

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL**  
**ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA - ESENFAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS -PPGCF**



**MIGUEL ÂNGELO SANTOS PINHEIRO SEGUNDO**

**Planejamento, Síntese e Avaliação Anti-*Trypanosoma cruzi* de Novos  
Derivados Aminoguanidina Hidrazonas**

**Maceió - AL**  
**2016**

**MIGUEL ÂNGELO SANTOS PINHEIRO SEGUNDO**

**Planejamento, Síntese e Avaliação Anti-*Trypanosoma cruzi* de Novos  
Derivados Aminoguanidina Hidrazonas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Escola de Enfermagem e Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Alves de Lima.

**Maceió - AL**

**2016**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

S456e Segundo, Miguel Ângelo Santos Pinheiro.  
Planejamento, síntese e avaliação anti-*trypanosoma cruzi* de novos derivados  
Aminoguanidina Hidrazonas / Miguel Ângelo Santos Pinheiro Segundo. – 2016.  
79f. : il.

Orientador: Thiago Mendonça de Aquino.  
Coorientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de  
Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. [53]-63.  
Anexos: f. 64-79.

1. Doença de Chagas. 2. Aminoguanidina hidrazonas. 3. Derivados indólicos. 4. *T. cruzi*. 5. Farmacologia. I. Título.

CDU: 615.3: 616.937

**Folha de Aprovação**

**MIGUEL ÂNGELO SANTOS PINHEIRO SEGUNDO**

**Planejamento, Síntese e Avaliação Anti-*Trypanosoma cruzi* de Novos Derivados Aminoguanidina Hidrazonas**

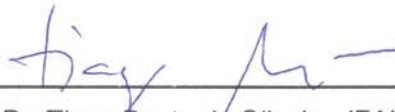
Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do grau de mestre.

Aprovado em: 30/03/2016.

**BANCA EXAMINADORA:**



\_\_\_\_\_  
(Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino, UFAL) (Orientador)



\_\_\_\_\_  
(Prof. Dr. Tiago Bento de Oliveira, IFAL) (Examinador Externo)

\_\_\_\_\_  
(Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior, UFAL) (Examinador Interno)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que sempre esteve lá de cima me iluminando em todas as horas de luta e dificuldade perante este trabalho.

Aos meus avós paternos e maternos (*in memorium*), que sempre fizeram de tudo para me dar a melhor educação.

Aos meus pais que sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha jornada acadêmica e profissional.

A minha irmã, meu braço direito, que sempre acreditou em mim e se fez presente em todos os momentos difíceis e de glória, e ao maior presente dado por ela, meu sobrinho.

Aos meus melhores amigos João Vasconcelos, Paulo Telles, Wilton Vieira, Eduardo Guimarães e Jofre Neto amigos de todas as horas, por todo apoio, paciência, compreensão e ajuda diária.

Ao Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino pelo compromisso na orientação desse trabalho.

Em especial à Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria do Carmo Alves de Lima pelo acolhimento no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) onde pude desenvolver a síntese desse trabalho.

Aos amigos e colegas do LQIT Jamerson Oliveira, César Amorim, Tiago Bento, Anekécia Lauro, Antônio Sérgio, Willams Leal, Elizabete Lafayette, Iris Trindade, Amélia, Keriolaine, Allana, Pedro, Paula, Edson, Luiz, Rodolfo, Bruno e Wanessa, pela parceria e execução das atividades relacionadas a obtenção das substâncias descritas nesse trabalho e pelas horas de descontração durante as atividades diárias do laboratório.

Ao Prof. Dr. Jorge Neves, do Departamento de Química Fundamental (DQF), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela disponibilidade e execução das técnicas espectroscópicas.

A Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Valéria Pereira, do Departamento de Imunologia (Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – FIOCRUZ / Pernambuco), pela grande ajuda, empenho e colaboração nos testes biológicos.

Não poderia deixar de agradecer a uma grande amiga querida que me ajudou no início da minha jornada como professor Cíntia Bezerra onde comecei a dar meus primeiros passos em sala de aula sob sua coordenação.

As minhas ex-coordenadoras Dr<sup>a</sup>. Maria Izabel e Norma Lins e aos primeiros colegas de profissão Paulo Falcão, Rosa Falcão, Thayze Padilha, Daniele Chianca, Adriana Souza e Aline Lopes por todo apoio e incentivo como professor na Autarquia de Ensino de Superior de Garanhuns (AESGA) grande escola de aprendizado profissional e pessoal.

As amigas Sarah Palácio, Katyane Rodrigues e Marcela Araújo que me incentivaram e apoiaram bastante no meu estágio em pesquisa científica, até o ingresso no mestrado.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Nereide Magalhães que me deu oportunidade de estágio em pesquisa científica no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Camila Braga por todo auxílio no processo seletivo na Universidade Federal de Alagoas (UFAL) desde o projeto até a apresentação e correção do mesmo.

Aos colegas de mestrado Edeildo, Tamires, Morgana, Cláudia, Ednaldo e muitos outros que fiz durante o mestrado.

Ao secretário do PPGCF-UFAL, Daniel Ricarte por todo suporte, paciência e compromisso com quem pude contar desde a minha inscrição até a conclusão desse trabalho.

A CAPES pelo suporte financeiro.

*As coisas nem sempre são como parecem, nossos medos podem nos enganar, nos fazendo temer, mudar de direção, com medo de seguir em frente. Mas, geralmente escondidas em nossos medos existem segundas chances na vida, na carreira, na glória, na família, no amor... E essas oportunidades não aparecem todos os dias. E quando aparecerem, temos que ser corajosos e aproveitar a chance enquanto podemos e queremos, para finalmente conseguirmos o que tanto almejamos na vida.*

## RESUMO

A doença de Chagas, uma infecção parasitária amplamente distribuída na América Latina, é um problema grave de saúde pública com consequências devastadoras em termos de morbidade e mortalidade humana. As alternativas terapêuticas existentes são limitadas e insuficientes devido principalmente à baixa eficácia e elevada toxicidade. Visando o planejamento de novos agentes antichagásicos, desenvolvemos, neste trabalho, a síntese de cinco novas substâncias, contendo os núcleos indol e aminoguanidina hidrazonas com potencial atividade anti-*T. cruzi* e sua avaliação biológica. Para a síntese das substâncias planejadas, partiu-se da *N*-feniltioureia através da reação de substituição com Mel, onde esta foi convertida no intermediário LQM-45, sintetizada via reação de *S*-alquilação. Este intermediário, por sua vez, através da reação de aminação com hidrazina resultou no LQM-44, o qual reagiu com cinco diferentes 3-indol-carboxaldeídos para obtenção das cinco novas substâncias com potencial atividade anti-*T. cruzi*, obtidas por reação de condensação. As substâncias finais foram sintetizadas com rendimentos entre 62 a 99%, e caracterizados por RMN  $^1\text{H}$ , onde foi possível observar a presença de singletos relativos aos sinais químicos dos hidrogênios ligados ao nitrogênio (NH), em uma faixa que variou entre 12.63 – 7.21 ppm. Além disso, foi também observado o sinal imínico característico (CH=N) na faixa de 8.44 – 8.54 ppm. Já nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , foi possível observar um sinal característico da ligação C=N na faixa de 152.4 – 153.2 ppm. A espectrometria de massas confirmou todas as substâncias sintetizadas através da averiguação do pico do íon molecular. Todas as substâncias foram submetidas à avaliação *in vitro* de suas atividades anti-*T. cruzi*, na forma epimastigota, além do ensaio de citotoxicidade em esplenócitos de camundongos. O LQM-31 apresentou melhor atividade frente a forma epimastigota ( $\text{CI}_{50} = 10,61 \mu\text{M}$ ) quando comparado as outras substâncias testadas. Por outro lado as substâncias apresentaram  $\text{CC}_{50}$  variando entre 4,37 – 5,62  $\mu\text{M}$  apresentando elevada citotoxicidade quando comparadas ao benznidazol. Diante dos resultados obtidos, serão realizadas novas modificações estruturais a partir da estrutura do LQM-31, modificando-se o anel ou grupo ligado à aminoguanidina, no intuito de se obter novos derivados aminoguanidínicos menos tóxicos e mais ativos frente ao parasito *T. cruzi*.

**Palavras chaves:** Doença de Chagas, aminoguanidina hidrazonas, derivados indólicos, *T. cruzi*.



## ABSTRACT

Chagas disease, a parasitic infection widespread in Latin America, is a serious public health problem with devastating consequences in terms of human morbidity and mortality. Existing treatment options are limited and insufficient mainly due to low efficacy and high toxicity. In order to plan new antichagasic agents, developed in this work the synthesis of five new substances containing the indole and aminoguanidine hydrazones with potential anti-*T. cruzi* activity and their biological evaluation. For the synthesis of scheduled substances departed from the *N*-phenyl-thiourea by substitution reaction with MeI, where it was converted to LQM-45 intermediate synthesized via *S*-alkylation reaction. This intermediate, in turn, through amination reaction with hydrazine resulted in LQM-44, which was reacted with five different indol-3-carboxaldehydes to obtain the five new substances with potential anti-*T. cruzi* activity, obtained by condensation reaction. The final compounds were synthesized in yields between 62 to 99%, and characterized by <sup>1</sup>H NMR, it was possible to observe the presence of singlets for the chemical signals of hydrogens attached to the nitrogen (NH), in a range varying between 12.63 - 7.21 ppm. Furthermore, it was also observed the characteristic signal imine (CH = N) in the range of 8.44 - 8.54 ppm. Already in the <sup>13</sup>C NMR spectra, we observed a characteristic sign of the C = N bond in the range of 152.4 - 153.2 ppm. Mass spectrometry confirmed all synthesized substances by investigating the molecular ion peak. All substances were subjected to in vitro assessment of their anti-*T. cruzi* activity epimastigote in shape in addition to cytotoxicity assay in splenocytes of mice. The LQM-31 showed better activity against epimastigote form (IC<sub>50</sub> = 10.61 μM) when compared to the other substances tested. On the other hand the substances showed CC<sub>50</sub> ranging from 4.37 to 5.62 μM showing high cytotoxicity when compared to benznidazole. Based on the results, will be carried out further structural changes from the structure of the LQM-31, changing the ring or group linked to aminoguanidine in order to obtain new less toxic aminoguanidínicos derivatives and most active against the parasite *T. cruzi*.

**Key words:** Chagas disease, aminoguanidine hydrazones, indole derivatives, *T. cruzi*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ar	Aromático
AcOEt	Acetato de Etila
BnZ	Benznidazol
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica para matar 50% de uma população
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva cinquenta por cento
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória cinquenta por cento
CYP	Citocromo P
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i> (iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas)
DNs	Doenças Negligenciadas
EMAR	Espectroscopia de Massas de Alta Resolução
FF	Faixa de fusão
Hex	Hexano
HI	Iodeto de hidrogênio (ácido iodrídico)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
Hz	<i>Hertz</i>
IS	Índice de seletividade
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LIT	<i>Liver Infusion Triptose</i> (meio de cultura para identificação da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> )
LV	<i>Leishmania Visceral</i>
Mel	Iodeto de metila
MGBG	Metil-glioxal-bis-guanilhidrazona
MHz	<i>MegaHertz</i>
mL	Mililitro
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometria de massas)
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sódio
NF <sub>x</sub>	Nifurtimox
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde

ppm	Partes por milhão
QSAR	<i>Quantitative structure-activity relationships</i> (Relação estrutura-atividade quantitativa)
R <sub>f</sub>	Razão de frente
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura)
SAR	<i>Structure-Activity Relationships</i> (Relação estrutura-atividade)
SFB	<i>Serum Fetal Bovine</i> (Soro Bovino Fetal)
sl	Singleto largo
TcCR	Cruzaína do <i>T. cruzi</i>
TcDHFR	Diidrofolato redutase do <i>T. cruzi</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
δ	Deslocamento químico
μL	Microlitro

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Principal vetor da doença de Chagas	21
<b>Figura 2</b>	Fases clínicas da Doença de Chagas	22
<b>Figura 3</b>	Fases evolutivas do <i>T. cruzi</i>	23
<b>Figura 4</b>	Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i>	24
<b>Figura 5</b>	Principais fármacos empregados na terapia anti- <i>T. cruzi</i>	25
<b>Figura 6</b>	Estruturas químicas dos fármacos posaconazol e ravuconazol	27
<b>Figura 7</b>	Estrutura cristalográfica da cruzaina de <i>T. cruzi</i>	28
<b>Figura 8</b>	Estrutura química do Trimetrexato	29
<b>Figura 9</b>	Estrutura química do 1-Metoxibrassinin	31
<b>Figura 10</b>	Estrutura química de derivado indólico	32
<b>Figura 11</b>	Estrutura química de derivado aminoguanidínico com atividade anti- <i>T. cruzi</i>	32
<b>Figura 12</b>	Estrutura química do 1,3,5-triacetilbenzeno tris(guanilhidrazona)	33
<b>Figura 13</b>	Estrutura química do 4-N-(2-metoxiestiril)-tiossemicarbazona	34
<b>Figura 14</b>	Estrutura química do <i>N</i> -(4-clorofenil)-2-((5-nitrofurano-2-il)metileno) hidrazina carboxamida	35
<b>Figura 15</b>	Estrutura química do 5-((5-bromo-1 <i>H</i> -indol-3-il) metileno)-3-(2,6-difluorobenzil) tiazolidina-2, 4-dione, melhor composto avaliado frente atividade antiparasitária.	51

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b>	Bioisosterismo de tiossemicarbazonas, semicarbazonas e aminoguanidina hidrazonas	35
<b>Esquema 2</b>	Rota sintética geral para obtenção de novos derivados aminoguanidina hidrazonas	39
<b>Esquema 3</b>	Mecanismo reacional envolvido na obtenção do LQM-45	43
<b>Esquema 4</b>	Mecanismo reacional envolvido na obtenção do LQM-44	44
<b>Esquema 5</b>	Mecanismo reacional envolvido na obtenção dos LQM's 29-32 e LQM-34	45

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Citotoxicidade das aminoguanidina hidrazonas testadas frente à 48  
esplenócitos de camundongos
- Tabela 2** Atividade *in vitro* das aminoguanidina hidrazonas sobre formas 49  
epimastigota de *T. cruzi*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>19</b>
2.1	Doenças Negligenciadas	19
2.2	Doença de Chagas	20
2.2.1	O parasito: <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
2.2.2	Transmissão e Patogenia	21
2.2.3	Formas evolutivas e ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
2.3	Quimioterapia	25
2.4	Alvos biológicos para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos	27
2.4.1	Cruzaína ( <i>TcCR</i> )	27
2.4.2	DNA topoisomerases I e II	28
2.4.3	Diidrofolato redutase ( <i>TcDHFR</i> )	29
2.4.4	Tripanotiona redutase ( <i>TcTR</i> )	29
2.5	Química Medicinal e a descoberta de novos fármacos	30
2.5.1	A importância do núcleo indol	31
2.5.2	Aminoguanidina hidrazonas	32
2.5.3	Bioisosterismo e a Hibridação Molecular	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
3.1	Objetivo Geral	37
3.2	Objetivos Específicos	37
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>38</b>
4.1	Parte Experimental – Estudo Químico	38
4.1.1	Cromatografias	38
4.1.2	Ponto de Fusão	38
4.1.3	Espectroscopias de Massas, RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C	38
4.1.4	Reagentes e Solventes	39
4.1.5	Equipamentos	39
4.2	Síntese	39
4.2.1	Procedimento para síntese do 2-metil-1-fenil-2-tio-pseudourea (LQM 45)	40
4.2.2	Procedimento para síntese do 1-amino-3-fenil-guanidina (LQM 44)	40

4.2.3	Procedimento de síntese para LQM 29-32 e LQM 34	40
4.3	Parte Experimental – Estudo Biológico	40
4.3.1	Equipamentos	41
4.3.2	Meios de cultura e Soluções	41
4.3.3	Animais	41
4.4	Metodologia	41
4.4.1	Obtenção das células esplênicas	41
4.4.2	Ensaio de citotoxicidade em esplenócitos em camundongos	42
4.4.3	Ensaio de viabilidade de epimastigotas in vitro do <i>T. cruzi</i>	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>43</b>
5.1	Estudo Químico	43
5.1.1	Síntese do 2-metil-1-fenil-2-tio-pseudoureia (LQM-45)	43
5.1.2	Síntese do 1-amino-3-fenil-guanidina (LQM-44)	43
5.1.3	Síntese das aminoguanida hidrazonas (LQM 29-32 e LQM-34)	44
5.2	Caracterização de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C e espectroscopia de massas	45
5.2.1	2-((1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -fenilhidrazinacarboximidamida (LQM-29)	45
5.2.2	2-((7-metil-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -fenilhidrazinacarboximidamida (LQM-30)	46
5.2.3	2-((5-bromo-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -fenilhidrazinacarboximidamida (LQM-31)	46
5.2.4	2-((5-ciano-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -fenilhidrazinacarboximidamida (LQM-32)	47
5.2.5	2-((1 <i>H</i> -benzo[ <i>f</i> ]indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -fenilhidrazinacarboximidamida (LQM-34)	47
5.3	Estudo Biológico	48
5.3.1	Ensaio de citotoxicidade em esplenócitos de camundongos	48
5.3.2	Ensaio de viabilidade de epimastigotas in vitro do <i>T. cruzi</i>	49
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>52</b>
	Referências	53
	Anexos	64



Anexo A	65
Espectro de RMN $^1\text{H}$ LQM-29	65
Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ LQM-29	66
Espectro de massas LQM-29	67
Anexo B	68
Espectro de RMN $^1\text{H}$ LQM-30	68
Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ LQM-30	69
Espectro de massas LQM-30	70
Anexo C	71
Espectro de RMN $^1\text{H}$ LQM-31	72
Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ LQM-31	72
Espectro de Massas LQM-31	73
Anexo D	74
Espectro de RMN $^1\text{H}$ LQM-32	74
Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ LQM-32	75
Espectro de Massas LQM-32	76
Anexo E	77
Espectro de RMN $^1\text{H}$ LQM-34	77
Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ LQM-34	78
Espectro de Massas LQM-34	79

## 1. INTRODUÇÃO

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

A maioria das infecções ocorre em áreas endêmicas por transmissão vetorial por meio da picada de insetos triatomíneos conhecidos como “barbeiros”. Atualmente vem sendo reportadas formas alternativas de transmissão desta doença, tais como transfusão de sangue, transplante de órgãos, transmissão vertical (mãe para filho), por ingestão de alimentos ou líquidos contaminados com o *T. cruzi* ou ainda acidentais, em laboratórios nos quais são manipulados parasitos vivos. (WHO, 2015; CROPTON, 2013; YANO, 2010).

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

Atualmente, não existem vacinas eficazes. A quimioprofilaxia não é ideal e a quimioterapia é inadequada. O desenvolvimento de resistência em algumas cepas do *T. cruzi* aos fármacos padrão-ouro, benznidazol e nifurtimox, constitui um importante problema de saúde pública (SERAFIM et al., 2014). Esses fármacos são produtores de metabólitos ativos que têm a capacidade de interagir com o DNA do hospedeiro e causar efeitos deletérios, incluindo câncer (KRYSHCHYSHYN et al., 2014; MORENO-RODRÍGUEZ et al., 2014; MERLINO et al., 2014).

O processo que envolve a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos vem crescendo notadamente nestes últimos anos, e existe uma grande necessidade do desenvolvimento de novas substâncias farmacologicamente ativas, que sejam eficazes contra diferentes patologias ainda sem tratamento, ou que possam substituir as existentes com custo reduzido e baixo efeito colateral (COLOMBO & PERRETO et al., 2008).

O núcleo indol representa uma das subunidades estruturais importantes para a

descoberta de novos fármacos. Alguns trabalhos na literatura relatam a atividade do anel indólico frente algumas doenças negligenciadas. Manda e colaboradores (2014) reportaram em seu trabalho uma série de novos derivados *N*-substituído-tetrahydro- $\beta$ -carbolinas que exibiram potencial atividade frente algumas espécies de *Leishmania* e *Trypanossoma*.

Aminoguanidina hidrazonas representam um grupo de compostos que, contém os grupos amidina (guanil) hidrazona. Entre o potencial biológico dessas moléculas, destacam-se as ações para doenças negligenciadas (DNs) tais como: malária, leishmaniose e doença de Chagas (MARTINS et al., 2004). Em relação à ação antitripanossomal desses compostos, existe grande interesse na pesquisa e no desenvolvimento de novos derivados de guanilhidrazonas, em função da facilidade de síntese e baixo custo de produção, o que é extremamente apropriado para uso em países pobres, como a África, por exemplo, onde além de existir milhares de pessoas infectadas com tripanossomas, há também graves efeitos em rebanhos bovinos (PAPADOPOULOU et al., 2014).

