

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JOSÉ VAZ CARDOSO MACHADO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE DERIVADOS AZÓLICOS DO
EUGENOL: CONTRIBUIÇÃO NA BUSCA DE NOVOS AGENTES
TRIPANOSSOMICIDAS**

ALFENAS/MG

2024

JOSÉ VAZ CARDOSO MACHADO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE DERIVADOS AZÓLICOS DO
EUGENOL: CONTRIBUIÇÃO NA BUSCA DE NOVOS AGENTES
TRIPANOSSOMICIDAS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas
Orientador: Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho
Coorientadores: Prof^ª. Dr^ª. Livia de Figueiredo Diniz e Prof. Dr. Lucas Lopardi Franco
Colaboradoras: Prof^ª. Dr^ª. Maria Emília da Silva Pereira de Souza e Prof^ª. Dr^ª. Maria Elizabeth Tiritan.

ALFENAS/MG

2024

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfnas
Biblioteca Central

Machado, José Vaz Cardoso.

Síntese e avaliação biológica de derivados azólicos do eugenol :
contribuição na busca de novos agentes tripanossomicidas / José Vaz
Cardoso Machado. - Alfnas, MG, 2024.

193 f. : il. -

Orientador(a): Diogo Teixeira Carvalho.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de
Alfnas, Alfnas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Doença de Chagas. 2. Eugenol. 3. Azois. 4. Hibridização. 5.
Enantiômero. I. Carvalho, Diogo Teixeira, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

Ficha catalográfica gerada no Sistema Eletrônico do SIBI/UNIFAL-MG

JOSÉ VAZ CARDOSO MACHADO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE DERIVADOS AZÓLICOS DO
EUGENOL: CONTRIBUIÇÃO NA BUSCA DE NOVOS AGENTES
TRIPANOSSOMICIDAS**

O presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovado em: 27 de agosto de 2024.

Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho
Presidente da banca Examinadora
Instituição Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Daniel Henriques Soares Leal
Instituição: Universidade Federal de Itajubá

Profa. Dra. Danielle Ferreira Dias
Instituição Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Marcos José Marques
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Diogo Teixeira Carvalho, Professor do Magistério Superior**, em 30/10/2024, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1323195** e o código CRC **1ED2345E**.

Dedico este trabalho aos professores Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro (*in memorian*) e Carlos Alberto Mansour Fraga (*in memorian*), que são perdas irreparáveis para a educação e a ciência brasileira e para a química medicinal internacional.

Especialmente, dedico aos meus pais, Charles e Dalva, à minha afilhada Rania, à minha avó Dalva e meu avô Geraldo (*in memorian*) e à minha tia Dalge, que me mostraram que o amor não tem limites.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Charles e Dalva, pelo incentivo constante, pelo investimento e conforto garantido para que esse trabalho pudesse ser realizado da melhor maneira possível. Pela confiança e paciência.

Ao orientador desse trabalho, professor Diogo, pelo excelente planejamento na condução de minha orientação. Pelo cuidado e respeito, pela dedicação, paciência e confiança ao longo de mais de 7 anos. Pela amizade. Pela referência como professor e pelo conhecimento que me possibilitou adquirir.

À professora Livia pela recepção em seu grupo. Pelo auxílio e pela orientação, dedicação e instrução por mais de 3 anos. Pelas produtivas reuniões e discussões. Pelo respeito e pela atenção, paciência e confiança. Pelo seu grupo de trabalho, em especial à Valquíria pela importante participação neste trabalho, pela amizade e paciência.

Ao professor Lucas pelas intensas contribuições. Pelas dicas e ensinamentos e pelos diversos momentos de descontração. Pela referência que foi na interpretação e construção de meus espectros. Pela compreensão e paciência.

Às alunas de iniciação científica Clara e Sarah pelo auxílio no trabalho e pela oportunidade que tive de contribuir em sua orientação.

Às professoras Emília e Beth pela recepção na FFUP, pelas instruções, orientações, pelo respeito e cuidado. À doutora Sara pela orientação durante todo período de estágio no LQOF.

Aos professores Thiago e Saulo e ao Cleydson pela realização das análises de espectrometria de massas.

Aos professores Danielle, Rudy e Thiago pelo aceite em compor minha banca de mudança de nível e pelo entendimento de que o projeto poderia avançar nesse sentido.

Aos professores Ricardo e Ivo pelas contribuições em minha banca de qualificação.

Aos professores Danielle, Daniel, Marcelo e Marcos pelas contribuições em minha defesa de tese.

À professora Jaqueline pelo espaço cedido em tempos difíceis de pandemia e à Karen pela intensa contribuição neste trabalho.

Aos demais familiares e amigos pela compreensão de minha ausência.

À Universidade Federal de Alfenas pelos longos 10 anos de formação e pela excelência como instituição. Pelo acolhimento. Pela saudade que deixa. Pelas oportunidades e pelo recebimento da premiação de menção honrosa. Ao seu corpo docente, técnico e demais servidores pela contribuição, direta ou indireta, para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG pela excelência e cuidado com seus alunos, pela sua estruturação e solidez.

Ao LQFar e todos meus colegas pela leveza que trouxeram aos nossos dias. Ao técnico Leandro pelas colaborações.

Ao Laboratório de Patologia e Parasitologia da UNIFAL-MG e seus integrantes pela solicitude, carinho e colaborações.

Ao LQOF da FFUP pelo espaço cedido e pelas contribuições.

À Universidade Federal de São João del-Rey Campus Divinópolis pelo espaço e pelas contribuições.

Aos órgãos de financiamento CAPES, CNPq e FAPEMIG.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

“Por um fármaco verde-amarelo, que fale português e seja desenvolvido por uma indústria nacional.”

BARREIRO, Eliezer Jesus de Lacerda. LASSBio: 20 anos. 2014.

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

ROSA, João Guimarães. Grande Sertão: Veredas, 1956.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo geneticamente diverso protozoário parasito *Trypanosoma cruzi*, está amplamente distribuída na América Latina, com elevada morbimortalidade, e tem se disseminado em países não endêmicos. Somente dois fármacos são aprovados para o seu tratamento, com atividade limitada, regimes terapêuticos prolongados e baixa adesão devido à graves efeitos adversos. Entre os principais fármacos em estudo para este propósito encontra-se a classe de fármacos azólicos, extremamente ativos em estudos *in vitro* e *in vivo* durante o tratamento, mas ainda incapazes de levar à eliminação sustentada do parasito em modelos animais e estudos clínicos. O eugenol é um fenilpropanoide natural ativo contra *T. cruzi* com propriedades antimicrobianas, possui estrutura promissora para o desenvolvimento de derivados potencialmente ativos contra *T. cruzi*. A técnica de hibridização molecular é uma aliada para este propósito e foi utilizada para a obtenção de híbridos inéditos contra o protozoário *T. cruzi*. Foram planejados dezoito híbridos entre subunidades farmacofóricas de azóis e fenilpropanoides, previamente validados quanto aos parâmetros farmacocinéticos ideais para fármacos, como potenciais inibidores da biossíntese de ergosterol através da interferência com TcCYP51. Seu plano sintético foi construído a partir de análise retrossintética e definição de rota sintética partindo do eugenol, por nitração aromática e/ou *O*-alquilação, para obter cinco derivados. A partir desses fenilpropanoides foram sintetizados seis epóxidos utilizando ácido *m*-cloroperbenzóico, seguido de suas aberturas com nucleófilos, como imidazol, 1,2,4-triazol e azida de sódio. Isso levou a obtenção de doze híbridos e cinco intermediários de azida, posteriormente convertidos em híbridos com a subunidade 1,2,3-triazol por reação de cicloadição polar. A obtenção de dezessete híbridos, caracterizados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas, permitiu identificar seu baixo potencial de toxicidade até 200 µg.mL⁻¹ em estudos de viabilidade celular *in vitro* com resazurina frente a células Vero e H9c2 por microdiluição seriada. Os dezessete híbridos foram avaliados por microscopia em ensaio de microdiluição seriada contra formas clinicamente relevantes de *T. cruzi* cepa Y, sendo inativos contra formas amastigotas. Curiosamente, dois deles foram ativos contra formas tripomastigotas, verificado por microscopia em câmara de Neubauer. Sendo os híbridos misturas racêmicas de enantiômeros, o mais ativo, com EC₅₀ de 7,2 µmol.L⁻¹ e IS de 145, foi resolvido em suas formas enantiomericamente puras por cromatografia líquida de alta eficiência com coluna preenchida com fase estacionária quiral fundamentada em celulose. Os enantiômeros isolados, com excesso enantiomérico maior que 99%, demonstraram inespecificidade entre si, com EC₅₀ em torno de 20 µmol.L⁻¹, de forma que sua resolução não deve ser essencial para atividade. Esses resultados contra formas tripomastigotas chamaram atenção pela possibilidade de o híbrido mais ativo atuar por mecanismo de ação diferente do planejado. Assim, observa-se que o planejamento de híbridos entre eugenol e azóis foi uma estratégia de sucesso com identificação de híbridos com baixo potencial de toxicidade e até 25 vezes mais ativo que seu precursor, o eugenol. Além disso, a possibilidade de ação através de um novo mecanismo traz a relevante importância desse desenvolvimento e mais estudos serão necessários para confirmar essa atividade.

Palavras-chave: doença de Chagas; eugenol; azóis; hibridização; enantiômeros.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the genetically diverse protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is widely distributed in Latin America, with high morbidity and mortality, and has been disseminated in non-endemic countries. Only two drugs are approved for its treatment, with limited activity, prolonged therapeutic regimens and low adherence due to serious adverse effects. Among the main drugs being studied for this purpose is a class ofazole drugs, extremely active in *in vitro* and *in vivo* studies during treatment, but still unable to lead to sustained elimination of the parasite in animal models and clinical studies. Eugenol is a natural phenylpropanoid active against *T. cruzi* with antimicrobial properties, and has a promising structure for the development of ecological commitments against *T. cruzi*. A molecular hybridization technique is an ally for this purpose and was used to obtain novel hybrids against the protozoan *T. cruzi*. Eighteen hybrids between pharmacophoric subunits of azoles and phenylpropanoids, previously validated for optimal pharmacokinetic configurations for drugs, were designed as potential inhibitors of ergosterol biosynthesis through interference with CYP51. Their synthetic plan was constructed from retrosynthetic analysis and definition of a synthetic route starting from eugenol, by aromatic nitration and/or *O*-alkylation, to obtain five results. From these phenylpropanoids, six epoxides were synthesized using *m*-chloroperbenzoic acid, followed by their openings with nucleophiles, such as imidazole, 1,2,4-triazole and sodium azide. This led to the obtaining of twelve hybrids and five azide intermediates, later converted into hybrids with the 1,2,3-triazole subunit by polar cycloaddition. The production of these hybrids, characterized by spectroscopic and spectrometric techniques, allowed us to identify their low toxicity potential up to 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in *in vitro* cell engineering studies with resazurin against Vero and H9c2 cells by serial microdilution. The seventeen hybrids were evaluated by microscopy in a serial microdilution assay against clinically relevant forms of *T. cruzi* strain Y, being inactive against amastigote forms. Interestingly, two of them were active against trypomastigote forms, selected by microscopy in the Neubauer chamber. Since the hybrids are racemic mixtures of enantiomers, the most active, with EC_{50} of 7.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and IS of 145, was resolved in its enantiomerically pure forms by high-performance liquid chromatography with a column packed with a chiral stationary phase based on cellulose. The isolated enantiomers, with enantiomeric excess greater than 99%, showed nonspecificity among themselves, with EC_{50} around 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, so that their resolution should not be essential for activity. These results against trypomastigote forms drew attention to the possibility that the most active hybrid acts by a mechanism of action different from the one planned. Thus, it can be observed that the design of hybrids between eugenol and azoles was a successful strategy with the identification of hybrids with low toxicity potential and up to 25 times more active than their precursor, eugenol. In addition, the possibility of action through a new mechanism brings relevant importance to this development and further studies will be necessary to confirm this activity.

Keywords: Chagas disease; eugenol; azoles; hybridization; enantiomers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	22
Figura 2 -	Estruturas químicas dos fármacos aprovados para o tratamento da DC.....	23
Figura 3 -	Estruturas químicas de fármacos e candidatos à fármacos em estudo para o tratamento da DC	25
Figura 4 -	Estruturas químicas de fenilpropanoides e derivados antimicrobianos	28
Figura 5 -	Estruturas químicas de híbridos bioativos obtidos a partir de 12 ou 13	30
Figura 7 -	Estrutura geral dos híbridos	31
Figura 7 -	Rota retrossintética para obtenção dos híbridos.....	32
Figura 8 -	Rota sintética desenvolvida para síntese dos intermediários e dos híbridos....	33
Figura 9 -	Mecanismo proposto para epoxidação.....	35
Figura 10 -	Mecanismo proposto para reação de formação de 1,2,3-triazol	37
Figura 11 -	Cromatograma da mistura racêmica e os respectivos enantiômeros de interesse.....	40
Figura 12 -	Cromatograma representando os enantiômeros obtidos isoladamente.	41
Figura 13 -	Percentual de inibição da viabilidade de células Vero incubadas por 24h em diluições seriadas de 400 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dos híbridos, avaliados por ensaio com resazurina	43
Figura 14 -	Percentual de mortalidade de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> cepa Y incubados por 24h em diluições seriadas de 100 a 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ dos intermediários e híbridos, contados por microscopia em câmara de Neubauer	47
Figura 15 -	Percentual de mortalidade de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> cepa Y incubados por 24h com diferentes concentrações de 60 e de seus enantiômeros isolados, contados por microscopia em câmara de Neubauer...	49
Figura 16 -	Reação de nitração	51
Figura 17 -	Reações de <i>O</i> -metilação ou <i>O</i> -benzilação	52
Figura 18 -	Reação de epoxidação.....	54
Figura 19 -	Reação de abertura de epóxido com nucleófilo	57
Figura 20 -	Reação para formação de 1,2,3-triazol	64
Figura 21 -	Reação de desproteção de 1,2,3-triazol dissustituído	67
Figura 22 -	Espectro de absorção na região do IV de 40	84
Figura 23 -	Espectro de RMN de ^1H de 40 (CDCl_3 , 300 MHz).	85
Figura 24 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 40 (CDCl_3 , 75 MHz)..	86

Figura 25 -	Espectro de absorção na região do IV de 41	87
Figura 26 -	Espectro de RMN de ^1H de 41 (CDCl_3 , 300 MHz).	88
Figura 27 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 41 (CDCl_3 , 75 MHz)..	89
Figura 28 -	Espectro de absorção na região do IV de 42	90
Figura 29 -	Espectro de RMN de ^1H de 42 (CDCl_3 , 300 MHz).	91
Figura 30 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 42 (CDCl_3 , 75 MHz)..	92
Figura 31 -	Espectro de absorção na região do IV de 43	93
Figura 32 -	Espectro de RMN de ^1H de 43 (CDCl_3 , 300 MHz).	94
Figura 33 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 43 (CDCl_3 , 75 MHz)..	95
Figura 34 -	Espectro de absorção na região do IV de 44	96
Figura 35 -	Espectro de RMN de ^1H de 44 (CDCl_3 , 300 MHz).	97
Figura 36 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 44 (CDCl_3 , 75 MHz)..	98
Figura 37 -	Espectro de absorção na região do IV de 45	99
Figura 38 -	Espectro de RMN de ^1H de 45 (CDCl_3 , 300 MHz).	100
Figura 39 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 45 (CDCl_3 , 75 MHz).	101
Figura 40 -	Espectro de absorção na região do IV de 46	102
Figura 41 -	Espectro de RMN de ^1H de 46 (CDCl_3 , 300 MHz).	103
Figura 42 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 46 (CDCl_3 , 75 MHz)	104
Figura 43 -	Espectro de absorção na região do IV de 47	105
Figura 44 -	Espectro de RMN de ^1H de 47 (CDCl_3 , 300 MHz).	106
Figura 45 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 47 (CDCl_3 , 75 MHz)	107
Figura 46 -	Espectro de absorção na região do IV de 48	108
Figura 49 -	Espectro de RMN de ^1H de 48 (CDCl_3 , 400 MHz).	109
Figura 48 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 48 (CDCl_3 , 100 MHz)	110
Figura 49 -	Espectro de absorção na região do IV de 49	111
Figura 50 -	Espectro de RMN de ^1H de 49 (CDCl_3 , 300 MHz).	112
Figura 51 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 49 (CDCl_3 , 75 MHz)	113
Figura 52 -	Espectro de EM de 49	114
Figura 53 -	Espectro de absorção na região do IV de 50	115
Figura 54 -	Espectro de RMN de ^1H de 50 (CDCl_3 , 300 MHz).	116
Figura 55	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 50 (CDCl_3 , 75 MHz)	117
Figura 56 -	Espectro de EM de 50	118
Figura 57 -	Espectro de absorção na região do IV de 51	119
Figura 58 -	Espectro de RMN de ^1H de 51 (CDCl_3 , 300 MHz).	120

Figura 59 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 51 (CDCl_3 , 75 MHz)	121
Figura 60 -	Espectro de EM de 51 .	122
Figura 61	Espectro de absorção na região do IV de 52 .	123
Figura 62 -	Espectro de RMN de ^1H de 52 (CDCl_3 , 300 MHz).	124
Figura 63 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 52 (CDCl_3 , 75 MHz)	125
Figura 64 -	Espectro de EM de 52 .	126
Figura 65 -	Espectro de absorção na região do IV de 53 .	127
Figura 66 -	Espectro de RMN de ^1H de 53 (CDCl_3 , 300 MHz).	128
Figura 67 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 53 (CDCl_3 , 75 MHz)	129
Figura 68 -	Espectro de EM de 53 .	130
Figura 69 -	Espectro de absorção na região do IV de 54 .	131
Figura 70 -	Espectro de RMN de ^1H de 54 (CDCl_3 , 300 MHz).	132
Figura 71 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 54 (CDCl_3 , 75 MHz)	133
Figura 72 -	Espectro de EM de 54 .	134
Figura 73 -	Espectro de absorção na região do IV de 55 .	135
Figura 74 -	Espectro de RMN de ^1H de 55 (CDCl_3 , 300 MHz).	136
Figura 75 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 55 (CDCl_3 , 75 MHz)	137
Figura 76 -	Espectro de EM de 55 .	138
Figura 77 -	Espectro de absorção na região do IV de 56 .	139
Figura 78 -	Espectro de RMN de ^1H de 56 (CDCl_3 , 300 MHz).	140
Figura 79 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 56 (CDCl_3 , 75 MHz)	141
Figura 80 -	Espectro de EM de 56 .	142
Figura 81 -	Espectro de absorção na região do IV de 57 .	143
Figura 82 -	Espectro de RMN de ^1H de 57 (CDCl_3 , 300 MHz).	144
Figura 83 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 57 (CDCl_3 , 75 MHz)	145
Figura 84 -	Espectro de EM de 57 .	146
Figura 85 -	Espectro de absorção na região do IV de 58 .	147
Figura 86 -	Espectro de RMN de ^1H de 58 (CDCl_3 , 300 MHz).	148
Figura 87 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 58 (CDCl_3 , 75 MHz)	149
Figura 88 -	Espectro de EM de 58 .	150
Figura 89 -	Espectro de absorção na região do IV de 59 .	151
Figura 90 -	Espectro de RMN de ^1H de 59 (CDCl_3 , 300 MHz).	152
Figura 91 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 59 (CDCl_3 , 75 MHz)	153
Figura 92 -	Espectro de EM de 59 .	154

Figura 93 -	Espectro de absorção na região do IV de 60	155
Figura 94 -	Espectro de RMN de ^1H de 60 (CDCl_3 , 400 MHz).	156
Figura 95 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 60 (CDCl_3 , 100 MHz).....	157
Figura 96 -	Espectro de EM de 60	158
Figura 97 -	Espectro de absorção na região do IV de 61	159
Figura 98 -	Espectro de RMN de ^1H de 61 (CDCl_3 , 300 MHz).	160
Figura 99 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 61 (CDCl_3 , 75 MHz).....	161
Figura 100 -	Espectro de absorção na região do IV de 62	162
Figura 101 -	Espectro de RMN de ^1H de 62 (CDCl_3 , 300 MHz).	163
Figura 102 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 62 (CDCl_3 , 75 MHz).....	164
Figura 103 -	Espectro de absorção na região do IV de 63	165
Figura 104 -	Espectro de RMN de ^1H de 63 (CDCl_3 , 300 MHz).	166
Figura 105 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 63 (CDCl_3 , 75 MHz).....	167
Figura 106 -	Espectro de absorção na região do IV de 64	168
Figura 107 -	Espectro de RMN de ^1H de 64 (CDCl_3 , 300 MHz).	169
Figura 108 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 64 (CDCl_3 , 75 MHz).....	170
Figura 109 -	Espectro de absorção na região do IV de 66	171
Figura 110 -	Espectro de RMN de ^1H de 66 (CDCl_3 , 300 MHz).	172
Figura 111 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 66 (CDCl_3 , 75 MHz).....	173
Figura 112 -	Espectro de absorção na região do IV de 67	174
Figura 113 -	Espectro de RMN de ^1H de 67 (CDCl_3 , 300 MHz).	175
Figura 114 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 67 (CDCl_3 , 75 MHz).....	176
Figura 115 -	Espectro de EM de 67	177
Figura 116 -	Espectro de absorção na região do IV de 68	178
Figura 117 -	Espectro de RMN de ^1H de 68 (CDCl_3 , 300 MHz).	179
Figura 118 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 68 (CDCl_3 , 75 MHz).....	180
Figura 119 -	Espectro de EM de 68	181
Figura 120 -	Espectro de absorção na região do IV de 69	182
Figura 121 -	Espectro de RMN de ^1H de 69 (CDCl_3 , 300 MHz).	183
Figura 122 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 69 (CDCl_3 , 75 MHz).....	184
Figura 123 -	Espectro de EM de 69	185
Figura 124 -	Espectro de absorção na região do IV de 70	186
Figura 125 -	Espectro de RMN de ^1H de 70 (CDCl_3 , 300 MHz).	187
Figura 126 -	Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 70 (CDCl_3 , 75 MHz).....	188

Figura 127 - Espectro de EM de 70	189
Figura 128 - Espectro de absorção na região do IV de 72	190
Figura 129 - Espectro de RMN de ^1H de 72 (CDCl_3 , 300 MHz).	191
Figura 130 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de 72 (CDCl_3 , 75 MHz)	192
Figura 131 - Espectro de EM de 72	193

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores de k_1 , α e R_s obtidos em diferentes proporções de fase móvel.	39
Tabela 2 -	Ordem de eluição, rotação específica e excesso enantiomérico dos enantiômeros resolvidos.....	42
Tabela 5 -	Reagentes utilizados para obtenção de 40, 41 e 42	52
Tabela 6 -	Dados físico-químicos e caracterização na região do IV de 40, 41 e 42	52
Tabela 7 -	Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C de 40, 41 e 42	52
Tabela 8 -	Reagentes utilizados para obtenção de 43, 44, 45, 46, 47 e 48	54
Tabela 9 -	Dados físico- químicos e caracterização na região do IV de 43, 44, 45, 46, 47 e 48	55
Tabela 10 -	Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C de 43, 44, 45, 46, 47 e 48	56
Tabela 11 -	Reagentes utilizados para abertura dos intermediários epóxido.....	57
Tabela 12 -	Dados físico-químicos e caracterização na região do IV e de EM de 49 a 54 . ..	58
Tabela 13 -	Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C de 49, 50, 51, 52, 53 e 54	58
Tabela 14 -	Dados físico-químicos e caracterização na região do IV e de EM de 55 a 60 . ..	60
Tabela 15 -	Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C de 55, 56, 57, 58, 59 e 60	60
Tabela 16 -	Dados físico- químicos e caracterização na região do IV de 61, 62, 63, 64 e 66	62
Tabela 17 -	Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C de 61, 62, 63, 64 e 66	62
Tabela 18 -	Reagentes utilizados para formação de 1,2,3-triazol	64
Tabela 19 -	Dados físico- químicos e caracterização na região do IV e de EM de 67 a 70 e 72	65
Tabela 20 -	Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C de 67, 68, 69, 70 e 72	65
Tabela 21 -	Reagentes utilizados para desproteção de 1,2,3-triazol dissustituído.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

α	- Fator de enantiosseletividade
aq.	- Aquoso
δ , em ppm	- Deslocamento químico, em partes por milhão
$\bar{\nu}$	- Número de onda
$^xJ_{y-z}$, Hz	- Constante de acoplamento via x ligações entre y e z, em Hertz
ATR	- <i>Attenuated total reflection</i>
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CC ₅₀	- Concentração de substância que induz metade do efeito citotóxico
CDCl ₃	- Clorofórmio deuterado
CYP51	- Esterol 14 α -desmetilase
DTU	- <i>Discrete typing units</i>
DC	- Doença de Chagas
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DMF	- Dimetilformamida
d	- Duplete
dd	- Duplete duplo
ddd	- Duplo duplete duplo
dtd	- Duplo tripleto duplo
DCM	- Diclorometano
DEPT	- <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMF	- <i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO- <i>d</i> ₆	- Dimetilsulfóxido deuterado
DMEM	- <i>Dulbecco modified eagle medium</i>
e.e.	- Percentual de excesso enantiomérico
EC ₅₀	- Concentração de substância que induz metade do efeito máximo
EM	- Espectrometria de massas
F.F.	- Faixa de fusão
IV	- Infravermelho
m	- Multiplete
M.M.	- Massa molar
MHz	- Mega-hertz
PAINS	- <i>Pan-assay interference structure</i>
PDB	- <i>Protein data bank</i>
R _s	- Fator de resolução
RMN	- Ressonância magnética nuclear
R _f	- Fator de retenção
s	- Simpleto
t.a.	- Temperatura ambiente
TMS	- Trimetilsililacetileno
TBAF	- Fluoreto de tetrabutylamônio
THF	- Tetraidrofurano
UV	- Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	Objetivo geral	20
1.1.2	Objetivos específicos	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	A DOENÇA DE CHAGAS	21
2.2	EUGENOL COMO FONTE ESTRUTURAL PARA NOVOS COMPOSTOS BIOATIVOS	26
2.3	A HIBRIDIZAÇÃO COMO ESTRATÉGIA PARA DOENÇAS MULTIALVO.....	28
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
3.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS E HÍBRIDOS.....	33
3.1.1	Reação de nitração aromática (Etapa i).....	34
3.1.2	Reações de <i>O</i> -alquilação (Etapas ii e iii)	34
3.1.3	Reações de epoxidação (Etapa iv).....	35
3.1.4	Reações de abertura dos epóxidos (Etapas v, vi e vii)	36
3.1.5	Reações de formação de 1,2,3-triazol (Etapa viii).....	37
3.2	RESOLUÇÃO DOS ENANTIÔMEROS	38
3.2.1	Validação do método por CLAE associado a colunas com fase estacionária quirál	38
3.2.2	Enriquecimento quantitativo dos enantiômeros isolados.....	41
3.2.3	Determinação de rotação específica dos enantiômeros isolados.....	41
3.3	ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	42
3.3.1	Avaliação de viabilidade celular	42
3.3.2	Avaliação da atividade anti- <i>T. cruzi</i>	44
3.3.2.1	Avaliação contra as formas tripomastigotas	46
3.3.2.1.1	<i>Avaliação com os enantiômeros isolados</i>	48
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	MÉTODOS DE SÍNTESE DOS INTERMEDIÁRIOS E HÍBRIDOS	51
4.1.1	Reação de nitração	51
4.1.2	Reações de <i>O</i> -alquilação	52
4.1.3	Reações de epoxidação.....	54
4.1.4	Reações de abertura dos epóxidos com nucleófilos.....	57
4.1.5	Reações para formação de 1,2,3-triazol	64
4.1.6	Reação de desproteção de 1,2,3-triazol dissustituído	67

4.2	MÉTODOS PARA RESOLUÇÃO QUIRAL DOS ENANTIÔMEROS	67
4.2.1	Validação de método.....	68
4.2.2	Obtenção quantitativa dos enantiômeros	68
4.2.3	Método para determinação de rotação específica.....	69
4.3	MÉTODOS PARA REALIZAÇÃO DOS ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	69
4.3.1	Avaliação de viabilidade celular	69
4.3.2	Avaliação de atividade anti-<i>T. cruzi</i>	70
4.3.2.1	Avaliação contra as formas amastigotas	71
4.3.2.2	Atividade contra as formas tripomastigotas.....	71
4.4	MÉTODOS PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
5	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	APÊNDICE.....	84

1 INTRODUÇÃO

Na presente tese, trata-se do estudo de química medicinal envolvendo a doença de Chagas (DC) e o desenvolvimento de híbridos derivados do eugenol para o seu tratamento.

Antes localizada principalmente na América Latina, essa complexa doença tem alcançado muitos países não endêmicos, sendo capaz de levar à morte através de manifestações graves (Avaria *et al.*, 2021). Seu tratamento é realizado por meio de fármacos nitroaromáticos que exigem longos períodos de exposição e geram diversos efeitos adversos, além de serem ineficientes durante a fase crônica e mais prevalente da doença (Vela *et al.*, 2021).

A carência de substâncias ativas, tratando-se de uma doença tropical negligenciada, tornou o reposicionamento de fármacos extremamente relevante para identificação de substâncias potencialmente ativas contra o parasito (Rycker *et al.*, 2016). Os azois, inibidores de biossíntese de ergosterol através da enzima CYP51, foram reposicionados a partir de estudos de atividade antifúngica demonstrados por Urbina *et al.* (1998) e são extremamente ativos contra formas replicativas do parasito em estudos *in vitro* (Urbina *et al.*, 2003). Estudos *in vivo* demonstraram grande expectativa com elevado potencial inclusive contra cepas resistentes à terapia convencional conforme Diniz *et al.* (2018); entretanto, estudos clínicos foram realizados sem a definição de um regime terapêutico efetivo que permitisse alcançar cura inequívoca dos pacientes (Torrice *et al.*, 2021). Devido a isso, o desenvolvimento de novos azois tem sido desestimulado, apesar de ser extremamente relevante a definição de novos parâmetros mais bem delineados para regimes terapêuticos em estudos clínicos com azois (Villalta; Rachakonda, 2019; Gabaldón-Figueira *et al.*, 2023).

Doenças complexas, como a DC, podem necessitar de fármacos que atuem simultaneamente em vias distintas para seu tratamento como destacado por Meunier (2008), tornando o desenvolvimento de substâncias híbridas relevante a este propósito. A utilização de um produto natural de fácil obtenção, como o eugenol demonstrado ativo contra diversos microrganismos por Kamatou; Vermaak; Viljoen (2012), permite explorar sua estrutura para desenvolvimento de novas substâncias potencialmente antimicrobianas (Kaufman, 2015). Nesse sentido, esse trabalho trouxe a hibridização molecular de subunidades de azois, eugenol e nitroaromáticos como estratégia de baixo custo para obtenção de híbridos inéditos e sítio-ativo planejados (Ivasiv *et al.*, 2019).

Neste trabalho foram propostas reações clássicas de química orgânica para obtenção de uma série de híbridos. Estes foram caracterizados por fator de retenção em cromatografia, faixa

de fusão, absorção na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono e por espectrometria de massas. Estudos *in vitro* determinaram seu baixo potencial de citotoxicidade contra duas linhagens de células amplamente utilizadas nesses estudos, o que tornou interessante sua avaliação contra *T. cruzi*. Contra o parasito, estudos *in vitro* chamaram atenção por dois híbridos benzilados serem ativos contra formas não replicativas, o que pode estar relacionado com atividade por mecanismo de ação diferente do planejado.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Obtenção de novos agentes tripanossomicidas.

1.1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desta tese são:

- a) sintetizar uma série de híbridos construídos a partir do eugenol e de subunidades de fármacos azólicos, amparados por estudos de previsão de propriedades físico-químicas;
- b) caracterizar os híbridos por técnicas espectroscópicas e espectrométricas, além de determinar o fator de retenção (Rf) em cromatografia em camada delgada e a faixa de fusão;
- c) avaliar a atividade citotóxica dos híbridos em estudos de viabilidade celular *in vitro* com células Vero e H9c2;
- d) avaliar o potencial tripanossomicida *in vitro* dos híbridos contra as formas clinicamente relevantes do parasito (cepa Y), além dos enantiômeros purificados do híbrido mais ativo.

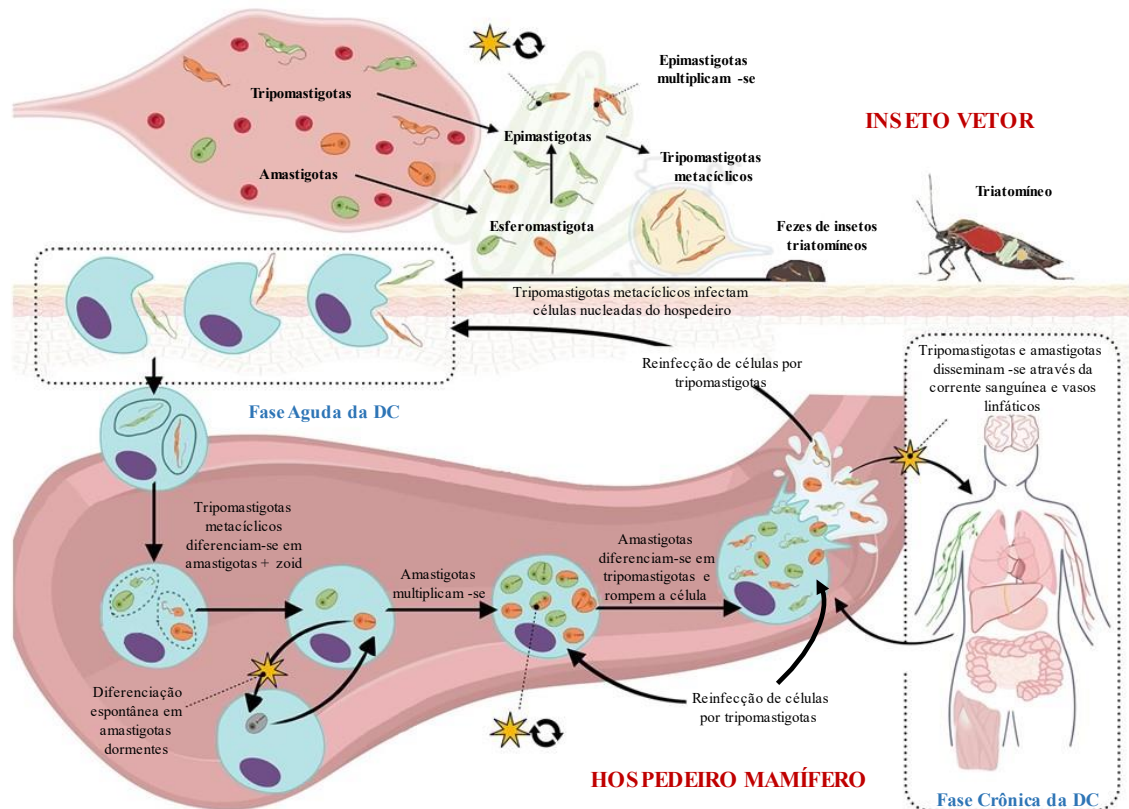
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DC) é uma antropozoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida por insetos pertencentes à subfamília Triatominae (Chagas, 1909; Dujardin; Schofield; Panzera, 2000). É uma doença tropical negligenciada (DTN) (HOTEZ *et al.*, 2020) capaz de gerar elevada morbidade por manifestações digestivas e levar à morte por manifestações graves como cardiomiopatia e meningoencefalite (Medina-Rincón *et al.*, 2021; Pérez-Molina; Molina, 2018).

A DC é endêmica em 21 países da América Latina, disseminando-se principalmente por transmissão vetorial, oral e vertical. No entanto, a doença tem alcançado muitos países não endêmicos da Europa, América do Norte, Ásia e Austrália devido ao intenso processo migratório nos anos 70 e 80 acompanhado de portadores da DC (Avaria *et al.*, 2021; De Sousa *et al.*, 2024; Lidani *et al.*, 2019; Schmunis, 2007). Diversos centros de doação de sangue e órgãos desses países não endêmicos foram afetados, o que trouxe a necessidade de implantação de políticas públicas locais para evitar a transmissão da doença (Guhl; David Ramírez, 2021; Schmidt; Filho; Maciel, 2016). Estima-se entre 6 e 8 milhões de pessoas portadoras da DC no mundo, além de outras 75 milhões que se encontram em risco de contrair a doença (CDC, 2024; WHO, 2024).

O protozoário flagelado *T. cruzi* possui um complexo ciclo biológico, representado na Figura 1 (Martín-Escolano *et al.*, 2022). No tubo digestivo do inseto vetor infectado, o protozoário está presente na forma replicativa não-infectante epimastigota, que é induzida à metaciclogênese gerando formas não-replicativas infectantes denominadas tripomastigotas. O processo de hematofagia do inseto envolve a eliminação de suas fezes contendo essas formas próximo da picada, o que pode levar à infecção de células nucleadas do hospedeiro. No interior da célula infectada, o parasito diferencia-se em formas replicativas amastigotas intracelulares, dando origem às formas não-replicativas infectantes tripomastigotas sanguíneas, as quais são liberadas para o meio extracelular. Na corrente sanguínea, o parasito pode infectar novas células nucleadas do hospedeiro ou será ingerido por um novo vetor triatomíneo, infectado ou não, quando este realizar a hematofagia. As formas tripomastigotas sanguíneas ingeridas pelo inseto vetor diferenciam-se em epimastigotas e dão início à um novo ciclo cepa-específico em seu tubo digestivo (Martín-Escolano *et al.*, 2022; Tyler; Engman, 2001).

Figura 1 - Ciclo de vida de *T. cruzi*

Fonte: Adaptado de Martin-Escolano (2022).

A evolução dessa infecção passa por duas fases, aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por um período de intensa multiplicação, podendo persistir por até dois meses. Após esse período, a resposta imune do hospedeiro limita o parasitismo e dá início à fase crônica (Pérez-Molina; Molina, 2018). Como a carga parasitária na DC crônica é geralmente baixa o diagnóstico ideal são os testes sorológicos ou técnicas de PCR (Echeverria *et al.* 2019).

Os dois fármacos aprovados para o tratamento da DC, apresentados na Figura 2, são os pró-fármacos nitroimidazólico benznidazol (1; Rochagan®; Lafepe) e nitrofurano nifurtimox (2; Lampit®) (Hall; Bot; Wilkinson, 2011; Hall; Wilkinson, 2012; Patterson; Wyllie, 2014; Wilkinson *et al.*, 2011), os quais são bioativados por nitroreduases (Figura 2) (Wittlin; Mäser, 2021).

São fármacos potentes durante a fase aguda, mas perdem muito desse potencial na fase crônica e mais prevalente da doença (Crespillo-Andújar *et al.*, 2022) devido possivelmente à limitada penetração tecidual, curta meia-vida e rápida metabolização e eliminação (Molina *et al.*, 2017; Soy *et al.*, 2015). Além disso, graves reações adversas são manifestadas para esses fármacos, tais como dermatite, náuseas, dor de cabeça, anorexia e distúrbios psicológicos. Essas reações são intensificadas pela necessidade de tratamentos prolongados e doses elevadas, que

contribuem para a limitada adesão dos pacientes ao tratamento (Bern, 2015; Müller Kratz *et al.*, 2018).

Figura 2 - Estruturas químicas dos fármacos aprovados para o tratamento da DC.



Fonte: Do autor.

Outra limitação encontrada para **1** e **2** tem relação com a heterogeneidade das cepas do parasito, que podem ser menos susceptíveis a eles (Filardi; Brener, 1987). A definição de cepas de *T. cruzi* geneticamente semelhantes em *discrete typing units* (DTU) foi determinada por marcadores moleculares ou imunológicos comuns, resultando em 7 DTUs, as quais podem apresentar, naturalmente, diferentes níveis de resistência ao tratamento etiológico (Vela *et al.*, 2021; Velásquez-Ortiz *et al.*, 2022; Zingales *et al.*, 2009, 2012).

Diversos desafios são associados à ampla disseminação da doença, à diversidade do parasito e às limitações dos fármacos aprovados para o seu tratamento. Apesar disso, algumas classes farmacológicas são especialmente promissoras, com destaque para nitro-heterociclos, inibidores de biossíntese de ergosterol e os benzoxaborois (Mazzeti *et al.*, 2021).

Entre nitroheterociclos ativos contra tripanossomatídeos, destaca-se o fexinidazol (**3**, Figura 3) e seus metabolitos sulfóxido (**4**) e sulfona (**5**) com potente atividade *in vitro* e *in vivo* contra *T. brucei* e cepas de *T. cruzi* suscetíveis e resistentes ao benznidazol (Bahia *et al.*, 2012, 2014; Torreele *et al.*, 2010; Wittlin; Mäser, 2021). Em estudos clínicos com **3**, protocolos de doses diárias levaram à eliminação do parasito em pacientes crônicos, de forma sustentada pelos 12 meses de acompanhamento dos pacientes. Contudo, essa atividade pode vir acompanhada de efeitos adversos graves, como neutropenia e anormalidades hepáticas (Torrice *et al.*, 2023). Foram então avaliados protocolos com administração e dosagens menores de **3**, que demonstraram menor incidência de efeitos adversos. Apesar disso, o esperado efeito antiparasitário sustentado não foi atingido para a maior parte dos pacientes (Pinazo *et al.*, 2024).

Entre os mais importantes inibidores da biossíntese de ergosterol, estão aqueles envolvidos com a enzima esterol 14 α -desmetilase (CYP51) (De Rycker *et al.*, 2016), de forma que a sua inibição leva ao aumento da concentração de esteróis di e trimetilados incapazes de atuarem na membrana desses microrganismos (Urbina *et al.*, 1998). Essa classe de inibidores é

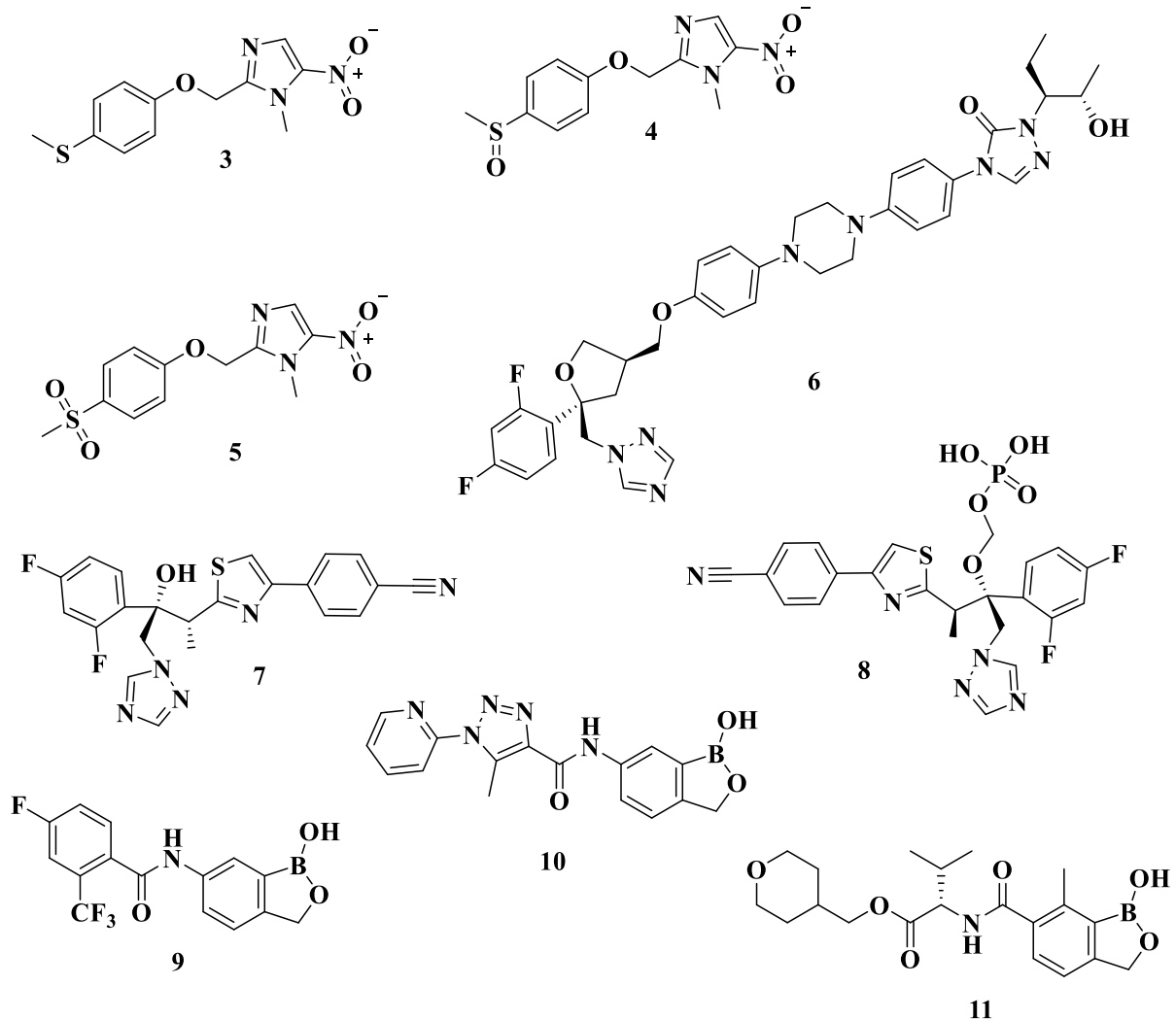
composta por fármacos azólicos, reconhecidamente antifúngicos (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2006) e extremamente ativos contra formas amastigotas de *T. cruzi* (Urbina, 2009). Entre os azóis mais ativos contra o protozoário estão posaconazol (**6**) e ravuconazol (**7**). São fármacos ativos *in vitro*, em escala entre nano e subnanomolar, contra as formas replicativas amastigotas intracelulares do parasito (Urbina *et al.*, 1998, 2003).

O destaque dessas substâncias em estudos *in vitro* rapidamente as levou aos estudos *in vivo*. Foi relatada ação no tratamento de modelos murinos com doses diárias de **6** por 20 dias (Molina *et al.*, 2000). Entretanto, estudos *in vivo* com **7** demonstraram atividade supressiva contra a DC aguda e crônica em modelos murinos, mesmo com maior dosagem e por até 50 dias (Urbina *et al.*, 2003). Modelos caninos tratados diariamente com **7** por 90 dias também demonstraram atividade supressiva (Diniz *et al.*, 2010). A combinação de doses diárias de **6** com **1**, por 7 dias, demonstrou-se promissora em modelos murinos com eficácia superior à monoterapia com **1** (Diniz *et al.*, 2013). A partir disso, estudos clínicos com **6** demonstraram o elevado potencial dessa substância na infecção por *T. cruzi*. Dois regimes terapêuticos foram capazes de eliminar a presença do parasito. Entretanto, a interrupção da administração de **6** levou ao reaparecimento do parasito com a identificação imediata de material genético de *T. cruzi* no protocolo de menor dose. O estudo de maior dose levou ao não aparecimento do parasito por algumas semanas após o final do tratamento, contudo também falhou na eliminação sustentada após mais de 30 dias (Molina *et al.*, 2014).

As razões para essas falhas podem não ter relação com a falta de capacidade dos fármacos avaliados para a interferência no ciclo do parasito, mas que carecem do desenvolvimento de um regime terapêutico clínico efetivo (Urbina, 2015). Estudos farmacocinéticos indicam que as doses avaliadas levam a concentração plasmática em humanos menor que a necessária para efeito em modelos animais (Nomeir *et al.*, 2000; Ullmann *et al.*, 2006), sendo entre 5 e 10 vezes menor que a necessária para gerar atividade em humanos (Molina; Salvador; Sánchez-Montalvá, 2015; Urbina, 2017, 2018).

Apesar dessas constatações, foram realizados estudos clínicos envolvendo a combinação de **6** com **1** por 2 meses. Nesse estudo, a monoterapia com **1** foi mais ativa em relação à monoterapia com **6** ou a combinação de **6** com **1**. Entretanto persistiram graves efeitos adversos de **1** que resultaram na descontinuação do tratamento por um terço dos pacientes (Morillo *et al.*, 2017).

Figura 3 - Estruturas químicas de fármacos e candidatos à fármacos em estudo para o tratamento da DC



Fonte: Do autor.

Em estudo clínico realizado com **8**, um pró-fármaco fosfatado derivado de **7**, doses semanais por 2 meses levaram a remissão do parasito em até 5 semanas de tratamento. Apesar desses resultados, dias após seu final houve reaparecimento do parasito. Modelos matemáticos demonstraram que o aumento da duração da terapia com **8** pode ser relevante na redução da probabilidade de reaparecimento do parasito de 60% quando tratados por 2 meses para 44% se forem tratados por 3 meses (Torrico *et al.*, 2018). Foi identificada cura em modelo murino infectado com a cepa Y de *T. cruzi* tratado com **8** em diferentes doses, que induziram níveis similares de cura e demonstra a alta susceptibilidade dessa cepa frente à substância. A avaliação de **8** contra a cepa Colombiana, multirresistente, demonstrou capacidade supressiva com ressurgimento do parasito em todos os animais infectados. Nesse sentido, a combinação de **8** com **1** demonstrou elevado potencial contra essa cepa em modelo murino em relação às suas monoterapias (Diniz *et al.*, 2018). Entretanto, estudos clínicos envolvendo a administração

semanal de **8** combinado com diferentes regimes terapêuticos de **1** na terapia por 2 meses não demonstraram melhora significativa na eficácia quando comparada à monoterapia com **1** (Torrice *et al.*, 2021).

Os resultados clínicos obtidos para os azóis mais ativos contra *T. cruzi* reduziram as expectativas associadas ao tratamento da DC com representantes desta classe, de forma que inibidores da CYP51 têm sido comumente menos priorizados para este propósito (Gabaldón-Figueira *et al.*, 2023). Contudo, considerando os regimes terapêuticos utilizados, com exposição sistêmica sub-ótima, e ainda o fato de haver supressão da parasitemia durante o período de tratamento, a falha terapêutica nos estudos clínicos poderia ser atribuída não à falta de atividade intrínseca dos azóis, mas sim a limitações no delineamento de doses e período de tratamento (Martínez-Peinado *et al.*, 2020; Villalta; Rachakonda, 2019).

Uma nova classe de substâncias, os benzoxaboróis, tem chamado atenção, com inibidores ativos contra *T. brucei* (Ding *et al.*, 2010). Novos derivados desta classe demonstraram-se potencialmente ativos contra *T. cruzi*, tendo sido identificado AN4169 (**9**), amplamente ativo *in vitro* contra diferentes DTU e capaz de eliminar o parasito em modelo murino (Bustamante *et al.*, 2014; Jacobs; Plattner; Keenan, 2011; Moraes *et al.*, 2014). Outro benzoxaborol, DNDI-6148 (**10**), foi selecionado como um potente inibidor contra *Leishmania* spp. e *T. brucei* com provável mecanismo de ação envolvendo a clivagem e poliadenilação específica do fator 3 (CPSF3) (Mowbray *et al.*, 2021; Wall *et al.*, 2018). A intensa avaliação de derivados dessa classe levou à identificação de AN15368 (**11**), altamente eficaz para o tratamento da infecção por *T. cruzi* capaz de levar a cura inequívoca da infecção em primatas não-humanos crônicos em infecções naturalmente adquiridas de diversas cepas de *T. cruzi* (Padilla *et al.*, 2022).

Baseado nisso nota-se a urgência na necessidade de novos fármacos para uso clínico no tratamento da DC, que sejam eficientes principalmente durante a fase crônica e com rápida ação, que evitem efeitos adversos e que sejam amplamente ativos contra as diferentes cepas do parasito.

2.2 EUGENOL COMO FONTE ESTRUTURAL PARA NOVOS COMPOSTOS BIOATIVOS

O eugenol (**12**, Figura 4) é o composto majoritário do óleo essencial extraído do cravo-da-índia, *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry. Ele é um fenilpropanoide com uma série de atividades biológicas importantes, tais como analgésica, antiinflamatória, hipotensora,

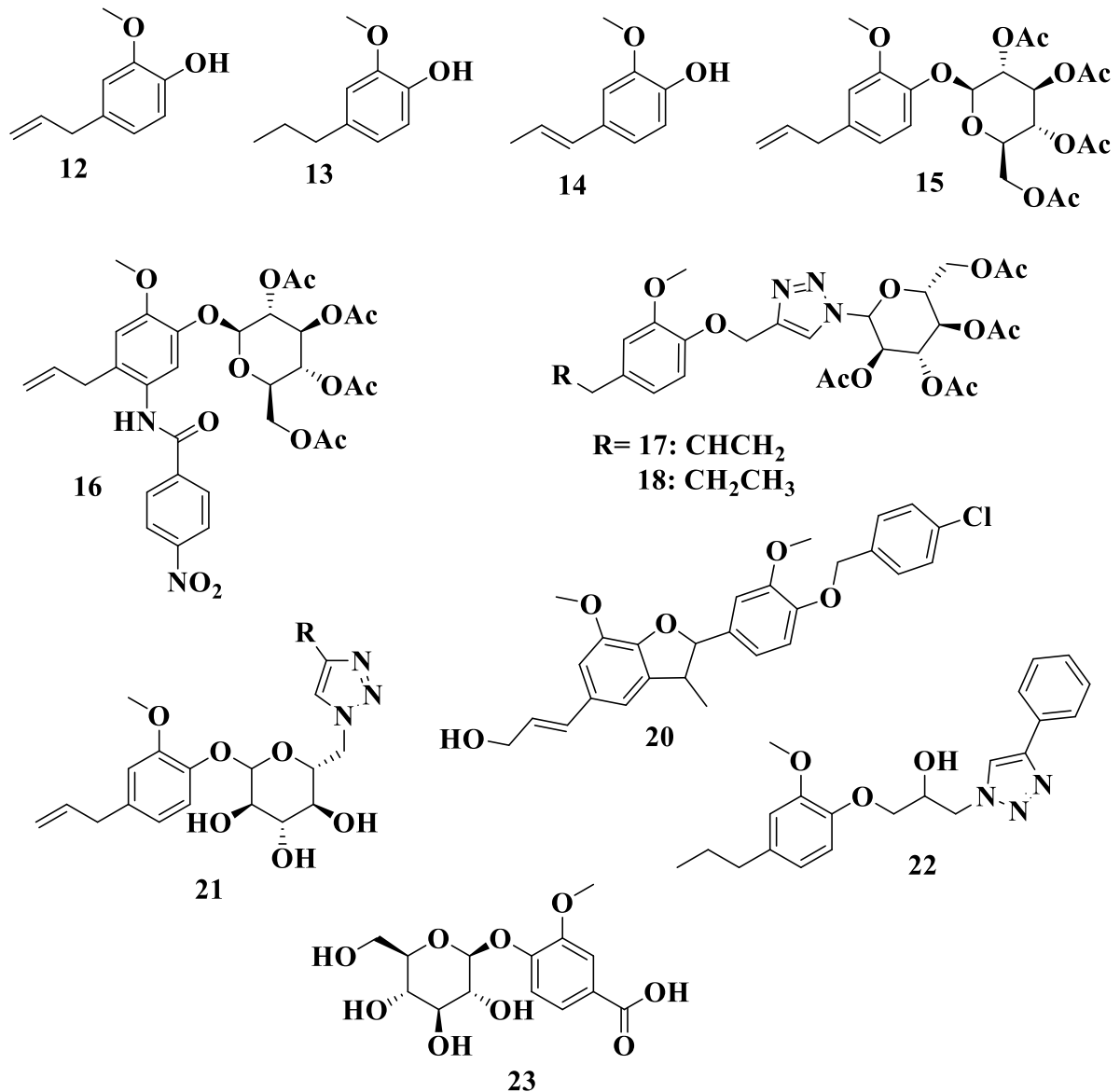
anticarcinogênica, antioxidante, antiparasitária, antifúngica, antibacteriana, antiespasmódico, antisséptico, analgésico dentário e antiviral. Também tem sido utilizado nas indústrias cosmética e de processamento de alimentos (Kamatou; Vermaak; Viljoen, 2012).

Entre as diversas atividades antimicrobianas de **12**, encontram-se estudos envolvendo sua ação antiprotozoários dos gêneros *Acanthamoeba* (Zamli *et al.*, 2023), *Leishmania* (Evangelista *et al.*, 2023; Nisar *et al.*, 2021), *Plasmodium* (Van Zyl *et al.*, 2006), *Giardia* (Islamuddin *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2011) e *Trypanosoma* (Azeredo *et al.*, 2014; SANTORO *et al.*, 2007). No entanto, a ampla atividade de **12** é pouco efetiva quando comparada aos fármacos existentes para o tratamento dessas infecções, mas pode ser explorada através das interações envolvidas no mecanismo de ação dessas atividades e melhorada a partir de modificações estruturais (Kaufman, 2015).

A estrutura química de fenilpropanoides como **12**, di-hidro Eugenol (**13**) e isoeugenol (**14**), contém grupos funcionais que os tornam excelentes materiais de partida para a síntese de uma ampla gama de derivados. A inserção de glicosídeos na hidroxila fenólica de **12** levou a obtenção de uma série de derivados ativos *in vitro* contra espécies de *Candida*, com destaque para **15** com EC₅₀ de 3,8 µmol.L⁻¹ e 160 vezes mais seletivo que **12** contra *C. glabrata* (Souza *et al.*, 2014). A partir desses estudos, novos derivados glicosídicos de **12** foram efetivos contra *C. krusei* e *C. tropicalis*, com EC₅₀ de 11 e 23 µmol.L⁻¹ respectivamente, para **16** (Hipólito *et al.*, 2018). A inserção de 1,2,3-triazol conectando glicosídeos à **12** ou **13** permitiu identificar **17** e **18** com EC₅₀ de 26 µmol.L⁻¹ contra *C. tropicalis* e *C. krusei* (Magalhães *et al.*, 2021).

Outra alteração em **12**, como a inserção de base de Mannich, deu origem à compostos altamente seletivos contra várias cepas de *Candida*, com valores de EC₅₀ entre 0,57 e 10 µmol.L⁻¹ (Abrão *et al.*, 2015). A síntese de análogos de licarina A, obtidos a partir de **14**, levou à identificação de **20**, ativo contra *Mycobacterium abscessus*, *M. fortuitum* e *M. massiliense* (Alvarenga *et al.*, 2020b). Uma série de derivados de **12** conectados a glicosídeo com 1,2,3-triazol substituídos, representados por **21**, apresentaram atividade contra *Salmonella typhimurium* e *Micrococcus luteus* (Souza *et al.*, 2015). Um derivado 1,2,3-triazol de **13**, representado por **22**, foi ativo em estudos *in vivo* contra *T. cruzi* com EC₅₀ de 42 µmol.L⁻¹ (Souza *et al.*, 2020). Além de atividade antimicrobiana, derivados glicosídicos de **12** demonstraram atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina (Alvarenga *et al.*, 2020a).

Figura 4 - Estruturas químicas de fenilpropanoides e derivados antimicrobianos



Fonte: Do autor.

Diante do que foi apresentado, nota-se a importância terapêutica de **12** contra protozoários além de sua aplicabilidade para obtenção de novos derivados bioativos. Com base nisso, surge o interesse em utilizar **12** e seus análogos como protótipos em estudos químico-medicinais visando a obtenção de derivados aprimorados.

2.3 A HIBRIDIZAÇÃO COMO ESTRATÉGIA PARA DOENÇAS MULTIALVO

O modelo de desenvolvimento de fármacos com múltiplos alvos, ou fármacos híbridos, tem se mostrado uma resposta eficiente à necessidade de agentes eficazes para o tratamento de

doenças crônicas multifatorial. Essa abordagem evita a combinação de fármacos, que pode levar a reações indesejadas (Morphy; Rankovic, 2005). Neste contexto, a hibridização molecular tem sido amplamente explorada como estratégia para obtenção racional de híbridos, através da combinação de diferentes subunidades farmacofóricas de substâncias bioativas. Tais híbridos podem ser obtidos a partir de um conector ou pela integração de farmacóforos (Ivasiv *et al.*, 2019; Meunier, 2008).

A hibridização pode reduzir os custos associados ao desenvolvimento de fármacos por permitir a aplicação de rotas convergentes, inserindo grupos farmacofóricos provenientes de diferentes substâncias em uma estrutura química pronta. Nesse contexto, podem ser menos susceptíveis à resistência microbiana se atuarem em pontos diferentes de uma via bioquímica essencial ou em vias diferentes, mas relativas à mesma doença (Bolognesi, 2013; Viegas; Barreiro; Fraga, 2007). No entanto, a farmacocinética e a farmacodinâmica dos novos híbridos serão diferentes dos fármacos de origem (Bolognesi, 2013; Kumar; Herrmann; Tsogoeva, 2020).

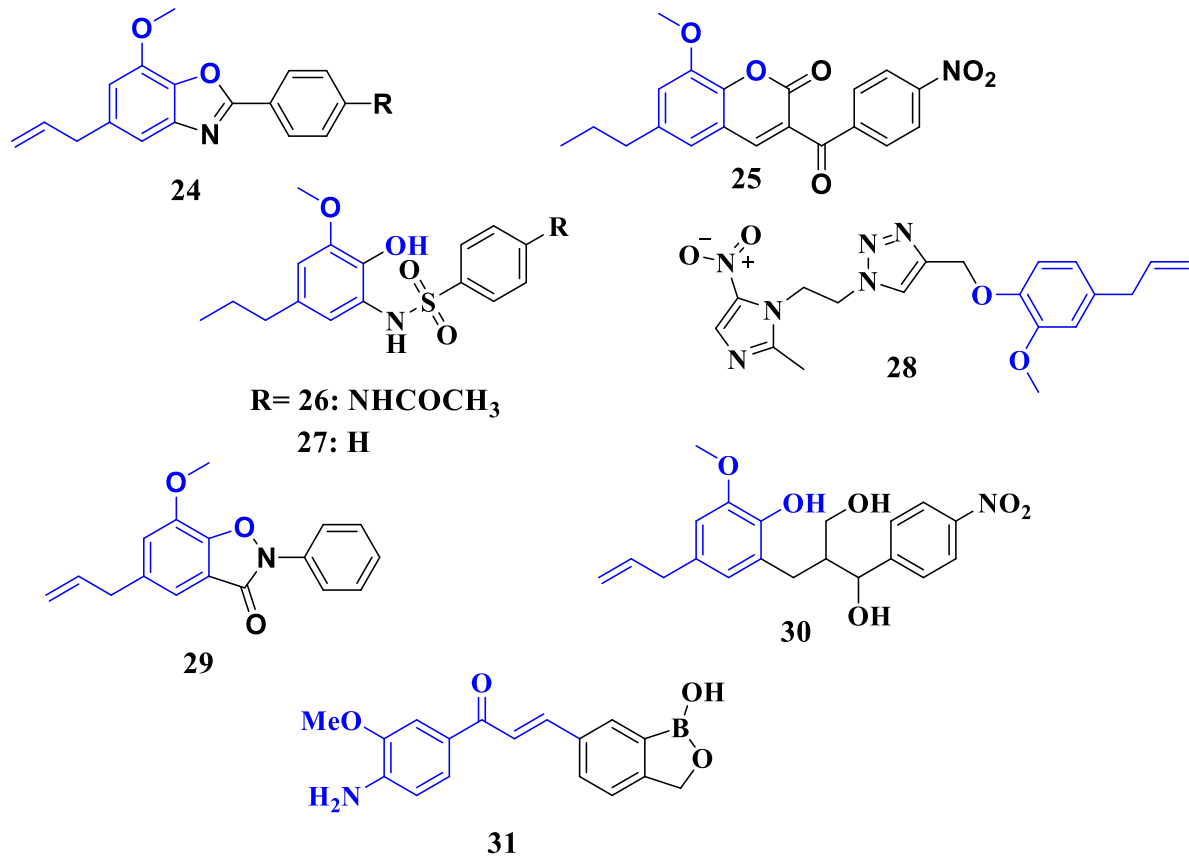
Os produtos naturais são atraentes como protótipos para uma estratégia de hibridização molecular por geralmente serem capazes de se ligar a múltiplos alvos. A complexa biossíntese dessas substâncias envolve enzimas naturalmente desenvolvidas, essenciais às plantas e aos animais, como potentes produtos de defesa (Prati; Uliassi; Bolognesi, 2014).

Dentre diversas classes de produtos naturais, derivados de fenilpropanoides têm sido amplamente estudados para o desenvolvimento de híbridos antimicrobianos. Foi demonstrado que uma série de híbridos planejados pela fusão de **12** com benzoxazol, representados pela estrutura geral de **24** (Figura 5), apresentou propriedades fungistáticas, com valores de EC₅₀ abaixo de 380 µmol.L⁻¹ e atividade até cinco vezes maior quando comparadas a **12** contra *C. albicans* e *C. glabrata* (Carvalho *et al.*, 2017). A presença de **13** como componente estrutural híbrido em cumarina, representada por **25**, apresentou atividade contra a forma epimastigota de *T. cruzi* na mesma magnitude que o benznidazol, além de ser capaz de reduzir a parasitemia em estudos *in vivo* (Brancaglioni *et al.*, 2018).

Híbridos como **26** e **27**, formados entre a união de subunidades farmacofóricas de sulfonamidas e **12**, demonstraram atividade de inibição da viabilidade de células, com destaque para o derivado propílico de sulfonamida (Azevedo-Barbosa *et al.*, 2019). Outros híbridos desse trabalho demonstraram atividade antibacteriana com valores de EC₅₀ abaixo de 80 µg.mL⁻¹ (Azevedo-Barbosa *et al.*, 2021). Híbridos entre metronidazol e análogos de **12** foram sintetizados utilizando um núcleo triazólico como *linker* e avaliados quanto sua capacidade tripanossomicida. Foi observado que um híbrido, representado por **28**, apresentou atividade

próxima do benzimidazol, com valor de EC_{50} de $10 \mu\text{M}$ contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Pelozo *et al.*, 2021). Foram avaliados híbridos baseados na associação entre benzisoxazolinonas e **12** frente a sua atividade antifúngica contra *C. albicans*. Esses estudos demonstraram que **29** apresentou EC_{50} de $53 \mu\text{mol.L}^{-1}$, valor comparável ao do fluconazol e muito inferior em relação ao IC_{50} reportado para **12**, de $1524 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Fregnan *et al.*, 2021).

Figura 5 - Estruturas químicas de híbridos bioativos obtidos a partir de **12** ou **13**



Fonte: Do autor.

Um estudo focando a síntese de híbridos baseados em análogos do cloranfenicol foi realizado com **12** em busca de atividade antifúngica. Foi demonstrado que o derivado **30** foi ativo contra duas cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* além de isolados clínicos resistentes à metilina de *Staphylococcus aureus* (Oliveira *et al.*, 2023). Foi sintetizada uma série de híbridos originados da conexão entre benzoxaboróis e chalconas, representados por **31**, os quais são reconhecidamente tripanossomicidas. Muitos dos derivados obtidos mostraram excelente atividade contra *T. brucei* e baixa citotoxicidade (Qiao *et al.*, 2012).

Baseado nisso, **12** trata-se de um produto natural relevante e de baixo custo para obtenção, viável para aplicação no desenvolvimento de híbridos.

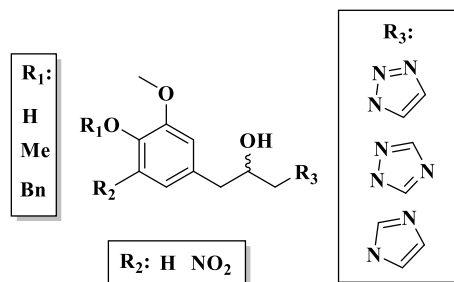
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada grave, de elevada morbimortalidade, sem cura durante sua fase mais prevalente e tem somente dois fármacos, **1** e **2**, aprovados para o seu tratamento, frequentemente associados a reações adversas e regimes terapêuticos prolongados (Kratz *et al.*, 2018). Os estudos clínicos mais recentes relacionados à sua terapia seguem sem candidatos mais eficientes que a terapia com **1**, sendo emergente a busca por novos agentes tripanossomicidas mais seguros e eficientes e o desenvolvimento de regimes terapêuticos mais adequados para os fármacos ativos existentes (Villalta; Rachakonda *et al.*, 2019; Gabaldón-Figueira *et al.*, 2023; Pinazo *et al.*, 2024).

Tendo como base a reconhecida atividade antiparasitária dos fenilpropanoides, *e.g.* **12**, e dos inibidores da biossíntese de ergosterol mais ativos contra *T. cruzi*, *e.g.* **6** e **7**, a promissora estratégia de hibridização molecular foi aplicada para o desenvolvimento de híbridos multialvo no tratamento da DC (Santoro *et al.*, 2007; Urbina *et al.*, 1998, 2003; Prati; Uliassi; Bolognesi, 2014). A união de subunidades farmacofóricas destas classes trouxe híbridos potencialmente tripanossomicidas e com baixos níveis de toxicidade, essencial para o desenvolvimento de fármacos para este propósito.

O planejamento da obtenção desses híbridos foi realizado pela união de **12** e triazóis e imidazóis β -hidroxilados. A estrutura química de **12** tem grande relevância para a química orgânica medicinal devido à sua reatividade para formar uma diversidade de funções orgânicas de interesse para construção de novos derivados bioativos (Kaufman, 2015).

Figura 6 - Estrutura geral dos híbridos



Fonte: Do autor.

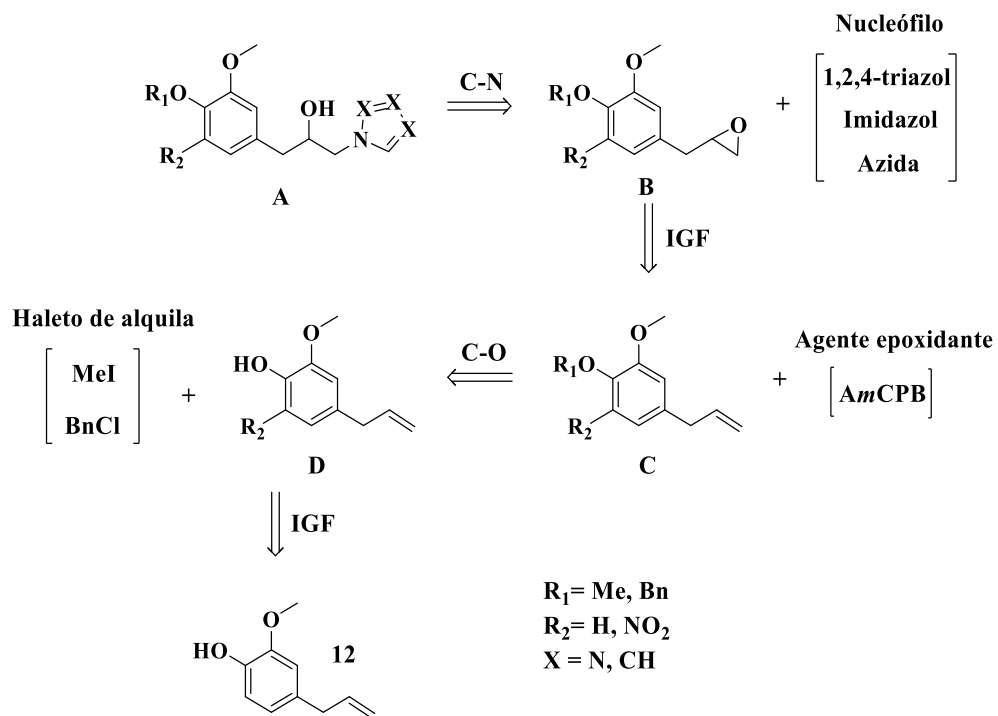
A inserção de grupos lipofílicos, como metila ou benzila, pode ser essencial para conexão com receptores sítio-específicos, além de reduzir a instabilidade química geralmente associada a fenóis (Souza *et al.*, 2020a). A posição *orto* em relação à hidroxila de **12** permite inserção de novos grupos funcionais, *e.g.* grupo nitro comumente encontrado em agentes

antiparasitários, além de poder melhorar a solubilidade de substâncias em água. A inserção de triazol ou imidazol β -hidroxilado pode dar origem à híbridos multialvo com maior potencial de ação, menor incidência de efeitos adversos e melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico em relação à **1**, **2**, **6**, **7** e **12**.

A avaliação prévia de parâmetros farmacocinéticos, físico-químicos e metabólicos dos híbridos foi avaliada através do servidor online SwissADME (Shweta; Rashmi, 2019), demonstrando que estes não infringiram a regra dos 5, proposta por Lipinski como ideal no desenvolvimento de fármacos. Os dados demonstram alta absorção pelo trato gastrointestinal, relacionado com biodisponibilidade adequada quando administrado via oral. Finalmente, sugere-se que os híbridos não apresentam capacidade de gerar resultados falso-positivos em triagens biológicas através do PAINS (*Pan-assay interference structure*).

O planejamento sintético dos híbridos foi estabelecido a partir de análise retrossintética (Corey, 1991), onde a estrutura geral **A** dos produtos finais híbridos heterocíclicos, eterificados ou não, nitrados ou não, representada na Figura 7, pode ser obtida através de um acoplamento C-N utilizando um nucleófilo e o epóxido de interesse. A obtenção dos epóxidos **B** foi planejada por interconversão de grupo funcional (IGF) utilizando o reagente ácido *m*-cloroperbenzóico, junto do derivado alílico de interesse. Para tanto, a obtenção dos derivados alílicos foi planejada partindo de **12** em reações de IGF e acoplamento C-O.

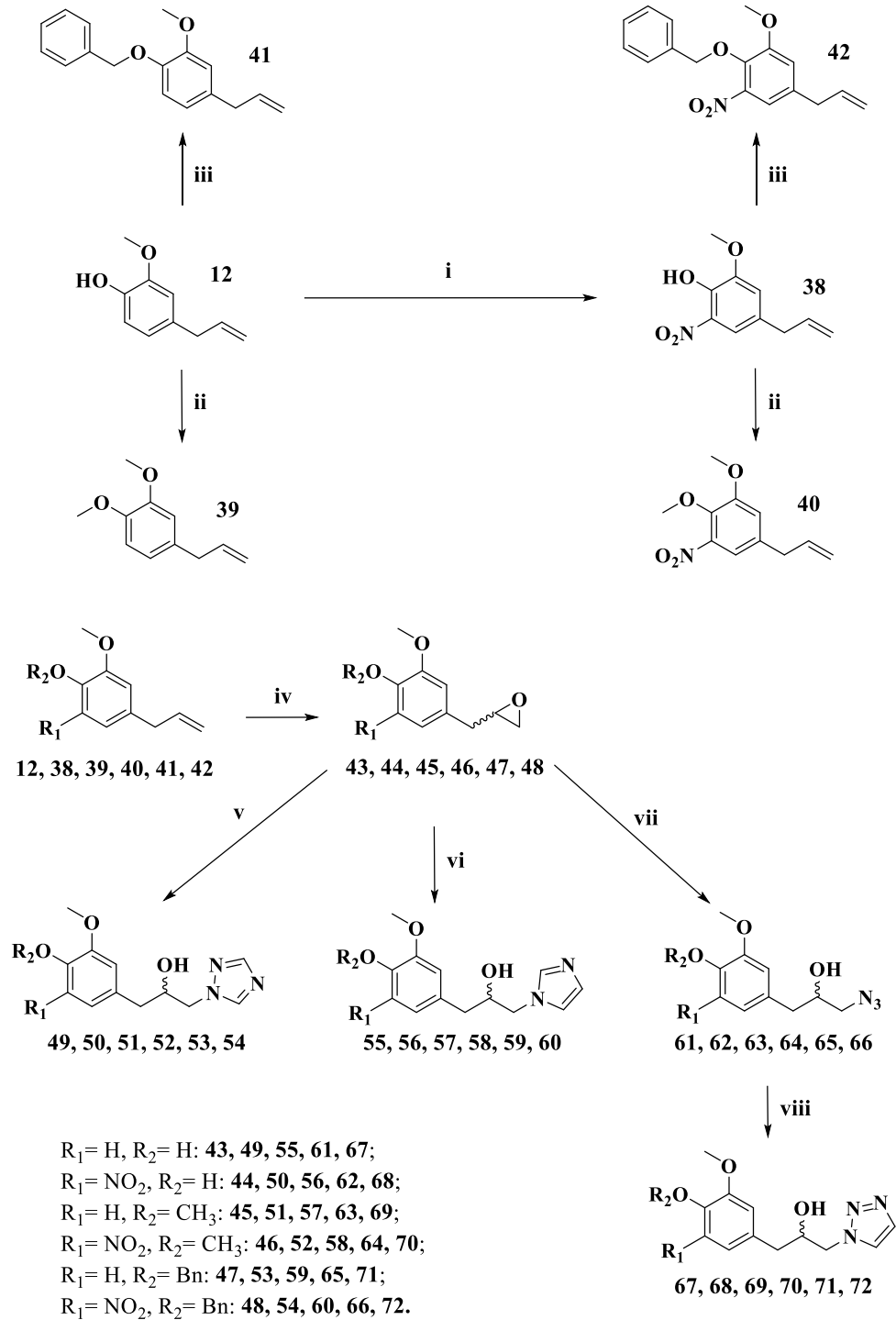
Figura 7 - Rota retrossintética para obtenção dos híbridos



3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS E HÍBRIDOS

A Figura 8 adiante demonstra a rota para síntese dos produtos finais híbridos inéditos.

Figura 8 - Rota sintética desenvolvida para síntese dos intermediários e dos híbridos



Fonte: Do autor

Nota: Condições de reação: **i)** CH_3COOH, HNO_3 , t.a.; **ii)** $MeI, K_2CO_3, EtOH, 70\text{ }^\circ C$; **iii)** $BnCl, K_2CO_3$, dimetilformamida (DMF), $80\text{ }^\circ C$; **iv)** Ácido *m*-cloroperbenzóico, $CHCl_3, 0\text{ }^\circ C$ - t.a.; **v)** 1,2,4-triazol, DMF, $80\text{ }^\circ C$; **vi)** Imidazol, DMF, $80\text{ }^\circ C$; **vii)** $NaN_3, DMF, 80\text{ }^\circ C$; **viii)** K_2CO_3 , ácido ascórbico, acetato de cobre, trimetilsililacetileno, $H_2O/MeOH$ (1:1; v/v), t.a.

Por nitração de **12** (Figura 8) com ácido acético glacial e ácido nítrico (etapa **i**; Collin *et al.*, 2014) foi obtido **38**. Por *O*-alquilação de **12** ou **38** (etapa **ii**; Heredia *et al.*, 2016) com iodometano ou cloreto de benzila (etapa **iii**; Stanek *et al.*, 2019) foram obtidos os intermediários **39** e **40** ou **41** e **42**, respectivamente. Pela epoxidação de **12** e dos intermediários **38** a **42** com ácido *m*-cloroperbenzóico (etapa **iv**; Elgandy *et al.*, 2008) foram obtidos **43** a **48**. Pela abertura do anel instável de **43** a **48** com nucleófilos como 1,2,4-triazol, imidazol e azida de sódio (etapas **v**, **vi** e **vii**, respectivamente) em dimetilformamida (DMF) foram obtidos os híbridos inéditos de **49** a **60** e as azidas de **61** a **64** e **66** respectivas. Tendo as azidas foi possível a obtenção dos híbridos **67** a **70** e **72** utilizando trimetilsililacetileno (etapa **viii**; Zhao *et al.*, 2018). A caracterização dos produtos finais e intermediários foi discutida de forma representativa a partir de **42**, **48**, **60**, **66** e **72**. Os produtos finais híbridos foram confirmados pelo seu valor $[M+H]^+$ através de espectrometria de massas. A azida **65** e o híbrido **71** não foram obtidos.

