

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**SÍNTESE E AVALIAÇÕES TRIPANOCIDA E MUTAGÊNICA DE
NITROIMIDAZÓIS SUBSTITUÍDOS COM DIFERENTES ANÉIS
AZÓLICOS**

BRUNA MARIA CASTRO SALOMÃO QUARESMA

Rio de Janeiro

2015



SÍNTESE E AVALIAÇÕES TRIPANOCIDA E MUTAGÊNICA DE NITROIMIDAZÓIS SUBSTITUÍDOS COM DIFERENTES ANÉIS AZÓLICOS

BRUNA MARIA CASTRO SALOMÃO QUARESMA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

Orientadores: Dra. Núbia Boechat e Dra. Alcione Silva de Carvalho

Rio de Janeiro
Março / 2015

Quaresma, Bruna Maria Castro Salomão.

Síntese e avaliações tripanocida e mutagênica de nitroimidazóis substituídos com diferentes anéis azólicos / Bruna Maria Castro Salomão Quaresma. Rio de Janeiro: UFRJ/ICB, 2015.

Dissertação (mestrado)- UFRJ/ICB/Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Rio de Janeiro, 2015.

Orientadores: Dra. Núbia Boechat e Dra. Alcione Silva de Carvalho

1. Doença de Chagas. 2. Nitroimidazóis. 3. Atividade Anti- *Trypanossoma cruzi* I. Boechat, Núbia & Carvalho, Alcione Silva II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós- Graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. Título.

"Síntese e Avaliações tripanocida e mutagênica de nitroimidazóis substituídos com diferentes anéis azólicos."

Bruna Maria Castro Salomão Quaresma

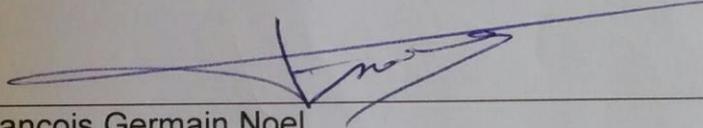
Orientadoras:

Prof.^a Dr.^a Nubia Boechat

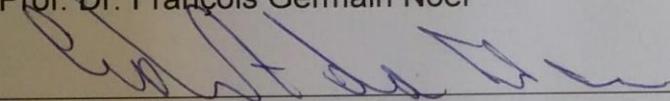
Prof.^a Dr.^a Alcione Silva de Carvalho

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

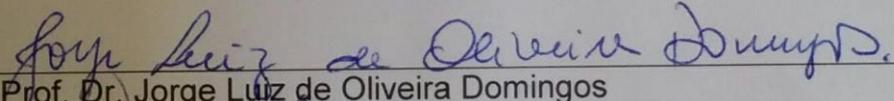
Aprovada por:



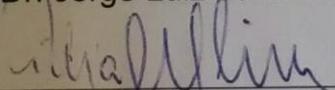
Prof. Dr. François Germain Noel



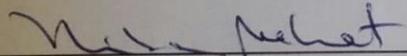
Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva



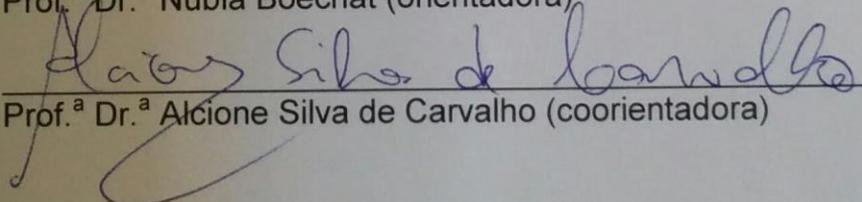
Prof. Dr. Jorge Luiz de Oliveira Domingos



Prof.^a Dr.^a Lidia Moreira Lima (Revisora)



Prof.^a Dr.^a Nubia Boechat (orientadora)



Prof.^a Dr.^a Alcione Silva de Carvalho (coorientadora)

Rio de Janeiro
24 de março de 2015

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)

“Dedico esta dissertação aos meus pais Ismar e Vânia, aos meus irmãos Marcelo e João, e ao meu namorado Tiago, pelo amor, paciência e por sempre terem acreditado em mim.”

AGRADECIMENTOS

Principalmente a Deus.

Agradeço a Dra. Núbia Boechat em especial, por toda sua orientação, apoio, amizade, conselhos e ensinamentos compartilhados. Obrigada pela imensa paciência comigo e muito obrigada pela oportunidade.

Agradeço a Dra. Alcione Carvalho em especial pela oportunidade de iniciar nesta carreira. Por ter me aceitado deste a iniciação científica. Obrigada pela IMENSA paciência, pelos ensinamentos, conselhos, auxílios, apoios e amizade. Obrigada por TUDO, obrigada por ser minha “mãe científica”!

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro e ao Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos) da Fiocruz por serem tão acolhedores e estimularem o aprendizado de seus alunos e pesquisadores

Ao órgão de fomento, a CAPES pela bolsa.

Aos colegas de pós-graduação, Natinha (Renata), Carlinhos, Fernando e Liviane, agradeço pelos momentos de estudos intensos, conversas, alegrias, conselhos e pela amizade neste período de mestrado.

Aos doutorandos e amigos Tissima (Rita) e Felipe, obrigada pelas inúmeras ajudas, conselhos, ensinamentos e amizades.

Aos colegas, do laboratório de Síntese Orgânica I de Farmanguinhos: Bruna Minardi, Elaine, Frederico, Jorge Lima, Mônica Bastos, Jessica, Sandra, Vanderléia, Carvalho, Daniele, e todos os colaboradores e alunos de IC, pela ajuda e companheirismo nesta jornada.

A Lúcia, Loudes, Miranda, Luis e Daniel pelas ajudas, ensinamentos, conselhos e amizade e as minhas amigas Natchê (Natalia) e Timone (Simone), pelo companheirismo e auxílio nesta jornada.

Ao colega de bancada João Mafra, por ter sido tão paciente, compreensivo e companheiro, mesmo quando um peixinho ou uma pinça sumia sem querer. Obrigada por ser essa pessoa tão especial e por me ensinar muito e como você sempre diz “Aprende que não vou durar pra sempre”. Obrigada também pelos momentos de cantoria nunca irei esquecer-me de “Besame Mucho” de sua autoria e lepeira.

À banca examinadora Dr. François, Dr. Edson e Dr. Jorge Luiz por terem aceitado o convite e por fazerem parte importante neste trabalho. Muito obrigada.

À Dra. Lídia Moreira por ter aceitado ser a revisora deste trabalho, além da atenção e ensinamentos de sempre.

Ao Dr. Samir Carvalho e Dr. Luis Eduardo M. Quintas por terem aceitado prontamente o papel de suplentes neste trabalho.

À Dra. Solange Wardel pela colaboração nas análises de cristalografia.

À Carla Menezes pela atenção, paciência e ensinamentos.

À Dra. Solange Castro e Dra. Kelly Salomão pela parceria nos proporcionando os testes biológicos, pelo companheirismo e auxílio.

À Dra. Helena Zamith, Msc e Ana Cláudia Trompowsky pela parceria nos proporcionando os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade.

À Dra. Claudia Aiub e Msc. Francisco Mello pela parceria nos proporcionando os ensaios de mutagenicidade.

Ao Silvio, pelas inúmeras ajudas com o reator PAR, pela amizade e ensinamentos, meu muito obrigada.

Ao colega Mazzei pela amizade, auxílio, orientação, ensinamentos e paciência com as análises de HPLC e SPA, obrigada.

À equipe de RMN Charles e Eliane, obrigada, pelo seu excelentíssimo trabalho, pela ajuda, pelos espectros divinos, por todos os conselhos, ensinamentos e amizade.

Ao pessoal da manutenção por todo o suporte prestado: Jorge, Sandro e todos os colaboradores.

Ao Leandro do suporte técnico, muito obrigada.

A todos da plataforma de métodos analíticos pelas análises cromatográficas de qualidade e por toda disponibilidade, atenção e paciência: Alexandre, Adélia, Rafaela, Shirley.

A todos os professores da Pós-Graduação, por todos os ensinamentos e palavras de incentivo, obrigada.

Ao meu namorado Tiago que sempre esteve me estimulando, encorajando, aconselhando e fazendo-me acreditar que seria possível ir até o fim.

E por último e não menos importante a minha família, meu pai Ismar, minha mãe Vânia e meus irmãos Marcelo e João, sem eles nada disso seria possível.

SUMÁRIO

I)- INTRODUÇÃO	1
1)- Tripanossomatídeo	1
1.1)- A doença de Chagas	1
1.1.1)- O ciclo evolutivo do protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.1.2)- Aspectos clínicos	6
1.2)- Quimioterapia da doença de Chagas	7
1.3)- Perspectivas para novos quimioterápicos	12
1.3.1)- Nitroimidazóis	19
1.3.2)- Triazóis	24
1.3.2.1)- 1,2,3-Triazóis: Aplicação Biológica e Síntese	26
1.3.2.2)- 1,2,4-Triazóis: Aplicação Biológica e Síntese	29
II-OBJETIVO	32
III-PLANEJAMENTO	33
VI- JUSTIFICATIVA	36
V- METODOLOGIA SINTÉTICA	37
VI- RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
1)- 1ª Metodologia	40
2)- 2ª Metodologia	72
3)- Avaliação da atividade anti- <i>T.cruzi</i>	96
4)- Resultados dos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade (Teste do cometa) e mutagenicidade (Teste de Ames).	103

VII- CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	109
VIII- EXPERIMENTAL DOS ENSAIOS BIOLOGICOS	111
1) Ensaio de Atividade Biológica dos novos 4-nitroimidazóis	111
1.1 Ensaio de Avaliação do Efeito in vitro na cepa Y da forma tripomastigota sanguínea de T.cruzi	111
2) Ensaio Cometa para Avaliação de dano ao DNA dos novos 4-nitroimidazóis.....	113
2.1- Metodologia: Método Eletroforético em Microgel	113
2.1.1- Ensaio de viabilidade celular mediado pelo diacetato de fluoresceína e brometo de etileno da substância	113
2.1.2-Ensaio Cometa	114
3- Ensaio de Mutagenicidade dos novos 4-nitroimidazóis.....	116
3.1- Metodologia: Teste de Ames	116
3.1.1- Controle negativo e positivo	116
3.1.2- Teste quantitativo de mutagenicidade e citotoxicidade (com pré-incubação) ...	116
IX- PARTE EXPERIMENTAL SINTÉTICA	119
1 – Instrumentação.....	119
2- Solventes e Reagentes	120
3- Primeira Metodologia Empregada	121
3.1- Preparação dos Novos Compostos Azólicos.....	121
3.1.1 - Técnica Geral de SNAr Utilizando como Base Dimsil (Carvalho, 2000)	121
3.1.2- Obtenção do 1'-metil-4'-nitro-1' <i>H</i> -1,5'-biimidazol (40a)	121
.....	

3.1.3- Obtenção do 1 <i>H</i> -1,2,4-triazol, 1-(<i>-</i> metil-4-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-5-il) (40b).....	122
.....	
.....	
4- Preparação das heteroaminas	123
4.1- Obtenção da Benzilazida (Ankati, 2009) (44).....	123
4.2-Técnica de Cicloadição de 1,2,3 Triazol via Click Chemistry (Kolb, 2001)	123
4.2.1- Obtenção do 1-benzil-4-ciclopropil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol (45a).....	124
4.2.2- Obtenção do 1-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carboxilato de etila (45b)	124
4.2.3- Obtenção do 1-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carboxilato de metila (45c)	125
4.2.4-Obtenção do 1-benzil -1 <i>H</i> -1,2,3-triazole-4-fenil (45f).....	125
4.3- Técnica Geral de hidrogenolise (Estermam and Seebach, 1988)	126
4.3.1- Obtenção do 4-ciclopropil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol (46a)	126
4.3.2- Obtenção do etil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carboxilato (46b).....	127
4.3.3- Obtenção do metil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carboxilato (46c)	127
4.3.4-Obtenção do 4-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol (46f)	128
5- Obtenção do 4-ciclopropil-1-(1-metil-4-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-5-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol (41a)	
.....	129
5.1- Obtenção do etil 1-(1-metil-4-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-5-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-	
carboxilato (41b)	130
6- Segunda Metodologia Empregada	131
6.1- Obtenção do intermediário chave 5-Azido-1-metil-4-nitroimidazol (47) (Taher,	
202).....	131
6.2- Técnica de Cicloadição de 1,2,3 Triazol via Click Chemistry (Kolb, 2001)	132
6.2.1- Obtenção do metil 1-(1-metil-4-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-5-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-	
carboxilato (41c).....	132

6.2.2- Obtenção do 1-(1-metil-4-nitro-1H-imidazol-5-il)-4-pentil-1H-1,2,3-triazol (41d).	133
6.2.3- Obtenção do 4-ciclohexenil-1-(1-metil-4-nitro-1H-imidazol-5-il)-1H-1,2,3-triazol (41e)	134
6.2.4- Obtenção do 1-(1-metil-4-nitro-1H-imidazol-5-il)-4-fenil-1H-1,2,3-triazol (41f)	135
6.2.5- Obtenção do 3-(1-(1-metil-4-nitro-1H-imidazol-5-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il) anilina (41g)	136
6.2.6- Obtenção do 1-(1-metil-4-nitro-1H-imidazol-5-il)-4-(4-pentilfenil)-1H-1,2,3-triazol (41h)	137
7- Preparação do intermediário chave 5-cloro-1-metil-4-nitroimidazol	138
7.1- Obtenção do 5-cloro-1-metilimidazol (Carvalho 2000)	138
7.1.1- Obtenção do 5-cloro-1-metil-4-nitroimidazol (Carvalho 2000)	139
X- REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICA	140

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica do número de casos da doença de Chagas em países não endêmicos	2
Figura 2: (A) <i>Triatoma infestans</i> , (B) <i>Rhodnius prolixus</i> e (C) <i>Triatoma dimidiata</i> , principais espécies de vetores que transmitem a doença de Chagas	3
Figura 3: Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> : epimastigota (A); tripomastigotas metacíclicos (B); tripomastigotas sanguíneas (C) e amastigotas (D).....	4
Figura 4: Ciclo de vida do <i>T. Cruzi</i>	5
Figura 5: Estruturas químicas de fucsina (rosanilina dye) (1), violeta de genciana (2), 5-nitrofurazona (3), megalzol (4), nifurtimox (5), benzonidazol (6), posaconazol (7) e fexinidazol (8).....	8
Figura 6: Estrutura química do posaconazol (7).	16
Figura 7: Estrutura química do ravuconazol (13) e seu análogo E 1224 (14).....	16
Figura 8: Estrutura química da nitazoxanida (15) e do benzonidazol (5).	17
.....	
Figura 9: Estrutura química do fexinidazol (8).	18
Figura 10: Estrutura química dos nitroheterociclos eflornitina (16), PA-824 (17) e OPC-67683 (18)	18
Figura 11: Exemplos de nitroimidazóis com diversas atividades biológicas.....	19
Figura 12: Estrutura química do megalzol (4)	20
Figura 13: Estruturas químicas de Brazilizona A (28) e megalzol (4).	21
Figura 14: Estrutura química de 29 e 4.	21
Figura 15: Estrutura química do metronidazol (19) e seu análogo (30).....	22
Figura 16: Exemplos de fármacos contendo o núcleo triazólico.	25

Figura 17: Bioisosterismo de anel entre imidazol e 1,2,4-triazol.....	29
Figura 18: Estrutura química dos 4-nitroimidazóis (40a-b e 41a-h).	32
Figura 19: Planejamento do composto 41f	34
Figura 20: Planejamento para os compostos 41g e 41h	34
Figura 21: Planejamento dos compostos 41e e 41a	35
Figura 22: Planejamento dos compostos 41b , 41c e 41d	35
Figura 23: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de 41a	60
Figura 24: Estrutura cristalográfica de 41a	63
Figura 25: Ligações de hidrogênio intermolecular do composto 41a	64
Figura 26: O arranjo da molécula 41a produzida a partir de todas as interações intermoleculares.	65
Figura 27: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de 41b	66
Figura 28: Estrutura cristalográfica de 41b	68
Figura 29: Ligações de hidrogênio intermolecular do composto 41b	69-70
Figura 30: O arranjo da molécula 41b produzida a partir de todas as interações intermoleculares.	71
Figura 31: Espectro de infravermelho do composto 47	73
Figura 32: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de 47	74
Figura 33: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em DMSO-d_6 de 41c	77
Figura 34: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de 41d	79
Figura 35: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em DMSO-d_6 de 41d	80
Figura 36: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de 41e	84
Figura 37: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de 41f	87
Figura 38: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de 41g	90

Figura 39: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de 41h	93
Figura 40: Estruturas químicas de 40a e 40b com seus CI_{50} contra formas tripomastigostas sanguíneas de <i>T. cruzi</i> (cepa Y)	99
Figura 41: Estruturas químicas dos 41a , 41e e 41f com seus CI_{50} e a analogia de 41f e 41h com benzonidazol contra formas tripomastigostas sanguíneas de <i>T. cruzi</i> (cepa Y).....	100
Figura 42: Estrutura química dos compostos 41f , 41g e 41h com seus CI_{50} contra formas tripomastigostas sanguíneas de <i>T. cruzi</i> (cepa Y)	100
Figura 43: Estruturas químicas dos compostos 41f a 41d com seus CI_{50} contra formas tripomastigostas sanguíneas de <i>T. cruzi</i> (cepa Y)..	101
Figura 44: Estrutura química dos compostos 41b , 41c , 41f , 41h e 41a com seus respectivos CI_{50} contra formas tripomastigostas sanguíneas de <i>T. cruzi</i> (cepa Y).	102
Figura 45: Estruturas químicas dos compostos testados para atividade toxicológica <i>in vitro</i> 40a-b e 41a-b	104

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Mecanismo de ação proposto para o nifurtimox (5).....	10
Esquema 2: Mecanismo de ação proposto para o benzonidazol (6).....	11
Esquema 3: Tautomerismo do 4-nitroimidazol e 5-nitroimidazol.	22
Esquema 4: Nitração de <i>N</i> -metil-imidazol.	23
Esquema 5: Nitração de <i>N</i> -metil-imidazol em NaNO ₃ / H ₂ SO ₄	23
Esquema 6: Nitrodehalogenação de imidazóis.	23
Esquema 7: Diazotação do 2-amino imidazol.	24
Esquema 8: Equilíbrio tautomérico em 1,2,3- e 1,2,4-triazóis.	25
Esquema 9: Obtenção pioneira de 1,2,3-triazóis pela metodologia Pechmann.	27
Esquema 10: Obtenção de 1,2,3-triazóis via ciclização [2N + 1N] de Wolff.	27
Esquema 11: Síntese de 1,2,3-triazóis via Huisgen.	28
Esquema 12: Síntese de 1,2,3-triazóis pela metodologia, a “click chemistry”.	28
Esquema 13: Metodologia [2N + 1N] para a preparação de 1,2,4-4 <i>H</i> -triazóis.	30
Esquema 14: Obtenção de 3-amino-1,2,4-1 <i>H</i> -triazóis utilizando aminoguanidina.	30
Esquema 15: Planejamento dos novos 4-nitroimidazóis (40a-b e 41a-h).	33
Esquema 16: Retrossíntese proposta para a obtenção dos novos 4-nitroimidazóis (40a-b e 41a-h).	37
Esquema 17: Retrossíntese proposta para os azóis (41a-h).	38
Esquema 18: Retrossíntese proposta para a obtenção dos novos 4-nitroimidazóis (41c-h).	39
Esquema 19: Mecanismo proposto de S _N Ar.	40
Esquema 20: Formação do “dmsyl sodium”.	41
Esquema 21: Obtenção do composto final 40a	41

Esquema 22: Principais propostas de fragmentações do 1'-metil-4'-nitro-1' <i>H</i> -1,5'- biimidazole (40a).....	42
Esquema 23: Obtenção do composto final 41b	43
Esquema 24: Principais propostas de fragmentações de 41b	43
Esquema 25: Estruturas químicas com 1- <i>H</i> -triazol e 4- <i>H</i> -triazol	44
Esquema 26: Possíveis formas tautoméricas do 1,2,4-triazol	45
Esquema 27: Síntese do fluconazol (48).	45
Esquema 28: Proposta de mecanismo de obtenção da benzilazida (44).	47
Esquema 29: Obtenção 1-benzil-4-ciclopropil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol (45a).....	47
Esquema 30: Mecanismo proposto para a reação de cicloadição 1,3-dipolar.....	48
Esquema 31: Principais propostas de fragmentações de 1-benzil-4-ciclopropil-1 <i>H</i> - 1,2,3-triazol (45a).....	49
Esquema 32: Obtenção 1-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carboxilato de etila (45b).....	50
Esquema 33: Principais propostas de fragmentações de 1-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4- carboxilato de etila (45b).....	50
Esquema 34: Obtenção do 1-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carboxilato de metila (45c).....	51
Esquema 35: Propostas de mecanismo com as principais fragmentações de 1-benzil- 1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carboxilato de metila (45c).....	52
Esquema 36: Obtenção do 1-benzil-4-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol (45f).....	52
Esquema 37: Tentativas de obtenção dos compostos 46c e 46f	53
Esquema 38: Tentativas de obtenção dos compostos 46a-b	54
Esquema 39: Obtenção do composto 46a	54
Esquema 40: Obtenção do composto 46b	55
Esquema 41: Mecanismo proposto para a principais fragmentações do composto 46b	56

Esquema 42: Obtenção do composto 46c	56
Esquema 43: Principal fragmentação proposta para 46c	57
Esquema 44: Obtenção do composto 46f	57
Esquema 45: Obtenção do composto final 41a	58
Esquema 46: Proposta de mecanismo de para as principais fragmentações do composto 41a	59
Esquema 47: Possíveis produtos devido ao tautomerismo do 1,2,3-triazol em solução.	62
Esquema 48: Obtenção do composto final 41b	65
Esquema 49: Obtenção do intermediário chave 47	72
Esquema 50: Proposta simplificada do mecanismo para formação dos novos nitroimidazóis 41c-h	75
Esquema 51: Obtenção do composto final 41c	75
Esquema 52: Obtenção do composto final 41d	78
Esquema 53: Obtenção do composto final 41e	83
Esquema 54: Obtenção do composto final 41f	86
Esquema 55: Obtenção do composto final 41g	89
Esquema 56: Obtenção do composto final 41h	92
Esquema 57: obtenção do 5-cloro-1-metilimidazol (50)	95
Esquema 58: obtenção do 5-cloro-1-metil-4-nitroimidazol (42).....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de alguns alvos moleculares que podem ser utilizados para o planejamento de novos compostos com ação anti- <i>T. cruzi</i>	13
Tabela 2: Diversas estratégias utilizando 1,2,3 triazol	26
Tabela 3: Dados comparativos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C dos compostos 40a-b	46
Tabela 4: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de 41a (δ relativo ao TMS, ¹ H a 400 MHz, ¹³ C a 100 MHz solvente DMSO- <i>d</i> ₆).	61
Tabela 5: Principais frequências de absorção na região do I.V no espectro do novo composto 41a (ATR).	62
Tabela 6: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de 41b (δ relativo ao TMS, ¹ H a 400 MHz, ¹³ C a 100 MHz solvente DMSO- <i>d</i> ₆).	67
Tabela 7: Principais frequências de absorção na região do I.V no espectro do novo composto 41b (ATR).	68
Tabela 8: Principais frequências de absorção na região do I.V no espectro do novo composto 47 (ATR).	73
Tabela 9: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de 41c (δ relativo ao TMS, ¹ H a 400 MHz, ¹³ C a 100 MHz solvente DMSO- <i>d</i> ₆).	76
Tabela 10: Principais frequências de absorção na região do I.V no espectro do novo composto 35c (ATR).	78
Tabela 11: Principais frequências de absorção na região do I.V no espectro do novo composto 41d (ATR).	81
Tabela 12: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C dos compostos 41b , 41c e 41d (δ relativo ao TMS, ¹ H a 400 MHz, ¹³ C a 100 MHz, solvente DMSO- <i>d</i> ₆).	82
Tabela 13: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C dos compostos 41e (δ relativo ao TMS, ¹ H a 400 MHz, ¹³ C a 100 MHz solvente DMSO- <i>d</i> ₆).	85

Tabela 14: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 41f (δ relativo ao TMS, ^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz solvente $\text{DMSO-}d_6$).	88
Tabela 15: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 41g (δ relativo ao TMS, ^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz solvente $\text{DMSO-}d_6$).	91
Tabela 16: Principais frequências de absorção na região do I.V no espectro do novo composto 41g (ATR).	92
Tabela 17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 41h (δ relativo ao TMS, ^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz solvente $\text{DMSO-}d_6$).	94
Tabela 18: Atividade <i>in vitro</i> dos compostos 40a-b e 41a-h , dos padrões benzonidazol e megazol sobre as formas tripomastigotas sanguíneas de <i>T. cruzi</i> na cepa Y e suas formas moleculares e peso molecular.....	97
Tabela 19: Resultados do ensaio de viabilidade celular (citotoxicidade) e do ensaio Cometa (genotoxicidade) em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i>	106
Tabela 20: Valores médios da inclinação da curva (potência mutagênica) determinados pelo método de Bernstein do megazol e seus análogos (41a-b).	107
Tabela 21: Intervalos de potenciais para a caracterização de mutagenicidade em Teste de Ames.	108
Tabela 22: Relação das linhagens de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium derivadas de LT1 utilizadas nos testes quantitativo e qualitativo de mutagenicidade e suas respectivas características genóticas.....	118

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1: Concentração que produz em 50% a lise do parasito (CI ₅₀) do composto 41a	112
--	-----

ANEXO

ÍNDICE DE ESPECTROS

Figura 1: Espectro de Massa (EM) do Composto 40a em MeOH.	1
Figura 2: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 40a	2
Figura 3: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 40a	3
Figura 4: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 40a	4
Figura 5: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 40a	5
Figura 6: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 40a	6
Figura 7: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 40a	7
Figura 8: Espectro de Massa (EM) do Composto 40b em MeOH.	8
Figura 9: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 40b	9
Figura 10: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 40b	10
Figura 11: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 40b	11
Figura 12: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 40b	12
Figura 13: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 40b	13
Figura 14: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto 40b em ATR.	14
Figura 15: Espectro de Massa de alta resolução do composto 40b	15
Figura 16: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto 44 em KBr.	16
Figura 17: Espectro de Massa (EM) do Composto 45a em MeOH.	17
Figura 18: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 45a	18
Figura 19: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 45a	19
Figura 20: Espectro de Massa (EM) do Composto 45b em MeOH.	20
Figura 21: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 45b	21
Figura 22: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 45b	22
Figura 23: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 46b	23
Figura 24: Espectro de Massa (EM) do Composto 45f em MeOH.	24

Figura 25: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 45f	25
Figura 26: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 45f	26
Figura 27: Espectro de Massa (EM) do Composto 46a em MeOH.	27
Figura 28: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 46a	28
Figura 29: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 46a	29
Figura 30: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 46a	30
Figura 31: Espectro de Massa (EM) do Composto 46b em MeOH.	31
Figura 32: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 46b	32
Figura 33: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 46b	33
Figura 34: Espectro de Massa (EM) do Composto 46c em MeOH.....	34
Figura 35: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 46c	35
Figura 36: Espectro de Massa (EM) do Composto 46f em MeOH.	36
Figura 37: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 46f	37
Figura 38: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 46f	38
Figura 39: Espectro de Massa (EM) do Composto 41a em MeOH.	39
Figura 40: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41a	40
Figura 41: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41a	41
Figura 42: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 40a	42
Figura 43: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 40a	43
Figura 44: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto 41a em ATR.	44
Figura 45: Espectro de Massa de alta resolução do composto 41a	45
Figura 46: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41b	46
Figura 47: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41b	47
Figura 48: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41b	48
Figura 49: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41b	49
Figura 50: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto 41b em ATR.	50
Figura 51: Espectro de Massa de alta resolução do composto 41b	51
Figura 52: Espectrometria de Massa com Ionização por Eletrospray [ESI-MS (+)] em modo positivo de composto 41b	52
Figura 53: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto 47 em ATR.	53
Figura 54: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 47	54

Figura 55: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41c	55
Figura 56: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41c	56
Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41c	57
Figura 58: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41c	58
Figura 59: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41c	59
Figura 60: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41c	60
Figura 61: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto 41c em ATR.....	61
Figura 62: Espectro de Massa de alta resolução do composto 41c	62
Figura 63: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41d	63
Figura 64: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41d	64
Figura 65: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41d	65
Figura 66: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41d	66
Figura 67: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41d	67
Figura 68: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41d	68
Figura 69: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41d	69
Figura 70: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto 41d em ATR.....	70
Figura 71: Espectro de Massa de alta resolução do composto 41d	71
Figura 72: Espectrometria de Massa com Ionização por Eletrospray [ESI-MS (+)] em modo positivo de composto 41d	72
Figura 73: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41e	73
Figura 74: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41e	74
Figura 75: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41e	75
Figura 76: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41e	76
Figura 77: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41e	77
Figura 78: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 41e	78

Figura 79: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41e	79
Figura 80: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41f	80
Figura 81: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41f	81
Figura 82: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41f	82
Figura 83: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41f	83
Figura 84: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41f	84
Figura 85: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41f	85
Figura 86: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41f	86
Figura 87: Espectro de Massa de alta resolução do composto 41f	87
Figura 88: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41g	88
Figura 89: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41g	89
Figura 90: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41g	90
Figura 91: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41g	91
Figura 92: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41g	92
Figura 93: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41g	93
Figura 94: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41g	94
Figura 95: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto 41g em ATR.....	95
Figura 96: Espectro de Massa de alta resolução do composto 41g	96
Figura 97: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41h	97
Figura 98: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41h	98
Figura 99: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41h	99
Figura 100: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41h	100
Figura 101: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41h	101
Figura 102: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41h	102

Figura 103: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41h	103
Figura 104: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 41h	104
Figura 105: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto 41h em ATR.	105
Figura 106: Espectrometria de Massa com Ionização por Eletrospray [ESI-MS (+)] em modo positivo de composto 41h	106
Figura 107: Espectro de Massa (EM) do Composto 50 em MeOH.	107
Figura 108: Espectro de Massa (EM) do Composto 42 em MeOH.	108

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

δ – Deslocamento Químico (em ppm)

CCF- Cromatografia de camada fina

CG/EM- Cromatografia gasosa acoplada ao espectrometria de massas

d - Duplete (RMN)

DMSO- Dimetilsulfóxido

DMSO_{d6}- Dimetilsulfóxido deuterado

DNA – Sigla em inglês para cido Desoxirribonucléico (ADN)

DNDi- Sigla em inglês para *iniciativa* de Medicamentos para Doenças Negligenciadas

h - Horas

HSQC- Experimento bidimensional (2D) de ressonância magnética nuclear (RMN) que permite detectar qual hidrogênio está diretamente ligado a determinado carbono. Sigla do inglês, Heteronuclear Single Quantum Coherence (Coerência quântica heteronuclear simples)

Hz - Hertz

CI₅₀ – Concentrao inibitória média

IV- Espectroscopia na região do infravermelho

J – Constante de acoplamento

m - Multiplete (RMN)

m/z – Relao massa/carga

MeOH- Metanol

NTR-I - Enzima nitroreductase tipo I

NTR-II - Enzima nitroreductase tipo II

OMS- Organização Mundial de Saúde

P.F – Ponto de fusão

RMN ¹³C- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN ¹H- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

ROS - Espécies reativas de oxigênio

s - Simpleto (RMN)

S_N2- Substituição nucleofílica bimolecular

S_NAr- Substituição Nucleofílica Aromática

T. brucei – *Trypanosoma brucei*

T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*

t.a. – Temperatura ambiente

ν - Frequência (em Hertz) (Infravermelho)

sx- Sexteto (RMN)

q- Quinteto (RMN)

ESI-MS (+)- Espectrometria de Massa com Ionização por Eletrospray em modo positivo.

RESUMO

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é um dos principais problemas socioeconômicos enfrentados na América Latina, onde existem aproximadamente 18 milhões de pessoas infectadas e 12 mil vão a óbito por complicações decorrentes da parasitose. A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que a problemática é mundial e de grande importância, devido ao avanço da doença no Brasil, em regiões não endêmicas e em países como a Espanha, EUA e Austrália. A sua quimioterapia se restringe a apenas dois fármacos, o nifurtimox (descontinuado no Brasil, Chile e Uruguai) e o benzonidazol. Estes fármacos estão longe de serem considerados ideais, devido ao seu longo período de tratamento, baixa eficácia na fase crônica e graves efeitos adversos. Assim, a busca para o desenvolvimento de novas substâncias bioativas se faz necessária e urgente. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi a síntese e a avaliação tripanocida, mutagênica e genotóxica de novos 4-nitroimidazóis (**40a-b** e **41a-h**). Neste trabalho foram investigadas duas metodologias sintéticas para a obtenção dos compostos **40a-b** e **41a-h** e foram obtidos 10 produtos finais, sendo 8 inéditos. Em relação a atividade tripanocida, os compostos **41a** e **41h** foram os mais ativos da série no teste *in vitro* contra *T. cruzi* na forma tripomastigota sanguínea em cepa Y, sendo **41a** o mais importante, por ser duas vezes mais ativo do que o benzonidazol e seu protótipo megazol. Considerando a toxicidade, os ensaios de mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade dos compostos **41a** e **41b** apresentaram níveis baixos de mutagenicidade e genotoxicidade e nenhum dos avaliados apresentou citotoxicidade. Diante desses resultados, conseguiu-se alcançar a proposta deste trabalho, a obtenção de uma substância mais ativa do que seu protótipo e menos genotóxica e mutagênica. Confirmando assim, mais uma vez, que é possível obter compostos nitroimidazólicos com alta atividade tripanocida e sem o efeito toxicológico *in vitro*. O composto **41a** se encontra em fase de ensaio *in vivo* contra *T. cruzi*.

Palavras-chave: Tripanossomatídeos; doença de Chagas; megazol, 4-nitroimidazóis; mutagenicidade; genotoxicidade.

ABSTRACT

Chagas disease or African trypanosomiasis is a major socioeconomic problem faced in Latin America where there are approximately 18 million infected and 12,000 will die from complications of parasitosis. World Health Organization (WHO) recognizes that the problem is global and of great importance, due to the advancement of the disease in Brazil, in non-endemic regions and countries such as Spain, USA and Australia. Its chemotherapy is restricted to only two drugs, nifurtimox (discontinued in Brazil, Chile and Uruguay) and benznidazole. These drugs are far from being considered ideal because of its long period of treatment, low efficacy in chronic and serious adverse effects. Thus, the search for the development of new bioactive substances is necessary and urgent. Hence, the objective of this work was the synthesis, trypanocidal, mutagenic, and genotoxic evaluation of new 4-nitroimidazoles (**40a-b** and **41a-h**). In this paper, we report two synthetic methodologies for obtaining the compounds **40a-b** and **41a-h** and were obtained 10 final products, 8 unpublished. With respect to trypanocidal activity, compounds **41a** and **41h** were the most active of the series in the *in vitro* test against *T. cruzi* in trypomastigotes form Y strain, and **41a** is the most important because it is twice as active as benznidazole and its megazole prototype. Considering the toxicity, mutagenicity, genotoxicity and cytotoxicity assays of compounds **41a** and **41b** showed extremely low levels of mutagenicity and genotoxicity and none of them presented toxicity. From these results, it was possible to achieve the purpose of this study, to obtain a more active and less mutagenic and genotoxic substance than their prototype. Thus, we can confirm that it is possible to separate these two activities in nitroimidazole compounds and thus obtain a molecule with high trypanocidal activity and without the toxicological effect. The compound **41a** is in *in vivo* test phase against *T. cruzi*.

Keywords: Trypanosomatids; Chagas disease; megazole; 4-nitroimidazoles; mutagenicity; genotoxicity.

I- INTRODUÇÃO

1. Tripanossomatídeo

As doenças parasitárias tropicais causadas por protozoários da família *Trypanosomatidae*, como a doença de Chagas (tripanossomíase americana), a tripanossomíase humana africana (doença do sono) e a leishmaniose, representam o maior número de mortes entre as doenças tropicais negligenciadas, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). As doenças negligenciadas afetam sempre uma grande parcela da população mundial e exercem influência limitante na qualidade de vida e no desenvolvimento dos países em que ocorrem (DEMORO *et. al.*, 2013; BOSCARDIN *et. al.*, 2010).

1.1 A doença de Chagas

Descoberta há mais de um século pelo médico e pesquisador Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, a tripanossomíase americana, popularmente conhecida como doença de Chagas, é uma doença parasitária que aflige diversas populações em diferentes países. Ela é considerada endêmica nos países da América Latina e Central e vem se disseminando também em outras partes do mundo, como resultado de imigração (Figura 1). Nos últimos anos, são frequentes os registros desta doença nos Estados Unidos, Canadá, em países da Europa, na Austrália e no Japão (FRANÇA *et. al.*, 2014 e URBINA, 2010).

Há cerca de 18 milhões de pessoas infectadas na América Latina, dos quais 3 milhões estão no Brasil. Ela é responsável por cerca de 12 mil mortes por ano, no mundo. A doença de Chagas tem duas fases, a primeira é a aguda, e a segunda fase, chamada de crônica, o tratamento existente é ineficaz, por não conseguir eliminar o parasito, portanto, não tendo cura (WILKINSON *et. al.*, 2011 e URBINA, 2010).

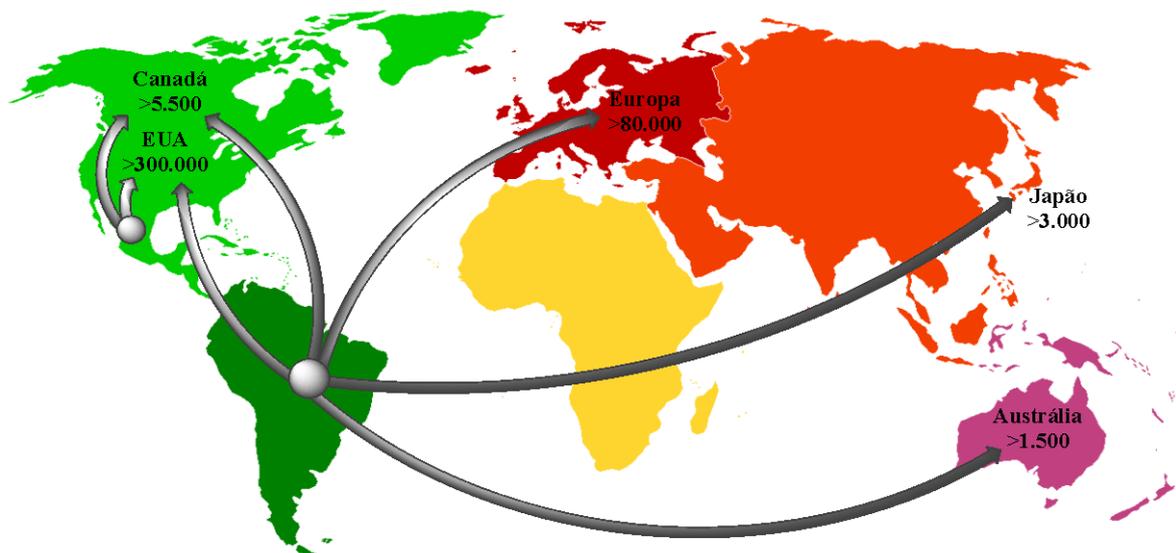


Figura 1: Distribuição geográfica do número de casos da doença de Chagas em países não endêmicos (FRANÇA *et. al.*, 2014).

Inicialmente, a principal via de transmissão era vetorial, através da picada da fêmea do *Triatoma infestans*, conhecido popularmente como barbeiro. Porém, com avanço do controle desse agente etiológico, hoje a maior via de transmissão é a oral, através da ingestão de alimentos contaminados. Existem também outras vias de transmissão como a vertical, de mãe para filho, por transfusão sanguínea e através de transplante de órgãos (URBINA, 2010).

1.1.1- O ciclo evolutivo do protozoário *Trypanosoma cruzi*

O protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* pertence à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Trypanosoma sp.* Tem como vetor o inseto pertencente à ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*. O parasito é transmitido por diversas espécies de triatomíneos, sendo os principais vetores *Triatomas infestans*, *Rhodinus prolixus* e *Triatoma dimidiata* (Figura 2) (RASSI Jr *et. al.*, 2010 e NOIREAU *et. al.*, 2005).

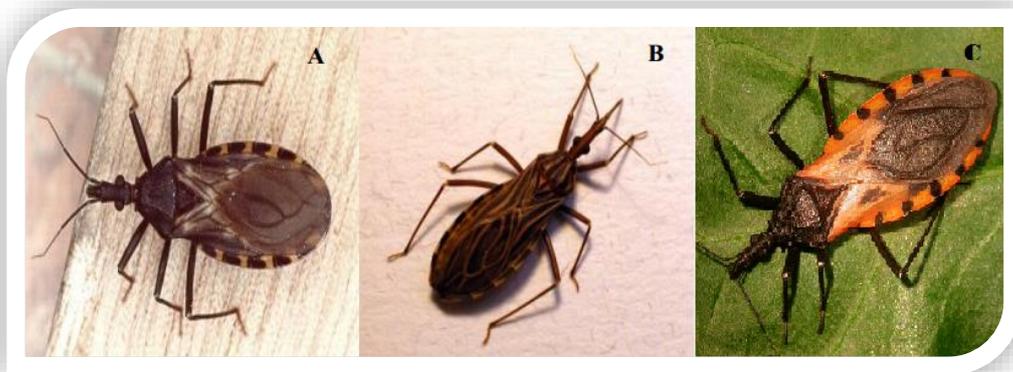


Figura 2. (A) *Triatoma infestans*, (B) *Rhodinus prolixus* e (C) *Triatoma dimidiata*, principais espécies de vetores que transmitem a doença de Chagas (Adaptado de NOIREAU *et. al.*, 2005 e TEXEIRA, *et. al.*, 2011).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi*, envolve várias formas evolutivas distintas, que apresentam características bioquímicas, morfológicas e funcionais diferentes. Essas mudanças ocorrem no decorrer do ciclo de vida do parasito e algumas estão relacionadas ao meio ambiente em que se encontram (MUÑOZ-SARAIVA *et. al.*, 2010). Ele se apresenta em quatro formas distintas (Figura 3):

- (i) epimastigota, forma presente no vetor;
- (ii) tripomastigota metacíclico, altamente infectantes e não proliferativas, presentes no vetor;

- (iii) tripomastigota, forma sanguínea infectante, presente no hospedeiro vertebrado;
- (iv) amastigota, forma de replicação intracelular, presente em mamíferos (MUÑOZ-SARAIVA *et. al.*, 2010 e DIAS *et. al.*, 2009).

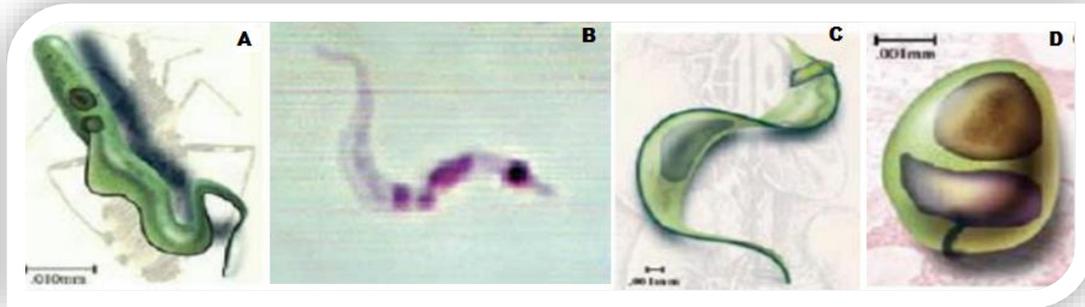


Figura 3: Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*: epimastigota (A); tripomastigotas metacíclicos (B); tripomastigotas sanguíneas (C) e amastigotas (D) (Adaptação de MUÑOZ-SARAIVA *et. al.*, 2010).

A transmissão do parasito *T. cruzi* envolve o hospedeiro invertebrado (triatomíneo) e o vertebrado (mamíferos). O triatomíneo pode se alimentar do sangue contendo formas tripomastigotas sanguíneas, que alcançam a porção anterior do intestino onde se diferenciam em epimastigotas. No lúmen do intestino médio do inseto, estas formas epimastigotas se proliferam por divisão binária e iniciam o processo denominado de metaciclogênese, no qual eles migram ativamente para a porção final do intestino, local onde ocorre a diferenciação para tripomastigotas metacíclicas. As formas metacíclicas, altamente infectantes e não proliferativas, são eliminadas juntamente com as fezes e urina do triatomíneo durante seu repasto sanguíneo no mamífero (SCHAUB & LÖSCH, 1988 e KOLLIEN *et. al.*, 1998).

A deposição de formas tripomastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado se inicia com a infecção das primeiras células que encontram no sítio de inoculação, como macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. Já no meio intracelular, estes parasitos se diferenciam em amastigotas no citoplasma da célula hospedeira. As formas amastigotas são altamente proliferativas e, após várias divisões, sofrem novamente diferenciação para tripomastigotas sanguíneas infectantes, que serão liberadas para o meio

extracelular após a ruptura da célula. Essas tripomastigotas sanguíneas poderão invadir outras células vizinhas ou, através da corrente sanguínea, alcançar outros tecidos. O ciclo se fecha quando um novo triatomíneo se alimentar deste mamífero infectado (Figura 4) (BERN, 2011).

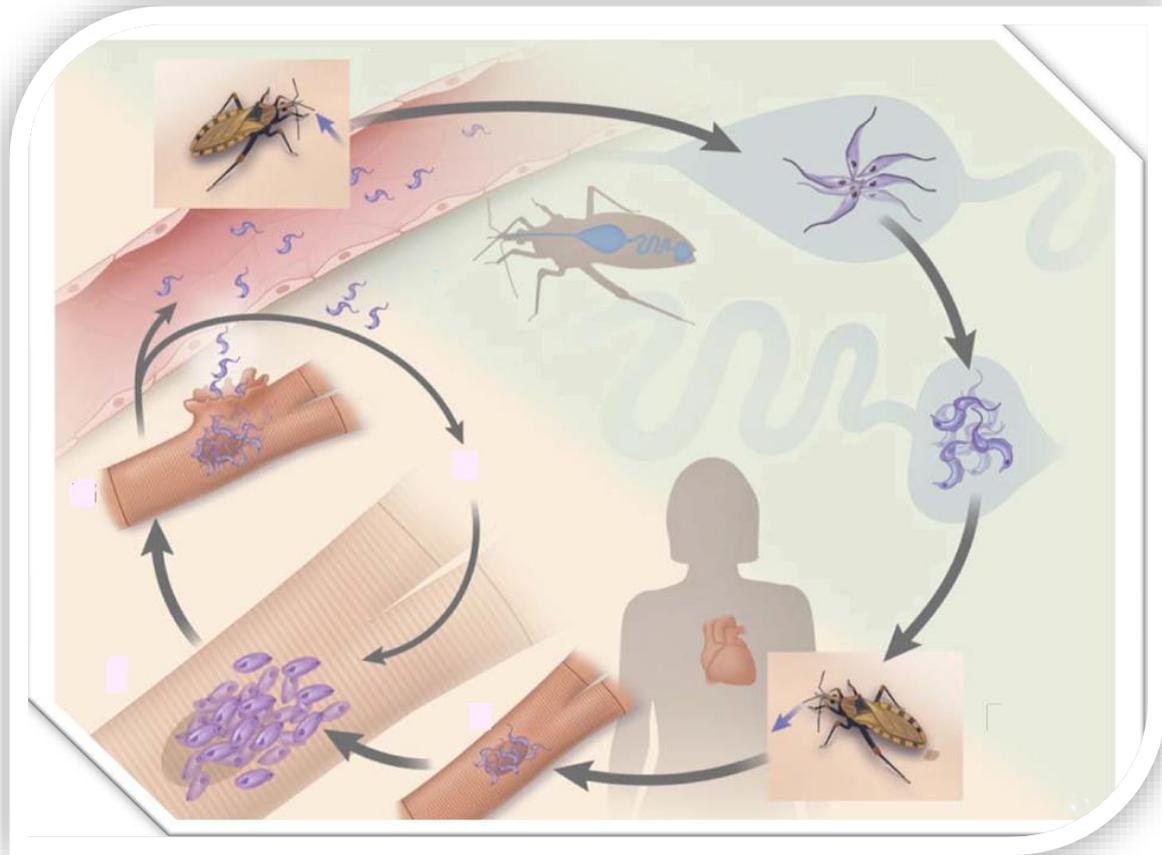


Figura 4: Ciclo de vida do *T. cruzi* (Adaptado de BERN, 2011).

1.1.2- Aspectos clínicos

Após a infecção, nota-se um curto período de incubação entre 7 a 10 dias, iniciando-se a fase aguda, primeiro estágio da doença que dura aproximadamente dois meses. Em média, 95% dos casos são assintomáticos. Esta fase é caracterizada pela alta parasitemia e presença de infiltrados inflamatórios em diferentes tecidos (BOSCARDIN *et. al.*, 2010).

Quando sintomática, a fase clínica aguda apresenta sintomas como febre, sonolência, mal estar, cólicas, diarreias, edemas e distúrbios respiratórios. Apenas 5% de uma pequena parte dos pacientes na fase aguda, geralmente as de classe de risco (crianças de até 2 anos de idade, idosos e imunossuprimidos) vão a óbito por miocardite ou meningoencefalite, com possíveis complicações, como broncopneumonia (TORRICO *et al.*, 2004 e RASSI Jr *et al.*, 2010).

A fase crônica é inicialmente assintomática e é confirmada por sorologia e/ou métodos parasitológicos indiretos. Cerca de 20-40% dos casos evoluem para sintomática, que se iniciam após 10-20 anos de infecção. As principais manifestações são (HIGUCHI *et. al.*, 2003):

- ✚ alterações cardíacas em 20-30% dos infectados, com arritmias, tromboembolismo, insuficiência cardíaca progressiva, podendo ocorrer, a qualquer momento, morte súbita;
- ✚ em 10% dos infectados podem ocorrer, alterações digestivas, caracterizadas por modificações de absorção, secreção e mobilidade, com aparecimento de megavísceras no esôfago e cólon;
- ✚ e 3% dos pacientes podem desenvolver, lesões neurológicas periféricas e meningoencefalites.

1.2 - Quimioterapia da doença de Chagas

A história das tentativas para a quimioterapia da doença Chagas pode ser dividida em oito principais fases:

1. 1912- foram testados atoxyl (arsênico), fucsina (rosanilina dye) (1), tártaro emético e cloridrato de mercúrio para o tratamento da doença de Chagas. Porém, nenhum destes produtos foi eficiente para o tratamento (COURA, 2009).
2. 1936-1960- foram avaliados diversos derivados quinolínicos, hidrazinas, sulfonamidas, ácido salicílico, *p*-amino e cortisona, porém, os resultados foram controversos e clinicamente questionáveis. O único composto que se destacou foi violeta de genciana (2), que ainda é utilizado como quimioprolático, para erradicar o *T. cruzi* em sangue contaminado em bancos de sangue (COURA & CASTRO, 2002; COURA, 2009 e PITA & PASCUTTI, 2011).
3. 1961- a 5-nitrofurazona (3), um nitrofurano, foi o primeiro a apresentar atividade anti-*T. cruzi*; no entanto, apresentou falhas terapêuticas (COURA, 2009 e DIAS *et. al.*, 2009);
4. 1968- foi sintetizado o composto conhecido como megazol (4), um derivado nitroimidazólico, que teve alta atividade anti-*T. cruzi*, e anti-*T. brucei* *sps.* Porém, ele não foi utilizado na quimioterapia por apresentar elevado efeito carcinomutagênico (MORETH *et. al.*, 2010 e COURA, 2009);
5. 1960-1970- foram desenvolvidos dois compostos, nifurtimox (5), um nitrofurano, e benzonidazol (6), um nitroimidazol, com boa atividade anti-*T. cruzi* e, são os únicos utilizados até os dias de hoje, para quimioterapia da doença de Chagas (DIAS *et. al.*, 2009 e PITA & PASCUTTI, 2011);

6. 2002- posaconazol um agente antifúngico, apresentou atividade *in vitro* e *in vivo* superior aos fármacos **5** e **6** entretanto em estudos clínico de fase III, o tratamento com **7** apresentou baixa biodisponibilidade, quando comparado ao benzonidazol (MOLINA *et. al.*, 2014);
7. 2011- foi feita uma nova formulação do benzonidazol, em dose pediátrica, para o tratamento da doença de Chagas em crianças (DNDi);
8. 2013- houve a redescoberta do nitroimidazol fexinidazol (**8**), ele apresentou boa atividade contra o *T. cruzi*, *T. brucei* sps e leishmaniose sem apresentar efeitos tóxicos, hoje o fexinidazol se encontra em estudos clínicos de fase III, sendo o composto mais promissor atualmente (Figura 5) (BAHIA *et. al.*, 2012).

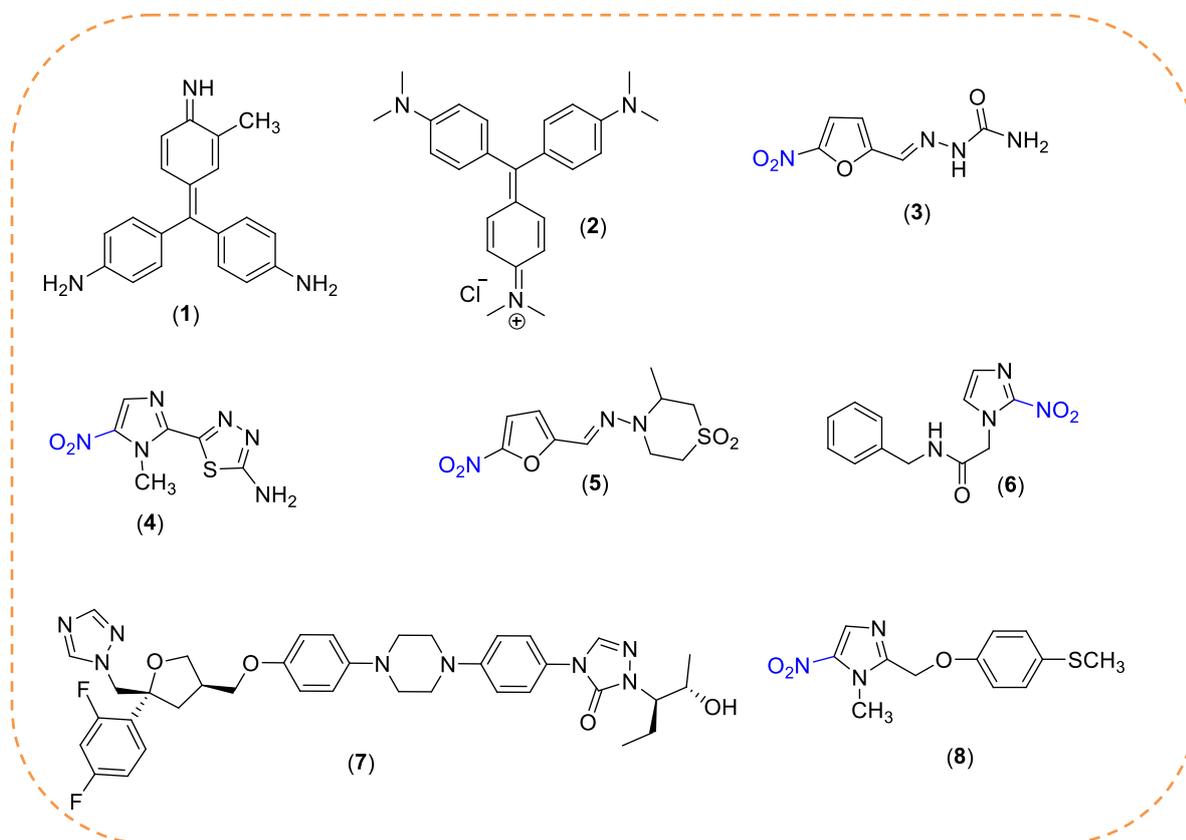
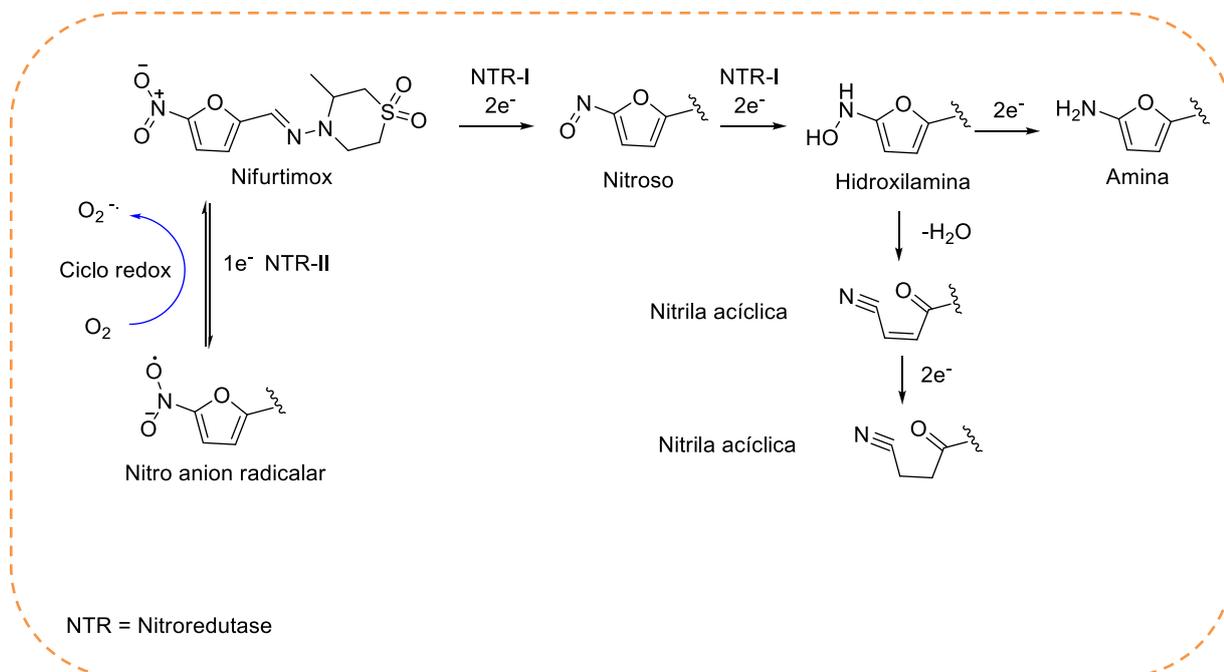


Figura 5: Estruturas químicas de fucsina (rosanilina dye) **(1)**, violeta de genciana **(2)**, 5-nitrofurazona **(3)**, megazol **(4)**, nifurtimox **(5)**, benzonidazol **(6)**, posaconazol **(7)** e fexinidazol **(8)**.

Após mais de um século da sua descoberta, a doença de Chagas possui apenas esses dois medicamentos, **5** e **6**, para o tratamento do paciente chagásico (URBINA, 2010 e DIAS *et. al.*, 2009). Eles estão longe de serem considerados fármacos ideais, já que só erradicam o parasito na fase aguda e na fase crônica diminuem os índices de parasitemia, sendo um grande problema, já que a maioria dos casos da doença é diagnosticada na fase crônica. Outro fator grave está relacionado a altas doses diárias necessárias e a necessidade de longo período de tratamento, de 60 a 120 dias. Isto acarreta sérios efeitos adversos, como anorexia, polineurite, manifestações digestivas, dermatite, depressão na medula óssea, dentre outros, levando à baixa adesão dos pacientes a estes fármacos. Além de todos esses elementos, as ações dos fármacos variam de acordo com a idade do paciente e sua região geográfica, devido a diferentes cepas de parasitos (COURA & CASTRO, 2002 e CARVALHO *et. al.*, 2014).

Na década de 1980, o nifurtimox (**5**) deixou de ser adotado no tratamento para a doença de Chagas no Brasil, Chile e Uruguai, devido a vários e severos efeitos adversos e a sua baixa eficácia com cepas de *T. cruzi* resistentes. Apenas o benzonidazol é ainda utilizado (DNDi; COURA & CASTRO, 2002 e URBINA, 2010).

O nifurtimox (**5**) e o benzonidazol (**6**) são pró-fármacos que necessitam da ativação de nitroredutases para apresentarem atividade biológica. O nifurtimox pode ser reduzido em condições anaeróbicas e aeróbicas. Na ativação, anaeróbica, **5** sofre redução de dois elétrons pela enzima nitroredutase tipo I (NTR-I), e na aeróbica, pela redução de apenas um elétron pela enzima nitroredutase tipo II (NTR-II) (Esquema 1) (PATTERSON & WYLLIE, 2014 e WILKINSON *et. al.*, 2011).



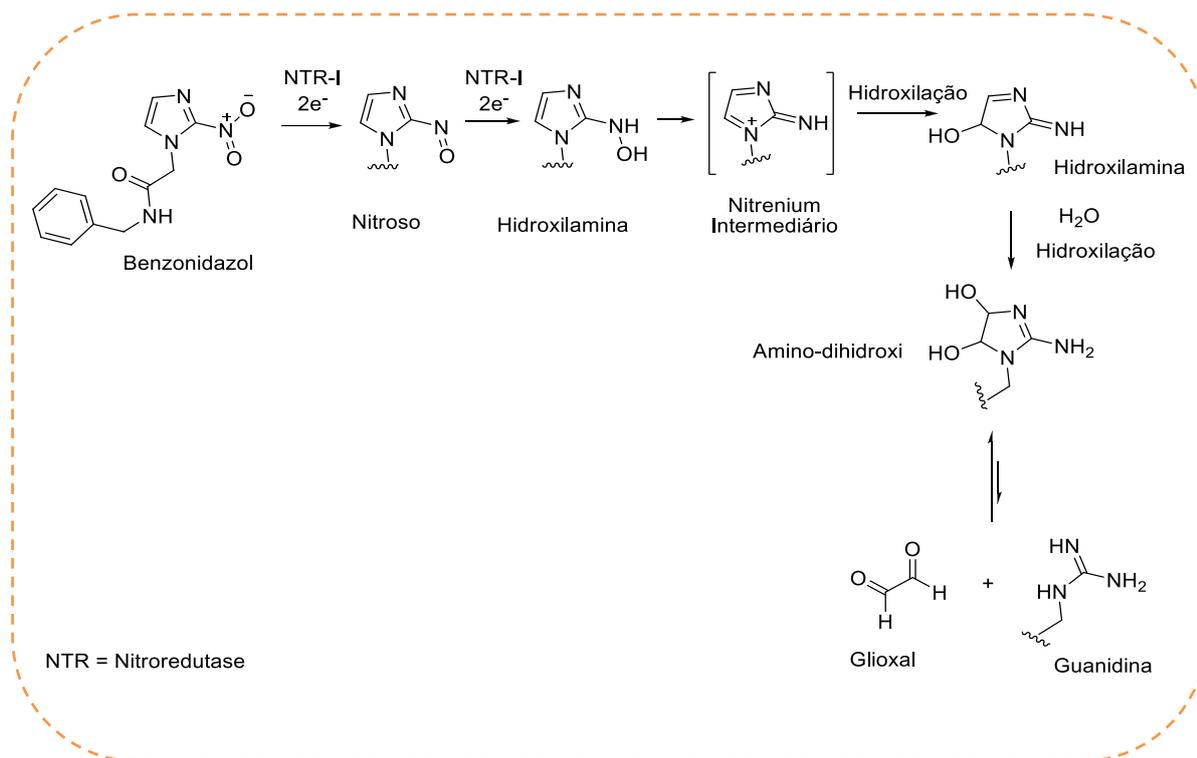
Esquema 1: Mecanismo de ação proposto para o nifurtimox (5) (Adaptado de PATTERSON & WYLLIE, 2014 e WILKINSON *et. al.*, 2011).

Em condições anaeróbicas, o intermediário nitroso pode ser formado e em seguida, poderá ser reduzido à hidroxilamina, e então à amina. A hidroxilamina poderá sofrer abertura do anel furano para a formação das nitrilas insaturadas e saturadas, que são tóxicas ao *T. cruzi*. Em condições aeróbicas, ele pode ser reduzido pela enzima NTR-II, perdendo um elétron e formando o nitro anion radicalar. Este radical reduz o oxigênio molecular (O_2) formando o íon superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e regenerando assim, o NO_2 num processo conhecido como ciclo redox (Esquema 1) (PATTERSON & WYLLIE, 2014; MAYA *et. al.*, 1997 e DIAS *et. al.*, 2009).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são tóxicas ao parasito, por não possuírem o mecanismo de detoxificação eficiente para metabólitos oxigenados, e assim sofrem um efeito maior sobre o “*stress oxidativo*”, se comparado ao hospedeiro humano. (PATTERSON & WYLLIE, 2014; MAYA *et. al.*, 1997 e DIAS *et. al.*, 2009).

O benzonidazol, diferentemente do nifurtimox, sofre apenas redução pela NTR-I em condições anaeróbicas, (Esquema 2) (PATTERSON & WYLLIE, 2014; VIODÉ *et. al.*, 1999 e OLIN-SANDOVAL *et. al.*, 2010). Por isso 6 não depende diretamente das ROS e não atua no ciclo redox como o nifurtimox. A sua redução gera

o intermediário nitroso, que irá perder dois elétrons para formar a hidroxilamina. Esta sofrerá uma série de biotransformações não enzimáticas, onde irá produzir uma espécie amino-dihidroxi, que em uma etapa lenta, levará a formação de glicoxal e guanidina, que se ligará a macromoléculas do parasito, sendo altamente tóxicas a eles (Esquema 2) (PATTERSON & WYLLIE, 2014; VIODÉ *et. al.*, 1999 e OLIN-SANDOVAL *et. al.*, 2010).



Esquema 2: Mecanismo de ação proposto para o benznidazol (6). (Adaptado de PATTERSON & WYLLIE, 2014).

Acredita-se que seu efeito tripanocida está associado às ligações covalentes com macromoléculas, como o DNA ou citocromo P450 do *T. cruzi* (DIAS *et. al.*, 2009).

Ambos os compostos, **5** e **6**, não são específicos ao parasito, atuando em outros sistemas, inclusive do hospedeiro humano. Esta baixa seletividade em vias bioquímicas definidas do parasito contribui para os efeitos tóxicos observados no tratamento dos pacientes, como mencionado anteriormente (PATTERSON & WYLLIE, 2014; VIODÉ *et. al.*, 1999 e OLIN-SANDOVAL *et. al.*, 2010).

1.3- Perspectivas para novos quimioterápicos

A busca por novas substâncias bioativas faz-se necessária, devido às limitações expostas ao tratamento atual para a doença de Chagas. A procura por novos compostos que possam substituir ou ser administrados em associações com nifurtimox e benzonidazol se faz urgente (DIAS *et. al.*, 2009 e URBINA, 2010).

No planejamento de novos compostos bioativos para a doença de Chagas, várias estratégias e combinações de métodos tradicionais e modernos vêm sendo empregadas, com intuito de obter substâncias com alta atividade anti-*T. cruzi*, sem efeitos tóxicos. Diversos alvos moleculares do parasito têm sido investigados. Dentre eles incluem-se a enzima nitroredutase, inibidores da biossíntese de ergosterol, inibição da enzima *Tripanotiona redutase*, inibição da cisteíno protease de *T. cruzi*, inibição da síntese de proteínas ou DNA, entre outras, como ilustra a tabela 1 (DIAS *et. al.*, 2009).

Tabela 1: Exemplos de alguns alvos moleculares que podem ser utilizados para o planejamento de novos compostos com ação anti-*T. cruzi* (adaptado de DIAS *et. al.*, 2009; CARVALHO *et. al.*, 2010; ROCHA *et. al.*, 2012; URBINA, 2009 e CHAUVIÈRE *et. al.*, 2003).

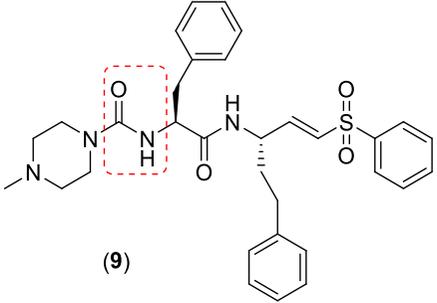
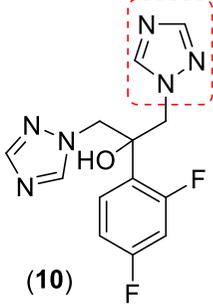
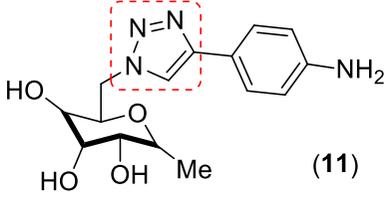
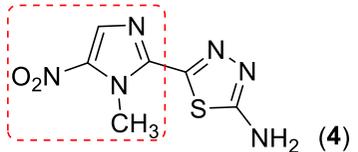
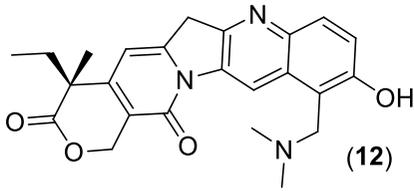
Alvo, via ou classe metabólica	Enzima, organela ou rota metabólica.	Função	Exemplos
Proteases	Cisteíno proteases; serino proteases; metaloproteínas e treonino proteases.	Múltiplas funções que envolvem desde invasão celular a escape do parasito do sistema imune.	 <p>(9)</p>
Biossíntese de esteróis	Esterol 14-demetilase; lanoesterol sintase; esqualeno epoxidase; esqualeno sintase; Δ -24(25) esterol metiltransferase; 3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima; redutases; farnesilpirofosfato sintase e farnesiltransferase.	Essencial para a composição estrutural de membranas, mitocôndria e plasma.	 <p>(10)</p>

Tabela 1: Continuação

<p>Via glicolítica</p>	<p>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; hexoquinase e fosfofrutoquinase.</p>	<p>Produção de energia.</p>	 <p>(11)</p>
<p>Metabolismo dependente de grupos tióis</p>	<p>Tripanotiona redutase; tripanotiona sintetase e triparedoxina peroxidase.</p>	<p>Mecanismo de defesa contra estresse oxidativo.</p>	 <p>(4)</p>
<p>DNA topoisomerases</p>	<p>DNA topoisomerase I e DNA topoisomerase II.</p>	<p>Replicação do DNA do <i>T. cruzi</i>.</p>	 <p>(12)</p>

Para o desenvolvimento de uma nova substância bioativa anti-*T. cruzi* é necessário que o composto apresente algumas das seguintes características (NWAKA & HUDSON, 2006):

- ✚ boa atividade contra tripomastigotas sanguíneas e / ou amastigotas intracelulares;
- ✚ boa atividade contra diferentes cepas de *T. cruzi*;
- ✚ boa atividade nas duas fases da doença;
- ✚ que seja ativo por via oral e preferencialmente em poucas doses;
- ✚ que tenha baixa toxicidade para o paciente, sendo o medicamento disponível a crianças, adultos e mulheres em fase reprodutiva;
- ✚ que possua estabilidade térmica, resistência a variações à temperaturas e
- ✚ preferencialmente, tenha baixo custo de produção e comercialização, já que se trata de pacientes negligenciados.

A introdução de um novo fármaco no mercado é caro, e se tratando de doença tropical, esta problemática é ainda maior, por se tratar de pacientes que, na sua maioria, possuem baixo ou nenhum poder de compra. Com isto, o processo de desenvolvimento de novos compostos bioativos anti-*T. cruzi* é limitado, devido ao pouco interesse dos laboratórios farmacêuticos (ADAMS & BRANTNER, 2006).

Sabendo deste desafio, pesquisadores vêm utilizando a estratégia “piggyback approach”. Essa estratégia consiste na avaliação anti-*T. cruzi* de um fármaco desenvolvido para outra doença. As vantagens desta estratégia são o conhecimento prévio da farmacocinética e da segurança deste fármaco, dando maior rapidez e diminuindo o custo do desenvolvimento de um novo fármaco na quimioterapia da doença de Chagas (FRANÇA *et. al.*, 2014). Como exemplo, podem-se destacar os antifúngicos triazólicos, inibidores da biossíntese do ergosterol. Dentre eles destaca-se o posaconazol (**7**) (Figura 6). Ele apresentou uma boa atividade no modelo murino nas fases aguda e crônica. (URBINA, 2009 e MOLINA *et. al.*, 2014). Porém, em estudos

clínico com pacientes humanos, na fase crônica da doença de Chagas, o tratamento com **7** apresentou falhas terapêuticas significativas, quando comparado ao benzonidazol (MOLINA *et. al.*, 2014).