Neste sentido, em nosso trabalho a partir das técnicas de bioisosterismo e hibridação molecular foram desenhadas e sintetizadas cinco novas substâncias contendo em suas estruturas as funções indol e aminoguanidina hidrazonas no intuito de se obter novas moléculas com atividade antichagásica.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Doenças Negligenciadas

Doenças negligenciadas (DNs) como a malária, doença de Chagas, doença do sono ou tripanossomíase humana africana (THA), leishmaniose visceral (LV), filariose linfática, dengue e esquistossomose são um conjunto de doenças infecciosas diferenciadas pelo alto nível de morbidade, entretanto com baixo nível de mortalidade. São responsáveis por afetar intensamente a qualidade de vida e causar impactos socioeconômicos negativos para a população dos países mais pobres. (DNDi, 2015; WHO, 2015).

Atualmente, essas doenças configuram um grande problema de saúde pública mundial, quantificando um total de 1 bilhão de pessoas acometidas por algum tipo de infecção de origem bacteriana, viral ou parasitária (PAPADOPOULOU et al., 2014).

Programas de controle da transmissão vetorial e melhoria das habitações nas últimas décadas, foram voltados para eliminação e controle da doença de Chagas na América Latina. A Iniciativa do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), do Pacto Andino (Colômbia, Equador, Peru e Venezuela) e do Pacto da América Central (Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua e Panamá), junto com a triagem dos bancos de sangue reduziram substancialmente (70%) a incidência da infecção e diminuiu o número da doença de Chagas na América Latina (RASSI et al., 2010).

O Brasil ganhou em junho de 2006, a certificação referente a erradicação da transmissão da doença de Chagas pelo seu vetor principal (*Triatoma infestans*) e pela via transfusional, concedida pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), da Organização Mundial de Saúde (OMS). Porém, existem mais de 42 espécies de triatomíneos relacionados no Brasil, reforçando a necessidade de ações de vigilância (WHO, 2015).

Embora o financiamento exista para pesquisas relacionadas à essas enfermidades, o conhecimento produzido não se reverte em avanços terapêuticos, como, por exemplo, novos fármacos, métodos diagnósticos e vacinas. Uma das razões para esse quadro é o baixo interesse da indústria farmacêutica nesse tema, justificado pelo reduzido potencial de retorno lucrativo para a mesma, uma vez que a população atingida é de baixa renda e presente, em sua maioria, nos países em desenvolvimento (BRASIL, 2010).

## 2.2. Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma das 17 doenças tropicais negligenciadas listadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e considerada pela mesma como sendo a 13ª doença tropical mais negligenciada dentre todas as outras pertencentes a essa classificação (CABALLERO et al., 2014).

Estima-se que cerca de 100 milhões de pessoas estão vivendo em 21 países considerados endêmicos, destas 8 milhões estão infectadas e, ainda 41 mil novos casos são reportados todos os anos (SERAFIM et al., 2014). Por conseguinte, a doença de Chagas tem sido considerada a enfermidade tropical “mais preocupante” da atualidade (MOREIRA et al., 2014; SERAFIM et al., 2014; PAPADOPOULOU et al., 2014).

A mudança no perfil epidemiológico da doença de Chagas teve grande influência dos processos migratórios da população, que se deslocou das zonas rurais para zonas urbanizadas. Quando a prevalência da doença era rural, relacionava-se o alto índice de contaminação à utilização de casas de taipa como moradia, o que propiciava o alojamento e a procriação dos insetos vetores. Com a chegada de pessoas infectadas às cidades, houve um espalhamento do número de infectados e o risco de transmissão pelas vias menos frequentes como transfusão sanguínea. Processos migratórios internacionais, promovidos em especial pela globalização, levaram focos da doença para outros continentes. Deste modo, a doença de Chagas que era considerada um problema da América Latina, hoje se encontra em vários países, como Estados Unidos, Austrália, Espanha e Japão tornando-se um problema de saúde pública mundial (URBINA, 2010; COURA & BORGES-PEREIRA, 2012; WHO, 2015).

### 2.2.1 O parasito: *Trypanosoma cruzi*

O gênero *Trypanosoma* é dividido em dois importantes grupos: o primeiro grupo conhecido como *Stercoraria* e o segundo grupo chamado de *Salivaria*. O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) se enquadra no grupo *Stercoraria*, por seus tripanossomos se desenvolverem no tubo digestivo do inseto vetor e serem liberados por suas fezes (FIOCRUZ, 2015).

O *T. cruzi* é um parasito da ordem dos Kinetoplastida, pertencente à família Trypanosomatidae. Essa família compreende vários gêneros importantes, porém o mais importante é o gênero *Trypanosoma*, causador de diversas doenças humanas, entre elas a doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e a doença do sono (*Trypanosoma rhodesiense* e *Trypanosoma gambiense*) (FIOCRUZ, 2015).

### 2.2.2 Transmissão e Patogenia

A principal via de transmissão da doença de Chagas é a vetorial, que ocorre pela picada de insetos triatomíneos hematófagos, conhecidos como “barbeiros” (*Triatoma infestans*) (Figura 1). Esses insetos, durante a picada, depositam no local fezes contaminadas com formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*; a penetração dessas formas parasitárias causa infecção no indivíduo picado (FIOCRUZ, 2015; WHO, 2015).

**Figura 1. Visualização do inseto pertencente à classe dos triatomíneos hematófagos (barbeiro), principal vetor da doença de Chagas.**



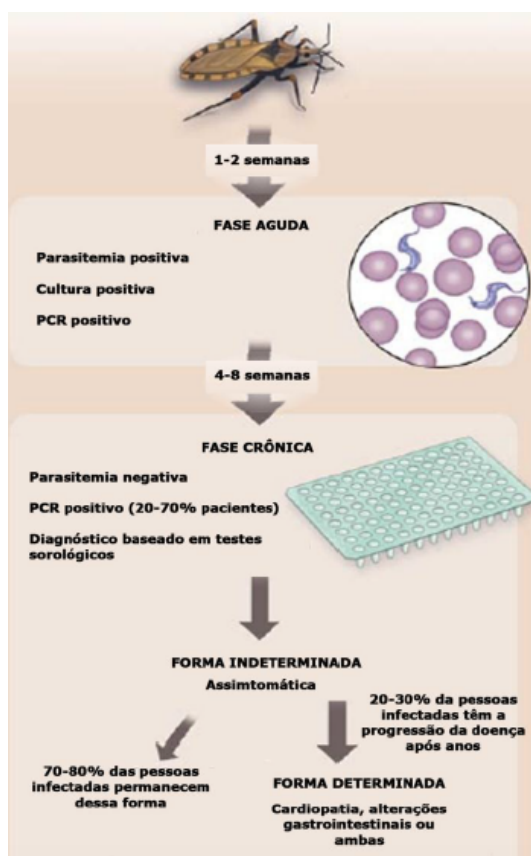
FONTE: PINHEIRO, 2012.

Outras formas não convencionais de infecção também podem ser encontradas tais como: transfusão sanguínea, transplacentária, transplante de órgãos, acidente de laboratório. Mais recentemente, a transmissão oral, através da ingestão de alimentos contaminados com excretas dos triatomíneos, passou a ocupar um importante papel na disseminação da doença, visto que, foi responsável por surtos de infecção aguda em áreas desprovidas de insetos vetores domiciliados. Esta via de infecção resulta em um quadro clínico agudo grave associado à uma infecção parasitária maciça com altas taxas de mortalidade (PEREIRA et al., 2009; CEVALLOS e HERNANDEZ, 2014).

A doença de Chagas apresenta duas fases bem caracterizadas e distintas: uma fase aguda e uma crônica. A fase aguda se inicia logo após a infecção podendo durar de 4 a 8 semanas, e é caracterizada por uma alta parasitemia e pela presença de infiltrados inflamatórios em diversos tecidos. Geralmente é assintomática ou pode apresentar sintomas menos específicos tais como febre e edema no local da inoculação (chagoma de inoculação ou sinal de Romaña). A mortalidade nesta fase ocorre ocasionalmente (<5-10% dos casos sintomáticos) como resultado de uma miocardite ou meningoencefalite grave (BERN, 2011).

Estudos mostram que 60 a 70% dos pacientes não desenvolvem clinicamente a doença, caracterizando a forma indeterminada da doença de Chagas, a qual apresenta positividade para exames sorológicos com exames radiológicos e eletrocardiograma normais. Na ausência de um tratamento específico, 30 a 40% dos pacientes desenvolvem a fase crônica determinada, que é caracterizada por lesões irreversíveis em alguns órgãos tais como o coração, esôfago e cólon (BERN, 2011).

**Figura 2. Fases clínicas da Doença de Chagas.**

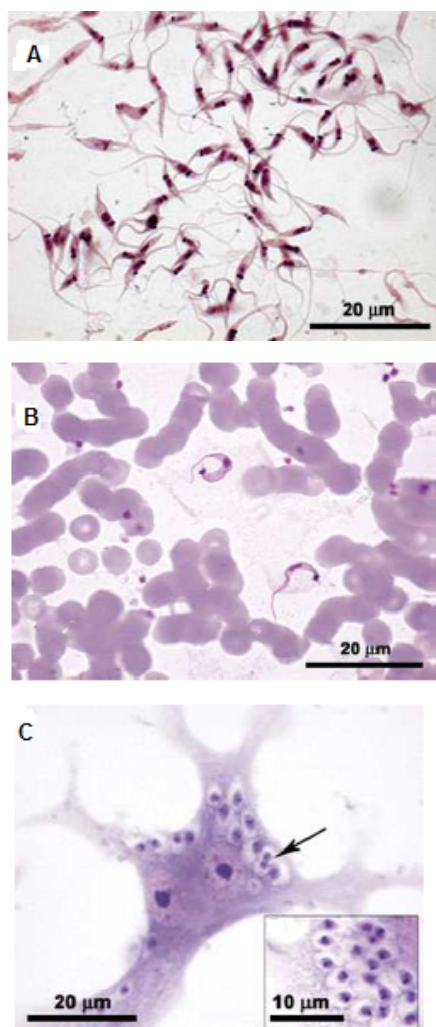


FONTE: BERN, 2011.

### 2.2.3 Formas evolutivas e ciclo biológico do *Trypanossoma cruzi*

As formas evolutivas do *T. cruzi* são: epimastigota (encontrada no tubo digestivo do vetor) (Figura 3A), tripomastigota (encontrada no vetor, sangue e espaço intercelular do hospedeiro vertebrado) (Figura 3B) e amastigota (encontrada no interior de células do hospedeiro vertebrado) (Figura 3C) definidas com base na forma geral da célula (esférica, piriforme e alongada), na posição relativa entre o núcleo e o cinetoplasto (anterior, lateral e posterior) e na maneira da saída do flagelo da bolsa flagelar (central ou lateral) (RASSI, 2010; KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2014).

**Figura 3. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi***

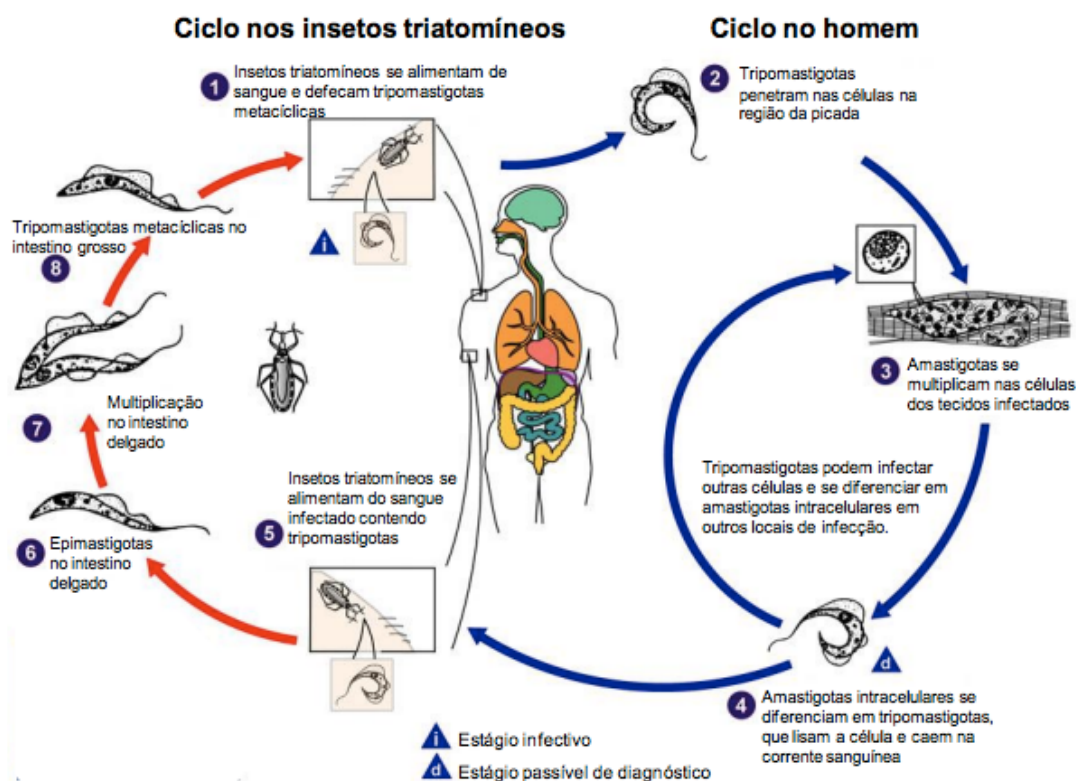


FONTE: RASSI *et al.*, 2010 (EDITADO). Formas evolutivas do *T. cruzi* em (A) Epimastigotas, em (B) Tripomastigotas e em (C) Amastigotas.



O ciclo biológico do *T. cruzi* é bastante complexo e envolve a passagem obrigatória por hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (insetos triatomíneos hematófagos). No inseto, o ciclo (Figura 4) tem início, quando durante o seu repasto sanguíneo ele ingere formas tripomastigotas sanguíneas. No estômago, estas formas se diferenciam em epimastigotas e se proliferam por divisão binária no lúmen intestinal. Na porção terminal do intestino, essas formas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, as quais serão eliminadas nas fezes do inseto durante seu repasto sanguíneo no mamífero. Já no hospedeiro vertebrado, as formas metacíclicas penetram em macrófagos e em células de tecido, escapam do vacúolo fagolisossomal e se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária no citoplasma da célula hospedeira. Depois de alguns ciclos de multiplicação, as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas, que serão liberadas pela ruptura da célula hospedeira, podendo então invadir novas células ou tecidos ou então serem ingeridas pelo inseto, completando assim o ciclo de vida do parasita (RASSI, 2010; KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2014).

**Figura 4 – Ciclo biológico do *Trypanossoma cruzi*.**



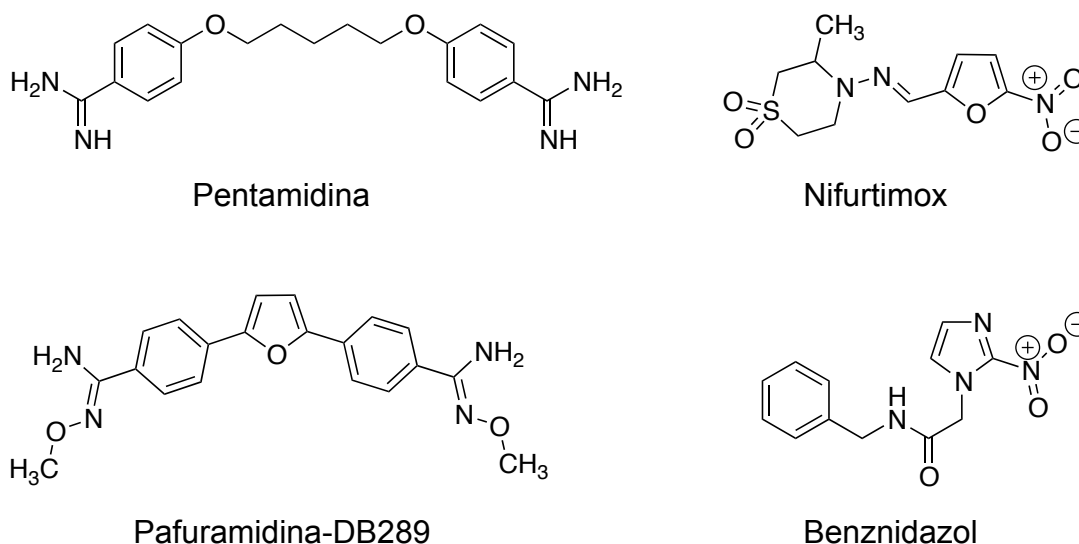
FONTE: PINHEIRO, 2012 (EDITADO).

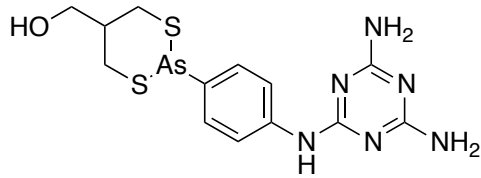
## 2.3 Quimioterapia

Embora as doenças tropicais e a tuberculose sejam responsáveis por 11,4% da carga global de doenças, apenas 21 (1,3%) dos 1.556 novos medicamentos registrados entre 1975 e 2004, foram desenvolvidos especificamente para essas doenças. Durante o mesmo período, 1.535 medicamentos foram registrados para outras doenças (DNDi, 2015). Fica mais evidente que o número de medicamentos para as doenças causadas por protozoários é insuficiente quando comparamos com a quimioterapia anti-HIV. Em 2011, estimativas apontavam para 35 milhões de pacientes infectados com o HIV, cujo arsenal terapêutico anti-HIV compreendia 33 medicamentos aprovados para uso clínico (BOONE & KOSZALKA, 2010; MENDONÇA-JÚNIOR & AQUINO 2015,).

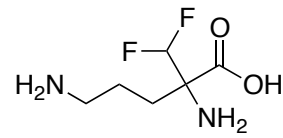
Atualmente, o desenvolvimento de resistência em algumas cepas do *T. cruzi* aos fármacos padrão-ouro, nifurtimox e benznidazol, constitui um importante problema de saúde pública (SERAFIM et al., 2014). Esses fármacos são produtores de metabólitos ativos que têm a capacidade de interagir com o DNA do hospedeiro e causar efeitos deletérios, incluindo câncer (KRYSHCHYSHYN et al., 2014; MORENO-RODRÍGUEZ et al., 2014; MERLINO et al., 2014). A Figura 5 ilustra os principais fármacos utilizados na terapia antitripanossomal (KRYSHCHYSHYN et al., 2014).

**Figura 5. Principais fármacos empregados na terapia anti-*T. cruzi*.**





Melarsoprol



Eflermitina

FONTE: KRYSHCHYSHYN et al., 2014 (EDITADO).

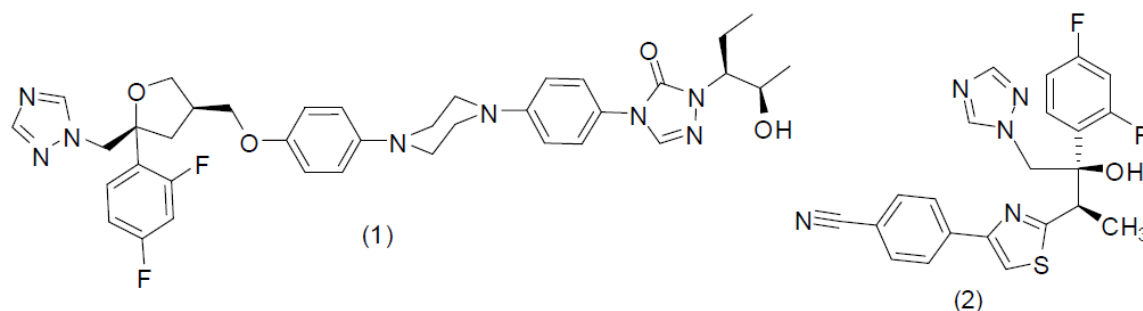
Benznidazol (BnZ) – *Rochagan*® e Nifurtimox (NFx) – *Lampit*® (Figura 5), atuam aumentando as espécies radiculares (principalmente, ânion superóxido  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ ), produzindo metabólitos eletrofilicos, bem como, aumentando o consumo de oxigênio pelo parasito. Porém, no caso do BnZ, este é capaz de gerar metabólitos que interagem com o DNA do hospedeiro, causando severos efeitos adversos, dificultando a adesão do paciente ao tratamento (KRYSHCHYSHYN et al., 2014; MORENO-RODRÍGUEZ et al., 2014; MERLINO et al., 2014).