3.1.1 Reação de nitração aromática (Etapa i)

A reação de nitração aromática foi alcançada seguindo adaptação de metodologia descrita por Collin *et al.* (2014), sendo possível a obtenção de **38** partindo de **12**. A reação é favorecida devido à presença do anel aromático bastante ativado eletronicamente, composto pelos grupos fenol, metoxila e a cadeia alílica. O efeito ativador da hidroxila fenólica é o maior, de forma que o rendimento é direcionado para obtenção do produto *orto* substituído em relação a ela, com rendimento final de 70%. O produto foi confirmado por cromatografia em camada delgada (CCD) com padrão pré-caracterizado e não foi novamente caracterizado.

A inserção do grupo nitro em **12** foi uma estratégia eficientemente aplicada para o desenvolvimento de derivados ativos contra *T. cruzi*, uma vez que esse grupo leva ao mecanismo de ação envolvido com os fármacos bioativos **1**, **2** e **3** (Hall; Bot; Wilkinson, 2011; Hall; Wilkinson, 2012).

3.1.2 Reações de *O*-alquilação (Etapas ii e iii)

Para obtenção dos derivados *O*-metilados foi utilizado iodometano em etanol (Heredia; Larghi; Kaufman, 2016) e para os *O*-benzilados, cloreto de benzila em DMF (Stanek *et al.*, 2019). O rendimento obtido a partir dessas reações foi entre 69 e 100%.

Após a análise do espectro de **42** (Figura 28, Página 90) na região do infravermelho, não foi verificado a banda larga clássica de estiramento **O-H**. A presença da função **NO₂** é verificada através de duas bandas, em 1531 e 1362 cm^{-1} , típicas de estiramento assimétrico e simétrico,

respectivamente. O restante das bandas também está presente nos espectros de **12** (Chowdhry *et al.*, 2015) ou corresponde ao interferente CO₂ presente na análise.

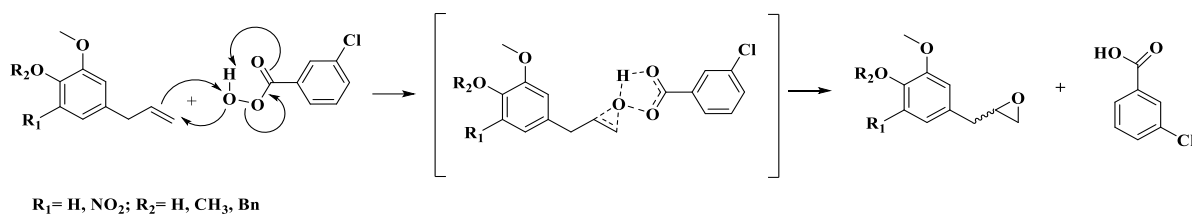
No espectro obtido por ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H de **42** (Figura 29, Página 91) observam-se os sinais respectivos aos hidrogênios **H10a** e **H10b** junto daqueles respectivos ao simpleto em 5,12 ppm referente aos dois hidrogênios metilênicos do grupo benzila, **H11**. O espectro de RMN de ¹³C de **42** (Figura 30, Página 92) traz o sinal do carbono metilênico pertencente ao grupo benzila, em 76 ppm, destacado no subespectro DEPT-135.

A partir disso, as produtivas reações de *O*-alquilação possibilitaram a obtenção dos intermediários **39** a **42**. A inserção desses grupos volumosos altera o perfil de solubilidade e pode complementar interações específicas no sítio ativo de enzimas alvo na terapia contra a DC (Souza *et al.*, 2020a).

3.1.3 Reações de epoxidação (Etapa iv)

A obtenção dos intermediários alílicos planejados levou à construção dos epóxidos. Sua polaridade e tensão no anel o tornam altamente reativo, fazendo deles úteis na síntese orgânica. De todos os métodos de produção disponíveis para converter alcenos em epóxidos, o mais utilizado é a reação com perácidos. O par de elétrons π presente no alceno age como nucleófilo e realiza um ataque ao oxigênio mais instável e eletrofílico presente no ácido *m*-cloroperbenzóico. Ocorre um estado de transição bicíclico idealmente disposto para a deslocalização simultânea de oito elétrons, o que leva ao produto epoxidado pretendido (Elgendy; Khayyat, 2008; Sienel; Rieth; Rowbottom, 2012). Foram obtidos rendimentos entre 42 e 52 %.

Figura 9 - Mecanismo proposto para epoxidação



Fonte: Do autor.

A análise do espectro de **48** (Figura 46, Página 108) na região do infravermelho permite observar duas bandas clássicas em epóxidos, em 837 e 967 cm⁻¹, correspondentes à deformação simétrica e assimétrica de anel, respectivamente.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de **48** (Figuras 47 e 48, Página 109 e 110) confirmam a formação do epóxido monossustituído a partir do alceno terminal de **42**. O hidrogênio **H9**, ligado ao carbono estereogênico, acopla de modo distinto com os dois pares de hidrogênio **H8** e **H10**, com constantes de acoplamento geminal e vicinal compatíveis. Já os carbonos **C9** e **C10** passam a ser hibridizados sp^3 , mas continuam mais desblindados que **C8** por pertencerem ao anel oxirano.

Os intermediários instáveis epóxido foram sintetizados para obtenção de híbridos entre os intermediários derivados de **12** e a subunidade farmacofórica de inibidores da biossíntese de ergosterol, *e.g.* **6** e **7**. A estratégia de hibridização molecular tem sido amplamente estudada no tratamento de doenças multifatoriais crônicas, *e.g.* DC, podendo levar a substâncias com perfil de atividade, segurança e biodisponibilidade adequados (Ivasiv *Et Al.*, 2019; Prati; Uliassi; Bolognesi, 2014; Uliassi *et al.*, 2018). Nesse contexto, a reatividade inerente aos intermediários epóxido possibilitou a obtenção de dezessete híbridos, planejados como inibidores potenciais da biossíntese de ergosterol através da interferência com CYP51.

3.1.4 Reações de abertura dos epóxidos (Etapas v, vi e vii)

As reações de abertura dos epóxidos com nucleófilos como 1,2,4-triazol, imidazol e azida de sódio em DMF levaram à obtenção de parte dos híbridos e das azidas. A metodologia empregada para obtenção dos álcoois β -nitrogenados utiliza DMF como solvente e o nucleófilo de interesse (Borowiecki *et al.*, 2013).

Apesar de não ter sido obtido o intermediário de azida **65**, foram obtidos 12 híbridos e 5 azidas. Pela análise do espectro de RMN de ^1H de **60** (Figura 94, Página 156) pode-se verificar três simpletos na região dos hidrogênios aromáticos com integral relativa a um hidrogênio cada, referentes aos imidazólicos **H11**, **H12** e **H13** que não acoplam entre si.

A constante de acoplamento 2J de 11,2 Hz entre **H10a** e **H10b** sustenta que o epóxido foi aberto, diminuindo o ângulo entre as ligações C-H geminais e fazendo com que seu valor aumente. Os hidrogênios **H9** e **H7** aparecem juntos com integral para 4 hidrogênios. O espectro de RMN de ^{13}C de **60** (Figura 95, Página 157) apresenta sinais para todos os vinte carbonos da molécula. Os dois carbonos **C12** e **C13**, presentes no heterociclo do imidazol, sustentam a formação da substância de interesse. O carbono **C11** não apareceu possivelmente devido a sobreposição de sinais que pode ter ocorrido também na interpretação de **54**.

A análise do espectro de **66** (Figura 109, Página 171) na região do infravermelho evidenciou a formação da azida com uma banda característica de estiramento $\text{N}=\text{N}=\text{N}$, além de

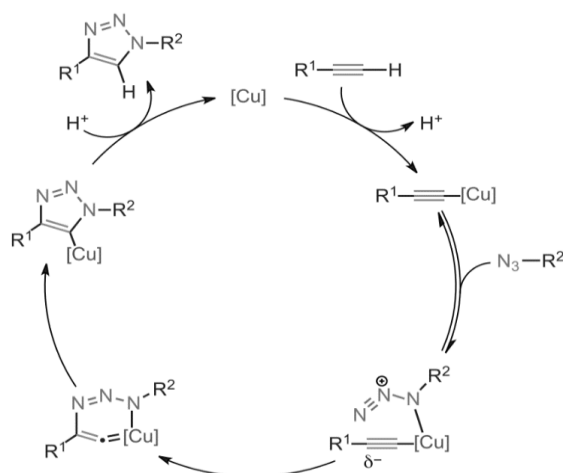
ter sido verificado o aparecimento de uma banda larga característica de estiramento **O-H**. Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de **66** (Figuras 110 e 111, Página 172 e 173) os hidrogênios **H10a** e **H10b** aparecem bem mais blindados. Aparecem alterações significativas somente em **C9** e **C10** com a abertura do epóxido.

3.1.5 Reações de formação de 1,2,3-triazol (Etapa viii)

Para obtenção dos derivados de 1,2,3-triazol, foi utilizada mistura de carbonato de potássio e ácido ascórbico em água para obtenção de ascorbato como agente redutor. Em seguida, foi adicionado acetato de cobre (II) (sólido azul), convertido a cobre (I) (mistura alaranjada), essencial para o desenvolvimento da reação. Foi então adicionado o intermediário de azida e, em seguida, o reagente trimetilsililacetileno (TMS acetileno) (Zhao *et al.*, 2019).

A Figura 10 representa o mecanismo da reação de cicloadição polar, onde o cobre coordena-se ao alcino terminal favorecendo a interação com átomos de nitrogênio provenientes da azida. A carga parcial negativa existente no alcino após associação entre alcino, azida e cobre permite formação de um intermediário cíclico. Esse intermediário da origem ao anel de cinco membros após um próton reestabilizar o ciclo e liberar o cobre novamente como catalisador (Worrell; Malik; Fokin, 2013).

Figura 10 - Mecanismo proposto para reação de formação de 1,2,3-triazol



Fonte: Worrell; Malik; Fokin (2013).

O rendimento dessa reação foi afetado, pois são obtidos dois produtos, sendo um deles o de interesse, com 55-65% de rendimento, e o outro o produto ainda protegido pela trimetilsilila. Essa reação é desenvolvida em água e metanol, sendo o metanol responsável por realizar a desproteção e dar origem ao produto monossustituído de interesse. No entanto, em

alguns casos o metanol não foi suficiente para desproteger 100% do produto. Quando foi o caso, o subproduto (1,2,3-triazol dissustituído) obtido da reação de formação do 1,2,3-triazol também foi convertido ao derivado monossustituído, utilizando fluoreto de tetrabutylamônio (TBAF) em tetraidrofurano (THF) (Nishihara *et al.*, 2017).

A análise do espectro de **72** (Figura 128, Página 190) na região do infravermelho evidenciou o desaparecimento da banda característica de estiramento N=N=N próxima de 2100 cm^{-1} . A análise do espectro de RMN de ^1H e ^{13}C de **72** (Figuras 129 e 130, Página 191 e 192) demonstra que os sinais de **H9**, **H10a** e **H10b** ficam mais desblindados, na região entre 4,56 e 4,30 ppm. Ainda, **H11** aparece como um duplete com $^3J_{11-12}$ de 3,9 Hz. A sobreposição de sinais fez com que **H12**, **H5** e os hidrogênios do grupo benzila aparecessem juntos em um multiplete com integral relativa a oito hidrogênios. Os carbonos **C9** e **C10** são confirmados pelo subspectro DEPT-135. Também se verifica o surgimento de dois sinais bastante desblindados para os dois carbonos pertencentes ao heterociclo 1,2,3-triazol, sendo eles **C11** e **C12**.

3.2 RESOLUÇÃO DOS ENANTIÔMEROS

Os híbridos apresentados neste trabalho são misturas racêmicas de enantiômeros. Devido a isso, os resultados obtidos na sessão 3.3 (ESTUDOS *in vitro*) a seguir chamaram atenção para a eventual possibilidade de estes atuarem de forma diferente contra o parasito. Dessa forma, foi proposta a resolução da mistura racêmica referente ao híbrido **60** pois este demonstrou o menor valor de EC_{50} e foi o mais seletivo em relação aos modelos celulares avaliados em estudo de viabilidade celular. A partir da confirmação da caracterização do produto sintetizado por RMN e avaliado seu grau de pureza, foi avaliada a separação do mesmo por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando colunas de fase estacionária quiral baseadas em polissacarídeos. A necessidade de enantiômeros puros exige uma avaliação crítica da maneira mais econômica de realizar sua análise e preparação (Calcaterra; D'acuarica, 2018).

3.2.1 Validação do método por CLAE associado a colunas com fase estacionária quiral

Para validação do método, foram utilizadas colunas baseadas em fase estacionária quiral de 3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose ou de celulose.

A separação dos enantiômeros foi avaliada por tentativa e erro em coluna analítica de amilose com fase móvel baseada em mistura de *n*-hexano (*n*-Hex) e etanol (EtOH) (Tabela 1). Partes iguais destes solventes em uma mistura para eluição apresentou fator de

enantiosseletividade (α) menor que 1,2. Dessa forma, novas misturas destes eluentes foram avaliadas considerando diminuição da polaridade com aumento gradual da proporção volumétrica de *n*-hexano. Apesar de continuar sem resolução efetiva dos enantiômeros, foi observado maior distanciamento dos picos de cada um deles, porém o tempo de retenção aumenta, o que inviabiliza sua acumulação.

Tabela 1 - Valores de k_1 , α e R_s obtidos em diferentes proporções de fase móvel

Fase móvel (v/v)	Coluna analítica de amilose			Coluna analítica de celulose		
	k_1	α	R_s	k_1	α	R_s
<i>n</i> -Hex:EtOH (50:50)	1,0	1,1	-	-	-	-
<i>n</i> -Hex:EtOH (60:40)	-	-	-	3,7	-	-
<i>n</i> -Hex:EtOH (70:30)	2,1	1,1	-	-	-	-
<i>n</i> -Hex:EtOH (70:30)*	1,4	1,1	-	4,8	-	-
<i>n</i> -Hex:EtOH (80:20)	3,0	1,1	-	5,25	1,3	2,4
<i>n</i> -Hex:EtOH (80:20)*	-	-	-	2,7	1,4	2,5
<i>n</i> -Hex:2-prOH (60:40)	-	-	-	2,9	1,3	-
<i>n</i> -Hex:2-prOH (60:40)*	-	-	-	2,7	1,3	-
<i>n</i> -Hex:2-prOH (70:30)	1,2	1,0	-	5,1	1,3	-
<i>n</i> -Hex:2-prOH (80:20)	-	-	-	11,6	1,3	-

Fonte: Do autor.

Nota: * 0,1% Dietilamina

Outras misturas de eluentes foram avaliadas nessa coluna, uma vez que a separação de enantiômeros não se dá pela diferença de polaridade dos eluentes, mas sim pelas interações quirais que ocorrem entre analito e fase estacionária. No entanto, a substituição do etanol por isopropanol em mistura com *n*-hexano promoveu alargamento da base dos picos dos enantiômeros, impedindo a sua coleta individualmente. Já com eluentes muito polares, como mistura metanol e acetonitrila, foi notada eluição da mistura racêmica junto da frente do solvente.

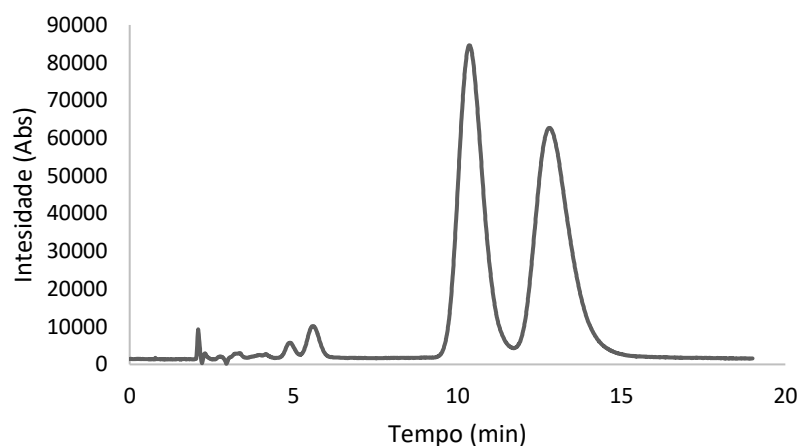
Aditivos de fase móvel básicos e ácidos podem ser usados para melhorar a resolução e o formato dos picos. É relatado na literatura um aumento significativo da seletividade e da resolução ao se fazer a adição desses aditivos supressores de ionização. A utilização desses aditivos em coluna analítica com fase estacionária quiral baseada em amilose influenciou na diminuição do tempo de retenção para obtenção dos enantiômeros, no entanto sem aumentar

grandemente a separação dos picos. Devido a isso, ainda sem resolução adequada e considerando que a adição de um novo interferente na análise pode atrapalhar as condições de purificação e isolamento dos enantiômeros isolados ao final, sua aplicação foi descontinuada para coluna de amilose.

Dessa forma, foi avaliada por tentativa e erro a coluna analítica com fase estacionária quiral baseada em celulose, eluída em fases móveis com *n*-hexano, 2-propanol (2-prOH) e etanol. Quando foi avaliada a mistura de *n*-hexano em 2-propanol, foram obtidos valores de α próximos de 1,3, porém ainda sem resolução. Quanto maior foi a quantidade de *n*-hexano nessa proporção, o valor de α aumentava, mas junto disso o tempo de eluição.

Com isso, novas avaliações em mistura de *n*-hexano e etanol foram analisadas, indicando melhores condições de resolução. O maior valor de fator de resolução foi definido em coluna de celulose para desenvolvimento da separação dos enantiômeros de **60** em eluente *n*-Hex:EtOH (80:20, v/v) sem adição de aditivo supressor de ionização. O cromatograma a seguir na Figura 11 representa os dois enantiômeros como os dois picos de maior área. Nessas condições, o método analítico ofereceu boa separação ($\alpha = 1,3$) e fator de resolução ($R_s = 2,4$). A partir disso foi possível planejamento de método para acumulação dos enantiômeros.

Figura 11 - Cromatograma da mistura racêmica e os respectivos enantiômeros de interesse



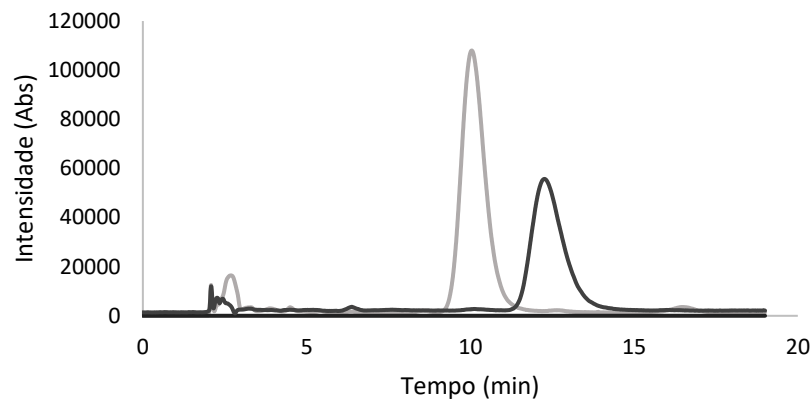
Fonte: Do autor.

A partir disso, sendo **60** uma mistura racêmica de enantiômeros, foi eficientemente realizada sua resolução quiral através de CLAE com coluna analítica de fase estacionária quiral baseada em celulose e eluente *n*-Hex:EtOH (80:20, v/v). O método analítico validado permitiu boa resolução, com fator de enantiosseletividade de 1,3 e fator de resolução de 2,4, o que levou à acumulação quantitativa dos enantiômeros isolados.

3.2.2 Enriquecimento quantitativo dos enantiômeros isolados

A acumulação em massa dos enantiômeros, eficientemente resolvidos a partir de método analítico validado, foi avaliada sem alteração nos parâmetros pré-estabelecidos através de diversas injeções e coletas no equipamento. A concentração foi avaliada em maior grau, no entanto como a resolução obtida não foi muito grande, se definiu 2 mg/mL para injeções em *loop* de 15 μ L. As frações analisadas juntas, representadas na Figura 12, indicaram excesso enantiomérico maior que 99% para cada enantiômero, com recuperação próxima de 75% para ambos.

Figura 12 - Cromatograma representando os enantiômeros obtidos isoladamente



Fonte: Do autor.

3.2.3 Determinação de rotação específica dos enantiômeros isolados

Os compostos enantioméricos apresentam propriedades físico-químicas similares, mas diferenciam-se pelo fato de desviarem o plano de luz polarizada em um mesmo ângulo, porém em sentidos opostos, (+) ou d (dextro) ou (-) ou l (levo). A atribuição da configuração absoluta dos enantiômeros é dada pelo sistema de Cahn-Ingold-Prelog, que não possui relação com o desvio da luz polarizada, mas com a disposição dos átomos ao redor do centro estereogênico. Este método permite determinar dois enantiômeros distintos: R e S (Krstulovic *et al.*, 1988).

Com os enantiômeros isolados foi feita sua análise em polarímetro, a fim de determinar sua rotação específica. Na resolução de **60**, o isômero (-)-**60'** é eluído primeiro seguido pelo isômero (+)-**60''**, e a separação da linha de base é alcançada. Isso significa que (+)-**60''** é retido mais fortemente na FEQ. O valor de $[\alpha]_D$ pode ter variado devido à diferença de concentração

da amostra. Foi resolvido 2 mg de **60** para obtenção de 0,77 e 0,73 mg de (-)-**60'** e (+)-**60''**, respectivamente, com excesso enantiomérico maior que 99% para ambos.

Tabela 2 - Ordem de eluição, rotação específica e excesso enantiomérico dos enantiômeros resolvidos

Híbrido	Ordem de eluição	$[\alpha]_D$ (c)	e.e. (%)	Recuperação (%)	Massa (mg)
60'	Primeiro	-42,55° (0,047)	>99	77	0,77
60''	Segundo	+111,11° (0,036)	>99	73	0,73

Fonte: Do autor.

3.3 ESTUDOS *IN VITRO*

A obtenção de 17 híbridos permitiu com que estes pudessem ser avaliados em estudos de viabilidade celular contra células de mamíferos e as diferentes formas de *T. cruzi*.

O desenvolvimento de fármacos exige substâncias seguras e por isso devem ser realizados estudos de viabilidade para evitar efeito citotóxico naquela concentração. A presença de solventes pode contribuir com a potencial toxicidade. Entretanto, foram utilizadas diluições de mais de 100 vezes nos poços de forma que o solvente não interfere.

3.3.1 Avaliação de viabilidade celular

Tratando-se de dezessete substâncias inéditas, foram avaliados seus potenciais de inibição de viabilidade celular *in vitro*, fundamental para o desenvolvimento de novos fármacos anti-infecciosos, principalmente em infecções que demandam regimes terapêuticos prolongados, *e.g.* na infecção por *T. cruzi*. Nesse cenário, os híbridos foram avaliados contra células Vero, padronizadas e de fácil cultura, além de cardiomiócitos H9c2, células alvo do protozoário.

Seguindo recomendações da literatura, foi considerado efeito citotóxico quando a redução da viabilidade celular calculada foi maior que 30% (ISO, 2009). Esse limiar representa uma redução substancial na viabilidade das células e pode levar a um efeito adverso significativo. O potencial citotóxico dos híbridos foi avaliado frente a duas linhagens celulares, Vero e H9c2, amplamente utilizadas em experimentos dessa natureza (ISO, 2009).

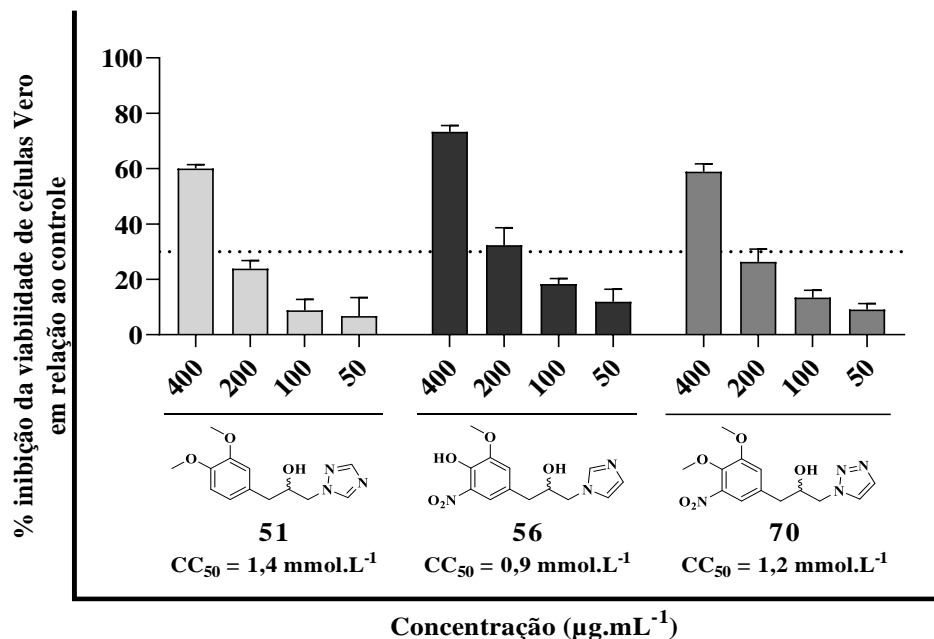
As células Vero, isoladas de tecido renal de macaco-verde-africano, apresentam um crescimento rápido em cultura, de forma que sua capacidade de aderir e proliferar eficientemente as torna adequadas para avaliar o impacto de substâncias em sua viabilidade.

Sua natureza padronizada permite a determinação de protocolos bem estabelecidos para cultura e manipulação, o que auxilia nas comparações entre diferentes experimentos e substâncias.

Os híbridos foram avaliados em quatro concentrações, de modo que foi possível a construção de uma curva para aqueles que demonstraram potencial de inibição superior a 50%. A análise da Figura 13, a seguir, permite identificar os híbridos potencialmente inibidores da viabilidade de células Vero, sendo que estes induziram efeito citotóxico quando utilizados na maior concentração.

Dentre os dezessete híbridos avaliados neste estudo utilizando células Vero, três deles demonstraram potencial de inibição. Um representante híbrido para cada variação de heterociclo foi identificado como citotóxico, levando a considerar que essa subunidade não apresenta diferenciação nesse potencial, mas deve estar presente para demonstrar atividade.

Figura 13 - Percentual de inibição da viabilidade de células Vero incubadas por 24h em diluições seriadas de 400 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dos híbridos, avaliados por ensaio com resazurina



Fonte: Do autor.

Nota: Significância estatística representada por **a** e **b** em 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; **&** e **#** em 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($P < 0,005$).

Quando avaliados em 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, os híbridos **51** e **70** apresentaram potencial de citotoxicidade estatisticamente equivalente. De forma diferente, **56**, um híbrido nitrado, apresentou o maior potencial quando avaliado nessa mesma concentração. Essa análise foi essencial para construção da curva de atividade e determinação dos valores de CC_{50} .

Na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, **51** não demonstrou potencial citotóxico. Já **56** e **70** demonstraram potencial citotóxico próximo do limiar de 30% (ISO, 2009). O bloqueio da hidroxila fenólica pode ter contribuído para diminuição desse potencial, uma vez que o híbrido metilado, **51**, foi menos tóxico que **56**. Contudo, a reconhecida atividade toxicofórica associada aos grupos nitroaromáticos, presentes em **56** e **70**, também pode ter contribuído para o aumento da toxicidade (Kovacic; Somanathan, 2014). Em concentrações menores que as mencionadas não foi identificado potencial citotóxico, além de ser possível observar efeito concentração dose-dependente.

Os estudos de inibição de viabilidade celular *in vitro* por microdiluição envolvendo células Vero ou H9c2 incubadas por 48 horas com os dezessete híbridos em diluições seriadas de 400 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstraram baixo potencial citotóxico, por meio do ensaio colorimétrico baseado em resazurina. Esse potencial foi inferior a 30%, limiar amplamente aceito em estudos dessa natureza, em concentrações até 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Células H9c2 não demonstraram susceptibilidade aos híbridos avaliados, sendo somente células Vero susceptíveis a **51**, **56** e **70**, que superaram esse limiar em concentração maior que 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A presença do grupo nitro em dois desses híbridos pode ter relação com a toxicidade; entretanto, no contexto da DC, as concentrações de estudo contra as formas clinicamente relevantes do parasito são geralmente inferiores a 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, com atividade idealmente inferior a 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e, devido a isso, nenhum deles foi considerado potencialmente tóxico.

3.3.2 Avaliação da atividade anti-*T. cruzi*

Os métodos *in vitro* são uma etapa fundamental dos procedimentos sequenciais de triagem de fármacos. Esses experimentos permitem a avaliação rápida e simultânea de um conjunto de compostos, com discriminação consistente entre os ativos e os inativos, e também evitam a utilização de animais de laboratório nas etapas preliminares da triagem (Sykes; Avery, 2018).

A falta de consenso em relação aos protocolos de triagem *in vitro* e *in vivo* têm dificultado a descoberta de novos tratamentos para a DC. O desenvolvimento e a triagem de substâncias tripanossomicidas exigem a padronização dos ensaios para um formato geral capaz de avaliar a eficácia de novos compostos de forma otimizada, segura e reprodutível. Neste sentido, devem ser considerados aspectos relevantes da biologia do parasito e da sua patogenicidade para potenciais hospedeiros experimentais pré-clínicos. A discussão sobre os critérios a serem adotados para modelos *in vitro* levou à definição de diretrizes para o uso de

tripomastigotas e amastigotas intracelulares, que são as formas parasitárias relevantes para a infecção humana (Katsuno *et al.*, 2015; Romanha *et al.*, 2010).

Além disso, é importante ressaltar que as estratégias envolvidas na triagem de fármacos devem ser realizadas preferencialmente para cepas de *T. cruzi* pertencentes às DTUs mais frequentemente associadas à infecção humana: DTUs TcI, TcII, TcV e TcVI (Zingales *et al.*, 2012).

Assim, os dezessete híbridos foram avaliados *in vitro* contra as formas clinicamente relevantes da cepa Y de *T. cruzi*. A forma amastigota é considerada o principal alvo na terapia da DC, uma vez que é essa a forma responsável pela rápida multiplicação do parasito após infecção das células do hospedeiro pelas formas tripomastigotas. Por tratar-se de forma intracelular, pode também ser menos susceptível devido ao difícil acesso de certos fármacos a esse meio em modelos *in vivo*. Essa é a principal forma encontrada durante a fase crônica da doença, disseminada também em tecidos de baixa irrigação sanguínea, o que dificulta ainda mais seu alcance e eliminação por fármacos com biodisponibilidade limitada. Os inibidores de biossíntese de ergosterol, *e.g.* **6** e **7**, são potentes agentes antiproliferativos contra essas formas do parasito, pois interferem na formação do ergosterol, essencial para a construção e manutenção de sua membrana plasmática, impedindo continuidade de seu ciclo de vida. Nos estudos com formas amastigotas, é relevante que a substância em avaliação demonstre IC₉₀ efetivo, ou seja, com atividade capaz de eliminar a maior parte dos parasitos (Patterson; Wyllie, 2014).

Os estudos de triagem *in vitro* por microdiluição envolvendo células Vero ou H9c2 infectadas com formas amastigotas da cepa Y de *T. cruzi* incubadas por 48 horas com os dezessete híbridos em diluição de 50 µmol.L⁻¹ demonstraram baixa eficácia, confirmada por microscopia. Nessa concentração, os híbridos avaliados nestes estudos *in vitro* não foram eficientes em eliminar o parasito em meio intracelular, uma vez que células tratadas apresentaram redução da infecção menor que 50% em relação às células não tratadas. Esse resultado pode ter relação com o mecanismo de ação envolvido na atividade, pois apesar de possuírem subunidades farmacofóricas encontradas em inibidores de biossíntese de ergosterol, os híbridos avaliados podem não atuar através da inibição dessa via enzimática. Resultados similares foram obtidos com os dezessete híbridos avaliados em estudos de triagem *in vitro* por microdiluição seriada com quinze diferentes cepas de *Candida* (Dados não apresentados).

Curiosamente, dois híbridos demonstraram atividade *in vitro* contra formas tripomastigotas, responsáveis pela ampla disseminação do parasito em meio extracelular através da corrente sanguínea e dos tecidos, com habilidade de infectar células nucleadas do

hospedeiro (Sánchez-Valdéz *et al.*, 2018). Apesar de estarem mais expostas aos fármacos devido ao meio em que se encontram, não têm capacidade de replicação, sendo muito menos sensíveis aos inibidores da biossíntese de ergosterol (Urbina *et al.*, 1998).

3.3.2.1 Avaliação contra as formas tripomastigotas

Nesses estudos foram utilizados tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y incubados junto dos híbridos por 24 horas com posterior contagem através de microscopia com auxílio da câmara de Neubauer, representados na Figura 14 adiante. O eugenol **12** demonstrou potencial de mortalidade dos parasitos inferior a 50% nas concentrações de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ou menor. Somente quando avaliado na concentração de 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foi identificado seu EC_{50} (Santoro *et al.*, 2007). Foi verificada a baixa capacidade de **12** em atuar contra essas formas do parasito em concentrações de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ou menor, representadas estatisticamente por **a**, **&** e **α** ($P < 0,005$).

O derivado nitrado de **12**, **38**, e seus dois derivados metilados, **39** e **40**, não demonstraram potencial maior que 50% contra essas formas do parasito. Já seus derivados benzilados, **41** e **42** demonstraram o maior potencial contra os parasitos entre os intermediários. Estes demonstraram potencial estatisticamente equivalente entre si e superiores ao de **12**, representados estatisticamente por **b**, **#** e **β** ($P < 0,005$).

Esses resultados demonstram que a benzilação de **12** e de seu derivado nitrado levou à obtenção de duas novas substâncias pelo menos 10 vezes mais ativas que seu precursor. Essa atividade pode estar relacionada com maior lipofilicidade associada ao grupamento benzílico ligado à hidroxila fenólica, além de poder ter relação direta com a interação da substância com seus receptores.

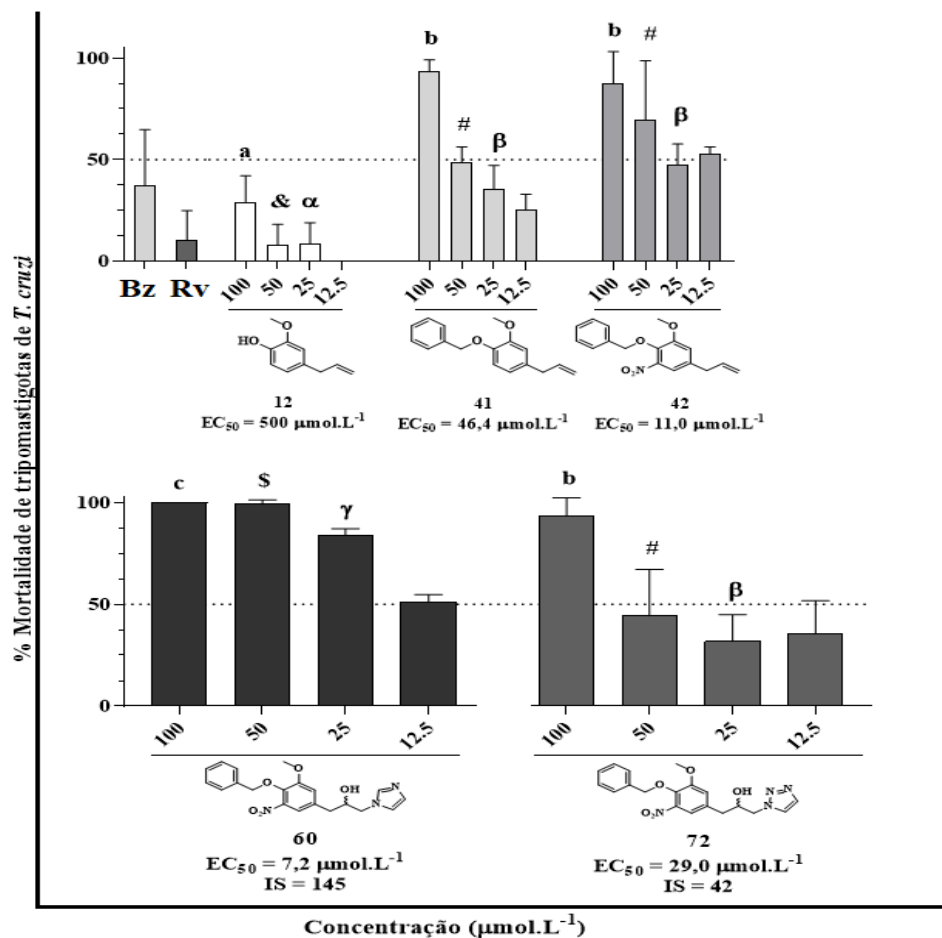
O grupamento nitro, presente em **42**, não demonstrou melhora na atividade em relação à **41**. Os dois derivados benzilados de **12** foram estatisticamente iguais nas três maiores concentrações avaliadas. O eugenol **12** demonstra atividade contra protozoários por mecanismos de ação diversos e a benzilação do mesmo pode ter favorecido algum desses mecanismos, de forma que se identificam duas novas substâncias, benziladas e nitrada capazes de serem exploradas como protótipos no desenvolvimento de novas substâncias bioativas.

Nenhum dos híbridos derivados de **12**, **38**, **39**, **40** e **41** demonstrou potencial contra a forma tripomastigota do parasito. No entanto, entre os derivados de **42**, dois deles, **60** e **72**, demonstraram potencial de mortalidade acima de 50% para os parasitos nas concentrações de 100 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Essa atividade pode ter sido favorecida pela presença do grupo benzílico em

sua estrutura, uma vez que isso também foi verificado para os intermediários benzilados derivados de **12**.

O híbrido **72** demonstrou potencial estatisticamente equivalente em relação aos seus precursores **41** e **42**. Essa atividade, apesar de superior a 50%, não se sustenta à medida que são feitas diluições. A presença do grupamento nitro não demonstrou melhora significativa da atividade nesse caso, uma vez que eles apresentam valores estatísticos equivalentes.

Figura 14 - Percentual de mortalidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y incubados por 24h em diluições seriadas de 100 a 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ dos intermediários e híbridos, contados por microscopia em câmara de Neubauer.



Fonte: Do autor.

Nota: Significância estatística representada por **a**, **b** e **c** em 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; **&**, **#** e **\$** em 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; **α** , **β** e **γ** em 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ($P < 0,005$). Controles de benznidazol (**Bz**) e ravuconazol (**Rv**) em 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 120 nmol.L⁻¹, respectivamente.

Curiosamente, foi verificado que **60** apresentou diferenças estatísticas de atividade, representadas por **c**, **\$** e **$\gamma$** ($P < 0,005$), em relação aos demais híbridos e intermediários avaliados. Sua atividade se manteve elevada mesmo em concentrações mais baixas.

apresentando capacidade de eliminação do parasito nas duas maiores concentrações. Ainda, em $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ este apresentou potencial de mortalidade em torno de 75%, o que chama atenção para a diferença deste para os outros híbridos e intermediários.

Os híbridos ativos são pelo menos 42 vezes mais seletivos para formas tripomastigotas de *T. cruzi* que para os modelos celulares avaliados nos estudos de viabilidade celular. Para o caso do híbrido **60**, o mais ativo contra formas tripomastigotas do parasito entre todos os híbridos, com EC_{50} de $7,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, o índice de seletividade foi de 145 vezes.

Foi demonstrado que **72** apresenta potencial estatisticamente equivalente ao seu precursor alílico, de forma que a presença do grupamento 1,2,3-triazol e do álcool secundário não interferiu na atividade desse híbrido. De forma interessante, a atividade de **60** foi estatisticamente maior contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* em comparação ao seu precursor, **42**, e ao segundo híbrido mais ativo, **72**. Essa análise permite compreender que a inserção do grupo imidazólico associado a um álcool secundário assimétrico eleva a atividade contra essas formas do parasito.

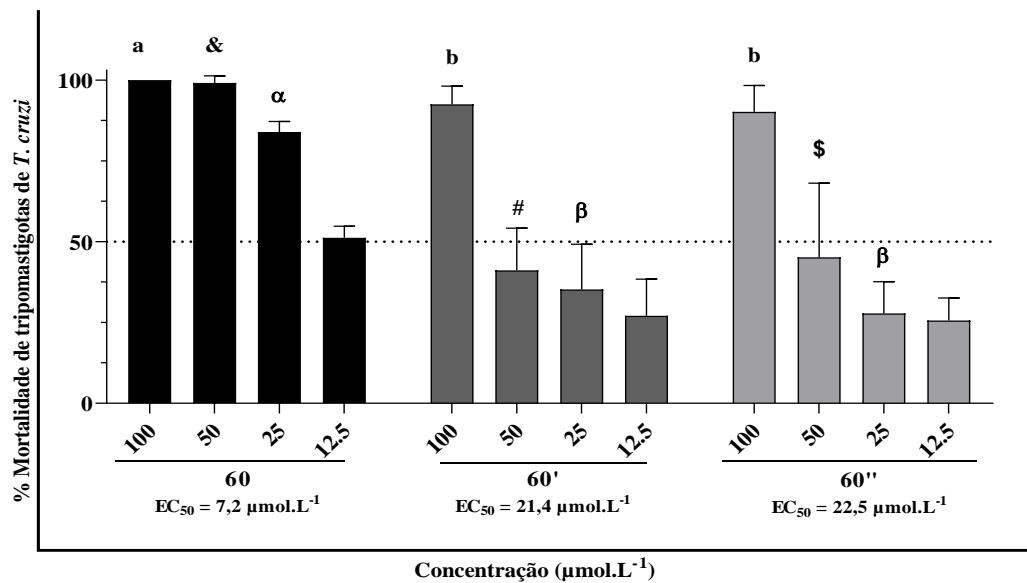
A identificação de atividade para o precursor **42** demonstra que a ação contra o parasito pode estar relacionada com subunidades encontradas nessa substância. Além disso, os resultados obtidos com **60** demonstram que a inserção do núcleo imidazólico e do álcool potencializaram essa atividade, de forma que a cadeia alílica presente em **42** não é essencial para atividade.

Os estudos de triagem *in vitro* por microdiluição envolvendo formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* incubadas por 24 horas com os intermediários e os dezessete híbridos em diluições seriadas de 100 a $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ demonstraram elevadas taxas de mortalidade, confirmadas por microscopia. Entre os intermediários avaliados nesses estudos *in vitro*, foram ativos **41** e **42**, com valor de EC_{50} de 46,4 e $11 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. A inserção do grupo benzílico em **12** ou **38** levou a substâncias muito mais ativas *in vitro* que seus precursores e estatisticamente equivalentes entre si; no entanto, não foram suficientes para eliminar mais que 90% do parasito em concentrações de até $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Já entre os dezessete híbridos, **72** e **60** foram os mais ativos, com valor de EC_{50} de 29 e $7,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente, e índice de seletividade superior a 145 vezes para **60**. São resultados interessantes, sendo o híbrido **60** até 70 vezes mais ativo *in vitro* que seu precursor de origem, **12**, contra a forma infectante de *T. cruzi*.

3.3.2.1.1 Avaliação com os enantiômeros isolados

A existência do álcool secundário assimétrico presente em **60** faz dessa substância uma mistura de enantiômeros, sendo **60'** e **60''** que podem diferir quanto a sua interação com outras moléculas assimétricas, além de seu desvio de luz polarizada. A análise dos gráficos de percentual de mortalidade dos enantiômeros contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* permite verificar grande similaridade na resposta entre eles.

Figura 15 - Percentual de mortalidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y incubados por 24h com diferentes concentrações de **60** e de seus enantiômeros isolados, contados por microscopia em câmara de Neubauer.



Fonte: Do autor.

Nota: Significância estatística representada por **a** e **b** em 100 µmol.L⁻¹; **&**, **#** e **\$** em 50 µmol.L⁻¹; **α** e **β** em 25 µmol.L⁻¹ ($P < 0,005$)

Os estudos *in vitro* por microdiluição envolvendo formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* incubadas por 24 horas com os enantiômeros **60'** e **60''** em diluições seriadas de 100 a 12,5 µmol.L⁻¹ corroboram as elevadas taxas de mortalidade identificadas para **60**, confirmadas por microscopia. No entanto, não foi identificada diferença estatística de atividade entre os dois enantiômeros ou sua mistura racêmica, com valores de EC₅₀ em torno de 20 µmol.L⁻¹. Esses resultados demonstram que **60**, na forma de mistura racêmica, foi três vezes mais ativo que os enantiômeros isolados.

Todos os híbridos avaliados nesses estudos apresentavam grau de pureza maior que 90% e foram avaliados em triplicatas repetidas pelo menos em dois dias diferentes. Os resultados demonstram que a mistura racêmica parece ser mais ativa que cada enantiômero isolado. Isso pode ter relação com a atividade sinérgica de um com outro. O sinergismo pode ocorrer quando

a mistura racêmica, que contém partes iguais de cada enantiômero, permite que estes apresentem maior potencial de ação quando comparados aos mesmos isolados. Entretanto, a obtenção de massa inferior a 1 mg de cada enantiômero isolado pode ter subestimado os resultados devido ao valor de erro inerente a balanças de laboratório e mais estudos serão necessários para confirmar essa possibilidade.

Além disso, a atividade encontrada é próxima do que é observado para o benznidazol, com EC_{50} variável entre 7,6 a 32 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Moreno *et al.*, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

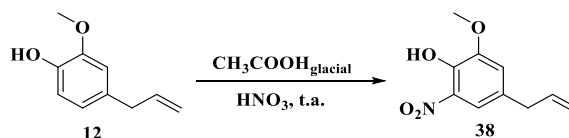
4.1 MÉTODOS DE SÍNTESE DOS INTERMEDIÁRIOS E HÍBRIDOS

Os híbridos propostos foram sintetizados no Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG, sob supervisão dos professores Dr. Diogo Teixeira Carvalho e Dr. Lucas Lopardi Franco. Foi utilizado **12** (Sigma-aldrich®) como material de partida para obtenção de todos os híbridos pretendidos.

Os intermediários e híbridos foram caracterizados a partir da obtenção de seus espectros na região do IV no Núcleo de Controle de Qualidade da UNIFAL-MG, sob supervisão do Prof. Dr. Rudy Bonfilio; de RMN em Bruker Avance III 300 MHz no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UNIFAL-MG, pelo técnico associado Gabriel de Oliveira Isac Moraes; de Espectrometria de Massas (EM) em sistema UPLC *Acquity*, modelo *Hclas* (Waters, USA) acoplado a analisador de massas quadrupolo simples com interface *electrospray*, modelo *Acquity QDa* na UFOP-MG, pelo Prof. Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga.

4.1.1 Reação de nitração

Figura 16 - Reação de nitração



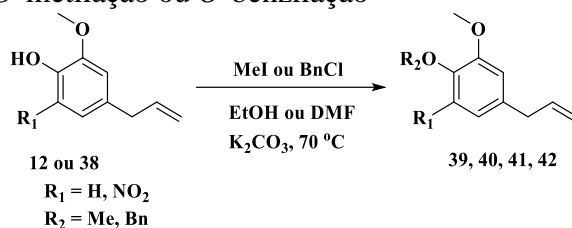
Fonte: Do autor.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foi adicionado 15 mL de ácido acético glacial e 1 mL de **12** (6,5 mmol) sob agitação. À solução reacional foi adicionado 0,27 mL de ácido nítrico (6,5 mmol, 1 eq.). Foi mantida à temperatura ambiente por 15 minutos, momento em que foi notado término da reação através de CCD usando como eluente mistura de hexano e acetato de etila (9:1; v/v).

A solução reagente foi neutralizada com 300 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio e extraída com 200 mL de DCM. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporada à pressão reduzida em rotaevaporador. O material obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica, utilizando como eluente mistura de hexano e acetato de etila (9,5:0,5; v/v). O rendimento final de **38** foi de 70%.

4.1.2 Reações de *O*-alquilação

Figura 17 - Reações de *O*-metilação ou *O*-benzilação



Fonte: Do autor.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foi adicionado 1 eq. do fenilpropanoide e 4 eq. de carbonato de potássio anidro em 20 mL de etanol absoluto ou DMF e mantido em agitação por 5 minutos. Foi então adicionado 4 eq. de iodometano ou 1 eq. de cloreto de benzila e mantido em agitação a 70 °C e sob refluxo. Após 12 horas foi identificado o término da reação por CCD utilizando como eluente mistura hexano e acetato de etila (9:1; v/v) e revelação com solução de cloreto férrico 10%.

A mistura foi filtrada à vácuo e o filtrado foi evaporado a pressão reduzida em rotaevaporador. O resultante foi dissolvido em acetato de etila e lavado duas vezes com solução de hidróxido de sódio 2 M e duas vezes com solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada em rotaevaporador.

Tabela 3 - Reagentes utilizados para obtenção de **40**, **41** e **42**

Fenilpropanoide	K ₂ CO ₃	MeI	BnCl	Produto	Rendimento (%)
12 (1 mL; 6,5 mmol)	3,59 g (26 mmol)	1,63 mL (26 mmol)	0,77 g (6,5 mmol)	39; 41	69; 97
38 (1 mL; 4,78 mmol)	2,64 g (19,14 mmol)	1,19 mL (19,14 mmol)	0,6 g (4,78 mmol)	40; 42	97; 100

Fonte: Do autor.

Tabela 4 - Dados físico-químicos e caracterização na região do IV de **40**, **41** e **42**

Dados	Dados físico-químicos			Ligaçao	Banda na região do IV, em cm ⁻¹ (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$)		
	40	41	42		40	41	42
Nome; F.M.; M.M., em g.mol ⁻¹	4-alil-2-metoxi-6-nitrofenol; C ₁₁ H ₁₃ NO ₄ ; 223,23	4-alil-1-(benziloxi)-2-metoxibenzeno; C ₁₇ H ₁₈ O ₂ ; 254,33	5-alil-2-(benziloxi)-1-metoxi-3-nitrobenzeno; C ₁₇ H ₁₇ NO ₄ ; 299,33	C-H	2942	2913	2930
Aspecto	Óleo amarelo	Óleo incolor	Óleo amarelo	C=C_{ar.}	1639	1591	1614
Estrutura Química				C-O-C	1278	1261	1275
Rf Hexano/AcO Et (9:1, v/v)	0,43	0,65	0,44	NO₂	1530; 1360	-	1531; 1362

Fonte: Do autor.

Tabela 5 - Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C de **40**, **41** e **42**

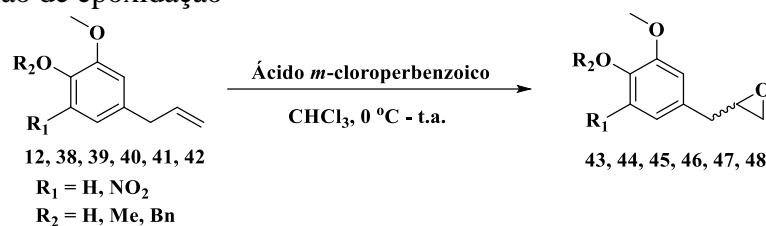
Posição	40	41	42
1	-	-	-
	141,1	146,6	139,8
2	-	-	-
	153,9	149,7	154,1
3	7,13 (d; $^4J_{3,5}=2,0$; 1)	6,74 (d; $^4J_{3,5}=2,0$; 1)	7,15 (d; $^4J_{3,5}=2,0$; 1)
	116,4	114,3	116,5
4	-	-	-
	136,4	133,4	136,5
5	6,90 (d; $^4J_{5,3}=2,0$; 1)	6,66 (dd; $^4J_{5,3}=2,0$, $^3J_{5,6}=8,1$; 1)	6,93 (d; $^4J_{5,3}=2,0$; 1)
	115,6	120,4	115,8
6	-	6,82 (d; $^3J_{6,5}=8,1$; 1)	-
	144,7	112,5	145,1
7	3,92 (s; -, 3)	3,88 (s; -, 3)	3,90 (s; -, 3)
	62,0	56,0	56,5
8	3,35 (d; $^3J_{8,9}=6,7$; 2)	3,33 (d; $^3J_{8,9}=6,7$; 2)	3,37 (d; $^3J_{8,9}=6,7$; 2)
	39,6*	39,8*	39,6*
9	5,89 (dtd; $^3J_{9,8}=6,7$, $^3J_{9,10a}=10,5$, $^3J_{9,10b}=17,1$; 1)	5,96 (dtd; $^3J_{9,8}=6,7$, $^3J_{9,10a}=10,1$, $^3J_{9,10b}=16,8$; 1)	5,92 (dtd; $^3J_{9,8}=6,7$, $^3J_{9,10a}=10,3$, $^3J_{9,10b}=16,9$; 1)
	135,8	137,6	135,8
10a	5,14 (dd; $^3J_{10a,9}=10,5$, $^2J_{10a,10b}=1,4$; 1)	5,09 (m; -, 1)	5,16-5,08 (m; -, 2)
10b	5,09 (m; -, 1)	5,05 (m; -, 1)	5,16-5,08 (m; -, 2)
	117,3*	115,7*	117,3*
11	3,88 (s; -, 3)	5,13 (s; -, 2)	5,16-5,08 (m; -, 2)
	56,4	71,3*	76,0*
12	-	-	-
	-	137,4	136,6
13	-	7,46-7,26 (m; -, 5)	7,49-7,30 (m; -, 5)
	-	127,3	128,4
14	-	7,46-7,26 (m; -, 5)	7,49-7,30 (m; -, 5)
	-	128,5	128,6
15	-	7,46-7,26 (m; -, 5)	7,49-7,30 (m; -, 5)
	-	127,8	128,3

Fonte: Do autor.

Nota: Com hachura: ^1H (300 MHz) - δ , em ppm (Multiplicidade; Acoplamento, em hertz; Integral); Sem hachura: ^{13}C (75 MHz) - δ , em ppm (* Carbono metilênico via DEPT-135)

4.1.3 Reações de epoxidação

Figura 18 - Reação de epoxidação



Fonte: Do autor.

Em um balão bitubulado de fundo redondo de 100 mL foi adicionado 2 eq. de ácido *m*-cloroperbenzóico e solubilizado em 40 mL de clorofórmio. A solução foi mantida em agitação em banho de gelo e o balão foi fechado em atmosfera inerte de argônio. Foi adicionado 1 eq. do fenilpropanoide em solução de clorofórmio através de seringa. A solução foi mantida em agitação a temperatura ambiente e a reação foi acompanhada por CCD utilizando como eluente mistura hexano e acetato de etila (7:3; v/v). Após 12 horas foi notado interrupção no desenvolvimento da reação.

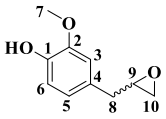
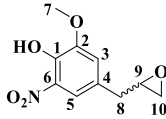
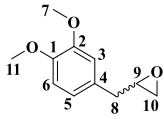

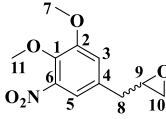
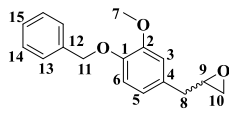
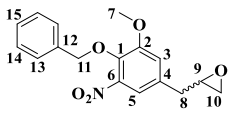

A mistura foi então lavada três vezes com solução saturada de bicarbonato de sódio e duas vezes com água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada em rotaevaporador e o material obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica utilizando como eluente hexano puro com aumento gradual de polaridade até a mistura hexano e acetato de etila (8:2; v/v).

Tabela 6 - Reagentes utilizados para obtenção de **43**, **44**, **45**, **46**, **47** e **48**

Fenilpropanoide	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzóico	Produto	Rendimento (%)
12 (0,3 mL; 1,85 mmol)	0,64 g (3,7 mmol)	43	49
38 (0,3 mL; 1,45 mmol)	0,5 g (2,9 mmol)	44	45
39 (0,3 mL; 1,7 mmol)	0,59 g (3,4 mmol)	45	52
40 (1 mL; 4,48 mmol)	1,55 g (8,96 mmol)	46	42
41 (1 mL; 3,95 mmol)	1,36 g (7,9 mmol)	47	52
42 (0,5 mL; 1,67 mmol)	0,58 g (3,34 mmol)	48	49

Fonte: Do autor.

Tabela 7 - Dados físico-químicos e caracterização na região do IV de **43**, **44**, **45**, **46**, **47** e **48**.

Dados	Dados físico-químicos			Ligação	Banda na região do IV, em cm^{-1} (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$)		
	43	44	45		43	44	45
Nome	(±)-2-metoxi-4-(oxiran-2-ilmetil)fenol	(±)-2-metoxi-6-nitro-4-(oxiran-2-ilmetil)fenol	(±)-2-(3,4-dimetoxibenzil)oxirano	O-H	3410	3230	-
F.M.	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_5$	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$	C-H	2938	2969	2936
M.M., em $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	180,20	225,20	194,23	C=C _{ar.}	1604	1622	1590
Aspecto	Óleo marrom	Semissólido laranja	Óleo castanho	C-O-C	1268	1265	1257
Estrutura Molecular				NO ₂	-	1537; 1332	-
R _f Hexano/AcOEt (7:3, v/v)	0,35	0,26	0,38		822	836	830
Dados	46	47	48	Lig.	46	47	48
Nome	(±)-2-(3,4-dimetoxi-5-nitrobenzil)oxirano	(±)-2-(4-(benziloxi)-3-metoxibenzil)oxirano	(±)-2-(4-(benziloxi)-3-metoxi-5-nitrobenzil)oxirano	O-H	-	-	-
F.M.	$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_5$	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_3$	$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_5$	C-H	2943	2926	2930
M.M., em $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	239,23	270,33	315,33	C=C _{ar.}	1614	1599	1666
Aspecto	Óleo amarelo	Óleo incolor	Semissólido amarelo	C-O-C	1278	1260	1281
Estrutura Molecular				NO ₂	1528; 1359	-	1533; 1361
R _f Hexano/AcOEt (7:3, v/v)	0,29	0,41	0,36		836	844	837

Fonte: Do autor.

Tabela 8 - Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C de **43**, **44**, **45**, **46**, **47** e **48**.

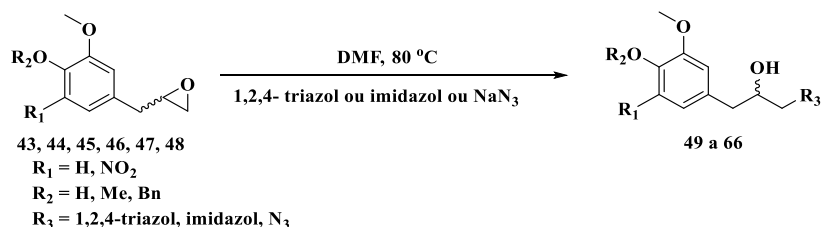
Posição	43	44	45	46	47	48 (^1H 400; ^{13}C 100 MHz)
1	-	-	-	-	-	-
	144,4	133,5	147,8	141,5	147,0	140,3
2	-	-	-	-	-	-
	146,5	149,9	148,9	154,0	149,7	154,2
3	6,85-6,70 (m; -, 3)	7,52 (d; $^4J_{3,5}=1,9$; 1)	6,77-6,74 (m; -, 3)	7,18 (d; $^4J_{3,5}=2,0$; 1)	6,84-6,70 (m; -, 3)	7,22 (d; $^4J_{3,5}=2,1$; 1)
	121,6	118,9	120,9	116,9	120,9	117,0
4	-	-	-	-	-	-
	129,0	128,5	129,7	133,6	130,4	133,7
5	6,85-6,70 (m; -, 3)	7,02 (d; $^4J_{5,3}=1,9$; 1)	6,77-6,74 (m; -, 3)	6,99 (d; $^4J_{5,3}=2,0$; 1)	6,84-6,70 (m; -, 3)	7,04 (d; $^4J_{5,3}=2,0$; 1)
	114,4	115,5	112,2	116,0	114,2	116,2
6	6,85-6,70 (m; -, 3)	-	6,77-6,74 (m; -, 3)	-	6,84-6,70 (m; -, 3)	-
	111,6	145,2	111,2	144,7	112,8	145,1
7	3,85 (s; -, 3)	3,91 (s; -, 3)	3,85 (s; -, 3)	3,92 (s; -, 3)	3,89 (s; -, 3)	3,94 (s; -, 3)
	55,9	56,7	55,9	62,0	56,0	56,5
8a	2,79-2,77 (m; -, 3)	2,69 (dd; $^3J_{8a,9}=6,5$, $^2J_{8a,8b}=14,9$; 1)	2,81-2,76 (m; -, 3)	2,72 (dd; $^3J_{8a,9}=6,5$, $^2J_{8a,8b}=14,8$; 1)	2,81-2,78 (m; -, 3)	2,77 (dd; $^3J_{8a,9}=6,4$, $^2J_{8a,8b}=14,9$; 1)
8b	2,79-2,77 (m; -, 3)	2,92 (dd; $^3J_{8b,9}=4,0$, $^2J_{8b,8a}=14,8$; 1)	2,81-2,76 (m; -, 3)	2,93 (dd; $^3J_{8b,9}=4,1$, $^2J_{8b,8a}=14,8$; 1)	2,81-2,78 (m; -, 3)	2,97 (dd; $^3J_{8b,9}=4,2$, $^2J_{8b,8a}=14,8$; 1)
	38,4*	37,9*	38,3*	38,1*	38,4*	38,2*
9	3,14-3,09 (m; -, 1)	3,11 (dtd; $^3J_{9,10b}=2,7$, $^3J_{9,10a}=3,9$, $^3J_{9,8a}=6,6$; 1)	3,10 (dtd; $^3J_{9,10b}=2,7$, $^3J_{9,10a}=3,9$, $^3J_{9,8a}=5,4$; 1)	3,13 (dtd; $^3J_{9,10b}=2,6$, $^3J_{9,10a}=4,0$, $^3J_{9,8a}=6,6$; 1)	3,14-3,12 (m; -, 1)	3,16 (dtd; $^3J_{9,10b}=2,6$, $^3J_{9,10a}=4,0$, $^3J_{9,8a}=6,6$; 1)
	52,8	51,9	52,6	51,9	52,6	51,8
10a	2,79-2,77 (m; -, 3)	2,79 (dd; $^3J_{10a,9}=4,0$, $^2J_{10a,10b}=4,7$; 1)	2,81-2,76 (m; -, 3)	2,80 (dd; $^3J_{10a,9}=3,9$, $^2J_{10a,10b}=4,8$; 1)	2,81-2,78 (m; -, 3)	2,84 (dd; $^3J_{10a,9}=3,8$, $^2J_{10a,10b}=4,9$; 1)
10b	2,53 (dd; $^3J_{10b,9}=2,6$, $^2J_{10b,10a}=4,9$; 1)	2,50 (dd; $^3J_{10b,9}=2,6$, $^2J_{10b,10a}=4,8$; 1)	2,51 (dd; $^3J_{10b,9}=2,7$, $^2J_{10b,10a}=4,9$; 1)	2,52 (dd; $^3J_{10b,9}=2,6$, $^2J_{10b,10a}=4,8$; 1)	2,54 (m; -, 1)	2,54 (dd; $^3J_{10b,9}=2,7$, $^2J_{10b,10a}=4,9$; 1)
	46,9*	46,6*	46,9*	46,7*	46,9*	46,6*
11	-	-	3,83 (s; -, 3)	3,86 (s; -, 3)	5,14 (s; -, 2)	5,15 (s; -, 2)
	-	-	55,8	56,5	71,1*	76,0*
12	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	137,3	136,5
13	-	-	-	-	7,45-7,42 (m; -, 2)	7,49-7,46 (m; -, 2)
	-	-	-	-	127,3	128,4
14	-	-	-	-	7,39-7,29 (m; -, 3)	7,40-7,32 (m; -, 3)
	-	-	-	-	128,5	128,7
15	-	-	-	-	7,39-7,29 (m; -, 3)	7,40-7,32 (m; -, 3)
	-	-	-	-	127,8	128,5

Fonte: Do autor.

Nota: Com hachura: ^1H (300 MHz) - δ , em ppm (Multiplicidade; Acoplamento, em hertz; Integral); Sem hachura: ^{13}C (75 MHz) - δ , em ppm. * : Carbono metilênico via DEPT-135.

4.1.4 Reações de abertura dos epóxidos com nucleófilos

Figura 19 - Reação de abertura de epóxido com nucleófilo



Fonte: Do autor.

Em um balão de fundo redondo de 25 mL foi adicionado 1 eq. do epóxido correspondente e 3 eq. do nucleófilo. O conteúdo do balão foi solubilizado em 5 mL de DMF e mantido em agitação a 80 °C em atmosfera inerte de argônio. Foram utilizadas 5 gotas de água para melhor dissolução dos reagentes, quando foi o caso. A reação foi acompanhada por CCD utilizando como eluente mistura clorofórmio e metanol (9:1; v/v). Após entre 12 e 120 horas foi notado interrupção no desenvolvimento da reação e a mistura foi mantida em capela sob jato de ar para evaporação do DMF.

Com o material bruto seco, este foi purificado por cromatografia em coluna de alumina neutra utilizando como eluente clorofórmio puro com aumento gradual de polaridade até a mistura clorofórmio e metanol (9:1; v/v).

Tabela 9 - Reagentes utilizados para abertura dos intermediários epóxido

Epóxido	1,2,4-Triazol	Imidazol	Azida de sódio	Água (gotas)	Tempo de reação (dias)	Produto	Rendimento (%)
43 (0,1 g; 0,55 mmol)	0,115 g (1,66 mmol)	0,114 g (1,66 mmol)	0,108 g (1,66 mmol)	-	4; 3; 3	49; 55; 61	34; 29; 33
44 (0,1 g; 0,44 mmol)	0,091 g (1,32 mmol)	0,090 g (1,32 mmol)	0,086 g (1,32 mmol)	-	4; 3; 3	50; 56; 62	32; 31; 31
45 (0,1 g; 0,52 mmol)	0,108 g (1,56 mmol)	0,106 g (1,56 mmol)	0,102 g (1,56 mmol)	-	3,5; 4; 3	51; 57; 63	37; 39; 39
46 (0,1 g; 0,42 mmol)	0,087 g (1,26 mmol)	0,086 g (1,26 mmol)	0,082 g (1,26 mmol)	-	5; 3; 4	52; 58; 64	36; 42; 36
47 (0,2 g; 0,74 mmol)	0,150 g (2,22 mmol)	0,150 g (2,22 mmol)	-	5; 5	1; 1	53; 59	52; 44
48 (0,15 g; 0,48 mmol)	0,098 g (1,42 mmol)	0,097 g (1,42 mmol)	0,093 g (1,42 mmol)	5; 5; 5	1; 1; 0,5	54; 60; 66	55; 44; 51

Fonte: Do autor.

Tabela 10 - Dados físico-químicos e caracterização na região do IV e de EM de 49 a 54

Dados	Dados físico-químicos			Ligação	Banda na região do IV, em cm^{-1} (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$)		
	49	50	51		49	50	51
Nome	(±)-4-(2-hidroxi-3-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)propil)-2-metoxifenol	(±)-4-(2-hidroxi-3-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)propil)-2-metoxi-6-nitrofenol	(±)-1-(3,4-dimetoxifenil)-3-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)propan-2-ol	O-H	3419	3388	3392
F.M.	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}$	$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$	C-H	2919	2917	2924
M.M., em g.mol^{-1}	249,27	294,27	263,30	C=C _{ar.}	1605	1653	1649
Aspecto (F.F., em °C)	Sólido branco (125-128)	Semissólido laranja	Óleo amarelo	C-O-C	1277	1262	1260
Estrutura Molecular				NO ₂	-	1531; 1324	-
Rf $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v)	0,28	0,23	0,34				
Massas (M+H) ⁺	250,1183	295,1033	264,1338				
Dados	52	53	54	Lig.	52	53	54
Nome	(±)-1-(3,4-dimetoxi-5-nitrofenil)-3-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)propan-2-ol	(±)-1-(4-(benziloxi)-3-metoxifenil)-3-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)propan-2-ol	(±)-1-(4-(benziloxi)-3-metoxi-5-nitrofenil)-3-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)propan-2-ol	O-H	3290	3356	3125
F.M.	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5$	$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$	$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_5$	C-H	2943	2925	2900
M.M., em g.mol^{-1}	308,29	339,40	384,39	C=C _{ar.}	1614	1660	1614
Aspecto (F.F., em °C)	Sólido amarelo (123-125)	Semissólido laranja	Semissólido cinza	C-O-C	1276	1261	1283
Estrutura Molecular				NO ₂	1530; 1357	-	1534; 1364
Rf $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v)	0,33	0,28	0,48				
Massas (M+H) ⁺	309,1190	340,22	385,22				

Fonte: Do autor.

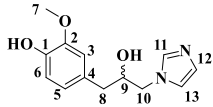
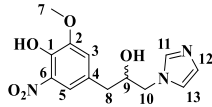
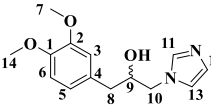
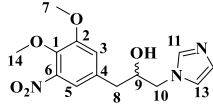
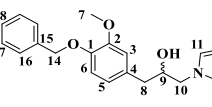
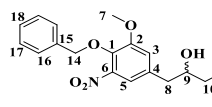
Tabela 11 - Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C de **49**, **50**, **51**, **52**, **53** e **54**

Posição	49	50	51	52	53	54
1	- 144,6	- 133,6	- 148,0	- 144,1	- 147,2	- 140,2
2	- 146,7	- 149,9	- 149,1	- 153,8	- 149,8	- 154,1
3	6,69 (d; $^4J_{3,5} = 1,7$; 1)	7,53 (d; $^4J_{3,5} = 2,0$; 1)	6,73 (dd; $^4J_{3,5} = 1,9$; 2)	7,15 (d; $^4J_{3,5} = 2,0$; 1)	6,75 (d; $^4J_{3,5} = 2,0$; 1)	7,21 (d; $^4J_{3,5} = 2,1$; 1)
4	- 111,8	- 119,2	- 121,3	- 117,5	- 121,3	- 117,4
5	128,5 6,66 (dd; $^4J_{5,3} = 1,9$; $^3J_{5,6} = 7,9$; 1)	- 7,05 (d; $^4J_{5,3} = 1,9$; 1)	- 6,73 (dd; $^4J_{5,3} = 1,9$; $^3J_{5,6} = 6,7$; 2)	- 6,98 (d; $^4J_{5,3} = 2,0$; 1)	- 6,67 (dd; $^4J_{5,3} = 2,0$; $^3J_{5,6} = 8,1$; 1)	- 7,03 (d; $^4J_{5,3} = 2,0$; 1)
6	122,0 6,82 (d; $^3J_{6,5} = 7,9$; 1)	116,0	112,3 6,80 (d; $^3J_{6,5} = 8,7$; 1)	116,3	114,3 6,82 (d; $^3J_{6,5} = 8,1$; 1)	116,5
7	114,7 3,83 (s; -; 3)	145,1 3,89 (s; -; 3)	111,4 3,85 (s; -; 3)	144,4 3,85 (s; -; 3)	113,1 3,86 (s; -; 3)	145,0 3,92 (s; -; 3)
8a	55,9 2,72-2,68 (m; -; 2)	56,8 2,80 (ddd; $^3J_{8a,9} = 4,6$; $^2J_{8a,8b} = 14,1$; 2)	55,9 2,74-2,71 (m; -; 2)	62,0 2,73 (ddd; $^3J_{8a,9} = 6,2$; $^2J_{8a,8b} = 21,8$; 2)	56,0 2,73-2,70 (m; -; 2)	56,5 2,88-2,84 (m; -; 2)
8b	2,72-2,68 (m; -; 2)	2,71 (ddd; $^3J_{8b,9} = 7,8$; $^2J_{8b,8a} = 14,0$; 2)	2,74-2,71 (m; -; 2)	2,68 (ddd; $^3J_{8b,9} = 6,2$; $^2J_{8b,8a} = 21,8$; 2)	2,73-2,70 (m; -; 2)	2,88-2,84 (m; -; 2)
9	40,6* 4,20-4,03 (m; -; 2)	40,0* 4,23-4,05 (m; -; 2)	40,5* 4,21-4,05 (m; -; 2)	40,3* 4,21-4,03 (m; -; 2)	40,5* 4,20-4,16 (m; -; 1)	40,0* 4,12-4,01 (m; -; 1)
10a	71,1 4,20-4,03 (m; -; 2)	70,3 4,23-4,05 (m; -; 2)	71,1 4,21-4,05 (m; -; 2)	70,0 4,21-4,03 (m; -; 2)	71,0 4,10-4,03 (m; -; 1)	71,7 3,50 (dd; $^3J_{10a,9} = 6,1$; $^2J_{10a,10b} = 11,2$; 1)
10b	4,32 (ddd; $^3J_{10b,9} = 2,9$; $^2J_{10b,10a} = 12,3$; 1)	4,29 (dd; $^3J_{10b,9} = 2,4$; $^2J_{10b,10a} = 13,3$; 1)	4,28 (dd; $^3J_{10b,9} = 2,4$; $^2J_{10b,10a} = 13,3$; 1)	4,26 (dd; $^3J_{10b,9} = 2,5$; $^2J_{10b,10a} = 13,1$; 1)	4,29-4,23 (m; -; 1)	3,61 (dd; $^3J_{10b,9} = 4,2$; $^2J_{10b,10a} = 11,2$; 1)
11	54,4* 8,06 (s; -; 1)	54,8* 8,10 (s; -; 1)	54,3* 8,08 (s; -; 1)	54,9* 8,10 (s; -; 1)	54,4* 8,06 (s; -; 1)	49,1* 7,49-7,32 (m; -; 7)
12	151,7 7,87 (s; -; 1)	151,7 7,84 (s; -; 1)	151,8 7,91 (s; -; 1)	151,3 7,78 (s; -; 1)	151,7 7,88 (s; -; 1)	154,1 7,49-7,32 (m; -; 7)
13	144,1 -	144,1 -	144,1 3,84 (s; -; 3)	141,3 3,82 (s; -; 3)	144,1 5,12 (s; -; 2)	133,7 5,13 (s; -; 2)
14	- -	- -	- 55,9	- 56,4	- 71,1*	- 76,0*
15	- -	- -	- -	- -	137,1 7,43-7,32 (m; -; 5)	136,5 7,49-7,32 (m; -; 7)
16	- -	- -	- -	- -	127,3 7,43-7,32 (m; -; 5)	128,4 7,49-7,32 (m; -; 7)
17	- -	- -	- -	- -	128,6 7,43-7,32 (m; -; 5)	128,6 7,49-7,32 (m; -; 7)
	- -	- -	- -	- -	127,9	128,5

Fonte: Do autor.

Nota: Com hachura: ^1H (300 MHz) - δ , em ppm (Multiplicidade; Acoplamento, em hertz; Integral); Sem hachura: ^{13}C (75 MHz) - δ , em ppm (* Carbono metilênico via DEPT-135)

Tabela 12 - Dados físico-químicos e caracterização na região do IV e de EM de 55 a 60

Dados	Dados físico-químicos			Ligaçã	Banda na região do IV, em cm ⁻¹ (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$)		
	55	56	57		55	56	57
Nome	(±)-4-(2-hidroxi-3-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)propil)-2-metoxifenol	(±)-4-(2-hidroxi-3-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)propil)-2-metoxi-6-nitrofenol	(±)-1-(3,4-dimetoxifenil)-3-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)propan-2-ol	O-H	3360	3410	3393
F.M.	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₃	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₅	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₃	C-H	2922	2917	2918
M.M., em g.mol⁻¹	248,28	293,28	262,31	C=C_{ar.}	1591	1622	1589
Aspecto (F.F., em °C)	Óleo marrom	Semissólido vermelho	Sólido marrom (130-133)	C-O-C	1262	1234	1236
Estrutura Molecular				NO₂	-	1510; 1336	-
Rf CHCl₃/Me OH (9:1, v/v)	0,14	0,12	0,18				
Massas (M+H)⁺	249,1228	294,2838	263,1382				
Dados	58	59	60	Lig.	58	59	60
Nome	(±)-1-(3,4-dimetoxi-5-nitrofenil)-3-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)propan-2-ol	(±)-1-(4-(benziloxi)-3-metoxifenil)-3-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)propan-2-ol	(±)-1-(4-(benziloxi)-3-metoxi-5-nitrofenil)-3-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)propan-2-ol	O-H	3456	3200	3195
F.M.	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₅	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₃	C ₂₀ H ₂₁ N ₃ O ₅	C-H	2917	2922	2921
M.M., em g.mol⁻¹	307,31	338,41	383,40	C=C_{ar.}	1615	1590	1612
Aspecto (F.F., em °C)	Semissólido laranja	Semissólido cinza	Semissólido laranja	C-O-C	1281	1226	1280
Estrutura Molecular				NO₂	1521; 1358	-	1527; 1358
Rf CHCl₃/Me OH (9:1, v/v)	0,16	0,14	0,18				
Massas (M+H)⁺	308,1235	339,23	384,23				

Fonte: Do autor.