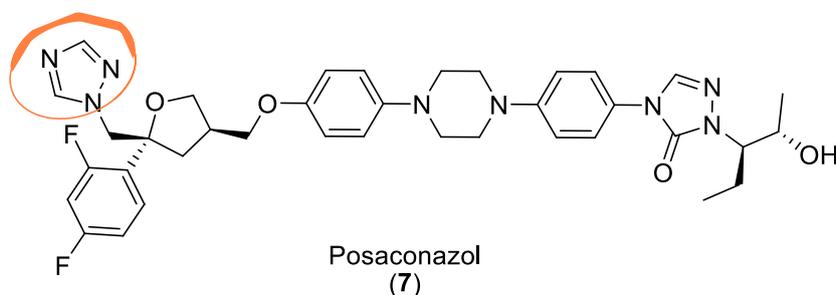


Figura 6: Estrutura química do posaconazol (**7**).

O ravuconazol (**13**) é outro antifúngico triazólico que apresentou boa atividade *in vitro* sobre as formas amastigotas do *T. cruzi*. O E1224 (**14**), um pró-fármaco de **13**, também teve boa ação anti-*T. cruzi*; porém, em estudos clínico de fase II com pacientes crônicos, o composto não proporcionou boa alternativa como monoterapia para o tratamento da doença de Chagas (DNDi; FRANÇA *et. al.*, 2014 e URBINA, 2009) (Figura 7). De acordo com a organização sem fins lucrativos de pesquisa e desenvolvimento para doenças negligenciadas-DNDi, atualmente estão sendo realizados estudos para avaliar uma nova combinação do E1224 (**14**) com o benzonidazol (**6**).

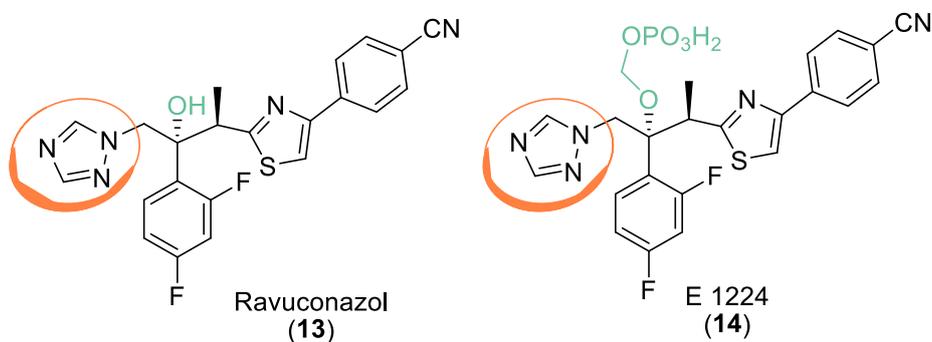


Figura 7: Estrutura química do ravuconazol (**13**) e seu derivado E 1224 (**14**).

A nitazoxanida (Annita®) (**15**) é outro representante importante desta classe. Ela é um fármaco com atividade anti-helmíntica e antiparasitária, que testada contra *T.cruzi* apresentou atividade duas vezes maior do que o **6** e com citototoxicidade, aproximadamente seis vezes menor (NOVA-ZUAZO *et. al.*, 2014). Estudo da relação estrutura e atividade biológica de nitrotiazóis mostrou a importância deste nitroheterociclo, onde as funções amídica como um possível grupo ligante, e uma terceira região, com grupos hidrofóbicos, aumenta a atividade contra *T.cruzi*, como ilustra a figura 8.

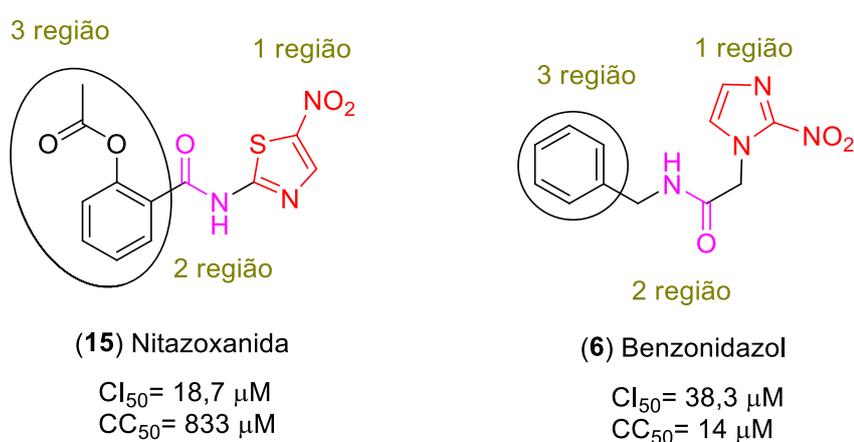


Figura 8: Estrutura química da nitazoxanida (**15**) e do benzonidazol (**6**).

Outro nitrocomposto é o fexinidazol (**8**) (Figura 9), um antiprotozoário de amplo espectro. O fexinidazol (**8**) foi desenvolvido na década de 70-80, porém seu desenvolvimento clínico foi descontinuado, por ter apresentados índices de toxicidade (BAHIA *et. al.*, 2012 e DNDi).

Entretanto, em janeiro de 2013, o fexinidazol foi redescoberto pelo DNDi e selecionado como um novo candidato para a doença de Chagas, doença do sono e leishmaniose. Uma equipe de especialistas, convocada pelo DNDi, incluindo médicos clínicos, cardiologistas e toxicologistas dos países endêmicos, revisou dados de segurança sobre **8** e apoiou plenamente a utilização dele, em adultos, para doença crônica indeterminada de Chagas (BAHIA *et. al.*, 2012 e DNDi). Atualmente ele,

encontra-se nos ensaios clínicos de fase III para doença do sono e Chagas (BAHIA *et. al.*, 2012; DNDi e KAISER *et. al.*, 2011).

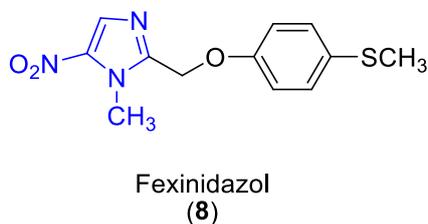


Figura 9: Estrutura química do fexinidazol (8).

O possível uso do fexinidazol (8) para o tratamento da doença do sono e Chagas, a utilização de associações do nifurtimox (5) com eflornitina (16) para o tratamento da doença do sono e a utilização de novos nitroimidazol-oxazine (PA-824) (17) e OPC 67683 (18) para o tratamento da tuberculose, fez ressurgir o interesse de nitroimidazóis para a quimioterapia de doenças infecciosas, indicando que é possível obter compostos ativos e sem toxicidade, como os compostos 8, 17 e 18. (Figuras 9 e 10) (BAHIA *et. al.*, 2012; MORETH *et. al.*, 2010 e MATSUMOTO *et. al.*, 2006).

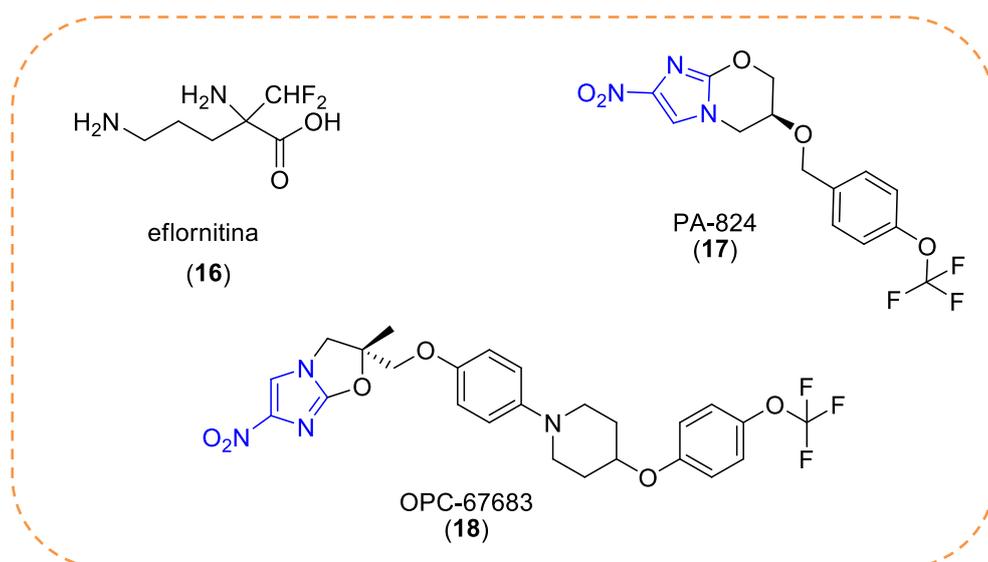


Figura 10: Estrutura química dos nitroheterociclos eflornitina (16), PA-824 (17) e OPC-67683 (18).

1.3.1- Nitroimidazóis

O núcleo nitroimidazólico é de grande relevância para química medicinal, devido ao seu amplo espectro e alta atividade biológica. Como exemplos, temos os nitroimidazóis com atividades anti-*T. cruzi* (MITAL, 2009, MORETH *et. al.*, 2010 e PATTERSON & WYLLIE, 2014), antibacteriano (MITAL, 2009), antifúngico (MITAL, 2009), anti-HIV (MITAL, 2009), anti-*Mycobacterium tuberculosis* (MITAL, 2009, MORETH *et. al.*, 2010) e antileishmania (MITAL, 2009) (Figura 11).

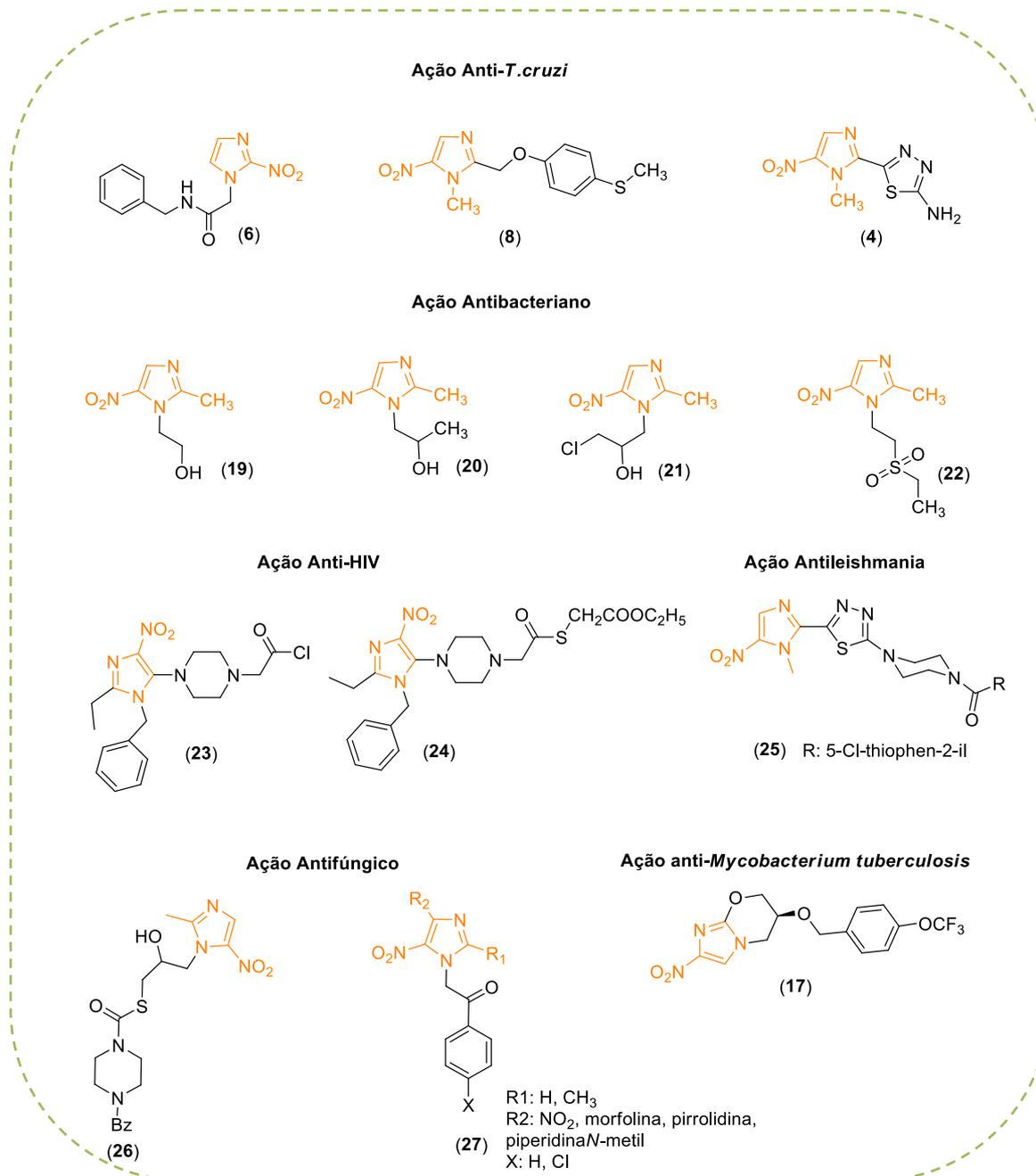


Figura 11: Exemplos de nitroimidazóis com diversas atividades biológicas.

Um representante desta classe, que merece destaque, com atividade tripanocida, é o megazol (**4**) (Figura 12). Ele apresentou atividade superior aos fármacos nifurtimox (**5**) e benzonidazol (**6**) contra *T. cruzi*, além de ser ativo em cepas resistentes a esses fármacos (CHAUVIÈRE *et. al.*, 2003).

Contra o *Trypanosoma brucei* sps, protozoário responsável pela doença do sono, em apenas uma única dose, ele erradicou o parasito. Essa elevada atividade de **4** é atribuída, por alguns autores, à presença do isómero do grupo amidínico ($H_2N-C=N$) na sua estrutura química, além, é claro, da porção nitroimidazólica (Figura 12) (CARVALHO *et. al.*, 2014; MORETH *et. al.*, 2010 e BOECHAT *et. al.*, 2001).

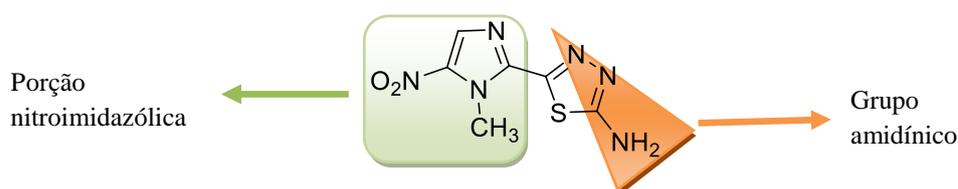


Figura 12: Estrutura química do megazol (**4**).

Existem algumas propostas de mecanismo de ação para **4**, mas nenhum está bem definido. Estudos indicam que a ação dele pode ser por: ativação das enzimas nitroredutase tipo I e/ ou tipo II (NTR), em condições anaeróbicas e/ou aeróbicas (VIODÉ *et. al.*, 1999 e CHAUVIÈRE *et. al.*, 2003); ou por interferência com o metabolismo do oxigênio (VIODÉ *et. al.*, 1999), possivelmente afetando os níveis de tióis intracelular, especialmente a *Tripanotiona reductase* (MAYA *et. al.*, 1997), e / ou através da inibição da atividade da redutase de NADH fumarato (DIAS *et. al.*, 2009).

Apesar da alta atividade de **4**, ele não é utilizado clinicamente, devido a sua alta ação mutagênica e carcinogênica (FERREIRA & FERREIRA, 1986). Sendo assim, **4** tem sido utilizado como protótipo na busca de novos compostos bioativos, visando manter a sua alta atividade tripanocida, sem os seus efeitos toxicológicos (CARVALHO *et al.*, 2014; CARVALHO *et. al.*, 2007; CARVALHO *et. al.*, 2006; BOECHAT *et. al.*, 2001; CARVALHO *et. al.*, 2008 e WALSH *et. al.*, 1987).

Carvalho e colaboradores, realizaram estudos de relação estrutura e atividade de nitroimidazóis, que os levaram ao derivado Brazilizona A (**28**), como o mais potente da série, e sem citotoxicidade comparada a **4** (Figura 13) (CARVALHO *et. al.*, 2008). Ele mostrou ser duas vezes mais ativo do que o **4** no teste *in vitro* contra *T.cruzi*, e este fato pode ser atribuído à introdução de uma terceira porção na estrutura do megazol (**4**).

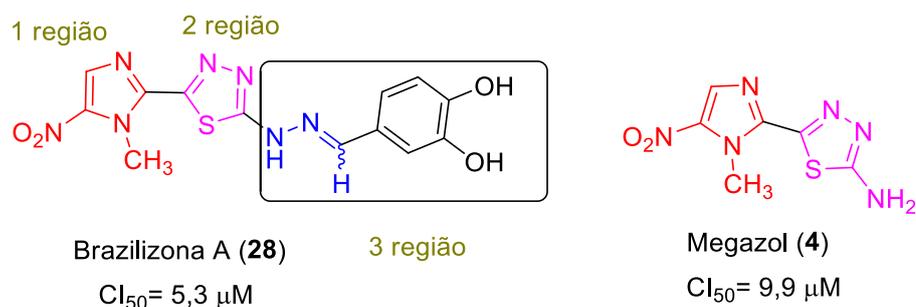


Figura 13: Estruturas químicas de brazilizona A (**28**) e megazol (**4**).

O nosso grupo de pesquisa em farmanguinhos-Fiocruz, estudou a transferência do grupo nitro da posição C-5 do anel imidazólico para a posição C-4 e a inserção de um grupamento na posição C-5 ao grupo nitro, forneceu o composto **29** com boa atividade tripanocida, anti-*T.cruzi* e anti-*T. brucei*, sem a atividade carcinomutagênica de **4** (Figura 14) (CARVALHO, 2000 e MELLO *et. al.*, 2013).

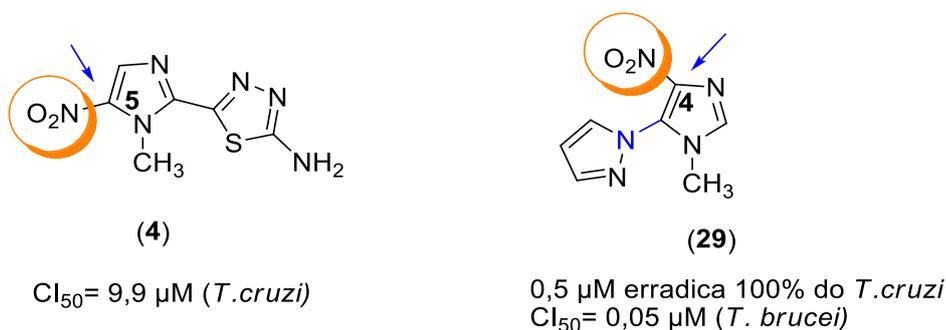


Figura 14: Estrutura química de **29** e **4**.

Walsh e colaboradores, quando desenvolveram o análogo do metronidazol (**19**), com substituintes na posição α ao grupo nitro, onde observou-se a atividade bactericida, sem o efeito citotóxico (Figura 15).

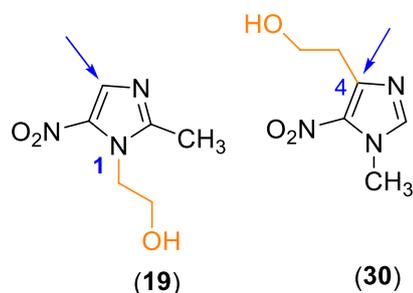
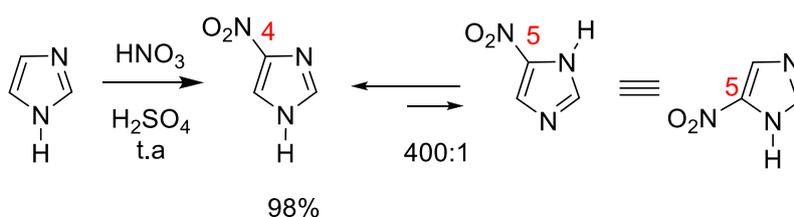


Figura 15: Estrutura química do metronidazol (**19**) e seu análogo (**30**).

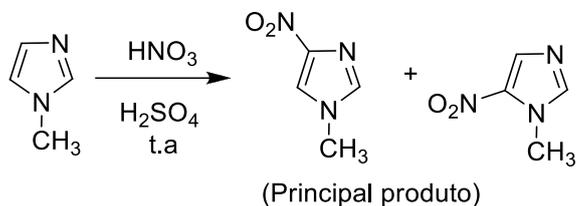
Os nitroimidazóis podem ser obtidos através da reação de nitração, utilizando ácido nítrico fumegante e ácido sulfúrico. A substituição eletrofílica ocorre, nas posições C-4 ou C-5 do anel imidazólico. Isso se deve a estrutura ambígua do imidazol, pois este sofre rápido equilíbrio tautomérico envolvendo o próton ligado ao nitrogênio quando este não está alquilado (Esquema 3) (MELO, 2000).



Esquema 3: Tautomerismo do 4-nitroimidazol e 5-nitroimidazol.

Porém, uma das características dos nitroimidazóis é a instabilidade do 5-nitroimidazol, devido ao equilíbrio tautomérico com o 4-nitroimidazol, o qual é favorecido devido à maior acidez do hidrogênio ligado ao nitrogênio do isômero 5-nitroimidazol. Este fato é confirmado por reações com imidazóis alquilado no N-1, no

qual obtém como principal produto o composto nitrado no C-4 (Esquema 4) (CARVALHO, 2000).



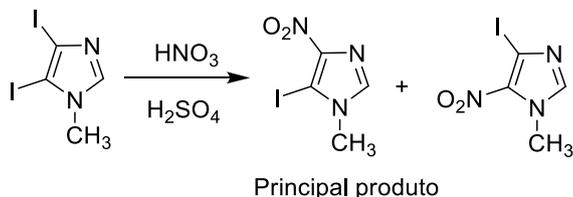
Esquema 4: Nitração de *N*-metil-imidazól.

Em condições mais brandas de nitração, utilizando NaNO_3 ao invés do HNO_3 obtém-se a regioseletividade da reação (Esquema 5) (YEOWELL & ELION, 1973).



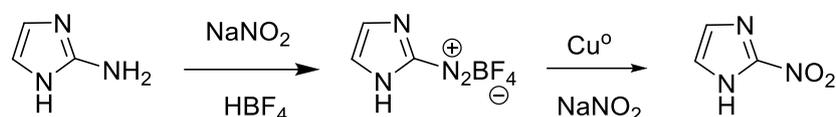
Esquema 5: Nitração de *N*-metil-imidazól em $\text{NaNO}_3 / \text{H}_2\text{SO}_4$.

A reação de nitrodehalogenação é outro método utilizado para obter nitroimidazóis. Porém, obtém-se mistura dos isômeros (Esquema 6) (MELO, 2000).



Esquema 6: Nitrodehalogenação de imidazóis.

Outra metodologia empregada para preparação de nitroimidazol é a reação de substituição nucleofílica em sais de diazônio. Esta metodologia é principalmente empregada quando se deseja introduzir o grupo nitro na posição 2 (Esquema 7) (MELO, 2000).



Esquema 7: Diazotação do 2-amino imidazol.

1.3.2 Triazóis

Outro heterociclo que merece destaque, devido a sua ampla atividade tripanocida, e também por ser alvo deste trabalho é o triazol, como mencionado anteriormente na estratégia “piggyback approach”.

Os triazóis possuem diversas atividades biológicas tais como antimicrobianos, anti-inflamatórios, antiprotozoários, antifúngicos, analgésicos, antivirais, antineoplásicos, antihipertensivos, anestésicos locais, antidepressivos, antihistamínicos, antioxidantes, antidiabéticos, dentre outras (Figuras 6,7 e 16) (KHARB *et. al.*, 2011; BOECHAT *et. al.*, 2014; CARVALHO *et. al.*, 2014 e FERREIRA *et. al.*, 2014).

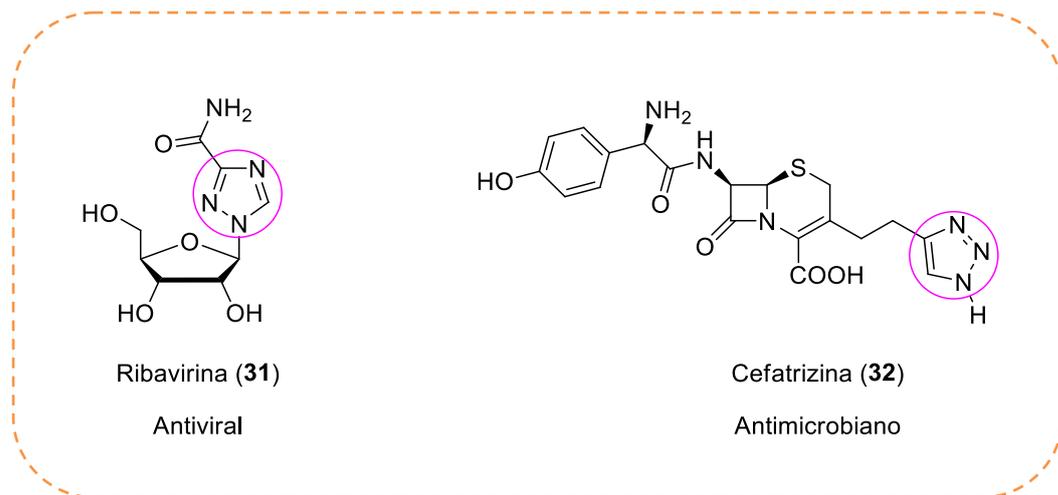
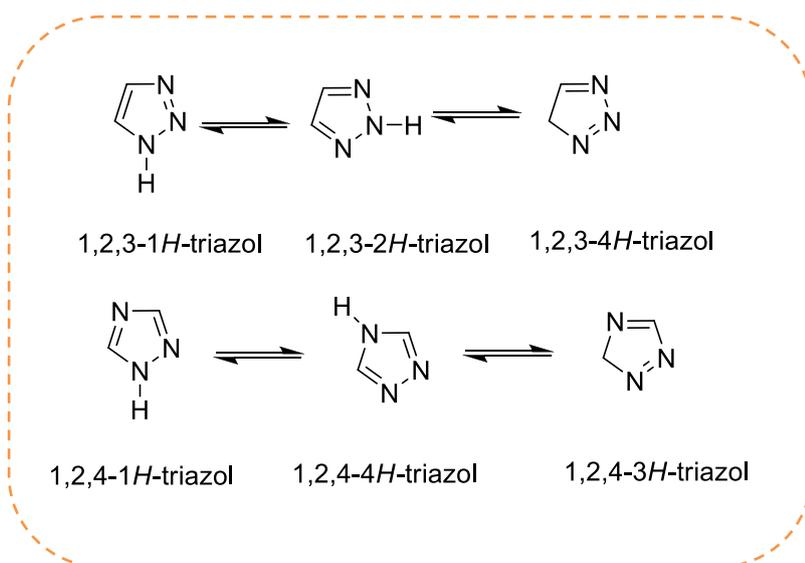


Figura 16: Exemplos de fármacos contendo o núcleo triazólico.

De acordo com a sua estrutura química, os triazóis podem se apresentar na sua forma 1,2,3, como contido na estrutura da cefatrizina (**32**) ou, 1,2,4, contido na estrutura da ribavirina (**31**). São compostos hetero-aromáticos, contendo seis elétrons π em anéis de cinco membros e três átomos de nitrogênio. Os 1,2,3- e 1,2,4-triazóis estão em equilíbrio tautomérico, como ilustra o esquema 8 (MELO *et. al.*, 2006 e FERREIRA *et. al.*, 2014).

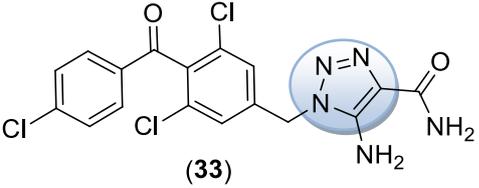
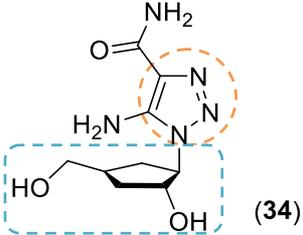
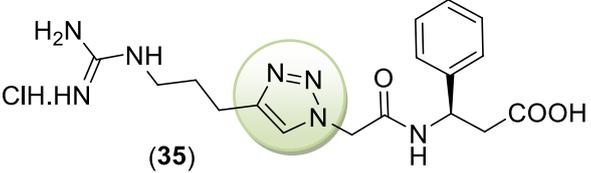
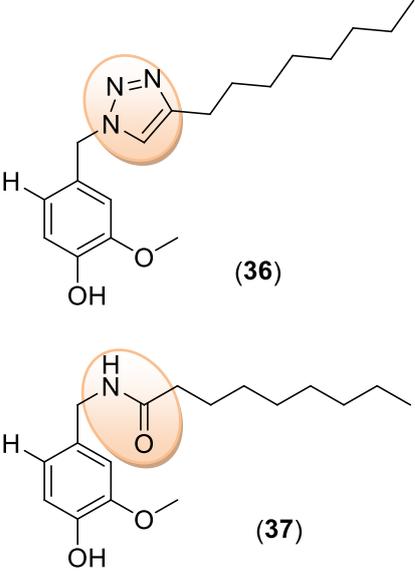


Esquema 8: Equilíbrio tautomérico em 1,2,3- e 1,2,4-triazóis.

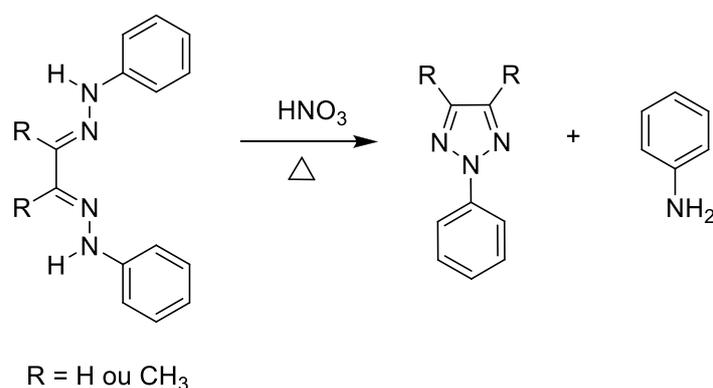
1.3.2.1- 1,2,3-Triazóis: Aplicação Biológica e Síntese

Os 1,2,3-triazóis são muito utilizados na química medicinal, pois podem atuar em diversas estratégias como mostra a tabela 2 (FREITAS *et. al.*, 2011; WHITING *et. al.*, 2006; TRABOCCHI *et. al.*, 2010 e SAITO *et. al.*, 2003).

Tabela 2: Diversas estratégias utilizando 1,2,3 triazol.

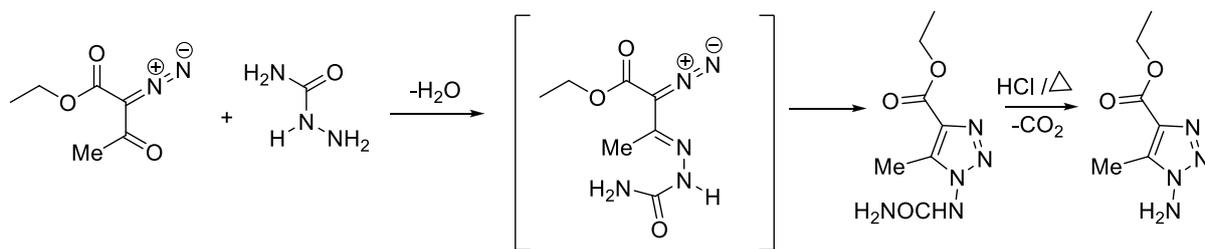
<p>Fragmento farmacofórico, em anticancerígeno 33 (AGALAVE <i>et. al.</i>, 2011).</p>	 <p>(33)</p>
<p>Estratégia de hibridação molecular com inibidor de transcriptase reversa de HIV o 34 (SAITO <i>et. al.</i>, 2003).</p>	 <p>(34)</p>
<p>No composto 35, o anel triazólico foi usado para mimetizar a glicina, atuando assim como grupo espaçador (TRABOCCHI <i>et. al.</i>, 2010).</p>	 <p>(35)</p>
<p>Na estratégia de bioisosterismo, o anel triazólico de 36 pode ser bioisótero de grupo amida de 37, por apresentar propriedades físico-químicas semelhantes. Estes anéis são mais estáveis por não sofrerem reações de hidrólise, oxidação ou redução (FREITAS <i>et. al.</i>, 2011).</p>	 <p>(36)</p> <p>(37)</p>

O heterociclo 1,2,3-triazol é de origem exclusivamente sintética. Eles podem ser obtidos por diversos métodos. A síntese pioneira foi realizada por Pechmann, em 1888, na preparação de 2-aryl-1,2,3-triazóis, no qual ele utilizou *bis*-fenil-hidrazonas derivadas de 1,2-dicarbonílicos com ácido nítrico (FREITAS *et. al.*, 2011 e MELO *et. al.*, 2006) (Esquema 9).



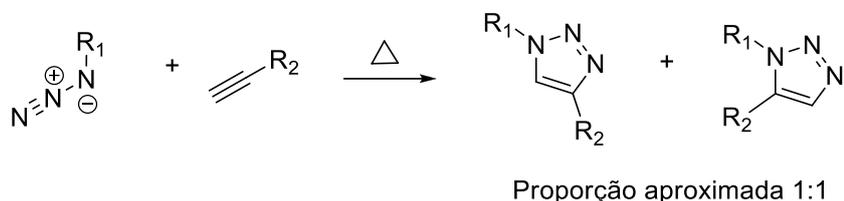
Esquema 9: Obtenção pioneira de 1,2,3-triazóis pela metodologia Pechmann.

Outras metodologias surgiram tal como a ciclização [2N + 1N] que foi descrita em 1902, por Wolff, onde ele utiliza o diazo acetoacetato de etila e uma semicarbazida, que reagem formando o 1,2,3-triazol-semicarbazona, ciclizando rapidamente, formando o ureído triazólico, que pode ser hidrolisado e descarboxilado, produzindo o 1-aminotriazol (MELO *et. al.*, 2006) (Esquema 10).



Esquema 10: Obtenção de 1,2,3-triazóis via ciclização [2N + 1N] de Wolff.

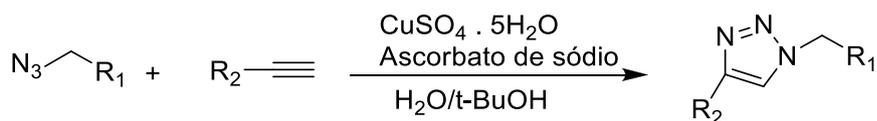
A cicloadição 1,3-dipolar foi originalmente observada por Arthur Michael, em 1893 e desenvolvida por Huisgen, em 1967. Este método consiste na utilização de azidas e acetilenos terminais em altas temperaturas (HUISGEN, 1967) (Esquema 11).



Esquema 11: Síntese de 1,2,3-triazóis via Huisgen.

Entretanto, a cicloadição de Huisgen não apresentou seletividade fornecendo misturas de regioisômeros 1,4 e 1,5- dissustituído (HEIN & FOKIN, 2010 e KOLB *et. al.*, 2001).

Sharpless e colaboradores, em 2001, desenvolveram a cicloadição de Huisgen através da “click chemistry”, que se baseia na utilização de Cu(I) para obtenção de substâncias de forma rápida, com bons rendimentos e formação exclusiva do regioisômero 1,4-dissustituído (Esquema 12) (HEIN *et. al.*, 2010 e KOLB *et. al.*, 2001).



Esquema 12: Síntese de 1,2,3-triazóis pela metodologia, a “click chemistry”.

Desde então este método para obter 1,2,3-triazol, vem sendo largamente utilizado, pois é eficiente e envolve a utilização de reagentes e solventes sem muita complexidade (MELO *et. al.*, 2006).

1.3.2.2- 1,2,4-Triazóis: Aplicação Biológica e Síntese

Outro triazol de grande importância é o 1,2,4-triazol que é amplamente encontrado nas estruturas dos fármacos, possuindo um amplo aspecto de atividades biológicas.

Os 1,2,4-triazóis são também muito utilizados na química medicinal, com objetivo de alterar a propriedade farmacodinâmica e farmacocinéticas (FRANÇA *et. al.*, 2014).

Ele é utilizado na estratégia de bioisosterismo, que consiste em substituir um outro heterociclo por ele, com objetivo de melhorar a atividade biológica, seletividade e biodisponibilidade, como ilustra a figura 17 (FRANÇA *et. al.*, 2014).

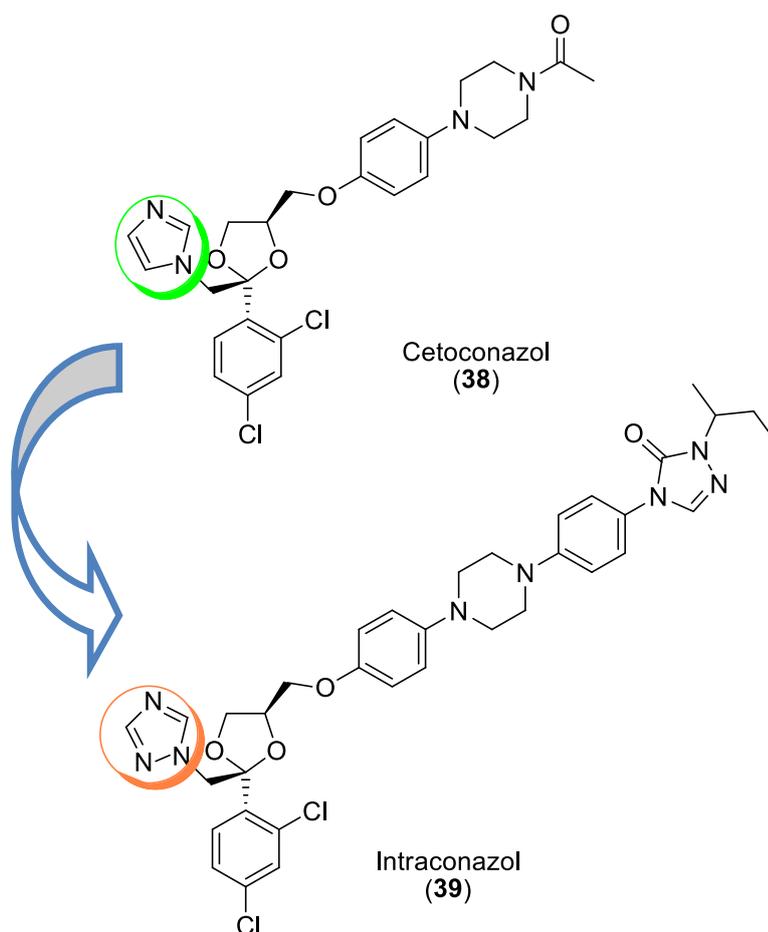
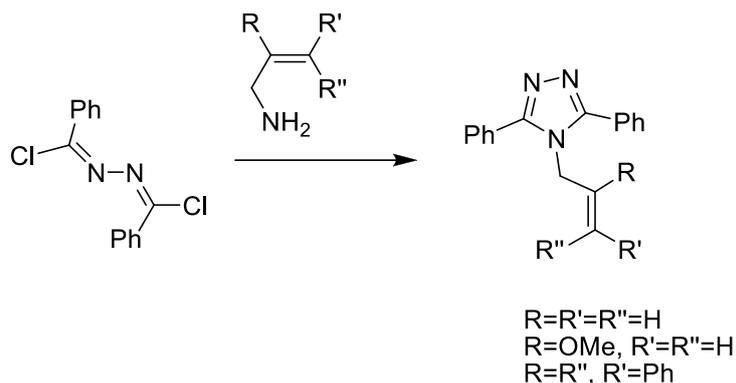


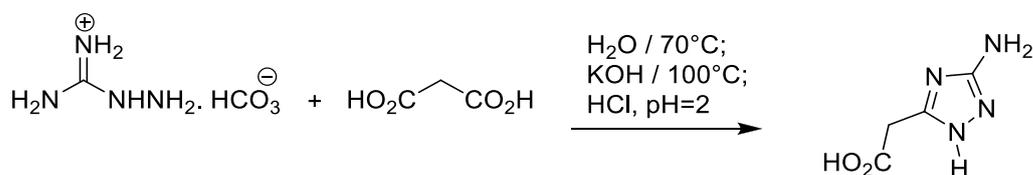
Figura 17: Bioisosterismo de anel entre imidazol e 1,2,4-triazol.

A obtenção de 1,2,4-triazol pode ser realizada através da metodologia [2N + 1N], a estratégia mais ampla para a preparação de 1,2,4-4*H*-triazóis. Esta metodologia foi desenvolvida em 1906, por Stollé e Thomas, a qual envolvia-se a adição de amins primárias ao reagente bis(clorobenzilideno) hidrazina, seguida de eliminação de HCl (Esquema 13). Os rendimentos variam de acordo com a amina utilizada (FERREIRA *et. al.*, 1999).



Esquema 13: Metodologia [2N + 1N] para a preparação de 1,2,4-4*H*-triazóis.

Outra metodologia bastante empregada consiste na utilização de aminoguanidinas reagindo com ácidos ou ésteres, formando 3-amino-1,2,4-1*H*-triazóis substituídos na posição 5 (Esquema 14) (FERREIRA *et. al.*, 1999).



Esquema 14: Obtenção de 3-amino-1,2,4-1*H*-triazóis utilizando aminoguanidina.

Diversas são as metodologias sintéticas para a formação de 1,2,4-triazóis descritas na literatura, com isso podemos observar o quanto esta síntese é importante para a preparação de compostos bioativos (FERREIRA *et. al.*, 1999).

Apesar de vários esforços na busca de novos compostos com ação tripanocida, até hoje não existe nenhum fármaco eficaz contra o *Trypanosoma cruzi*. Assim, a busca para o desenvolvimento de novas substâncias bioativas se faz necessária e urgente e é o objetivo principal deste trabalho.

O nosso grupo de pesquisa em Farmanguinhos-Fiocruz tem desenvolvido estratégias para a busca de novos compostos tripanocidas. Dentre as pesquisas em andamento, a síntese de novos derivados nitroimidazólicos e as avaliações da atividade inibitória e toxicológica contra as formas de *T. cruzi* e *T. brucei* revelaram compostos ativos contra esses parasitos, sem os efeitos carcinomutagênicos (MELLO *et. al.*, 2013). Com esta conquista, conseguimos a obtenção de algumas moléculas protótipos, estando agora na fase de otimização da sua eficácia que é o objetivo específico deste trabalho.

II-OBJETIVO

Dando continuidade ao desenvolvimento de novos padrões moleculares anti-*T. cruzi*, o objetivo deste trabalho é a síntese e a avaliação das atividades tripanocida, mutagênica e genotóxica de 4-nitroimidazóis **40a-b** e **41a-h**. Esse estudo visa à obtenção de compostos mais ativos do que o protótipo **29** e com menor efeitos toxicológicos (Figura 18).

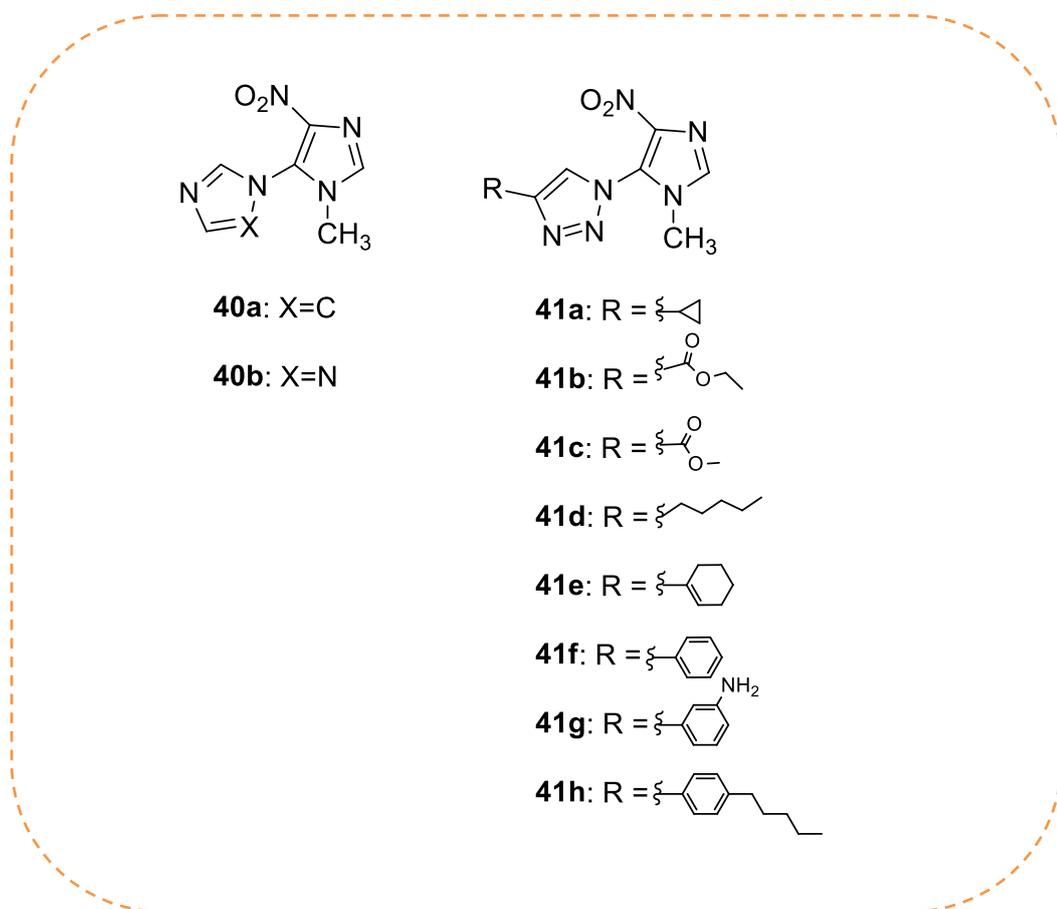
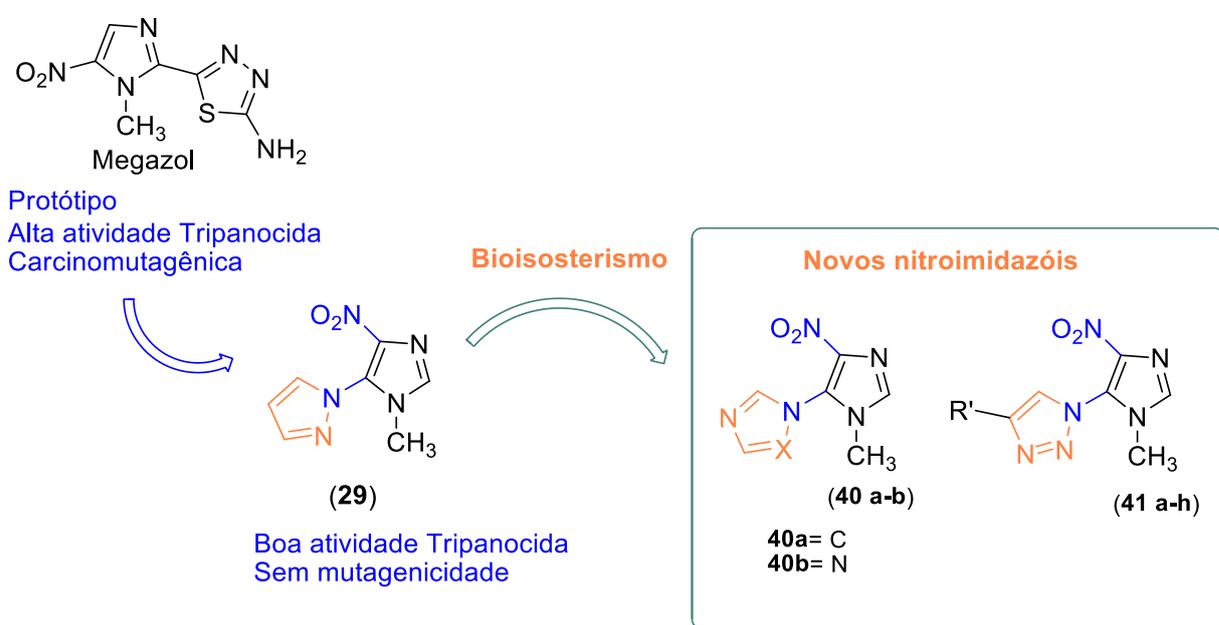


Figura 18: Estrutura química dos 4-nitroimidazóis (**40a-b** e **41a-h**).

III-PLANEJAMENTO

O planejamento dos compostos nitroimidazóis propostos **40a-b** e **41a-h** teve o composto **29** como protótipo, pois em estudos anteriores ele apresentou boa atividade anti-*T. cruzi* e anti-*T. brucei in vitro*, porém sem apresentar o efeito carcinomutagênico do seu protótipo megazol (CARVALHO, 2000 e MELLO *et. al.*, 2013). Para tal utilizou-se o bioisosterismo entre os anéis azólicos: pirazol, imidazol, 1,2,4-triazol, e 1,2,3-triazol, ligados à posição 5 do núcleo 1-metil-4-nitroimidazol (Esquema 15).



Esquema 15: Planejamento dos novos 4-nitroimidazóis (**40a-b** e **41a-h**).

Além de poder avaliar o bioisosterismo entre os anéis pirazol de **29** e 1,2,3-triazol de **41a-h**, também serão avaliadas a importância dos substituintes na posição 4 do anel 1,2,3-triazol, como uma terceira região nestas moléculas, se comparada ao megazol e benzonidazol. No composto **41f** o substituinte fenila foi proposto baseado na estrutura do benzonidazol (**6**), avaliando-se a influência e importância da fenila, na atividade biológica, uma vez que ela apresenta característica hidrofóbica e pouca liberdade conformacional (Figura 19).

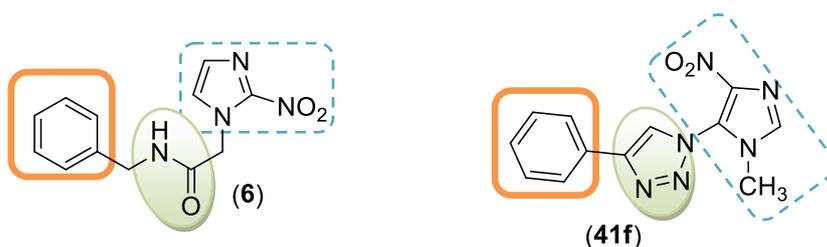


Figura 19: Planejamento do composto **41f**.

Foram propostos também substituintes na posição *meta* e *para* do anel fenila com o intuito de avaliar como esta nova classe irá se comportar: o substituinte NH₂, no composto **41g**, teve como objetivo avaliar a influência de um grupo hidrofílico, enquanto a introdução do substituinte *n*-pentila em **41h**, avaliou um grupo de natureza lipofílica (Figura 20).

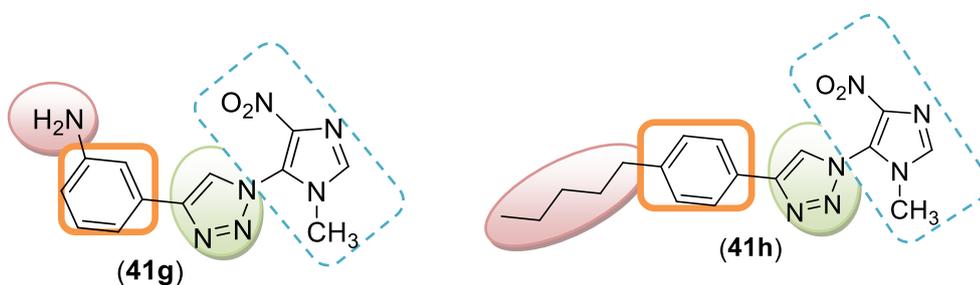


Figura 20: Planejamento para os compostos **41g** e **41h**.

A escolha dos substituintes ciclohexenil e ciclopropil nos compostos **41e** e **41a**, respectivamente, teve como objetivo avaliar a influência do volume espacial, rigidez e lipofilicidade nesta nova classe frente à atividade biológica (Figura 21).



Figura 21: Planejamento dos compostos **41e** e **41a**.

Para os compostos **41b**, **41c** e **41d** propôs-se avaliar a importância e a diferença de características lipofílica, como *n*-pentila, e hidrofílicas, como éster etílico e metílico, nessa terceira região (Figura 22).

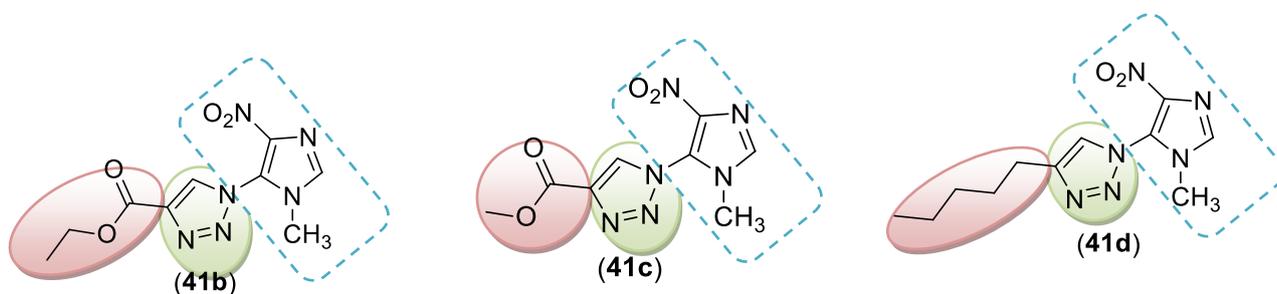


Figura 22: Planejamento dos compostos **41b**, **41c** e **41d**.

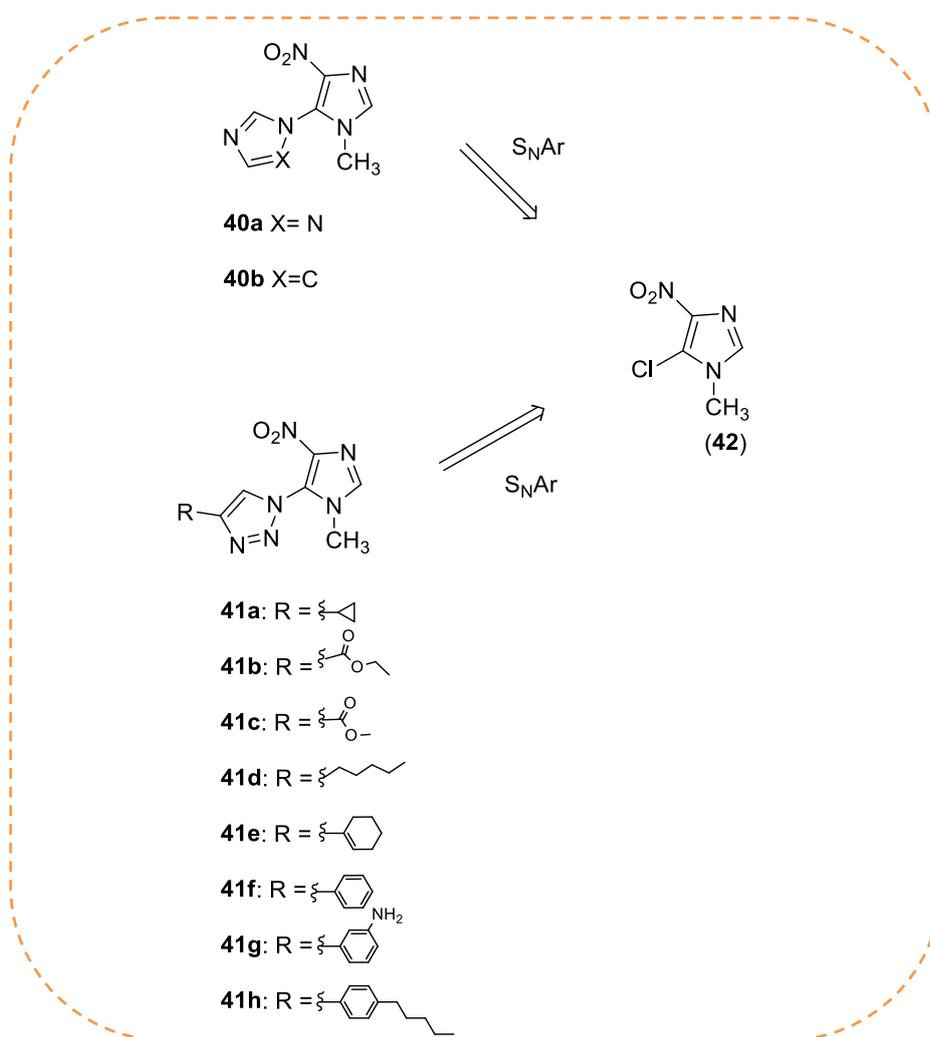
IV- JUSTIFICATIVA

A química medicinal busca prever as propriedades de uma molécula, tentando minimizar as falhas no processo de desenvolvimento do fármaco. Como resultado, os compostos contendo o grupo nitro são geralmente descartados e moléculas promissoras são perdidas. Mas apesar das preocupações sobre a segurança de compostos nitroaromáticos, há grande interesse em seu uso como agentes terapêuticos para doenças infecciosas. Os quais devem ser seletivamente tóxicos aos agentes infecciosos e não ao hospedeiro. São exemplos recentes o fexinidazol (**8**), o PA-824 (**17**) e o OPC-67683 (**18**). Diante de todos estes resultados podemos concluir que as moléculas nitradas têm importante atividade antiparasitária e não devem ser descartadas. O nosso grupo de pesquisa tem sintetizado vários novos nitroimidazóis, que foram testados para *T. cruzi*, *T. brucei*, avaliados quanto às atividades genotóxica e mutagênica e, temos concluído que o grupo nitro não é o único responsável por estas atividades negativas (MELLO *et. al.*, 2013, PATTERSON& WYLLIE, 2014, CARVALHO *et. al.*, 2014 e BOECHAT *et. al.*, 2014).

V- METODOLOGIA SINTÉTICA

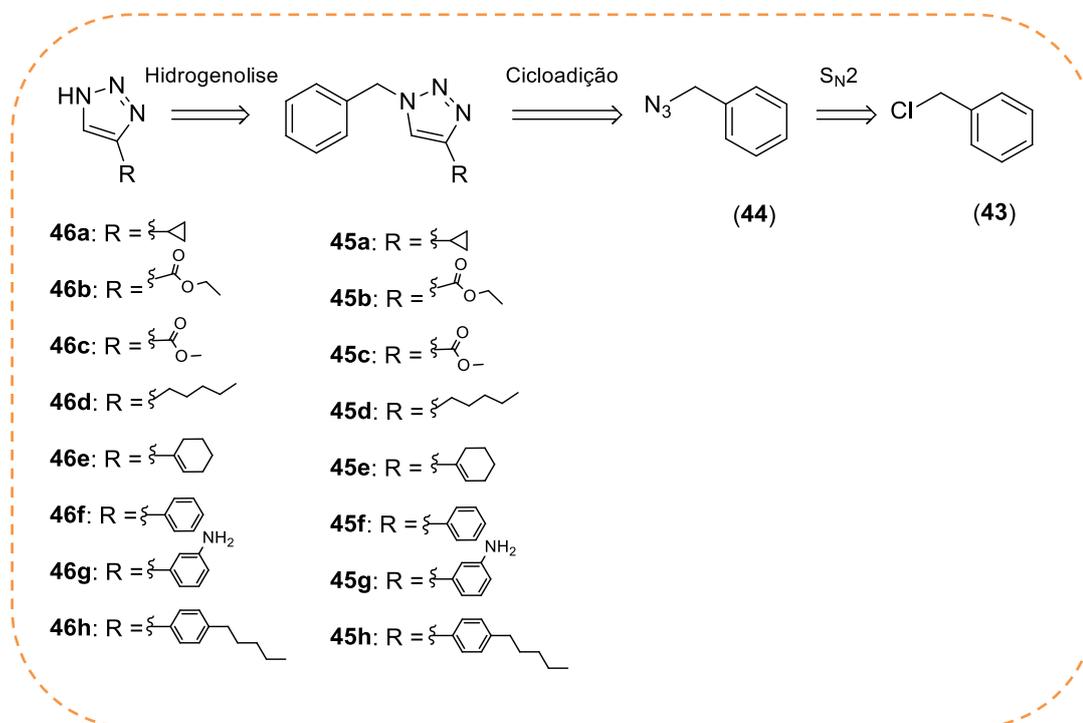
Neste trabalho foram propostas duas metodologias sintéticas para a preparação dos compostos finais **40a-b** e **41a-h**.

Para a obtenção dos nitroimidazóis utilizou-se a reação de substituição nucleofílica aromática (S_NAr) entre o 5-cloro-1-metil-4-nitroimidazol (**42**) e os respectivos azóis (Esquema 16). Esta reação já vem sendo utilizada pelo grupo com êxito para a preparação de nitroimidazóis, análogos do megazol (**4**) (BOECHAT *et. al.*, 2001; CARVALHO *et. al.*, 2014; CARVALHO *et. al.*, 2007 e CARVALHO *et. al.*, 2006).



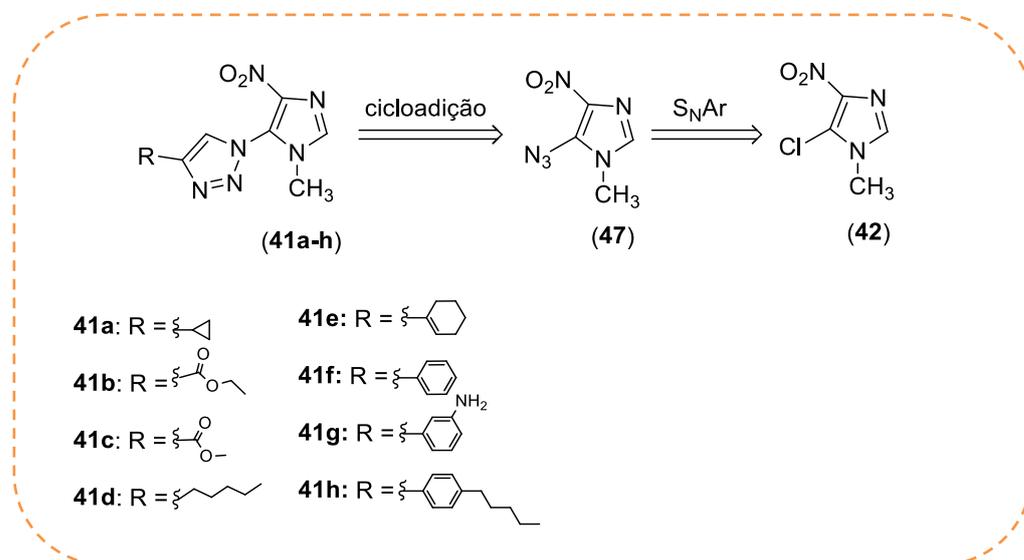
Esquema 16: Retrossíntese proposta para a obtenção dos novos 4-nitroimidazóis (**40a-b** e **41a-h**).

Para a síntese dos novos substituídos nitroimidazóis **41a-h**, se fez necessário à preparação dos intermediários triazólicos (**46a-h**), conforme a retrosíntese apresentada no esquema 17.



Esquema 17: Retrossíntese proposta para os azóis (**46a-h**).

A segunda metodologia empregada para a síntese dos novos nitroimidazóis **41a-h** foi proposta em duas etapas, através da reação de cicloadição de **47**, que foi obtido pela S_NAr de **42** (Esquema 18).

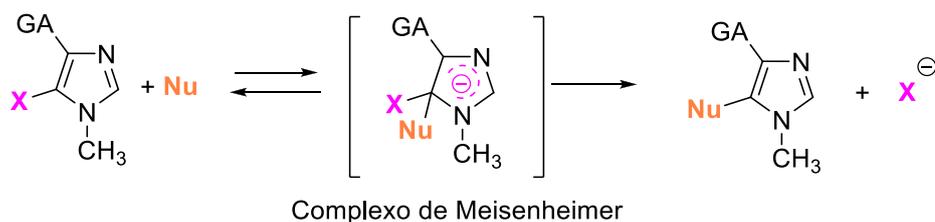


Esquema 18: Retrossíntese proposta para a obtenção dos novos 4-nitroimidazóis (**41c-h**)

VI- RESULTADOS E DISCUSSÃO

1- 1ª Metodologia realizada

A primeira etapa feita nesse trabalho, para a síntese dos compostos planejados, foi a reação de S_NAr . Esta envolveu a adição do nucleófilo ao anel imidazólico, formando um intermediário aniônico, também conhecido como complexo de Meisenheimer, seguido da eliminação do grupo abandonador, pela rearomatização do anel, como ilustrado no esquema 19 (SMITH, 1994). A etapa determinante da velocidade desta reação é o ataque do nucleófilo ao anel aromático e não a quebra C-X. Por esta razão, os halogênios, como grupos abandonadores, apresentam ordem de reatividade inversa à de uma S_N2 , ou seja: $F \gg Br \sim Cl > I$ (RASMUSSEN *et. al.*, 1999; NAGARAJAN *et. al.*, 1997).

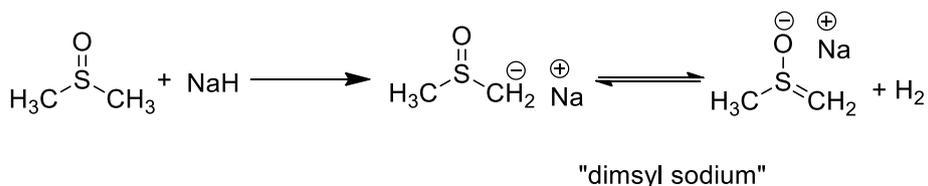


GA = Grupo ativante;
X = Grupo abandonador

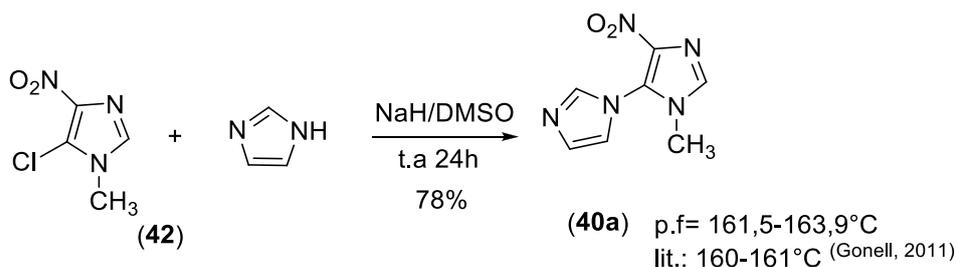
Esquema 19: Mecanismo proposto de S_NAr .

A reatividade de sistemas heterocíclicos de cinco membros frente à reação de S_NAr , geralmente é maior do que no sistema benzênico. O intermediário aniônico forma-se mais rapidamente devido à baixa aromaticidade do anel e a facilidade do heteroátomo para acomodar a carga negativa (TERRIER, 1991 e WOLFF *et. al.*, 1998). O anel imidazólico, assim como outros sistemas aromáticos, necessita de grupos retiradores de elétrons (grupos ativantes) como o NO_2 , para que ocorram as substituições nucleofílicas, estes grupos atuam diminuindo a densidade eletrônica do sistema e facilitando a adição do nucleófilo (SILBER *et. al.*, 1999 e WOLFF *et. al.*, 1998).

Para formação do primeiro produto desejado **40a**, foi feita a reação entre 5-cloro-1-metil-4-nitroimidazol e o imidazol como nucleófilo (Esquema 21) em presença de “dimsyl sodium” (Esquema 20). Assim o composto final **40a** foi obtido em bom rendimento (78%), como um sólido marrom claro.

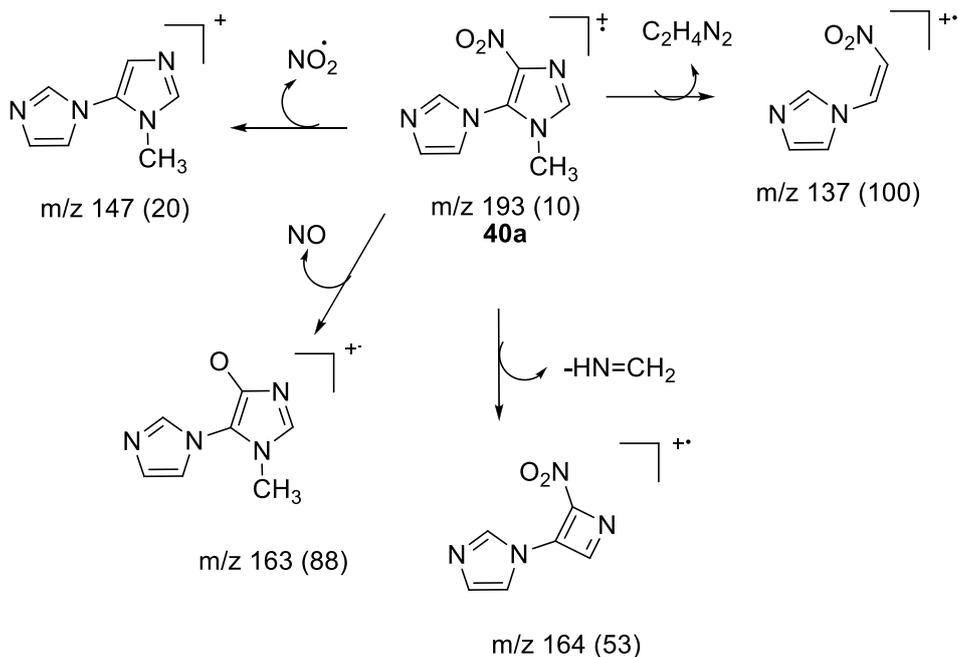


Esquema 20: Formação do “dimsyl sodium”.



Esquema 21: Obtenção do composto final **40a**.

A formação do produto **40a** foi confirmada pela comparação do ponto de fusão obtido, com o da literatura e pela análise do espectro de massas obtido por CG/EM. Apresentou o íon molecular de m/z 193 e o pico base m/z 137, correspondente à perda de C₂H₄N₂. Apresentou também fragmento m/z 163, referente à perda de NO, característico do grupo nitro, e fragmentos correspondes à fragmentação do anel imidazólico. As propostas de fragmentação estão apresentadas no esquema 22.

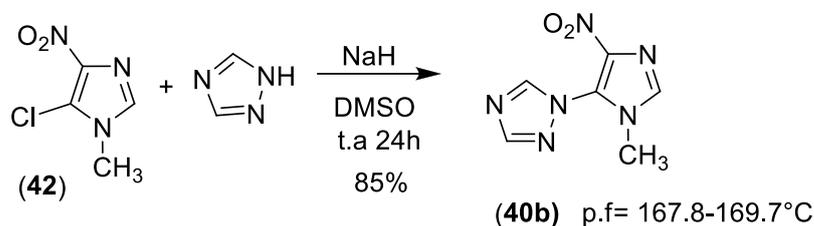


Esquema 22: Proposta de mecanismo para as principais de fragmentações do 1'-metil-4'-nitro-1'H-1,5'-biimidazole (**40a**).

A análise de RMN ^1H apresentou um simpleto para 3H, em δ 3,49, referente aos hidrogênios da metila do anel imidazólico, em δ 7,19 e 8,03, correspondente aos hidrogênios do anel imidazólico, e em δ 7,55, referente ao hidrogênio do anel imidazólico e um simpleto em δ 8,01 corresponde ao hidrogênio do C-2 do anel nitroimidazólico.

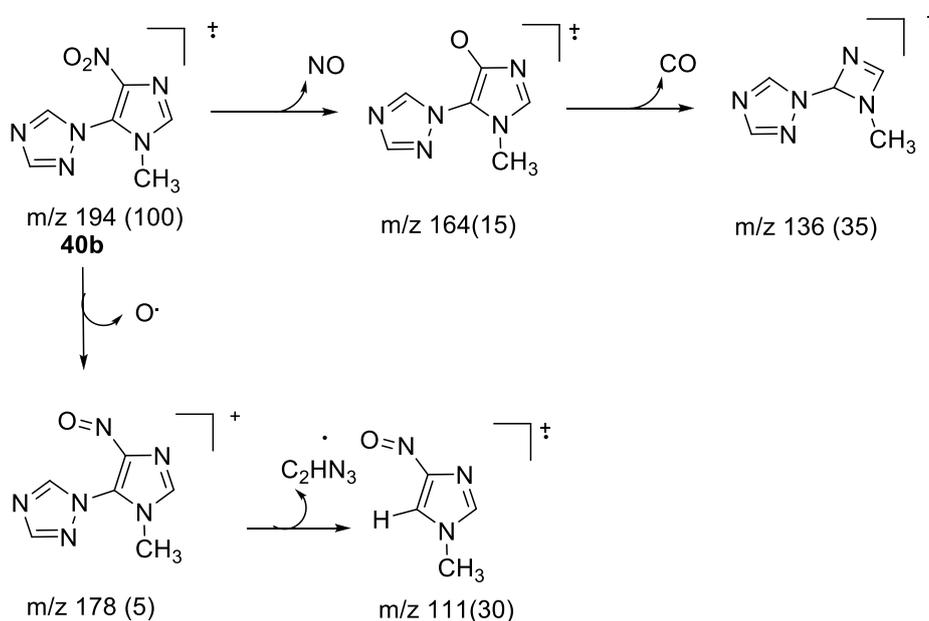
O espectro de RMN ^{13}C apresentou sinais em δ 31,6 e 134,8, característicos dos hidrogênicos do N- CH_3 e C-2 do anel nitroimidazólico. Os carbonos quartenários em δ 125,0 e 132,2, correspondentes aos C-5 e C-4 do nitroimidazol, e sinais em δ 138,7, 120,8 e 129,4, referentes aos C-7, C-9 e C-10 do anel imidazólico, estes sinais foram confirmados através da técnica de HSQC.