BnZ e NFx não são eficazes em acabar com a carga parasitária do hospedeiro, já que cerca de 80% dos pacientes em estágio crônico, tratados com tais fármacos, não atingem a cura completa (SERAFIM et al., 2014; OH et al., 2014). De acordo com Moreira e colaboradores (2014), existe uma tendência em associar fármacos na terapia clínica de pacientes portadores da doença de Chagas, com a finalidade de evitar o surgimento de cepas resistentes de *T. cruzi*.

Posaconazol (**1**) e ravuconazol (**2**) (Figura 6), são alguns dos novos candidatos a fármacos que têm apresentado um bom espectro de ação antichagásico, tendo como alvo a via da biossíntese do ergosterol, porém ainda estão em fase de testes clínicos (CARDOSO et al., 2014).

O posaconazol tem como alvo a enzima esterol-14 $\alpha$ -desmetilase (CYP51), porém o mecanismo de ação desse fármaco não está totalmente elucidado. Em adição, esse fármaco falhou na eliminação do parasito em ensaios experimentais em primatas. Ademais, inibidores do CYP51 são capazes de inibir outras enzimas importantes para o metabolismo de outros fármacos como, por exemplo, a via do CYP3A4 (PAPADOPOULOU et al., 2014).

**Figura 6. Estruturas químicas dos fármacos posaconazol (1) e ravuconazol (2), os quais encontram-se em fase clínica de desenvolvimento.**



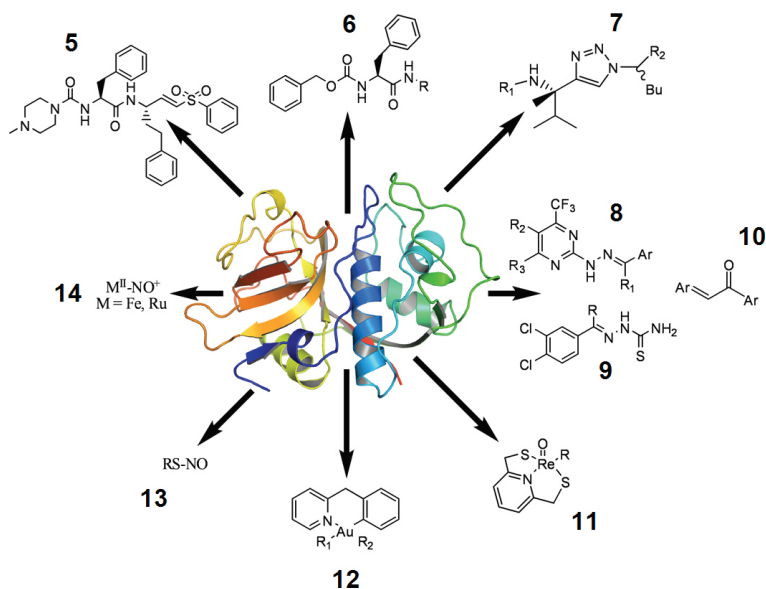
## 2.4 Alvos biológicos para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos

### 2.4.1 Cruzaína (TcCR)

A Cruzaína (TcCR), a maior cisteína protease tripanossomal, está envolvida nos processos de invasão, diferenciação e proliferação do parasito nas células do hospedeiro (MOREIRA et al., 2014; SERAFIM et al., 2014; CARDOSO et al., 2014). De acordo com CAPUTTO e colaboradores (2011) esta enzima é expressa em todos os estágios de desenvolvimento do parasito, sendo ainda responsável por produzir substâncias pro-inflamatórias que exercem importantes papéis nas manifestações clínicas, citadas anteriormente (KRYSHCHYSHYN et al., 2014). Em adição, a cruzaína também é responsável por degradar as proteínas celulares do hospedeiro e contribuir com retorno da infecção (MOREIRA et al., 2014).

As principais classes de inibidores desta enzima incluem (Figura 7): (a) derivados peptídicos (**5** e **6**) (DUSCHAK et al; 2007) ; (b) derivados não-peptídicos (triazóis **7**, pirimidinas **8**, tiossemicarbazonas **9** e chalconas **10**) (MOREIRA et al., 2014; SOEIRO et al., 2009; McKERROW et al., 2008); (c) complexos de rênio e ouro (oxorênios **11** e ciclometalados de ouro **12**); e (d) doadores de óxido nítrico (nitrosotióis **13** e nitrosilo complexos de ferro e rutênio **14**) (SILVA et al., 2007). Os derivados peptídicos constituem a classe mais importante de inibidores da cruzaína, especialmente o dipeptidil vinil sulfônico N-metil-Pip-F-hF-VSØ (**5**) (BRAK et al., 2008). Este inibidor, além de alta seletividade, também exibiu potente atividade *in vitro* e *in vivo*, inclusive em modelos imunossuprimidos de infecção experimental aguda de doença de Chagas.

**Figura 7. Estrutura cristalográfica da cruzaina de *T. cruzi* e principais fármacos inibidores.**



FONTE: DIAS et al., 2009. Inibidores da enzima alvo de diferentes classes químicas (5-14).

#### 2.4.2 DNA topoisomerasas I e II

Essas enzimas têm atraído grande atenção da comunidade científica, pois desempenham papel essencial na replicação do DNA do *T. cruzi* e, em particular, no processo de replicação da cadeia de minicírculos e maxicírculos do DNA do kinetoplasto (kDNA). O planejamento de inibidores destas isomerasas representou grande sucesso no desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos citotóxicos (DIAS et al., 2009).

Existem alguns fármacos antineoplásicos disponíveis comercialmente que atuam nesses alvos, tais como os inibidores da topoisomerase I, irinotecano (Camptosar®, da Pfizer) e topotecana (Hycamtin®, da GlaxoSmithKline); e os inibidores da topoisomerase II, etoposida e teniposida (Vepesid® e Vumon®, respectivamente, da Bristol-Myers Squibb). As antraciclina, camptotecinas, acridinas e fluoroquinolonas formam classes de inibidores bem conhecidas, as quais apresentaram bons resultados contra formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*. Diversos estudos têm demonstrado que as acridinas atuam como boas candidatas a inibidores, isso ocorre porque elas ligam-se ao DNA devido a sua capacidade de

intercalação (DIAS et al., 2009).

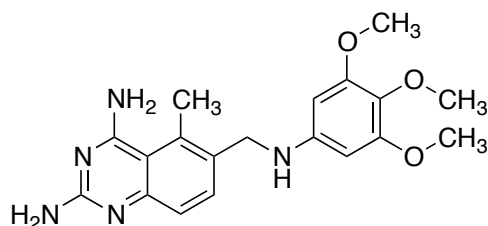
#### 2.4.3 Diidrofolato redutase (*TcDHFR*)

A enzima diidrofolato redutase (DHFR) do *T. cruzi* (*TcDHFR*) é extremamente essencial ao parasito, e representa um alvo potencial para o planejamento racional de novos fármacos anti-*T. cruzi*. De modo geral, todos os organismos necessitam de folato. Formas reduzidas de folato e seus derivados são necessários para a síntese de biomoléculas, tais como proteínas, DNA e RNA (SCHORMANN et al., 2010; KRYSHCHYSHYN et al., 2014).

Em geral, a ação de fármacos sobre essa enzima encontra-se relacionada à quimioterapia antineoplásica. Porém, a maioria dos inibidores da DHFR é utilizada no tratamento de infecções bacterianas e outros parasitos (SCHORMANN et al., 2010).

De acordo com Schormann e colaboradores (2010) o fármaco mais efetivo como inibidor da DHFR conhecido na literatura é o trimetrexato (TMQ) (Figura 8). Esse fármaco é extremamente eficaz na inibição do crescimento das formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, *in vitro*.

**Figura 8. Estrutura do Trimetrexato, fármaco mais efetivo como inibidor da DHFR.**



#### 2.4.4 Tripanotiona redutase (*TcTR*)

A tripanotiona redutase (*TcTR*) é um importante alvo para fármacos em tripanossomatídeos. Essa enzima, dependente de NADPH, catalisa a redução da tripanotiona dissulfida ditiol em tripanotiona, desencadeando uma cascata de eventos responsáveis pela neutralização de espécies reativas de oxigênio. Dessa forma, esta enzima está relacionada com a capacidade de sobrevivência do parasito a fármacos geradores de espécies radicalares (RODRIGUES et al., 2012; KUMAR et al., 2014).

Segundo Rodrigues e colaboradores (2012) o principal benefício de utilizar essa enzima como alvo para planejamento de fármacos é que a mesma apresenta uma morfologia muito diferente da enzima equivalente em humanos, a glutatona redutase. Desse modo, é mais provável a ação desses fármacos sobre a TcTR sem que haja interferências sobre a glutatona redutase do hospedeiro.

## **2.5 Química Medicinal e a descoberta de novos fármacos**

A química medicinal compreende a síntese ou isolamento de compostos com atividade biológica, elucidação ou confirmação da estrutura, a caracterização das propriedades físico-químicas, a determinação da atividade biológica, a exploração desta atividade em nível molecular e o estudo das relações entre estrutura química e a atividade biológica, SAR/QSAR (MONTANARI, 2011).

Ela é definida como uma ciência que se dedica a estudar as razões moleculares da ação dos fármacos, a relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica, incluindo o planejamento e o desenho estrutural de novas substâncias. Esta tarefa envolve uma multiplicidade de fatores responsáveis pela resposta terapêutica de um fármaco que precisa apresentar elevada eficácia e possuir efeitos tóxicos reduzidos (BARREIRO, 2009).

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

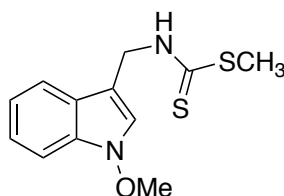
A química medicinal permite a utilização de estratégias que conduzem ao desenho molecular de candidatos a novos fármacos. Estas estratégias são fundamentais na etapa de modificação molecular necessária à sua otimização. Dentre essas estratégias destacam-se o bioisosterismo e a hibridação molecular (BARREIRO, 2009).

### 2.5.1 A importância do núcleo indol

O anel indol representa uma das subunidades estruturais importantes para a descoberta de novos fármacos. Indóis são conhecidos por suas atividades biológicas dentre elas para doenças negligenciadas tais como como anti-*Trypanosoma cruzi*, (MEZENCEV et. al., 2009), anti-*Leishmania* (SHARMA et. al., 2013) e anti-*Plasmodium* (SANTOS et. al., 2015).

Mezencev e colaboradores (2009) relatam o efeito tripanomicida de 1-metoxiespirobrassinol e outros fitoalexinas-indol, metabólitos secundários produzidos pelas plantas crucíferos. Estes compostos, que demonstraram anteriormente atividade antimicrobiana e propriedades anticancerígenas, tem apresentado efeitos antiproliferativos significativos sobre amastigotas do *T. cruzi* intracelular e podem ser potenciais candidatos para a concepção e desenvolvimento de medicamentos e antichagásicos. O 1-Metoxibrassinin (Figura 9) exibiu uma potência mais elevada do que os agentes antichagásicos nifurtimox, benznidazol, e o conhecido agente antiparasitário 4-fenoxifenoxietil tiocianato (CINQUE et al., 1998), cujos valores de  $CI_{50}$  sob semelhantes condições experimentais são 2,8, 3,7 e 12  $\mu$ M, respectivamente (SZAJNMAN et al., 2008).

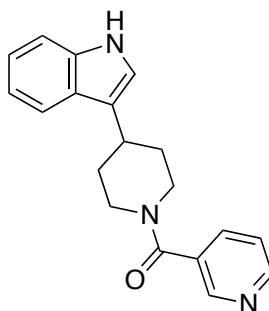
**Figura 9. Estrutura do 1-Metoxibrassinin, derivado indólico potente agente antiparasitário.**



Santos e colaboradores (2015) sintetizaram uma série de 3-piperidina-4-il-1H-indol, a qual foi ativa frente o *Plasmodium falciparum*. A relação estrutura-atividade (SAR) mostrou um novo composto o (4-(1H-indol-3-il)piperidina-1-il)(piridina-3-il) metanona (Figura 10), com atividade antimalárica contra fármaco-resistentes e sensíveis (valores  $CE_{50} \sim 3 \mu$ M), seletividade para parasita da malária e a resistência cruzada com cloroquina, representando, assim, um novo potencial quimioterápico para maior otimização no sentido de novos antimaláricos acessíveis.



**Figura 10. Estrutura química de derivado indólico ativo frente ao *Plasmodium falciparum* (CE<sub>50</sub> ~ 3 µM)**



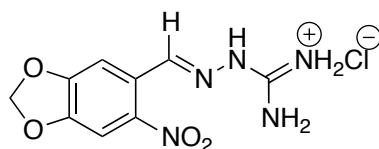
### 2.5.2 Aminoguanidina Hidrazonas

Aminoguanidina hidrazonas representam um grupo de compostos que, contém os grupos amidina (guanil) hidrazona. Na química, são utilizados como intermediários na construção de compostos heterociclos polifuncionais contendo átomos de nitrogênio (GOSSNITZER et al., 2002).

A principal característica estrutural, mostrada pelas guanilhidrazonas, é o terminal catiônico. Essa parte da estrutura pode ter grande importância nas propriedades antimicrobianas apresentadas por esses compostos. Algumas guanilhidrazonas foram estudadas e apresentaram valores de DI<sub>50</sub> (Dose inibitória de 50% dos parasitos circulantes no sangue testado) muito superiores ao metil-glioxal-bis-guanilhidrazona (MGBG) e o cristal violeta ou violeta genciana, que é empregado em bancos de sangue na quimioprofilaxia de sangue contaminado (MESSEDER, 1995).

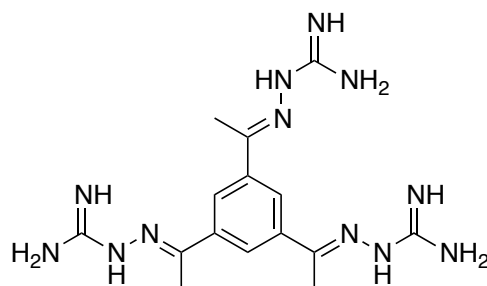
Messeder e colaboradores (1995) sintetizaram uma série de guanilhidrazonas aromáticas, preparadas por condensação de vários aldeídos com cloridrato de aminoguanidina, e testado *in vitro* contra a forma tripomastigota de *T. cruzi*. A maior parte dos compostos, especialmente os que não têm grupos de ligação de hidrogênio e possuindo orto-substituição, foram significativamente mais ativos do que violeta genciana (DI<sub>50</sub> = 536 µM). O composto mais ativo (Figura 11) teve um valor de DI<sub>50</sub> = 17 µM (25 vezes mais potente do que a violeta genciana).

**Figura 11. Estrutura química de derivado aminoguanidínico com atividade anti-*T. cruzi* (DI<sub>50</sub> = 17 µM).**



Ulrich e Cerami (1984) se basearam na atividade antitripanossomal de 1,3-diacetilbenzeno bis(guanilhidrazona) e 2,6-diacetilpiridina bis(guanilhidrazona), e uma série de heterocíclicos substituídos de 1,3-dicetona arileno bis(guanilhidrazona) foram preparadas e testadas contra as infecções por *Trypanosoma brucei* em ratos. Foi reportado que o composto 1,3,5-triacetilbenzeno tris(guanilhidrazona) (Figura 12) foi cerca de 9 vezes mais ativo que o derivado 1,3-diacetilbenzeno bis(guanilhidrazona) ratificando assim a importância do grupo guanilhidrazona nesta série de compostos.

**Figura 12. Estrutura química do 1,3,5-triacetilbenzeno tris(guanilhidrazona), derivado ativo contra infecção por *T. brucei* em ratos.**



### 2.5.3 Bioisosterismo e a Hibridação Molecular

O termo bioisosterismo foi introduzido por Friedman em 1951 para designar moléculas que além das suas semelhanças físicas e químicas, compartilham algumas propriedades biológicas (PÉREZ, 2004).

Bioisósteros são compostos resultantes da substituição de átomos ou grupo de átomos por outros semelhantes quimicamente. Essa substituição bioisostérica produz um novo composto, estruturalmente similar ao original, mas que poderá produzir efeitos biológicos diferentes, sendo possível prever esses efeitos a partir de propriedades físico-químicas adquiridas com a substituição (BARREIRO & FRAGA, 2002; KIER & HALL, 2004).

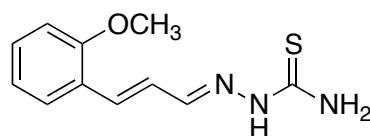
O bioisosterismo é uma ferramenta importante na obtenção de fármacos mais

ativos e com menores efeitos adversos. A estrutura química e mecanismo de ação devem ser bem conhecidos, se possível a nível da interação com o receptor topográfico, incluindo o conhecimento de todos os seus grupos farmacofóricos. Além disso, as vias de inativação metabólica, bem como os principais fatores estruturais determinantes das propriedades físico-químicas que regulam a biodisponibilidade e os efeitos colaterais devem ser conhecidos a fim de permitir uma previsão ampla da relação bioisotérica a ser utilizada (MOREIRA, 2005).

Neste trabalho, as moléculas sintetizadas foram planejadas a partir das estruturas de tiossemicarbazonas e semicarbazonas com atividade antiparasitária, descritos nos próximos parágrafos, utilizando-se desta estratégia de bioisosterismo.

No trabalho de Soares e colaboradores (2011), cinco derivados de tiossemicarbazonas e semicarbazonas foram avaliadas *in vitro* contra cultura de tripomastigotas do *T. cruzi*. Entre os compostos investigados, o composto 4-N-(2-metoxiestiril)-tiossemicarbazona (Figura 13) foi o mais eficiente com um DL<sub>50</sub>/ 24 h valor de 0,4 µM, enquanto que Benznidazol mostrou uma menor atividade do que os compostos em teste (1,8 µM).

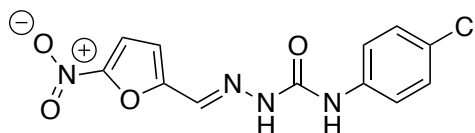
**Figura 13. Estrutura química do 4-N-(2-metoxiestiril)-tiossemicarbazona, derivado ativo frente as formas tripomastigotas de *T. cruzi*.**



Alves e colaboradores (2015) sintetizaram duas séries de novos derivados semicarbazonas onde o composto *N*-(4-clorofenil)-2-((5-nitrofurano-2-il)metileno)hidrazina carboxamida (Figura 14) se destacou mostrando dupla atividade, leishmanicida e tripanomicida. Para a atividade anti-*T. cruzi* o composto em destaque obteve Cl<sub>50</sub> = 1.9 µM enquanto o Nifurtimox que foi utilizado como fármaco padrão mostrou Cl<sub>50</sub> = 7.7 µM. Já para a atividade leishmanicida para inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. major* foram investigadas, utilizando pentamidina como padrão. Os compostos com valores de Cl<sub>50</sub> < 100 µM foram selecionados para o estudo da sua atividade citotóxica contra amastigotas de *L. Major* onde o composto em destaque apresentou Cl<sub>50</sub> = 1.5 µM enquanto a pentamidina apresentou Cl<sub>50</sub> = 17.1

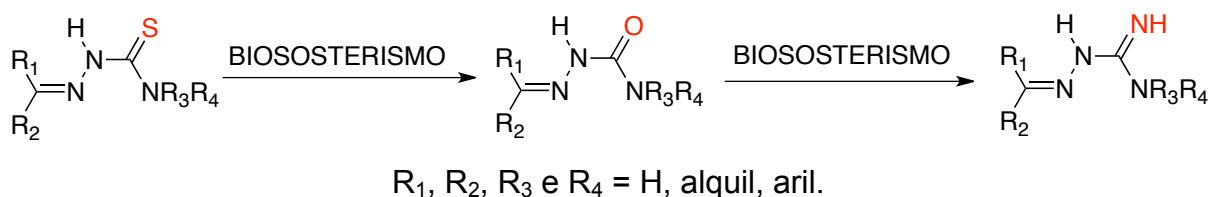
μM.

**Figura 14. Estrutura química do *N*-(4-clorofenil)-2-((5-nitrofurano-2-il)metileno) hidrazina carboxamida, semicarbazona ativa frente formas amastigotas de *L. major*.**



Como descrito anteriormente, na estratégia de bioisosterismo, onde a partir a partir das tiossemicarbazonas e semicarbazonas, os átomos de enxofre (S) e oxigênio (O) foram substituídos pelo grupo NH das aminoguanidina hidrazonas ou guanilhidrazonas (Esquema 1).