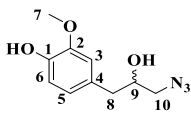
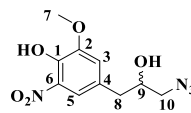
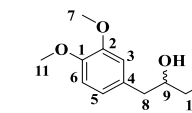
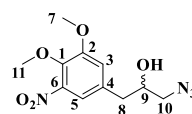
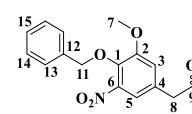
Tabela 13 - Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C de **55**, **56**, **57**, **58**, **59** e **60**

Posição	55	56	57	58	59	60 (^1H 400; ^{13}C 100 MHz)
1	-	-	-	-	-	-
	145,3	136,4	147,8	135,2	147,1	141,1
2	-	-	-	-	-	-
	147,7	150,8	149,0	154,1	149,8	155,1
3	6,67-6,62 (m; -; 2)	6,99 (s; -; 1)	6,81 (s; -; 1)	6,94 (s; -; 1)	6,75 (d; $^4J_{3,5}=2,0$; 1)	7,07 (s; -; 1)
	115,7	117,2	119,8	117,7	121,3	118,4
4	-	-	-	-	-	-
	129,6	126,9	129,7	128,8	121,9	-
5	6,67-6,62 (m; -; 2)	6,87 (s; -; 1)	6,74 (d; $^3J_{6,5}=6,7$; 2)	6,91 (s; -; 1)	6,67 (dd; $^4J_{5,3}=2,0$, $^3J_{5,6}=8,1$; 1)	6,94 (s; -; 1)
	113,8	116,9	112,4	116,4	114,4	117,2
6	6,84 (d; $^3J_{6,5}=7,9$; 1)	-	6,74 (d; $^3J_{6,5}=6,7$; 2)	-	6,83 (d; $^3J_{6,5}=8,1$; 1)	-
	112,1	-	111,3	144,8	113,1	145,1
7	3,82 (s; -; 3)	3,80 (s; -; 3)	3,85 (s; -; 6)	3,91 (s; -; 3)	3,85 (s; -; 3)	3,89 (s; -; 3)
	55,9	56,7	55,9	62,2	71,8	57,5
8a	2,73-2,60 (m; -; 2)	2,66-2,45 (m; -; 2)	2,71 (d; $^3J_{8a,9}=6,6$; 2)	2,73 (m; -; 2)	2,71-2,67 (m; -; 2)	2,71 (dd; $^2J_{8a,8b}=14,0$; $^3J_{8a,9}=8,7$; 1)
	2,73-2,60 (m; -; 2)	2,66-2,45 (m; -; 2)	2,71 (d; $^3J_{8b,9}=6,6$; 2)	2,73 (m; -; 2)	2,71-2,67 (m; -; 2)	2,80 (dd; $^2J_{8b,8a}=14,0$; $^3J_{8b,9}=4,1$; 1)
8b	40,8*	40,3*	40,8*	40,8*	40,8*	41,4*
	4,06-3,98 (m; -; 2)	3,43-3,24 (m; -; 1)	4,01 (d; $^3J_{9,8}=10,9$; 1)	3,94-3,87 (d; -; 1)	4,06-4,00 (m; -; 2)	3,96-3,88 (m; -; 1)
9	71,4	70,1	71,7	71,1	56,0	72,1
	4,06-3,98 (m; -; 2)	3,43-3,24 (m; -; 1)	4,49 (s; -; 2)	4,06-4,00 (m; -; 2)	4,06-4,00 (m; -; 2)	4,04 (dd; $^2J_{10a,10b}=4,0$; $^3J_{10a,9}=8,7$; 1)
10a	3,89 (m; -; 1)	4,05-3,99 (m; -; 1)	4,49 (s; -; 2)	4,06-4,00 (m; -; 2)	3,71-3,64 (m; -; 1)	4,08 (dd; $^2J_{10b,10a}=7,7$; $^3J_{10b,9}=3,5$; 1)
	52,3*	52,4*	52,6*	53,2*	52,4*	53,8*
11	7,48 (s; -; 1)	7,15 (s; -; 1)	7,42 (s; -; 1)	7,43 (s; -; 1)	7,59 (s; -; 1)	7,42 (s; -; 1)
	128,3	138,2	137,6	137,7	137,8	137,3
12	6,97 (d; $^3J_{12,13}=5,8$; 2)	7,27 (d; $^3J_{12,13}=1,8$; 1)	6,92 (s; 2)	6,99 (d; $^3J_{12,13}=2,0$; 1)	6,96 (m; -; 2)	7,02 (d; $^3J_{12,13}=2,1$; 1)
	121,9	128,3	128,4	122,0	128,9	129,9
13	7,52 (s; -; 1)	7,58 (s; -; 1)	6,92 (s; -; 2)	7,18 (d; $^3J_{13,12}=1,9$; 1)	6,96 (m; -; 2)	7,21 (d; $^3J_{13,12}=2,0$; 1)
	118,6	120,6	121,3	120,6	119,9	120,6
14	-	-	3,85 (s; -; 6)	3,86 (s; -; 3)	5,12 (s; -; 2)	5,14 (s; -; 2)
	-	-	55,9	56,9	71,2*	76,9*
15	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	135,1	135,0
16	-	-	-	-	7,48-7,29 (m; -; 5)	7,48-7,46 (m; -; 2)
	-	-	-	-	127,3	129,4
17	-	-	-	-	7,48-7,29 (m; -; 5)	7,37-7,33 (m; -; 3)
	-	-	-	-	128,6	129,6
18	-	-	-	-	7,48-7,29 (m; -; 5)	7,37-7,33 (m; -; 3)
	-	-	-	-	127,9	129,3

Fonte: Do autor.

Nota: Com hachura: ^1H (300 MHz) - δ , em ppm (Multiplicidade; Acoplamento, em hertz; Integral); Sem hachura: ^{13}C (75 MHz) - δ , em ppm (* Carbono metilênico via DEPT-135)

Tabela 14 - Dados físico-químicos e caracterização na região do IV de **61**, **62**, **63**, **64** e **66**

Dados	Dados físico-químicos			Ligação	Banda na região do IV, em cm^{-1} (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$)		
	61	62	63		61	62	63
Nome	(±)-4-(3-azido-2-hidroxipropil)-2-metoxifenol	(±)-4-(3-azido-2-hidroxipropil)-2-metoxi-6-nitrofenol	(±)-1-azido-3-(3,4-dimetoxifenil)propan-2-ol	O-H	3434	3391	3406
F.M.	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$	C-H	2936	2928	2925
M.M., em g.mol^{-1}	223,23	268,23	237,26	C=C _{ar.}	1605	1644	1592
Aspecto (F.F., em °C)	Óleo amarelo	Óleo laranja	Óleo incolor	C-O-C	1271	1264	1261
Estrutura Molecular				N=N=N	2101	2101	2099
Rf $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v)	0,48	0,45	0,53	NO ₂	-	1544; 1363	-
Dados	64		66	Lig.	64	66	
Nome	(±)-1-azido-3-(3,4-dimetoxi-5-nitrofenil)propan-2-ol		(±)-1-azido-3-(4-(benziloxi)-3-metoxi-5-nitrofenil)propan-2-ol	O-H	3374	3396	
F.M.	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5$		$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$	C-H	2942	2930	
M.M., em g.mol^{-1}	282,25		358,35	C=C _{ar.}	1614	1662	
Aspecto (F.F., em °C)	Óleo amarelo		Óleo preto	C-O-C	1278	1280	
Estrutura Molecular			N=N=N	2097	2100		
Rf $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v)	0,49		0,53	NO ₂	1529; 1358	1531; 1361	

Fonte: Do autor.

Tabela 15 - Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C de **61**, **62**, **63**, **64** e **66**

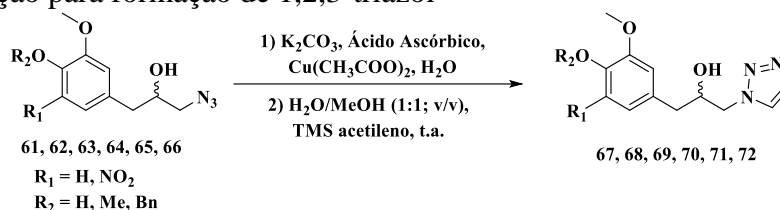
Posição	61	62	63	64	66
1	-	-	-	-	-
	144,4	133,5	147,8	141,5	136,4
2	-	-	-	-	-
	146,6	149,9	149,0	154,0	154,3
3	6,69-6,65 (m; -, 2)	7,53 (d; $^4J_{3,5}=2,0$; 1)	6,75-6,71 (m; -, 2)	7,16 (d; $^4J_{3,5}=2,0$; 1)	7,08 (d; $^4J_{3,5}=2,0$; 1)
	111,8	115,9	121,3	116,3	116,5
4	-	-	-	-	-
	128,8	128,6	129,5	133,7	130,6
5	6,69-6,65 (m; -, 2)	7,01 (d; $^4J_{5,3}=1,9$; 1)	6,75-6,71 (m; -, 2)	6,96 (d; $^4J_{5,3}=1,9$; 1)	7,20 (d; $^4J_{5,3}=2,0$; 1)
	121,9	119,1	112,3	117,2	117,4
6	6,83 (d; $^3J_{6,5}=7,9$; 1)	-	6,81 (d; $^3J_{6,5}=7,9$; 1)	-	-
	114,6	145,2	111,3	144,6	144,9
7	3,85 (s; -, 3)	3,92 (s; -, 3)	3,86 (s; -, 3)	3,92 (s; -, 3)	3,93 (s; -, 3)
	55,9	56,8	55,9	62,0	56,6
8a	2,67 (dd; $^3J_{8a,9}=6,2$, $^2J_{8a,8b}=12,5$; 1)	2,72 (dd; $^3J_{8a,9}=7,0$, $^2J_{8a,8b}=13,3$; 1)	2,70 (dd; $^3J_{8a,9}=6,8$, $^2J_{8a,8b}=12,9$; 1)	2,73 (dd; $^3J_{8a,9}=6,6$, $^2J_{8a,8b}=12,8$; 1)	2,77 (dd; $^2J_{8a,9}=7,3$, $^3J_{8a,8b}=14,1$; 1)
8b	2,74 (dd; $^3J_{8b,9}=4,5$, $^2J_{8b,8a}=12,5$; 1)	2,78 (dd; $^3J_{8b,9}=4,5$, $^2J_{8b,8a}=13,3$; 1)	2,77 (dd; $^3J_{8b,9}=4,8$, $^2J_{8b,8a}=13,0$; 1)	2,79 (dd; $^3J_{8b,9}=4,1$, $^2J_{8b,8a}=12,8$; 1)	2,90-2,82 (m; -, 1)
9	40,5*	39,9*	40,4*	40,1*	40,2*
	3,97-3,89 (m; -, 1)	4,01-3,94 (m; -, 1)	4,00-3,92 (m; -, 1)	4,0-3,95 (m; -, 1)	4,56-4,46 (m; -, 1)
10a	71,9	71,2	71,8	71,2	70,8
	3,26 (dd; $^3J_{10a,9}=6,7$, $^2J_{10a,10b}=12,5$; 1)	3,29 (dd; $^3J_{10a,9}=6,8$, $^2J_{10a,10b}=12,4$; 1)	3,28 (dd; $^3J_{10a,9}=6,7$, $^2J_{10a,10b}=12,5$; 1)	3,29 (dd; $^3J_{10a,9}=6,8$, $^2J_{10a,10b}=12,5$; 1)	1,21 (dd; $^2J_{10a,9}=2,4$, $^3J_{10a,10b}=6,0$; 1)
10b	3,35 (dd; $^3J_{10b,9}=3,8$, $^2J_{10b,10a}=12,5$; 1)	3,42 (dd; $^3J_{10b,9}=3,8$, $^2J_{10b,10a}=12,4$; 1)	3,37 (dd; $^3J_{10b,9}=3,8$, $^2J_{10b,10a}=12,5$; 1)	3,40 (dd; $^3J_{10b,9}=3,8$, $^2J_{10b,10a}=12,4$; 1)	1,39-1,31 (m; -, 1)
11	55,9*	56,2*	55,9*	56,1*	54,5*
	-	-	3,85 (s; -, 3)	3,89 (s; -, 3)	5,13 (s; -, 2)
12	-	-	55,9	56,5	76,0*
	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	133,6
	-	-	-	-	7,50-7,43 (m; -, 2)
14	-	-	-	-	128,4
	-	-	-	-	7,41-7,31 (m; -, 3)
15	-	-	-	-	128,6
	-	-	-	-	7,41-7,31 (m; -, 3)
	-	-	-	-	128,5

Fonte: Do autor.

Nota: Com hachura: ^1H (300 MHz) - δ , em ppm (Multiplicidade; Acoplamento, em hertz; Integral); Sem hachura: ^{13}C (75 MHz) - δ , em ppm (* Carbono metilênico via DEPT-135)

4.1.5 Reações para formação de 1,2,3-triazol

Figura 20 - Reação para formação de 1,2,3-triazol



Fonte: Do autor.

Em um balão de fundo redondo de 10 mL foi adicionado 1,6 eq. de carbonato de potássio e 0,4 eq. de ácido ascórbico e a mistura foi solubilizada em 2 mL de água destilada e mantida em agitação. À mistura foi adicionado 1 eq. do derivado de azida em solução de água e metanol (1:1; v/v) e 0,2 eq. de acetato de cobre. Foi adicionado 1,6 eq. de trimetilsililacetileno através de micropipeta volumétrica e a reação foi mantida em agitação a temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCD utilizando como eluente mistura clorofórmio e metanol (9,5:0,5; v/v).

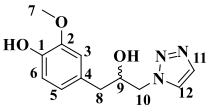
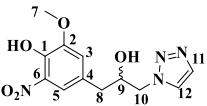
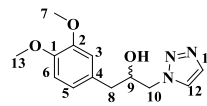
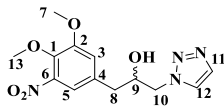
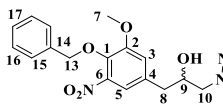
Após 24 horas de reação foi notado seu término; então o material foi dissolvido em 100 mL de diclorometano e lavado com água destilada duas vezes. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada em rotaevaporador. O material obtido foi purificado em cromatografia em coluna de alumina neutra utilizando eluente clorofórmio puro com aumento gradual de polaridade até a mistura clorofórmio e metanol (9:1; v/v).

Tabela 16 - Reagentes utilizados para formação de 1,2,3-triazol

Azida	K ₂ CO ₃	Ácido Ascórbico	Acetato de Cobre	TMS acetileno	Produto	Rendimento (%)
61 (0,06 g; 0,27 mmol)	0,059 g (0,43 mmol)	0,019 g (0,108 mmol)	0,011 g (0,054 mmol)	59 µL (0,43 mmol)	67	59
62 (0,07 g; 0,26 mmol)	0,058 g (0,416 mmol)	0,019 g (0,104 mmol)	0,01 g (0,052 mmol)	58 µL (0,416 mmol)	68	60
63 (0,08 g; 0,34 mmol)	0,075 g (0,544 mmol)	0,024 g (0,136 mmol)	0,014 g (0,068 mmol)	75 µL (0,544 mmol)	69	55
64 (0,02 g; 0,07 mmol)	0,016 g (0,112 mmol)	0,005 g (0,028 mmol)	0,003 g (0,014 mmol)	16 µL (0,112 mmol)	70	65
66 (0,05 g; 0,14 mmol)	0,031 g (0,224 mmol)	0,01 g (0,056 mmol)	0,005 g (0,028 mmol)	31 µL (0,224 mmol)	72	58

Fonte: Do autor.

Tabela 17 - Dados físico-químicos e caracterização na região do IV e de EM de 67 a 70 e 72

Dados				Ligação	Banda na região do IV, em cm^{-1} (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$)		
	67	68	69		67	68	69
Nome	(±)-4-(2-hidroxi-3-(1H-1,2,3-triazol-1-il)propil)-2-metoxifenol	(±)-4-(2-hidroxi-3-(1H-1,2,3-triazol-1-il)propil)-2-metoxi-6-nitrofenol	(±)-1-(3,4-dimetoxifenil)-3-(1H-1,2,3-triazol-1-il)propan-2-ol	O-H	3139	3394	3382
F.M.	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5$	$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$	C-H	2941	2937	2936
M.M., em $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	249,27	294,26	263,29	C=C _{ar.}	1601	1632	1591
Aspecto (F.F., em °C)	Semissólido branco	Óleo vermelho	Óleo incolor	C-O-C	1269	1267	1259
Estrutura Molecular				NO ₂	-	1531; 1381	-
Rf $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v)	0,33	0,32	0,39				
Massas (M+H) ⁺	250,21	295,1032	264,1337				
Dados	70		72	Lig.	70	72	
Nome	(±)-1-(3,4-dimetoxi-5-nitrofenil)-3-(1H-1,2,3-triazol-1-il)propan-2-ol		(±)-1-(4-(benziloxi)-3-metoxi-5-nitrofenil)-3-(1H-1,2,3-triazol-1-il)propan-2-ol	O-H	3383	3302	
F.M.	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5$		$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_5$	C-H	2941	2917	
M.M., em $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	308,29		384,39	C=C _{ar.}	1615	1612	
Aspecto (F.F., em °C)	Óleo laranja		Semissólido marrom	C-O-C	1281	1223	
Estrutura Molecular				NO ₂	1531; 1361	1530; 1357	
Rf $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v)	0,36		0,53				
Massas (M+H) ⁺	309,1188		385,21				

Fonte: Do autor.

Tabela 18 - Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C de **67**, **68**, **69**, **70** e **72**

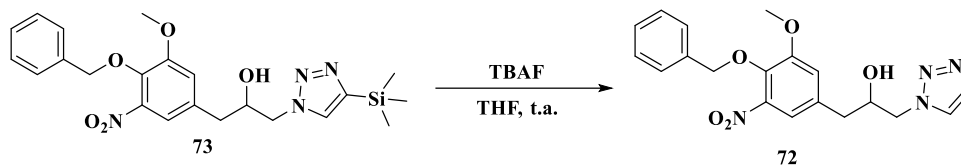
Posição	67	68	69	70	72
1	-	-	-	-	-
	144,7	133,8	147,9	141,4	140,3
2	-	-	-	-	-
	146,8	150,1	149,0	153,9	154,3
3	6,71-6,67 (m; -, 2)	7,07 (s; -, 1)	6,79-6,71 (m; -, 3)	7,05 (dd; $^4J_{3,5}=2,0$; 1)	6,45 (d; $^4J_{3,5}=2,0$; 1)
	114,7	119,3	121,4	116,4	117,4
4	-	-	-	-	-
	125,1	128,2	129,2	133,7	133,4
5	6,71-6,67 (m; -, 2)	7,55 (s; -, 1)	6,79-6,71 (m; -, 3)	7,21 (d; $^4J_{5,3}=1,8$, 1)	7,09 (d; -, 1)
	112,1	116,0	112,4	117,6	116,5
6	6,82-6,79 (m; -, 1)	-	6,79-6,71 (m; -, 3)	-	-
	122,0	145,4	111,3	144,5	145,1
7	3,82 (s; -, 3)	3,93 (s; -, 3)	3,82 (s; -, 3)	3,94 (s; -, 3)	3,33 (s; -, 3)
	55,9	56,9	55,9	56,5	56,6
8a	2,65 (dd; $^3J_{8a,9}=7,5$, $^2J_{8a,8b}=13,9$; 1)	2,89-2,66 (m; -, 2)	2,66 (dd; $^3J_{8a,9}=7,5$, $^2J_{8a,8b}=13,8$; 1)	2,77 (dd; $^3J_{8a,9}=7,2$, $^2J_{8a,8b}=13,9$; 1)	2,14 (dd; $^3J_{8a,9}=7,6$, $^2J_{8a,8b}=14,0$; 1)
8b	2,74 (m; -, 1)	2,89-2,66 (m; -, 2)	2,76 (dd; $^3J_{8b,9}=5,2$, $^2J_{8b,8a}=13,8$; 1)	2,87 (dd; $^3J_{8b,9}=4,6$, $^2J_{8b,8a}=14,0$; 1)	2,25 (dd; $^3J_{8b,9}=4,0$, $^2J_{8b,8a}=13,6$; 1)
9	40,1*	40,1*	40,5*	40,3*	40,3*
	4,31-4,20 (m; -, 2)	4,33 (d; $^3J_{9,10a}=8,4$; 2)	4,30-4,20 (m; -, 2)	4,38-4,28 (m; -, 2)	3,11-3,05 (m; -, 2)
10a	71,4	70,9	71,3	70,8	70,8
	4,31-4,20 (m; -, 2)	4,33 (d; $^3J_{10a,9}=8,4$; 2)	4,30-4,20 (m; -, 2)	4,38-4,28 (m; -, 2)	3,11-3,05 (m; -, 2)
10b	4,49 (dd; $^3J_{10b,9}=2,5$, $^2J_{10b,10a}=13,4$; 1)	4,53 (d; $^2J_{10b,10a}=9,9$; 1)	4,49 (dd; $^3J_{10b,9}=2,0$, $^2J_{10b,10a}=12,9$; 1)	4,53 (dd; $^3J_{10b,9}=7,6$, $^2J_{10b,10a}=10,6$; 1)	3,95 (m; -, 1)
11	54,9*	55,1*	54,9*	55,1*	54,9*
	7,67 (s; -, 1)	7,66 (s; -, 2)	7,65 (d; $^3J_{11,12}=1,0$; 1)	7,68-7,62 (m; -, 2)	6,90-6,71 (m; -, 7)
12	128,5	133,5	133,5	133,4	129,7
	7,60 (m; -, 1)	7,66 (s; -, 2)	7,59 (d; $^3J_{12,11}=0,9$; 1)	7,68-7,62 (m; -, 2)	6,90-6,71 (m; -, 7)
13	133,4	125,2	125,1	130,7	-
	-	-	3,81 (s; -, 3)	3,91 (s; -, 3)	4,53 (s; -, 2)
14	-	-	55,9	62,0	76,0*
	-	-	-	-	6,90-6,71 (m; -, 7)
15	-	-	-	-	136,4
	-	-	-	-	6,90-6,71 (m; -, 7)
16	-	-	-	-	128,4
	-	-	-	-	6,90-6,71 (m; -, 7)
17	-	-	-	-	128,6
	-	-	-	-	6,90-6,71 (m; -, 7)
	-	-	-	-	128,5

Fonte: Do autor.

Nota: Com hachura: ^1H (300 MHz) - δ , em ppm (Multiplicidade; Acoplamento, em hertz; Integral); Sem hachura: ^{13}C (75 MHz) - δ , em ppm (* Carbono metilênico via DEPT-135)

4.1.6 Reação de desproteção de 1,2,3-triazol dissustituído

Figura 21 - Reação de desproteção de 1,2,3-triazol dissustituído



Fonte: Do autor.

Em um balão de fundo redondo de 25 mL foi solubilizado 1 eq. do produto protegido em quantidade suficiente de THF. Foi adicionado 1 eq. de TBAF em solução de THF e mantido em agitação a temperatura ambiente conforme reação era acompanhada por CCD.

O término da reação foi observado após 24 horas, sendo então o material concentrado em rotaevaporador, solubilizado em DCM e lavado com água destilada uma vez. A fase orgânica foi concentrada em rotaevaporador e o produto desprotegido foi obtido sem necessidade de purificação por coluna cromatográfica.

Tabela 19 - Reagentes utilizados para desproteção de 1,2,3-triazol dissustituído

1,2,3-triazol dissustituído	TBAF	Produto	Rendimento (%)
73 (20 mg; 0,055 mmol)	17 µg (0,055 mmol)	72	100

Fonte: Do autor.

A substância **73** não foi caracterizada por espectrometria de absorção na região do IV e nem de RMN. Somente foi observado sua formação através de CCD onde dois produtos eram formados em cada reação, sendo o menos polar o material dissustituído e o mais polar o produto de interesse.

4.2 MÉTODOS PARA RESOLUÇÃO QUIRAL DOS ENANTIÔMEROS

Os enantiômeros isolados foram obtidos durante estágio sanduiche no Laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal, sob supervisão das professoras Dra. Maria Emília da Silva Pereira de Souza, Dra. Maria Elizabeth Tiritan e da técnica Dra. Sara Manuela Mendonça da Silva Cravo.

Os híbridos **60'** e **60''** foram isolados por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna quiral. Todos os solventes utilizados apresentavam grau CLAE de pureza. As fases

móveis foram preparadas por relação volume/volume e degaseificadas por 15 minutos em banho de ultrassom. Todo o volume de amostra foi filtrado através de membrana Durapore-GV de $0,45 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Millipore) antes da injeção. As fases móveis utilizadas foram baseadas em misturas de n-hexano, etanol, metanol e isopropanol, acompanhados ou não de dietilamina como base em modo normal.

Foi utilizado equipamento *Jasco 880-PU Intelligent HPLC Pump* (Japão) de injeção manual com *loop* de $20 \mu\text{L}$ acoplado a detector *Jasco 875-UV Intelligent UV/VIS Detector*, polarímetro *Jasco OR-2090Plus Chiral Detector* e sistema de controle *Jasco LC-Net II/ADC*.

4.2.1 Validação de método

Foram utilizadas colunas analíticas preenchidas com fases estacionárias quirais de carbamato fundamentadas em amilose ($25 \times 0,46 \text{ cm}$) ou celulose ($15 \times 0,46 \text{ cm}$).

O espectro de varredura na região do UV foi avaliado e definido em 260 nm como o de maior absorção. As separações cromatográficas foram desenvolvidas à temperatura ambiente, em fluxo de $0,8 \text{ mL.min}^{-1}$. A coluna foi acondicionada com etanol absoluto *overnight* em fluxo de $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$.

O fator de retenção (k) foi calculado por $[k = (T_R - T_0)/T_0]$ onde T_R é o tempo de eluição do primeiro enantiômero. O fator de enantiosseletividade (α) foi determinado como $[\alpha = k_2/k_1]$. O fator de resolução (R_s) foi determinado como $[R_s = 2(T_{R2} - T_{R1})/(W_1 + W_2)]$ onde T_R e W são os tempos de retenção e a largura de base do pico de cada enantiômero. O T_0 foi considerado como o tempo igual ao do pico da frente de solvente.

4.2.2 Obtenção quantitativa dos enantiômeros

Para coleta de cada enantiômero isolado, o polarímetro foi desconectado e a coleta foi realizada a partir da saída de eluente do tubo conectado ao UV-VIS. O tempo de saída foi calculado subtraindo o tempo de detecção no polarímetro do tempo de detecção no UV-VIS, o que resultou em aproximadamente 30 segundos em fluxo de $0,8 \text{ mL.min}^{-1}$. Esse tempo também poderia ter sido calculado através da espessura e comprimento da tubagem e o fluxo.

A partir disso foram definidos cortes no cromatograma de forma que isso permitisse a coleta de frações de fase móvel contendo cada enantiômero isoladamente. As frações iguais foram reunidas e foram analisadas de modo a se verificar o excesso enantiomérico em cada caso.

4.2.3 Método para determinação de rotação específica

Os valores de rotação óptica foram determinados em polarímetro Perkin-Elmer 241 equipado com lâmpada de sódio a temperatura de 22,8 °C a partir da fórmula $\{[\alpha]_D = \alpha \cdot 100 / l \cdot c\}$, sendo α , a rotação observada; l , o comprimento do tubo em dm (decímetro); c , a concentração em $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. O volume na célula de leitura foi de 1 mL e o caminho óptico de 10 dm.

4.3 MÉTODOS PARA REALIZAÇÃO DOS ESTUDOS *IN VITRO*

Os estudos de viabilidade celular e tripanossomicidas foram realizados no Laboratório de Patologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas, UNIFAL-MG, sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Lívia de Figueiredo Diniz Castro e com a colaboração da doutoranda Valquíria Ângelis Fernandes. Os híbridos foram solubilizados em mistura de água e DMSO.

4.3.1 Avaliação de viabilidade celular

Os estudos de viabilidade celular foram desenvolvidos utilizando placas de 96 poços. O plaqueamento foi feito poço a poço, adicionando 200 μL de meio DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) suplementado a 5% de soro fetal bovino (SFB) contendo uma suspensão de 2×10^3 células Vero ou H9c2. As placas foram mantidas por 24 horas em estufa a 37 °C e com atmosfera controlada a 5% de CO_2 .

Após esse período e já com as células Vero ou H9c2 aderidas à placa, foi feita a incubação das células com os híbridos através da substituição do meio previamente existente por meio DMEM suplementado a 5% de SFB junto de diferentes concentrações (400; 200; 100; 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) dos dezessete híbridos a serem avaliados individualmente. Para o controle positivo, foram utilizados quatro poços contendo células incubadas somente com o meio DMEM suplementado a 5% de SFB.

Dessa forma, as placas foram incubadas por 48 horas em estufa com atmosfera e temperatura controladas. Após esse período, o meio existente foi substituído por meio DMEM suplementado a 5% de SFB contendo 10% de resazurina (Sigma[®]) 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Foram mantidos oito poços para controle negativo com meio DMEM suplementado a 5% SFB sem células, com e sem adição de resazurina em cada quatro poços, de modo que se permitiram os cálculos de redução. Seis horas após a adição da resazurina a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm, com objetivo de calcular o percentual de redução e de inibição.

Para determinar o percentual de redução do corante, correspondente a atividade metabólica celular, inicialmente é feito o cálculo do fator de correção (R_0), calculado a partir dos valores de absorvância do controle negativo (**Controle -**), onde não houve adição de células. mA_{570} ou mA_{600} são as média das absorvâncias do grupo controle em 570 ou 600 nm; mA_{570Rz} ou mA_{570Mp} são as média das absorvâncias dos poços contendo meio e resazurina ou meio puro em 570 nm; mA_{600Rz} e mA_{600Mp} são as média das absorvâncias dos poços contendo meio e resazurina ou meio puro em 600 nm. Foram considerados valores de R_0 próximos de 0,7. Esse cálculo foi realizado a partir da seguinte fórmula:

$$R_0 = \left(\frac{mA_{570Rz} - mA_{570Mp}}{mA_{600Rz} - mA_{600Mp}} \right)_{\text{Controle -}}$$

Em seguida, foi feito o cálculo de **Redução do controle**, baseado no valor obtido da redução nos poços contendo células, meio e resazurina, na ausência de substâncias em avaliação. A fórmula para obtenção de **Redução do controle** está mostrada adiante:

$$\text{Redução do controle} = mA_{570} - (mA_{600} \times R_0)$$

A partir desses valores, foi calculado o percentual de inibição da proliferação para cada uma das substâncias em avaliação, seguindo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[\frac{A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Tratado}}}{\text{Redução do controle}} \right] \times 100$$

Nestas fórmulas, A_{570} = Absorbância a 570 nm; A_{600} = Absorbância a 600 nm. A obtenção desses dados permitiu a construção de gráfico baseado em dose-efeito com auxílio do software *GraphPad Prism 8*.

4.3.2 Avaliação de atividade anti-*T. cruzi*

Os parasitos utilizados foram *T. cruzi* cepa Y (Silva; Nussenzweig, 1953) obtidos a partir de garrafas de cultura de células de 100 mL contendo células distribuídas em monocamada e infectadas com sangue de camundongos infectados.

4.3.2.1 Avaliação contra as formas amastigotas

A avaliação do efeito do tratamento com os híbridos contra formas amastigotas de *T. cruzi* foi realizada utilizando células Vero ou H9c2 como hospedeiras.

Foram utilizadas placas de 24 poços para plaquear 7500 células em cada poço. Após adesão em lamínula de vidro, as células foram infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* na proporção de 20 parasitos por célula. Após 24 horas de interação, cada poço foi lavado com meio DMEM a fim de remover os parasitos não internalizados e proceder à incubação com as substâncias. Foi utilizado meio de cultura fresco, contendo ou não as substâncias em concentração única $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, para adição em cada poço e incubação das células novamente. Foi definida, a partir de recomendações da literatura (Katsuno *et al.*, 2015; Romanha *et al.*, 2010), a utilização de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, baseada também nos resultados obtidos a partir dos estudos de citotoxicidade. Em todos os experimentos foram mantidas como controle células infectadas e não tratadas. Após 48 horas de incubação, as lamínulas contendo as células foram lavadas com meio, fixadas com metanol e coradas por solução de Giemsa.

Após secagem das lamínulas e montagem em lâmina com Entellan (Merck®), foi determinado o número de células infectadas em uma contagem de no mínimo 200 células ao microscópio ótico (aumento de 100x). Apenas as formas do parasito com morfologia característica foram consideradas na avaliação da infecção. O percentual de infecção observado nas células tratadas foi utilizado para calcular o percentual de redução do número de células infectadas com relação àquelas infectadas e não tratadas. Esse percentual de inibição foi então utilizado para construção de gráfico baseado em dose-efeito com auxílio dos softwares *GraphPad Prism 8* e *CompuSyn* (Biosoft, Reino Unido). Todos os experimentos com amastigotas foram realizados em triplicatas, em no mínimo duas repetições.

4.3.2.2 Atividade contra as formas tripomastigotas

A avaliação do efeito do tratamento com os híbridos contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi realizada utilizando 250 mil parasitos por poço em placas de 96 poços na presença de diferentes concentrações (100; 50; 25; $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) dos híbridos em avaliação.

Os parasitos foram incubados por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 . Após a incubação, a viabilidade dos parasitos foi examinada pela mobilidade dos mesmos por análise em microscópio óptico e quantificados os parasitos vivos em câmara de Neubauer. Em todos os experimentos foram mantidos como controle poços com parasitos não tratados. O percentual

de mortalidade foi calculado a partir da comparação entre os poços tratados e não tratados. O experimento foi realizado em triplicatas, com no mínimo duas repetições. Os cálculos de EC₅₀ foram realizados com auxílio dos softwares *GraphPad Prism 8* e *CompuSyn*.

4.4 MÉTODOS PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estatísticos foram avaliados por teste T, sendo os dados considerados significativos quando a probabilidade de erro foi menor que 5% ($P < 0,005$).

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram planejados dezoito híbridos entre o eugenol e subunidades de fármacos azólicos como agentes antiparasitários contra *T. cruzi* através da inibição de CYP51. Para sua obtenção foi construída rota sintética contendo trinta e cinco derivados do eugenol, sendo **40**, **42** e **44** a **72** inéditos.

O eugenol, de origem natural, é provido de atividade contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*, com EC₅₀ de 500 µmol.L⁻¹. Sua benzilação, acompanhada ou não da nitração, gerou derivados, **41** e **42**, mais ativos, com EC₅₀ de 46 e 11 µmol.L⁻¹, respectivamente.

Ao avaliar os dezessete produtos finais híbridos em estudos *in vitro* de viabilidade celular com linhagens de células Vero e H9c2, foi demonstrado que não apresentavam atividade citotóxica em concentrações menores que 200 µg.mL⁻¹. Isso permite que essas substâncias sejam seletivas em estudos antimicrobianos. Somente **51**, **56** e **70** demonstraram atividade citotóxica em concentração de 400 µg.mL⁻¹, com CC₅₀ em torno de 1 mmol.L⁻¹.

Esses resultados levaram à avaliação dos mesmos contra as diferentes formas clinicamente relevantes do parasito *T. cruzi* cepa Y. Seu planejamento teve como alvo formas amastigotas replicativas, no entanto foi identificada atividade somente contra formas tripomastigotas extracelulares. Os híbridos **60** e **72** apresentaram valor de EC₅₀ de 7,2 e 29 µmol.L⁻¹ contra as formas não replicativas e índice de seletividade maior que 140 vezes.

Sendo o híbrido **60** o mais ativo entre os derivados de eugenol, foram avaliados seus enantiômeros isolados contra as formas susceptíveis ao racemato. Foi demonstrado que os enantiômeros **60'** e **60''** apresentaram valor de EC₅₀ de 22 µmol.L⁻¹, o que corrobora a atividade encontrada para o racemato **60**, apesar de ser inferior. Há possibilidade que ocorra sinergismo entre os enantiômeros quando em mistura racêmica e mais estudos serão necessários para confirmar essa hipótese.

Considerando a ineficiência dos híbridos em atuar contra formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, atividade amplamente reconhecida para fármacos azólicos, avalia-se que estes devam agir por mecanismo de ação diferente do reportado para azóis. A presença do grupo benzílico foi de extrema importância para aumentar atividade contra formas tripomastigotas, visto que sem esse grupo não foi identificado potencial. O mesmo é observado para a presença do heterociclo na estrutura, ainda que a atividade não seja exclusiva para um ou outro heterociclo específico. Diante disso, considera-se **60** um candidato relevante para prosseguimento em estudos biológicos de atividade tripanossomicida *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, P. H. O. *et al.* Synthesis and biological evaluation of new eugenol mannich bases as promising antifungal agents. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 86, n. 4, p. 459–465, 1 Oct. 2015.
- ALVARENGA, D. J. *et al.* Synthesis of eugenol-derived glucosides and evaluation of their ability in inhibiting the angiotensin converting enzyme. **Natural Product Research**, v. 36, n. 9, p. 2246–2253, 2020a.
- ALVARENGA, D. J. *et al.* Exploring how structural changes to new Licarin A derivatives effects their bioactive properties against rapid growing mycobacteria and biofilm formation. **Microbial Pathogenesis**, v. 144, 1 July. 2020b.
- AVARIA, A. *et al.* Population movements, borders, and chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 116, n. 1, 2021.
- AZEREDO, C. M. O. *et al.* *In vitro* biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on Cinnamomum verum essential oil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, 22 Aug. 2014.
- AZEVEDO-BARBOSA, H. *et al.* Phenylpropanoid-based sulfonamide promotes cyclin D1 and cyclin E down-regulation and induces cell cycle arrest at G1/S transition in estrogen positive MCF-7 cell line. **Toxicology in vitro**, v. 59, p. 150–160, 1 Sept. 2019.
- AZEVEDO-BARBOSA, H. *et al.* Design, Synthesis, Antimicrobial Evaluation and *in silico* Studies of Eugenol-Sulfonamide Hybrids. **Chemistry and Biodiversity**, v. 18, n. 5, 1 May 2021.
- BAHIA, M. T. *et al.* Fexinidazole: a potential new drug candidate for chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, Nov. 2012.
- BAHIA, M. T. *et al.* Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4362–4370, 2014.
- BARR, S. C. *et al.* A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 5160–5161, Dec. 2005.
- BARREIRO, E. J. L. **LASSBio**: 20 anos. Rio de Janeiro, RJ: Universidade do Rio de Janeiro, 2014.
- BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 30 July 2015.
- BOLOGNESI, M. L. Polypharmacology in a Single Drug: Multitarget Drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1639, 2013.

BOROWIECKI, P. *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of imidazolium and triazolium chiral ionic liquids. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 4, p. 712–720, 2013.

BRANCAGLION, G. A. *et al.* *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activities of 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-cromen-2-one, a new synthetic coumarin of low cytotoxicity against mammalian cells. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 92, n. 5, p. 1888–1898, 2018.

BUSTAMANTE, J. M. *et al.* New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 1, p. 150–162, 1 Jan. 2014.

CALCATERRA, A.; D'ACQUARICA, I. The market of chiral drugs: chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 323–340, 2018.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J. *et al.* Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Rev Esp Quimioterap**, v. 19, n. 2, p. 130–139, 2006.

CARVALHO, L. I. S. *et al.* Antifungal Activity of New Eugenol-Benzoxazole Hybrids against *Candida* spp. **Journal of Chemistry**, v. 2017, 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), **American Trypanosomiasis**. DPDx – Laboratory Identification of parasites of public health concern. Estados Unidos. Disponível em: cdc.gov/parasites/chagas. Acesso em: 16 Sept. 2025.

CHOWDHRY, B. Z. *et al.* Infrared and raman spectroscopy of eugenol, isoeugenol and methyl eugenol: conformational analysis and vibrational assignments from dft calculations of the anharmonic fundamentals. **J. Phys. Chem. A**, v. 119, n. 46, p. 11280–92, Nov. 2015.

COLLIN, P. *et al.* **N-substituted 3,4-bis(catechol)pyrrole compounds, their preparation and their use in the treatment of cancer**. International patent WO2014060366 A1, Organização Mundial da Propriedade Intelectual (WIPO). June 2014.

COREY, E. J. The logic of chemical synthesis: multistep synthesis of complex carbogenic molecules (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie**, v. 30, n. 5, p. 455–612, May 1991.

CRESPILLO-ANDÚJAR, C. *et al.* Use of benznidazole to treat chronic Chagas disease: An updated systematic review with a meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 5, 1 May 2022.

DING, D. *et al.* Discovery of novel benzoxaborole-based potent antitrypanosomal agents. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, n. 4, p. 165–169, 2010.

DINIZ, L. F. *et al.* Outcome of E1224-benznidazole combination treatment for infection with a multidrug-resistant *Trypanosoma cruzi* strain in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 6, 1 June 2018.

DINIZ, L. F. *et al.* Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 2979–2986, 2010.

DINIZ, L. F. *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, 2013.

DRAYER, D. E. Pharmacodynamic and pharmacokinetic differences between drug enantiomers in humans: An overview. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 40, n. 2, p. 125-33, Aug. 1986.

DUJARDIN, J.-P.; SCHOFIELD, C. J.; PANZERA, F. Les vecteurs de la maladie de Chagas recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. **Memoires de la Academie Royale Des Sciences Doutre-Mer, Classe des Sciences Naturelles et Medicales**, v. 8 NOUVELLE, n. 24 (5), p. 1–162, 2000.

ELGENDY, E. M.; KHAYYAT, S. A. Oxidation reactions of some natural volatile aromatic compounds: anethole and eugenol. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 823–829, 2008.

ENGEL, J. C. *et al.* Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 4, p. 725–734, 1998.

EVANGELISTA, R. S. *et al.* Synthesis and evaluation of the antileishmanial activity of novel eugenol analogs containing 1,2,3-triazole fragments against intracellular *Leishmania braziliensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, n. 12, p. 1810–1824, 2023.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 755–759, 1987.

FREGNAN, A. M. *et al.* A new 1,2-benzisoxazolin-3-one synthesized from eugenol shows anti- candida spp. activity, especially against opportunistic *Candida glabrata*. **Current Bioactive Compounds**, v. 17, n. 5, p. 8, 2021.

GABALDÓN-FIGUEIRA, J. C. *et al.* State-of-the-art in the drug discovery pathway for chagas disease: a framework for drug development and target validation. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. Volume 14, p. 1–19, June 2023.

GUHL, F.; DAVID RAMÍREZ, J. Poverty, migration, and Chagas disease. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, p. 52–58, 2021.

HALL, B. S.; BOT, C.; WILKINSON, S. R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 15, p. 13088–13095, 15 Apr. 2011.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 115–123, Jan. 2012.

HEREDIA, D. A.; LARGHI, E. L.; KAUFMAN, T. S. A straightforward synthesis of 5-methylaaptamine from eugenol, employing a 6π -electrocyclization reaction of a 1-azatriene. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2016, n. 7, p. 1397–1404, 2016.

HIPÓLITO, T. M. M. *et al.* Synthesis, activity, and *docking* studies of eugenol-based glucosides as new agents against *Candida* sp. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 92, n. 2, p. 1514–1524, 1 Aug. 2018.

HOTEZ, P. J. *et al.* What constitutes a neglected tropical disease? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1–6, 2 Jan. 2020.

ISO 10993-5:2009. **Biological evaluation of medical devices**. Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Geneva: International Organization for Standardization, 2009.

ISLAMUDDIN, M. *et al.* Immunotherapeutic potential of eugenol emulsion in experimental visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, 24 Oct. 2016.

IVASIV, V. *et al.* Molecular hybridization as a tool for designing multitarget drug candidates for complex diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 19, p. 1694–1711, 26 Jun. 2019.

JACOBS, R. T.; PLATTNER, J. J.; KEENAN, M. Boron-based drugs as antiprotozoals. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, n. 6, p. 586–592, Dec. 2011.

KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. Eugenol - From the remote Maluku Islands to the international market place: A review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6953–6981, June 2012.

KATSUNO, K. *et al.* Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751–758, 1 Nov. 2015.

KAUFMAN, T. S. The multiple faces of eugenol. A versatile starting material and building block for organic and bio-organic synthesis and a convenient precursor toward bio-based fine chemicals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 6, p. 1055–1085, 1 June 2015.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 8, p. 810–824, 2014.

KUMAR, H. M. S.; HERRMANN, L.; TSOGOEVA, S. B. Structural hybridization as a facile approach to new drug candidates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 23, 1 Dec. 2020.

KRATZ, J. M. *et al.* Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943–957, 3 Oct. 2018.

LIDANI, K. C. F. *et al.* Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. **Journal of Physical Oceanography**, v. 49, n. 6, 2019.

MACHADO, M. *et al.* Anti-giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: Effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 4, p. 732–739, Apr. 2011.

MAGALHÃES, L. S. DE *et al.* Glucosyl-1,2,3-triazoles derived from eugenol and analogues: Synthesis, anti-*Candida* activity, and molecular modeling studies in CYP-51. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 98, n. 5, p. 903–913, 1 Nov. 2021.

MARTÍN-ESCOLANO, J. *et al.* An updated view of the *Trypanosoma cruzi* life cycle: intervention points for an effective treatment. **ACS Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 1107–1115, 10 June 2022.

MARTÍNEZ-PEINADO, N. *et al.* Emerging agents for the treatment of Chagas disease: what is in the preclinical and clinical development pipeline? **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 2020.

MAZZETI, A. L. *et al.* Review on experimental treatment strategies against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 13, p. 409–432, 2021.

MEDINA-RINCÓN, G. J. *et al.* Molecular and clinical aspects of chronic manifestations in chagas disease: A state-of-the-art review. **Pathogens**, v. 10, n. 11, 1 Nov. 2021.

MEUNIER, B. Hybrid molecules with a dual mode of action: Dream or reality? **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 1, p. 69–77, Jan. 2008.

MOLINA, I. *et al.* Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 20, p. 1899–1908, 15 May 2014.

MOLINA, I. *et al.* Pharmacokinetics of benznidazole in healthy volunteers and implications in future clinical trials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, 1 Apr. 2017.

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A. The use of posaconazole against Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, n. 5, p. 397–407, 1 Jan. 2015.

MOLINA, J. *et al.* Activities of the triazole derivative sch 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 150–155, 2000.

MORAES, C. B. *et al.* Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: Implications for Chagas disease drug discovery and development. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–11, 16 Apr. 2014.

MORENO, M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility *in vitro* does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 918–924, 2010.

MORILLO, C. A. *et al.* Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. cruzi* carriers: the stop-chagas trial. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 8, p. 939–947, 28 Feb. 2017.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 21, p. 6523–6543, 20 Oct. 2005.

MOWBRAY, C. E. *et al.* DNDI-6148: a novel benzoxaborole preclinical candidate for the treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 21, p. 16159–16176, 11 Nov. 2021.

MURTA, S. M. F. *et al.* New drug discovery strategies for the treatment of benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **Expert Opinion on Drug Discovery**, 2024.

NISAR, M. F. *et al.* Pharmacological properties and health benefits of eugenol: a comprehensive review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021. 2021.

NISHIHARA, T. *et al.* Remarkably improved stability and enhanced activity of a: Burkholderia cepacia lipase by coating with a triazolium alkyl-PEG sulfate ionic liquid. **Green Chemistry**, v. 19, n. 21, p. 5250–5256, 2017.

NOMEIR, A. A. *et al.* Pharmacokinetics of SCH 56592, a new azole broad-spectrum antifungal agent, in mice, rats, rabbits, dogs, and cynomolgus monkeys. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 727–731, 2000.

OLIVEIRA, L. M. *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of molecular hybrids based on eugenol and chloramphenicol pharmacophores. **Folia Microbiologica**, v. 68, n. 6, p. 823–833, 1 Dec. 2023.

PADILLA, A. M. *et al.* Discovery of an orally active benzoxaborole prodrug effective in the treatment of Chagas disease in non-human primates. **Nature Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 1536–1546, 1 Oct. 2022.

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

PELOZO, M. F. *et al.* Synthesis of new hybrid derivatives from metronidazole and eugenol analogues as trypanocidal agents. **J Pharm Pharm Sci (www.cspsCanada.org)**, v. 24, p. 421–434, 2021.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 6 Jan. 2018.

PINAZO, M. J. *et al.* Efficacy and safety of fexinidazole for treatment of chronic indeterminate Chagas disease (FEXI-12): a multicentre, randomised, double-blind, phase 2 trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 395–403, 1 Apr. 2024.

PRATI, F.; ULIASSI, E.; BOLOGNESI, M. L. Two diseases, one approach: Multitarget drug discovery in Alzheimer's and neglected tropical diseases. **MedChemComm**, v. 5, n. 7, p. 853–861, 2014.

QIAO, Z. *et al.* Chalcone-benzoxaborole hybrid molecules as potent antitrypanosomal agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 3553–3557, 12 Apr. 2012.

ROMANHA, A. J. *et al.* *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 233–238, 2010.

ROSA, J. G. **Grande Sertão: Veredas**. São Paulo: Companhia das letras, 2019.

RYCKER, M. *et al.* Identification of trypanocidal activity for known clinical compounds using a new *Trypanosoma cruzi* hit-discovery screening cascade. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, 15 Apr. 2016.

SÁNCHEZ-VALDÉZ, F. J. *et al.* Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **eLife**, v. 7, p. 1–20, 2018.

SANTORO, G. F. *et al.* *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, n. 3, p. 283–290, July 2007.

SCHMIDT, A.; FILHO, J. A. P.; MACIEL, B. C. Epidemiologia no século XXI e aspectos clínicos da Doença de Chagas crônica / Epidemiology in the XXI century and clinical aspects of chronic Chagas Disease. **Rev Soc Cardiol**, v. 26, n. 4, p. 230–233, 2016.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 102, p. 75–85, 2007.

SHWETA, M.; RASHMI, D. *In-vitro* ADME studies of TUG-891, a GPR-120 inhibitor using Swiss ADME predictor. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, 2019.

SIENEL, G.; RIETH, R.; ROWBOTTOM, K. T. Epoxides. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 15 June. 2012.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. A strain of *Trypanosoma cruzi* highly virulent for mice. **Folia Clinica et Biologica**, v. 20, n. 3, p. 191–207, 1953.

SOUSA, A. S. *et al.* Chagas disease. **The Lancet**. Elsevier B.V., 13 Jan. 2024.

SOUZA, M. L. *et al.* Discovery of potent, reversible, and competitive cruzain inhibitors with trypanocidal activity: a structure-based drug design approach. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 2, p. 1028–1041, 24 Feb. 2020a.

- SOUZA, T. B. *et al.* Synthesis and *in vitro* evaluation of antifungal and cytotoxic activities of eugenol glycosides. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 1, p. 496–502, Jan. 2014.
- SOUZA, T. B. *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of 6-triazolo-6-deoxy eugenol glucosides. **Carbohydrate Research**, v. 410, p. 1–8, 17 June. 2015.
- SOUZA, T. B. *et al.* Synthesis, activity, and molecular modeling studies of 1,2,3-triazole derivatives from natural phenylpropanoids as new trypanocidal agents. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 95, n. 1, p. 124–129, 1 Jan. 2020b.
- SOY, D. *et al.* Population pharmacokinetics of benznidazole in adult patients with Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3342–3349, 1 June. 2015.
- STANEK, M. *et al.* Hybridization of β -Adrenergic Agonists and Antagonists Confers G Protein Bias. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 10, p. 5111–5131, 2019.
- SYKES, M. L.; AVERY, V. M. 3-Pyridyl inhibitors with novel activity against *Trypanosoma cruzi* reveal *in vitro* profiles can aid prediction of putative cytochrome P450 inhibition. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.
- TORRELE, E. *et al.* Fexinidazole - a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. 1–15, Dec. 2010.
- TORRICO, F. *et al.* Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 419–430, 1 Apr. 2018.
- TORRICO, F. *et al.* New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 8, p. 1129–1140, 1 Aug. 2021.
- TORRICO, F. *et al.* A Phase 2, randomized, multicenter, placebo-controlled, proof-of-concept trial of oral fexinidazole in adults with chronic indeterminate Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 76, n. 3, p. E1186–E1194, 1 Feb. 2023.
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472-81, 2001.
- ULIASSI, E. *et al.* Development of a focused library of triazole-linked privileged-structure-based conjugates leading to the discovery of novel phenotypic hits against protozoan parasitic infections. **ChemMedChem**, v. 13, n. 7, p. 678–683, 6 Apr. 2018.
- ULLMANN, A. J. *et al.* Pharmacokinetics, safety, and efficacy of posaconazole in patients with persistent febrile neutropenia or refractory invasive fungal infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 658–666, Feb. 2006.
- URBINA, J. A. *et al.* Antiproliferative effects and mechanism of action of sch 56592 against *Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 7, p. 1771–1777, 1998.

URBINA, J. A. *et al.* *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n. 1, p. 27–38, 2003.

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

URBINA, J. A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: Advances, challenges and perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 149–156, 1 Jan. 2015.

URBINA, J. A. Pharmacodynamics and follow-up period in the treatment of human *Trypanosoma cruzi* infections with posaconazole. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 2, p. 299–300, 2017.

URBINA, J. A. The long road towards a safe and effective treatment of chronic Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 363–365, 1 Apr. 2018.

VAN ZYL, R. L. *et al.* The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. SPEC. ISS., p. 129–133, 2006.

VELA, A. *et al.* *In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (Dtus) to benznidazole: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, 1 Mar. 2021.

VELÁSQUEZ-ORTIZ, N. *et al.* Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi*: Geographical and biological distribution in the Americas. **Scientific Data**, v. 9, n. 1, 1 Dec. 2022.

VIEGAS, C.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 17, p. 1829–1852, 30 June 2007.

VILLALTA, F.; RACHAKONDA, G. Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 1161–1174, 2 Nov. 2019.

WALL, R. J. *et al.* Clinical and veterinary trypanocidal benzoxaboroles target CPSF3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 38, p. 9616–9621, 18 Sept. 2018.

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Geneva: WHO, 2024. V. 1.

WILKINSON, S. R. *et al.* Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2072–2084, 2011.

WITTLIN, S.; MÄSER, P. From magic bullet to magic bomb: reductive bioactivation of antiparasitic agents. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 10, p. 2777–2786, 8 Oct. 2021.

WORRELL, B. T.; MALIK, J. A.; FOKIN, V. V. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. **Science**, v. 340, n. 6131, p. 457–460, 2013.

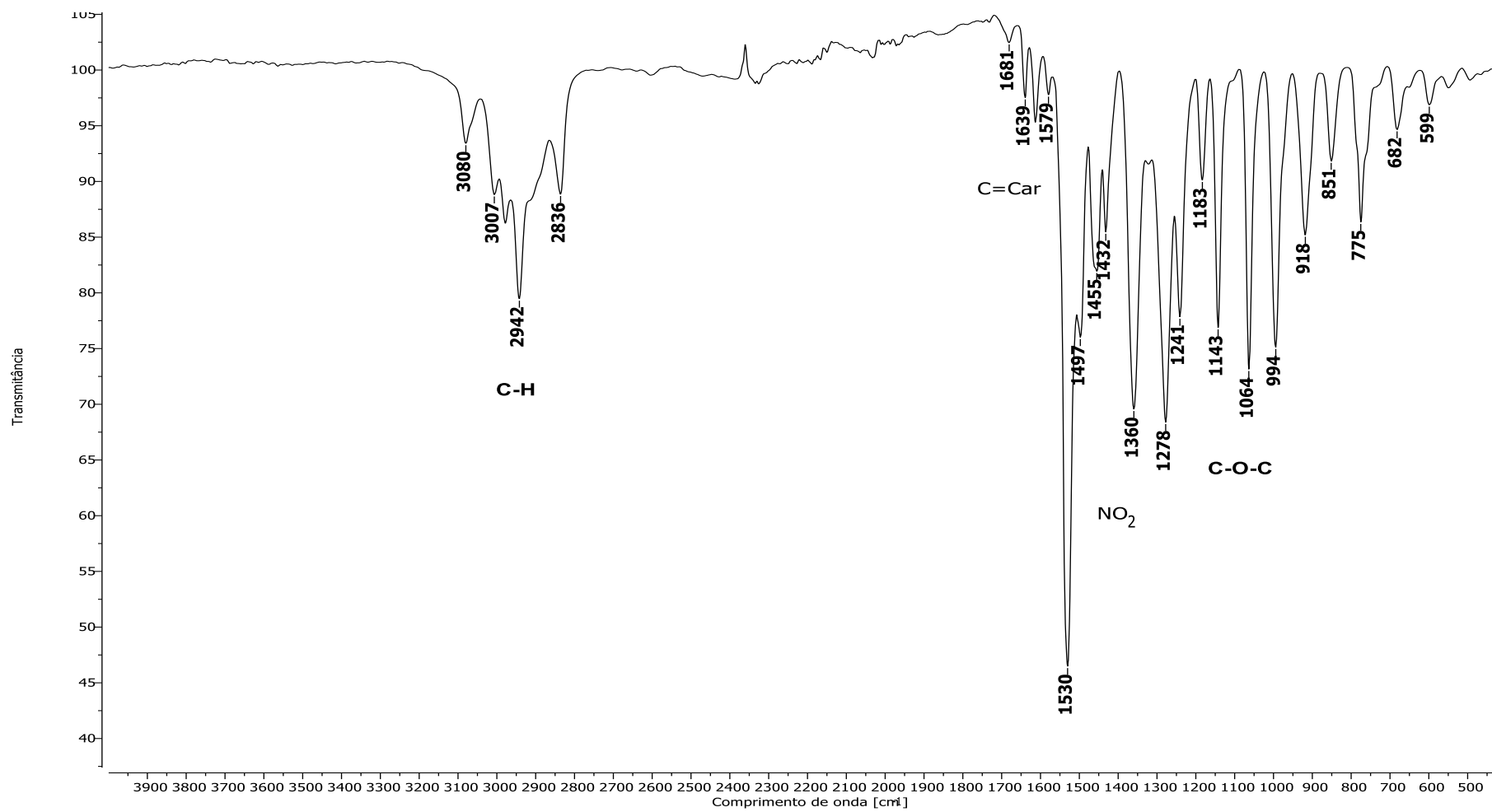
ZAMLI, K. M. *et al.* Synthesis, anti-amoebic activity and molecular *docking* simulation of eugenol derivatives against *Acanthamoeba* sp. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 31, n. 9, 1 Sept. 2023.

ZHAO, Y. *et al.* Balancing bulkiness in gold(i) phosphino-triazole catalysis. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2019, n. 31–32, p. 5540–5548, 2019.

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

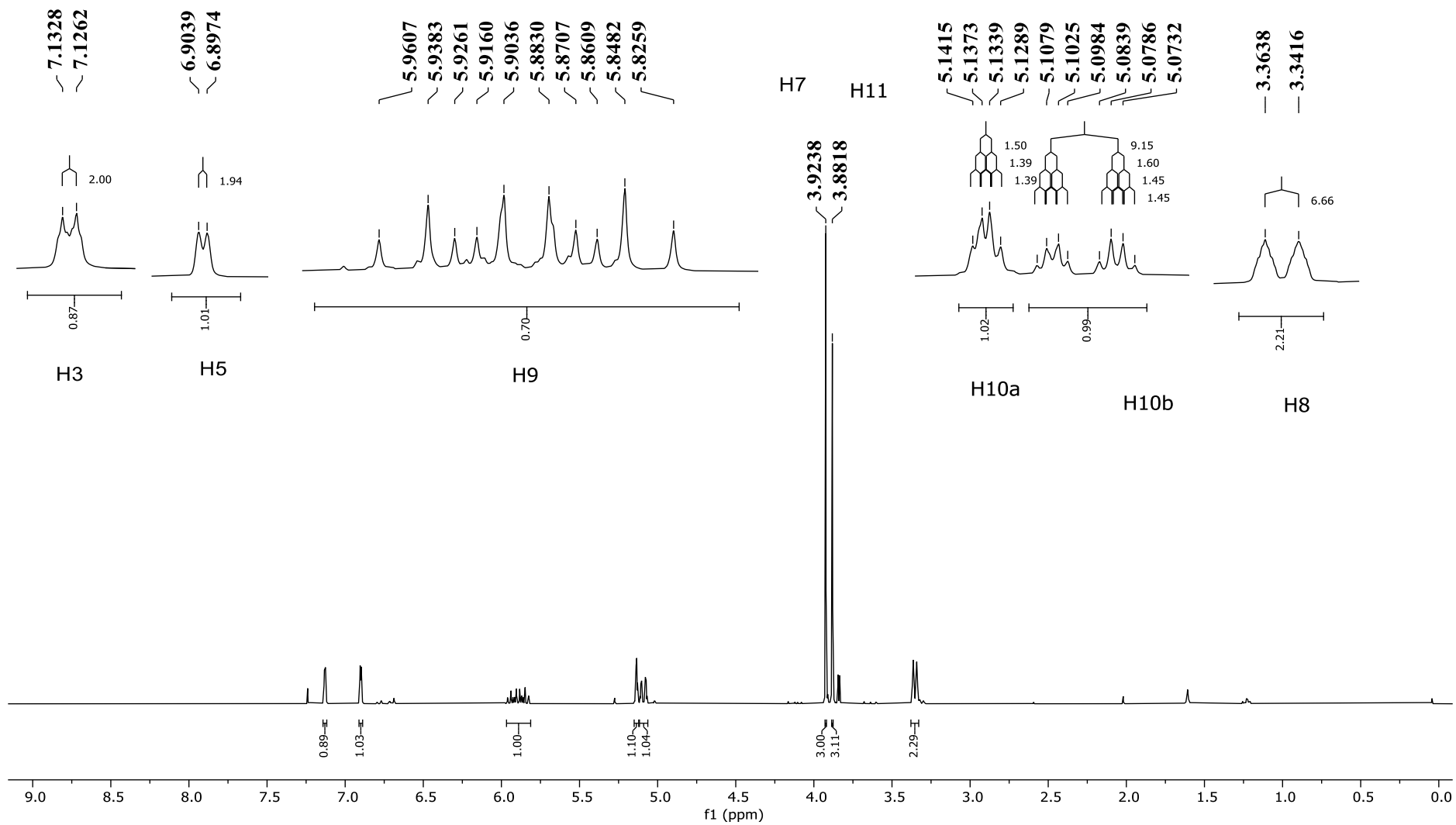
ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, Mar. 2012.

APÊNDICE

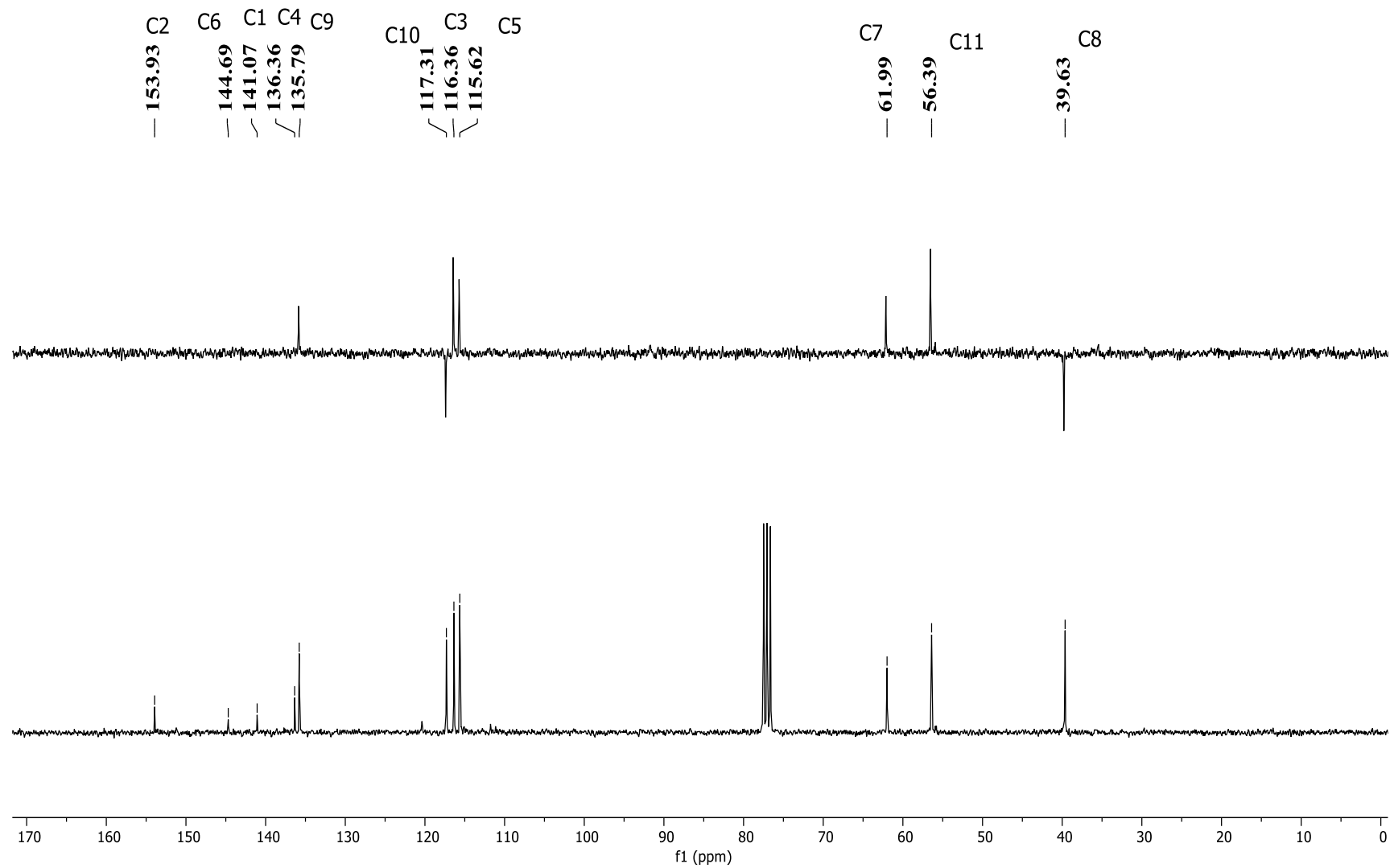
Figura 22 - Espectro de absorção na região do IV de **40**.

Fonte: Do autor.

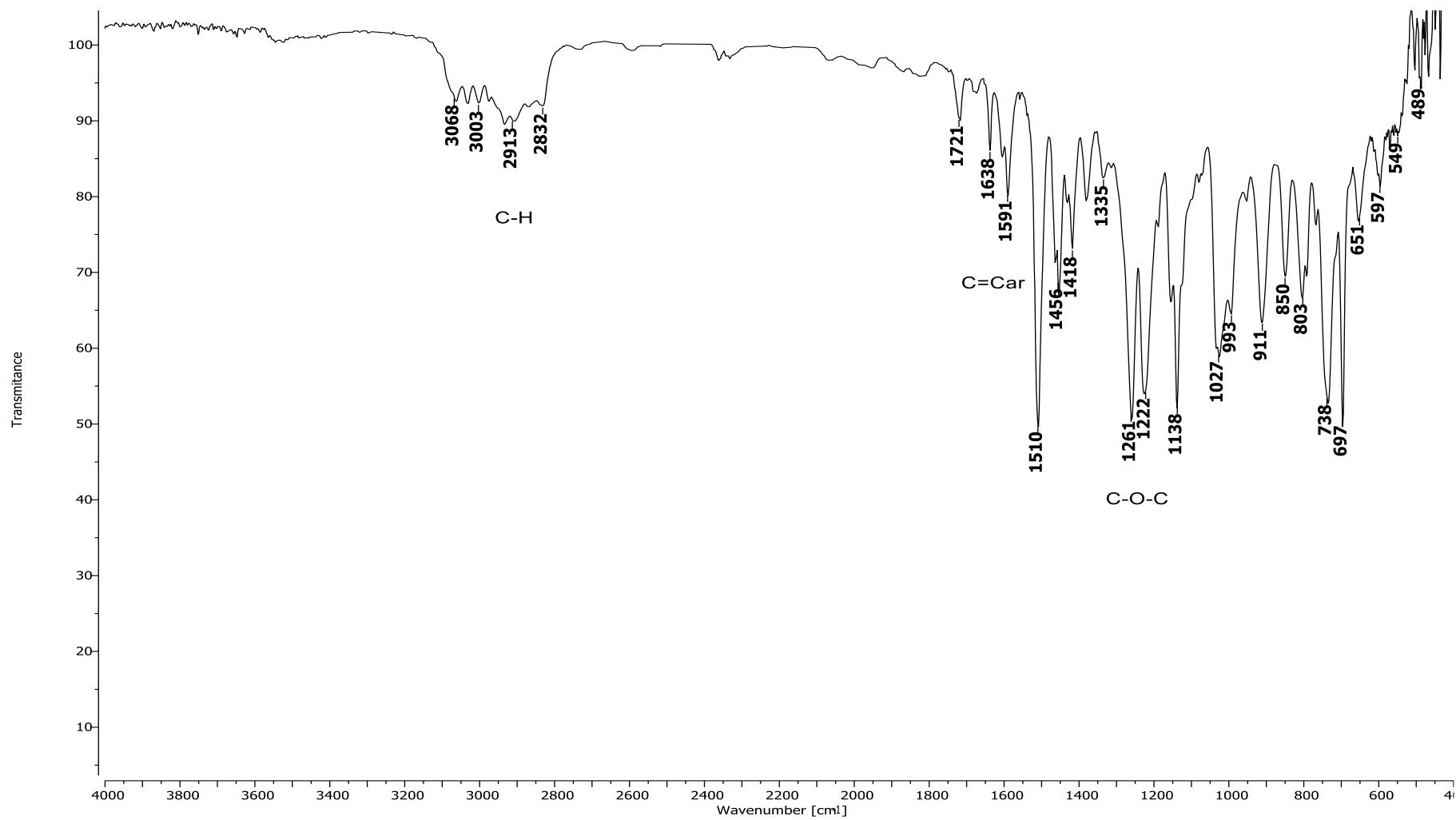
Figura 23 - Espectro de RMN de ^1H de **40** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Do autor.

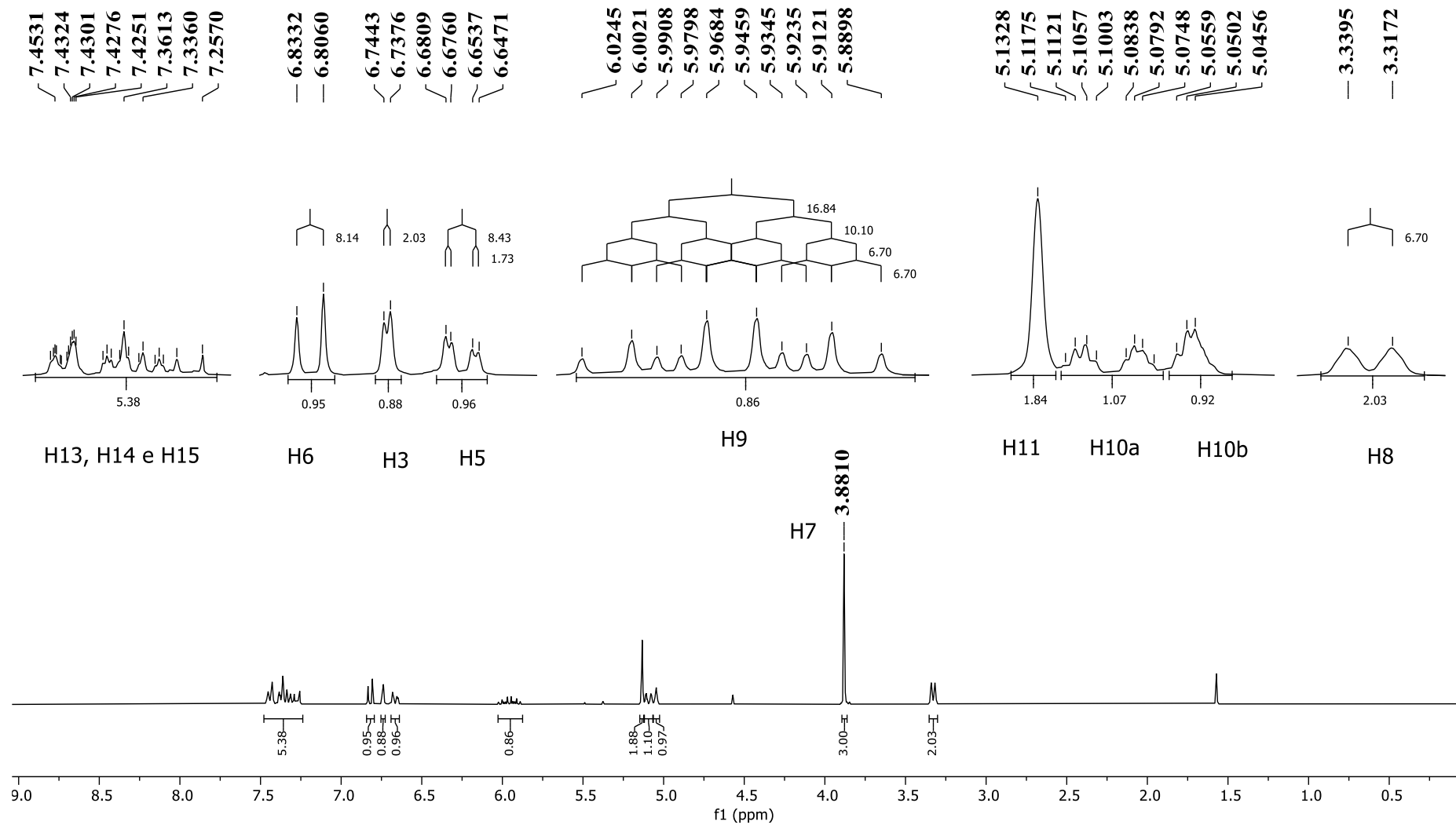
Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **40** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

Figura 25 - Espectro de absorção na região do IV de **41**.

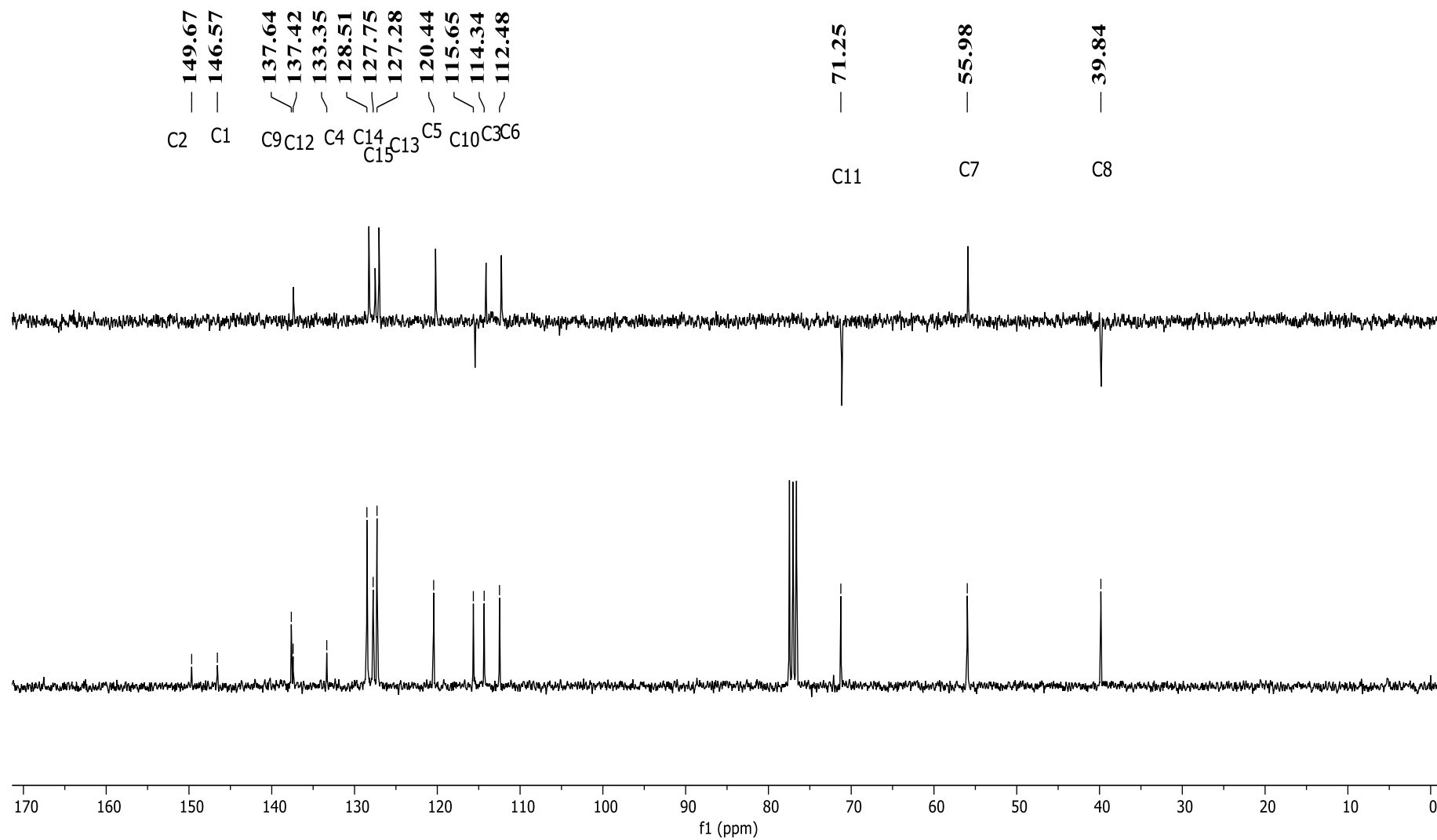
Fonte: Do autor.

Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H de **41** (CDCl_3 , 300 MHz).

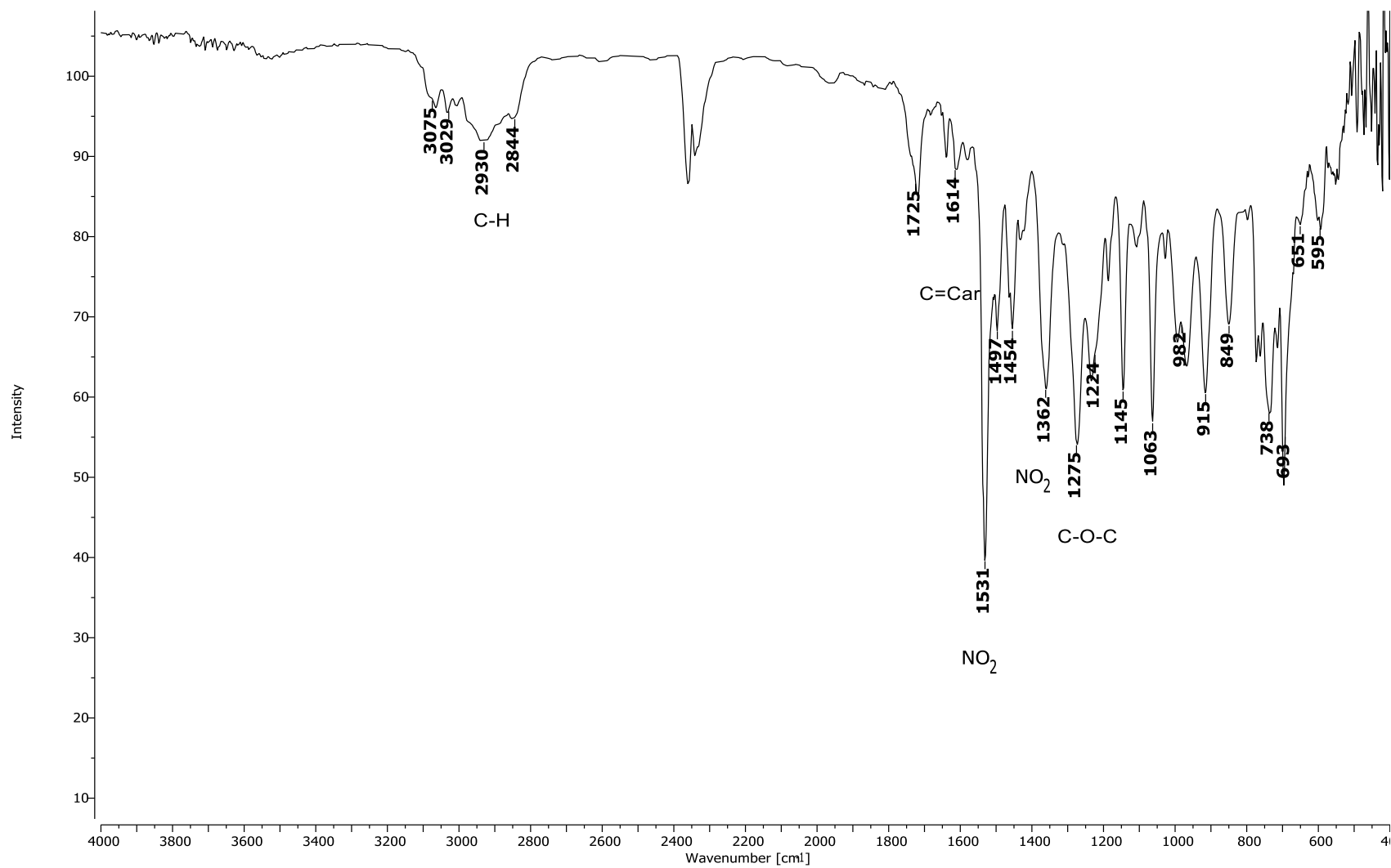


Fonte: Do autor.