O nitroimidazol **40b** contendo o núcleo 1,2,4-*H*-triazol, foi obtido como cristal branco em 85% de rendimento (Esquema 23).



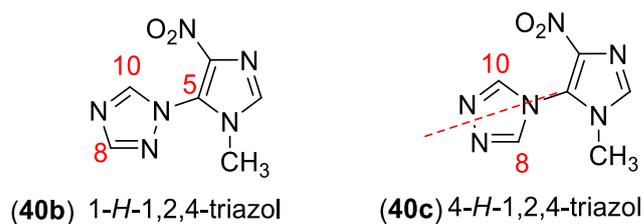
Esquema 23: Obtenção do composto final **40b**.

A formação do produto **40b** foi confirmada pela análise do espectro de massas que apresentou o íon molecular m/z 194. Os fragmentos característicos da presença do grupo nitro, correspondentes à perda de NO e CO (m/z 165 e 136) e a perda do anel 1,2,4-triazólico (m/z 111) (Esquema 24).



Esquema 24: Proposta de mecanismo para as principais fragmentações de **40b**.

A análise de RMN ^1H apresentou um sinal simples em δ 3,57, para 3H, correspondente aos hidrogênios da metila e um simpleto em δ 8,09, referente ao hidrogênio do C-2 do anel imidazólico. Os simpletos em 8,48 e 9,09 referentes aos hidrogênios do núcleo 1,2,4-triazólico foram importantes para elucidar a estrutura do triazol, já que nesta estrutura química 1*H*-triazol não existe um plano de simetria, consequentemente os hidrogênios se apresentam em campos diferentes, no qual isso não ocorre com o 1,2,4-4*H*-triazol (Esquema 25).

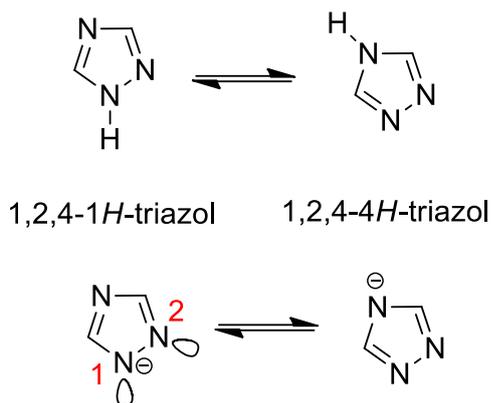


Esquema 25: Estruturas químicas de 1-*H*-triazol e 4-*H*-triazol

No espectro de RMN ^{13}C de **40b** os carbonos se comportaram da mesma maneira, ocorrendo dois sinais referentes ao C-8 e C-10 em δ 148,3 e em δ 153,4, respectivamente (Tabela 3).

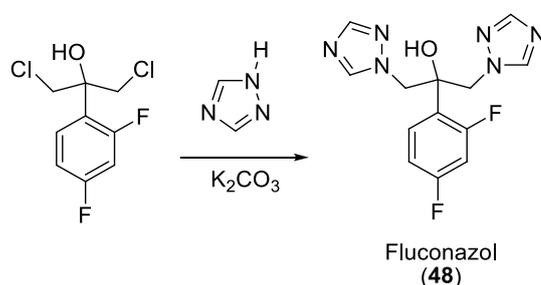
A análise do espectro de massas de alta resolução mostrou o sinal 217,0446 referente ao íon molecular do **40a** mais sódio.

O produto **40b** foi obtido pelo ataque do nucleófilo do 1*H*-triazol, por este ser mais reativo, devido à repulsão eletrônica entre os pares de elétrons dos nitrogênios N-1 e N-2 (Esquema 26).



Esquema 26: Possíveis formas tautoméricas do 1,2,4-triazol.

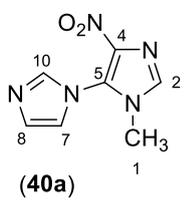
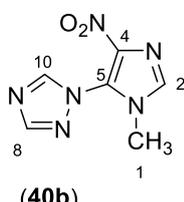
Esta superior reatividade já vem sendo relatada na literatura, como por exemplo, na síntese do fármaco fluconazol (**48**), que tem sua estrutura inequívoca confirmada por cristalografia pelo ataque do nucleófilo 1-*H*-1,2,4-triazol por reação S_N2 (Esquema 27) (WANG & BIAN 2014).



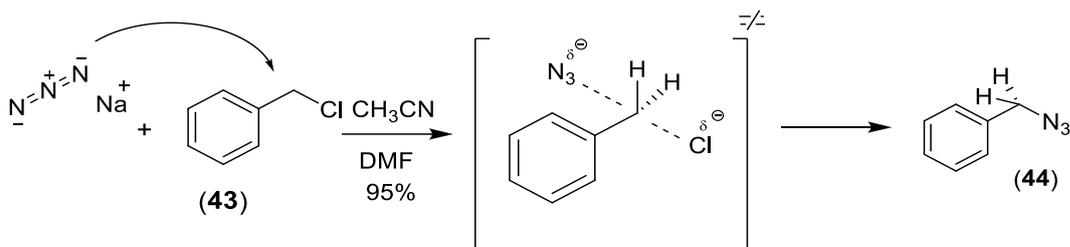
Esquema 27: Síntese do fluconazol (**48**).

Comparando o deslocamento químico dos compostos **40a** e **40b**, observou-se a influência da ligação do núcleo triazólico e do núcleo imidazólico sobre o anel nitroimidazólico. Para o RMN 1H o deslocamento de H-8 do **40b** comparado ao **40a**, sofreu maior influência do efeito eletroatrator, diminuindo a densidade eletrônica tornando-o mais desblindado (Tabela 3). Para o RMN ^{13}C observou-se esta influência também quando comparou-se os C-8 e C-10 de **40a** e **40b**, onde os carbonos do **40b** encontram-se mais desblindados e em maior frequência, devido à eletronegatividade do átomo de nitrogênio (Tabela 3).

Tabela 3: Dados comparativos de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos compostos **40a-b**.

RMN ^1H / ^{13}C	 (40a)		 (40b)	
C-1	3,49	31,6	3,57	32,2
C-2	8,01	134,8	8,09	135,7
C-4	--	132,2	-	138,8
C-5	--	125,0	-	123,5
C-7	7,19	120,8	-	-
C-8	7,55	129,4	9,09	148,3
C-10	8,03	138,7	8,47	153,4

Para a obtenção dos novos nitroimidazóis **41a-h**, através da $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ se fez necessária à preparação dos intermediários triazólicos **46a-h**. Foi feita inicialmente a reação de substituição nucleofílica do tipo $\text{S}_{\text{N}}2$, utilizando o cloreto de benzila (**43**), e a azida de sódio, como nucleófilo, em acetonitrila e dimetilformamida (ANKATI, 2009). O produto **44** foi obtido com 95% de rendimento (Esquema 28).

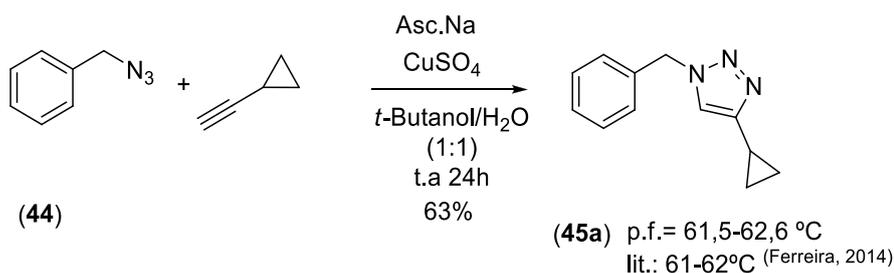


Esquema 28: Proposta de mecanismo de obtenção da benzilazida (**44**).

A presença da azida **44** foi confirmada pelo espectro na região do infravermelho, que apresentou um estiramento em 2096 cm^{-1} , referente à banda característica de N_3 .

A próxima etapa foi feita a reação de cicloadição de Huisgen “revigorada” a “Click Chemistry”. Esta metodologia se baseia na utilização de Cu(I) para obter substâncias de forma rápida, em bons rendimentos e regiosseletiva para o 1,4-dissubstituído. Nesta etapa foi utilizado como solventes *t*.BuOH e H_2O , como agente redutor ascobarto de sódio (Asc.Na) e como fonte de cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ com os respectivos acetilenos e azida **44**.

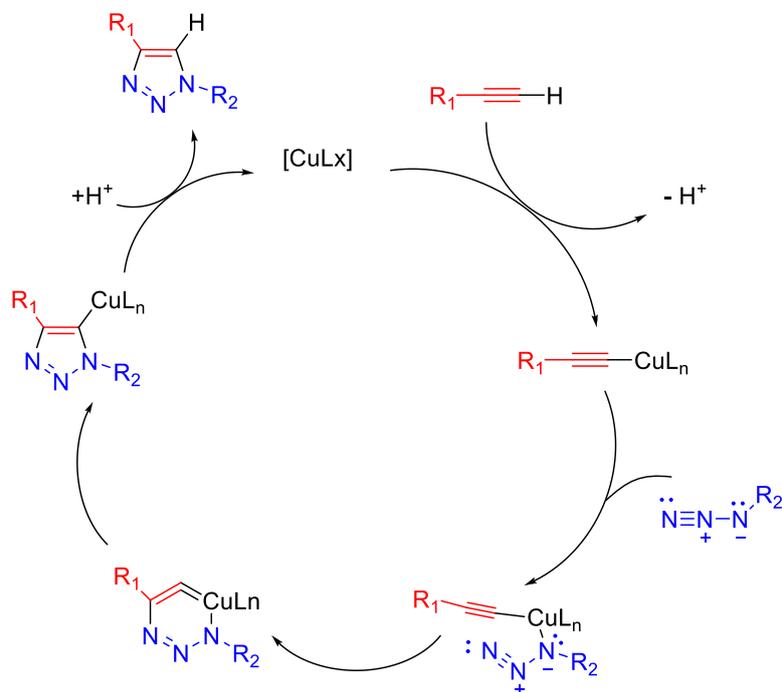
Como descrito na literatura, esta reação fornece bons rendimentos. Quando o ciclopropil foi utilizado, obteve-se o produto **45a** como um sólido amarelado em 63% de rendimento, com formação exclusiva do regioisômero 1,4-dissubstituído (KOLB *et. al.*, 2001 e FERREIRA *et. al.*, 2014) (Esquema 29).



Esquema 29: Obtenção 1-benzil-4-ciclopropil-1*H*-1,2,3-triazol (**45a**).

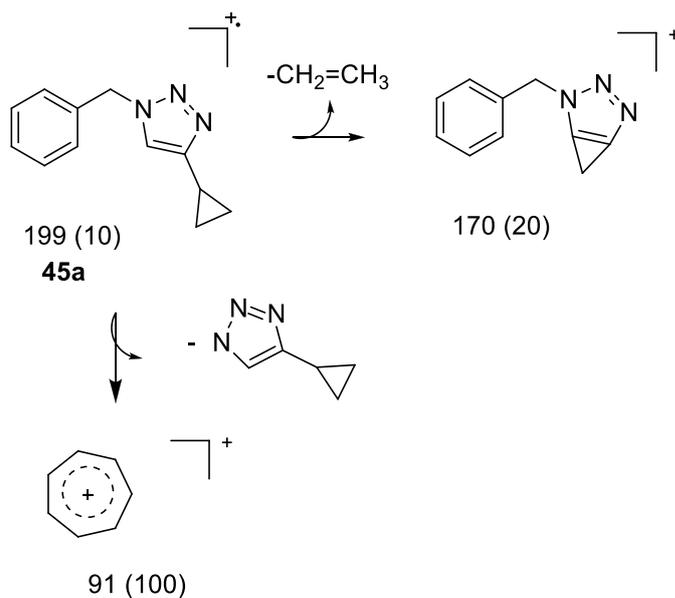
O mecanismo simplificado proposto para esta reação se baseia na redução do Cu^{2+} para Cu^{1+} pelo Asc.Na, o Cu^{1+} irá se complexar no carbono terminal do acetileno e

com o nitrogênio nucleofílico da benzilazida dando início a cicloadição 1,3 dipolar (Esquema 30) (HEIN & FOKIN, 2010; WORRELL *et. al.*, 2013 e FREITAS *et. al.*, 2011).



Esquema 30: Mecanismo proposto para a reação de cicloadição 1,3-dipolar (Adaptado de HEIN & FOKIN, 2010; WORRELL *et. al.*, 2013 e FREITAS *et. al.*, 2011).

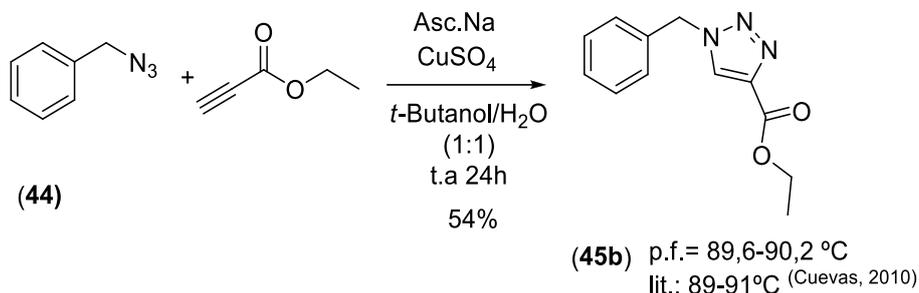
A formação do produto **45a** foi confirmada pela análise do espectro de massas obtido através de CG/EM, que apresentou o íon molecular de m/z 199, o fragmento m/z 170, referente à perda do grupo $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ($M-29$) e o fragmento m/z 91, que corresponde à perda do anel triazólico ($M-108$). As principais fragmentações são apresentadas a seguir (Esquema 31).



Esquema 31: Principais propostas de fragmentações de 1-benzil-4-ciclopropil-1*H*-1,2,3-triazol (**45a**).

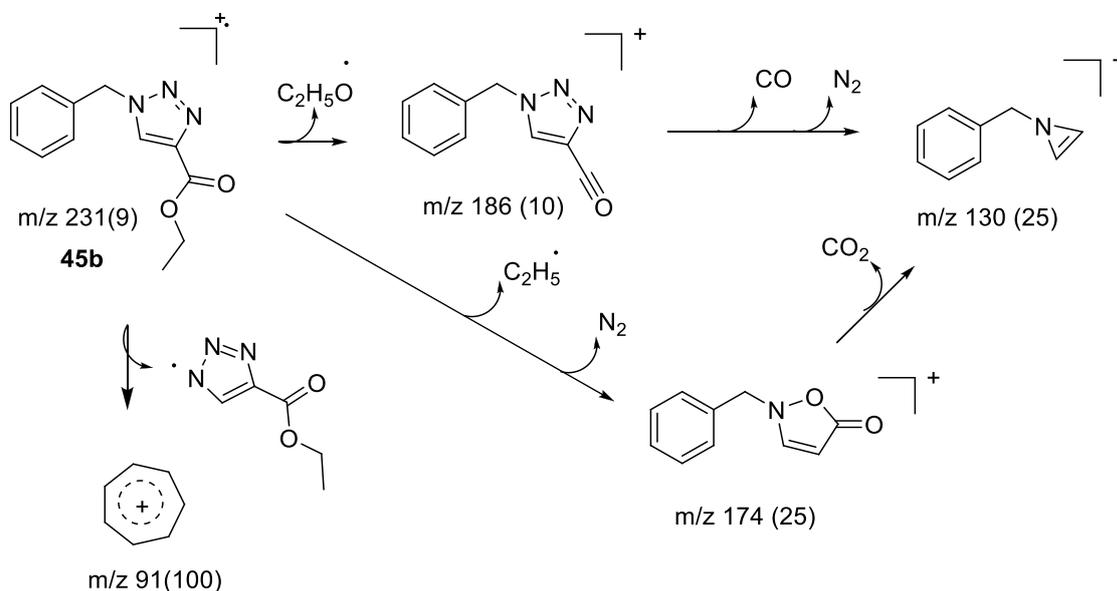
A análise de RMN ^1H apresentou multipletos em δ 0,69, 0,87 e 1,92 correspondentes aos CH_2 e CH do ciclopropil, respectivamente, e um simpleto em δ 7,85 referente ao CH do anel triazólico, que se encontra mais desblindado, devido à vizinhança do nitrogênio no anel (mais eletronegativo que o carbono, proporcionando uma menor densidade eletrônica em torno do núcleo).

O composto **45b** foi obtido como um sólido amarelado em 54% de rendimento utilizando a mesma metodologia (Esquema 32).



Esquema 32: Obtenção 1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxilato de etila (**45b**).

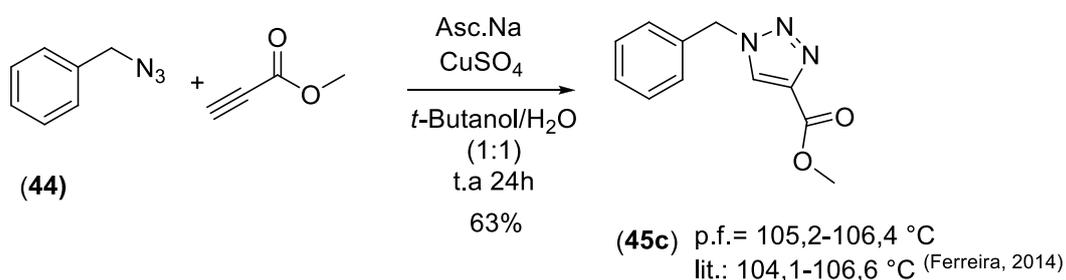
Analisando o espectro de massas obtidos através de CG/EM do composto **45b**, observou-se a presença do íon molecular de m/z 231. Os fragmentos característicos como a perda de $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$, N_2 (m/z 216) e a fragmentação do anel triazólico substituído são apresentadas a seguir (Esquema 33).



Esquema 33: Propostas de mecanismo com as principais fragmentações de 1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxilato de etila (**45b**).

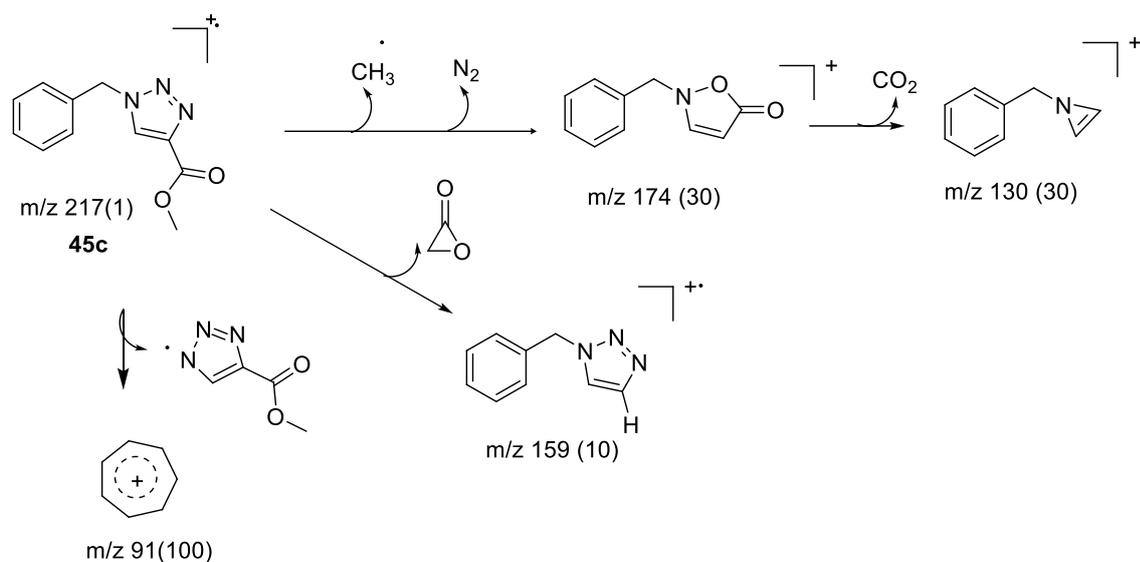
Este produto foi confirmado pelo espectro de RMN ^1H onde apresentou um tripleto, em δ 1,28, para 3H, correspondente á metila do éster. Um simpleto, para 1H, em δ 8,86, referente ao hidrogênio do triazol, um quarteto, para 2H, em δ 4,29 correspondente ao metileno do éster, um sinal simpleto em δ 5,65, para 2H, referente ao metileno benzílico e um sinal múltiplo centrado em δ 7,36 correspondente aos 5 hidrogênios aromáticos.

O composto **45c** foi obtido como um sólido branco em 63% de rendimento utilizando a mesma metodologia (Esquema 34).



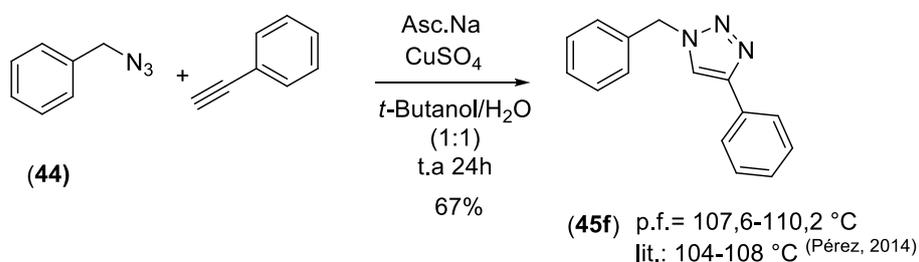
Esquema 34: Obtenção do 1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-carboxilato de metila (**45c**).

Analisando o espectro de massas obtido através de CG/EM do composto **45c**, observou-se a presença do íon molecular de m/z 217 com as fragmentações características deste sistema, quando comparado ao composto anterior (Esquema 35).



Esquema 35: Propostas de mecanismo com as principais fragmentações de 1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-carboxilato de metila (**45c**).

O produto **45f** foi obtido como um sólido branco em 67% de rendimento (Esquema 36).



Esquema 36: Obtenção do 1-benzil-4-fenil-1H-1,2,3-triazol (**45f**).

O composto **45f** não é inédito e apresentou ponto de fusão compatível com a literatura. A formação do produto **45f** foi também confirmada pela análise do espectro de massa através de CG/EM que apresentou o íon molecular de m/z 235 e as fragmentações características desta classe, tal como as anteriores.

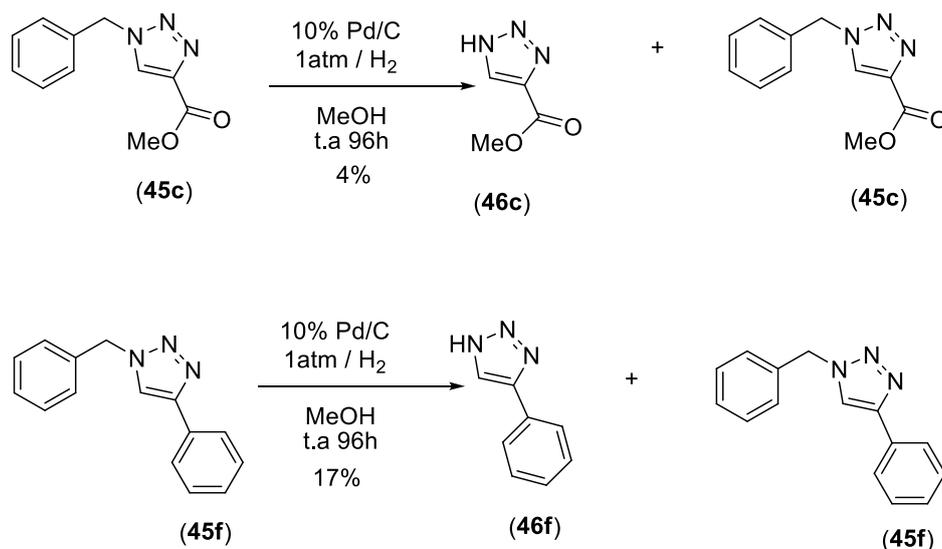
A análise do espectro de RMN ^1H apresentou um simpleto, para 2H, em δ 5,64 correspondente ao metileno benzílico. Um simpleto em δ 8,63 referente ao hidrogênio

do triazol e um duplete e múltiplo em δ 7,85 e 7,38 correspondentes aos hidrogênios aromáticos.

Uma vez preparados esses quatro intermediários **45a**, **45b**, **45c** e **45f** foi realizada a última etapa para obtenção dos triazóis substituídos, através da reação de hidrogenólise. Os catalisadores mais utilizados nas hidrogenólises de ligações N-benzílicas, são os Pd/C e Pd(OH)₂ (SMITH & NOTHEISZ, 1999).

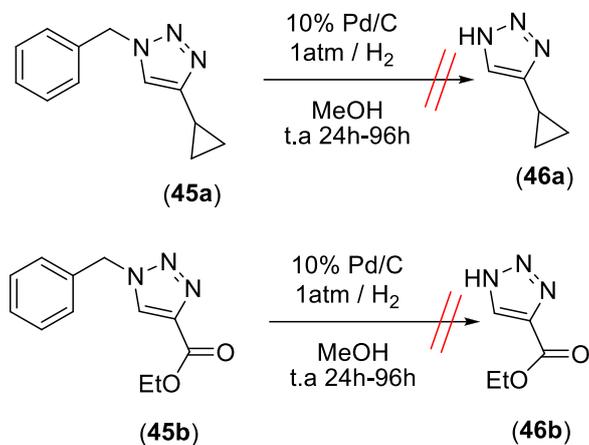
Inicialmente optou-se por usar o Pd/C a 10% para a obtenção dos 1,2,3-1*H*-triazóis substituídos **46a** e **46b**. Entretanto, não se obteve êxito para ambos os substratos testados.

No entanto para os **45c** e **45f** uma pequena conversão foi observada, através da cromatografia em camada fina (CCF) e pela confirmação da análise por CG/EM (Esquema 37).



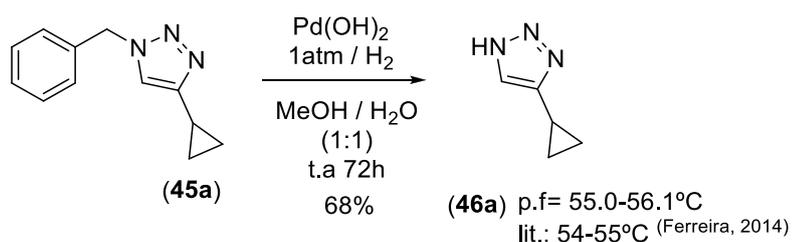
Esquema 37: Tentativas de obtenção dos compostos **46c** e **46f**.

Para os substratos **45a** e **45b**, mesmo variando o tempo de reação não observou-se o progresso da reação, recuperando todo material de partida (Esquema 38).



Esquema 38: Tentativas de obtenção dos compostos **46a-b**.

Assim, optou-se pelo catalisador $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (ESTERMANN & SEEBACH, 1988; FULMER *et. al.*, 2009 e FERREIRA *et. al.*, 2014). Para formação do composto **46a**, após 72 horas, observou-se pela CCF a conversão total ao produto desejado, que foi obtido como sólido amarelado, em 68% de rendimento (Esquema 39).

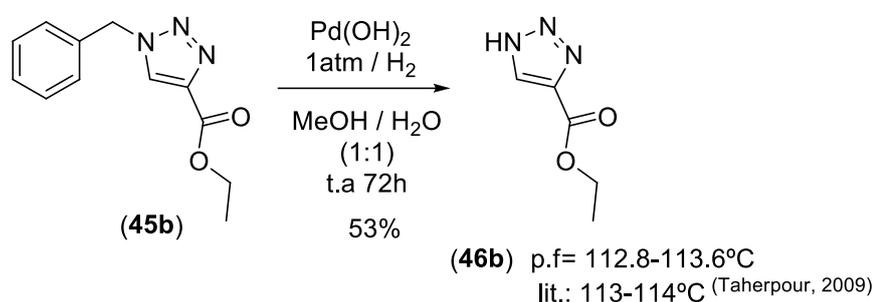


Esquema 39: Obtenção do composto **46a**.

A confirmação do composto **46a** foi feita pela comparação dos pontos de fusão determinado e o da literatura, e através da análise por CG/EM, que apresentou o íon molecular de m/z 109 e o fragmento correspondente à perda de $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ (M-29).

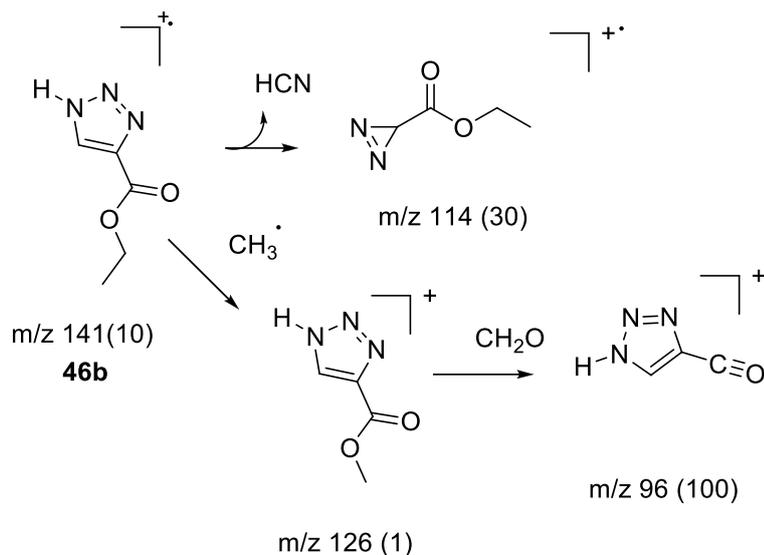
O **46a** foi confirmado também pelo espectro de RMN ^1H , onde apresentou um multipeto entre δ 0,70 e 0,89, referente aos hidrogênios do CH_2 do ciclopropil, multipeto em δ 1,94 correspondente, ao CH do ciclopropil. Apresentou também um simpleto em δ 7,52, referente ao hidrogênio no núcleo triazólico. Um sinal largo em δ 14,53 foi atribuído ao hidrogênio ligado a nitrogênio (NH).

O **46b** foi obtido também com sucesso utilizando $\text{Pd}(\text{OH})_2$, após 72h, como um sólido branco em 53% de rendimento (Esquema 40).



Esquema 40: Obtenção do composto **46b**.

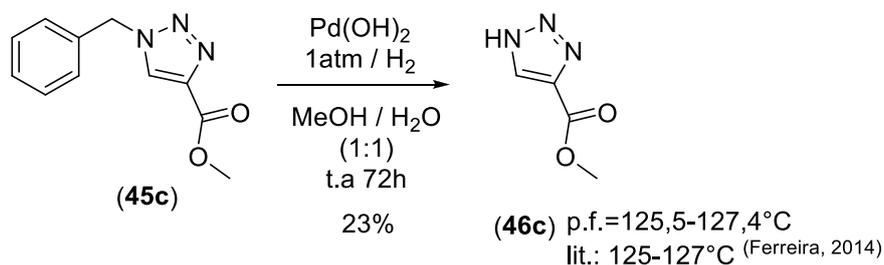
A formação do produto **46b** foi confirmada pela comparação entre os pontos de fusão determinado e o da literatura e através da análise por CG/EM, que apresentou o íon molecular de m/z 141 e o fragmento correspondente à perda de CH_3 ($M-15$). As fragmentações são apresentadas no esquema 41.



Esquema 41: Mecanismo proposto para as principais fragmentações do composto **46b**.

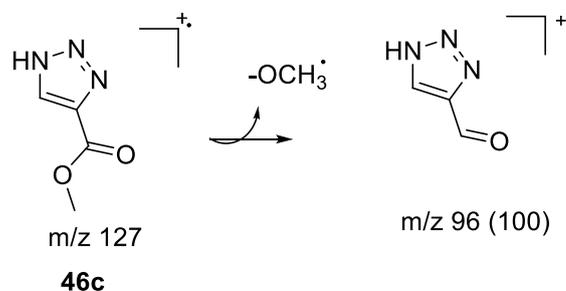
O composto **46b** foi confirmado também por RMN ^1H , que apresentou um tripleto em δ 1,30 correspondente aos 3 hidrogênios da metila do éster. Um simpleto em δ 8,49 referente ao H-5 do triazol e um quarteto em δ 4,33 correspondente aos 2 hidrogênios do éster, com desaparecimento dos hidrogênios do grupo benzil.

O produto **46c** foi obtido como um sólido branco, também usando a mesma metodologia, porém em baixo rendimento de 23% (Esquema 42).



Esquema 42: Obtenção do composto **46c**.

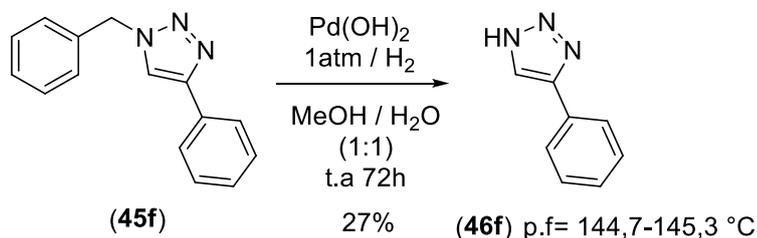
A confirmação do produto **46c** foi feita através da análise do espectro de massas obtido através de CG/EM, que apresentou o íon molecular de m/z 127 e o fragmento correspondente à perda de OCH₃ (M- 31). A fragmentação esta apresentada no esquema 43.



Esquema 43: Principal fragmentação proposta para **46c**.

O composto **46c** foi confirmado também por RMN ¹H, onde apresentou o sinal simples em δ 3,84 correspondente aos 3 hidrogênios da metila do éster. Um simpleto em δ 8,55 referente à H-5 do triazol e um sinal largo em δ 15,79 correspondente ao hidrogênio do NH.

O composto **46f**, não diferente do **46c**, foi obtido como sólido branco em baixo rendimento de 27% (Esquema 44).

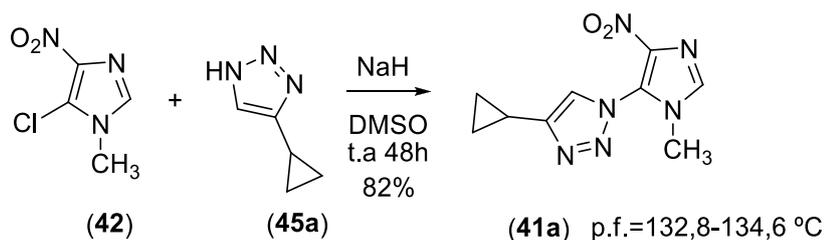


Esquema 44: Obtenção do composto **46f**.

A confirmação do produto **46f** foi feita através da análise do espectro de massas obtido por CG/EM, que apresentou o íon molecular de m/z 145 apresentou-se como pico base e o fragmento correspondente à perda de CH_2CH_3 ($M-29$).

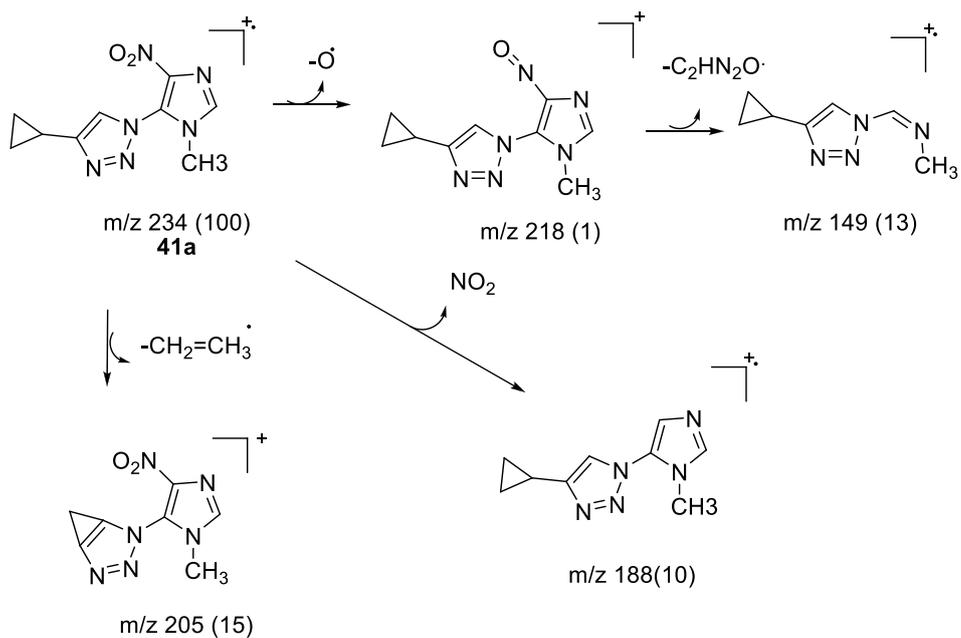
A análise do espectro de RMN ^1H , apresentou um simpleto em δ 8,31 referente ao hidrogênio do triazol, um tripleto em δ 7,45 ($J=7,52$ Hz), um dubleto em δ 7,85 ($J=7,52$ Hz) e um multipletto em δ 7,35 correspondente aos 5 hidrogênios aromáticos e um sinal largo em δ 15,02 referente ao NH .

Uma vez preparados os azóis substituídos **46a**, **46b**, **46c** e **46f** procedeu-se para a última etapa de preparação dos novos nitroimidazóis ligados ao núcleo 1,2,3-triazólico. A reação de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ foi feita utilizando a mesma metodologia utilizada para a obtenção de **40a-b**. O novo nitroimidazol **41a** foi obtido em bom rendimento (82%) (Esquema 45).



Esquema 45: Obtenção do composto final **41a**.

O composto **41a** foi confirmado pela análise do espectro de massas obtido através de CG/EM, que apresentou o íon molecular de m/z 234. Os fragmentos característicos do grupo nitro e dos anéis triazólico e imidazólico. O esquema 46 mostra as principais fragmentações propostas.



Esquema 46: Proposta de mecanismo de para as principais fragmentações do composto **41a**.

A análise do espectro de RMN ^1H apresentou três multipletos em δ 0,86, 1,06 e 2,13 referentes aos dois CH_2 e CH do ciclopropil, respectivamente. Um simpleto em δ 3,54 correspondente aos hidrogênios da metila do anel imidazólico e dois simpletos em δ 8,06 e 8,11 correspondente aos CH do anel imidazólico e triazólico respectivamente (Tabela 4) (Figura 23).

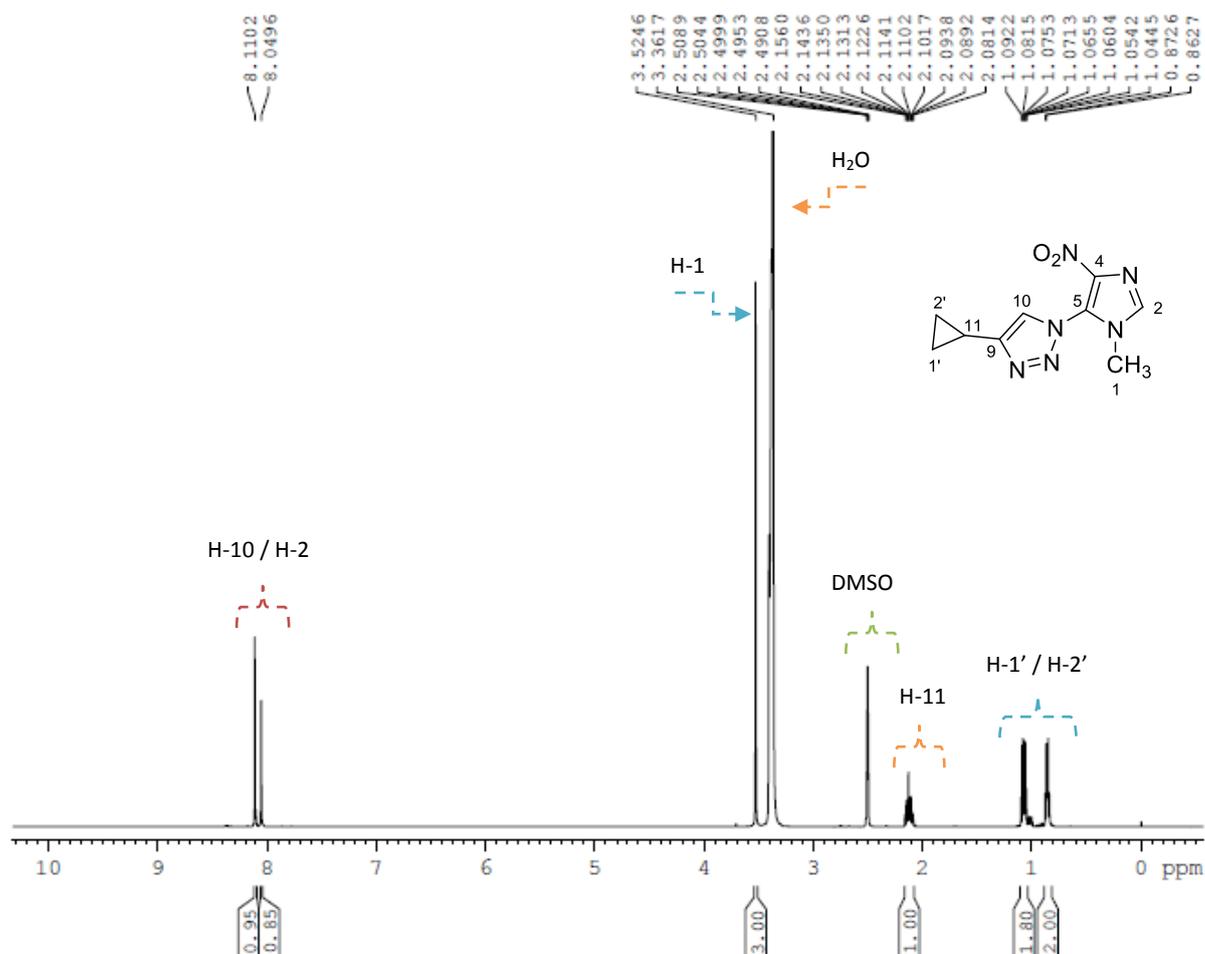
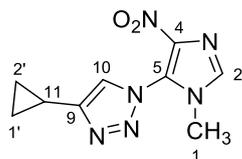


Figura 23: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_{d6} de **41a**.

A análise de RMN ^{13}C mostrou os sinais em δ 32,3 referente ao carbono da metila do anel imidazólico (C-1). Os sinais quaternários em δ 138,9 e 154,3 correspondentes aos C-5 e C-4 do imidazol. Apresentou também o sinal em δ 8,7 correspondente ao C-11 do ciclopropil e sinais em δ 6,6 e 7,9 referentes aos CH_2 do ciclopropila (Tabela 4).

Tabela 4: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **41a** (δ relativo ao TMS, ^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz solvente $\text{DMSO-}d_6$).



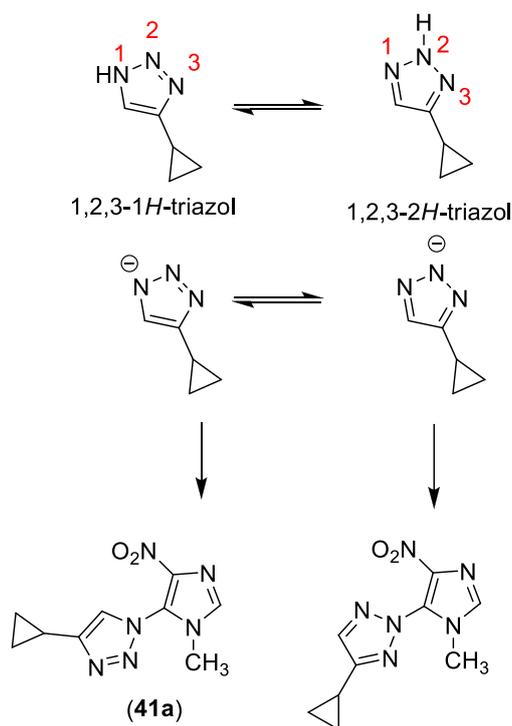
Tipos C/H	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
CH₃	3,54	32,2
2	8,11	135,5
4	-	154,3
5	-	138,9
9	-	125,8
10	8,06	135,5
11	2,13	8,7
1'	0,86 ou 1,06	6,6 ou 7,9
2'	0,86 ou 1,06	6,6 ou 7,9

O espectro na região do infravermelho de **41a** apresentou bandas na região de 1507 e 1358 cm^{-1} , referentes às ligações de deformação axial assimétrica e simétrica do grupo nitro, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5: Principais frequências de absorção na região do I.V no espectro do novo composto **41a** (ATR).

Tipos de vibrações	Absorções (cm ⁻¹)
ν C-H Ar	3107
ν C=C Ar	1617
ν NO ₂	1507 e 1358
ν C-N	831

A cristalografia de raios X de **41a** também foi feita com objetivo de avaliar inequivocamente a sua estrutura química. Já que se poderia obter dois possíveis isômeros devido ao tautomerismo do 1,2,3-*H*-triazol e 1,2,3-*2H*-triazol (Esquema 47).



Esquema 47: Possíveis produtos devido ao tautomerismo do 1,2,3-triazol em solução.

Pela análise cristalográfica de **41a** verificou-se a ligação do C-15 ao N-1 e não ao N-2, confirmando assim a regioseletividade da reação (Figura 24).

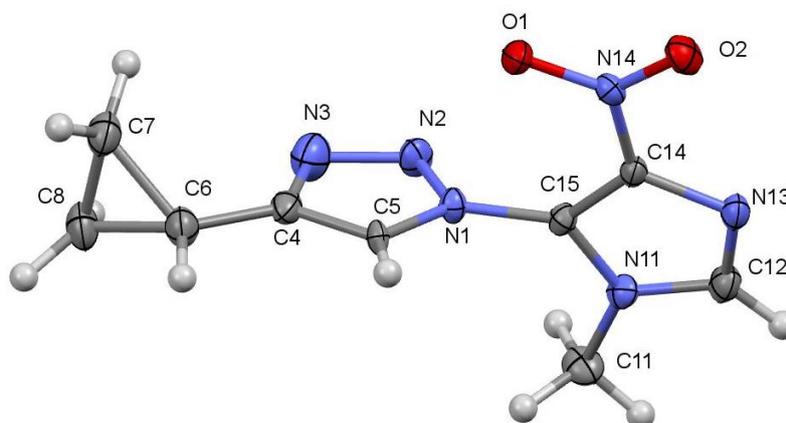


Figura 24: Estrutura cristalográfica de **41a**.

Na avaliação dos dados cristalográficos de **41a** foi observado o arranjo de moléculas formadas a partir de ligações de hidrogênios intermoleculares de C8-H8B e O1; C12-H12 e O2; C5-H5 e O1 onde essas interações são intensificadas pelas ligações do N14-O1 com sistema π ; esse sistema π interage com C7-H7a e C8-H8A (Figura 25); na figura 26 demonstra o arranjo da molécula produzida a partir de todas as interações intermoleculares.

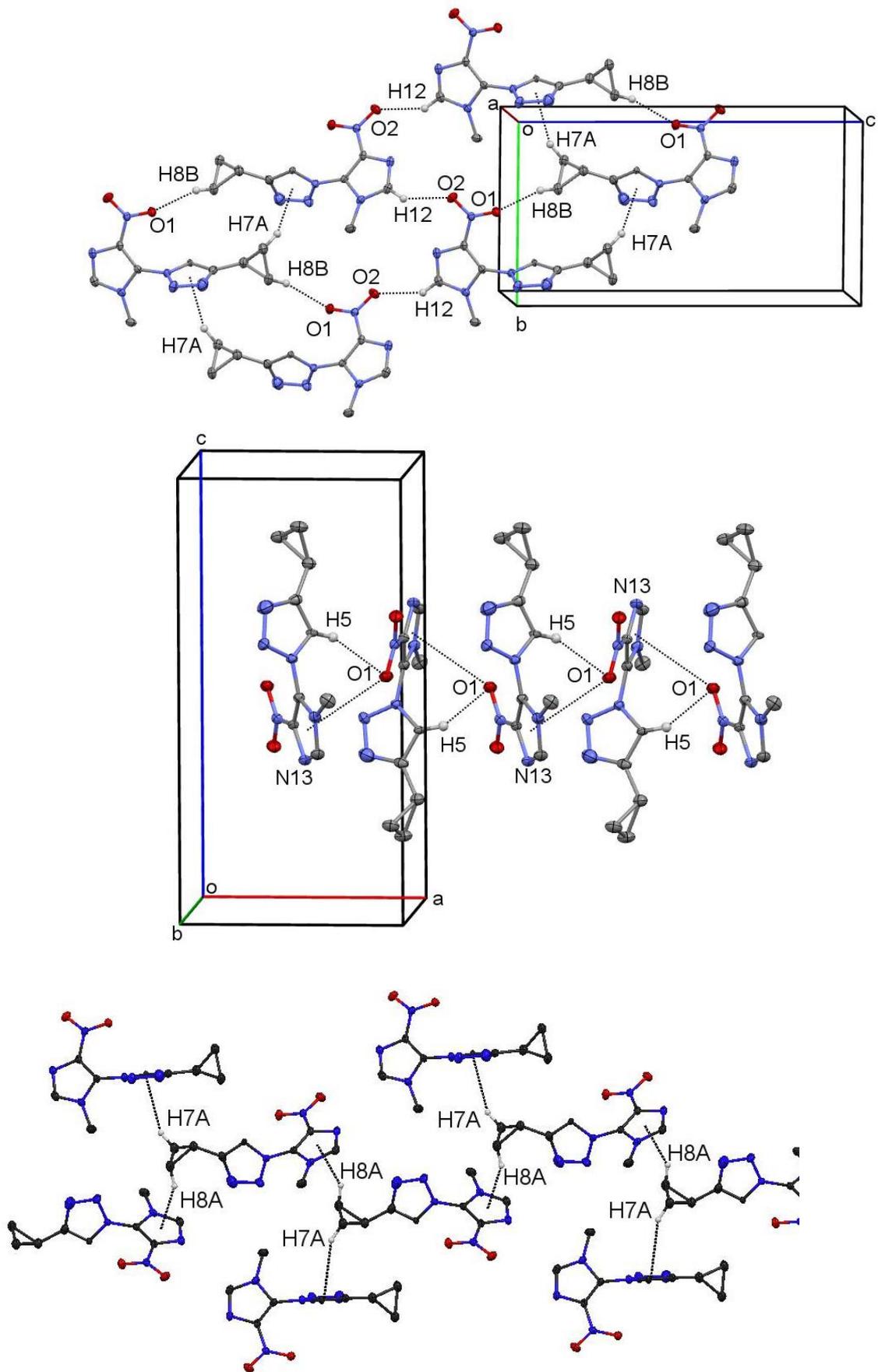


Figura 25: Ligações de hidrogênio intermolecular do composto **41a**.

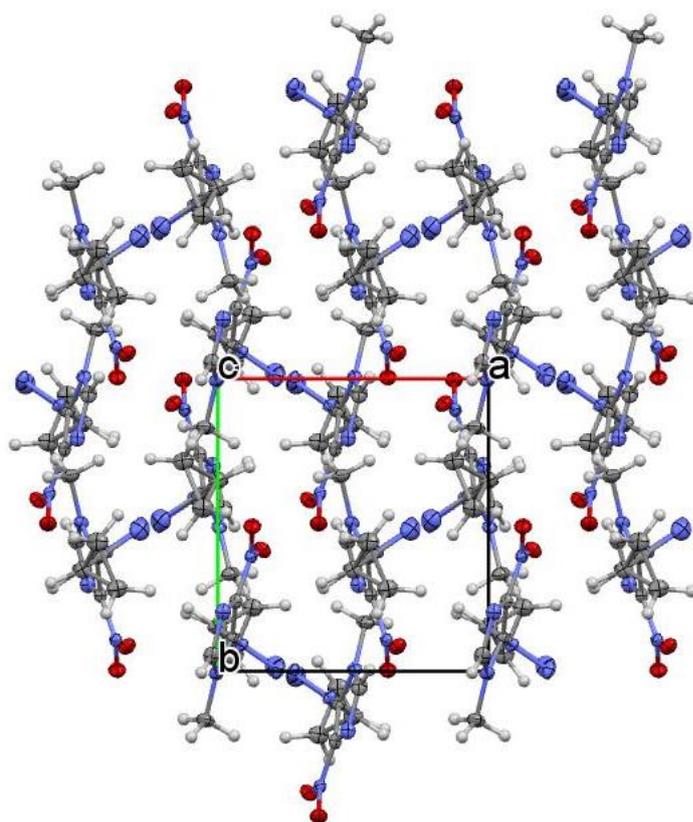
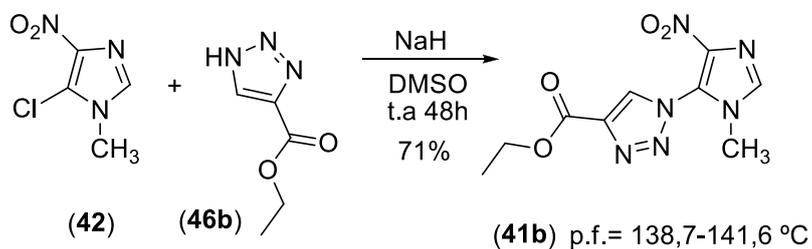


Figura 26: O arranjo da molécula **41a** produzida a partir de todas as interações intermoleculares.

O segundo nitroimidazol contendo o núcleo 1,2,3-triazol **41b** também foi obtido com êxito, como sólido branco em 71% de rendimento (Esquema 48).



Esquema 48: Obtenção do composto final **41b**.

A formação de **41b** foi confirmada pela análise de RMN ^1H , a qual apresentou um triplo em δ 1,34 ($J=7,1$ Hz), correspondente os três hidrogênios da metila do éster etílico. Um simpleto em δ 3,60, para 3H, referente aos hidrogênios mais desblindados da metila do anel imidazólico. Apresentou um quarteto, para 2H, em δ 4,38 ($J=7,1$ Hz), correspondente ao CH_2 do éster e dois simpletos, para 1H cada, em δ 8,17 e 9,36, referentes ao CH do anel imidazólico e triazólico, respectivamente (Figura 27) (Tabela 6).

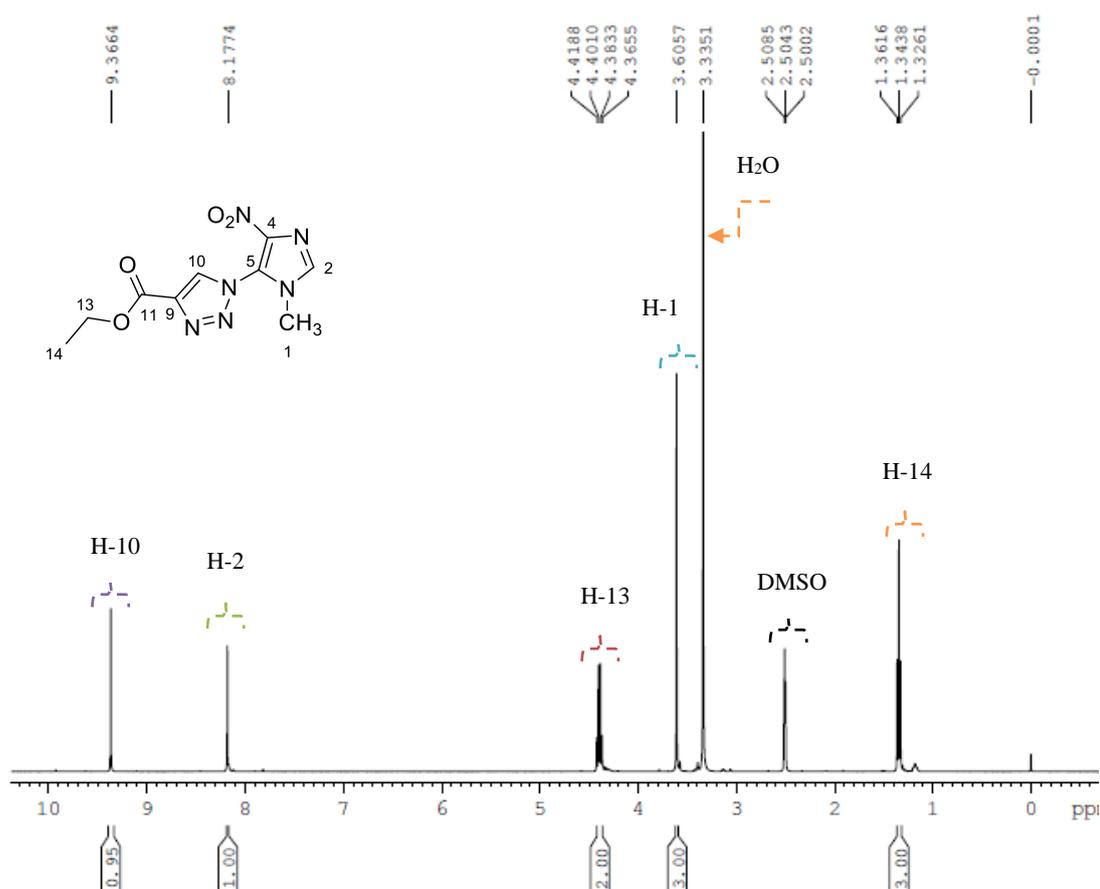
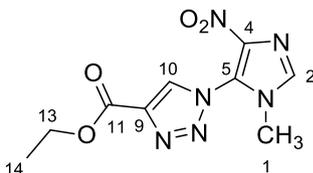


Figura 27: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de **41b**.

A análise de RMN ^{13}C mostrou os sinais em δ 32,4 e 14,1, referentes aos carbonos das metilas do anel imidazólico (C-1) e do éster etílico (C-14). Os sinais quaternários em δ 139,1 e 139,2, correspondentes aos C-5 e C-4 do imidazol. Apresentou sinais em δ 136,3, 133,3 e 159,5, característicos das ligações de C-2 do anel

imidazólico, C-10 do anel triazólico e ligação de C=O do éster etílico, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **41b** (δ relativo ao TMS, ^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz solvente DMSO-*d*₆).



Tipos C/H	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
CH₃	3,60	32,4
2	8,17	136,3
4	-	139,2
5	-	139,1
9	-	122,3
10	9,36	133,3
11	-	159,5
13	4,34 ($J=7,1$ Hz)	61,1
14	1,34 ($J=7,1$ Hz)	14,1

A análise do espectro na região do infravermelho de **41b** apresentou bandas na região 1718 e 1261 cm^{-1} referentes ao estiramento das ligações C=O e C-O da função éster, respectivamente e absorções características na região de 1546; 1509 e 1330 cm^{-1} , correspondentes às ligações de deformação axial assimétrica e simétrica do grupo nitro, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7: Principais frequências de absorção na região do I.V no espectro do novo composto **41b** (ATR).

Tipos de vibrações	Absorções (cm ⁻¹)
ν C-H Ar	3124
ν C=O	1718
ν C=C Ar	1613
ν NO ₂	1546; 1509 e 1330
ν C-O	1261
ν C-N	830

A análise do espectro de massas com infusão direta mostrou o sinal 289 referente ao íon molecular do composto mais sódio.

Foi feito também a análise cristalográfica de **41b** confirmando também a sua estrutura química e a regioseletividade da reação (Figura 28).

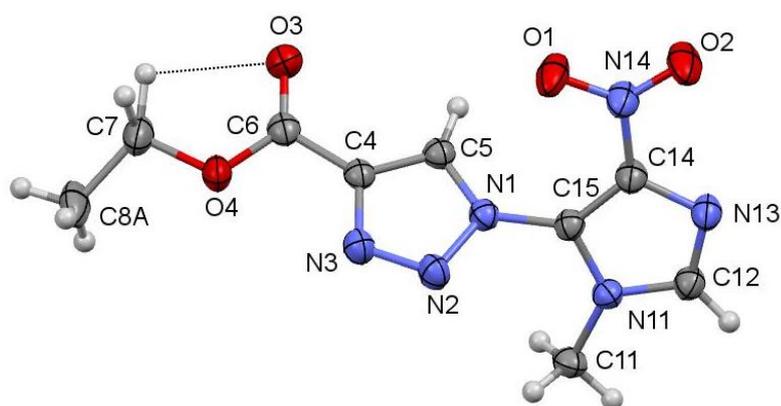
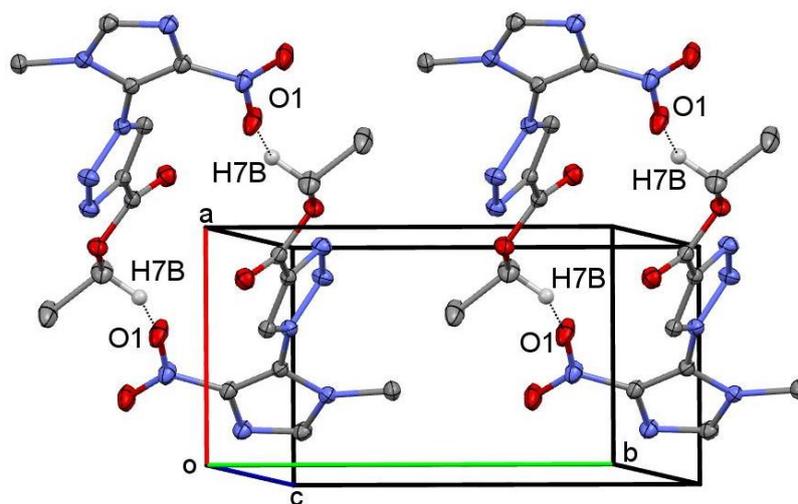
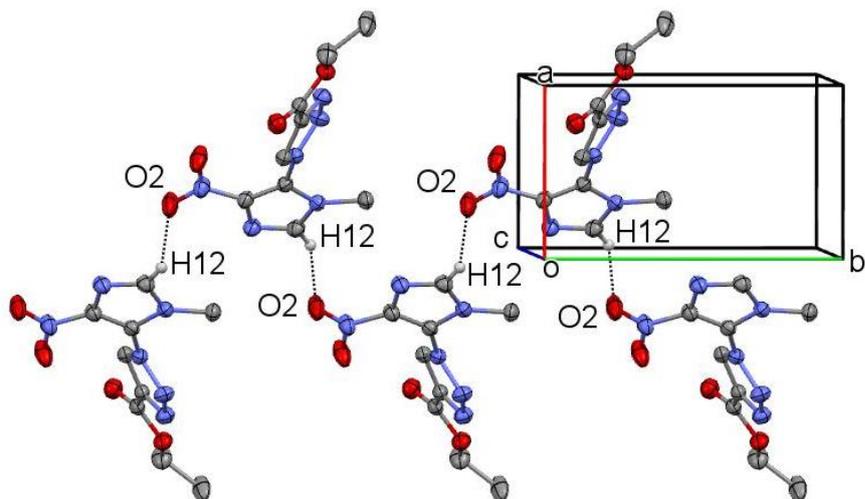


Figura 28: Estrutura cristalográfica de **41b**.

Na avaliação dos dados cristalográficos de **41b** foi observado o arranjo de moléculas formadas a partir de ligações de hidrogênios intermoleculares C12-H12 e O2; C7-H7B e O1; C5-H5 e O3 e interações π e N4-O2 (Figura 29); na figura 30 demonstra o arranjo da molécula produzida a partir de todas as interações intermoleculares.



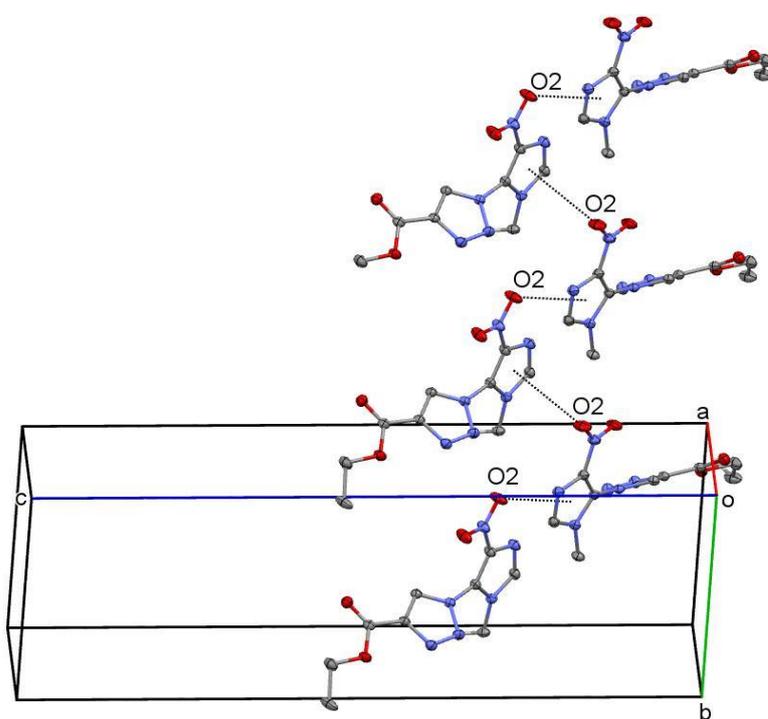
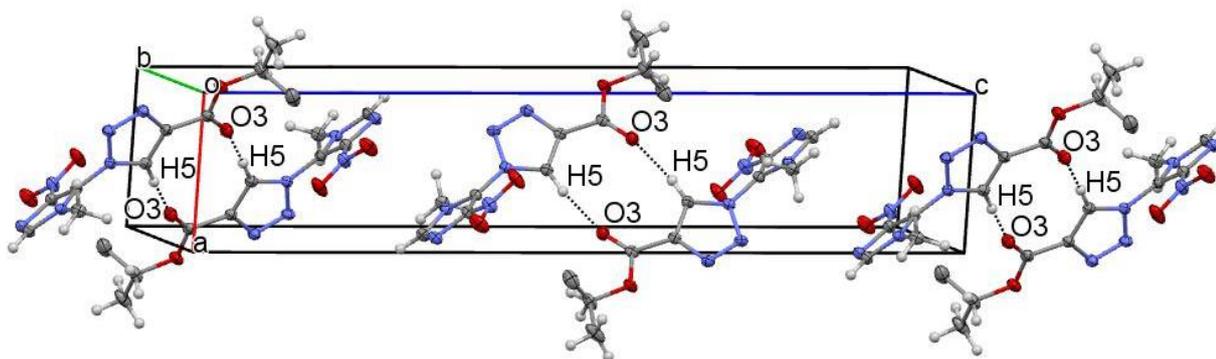


Figura 29: Ligações de hidrogênio intermolecular do composto **41b**.

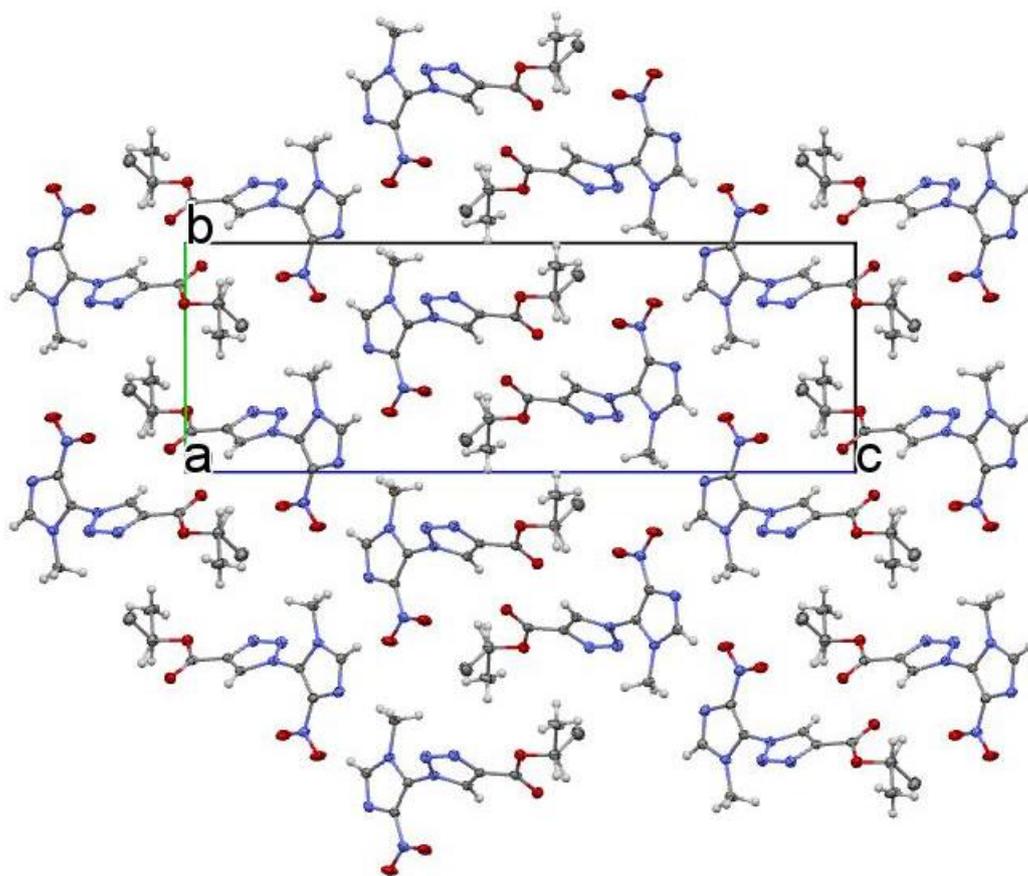
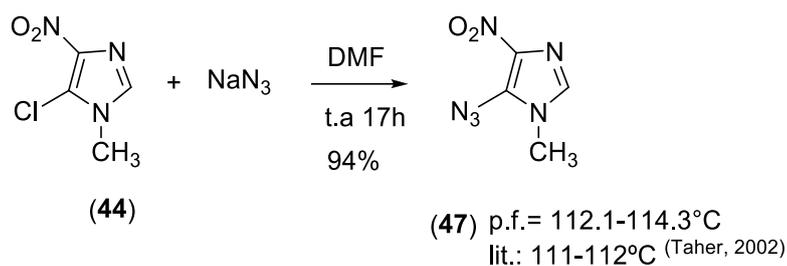


Figura 30: O arranjo da molécula **41b** produzida a partir de todas as interacções intermoleculares.

Para obtenção dos nitroimidazóis **41c** e **41f** não se utilizou a S_NAr , pois os azóis **46c** e **46f** foram obtidos em quantidades insuficientes na etapa de hidrogenólise. Sendo assim, foi empregada a segunda metodologia, para a obtenção dos outros compostos finais **41c-h**.

2- 2ª Metodologia realizada.

Nesta segunda metodologia, foi necessária a preparação do intermediário- chave azido **47**. Para isto, foi feita a S_NAr de **44** com azida de sódio como nucleófilo em DMF como solvente. O produto foi obtido com 94% de rendimento (Esquema 49).



Esquema 49: Obtenção do intermediário chave **47**.

Este composto foi confirmado pela comparação dos pontos de fusão determinado e o da literatura e também através da análise do espectro na região do infravermelho, o qual apresentou banda característica de N_3 na região de 2151 cm^{-1} e bandas em 1551 e 1362, referentes às ligações de deformação axial assimétrica e simétrica do grupo nitro, respectivamente (Figura 31) (Tabela 8).