**Esquema 1.** Bioisosterismo de tiossemicarbazonas, semicarbazonas e aminoguanidina hidrazonas



Também foi utilizado neste trabalho a hibridação molecular, que consiste em uma estratégia de modificação molecular baseada no reconhecimento das subunidades farmacofóricas na composição estrutural de dois ou mais produtos bioativos. A fusão dessas subunidades conduz a concepção de um novo híbrido mantendo as características das moléculas originais pré-selecionadas (ADDLA et al., 2012). Além disso, esta estratégia pode resultar em compostos apresentando perfil de seletividade modificado, e/ou dois modos diferentes de ação e efeitos colaterais indesejáveis reduzidos (VIEGAS-JUNIOR, 2007). Como descrito anteriormente diversas moléculas contendo o núcleo indólico apresentam propriedades para DNs como leishmaniose (SHARMA et al., 2013), malária (SANTOS et al., 2015), doença de Chagas (MEZENECV et al., 2009), entre outras.

Diante das evidências que apontam a versatilidade química e biológica das aminoguanidina hidrazonas através do bioisosterismo e da hibridação molecular como princípios no planejamento de fármacos, propomos neste trabalho sintetizar cinco novas substâncias contendo em suas estruturas ambas as funções indol e aminoguanidina hidrazonas no intuito de se obter uma alternativa terapêutica para doença de Chagas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Síntese de novos derivados aminoguanidina hidrazonas, contendo em suas estruturas o núcleo indol substituído e avaliação da citotoxicidade e atividade antiparasitária frente a forma epimastigota de *T. cruzi*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Sintetizar os novos derivados aminoguanidina hidrazonas;
- ✓ Elucidar as estruturas químicas através das análises espectroscópicas: ressonância magnética nuclear de hidrogênio, carbono treze e espectroscopia de massas.
- ✓ Avaliar a atividade anti-*T.cruzi* dos derivados sintetizados sobre a forma epimastigota de *T. cruzi*;
- ✓ Analisar a citotoxicidade dos derivados sintetizados através da técnica de incorporação de timidina tritiada sobre esplenócitos de camundongos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Estudo Químico

#### 4.1.1 Cromatografias

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram conduzidas em placas de Sílica Gel 60 F<sub>254</sub> da MERCK de 0,25 mm de espessura. A leitura das mesmas foi realizada através de radiação de ultravioleta (UV) no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 254 nm.

#### 4.1.2 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão foram determinados utilizando equipamento MSTecnopon®, modelo PFMII Digital, em tubos capilares contendo cada uma das amostras individualmente.

#### 4.1.3 Espectroscopias de Massas, RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C

A espectrometria de massas foi realizada no aparelho MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). A elucidação estrutural das novas substâncias sintetizados foi realizada através da ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono treze (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C), utilizando-se o espectrofotômetro Varian Modelo Plus 400 MHz, no Departamento de Química Fundamental (DQF) na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As multiplicidades dos sinais foram indicadas pelas seguintes abreviações: simpleto (s), simpleto largo (sl), dubleto (d), tripleto (t), multipletto (m). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm e os acoplamentos em Hz.

Para cada substância foi utilizada uma massa de 15 mg e 500  $\mu$ L do solvente DMSO-*d*<sub>6</sub> a uma temperatura de 26° C com tempo de aquisição para o RMN <sup>1</sup>H de 2,5559 segundos e 16 *scans*. Já para o RMN <sup>13</sup>C, foram utilizadas a mesma quantidade de substância, solvente e temperatura. O tempo de aquisição foi de 1,3107 segundos e 256 *scans*.

#### 4.1.4 Reagentes e Solventes

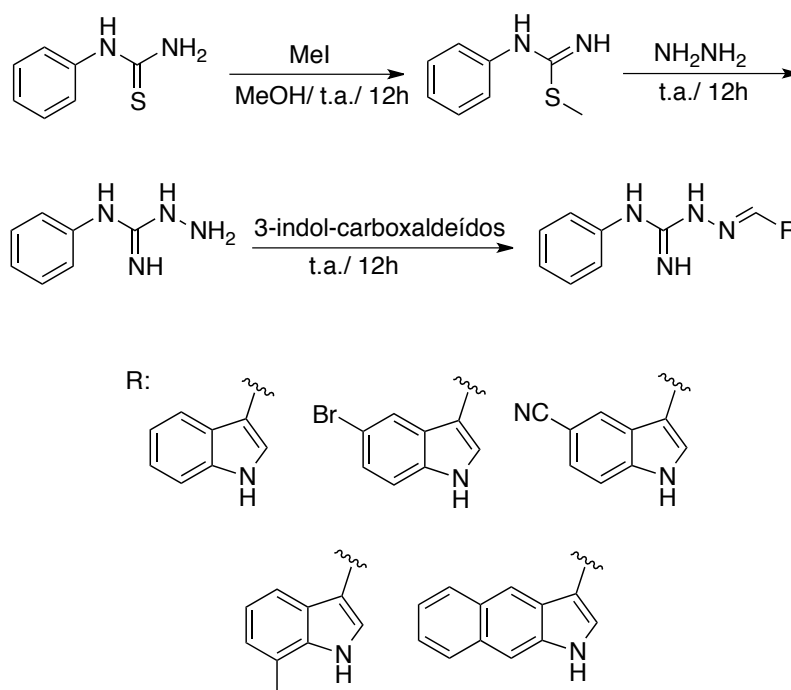
Os reagentes e solventes utilizados para síntese foram 1*H*-indol-3-carbaldeído, 2,3-diidro-1*H*-benzo[*f*]indol-3-carbaldeído, 3-formil-1*H*-indol-5-carbonitrila, 5-bromo-1*H*-indol-3-carbaldeído, 7-metil-1*H*-indol-3-carbaldeído, Acetato de etila, Ácido acético, Clorofórmio absoluto, Dimetil sulfóxido deuterado, Etanol absoluto, Hexano, Metanol. Todos fornecidos pela Sigma-Aldrich, Fluka e Merck.

#### 4.1.5 Equipamentos

Bomba de alto vácuo (Marca: Fabbe-Primmar, Modelo: 56-RC6264); Estufa (Marca: MedClave, Modelo: 0/1/2/3); Evaporador rotativo (Marca: Ika, Modelo: RV10 basic, IKA); Placas de agitação e aquecimento (Marca: Fisatom, Modelo: 752A); Vidrarias apropriadas; Capela com exaustão; Balança semi-analítica; Balança analítica (4 casas decimais) (Marca: Fade, Modelo: FA2104N) e Freezer.

#### 4.2 Síntese

##### Esquema 2 – Rota sintética geral para obtenção de novos derivados aminoguanidina hidrazonas





#### **4.2.1 Procedimento para síntese do 2-metil-1-fenil-2-tio-pseudoureia (LQM-45)**

Em um balão foram adicionados *N*-fenil-tioureia (32.84 mmol) e o iodeto de metila (1.5 eq). A mistura foi agitada por 12 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi rotaevaporada, onde posteriormente foram realizadas lavagens com AcOEt seguido de filtração, onde foi obtido um sólido branco, com rendimento de 87%.

#### **4.2.2 Procedimento para síntese do 1-amino-3-fenil-guanidina (LQM-44)**

Em um balão foram adicionados o intermediário LQM-45 (16.99 mmol) e hidrazina 80% (2 eq). A mistura foi agitada por 12 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de hidrazina foi removido sob pressão reduzida e o composto formado (LQM-44) foi utilizado diretamente nas etapas seguintes da rota sintética sem purificação prévia, com rendimento de 70%.

#### **4.2.3 Procedimento de síntese para LQM 29-32 e LQM-34**

Em um balão foram adicionados o **1-amino-3-fenil-guanidina (LQM-44)**, o aldeído requerido (1.5 eq), 10 mL de metanol e poucas gotas de ácido acético. A mistura foi agitada por 12 horas à temperatura ambiente. Após o fim da reação (acompanhada por CCD), o solvente foi evaporado e o sólido bruto foi submetido à extração AcOEt/H<sub>2</sub>O. A fase orgânica foi separada, tratada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e rotaevaporada. Por fim, o produto final foi purificado por coluna cromatográfica utilizando-se AcOEt/Hexano 8:2 como sistema eluente.

### **4.3 Parte Experimental – Estudo Biológico**

A atividade biológica desse estudo foi realizada no Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/ Pernambuco), na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob a orientação e colaboração da Profa. Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira.

### **4.3.1 Equipamentos e Software**

Para os experimentos foram utilizados: Câmara de Neubauer; Centrífuga; Contador de Cintilação; Espectrofotômetro (BIORAD 3550); Estufa de CO<sub>2</sub>; Fluxo Vertical e o Software Graphpad Prism 4

### **4.3.2 Meios de Cultura e Soluções**

Os meios de cultura e soluções utilizadas foram: Azul de trypan; Duodecil Sulfato de Sódio (DSS) 10%; Isopropanol 50%; Meio RPMI 1640 sem SBF; Saponina 0,05% e Timidina Tritiada.

### **4.3.3 Animais**

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* das linhagens isogênicas BALB/c, machos e fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade e pesando entre 20 g e 22g, provenientes do biotério do CPqAM/FIOCRUZ/PE. O protocolo de experimentação animal foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA N° 26/2011).

## **4.4 Metodologia**

### **4.4.1 Obtenção de células esplênicas**

Para a avaliação da atividade citotóxica das substâncias em células de camundongos, foram utilizadas células esplênicas obtidas a partir dos baços de 3 camundongos de cada grupo. Após a eutanásia do animal, o baço de cada camundongo foi removido em condições assépticas e colocado em tubo Falcon contendo meio RPMI 1640 sem SBF (meio incompleto).

No fluxo vertical, cada baço foi transferido para placa de Petri onde foram macerados. As suspensões celulares obtidas foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10 mL de meio incompleto por baço, centrifugadas a 4°C, 200 x g durante 5 minutos.

Após descarte do sobrenadante, ao sedimento adicionou-se água destilada para promover a lise das hemácias. O sobrenadante, sem conter os debris celulares,

foi coletado e centrifugado a 4°C, 200 x g durante 5 minutos. O sedimento, contendo as células, foi ressuspenso em meio RPMI 1640 completo. Uma alíquota de cada suspensão celular foi separada e, em seguida, diluída em azul de trypan para ser quantificada em câmara de Neubauer, assim como para verificar a viabilidade celular (PEREIRA et al., 2004; GROSS, 2000).

#### **4.4.2. Ensaios de citotoxicidade em esplenócitos de camundongos**

Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram incubadas com as substâncias sintetizadas em seis diferentes concentrações (100, 50, 25, 10, 5 e 1 µg/ml) e com timidina tritiada (1 µCi/poço) durante 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Para o controle negativo foram utilizadas células tratadas com saponina (0,05%) e células sem tratamento, todos com timidina tritiada (1 µCi/poço) associada em paralelo. Cada substância foi testada em triplicata. Após 24 horas de incubação, as células foram coletadas em papel de fibra de vidro e, posteriormente, a captação de timidina tritiada determinada através do contador beta de cintilação. A concentração citotóxica para 50% da cultura (CC<sub>50</sub>) foi determinada por análise de regressão pelo software GraphPad Prism 4. Cada ensaio foi realizado em triplicata (n=3).

#### **4.4.3 Ensaio de viabilidade de epimastigotas *in vitro* do *T. cruzi***

Formas epimastigotas (Dm 28c) foram contadas em um hemocitômetro e em seguida foram incubadas em placa de 96 poços em meio LIT, contendo 10<sup>6</sup> células/poço. Os compostos foram dissolvidos em DMSO (1%) e depois diluídos em meio LIT em uma diluição em série (1.23; 3.70; 11.11; 33.33 e 100 µg/mL) e adicionou-se nos respectivos poços, em triplicata. A placa foi incubada durante 5 dias a 26° C. O crescimento e as alterações morfológicas da cultura foram acompanhados por microscopia óptica. Alíquotas de cada poço foram recolhidas, e o número de parasitos viáveis foram contados em uma câmara de Neubauer e comparada com a cultura de parasitos não tratada. A concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) foi calculada utilizando regressão não-linear em software GraphPad Prism 4. Benznidazol e nifurtimox foram utilizados como os fármacos de referência.

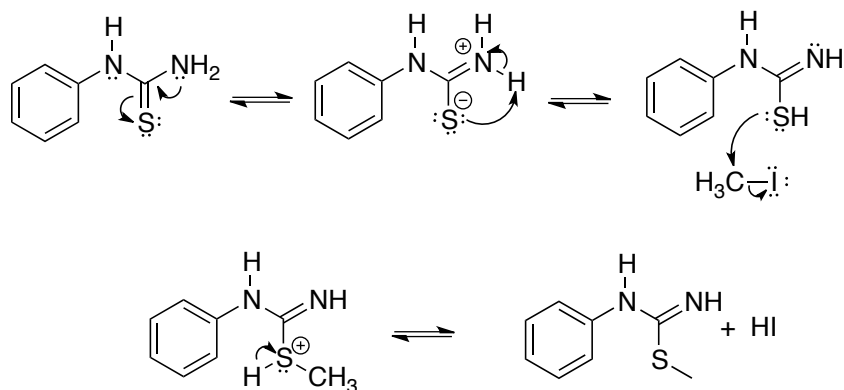
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo Químico

#### 5.1.1 Síntese do 2-metil-1-fenil-2-tio-pseudourea (LQM-45)

Para obtenção do LQM-45, uma reação de S-alkilação foi utilizada. Inicialmente a *N*-fenil-tiourea através de um equilíbrio tautomérico origina uma espécie nucleofílica responsável pelo ataque ao carbono parcialmente positivo do iodeto de metila ( $\text{I-CH}_3$ ) com posterior abandono do grupo de saída ( $\text{I}^-$ ). Em seguida, o iodeto captura um hidrogênio diretamente ligado ao enxofre restaurando a carga formal zero, originando o 2-metil-1-fenil-2-tio-pseudourea.

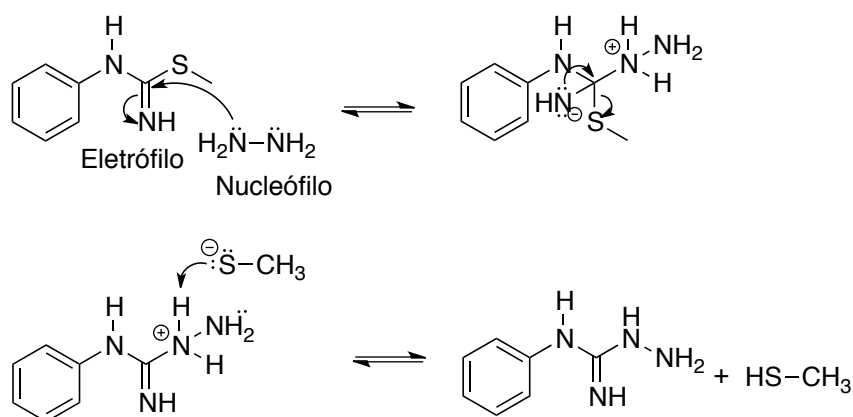
#### Esquema 3 – Mecanismo reacional envolvido na obtenção do LQM-45



#### 5.1.2 Síntese do 1-amino-3-fenil-guanidina (LQM-44)

O LQM-44 foi obtido a partir de uma reação de aminação, onde a hidrazina foi o nucleófilo utilizado. Inicialmente o par de elétrons do nitrogênio da hidrazina ataca o carbono parcialmente positivo do LQM-45 com posterior deslocalização da ligação pi para o átomo de nitrogênio. Conseqüentemente houve abandono do grupo de saída metil-tio ( $\text{S-CH}_3$ ) e formação da 1-amino-3-fenil-guanidina.

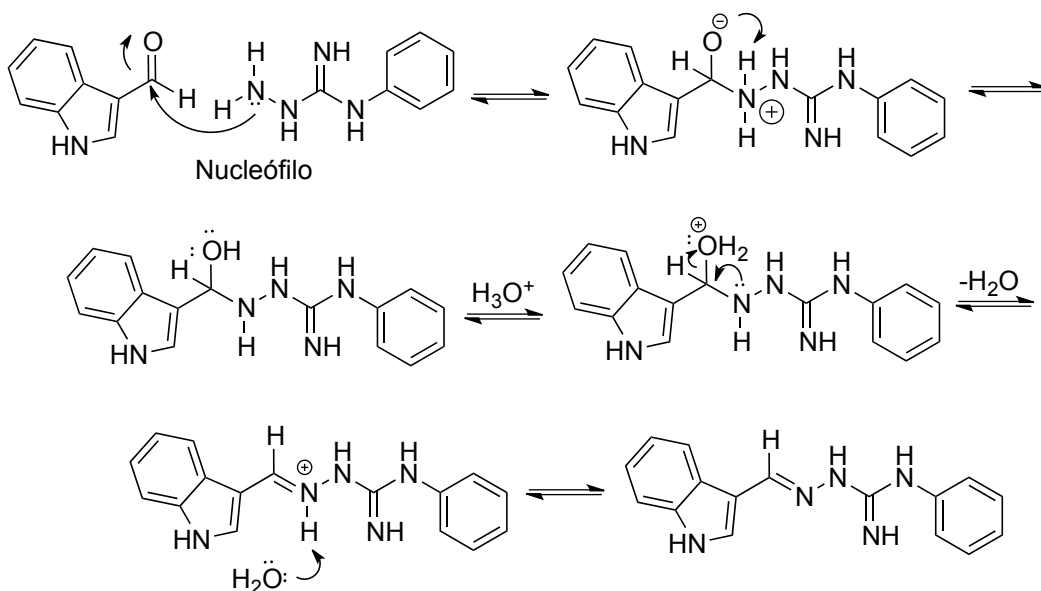
#### Esquema 4 – Mecanismo reacional envolvido na obtenção do LQM-44



#### 5.1.3 Síntese das aminoguanidina hidrazonas (LQM 29-32 e LQM-34)

O LQM-44 previamente sintetizado serviu de intermediário na obtenção das aminoguanidina hidrazonas. Para tal, foram utilizados cinco diferentes 3-indol-carboxaldeídos. O mecanismo reacional envolvido nesta etapa de síntese compreendeu inicialmente o ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio da 1-amino-3-fenil-guanidina atacou o carbono do aldeído, com posterior deslocalização da ligação pi e formação da carga formal -1 no átomo de oxigênio. Em seguida, o átomo de oxigênio carregado negativamente, abstrai um próton do nitrogênio carregado positivamente para reestabelecer a carga formal zero em todos os átomos da molécula. A fim de favorecer a desidratação do intermediário formado, o par de elétrons do oxigênio abstrai o próton do ácido (catalisador) e após a deslocalização do par de elétrons do nitrogênio a água é liberada e uma imina é formada. Em seguida, a base conjugada do ácido, remove o próton do nitrogênio imínico e conduz a formação das novas substâncias finais de interesse.

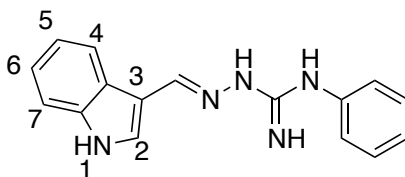
#### Esquema 5 – Mecanismo reacional envolvido na obtenção dos LQM's 29-32 e LQM-34



## 5.2 Caracterização de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ e espectroscopia de massas

A elucidação estrutural das substâncias objetivados nesse estudo apresentaram um perfil semelhante em seus espectros de RMN  $^1\text{H}$ . Foi possível observar a presença de singletos relativos aos sinais químicos dos hidrogênios ligados ao nitrogênio (NH), em uma faixa que variou entre 12.63 – 7.21 ppm. Além disso, foi também observado o sinal imínico característico (CH=N) na faixa de 8.44 – 8.54 ppm. Adicionalmente, as substâncias de interesse foram elucidadas através da técnica de RMN  $^{13}\text{C}$ , onde foi possível observar um sinal característico da ligação C=N na faixa de 152.4 – 153.2 ppm. A espectrometria de massas confirmou todas as substâncias sintetizadas através da averiguação do pico do íon molecular.