Figura 27 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **41** (CDCl_3 , 75 MHz).

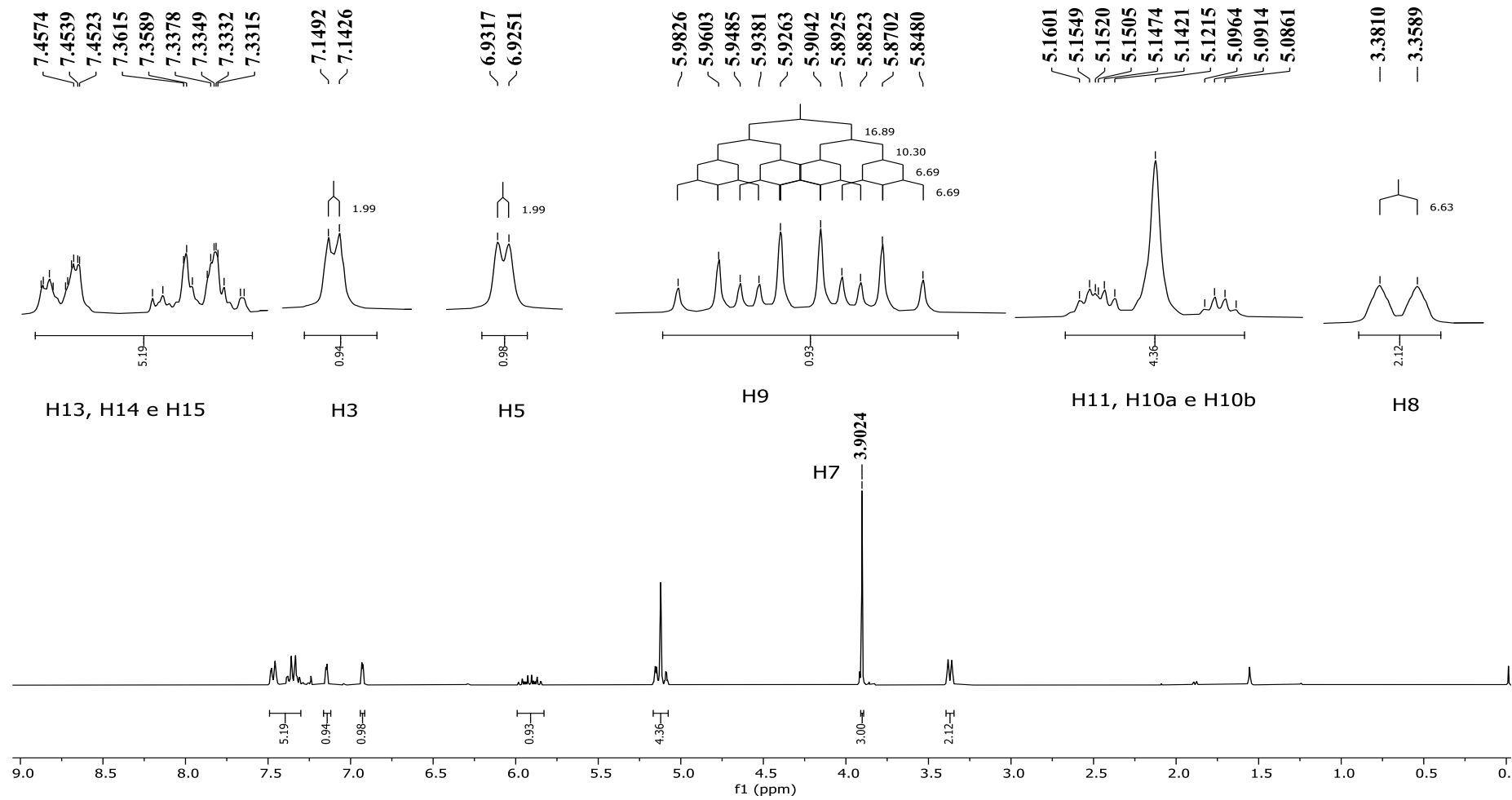


Fonte: Do autor.

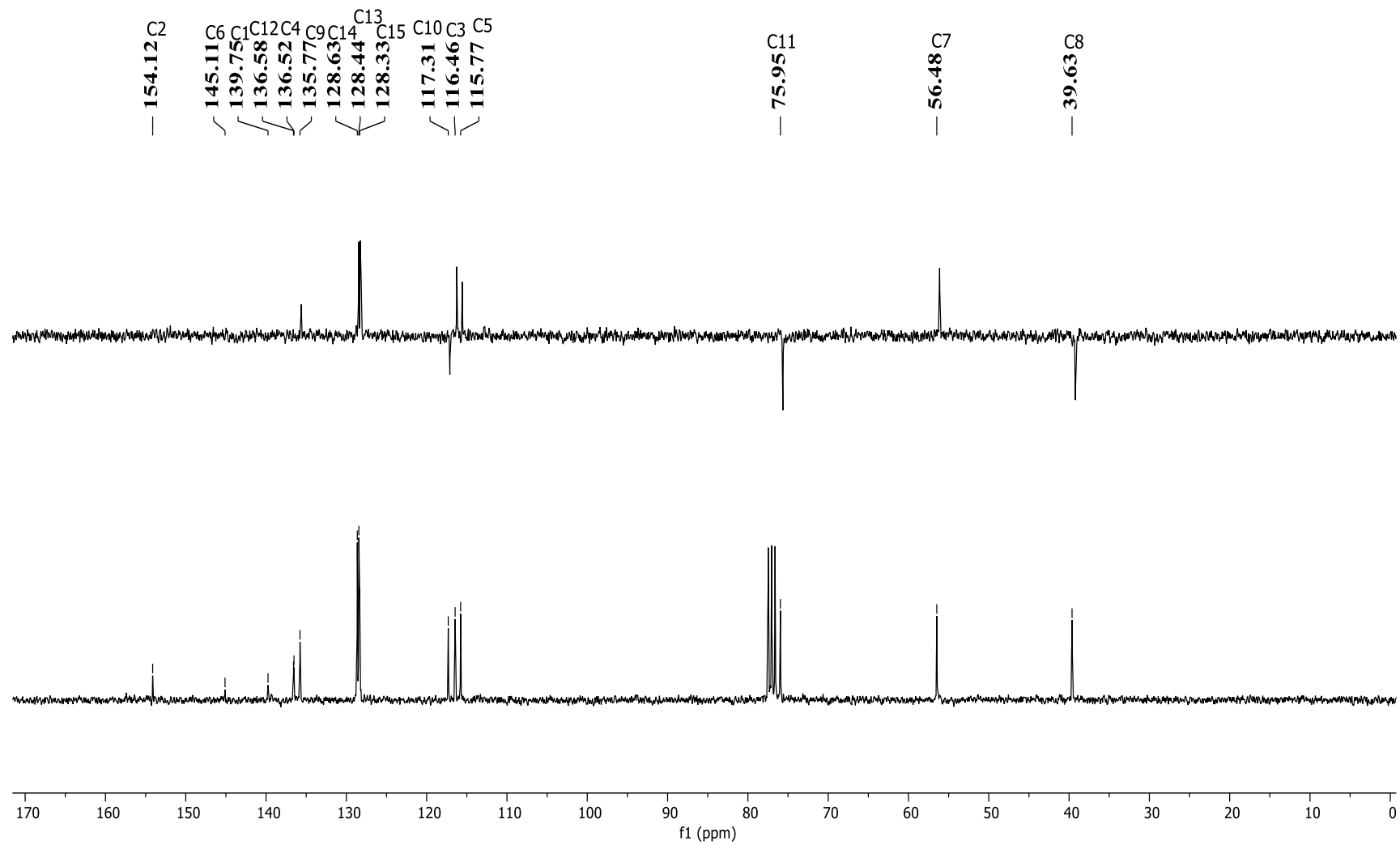
Figura 28 - Espectro de absorção na região do IV de **42**.

Fonte: Do autor.

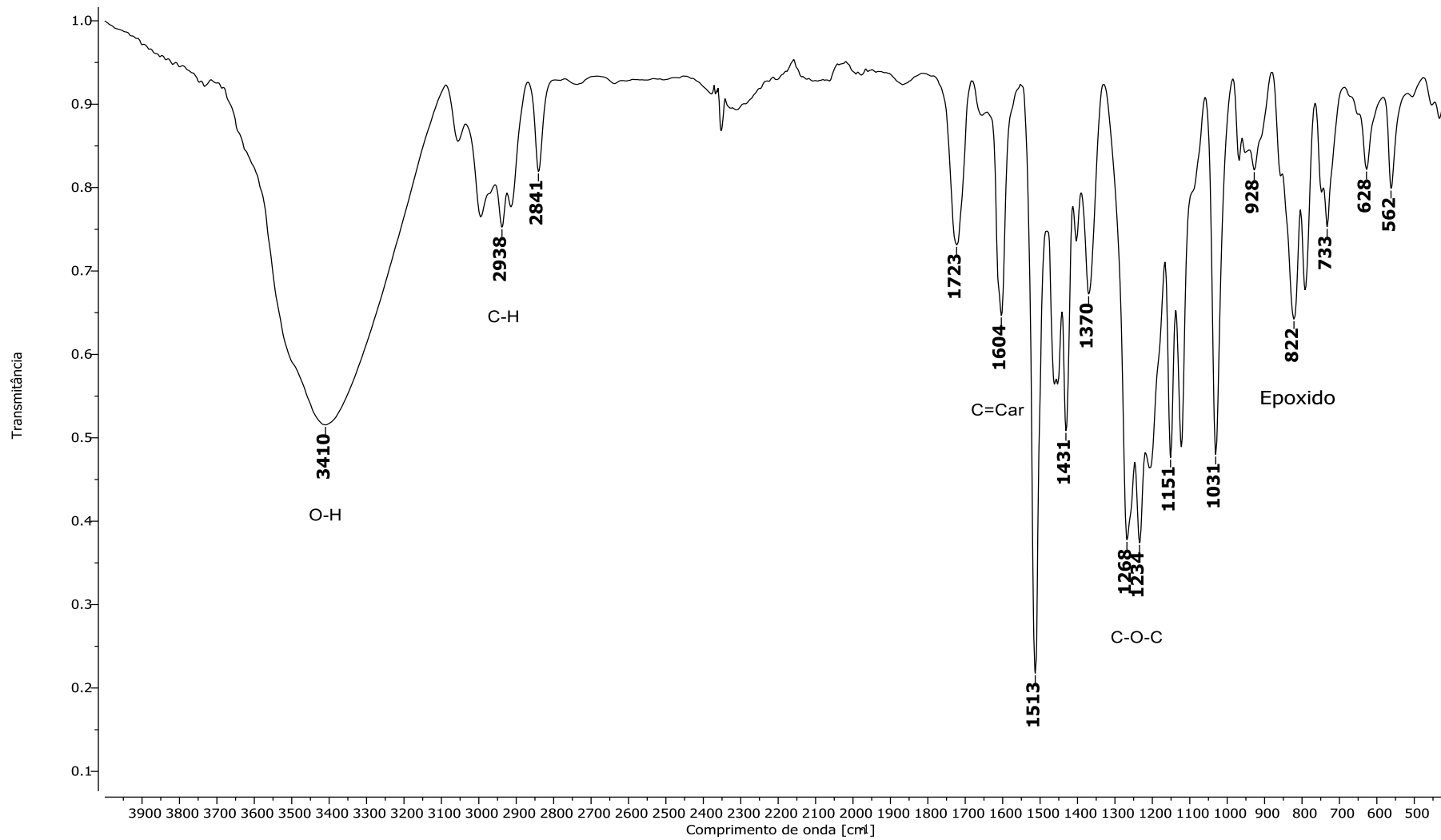
Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H de **42** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Do autor.

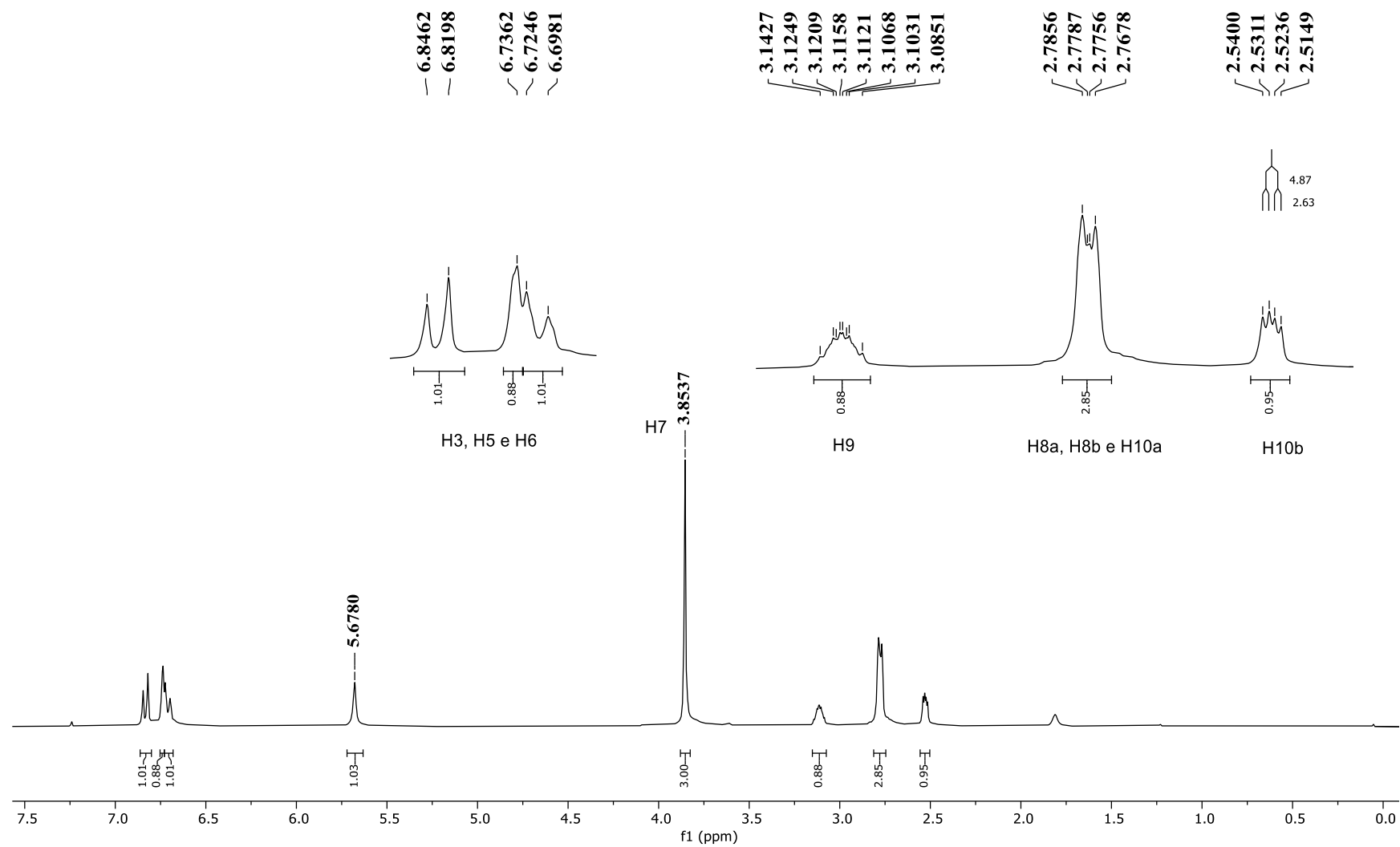
Figura 30 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **42** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

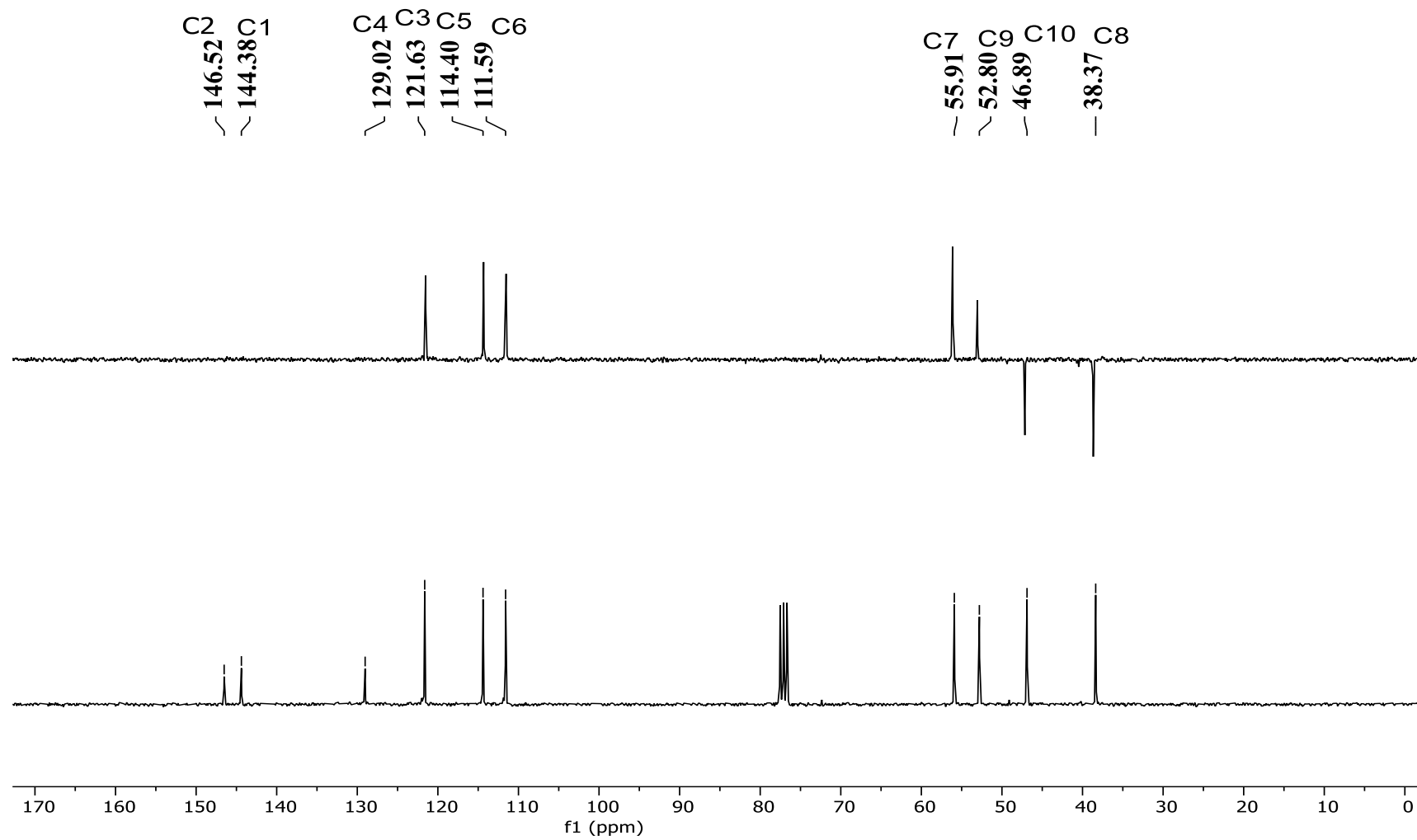
Figura 31 - Espectro de absorção na região do IV de **43**.

Fonte: Do autor.

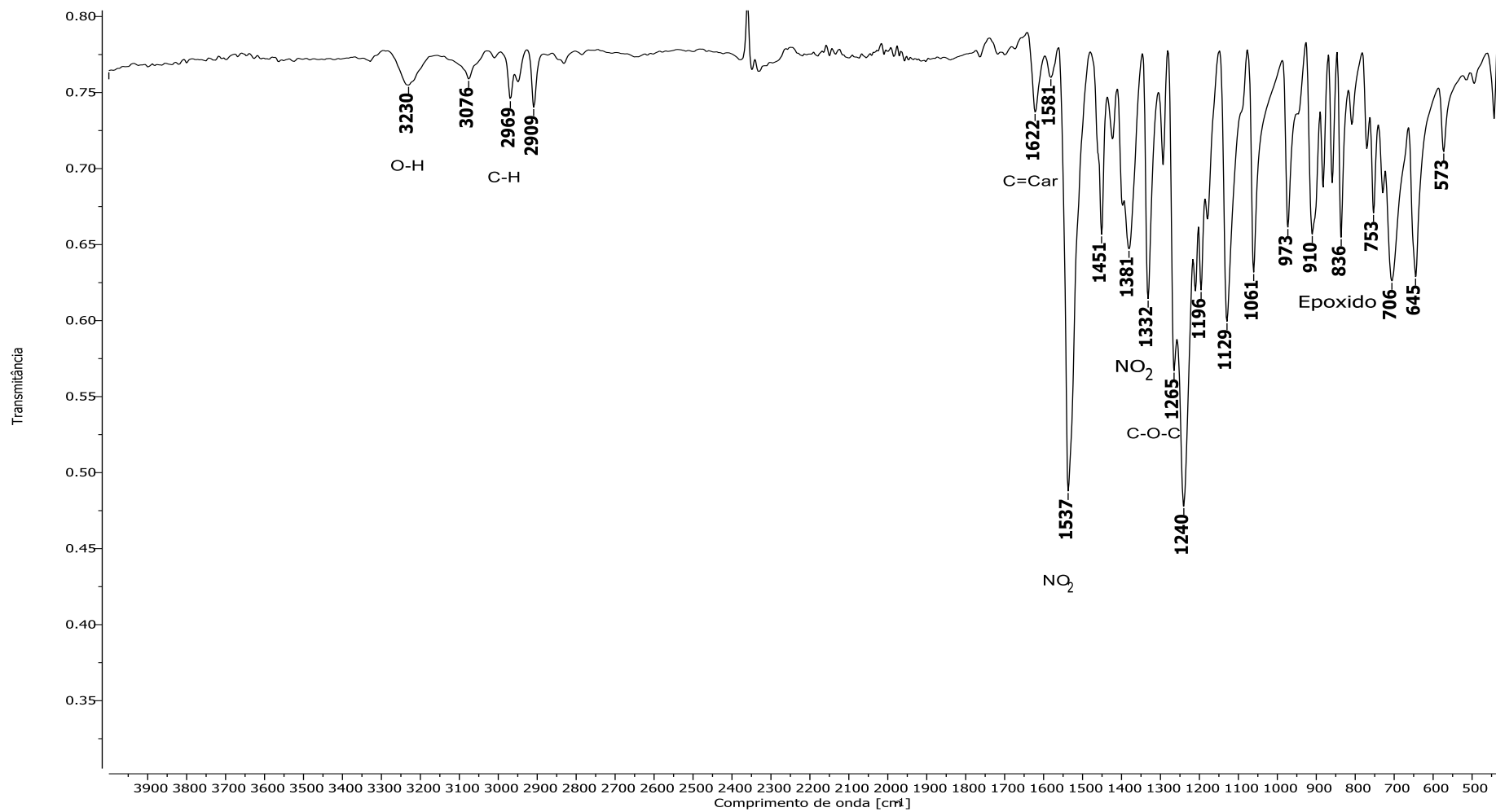
Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H de **43** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Do autor.

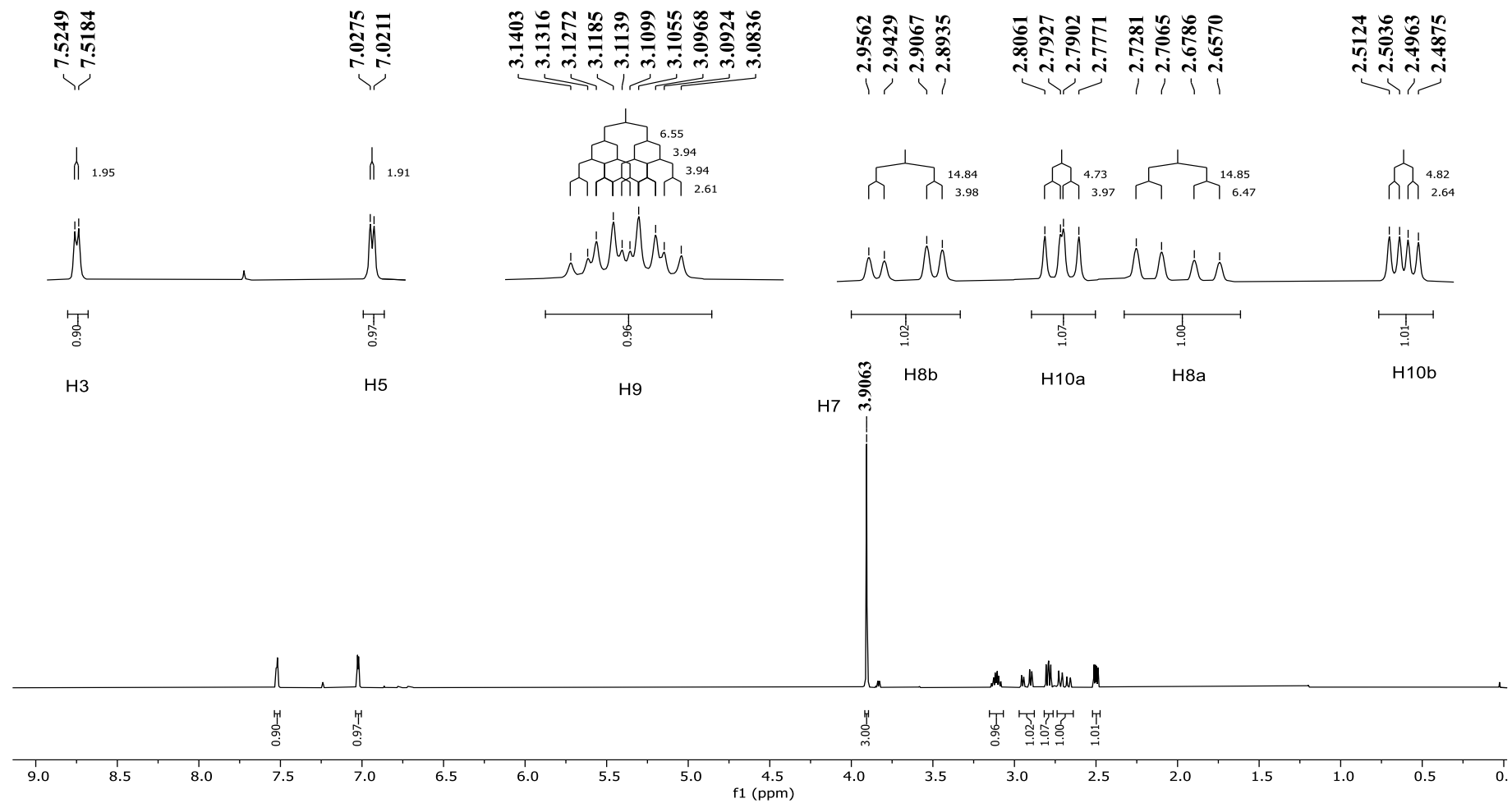
Figura 33 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **43** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

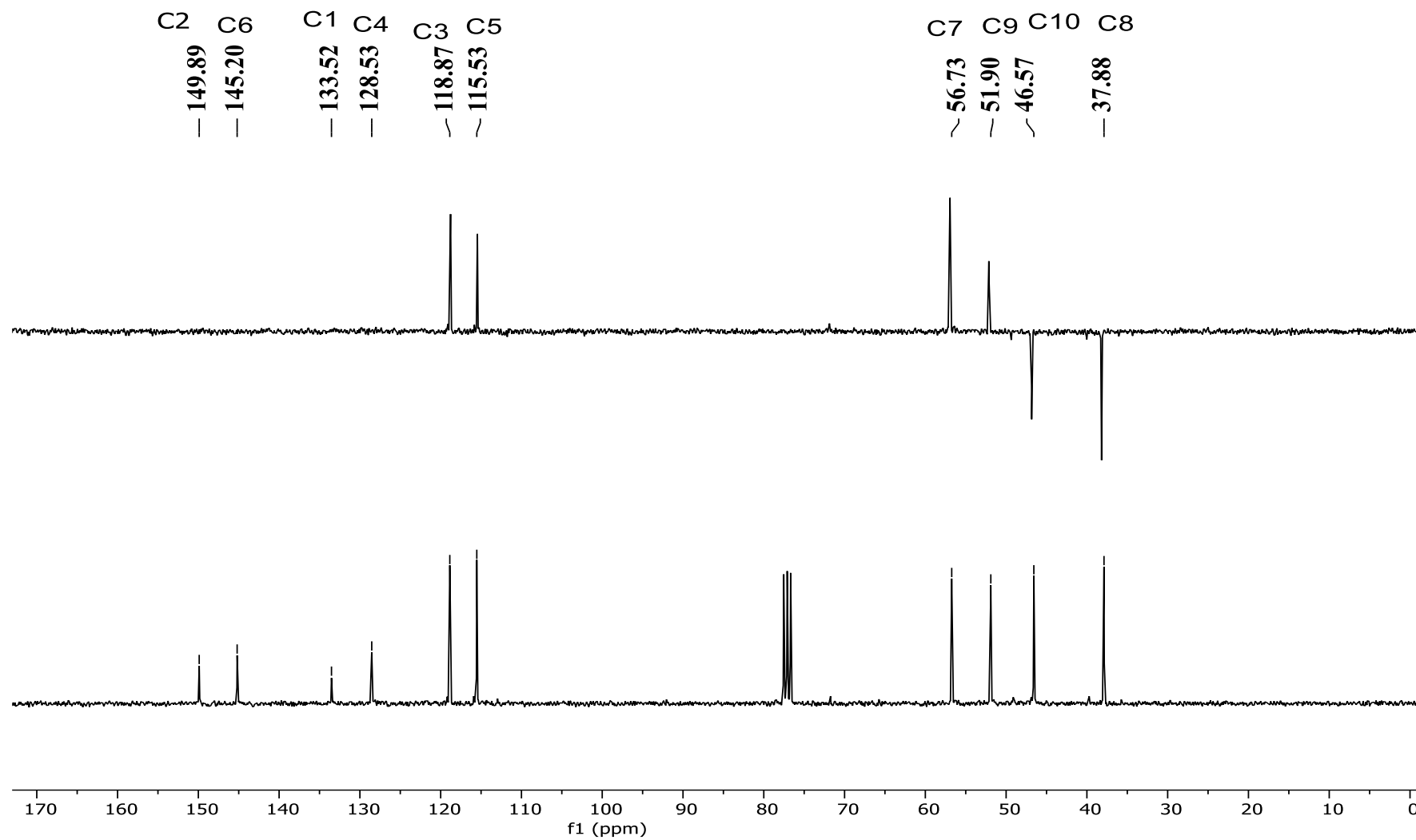
Figura 34 - Espectro de absorção na região do IV de **44**.

Fonte: Do autor.

Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H de **44** (CDCl_3 , 300 MHz).

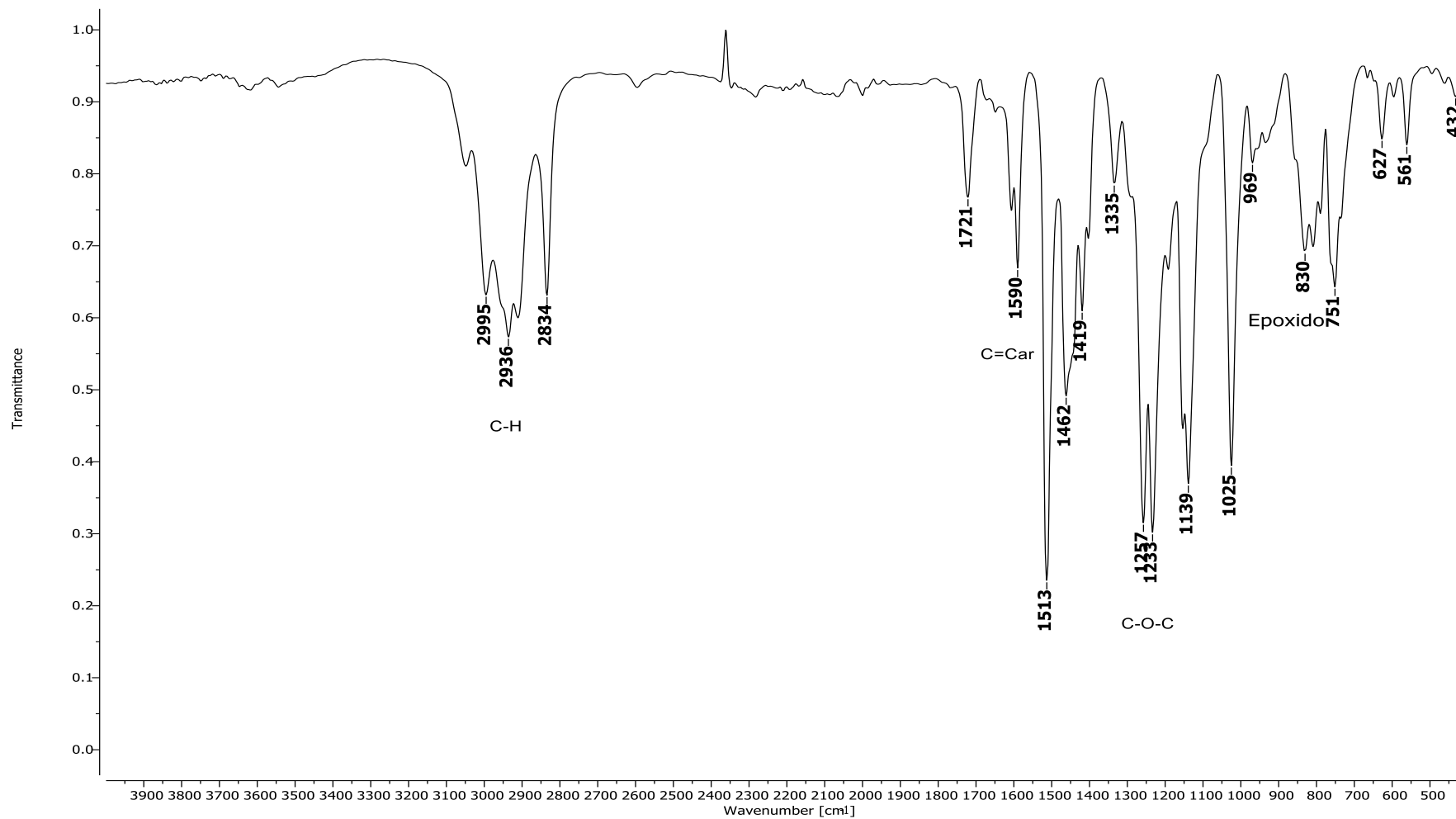


Fonte: Do autor.

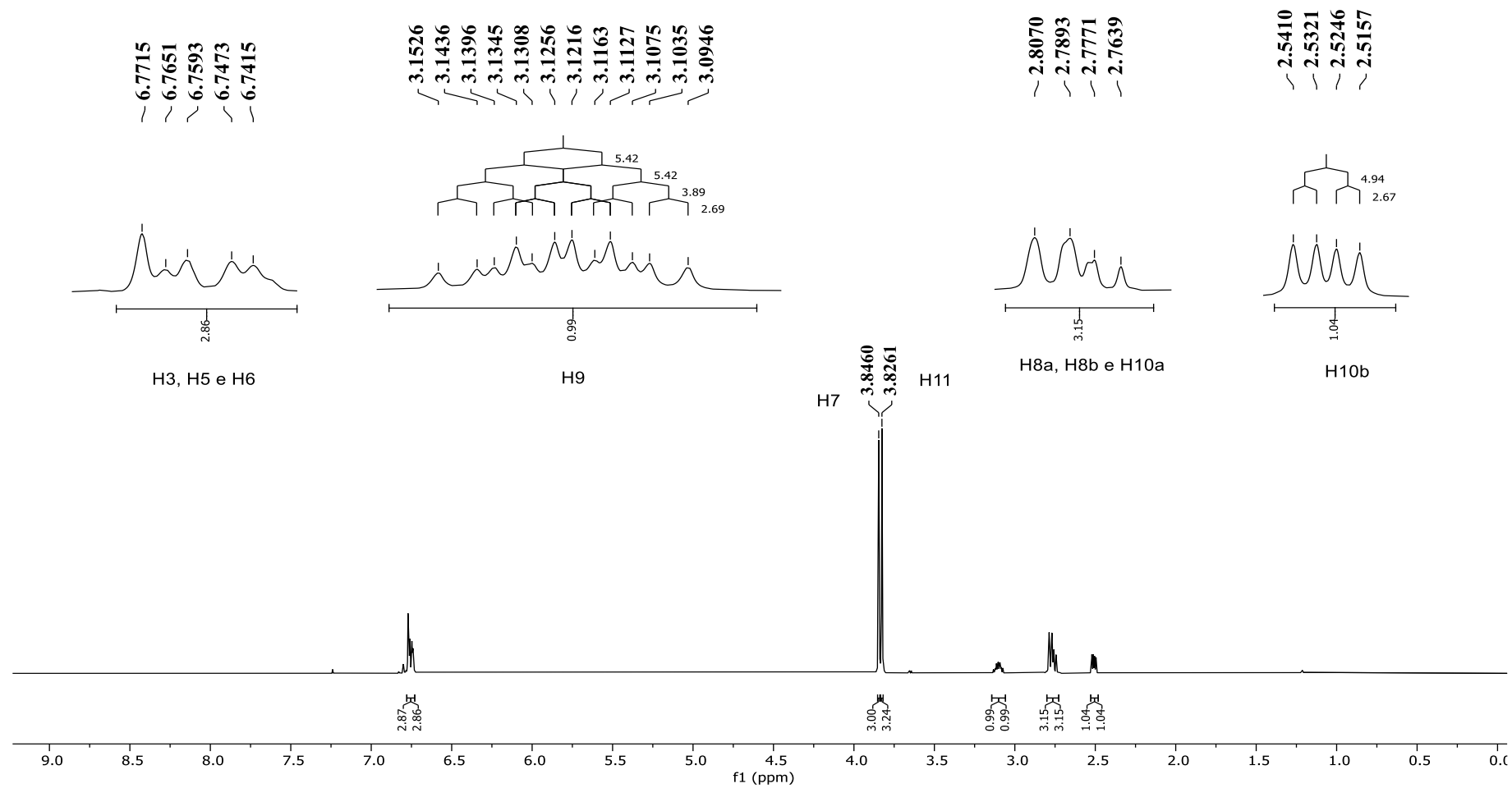
Figura 36 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **44** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

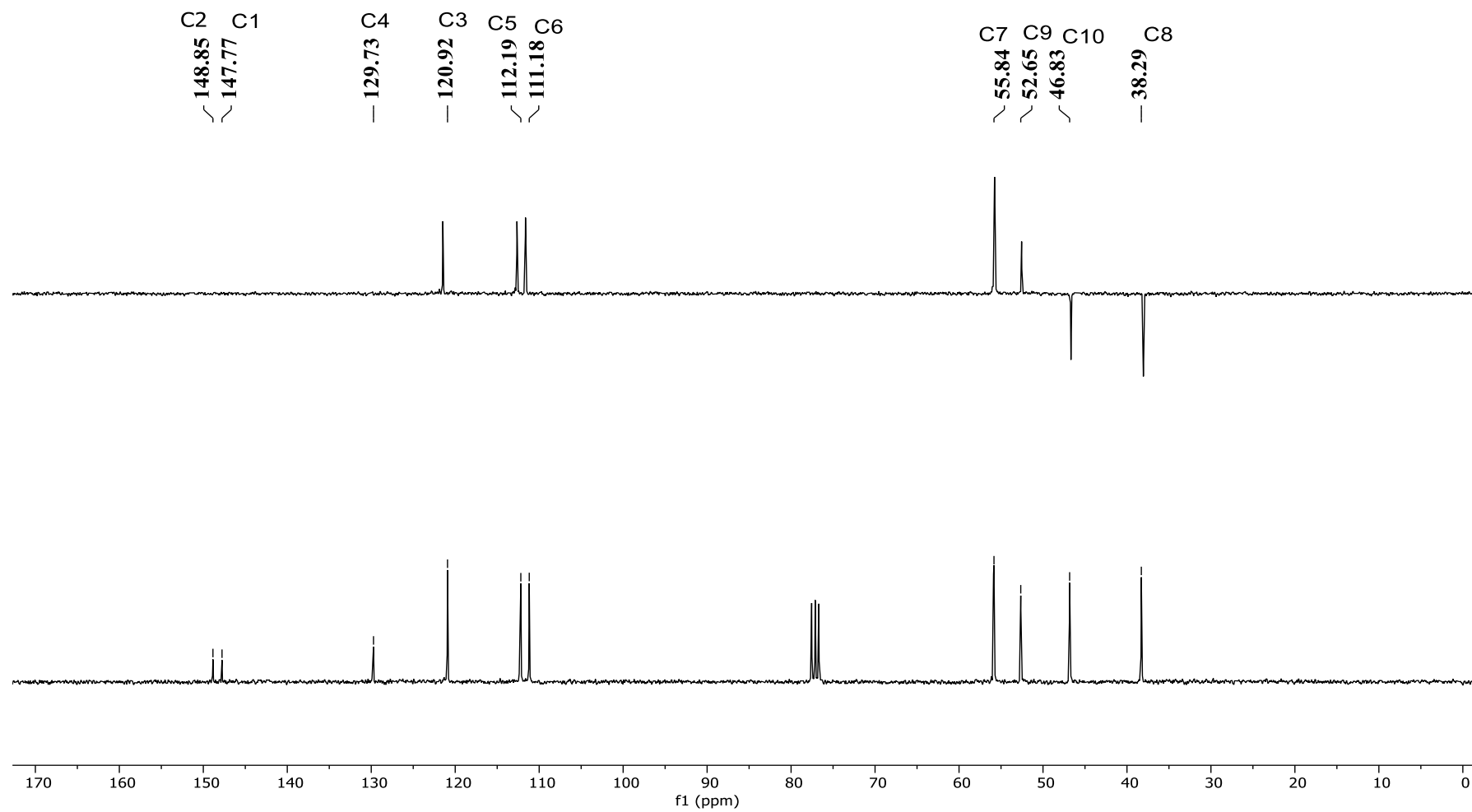
Figura 37 - Espectro de absorção na região do IV de 45.



Fonte: Do autor.

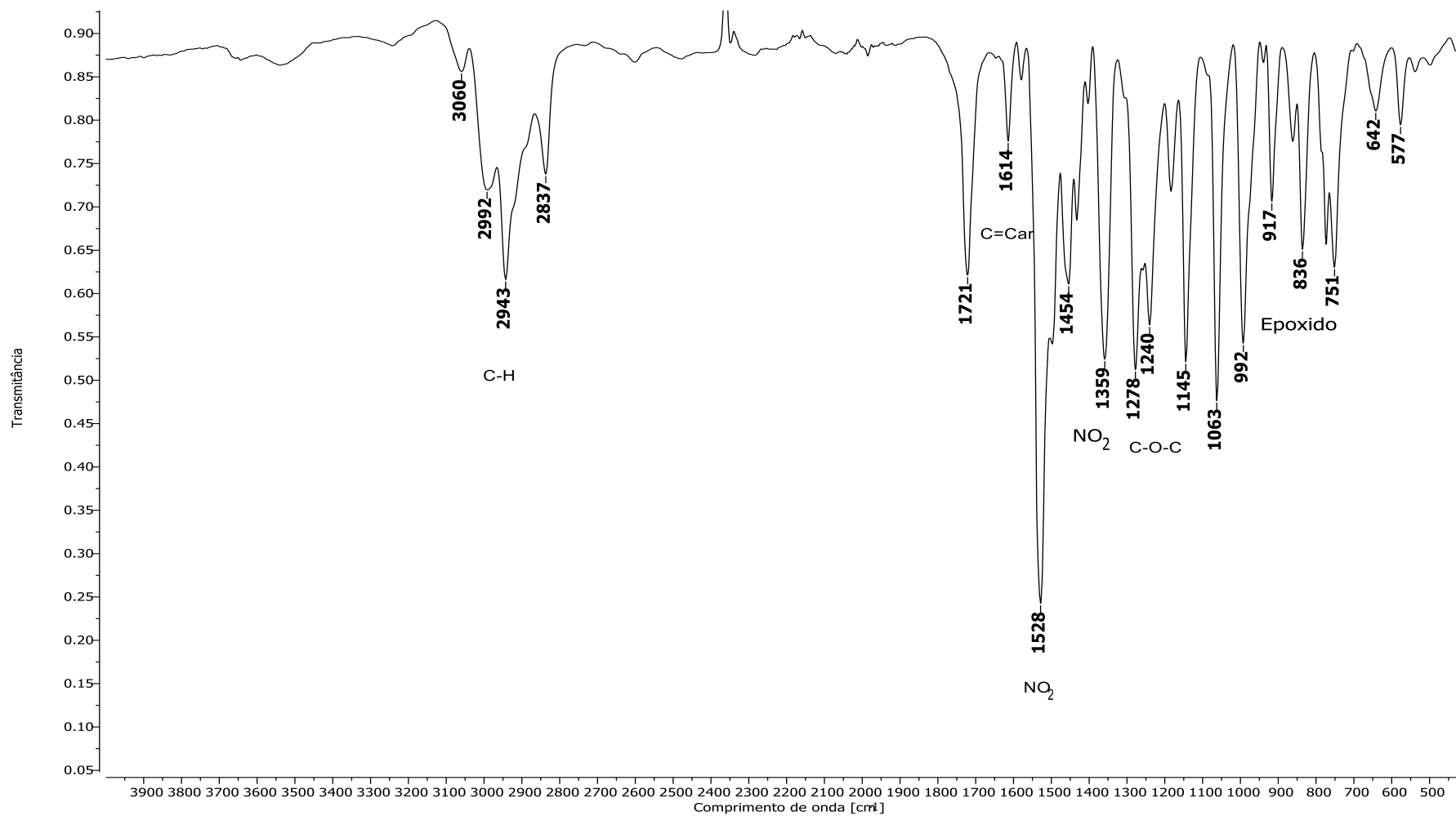
Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H de **45** (CDCl_3 , 300 MHz).

Fonte: Do autor.

Figura 39 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **45** (CDCl_3 , 75 MHz).

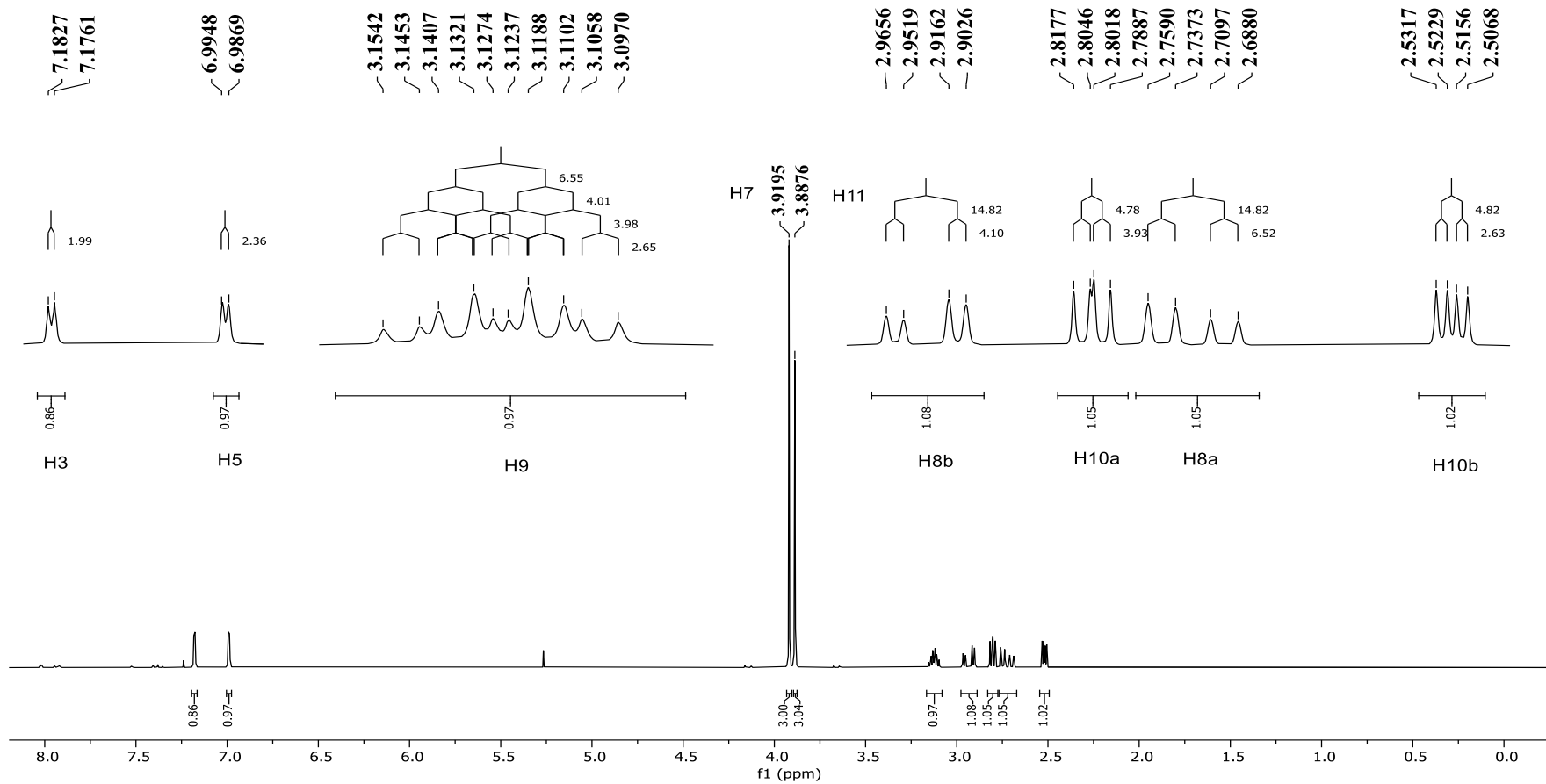
Fonte: Do autor.

Figura 40 - Espectro de absorção na região do IV de 46.

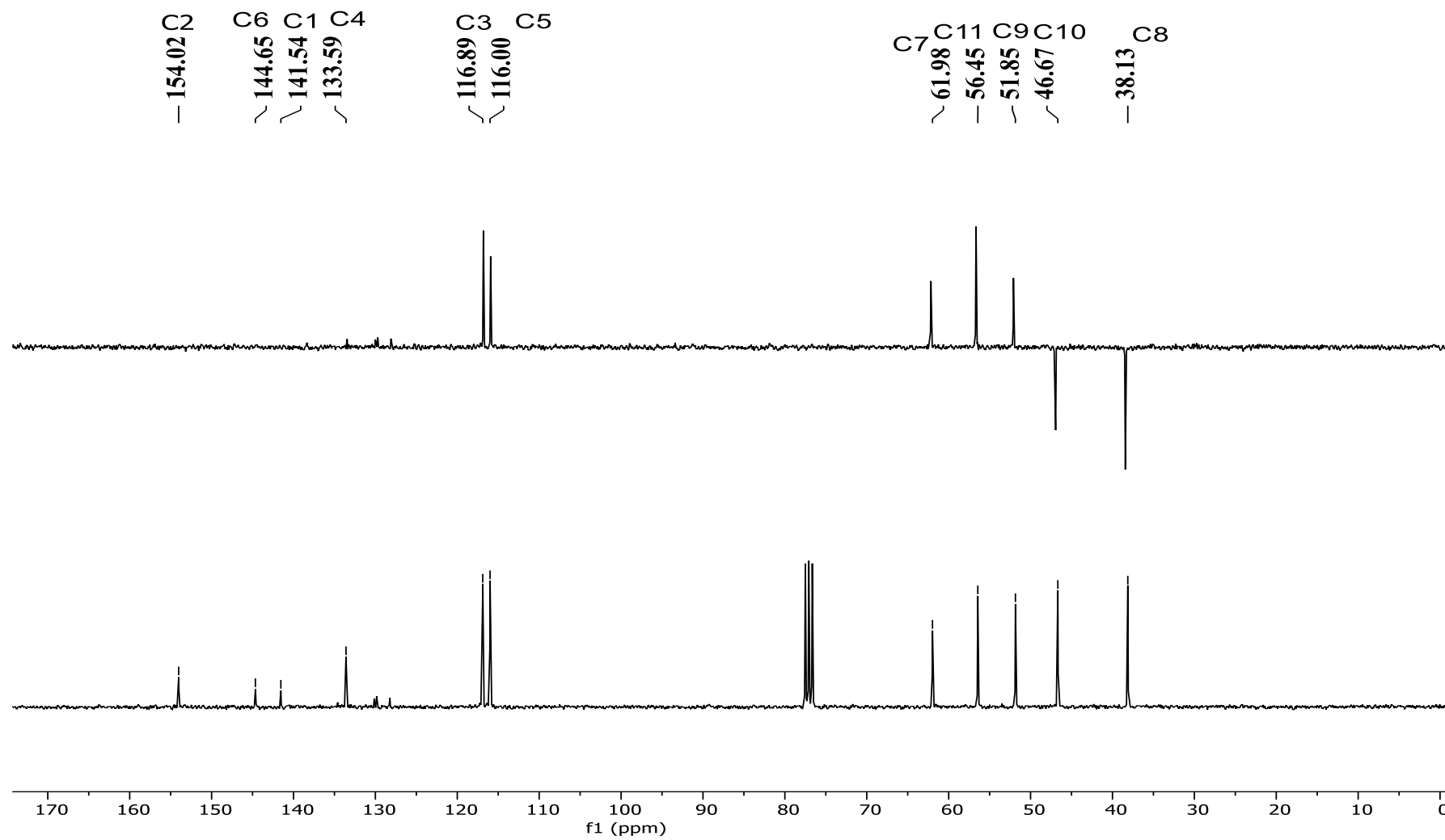


Fonte: Do autor.

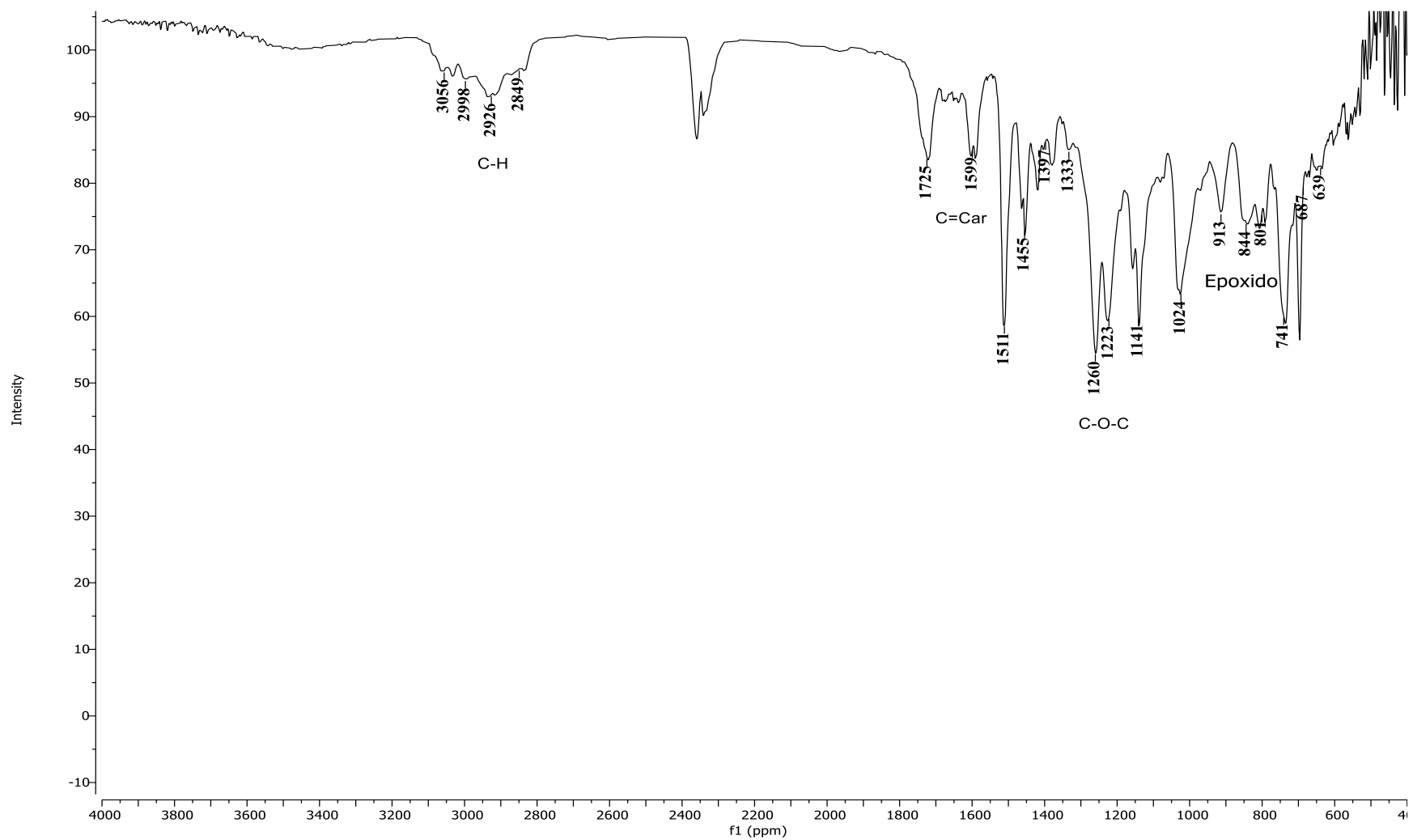
Figura 41 - Espectro de RMN de ^1H de **46** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Do autor.

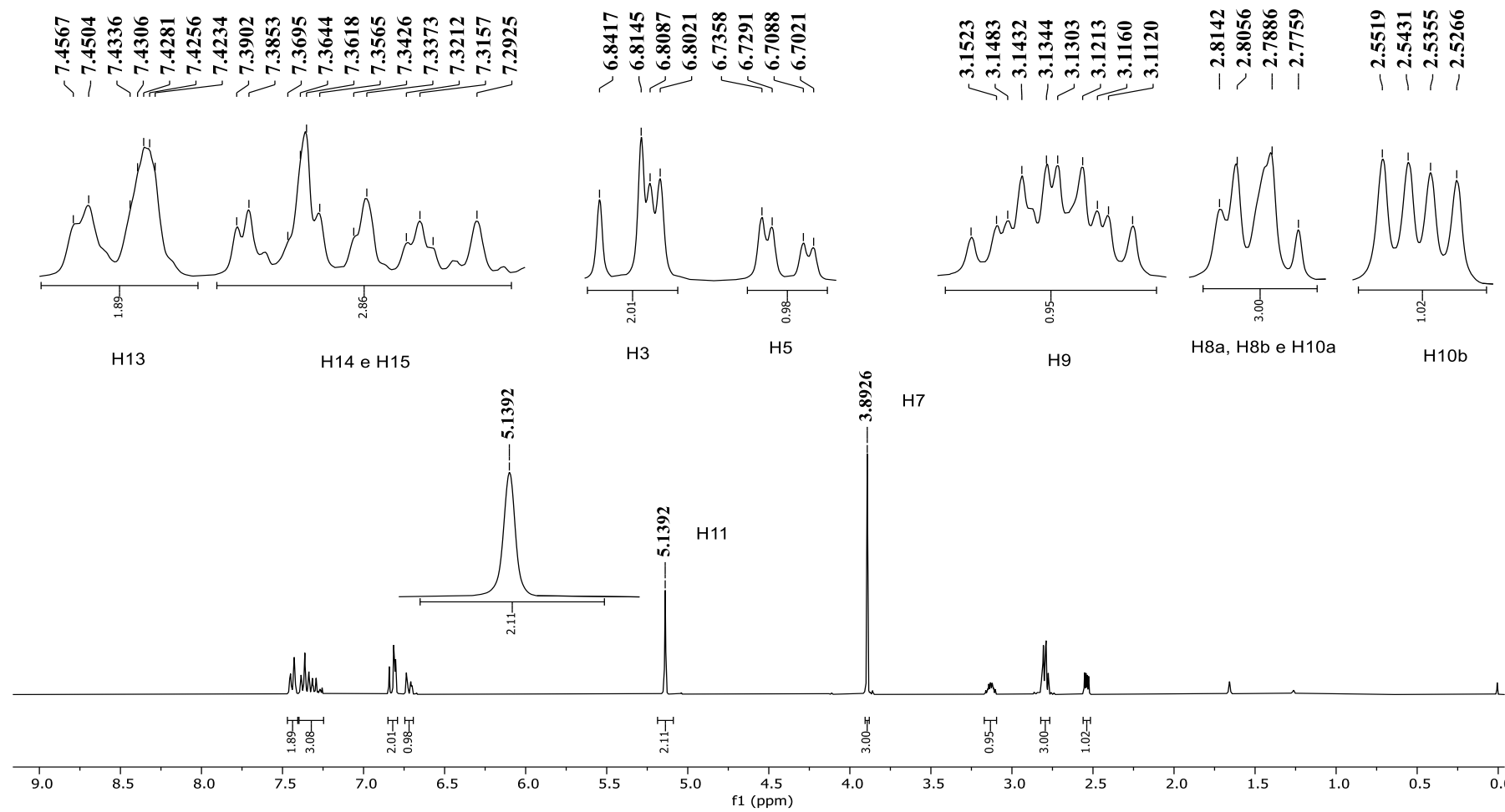
Figura 42 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **46** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

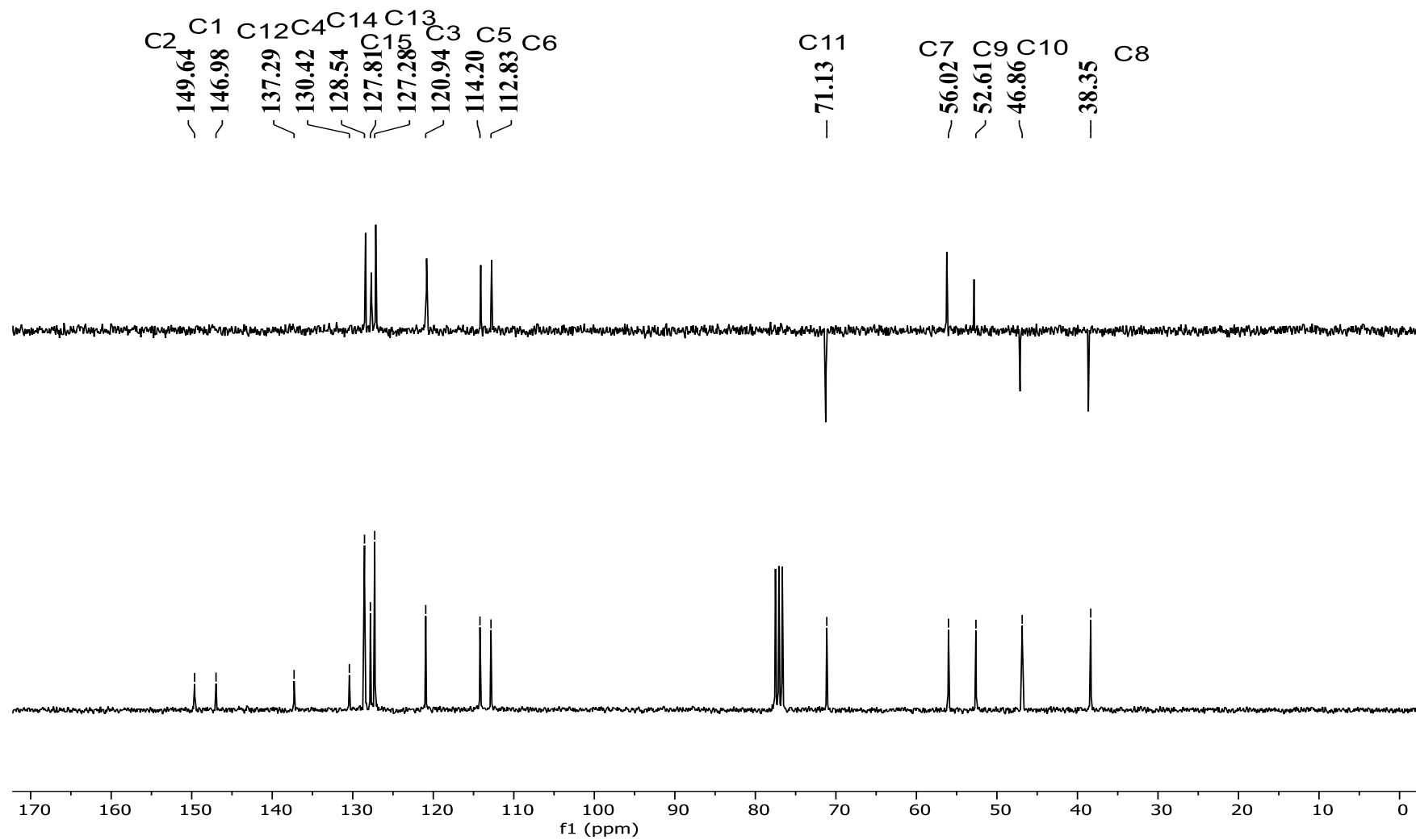
Figura 43 - Espectro de absorção na região do IV de **47**.

Fonte: Do autor.

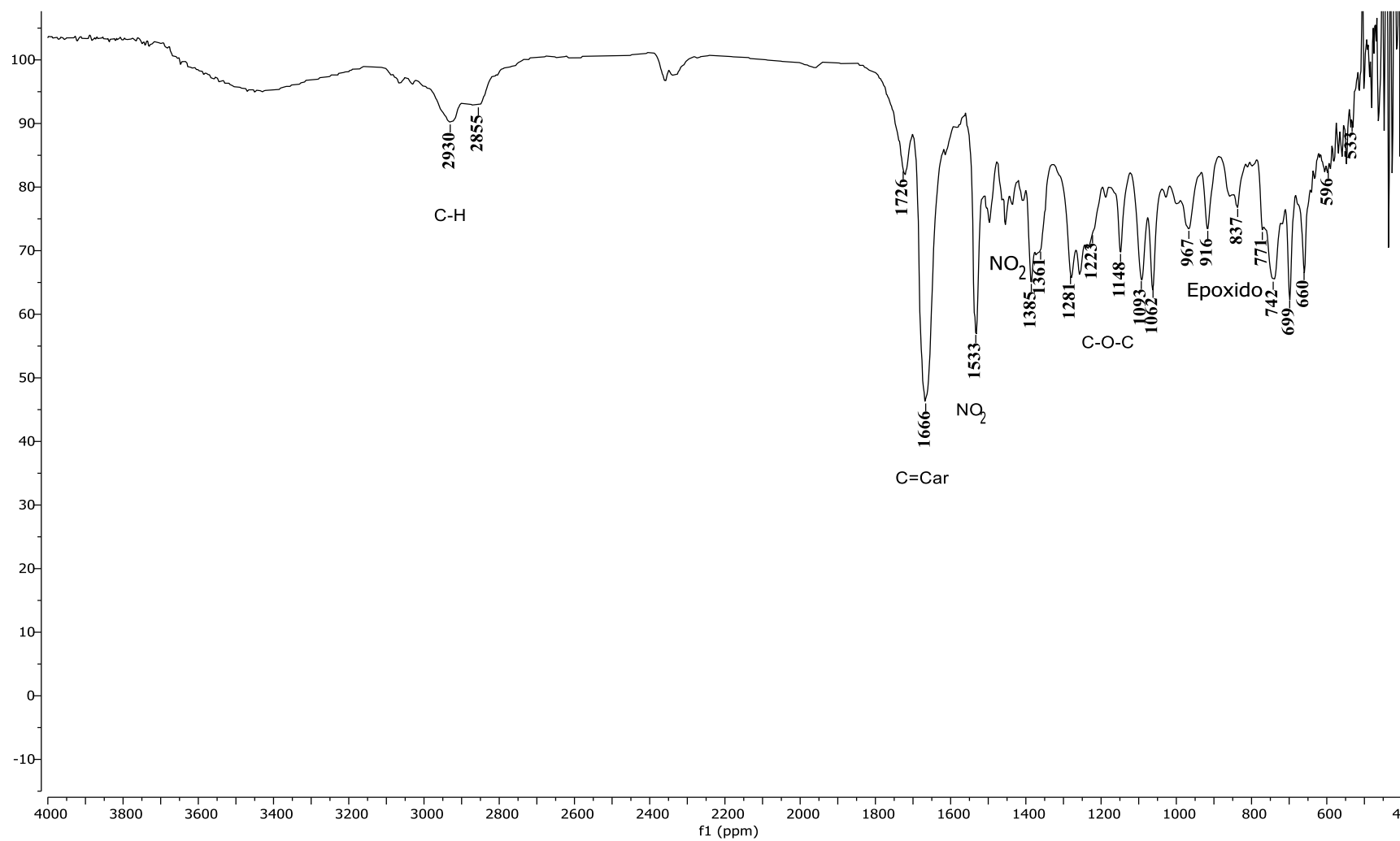
Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H de **47** (CDCl_3 , 300 MHz).



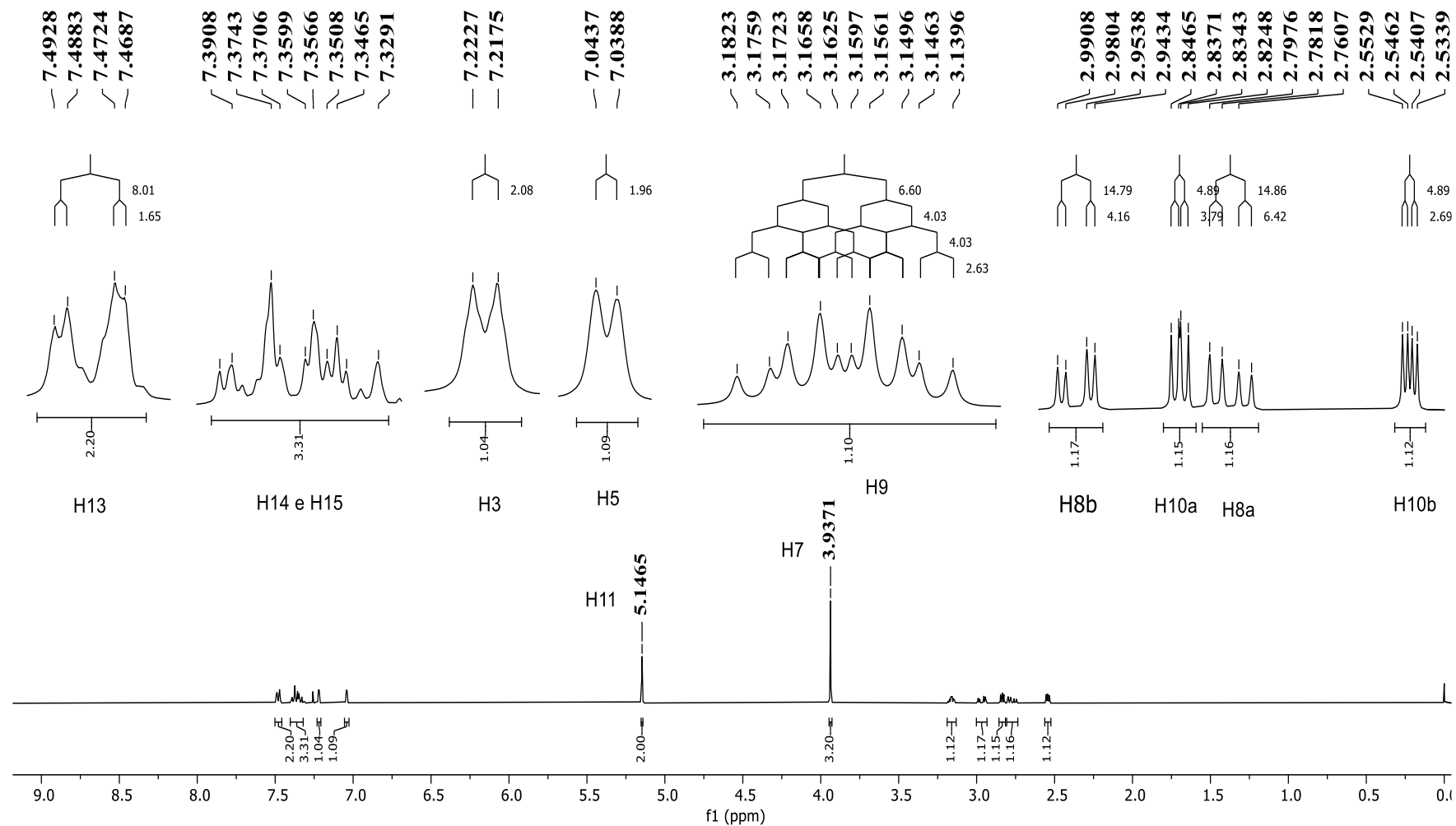
Fonte: Do autor.

Figura 45 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **47** (CDCl_3 , 75 MHz).

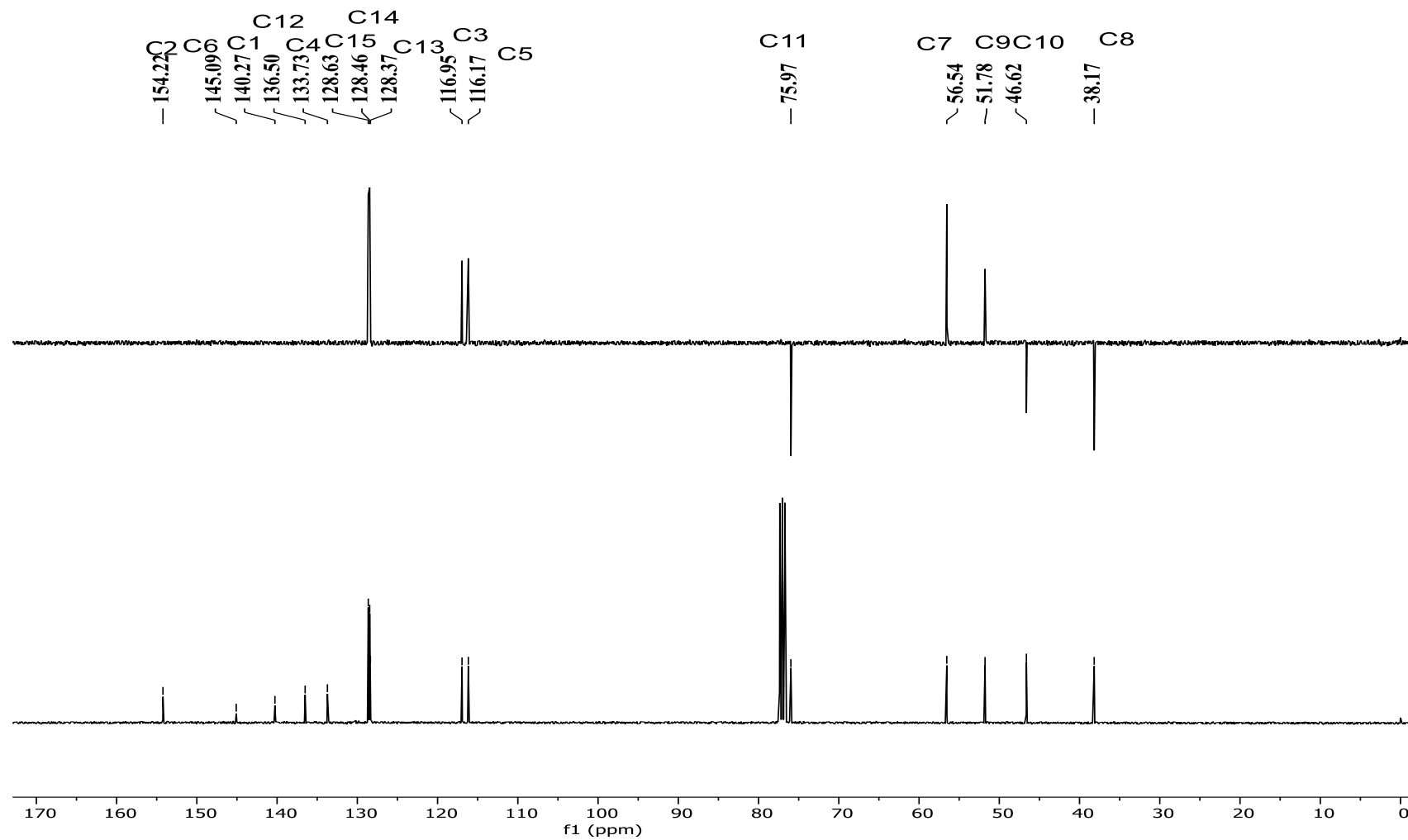
Fonte: Do autor.

Figura 46 - Espectro de absorção na região do IV de **48**.

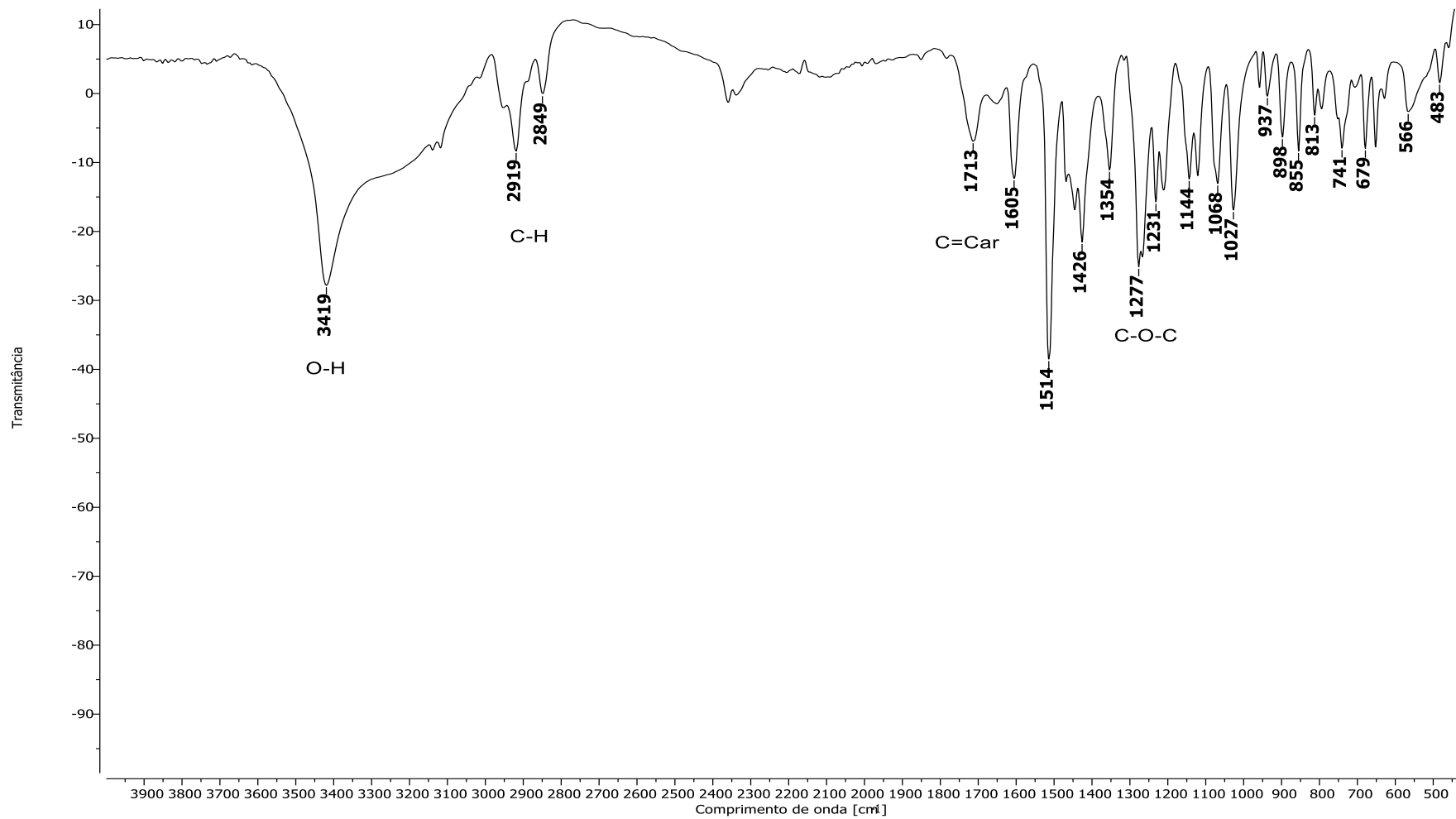
Fonte: Do autor.

Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H de **48** (CDCl_3 , 400 MHz).

Fonte: Do autor.

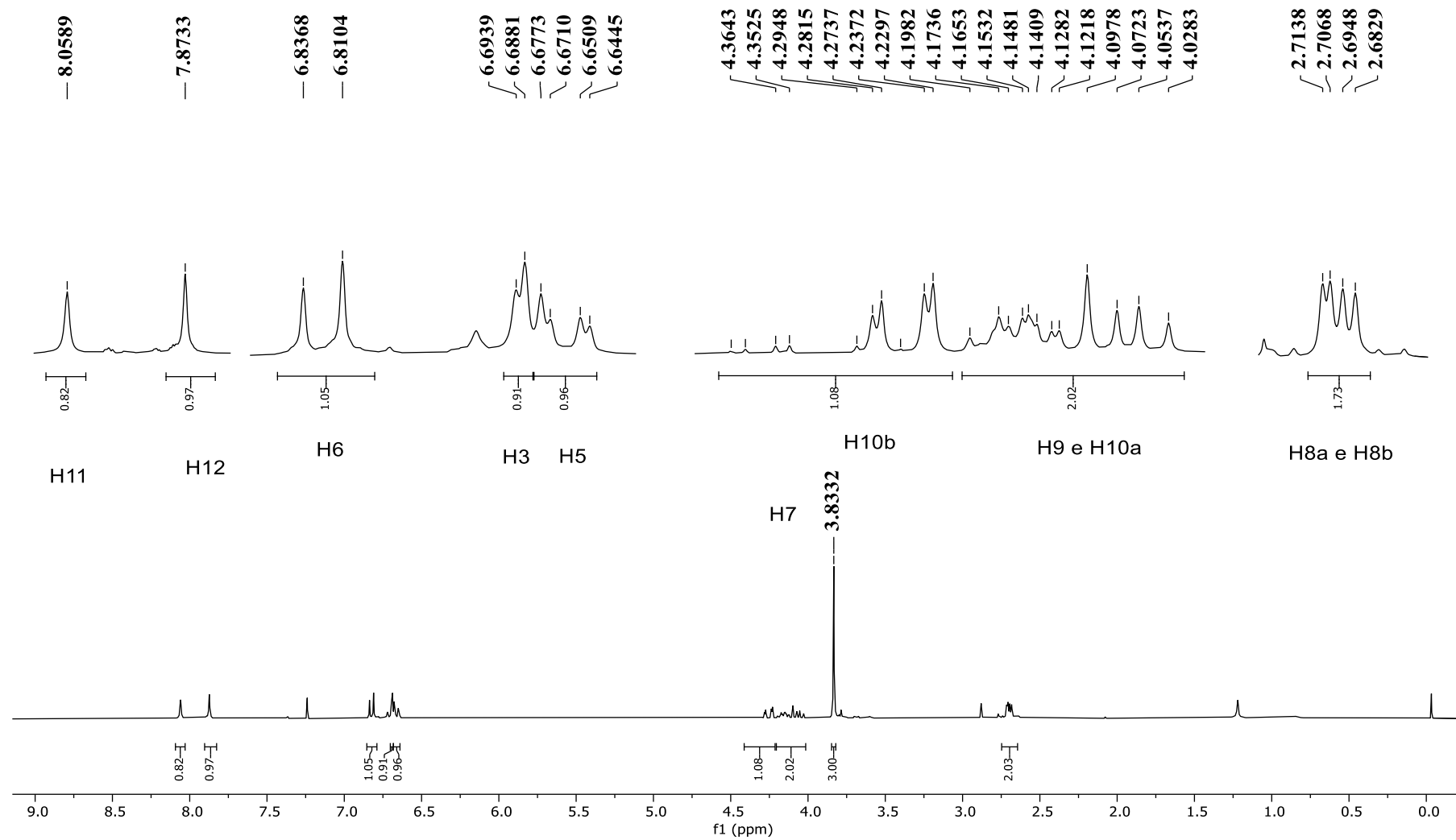
Figura 48 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **48** (CDCl_3 , 100 MHz).

Fonte: Do autor.

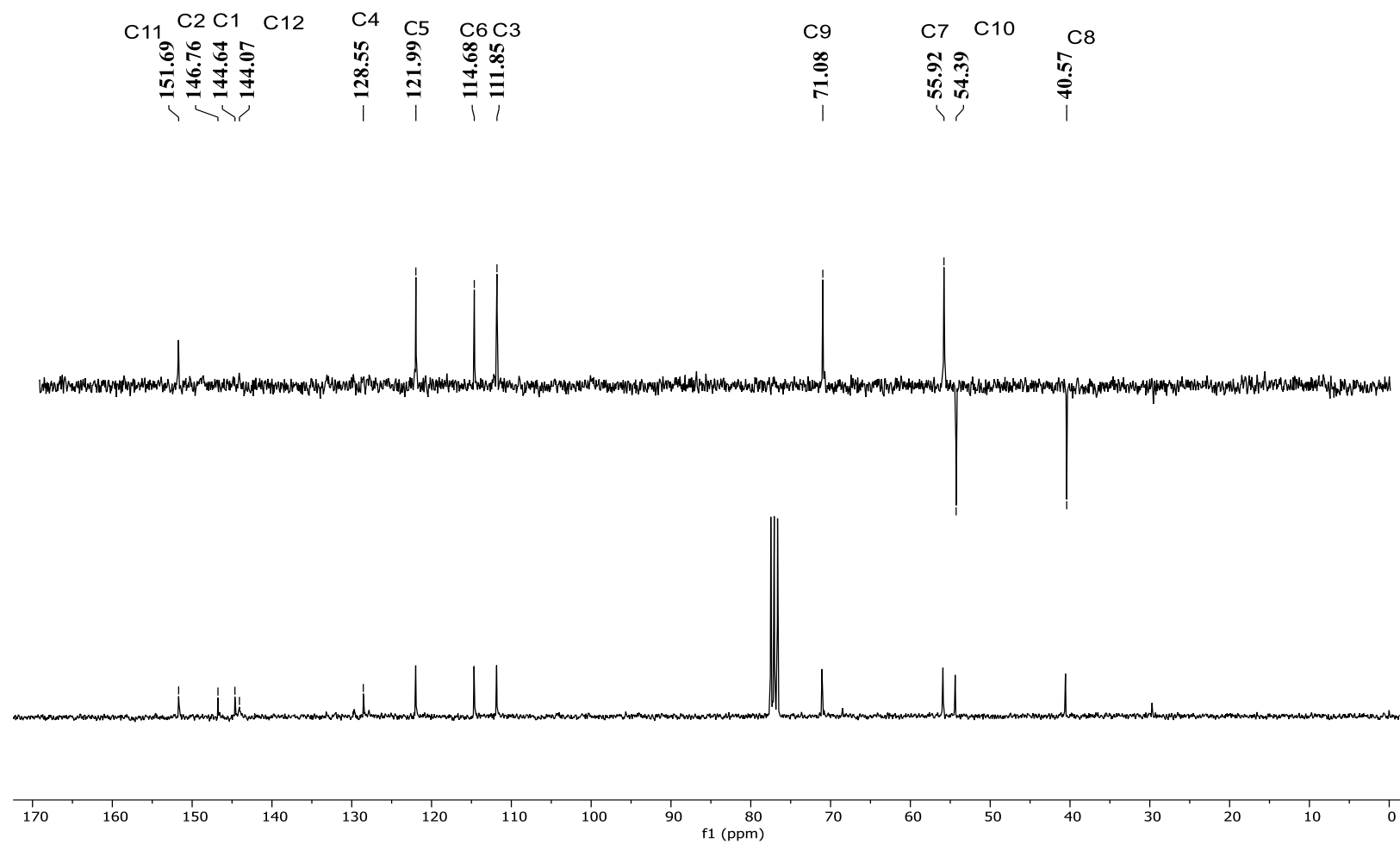
Figura 49 - Espectro de absorção na região do IV de **49**.

Fonte: Do autor.

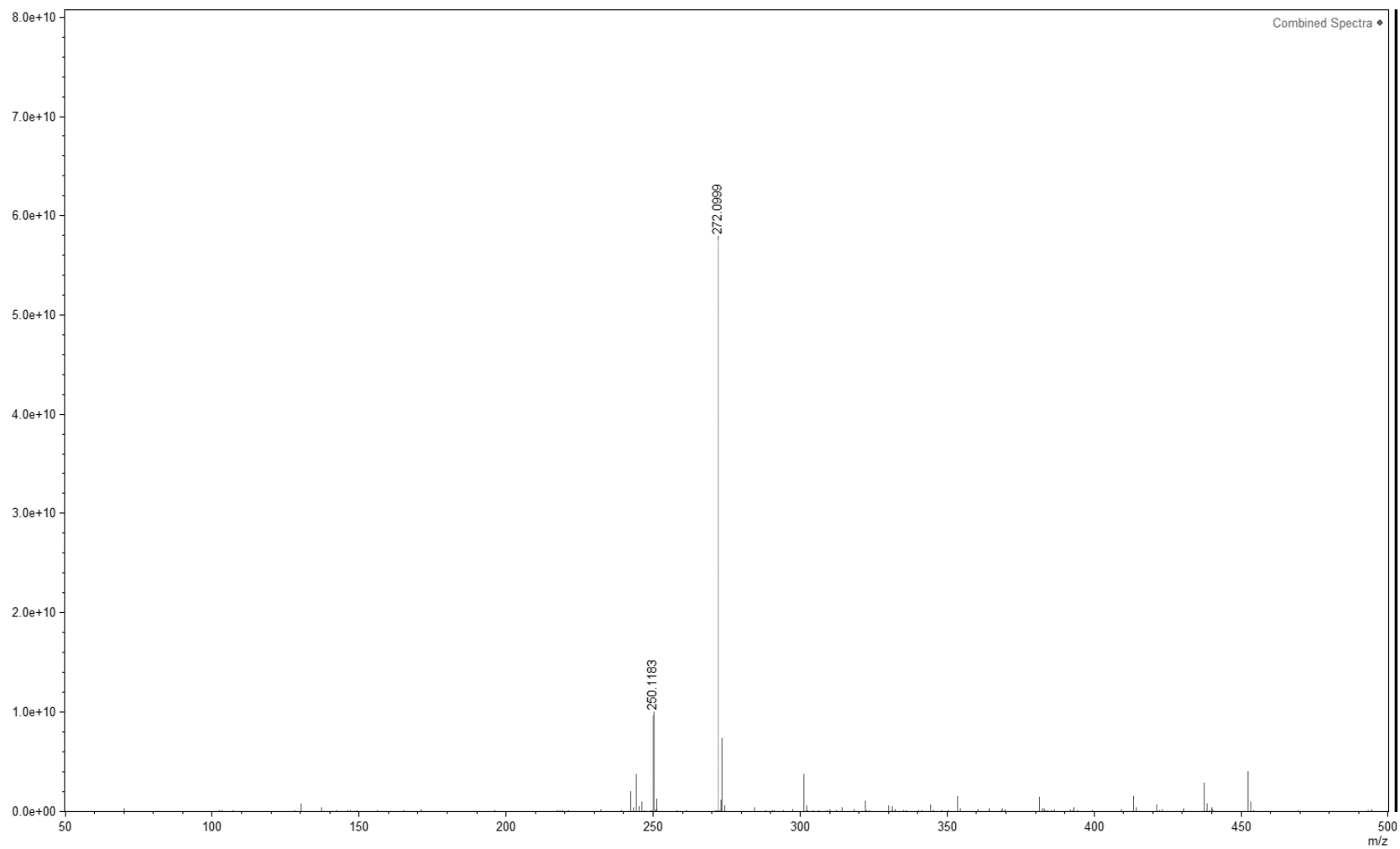
Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H de **49** (CDCl_3 , 300 MHz).



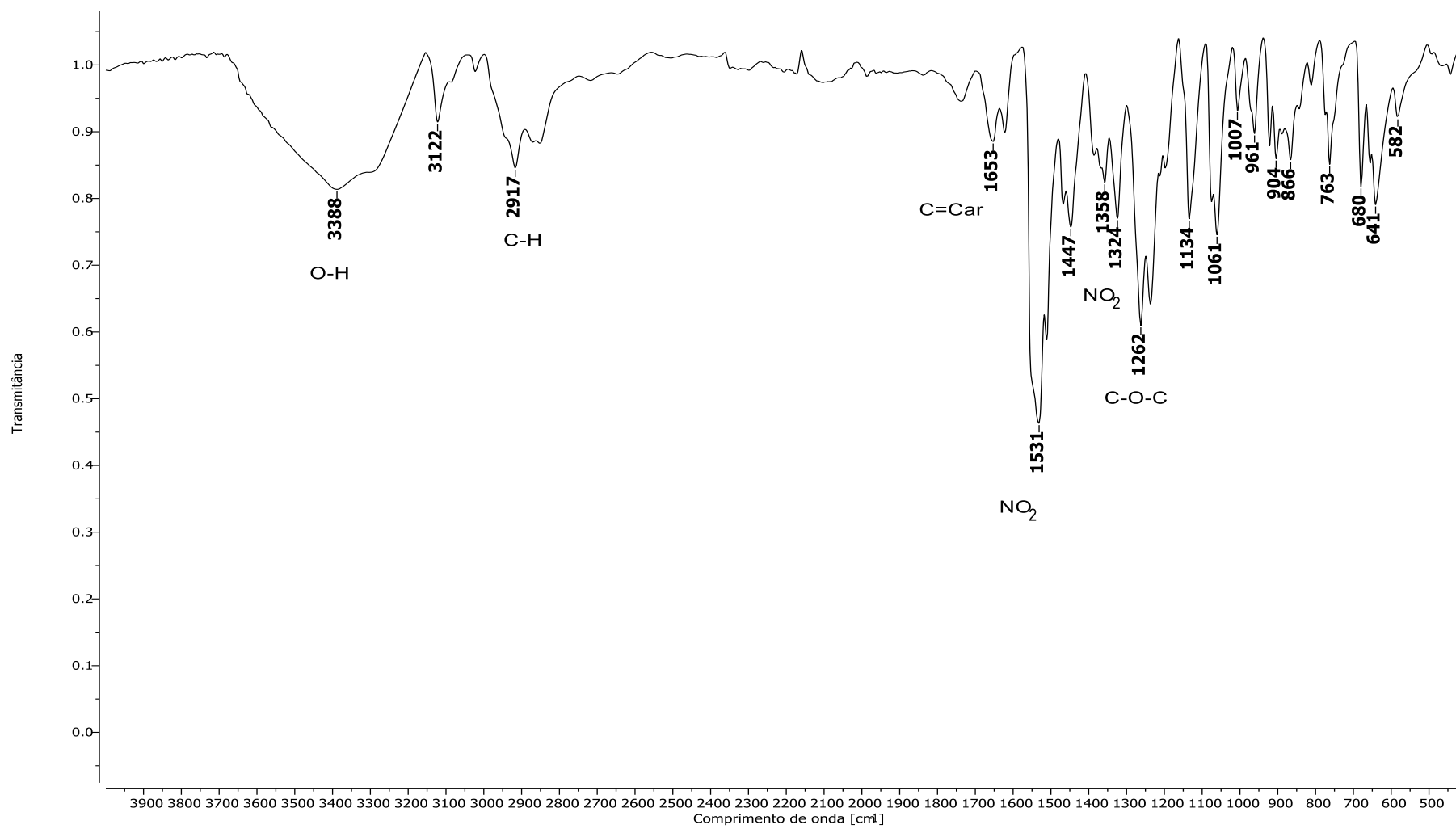
Fonte: Do autor.

Figura 51 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **49** (CDCl_3 , 75 MHz).

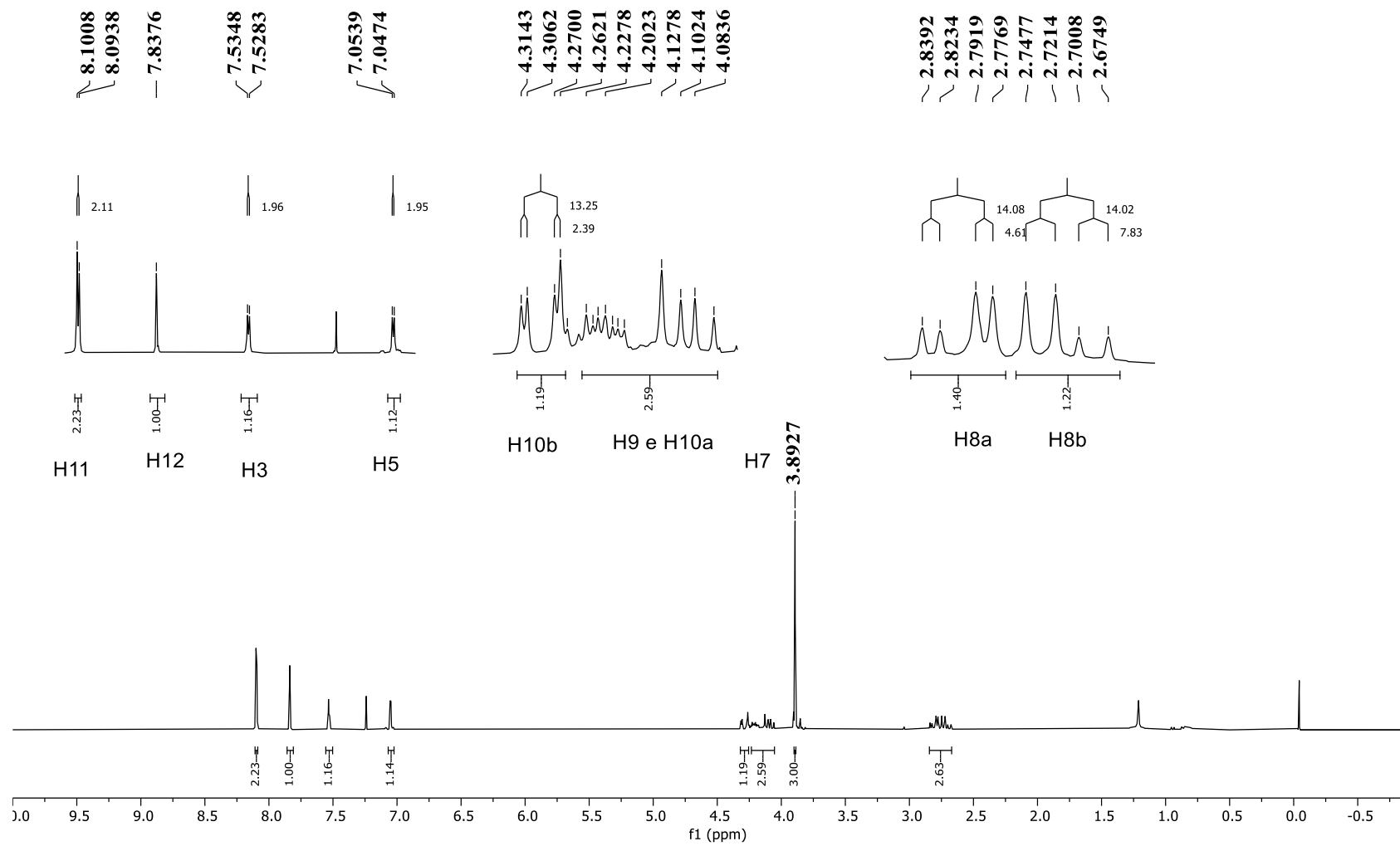
Fonte: Do autor.

Figura 52 - Espectro de EM de **49**.

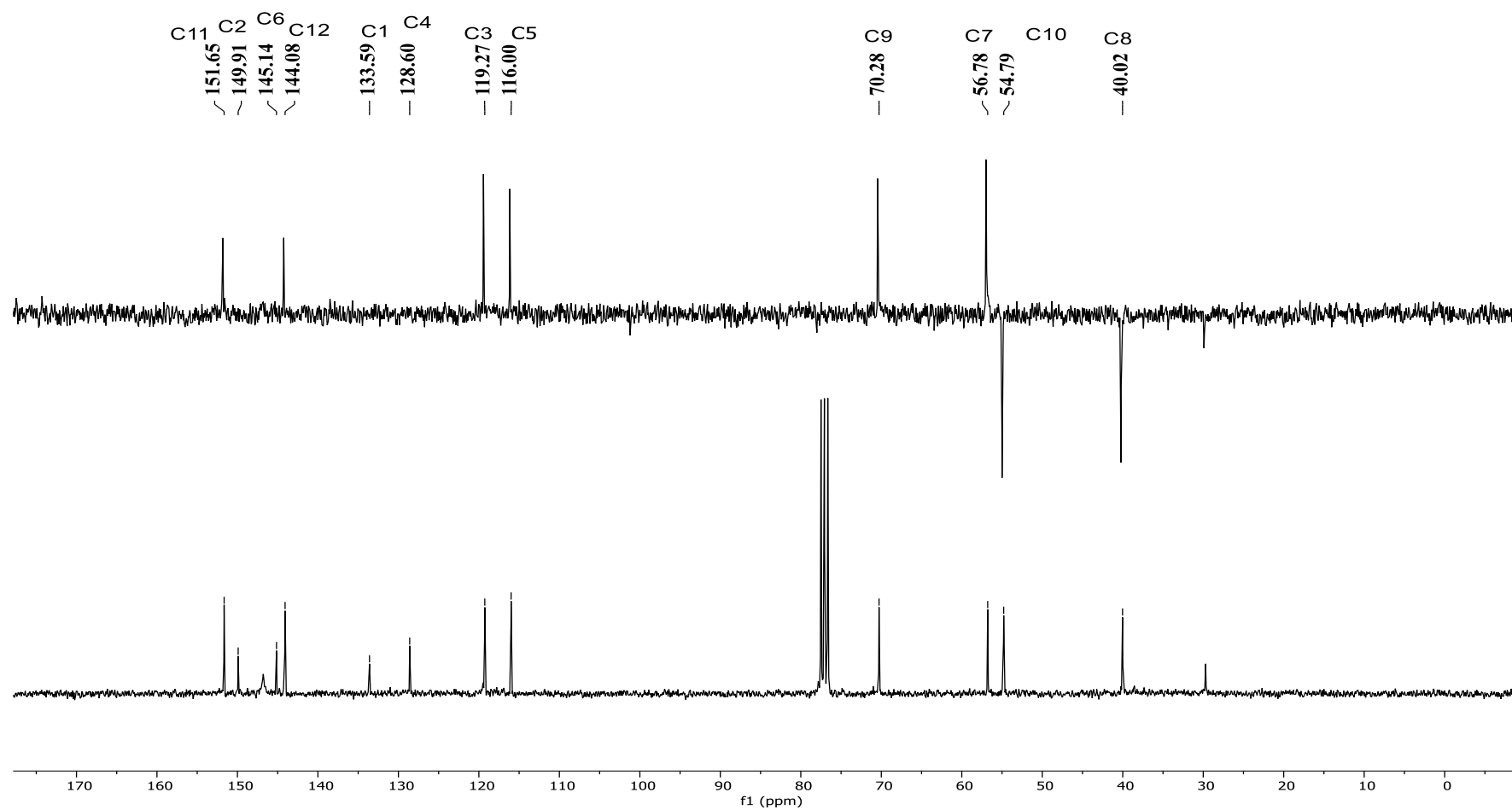
Fonte: Do autor.

Figura 53 - Espectro de absorção na região do IV de **50**.

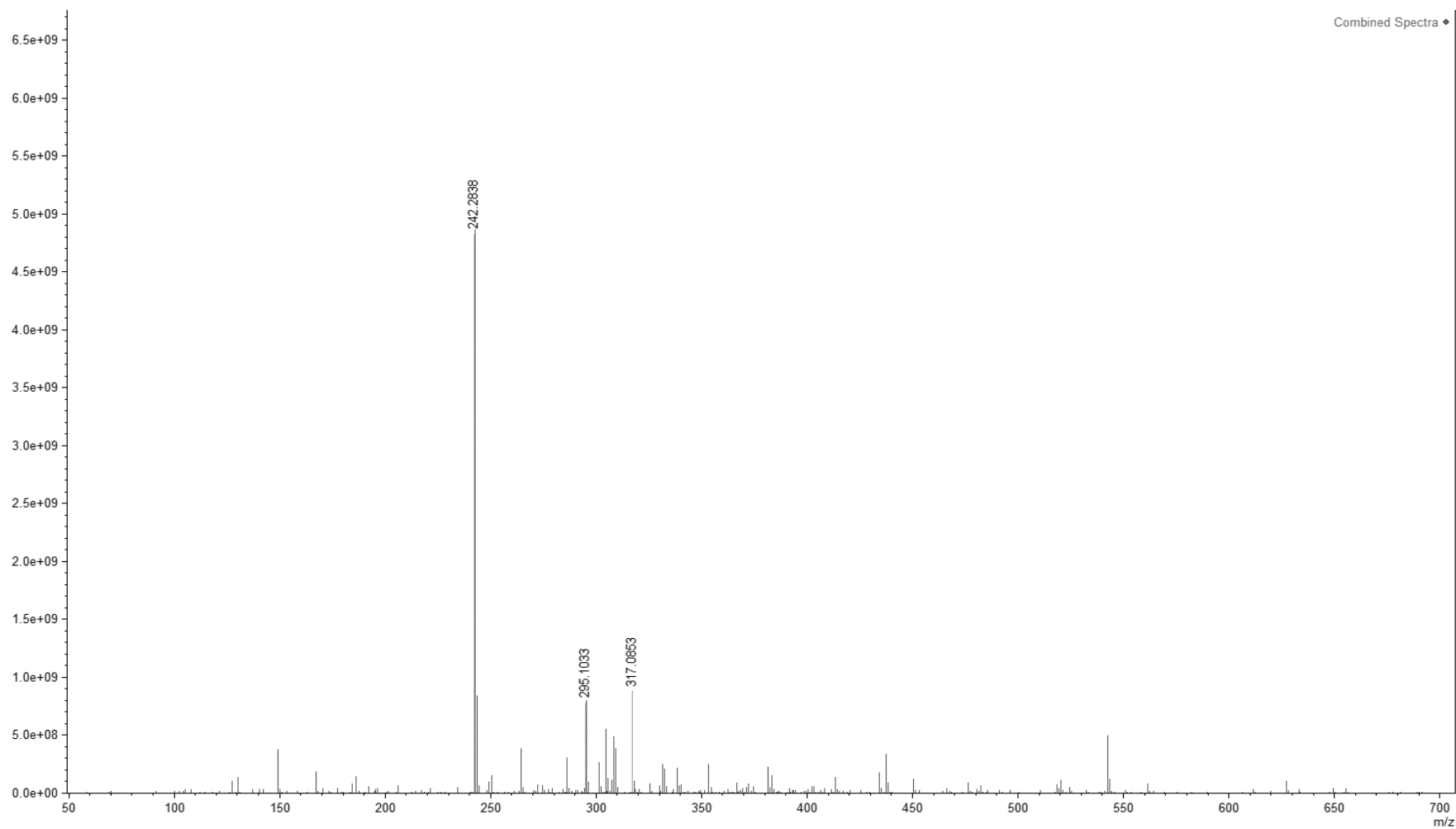
Fonte: Do autor.

Figura 54 - Espectro de RMN de ^1H de **50** (CDCl_3 , 300 MHz).

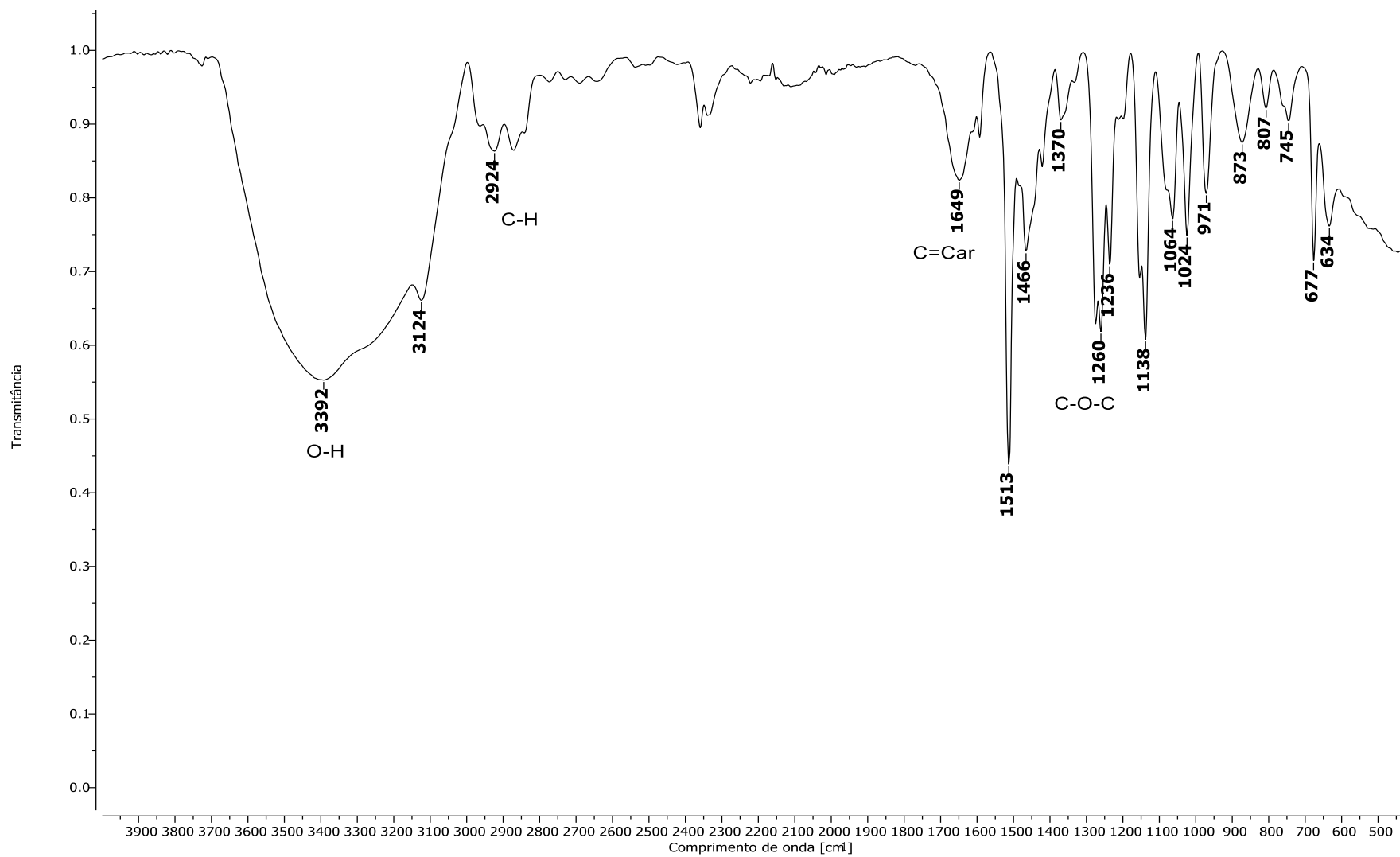
Fonte: Do autor.

Figura 55 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **50** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

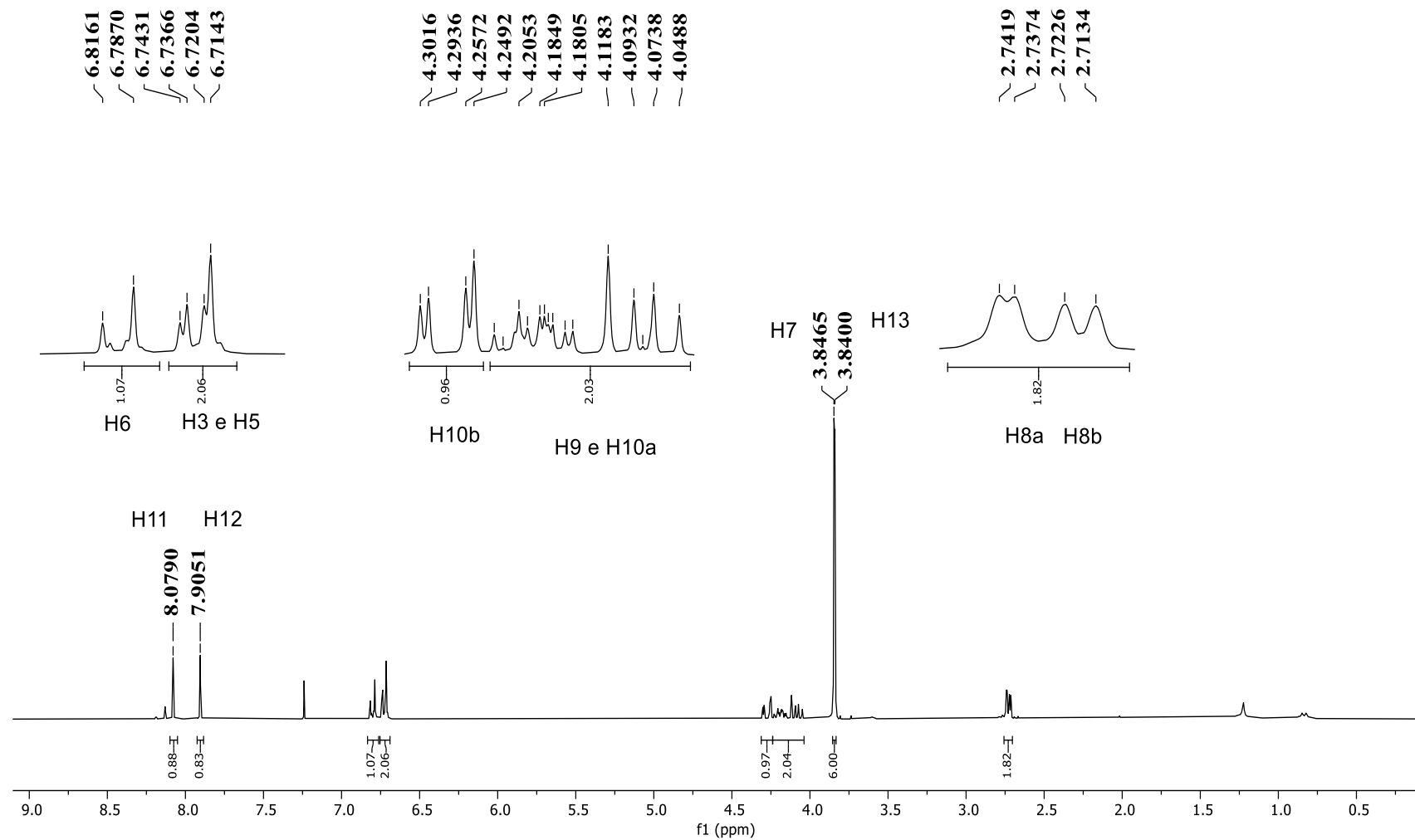
Figura 56 - Espectro de EM de **50**.

Fonte: Do autor.

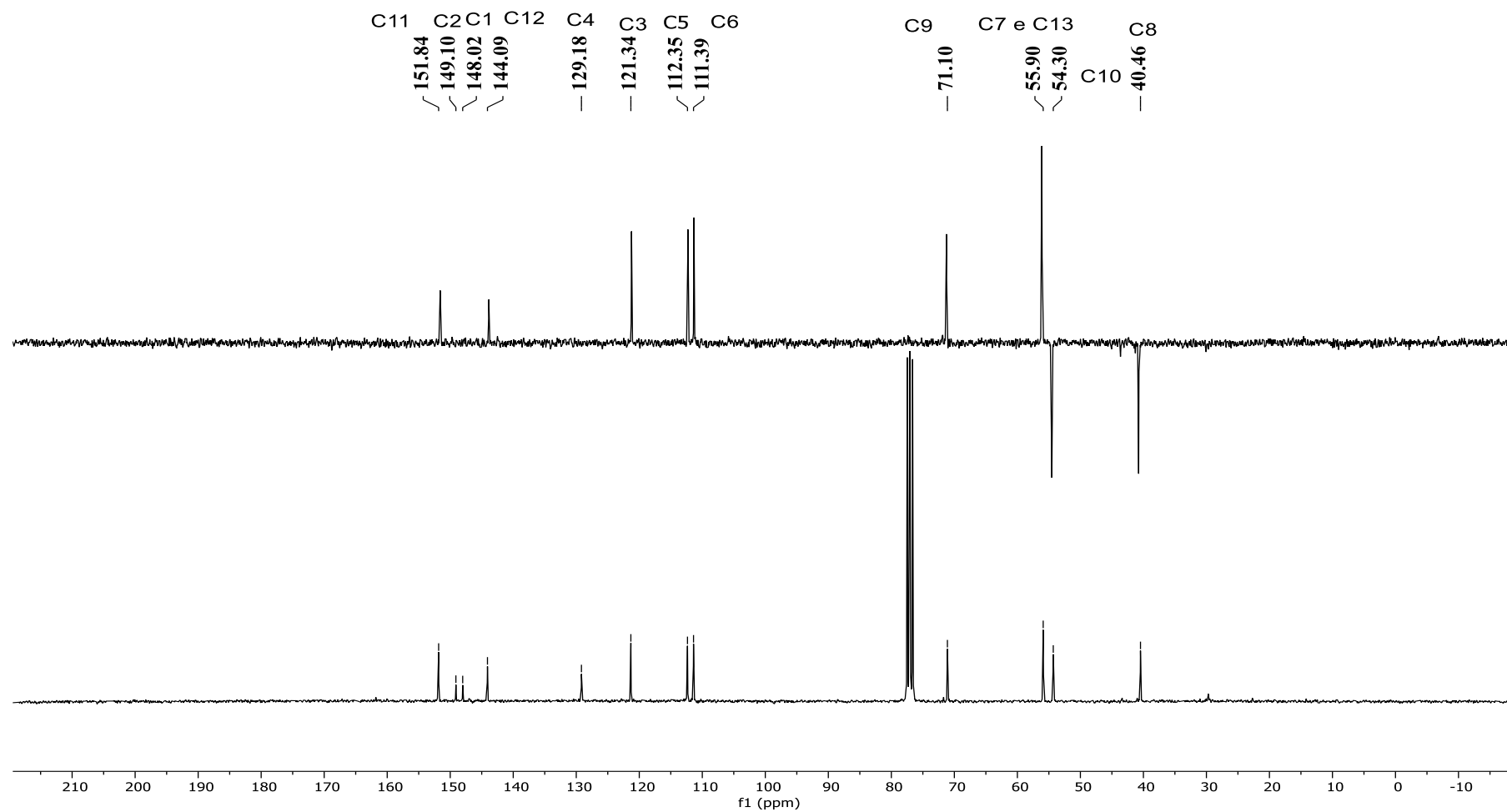
Figura 57 - Espectro de absorção na região do IV de **51**.

Fonte: Do autor.

Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H de **51** (CDCl_3 , 300 MHz).

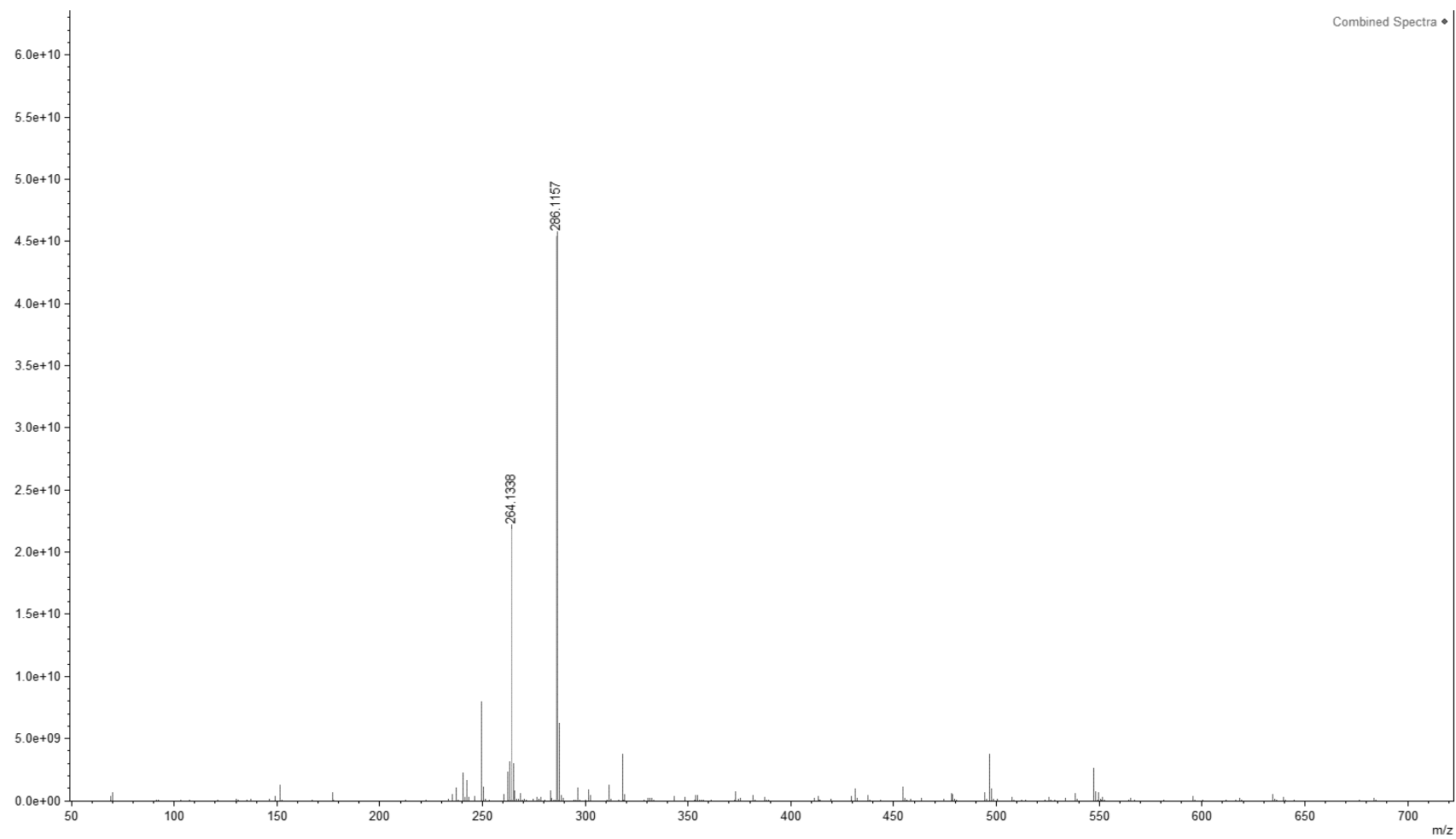


Fonte: Do autor.

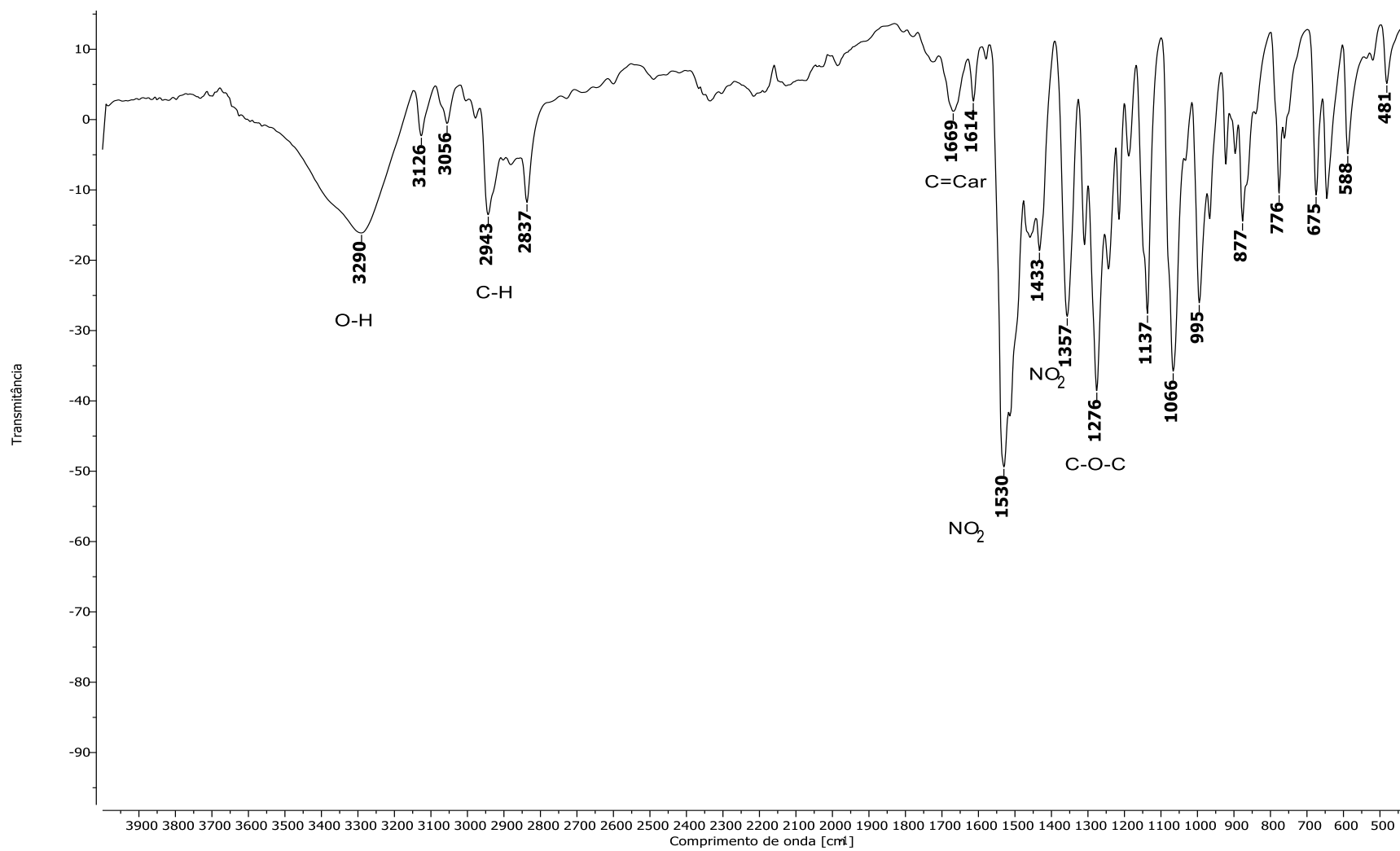
Figura 59 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **51** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

Figura 60 - Espectro de EM de 51.

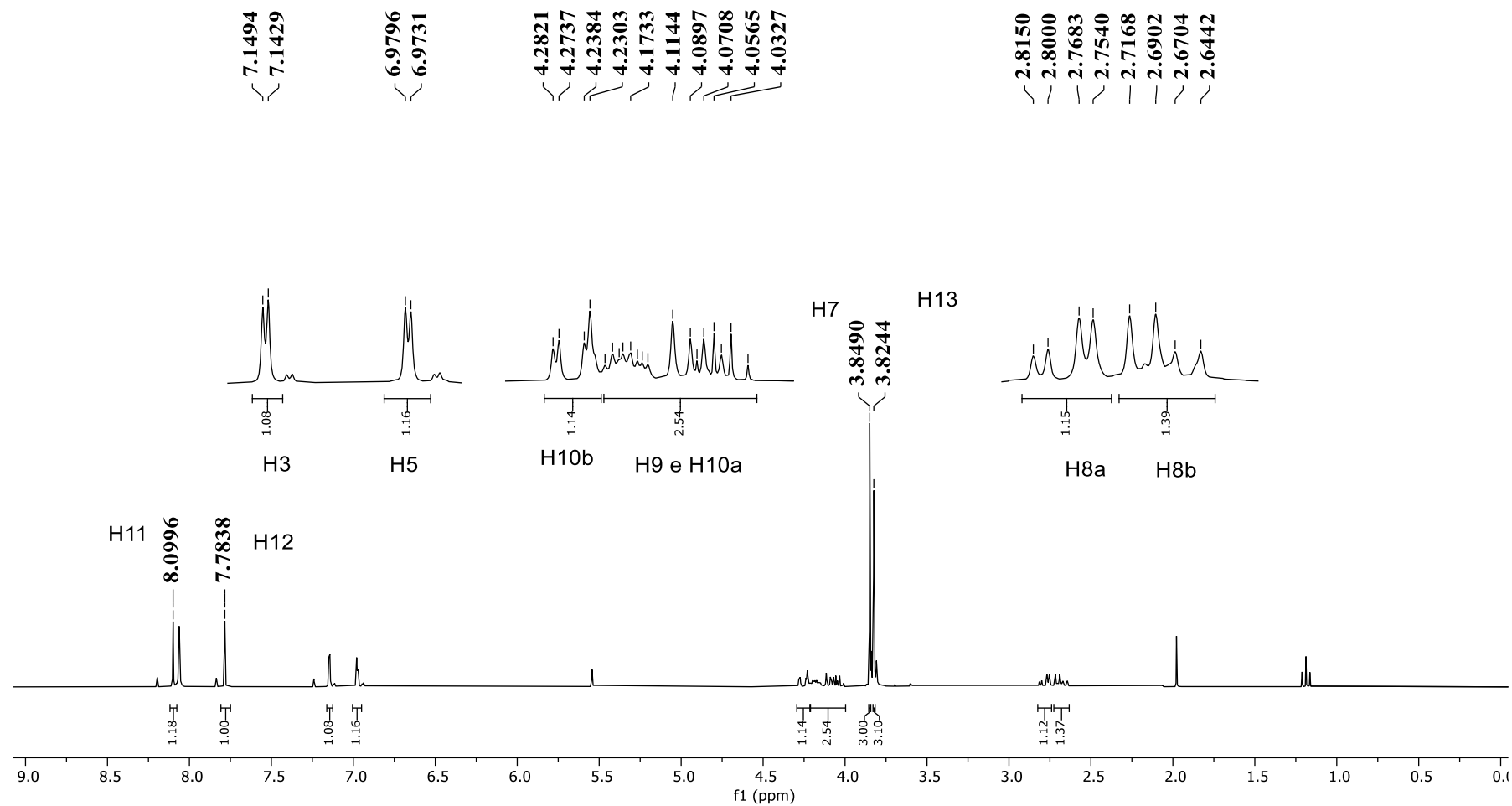


Fonte: Do autor.

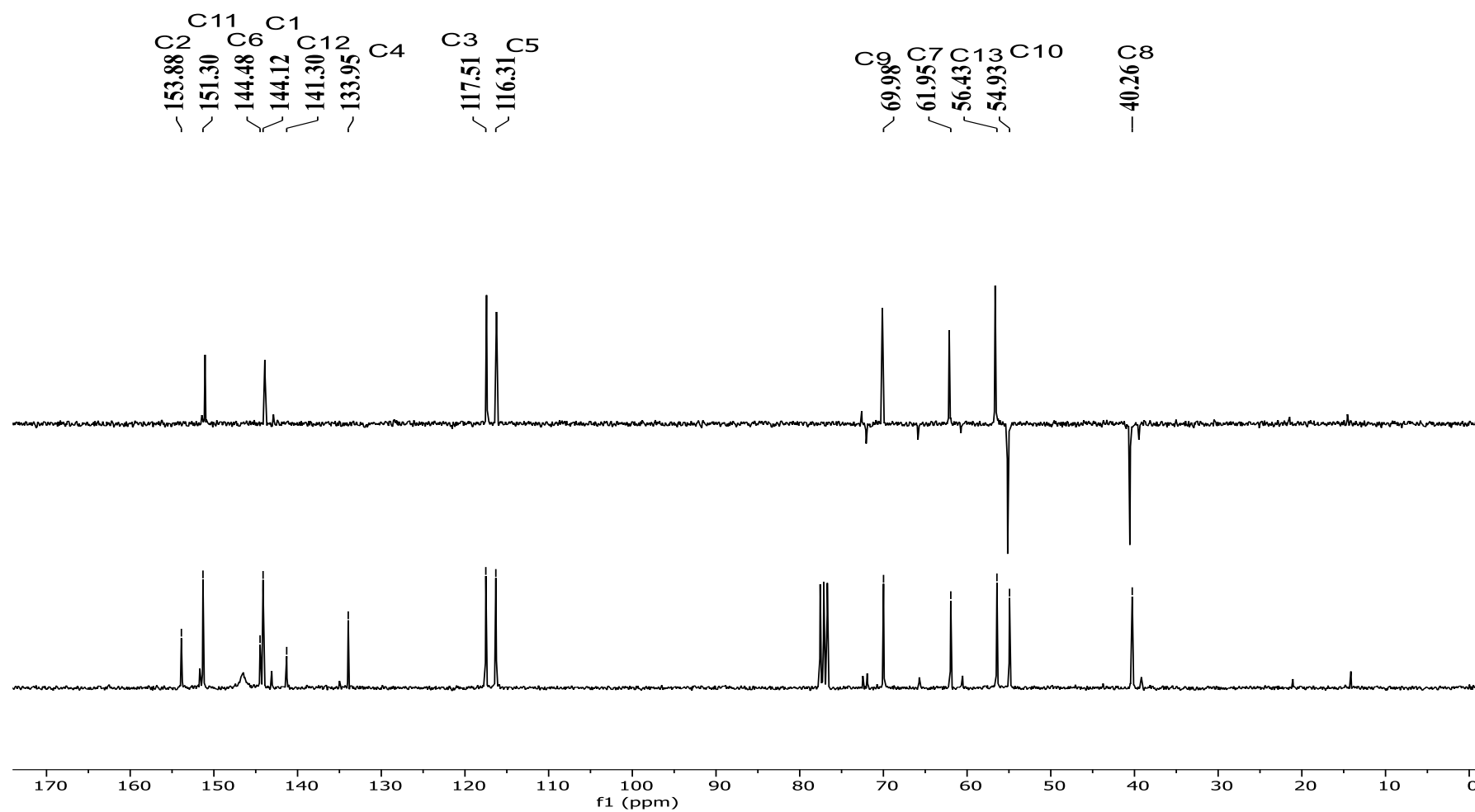
Figura 61 - Espectro de absorção na região do IV de **52**.

Fonte: Do autor.

Figura 62 - Espectro de RMN de ^1H de **52** (CDCl_3 , 300 MHz).

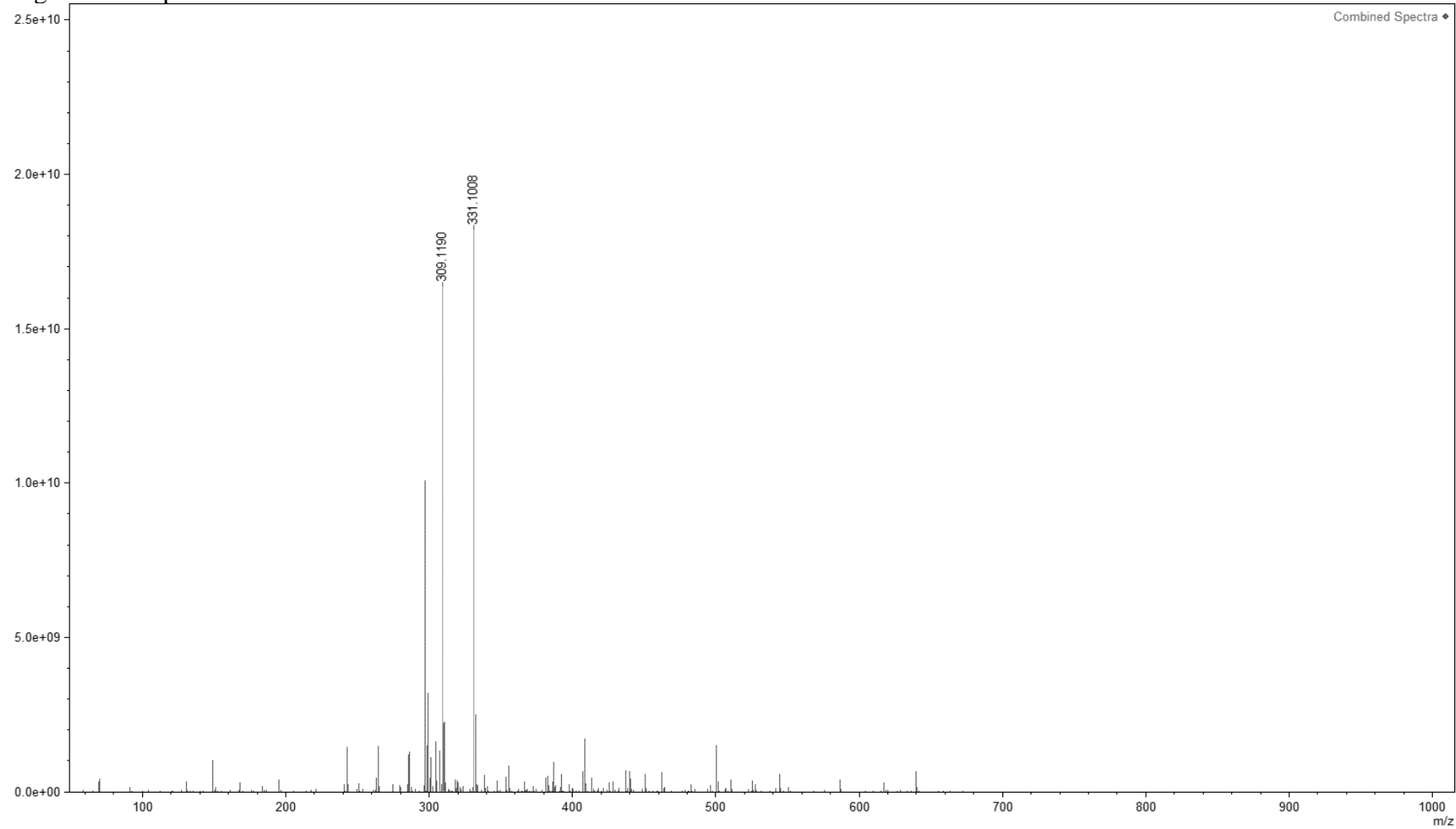


Fonte: Do autor.

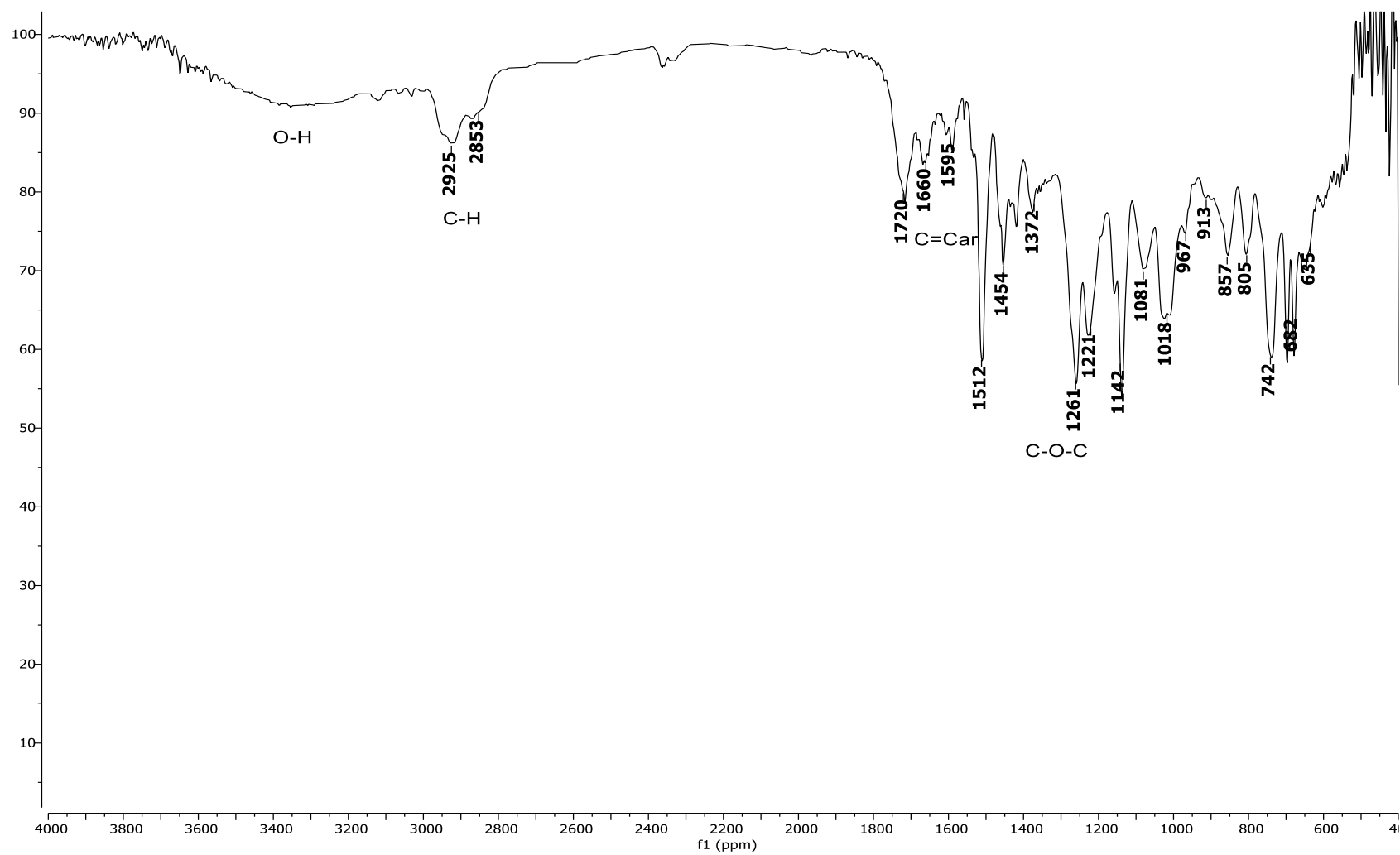
Figura 63 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **52** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

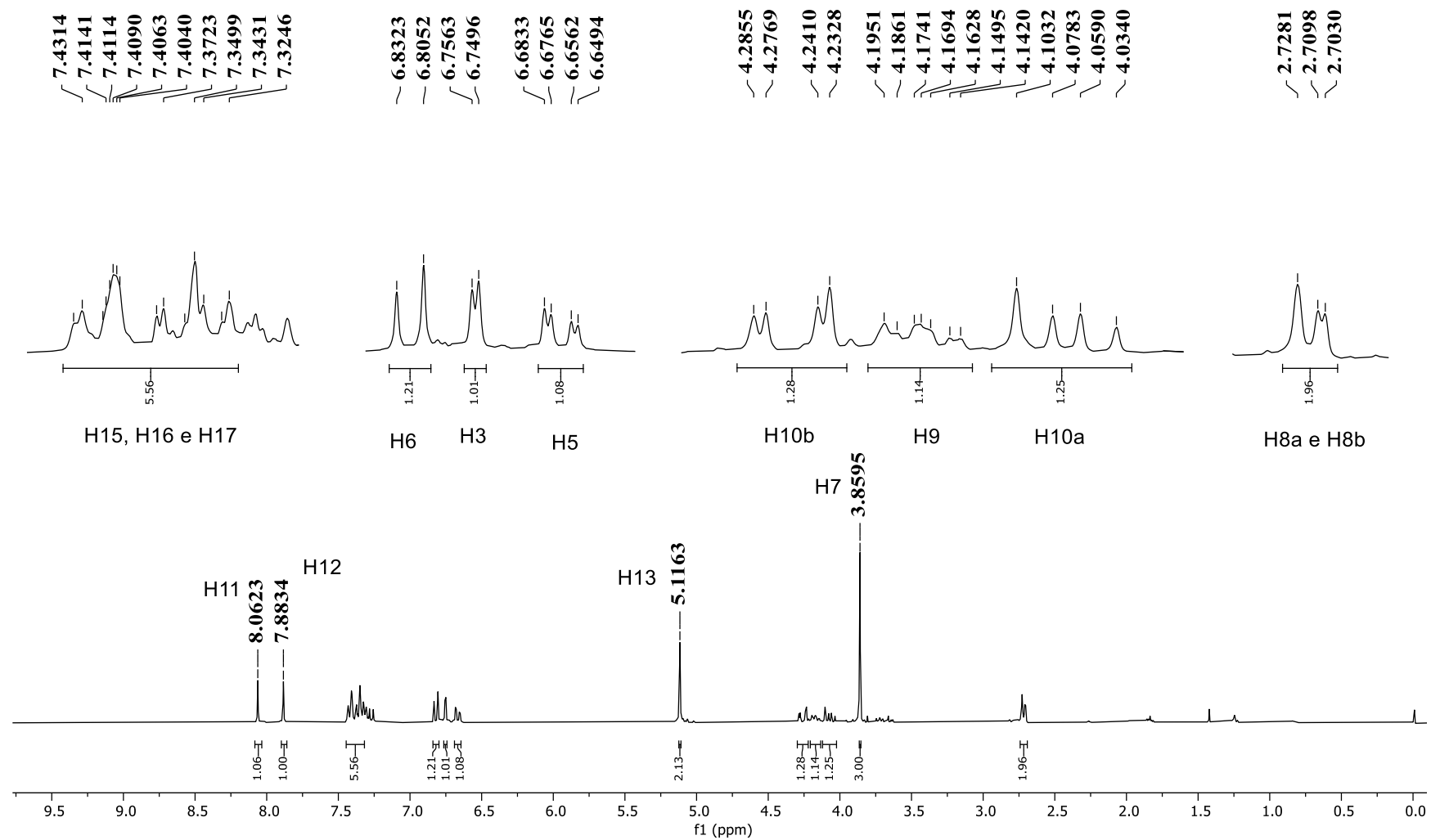
Figura 64 - Espectro de EM de 52.



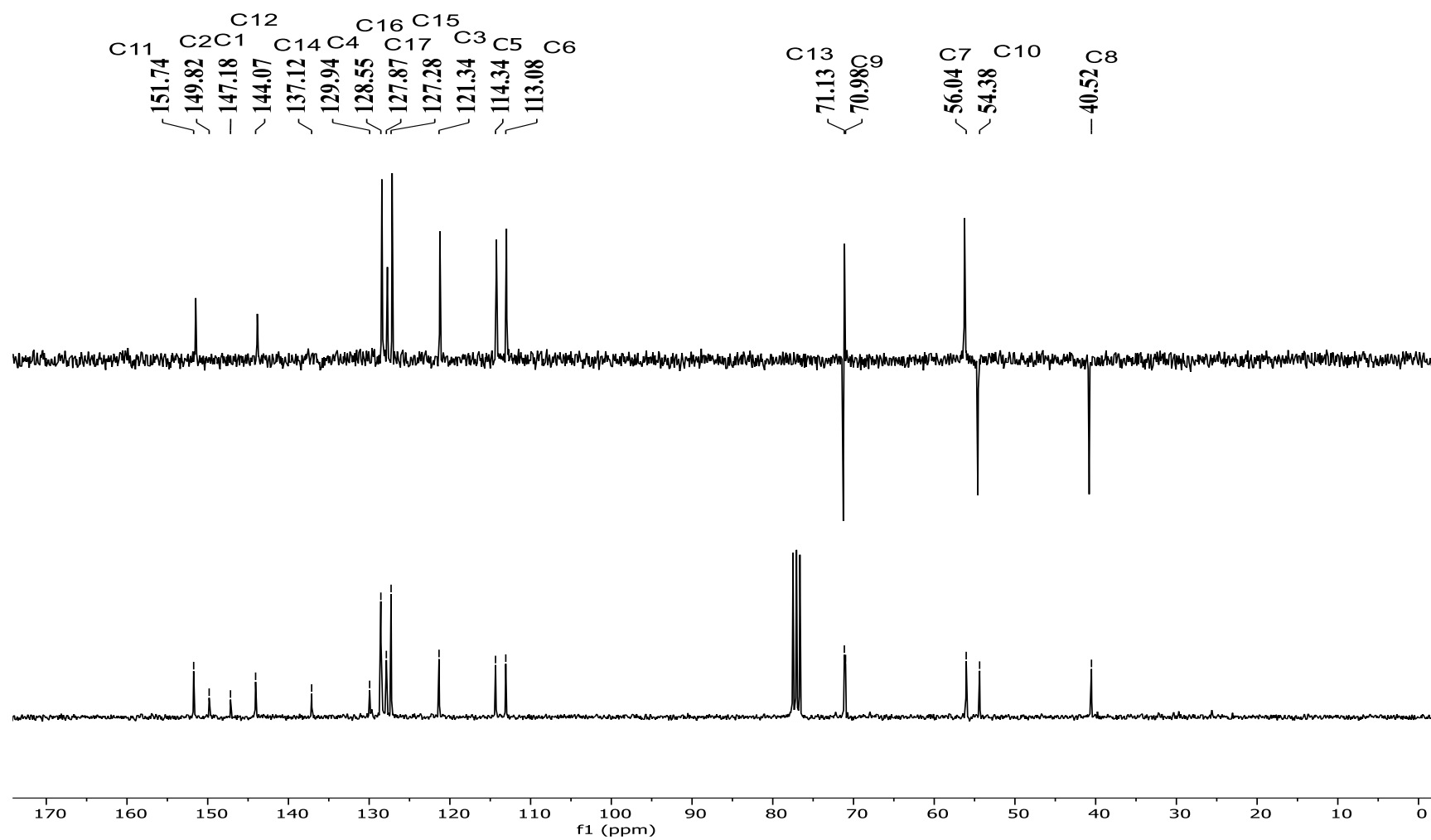
Fonte: Do autor.

Figura 65 - Espectro de absorção na região do IV de **53**.

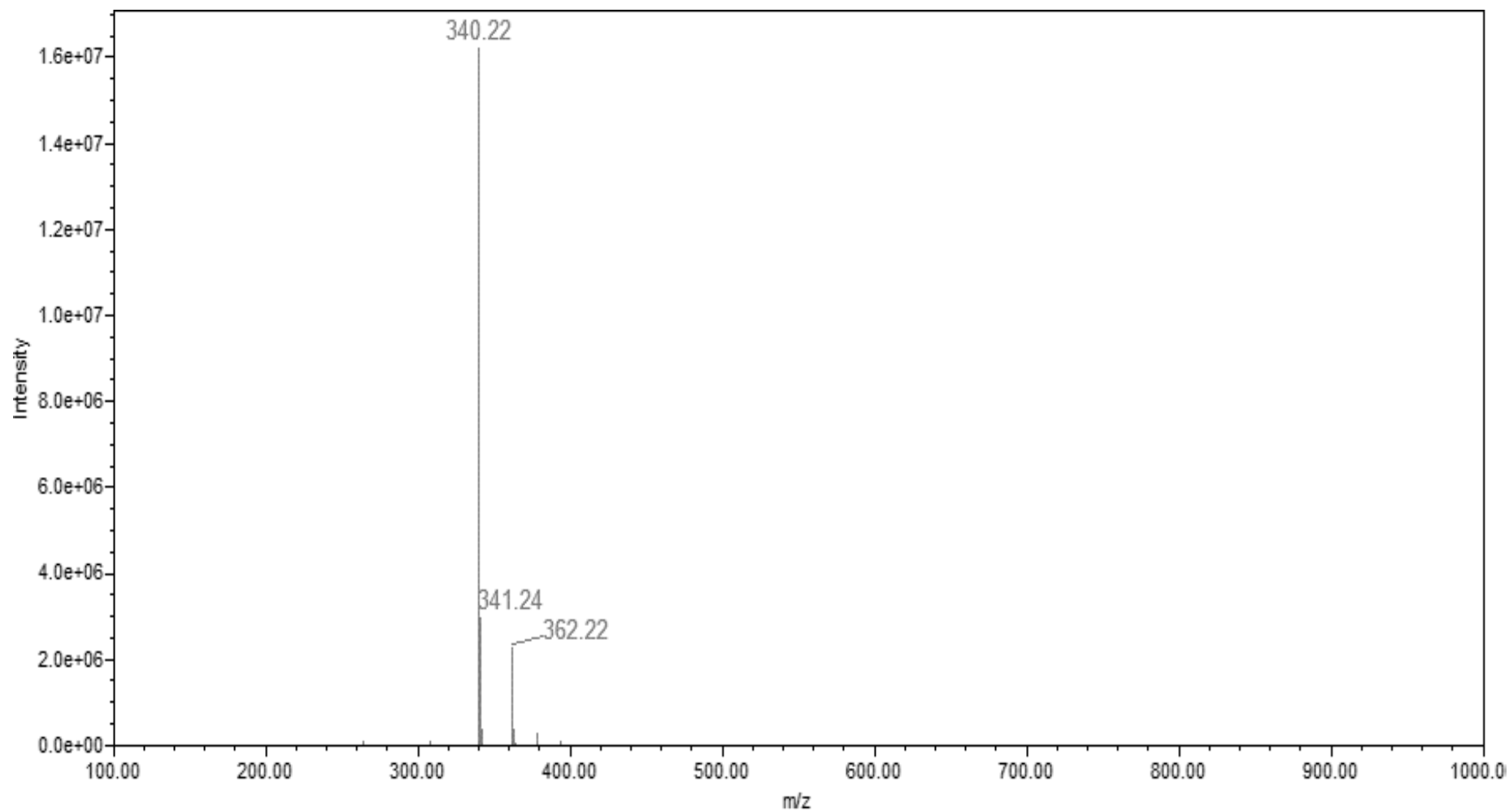
Fonte: Do autor.

Figura 66 - Espectro de RMN de ^1H de **53** (CDCl_3 , 300 MHz).

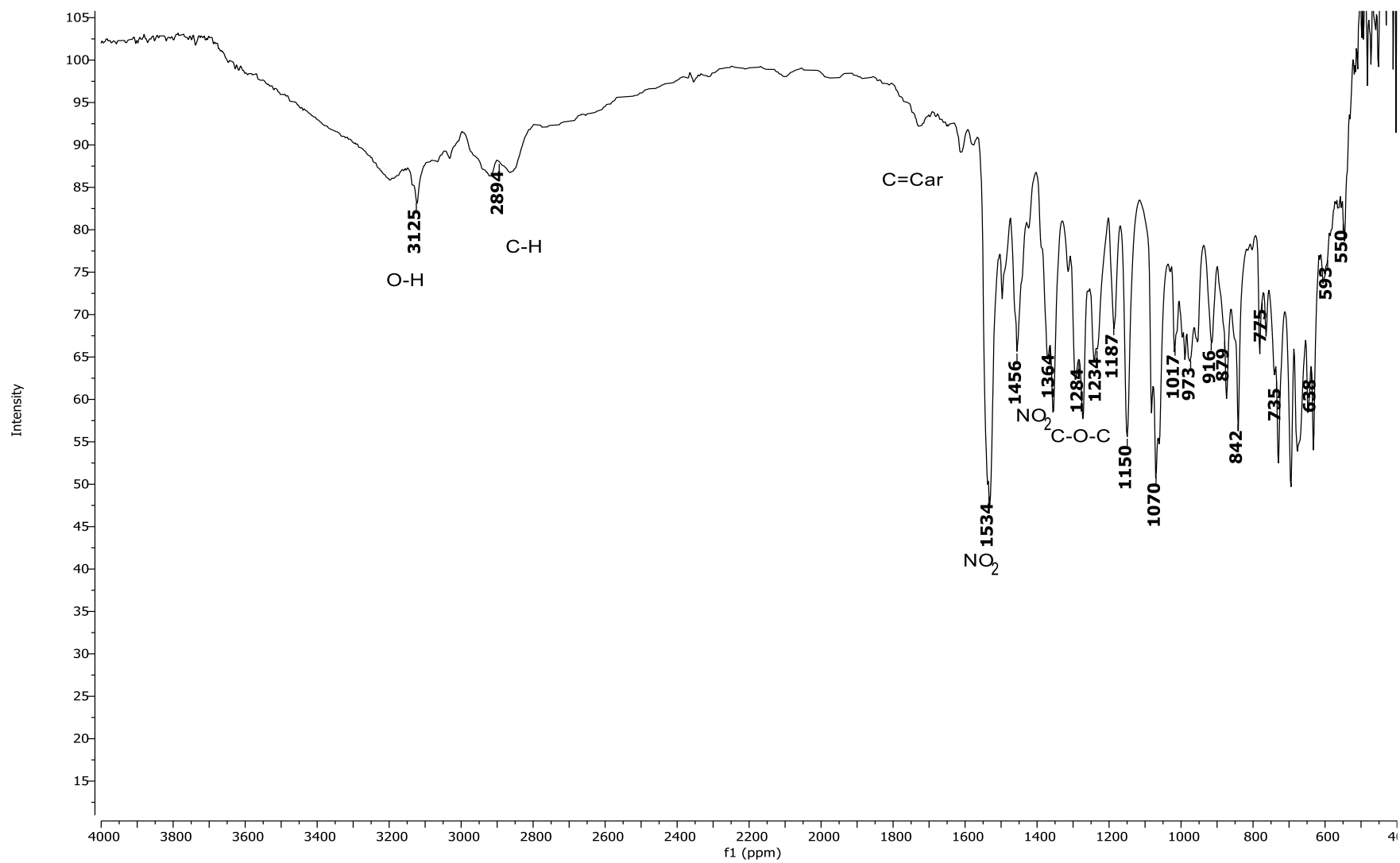
Fonte: Do autor.