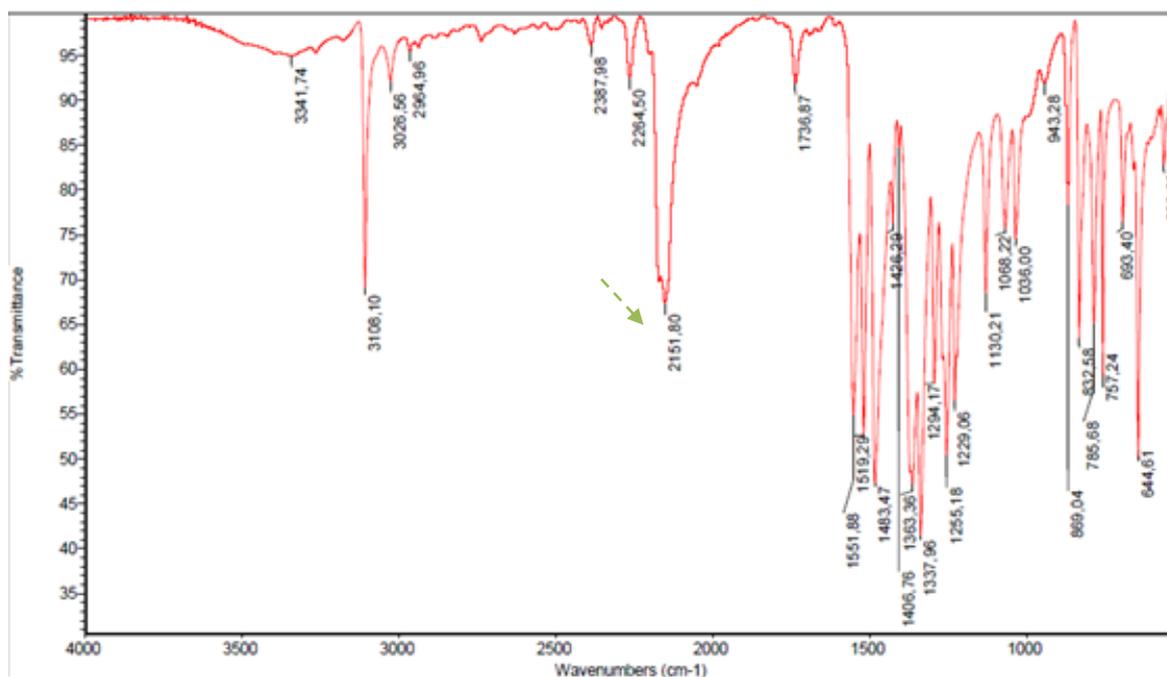


Figura 31: Espectro de infravermelho do composto **47**.

Tabela 8: Principais frequências de absorção na região do I.V no espectro do novo composto **47** (ATR).

Tipos de vibrações	Absorções (cm ⁻¹)
ν C-H Ar	3108
N ₃	2151
ν NO ₂	1551 e 1362
ν C-N	832

O espectro de RMN ¹H de **47** apresentou os singletos em δ 3,52 e 7,74, correspondentes dos hidrogênios da metila e H-2 do anel imidazólico (Figura 32).

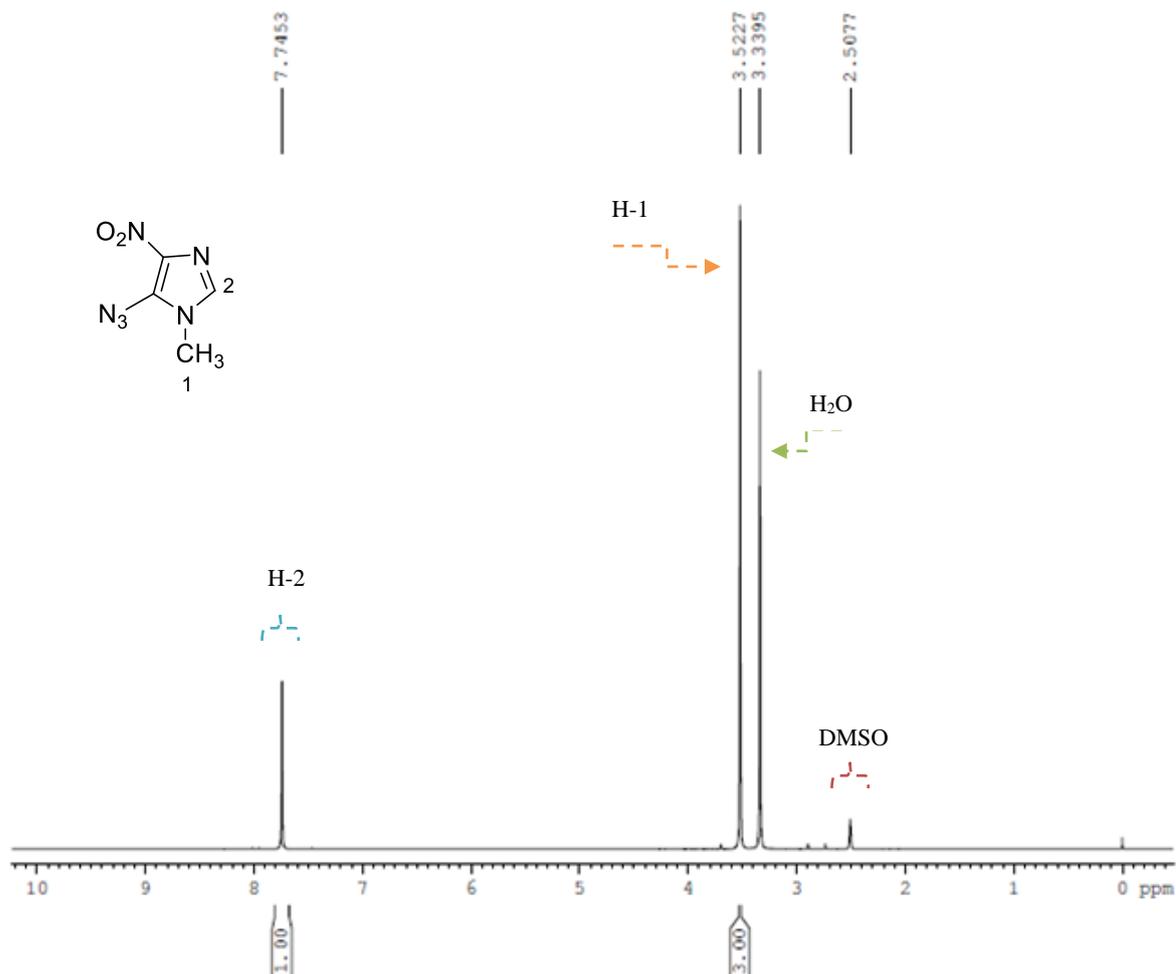
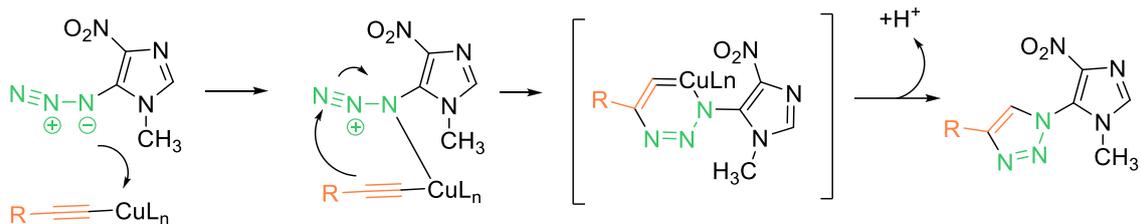


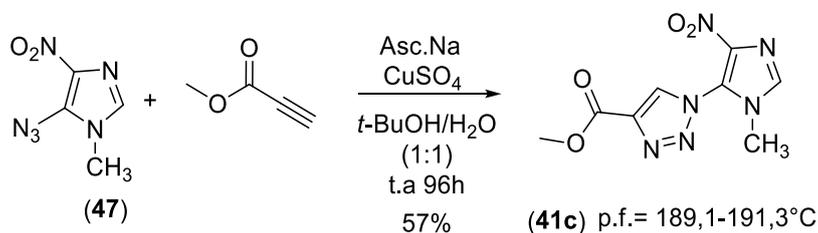
Figura 32: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de **47**.

A etapa seguinte foi à reação de cicloadição do azido **47** com os respectivos acetilenos. Empregou-se a mesma metodologia utilizada anteriormente, com o Cu(I) em $t\text{-BuOH}$ e H_2O e Asc.Na . Como o nitrogênio da azida, em **47** já está posicionado no anel imidazólico, por esta metodologia só se pode obter um dos isômeros 1,2,3- $1H$ -triazol, como ilustra o mecanismo abaixo (Esquema 50).



Esquema 50: Proposta simplificada do mecanismo para formação dos novos nitroimidazóis **41c-h** (HEIN & FOKIN, 2010; WORRELL *et. al.*, 2013 e FREITAS *et. al.*, 2011).

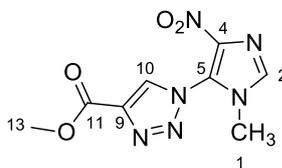
Para a obtenção do novo nitroimidazol **41c**, contendo o éster metílico na posição C-4 do 1,2,3-*H*-triazol, não foi observado a conversão total ao produto, mesmo variando o tempo e as quantidades dos reagentes. Após 96h, a reação foi isolada em 72% de rendimento bruto, o qual foi purificado com sucesso através da técnica de recristalização, MeOH/H₂O. O produto **41c** foi obtido em 57% de rendimento (Esquema 51).



Esquema 51: Obtenção do composto final **41c**.

A formação de **41c** foi confirmada pela análise de RMN ¹H, onde apresentou dois simpletos em δ 3,60 e 3,91 correspondentes aos hidrogênios da metila do anel imidazólico e da metila do éster metílico, respectivamente. Dois simpletos em δ 8,17 e 9,37, referentes aos hidrogênios H-2 e H-10 (Tabela 9).

Tabela 9: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **41c** (δ relativo ao TMS, ^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz solvente $\text{DMSO-}d_6$).



Tipos C/H	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
1	3,60	32,3
2	8,17	136,2
4	-	139,1
5	-	138,8
9	-	122,2
10	9,37	133,3
11	-	159,9
13	3,91	52,1

A análise de RMN ^{13}C mostrou os sinais em δ 32,3 e 52,1 referentes aos carbonos das metilas do anel imidazólico (C-1) e do éster metílico (C-13). Os sinais quaternários em δ 138,8 e 139,1 correspondentes aos C-5 e C-4 do imidazol. Apresentou sinais em δ 133,3, 136,2 e 159,9, característicos as ligações de C-H do anel imidazólico, triazólico e ligação de C=O correspondente ao éster metílico, respectivamente (Figura 33) (Tabela 9).

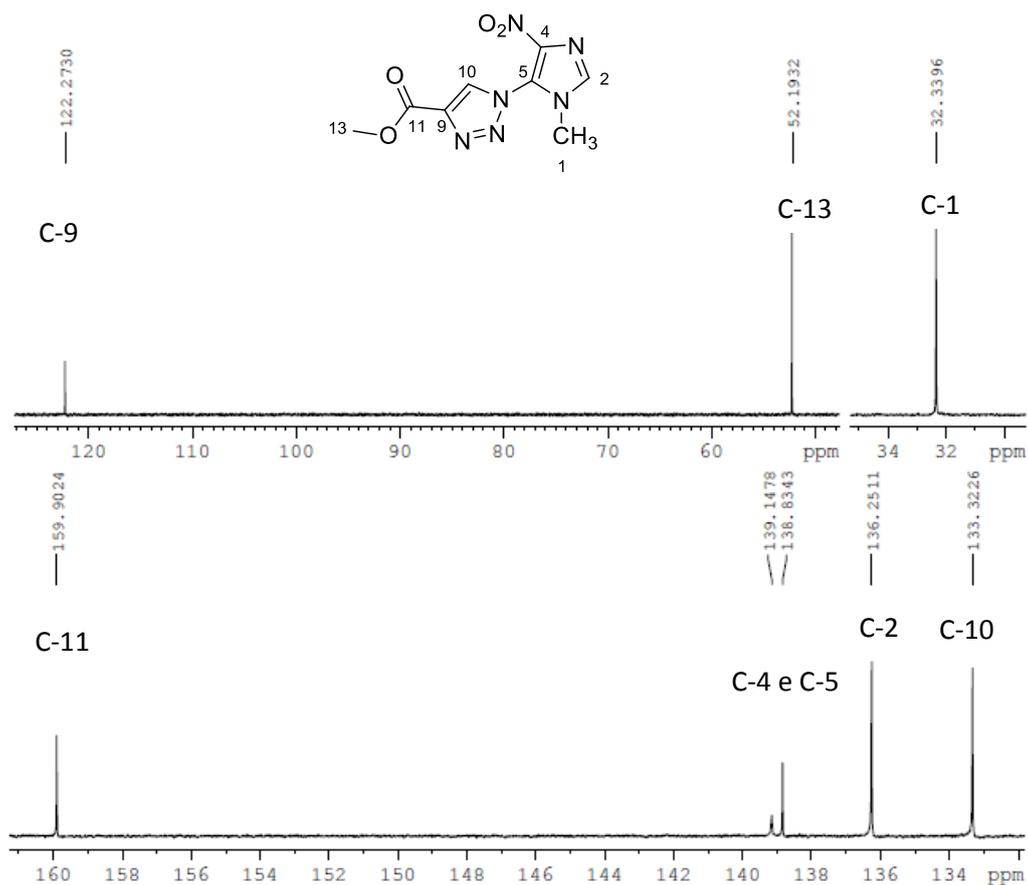


Figura 33: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em DMSO_{d6} de **41c**.

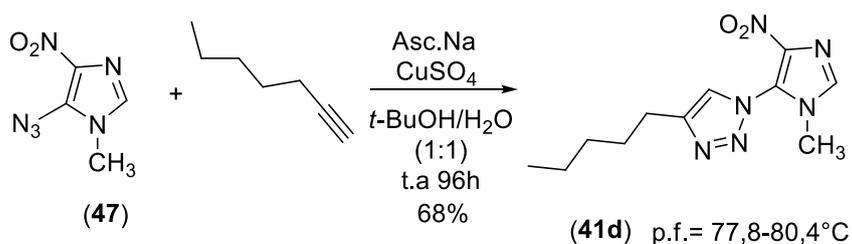
O infravermelho de **41c** apresentou bandas características na região de 1534 e 1510 cm^{-1} , referentes às ligações de deformação axial assimétrica e simétrica do grupo nitro, respectivamente. Apresentou bandas na região 1716 e 1740 correspondentes as ligações C=O (Tabela 10)

Tabela 10: Principais frequências de absorção na região do I.V do novo composto **41c** (ATR).

Tipos de vibrações	Absorções (cm ⁻¹)
ν C-H Ar	3114
ν C=O	1716 e 1740
ν C=C Ar	1603
ν NO ₂	1534; 1510 e 1362
ν C-N	828

A análise do espectro de massas de alta resolução mostrou o sinal 275,0504 referente ao íon molecular do **41c** mais sódio.

Para formação do novo nitroimidazol **41d**, também se utilizou a mesma metodologia de cicloadição, com respectivo acetileno. Aqui também, não houve a conversão total ao produto, após 96h. O produto foi obtido em 81% de rendimento bruto e após recristalização, em MeOH/H₂O, obteve-se 68% de produto puro (Esquema 52).



Esquema 52: Obtenção do composto final **41d**.

O **41d** foi confirmado por RMN ¹H, onde apresentou um tripleto em δ 0,88 referentes aos hidrogênios da metila de H-15 com $J=7,1$ Hz, sexteto em δ 1,34 (H-14 e H-13) com $J=7,2$ Hz e um quinteto 1,66 com $J=7,4$ Hz (H-12). Apresentou um tripleto

em δ 2,75 com $J=7,5$ Hz correspondente ao H-11. Os sinais referentes aos hidrogênios H-2 e H-10, apresentaram um simpleto em δ 8,11 e 8,39, respectivamente (Figura 34).

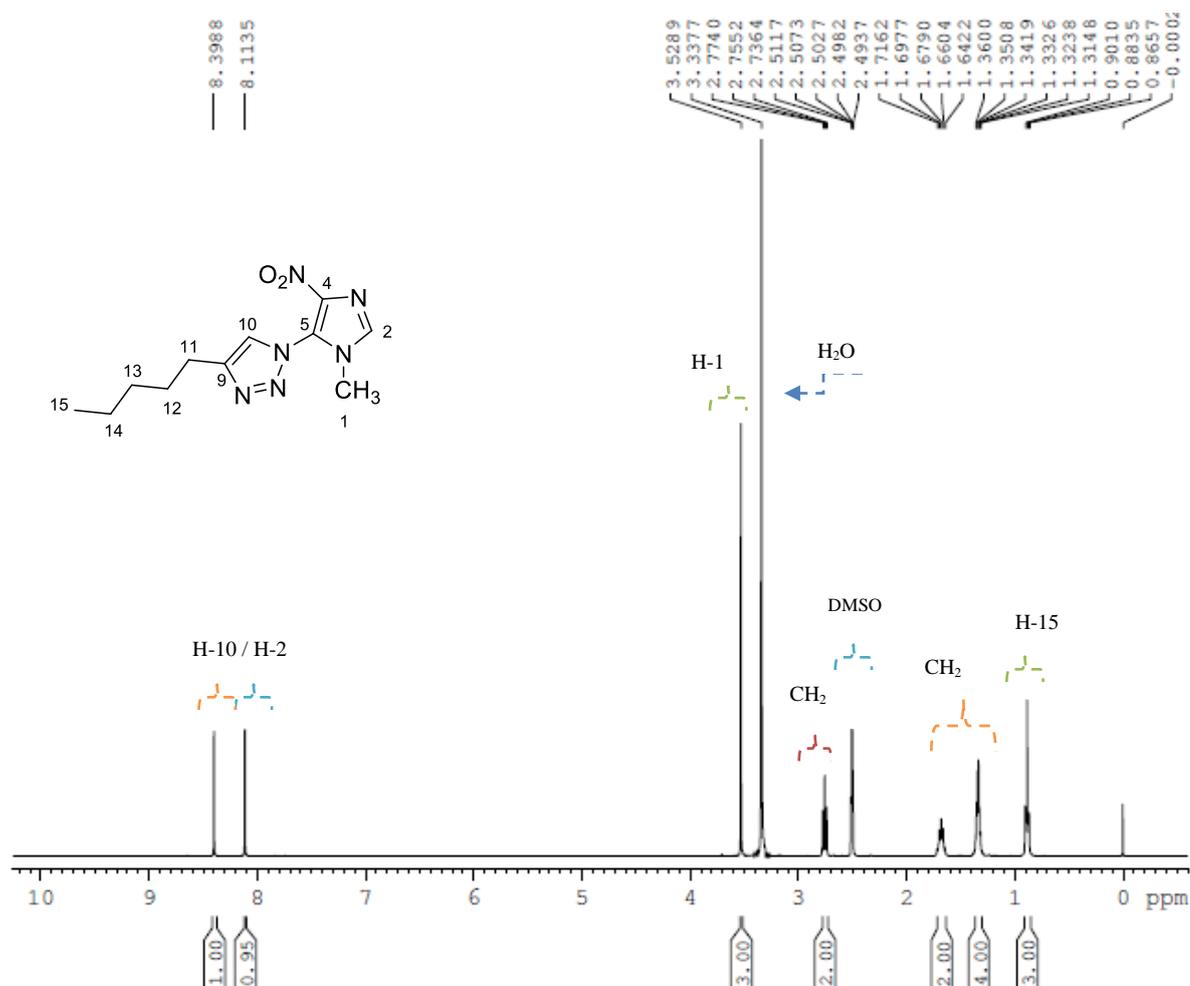


Figura 34: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_{d6} de **41d**.

No espectro de RMN ^{13}C de **41d** observou dois sinais simples em δ 13,7 e 32,1, característico do carbono da metila e da cadeia alifática e do anel imidazólico. Os quartetos em δ 147,2, 138,7 e 123,7, correspondentes aos carbonos C-4, C-5 e C-9. Os carbonos secundários apresentaram sinais em δ 24,5 (C-11), 28,1 (C-12), 30,5 (C-13) e 21,7 (C-14) (Figura 35).

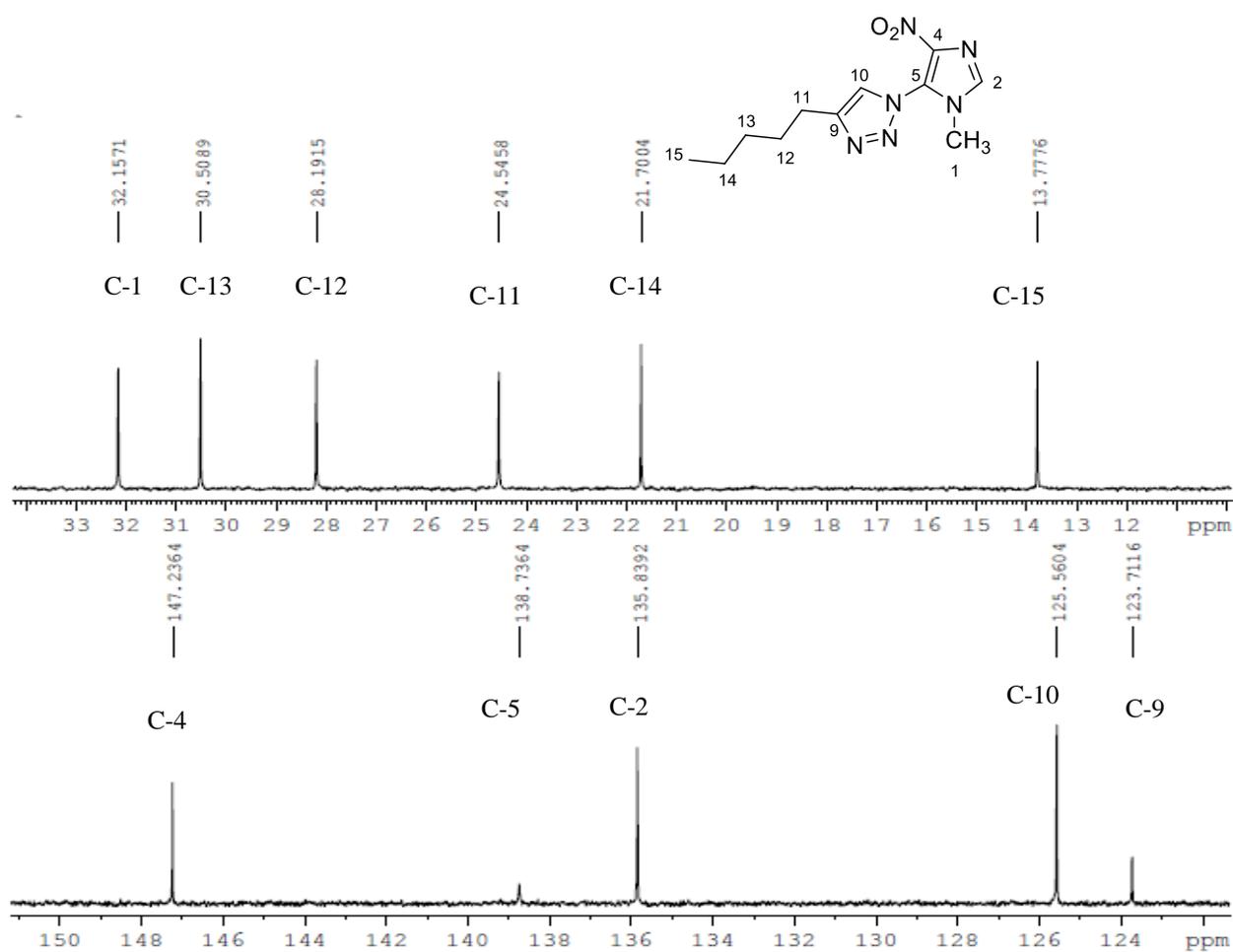


Figura 35: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de **41d**.

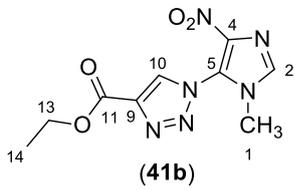
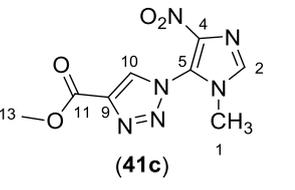
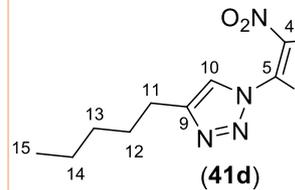
A análise do espectro na região do infravermelho de **41d** apresentou bandas com absorção em 1520 e 1360 cm^{-1} , referentes às ligações de deformação axial assimétrica e simétrica do grupo nitro, respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11: Principais frequências de absorção na região do I.V no espectro do novo composto **41d** (ATR).

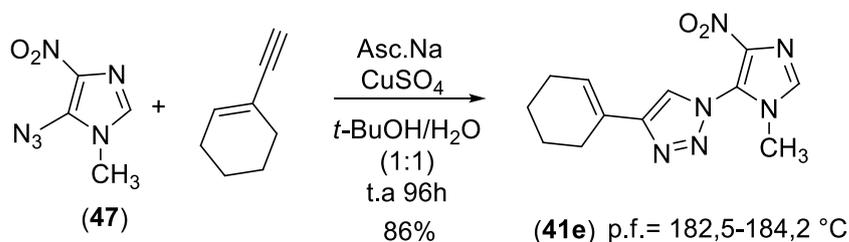
Tipos de vibrações	Absorções (cm ⁻¹)
ν C-H Ar	3107
ν C=C Ar	1622
ν NO ₂	1520 e 1360
ν C-N	830

Os compostos **41b-d** apresentaram variações no deslocamento químico, de acordo com a interferência dos substituintes no C-9 do 1,2,3-*H*-triazol. Quando se comparou os compostos com o substituinte éster etílico (**41b**) e éster metílico (**41c**), observou-se variações nos deslocamentos do hidrogênio das metilas; o H-13 do éster metílico **41c** com menor densidade eletrônica por ser vizinho ao átomo de oxigênio; o H-14 do éster etílico **41b** mostrou-se menos desblindado, por ter um CH₂ entre os átomos de oxigênio, sofrendo uma menor influência da eletronegatividade. O deslocamento da metila H-15 de **41d**, quando comparada aos compostos **41b** e **41c** apresentou a menor influência do efeito eletronegativo (Tabela 12).

Tabela 12: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **41a**, **41c** e **41d** (δ relativo ao TMS, ^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, solvente $\text{DMSO-}d_6$).

RMN $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$	 (41b)		 (41c)		 (41d)	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	3,60	32,4	3,60	32,3	3,52	32,1
2	8,17	136,3	8,17	136,2	8,11	135,8
4	-	139,2	-	139,1	-	147,2
5	-	139,1	-	138,8	-	138,7
9	-	122,3	-	122,2	-	123,7
10	9,36	133,3	9,37	133,3	8,39	125,5
11	-	159,5	-	159,9	2,75 ($J=7,5$ Hz)	24,5
12	-	-	-	-	1,67	28,1
13	4,34 ($J=7,1$ Hz)	61,1	3,91	52,1	1,34	30,5
14	1,34 ($J=7,1$ Hz)	14,1	-	-	1,34	21,7
15	-	-	-	-	0,88	13,7

Dando continuidade na síntese dos compostos finais, foi feita a obtenção do novo nitroimidazol, contendo ciclohexenila no C-4 do 1,2,3-*H*-triazol (**41e**). Diferente dos outros produtos preparados anteriormente, este foi obtido por conversão total, como produto puro em 86% de rendimento (Esquema 53).



Esquema 53: Obtenção do composto final **41e**.

O novo nitroimidazol **41e** teve a sua estrutura confirmada pelo espectro de RMN ¹H, o qual apresentou multipletos com integração dois em δ 1,65, 1,74, 2,21 e 2,37, correspondentes aos CH₂ anel hexenila e um tripleto com integração para 1H, em δ 6,59 ($J = 1,7$ Hz), referente ao CH do ciclohexenila. Também apresentou simpletos em δ 3,55, 8,12 e 8,60, correspondentes aos hidrogênios da metila e dos hidrogênios aromáticos dos anéis imidazólico e triazólico, respectivamente (Figura 36) (Tabela 13).

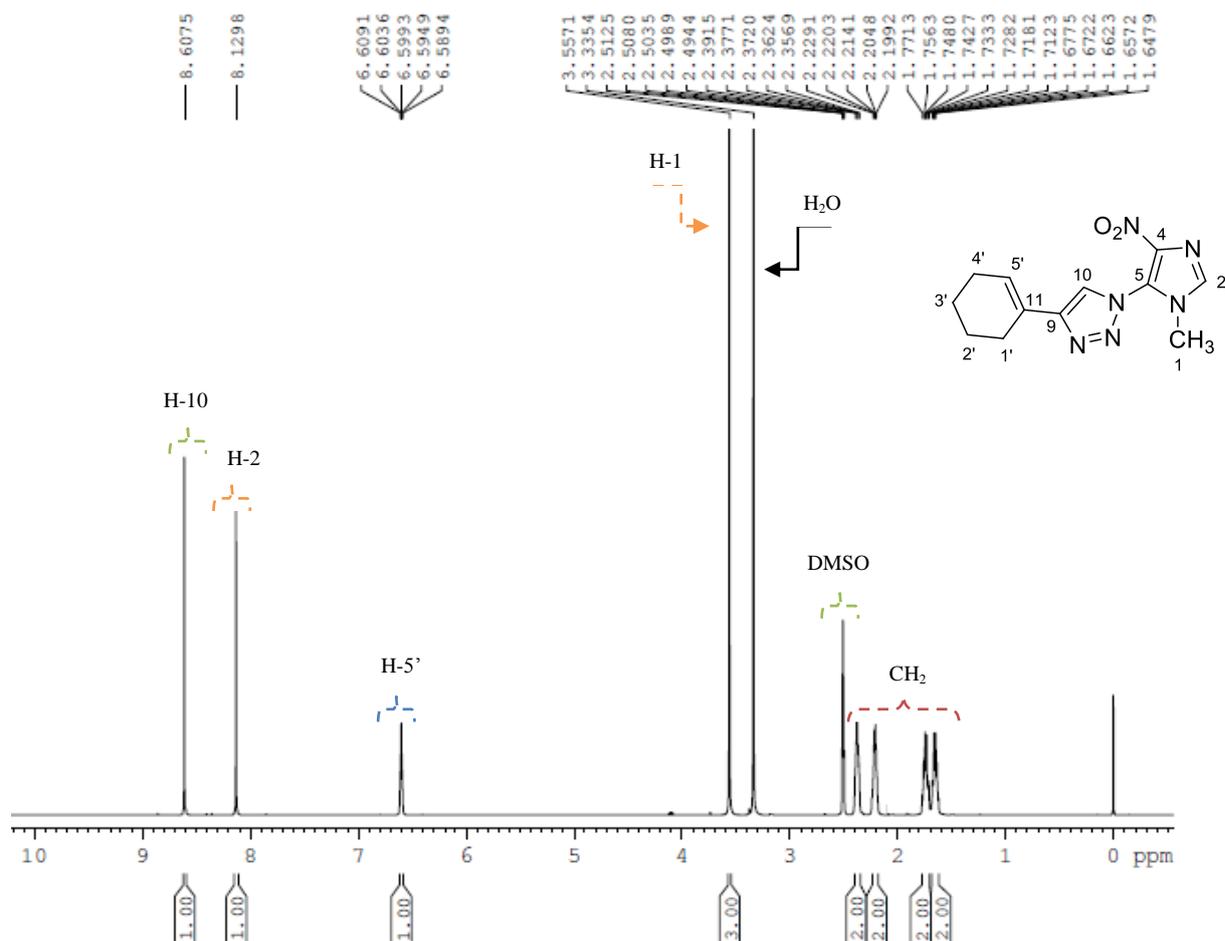
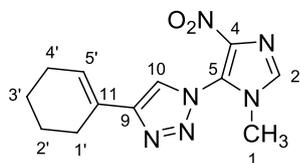


Figura 36: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_{d6} de **41e**.

A análise do RMN ^{13}C de **41e** apresentou quatro carbonos quaternários em δ 148,1 (C-4), 138,7 (C-5), 123,4 (C-9) e 126,3 (C-11). O sinal em δ 32,2 referente ao carbono da metila (C-1). Três carbonos terciários em δ 135,9, 123,2 e 125,3 correspondem aos carbonos C-2, C-5' e C-10, respectivamente. Sinais em 21,6 (C-2' ou C-3'), 21,8 (C-2' ou C-3'), 24,6 (C-1' ou C-4') e 25,6 (C-1' ou C-4'), referente aos carbonos secundários do ciclohexenila (Tabela 13).

Tabela 13: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **41e** (δ relativo ao TMS, ^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz solvente $\text{DMSO-}d_6$).

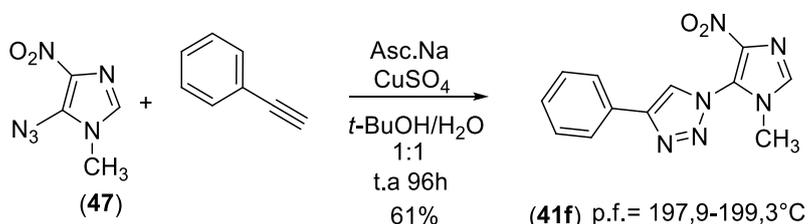


Tipos C/H	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
1	3,55	32,2
2	8,12	135,9
4	-	148,1
5	-	138,7
9	-	123,4
10	8,60	125,3
11	-	126,3
1'	2,21 ou 2,37	24,6 ou 25,6
2'	1,65 ou 1,74	21,6 ou 21,8
3'	1,65 ou 1,74	21,6 ou 21,8
4'	2,21 ou 2,37	24,6 ou 25,6
5'	6,59 ($J=1,7$ Hz)	123,2

Para a obtenção do novo nitroimidazol, contendo a fenila na posição C-4 do 1*H*-1,2,3-triazol **41f** observou-se uma mistura contendo o substrato e o produto desejado. Assim, foi necessário proceder à sua purificação. Várias metodologias foram testadas tais como coluna cromatográfica em sílica, placa preparativa, recristalizações em diversos solventes, porém nenhuma com êxito.

Em parceria com a central analítica de Farmanguinhos, foi desenvolvido o método de separação por extração em fase sólida (SPA), com o auxílio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Usou-se como solventes 30% de MeOH em H₂O.

A extração em fase sólida é uma técnica de separação líquido-sólido e tem como vantagens, frente à extração clássica líquido-líquido, o menor consumo de solvente orgânico, a não formação de emulsões, altas porcentagens de recuperação do analito, volumes reduzidos de resíduos tóxicos, capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito e disponibilidade comercial de muitos equipamentos e solventes para a SPA (JARDIM, 2010). O composto **41f** foi obtido puro em 61% de rendimento (Esquema 54).



Esquema 54: Obtenção do composto final **41f**.

O **41f** foi confirmado pela análise de RMN ¹H, pois apresentou um simpleto em δ 3,62 correspondente aos hidrogênios da metila do anel imidazólico, um tripleto em δ 7,42, correspondente ao hidrogênio aromático H-3' com 7,44 Hz, um duplete em δ 7,95 referente aos hidrogênios aromáticos H-1' e H-5' (*J*=7,24 Hz) e um tripleto em δ 7,53 correspondente aos hidrogênios aromáticos H-2' e H-4' com *J*=7,44 Hz. Simpleto em δ

8,16 e 9,12 referentes aos hidrogênios aromáticos do anel imidazólico e triazolico (H-2 e H-10), respectivamente (Figura 37) (Tabela 14).

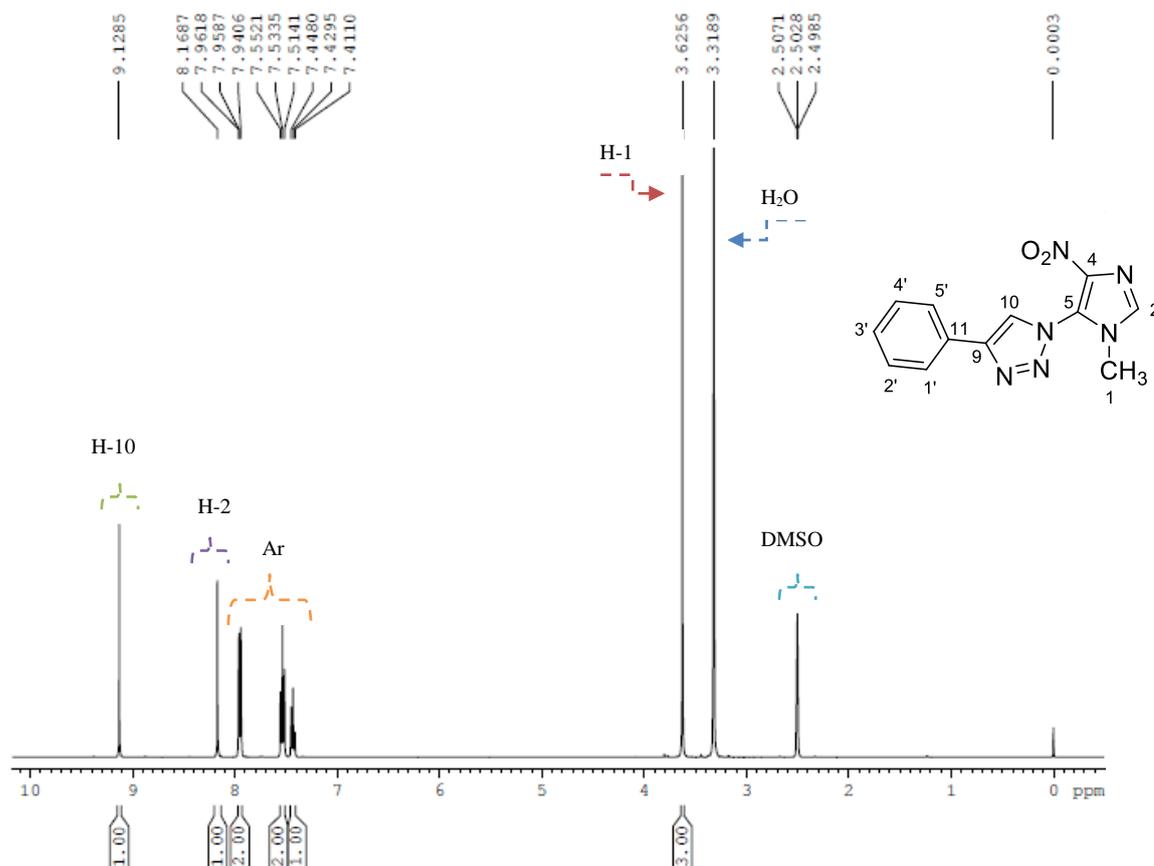
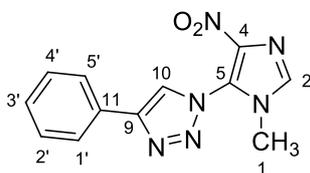


Figura 37: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_{d_6} de **41f**.

A análise do espectro de RMN ^{13}C de **41f** apresentou um sinal em δ 32,3 característico do carbono da metila do anel imidazólico. Sinais dos carbonos quaternário em δ 146,5 (C-4), 138,8 (C-5), 123,3 (C-9) e 129,3 (C-11). Apresentou sinais em δ 136,1 (C-2), 125,0 (C-10) e 128,6 (C-3') referente aos carbonos terciários do anel imidazólico, triazolico e fenila, respectivamente (Tabela 14).

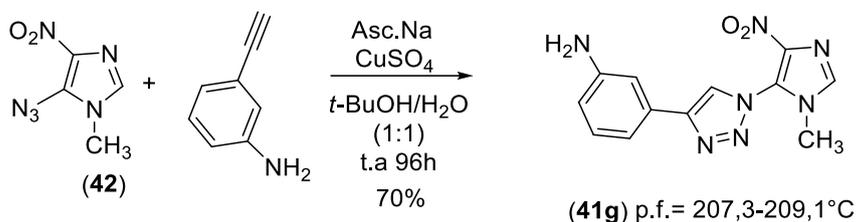
Tabela 14: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **41f** (δ relativo ao TMS, ^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz solvente $\text{DMSO-}d_6$).



Tipos C/H	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
1	3,62	32,3
2	8,16	136,1
4	-	146,5
5	-	138,8
9	-	123,3
10	9,12	125,0
11	-	129,3
1'	7,95 ($J=7,24$ Hz)	125,4
2'	7,53 ($J=7,44$ Hz)	129,0
3'	7,42 ($J=7,44$ Hz)	128,6
4'	7,53 ($J=7,44$ Hz)	129,0
5'	7,95 ($J=7,24$ Hz)	125,4

A análise do espectro de massas de alta resolução mostrou o sinal 293,0755 referente ao íon molecular do **41f** mais sódio

O novo nitroimidazol **41g** foi obtido com 84% de rendimento bruto. O método utilizado para a separação do substrato do produto foi à recristalização, em acetona/H₂O. Conseguindo o composto puro com 70% de rendimento (Esquema 55).



Esquema 55: Obtenção do composto final **41g**.

A análise de RMN ¹H de **41g** apresentou um simpleto em δ 3,61 correspondente aos hidrogênios da metila do anel imidazólico. Um simpleto em δ 5,28 atribuído ao NH₂, e dois outros simpletos em δ 8,15 e 8,95 com integrações proporcionais a um hidrogênio cada, referentes aos hidrogênios ligados aos C-2 e C-10 respectivamente. Os hidrogênios do anel aromático apareceram em: δ 6,59 atribuído ao H-3'; em δ 7,03 atribuído ao H-1 na forma de um duplete distorcido com $J=7,76$ Hz; em δ 7,14 atribuído ao H-2' como um tripleto $J=7,76$ Hz e em δ 7,18 atribuído ao H-5' (Figura 38) (Tabela 15).

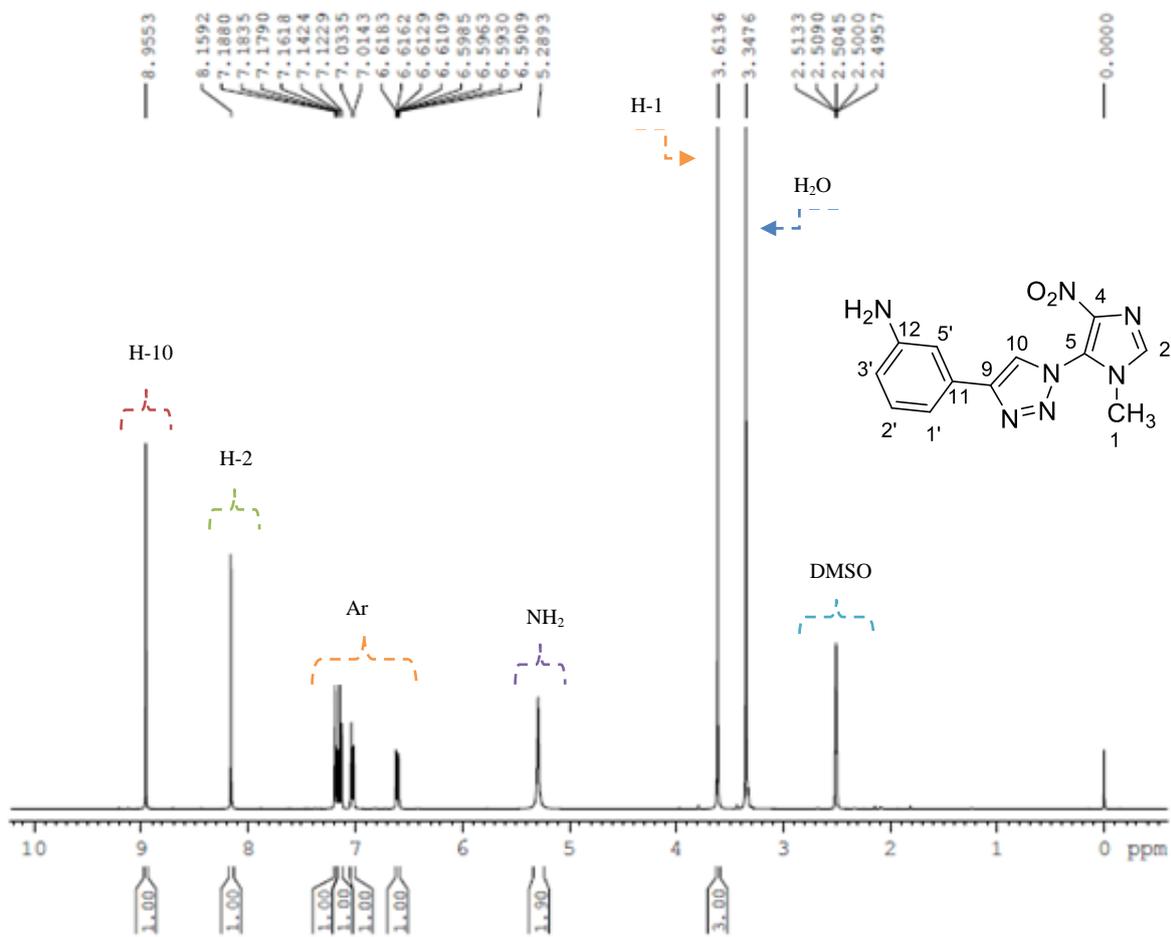
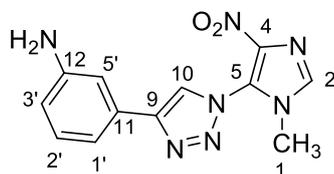


Figura 38: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_{d6} de **41g**.

O espectro de RMN ^{13}C de **41g** apresentou sinais em δ 32,3 e 149,1 referentes ao carbono da metila ligado ao anel imidazólico e ao carbono ligado no NH_2 . Os carbonos quaternários apresentaram sinais em δ 147,2 (C-4), 138,8 (C-5), 123,4 (C-9) e 124,5 (C-11). Os carbonos do anel aromático em δ 113,0 (C-1'), 129,5 (C-2'), 114,1 (C-3') e 110,4 (C-5') e os carbonos aromáticos do anel imidazólico apresentaram sinais em δ 136,0 (C-2) e 129,7 (C-10) (Tabela 15).

Tabela 15: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **41g** (δ relativo ao TMS, ^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz solvente $\text{DMSO-}d_6$).



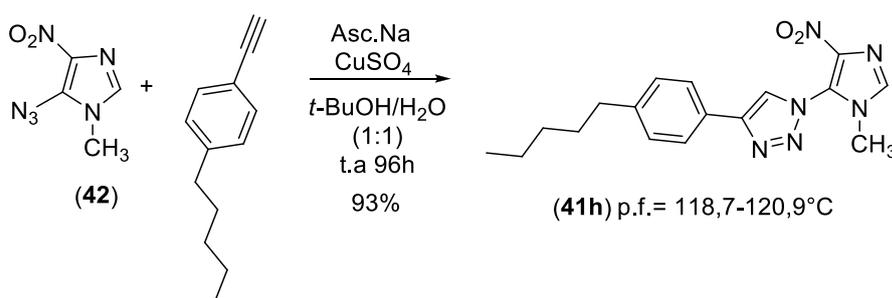
Tipos C/H	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
1	3,61	32,3
2	8,15	136,0
4	-	147,2
5	-	138,8
9	-	123,4
10	8,95	129,7
11		124,5
1'	7,03 ($J= 7,76$ Hz)	113,0
2'	7,14 ($J= 7,76$ Hz)	129,5
3'	6,59	114,1
5'	7,18	110,4
C-NH₂	5,28	149,1

O espectro de infravermelho apresentou bandas na região 3463 e 3359 cm^{-1} referentes às deformações axiais no NH_2 . Apresentou também bandas características na região de 1518 e 1337 cm^{-1} , correspondente às ligações de deformação axial assimétrica e simétrica do grupo nitro (Tabela 16).

Tabela 16: Principais frequências de absorção na região do I.V no espectro do novo composto **41g** (ATR).

Tipos de vibrações	Absorções (cm ⁻¹)
ν N-H	3463 e 3359
ν C-H Ar	3117
ν C=C Ar	1603
ν NO ₂	1518 e 1337
ν C-N	829

O último composto da série o **41h** foi obtido como um cristal branco puro em 93% de rendimento (Esquema 56).



Esquema 56: Obtenção do composto final **41h**.

O **41h** foi confirmado pela análise de RMN ¹H, o qual apresentou três simpletos em δ 3,62, 8,16 e 9,06, correspondentes aos hidrogênios da metila do anel imidazólico e aos hidrogênios aromáticos do anel imidazólico e triazólico, respectivamente. Os hidrogênios do anel aromático apresentaram: dois dubletos em δ 7,33 com $J= 8,04$ Hz e 7,83 com $J= 8,04$ Hz, referentes aos hidrogênios H-2' e H-4' e H-1' e H-5' respectivamente. Um tripleto em δ 0,87 referente à metila H-17 com $J= 7,08$ Hz, um multipletto em δ 1,30 referentes aos CH₂ dos H-15 e H-16, um quinteto em δ 1,61

referente ao CH₂ do H-14 com $J = 7,16$ Hz e um triplo em δ 2,63 referente ao CH₂ do H-13 com $J = 7,68$ Hz (Figura 39) (Tabela 17).

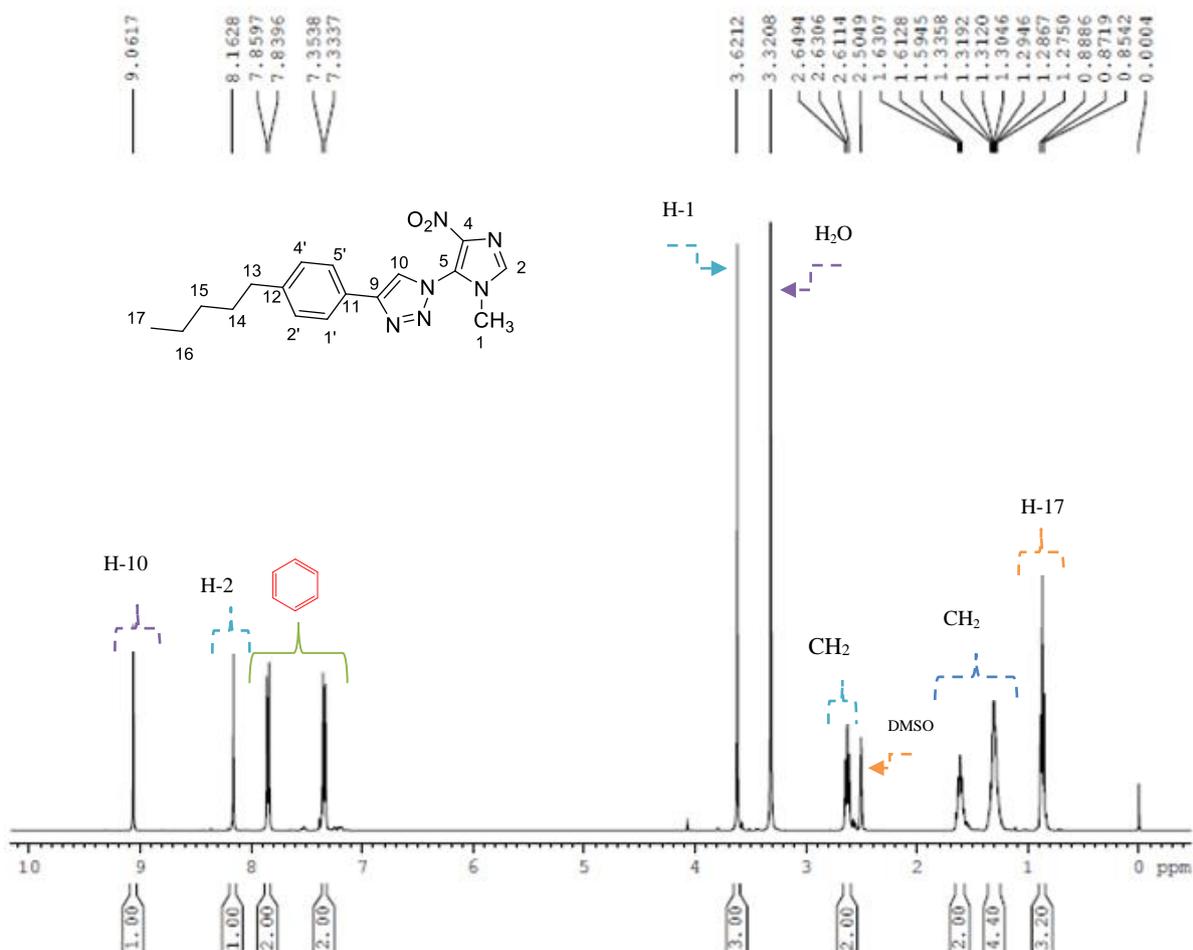
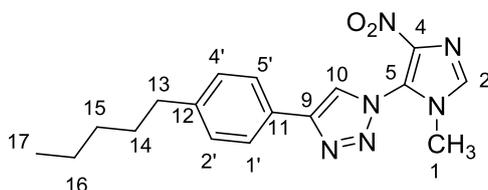


Figura 39: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) em DMSO-*d*₆ de **41h**.

A análise do RMN ¹³C de **41h** apresentou sinais em δ 32,3 e 13,8 referentes ao carbono da metila ligado ao anel imidazólico e da cadeia alifática. Os carbonos quaternários apresentaram sinais em δ 146,7 (C-4), 138,9 (C-5), 123,4 (C-9) e 128,5 (C-11). Os carbonos do anel aromático em δ 128,9 (C-2' e C-4'), 124,6 (C-1' e C-5'), os carbonos aromáticos do anel imidazólico apresentaram sinais em δ 136,1 (C-2) e 125,4 (C-10). Os carbonos da cadeia alifática apresentaram sinais em δ 21,9 (C-16), 30,4 (C-15), 30,7 (C-14), 34,8 (C-13) e 131,5 (C-12) (Tabela 17).

Tabela 17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **41h** (δ relativo ao TMS, ^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz solvente $\text{DMSO-}d_6$).



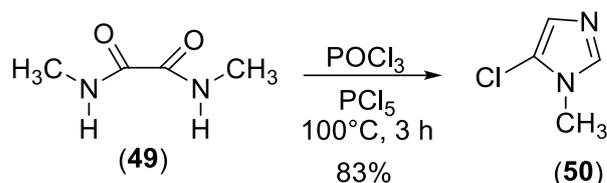
Tipos C/H	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
1	3,62	32,3
2	8,16	136,1
4	-	146,7
5	-	138,9
9	-	123,4
10	9,06	126,8
11	-	128,5
1'	7,83 ($J= 8,04$ Hz)	124,6
2'	7,33 ($J= 8,04$ Hz)	128,9
4'	7,33 ($J= 8,04$ Hz)	128,9
5'	7,83 ($J= 8,04$ Hz)	124,6
12	-	131,5
13	2,63 ($J= 7,68$ Hz)	34,8
14	1,61 ($J= 7,16$ Hz)	30,7
15	1,30	30,4
16	1,30	21,9
17	0,87 ($J= 7,08$ Hz)	13,8

A análise do espectro de infravermelho apresentou bandas nas regiões 1524, 1508, 1360 e 1329 cm^{-1} , referentes às ligações de deformação axial assimétrica e simétrica do grupo nitro respectivamente.

A análise do espectro de massas de alta resolução mostrou o sinal 303,0963 referente ao íon molecular do **41h** mais potássio.

Com o intuito de ter o domínio total da síntese dos compostos **40a-b** e **41a-h**, foi realizada a síntese do intermediário-chave 5-cloro-1-metil-4-nitroimidazol (**42**).

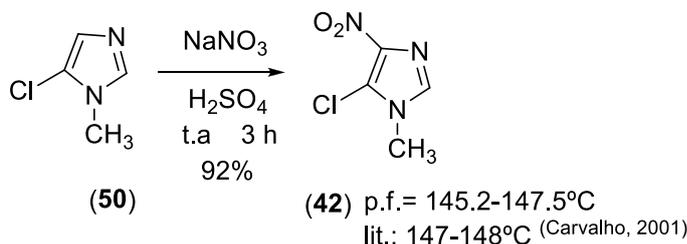
Inicialmente foi realizada a reação de Wallach, entre a *N,N'* dimetiloxamida (**49**) com pentacloreto de fósforo e oxicloreto de fósforo para formação do núcleo imidazólico. O produto **50** foi obtido como um óleo castanho em 83% de rendimento. (Esquema 57).



Esquema 57: Obtenção do 5-cloro-1-metilimidazol (**50**).

O produto foi confirmado por espectro de CG/EM onde apresentou o íon molecular de m/z 116 com a presença do pico $M+2$ (m/z 118) e seus respectivos fragmentos.

A segunda e última etapa foi à reação de nitração em condições brandas, utilizando nitrato de sódio, a temperatura ambiente, por três horas, fornecendo o intermediário-chave **42** como um sólido branco em 92% de rendimento (Esquema 58).



Esquema 58: Obtenção do 5-cloro-1-metil-4-nitroimidazol (**42**).

A formação do produto **42** foi confirmada pelo ponto de fusão comparado com a da literatura e também por espectro de CG/EM que apresentou íon molecular m/z 161 e o $M+2$ 163 e suas respectivas fragmentações.

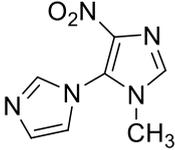
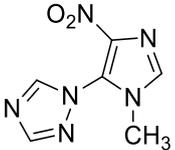
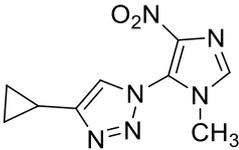
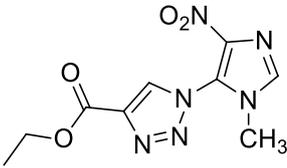
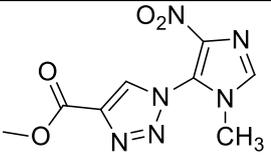
3- Avaliação da atividade anti-*T. cruzi*

Uma vez preparados todos os nitroimidazóis **40a-b** e **41a-h**, eles foram submetidos ao ensaio *in vitro* nas formas tripomastigotas sanguínea de *T. cruzi* na cepa Y em colaboração com a Dra. Kelly Salomão e Dra. Solange Lisboa de Castro do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ. Os resultados estão apresentados na tabela 18.

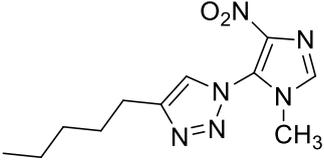
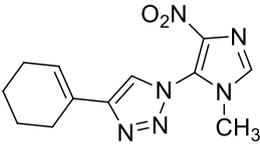
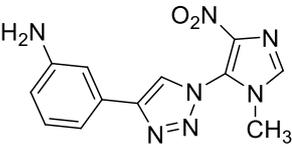
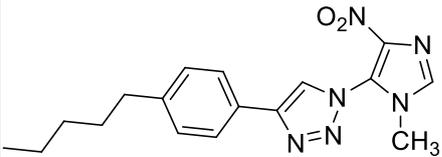
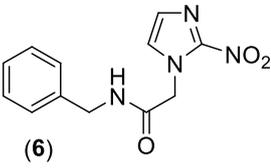
Os compostos **40a** e **40b** contendo apenas o anel imidazólico e 1,2,4-1*H*-triazólico apresentaram baixa atividade contra *T. cruzi*.

Já os novos nitroimidazóis **41a-h** contendo o núcleo 1,2,3-1*H*-triazol, com diferentes substituintes ligados ao carbono C-4 do triazol, tiveram maior atividade (Tabela 18). O mais ativo da série foi o **41a**, substituído com ciclopropila (CI_{50} = 5,4 μ M) e que apresentou atividade quase duas vezes maior do que o megazol (**4**) (CI_{50} = 9,9 μ M) e duas vezes mais que o benzonidazol (**6**) (CI_{50} = 10,8 μ M). O composto **41h** (CI_{50} = 12,9 μ M), substituído com 4-*n*-pentil-fenila foi também promissor, pois apresentou atividade equipotente do benzonidazol (**6**) (Tabela 18).

Tabela 18: Atividade *in vitro* dos compostos **40a-b** e **41a-h**, dos padrões benzonidazol e megalzol sobre as formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* na cepa Y e suas formas moleculares e peso molecular.

COMPOSTOS	FORMULA MOLECULAR	P.M	IC ₅₀ (μM) / DVP
 <p>(40a)</p>	C ₇ H ₇ N ₅ O ₂	193,16	>2000
 <p>(40b)</p>	C ₆ H ₆ N ₆ O ₂	194,15	353,7 ± 27,0
 <p>(41a)</p>	C ₉ H ₁₀ N ₆ O ₂	234,21	5,4 ± 0,63
 <p>(41b)</p>	C ₉ H ₁₀ N ₆ O ₄	266,21	45,3 ± 4,0
 <p>(41c)</p>	C ₈ H ₈ N ₆ O ₄	252,18	31,3 ± 6,8

DVP= Desvio Padrão

 <p>(41d)</p>	$C_{11}H_{16}N_6O_2$	264,28	$54,3 \pm 6,9$
 <p>(41e)</p>	$C_{12}H_{14}N_6O_2$	274,27	$41,7 \pm 4,2$
 <p>(41g)</p>	$C_{12}H_{11}N_7O_2$	285,26	$41,2 \pm 3,6$
 <p>(41h)</p>	$C_{17}H_{20}N_6O_2$	340,37	$12,9 \pm 1,2$
 <p>(4)</p> <p>Megazol</p>	$C_6H_6N_6O_2S$	226,21	$9,9 \pm 0,8$
 <p>(6)</p> <p>Benzonidazol</p>	$C_{12}H_{12}N_4O_3$	260,24	$10,8 \pm 0,5$

DVP= Desvio Padrão

Quando se comparam os resultados dos ensaios contra *T. cruzi* para os compostos inativos **40a** ($CI_{50} > 2000 \mu M$) e **40b** ($CI_{50} = 353,7 \mu M$), observa-se que a introdução de mais um nitrogênio no anel gerando o sistema 1,2,4-triazol, melhorou o padrão de atividade, mas não foi suficiente para torná-lo promissor (Figura 40).

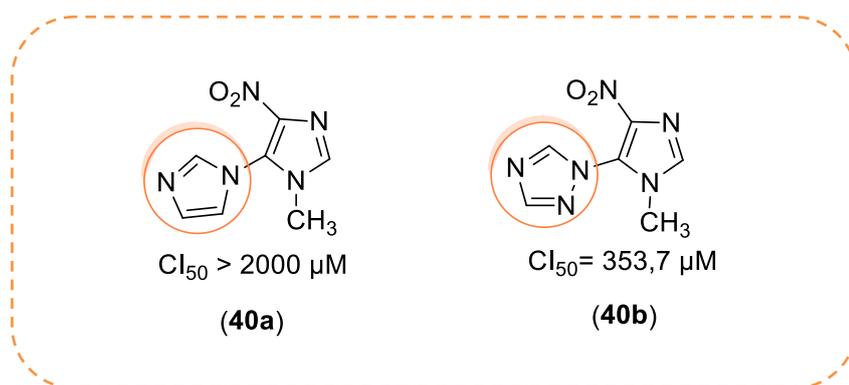


Figura 40: Estruturas químicas de **40a** e **40b** com seus CI_{50} contra formas tripomastigostas sanguíneas de *T. cruzi* (cepa Y).

Quando se comparam os resultados com substituintes mais rígidos no C-4 do 1,2,3-1*H*-triazol, **41a** ($CI_{50} = 5,4 \mu M$), **41e** ($CI_{50} = 41,7 \mu M$), **41f** ($CI_{50} = 25,2 \mu M$) e **41h** ($CI_{50} = 12,9 \mu M$), observa-se a maior contribuição para a atividade da ciclopropila (Figura 41) em relação aos outros substituintes. Já as superiores atividades de **41f** e **41h**, podem ser associadas à analogia com o benzonidazol, tal como foi previsto no planejamento apresentado na figura 19.

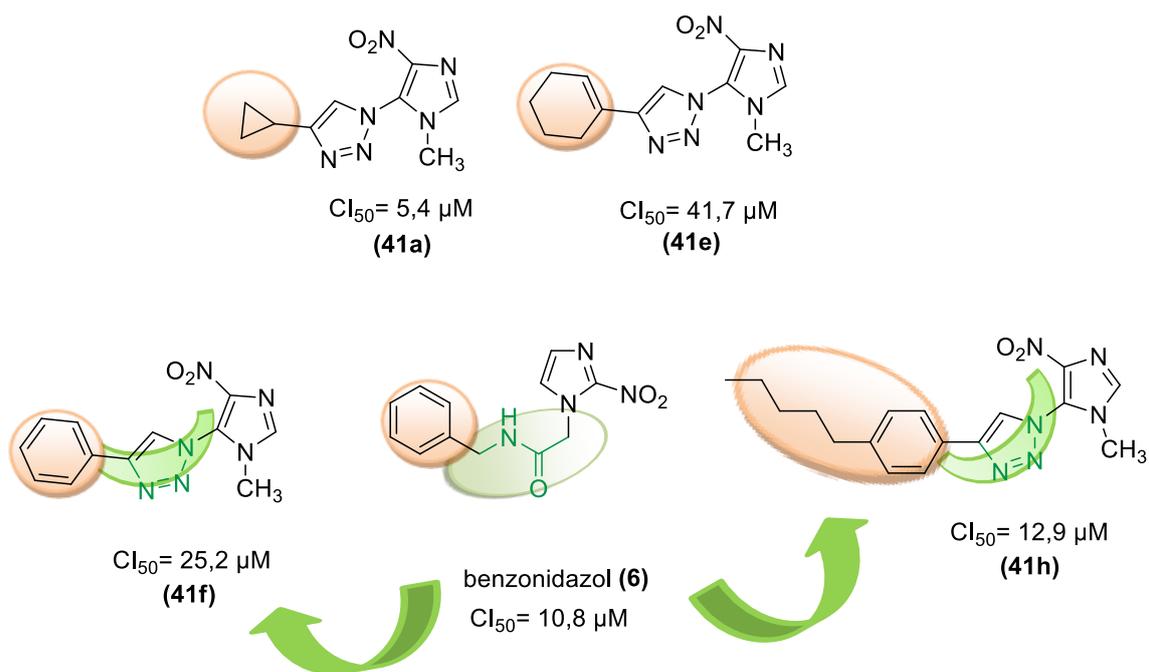


Figura 41: Estruturas químicas dos **41a**, **41e** e **41f** com seus CI_{50} e a analogia de **41f** e **41h** com benzonidazol, contra formas tripomastigostas sanguíneas de *T. cruzi* (cepa Y).

Quando comparamos os resultados da atividade biológica de **41g** e **41h**, contendo 3-aminofenila ($CI_{50} = 41,2 \mu M$) e 4-*n*-pentilfenila ($CI_{50} = 12,9 \mu M$), respectivamente, (Figura 42), verificou-se a importância de mais um grupo lipofílico nessa região.

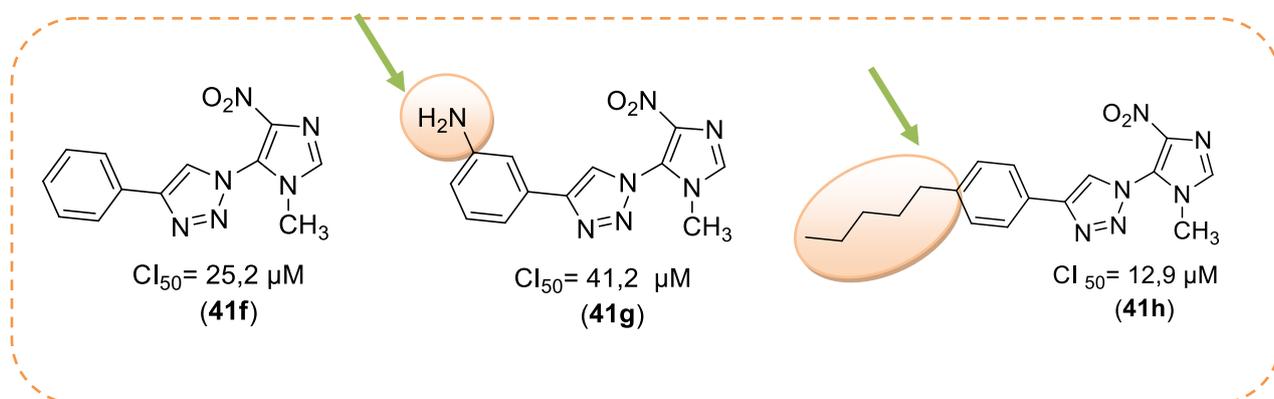


Figura 42: Estrutura química dos compostos **41f**, **41g** e **41h** com seus CI_{50} contra formas tripomastigostas sanguíneas de *T. cruzi* (cepa Y).

Ainda comparando grupos com interações hidrofóbicas na 3ª região, porém com diferenças de flexibilidade nas suas estruturas químicas, como o **41f** (fenila) e **41d** (*n*-pentila), pode observar a influência da rigidez nesse sítio (Figura 43).

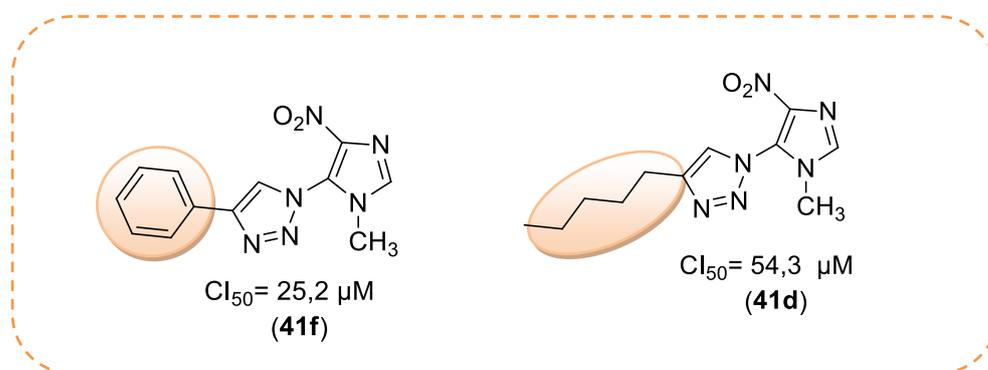


Figura 43: Estruturas químicas dos compostos **41f** a **41d** com seus CI₅₀ contra formas tripomastigostas sanguíneas de *T. cruzi* (cepa Y).

Quando foram comparados aos compostos contendo o substituinte éster etílico e o éster metílico, **41b** (CI₅₀ = 45,3 µM) e **41c** (CI₅₀ = 31,3 µM), respectivamente, observou-se o aumento da atividade biológica com o éster metílico (Figura 39). A importância do aumento da interação hidrofóbica nesta região também pode ser observada, quando **41f** (fenila; CI₅₀ = 25,2 µM) e **41h** (4-npentilfenila; CI₅₀ = 12,9 µM) são comparadas entre si, e com **41g** (3-aminofenila; CI₅₀ = 41,2 µM) que teve a introdução de um grupo polar (amino) (Figura 44).

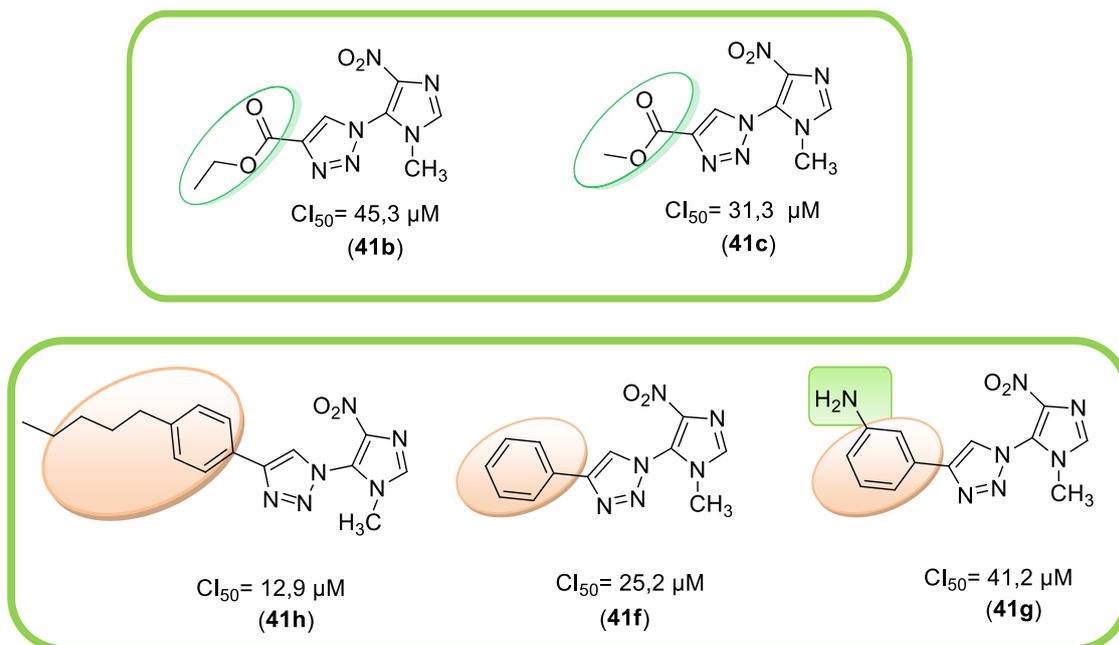


Figura 44: Estruturas químicas dos compostos **41b**, **41c**, **41f**, **41h** e **41g** com seus respectivos Cl_{50} contra formas tripomastigostas sanguíneas de *T. cruzi* (cepa Y).

Estes resultados corroboram com a hipótese de que uma boa substância com ação anti-*T. cruzi* se faz necessário à existência de porções lipofílicas para gerar uma maior difusão tecidual.