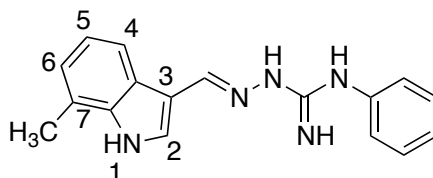
### 5.2.1 2-((1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-fenilhidrazinacarboximidamida (LQM-29)



Substância obtida: sólido amorfo marrom; rendimento: 82%;  $R_f = 0,56$  (AcOEt/Hex 8:2); PF: 190 – 191 °C; Log P: 2,40; RMN  $^1\text{H}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7,15 (1H, t,  $J = 7,2$  Hz, H-5), 7,22 (1H, t,  $J = 7,2$  Hz, H-6), 7,31 – 7,37 (3H, m, Ar-H), 7,45 – 7,51 (3H,

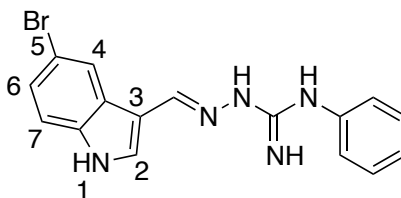
m, Ar-H e H-7), 7,96 (1H, sl, NH), 7,96 (1H, d,  $J=2,4$  Hz, H-2), 8,32 (1H, d,  $J=8$  Hz, H-4), 8,47 (1H, s, CH=N), 9,80 (1H, s, NH), 11,50 (1H, s, NH), 11,76 (1H, s, NH); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  152,4 (C=NH), 146,2 (Cq), 137,0 (CH=N), 135,5 (Cq), 132,2 (CH indol), 129,6 (CH), 126,3 (Cq), 123,8 (CH), 122,8 (CH), 122,3 (CH), 120,7 (CH), 111,8 (CH), 110,5 (CH); EMAR m/z calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 278,13, encontrado: 278,11 (ver Anexo A).

### 5.2.2 2-((7-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenilhidrazinacarboximidamida (LQM-30)



Substância obtida: sólido amorfo marrom; rendimento: 87%;  $R_f$ : 0,56 (AcOEt/Hex 8:2); PF: 211 – 212 °C; Log P: 2,88; RMN  $^1\text{H}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2,50 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 7,01 – 7,08 (2H, m, H-5 e H-6), 7,31 – 7,37 (3H, m Ar-H), 7,48 – 7,52 (2H, m, Ar-H), 7,98 (1H, s, H-2), 7,98 (1H, sl, NH), 8,13 (1H, d,  $J$  7,2 Hz, H-4), 8,47 (1H, s, CH=N), 9,72 (1H, s, NH), 11,39 (1H, s, NH), 11,74 (1H, s, NH); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  152,7 (C=NH), 146,2 (Cq), 136,4 (CH=N), 135,5 (Cq), 131,8 (CH indol), 129,6 (CH), 126,2 (Cq), 123,6 (Cq), 123,3 (CH), 121,0 (Cq), 120,9 (CH), 119,7 (Cq), 110,9 (CH), 16,7 ( $\text{CH}_3$ ); EMAR m/z calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 292,15, encontrado: 292,13 (ver Anexo B).

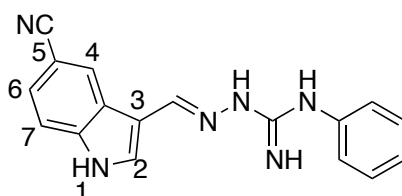
### 5.2.3 2-((5-bromo-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenilhidrazinacarboximidamida (LQM-31)



Substância obtida: sólido amorfo marrom; rendimento: 99%;  $R_f$ : 0.67 (AcOEt/Hex 8:2); PF: 255 – 257 °C; Log P: 3,23; RMN  $^1\text{H}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7,29 – 7,36 (4H, m, Ar-H), 7,42 – 7,44 (2H, m, Ar-H e H7), 7,46 – 7,50 (2H, m, H-2 e H-6), 8,01 (1H, s, H-4), 8,02 (1H, sl, NH), 8,44 (1H, s, CH=N), 9,80 (1H, sl, NH), 11,43 (1H, sl, NH), 11,92 (1H, sl, NH); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  152,4 (C=NH), 146,1 (Cq), 145,9 (Cq),

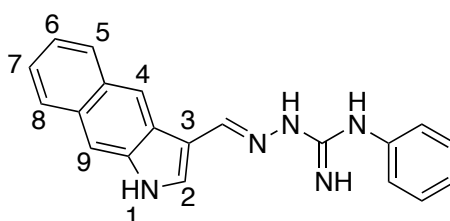
135,8 (CH indol), 133,3 (CH), 129,6 (CH), 129,6 (Cq), 126,1 (Cq), 125,5 (CH), 125,4 (Cq), 124,1 (CH), 113,8 (CH), 113,6 (CH), 110,2 (CH); EMAR m/z calculado para  $C_{16}H_{14}BrN_5 [M+H]^+$ : 356,04, encontrado: 356,03 (ver Anexo C).

#### 5.2.4 2-((5-ciano-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenilhidrazinacarboximidamida (LQM-32)



Substância obtida: sólido amorfo amarelo; rendimento: 89%;  $R_f$ : 0,64 (AcOEt/Hex 8:2); PF: 238 – 239°C; Log P: 2,43; RMN  $^1H$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7,21 (1H, sl, NH), 7,41 – 7,42 (5H, m, Ar-H), 7,54 – 7,63 (3H, m, H-2, H-6 e H-7), 8,08 (1H, s, H-4), 8,47 (1H, s, CH indol), 8,80 (1H, s, Ar-H), 12,71 (2H, sl, NH); RMN  $^{13}C$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  153,2 (C=NH), 145,2 (Cq), 138,8 (CH=N), 133,6 (CH indol), 133,5 (Cq), 129,9 (Cq), 129,4 (CH), 127,8 (Cq), 127,1 (CH), 126,1 (Cq), 125,7 (CH), 123,6 (CH), 120,6 (C=N), 113,1 (CH), 102,8 (CH); EMAR m/z calculado para  $C_{17}H_{14}N_6 [M+H]^+$ : 303,13, encontrado: 303,12 (ver Anexo D).

#### 5.2.5 2-((1H-benzo[f]indol-3-il)metileno)-N-fenilhidrazinacarboximidamida (LQM-34)



Substância obtida: sólido amorfo marrom; rendimento: 62%;  $R_f$ : 0,61 (AcOEt/Hex 8:2); PF: 221 – 222 °C; LogP: 3,39; RMN  $^1H$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7,32 – 7,38 (3H, m, Ar-H), 7,46 – 7,52 (3H, m, Ar-H, H-7, H-8 e H9), 7,57 – 7,62 (2H, m, Ar-H), 7,98 (2H, d,  $J$  8 Hz, H-2 e NH sl), 8,05 (1H, d,  $J$  2,8 Hz, H-4), 8,39 – 8,43 (2H, m, H-5 e H-6), 8,54 (1H, s, CH=N), 9,78 (1H, s, NH), 11,45 (1H, s, NH), 12,63 (1H, s, NH); RMN  $^{13}C$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  152,4 (C=NH), 146,2 (Cq), 135,5 (Cq), 133,9 (Cq), 131,8 (CH,



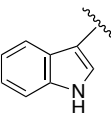
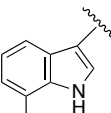
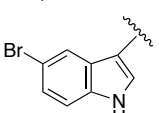
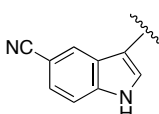
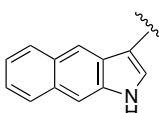
indol), 130,4 (Cq), 130,2 (CH), 129,6 (CH), 128,3 (CH), 126,4 (Cq), 125,7 (CH), 124,3 (CH), 121,6 (CH), 121,2 (CH), 120,7 (CH), 120,1 (Cq); EMAR m/z calculado para  $C_{20}H_{17}N_5 [M+H]^+$ : 328,15, encontrado 328,15 (ver Anexo E).

### 5.3 Estudo Biológico

#### 5.3.1 Ensaio de citotoxicidade em esplenócitos de camundongos

O estudo da citotoxicidade, tem por finalidade determinar concentrações que são atóxicas para células saudáveis de mamíferos, visando uma maior seletividade que as substâncias testadas apresentem sobre o alvo biológico em comparação às outras células do hospedeiro. As substâncias testadas apresentaram valores de  $CC_{50}$  que variaram de 4,37 a 5,62  $\mu M$  (Tabela 1).

**Tabela 1. Citotoxicidade das aminoguanidina hidrazonas testadas frente à esplenócitos de camundongos.**

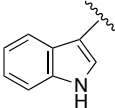
LQM	R	$CC_{50}$ ( $\mu M$ )
LQM-29		5,62
LQM-30		5,35
LQM-31		4,37
LQM-32		5,15
LQM-34		4,76
BnZ	-	96,1
NF <sub>x</sub>	-	3,5

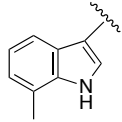
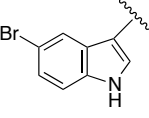
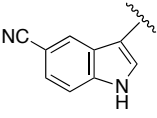
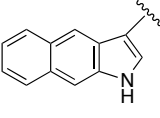
Os resultados de citotoxicidade revelaram que todas as substâncias testadas apresentam alta toxicidade quando comparadas ao Benznidazol ( $CC_{50} = 96,1 \mu\text{M}$ ), sendo a mais tóxica destas a LQM-31. Porém, quando comparadas ao outro fármaco padrão utilizado no experimento, o nifurtimox ( $CC_{50} = 3,5 \mu\text{M}$ ), essas substâncias apresentaram-se menos citotóxicas. Oliveira e colaboradores (2015) avaliaram em seu estudo, novas tiossemicarbazonas frente a atividade antitumoral. Foi evidenciado que o composto mais citotóxico também foi aquele que obteve uma melhor reposta antitumoral. Adicionalmente, os ensaios de toxicidade aguda, para esse mesmo composto em modelo animal, revelou ausência de toxicidade da molécula. Sendo assim, em relação aos nossos resultados, os valores de citotoxicidade das novas substâncias não podem ser descartados visto que em modelo animal, a molécula pode ser não tóxica.

### 5.3.2 Ensaio de viabilidade de epimastigotas *in vitro* do *T. cruzi*

Na avaliação da atividade frente a forma epimastigota do *T. cruzi* verificamos que as substâncias LQM-29, LQM-30, LQM-32 e LQM-34, não apresentaram atividade satisfatória frente esta forma do parasito quando comparadas com os fármacos padrão. No entanto, o LQM-31 apresentou uma concentração inibitória de  $10,61 \mu\text{M}$ , podendo ser considerada satisfatória quando comparado as outras substâncias testadas (Tabela 2).

**Tabela 2. Atividade *in vitro* das aminoguanidina hidrazonas sobre formas epimastigota de *T. cruzi***

LQM	R	$CI_{50}$ epimastigotas ( $\mu\text{M}$ )
LQM-29		26,50

<b>LQM-30</b>		77,67
<b>LQM-31</b>		10,61
<b>LQM-32</b>		>100
<b>LQM-34</b>		18,11
<b>BnZ</b>	-	6,6
<b>NF<sub>x</sub></b>	-	5,7

\*ND = não determinado.

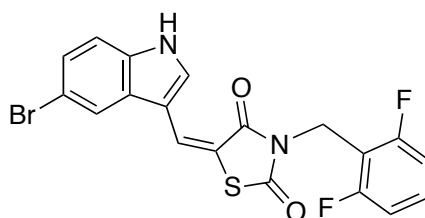
O LQM-29 representa o esqueleto base dessa série de substâncias, onde esta apresenta o núcleo indol sem nenhuma substituição (Log P = 2,40). Todas as substituições realizadas nas demais substâncias provocaram um aumento do valor numérico do Log P, ressaltando as substâncias LQM-31 (Log P = 3,23) e LQM-34 (Log P = 3,39), uma vez que tais substâncias apresentaram melhores valores de  $CI_{50}$  para a forma epimastigota.

Nos estudos de Gomes e colaboradores (2016) foi evidenciado que substituições realizadas na série de ftalimido-tiazóis conduziram a um aumento do valor numérico do Log P, por consequência aumento da atividade anti- *T. cruzi*. O Log P garante um caráter hidrofílico para a molécula suficientemente capaz de conduzir a sua dissolução no meio biológico, e um caráter lipofílico necessário para esta atravessar as barreiras biológicas (membranas), chegar ao seu alvo farmacológico e desenvolver a sua ação. No nosso estudo, a molécula precisaria atravessar o tegumento do parasito para lhe causar algum dano que conduzisse a sua morte. Esses efeitos foram melhor observados para as substâncias LQM-31 e LQM-34.

Moléculas com o núcleo indol têm sido amplamente estudadas, visto o seu vasto espectro de atividades associadas a este heterociclo, ressaltando a sua

importância para as doenças negligenciadas tais como anti-*Trypanosoma cruzi*, (MEZENECV et. al., 2009), anti-*Leishmania* (SHARMA et. al., 2013) e anti-*Plasmodium* (SANTOS et. al., 2015). Todas as substâncias avaliadas nesse estudo possuem o núcleo indol em sua estrutura, sendo o melhor composto avaliado o LQM-31 que possui uma substituição na posição 5 do indol pelo átomo de bromo (OLIVEIRA et al. 2015a). Oliveira e colaboradores (2015) avaliaram a atividade esquistossomocida e tripanocida de novas indol-tiazolidinas. O melhor composto avaliado no estudo foi o 5f (Figura 15), o qual apresenta em sua estrutura a substituição 5-bromo-indol a mesma substituição encontrada na nossa molécula LQM-31, ressaltando a importância dessa substituição para a atividade antiparasitária. A incorporação de átomos de halogênios como substituinte conduzem a um aumento da lipofilicidade e posterior chegada ao seu alvo farmacológico (THOMAS, 2013).

**Figura 15. Estrutura química do 5-((5-bromo-1*H*-indol-3-il) metileno)-3-(2,6-difluorobenzil) tiazolidina-2, 4-dione, melhor composto avaliado frente atividade antiparasitária.**



## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Conclui-se com este trabalho que as metodologias sintéticas empregadas nesse estudo foram bastante eficazes, possibilitando a obtenção de cinco substâncias inéditas, com rendimentos variando entre 62 e 99%. Todos os derivados obtidos foram adequadamente caracterizados através de técnicas de RMN de hidrogênio e carbono treze e espectrometria de massas.

Dentre os cinco compostos finais sintetizados, o LQM-31 apresentou uma concentração inibitória de 10,61  $\mu\text{M}$  frente a forma epimastigota de *T. cruzi*, podendo ser considerada satisfatória quando comparado as outras substâncias testadas (Tabela 2). Por outro lado, todos as substâncias sintetizadas apresentaram elevada citotoxicidade quando comparados ao benznidazol.

Neste sentido, novas modificações estruturais a partir da estrutura do LQM-31 serão realizadas em nosso grupo de pesquisa, especialmente modificando-se o anel ou grupo ligado à aminoguanidina, no intuito de se obter novos derivados aminoguanidínicos menos tóxicos e mais ativos frente ao parasito *T. cruzi*.

## REFERÊNCIAS

ADDLA, D; BHIMA; SRIDHAR, B; DEVI, A; KANTEVARI, S. Design, synthesis and antimicrobial evaluation of novel 1-benzyl-2-butyl-4-chloroimidazole embodied 4-azafluorenones via molecular hybridization approach. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. India. v.22. p.7475-7480. 2012.

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

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

ALVES, M. A., QUEIROZ A. C., ALEXANDRE-MOREIRA, M. S., VARELA, J., CERECETTO, H., GONZÁLEZ, M., DORIGUETTO, A. C., LANDRE, I. M., BARREIRO E. J. , LIMA L. M., Design, synthesis and in vitro trypanocidal and leishmanicida activities of novel semicarbazone derivatives, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 100, p. 24-33, 2015.

AQUINO, T. **Síntese e Avaliação das Atividades Anti-Toxoplasma gondii e Anti microbiana de Benzaldeído 4-Fenil-3-tiossemicarbazonas e Derivados 2[(Fenilmetileno)hidrazono]-3-fenil-4- tiazolidinona-5-substituídos**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

BARREIRO, E. J. A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 26-34, 2009.

BERN C., MONTGOMERY S.P., HERWALDT B. L., RASSI J. R, A., MARIN-NETO J. A., DANTAS R. O., MAGUIRE J. H., ACQUATELLA H., MORILLO C., KIRCHHOFF L. V., GILMAN R. H., REYES P. A., SALVATELLA R., MOORE A. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. **The Journal of the American Medical Association**, v. 298, p.2171-2181, 2007.

BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **The New England journal of medicine**, Atlanta, USA, v. 364, p. 2527–2234, 2011.

BISWAS, A.; SRINIVASAN, V.; MUSALLAM, H.A.; REID, W.A.JR.; AGER, A.L. BOIBESSOT, I.; TURNER, C.M.; WATSON, D.G.; GOLDIE, E.; CONNEL, G., MCINTOSH, A.; GRANT, M.H.; SKELLERN, G.G. Metabolism and distribution of phenanthridine *trypanocides* in *Trypanosoma brucei*. Glasgow, UK, **Acta Tropica**, v. 84, p. 219-228, 2002.

BOONE, L. R.; KOSZALKA, G. W. Antiretroviral drug development for HIV: Challenges for the future, London, England, **Current opinion in investigational drugs**, v.11, p. 863–67, 2010.

BRASIL, Doenças negligenciadas: Estratégias do Ministério da Saúde, **Revista de Saúde Pública**, v. 44, p. 200-2, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Ações de controle da malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica. Brasília; 2006.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETTO, M., *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, Rio de Janeiro, 2ª edição, Editora Guanabara Kogan, p. 431, 2000.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.114, n. 2, p. 103-10, 1997.

CABALLERO, A. B.; RODRÍGUEZ-DIÉGUEZ, A.; QUIRÓS, M.; SALAS, J. M.; HUERTAS, O.; RAMÍREZ-MACÍAS, I.; OLMO, F.; MARÍN, C.; CHAVES-LEMAUR, G.; GUTIERREZ-SÁNCHEZ, R.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Triazolopyrimidine compounds containing first-row transition metals and their activity against the neglected infectious Chagas disease and leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, n. [sl], p. 526-534, 2014.

CARDOSO, M. V. O., SIQUEIRA, L. R. P., SILVA, E. B., COSTA, L. B., HERNANDES, M. Z., RABELLO, M. M., FERREIRA, R. S., CRUZ, L. R., MOREIRA, D. R. M., PEREIRA, V. R. A., CASTRO, M. C. A. B., BERNHARDT, P. V., LEITE, A. C. L. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 48-59, 2014.

CEVALLOS, A. M. e HERNANDEZ, R.; Chagas' Disease: Pregnancy and Congenital Transmission; **BioMed Research International**; v. 2014, 10 pages 2014, Article ID 401864, 2014.

CHAGAS C. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 1, p. 159–218, 1909.

CINQUE, G.M., SZAJNMAN, S.H., ZHONG, L., DOCAMPO, R., SCHVARTZAPEL, A.J., RODRIGUEZ, J.B., GROS, E.G. Structure–activity relationship of new growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*; **Journal of Medicinal Chemistry**; v. 41, p. 1540–

1554, 1998.

COLOMBO, M.; PERETTO, I. Chemistry strategies in early drug Discovery: overview of recent trends. **Drug Discovery Today**, v.13, p.15-16, 2008.

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

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 286-296, 2012.

COURA, J. R.; BORGES, J. P. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 641–645, 2011.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 31-40, 2009.

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

DIAS J. C. P., Vigilância epidemiológica em doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, v.16(supl. 2), p. 43-59, 2000.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. S13-S22, 2007.

DIAS, J. C. P. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and its bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, p. 370-375, 2006.

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 2444-2457, 2009.

DNDi – Drugs for Neglected Disease initiative. Chagas. Disponível em: <http://dndi.org/diseases/chagas.html>. Acesso em: 17 de Outubro de 2015.

DO CAMPO, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. **Current pharmaceutical design**, v. 7, p. 1157-1164, 2001.



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

FELDMAN A. M., McNAMARA D., Myocarditis. **The New England journal of medicine**; v. 343, p. 1388-398, 2000.

FIOCRUZ. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=1>>. Acessado em: 19 de Outubro de 2015.

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

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

GALVÃO C., CARCAVALLO R., ROCHA D. S., JURBERG J.,. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) and their geograflcal distribution with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, v. 202, p.1-36, 2003.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**. Espanha. v. 115, nº. 1-2, p. 22-27, Agosto. 2010.