Figura 67 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **53** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

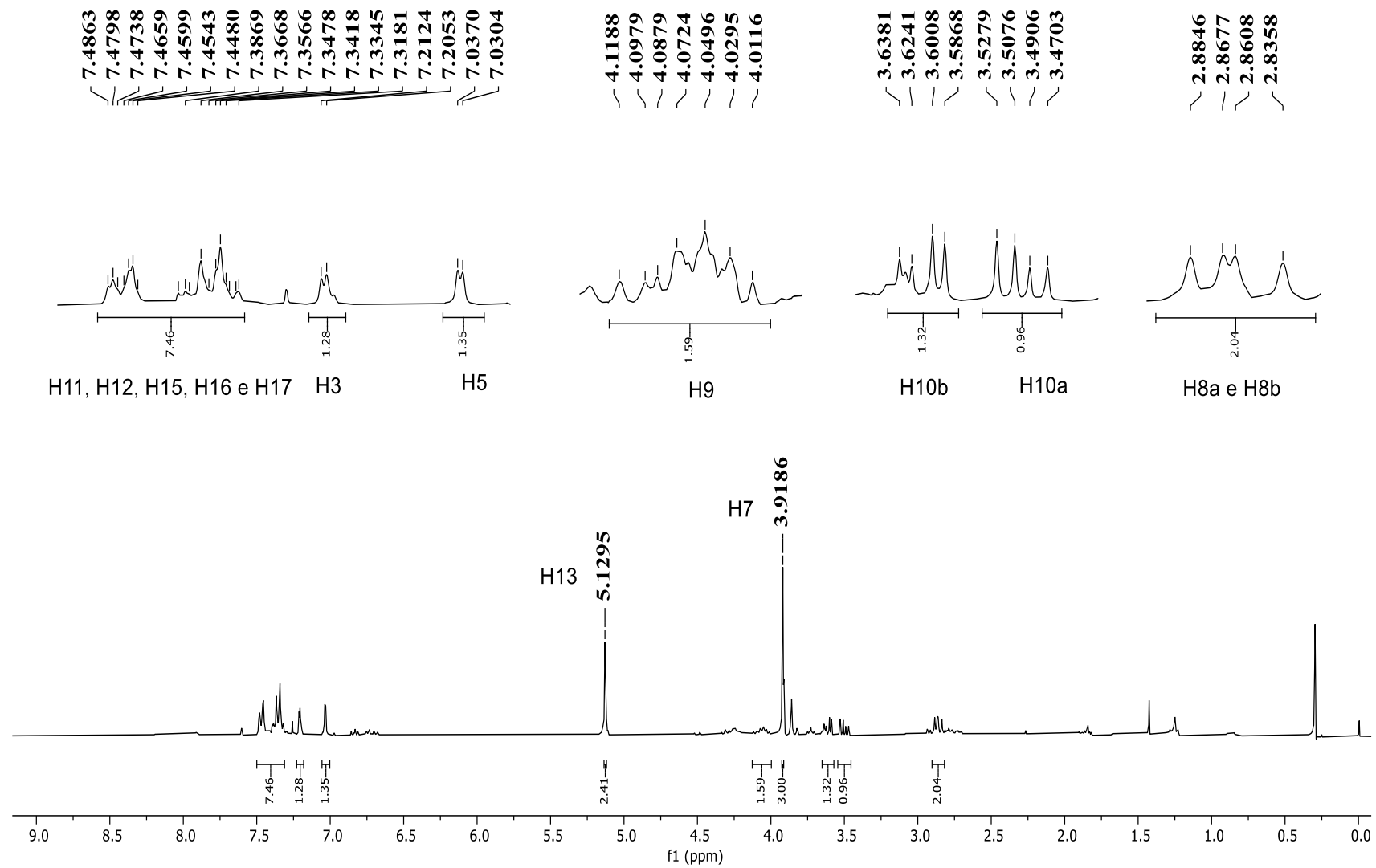
Figura 68 - Espectro de EM de **53**.

Fonte: Do autor.

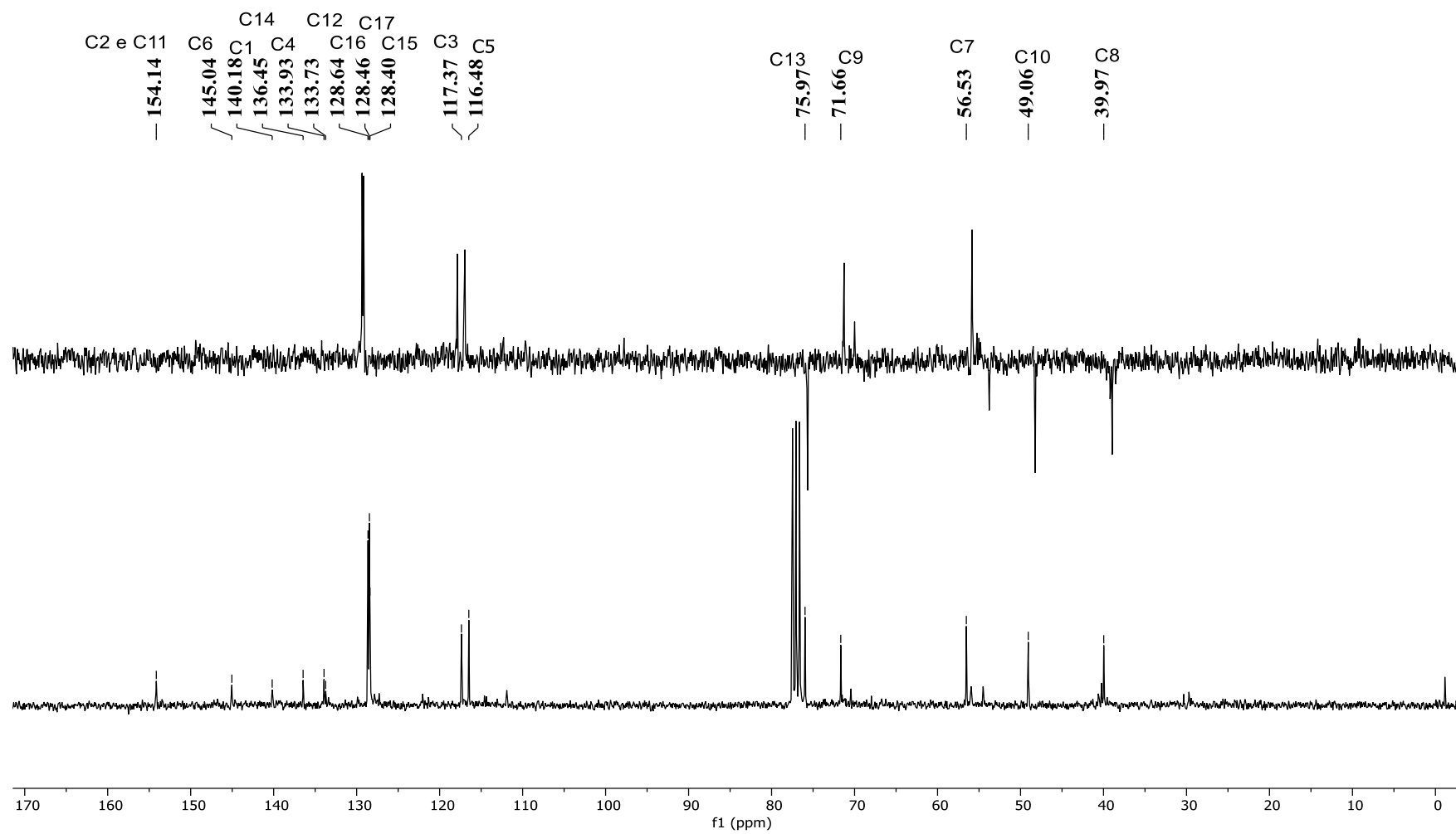
Figura 69 - Espectro de absorção na região do IV de **54**.

Fonte: Do autor.

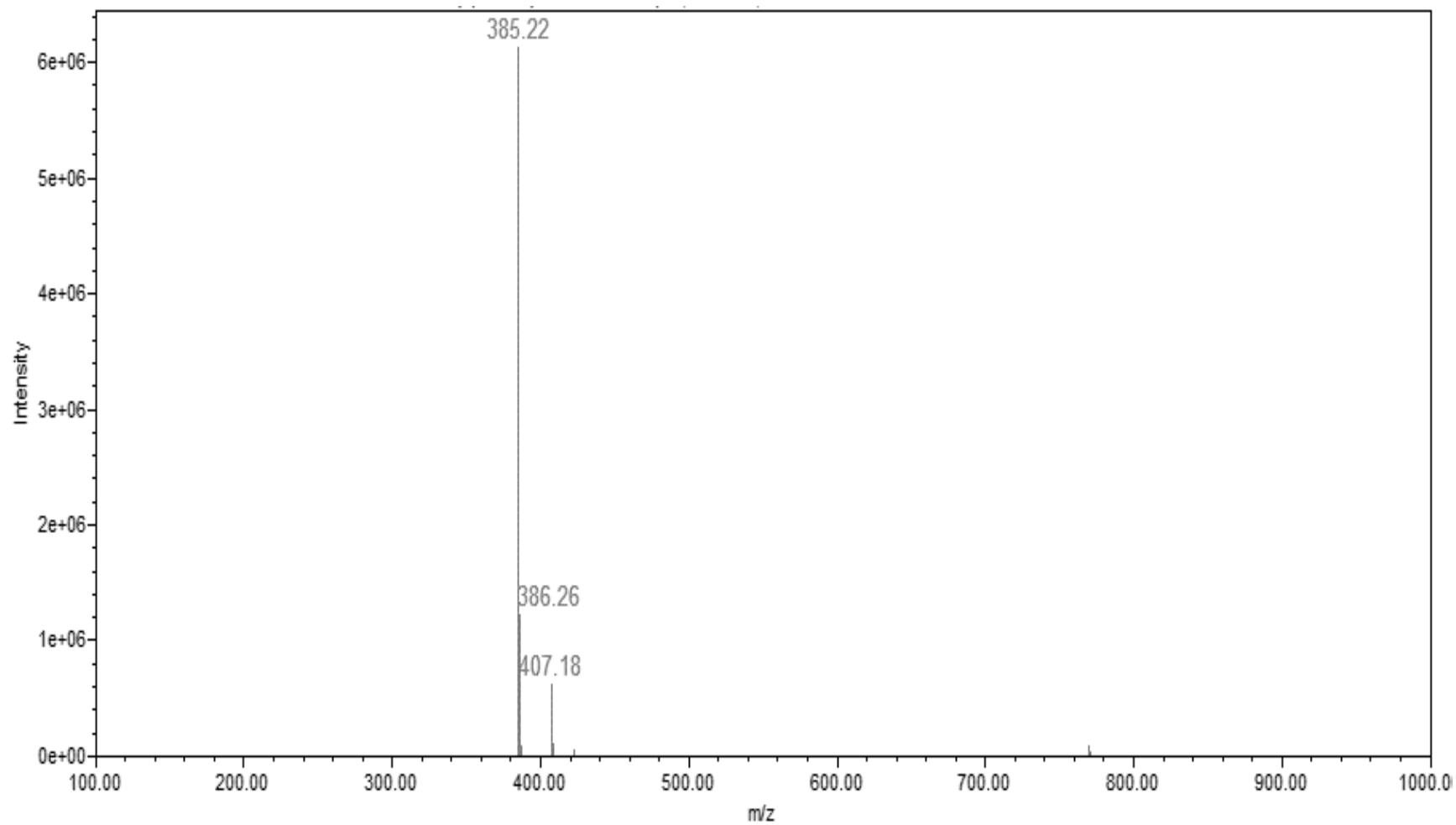
Figura 70 - Espectro de RMN de ^1H de **54** (CDCl_3 , 300 MHz).



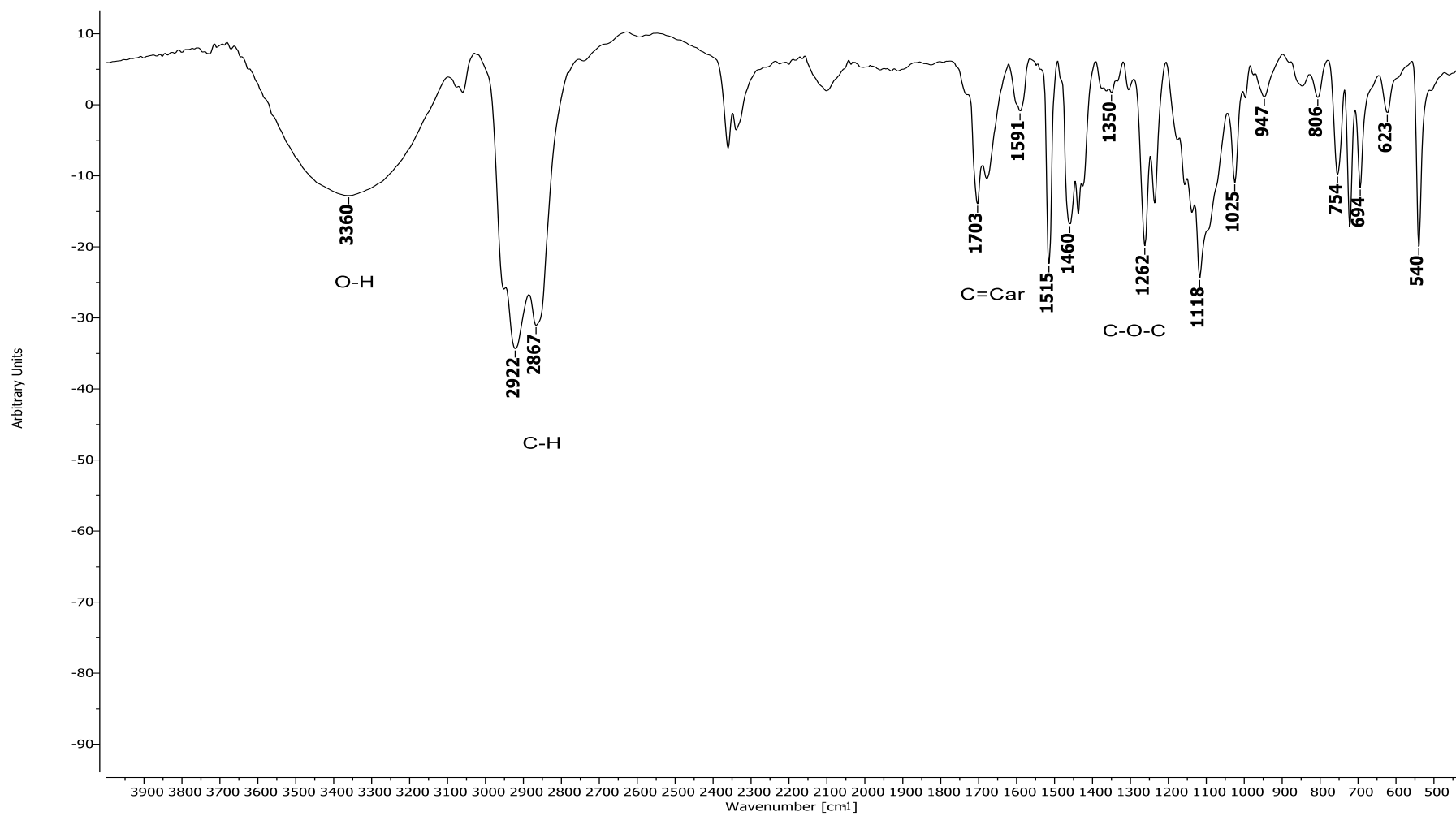
Fonte: Do autor.

Figura 71 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **54** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

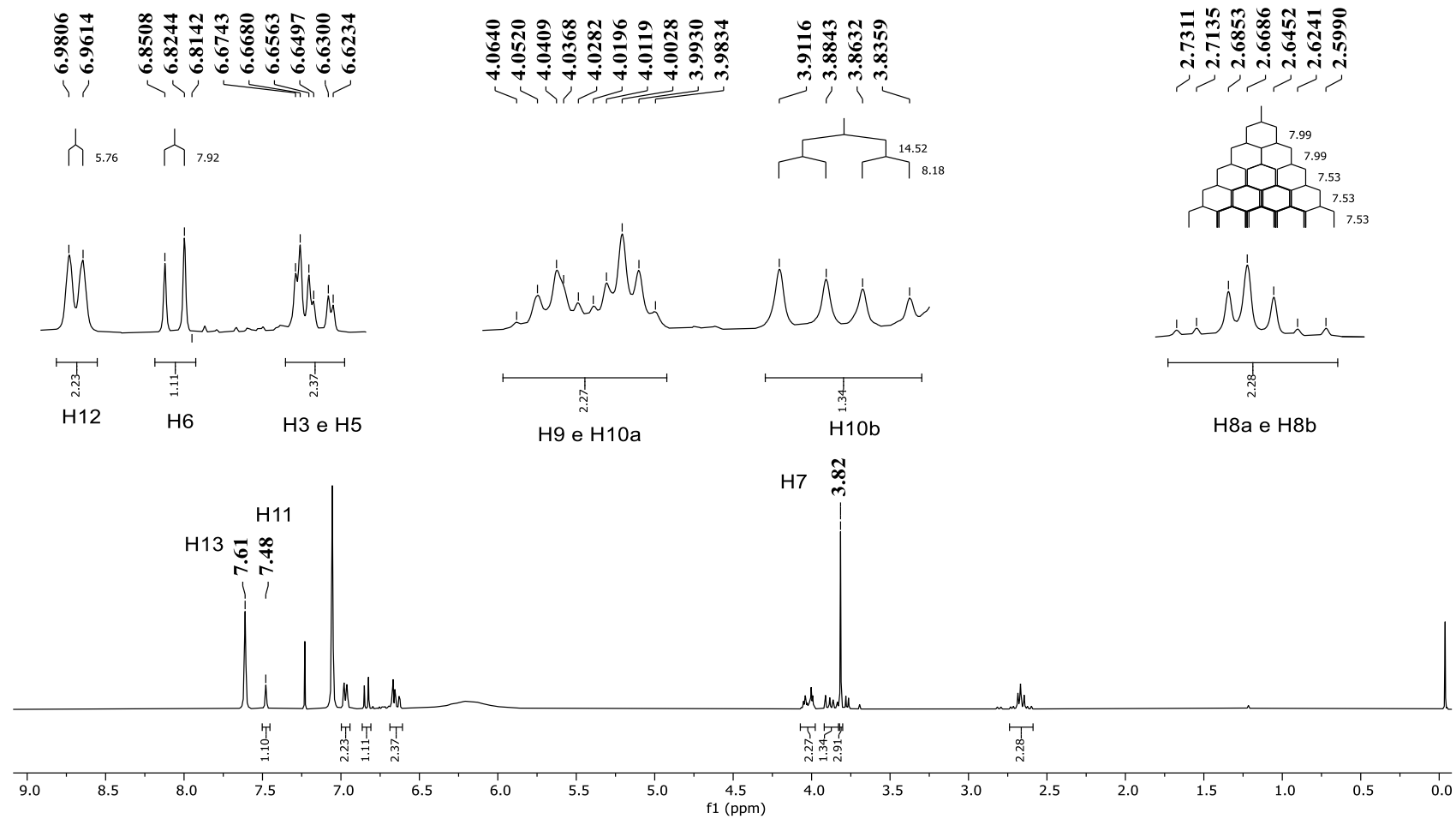
Figura 72 - Espectro de EM de **54**.

Fonte: Do autor.

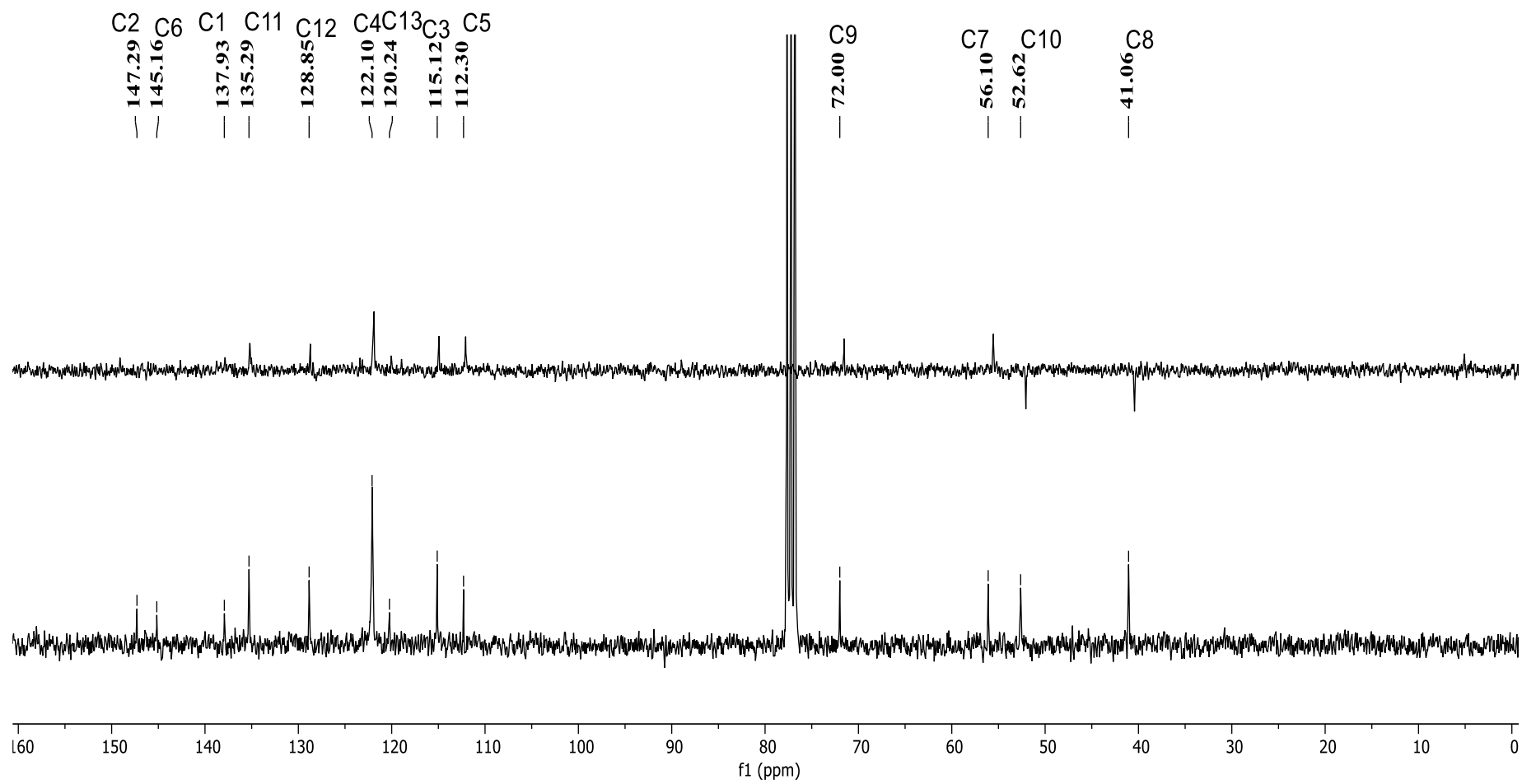
Figura 73 - Espectro de absorção na região do IV de **55**.

Fonte: Do autor.

Figura 74 - Espectro de RMN de ^1H de **55** (CDCl_3 , 300 MHz).

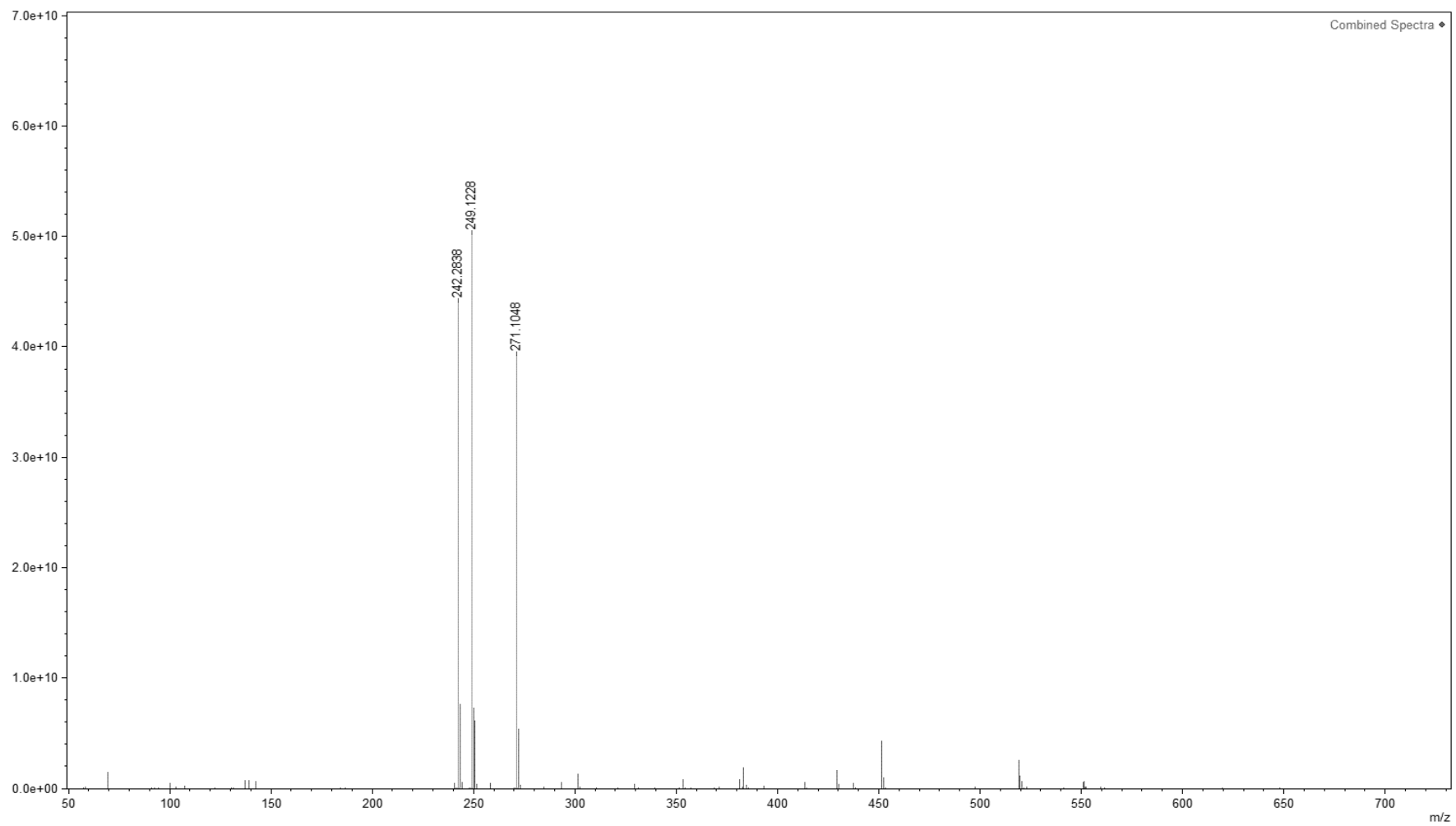


Fonte: Do autor.

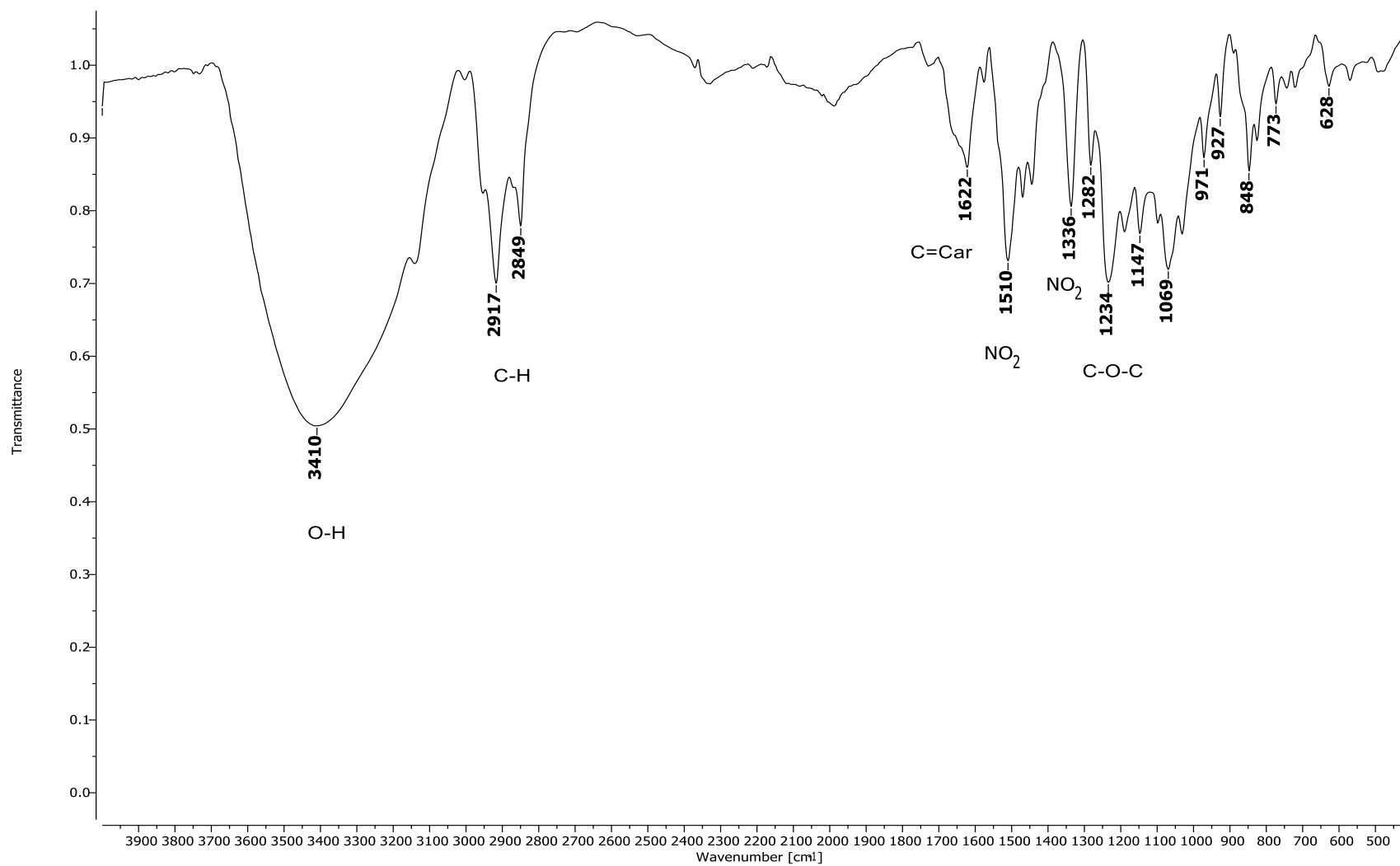
Figura 75 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **55** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

Figura 76 - Espectro de EM de 55.

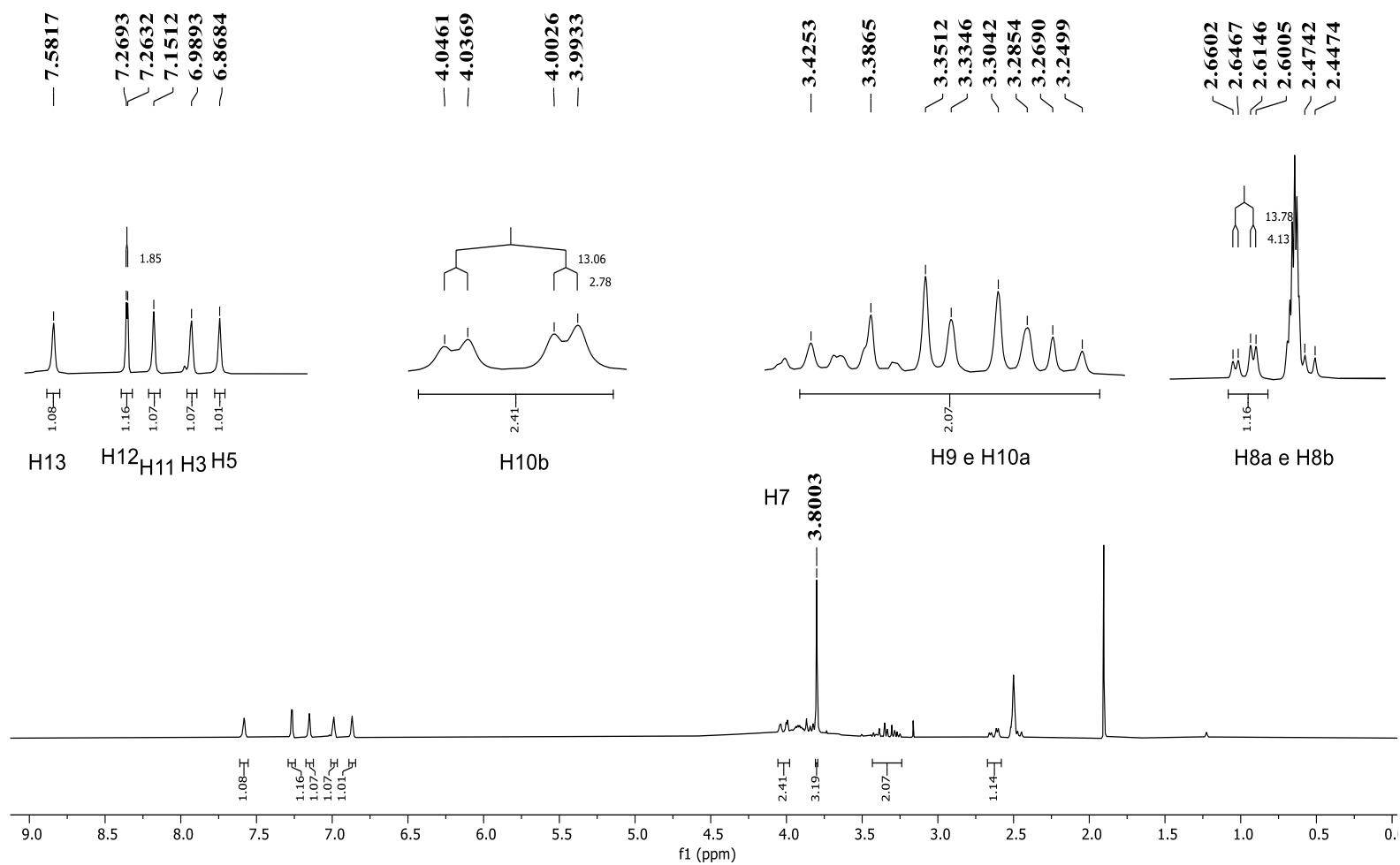


Fonte: Do autor.

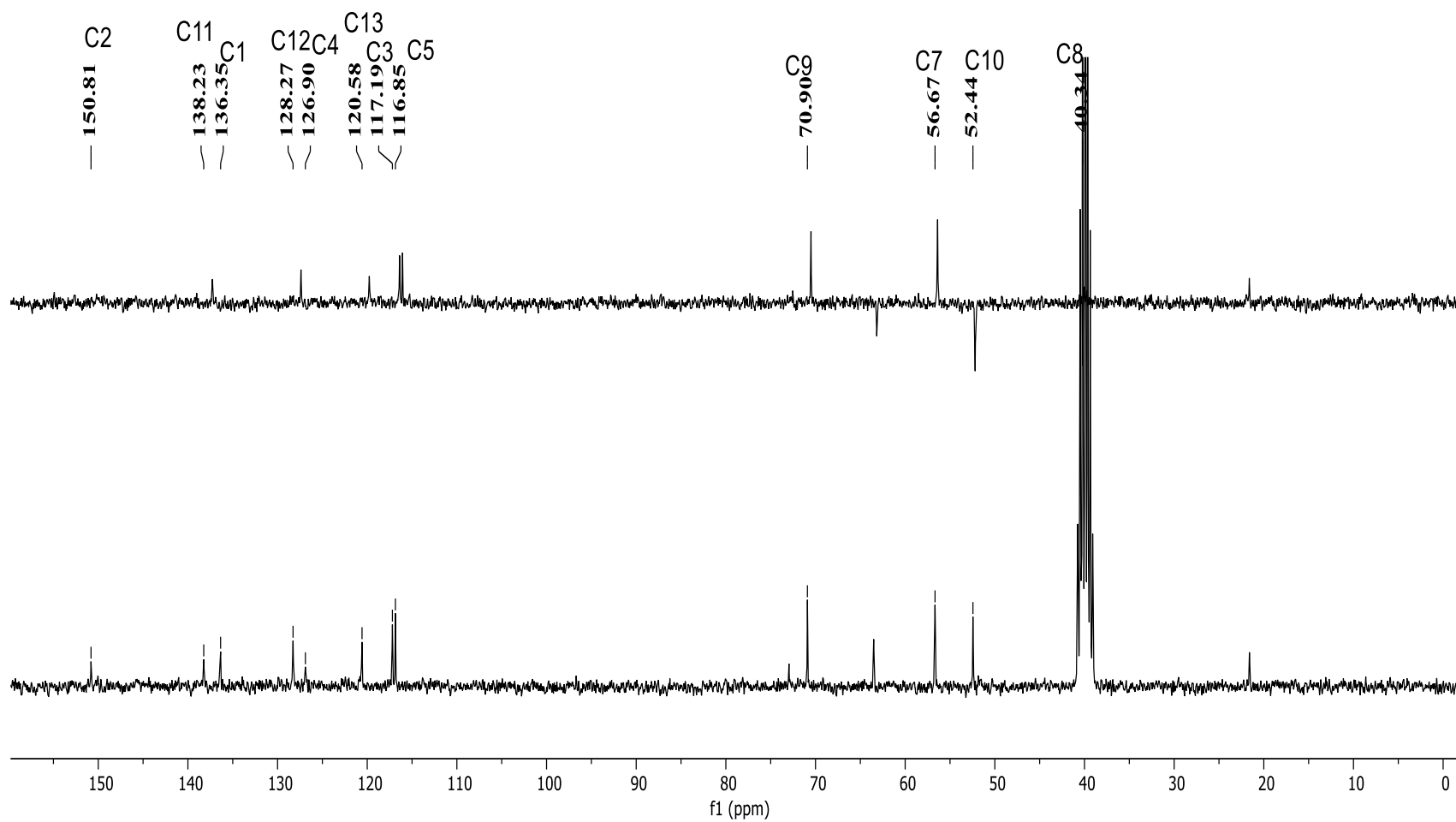
Figura 77 - Espectro de absorção na região do IV de **56**.

Fonte: Do autor.

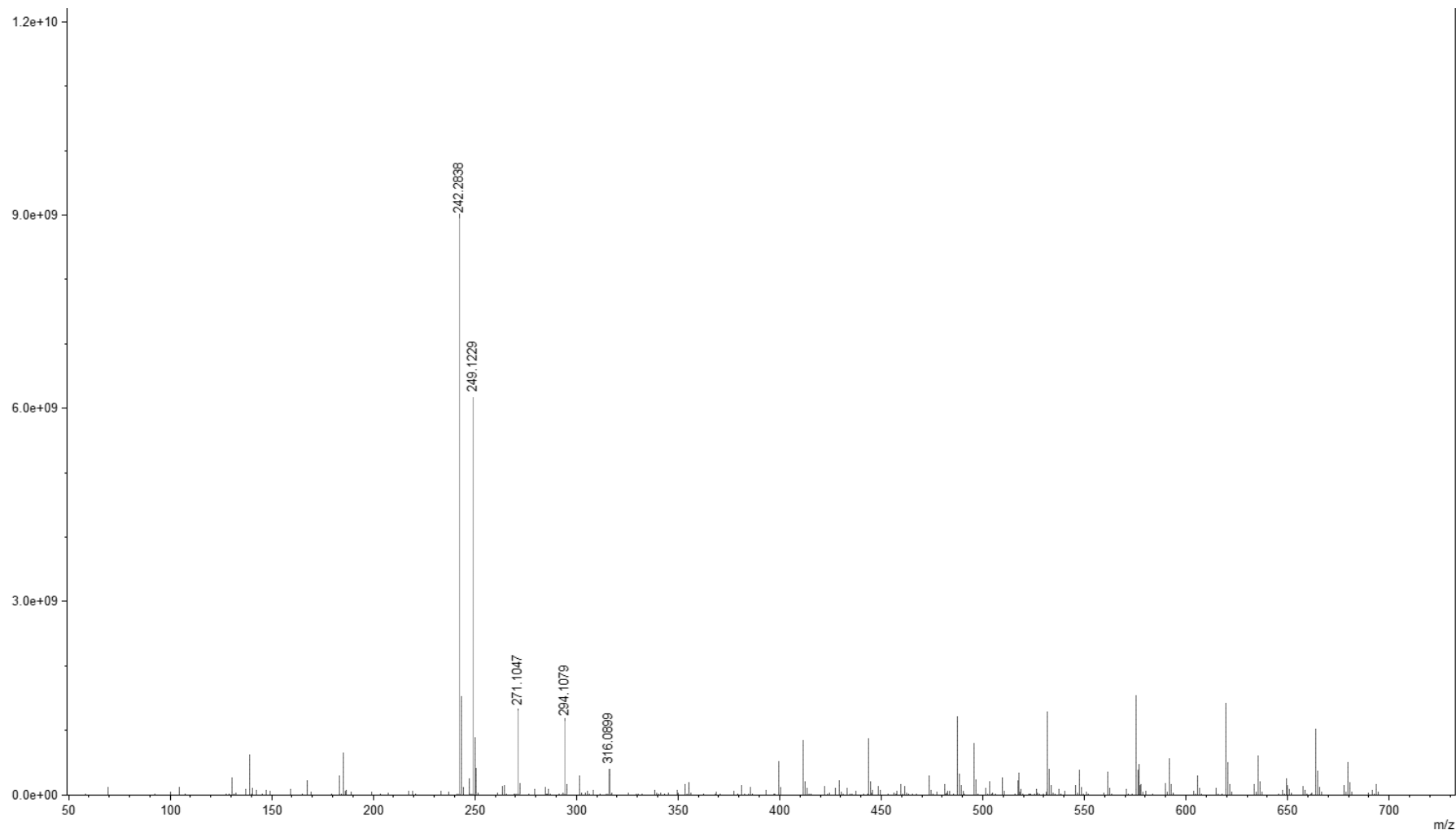
Figura 78 - Espectro de RMN de ^1H de **56** (CDCl_3 , 300 MHz).



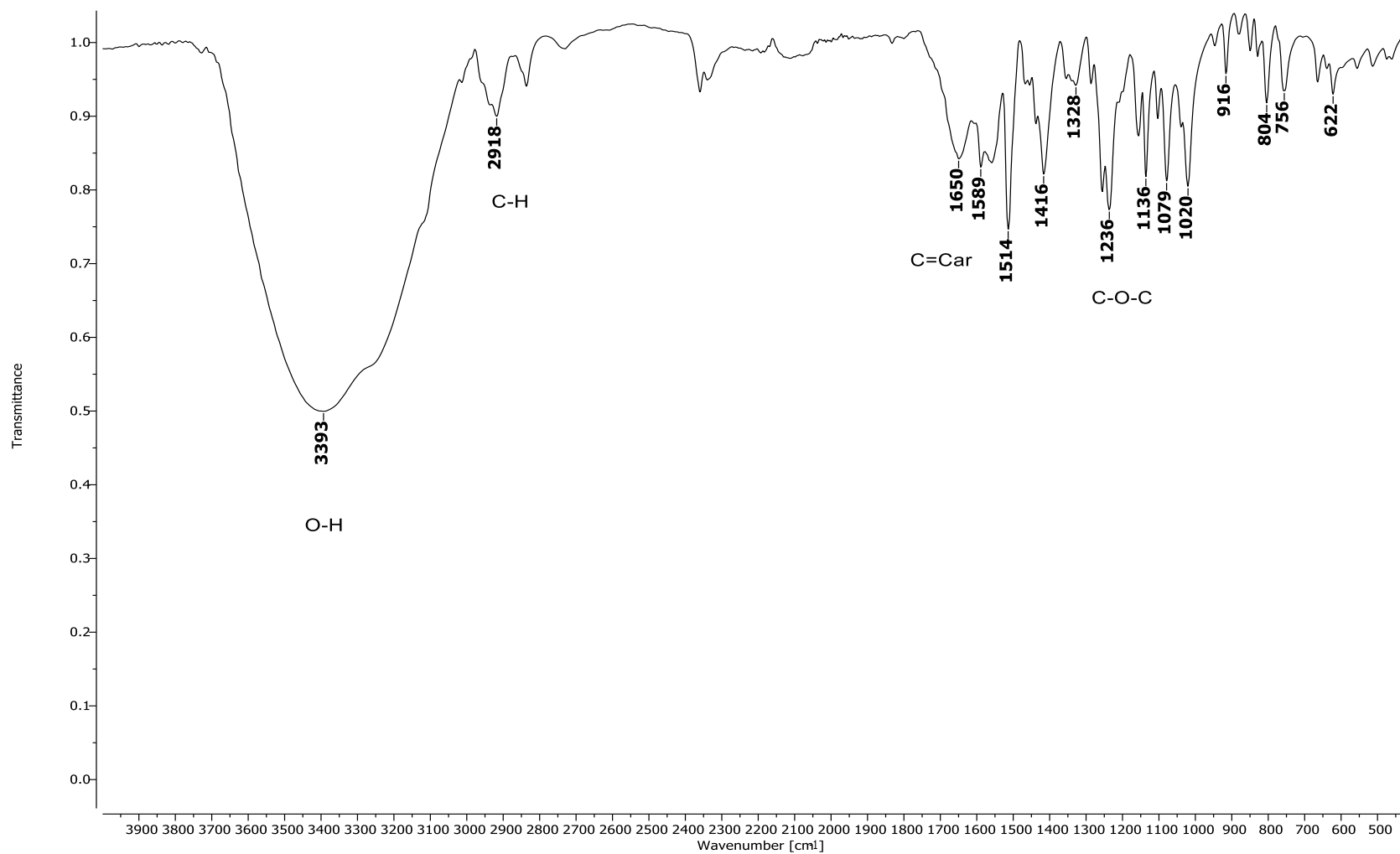
Fonte: Do autor.

Figura 79 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **56** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

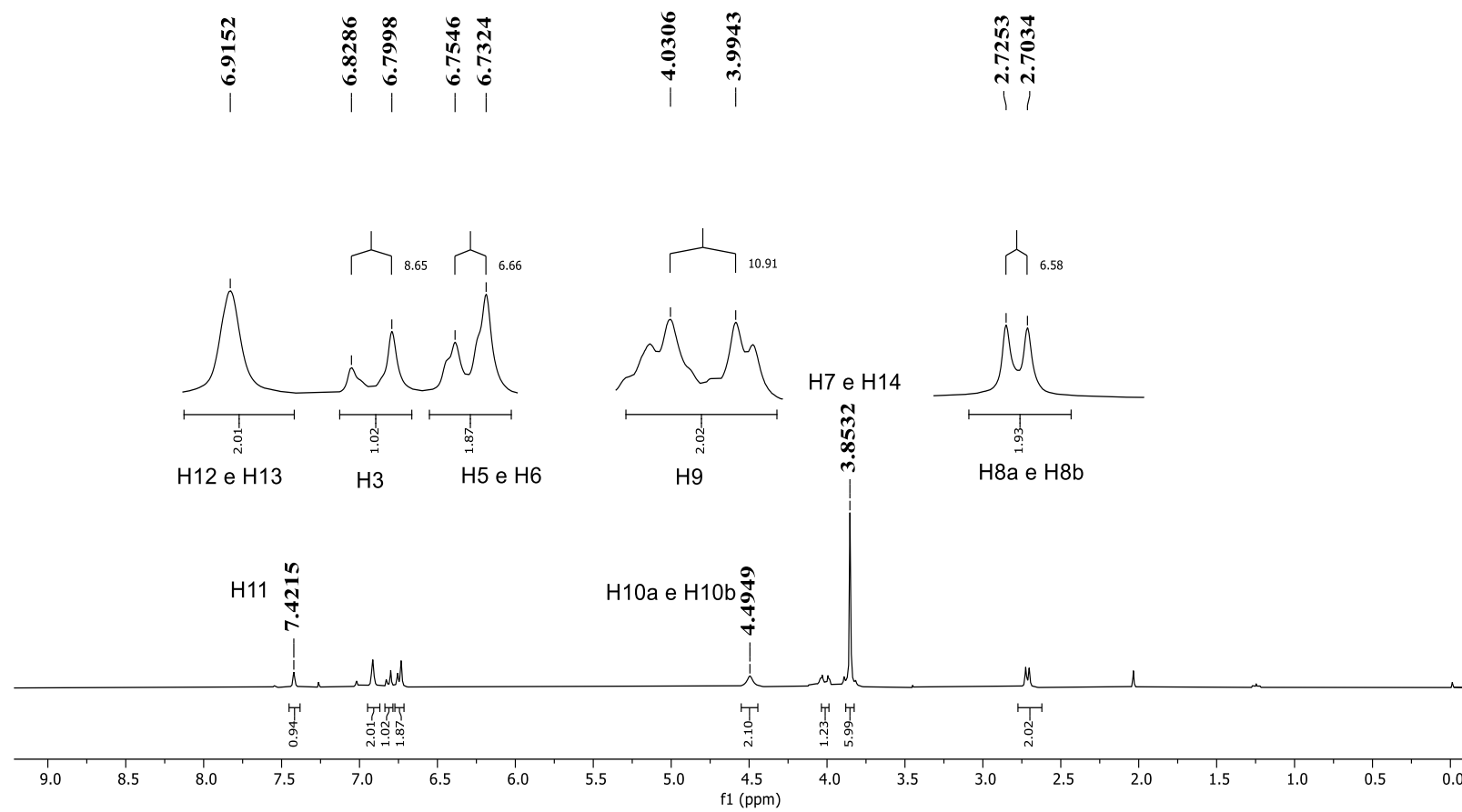
Figura 80 - Espectro de EM de **56**.

Fonte: Do autor.

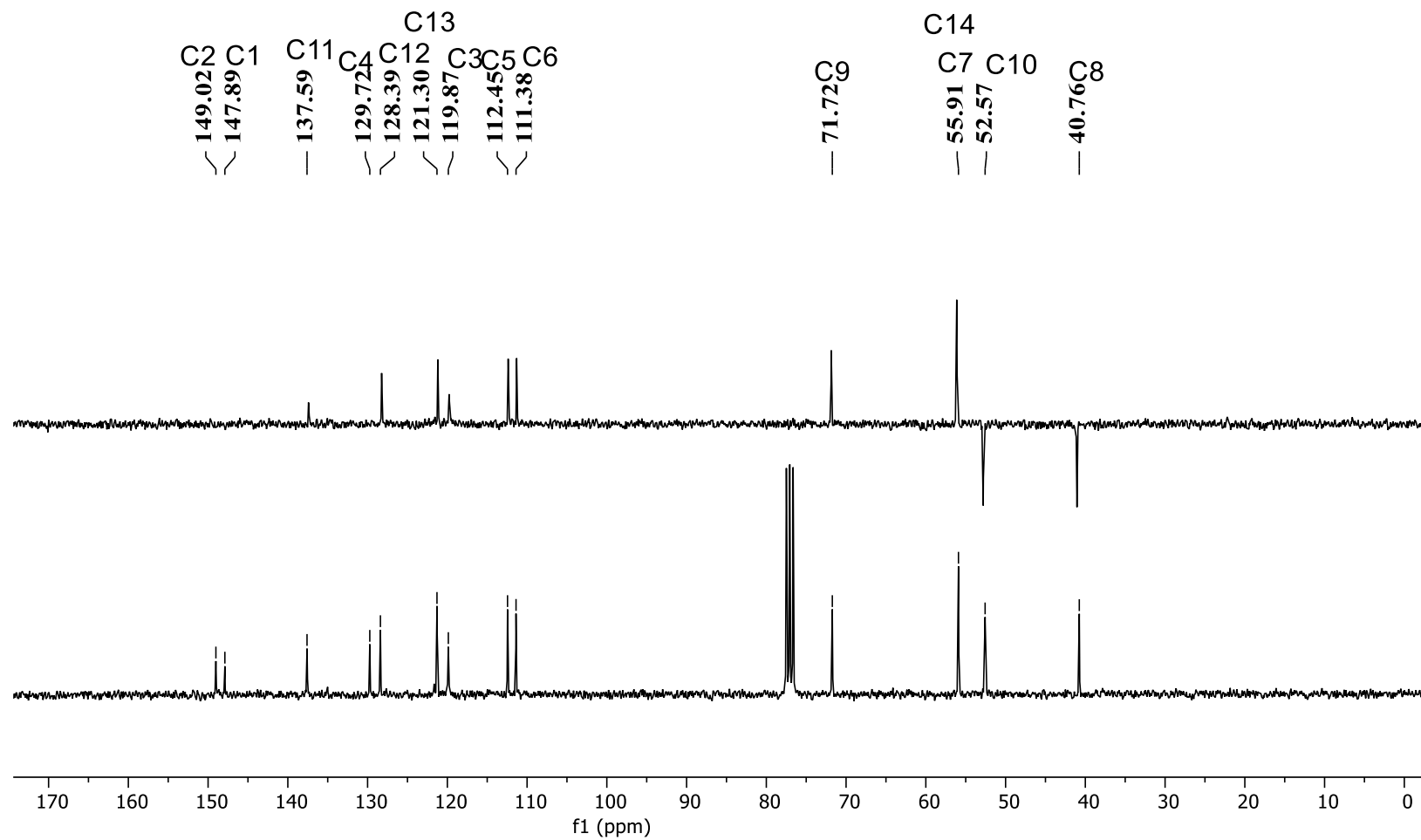
Figura 81 - Espectro de absorção na região do IV de **57**.

Fonte: Do autor.

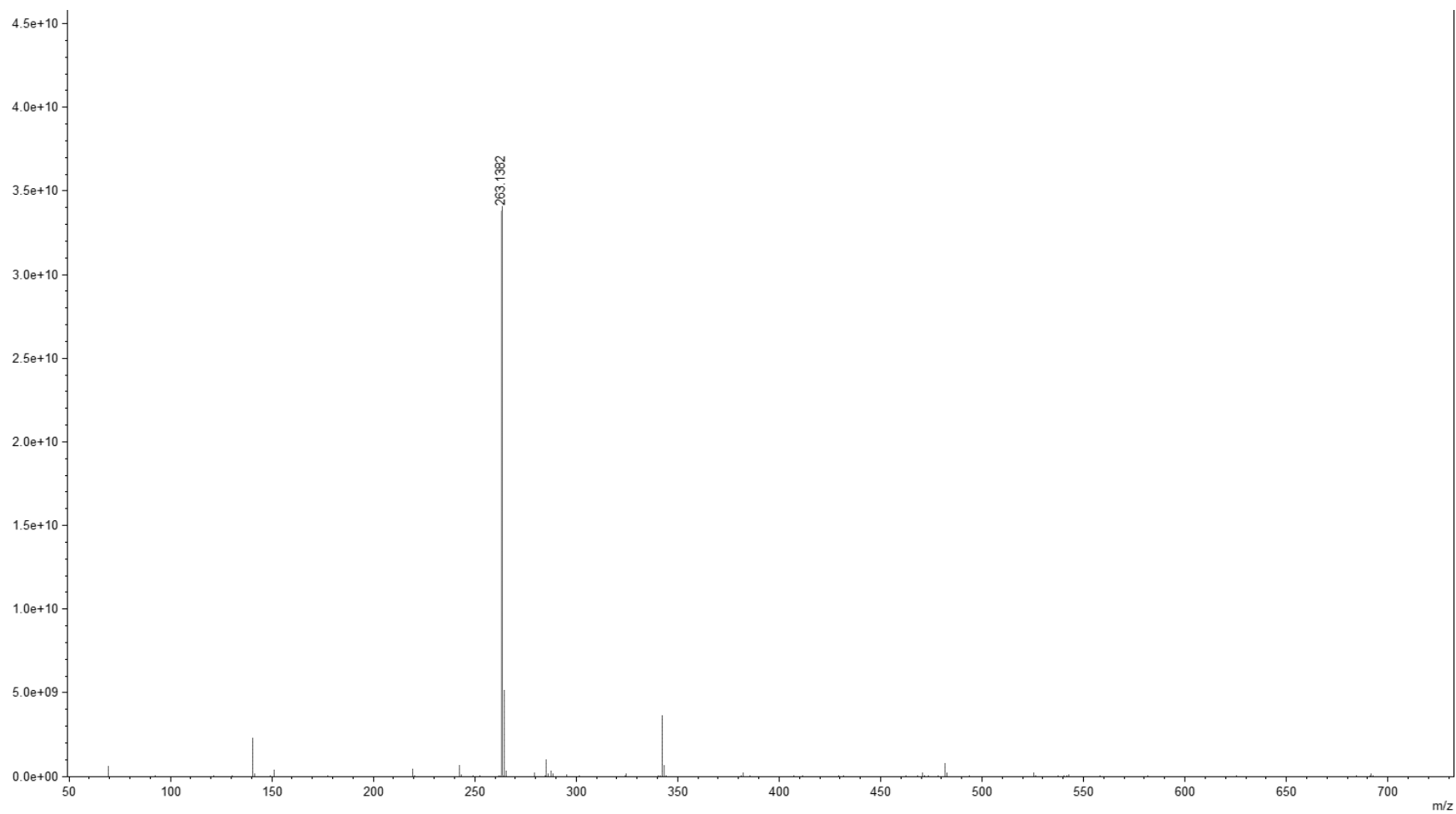
Figura 82 - Espectro de RMN de ^1H de **57** (CDCl_3 , 300 MHz).



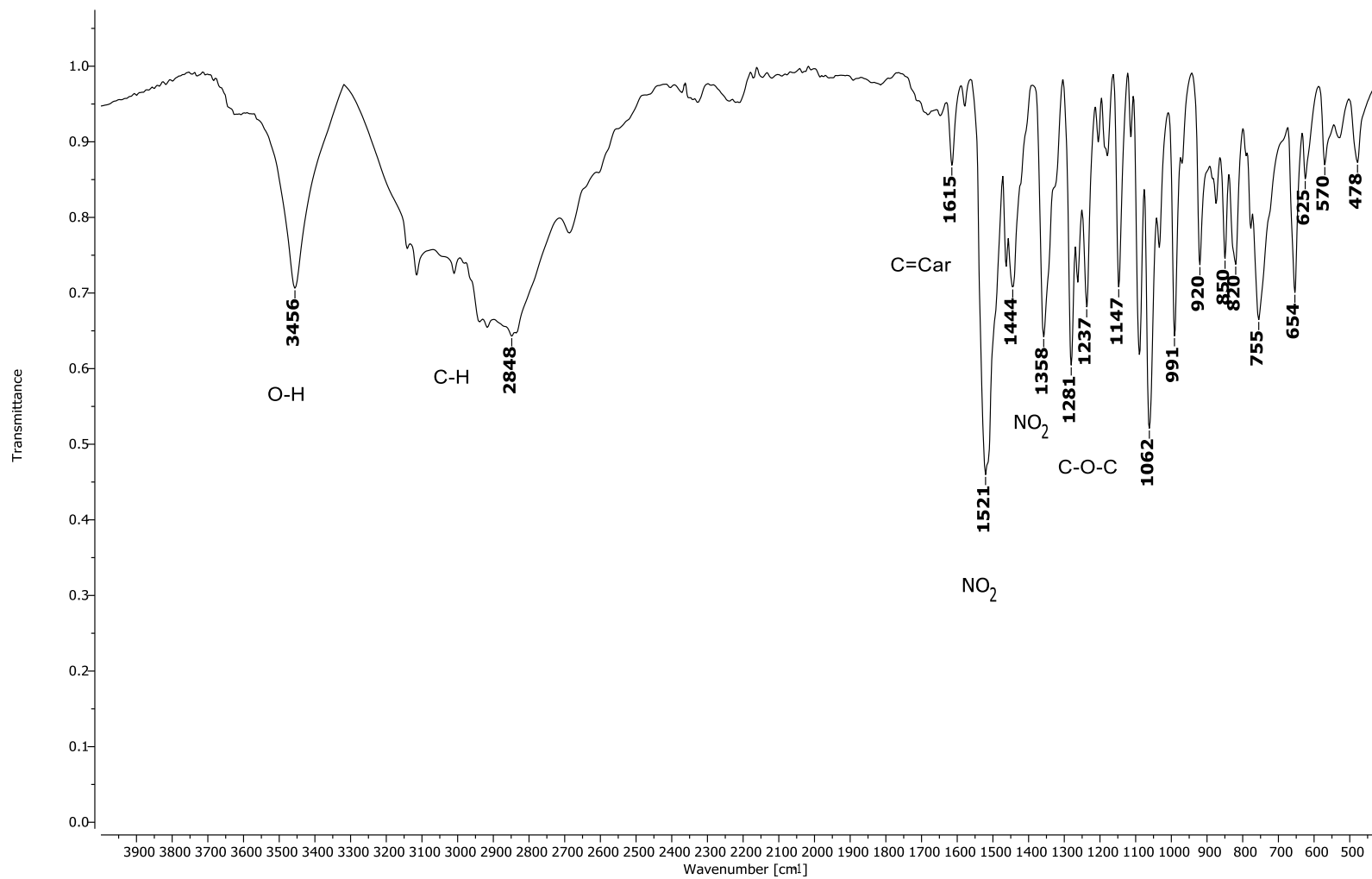
Fonte: Do autor.

Figura 83 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **57** (CDCl_3 , 75 MHz).

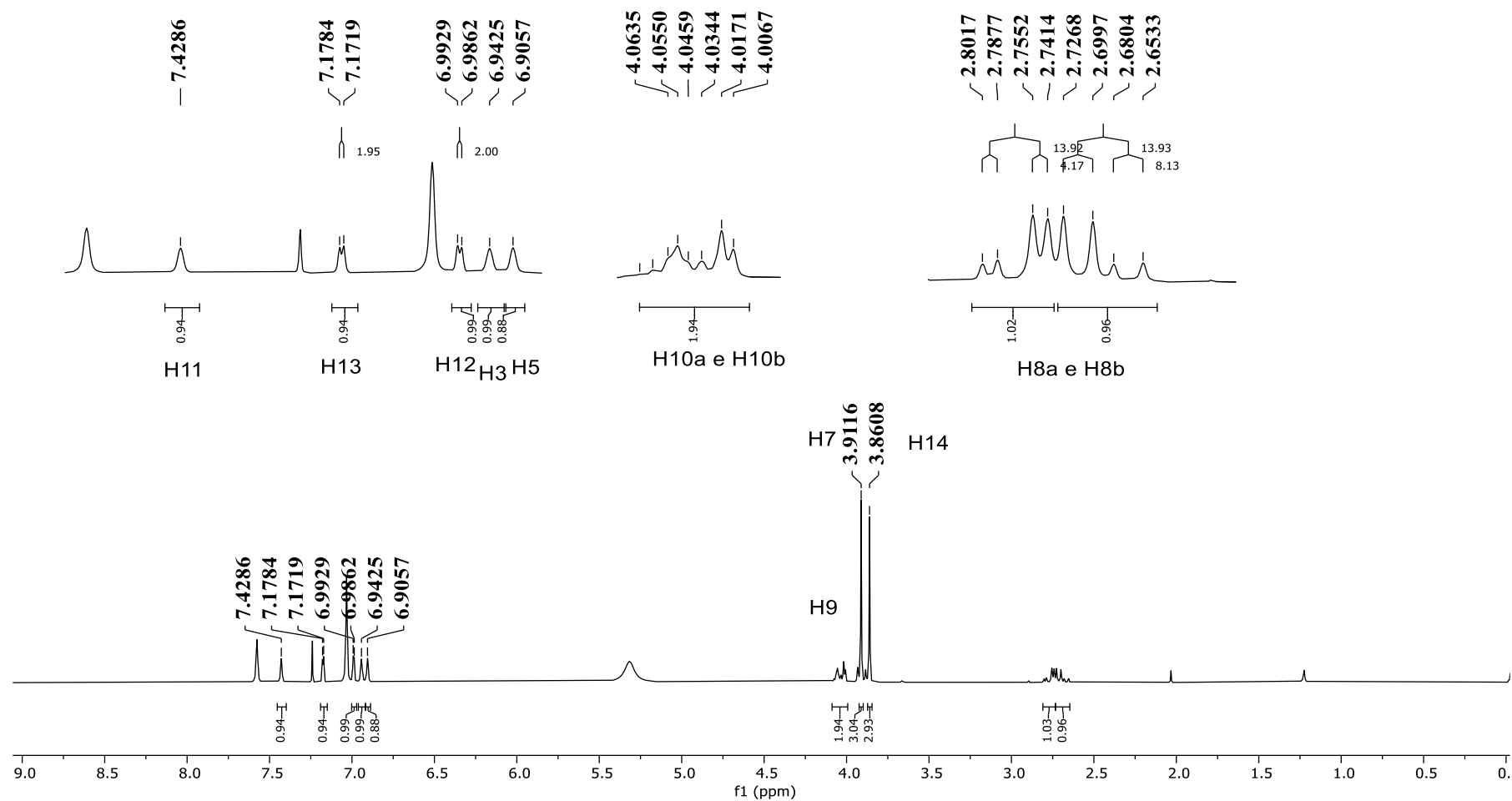
Fonte: Do autor.

Figura 84 - Espectro de EM de **57**.

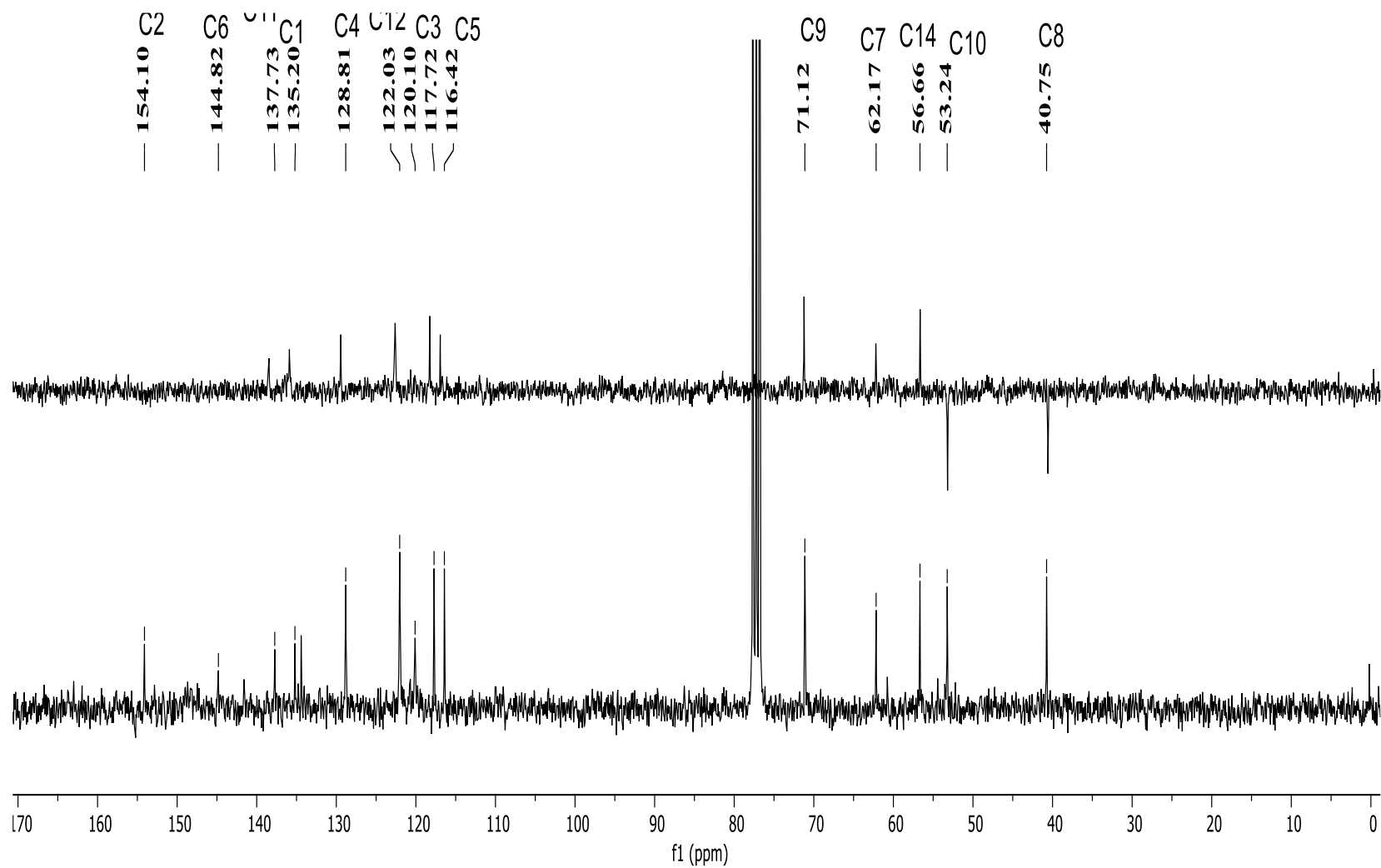
Fonte: Do autor.

Figura 85 - Espectro de absorção na região do IV de **58**.

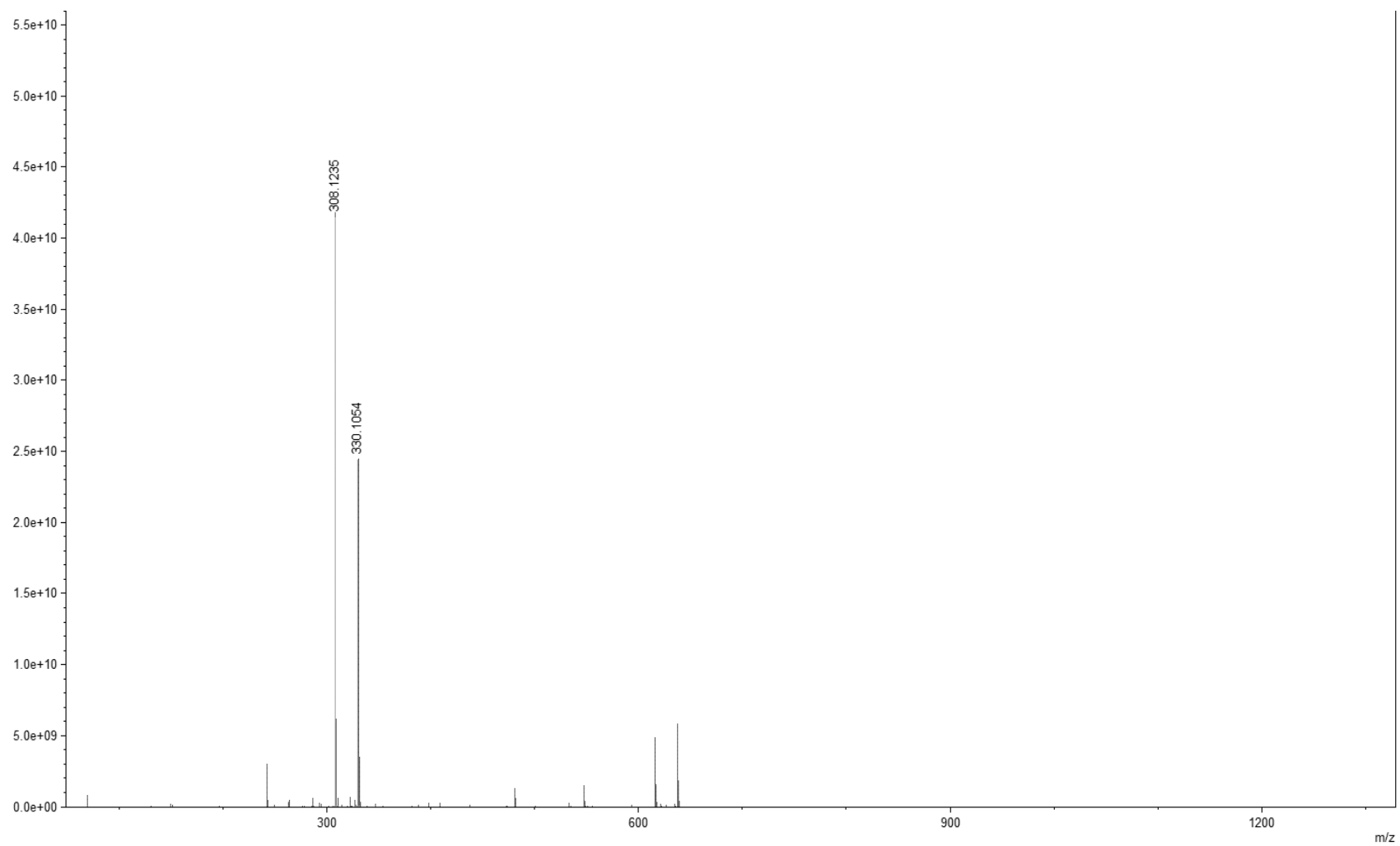
Fonte: Do autor.

Figura 86 - Espectro de RMN de ^1H de **58** (CDCl_3 , 300 MHz).

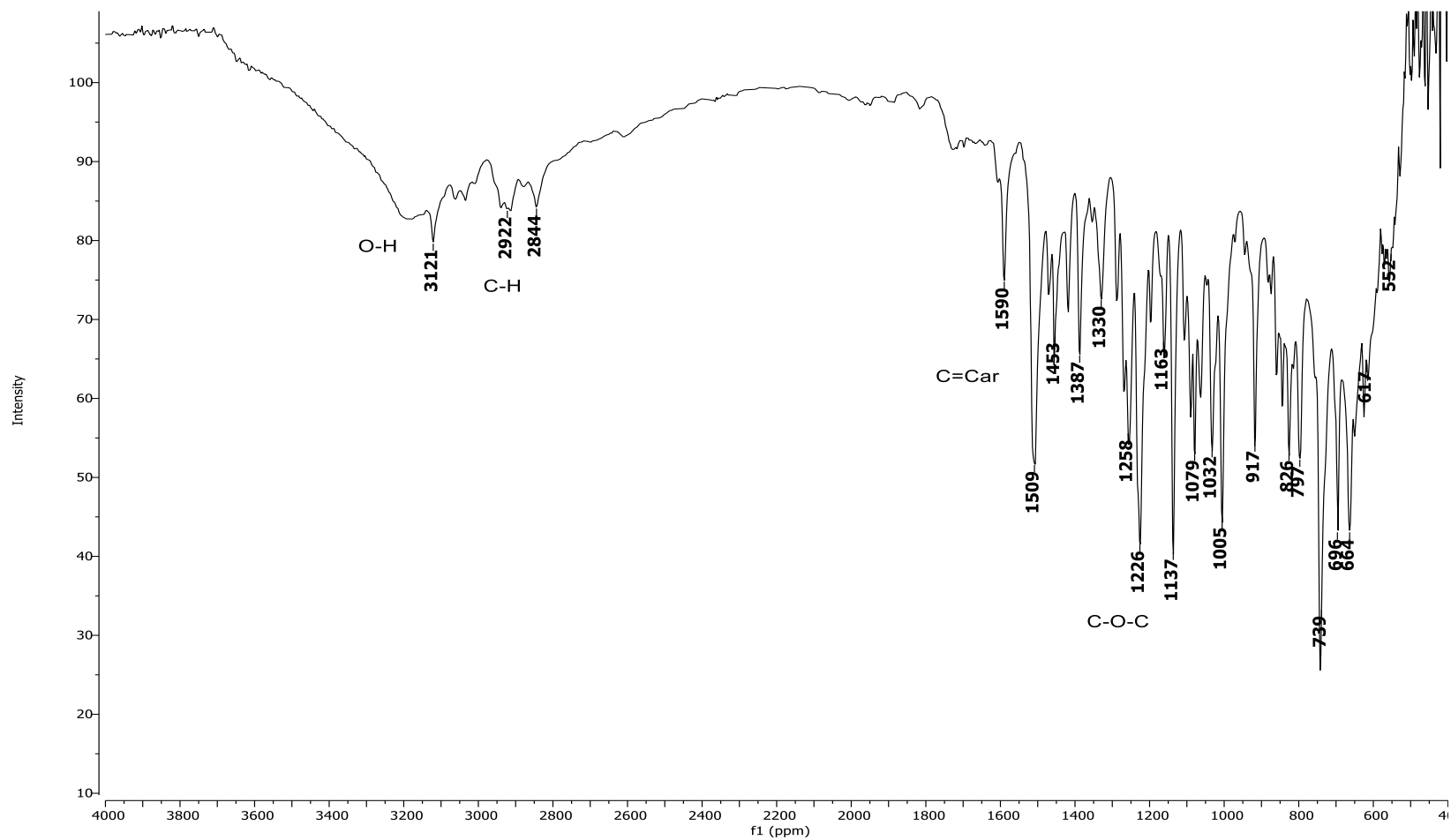
Fonte: Do autor.

Figura 87 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **58** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

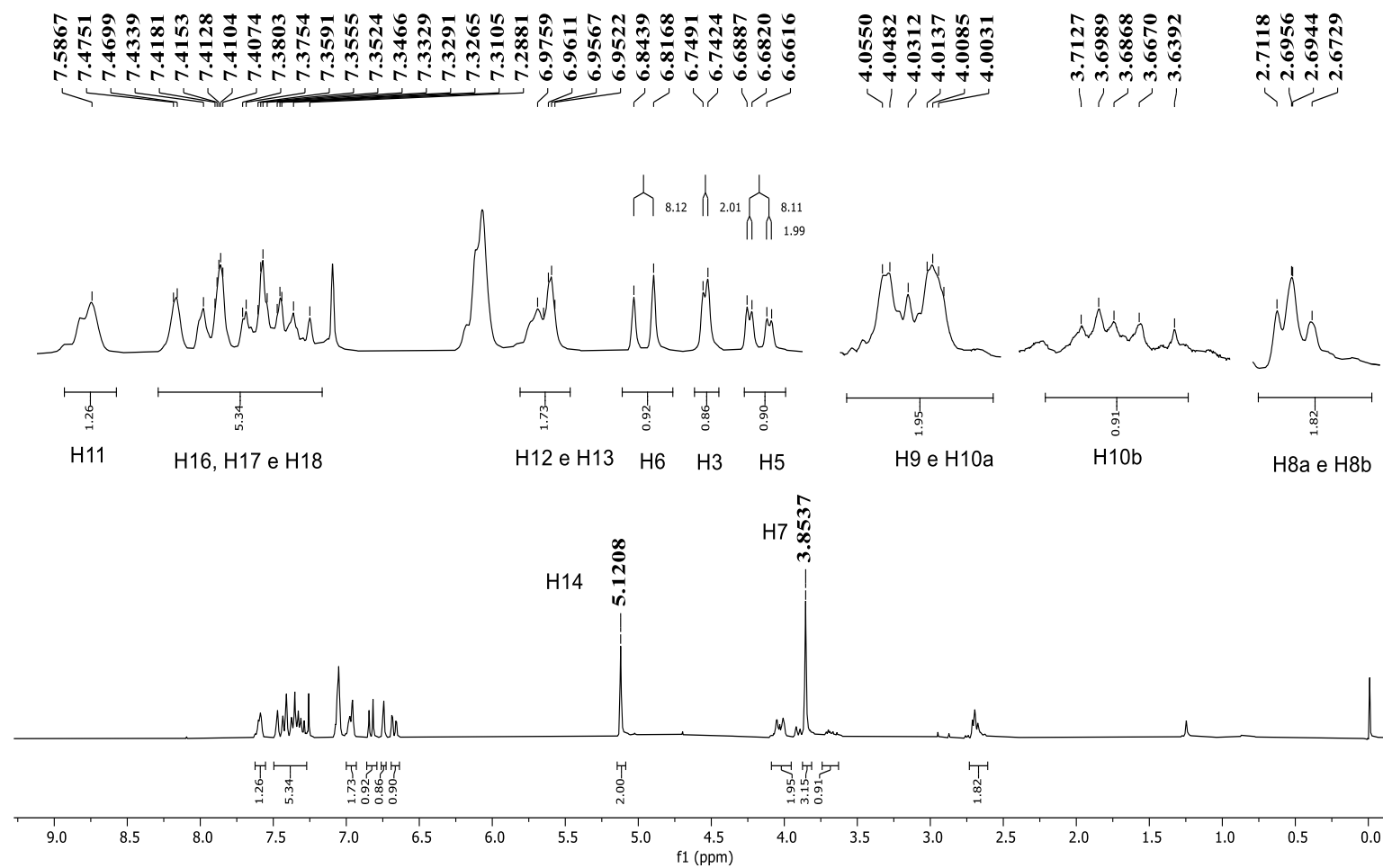
Figura 88 - Espectro de EM de **58**

Fonte: Do autor.