4- Resultados dos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade (Teste do cometa) e mutagenicidade (Teste de Ames)

As moléculas nitradas têm importante atividade antiparasitária e não devem ser descartadas durante a etapa de identificação de um protótipo. Porém, para o desenvolvimento de novos compostos bioativos, contendo o grupo nitro na sua estrutura química, antes de descartar uma molécula promissora, faz-se necessário avaliar as suas propriedades toxicológicas. Dentre as várias reações adversas, a ocorrência de efeitos genotóxicos e carcinogênicos tem sido apresentadas (BRAMBILLA & MARTELLI, 2009) e os agentes genotóxicos podem interagir quimicamente com o material genético, formando adutos, alterações oxidativas ou mesmo quebras na molécula de DNA, com a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética, provocando alterações hereditárias (mutações) (REKHA & NAIK, 2006 e ABHILASH & NANDITA, 2009).

Compreendendo a relevância destes ensaios, os compostos **40a-b** e **41a-b** foram submetidos a estas avaliações.

As avaliações das atividades toxicológicas *in vitro* foram feitas para os compostos **40a-b** e **41a-b** (Figura 45), que foram escolhidos aleatoriamente. Eles foram submetidos à avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade em células sanguíneas humanas *in vitro* e o ensaio de mutagenicidade, em linhagens de *Salmonella enterica*. Os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade foram feitos em colaboração com as pesquisadoras Msc. Ana Cláudia Trompowosky e Dra. Helena Zamith, do INCQS/Fiocruz. Os ensaios de mutagenicidade de **41a** e **41b** foram feitos em colaboração com os pesquisadores Msc. Francisco Mello e a Dra. Claudia Aiub da UNIRIO.

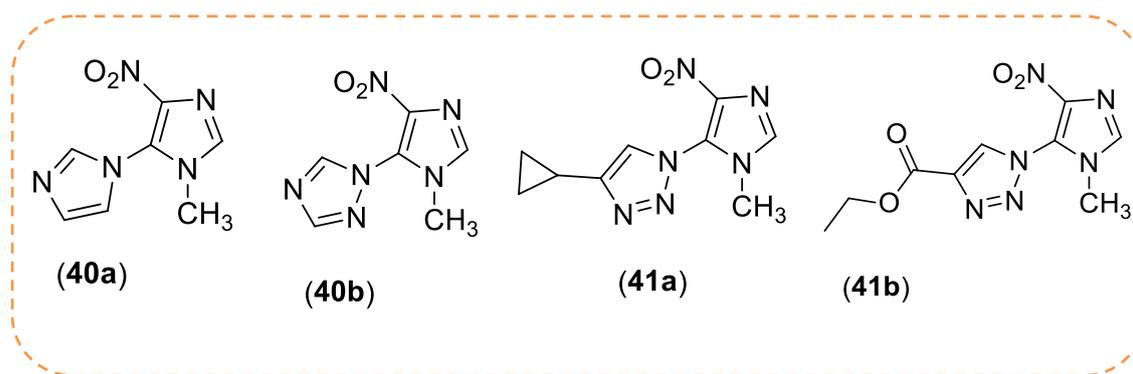


Figura 45: Estruturas químicas dos compostos testados para atividade toxicológica *in vitro* **40a-b** e **41a-b**.

Os resultados preliminares dos compostos **40a-b** e **41a-b** frente à citotoxicidade em células sanguíneas humanas *in vitro*, na faixa de concentração testada de 149 a 10.000 μM , indicam ausência de citotoxicidade, ou seja, não induziram o decréscimo da viabilidade celular, após um período de tratamento de 2h, à 37°C em ralação ao controle-solvente (DMSO 5%) (Tabela 19).

Das análises dos resultados do ensaio de genotoxicidade (Teste do cometa) dos compostos finais **40a-b** e **41a-b** em células sanguíneas humanas heparinizadas no período de 2h, à 37°C (SPEIT & HARTMANN, 2006) observou-se que:

- ✚ o composto **40a** não induziu dano significativo ao DNA de células sanguíneas humanas *in vitro*, na concentração máxima testada de 6.400 μM em ralação ao controle-solvente (DMSO 5%) (Tabela 19);
- ✚ o **40b**, na faixa de concentração de 149 a 6.400 μM não apresentou genotoxicidade, em células sanguíneas humanas *in vitro* em ralação ao controle-solvente (DMSO 5%) (Tabela 19);

✚ na faixa de concentração de 149 a 2.500 μM o composto **41a** não induziu dano significativo ao DNA em relação ao controle-solvente (DMSO 5%) (Tabela 19);

✚ o composto **41b**, na faixa de concentrações de 149 a 1.562 μM não induziu dano significativo ao DNA em relação ao controle-solvente (DMSO 5%) (Tabela 19).

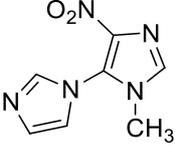
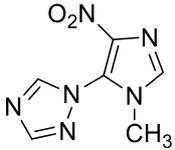
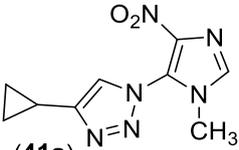
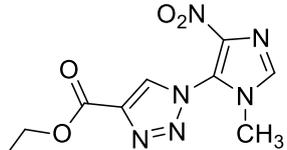
Diante dos resultados, observou que:

O composto **40a** não apresentou genotoxicidade na sua concentração máxima testada.

Os compostos **40a**, **40b** e **41a** foram menos genotóxico que o seu protótipo megazol que possui toxicidade nas concentrações de 1.562 μM .

Dos compostos testados apenas o **41b** (1.562 μM) apresentou genotoxicidade na mesma concentração que o seu protótipo megazol (**4**) (1.562 μM) (Tabela 19).

Tabela 19: Resultados do ensaio de viabilidade celular (citotoxicidade) e do ensaio Cometa (genotoxicidade) em células sanguíneas humanas *in vitro*.

COMPOSTOS	Viabilidade Celular (CITOTOXICIDADE)	Ensaio Cometa (GENOTOXICIDADE)	
	Concentrações 149 a 10.000 μM	Concentrações 149 a 10.000 μM	Média de UAT \pm EPM
Controle-solvente (DMSO 5%)	0%	---	32,7 \pm 7,4
MEGAZOL	0%	1.562 μM	(p< 0,05)
 (40a)	0%	Ausência *	---
 (40b)	0%	6.400 μM	89,0 \pm 2,0 (p< 0, 05)
 (41a)	0%	2.500 μM	57,0 \pm 3,0 (p< 0,05)
 (41b)	0%	1.562 μM	53,7 \pm 3,8 (p< 0,05)

- Diferença significativa (p< 0,05); Diferença altamente significativa (p< 0,01)

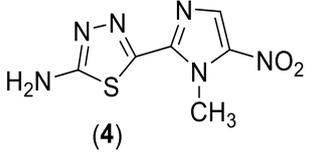
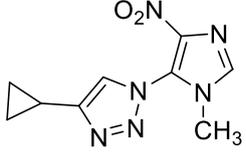
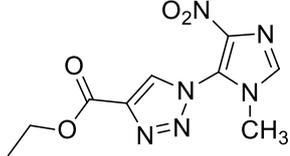
*: Sem efeito na maior concentração usada (6,400 μM)

- UAT= Unidades Arbitrárias Totais (unidade que mede o dano ao DNA)

- EPM= Erro padrão da media

Os resultados dos ensaios de mutagenicidade dos dois novos 4-nitroimidazóis **40a** e **40b** estão ilustrados na tabela 20 e para a caracterização da potência de mutagenicidade dos compostos, utilizamos a tabela 21 (CLAXTON *et. al*, 1991). Frente a esses resultados podemos verificar que os novos 4-nitroimidazóis **41a** e **41b** apresentaram níveis baixos de mutagenicidade em todas as linhagens de *Salmonella enterica* testadas, inclusive na TA100 uma linhagem específica para nitrocompostos, diferente do seu protótipo o megazol (**4**) (Tabela 20 e 21). Assim, tornando-as substâncias promissoras.

Tabela 20: Valores médios da inclinação da curva (potência mutagênica) determinados pelo método de Bernstein do megazol e seus análogos (**41a-b**).

Amostras	 (4) Megazol	 (41a)	 (41b)
Linhagens	-S9 +S9	-S9 +S9	-S9 +S9
TA97	505 461	0,64 0,22	N.D. 0,07
TA98	329 82	0,001 0,006	0,002 0,08
TA100	2195 2364	0,24 0,03	0,35 0,33
TA1535	N.D.	0,05 0,14	0,08 0,02
TA102	89 2174	0,007 0,003	0,27 0,0001
YG1021	N.D.	0,0009 0,004	0,01 0,002
YG1024	N.D.	0,002 0,004	0,004 0,02

N.D.: Não definido.

-S9 = sem agente metabolizador

+S9= com agente metabolizador

Tabela 21: Intervalos de potenciais para a caracterização de mutagenicidade em Teste de Ames.

Limite de reversão / μg (i.e., slopes)	Faixa de Mutagenicidade
< 0.1	Suspeito
0.1- 1.0	Extremamente baixo
1.0- 10.0	Baixo
10.0- 100.0	Moderado
100.0-1000.0	Alto
> 1000.0	Extremamente Alto

Diante destes resultados de mutagenicidade, genotoxicidade, citotoxicidade acrescido com o resultado do teste *in vitro* contra *T. cruzi*, identificou o composto **41a** como o mais promissor da série, por ele ser duas vezes mais ativo do que o benzonidazol (**6**) e o megazol (**4**) e por não ter os efeitos toxicológicos de **4**. Assim, o **41a** foi enviado para o ensaio *in vivo* contra *T. cruzi* e encontra-se em andamento.

No contexto de doenças negligenciadas, os compostos **40a-b** e **41a-h**, também foram enviados para testes em *T. brucei sps*, parasito pertencente à mesma família *Trypanosomatidea*, responsável pela doença do sono ou tripanossomose africana, e também para a avaliação na enzima *Tb*-nitroredutase. Os resultados ainda não estão disponíveis.

VII- CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Foram sintetizados 18 compostos, dentre eles 8 intermediários sintéticos, 10 produtos finais, sendo oito inéditos.

Neste trabalho foram investigadas duas metodologias sintéticas para a obtenção dos compostos finais **41a-h**.

O melhor catalizador para as reações de hidrogenólise de ligações C-N foi o Pd(OH)₂.

Os estudos de cristalografia dos compostos **41a** e **41b**, confirmam as suas estruturas químicas e a regioseletividade da reação de S_NAr.

Os compostos **41a-h** apresentaram atividade anti-*T.cruzi* superiores aos **40a-b**. Reforçando a importância de uma terceira região nessa classe de compostos.

O composto mais ativo da série **41a** foi aproximadamente duas vezes mais potente do que o protótipo megazol (**4**) e o benzonidazol (**6**), e sem efeitos mutagênico e citotóxico.

O segundo composto mais promissor da classe o **41h** apresentou CI₅₀= 12,9 µM, na mesma faixa do benzonidazol (CI₅₀= 10,8 µM).

Diante dos resultados das atividades biológica e toxicológicas, conseguiu-se alcançar a proposta do trabalho, que foi a obtenção de uma substância mais ativa do que seu protótipo e menos genotóxica e mutagênica. A molécula em questão, **41a**, encontra-se em ensaio *in vivo* contra *T. cruzi*.

Outro dado de grande relevância foi à separação das atividades tripanocida e toxicológicas atribuídas ao grupo nitroimidazólico. Confirmando assim, que é possível, obter substâncias nitroheterocíclicas com alta atividade tripanocida sem o efeito toxicológico.

Como perspectivas pretende-se otimizar a segunda metodologia utilizada neste trabalho e realizar teste *in vivo* e toxicológicos com o segundo composto mais promisso, o **41h**.

VIII- EXPERIMENTAL DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

1- ENSAIO DE AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS NOVOS 4-NITROIMIDAZÓIS

Os 10 novos 4-nitroimidazóis **40a-b** e **41a-h** foram submetidos à avaliação biológica, *in vitro*, na cepa Y da forma tripomastigota sanguínea de *T. cruzi*. Os ensaios foram realizados no Instituto Osvaldo Cruz- Fiocruz, no laboratório de Biologia Celular, pela Dra. Kelly Salomão, sob a coordenação da Dra. Solange Lisboa de Castro.

1.1 Ensaio de Avaliação do Efeito *in vitro* na cepa Y da forma tripomastigota sanguínea de *T. cruzi*

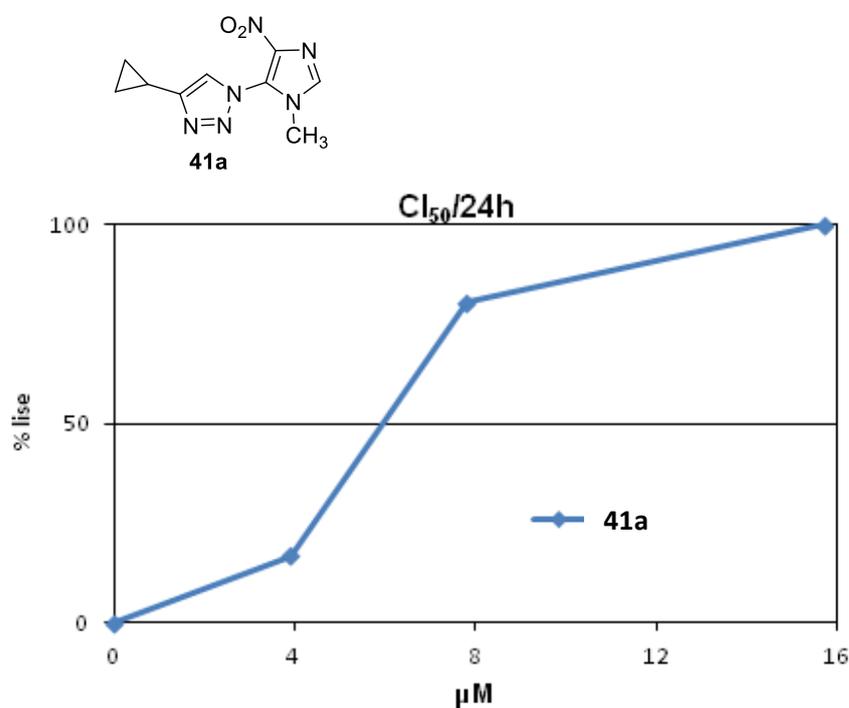
Para a realização dos experimentos foram utilizados *T. cruzi* de cepa Y (SILVA & NUSSENSZWEIG, 1953), forma tripomastigota sanguínea, obtidos no pico da parasitemia (7º dia pós-infecção) de camundongos albinos Swiss inoculados com 10^5 parasitos, via intraperitoneal. Os tripomastigotas passaram por um processo de centrifugação diferencial, para a separação de eritrócitos, leucócitos e concentração dos parasitos no plasma. No final o sobrenadante foi ressuspensão em meio Eagle modificado por Dulbecco (DME), e a concentração celular foi determinada através de contagem na câmara de Neubauer.

Solução estoque de cada composto foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO). Os ensaios com *tripomastigotas* foram realizados em placas de 96 poços.

Tripomastigotas: No primeiro poço foi colocado o dobro da maior concentração desejada de cada composto, num volume final de 200 µl, nos poços seguintes foram adicionados 100 µl meio DME suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2% de *l*-glutamina (DMES). Posteriormente foram acrescentados 100 µl de suspensão de parasitos (10^6 *tripomastigotas*), obtendo-se uma concentração final de 5×10^6 parasitos/ml. Na sequência, foram incubados por 24h a 37°C ou a 4°C, e quantificados em câmara de Neubauer por microscopia de luz. Alternativamente, experimentos eram realizados em sangue total de camundongo sendo 196 µl da suspensão de parasitos na concentração de 5×10^6 parasitos/ml incubados com 4 µl de

cada composto (50X a concentração final desejada). A atividade dos derivados foi expressa pelo parâmetro CI_{50} que corresponde à concentração do composto que produz em 50% a lise do parasito, como representado no gráfico 1 do composto **41a**. Foram realizados pelo menos quatro experimentos independentes e calculados a média e o desvio padrão.

Gráfico 1: Concentração que produz em 50% a lise do parasito (CI_{50}) do composto **41a**.



2- ENSAIO COMETA PARA AVALIAÇÃO DE DANO AO DNA DOS NOVOS 4-NITROIMIDAZÓIS

Os quatro novos 4-nitroimidazóis **40a-b** e **41a-b** foram submetidos a avaliação de genotoxicidade e citotoxicidade. Os ensaios foram realizados no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)- Fiocruz, Unidade Analítica: DFT- Departamento de Fármaco - Toxicologia, sob a coordenação da Dra. Helena Pereira da Silva Zamith.

O ensaio cometa em células sanguíneas humanas foi realizado de acordo com o Procedimento Operacional Padronizado (POP) nº 65.3330.011, referente ao ensaio cometa (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2012). O POP foi baseado em diretrizes estabelecidas por SPEIT; HARTMANN, (2006). De dois a três ensaios independentes foram realizados para cada substância testada.

2.1- Metodologia: Método Eletroforético em Microgel.

2.1.1- Ensaio de viabilidade celular mediado pelo diacetato de fluoresceína e brometo de etileno da substância.

Para a seleção da faixa de concentração da amostra a ser testada no ensaio cometa, efetuamos, inicialmente, um ensaio de citotoxicidade mediado pelo diacetato de fluoresceína e brometo de etídio para determinação da viabilidade de células sanguíneas humanas após tratamento com a amostra em DMSO 5% durante 2h a 37°C. As células de sangue total humano heparinizado, obtido por punção venosa, foram tratadas com DMSO 5% (controle-solvente) e com dez concentrações da amostra em DMSO 5% na faixa de 149 a 10000 µM. Após um período de tratamento, determinou-se a viabilidade celular de todas as culturas, empregando-se o ensaio de viabilidade mediado pelo diacetato de fluoresceína (30 µg/mL) e brometo de etídio (8 µg/mL), segundo HERTMANN; SPEIT (1997). Foram analisadas, em microscópio de fluorescência, 200 células por lamina e por concentração, a um aumento de 400X. As células variáveis mostraram fluorescência verde, enquanto núcleos corados em laranja indicam células mortas. O resultado foi expresso como percentual de citotoxicidade ou

percentual de decréscimo de viabilidade celular. Devemos evitar no ensaio cometa concentrações que determinem valores superiores a 30% de decréscimo de viabilidade celular, quando comparadas ao controle (ANDERSON *et al*, 1998 e HENDERSON *et al*, 1998).

2.1.2- Ensaio Cometa.

Foram realizados de 2 a 3 experimentos, empregando-se sangue total humano heparinizado obtido por punção venosa. As células sanguíneas humanas foram tratadas em duplicata durante 2h a 37°C com DMSO 5% (controle solvente) e com dez concentrações da amostra em 5% de DMSO na faixa de 149 a 10000 µM. O MMS, mutágeno de ação direta, na concentração de 160 µM, foi empregado como controle positivo. Em seguida, 5 µL da mistura de incubação foi misturada com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (BPF) 0,5% p/v e adicionado a lâmina de microscópio, previamente revestidas pela agarose de ponto de fusão normal 1,5% p/v.

As lâminas foram cobertas com uma lamínula e mantidas na geladeira (4 a 10°C), por cerca de 5 minutos, para solidificar a agarose de BPF. Após a solidificação da agarose, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas foram então mergulhadas na solução lise (sarcosinato de lauroilo sódico 1%, NaCl 2,5 M, EDTA dissódico 100 mM, Tris 10 mM, pH 10 e triton X-100 1%) durante 1h em geladeira, para lisar as células e permitir o desdobramento do DNA.

As lâminas foram então removidas da solução da lise e colocadas em cuba de eletroforese horizontal (BIO-RAD) contendo solução tampão alcalina para eletroforese (EDTA dissódico 1 mM e NaOH 300mM). As lâminas foram mantidas em solução tampão alcalina para eletroforese, por 20 min, em banho de gelo, para permitir o desdobramento do DNA e expressão dos sítios álcali-lábeis antes da eletroforese. Em seguida, a eletroforese foi realizada durante 20 min aplicando-se uma corrente elétrica de 25 V (0,86 V/cm) e 300 mA.

Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com solução Tris 0,4 M, pH 7,5, coradas com brometo de etídio (20 µL) e 50 células, selecionadas ao acaso, foram analisadas por lâminas, usando-se um microscópio de fluorescência (Nikon). A análise microscópica foi efetuada avaliando-se a extensão de migração do DNA em 100 células (2 lâminas), de acordo com o tamanho da cauda dos cometas em 4 diferentes classes (0

a 3), da seguinte forma: classe 0: ausência da cauda; classe 1: pequena cauda; classe 2: grande cauda; classe 3: DNA totalmente danificado (cabeça do cometa muito pequena com praticamente todo o DNA na cauda). O dano ao DNA foi expresso em porcentagem de células nas quatro diferentes classes e em número de unidades arbitrárias (UA), de acordo com a seguinte fórmula:

$$UA = [(M_0 \times 0) + (M_1 \times 1) + (M_2 \times 2) + (M_3 \times 3)]$$

M_0 = Número de células com classe de dano 0

M_1 = Número de células com classe de dano 1

M_2 = Número de células com classe de dano 2

M_3 = Número de células com classe de dano 3

3- ENSAIO DE MUTAGENICIDADE DOS NOVOS 4-NITROIMIDAZÓIS

Os dois novos 4-nitroimidazóis **41a-b** foram submetidos à avaliação de mutagenicidade. Os ensaios foram realizados na Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), no Laboratório de Mutagênese Ambiental, Departamento de Biofísica e Biometria do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, pelo doutorando Francisco V. C. Mello, sob a coordenação do Dr. Israel Felzenszwalb.

3.1- Metodologia: Teste de Ames

3.1.1- Controle negativo e positivo

O controle negativo utilizado neste ensaio foi o DMSO e os controles positivos utilizados, na ausência e presença de S9 *mix*, respectivamente, foram: 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO), CAS# 7608-65-0, pureza $\geq 97\%$, e 2-amino-antraceno (2AA), CAS# 613-13-8, pureza $\geq 96\%$, para TA97, TA98, YG1021 e YG1024; Azida sódica (AS), CAS# 26628-22-8, pureza $\geq 99,5\%$, e 2AA para TA100 e TA1535; Mitomicina-C (MitC), CAS# 50-07-7, pureza $\geq 99\%$, para TA102. Todas as substâncias mutagênicas foram fornecidas pela Sigma Co.

3.1.2- Teste quantitativo de mutagenicidade (com pré-incubação)

A mutagenicidade foi determinada segundo Mortelmans e Zeiger (2000), utilizando-se as linhagens de *S. entérica*, descritas na tabela 22. As cepas cresceram por 16 horas em meio Louria Bertani, alcançando-se a fase estacionária contendo $1-2,0 \times 10^9$ células/mL.

Em tubos de ensaio, foram adicionados 100 mL de cultura bacteriana, 500 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4 (para o ensaio sem ativação metabólica) ou 500 mL de S9 *mix* (para o ensaio com ativação metabólica), e 100 mL da droga teste, assim como o controle negativo e controle positivo, em substituição ao agente teste. Em seguida, foram incubados por 20 minutos, a 37°C, com agitação constante (131 OPM).

Para o teste de mutagenicidade, foram adicionados 2,0 mL de top ágar em cada tubo e esta solução vertida em placas de Petri contendo meio mínimo. Em seguida, foram incubadas em estufa, a 37°C, por 72 horas. Após, as colônias revertentes *His*⁺

foram contadas e o índice de mutagenicidade (I.M.) determinado pela razão do número de revertentes da amostra pelo número de revertentes do controle negativo.

Para a análise qualitativa de mutagenicidade, foram utilizadas as seguintes linhagens: TA97, TA98, YG1021, YG1024, TA100, TA1535 e TA102 (Tabela 22). Os experimentos foram realizados em triplicata, para a confirmação dos resultados.

O modelo do programa escolhido para análise dos dados foi o de Bernstein, modelo SALANAL (BERNSTEIN *et al*, 1982). A inclinação da reta da parte linear da curva dose-resposta é também fornecida por esse programa e corresponde ao número de revertentes induzidos por unidade de medida da amostra analisada.

A partir dos resultados foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose analisada de cada composto. A RM é dada pela seguinte equação:

$$\text{RM} = \frac{\text{média n}^\circ \text{ revertentes por placa teste (espontâneos + induzidos)}}{\text{média n}^\circ \text{ revertentes por placa do controle negativo (espontâneos)}}$$

Tabela 22: Relação das linhagens de *Salmonella enterica* sorovar de Typhimurium derivadas de LT1 utilizadas nos testes quantitativo e qualitativo de mutagenicidade e suas respectivas características genóticas (MARON & AMES, 1983; WATANABE *et. al.*, 1989; WATANABE *et. al.*, 1990; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Linhagem	Alvo genético	Mutação <i>his</i>	Evento mutacional e outras características
TA97	CCCCC	<i>hisD6610</i>	Alteração no quadro de leitura, por deleção de pares de base G-C.
TA98	CGCGCGCG	<i>hisD3052</i>	Alteração no quadro de leitura, por adição de pares de base G-C.
YG1021	CGCGCGCG	<i>hisD3052</i>	Substituição de pares de base de G-C para T-A; supercompetente na síntese de enzimas nitroreductase.
YG1024	CGCGCGCG	<i>hisD3052</i>	Alteração no quadro de leitura, por adição de pares de base G-C; supercompetente na síntese de enzimas acetiltransferase.
TA100	GGG	<i>hisG46</i>	Substituição de pares de base de G-C para T-A.
TA1535	GGG	<i>hisG46</i>	Substituição de pares de base de G-C para T-A.
TA102	TAA	<i>hisG428</i>	Transições/transversões; substituição de pares de base T-A para G-C.

IX- PARTE EXPERIMENTAL SINTÉTICA

1 - Instrumentação

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho BÜCHI Melting Point (B-545) e os valores foram corrigidos.

As amostras analisadas por espectroscopia na região do infravermelho (IV) foram feitas por refletância, diluídas em brometo de potássio (KBr), utilizando o espectrofotômetro Shimadzu®, modelo IR Prestige-21 e o Thermo Nicolet 6000 com ATR. Os valores para as absorções foram expressos em número de onda, utilizando-se como unidade o centímetro recíproco (cm⁻¹).

Os espectros de massas, acoplado ao cromatógrafo gasoso, foram obtidos por impacto de elétrons (CG-EM) a 70eV, em cromatógrafo Agilent® modelo 6890 com o módulo de massas Agilent® modelo 5973 à 70 eV. A coluna utilizada foi uma HP-5, com 30 m de comprimento, 25 µm de espessura de filme e 0,25 mm de diâmetro interno. Como gas carreador utilizou-se hênio ultrapuro de 1 mL/min e split de 1:20. As condições de análises empregadas foram: temperatura inicial da coluna 70°C, gradiente 10°C /min, temperatura final da coluna em 300°C, temperatura do injetor a 270°C. O volume de injeção foi de 1 µL com concentração de amostra de 5 mg/mL.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H) foram obtidos a 400,00 ou 500,00 MHz em aparelho Bruker® Avance 500. A referência interna utilizada foi o tetrametilsilano (TMS). Os valores de deslocamento químico foram referidos em partes por milhão (ppm) em relação ao TMS e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz). As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica, suas multiplicidades foram descritas da seguinte forma: s- simpleto; d- duplete; dd- duplo duplete; t- tripleto; q- quarteto; sl- sinal largo; m- multiplete; sx- sexteto. Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN de ¹³C) foram obtidos a 100 MHz em aparelho Bruker® Avance 500.

As “*fids*” adquiridas foram editadas com programa MestReNova® versão cortesia de demonstração 6.0.2 (© 2009 Mestrelab Research S. L., Santiago de Compostela, Espanha).

A espectrometria de massas com ionização por eletrospray em modo negativo ou positivo (ESI-MS) foi realizada em equipamento Waters® Micromass ZQ4000 e os parâmetros experimentais variáveis estão localizados no cabeçalho de cada espectro, e

são referentes à voltagem do capilar, voltagem do cone, temperatura da fonte e temperatura de dessolvatação. Os valores estão expressos em relação massa/carga (m/z) e são equivalentes à massa molecular da substância podendo apresentar menos ou mais um próton.

As estruturas deste trabalho foram desenhadas utilizando o programa ChemDraw 11.0 versão cortesia de demonstração (© 2009 CambridgeSoft Corporation, Cambridge, USA).

2- Solventes e Reagentes

Os solventes e reagentes, foram tratados, destilados e secos, segundo as necessidades requeridas nas metodologias adotadas.

As reações de substituição nucleofílica aromática foram realizadas em atmosfera de argônio e toda a aparelhagem de vidro utilizada sofreu uma previa secagem na estufa anidra a 200°C, por 2 horas.

O processo de monitoramento das reações foi realizado através da Cromatografia em Camada Fina (CCF), em cromato folhas de alumínio de Kieselgel 60 F-254 com espessura de 0,25 mm com indicador para UV (254 nm), marca Merck. Os eluentes foram preparados na hora volume a um volume (V/V) e a visualização das substâncias em CCF foi realizada em lâmpadas de UV (254-366 nm) ou complexação com solução de vanilina sulfúrica 3% em etanol.

3- Primeira Metodologia Empregada

3.1- Preparação dos Novos Compostos Azólicos

3.1.1-Técnica geral de S_NAr Utilizando como Base Dimsil sódico (Carvalho, 2000)

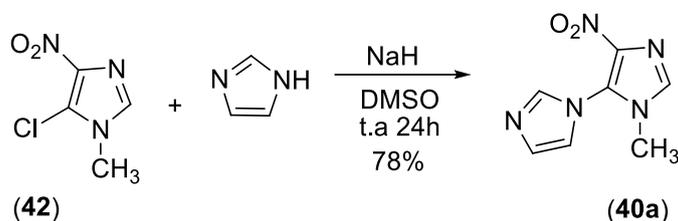
Em um balão de duas bocas com agitador magnético e atmosfera de argônio, adicionou-se hidreto de sódio (9,3 mmol, 3eq) e 2 mL de DMSO anidro. Em seguida adicionou-se vagarosamente (9,3 mmol, 3eq) o azol respectivo, previamente dissolvido em 2 mL de DMSO anidro. Uma mudança de coloração foi observada.

Após 30 min, adicionou-se (0,5 g; 3,2 mmol) 5-cloro-1-metil-4-nitroimidazol dissolvido em 2 mL de DMSO anidro. Observando outra vez a mudança da coloração.

A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente por 48 horas.

O meio reacional foi vertido num becker contendo gelo, o precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada, fornecendo o produto desejado.

3.1.2- Obtenção do 1'-metil-4'-nitro-1'H-1,5'-biimidazol (40a)



Após a filtração a vácuo, foi obtido um sólido marrom claro (0,48 g) em 78% de rendimento.

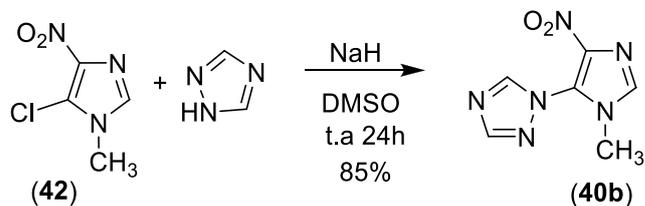
p.f.= 161, 5-163,9 °C (lit.: 160-161°C ^{Gonell, 2011})

CG-EM (70 eV), m/z (%): 163 (85), 137 (100), 135 (71), 164 (43) e 83 (37).

RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆ δ): 3,49 (s, 3H, CH₃); 7,19 (s, 1H, H-7); 7,55 (t, 1H, H-8); 8,01 (s, 1H, H-2) e 8,03 (s, 1H, H-10).

RMN ¹³C (100 MHz) (DMSO-*d*₆ δ): 31,6 (C-1); 120,8 (C-7); 125,0 (C-5); 129,4 (C-8); 132,2 (C-4); 134,8 (C-2) e 138,7 (C-10).

3.1.3- Obtenção do 1*H*-1,2,4-triazol, 1-(-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il) (40b)



Após a filtração a vácuo, foram obtidos cristais brancos (0,51 g) em 85% de rendimento.

p.f.=167,8-169,7°C

CG-EM (70 eV), m/z (%): 194 (100), 136 (35), 94 (25), 84 (26), 83 (55).

RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆ δ): 3,57 (s, 3H, CH₃); 8,09 (s, 1H, H-2); 8,48 (s, 1H, H-10) e 9,10 (s, 1H, H-7).

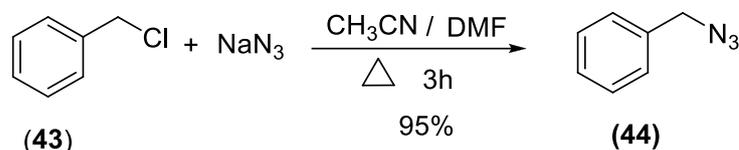
RMN ¹³C (100 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 32,2 (C-1); 123,5 (C-5); 135,7 (C-2); 138,8 (C-4); 148,3 (C-7) e 153,4 (C-10).

IV (ATR, cm⁻¹): 3113 (ν C-H Ar); 1614 (ν C=C Ar); 1518 (ν NO₂); 1501 (ν NO₂); 1369 (ν NO₂) e 830 (ν C-N).

ESI-MS (+): 217,0446 (+ Na⁺).

4- Preparação das heteroaminas

4.1- Obtenção da Benzilazida (44) (Ankati, 2009)



Em um balão de 100 ml foram adicionados cloreto de benzila (5,4 ml; 42,8 mmol), azida de sódio (4 g; 69,0 mmol), Acetonitrila (90 ml) e DMF (2 ml) temperatura ambiente. Após a adição dos reagentes o meio reacional foi mantido sob refluxo por 3h.

Em seguida adicionou-se 60 ml de água e fez-se a extração com clorofórmio (3 X 20 mL), a fase orgânica foi seca com Sulfato de sódio anidro e evaporada para fornecer **44** (5,4 ml) como um óleo em 95% de rendimento.

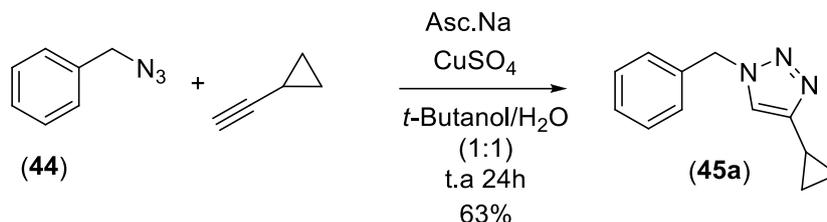
IV (KBr, cm^{-1}): 2113 (ν N=N=N).

4.2-Técnica geral de Cicloadição de 1,2,3 Triazol via Click Chemistry (Kolb, 2001)

Em um balão de 100 ml, à temperatura ambiente, adicionou-se a benzilazida (1,0 ml; 7,52 mmol) e 60 ml de solução H₂O/*t*.BuOH (1:1), sob agitação magnética. Em seguida acrescentou-se o acetileno apropriado (9,02 mmol, 1,2 eq), CuSO₄ · 5 H₂O (0,07 mmol, 0,01 eq) e o Asc.Na (0,75 mmol, 0,1 eq). A reação foi mantida à temperatura ambiente por 24 horas.

Após este período o meio reacional foi vertido em um becker com gelo picado, em seguida levado à geladeira por 12 horas. O precipitado formado foi filtrado a vácuo fornecendo o produto desejado e a fase aquosa foi extraída com clorofórmio (3 X 15mL), a fase orgânica foi seca com Sulfato de sódio anidro e evaporada fornecendo também o produto desejado.

4.2.1- Obtenção do 1-benzil-4-ciclopropil-1*H*-1,2,3-triazol (45a)



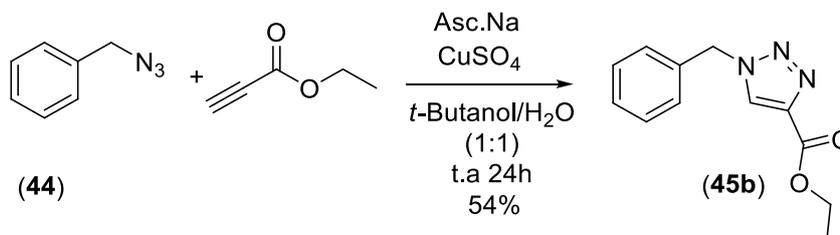
Foi obtido um sólido amarelado (0,9 g) em 63% de rendimento.

p.f.= 61,5-62,6 °C (lit.: 61-62°C ^{Ferreira, 2014})

CG/EM (70 eV), m/z (%): 199 (10); 170 (20); 143 (6); 92 (16); 91 (100).

RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆ δ): 0,69 (m, 2H, CH₂ ciclopropil); 0,87 (m, 2H, CH₂ ciclopropil); 1,92 (m, 1H, H-1'); 5,50 (s, 2H, H-6); 7,33 (m, 5H, H-1'', H-2'', H-3'', H-4'', H-5'') e 7,85 (s, 1H, H-5).

4.2.2- Obtenção do 1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxilato de etila (45b)



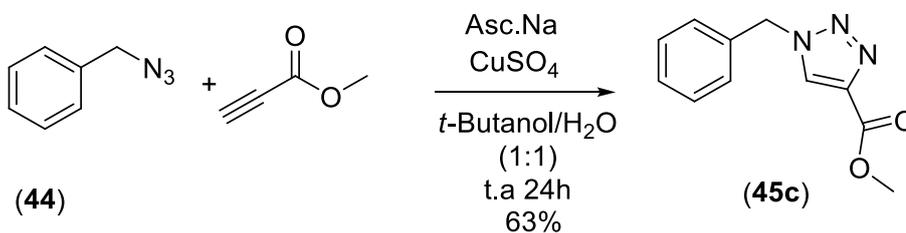
Foi obtido um sólido amarelado (0,9 g) em 54% de rendimento.

p.f.= 89,6-90,2 °C (lit.: 89-91°C ^{Cuevas, 2010})

CG/EM (70 eV), m/z (%): 174 (27); 131 (10); 130 (24); 92 (8); 91 (100).

RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆ δ): 1,28 (t, 3H, CO₂CH₂CH₃ (J=7,1 Hz)); 4,29 (q, 2H, CO₂CH₂CH₃ (J= 7,1 Hz)); 5,65 (s, 2H, H-6); 7,36 (m, 5H, H-1', H-2', H-3', H-4' e H-5') e 8,86 (s, 1H, H-5).

4.2.3- Obtenção do 1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxilato de metila (45c)

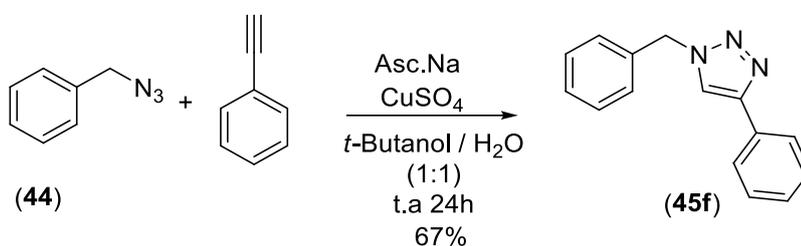


Foi obtido um sólido branco (1,0 g) em 63% de rendimento.

p.f.= 105,2-106,4 °C (lit.: 104,1–106,6 °C ^{Ferreira, 2014})

CG-EM (70 eV), m/z (%): 188 (14); 174 (25); 131 (10); 130 (25); 91 (100).

4.2.4-Obtenção do 1-benzil-4-fenil-1*H*-1,2,3-triazole (45f)



Foi obtido um sólido branco (1,1 g) em 67% de rendimento.

p.f.=107, 6-110, 2 °C (lit.: 104-108 °C ^{Pérez, 2014})

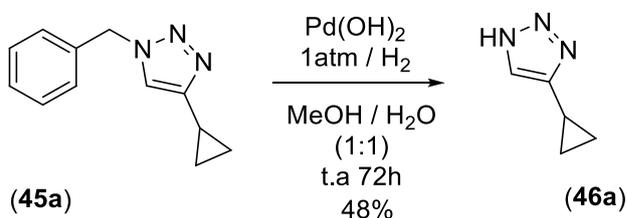
CG/EM (70 eV), m/z (%): 235 (22); 206 (77); 116 (100); 91 (78); 89 (29).

RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆ δ): 5,64 (s, 2H, H-6); 7,38 (m, 8H, H-2', H-3', H-4', H-1'', H-2'', H-3'', H-4'' e H-5''); 7,85 (m, 2H, H-1', H-5'); 8,63 (s, 1H, H-5).

4.3- Técnica geral de hidrogenolise (Estermam & Seebach, 1988)

O composto 1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol (4,89 mmol) foi solubilizado com 100 ml de uma solução H₂O/MeOH (1:1), em seguida foi adicionado o Pd(OH)₂ (0,49 g; 0,08 mmol). A reação foi colocada no hidrogenador (reator PAR) sob atmosfera de hidrogênio e agitação mecânica por 72 horas. Após este período, o meio reacional foi filtrado em celite e a fase líquida extraída com CHCl₃ (3 X 20 ml). A fase orgânica foi lavada com água (2 X 10 ml), seca com MgSO₄, e evaporada.

4.3.1- Obtenção do 4-ciclopropil-1*H*-1,2,3-triazol (46a)



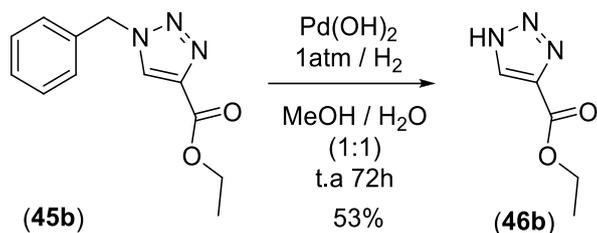
A fase orgânica foi evaporada, obtendo-se um sólido amarelado (0,9 g) em 48% de rendimento.

p.f. = 55,0-56,1°C (lit.: 54-55°C ^{Ferreira, 2014})

CG-EM (70 eV), m/z (%): 109 (77); 108 (20); 83 (11); 81 (16); 80 (100).

RMN ¹H(400 MHz) (DMSO-*d*₆ δ): 0,70 (m, 2H, CH₂ ciclopropil); 0,89 (m, 2H, CH₂ ciclopropil); 1,94 (m, 1H, H-1'); 7,52 (s, 1H, H-5) e 14,53 (s, 1H, NH).

4.3.2- Obtenção do etil-1H-1,2,3-triazol-4-carboxilato (46b)



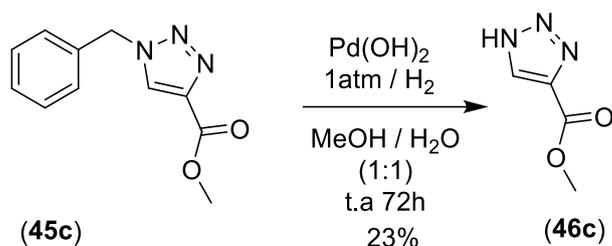
A fase orgânica foi evaporada, obtendo-se um sólido branco (1,3 g) em 53% de rendimento.

p.f.= 112, 8-113, 6°C (lit.: 113-114°C Taherpour, 2009)

CG/EM (70 eV), m/z (%): 141 (7); 114 (36); 113 (3); 97 (20); 96 (100).

RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆ δ): 1,30 (t, 3H, CO₂CH₂CH₃ (J=7,1 Hz)); 4,33 (q, 2H, CO₂CH₂CH₃ (J= 7,1 Hz)) e 8,49 (s, 1H, H-5).

4.3.3- Obtenção do metil-1H-1,2,3-triazol-4-carboxilato (46c)



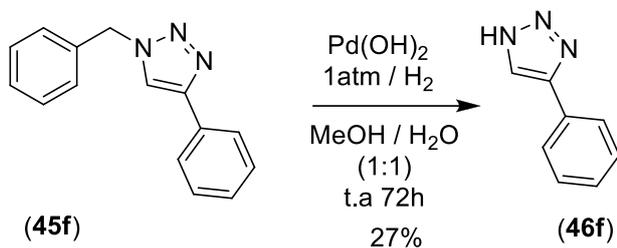
A fase orgânica foi evaporada, obtendo-se um sólido branco (0,5 g) em 23% de rendimento.

p.f.= 125,5-127,1°C (lit.: 125.7–127.1 °C Ferreira, 2014).

CG-EM (70 eV), m/z (%): 127 (10); 99 (1); 98 (3); 97 (68); 96 (100).

RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆ δ): 3,84 (s, 3H, CO₂CH₃); 8,55 (s, 1H, H-5) e 15,79 (s, 1H, NH).

4.3.4-Obtenção do 4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol (46f)



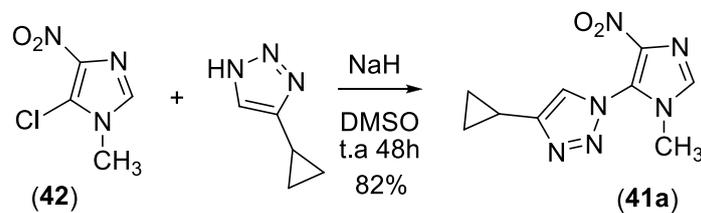
A fase orgânica foi evaporada, obtendo-se um sólido branco (0,7 g) em 27% de rendimento.

p.f.= 144,6-145,4°C

CG-EM (70 eV), m/z (%): 145 (100); 118 (20); 91 (20); 90 (15); 89 (21).

RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆ δ): 7,35 (m, 1H, H-3'); 7,45 (t, 2H, H-2'; H-4' (*J*= 7,52 Hz)); 7,85 (d, 2H, H-1', H-5' (*J*= 7,52 Hz)); 8,31 (s, 1H, H-5); 15,02 (s, 1H, NH).

5- Obtenção do 4-ciclopropil-1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol (41a)



Após a filtração a vácuo, foi obtido um sólido branco (0,59 g) em 82% de rendimento.

p.f.= 132,8-134,6°C

CG-EM (70 eV), m/z (%): 234 (100), 149 (13), 111 (13), 94 (17), 83 (21).

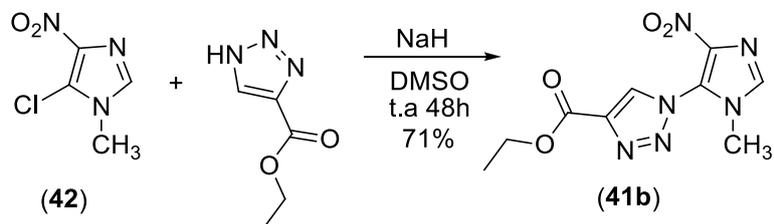
RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 0,86 ((m, 2H, CH₂ ciclopropil); 1,06 (m, 2H, CH₂ ciclopropil); 2,13 (m, 1H, H-11); 3,54 (s, 3H, CH₃); 8,06 (s, 1H, H-10) e 8,11 (s, 1H, H-2).

RMN ¹³C (100 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 6,6 (C-1'ou C-2'); 7,9 (C-1'ou C-2'); 8,7 (C-11); 32,2 (C-1); 125,8 (C-9); 135,5 (C-2); 135,5 (C-10); 138,9 (C-5) e 154,3 (C-4).

IV (ATR, cm⁻¹): 3107 (ν C-H Ar); 1617 (ν C=C Ar); 1507 (ν NO₂); 1358 (ν NO₂) e 831 (ν C-N).

ESI-MS (+): 254,0759 (+Na⁺).

5.1-Obtenção do etil 1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il) -1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxilato (41b)



Após a filtração a vácuo, foi obtido um sólido branco (0,58 g) em 71% de rendimento.

p.f.=138,7-141,6°C

RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆ δ): 1,34 (t, 3H, CO₂CH₂CH₃ (*j*=7,1 Hz)); 3,60 (s, 3H, CH₃); 4,38 (q, 2H, CO₂CH₂CH₃); 8,17 (s, 1H, H-2) e 9,36 (s, 1H, H-10).

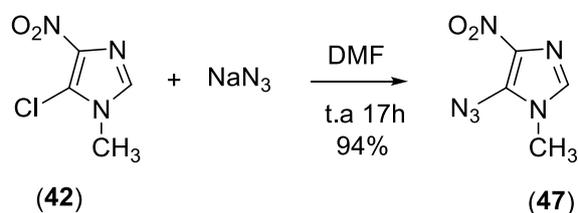
RMN ¹³C (100 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 14,1 (C-14); 32,4 (C-1); 61,1 (C-13); 122,3 (C-9); 133,3 (C-10); 136,3 (C-2); 139,1 (C-5); 139,2 (C-4) e 159,5 (C-11).

IV (ATR, cm⁻¹): 3124 (ν C-H Ar); 1718 (ν C=O); 1613 (ν C=C Ar); 1546 (ν NO₂); 1509 (ν NO₂); 1330 (ν NO₂) e 830 (ν C-N).

ESI-MS (+): 289,0 (+Na⁺).

6- Segunda Metodologia Empregada

6.1-Obtenção do intermediário chave 5-azido-1-metil-4-nitroimidazol (47) (Taher, 2002)



Em um balão de 25 mL, foi adicionado o 5-cloro-1-metil-4-nitroimidazol (1,0 g; 6,21 mmol), o mesmo foi solubilizado com dimetilformamida (DMF) (8,0 mL), adicionou-se a Azida de Sódio (6,21 mmol). Após a adição dos reagentes a reação foi protegida da luz e mantida à temperatura ambiente por 17 horas. O DMF do meio reacional foi evaporado, em seguida adicionou-se 6 mL de água destilada no sólido formado, o sólido foi filtrado e lavado com água gelada, fornecendo o produto **47** (1,0 g) como um sólido amarelo em 94% de rendimento.

p.f.= 112, 1-114, 3°C (lit.: 111-112°C Taher, 2002)

RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆ δ): 3,52 (s, 3H, CH₃) e 7,74 (s, 1H, H-2).

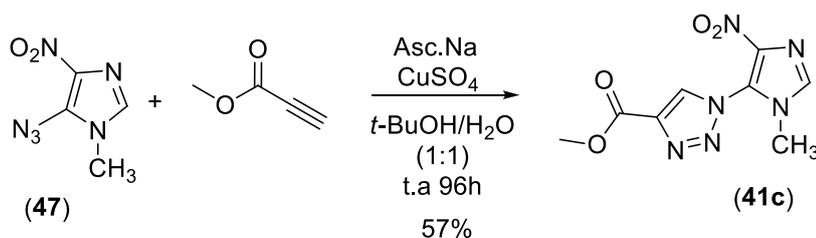
IV (ATR, cm⁻¹): 2151 (ν N=N=N), 1551 (ν NO₂) e 1363 (ν NO₂).

6.2-Técnica geral de Cicloadição de 1,2,3 Triazol via Click Chemistry (Kolb, 2001).

Em um balão de 25 ml à temperatura ambiente, adicionou-se o 5-azido-1-metil-4-nitroimidazol (2,97 mmol) e 30 ml de solução H₂O/*t*.BuOH (1:1) sob agitação magnética. Em seguida acrescentou-se o acetileno apropriado (3,56 mmol, 1,2 eq), CuSO₄.5 H₂O (0,02 mmol, 0,01 eq) e o Asc.Na (0,28 mmol, 0,1 eq). A reação foi mantida à temperatura ambiente por 96 horas.

Após este período reacional o precipitado formado em meio reacional foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada.

6.2.1-Obtenção do metil 1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il) -1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxilato (41c)



Após a filtração a vácuo, obteve-se um sólido amarelado (0,54 g) em 72% de rendimento bruto. Foi feita purificação utilizando o método de recristalização. O composto **41c** foi solubilizado a quente com MeOH em seguida gotejamos água destilada na solução, quando começou a turvar, foi retirado do aquecimento e iniciou-se a formação de um precipitado que foi filtrado, fornecendo um sólido branco (0,3 g) em 57% de rendimento.

p.f.=189,1-191,3°C

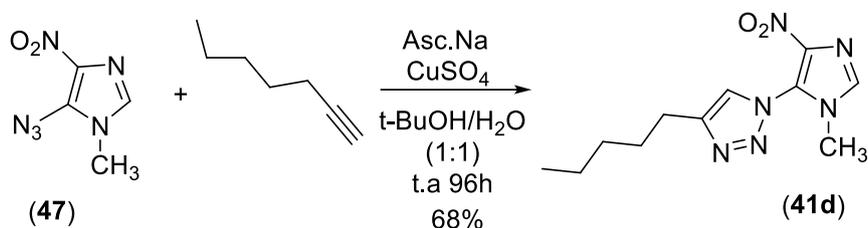
RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 3,60 (s, 3H, CH₃); 3,91 (s, 3H, CO₂CH₃) 8,17 (s, 1H, H-2) e 9,37 (s, 1H, H-10).

RMN ¹³C (100 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 32,3 (C-1); 52,1 (C-12); 122,2 (C-9); 133,3 (C-10); 136,2 (C-2); 138,8 (C-5); 139,1 (C-4) e 159,9 (C-11).

IV (ATR, cm⁻¹): 3114 (ν C-H Ar); 1716 (ν C=O); 1740 (ν C=O); 1603 (ν C=C Ar); 1534 (ν NO₂); 1510 (ν NO₂); 1362 (ν NO₂) e 828 (ν C-N).

ESI-MS (+): 275,0504 (+Na⁺).

6.2.2- Obtenção do 1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il) -4-pentil-1*H*-1,2,3-triazol (41d)



Após a filtração a vácuo, obteve-se um sólido bege (0,6 g) em 81% de rendimento bruto. Foi feita uma purificação utilizando o método de recristalização. O composto **41d** foi solubilizado a quente com MeOH em seguida gotejamos água destilada na solução, quando começou a turvar, foi retirado a aquecimento e em seguida iniciou-se a formação de um precipitado que foi filtrado, fornecendo cristais brancos (0,4 g) em 68% de rendimento.

p.f.=77,8-80,4°C

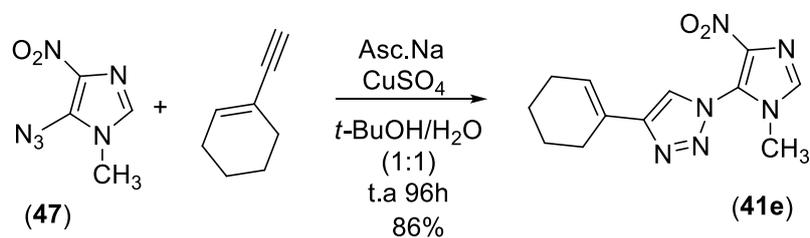
RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 0,88 (t, 3H, H-15 (*J*= 7,12 Hz)); 1,34 (sx, 4H, H-14, H-13 (*J*= 7,2 Hz)); 1,66 (q, 2H, H-12 (*J*= 7,44 Hz)); 2,75 (t, 2H, H-11 (*J*=7,52 Hz)); 3,52 (s, 1H, H-1); 8,11 (s, 1H, H-2) e 8,39 (s, 1H, H-10).

RMN ¹³C (100 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 13,7 (C-15); 21,7 (C-14); 24,5 (C-11); 28,1 (C-12); 30,5 (C-13); 32,1 (C-1); 123,7 (C-9); 125,5 (C-10); 135,8 (C-2); 138,7 (C-5) e 147,2 (C-4).

IV (ATR, cm⁻¹): 3107 (ν C-H Ar); 1622 (ν C=C Ar); 1520 (ν NO₂); 1360 (ν NO₂) e 830 (ν C-N).

ESI-MS (+): 285,1401 (+H⁺).

6.2.3- Obtenção do 4-ciclohexenil-1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il) -1*H*-1,2,3-triazol (41e)



Após a filtração a vácuo, foi obtido um sólido bege (0,7 g) em 86% de rendimento.

p.f.=182,5-184,2°C

RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 1,65 (m, 2H, H-2' ou H-3'); 1,74 (m, 2H, H-2' ou H-3'); 2,21 (m, 2H, H-1' ou H-4'); 2,37 (m, 2H, H-1' ou H-4'); 3,5 (s, 3H, CH₃); 6,5 (q, 2H, H-5' (*J*= 1,7) 8,12 (s, 1H, H-2) e 8,60 (s, 1H, H-10).

RMN ¹³C (100 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 21,6 (C-2' ou C-3'); 21,8 (C-2' ou C-3'); 24,6 (C-1' ou C-4'); 25,6 (C-1' ou C-4'); 32,2 (C-1); 123,2 (C-10); 123,4 (C-9); 125,3 (C-5'); 126,3 (C-11); 135,9 (C-2); 138,7 (C-5) e 148,1 (C-4).

6.2.4- Obtenção do 1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il) -4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol (41f)



Após a filtração a vácuo, obtivemos um sólido bege (0,4 g) em 61% de rendimento bruto. Em seguida foi feita uma purificação utilizando o método de extração em fase sólida, utilizando como fase móvel MeOH 30% em H₂O e fase estacionária sílica C18. Foi obtido um sólido branco (0,4 g) em 61% de rendimento.

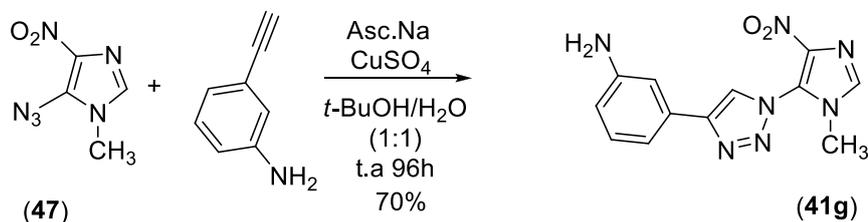
p.f.=197,9-199,3°C

RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 3,62 (s, 3H, CH₃); 7,42 (t, 1H, H-3' (J= 7,44 Hz)); 7,53 (t, 2H, H-2'e H-4' (J= 7,44 Hz)); 7,95 (d, 2H, H-1'e H-5' (J=7,24 Hz)); 8,16 (s, 1H, H-2) e 9,1 (s, 1H, H-10).

RMN ¹³C (100 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 32,3 (C-16); 123,3 (C-9); 125,0 (C-10); 125,4 (C-1'e C-5'); 128,6 (C-3'); 129,0 (C-2'e C-4'); 129,3 (C-11); 136,1 (C-2); 138,8 (C-5) e 146,5 (C-4).

ESI-MS (+): 293,0755 (+Na⁺).

6.2.5- Obtenção do 3-(1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il) -1*H*-1,2,3-triazol-4-il)anilina (41g)



Após a filtração a vácuo, obteve-se um sólido preto (0,7 g) em 84% de rendimento bruto. Foi feita uma purificação utilizando o método de recristalização. O composto foi solubilizado a quente com Acetona em seguida gotejamos água destilada na solução. Quando começou a turvar, foi retirado do aquecimento e iniciou-se a formação de cristais que foram filtrados, fornecendo cristais alaranjados (0,5 g) em 70% de rendimento.

p.f.=207,3-209,1°C

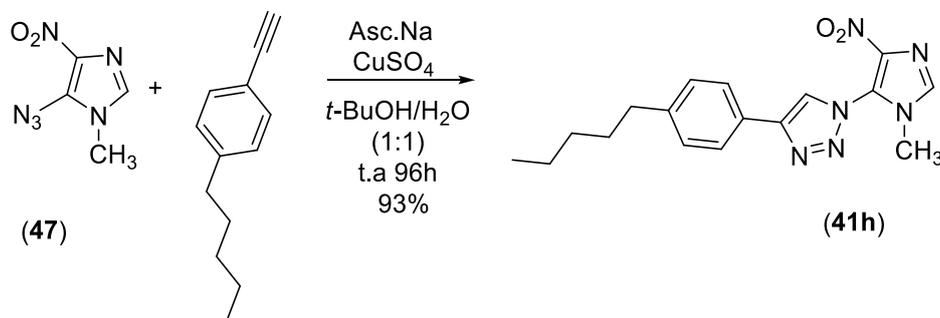
RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 3,61 (s, 1H, CH₃); 5,28 (s, 2H, NH₂); 6,59 (m, 1H, H-3'); 7,03 (d, 1H, H-1' (*J*= 7,76 Hz)); 7,14 (t, 2H, H-2' (*J*= 7,76 Hz)); 7,18 (m, 1H, H-5'); 8,15 (s, 1H, H-2) e 8,95 (s, 1H, H-10).

RMN ¹³C (100 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 32,3 (C-1); 110,4 (C-5'); 113,0 (C-1'); 114,1 (C-3'); 123,4 (C-9); 124,5 (C-11); 129,5 (C-2'); 129,7 (C-10); 136,0 (C-2); 138,8 (C-5); 147,2 (C-4) e 149,1 (C-NH₂).

IV (ATR, cm⁻¹): 3463 (ν N-H); 3359 (ν N-H); 3117 (ν C-H Ar); 1603 (ν C=C Ar); 1518 (ν NO₂); 1337 (ν NO₂) e 829 (ν C-N).

ESI-MS (+): 286,1053 (+H⁺).

6.2.6-Obtenção do 1-(1-metil-4-nitro-1*H*-imidazol-5-il) -4-(4-pentilfenil) -1*H*-1,2,3-triazol (41h)



Após a filtração a vácuo, foi obtido um sólido bege (0,94 g) em 93% de rendimento.

p.f.=118,7-120,9°C

RMN ¹H (400 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 0,87 (t, 3H, H-17 (*J*= 7,08 Hz)); 1,30 (m, 4H, H-16 e H-15); 1,61 (q, 2H, H-14 (*J*= 7,16 Hz)); 2,63 (t, 2H, H-13 (*J*=7,68 Hz)); 3,62 (s, 1H, H-1); 7,33 (d, 2H, H-2' e H-4' (*J*= 8,04Hz)); 7,83 (d, 2H, H-1' e H-5'(*J*= 8,04 Hz)); 8,16 (s, 1H, H-2) e 9,06 (s, 1H, H-10).

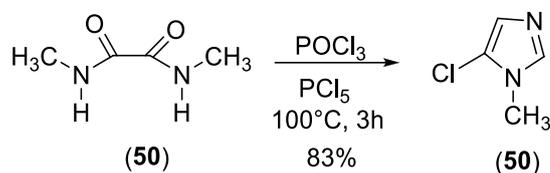
RMN ¹³C (100 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 13,8 (C-17); 21,9 (C-16); 30,4 (C-15); 30,7 (C-14); 32,3 (C-1); 34,8 (C-13); 123,4 (C-9); 124,6 (C-1' e C-5'); 126,8 (C-10); 128,5 (C-11); 128,9 (C-2' e C-4'); 131,5 (C-12); 136,1 (C-2); 138,9 (C-5) e 146,7 (C-4).

IV (ATR, cm⁻¹): 3112 (ν C-H Ar); 1612 (ν C=C Ar); 1524 (ν NO₂); 1508 (ν NO₂); 1360 (ν NO₂); 1329 (ν NO₂) e 830 (ν C-N).

ESI-MS (+): 363,0 (+Na⁺).

7- Preparação do intermediário chave 5-cloro-1-metil-4-nitroimidazol (42)

7.1- Obtenção do 5-cloro-1-metilimidazol (50) (Bhaduri, 1989)



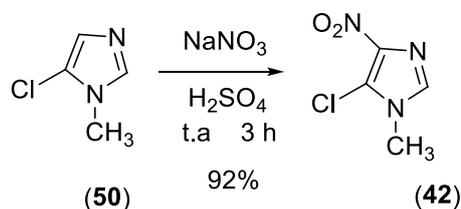
Em um balão de 50 ml conectado a um condensador de refluxo, foram adicionados pentacloreto de fósforo (3,1 g; 15 mmol) e oxicloreto de fósforo (8 ml; 53 mmol), sob agitação magnética, à 60°C , por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se *N,N'*-dimetiloxamida (0,8 g; 7 mmol) e a temperatura foi aumentada lentamente para 100°C , prosseguindo a reação por 135 minutos.

O meio reacional foi resfriado e o excesso de oxicloreto de fósforo foi retirado por pressão reduzida. Em seguida, a mistura foi vestida sobre gelo picado, basificada com NaOH (15N, 15ml) para $\text{pH} = 9$ e extraída com clorofórmio (5 X 10ml). A fase orgânica foi lavada com água (2x 10 ml), seca sob sulfato de sódio anidro e evaporado para obter um óleo amarelo escuro.

Adicionou-se éter seco ao óleo formado e a solução foi deixada no refrigerador durante uma noite. O sólido formado foi isolado e o filtrado concentrado para fornecer (0,6 g) do produto desejado como óleo amarelo claro em 83% de rendimento.

CG-EM (70 e V), m/z (%): 116 (100); 118 (30); 89 (12); 81 (43) e 54 (72).

7.1.1- Obtenção do 5-cloro-1-metil-4-nitroimidazol (42) (Yeowell, 1973)



Em um balão de 25 ml foi adicionados o imidazol (1,0 g; 9,7 mmol) e, lentamente o ácido sulfúrico concentrado (7 ml), sob agitação magnética à 0°C. Em seguida, adicionou-se, lentamente, o NaNO₃ (0,8 g; 9,7 mmol) Após a adição do reagente a reação foi mantida a temperatura ambiente por 180 minutos. Passando-se este tempo, o meio reacional foi vertido num becker contendo água gelada e gelo picado.

O precipitado formado na fase aquosa foi filtrado a vácuo fornecendo um sólido branco cristalino (1,2 g) em 92% de rendimento.

p.f.= 145,2-147,5°C (lit.: 147-148°C ^{Carvalho, 2001})

CG-EM (70 e V), m/z (%): 161 (84); 163 (28); 104 (25) e 76 (100).

X- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABHILASH, P.C., NANDITA, S., Pesticide use and application: An Indian scenario. **Journal of Hazardous Materials**, **2009**, 165: 1–12.

ADAMS, C. P., BRANTNER, V. V.; Estimating the cost of new drug development: is it really 802 milion dollats? **Health Affairs**, **2006**, 25: 420-428.

AGALAVE, S. G., MAUJAN, S. R., PORE, V.; Click Chemistry: 1,2,3-Triazoles as Pharmacophores. **Journal Chemistry Asian**, **2011**, 6: 2696-2718.

ANKATI, H., BIEHL, E.; Microwave-assisted benzyne-click chemistry: preparation of 1H-benzo[d][1,2,3]triazoles. **Tetrahedron Lett**, **2009**, 50: 4677-4682.

BAHIA, M. T., ANDRADE, I. M., MARTINS, T. A. F., NASCIMENTO, A. F. S., DINIZ, L. F., CALDAS, I. S., TALVANI, A., TRYNZ, B. B., TORREELE, E., RIBEIRO, I.; Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2012, 6, 11: e1870.

BERN, C.; Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, **2011**, 364: 2527-2534.

BERNSTEIN, L., KALDOR, J., McCANN, J., PIKE, M.C.; An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from Salmonella test. **Mutation Research**, **1982**, 97: 267-281,.

BHADURI, A. P., MUKHERJEE, A., SETH, M.; Synthesis of 1-Methyl-4-nitro-5-substituted-imidazole and Substituted Imidazolothiazole Derivatives as Possible Antiparasitic Agentes. **Indian Journal of Chemistry**, **1989**, 28B: 391-396.

BOECHAT, N., CARVALHO, A. S., FERNANDEZ-FERREIRA, E., SOARES, R.O. A., SOUZA, A. S., GIBALDI, D., BOZZA, M., PINTO, A. C.; Novel nitroimidazoles with trypanocidal and cell growth inhibition activities. **Cytobios**, **2001**, 105: 83-90.

BOECHAT, N., FERREIRA, M. L. G., BASTOS, M. M., CAMILO, A. L. S., WARDELL, S. M. S., WARDELL, J. L., TIEKINK, E. R. T.; Crystal and Molecular Structures of Two Triazole Derivatives: 4-Cyclopropyl-4,5-dihydro-1H-1,2,3-triazole and Methyl 1-benzyl- 1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate. **Journal Chemistry Crystallogr**, **2010**, 40: 1137-1141.

BOECHAT, N., FERREIRA, V. F., FERREIRA, S. B., FERREIRA, M. L. G., DA SILVA, F. C., BASTOS, M. M., COSTA, M. S., LOURENÇO, M. S., PINTO, A. C., KRETTLI, A. U., AGUIAR, A. C., TEXEIRA, B. M., DA SILVA, N.V., MARTINS, P. R. C., BEZERRA, F. A. F. M., CAMILO, A. L., DA SILVA, G. P., COSTA, C. C. P.; Novel 1,2,3-Triazole Derivatives for Use against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 2729) Strain. **Journal Medicinal Chemistry**, **2011**, 54: 5988-5999.

BOECHAT, N., FERREIRA, M. L. G., PINHEIRO, L. C. S., JESUS, A. M. L., LEITE, M. M. M., JÚNIOR, C. C. S., AGUIAR, A. C. C., ANDRADE DE, I. M., KRETTLI, A. U.; New Compounds Hybrids 1H-1,2,3-Triazolo-Quinoline Against *Plasmodium falciparum*. **Chemical Biology & Drug Design**, **2014**, 84: 325-332.

BOSCARDIN, S. B., TORRECILHAS, A. C. T., MANARIN, R., REVELLI, S., REY, E. G., TONELLI, R. R., SILBER, A. M.; Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, **2010**, 14, 6B: 1373-1384.

BRAMBILLA, G., MARTELLI, A.; Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. **Pharmacological Research**, **2009**, 60: 1-17.

CARVALHO, A. S., SALOMÃO, K., DE CASTRO, S. L., CONDE, T. R., ZAMITH, H. P. S., CAFFARENA, E. R., HALL, B. S., WILKINSON, S. R., BOECHAT, N.; Megazol and its bioisostere 4H-1,2,4-triazole: comparing the trypanocidal, cytotoxic and genotoxic activities and their in vitro and in silico interactions with the *Trypanosoma brucei* nitroreductase enzyme. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, **2014**, 109: 315-323.

CARVALHO, A. S.; Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Compostos Azólicos como Candidatos a Agentes Tripanomicidas. **2000**, 185f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CARVALHO, A.S., GIBALDI, D., PINTO, A. C., BOZZA, M., BOECHAT, N.; Synthesis and Trypanocidal Evaluation of News 5-[N-(3-(5-Substituted)-1,3,4-Thiadiazolyl)]Amino-1-Methyl-4-Nitroimidazoles. **Letters in Drug Design & Discovery**, **2006**, 3: 98-102.

CARVALHO, A.S., MENNA-BARRETO, R. F. S., ROMEIRO, N. C., DE CASTRO, S. L., BOECHAT, N.; Design, Synthesis and Activity Against Trypanosoma cruzi of Azaheterocyclic Analogs of Megazol. **Medicinal Chemistry**, **2007**, 3: 460-465.

CARVALHO, I., ANDRADE, P., CAMPO, V. L., GUEDES, P. M. M., SESTI-COSTA, R., SILVA, J. S., SCHENKMAN, S., DEDOLA, S., HILL, L., REJZEK, M., NEPOGODIEV, S. A., FIELD, R. A.; 'Click chemistry' synthesis of a library of 1,2,3-triazole-substituted galactose derivatives and their evaluation against Trypanosoma cruzi and its cell surface trans sialidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **2010**, 18: 2412-2427.

CARVALHO, S. A., LOPES, F. A. S., SALOMÃO, K., ROMIRO, N. C., WARDELL, S. M. S. V., CASTRO, S. L., SILVA, E. F., FRAGA, C. A. M.; Studies toward the structural optimization of new brazilzone-related trypanocidal 1,3,4-thiazdiazole-2-arylhydrazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **2008**, 16: 413-421.

CAVALLI, A., LIZZI, F., BONGARZONE, S., BELLUTI, F., PIAZZI, L., BOLOGNESI, M. L.; Complementary medicinal chemistry-driven strategies toward new antitrypanosomal and antileishmanial lead drug candidates. **Immunology & Medical Microbiology**, **2010**, 58: 51-60.

CHAUVIÈRE, G., BOUTEILLE, B., ENANGA, B., ALBUQUERQUE, C., CROFT, S. L., DUMAS, M., PÉRIÉ, J.; Synthesis and Biological Activity of Nitro Heterocycles Analous to Megazol, a Trypanocidal Lead. **Journal of Medicinal Chemistry**, **2003**, 46: 427-440.

CLAXTON, L. D., HOUK, V. S., WARNER, J. R., MYERS, L. E., HUGHES, T. J.; Assessing the use of known mutagens to calibrate the Salmonella typhimurium mutagenicity assay: II. With exogenous activation. **Mutation Research**, **1991**, 253: 149-159

CLAXTON, L. D., HOUK, V. S., WARNER, J. R., MYERS, L. E., HUGHES, T. J.; Assessing the use of known mutagens to calibrate the Salmonella typhimurium mutagenicity assay: I. Without exogenous activation. **Mutation Research**, **1991**, 253: 137-147

COURA, J. R., DE CASTRO, S. L.; A Critical review on chagas disease Chemoterapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **2002**, 97, 1: 3-24.

COURA, J. R., VINAS, P. A.; Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, **2010**, 465: S6–S7.

COURA, J. R.; Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **2009**, 104: 549-554.