GOMES, P. A., OLIVEIRA, A. R., CARDOSO, M. V., SANTIAGO, E. D. E. F., BARBOSA, M. D. E. O., DE SIQUEIRA, L. R., MOREIRA, D. R., BASTOS, T. M., BRAYNER, F. A., SOARES, M. B., MENDES, A. P., DE CASTRO, M. C., PEREIRA V. R., LEITE, A. C., Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. **Europe Journal Medicinal Chemistry**, v. 111, p. 46-57. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.01.010. 2016

GOSSNITZER. E.; FEIERL, G.; WAGNER, U. Synthesis, structure investigations, and antimicrobial activity of selected s-trans-6-aryl-4-isopropyl-2-[2-[(E)-1-phenyl-alkylidene](E)hydrazino]-1,4-di-hydro-pyrimidine-hydrochlorides. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.15, p. 4961, 2002.

GROSS, C. G. Neurogenesis in the Adult Brain: Death of a Dogma. **Nature**. v. 1. p. 67-73. 2000.

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

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

HASSLOCHER-MORENO, A. M.; do Brasil, P. E.; de Sousa, A. S.; Xavier, S. S.; Chambela, M. C.; da Silva, G. M. S. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1261–1266, 2012.

KEALEY, A.; SMITH, R. Neglected tropical diseases: infection, modeling and control. **Journal of Health Care Poor Underserved**, v. 21, p. 53–69, 2010.

KIER, L. B. & HALL, L. H. Bioisosterism: Quantitation of Structure and Property Effects. **Chemistry & Biodiversity**, v. 1, p. 138-151, 2004.

KRYSHCHYSHYN, A.; KAMINSHYY, D.; GRELLIER, P.; LESYK, R. Trends in Research of Antitrypanosomal Agents Among Synthetic Heterocycles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, n. [sl], p. 51-64, 2014.

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

KUMAR, M.; MAKHAL, B.; GUPTA, V. K.; SHARMA, A. In silico Investigation of Medicinal Spectrum of Imidazo-azines from the Perspective of Mutitarget Screening Against Malaria, Tuberculosis and Chagas Disease. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 50, n. [sl], p. 1-9, 2014.

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

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

MARTINS, T. L. C.; RAMALHO, T. C.; FIGUEROA, V. J.; FLORES, A. F. C.; PEREIRA, C. M. P. Theoretical and experimental <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR investigation of Guanylhydrazones in solution. **Magnetic Resonance In Chemistry**, 2003.

MARTINS, T. L. C. **Síntese de guanilhidrazonas, atividade antibiótica e estudos de interação com DNA por RMN**. Tese (Doutorado, Instituto Militar de Engenharia),

Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

MARTINS, T. L. C.; RAMALHO, T.C.; FRANCA, T.C.C.; FIGUEROA, V.J. Synthesis of Guanylhyazones under Microwave Irradiation. **Synthetic Communications**, v. 34, p.3891-3899, 2004.

MENDONÇA JUNIOR, F. J., AQUINO, T. M., Doenças negligenciadas sob a ótica da química medicinal, Ed. CRV, 2015.

MESSEDER, J. C.; FIGUEROA VILLAR, J. D.; TINOCO, L. W.; SOUZA, E. M.; SANTA RITA, R.; DE CASTRO, S. L. Aromatic guanyl hydrazones: Synthesis, structural studies and in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. **Biorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 5(24), p. 3079-3084, 1995.

MEZENECV R., GALIZZI M., KUTSCHY P., DOCAMPO R., *Trypanosoma cruzi*: Antiproliferative effect of indole phytoalexins on intracellular amastigotes in vitro, **Experimental Parasitology**, v. 122(1), p. 66-69, 2009.

MILLER III, B. R. e ROITBERG, A. E. Design of e-Pharmacophore Models Using Compound Fragments for the Trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*: Screening for Novel Inhibitor Scaffolds. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 45, n. [sl], p. 84-97, 2013.

MITCHELL B.A.; BROWN M.H.; SKURRAYR, A. QacA Multidrug Efflux Pump from *Staphylococcus aureus*: Comparative Analysis of Resistance to Diamidines, Biguanidines, and Guanylhyazones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p.475–477, 1998.

MONCAYO, A. Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98(5), p. 577-591, 2003.

MONTANARI, CA. Química Medicinal. **Métodos e fundamentos em planejamento de fármacos**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2011.

MORAN, M. A., Breakthrough in R&D for neglected diseases: News ways to get the drugs we need, **PloS Medicine**, v. 2(9), p. 309, 2005.

MOREIRA, L.; BARREIRO, E. J.; Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 23-49, 2005.

MOREIRA, D. R. M.; OLIVEIRA, A. D. T.; GOMES, P. A. T. M.; SIMONE, C. A.; VILLELA, F. S.; FERREIRA, R. S.; SILVA, A. C.; SANTOS, T. A. R.; CASTRO, M. C. A. B.; PEREIRA, V. R. A.; LEITE, A. C. L. Conformational Restriction of Aryl

Thiosemicarbazones Produces Potent and Selective anti-Trypanosoma cruzi Compounds Which Induce Apoptotic Parasite Death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, n. [sl], p. 467-478, 2014.

MORELLO A. et al.. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of Trypanosoma cruzi. **Comparative Physiology and Biochemistry**, New York, v.90, p. 1-12, 1994.

MORENO-RODRÍGUEZ, A.; SALAZAR-SCHETTINO, P. M.; BAUTISTA, J. L.; HERNÁNDEZ-LUIS, F.; TORRENS, H.; GUEVARA-GÓMEZ, Y.; PINA-CANSECO, S.; TORRES, M. B.; CABRERA-BRAVO, M.; MARTINEZ, C. M.; PEREZ-CAMPOS, E. In vitro Antiparasitic Activity of New Thiosemicarbazones in Strains of Trypanosoma cruzi. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 87, n. [sl], p. 23-29, 2014.

NETO, V. A.; PASTERNAK, J. Centenário da Doença de Chagas. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, p. 381-382, 2009.

NWAKA, S.; RIDLEY, R.G. Drugs for Neglected Diseases initiative. **Nature Review Drug Discovery**, v. 2, p. 919, 2009.

OLIVEIRA, J. F., SILVA, A. L., VENDRAMINI-COSTA, D. B., AMORIM, C. A. C., CAMPOS, J. F., RIBEIRO, A. G., MOURA, R. O., NEVES, J. L., RUIZ, A. L. T. G., CARVALHO, J. E., LIMA, M. C. A. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. **European Journal Medicinal Chemistry**, v. 104, p. 148-156.

DOI:10.1016/j.ejmech.2015.09.036. 2016

OLIVEIRA, J. F., SILVA, A. L., ALMEIDA-JUNIOR, A. S. A., SANTIAGO, E. F., OLIVEIRA, S. A. O., SILVA, V. B. R., SILVA, A. C., BARROS, A. F., PEREIRA, V. R. A., PITTA, I. R., LIMA, M. C. A., Synthesis and Evaluation of the Schistosomicidal and Trypanocidal Properties of Thioxo-Imidazolidines and Thiazolidin-2, 4-Diones, **British Journal of Pharmaceutical Research**, v.7(6), p. 386-400, 2015, Article ISSN: 2231-2919. 2015

PAPADOPOULOU, M. V.; BLOOMER, W. D.; ROSENZWEIG, H. S.; WILKINSON, S. R.; KAISER, M. Novel Nitro(triazole/imidazole)-based Heteroarylamides/Sulfonamides as Potential Antitrypanosomal Agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 87, n. [sl], p. 79-88, 2014.

PÉCOUL B., CHIRAC P., TROUILLER P. & PINEL J., Access to essential medicines in poor countries: a lost battle? **Journal of the American Medical Association**, v. 281, p. 361-367, 1999.

PEREIRA, K.S. et al. Chagas disease as a foodborne illness. **Journal of Food Protection**. V.72, p. 441–446, 2009.

PEREIRA, V. R. A.; LORENA, V. M. B. ; SILVA, A. P. G. ; COUTINHO, E. M ; MIRANDA, P. ; SILVA, E. D. ; FERREIRA, A. G. P. ; KRIEGER, M. A. ; GOLDENBERG, S. ; OLIVEIRA, R. C. ; GOMES, Y. M. . Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice. **Parasitology** (London. Print), v. 129, n.5, p. 563-570, 2004.

PERÉZ, J. A. G. Panorama actual de La química farmacêutica. Universidad de Sevilla, Secretariado de Publicaciones, 2 ed., p. 384, 2004.

PINAZO, M. J.; MUÑOZ, J.; POSADA, E.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; GÁLLEGO, M.; AYALA, E.; DEL CACHO, E.; SOY, D.; GASCON, J., Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas disease in adults. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p.4896–4899, 2010.

PINHEIRO, M. P., **Planejamento de inibidores das enzimas di-idroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major***. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

PINTO, A. V.; DE CASTRO, S. L. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. **Molecules**, v. 14, p. 4570-4590, 2009.

PINTO, A.Y. et al. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. **Revista Panamericana de Salud Pública**. México, v. 25, p. 77–83, 2009.

RASSI, A., J, RASSI, A., MARIN-NETO, J. Chagas disease. *Lancet*. 375:1388-1402, 2010.

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

RODRIGUES, R. F.; CASTRO-PINTO, P.; ECHEVARRIA, A.; REIS, C.M.; CISTIA, C. N. D.; SANT'ANNA, C. M. R.; TEIXEIRA, F.; CASTRO, H.; CANTO-CAVALHEIRO, M.; LEON, L. L.; TOMÁS, A. Investigation of Trypanothione Reductase Inhibitory Activity by 1,3,4-Thiadiazolium-2-aminide Derivatives and Molecular Docking Studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 1760-1766, 2012.

SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.; MENDONÇA, L.Z.;

SOARES, M. J. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 283-290, 2007.

SANTOS, S. A., LUKENS, A. K., COELHO, L. E, NOGUEIRA F., E, WIRTH D. F., MAZITSCHKE R., MOREIRA R., PAULO A., Exploring the 3-piperidin-4-yl-1H-indole scaffold as a novel antimalarial chemotype. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 102, p. 320-33. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.07.047. 2015.

SCHORMANN, N.; VELU, S. E.; MURUGESAN, S.; SENKOVICH, O.; WALKER, K.; CHENNA, B. C.; SHINKRE, B.; DESAI, A.; CHATTOPADHYAY, D. Synthesis and Characterization of Potent Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Dihydrofolate Reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 4056-4066, 2010.

SERAFIM, R. A. M.; GONÇALVES, J. E.; SOUZA, F. P.; LOUREIRO, A. P. M.; STORPIRTIS, S.; KROGH, R.; ANDRICOPULO, A. D.; DIAS, L. C.; FERREIRA, E. I. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Hybrid Bioisoster Derivatives of N-acylhydrazone and Furoxan Groups With Potential and Selective Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 82, n. [s], p. 418-425, 2014.

SHARMA R., PANDEY A. K., SHIVAHARE R., SRIVASTAVA K., GUPTA S., CHAUHAN P. M. S., Triazino indole–quinoline hybrid: A novel approach to antileishmanial agentes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, India, v. 24(1) p. 298-301, 2013.

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

SMITH, A. L.; STEVENSON, G. I.; SWAIN, C. J.; CASTRO, J. L. Traceless solid phase synthesis of 2,3-disubstituted indoles. **Tetrahedron Letters**, v. 39, p. 8317-8320, 1998.

SOARES R. O. A., ECHEVARRIA, A., BELLINENY M. S. S., PINHO R. T., LEO, R. M.M., SEGUINS W. S., MACHADO G. M., CANTO-CAVALHEIRO M. M., LEON, L. L., Evaluation of thiosemicarbazones and semicarbazones as potential agentes anti-*Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v.129, p. 381–387, 2011.

SOEIRO, M. N. C.; Castro, S. L.; Screening of Potential anti-*Trypanosoma cruzi* Candidates: *In Vitro* and *In Vivo* Studies. **The open medicinal chemistry journal**, v.5, p. 21-30, 2011.

SOUZA, E.M. Modulação induzida por estradiol na fase aguda da infecção por

*Trypanosoma cruzi* em camundongos. Tese (Mestrado em Saúde Pública), Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

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

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

SZAJNMAN, S. H., GARCÍA LIÑARES, G. E., LI, Z.H., JIANG, C., GALIZZI, M., BONTEMPI, E. J., FERELLA, M., MORENO, S. N., DOCAMPO, R., RODRIGUEZ, J. B. Synthesis and biological evaluation of 2-alkylaminoethyl-1, 1-bisphosphonic acids against *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* targeting farnesyl diphosphate synthase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.16, p. 3283–3290, 2008.

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

THOMAS G., **Química medicinal: uma introdução**. 2º Edição. Editora Guanabara, Koogan; 2003.

ULRICH, P. & CERAMI, A. Trypanocidal 1,3-arylenediketone bis (guanylhydrazone). Structure activity relationships among substituted and heterocyclic analogues. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 3540, 1984.

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

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

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

VIEGAS-JUNIOR, C.; DANUELLO, A.; SILVA, V. B.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. S. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 17, p. 1829-1852, 2007.

VINHAES M. C, DIAS J. C. P., Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16(supl. 2), p. 7-12, 2000.

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, suplemento 2, 2000.

WALZER, P. D.; FOY, J.; RUNCK, J.; STEELE, P.; WHITE, M.; KLEIN, R. S.; OTTER, B. A.; SUNDBERG, R. J. Guanylhydrazones in therapy of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunosuppressed rats. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.38, p. 2572-2576, 1994.

WHO, World Health Organization. Chagas disease.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> Acessado em: 17/10/2015.

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

YAN, W., MORENO, S. N. J. A method to assess invasion and intracellular replication of *Trypanosoma cruzi* based on differential uracil incorporation. **Journal of Immunological Methods**, v. 220, p. 123–128, 1998.

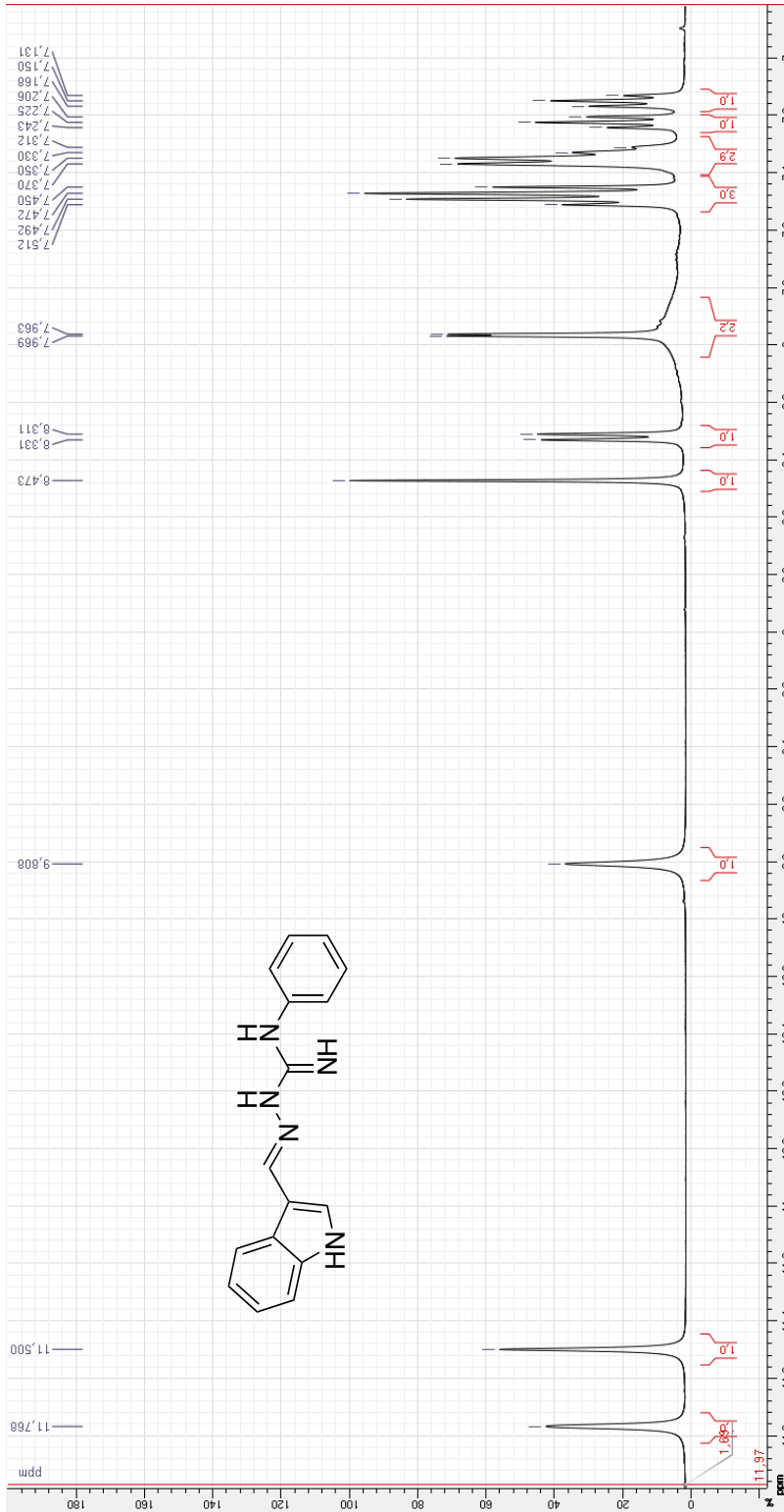
YANO, C. Açaí pode transmitir doença de Chagas. EXAME.com. Brasil, maio 2010. Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/tecnologia/noticias/acai-pode-transmitir-doenca-chagas-558972>>. Acesso em: 21 de dez. de 2013.



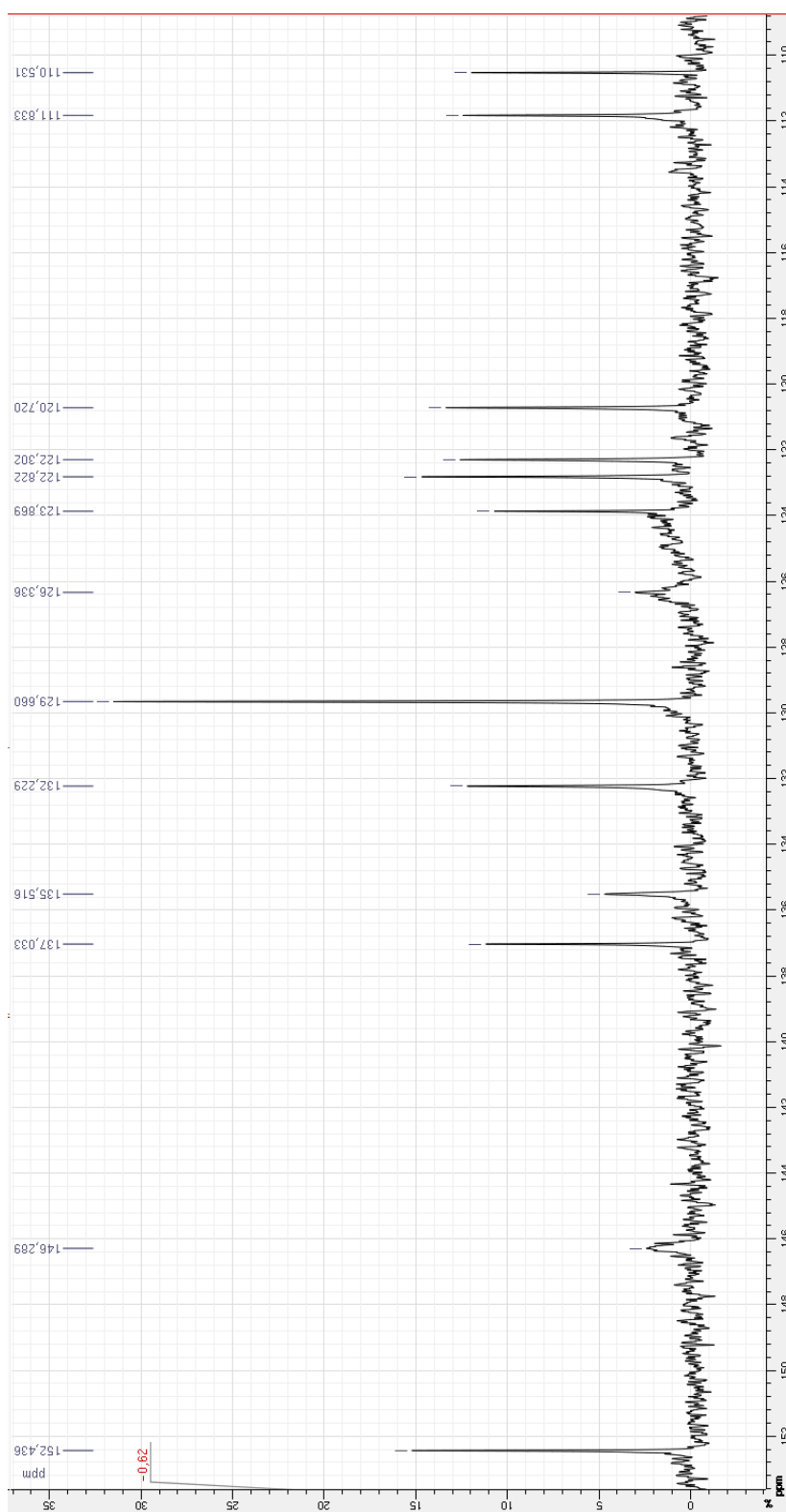
# **Anexos**

# Anexo A

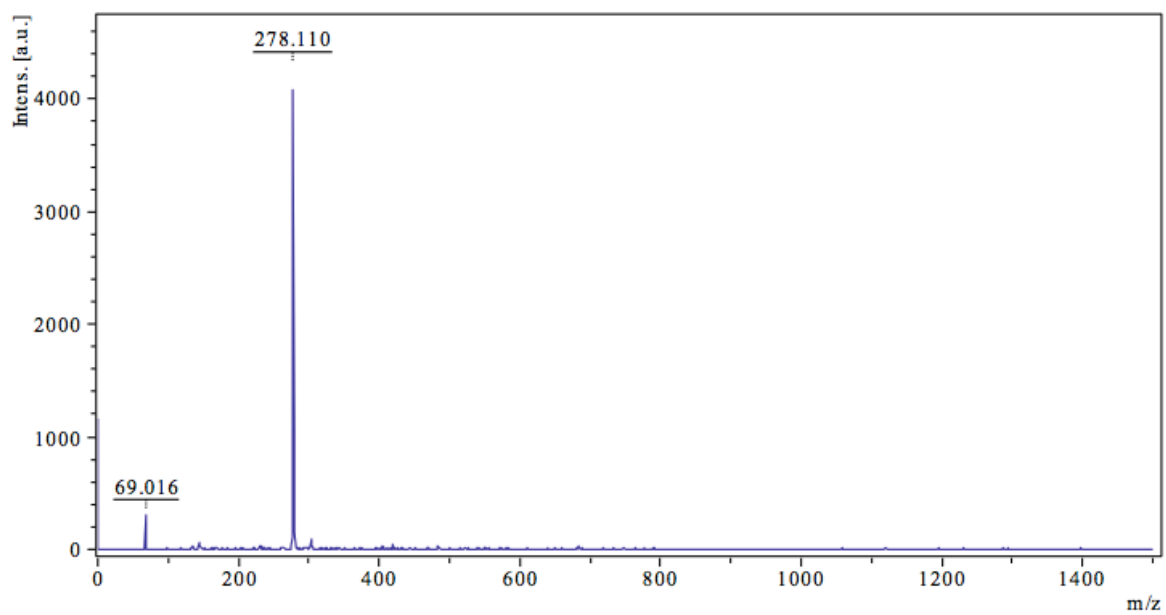
## Espectro de RMN $^1\text{H}$ LQM-29 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ )



Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  LQM-29 (100 MHz, DMSO- $d_6$ )

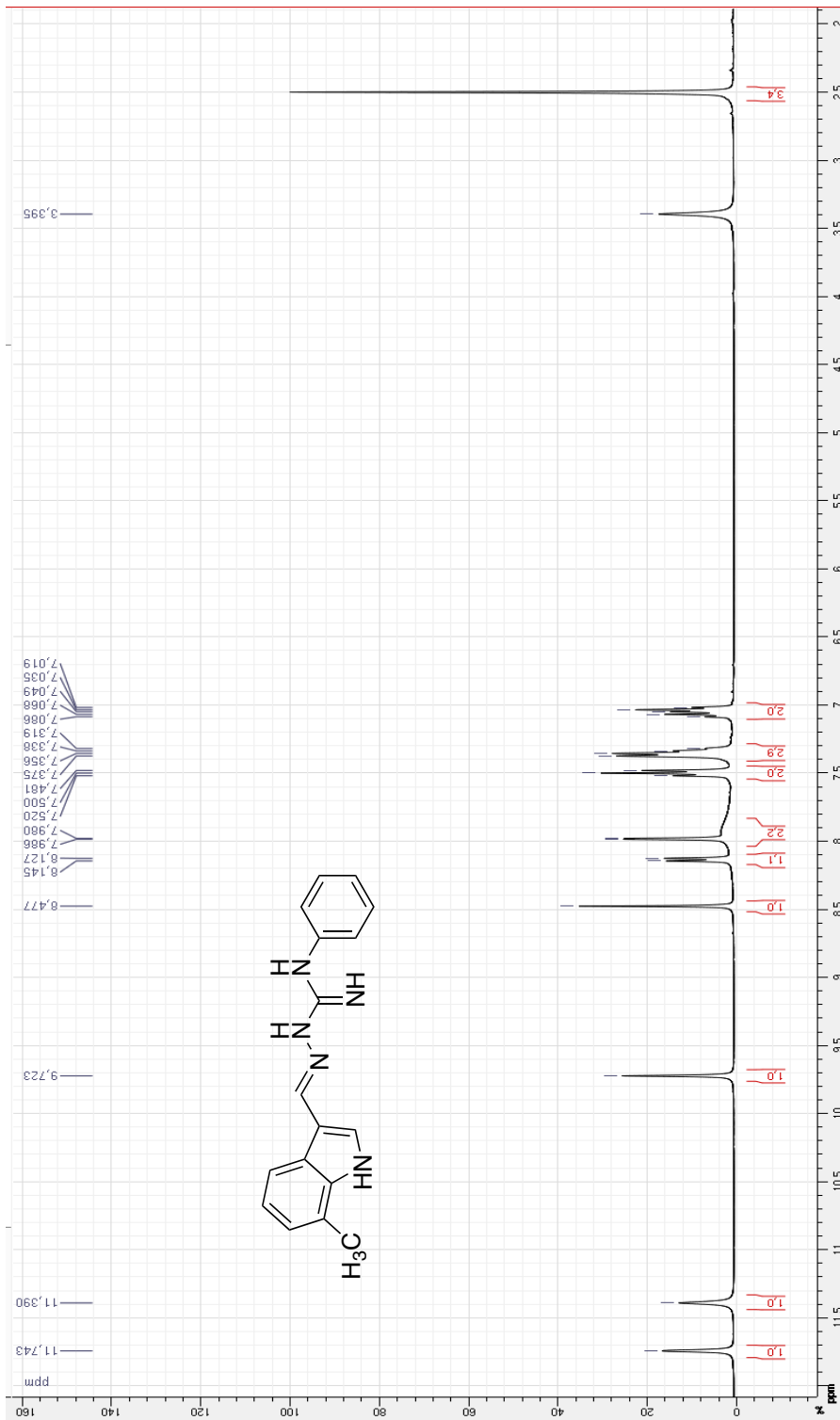


# Espectro de massas LQM-29

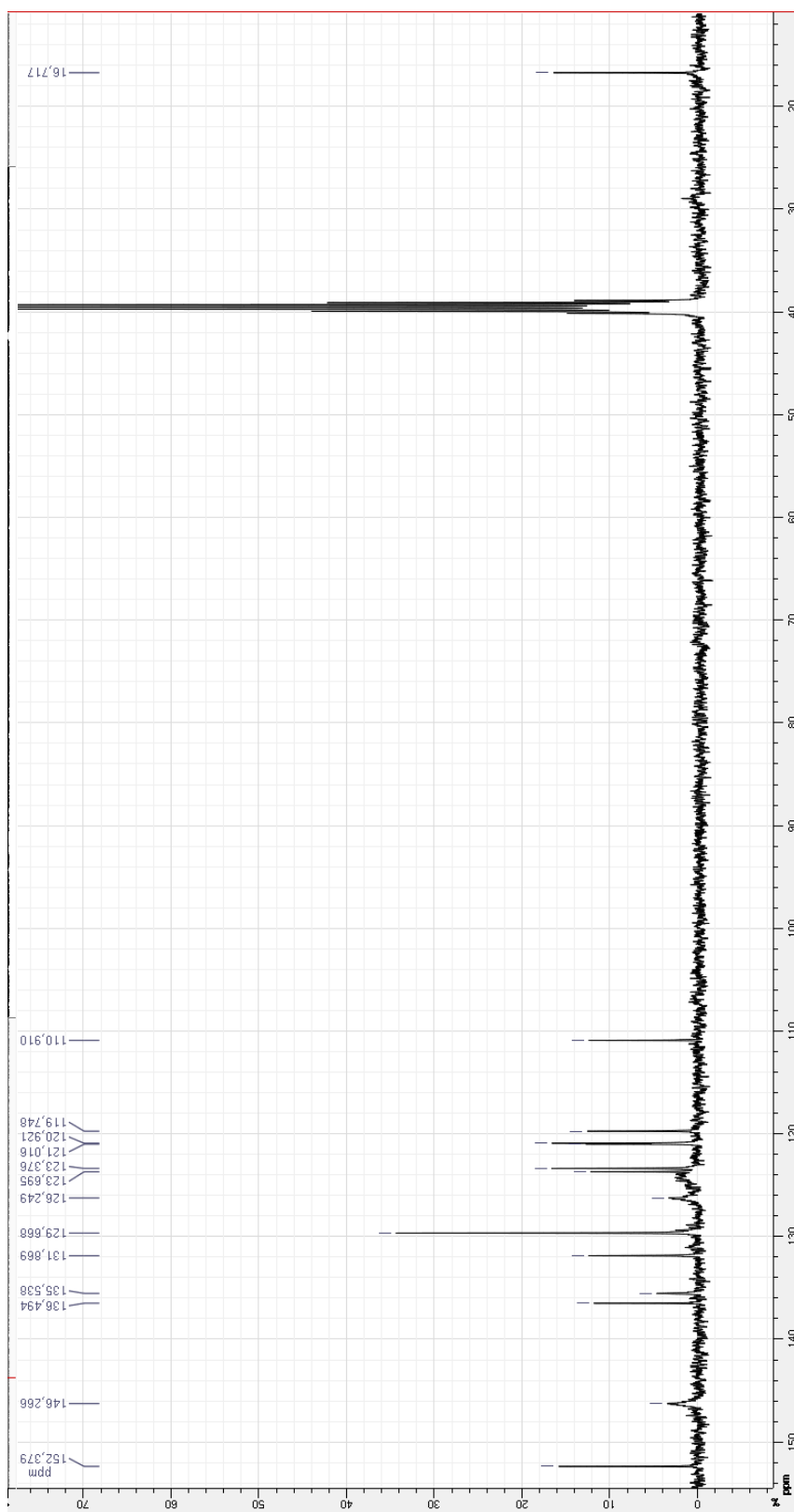


## Anexo B

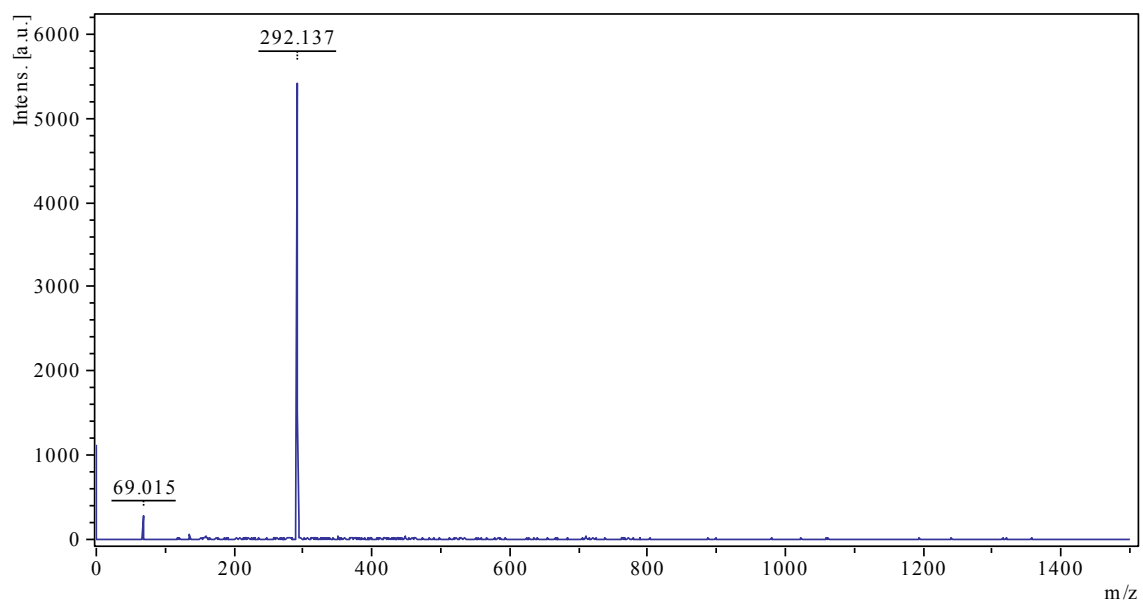
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  LQM-30 (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  LQM-30 (100 MHz, DMSO- $d_6$ )

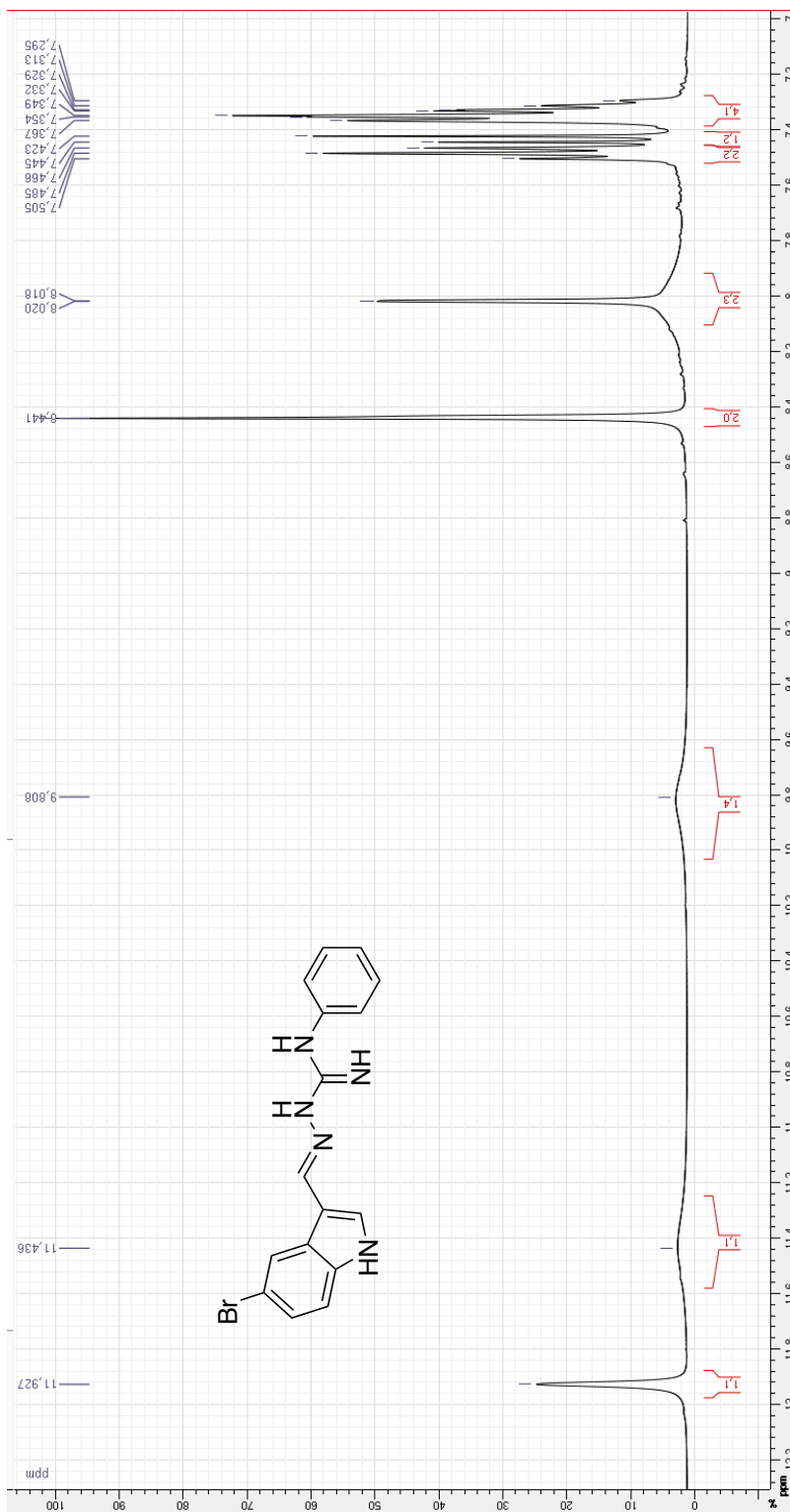


# Espectro de massas LQM-30



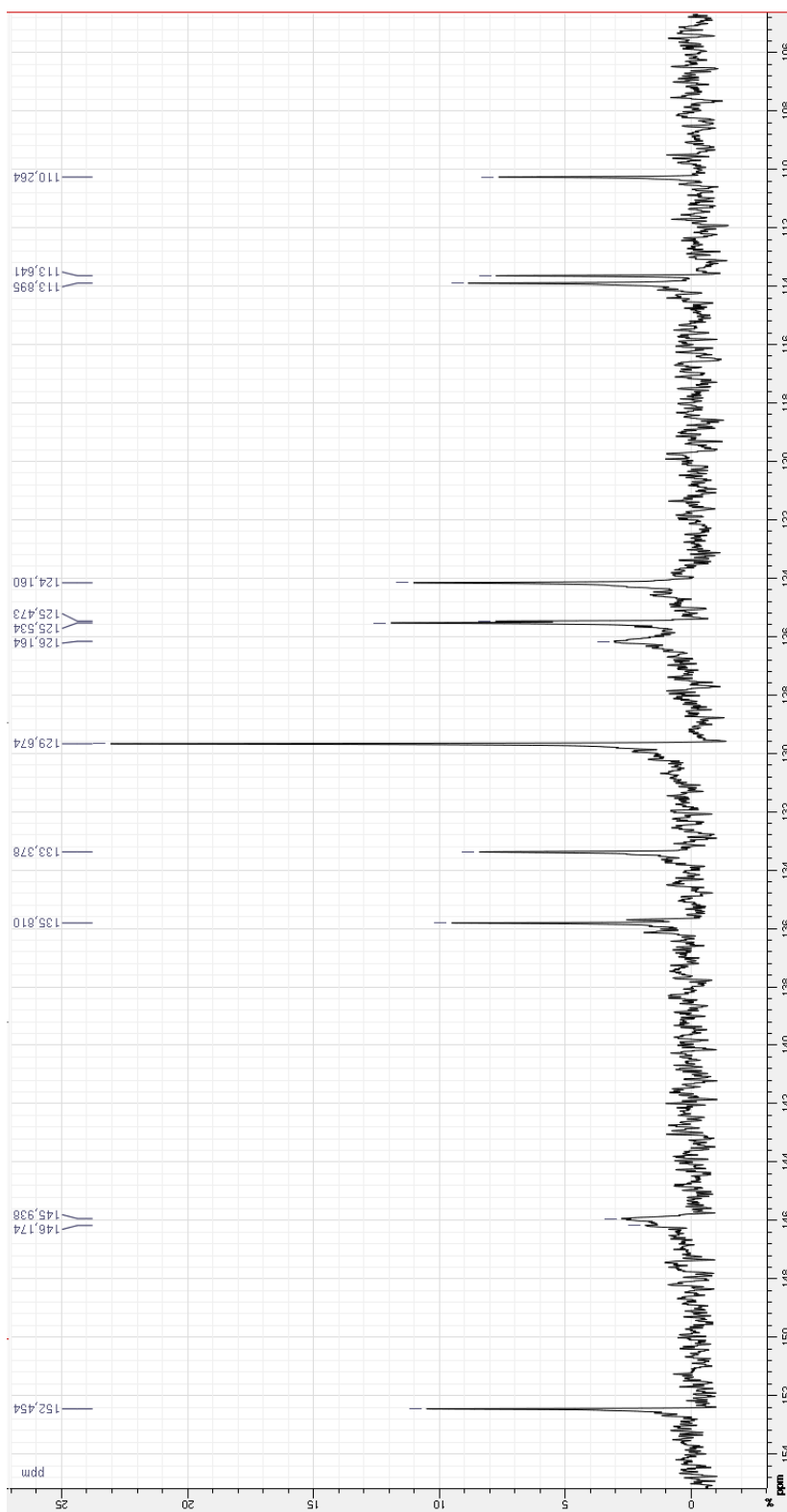
# Anexo C

## Espectro de RMN $^1\text{H}$ LQM-31(400 MHz, DMSO- $d_6$ )

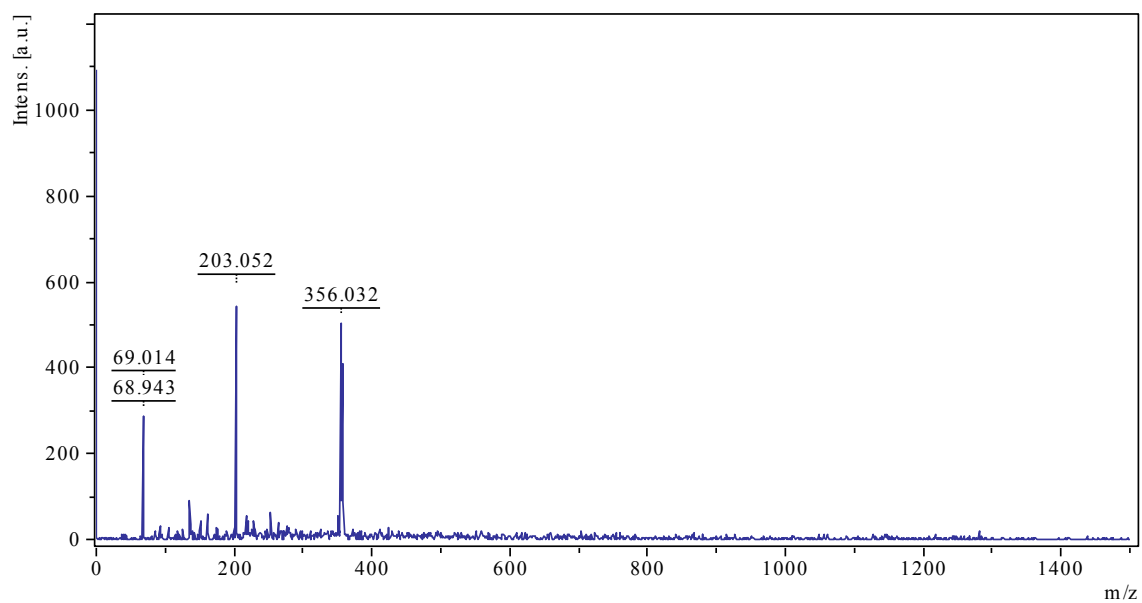




Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  LQM-31(100 MHz, DMSO- $d_6$ )