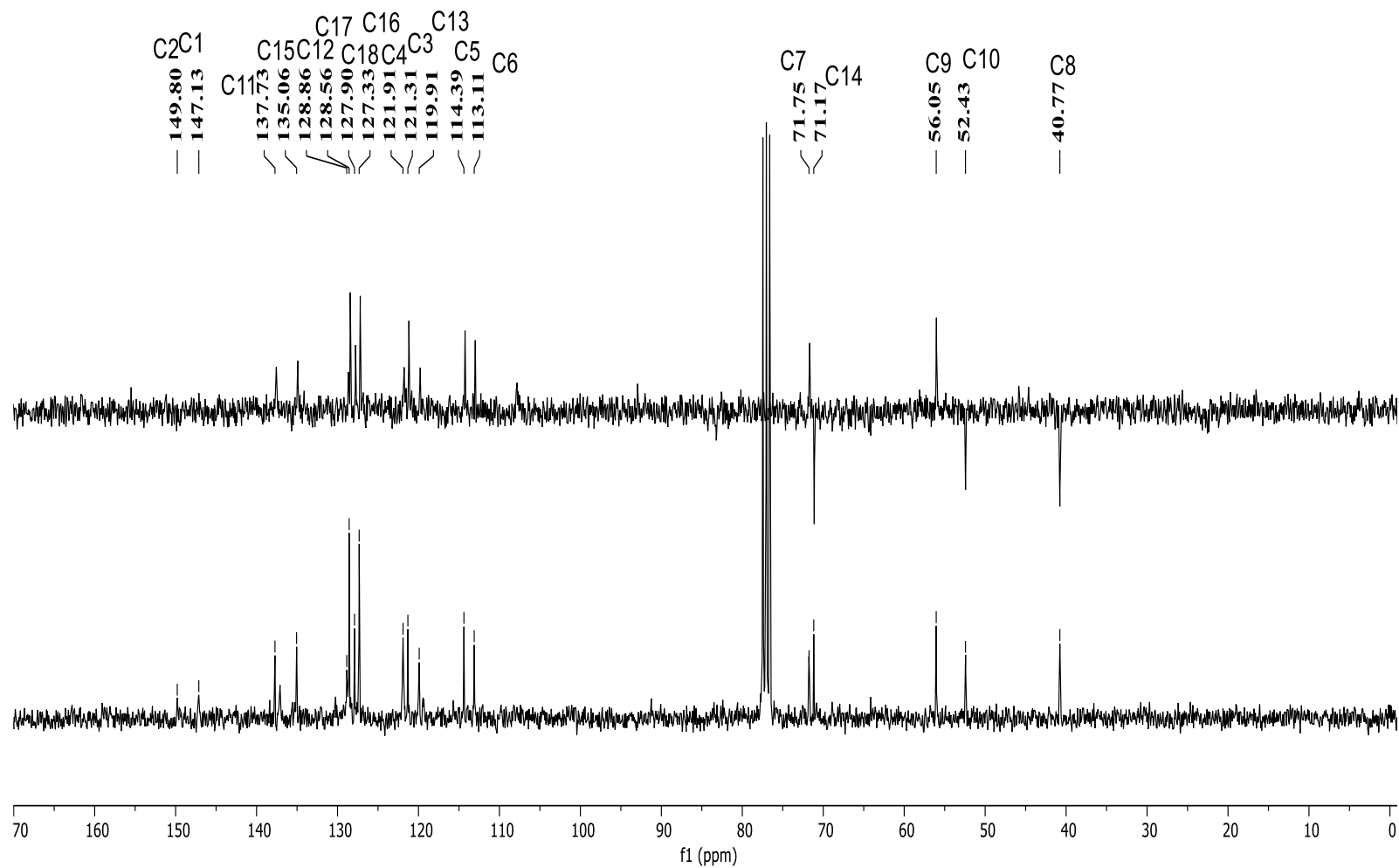
Figura 89 - Espectro de absorção na região do IV de **59**.

Fonte: Do autor.

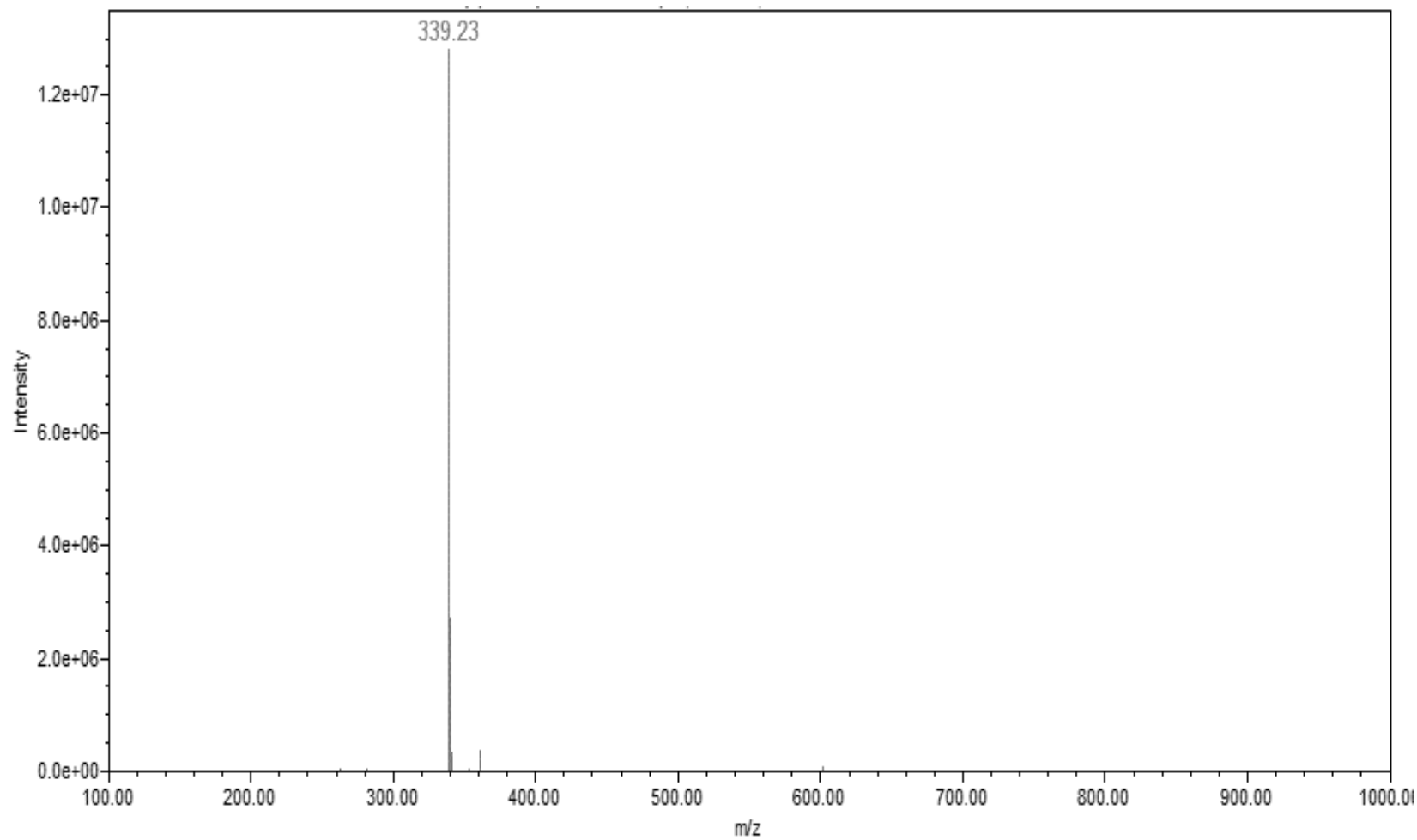
Figura 90 - Espectro de RMN de ^1H de **59** (CDCl_3 , 300 MHz).



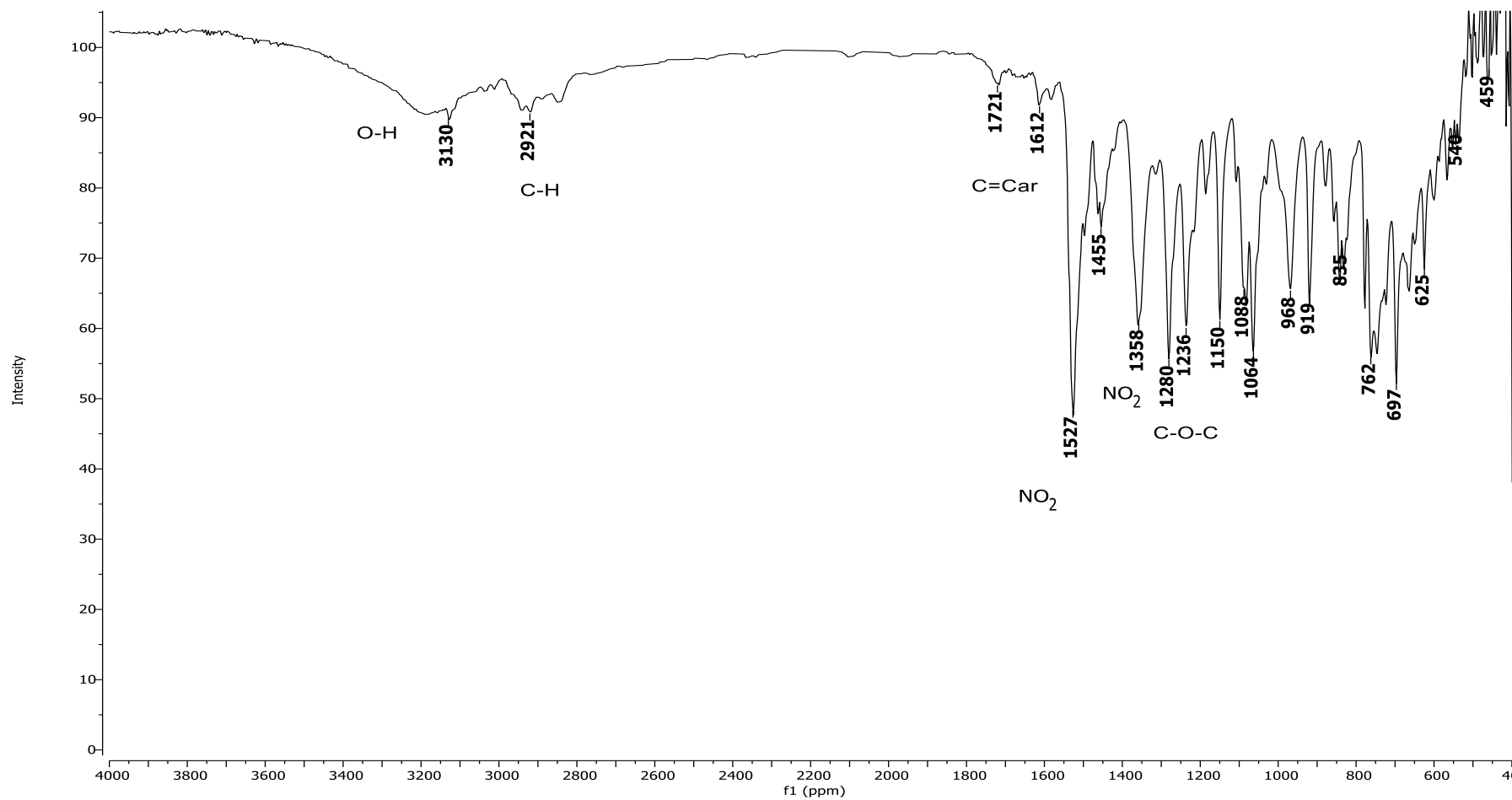
Fonte: Do autor.

Figura 91 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **59** (CDCl_3 , 75 MHz).

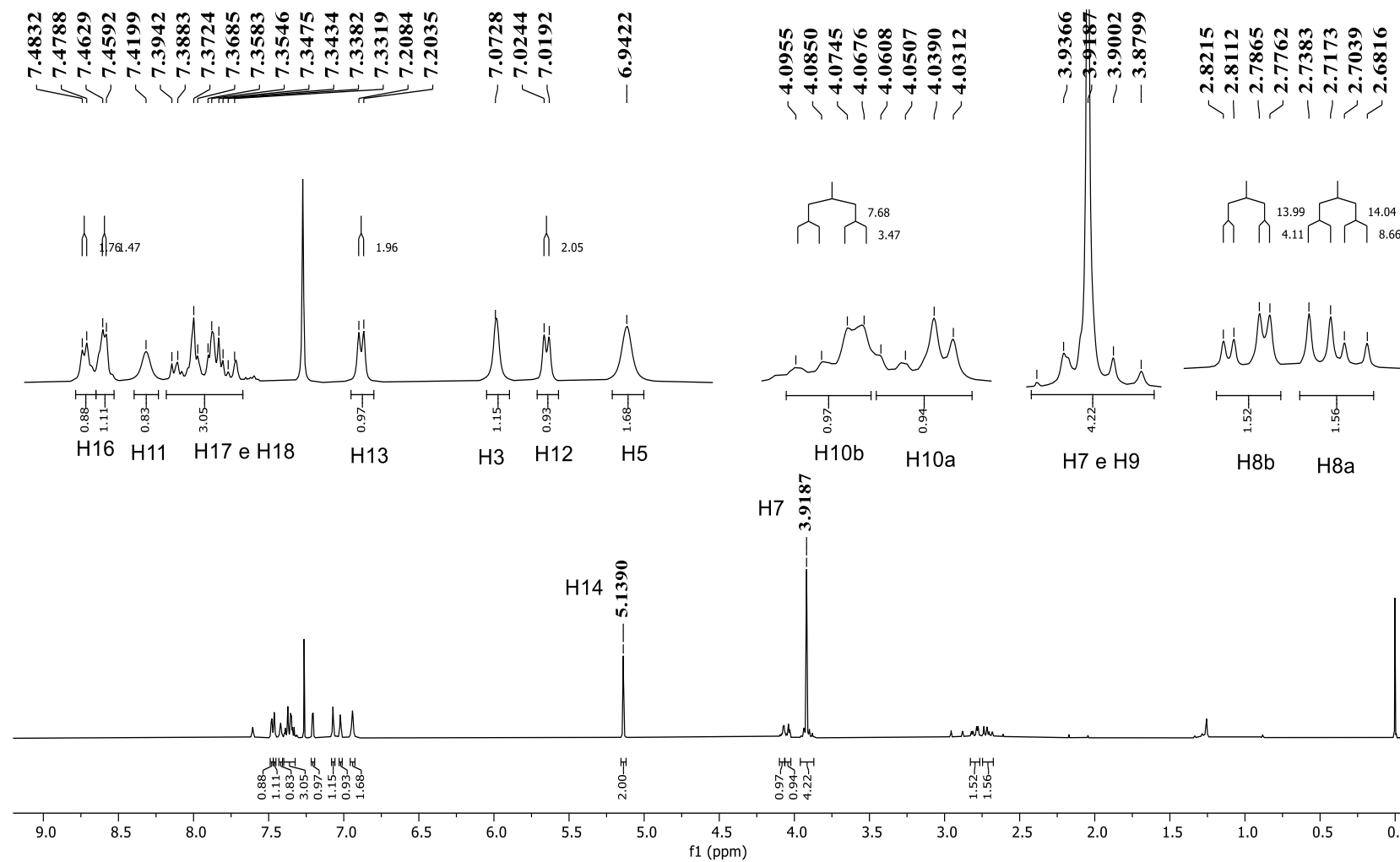
Fonte: Do autor.

Figura 92 - Espectro de EM de **59**.

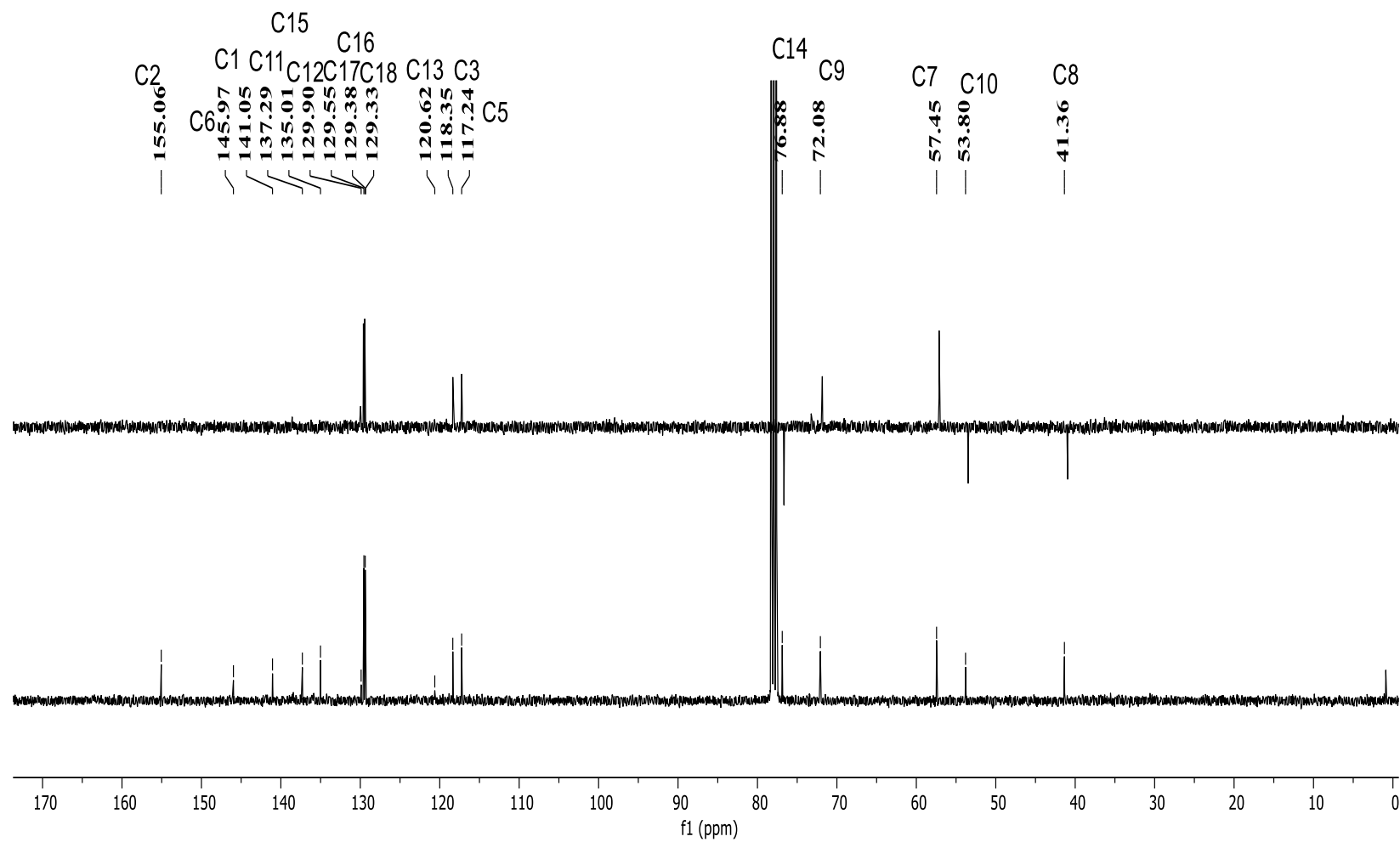
Fonte: Do autor.

Figura 93 - Espectro de absorção na região do IV de **60**.

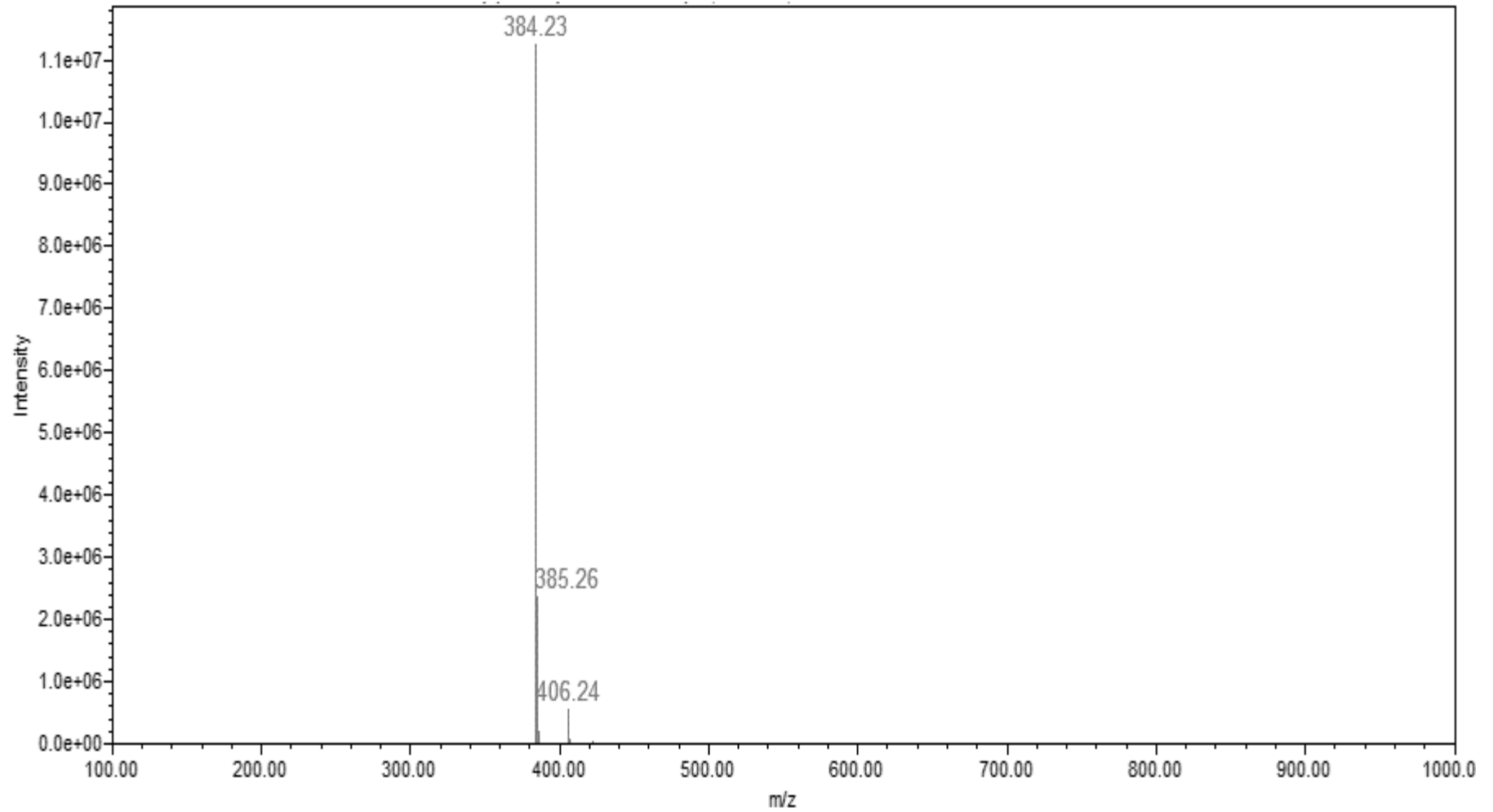
Fonte: Do autor.

Figura 94 - Espectro de RMN de ^1H de **60** (CDCl_3 , 400 MHz).

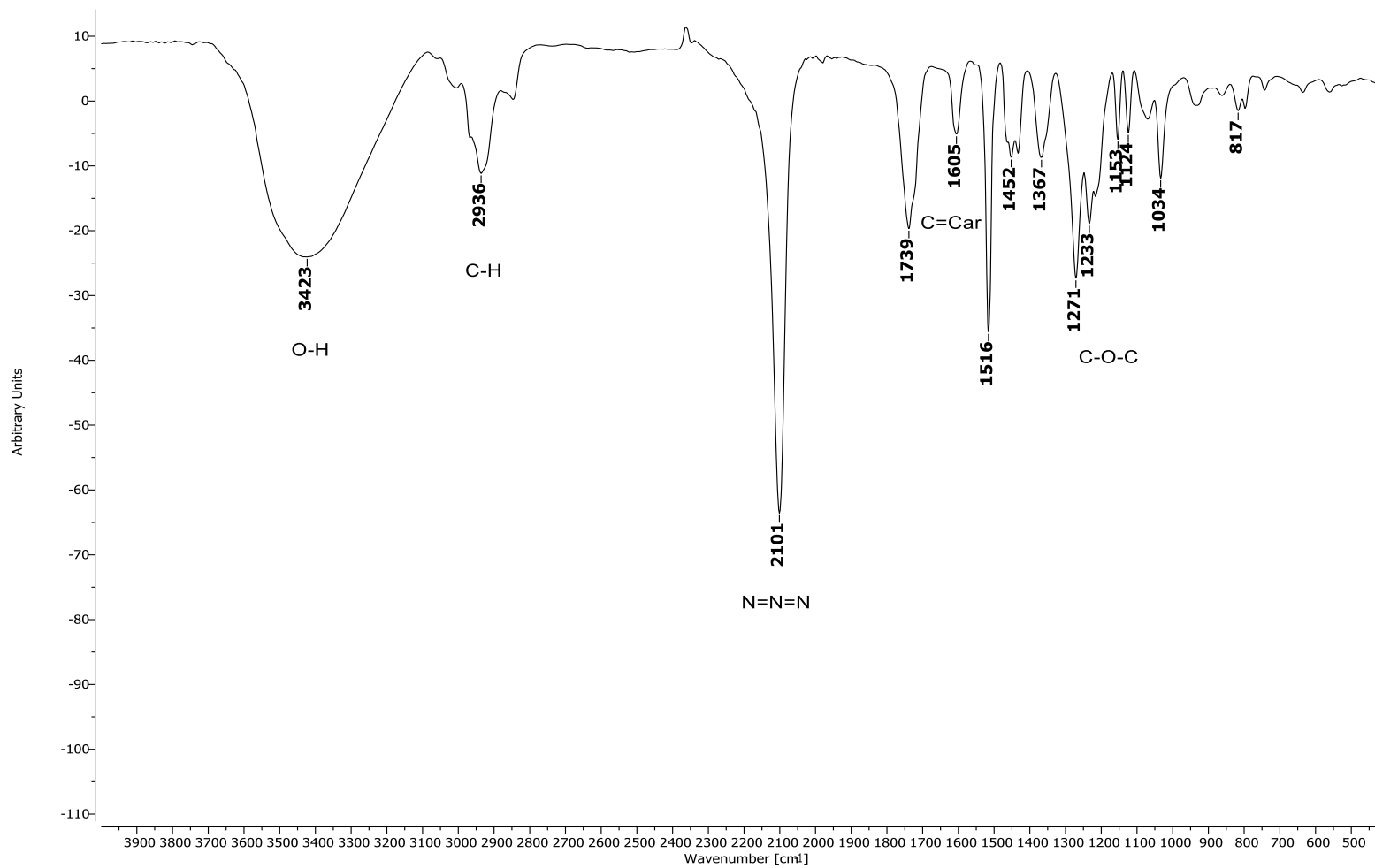
Fonte: Do autor.

Figura 95 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **60** (CDCl_3 , 100 MHz).

Fonte: Do autor.

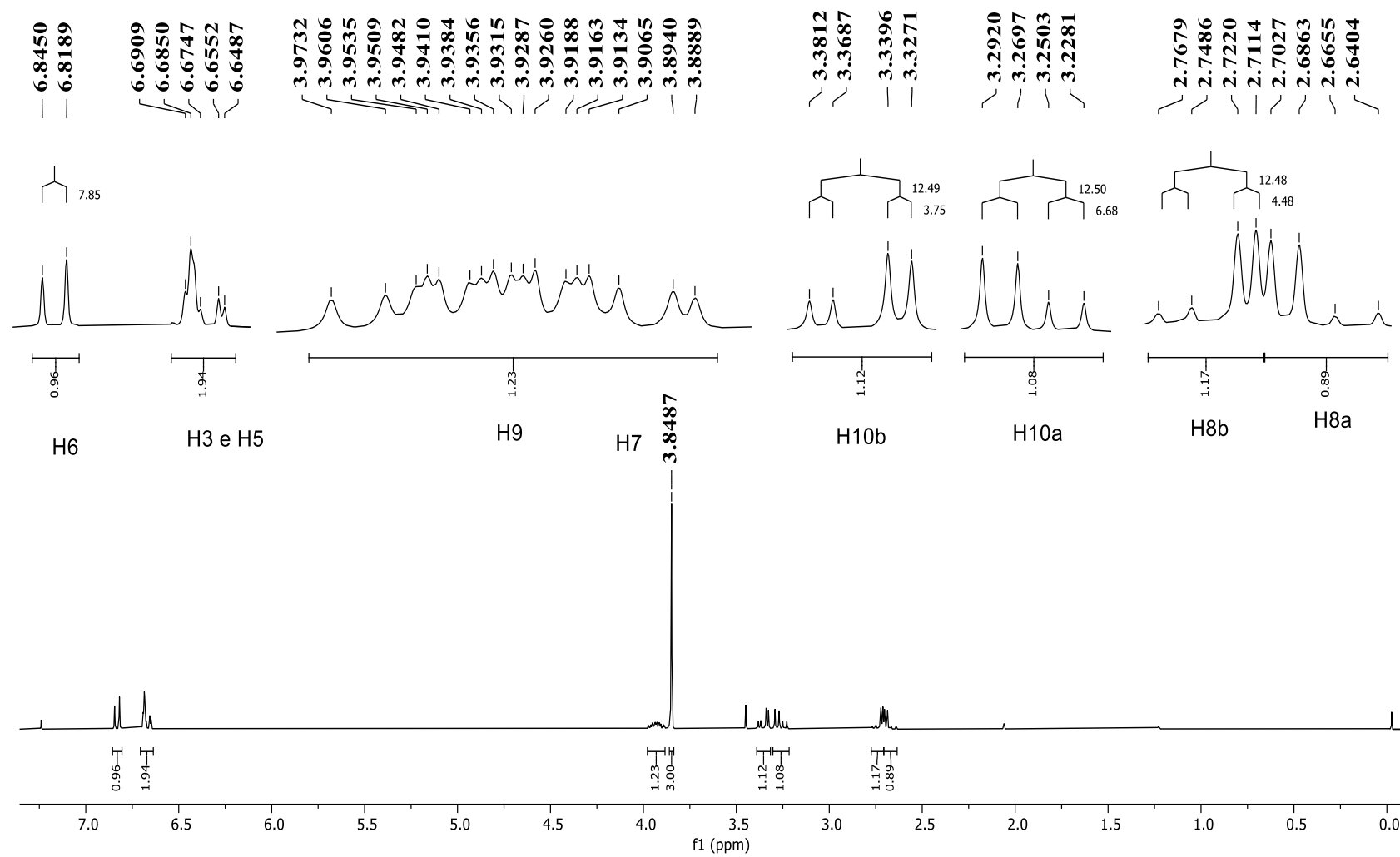
Figura 96 - Espectro de EM de **60**

Fonte: Do autor.

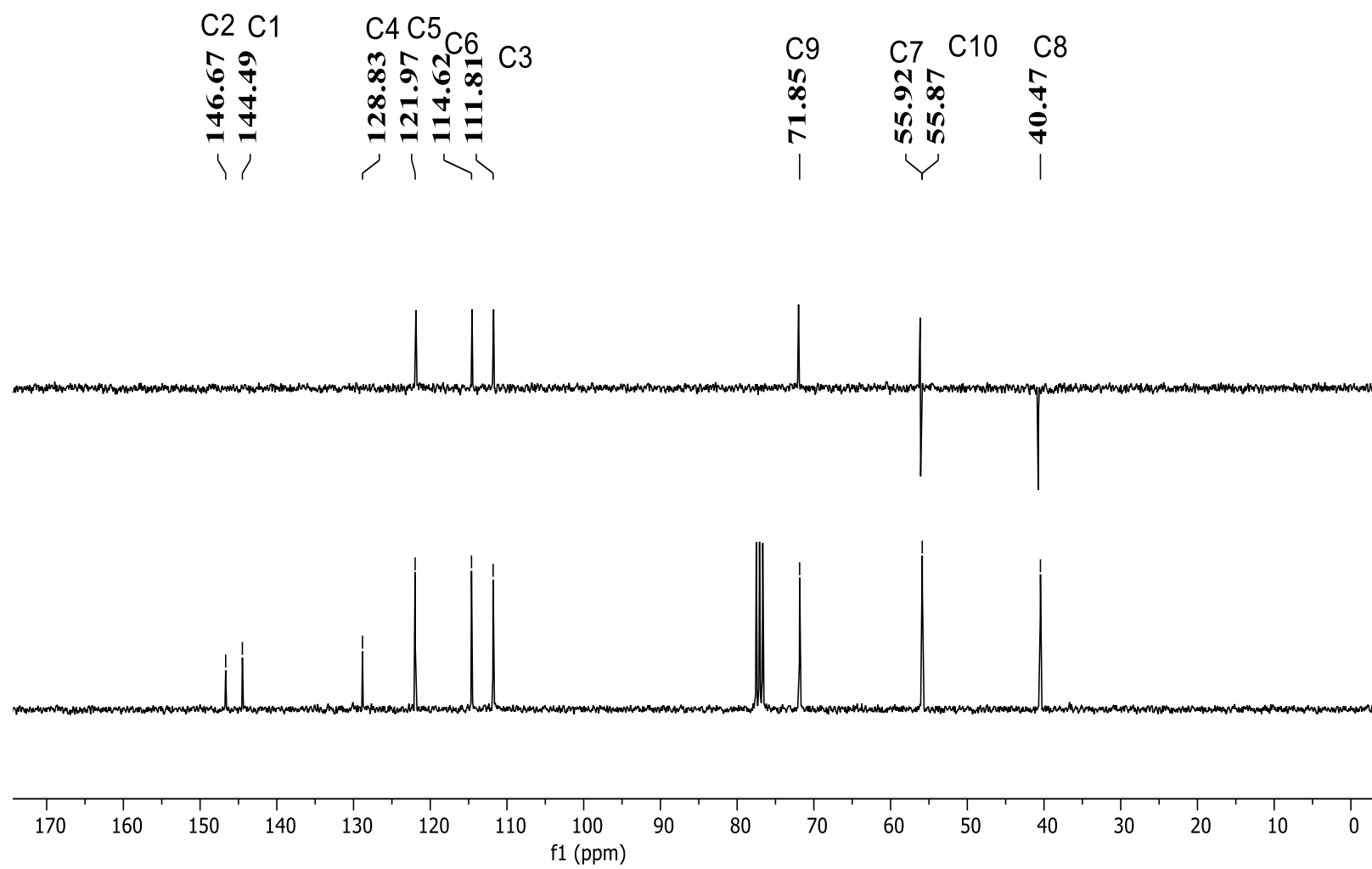
Figura 97 - Espectro de absorção na região do IV de **61**.

Fonte: Do autor.

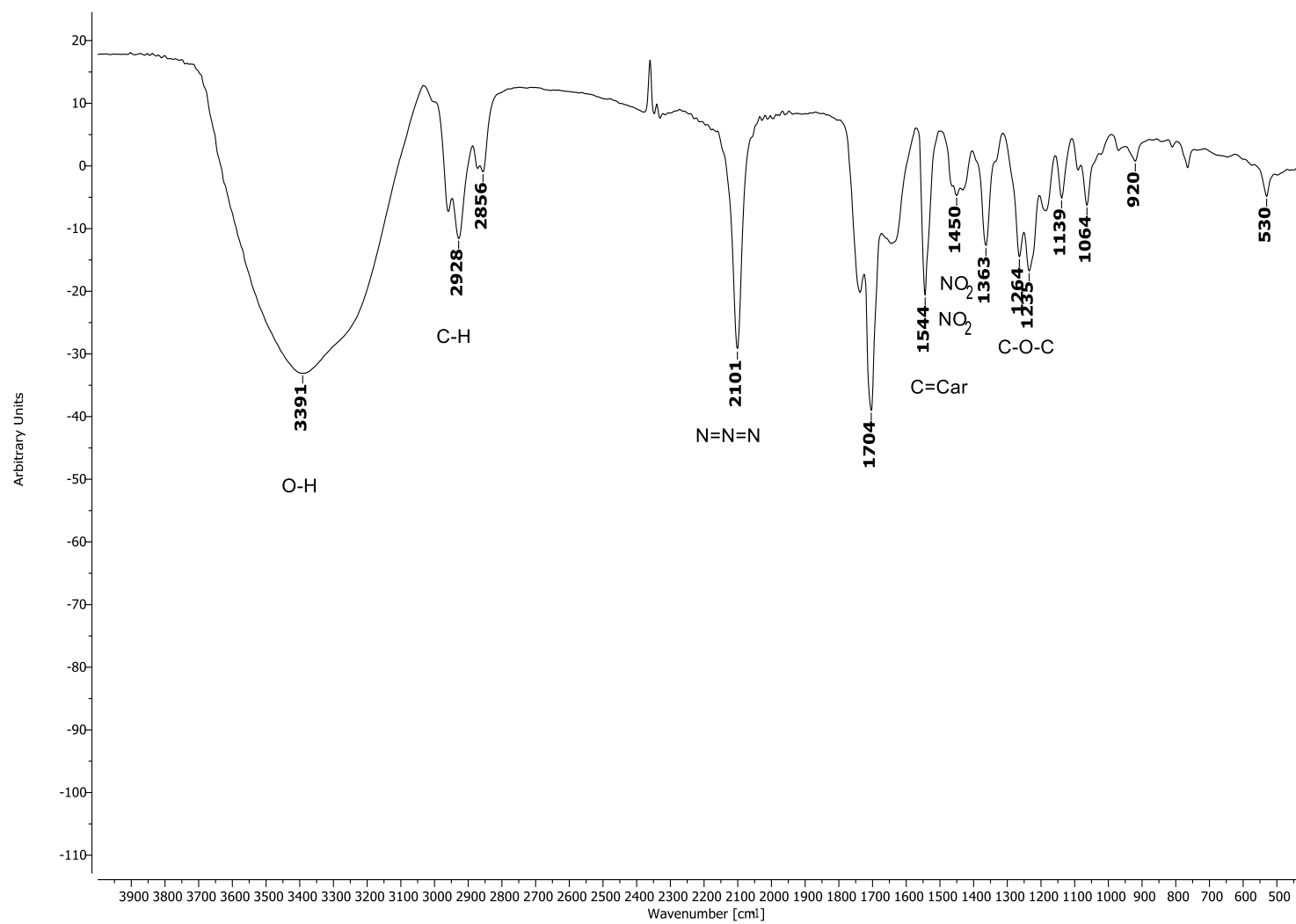
Figura 98 - Espectro de RMN de ^1H de **61** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Do autor.

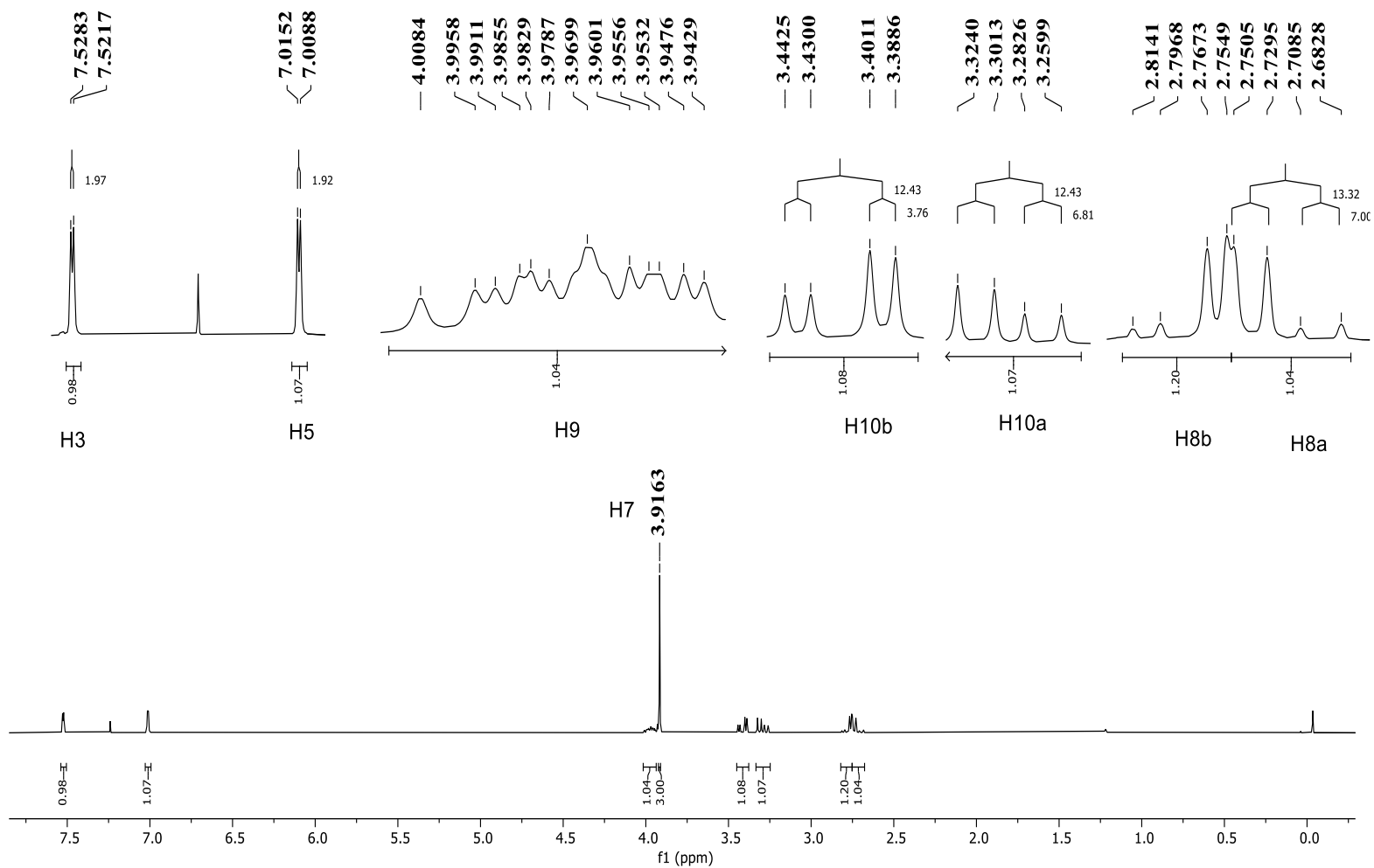
Figura 99 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **61** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

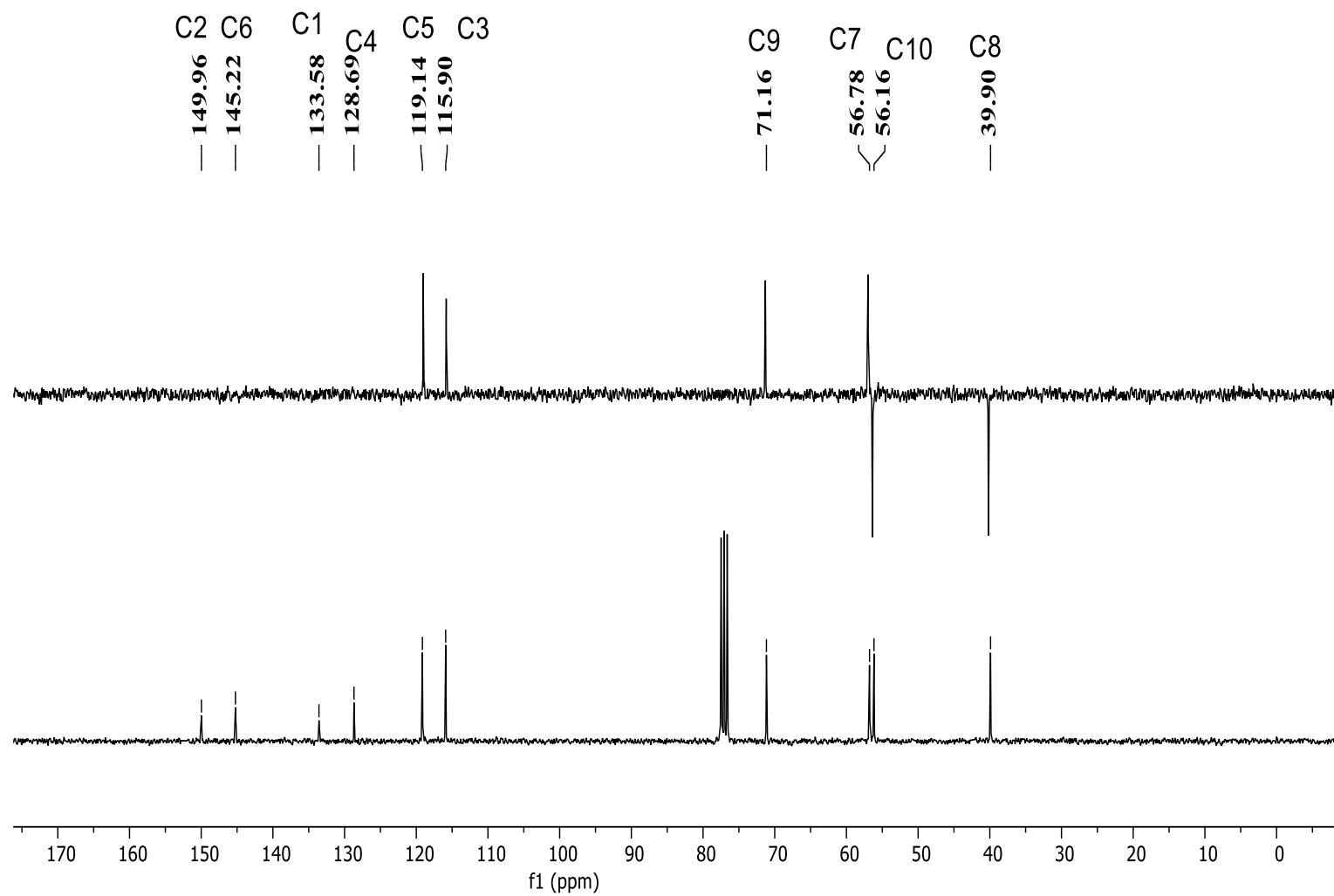
Figura 100 - Espectro de absorção na região do IV de **62**.

Fonte: Do autor.

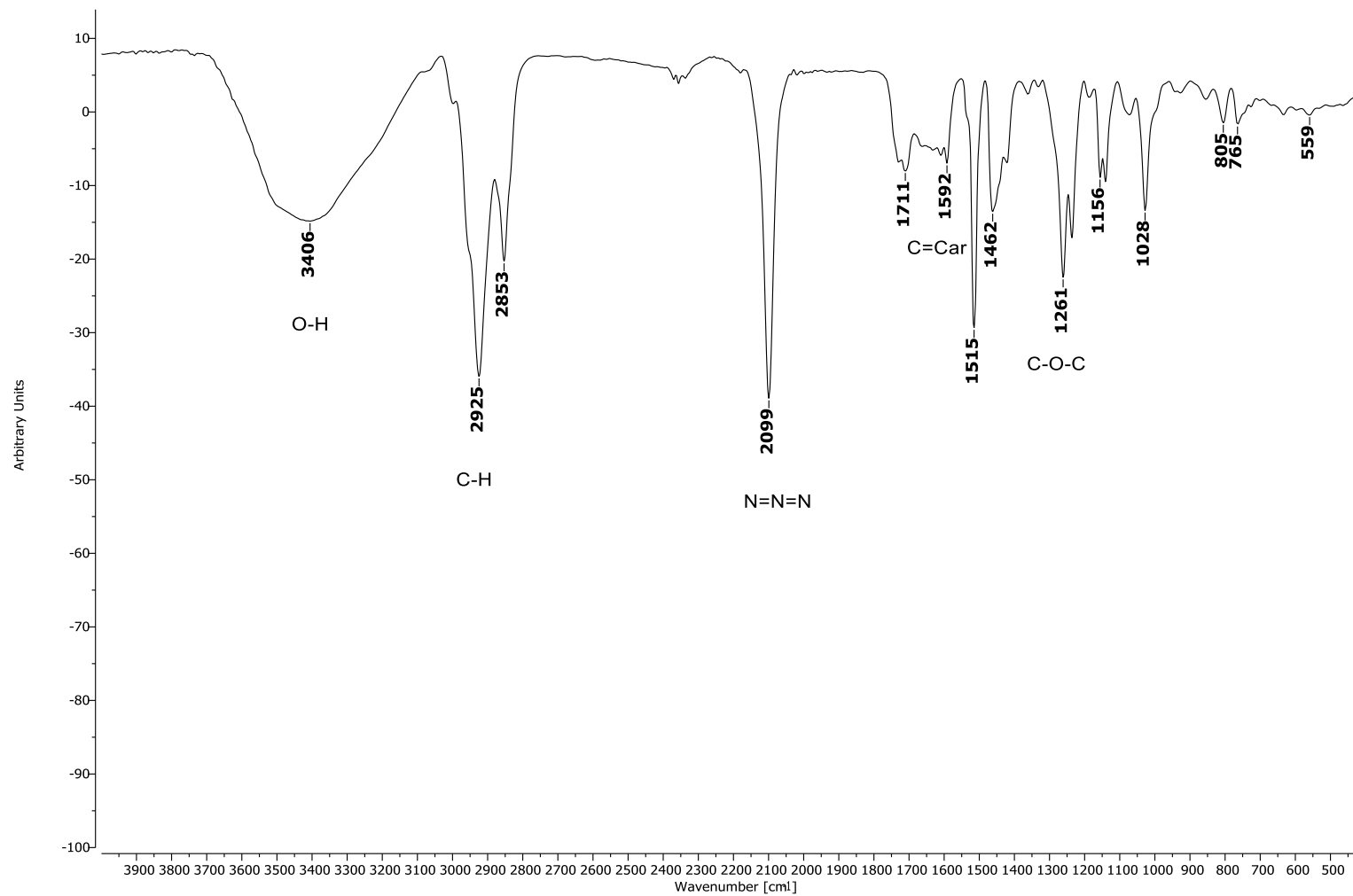
Figura 101 - Espectro de RMN de ^1H de **62** (CDCl_3 , 300 MHz).



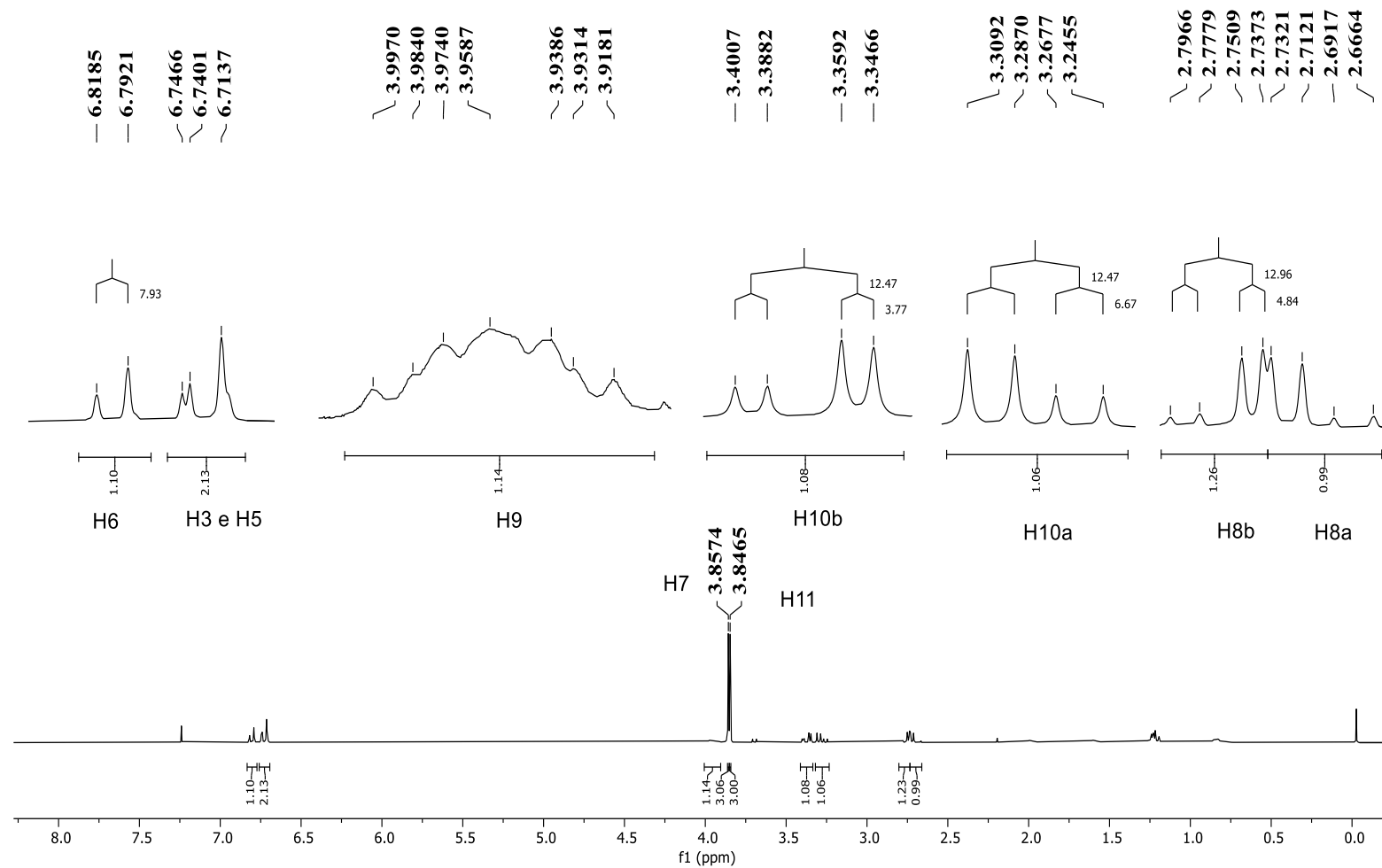
Fonte: Do autor.

Figura 102 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **62** (CDCl_3 , 75 MHz).

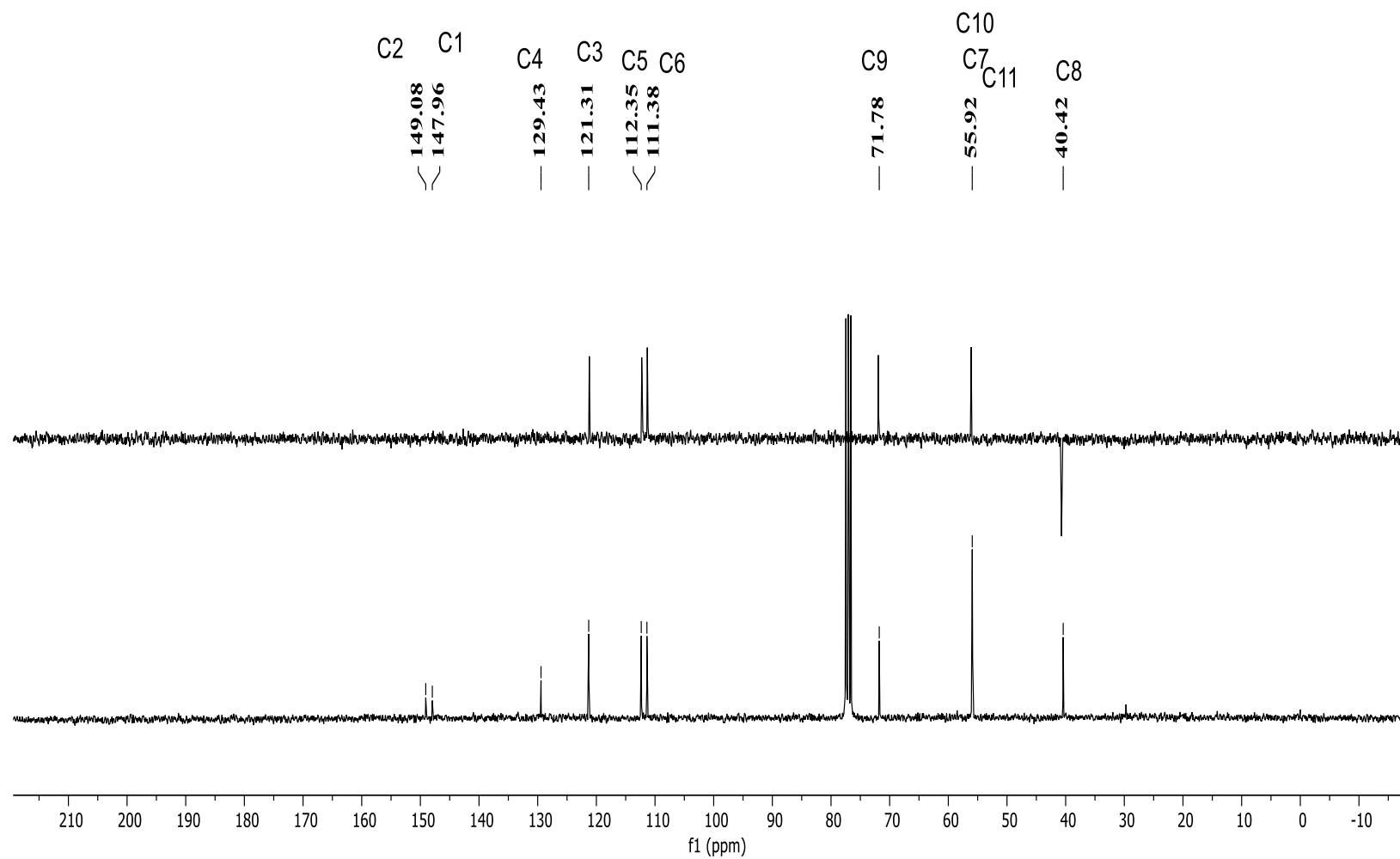
Fonte: Do autor.

Figura 103 - Espectro de absorção na região do IV de **63**.

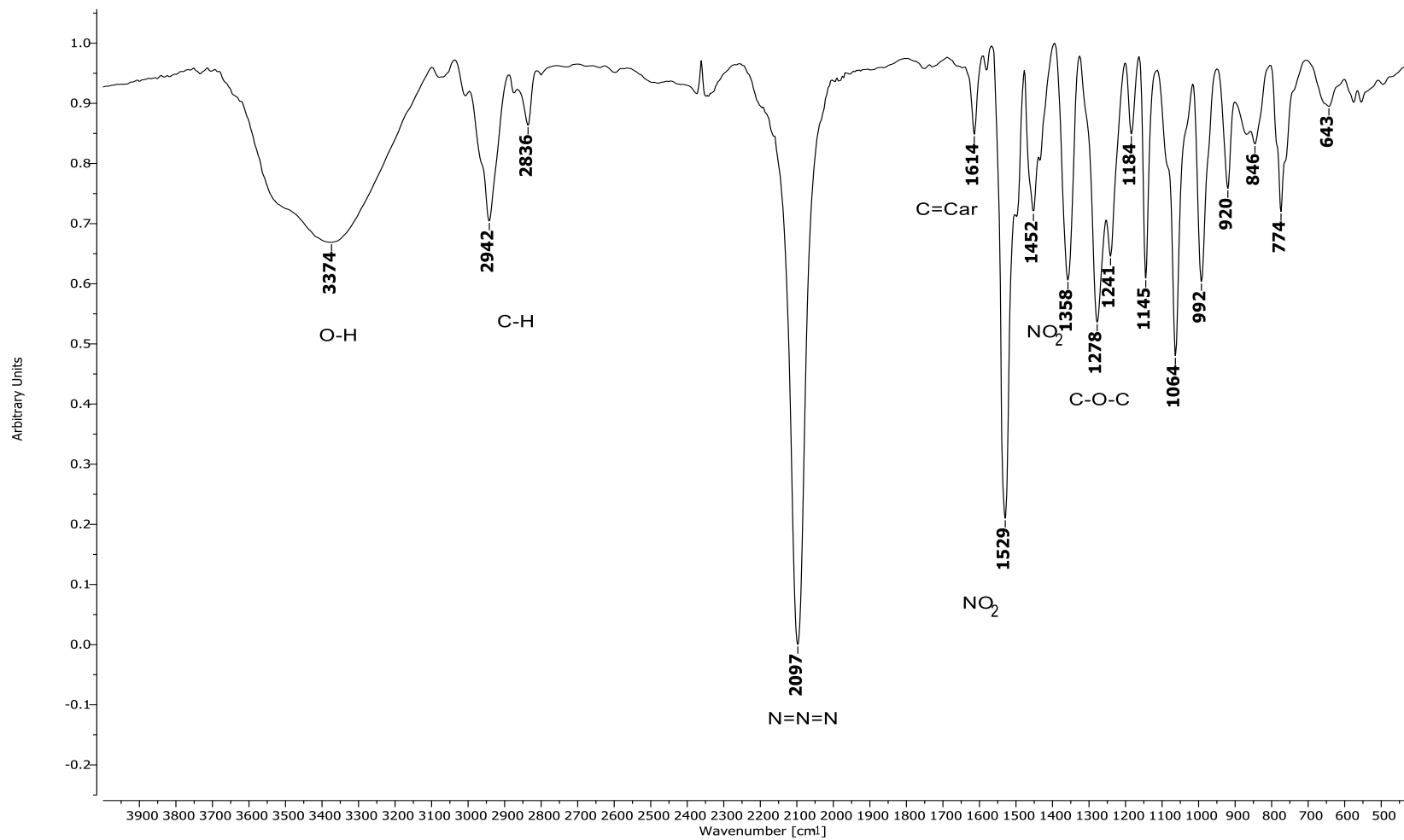
Fonte: Do autor.

Figura 104 - Espectro de RMN de ^1H de **63** (CDCl_3 , 300 MHz).

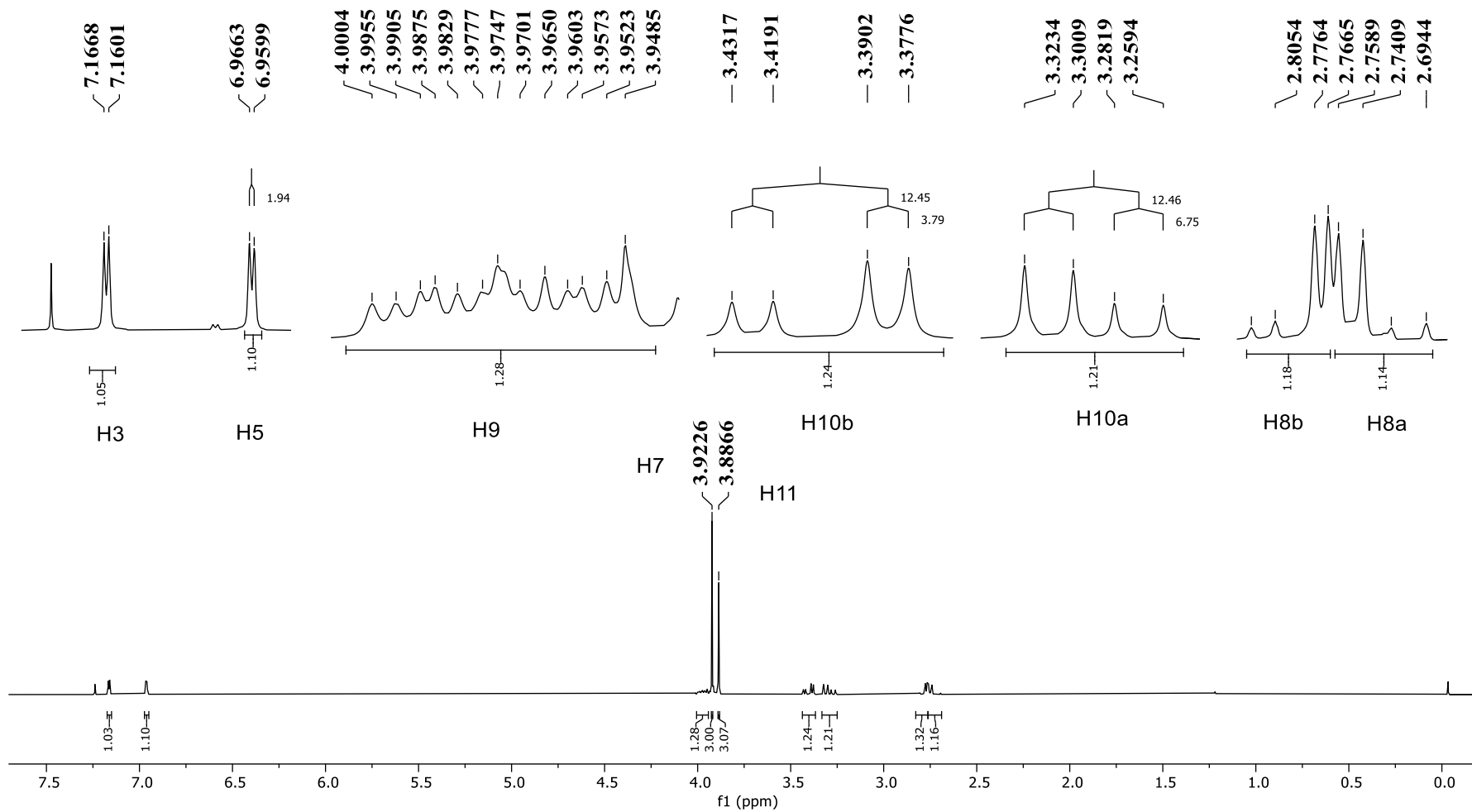
Fonte: Do autor.

Figura 105 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **63** (CDCl_3 , 75 MHz).

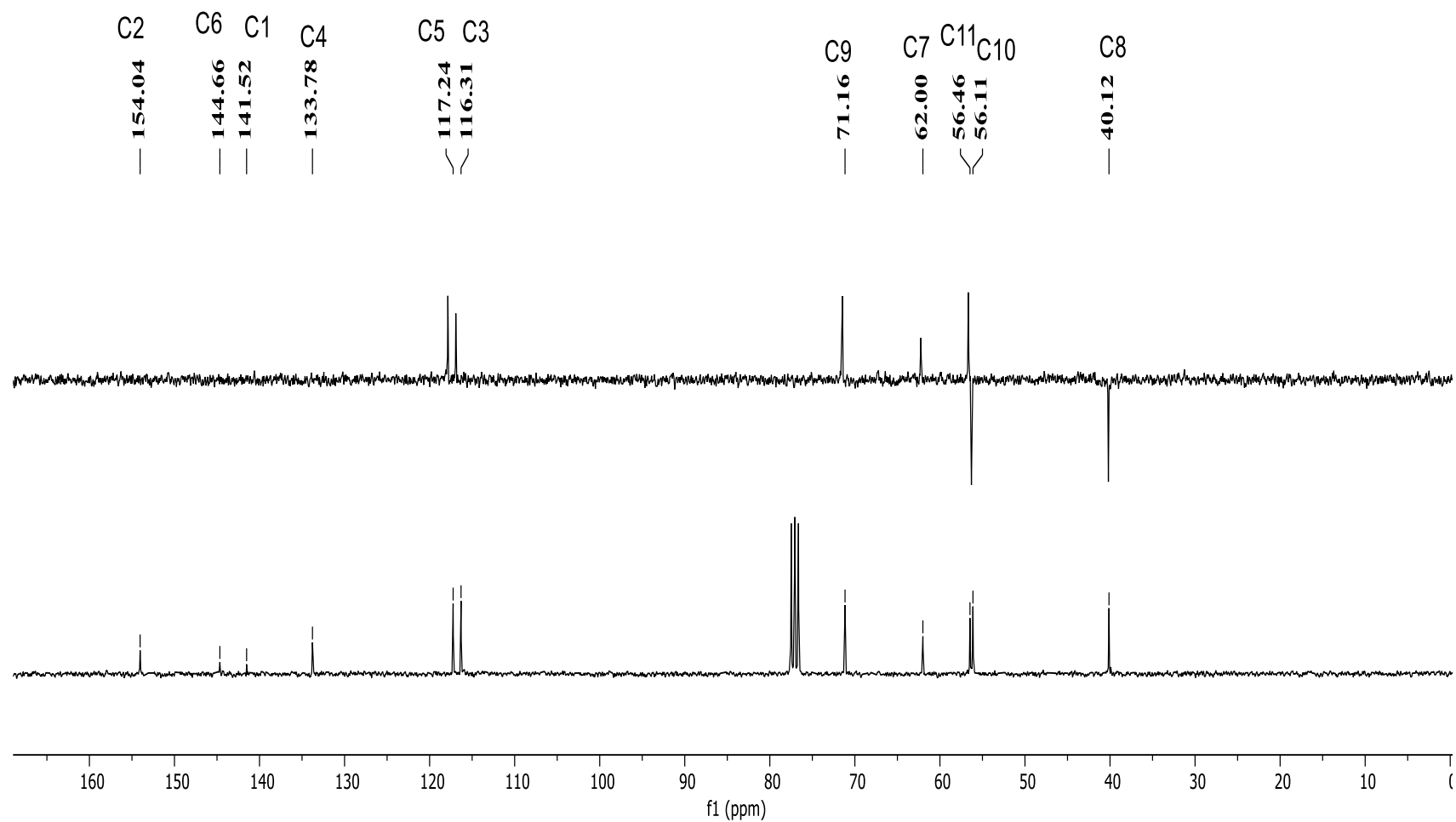
Fonte: Do autor.

Figura 106 - Espectro de absorção na região do IV de **64**.

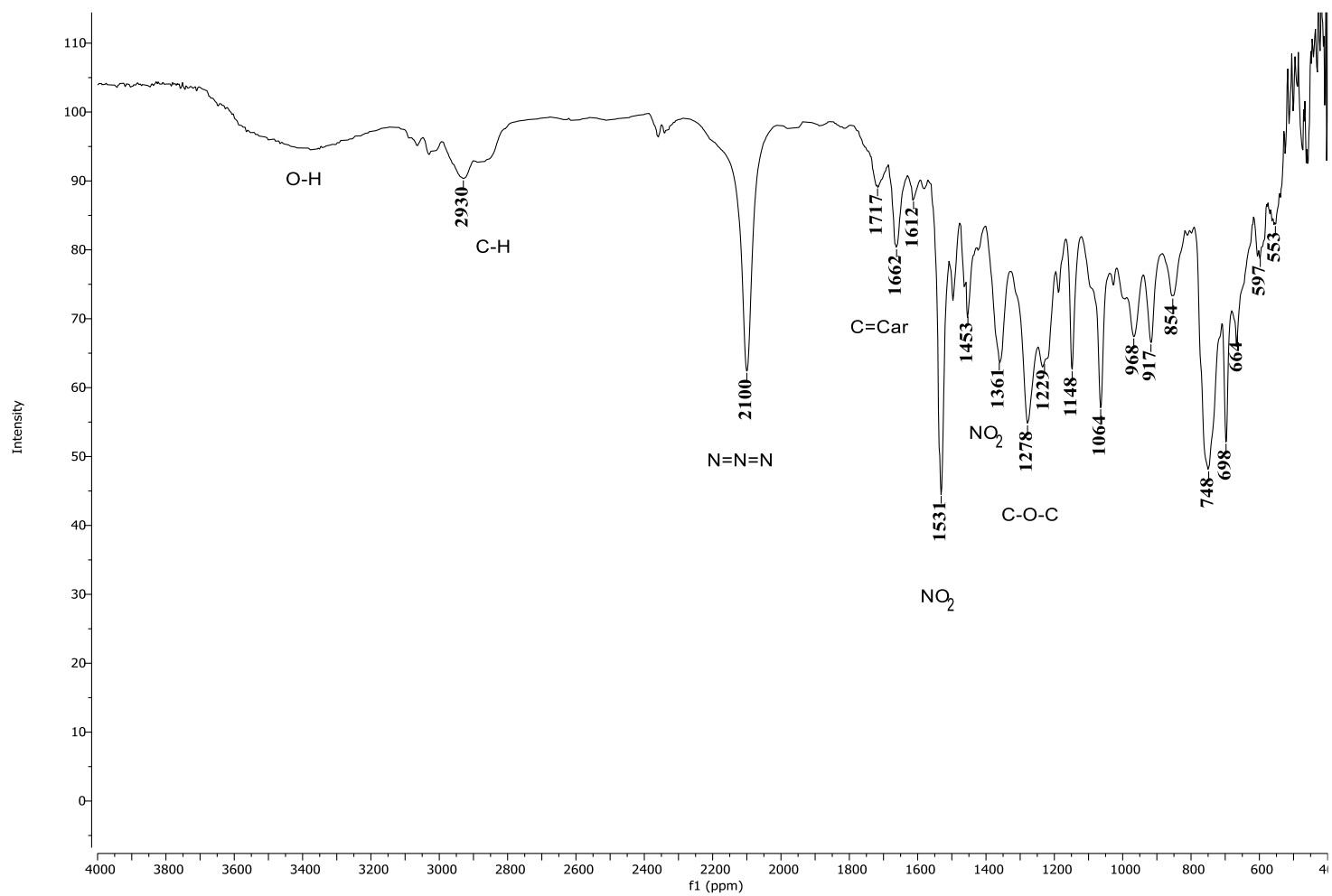
Fonte: Do autor.

Figura 107 - Espectro de RMN de ^1H de **64** (CDCl_3 , 300 MHz).

Fonte: Do autor.

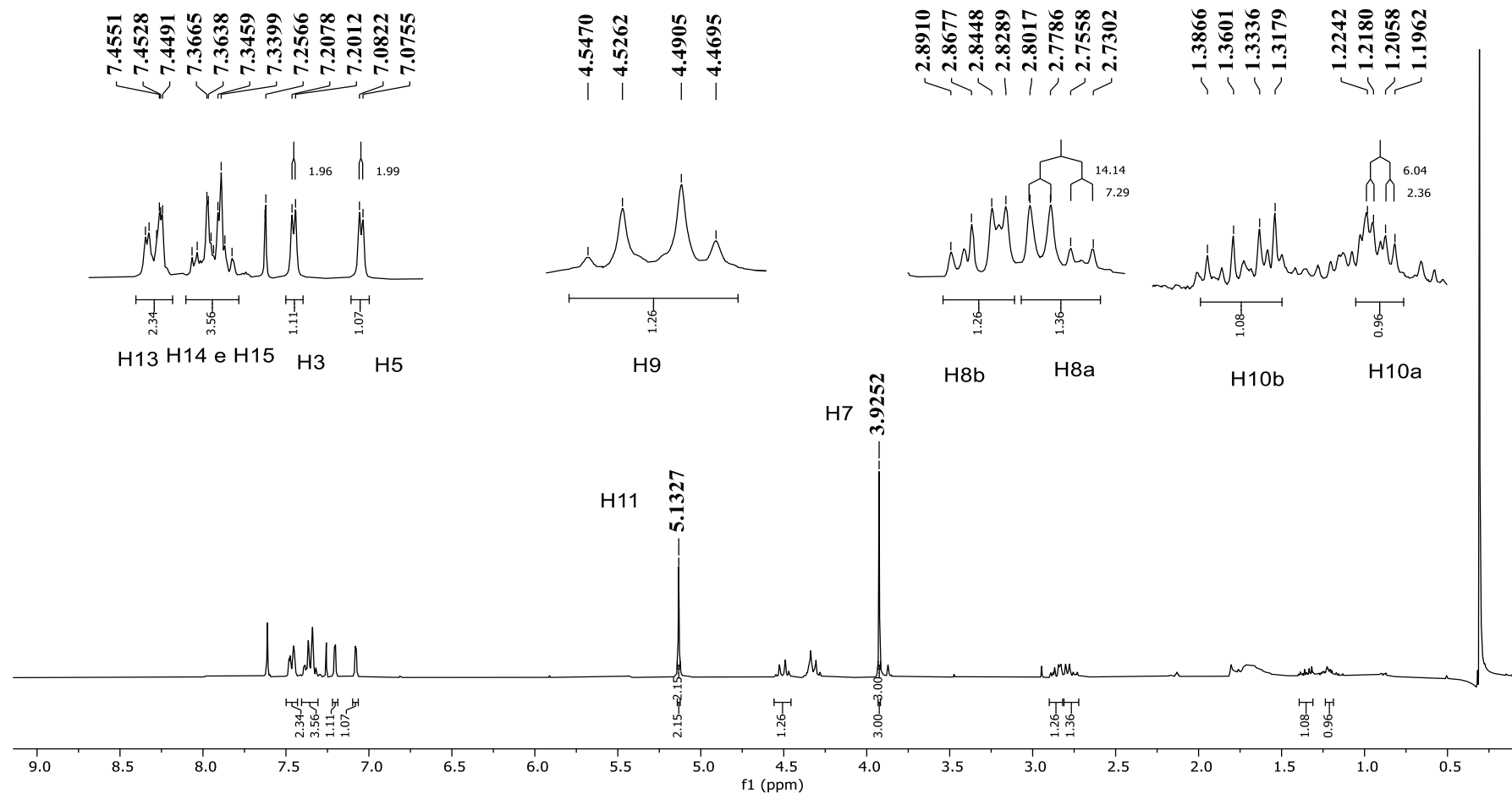
Figura 108 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **64** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

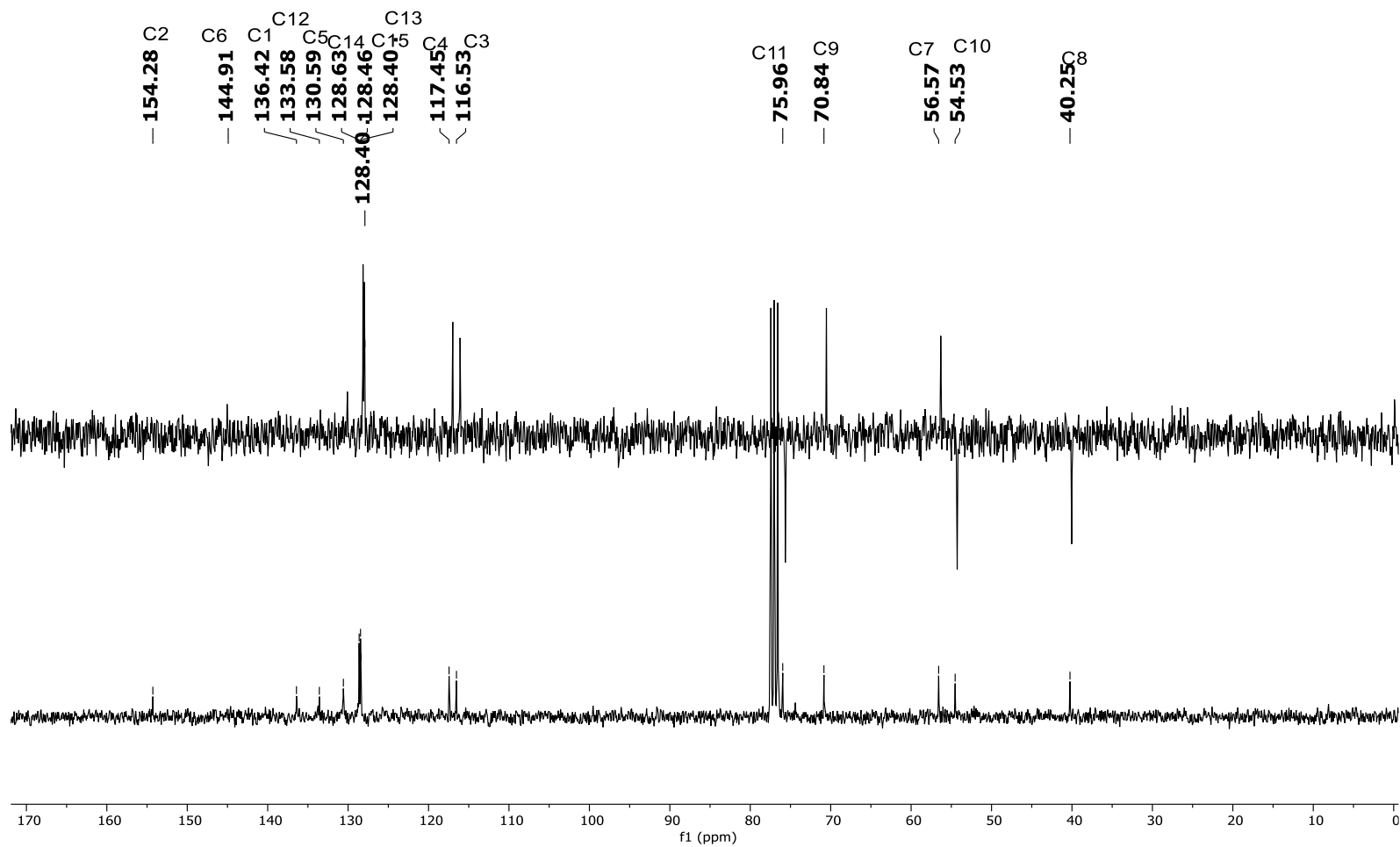
Figura 109 - Espectro de absorção na região do IV de **66**.