DA SILVA Jr, E. N., MENNA-BARRETO, R. F. S., PINTO, M. C. F. R., SILVA, R. S. F., TEXEIRA, D. V., DE SOUZA, M. C. B. V., DE SIMONE, C. A., DE CASTRO, S. L., FERREIRA, V.F., PINTO, A.; Naphthoquinoidal [1,2,3]-triazole, a new structural moiety active against Trypanosoma cruzi. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **2008**, 43: 1774-1780.

DA SILVA, F. C., FERREIRA, S. B., DA ROCHA, D. R., FERREIRA, V. F., Chagas Disease: Challenges in Developing New Trypanocidal Lead Compounds. **Revista Virtual de Química**, **2012**, 4, 1: 46-72.

DANDAPANI, S., GERMAIN, A.R., JEWETT, I., LE QUEMENT, S., MARIE, J. C., MUNCIPINTO, G., DUVALL, J. R., CARMONDY, L. C., PEREZ, J. C., GUT, J., KELLAR, D., SIQUEIRA-NETO, J. L., MCKERROW, J. H., KAISER, M., RODRIGUES, A., PALMER, M. A., FOLEY, M., SCHREIBER, S. L., MUNOZ, B.; Diversity-Oriented Synthesis Yields a New Drug Lead for Treatment of Chagas Disease. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, **2014**, 5, 2: 149-153.

DE ALMEIDA, E. A., SILVA, E. L., AOKI, F. H., PEDRO, R. J.; Aetiological treatment with itraconazole or ketoconazole in individuals with *Trypanosoma cruzi*/HIV co-infection. **Ann Trop Med Parasitol**, **2009**, 103, 6: 471-476.

DEMORO, B., ROSSI, M., CARUSO, F., LIEBOWITZ, D., OLEA-AZAR, C., KEMMERLING, U., MAYA, J. D., GUISET, H., MORENO, V., PIZZO, C., MAHLER, G., OTERO, L., GAMBINO, D.; Potential Mechanism of the Anti-trypanosomal Activity of Organoruthenium Complexes with Bioactive Thiosemicarbazones. **Biological Trace Element Research**, **2013**, 153: 371-381.

DIAS, L. C., DESSOY, M. A., SILVA, J. J. N., THIEMANN, O. H., OLIVA, G., ANDRICOPULO, A. D.; Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da Arte e Perspectivas no desenvolvimento de novos Fármacos. **Química Nova**, **2009**, 32, 9: 2444-2457.

ESTERMANN, H., SEEBACH, D., Diastereoselective Alkylierung von 3-Aminobutansäure in der 2-Stellung. **Helvetica Chimica Acta**, **1988**, 71: 1824-1839.

FAROOQ, T., SYDNES, L. K., TÖRNROOS, K. W., HAUG, B. E.; Desbenzylation of Functionalized 4- and 5-Substituted 1,2,3-Triazole. **Synthesis**, **2012**, 44: 2070-2078.

FERREIRA, E. I.; Planejamento de Fármacos na Área de Doença de Chagas: Avanços e Desafios. **Revista Virtual de Química**, **2012**, 4, 3: 225-246.

FERREIRA, M. L. G., PINHEIRO, L. C. S., SANTOS-FILHO, O. A., PEÇANHA, M. D. S., SACRAMENTO, C. Q., MACHADO, V., FERREIRA, V. F., SOUZA, T. M. L., BOECHAT, N.; Design, synthesis, and antiviral activity of new 1*H*-1,2,3-triazole nucleoside ribavirin analogs. **Medicinal Chemistry Research**, **2014**, 23: 1501-1511.

FERREIRA, R. C. C., FERREIRA, L. C.S.; Mutagenicity of CL 64855 a Potent anti-*Trypanosoma cruzi* Drug. **Mutation Research**, **1986**, 171: 11-15.

FERREIRA, V. F., SOUZA, M. C. B., FERREIRA, M. L. G., CUNHA, A. C.; Heterociclos Contendo o Núcleo Triazólico: Métodos de Síntese, Reatividade e Atividade Biológica, **Cadernos do Instituto de Química-UFRJ**; PINTO, A. C., BICCA, R. A.; eds., **1999**.

FRANÇA, R. R. F., CARVALHO, A. S., BRANCO, F. S. C., PINTO, A. C., BOECHAT, N.; Inibidores Potentes da Enzima Esterol 14 α -desmetilase Contra *Trypanosoma cruzi*. **Revista Virtual de Química**, 2014, 6, 5: 1483-1516.

FREITAS, L. B. O., RUELA, F. A., PEREIRA, G. R., ALVES, R. B., FREITAS, R. P.; A reação “click” na síntese de 1,2,3-triazóis: Aspectos químicos e aplicações. **Química Nova**, 2011, 34: 1791-1804.

FULMER, G. R., MULLER, R. P., KEMP, R. A., GOLDBERG, K. I.; Hydrogenolysis of Palladium (II) Hydroxide and Methoxide Pincer Complexes. **Journal American Chemical Society**, 2009, 131: 1346-1347.

GONELL, S., POYATOS, M., MATA, J. A., PERIS, E.; A Y-Shaped Tris-N-Heterocyclic Carbene for the Synthesis of Simultaneously Chelate-Monodentate Dipalladium Complexes. **Organometallis**, 2011, 30: 5985-5990.

HEIN, J. E., FOKIN, V. V.; Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper (I) acetylides. **Chemical Society Reviews**, 2010, 39: 1302-1315.

HIGUCHI, M. L., BENVENUTI, L. A., MARTINS, M. R., METZGER, M.; Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc Res**, 2003, 60: 96-107.

<http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/azoles-e1224.html> 24/01/2015 as 10:05hs.

<http://www.dndial.org/pt/centro-de-documentacao/pres-releases/616-fexichagas.html> acessado em 15/12/2014 as 10:00hs.

HUISGEN, R.; Neves Über 1,3 Cycloadditionen. **Helvetica Chimica Acta**, 1967, 50, 254: 2421-2440.

KHARB, R., SHARMA, P. C., YAR, M. S.; Pharmacological significance of triazole scaffold. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 2011, 26, 1: 1–21.

KOLB, H. C., FINN, M. G., SHARPLESS, K.B.; Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, **2001**, 40, 11: 2004-2021

KOLB, H. C., SHARPLESS, B.; The growing impact of click chemistry on drug Discovery. **DDT**, **2003**, 8,24: 1128-1137.

KOLB, H. C., SHARPLESS, K.B.; The growing impact of click chemistry on drug discovery. **Drug Discovery Today**, **2003**, 8: 1128-1137.

KOLLIEN, A.H., SCHMIDT, J., SCHAUB, G. A.; Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. **Acta Tropica**, **1998**, 70: 127-141.

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

LOPES, W. A., FASCIO, M.; Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, **2004**, 27, 4: 670-673.

MARON, D.M., AMES, B. M.; Revised methods for the Salmonella mutagenicity test.

MATSUMOTO, M., HASHIZUME, H., TOMISHIGE, T., KAWASAKI, M., TSUBOUCHI, H., SASAKI, H., SHIMOKAWA, Y., KOMATSU, M.; OPC-67683, a Nitro-Dihydro-Imidazooxazole Derivative with Promising Action against Tuberculosis In Vitro and In Mice. **PLOS Medicine**, **2006**, 3, 11: 2131-2144.

MAYA, J. D., REPETTO, Y., AGOSÍN, M., OJEDA, J. M., TELLEZ, R., GAULE, C., MORELLO, A.; Effects of Nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **1997**, 86: 101-106.

MELLO, F. V. C., CARVALHO, A. S., BASTOS, M. M., BOECHAT, N., AIUB, C. A. F., FELZENSZWALB, I.; Evaluation of genotoxic effects of new molecules with possible trypanocidal activity for chagas disease treatment. **The Scientific World Journal**, **2013**, ID. 287319, 2013.

MELO, J. O. F., DONNICI, C. L., AUGUSTI, R., FERREIRA, V. F., DE SOUZA, M. C. B. V., FERREIRA, M. L. G., CUNHA, A. C.; Heterociclos 1,2,3-triazólicos: Histórico, Métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, **2006**, 29, 3: 569-579.

MELO, S. C. S.; Uma nova abordagem para a síntese de iodoimidazóis. **2000**, 190f. Tese (Mestrado em Química Orgânica)- Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MITAL, A.; Synthetic Nitroimidazoles: Biological Activities and Mutagenicity Relationships. **Scientia Pharmaceutica**, **2009**, 77: 497-520.

MIYAMOTO, Y., KALISIAK, J., KORTHALS, K., LAUWAET, T., CHEUNG, Y., LOZANO, R., COBO, E. R., UPCROFT, P., UPCROFT, J. A., BERG, D. E., GILLIN, F. D., FOKIN, V. V., SHARPLESS, K. B., ECKMANN, L.; Expanded therapeutic potential in activity space of next-generation 5-nitroimidazole antimicrobials with broad structural diversity. **PNAS**, **2013**, 110, 43: 17564-17569.

MOLINA, I., GÓMEZ, P. J., SALVADOR, F., TREVINÑO, B., SULLEIRO, E., SERRE, N., POU, D., ROURE, S., CABEZOS, J., VALERIO, L., BLANCO-GRAU, A., SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A., VIDAL, X., PAHISSA, A.; Randomized Trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, **2014**, 370, 20: 1899-1908.

MORETH, M., ORNELAS, D., GOMES, C. R. B., DE SOUZA, M. V. N.; Nitroimidazóis – uma promissora classe de substâncias para o tratamento da Tuberculose. **Revista Virtual de Química**, **2010**, 2, 2: 105-117.

MORTELMANS, K., ZEIGER, E., The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, **2000**, 455: 29-60.

MUÑOZ-SARAIVA, S. G., HABERLAND, A., WALLUKAT, G., SCHIMKE, I.; Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart Failure Review**, **2010**, 17, 1: 45-64.

Mutation Research, **1983**, 113, (3-4):173-215

NAGARAJAN, K., SIVARAMAKRISHNAN, H., RAVI, R.; Nucleophilic Substitutions on 3-chloro-4-fluoronitrobenzene. **Indian Journal of Chemistry**, 1997, 36B: 347-348.

NOIREAU, F., CARBAJAL-DE-LA-FUENTE, A. L., LOPES, C. M., DIOTAIUTI, L.; Some considerations about the ecology of Triatominae. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2005, 77, 3: 431-436.

NOVA-ZUAZO, C., CHÁVEZ-SILVA, F., MOO-PUC, R., CHAN-BACAB, M. J., ORTEGA-MORALES, B. O., MORENO-DÍAZ, H., DÍAZ-COUTINO, D., HERNÁNDEZ-NÚÑEZ, E., NAVARRETE-VÁZQUES, G.; 2-Acylam in o-5-nitro-1,3-thiazoles: Preparation and in vitro bioevaluation against four neglected protozoan parasite. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2014, 22: 1626-1633.

NWAKA, S., HUDSON, A.; Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews**, 2006, 5: 941-955.

OLIN-SANDOVAL, V., MORENO-SÁNCHEZ, R., SAAVEDRA, E.; Targeting Trypanothione Metabolism in Trypanosomatid Human Parasites. **Current Drug Targets**, 2010, 11: 1614-1630.

PAGLIAI, F., PIRALI, T., GROSSO, E. D., DI BRISCO, R., TRON, G. C., SORBA, G., GENAZZANI, A. A.; Rapid Synthesis of Triazole-Modified Resveratrol Analogues via Click Chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2006, 49: 467-470.

PATTERSON, S., WYLLIE, S.; Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, 2014, 30: 289-298.

PITA, S. S. R., PASCUTTI, P. G.; Alvos Terapêuticos na Doença de Chagas: a Tripanotiona Redutase como foco. **Revista Virtual de Química**, 2011, 3, 4: 307-324.

PRABAKARAM, K., KHAN, F-R. N., JIN, J. S.; ZnO nanoparticles-mediated regioselective synthesis of methyl-N-alkylated 1,2,3-triazole-4-carboxilates. **Research on Chemical Intermediates**, 2012, 38: 1101-1109.

RASMUSSEN, P. G., COAD, E. C., LIU, H.; Synthesis and Characterization of Derivatives and Dimers of 4,5-Dicyanoimidazole. **Tetrahedron**, **1999**, 55: 2811-2826.

RASSI, A. Jr., RASSI, A., MARIN-NETO, J. A.; Chagas disease. **Lancet**, **2010**, 375, 9723: 1388-1402.

REKHA, S.N., NAIK, R.; Pesticide residue in organic and conventional food—risk analysis. **Journal of Chemical Health and Safety**, **2006**, 13: 12–19.

ROCHA, D. R., SANTOS, W. C., LIMA, E. S., FERREIRA, V. F.; Synthesis of 1,2,3-triazole glycoconjugates as inhibitors of α -glucosidases. **Carbohydrate Research**, **2012**, 350: 14-19.

SAITO, Y., ESCURET, V., DURANTELO, D., ZOULIM, F., SCHINAZI, R. F., AGROFOGLIO, L. A.; “Synthesis of 1,2,3-triazolo-carbanucleoside analogues of ribavirin targeting an HCV in replicon”, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **2003**, 11,17: 3633-3639.

SCHAUB, G. A., LÖSCH, P.; *Trypanosoma cruzi*: Origin of Metacyclic Trypomastigotes in the Urine of the Vector *Triatoma infestans*. **Experimental Parasitology**, **1988**, 65: 174-186.

SILBER, J. J., CORREA, M.N., DURANTINI, N.; Catalysis in Micellar Media. Kinetics and Mechanism for the Reaction of 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene with *n*-butylamine and Piperidine in *n*-Hexane and AOT/*n*-Hexane/Water Reverse Micelles. **Journal Organic Chemistry**, **1999**, 64: 5757-5763.

SILVA, L. H. P., NUSSENZWEIG, V.; Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clínic et Biol**, **1953**, 20:191-208.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J.; Spectrometric Identification of Organic Compounds, John Wiley & Sons, Inc, ed. 7th, **2005**.

SMITH, B. M.; Aromatic Substitution, Organic Synthesis, McGraw-Hill International Editions, cap. 2, 183-199, **1994**.

SMITH, G.V., NOTHEISZ, F.; Heterogeneous Catalysis in Organic Chemistry. Elsevier, ed.1, cap. 4, **1999**.

SOLARI, A., SAAVEDRA, H., SEPÚLVEDA, C., ODDÓ, D., ACUÑA, G., LABARCA, J., MUÑOZ, S., CUNY, G., BRENGUES, C., VEAS, F.; Successful treatment of *Trypanosoma cruzi* encephalitis in a patient with hemophilia and AIDS. **Clinical Infections Diseases**, **1993**, 16, 2: 255-259.

SPEIT, G., HARTMANN, A.; The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in Molecular Biology**, **2006**, 314: 275-286.

TAHER, A., EICHENSEHER, S., SLAWIN, A. M. Z., TENNANT, G., WEAVER, G. W.; Synthesis of 2-aryl-2*H*-imidazol [4,5-*d*][1,2,3] triazoles from triethyl *N*-(1-ethyl-2-methyl-4-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)phosphorimidate by reaction with aryl isocyanates. **Journal Chemistry Society, Perkin Trans**, **2002**, 1: 1968-1972.

TERRIER, F.; Nucleophilic Aromatic Displacement, The Influence of the Nitro Group, VCH Publishers, Inc., cap 1 e 2, 1-147, **1991**.

TEXEIRA, D. E., BENCHIMOL, M., CREPALDI, P. H., DE SOUZA, W.; Atlas didático: Ciclo de vida do trypanossoma cruzi. Rio de Janeiro: **Fundação CECIERJ**, **2011**. 61p.

TORRICO, F., ALONSO-VEGA, C., SUAREZ, E., RODRIGUEZ, P., TORRICO, M-C., DRAMAIX, M., TRUYENS, C., CARLIER, A. Y.; Maternal *Trypanosoma cruzi* Infection, Pregnancy Outcome, Morbidity, and Mortality of Congenitally Infected and Non-infected Newborns in Bolivia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **2004**, 70, 2: 201–209.

TROBOCCHI, A., MENCHI, G., CINI, N., BIANCHINI, F., RASPANTI, S., BOTTONCETTI, A., PUPI, A., CALORINI, L., GUARNA, A.; Click-Chemistry-Derived Triazole Ligands of Arginine-Glycine-Aspartate (RGD) Integrins with a Broad Capacity To Inhibit Adhesion of Melanoma Cells and Both in Vitro and in Vivo Angiogenesis. **Journal of Medicinal Chemistry**, **2010**, 53: 7119-7128.

URBINA, J. A.; Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **2009**, 104, 1: 311-318.

URBINA, J. A.; Parasitological cure of Chagas disease: It is possible? Is it relevant? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **1999**, 94, 1: 349-355.

URBINA, J. A.; Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, **2010**, 115: 55–68

VIODÉ, C., BETTACHE, N., CENAS, N., KRAUTH-SIEGEL, R. L., CHAUVIÈRE, G., BAKALARA, N., PÉRIÉ, J.; Enzymatic Reduction Studies of Nitroheterocycles. **Biochemical Pharmacology**, **1999**, 57: 549-557.

WALSH, J. S., WANG, R., BAGAN, E., WANG, C. C., MIWA, G. T.; Structural alterations that differentially affect the mutagenic and antitrichomonal activities of 5-nitroimidazoles. **Journal of Medicinal Chemistry**, **1987**, 30: 150-156.

WANG, Y., BIAN, C.; Synthesis and Crystal Structure of [α -(2,4-Difluorophenyl)- α -(1*H*-1,2,4-triazole-1-ylmethyl)-1*H*-1,2,4-triazole-1-ethanol]Cu(II) Complex. **Asian Journal of Chemistry**, **2014**, 26, 24: 8593-8595.

WARRELL, B. T., MALIK, J. A., FOKIN, V.V., Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu (I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. **SCIENCE**, **2013**, 340: 457-460.

WATANABE, M., ISHIDATE, M., NOHMI, T.; A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. **Mutation Research**, **1989**, 216, 4: 211-220.

WATANABE, M., ISHIDATE, M., NOHMI, T.; Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated *O*-acetyltransferase levels. **Mutation Research**, **1990**, 234, 5: 337-348.

WHITING, M., TRIPP, J. C., CHUAN LIN, Y., LINDSTROM, W., OLSON, A. J., ELDER, J. H., SHARPLESS, K. B., FOKIN, V.V.; Rapid Discovery and Structure-Activity Profiling of Novel Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Enabled by the Copper(I)-Catalyzed Synthesis of 1,2,3-Triazoles and Their Further Functionalization. **Journal of Medicinal Chemistry**, **2006**, 49: 7697-7710.

WHO Chagas disease. Thirteenth Programme Report UNDP/WB/TDR, Geneva, p 112-123.

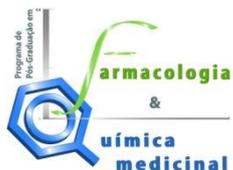
WHO/TDR Report of the Scientific Working Group on Chagas disease, Buenos Aires, Geneva, p 7.

WILKINSON, S. R., BOT, C., KELLY, J. M., HALL, B. S.; Trypanocidal Activity of Nitroaromatic Prodrugs: Current Treatments and Future Perspectives. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2011, 11: 2072-2084.

WOLFF, J. J., ZIETSCH, A., OESER, T., BOLOCAN, I.; Rate Increase in Consecutive Nucleophilic Aromatic Substitution Reactions of Trichlorotrinitrobenzene: The Synthesis of 1(Alkylamino)-3,5-dichloro-2,4,6-trinitrobenzenes. **Journal Organic Chemistry**, 1998, 63: 5164-5168.

YEOWELL, H. N., ELION, G. B.; Synthesis of 6-(1-Methyl-4-nitro-[4,5-¹⁴C]imidazolyl) thiopurine (Azathioprine). **Journal of Heterocyclic Chemistry**, 1973, 10: 1017-1019.

YOUCEF, R. A., DOS SANTOS, M., ROUSSEL, S., BALTAZE, J-P., LUBINGERMAIN, N., UZIEL, J.; Huisgen Cycloaddition Reaction of C-Alkynyl Ribosides under Micellar Catalysis: Synthesis of Ribavirin Analogues. **Journal Organic Chemistry**, 2009, 74: 4318-4323.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

CADERNO DE ESPECTROS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO TRIPANOCIDA E MUTAGÊNICA DE
NITROIMIDAZÓIS SUBSTITUÍDOS COM DIFERENTES ANÉIS
AZÓLICOS**

BRUNA MARIA CASTRO SALOMÃO QUARESMA

Rio de Janeiro

2015

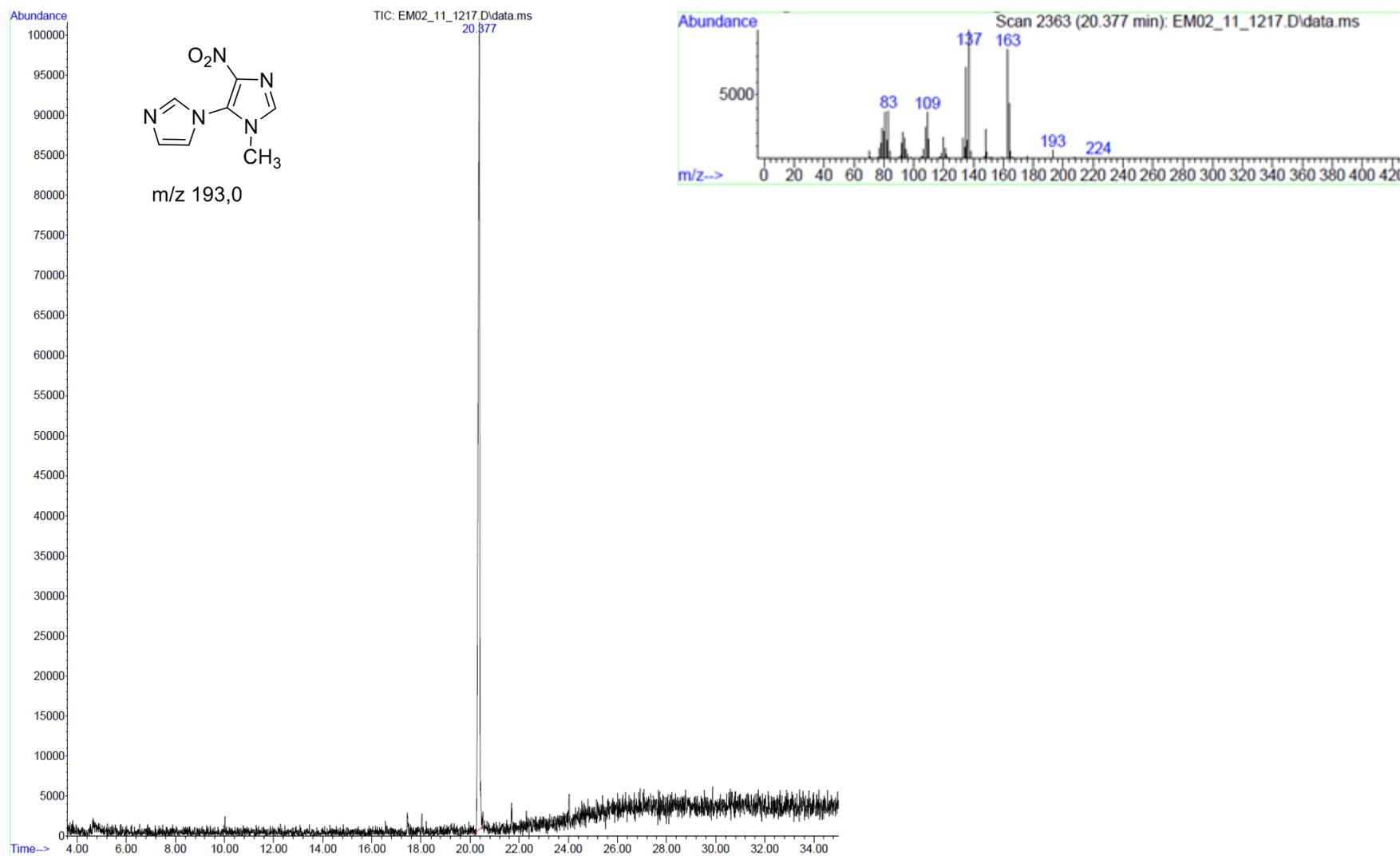


Figura 1: Espectro de Massa (EM) do Composto **40a** em MeOH.

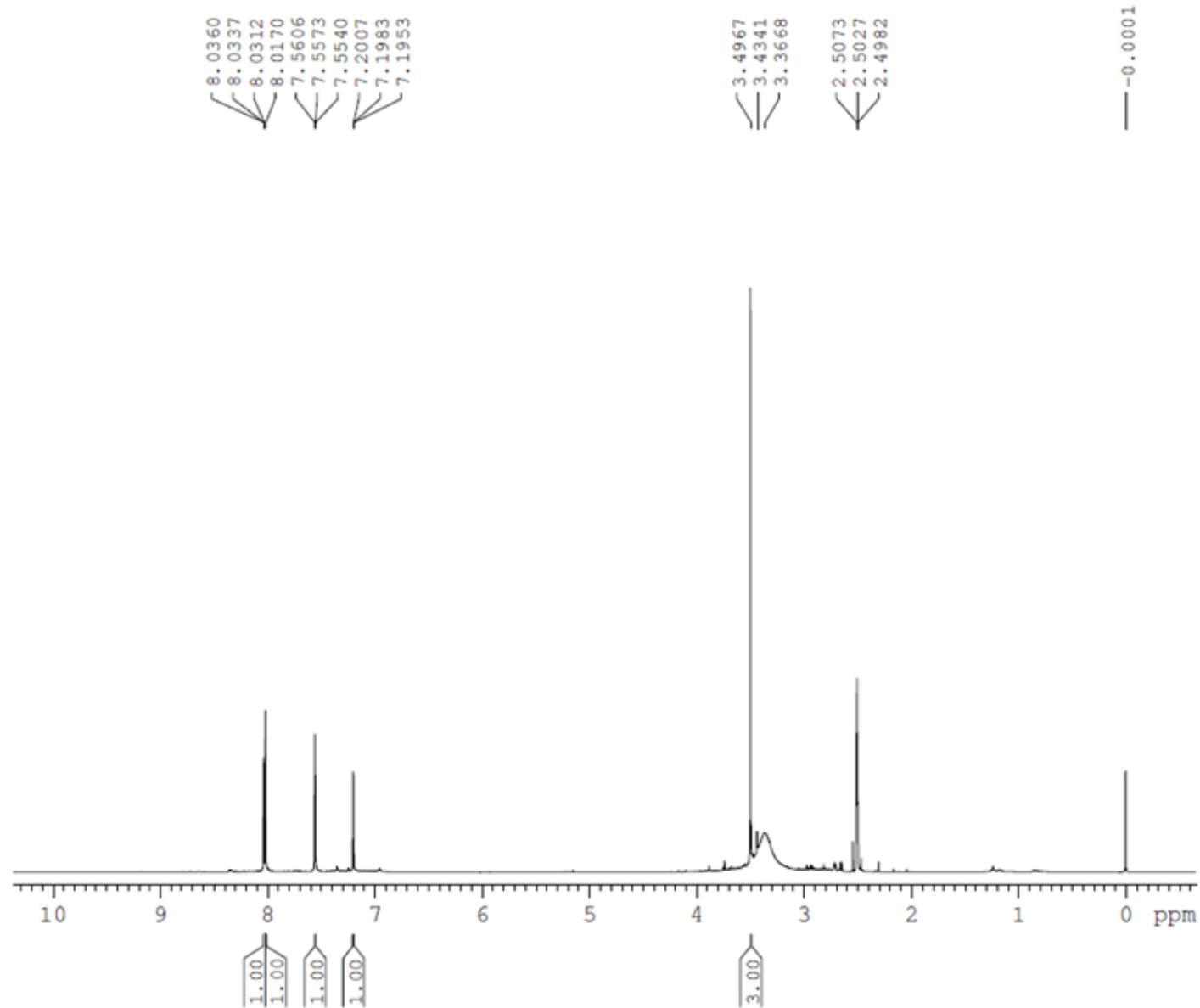
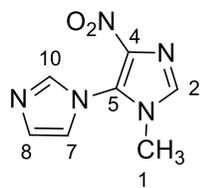


Figura 2: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **40a**.

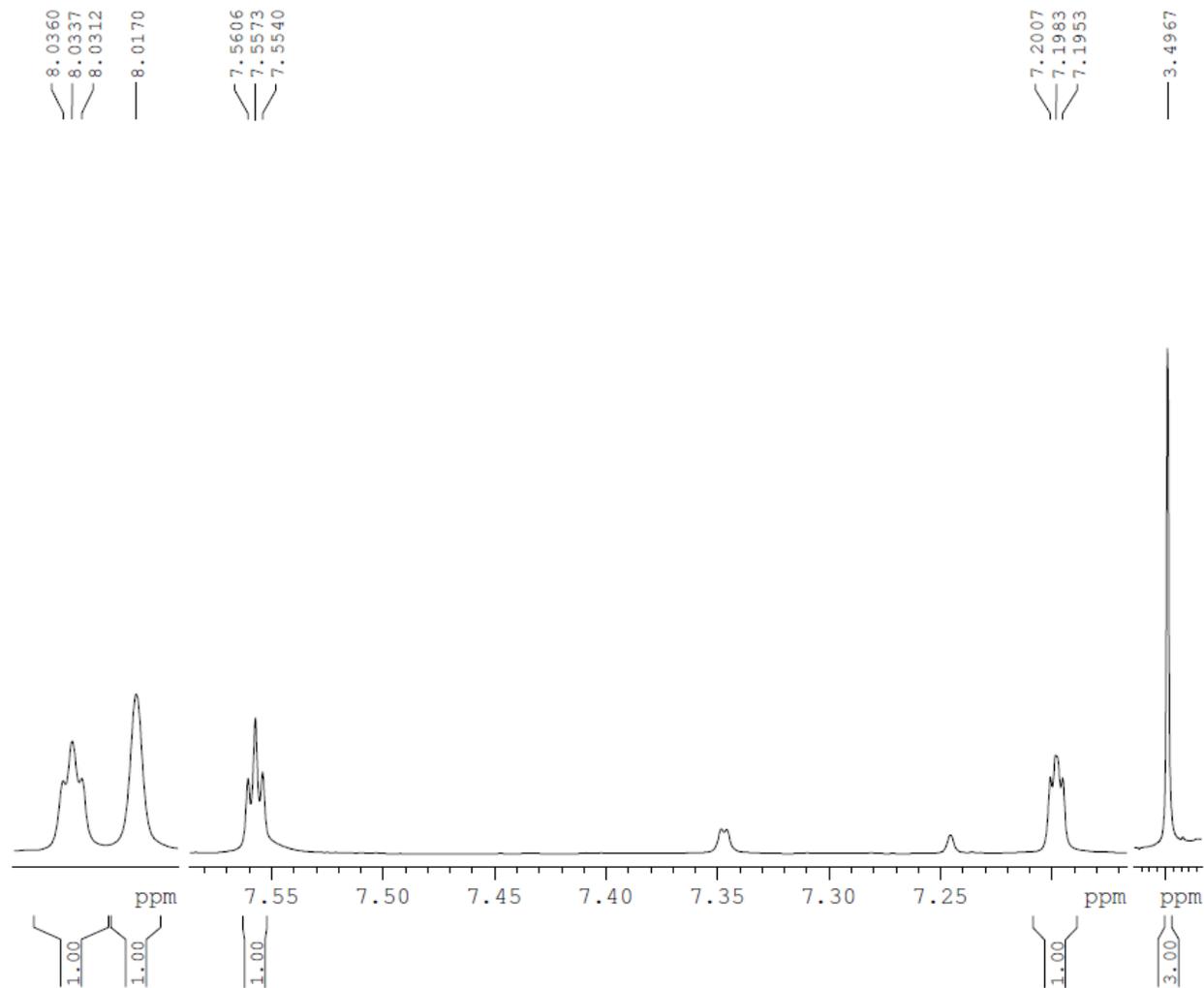
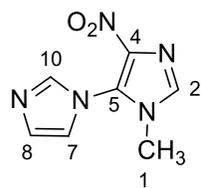


Figura 3: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **40a**.

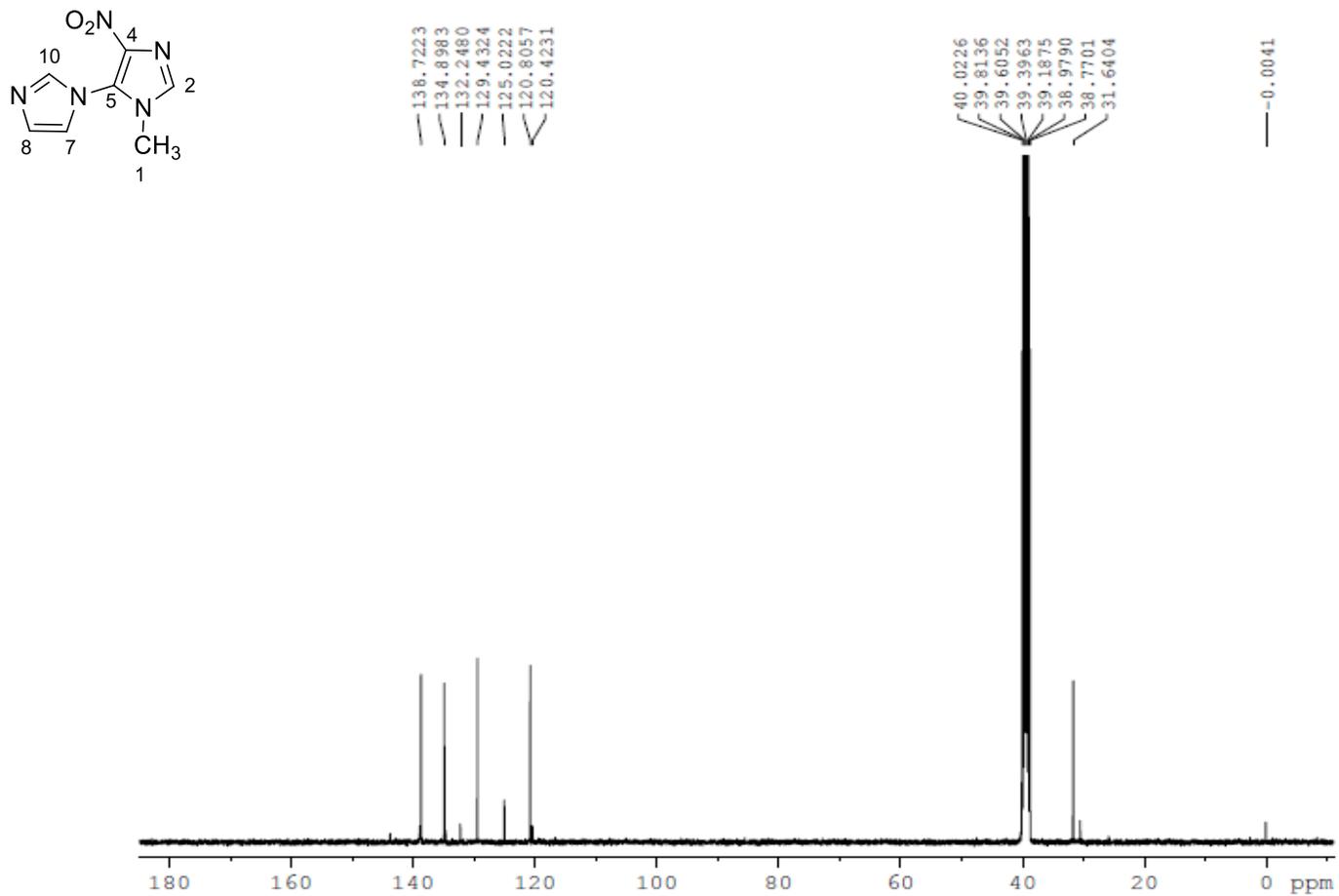


Figura 4: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em DMSO-d_6 de **40a**.

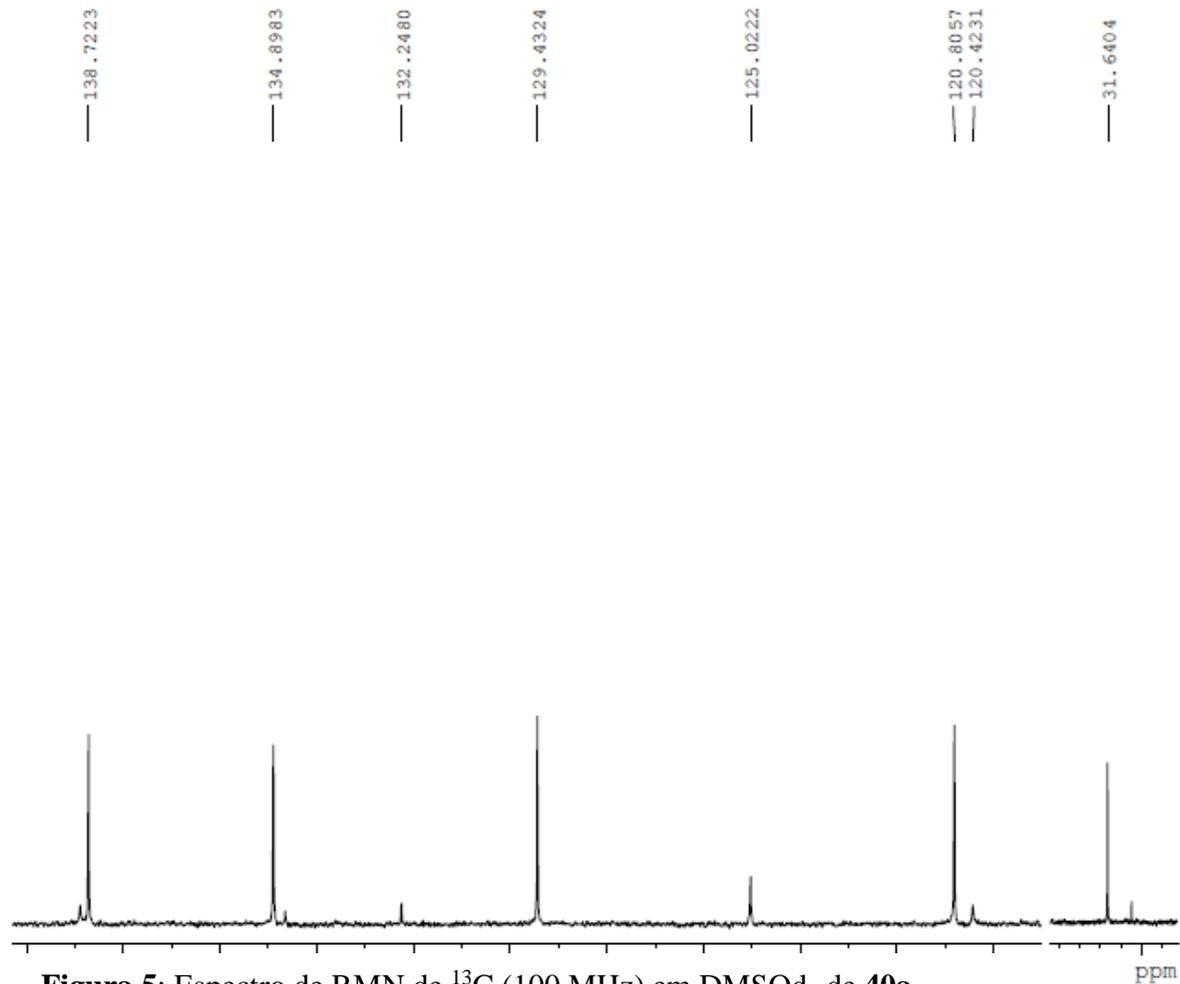
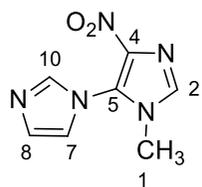


Figura 5: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em DMSO_d_6 de **40a**.

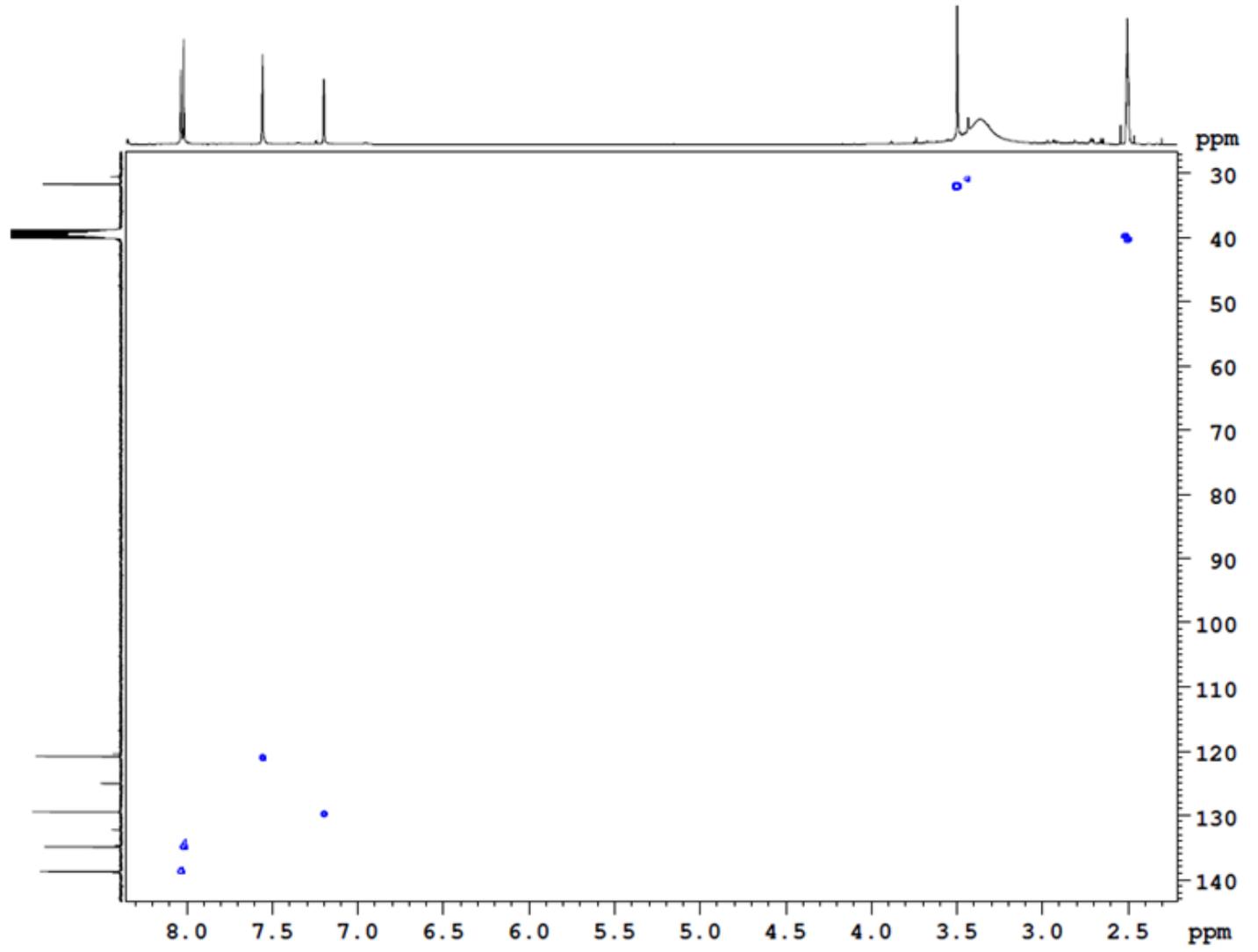
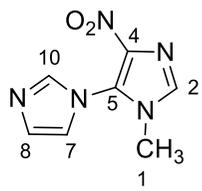


Figura 6: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSOd₆ de **40a**.

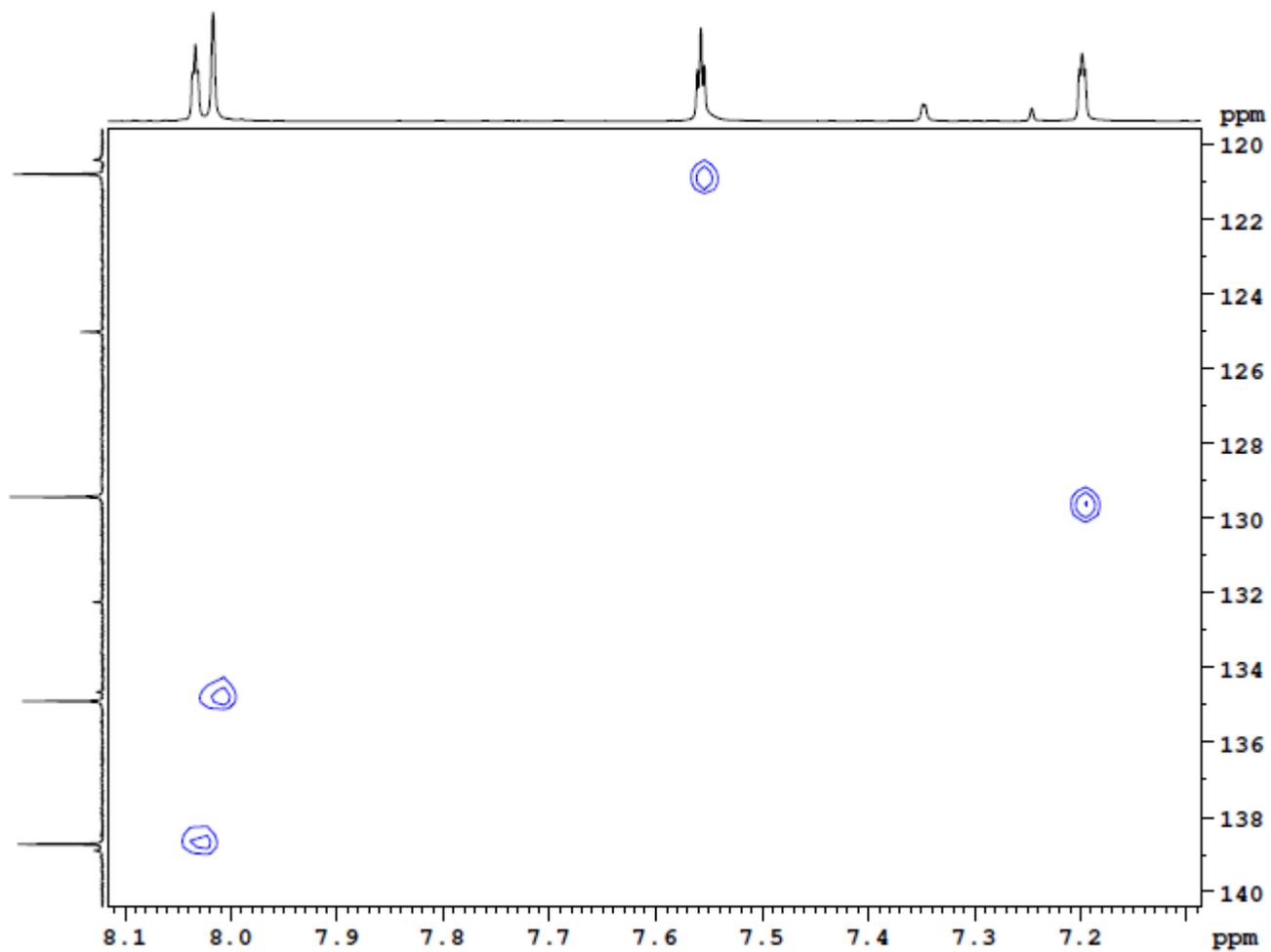
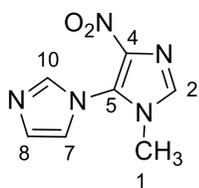


Figura 7: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO₆ de **40a**.

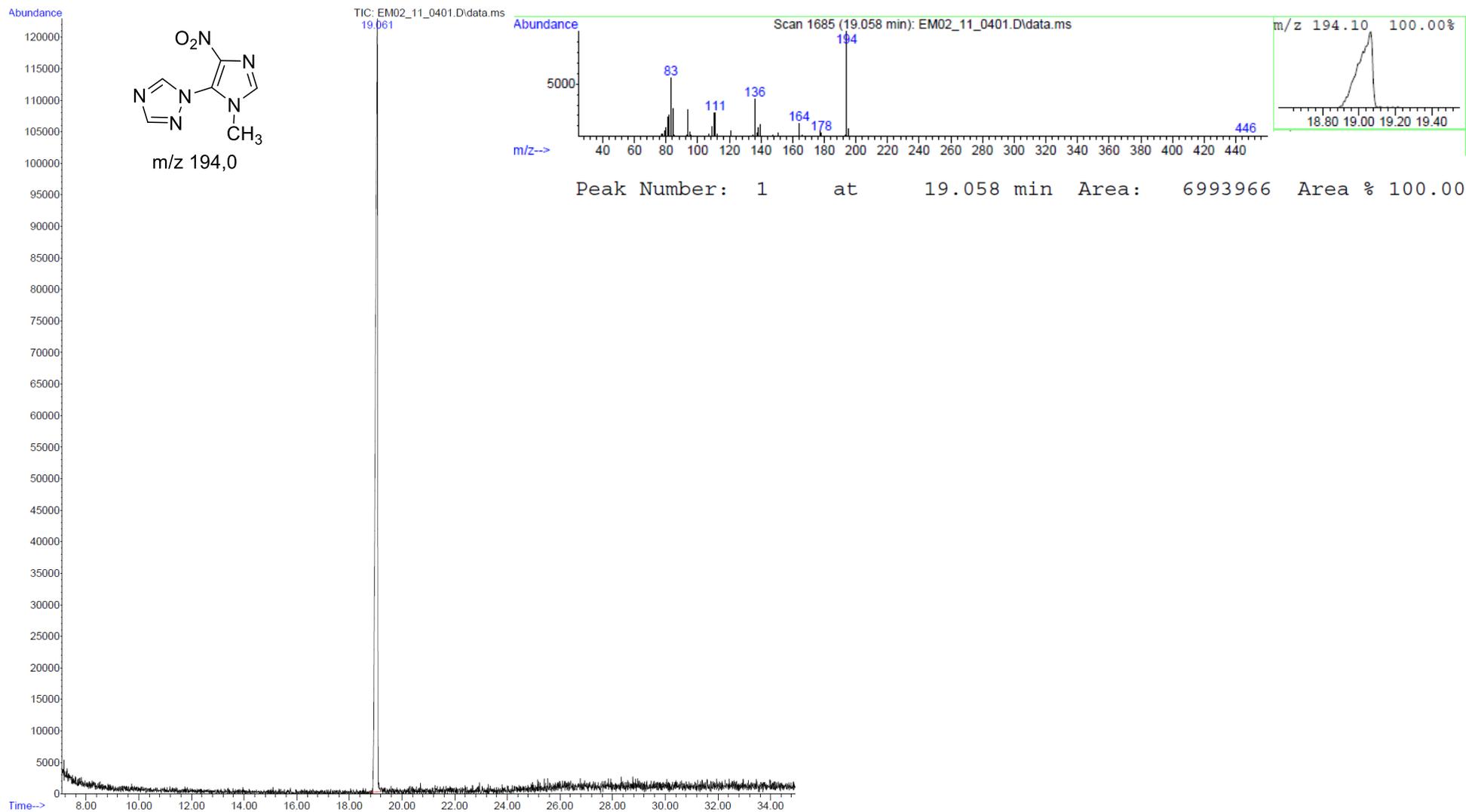


Figura 8: Espectro de Massa (EM) do Composto **40b** em MeOH.

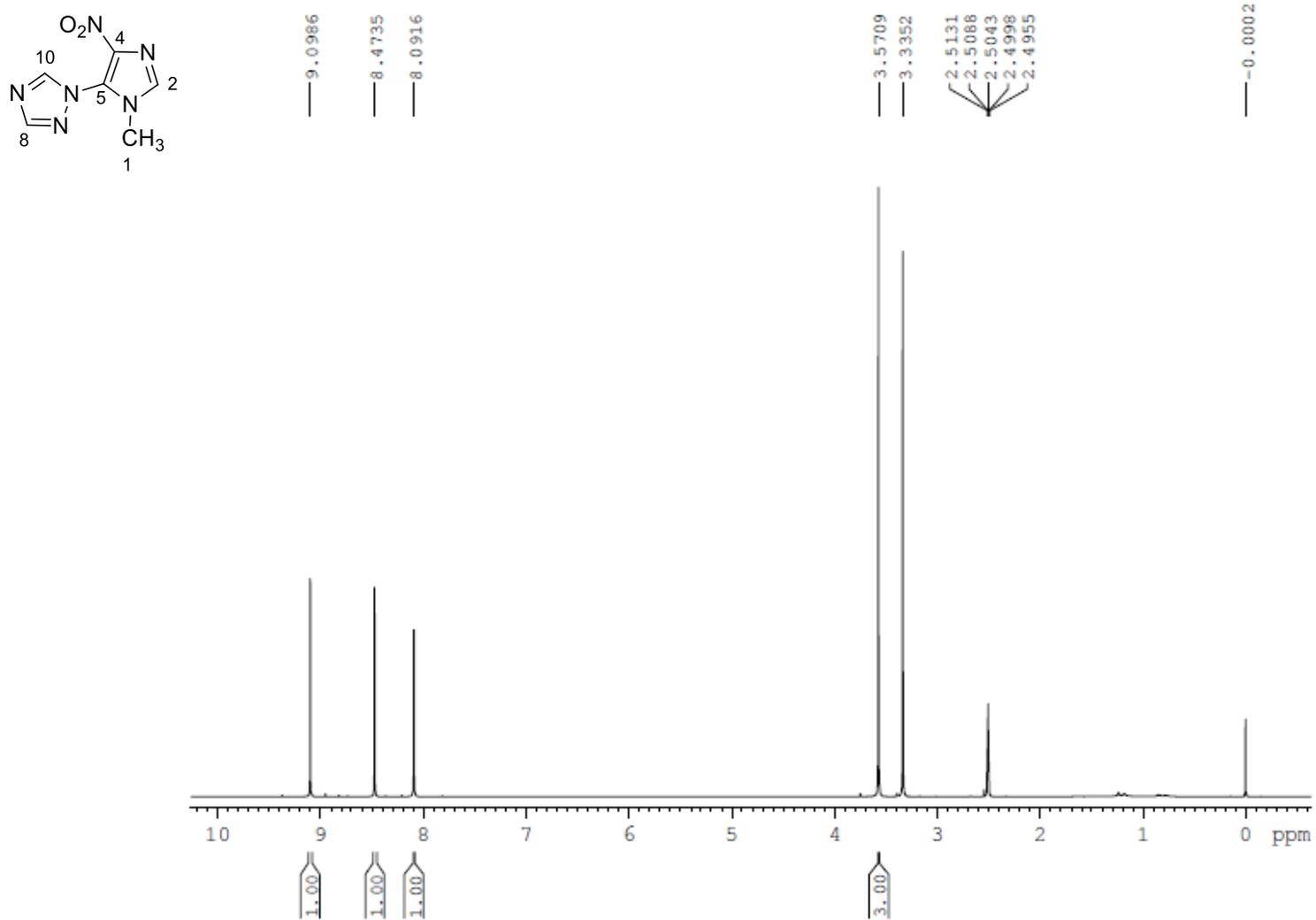


Figura 9: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **40b**.

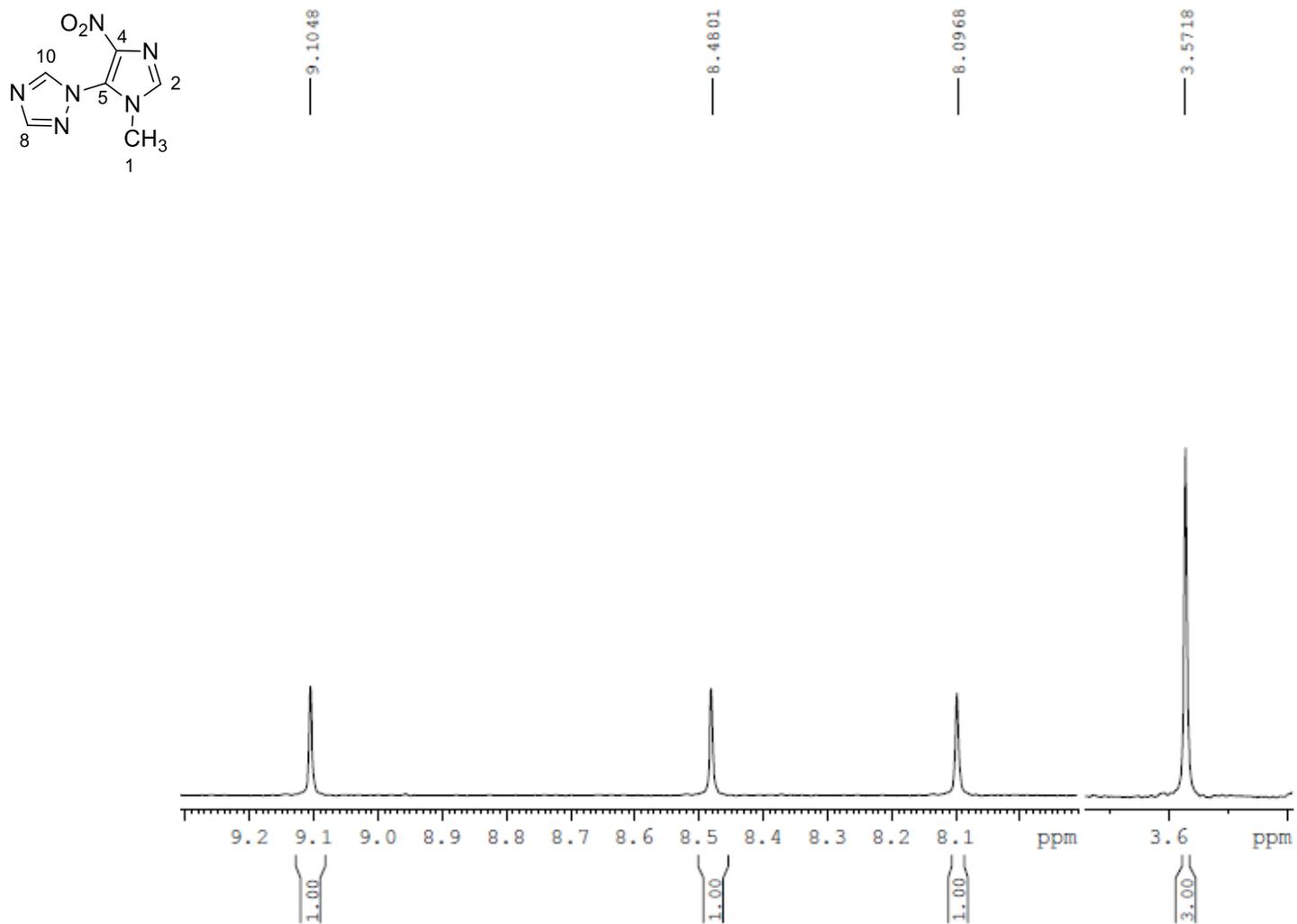


Figura 10: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de **40b**.

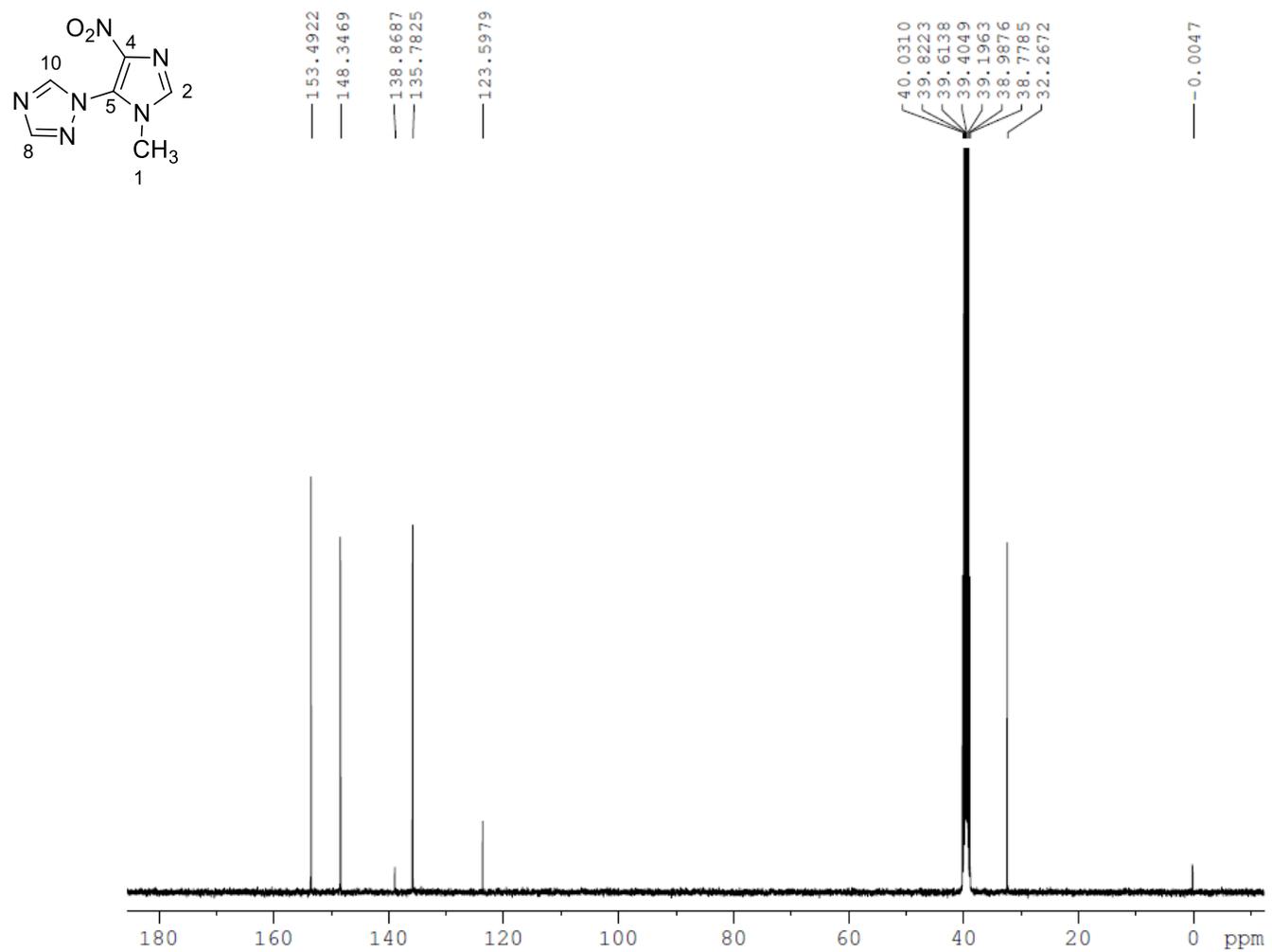


Figura 11: Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz) em DMSO_d₆ de **40b**.

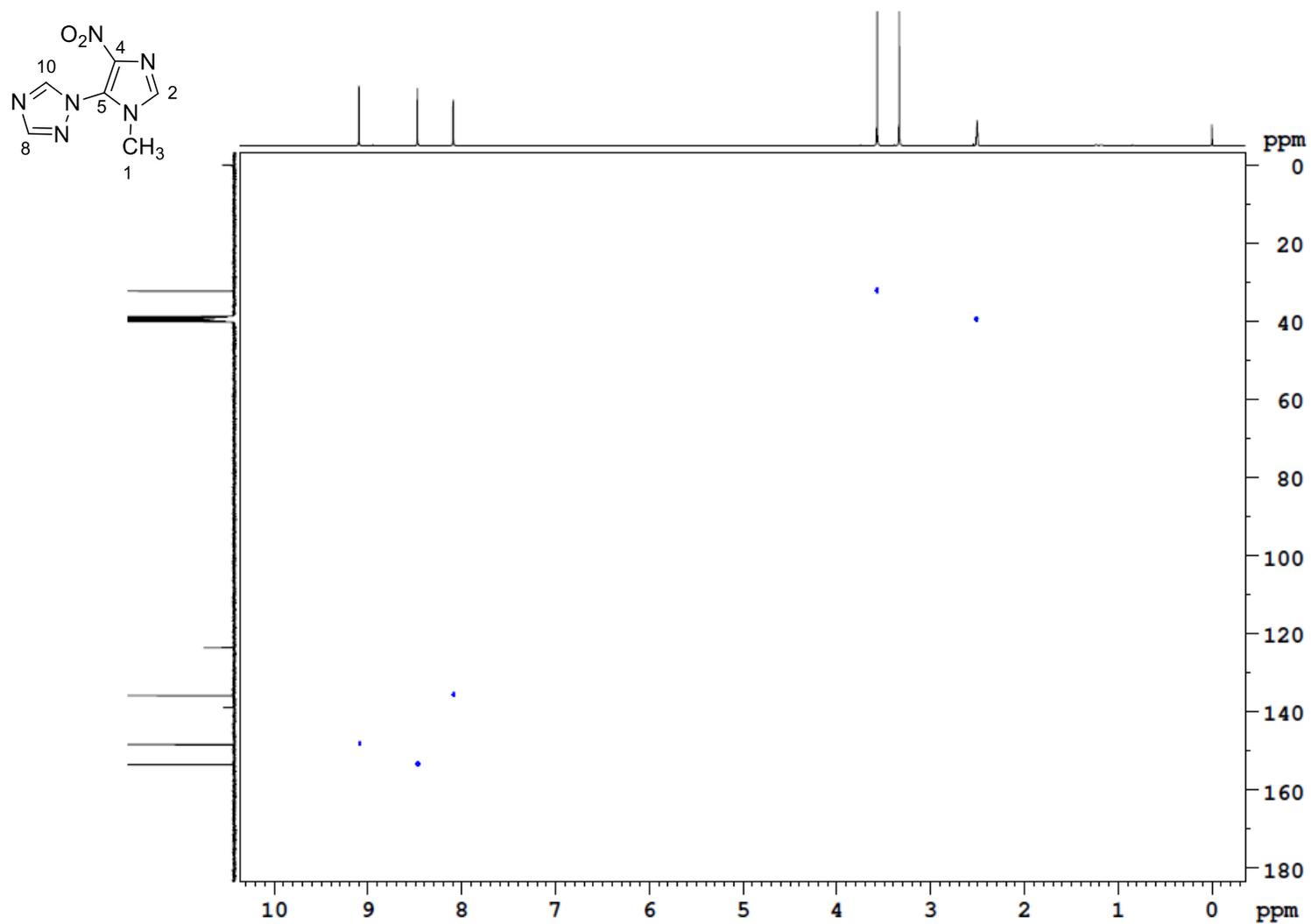


Figura 12: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO_d₆ de **40b**.

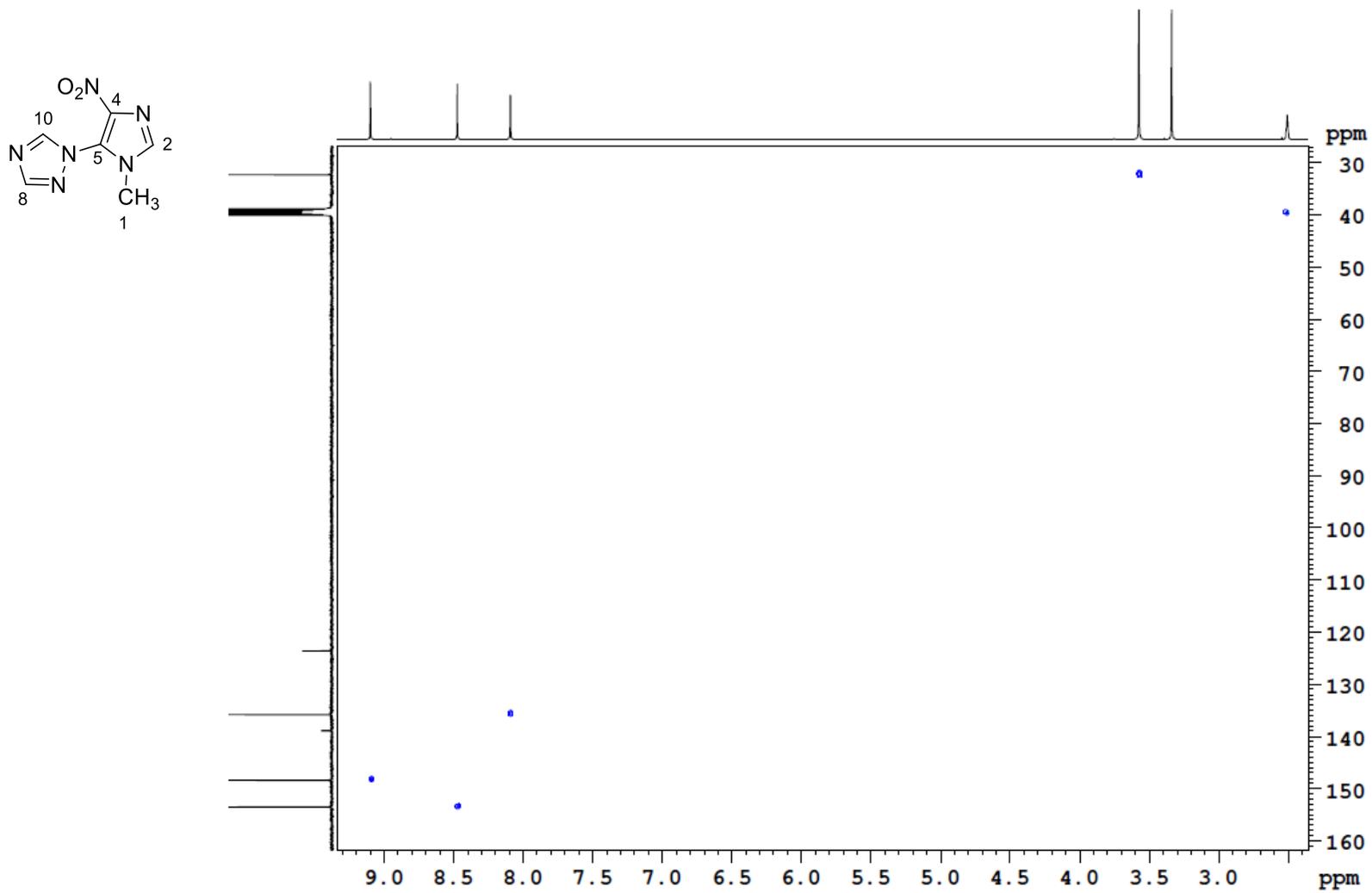


Figura 13: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO_d₆ de **40b**.

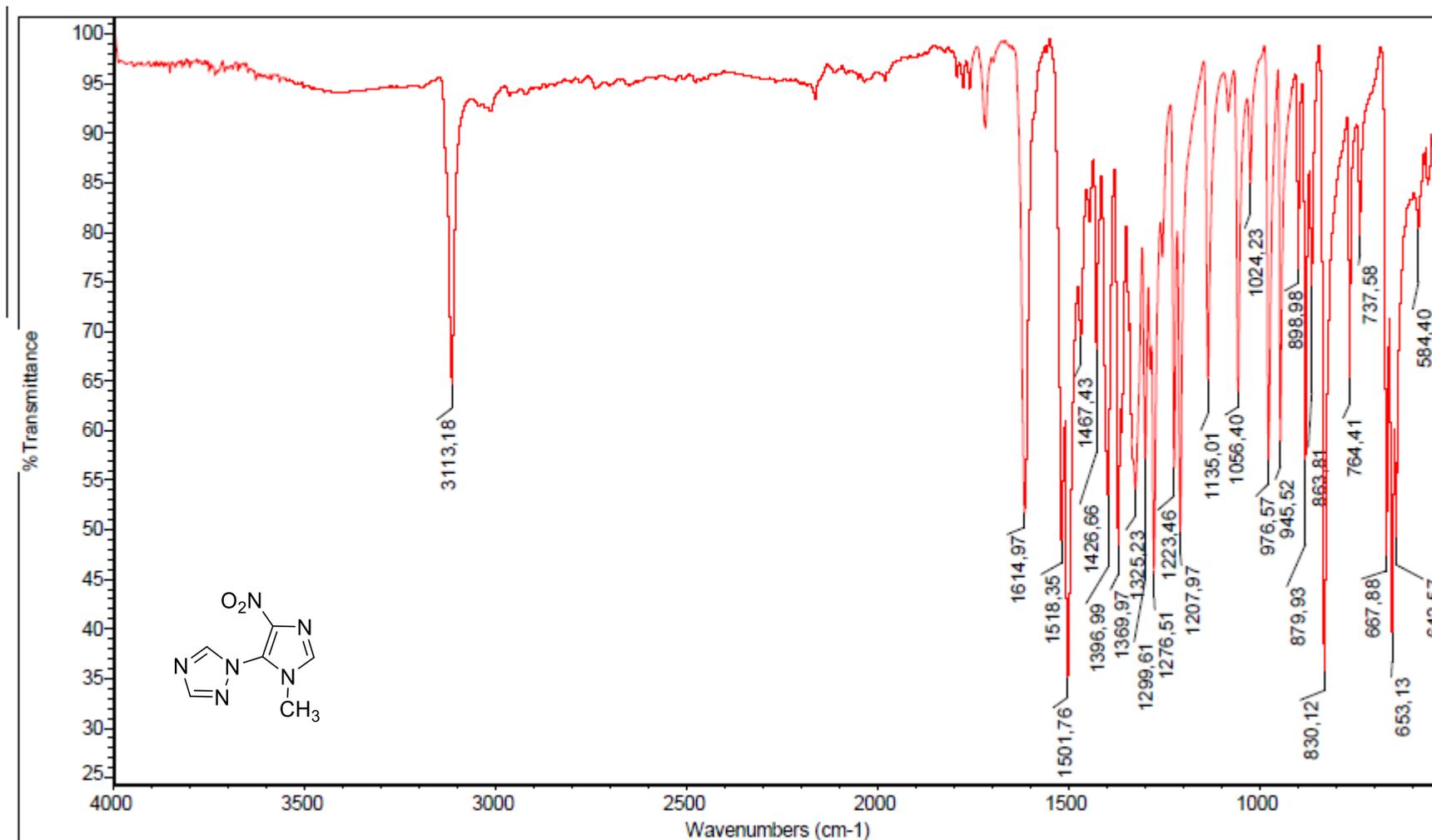


Figura 14: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto **40b** em ATR.