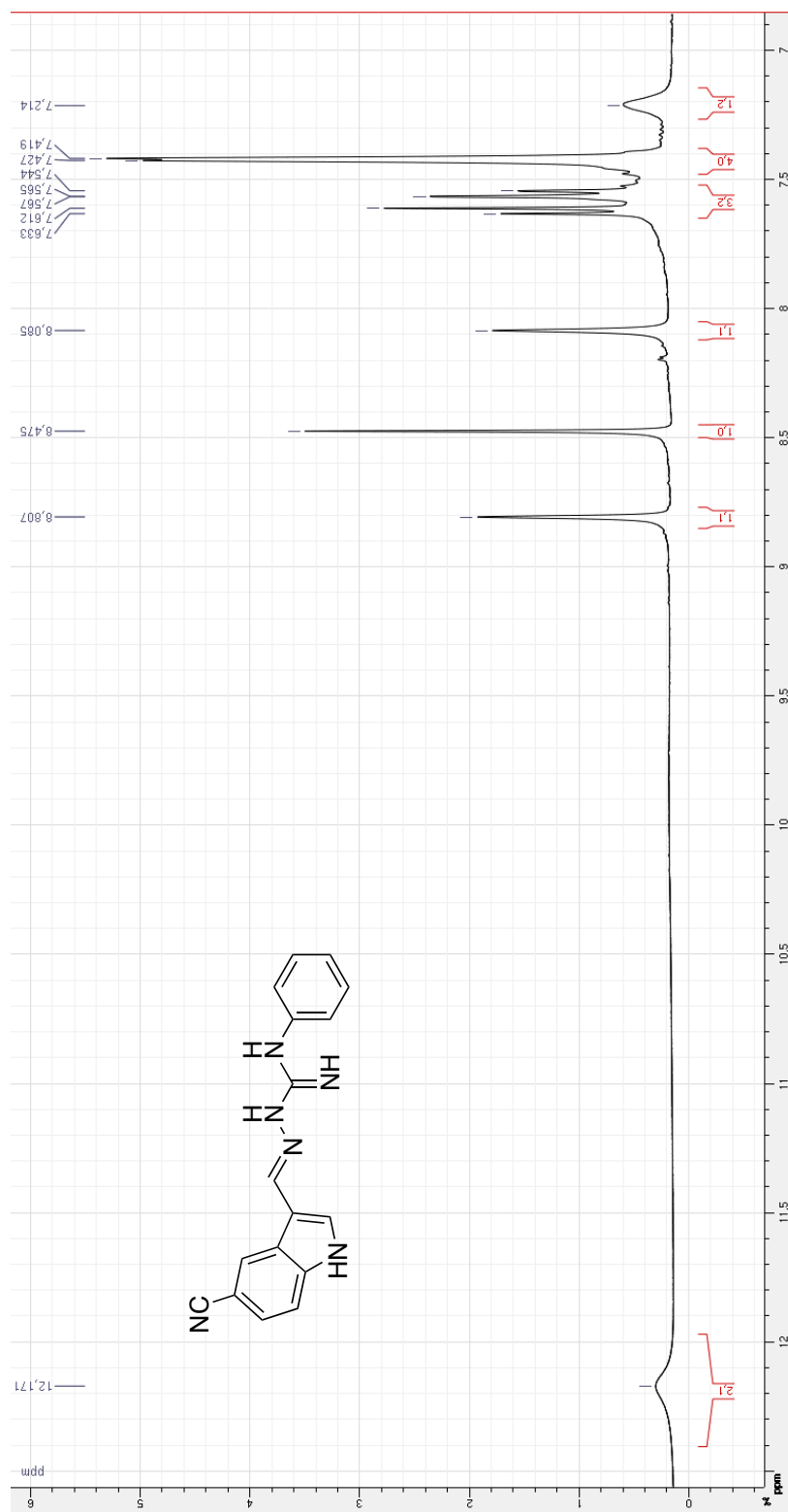


# Espectro de massas LQM-31

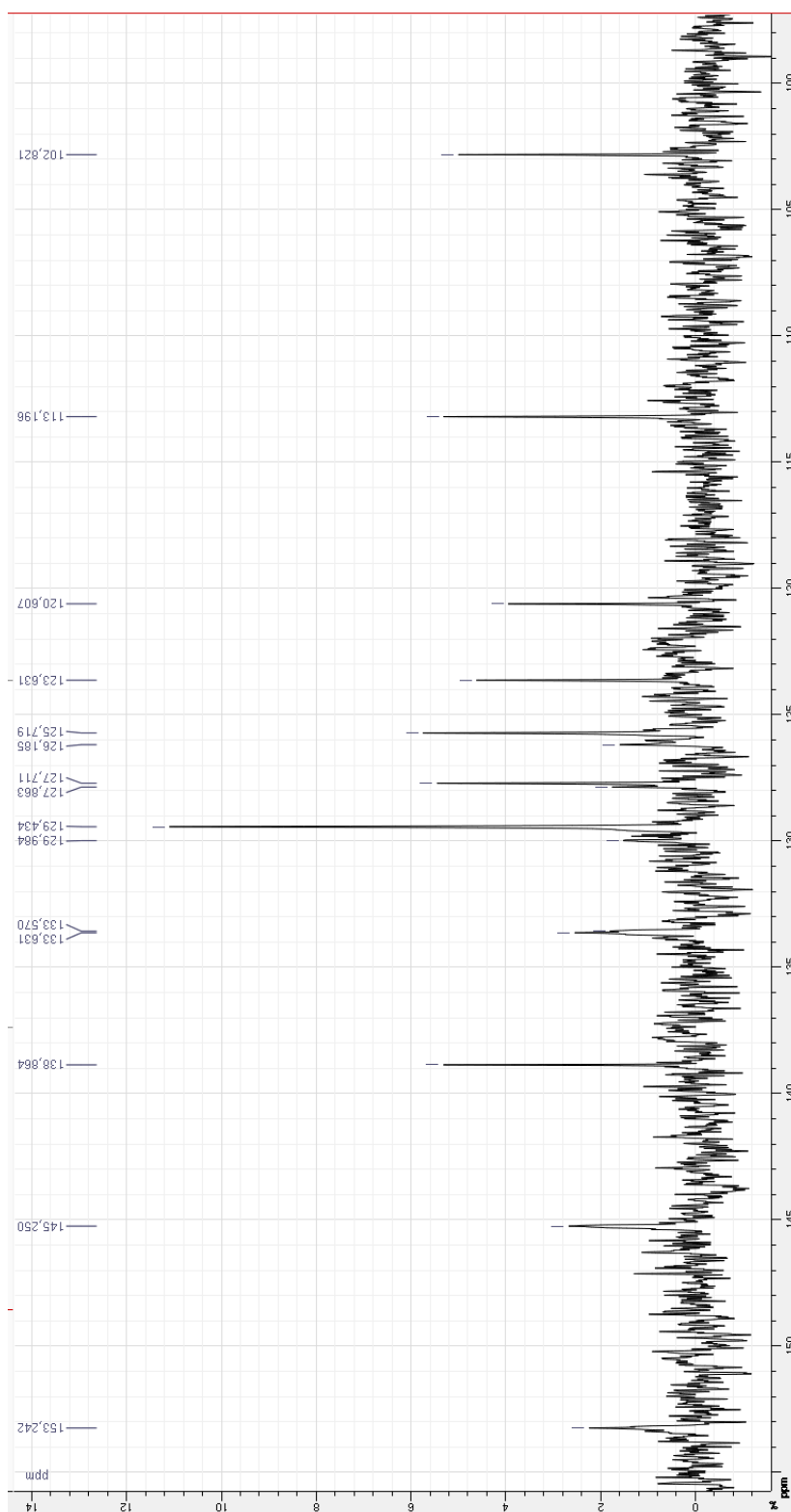


# Anexo D

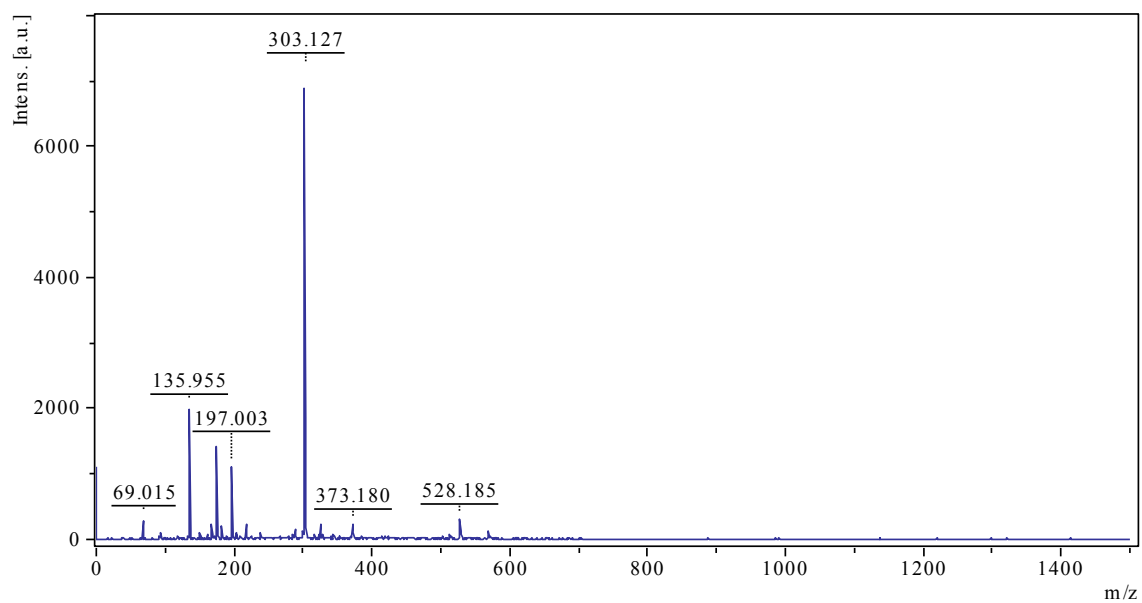
## Espectro de RMN $^1\text{H}$ LQM-32 (400 MHz, DMSO- $d_6$ )



# Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ LQM-32 (100 MHz, DMSO- $d_6$ )

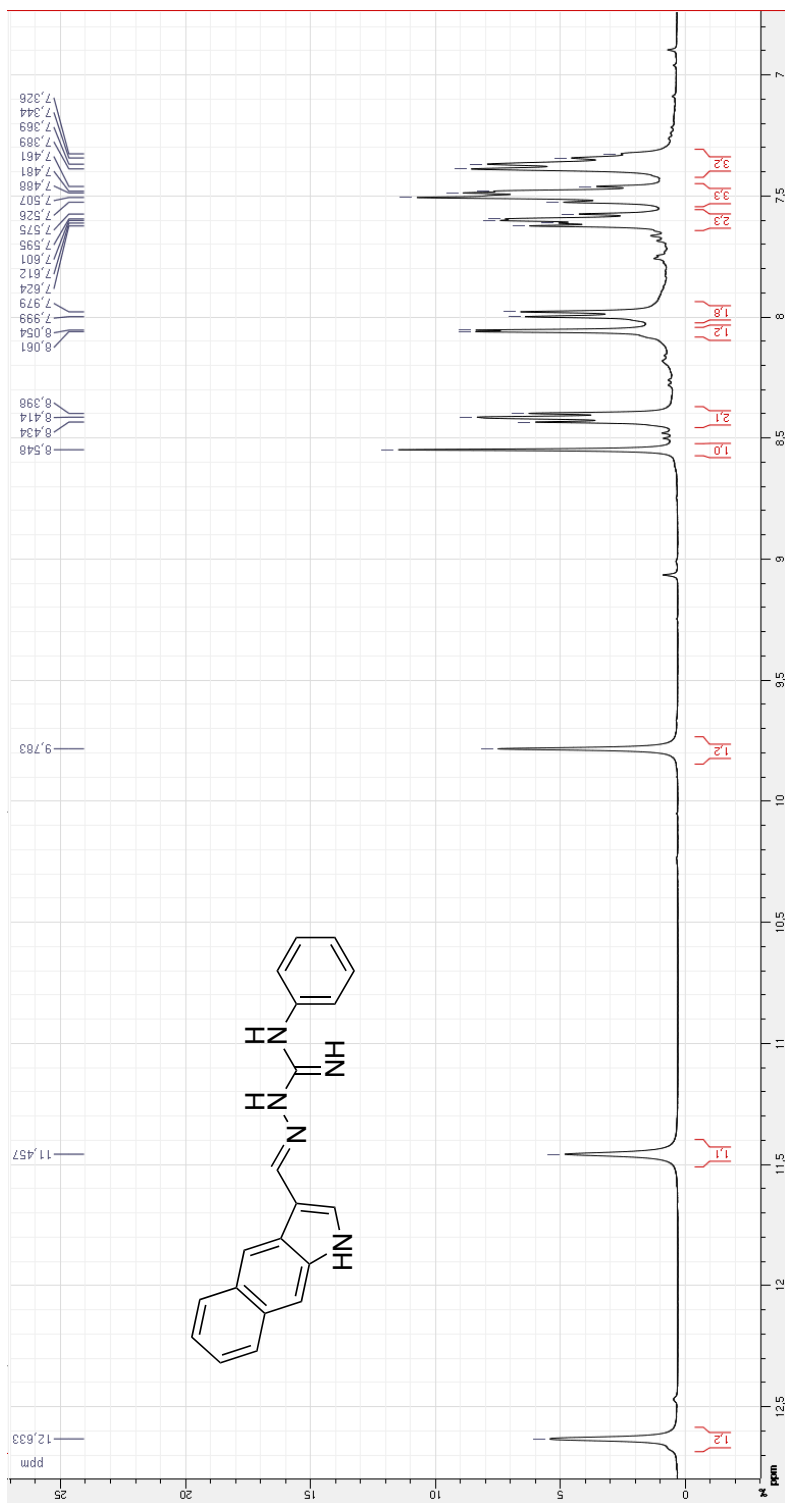


# Espectro de massas LQM-32

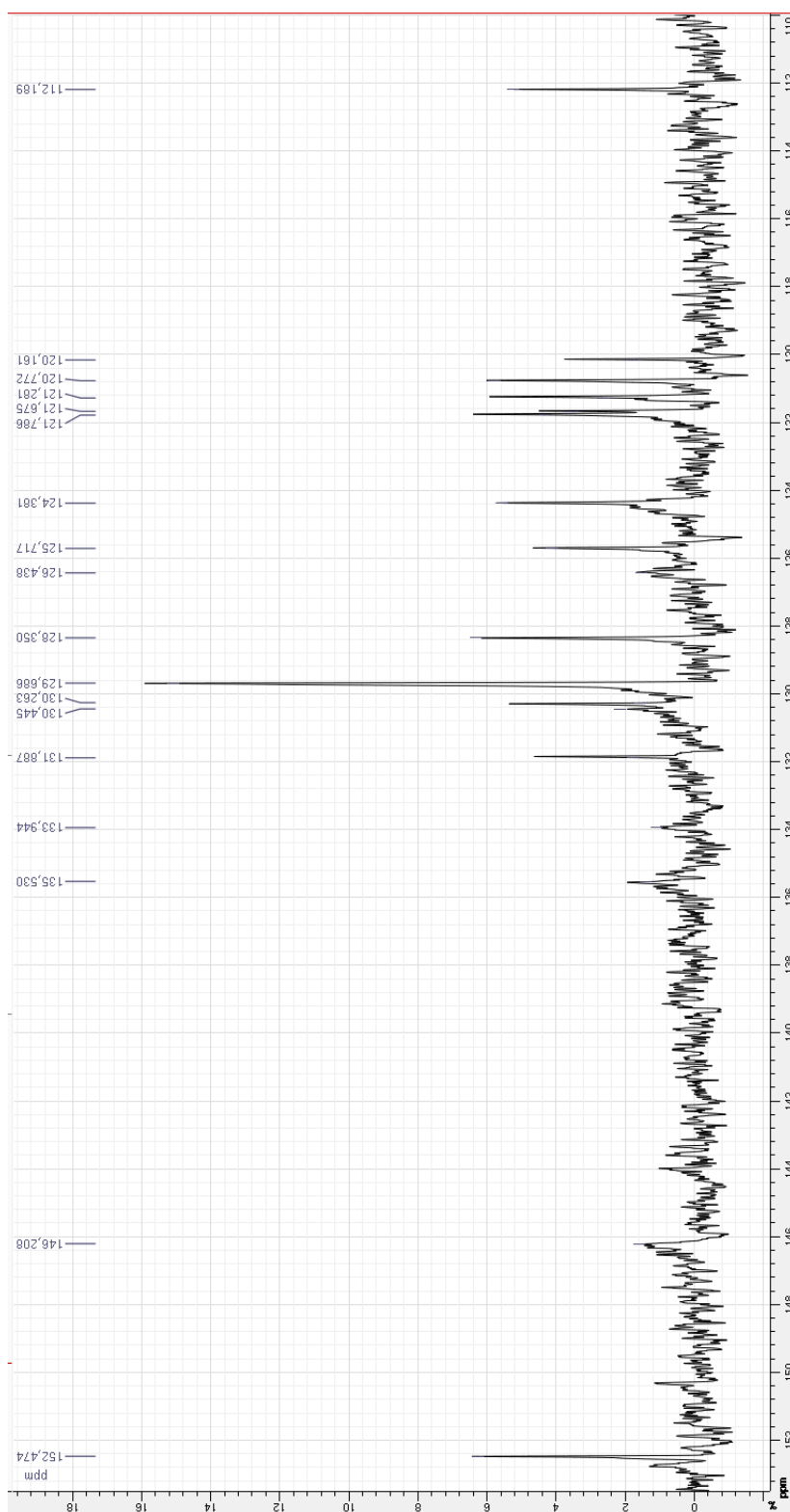


# Anexo E

## Espectro de RMN $^1\text{H}$ LQM-34 (400 MHz, DMSO- $d_6$ )



Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  LQM-34 (100 MHz, DMSO- $d_6$ )



# Espectro de massas LQM-34