Fonte: Do autor.

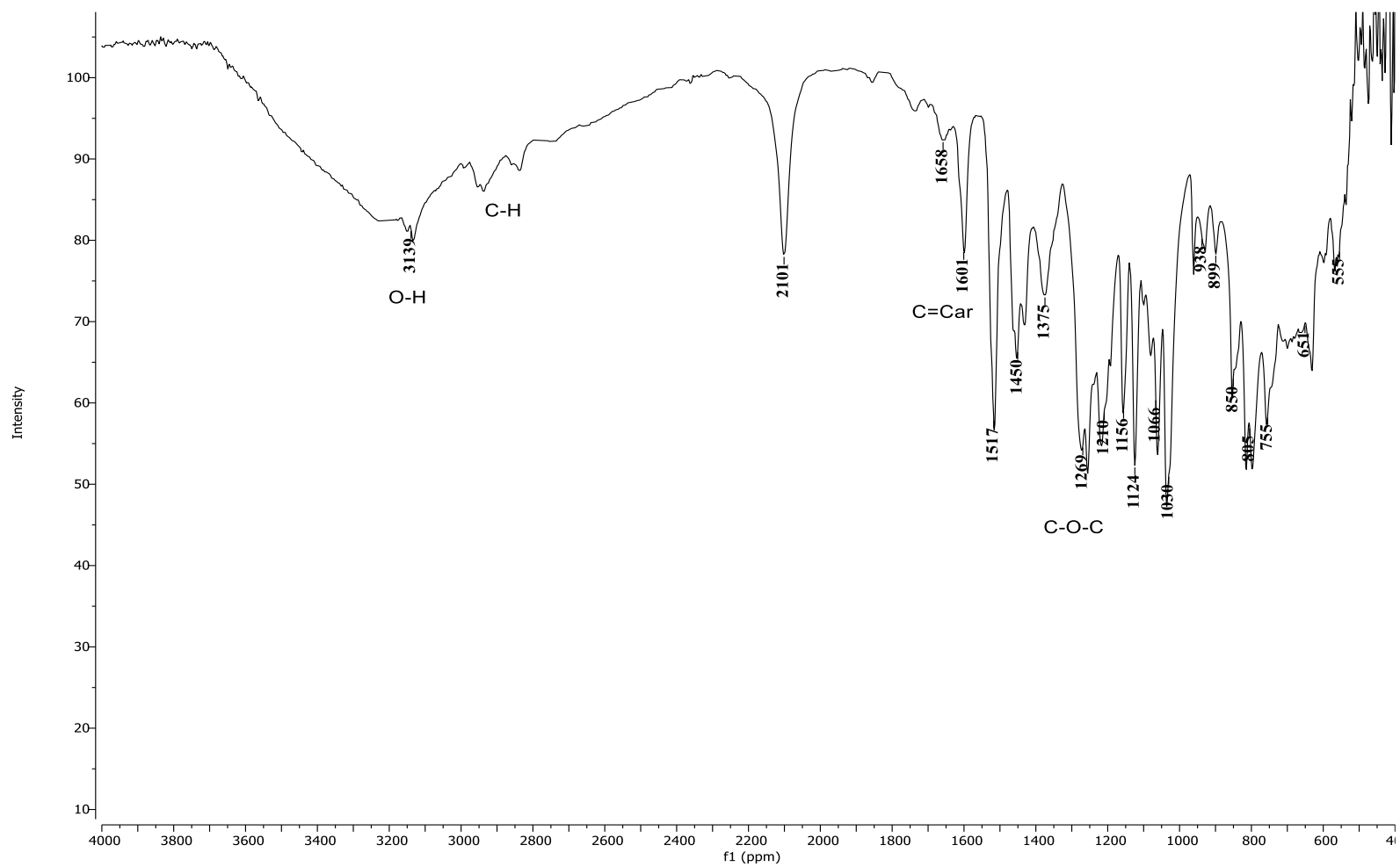
Figura 110 - Espectro de RMN de ^1H de **66** (CDCl_3 , 300 MHz).



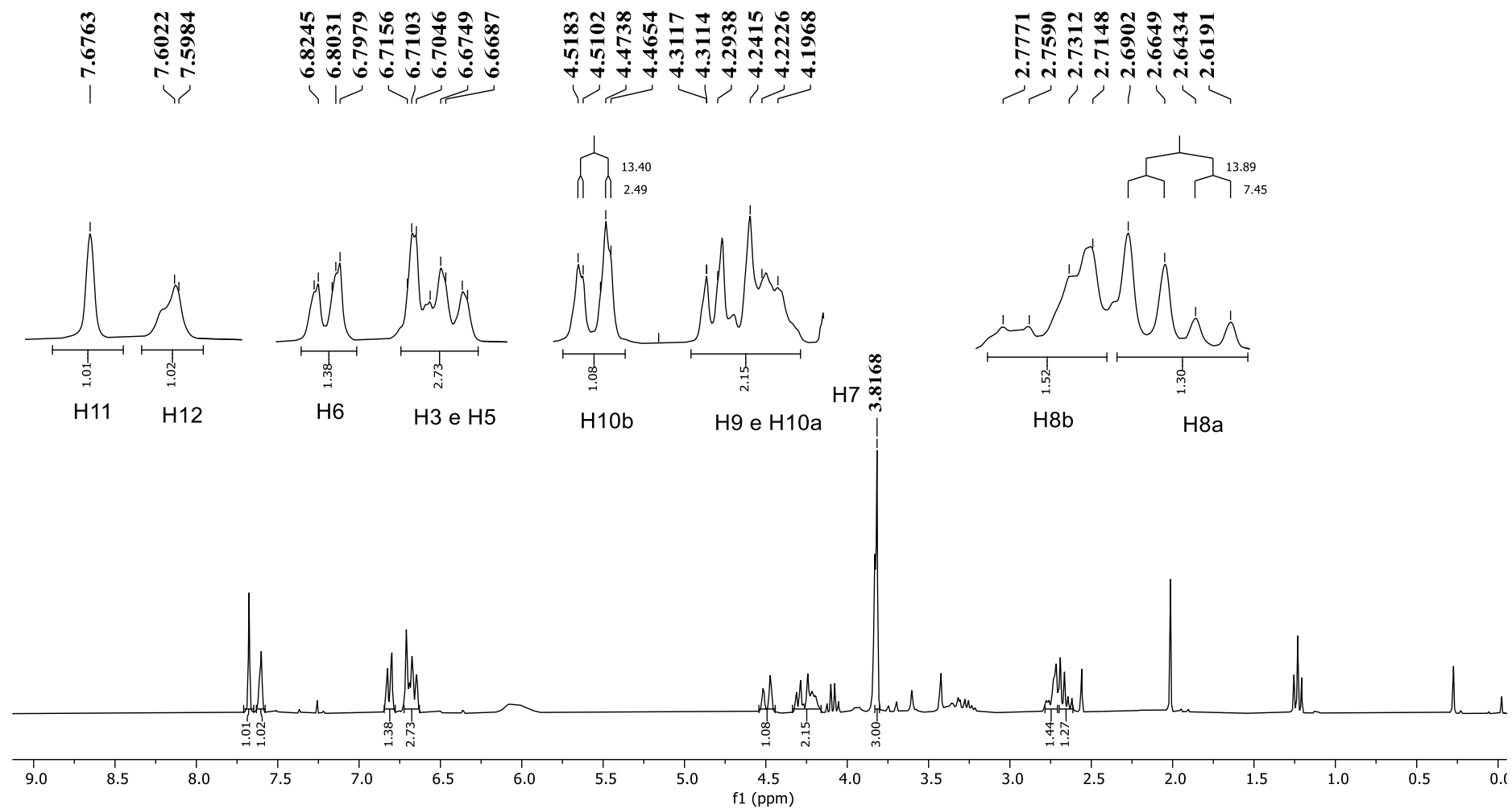
Fonte: Do autor.

Figura 111 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **66** (CDCl_3 , 75 MHz).

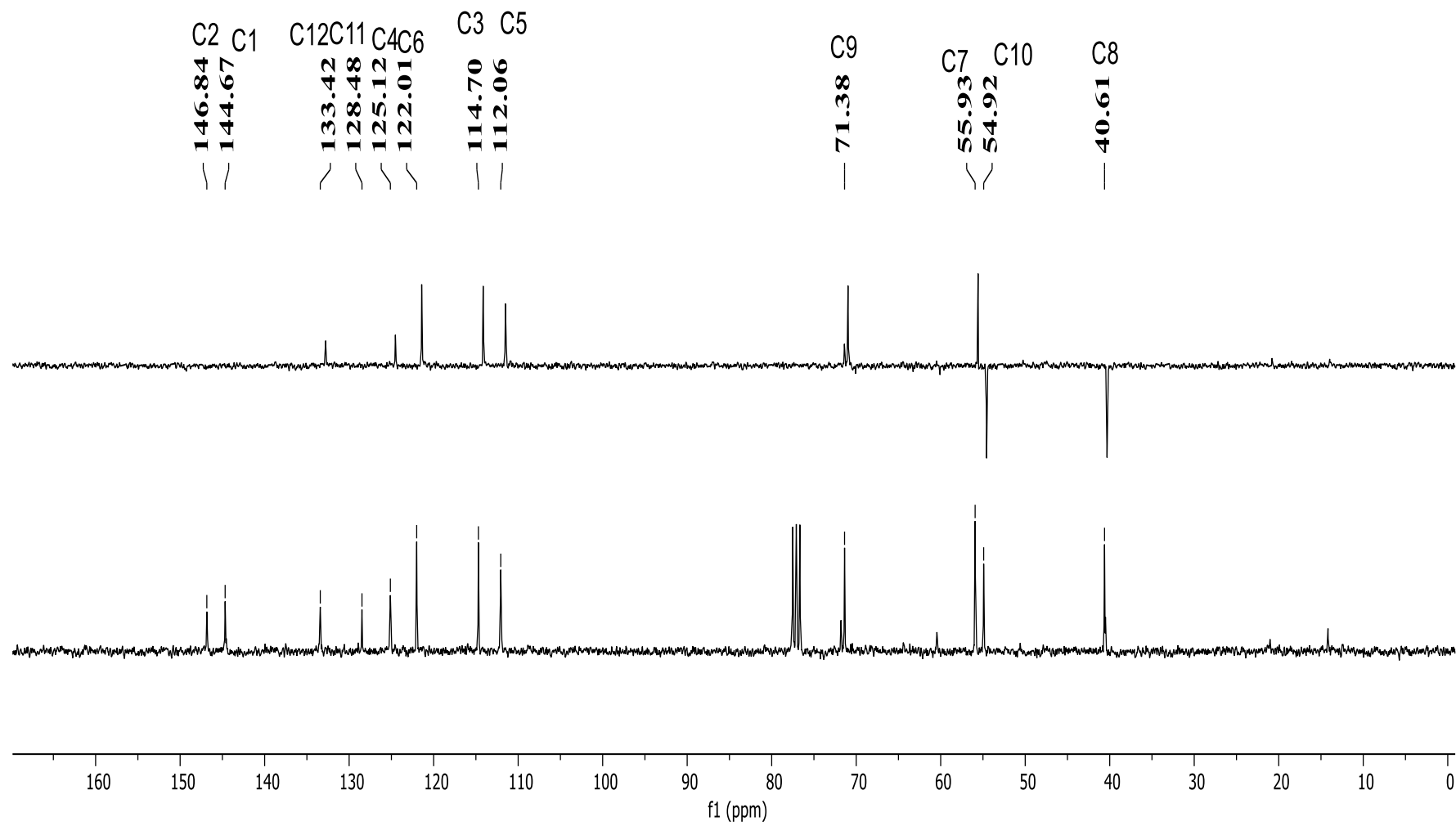
Fonte: Do autor.

Figura 112 - Espectro de absorção na região do IV de **67**.

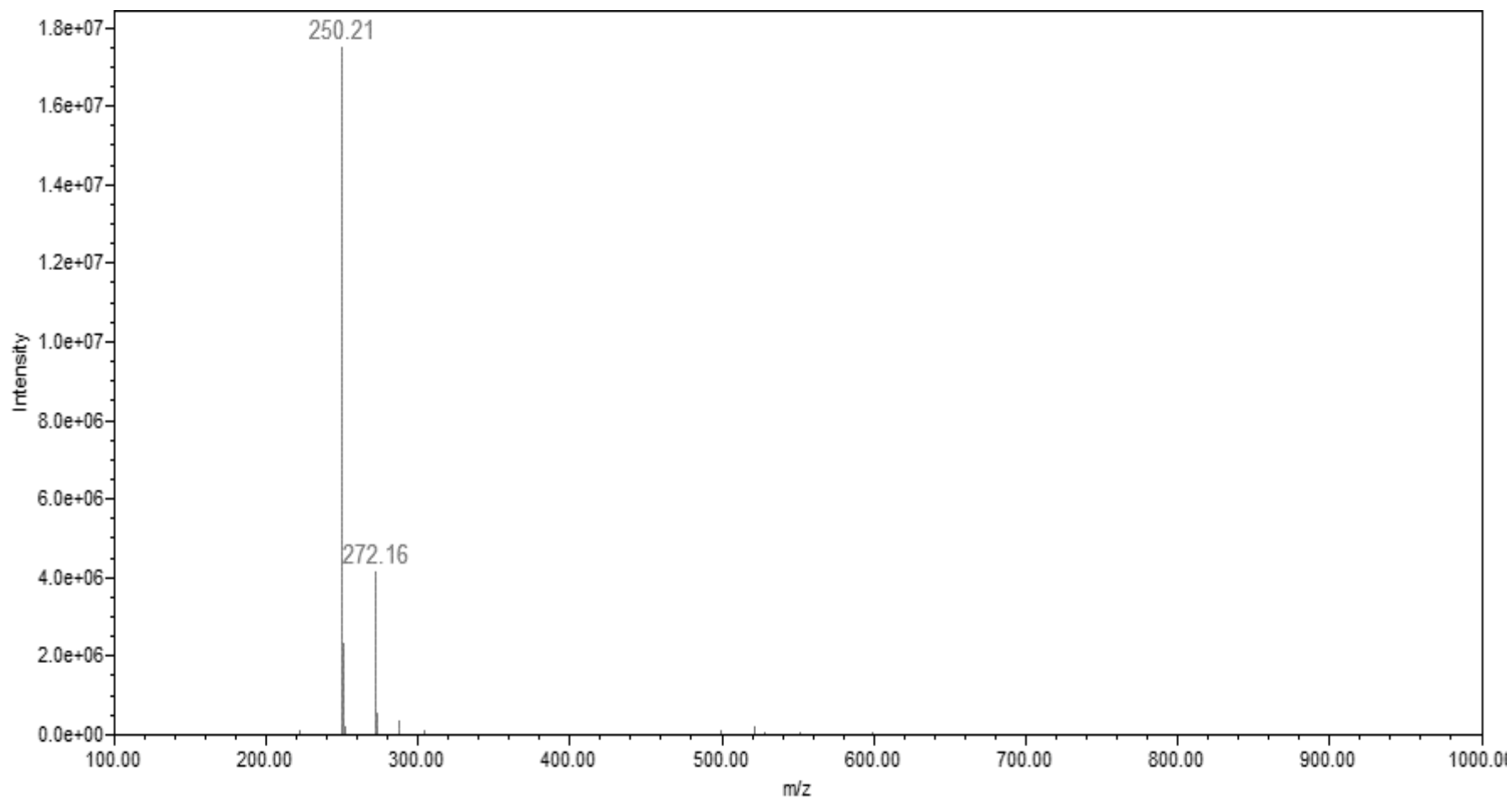
Fonte: Do autor.

Figura 113 - Espectro de RMN de ^1H de **67** (CDCl_3 , 300 MHz).

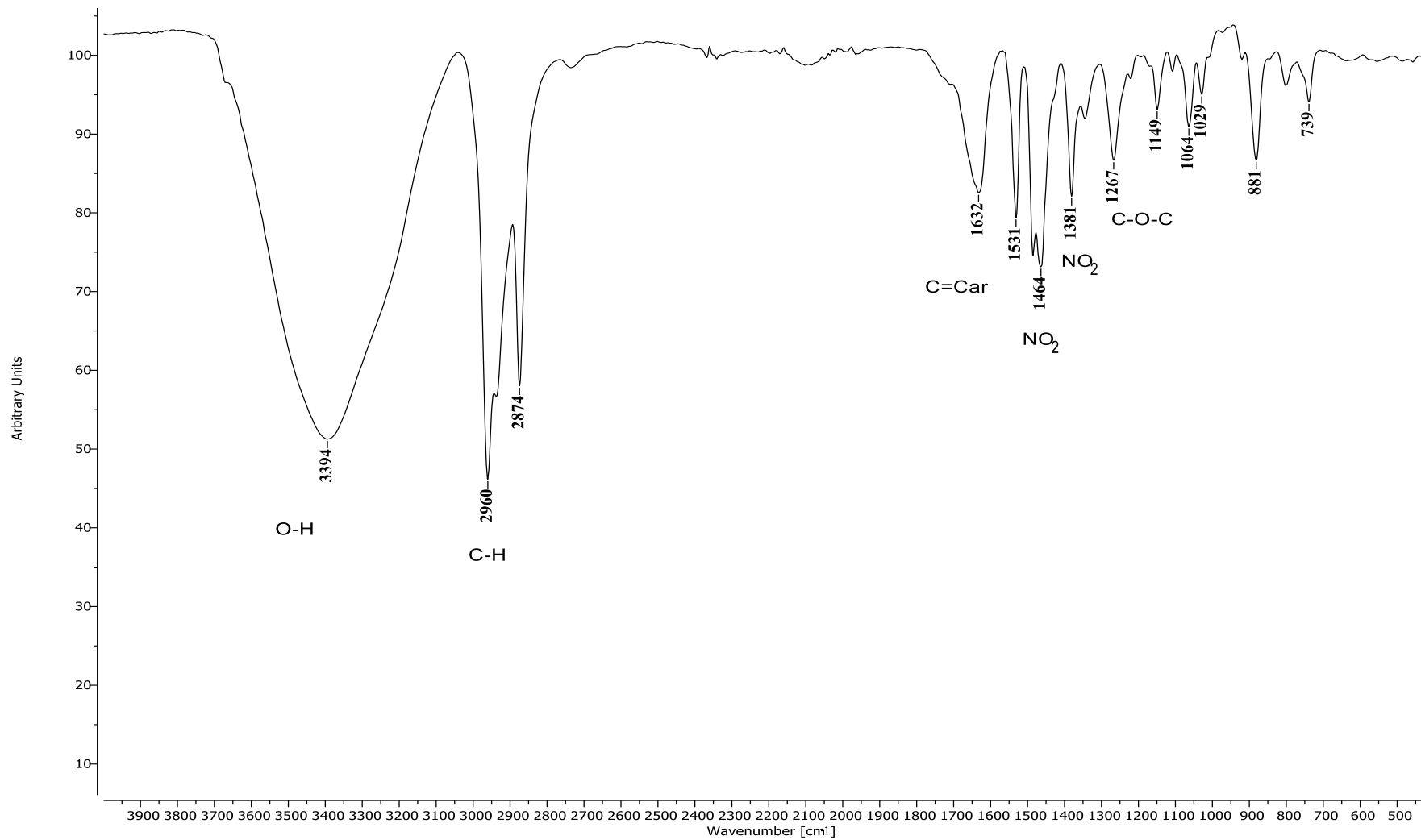
Fonte: Do autor.

Figura 114 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **67** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

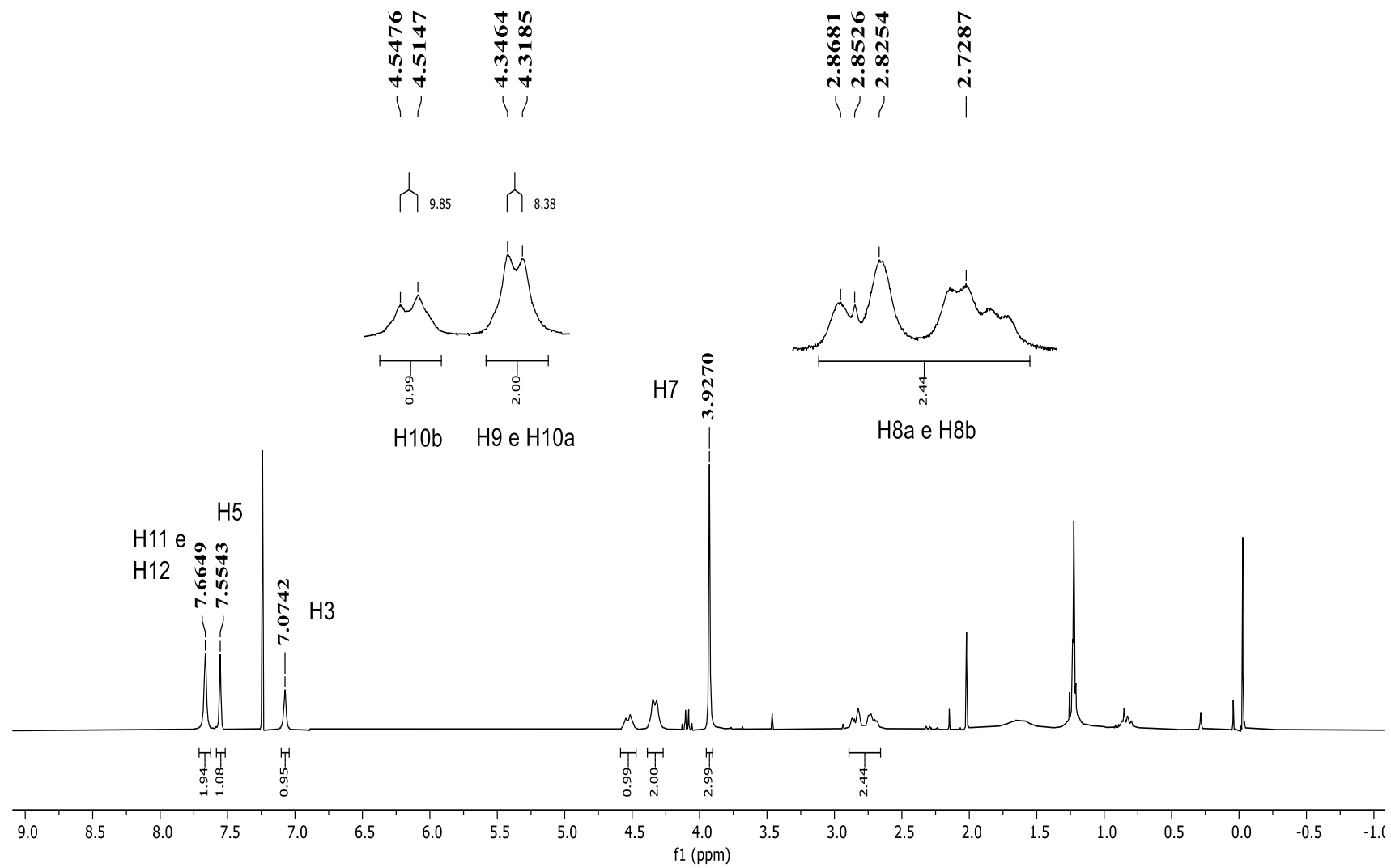
Figura 115 - Espectro de EM de **67**

Fonte: Do autor.

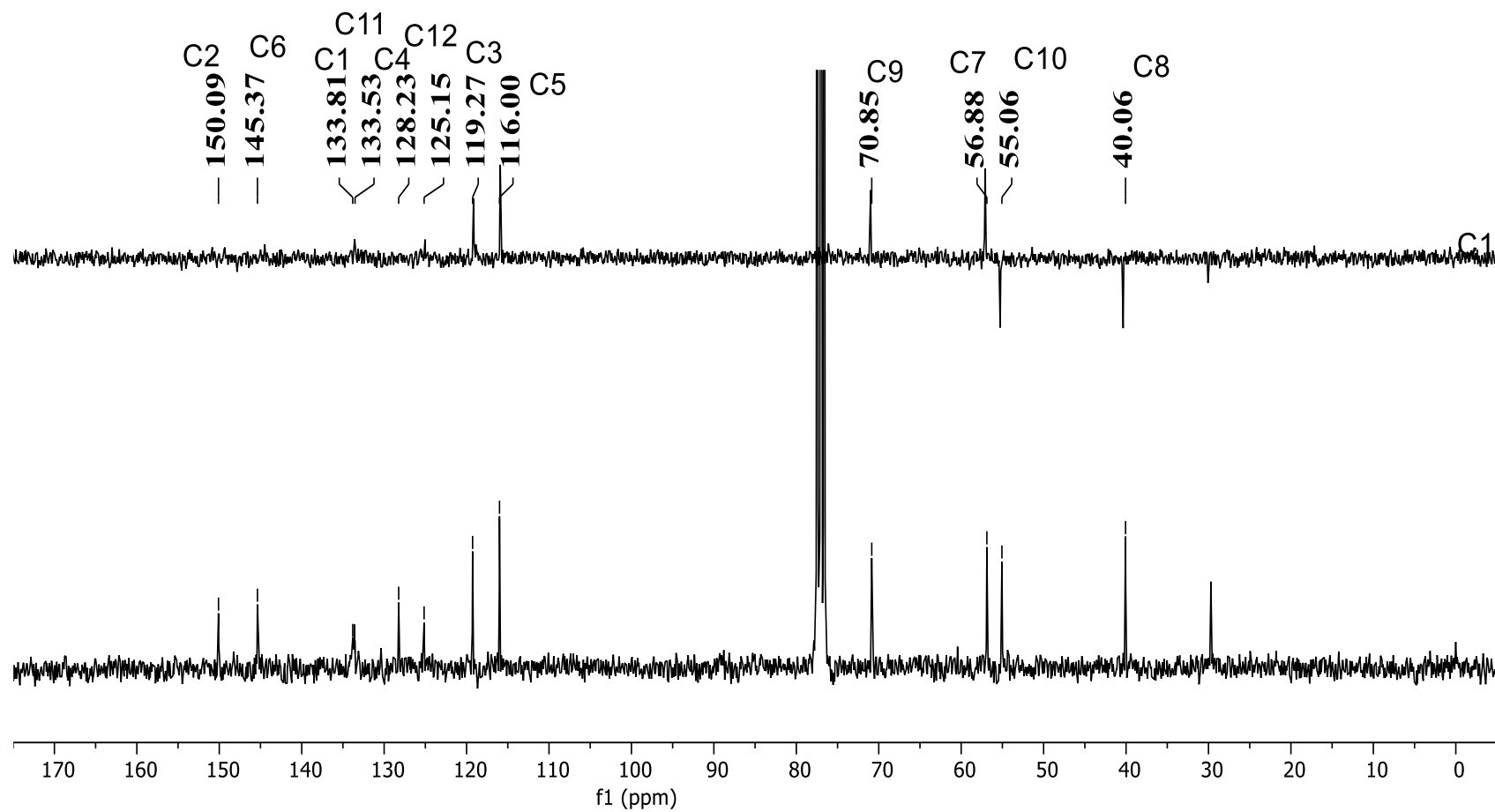
Figura 116 - Espectro de absorção na região do IV de **68**.

Fonte: Do autor.

Figura 117 - Espectro de RMN de ^1H de **68** (CDCl_3 , 300 MHz).

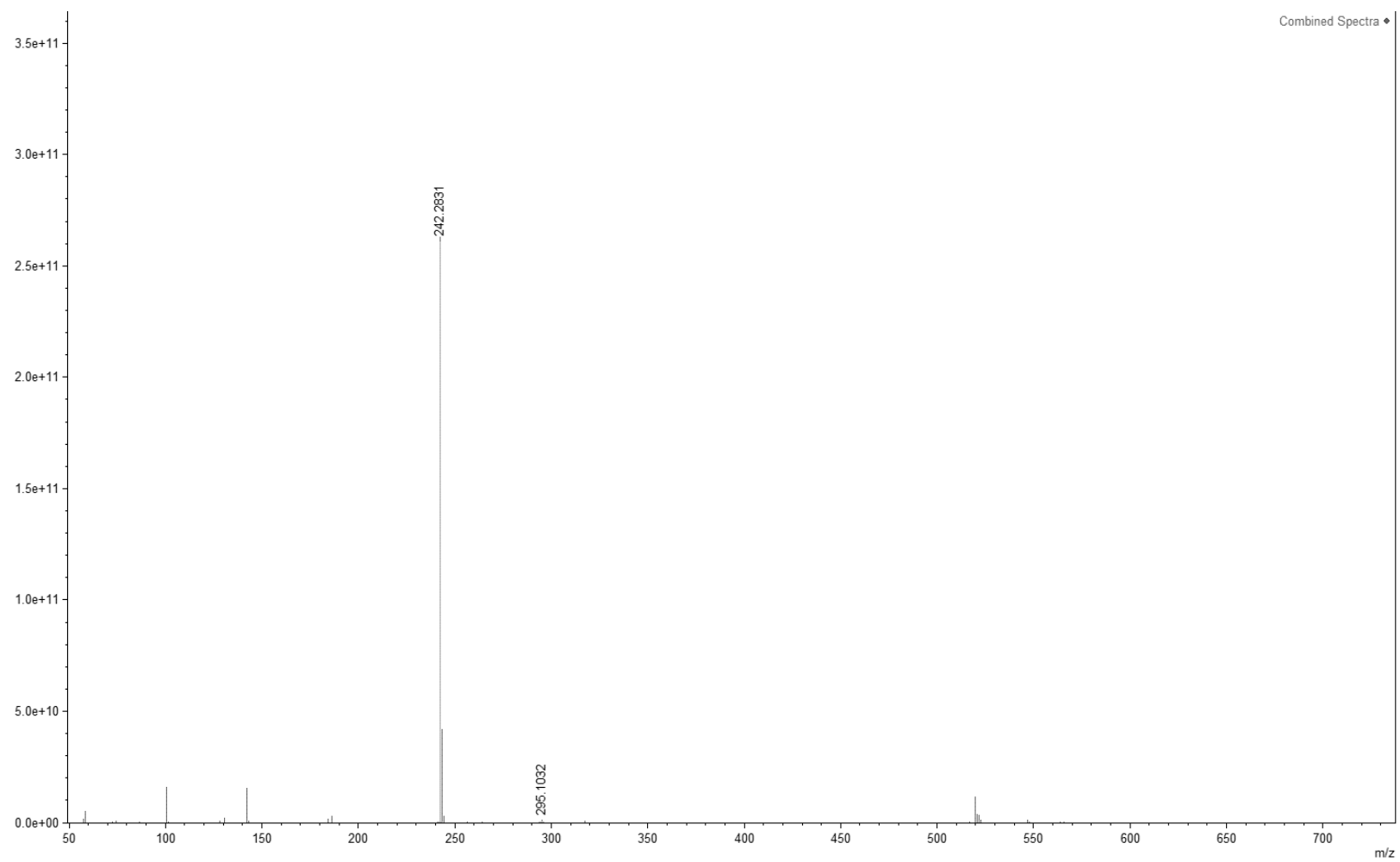


Fonte: Do autor.

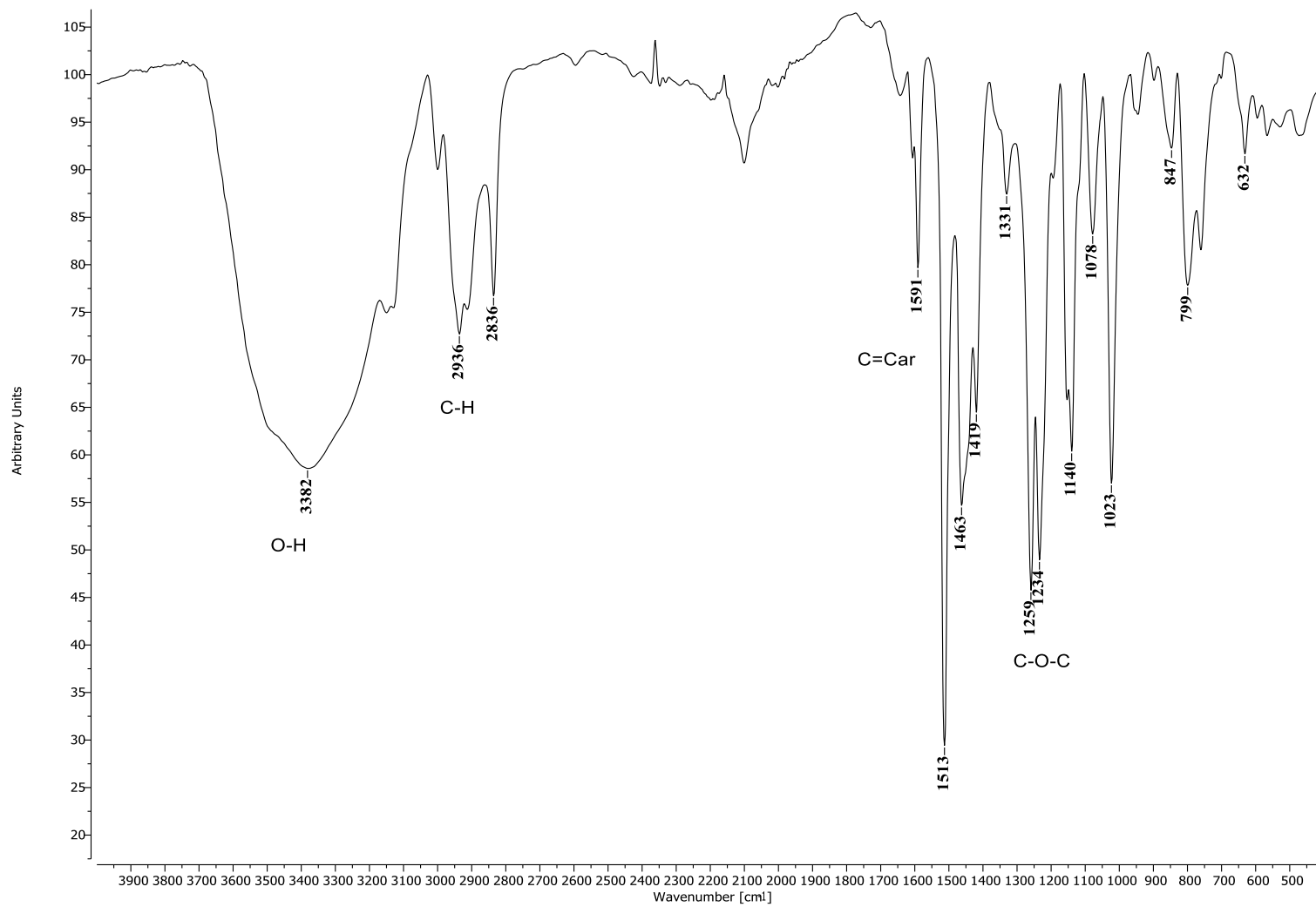
Figura 118 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **68** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

Figura 119 - Espectro de EM de 68

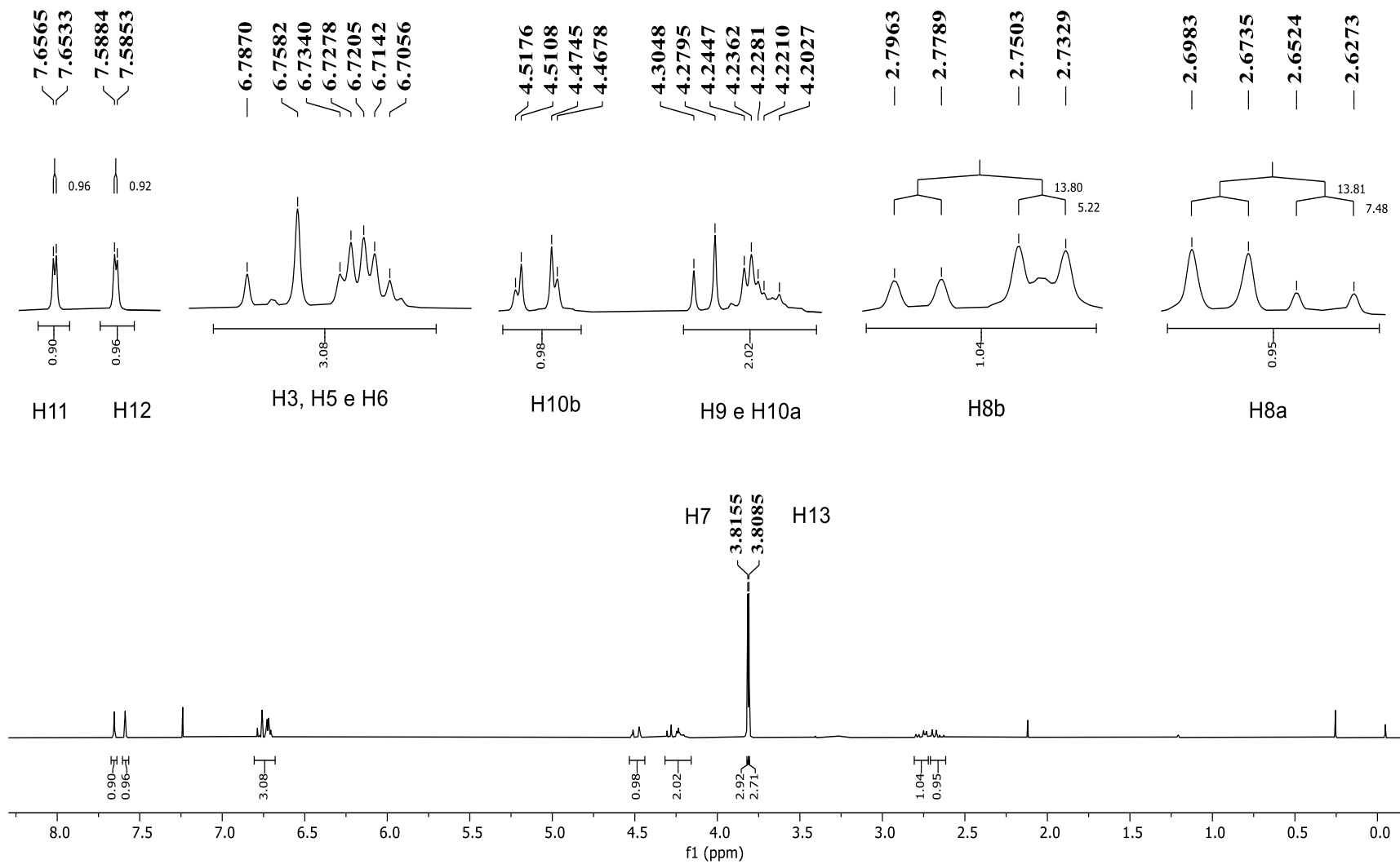


Fonte: Do autor.

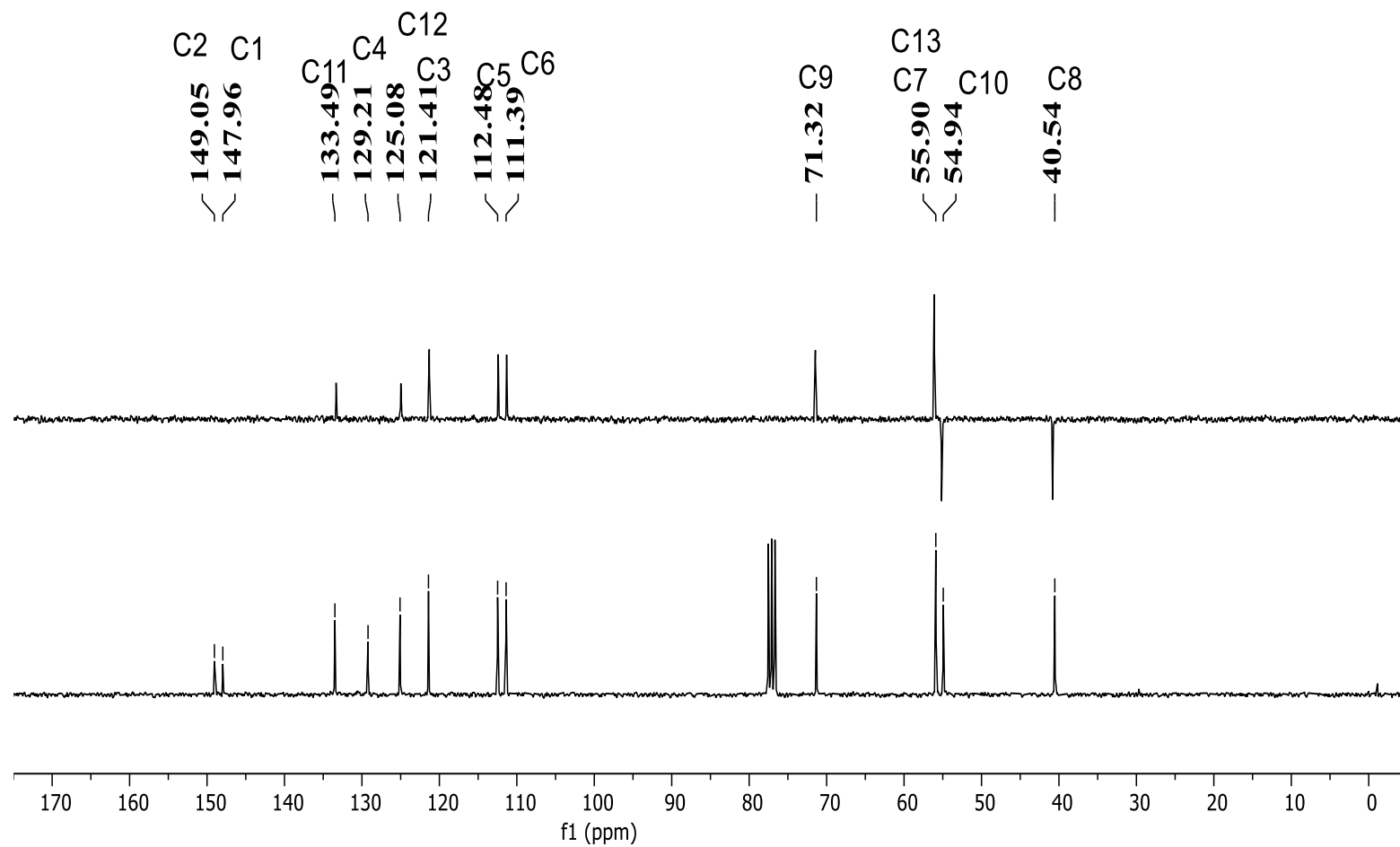
Figura 120 - Espectro de absorção na região do IV de **69**.

Fonte: Do autor.

Figura 121 - Espectro de RMN de ^1H de **69** (CDCl_3 , 300 MHz).



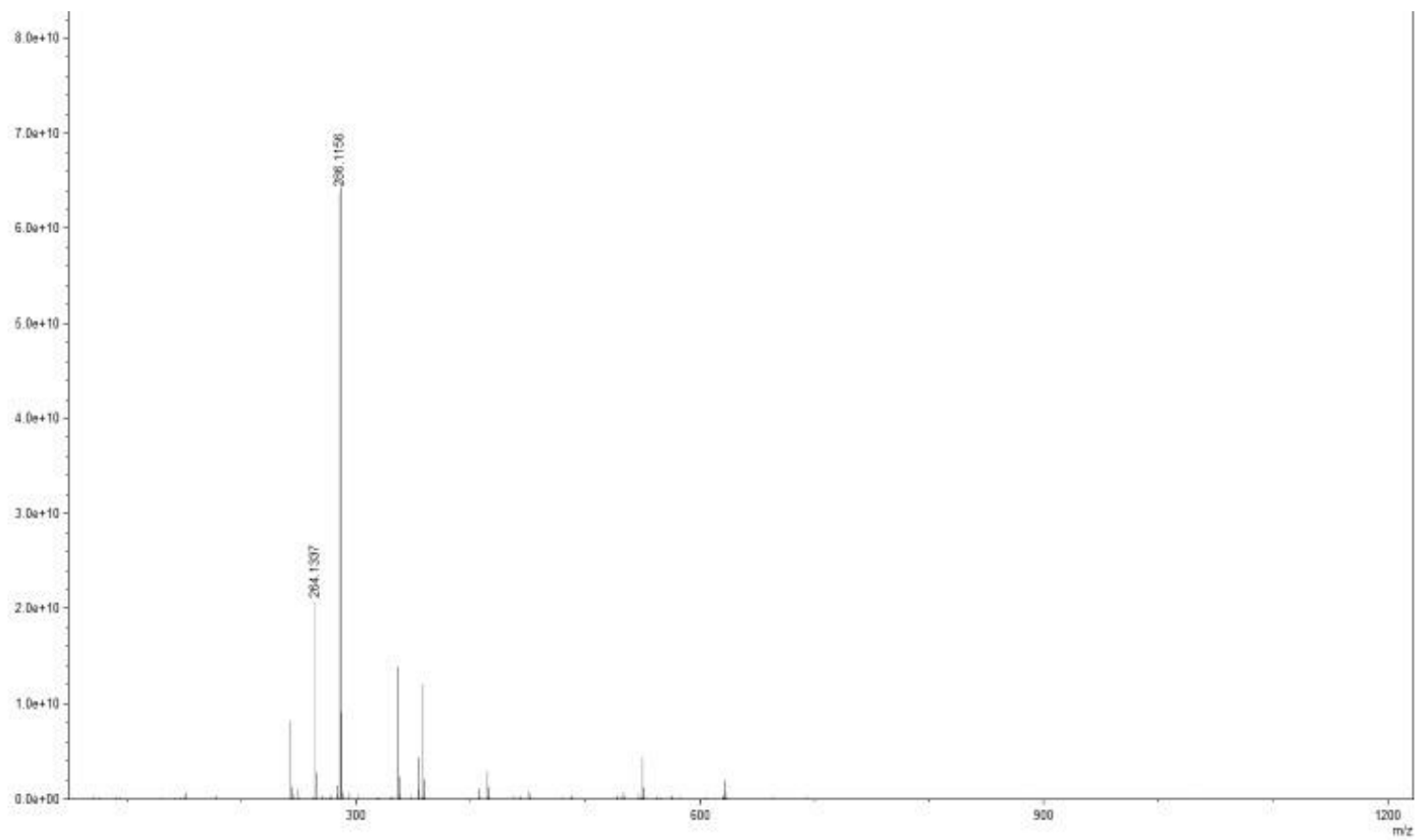
Fonte: Do autor.

Figura 122 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **69** (CDCl_3 , 75 MHz).

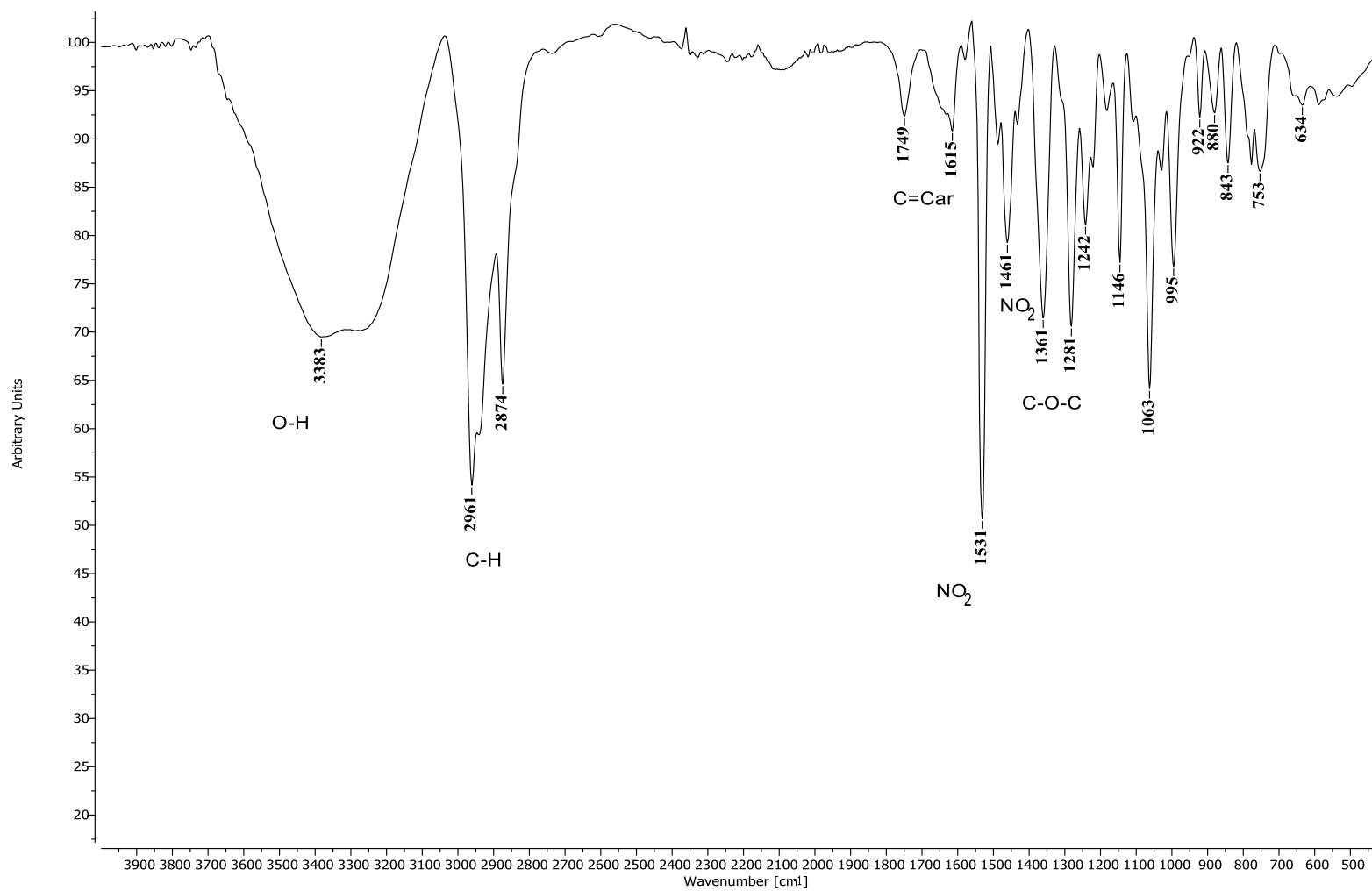
Fonte: Do autor.

Figura 123 - Espectro de EM de 69

3M

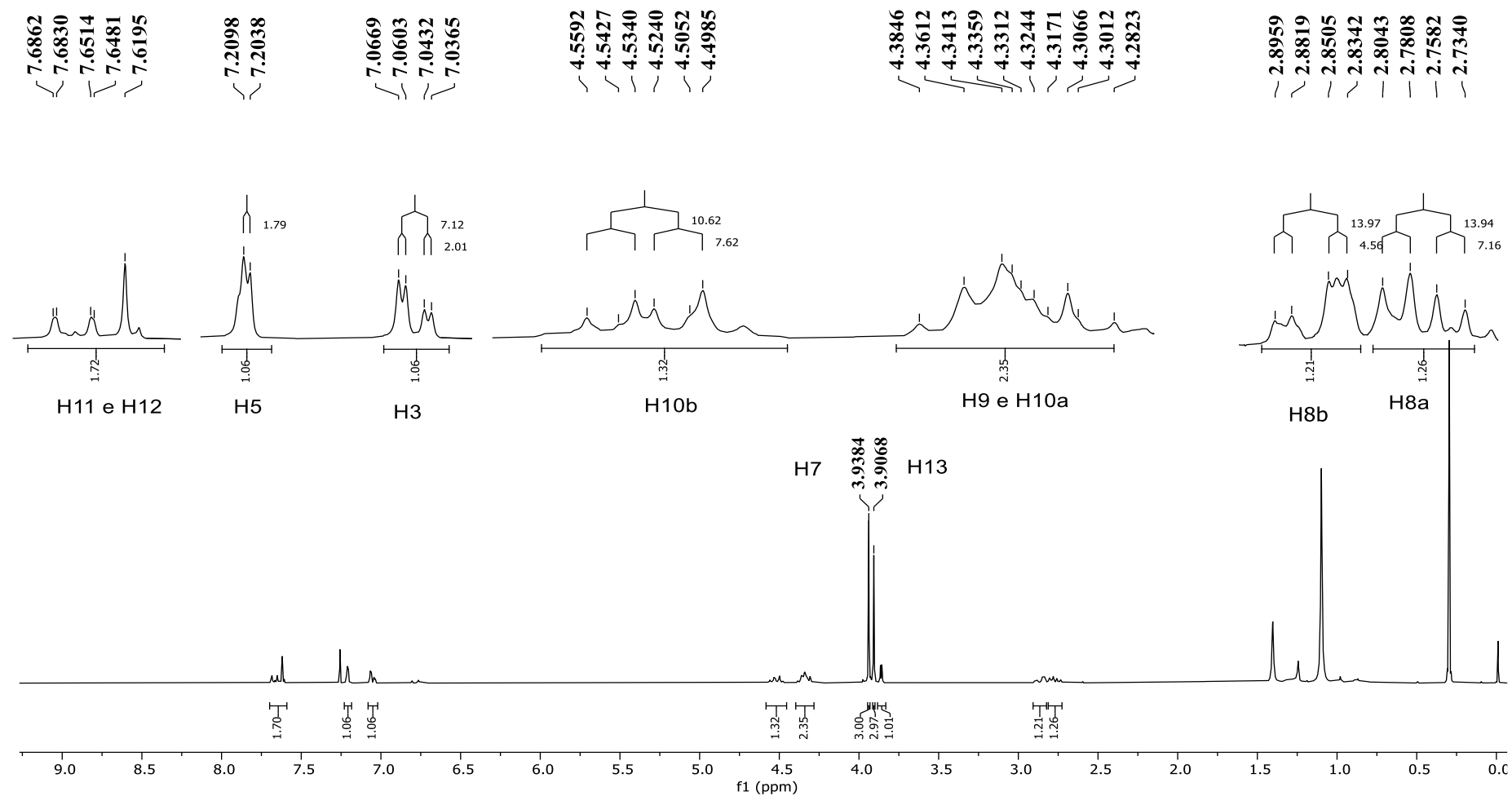


Fonte: Do autor.

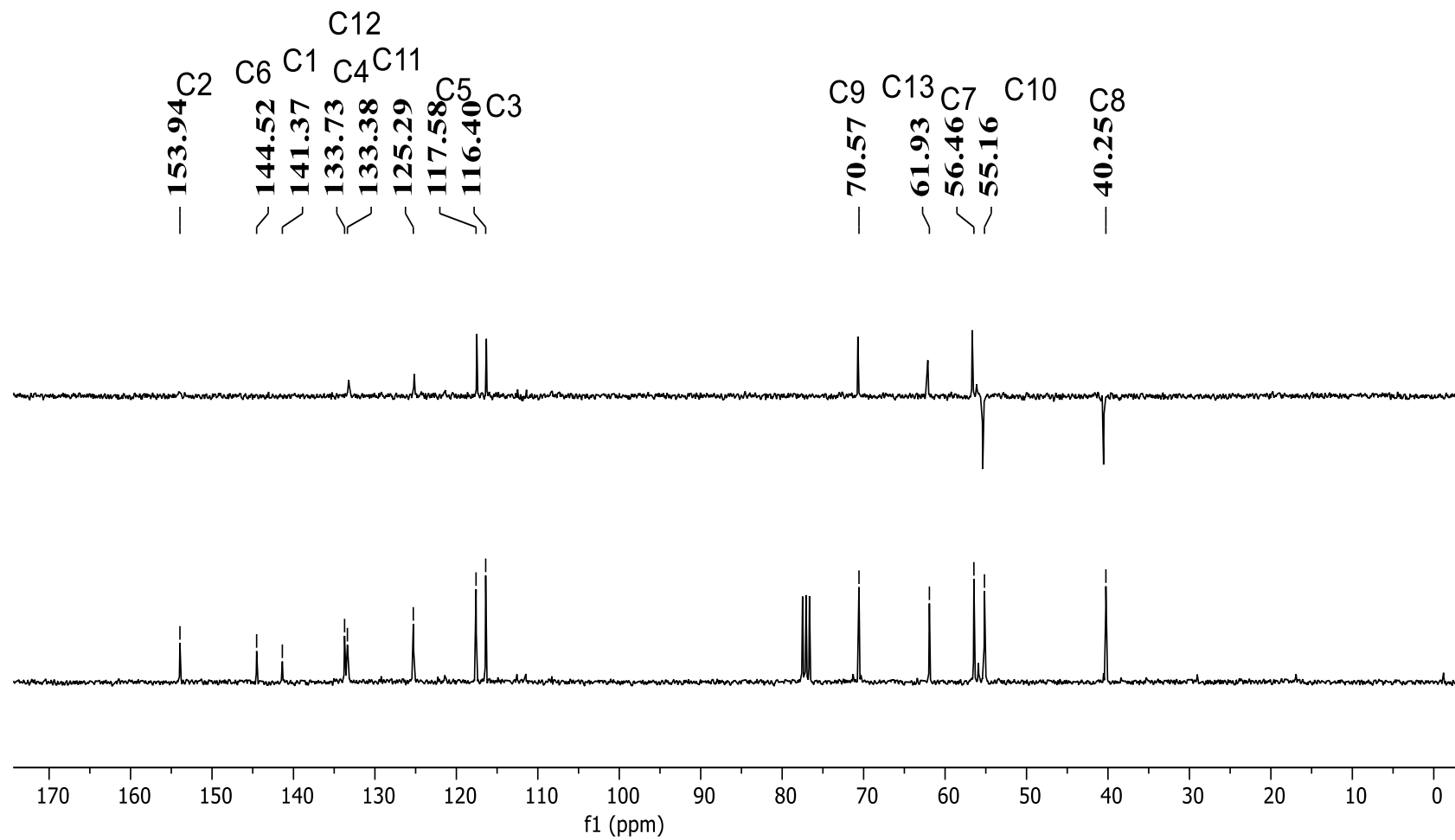
Figura 124 - Espectro de absorção na região do IV de **70**.

Fonte: Do autor.

Figura 125 - Espectro de RMN de ^1H de **70** (CDCl_3 , 300 MHz).

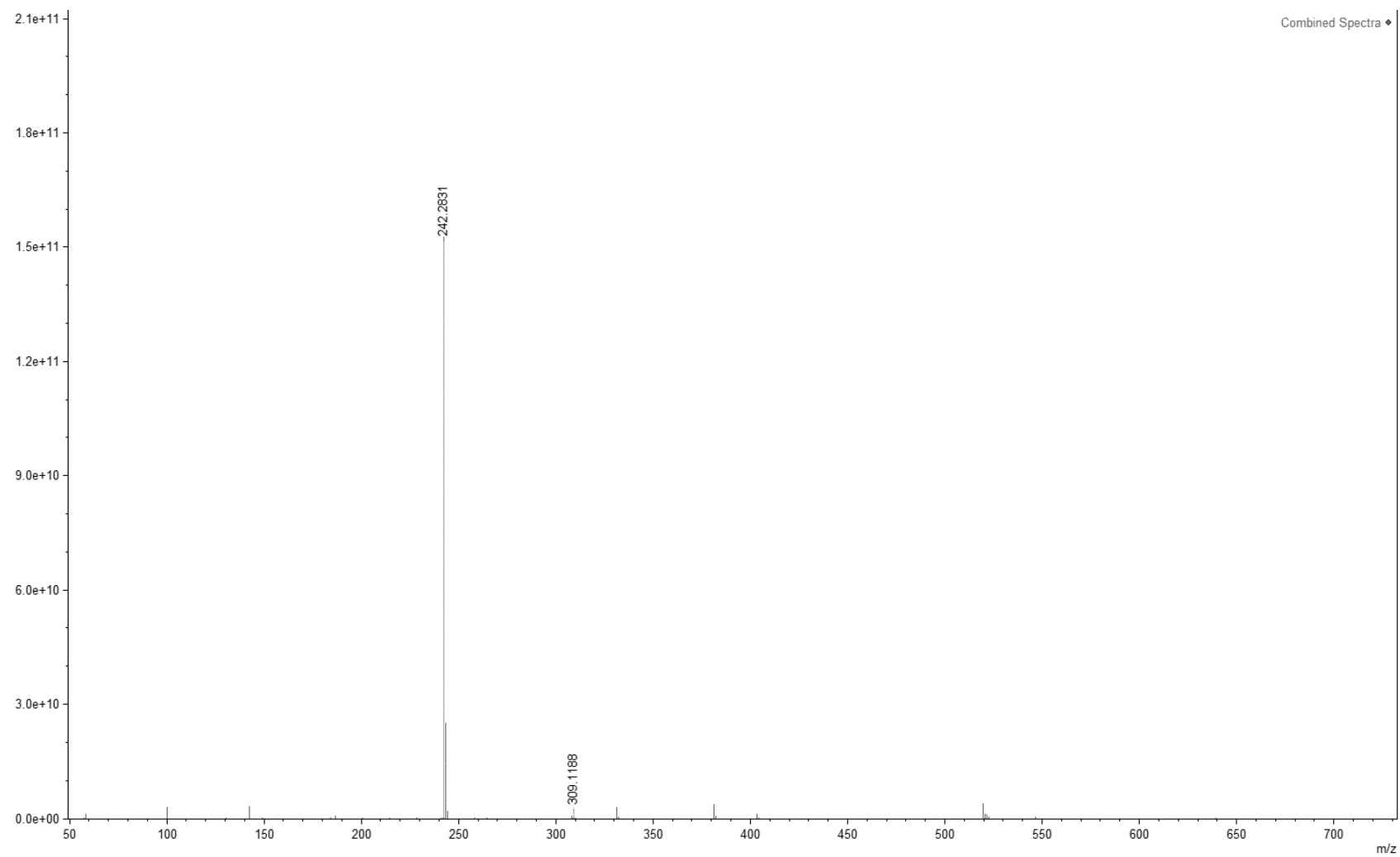


Fonte: Do autor.

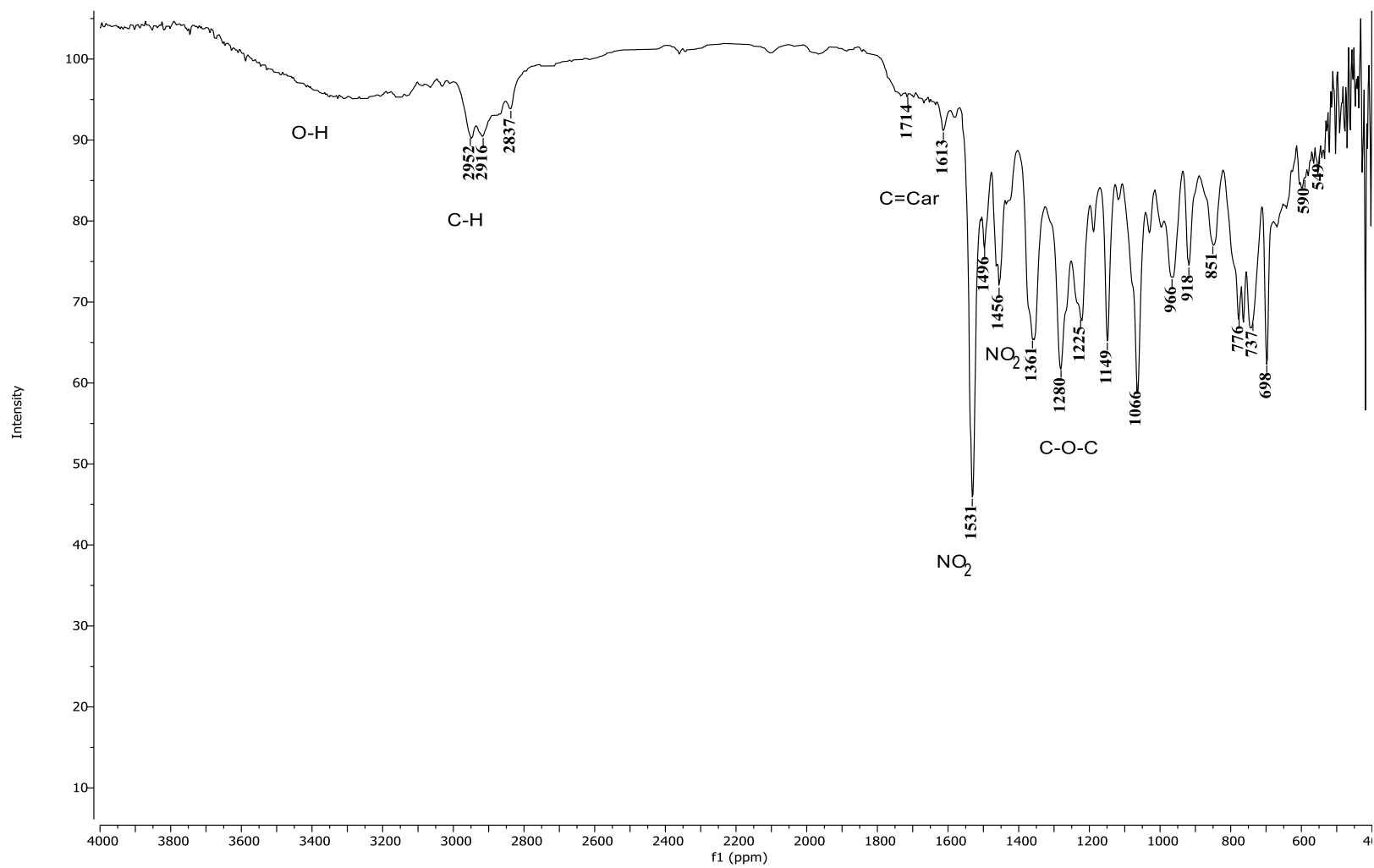
Figura 126 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **70** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

Figura 127 - Espectro de EM de 70

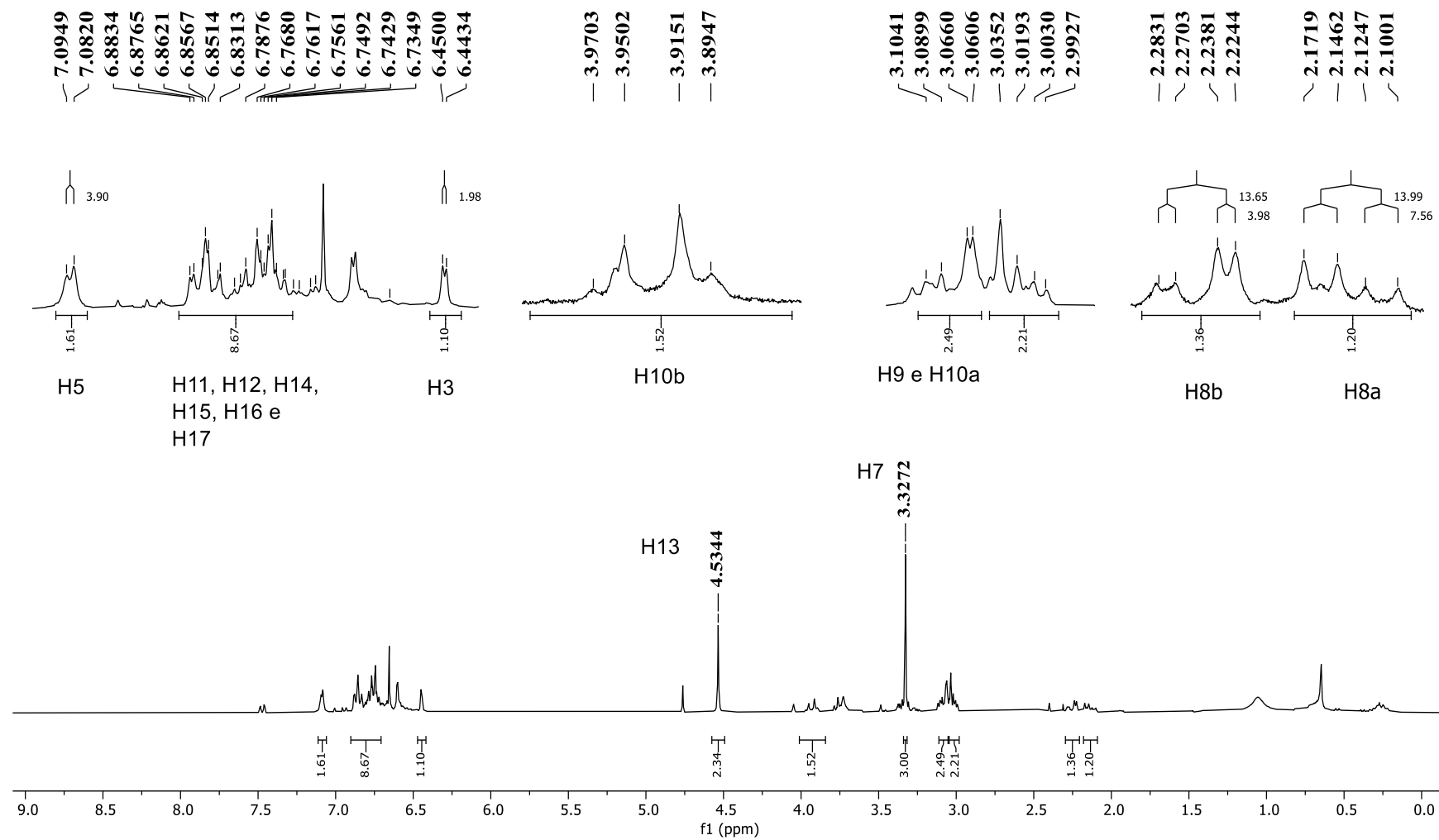


Fonte: Do autor.

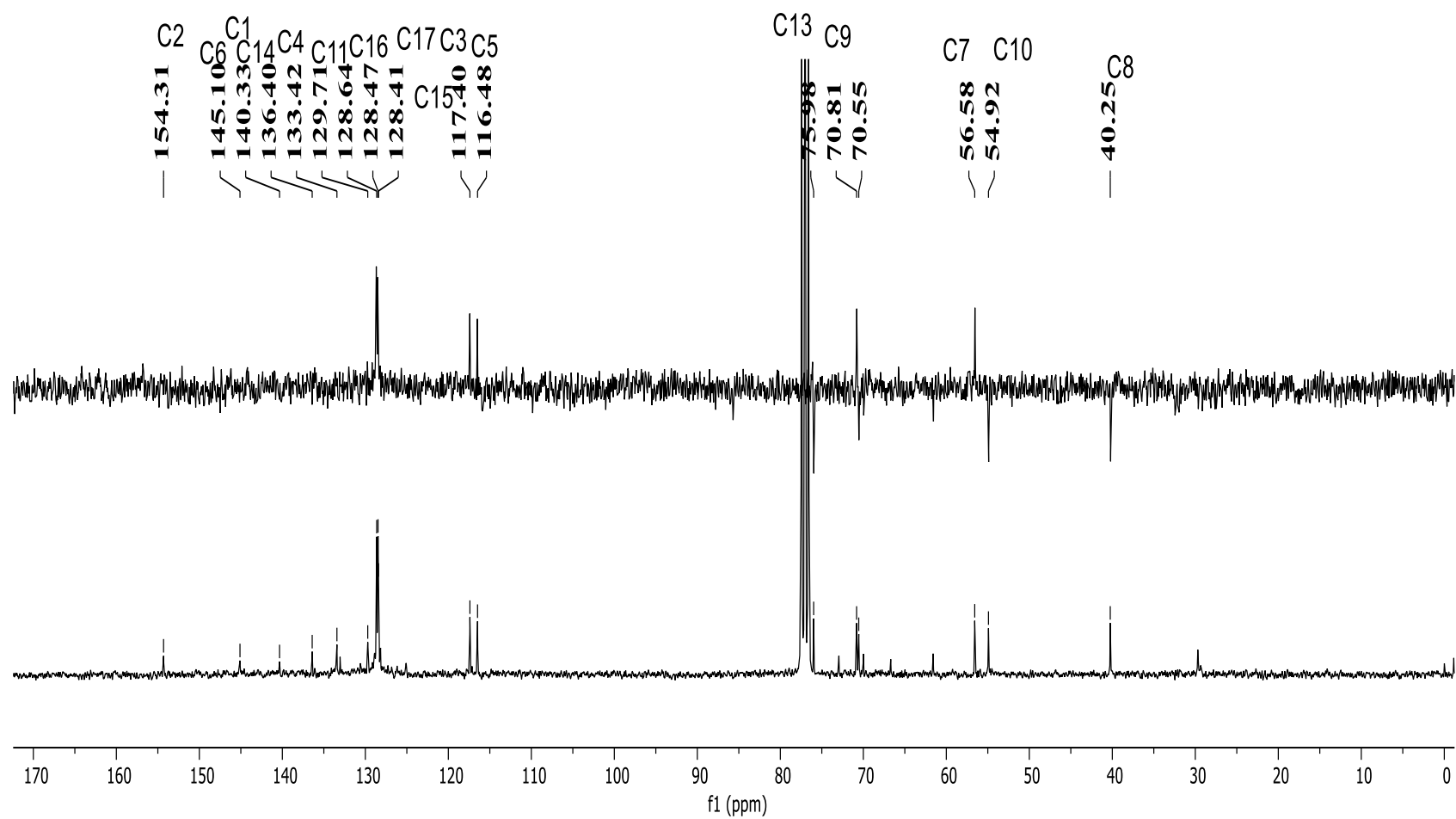
Figura 128 - Espectro de absorção na região do IV de **72**.

Fonte: Do autor.

Figura 129 - Espectro de RMN de ^1H de **72** (CDCl_3 , 300 MHz).

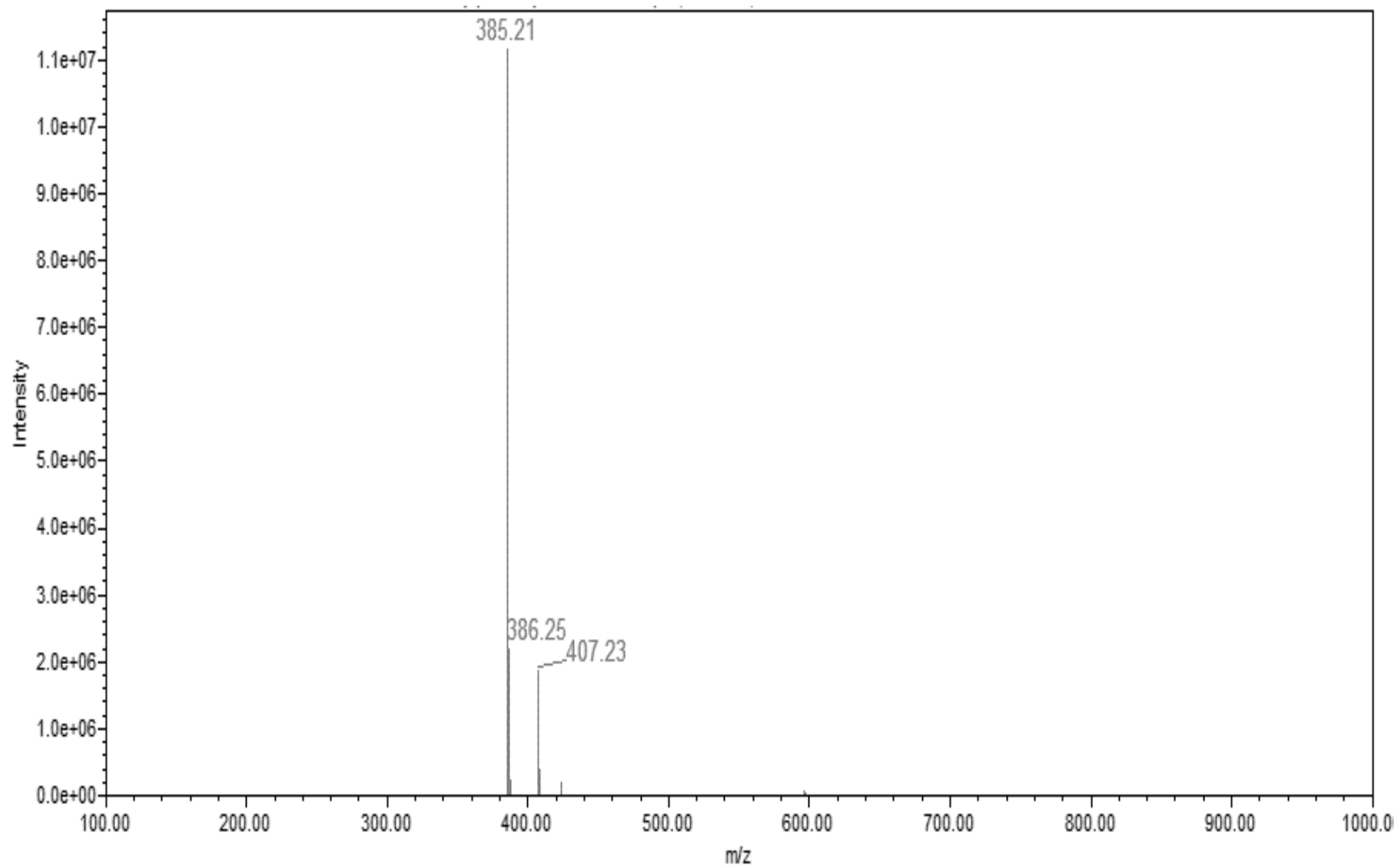


Fonte: Do autor.

Figura 130 - Espectro de RMN de ^{13}C e Subespectro DEPT-135 de **72** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

Figura 131 - Espectro de EM de 72



Fonte: Do autor.