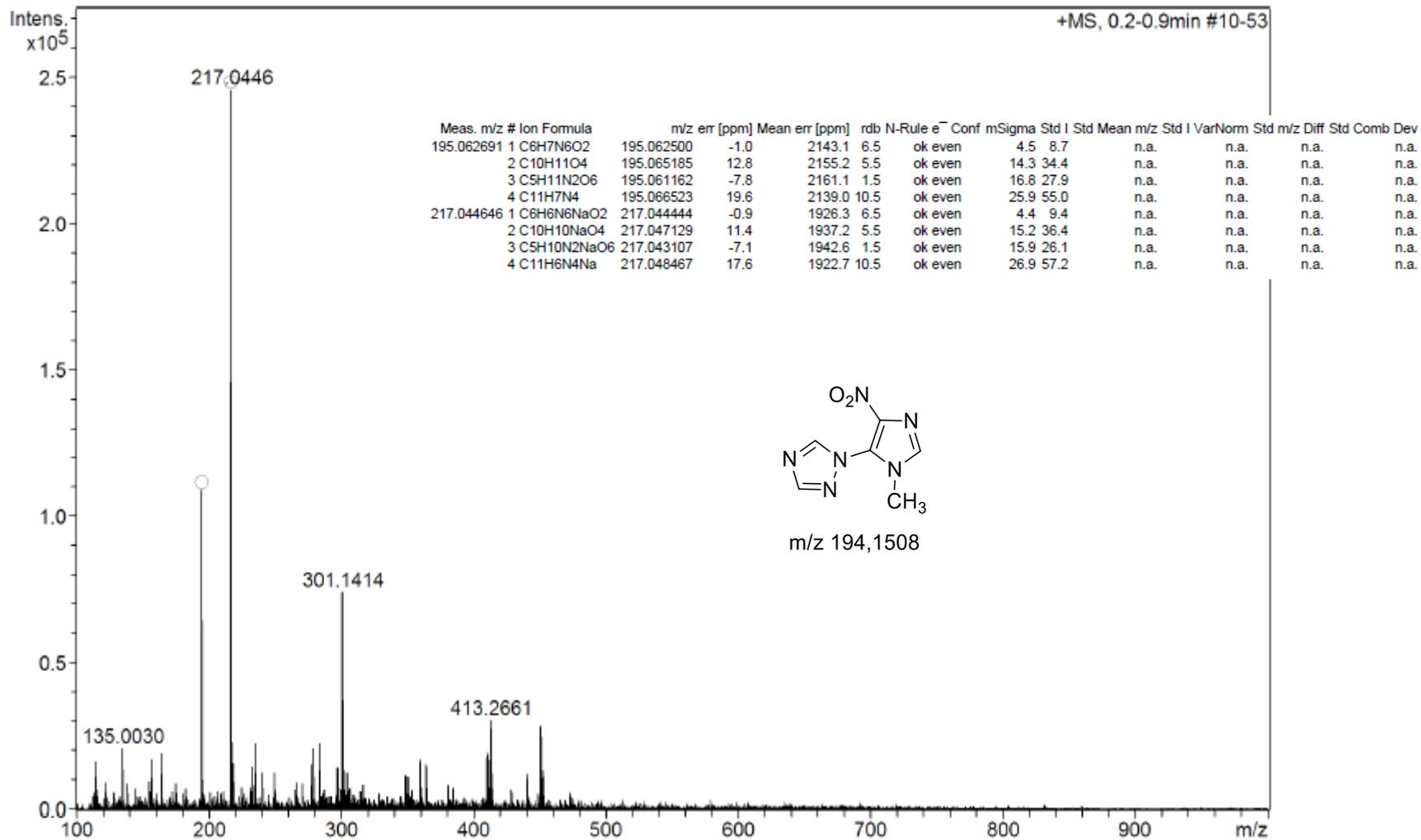


Figura 15: Espectro de Massa de alta resolução do composto **40b**.

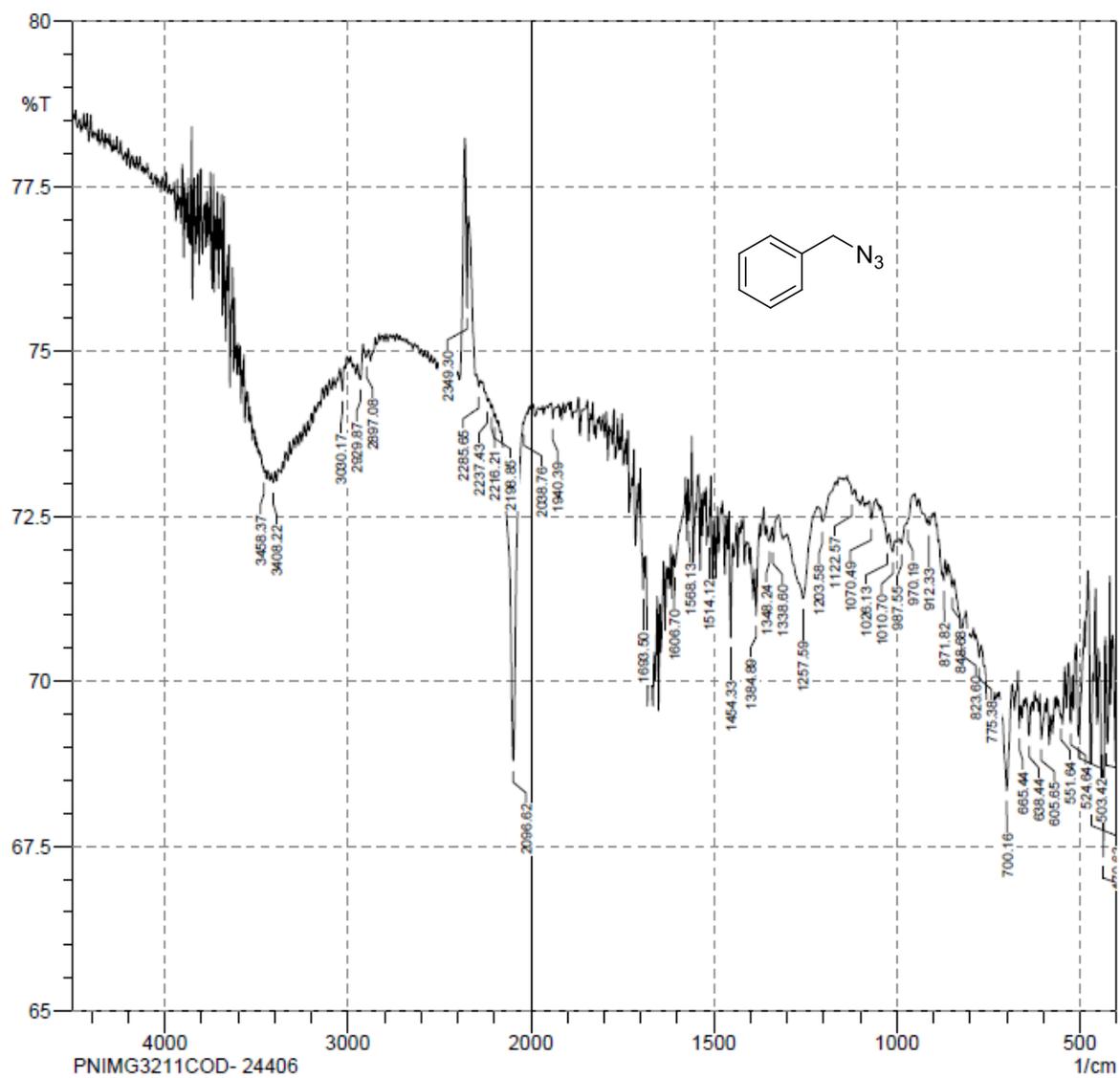


Figura 16: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto **44** em KBr.

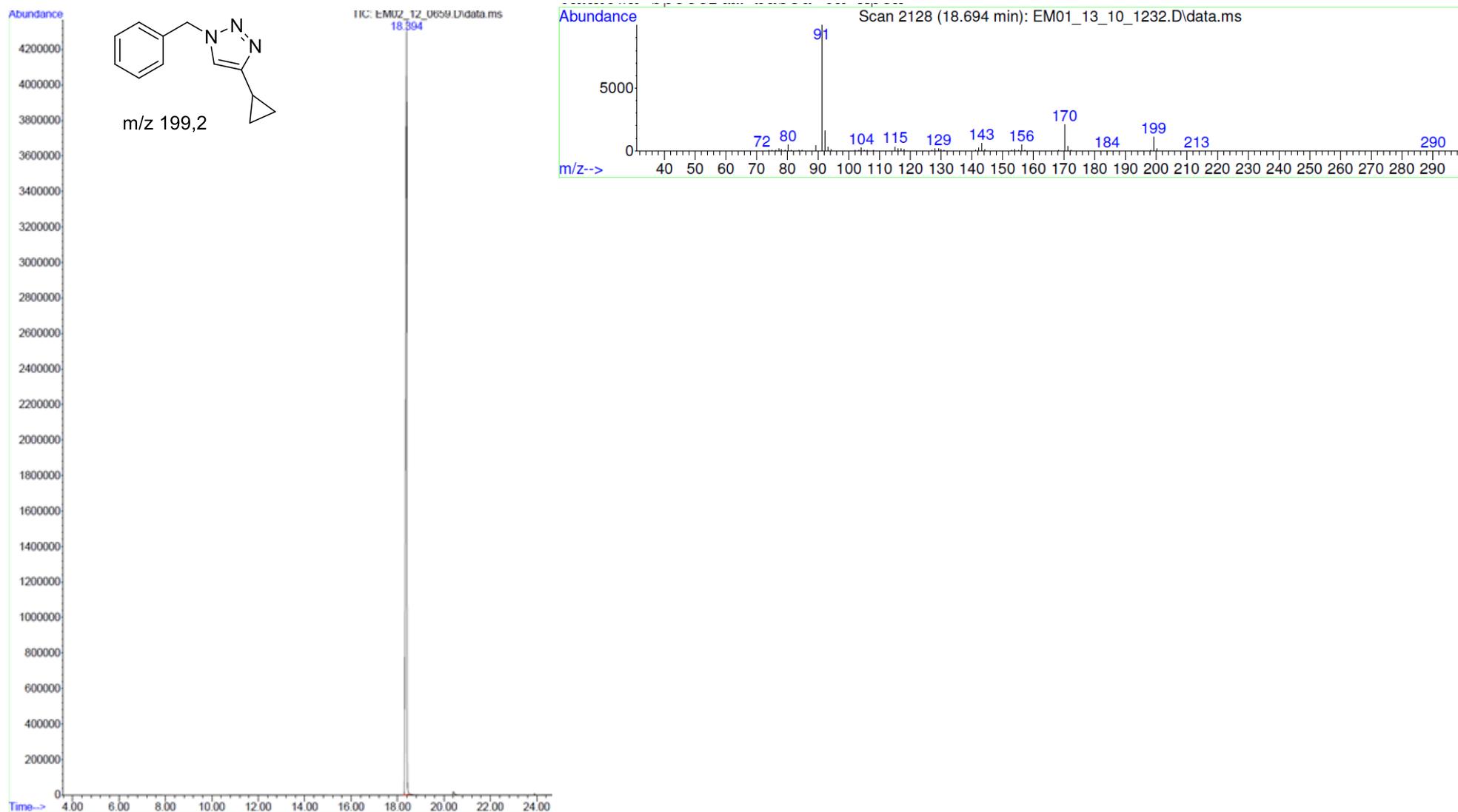


Figura 17: Espectro de Massa (EM) do Composto 45a em MeOH.

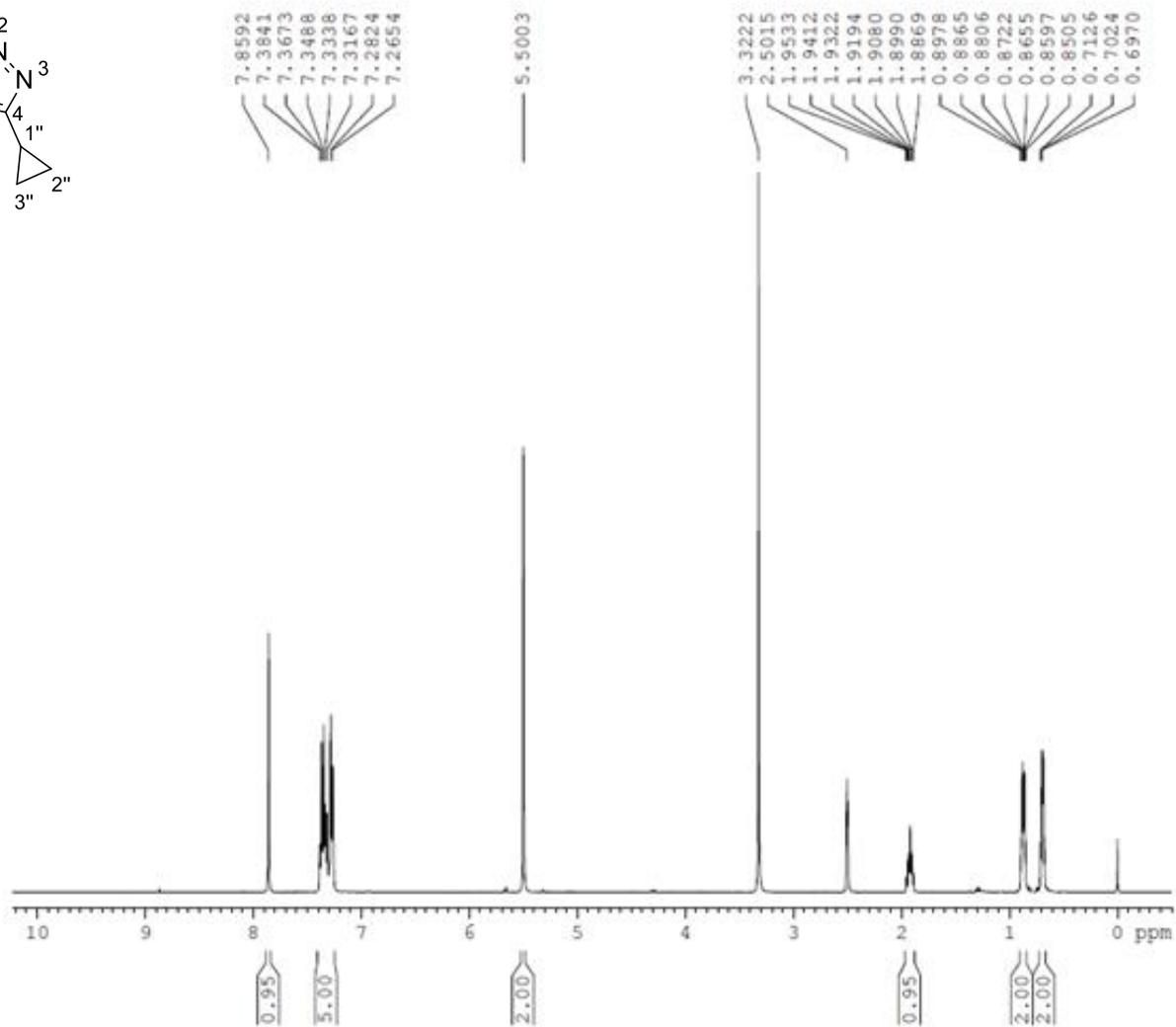
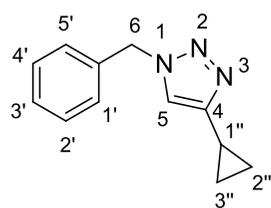


Figura 18: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **45a**.

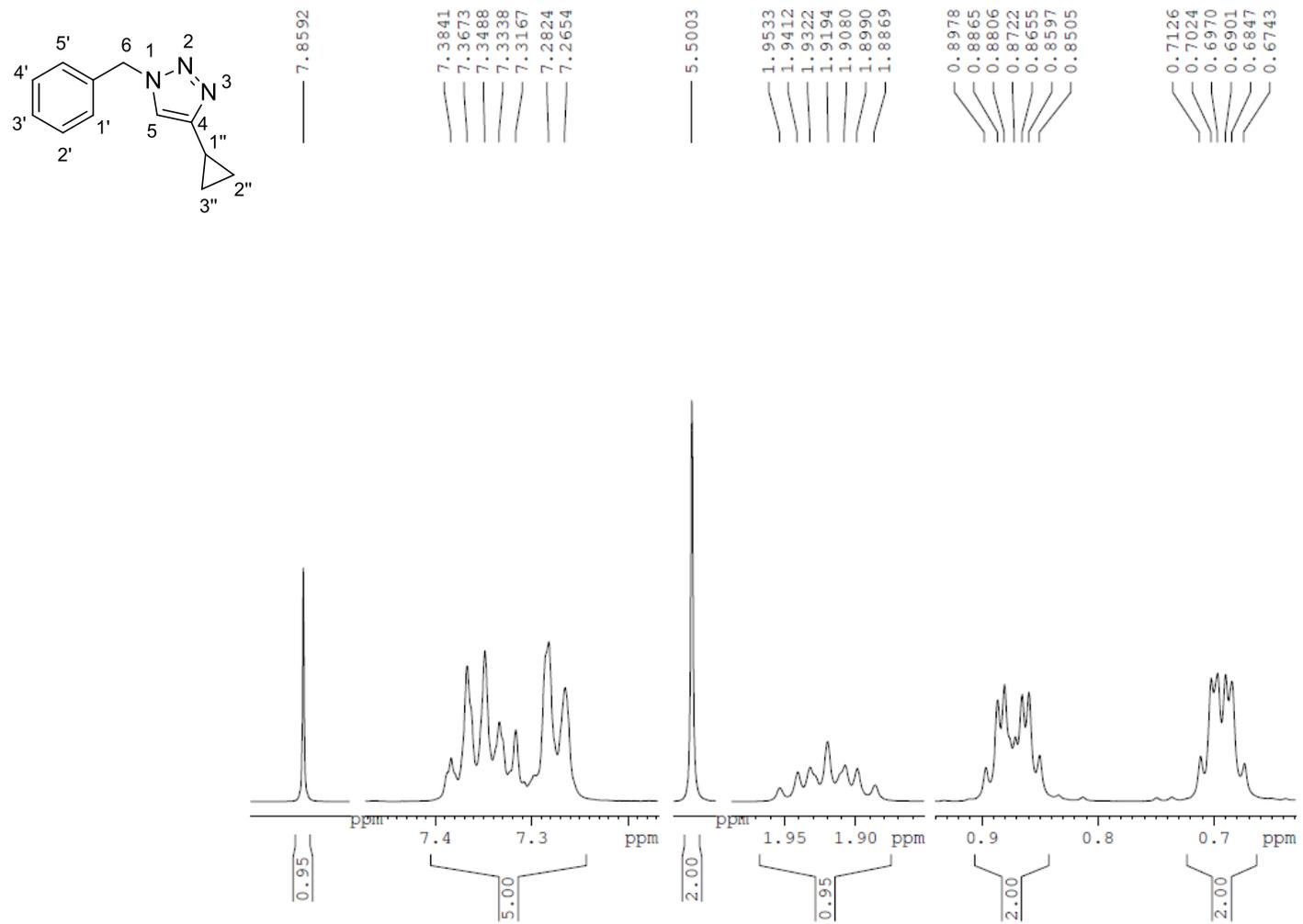


Figura 19: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **45a**.



Figura 20: Espectro de Massa (EM) do Composto **45b** em MeOH.

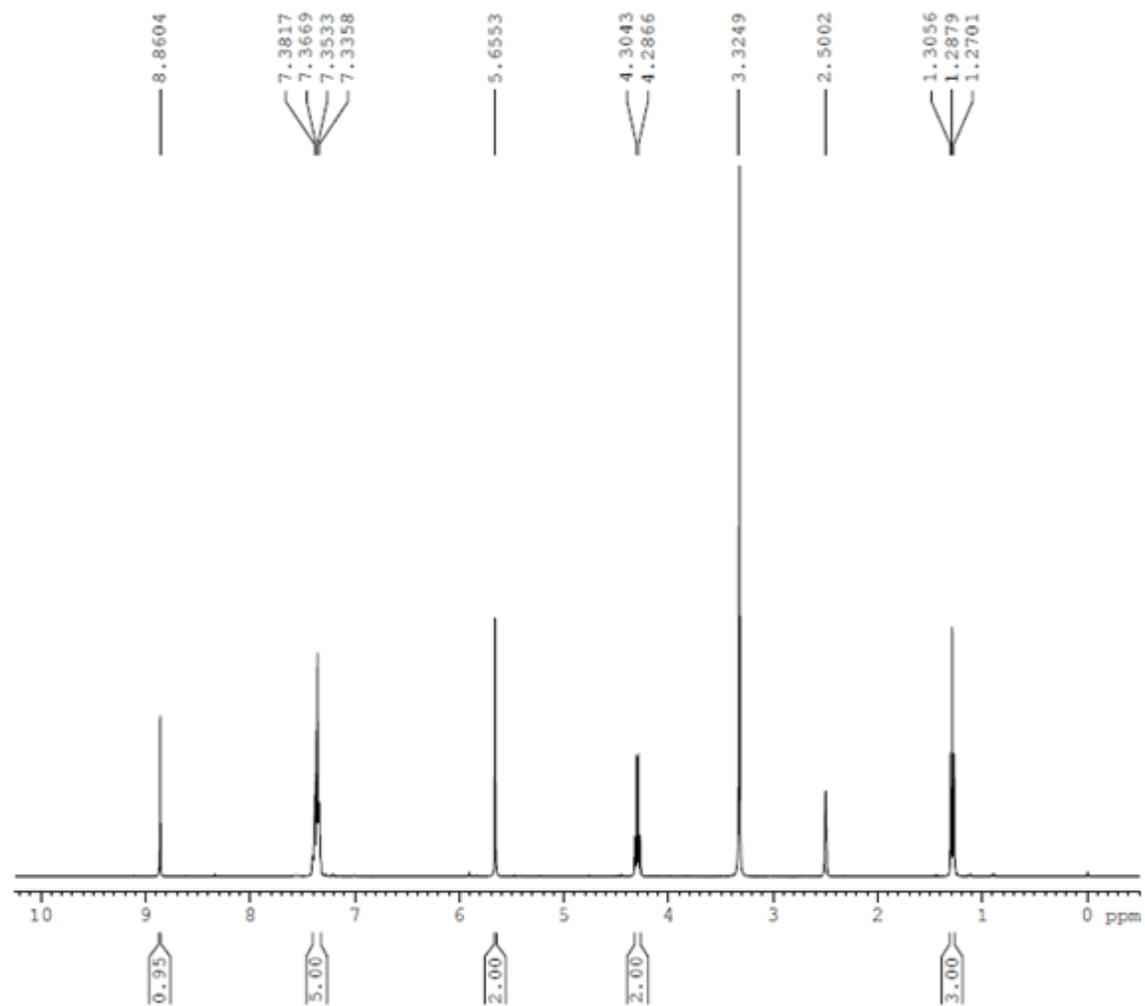
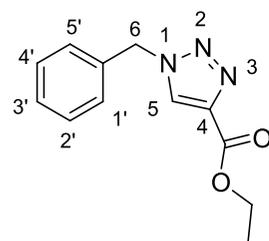


Figura 21: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de **45b**.

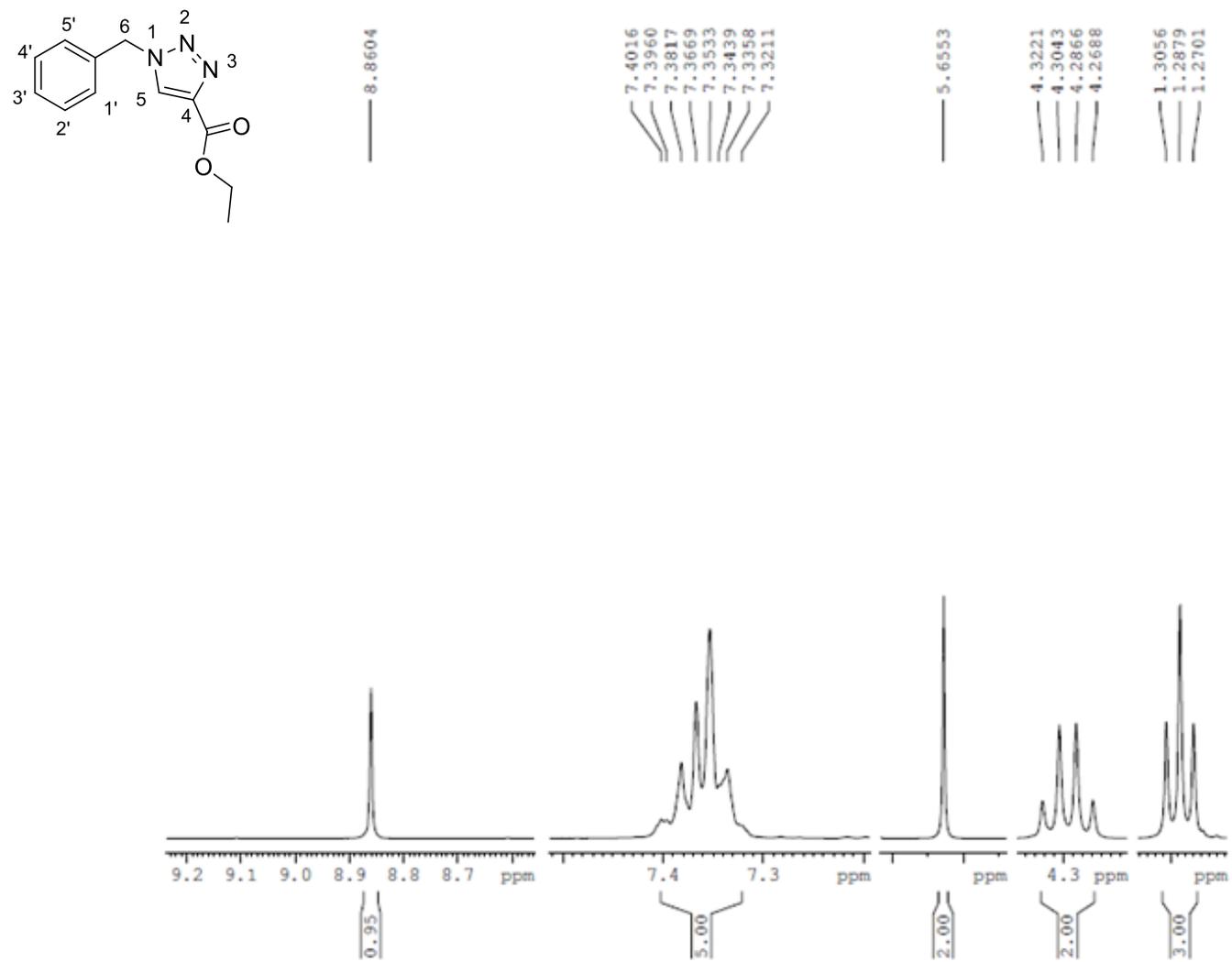


Figura 22: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **45b**.

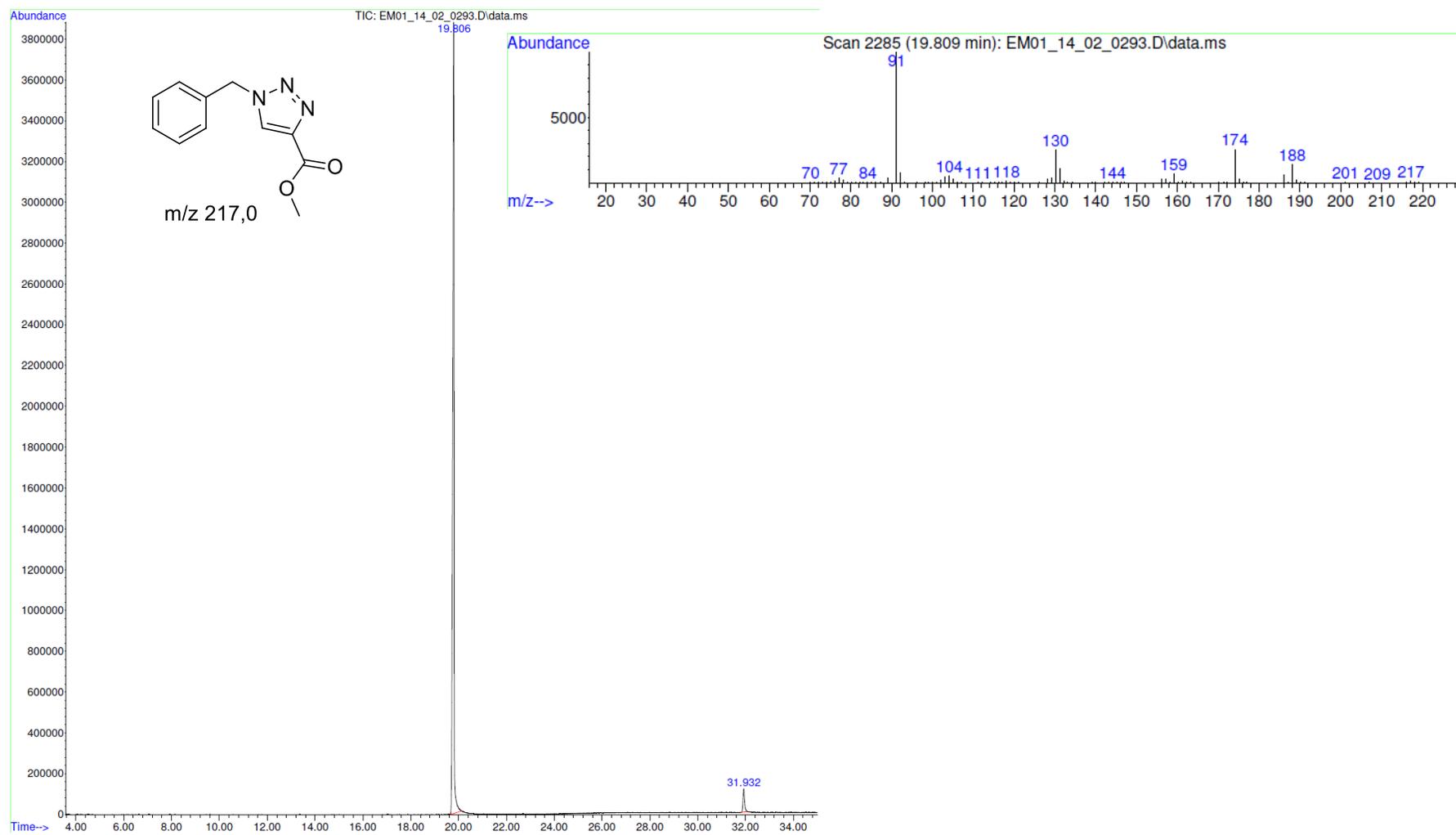


Figura 23: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **46b**.

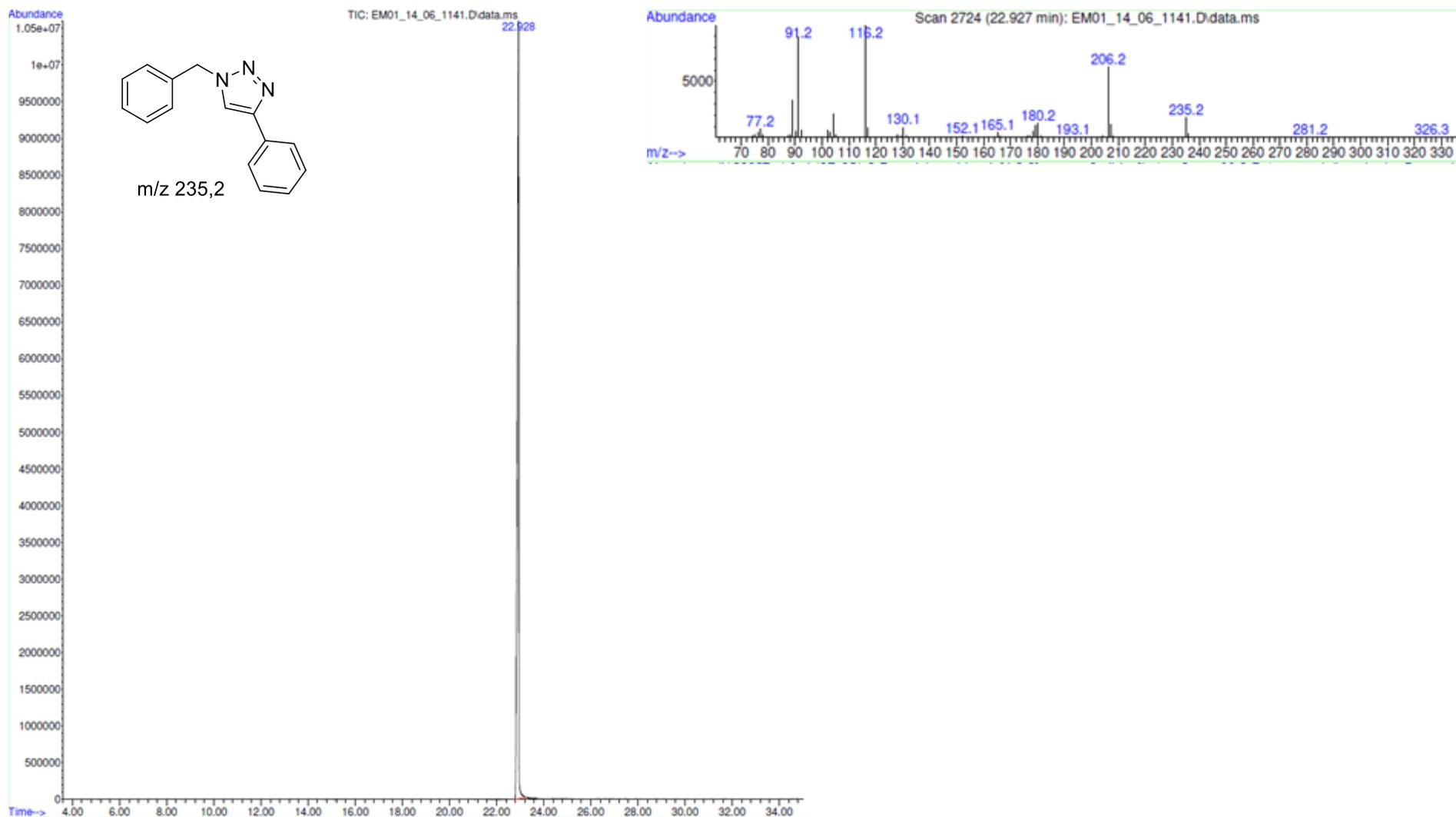


Figura 24: Espectro de Massa (EM) do Composto 45f em MeOH.

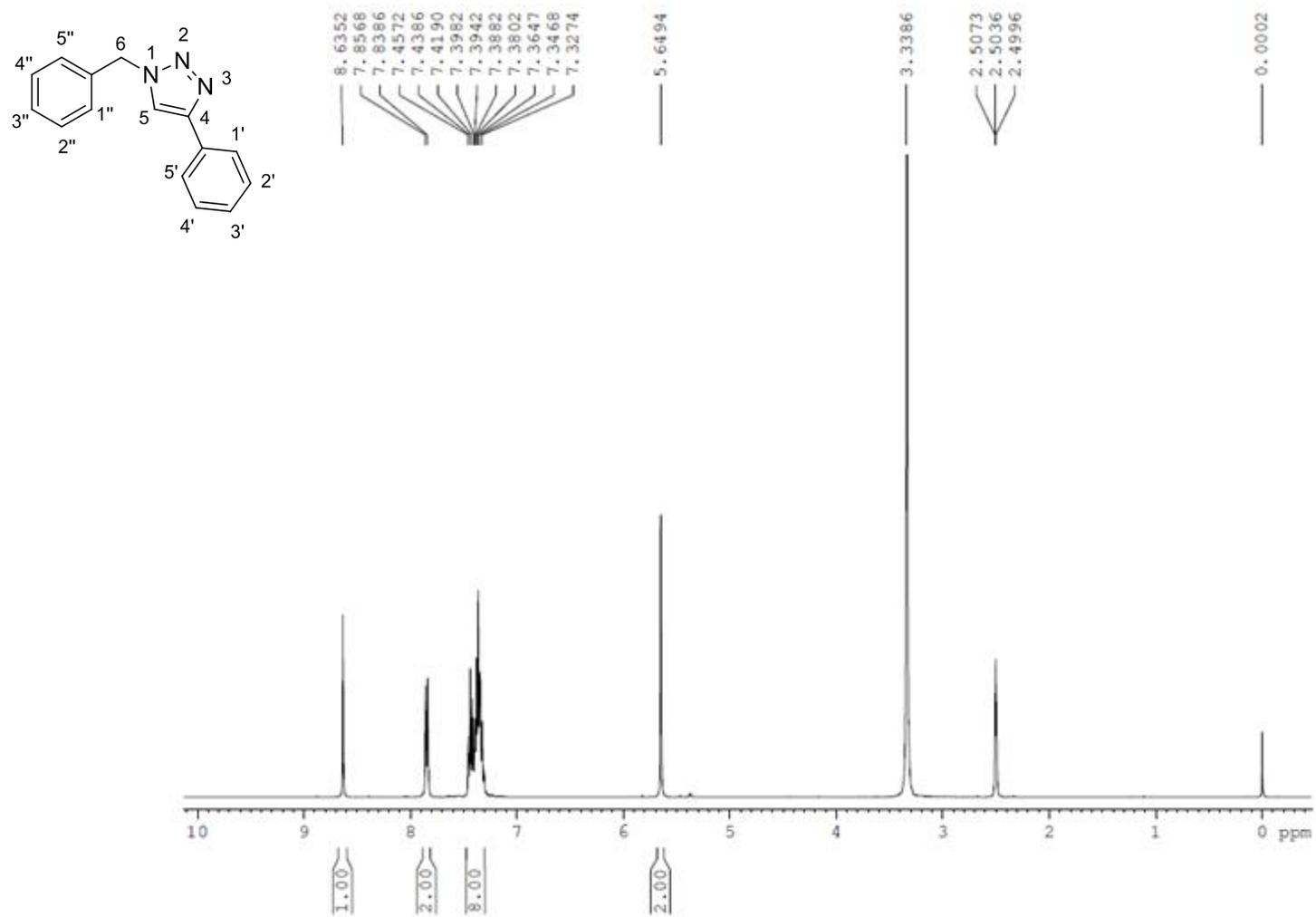


Figura 25: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) em DMSO₆ de **45f**.

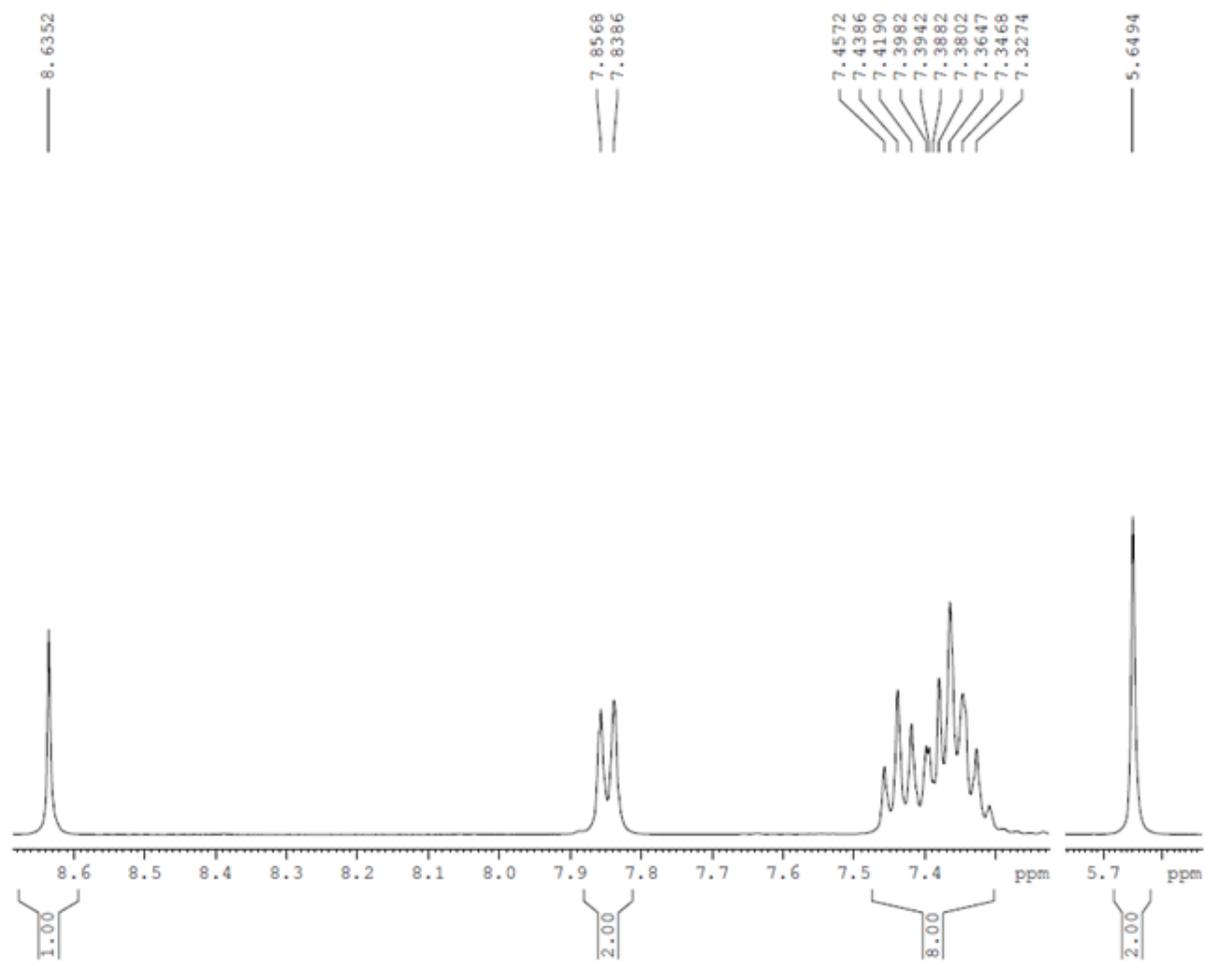
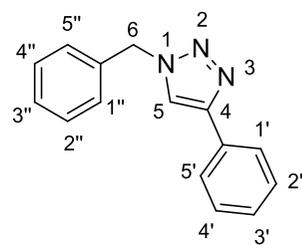


Figura 26: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **45f**.

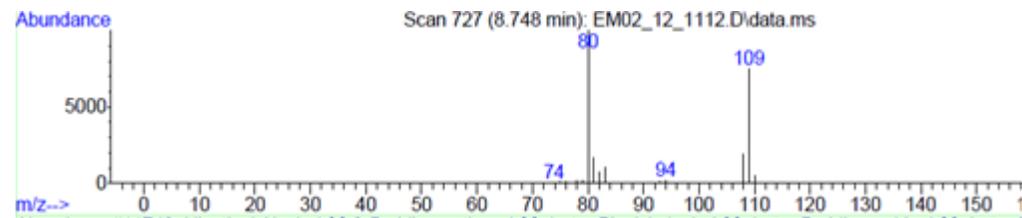
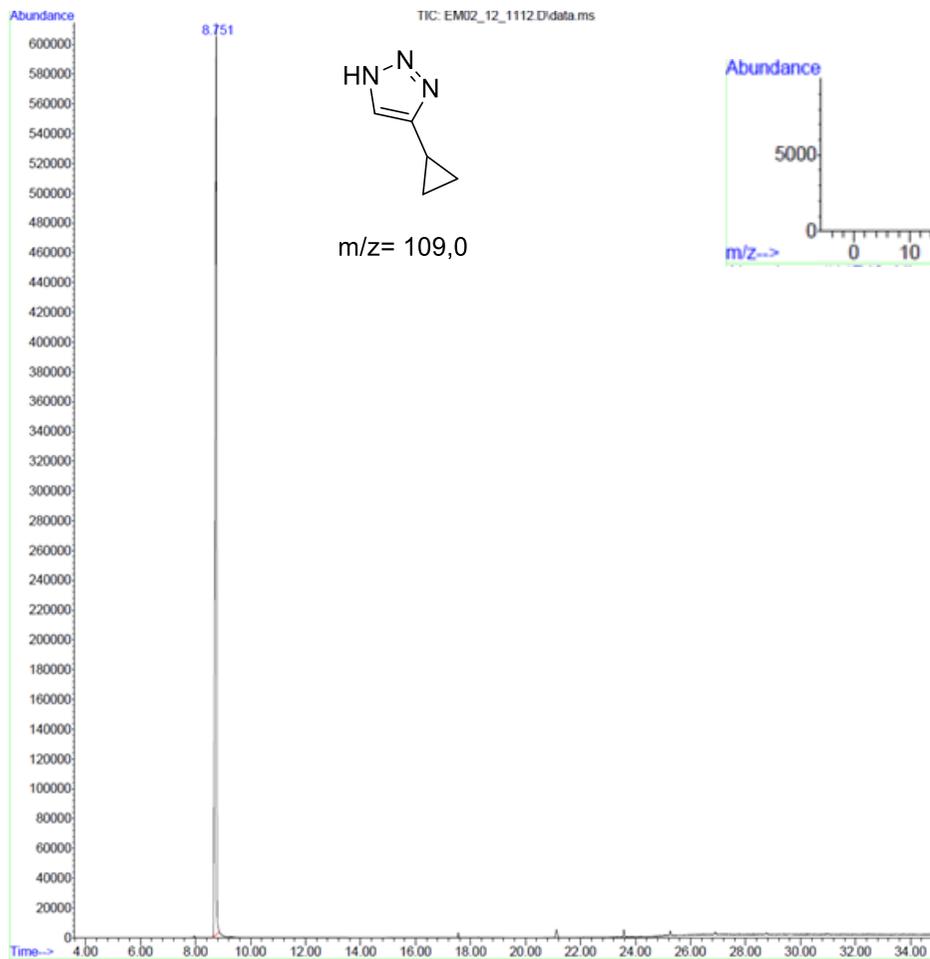


Figura 27: Espectro de Massa (EM) do Composto **46a** em MeOH.

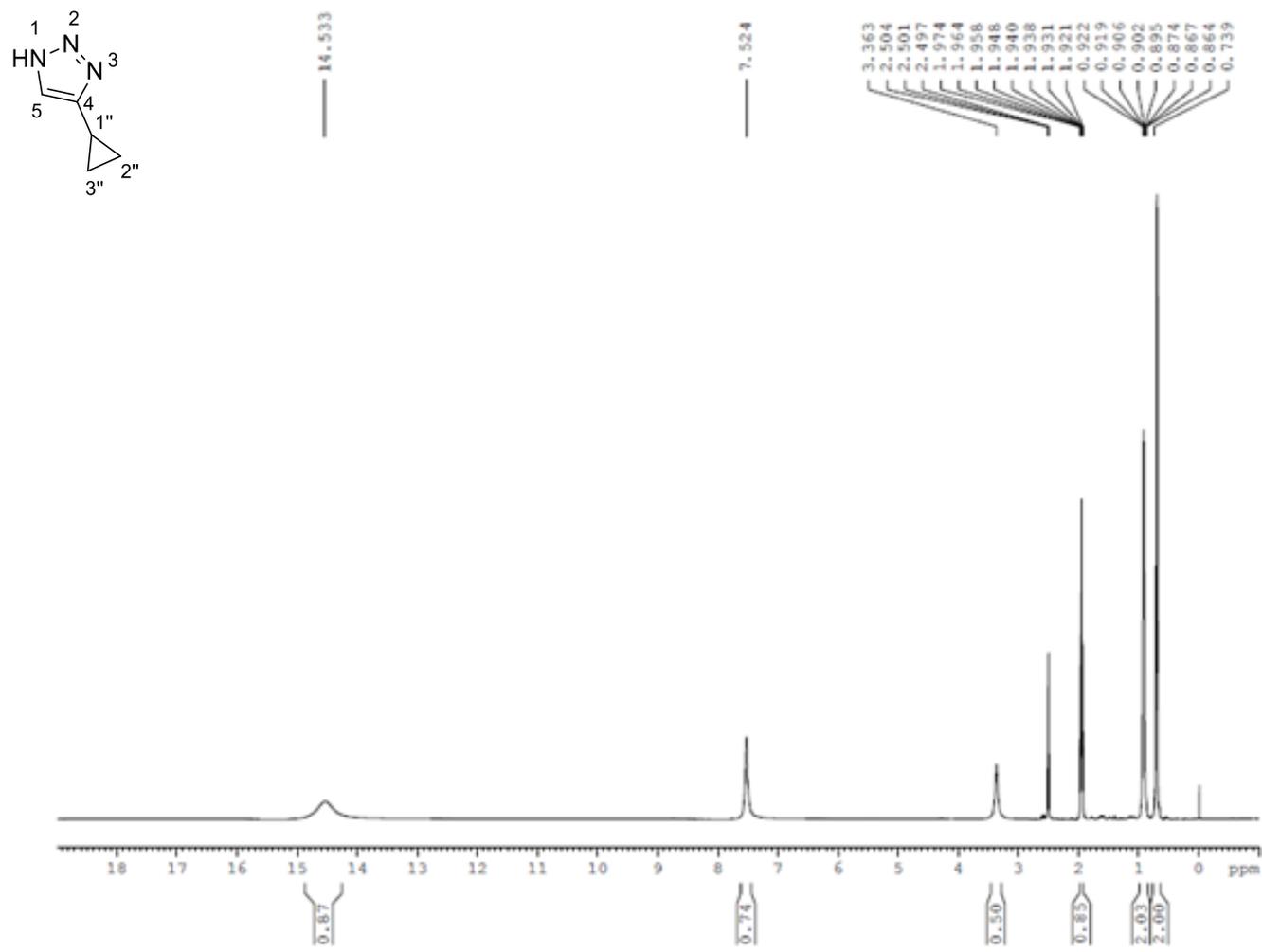


Figura 28: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) em DMSO₆ de **46a**.

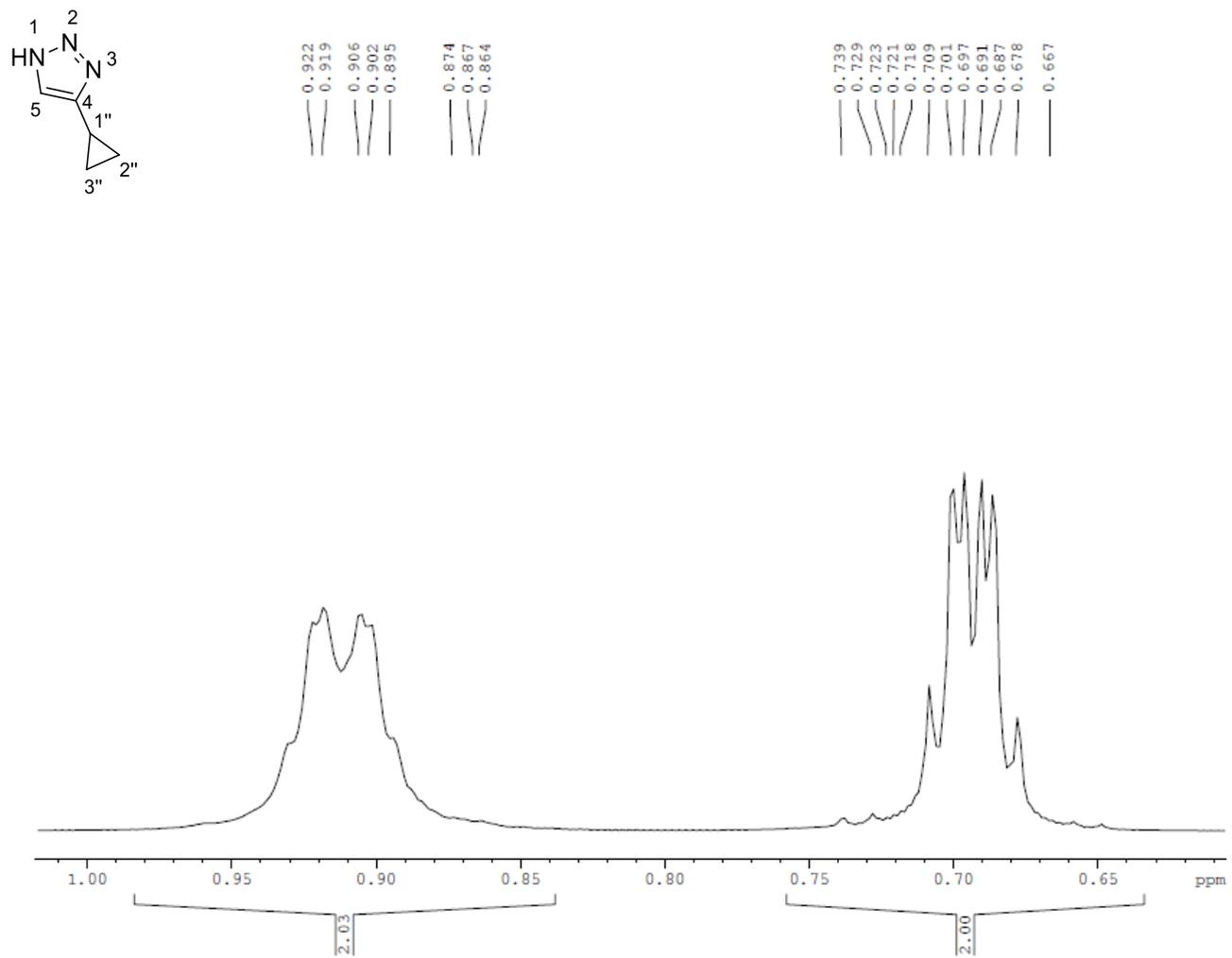


Figura 29: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **46a**.

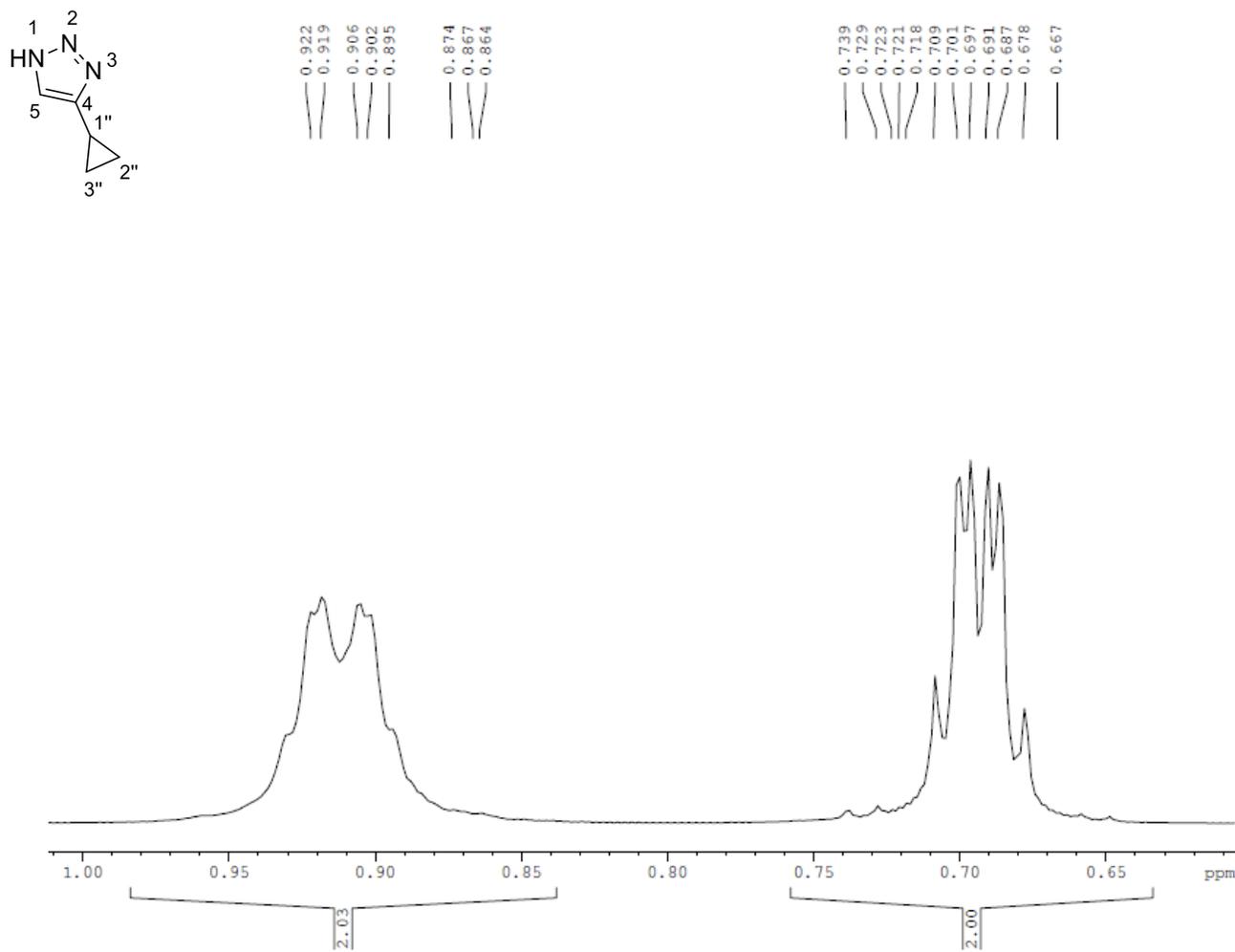


Figura 30: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de **46a**.

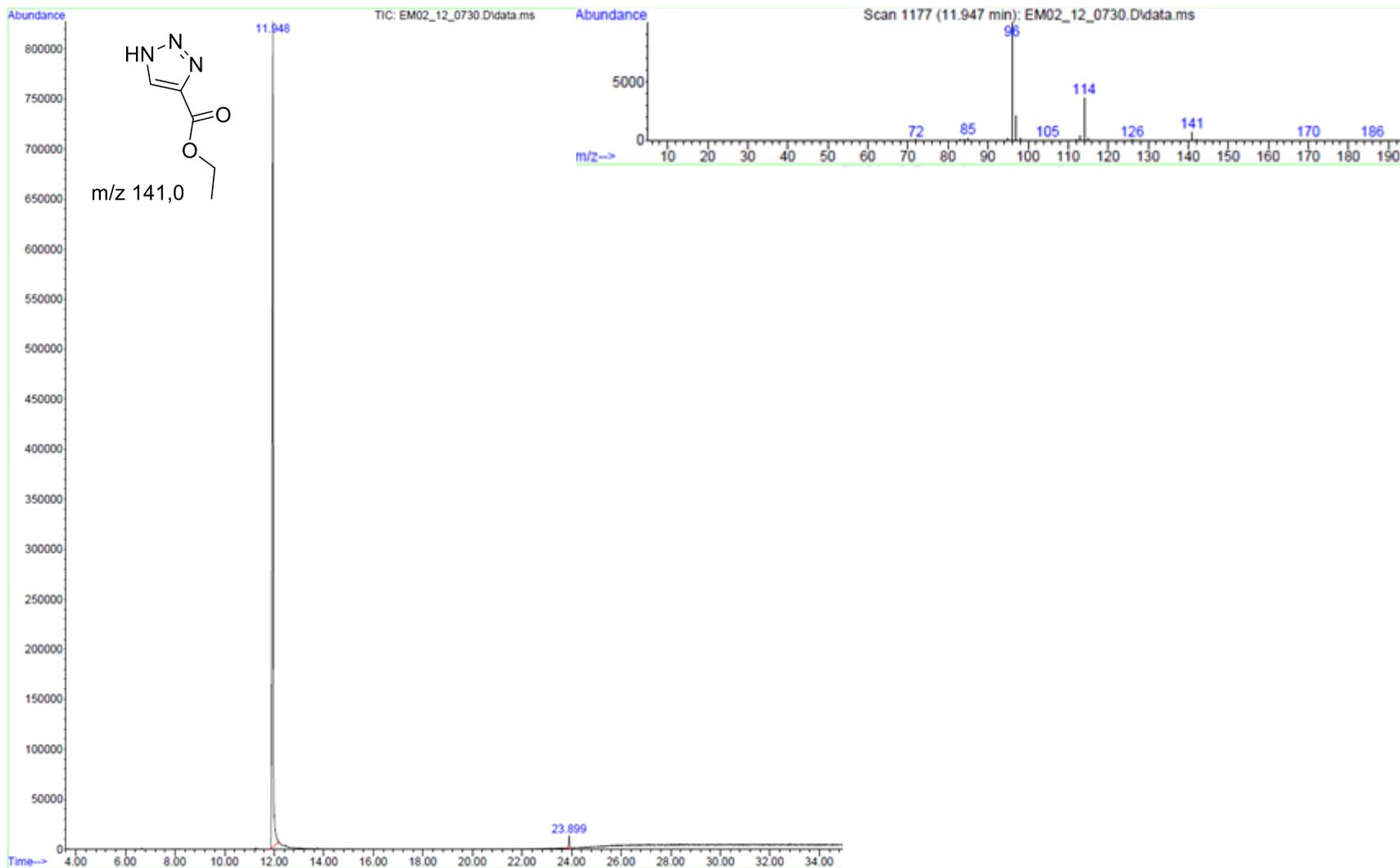


Figura 31: Espectro de Massa (EM) do Composto **46b** em MeOH.

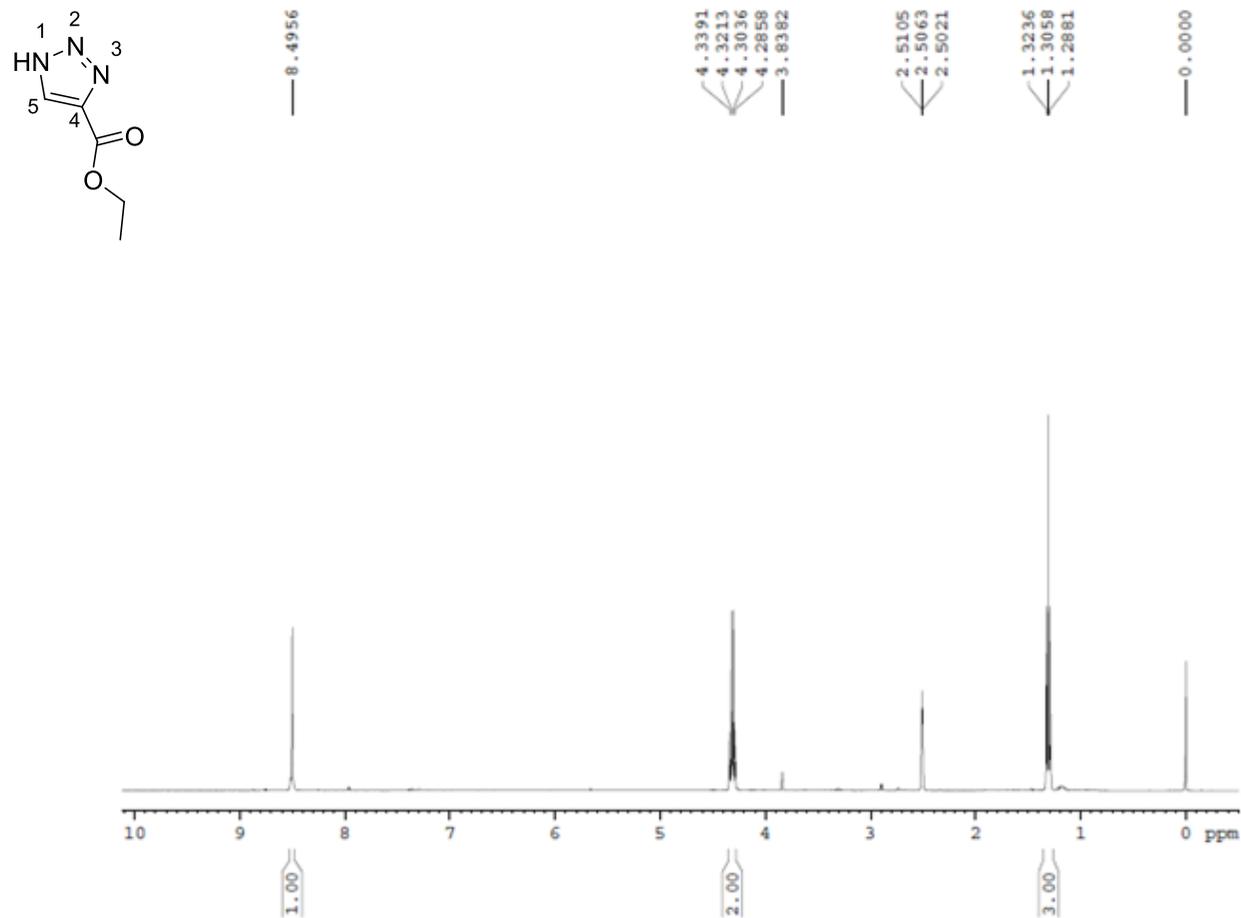


Figura 32: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **46b**.

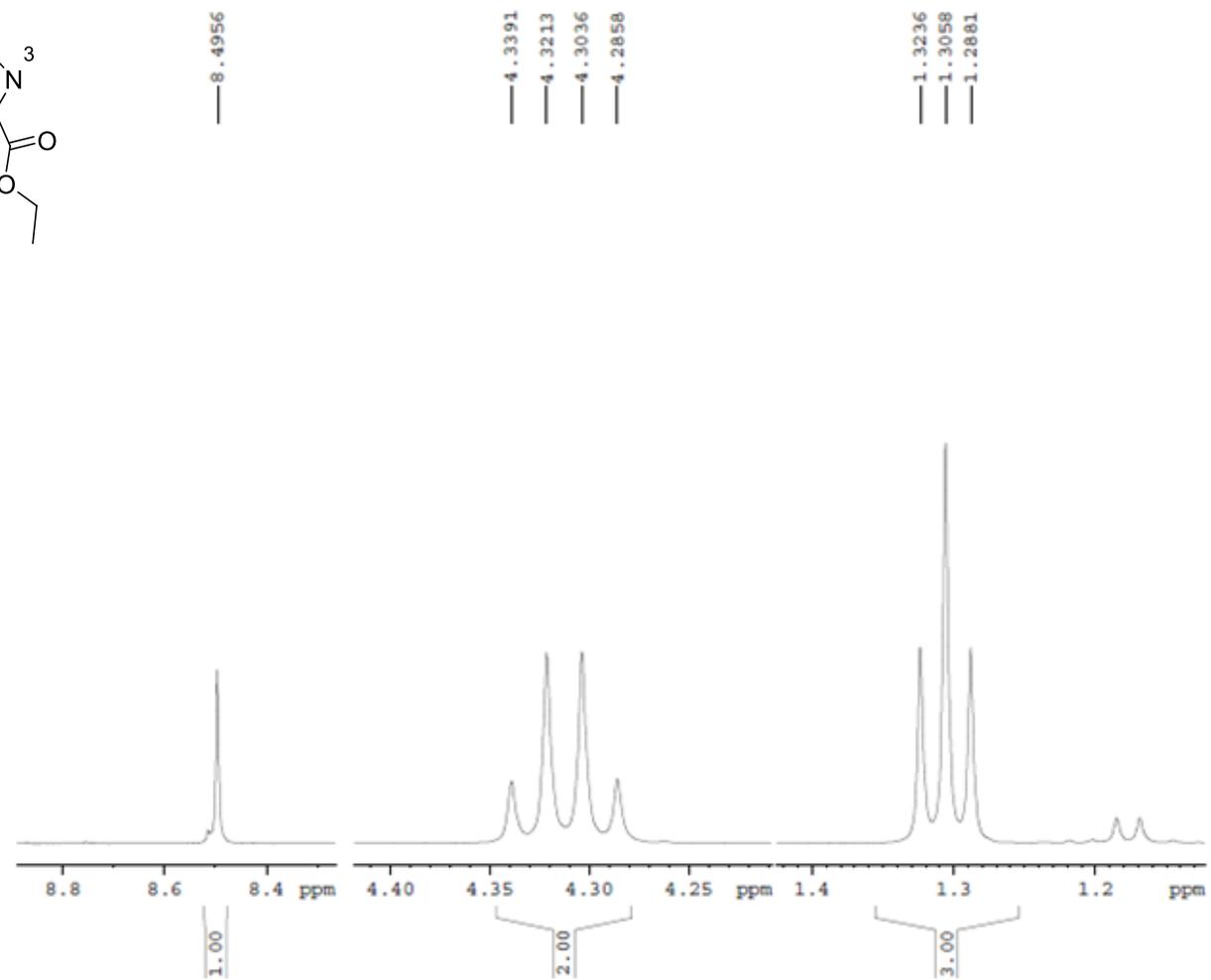
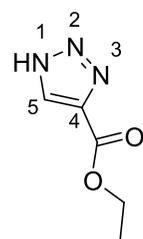


Figura 33: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de **46b**.

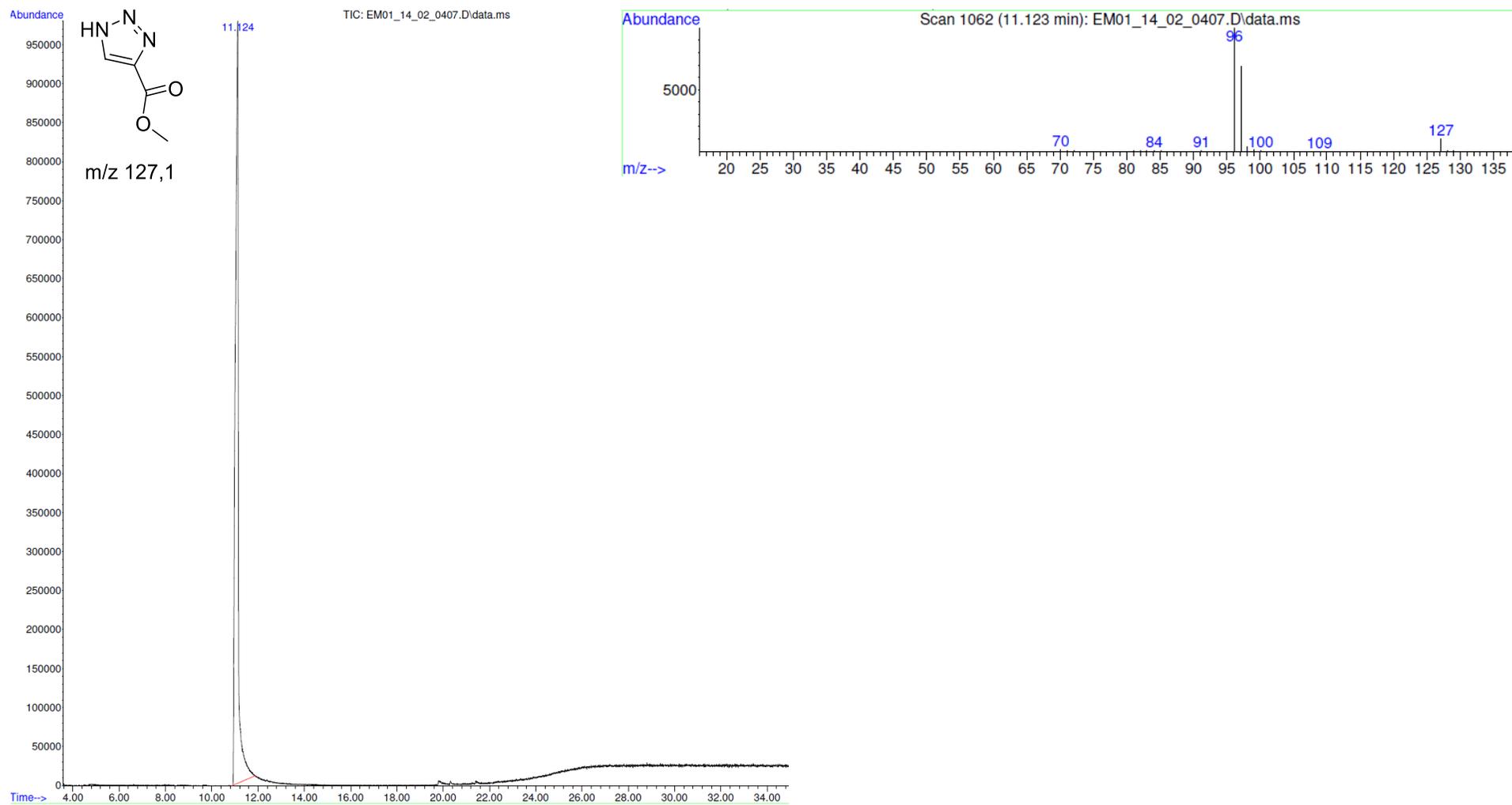


Figura 34: Espectro de Massa (EM) do Composto **46c** em MeOH.

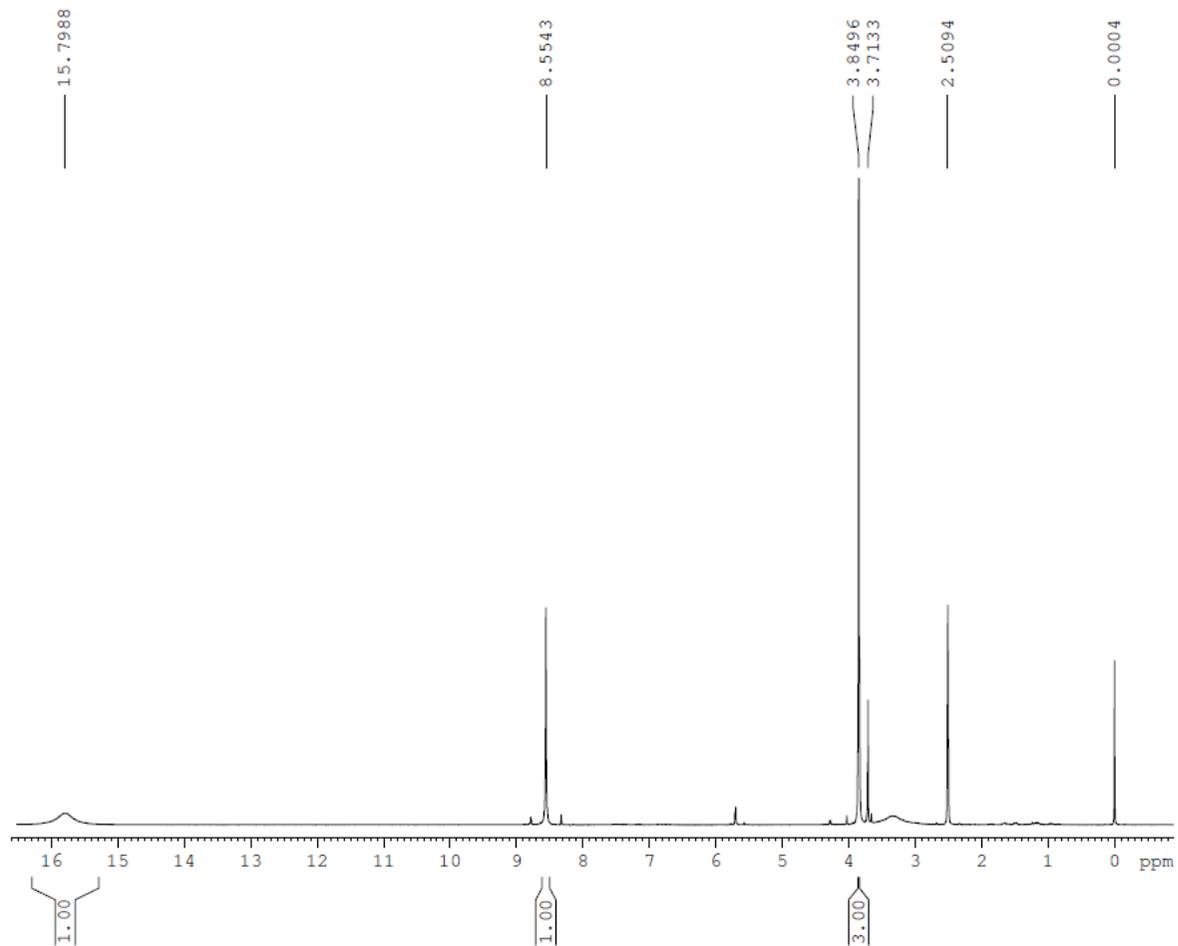
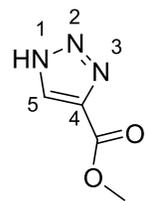


Figura 35: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de **46c**.

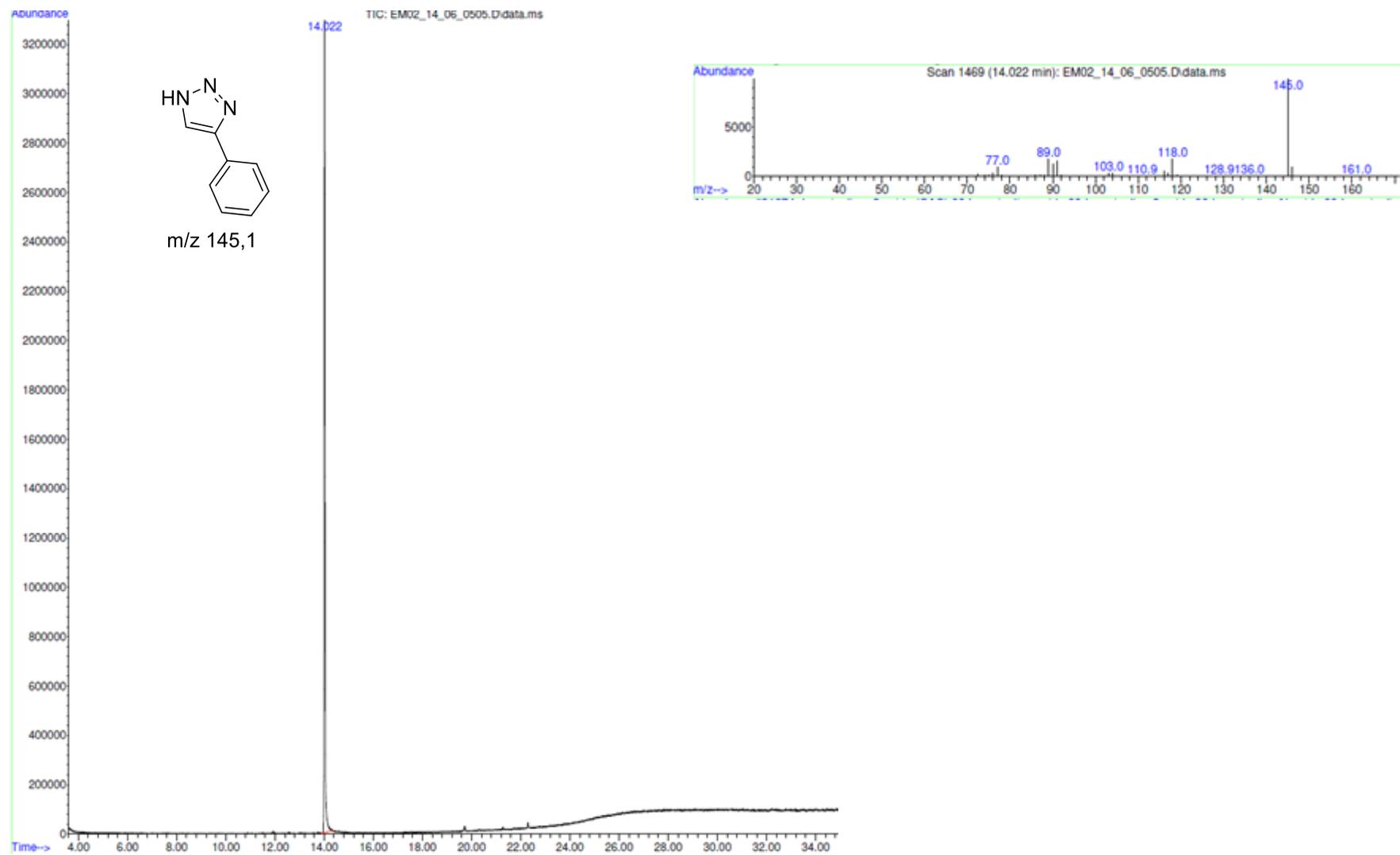


Figura 36: Espectro de Massa (EM) do Composto **46f** em MeOH.

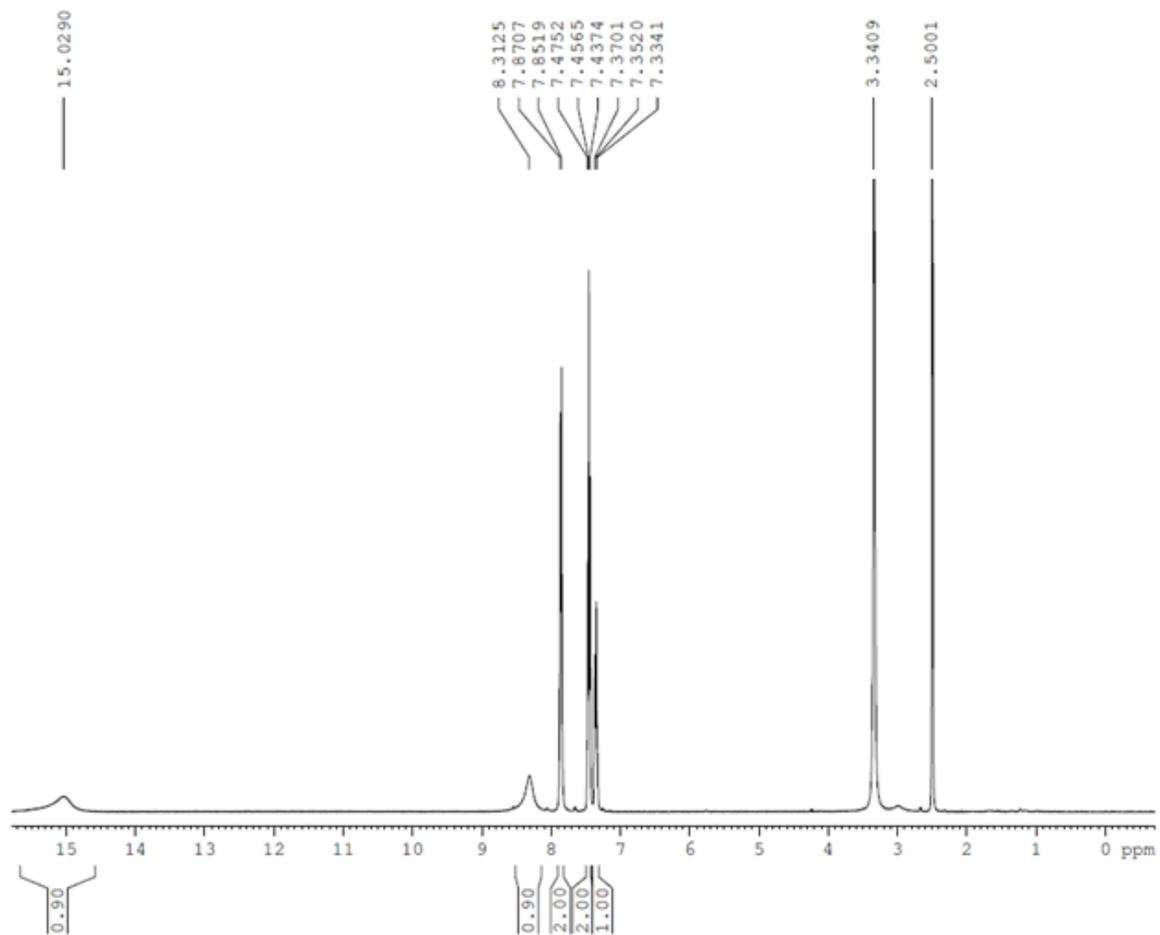
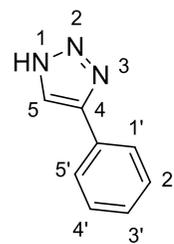


Figura 37: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de **46f**.

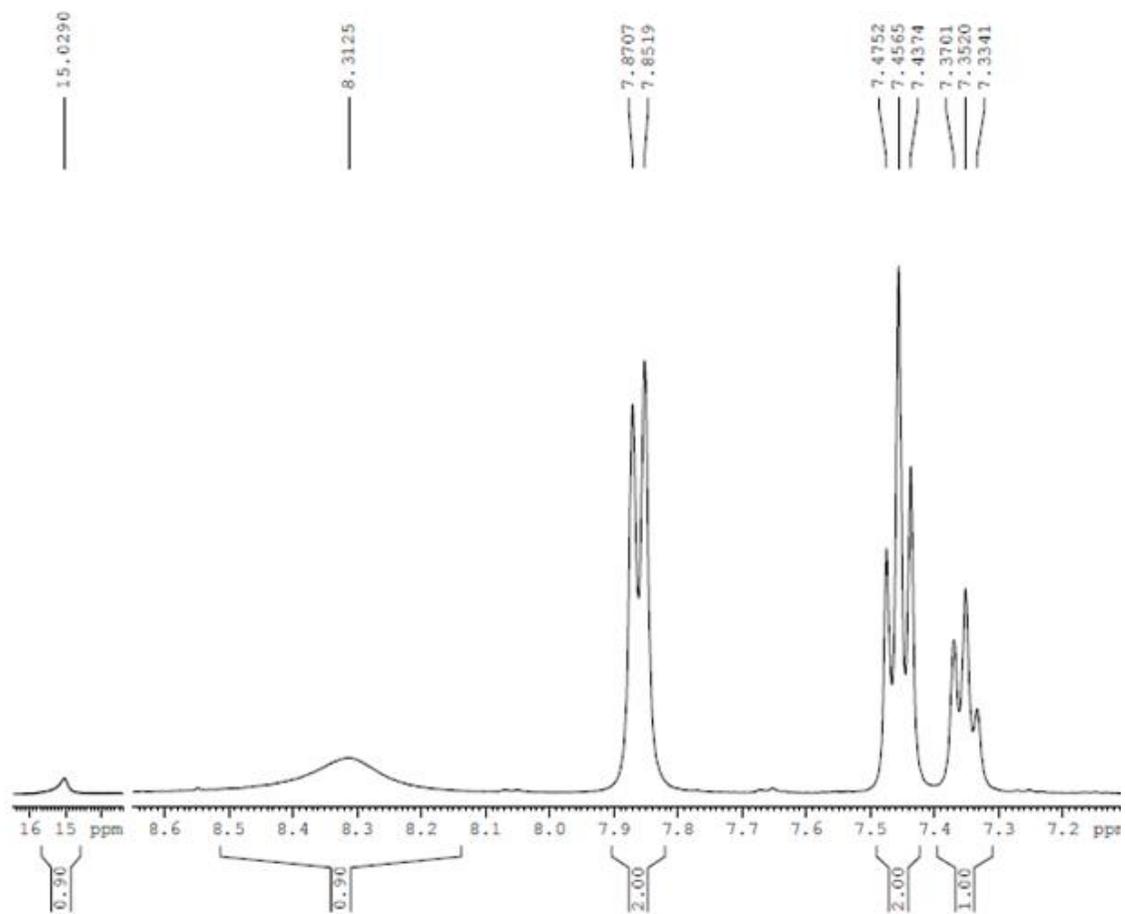
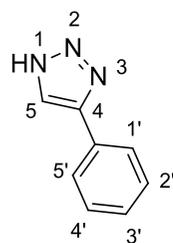


Figura 38: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de **46f**.

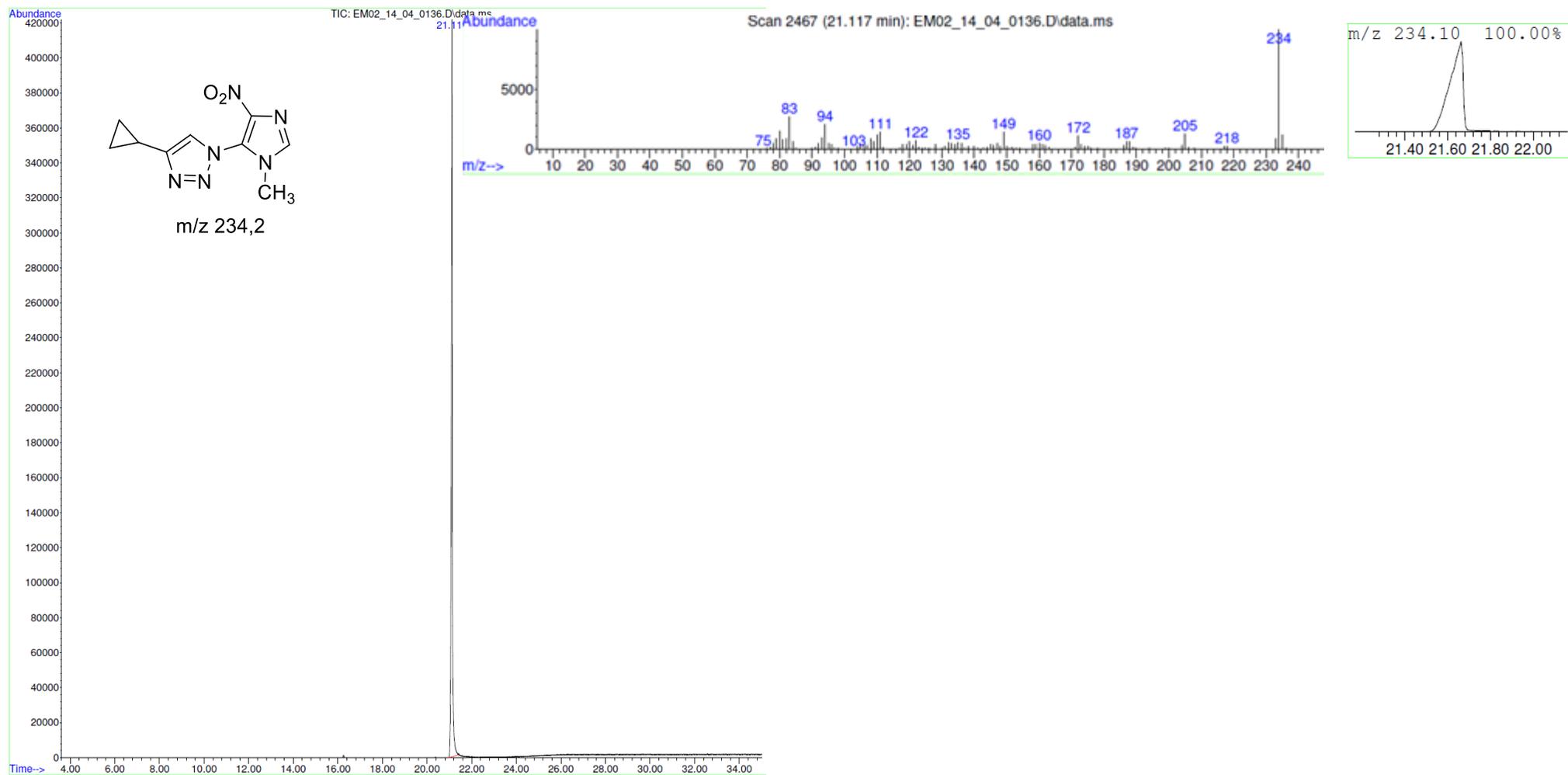


Figura 39: Espectro de Massa (EM) do Composto 41a em MeOH.

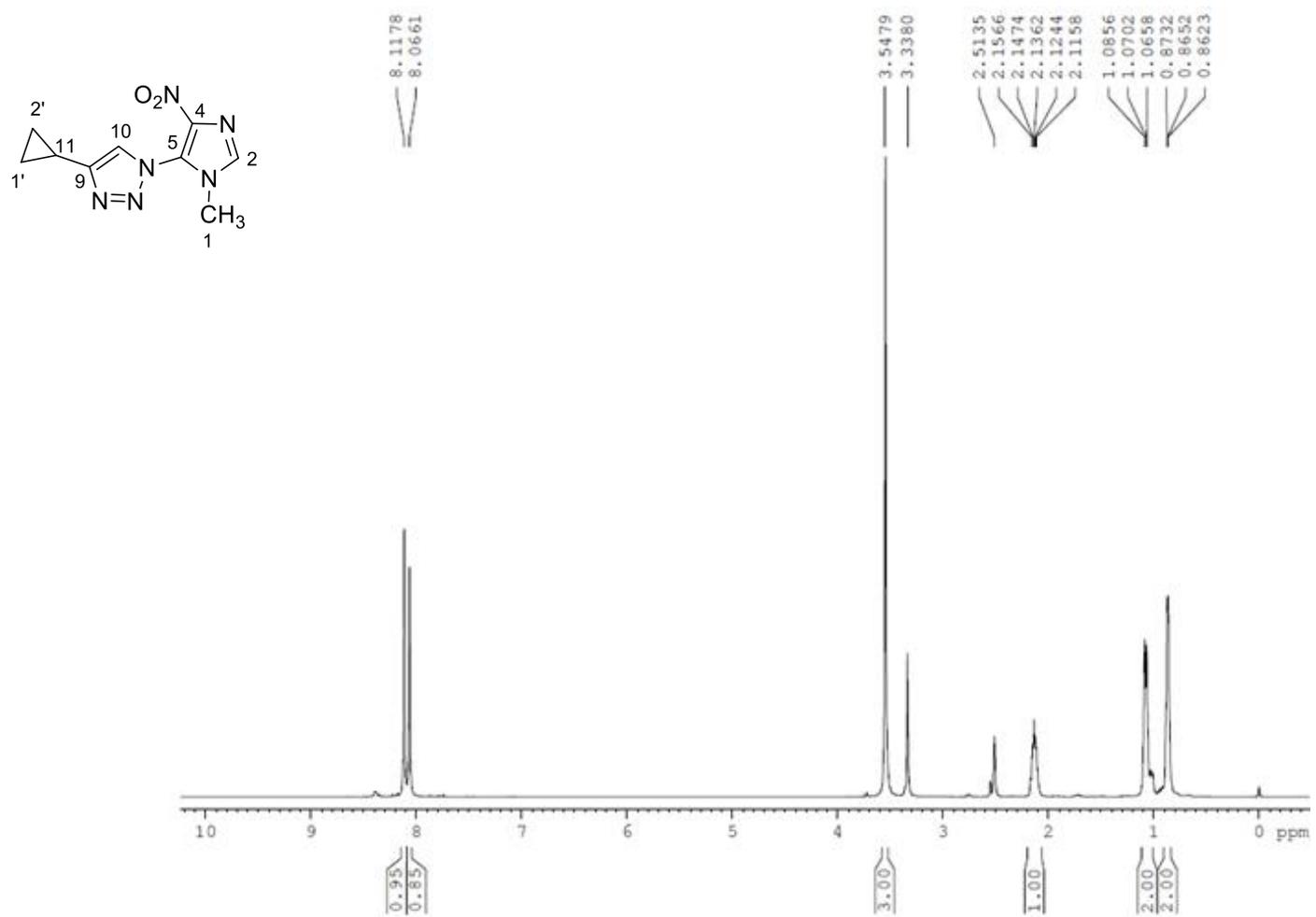


Figura 40: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) em DMSO₆ de **41a**.

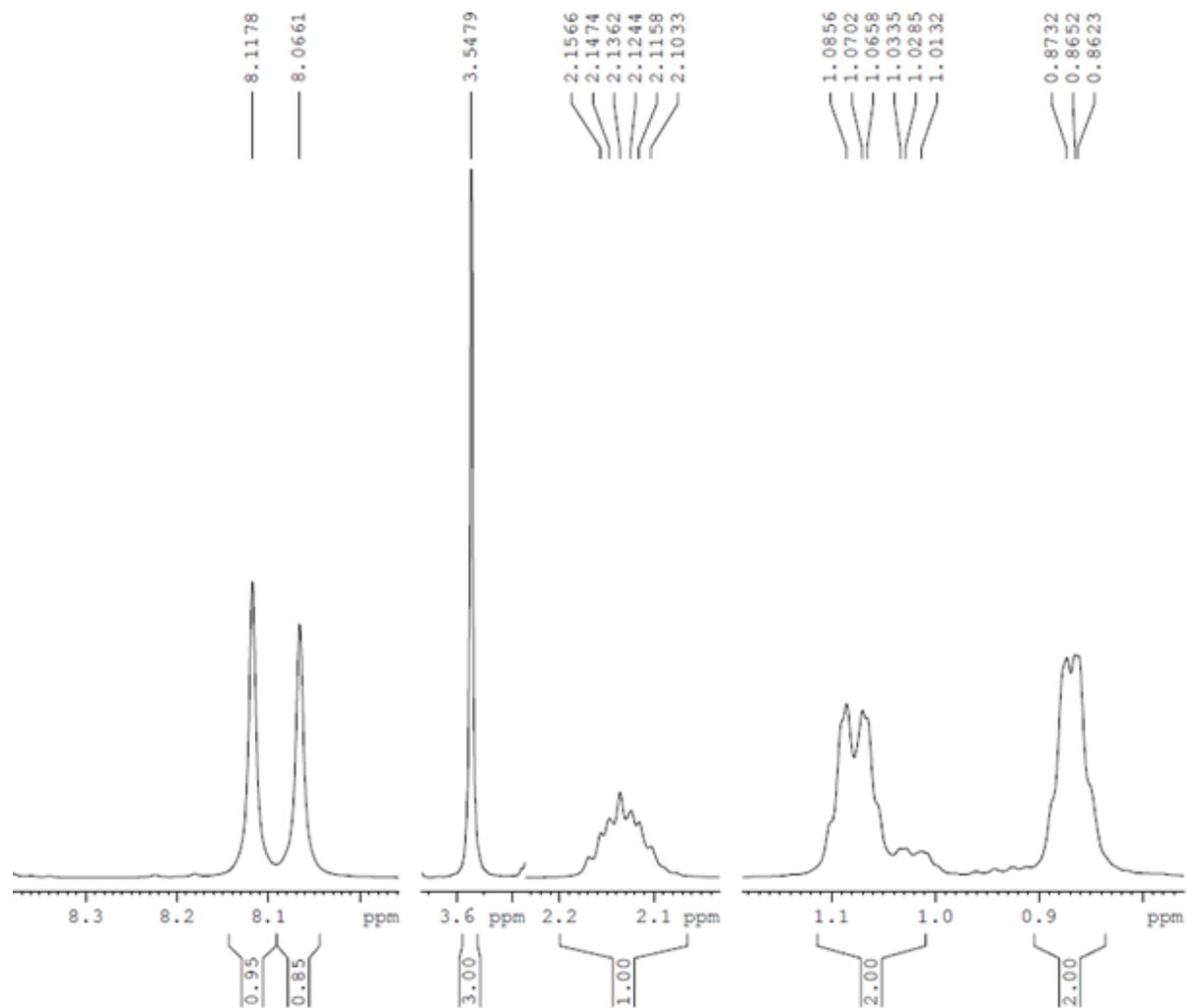
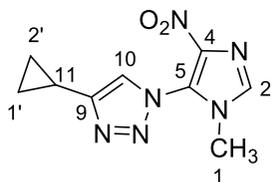


Figura 41: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de **41a**.

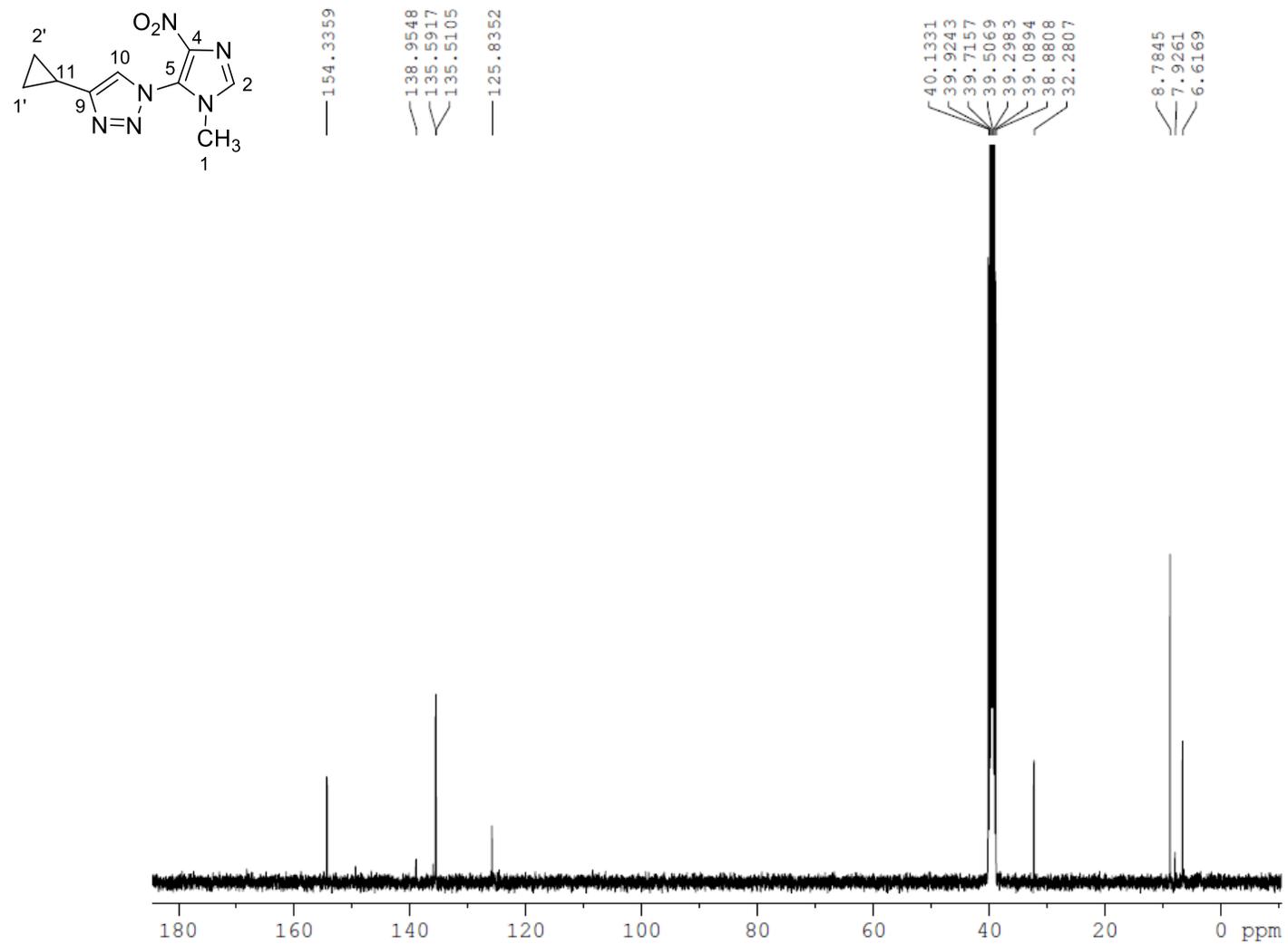


Figura 42: Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz) em DMSO₆ de **40a**.

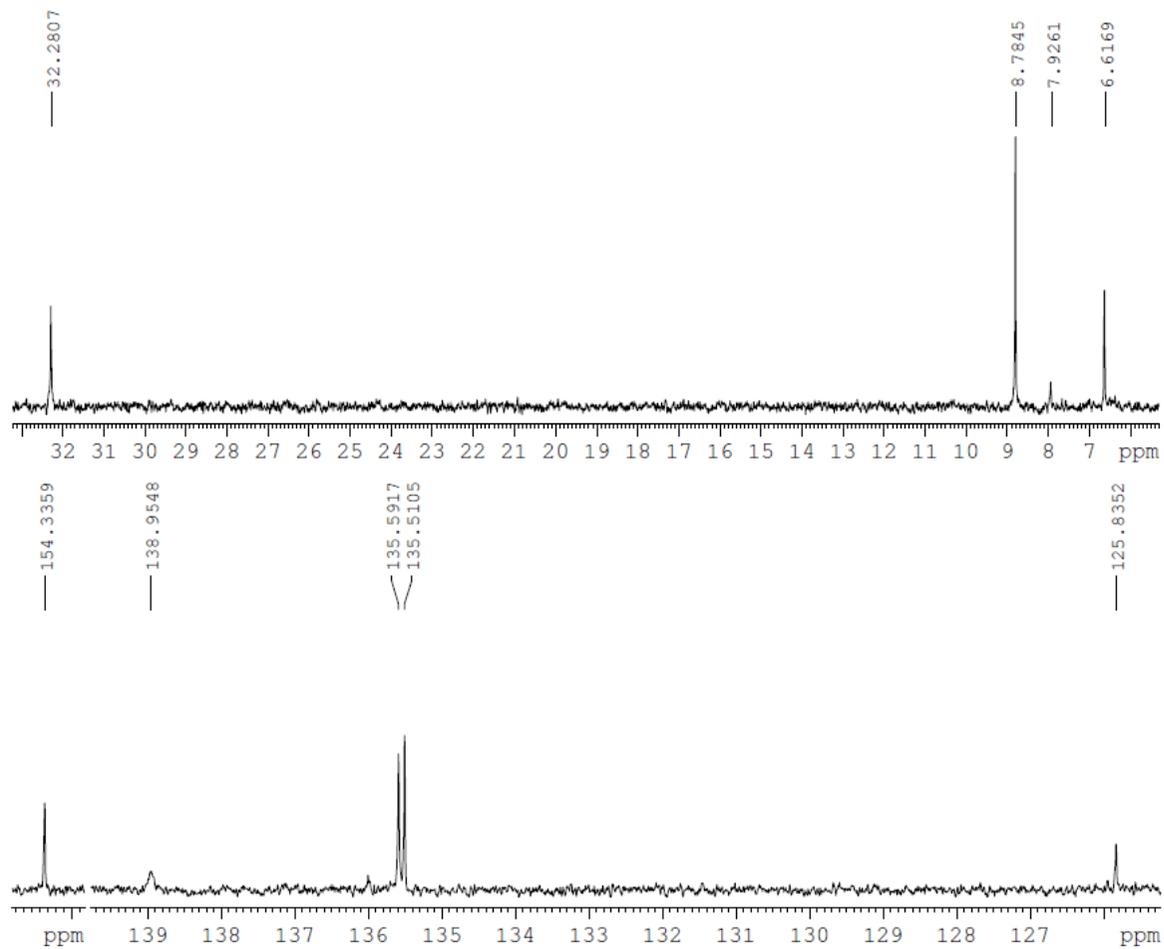
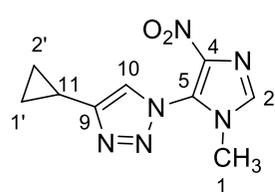


Figura 43: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em DMSO-d_6 de **40a**.

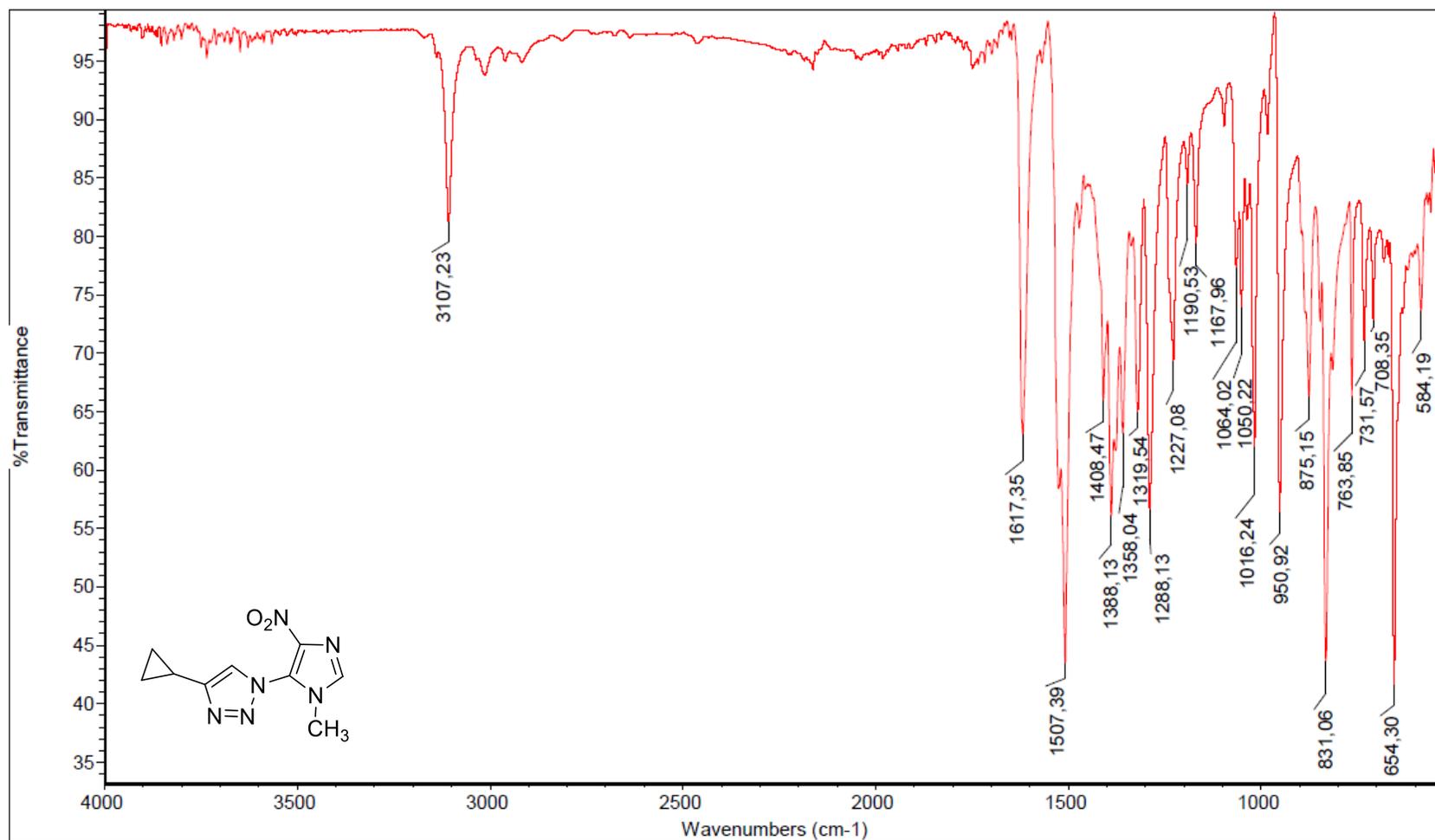


Figura 44: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto **41a** em ATR.

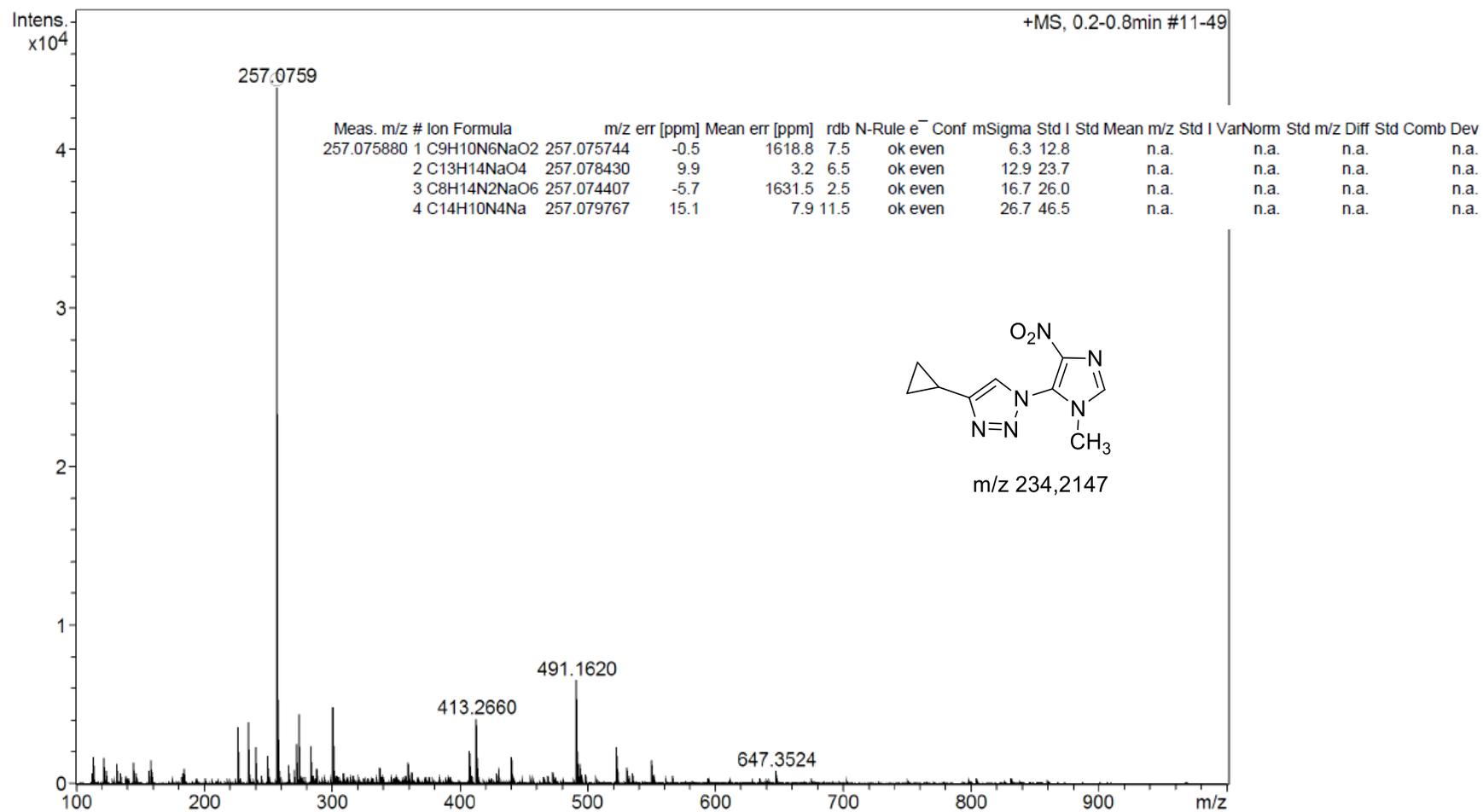


Figura 45: Espectro de Massa de alta resolução do composto **41a**.

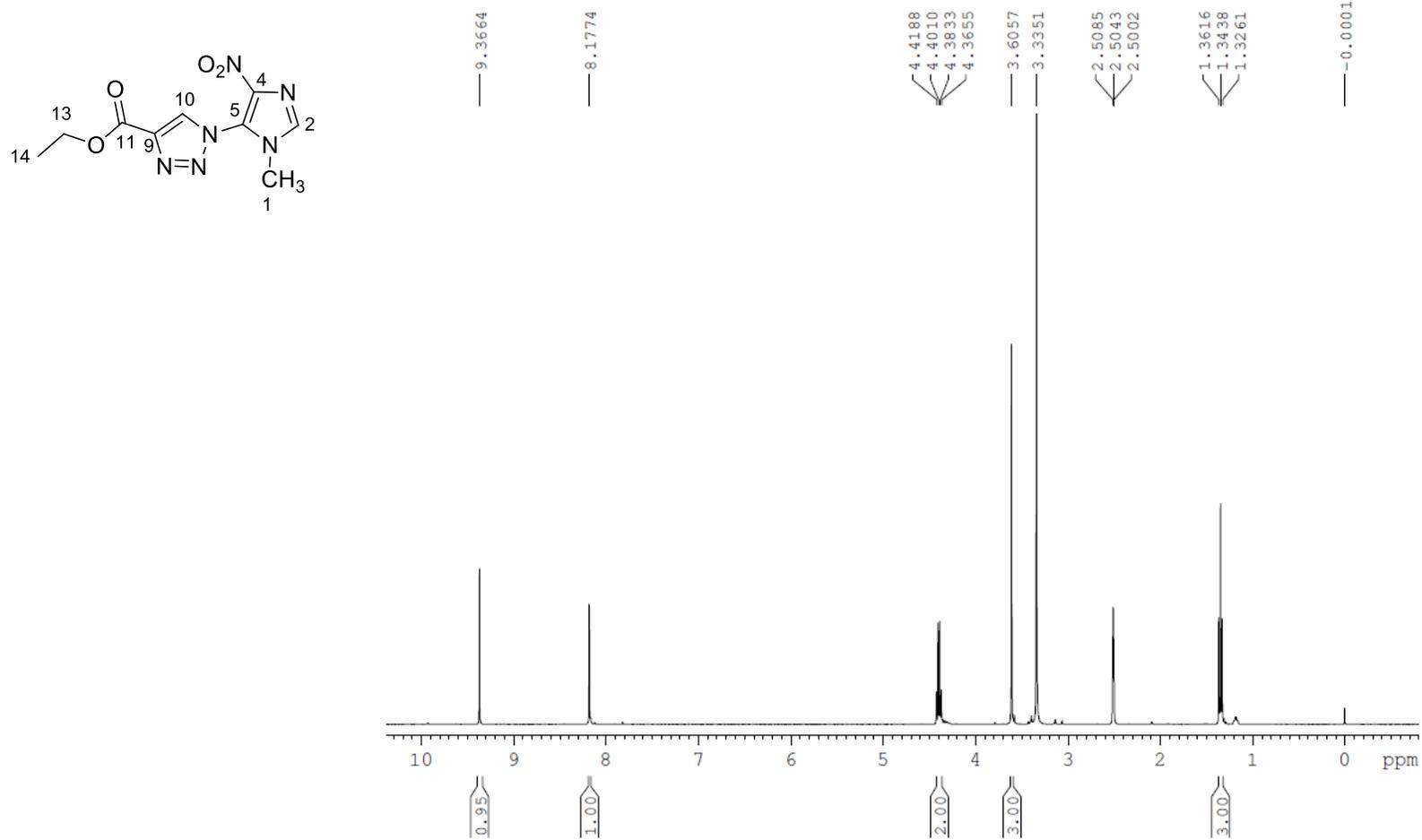


Figura 46: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) em DMSO₆ de **41b**.

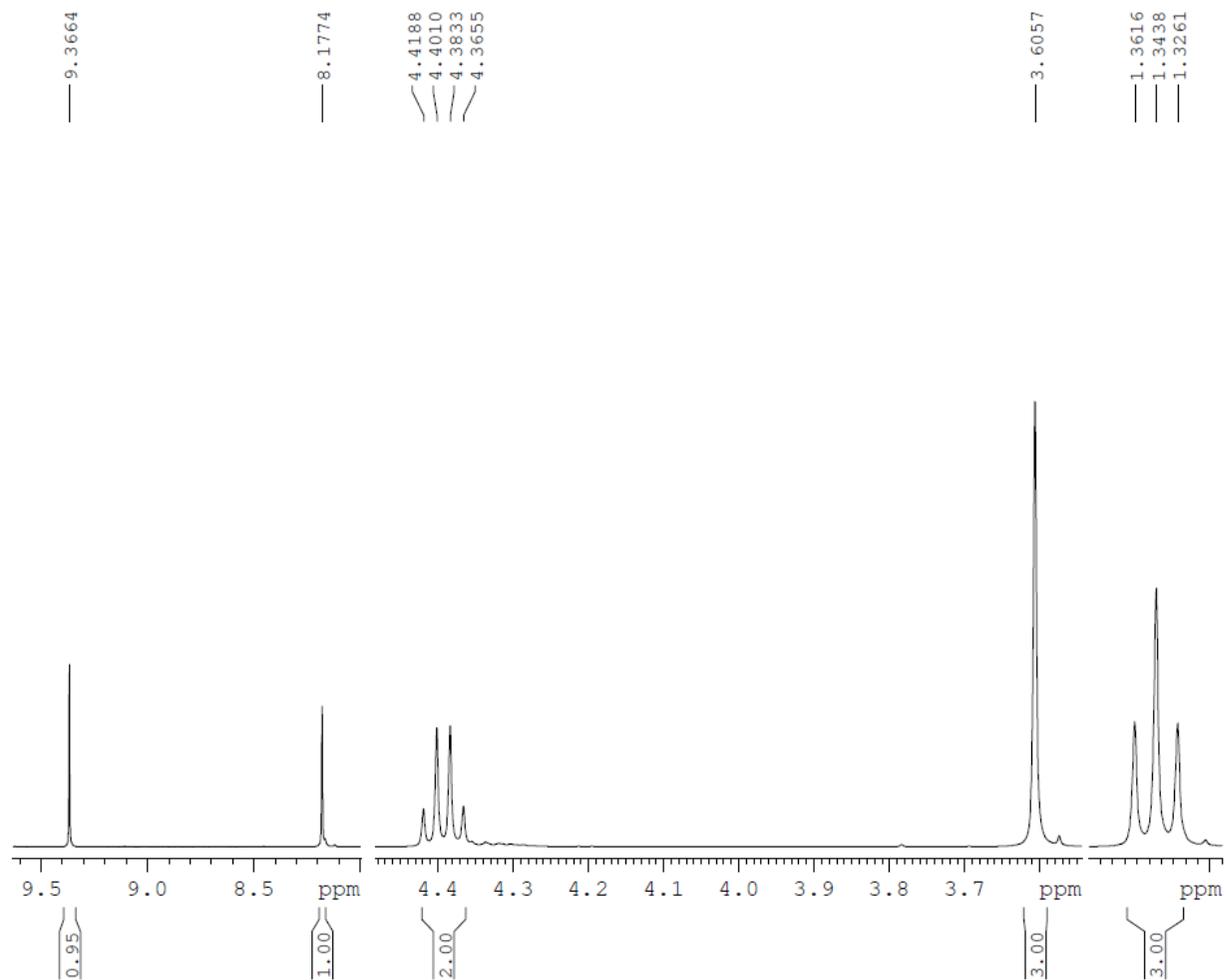
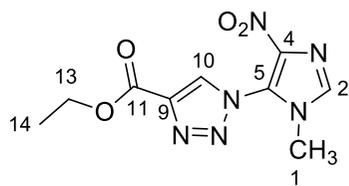


Figura 47: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **41b**.

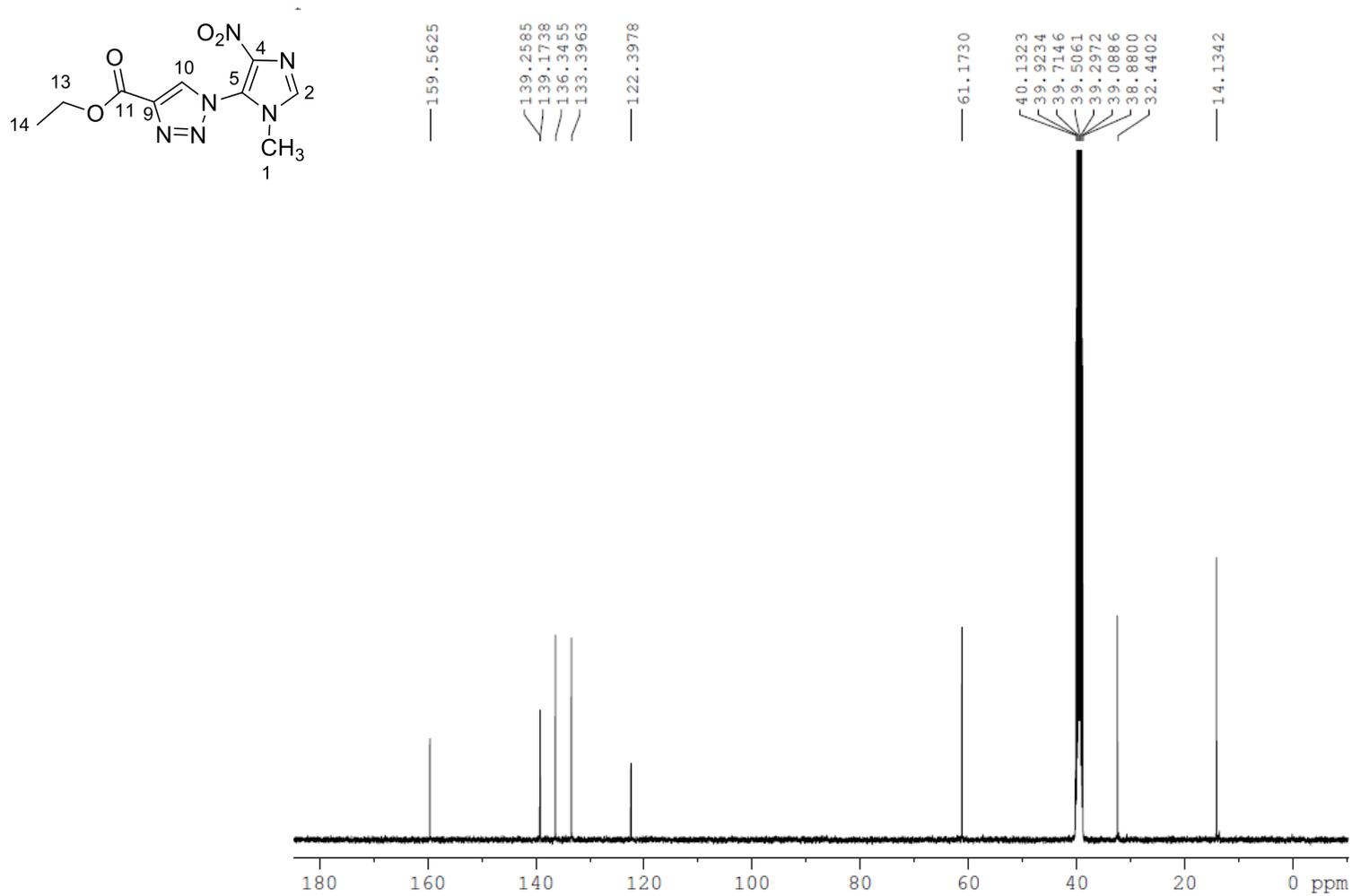


Figura 48: Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz) em DMSO₆ de **41b**.

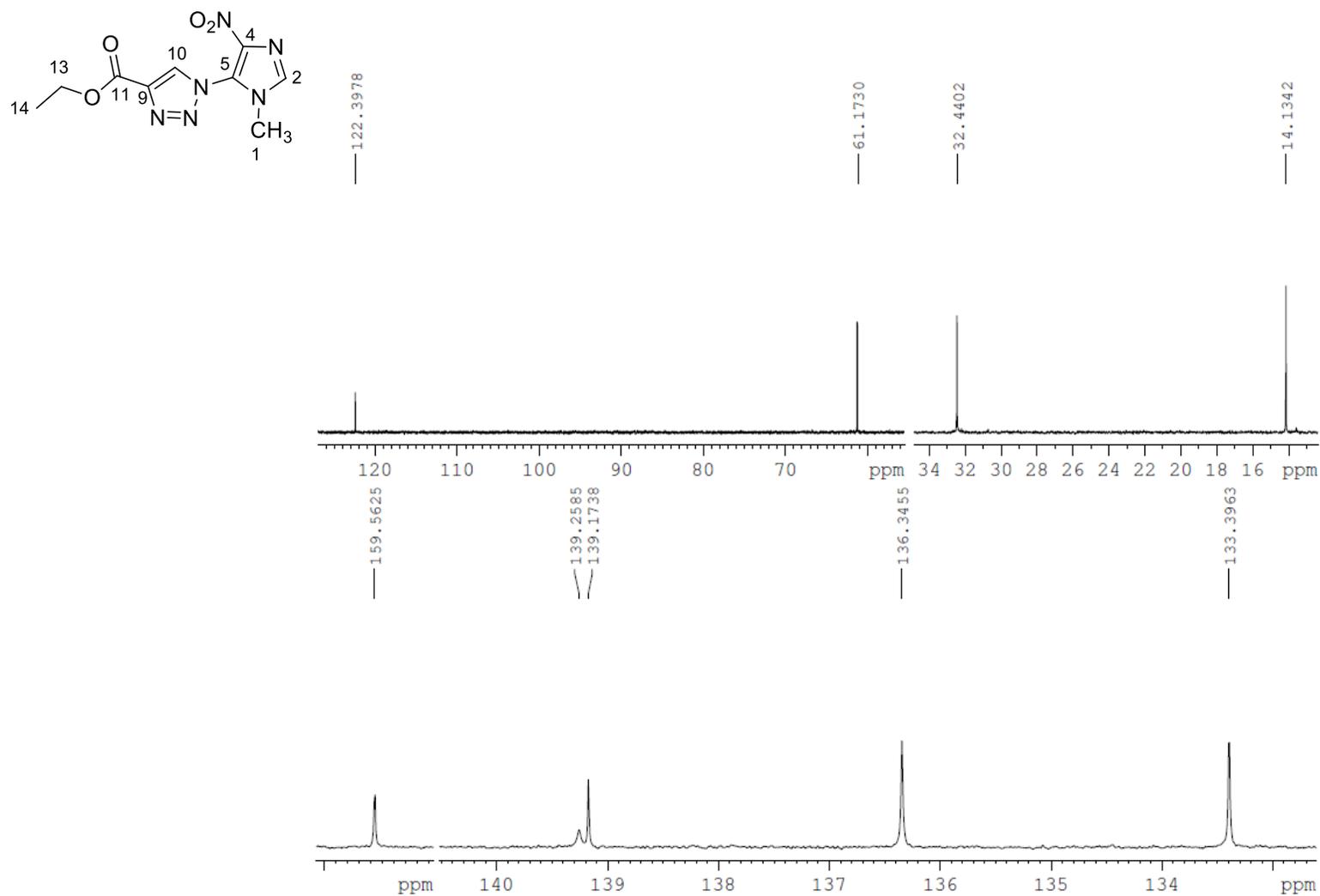


Figura 49: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em DMSO_d_6 de **41b**.

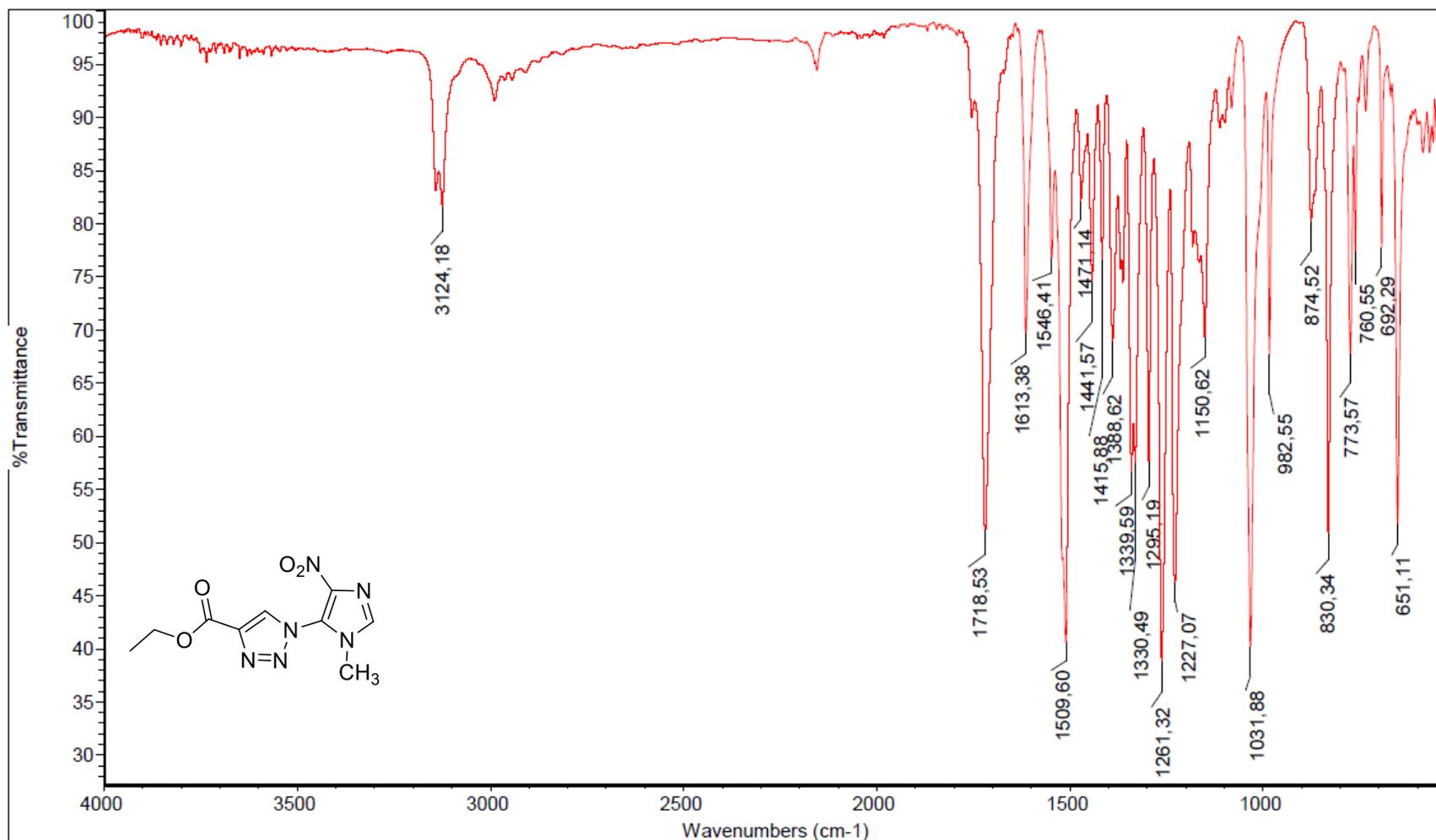


Figura 50: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto **41b** em ATR.

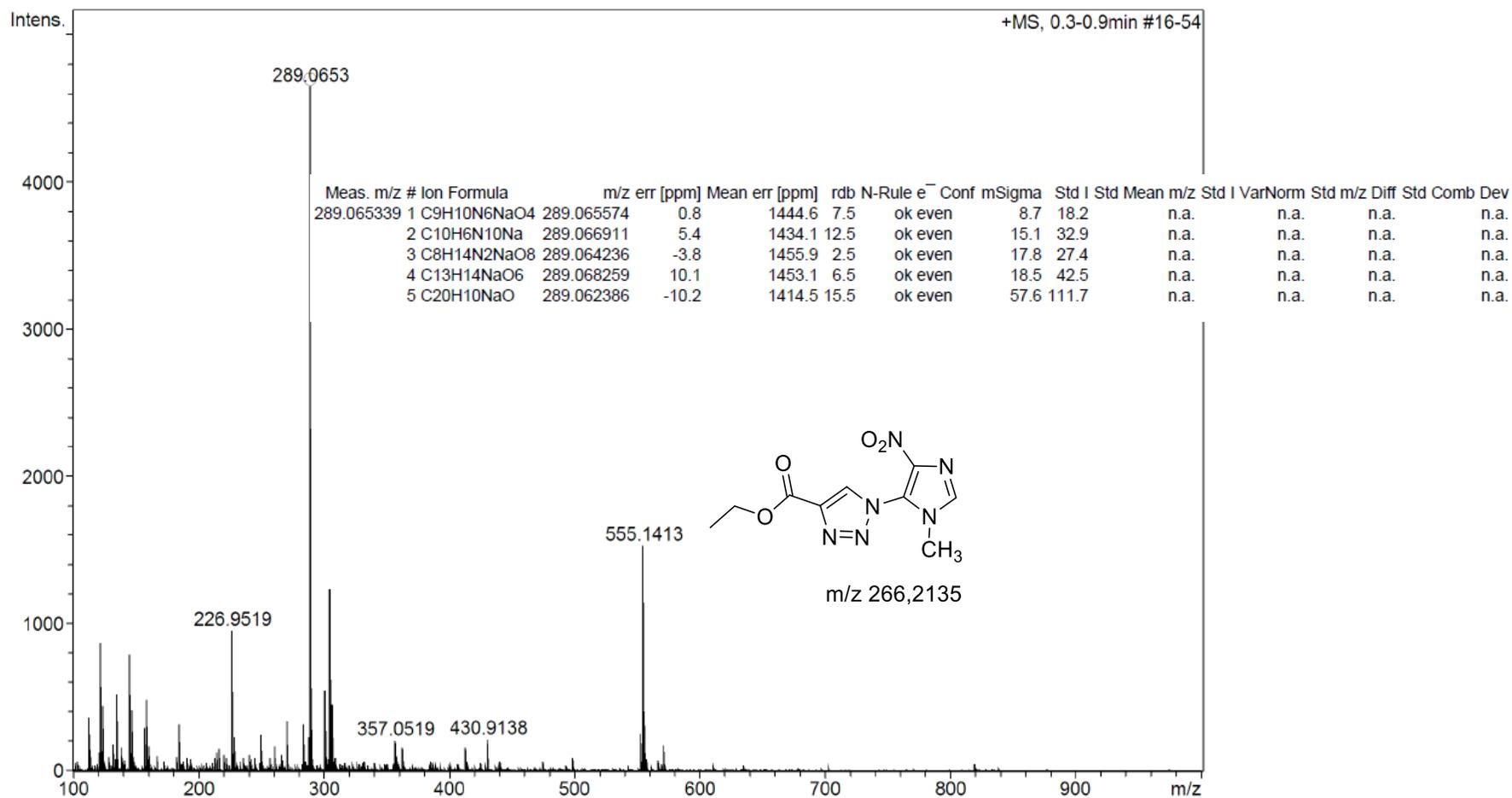


Figura 51: Espectro de Massa de alta resolução do composto **41b**.

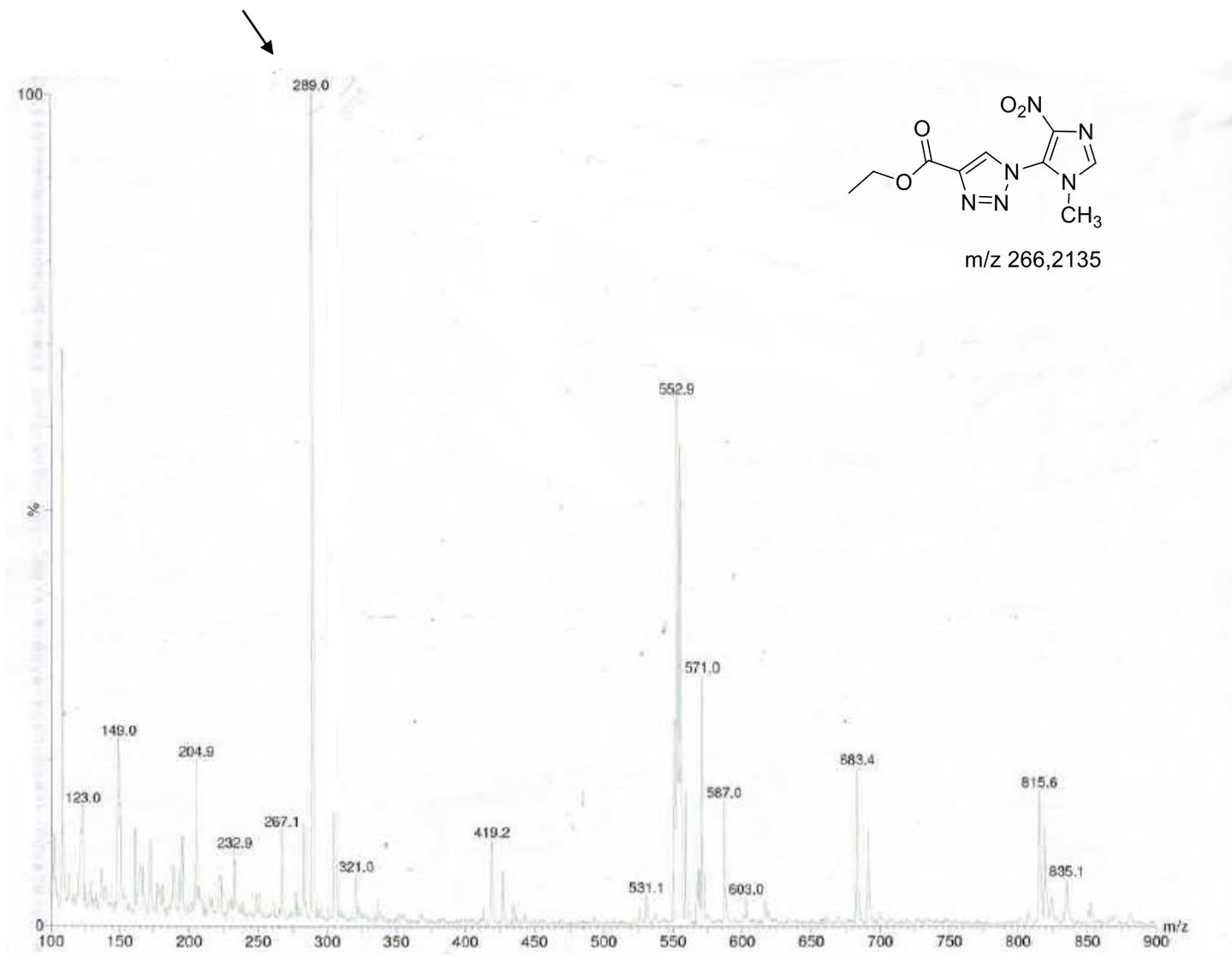


Figura 52: Espectrometria de Massa com Ionização por Eletrospray [ESI-MS (+)] em modo positivo de composto **41b**.

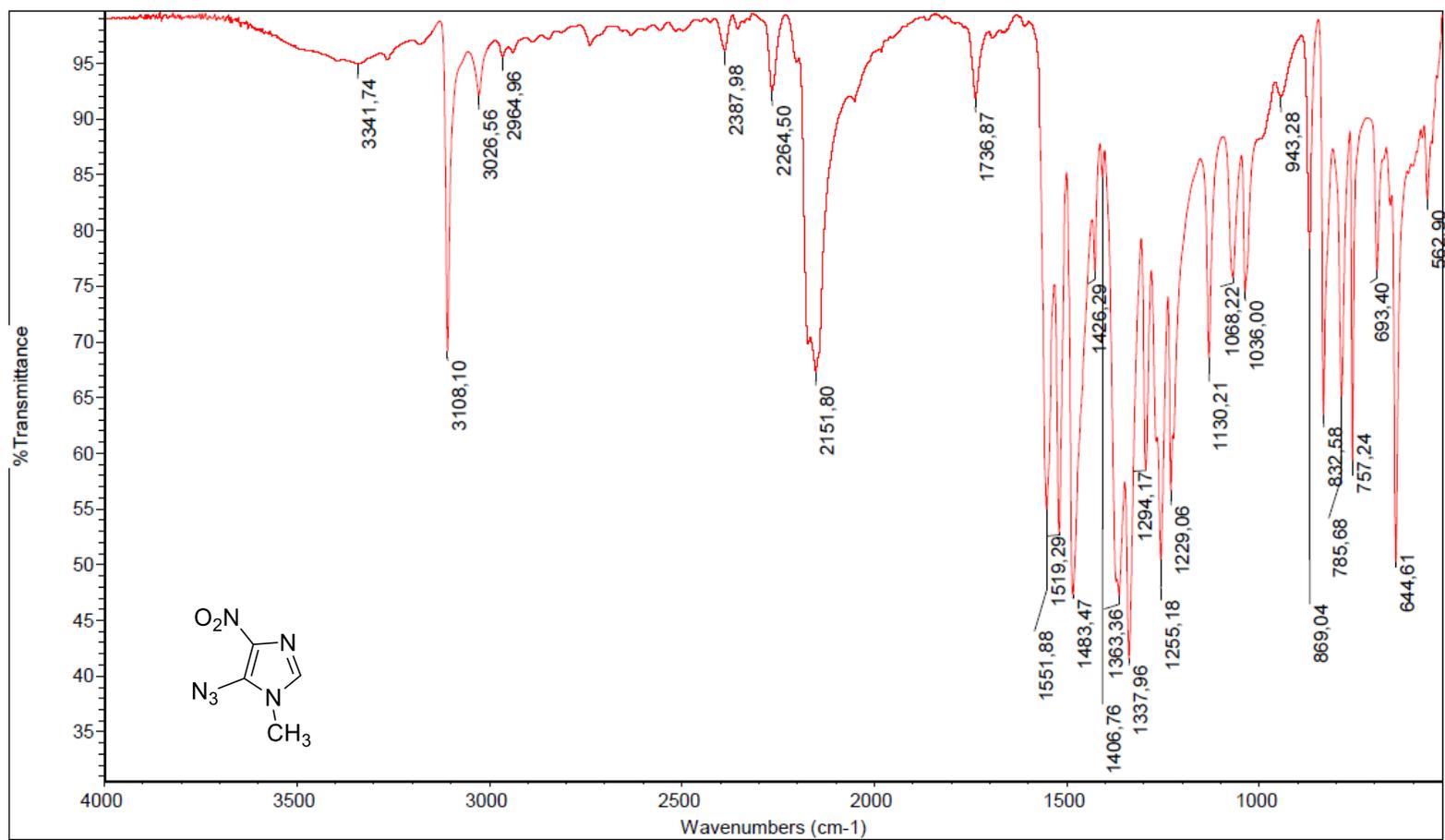


Figura 53: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto 47 em ATR.

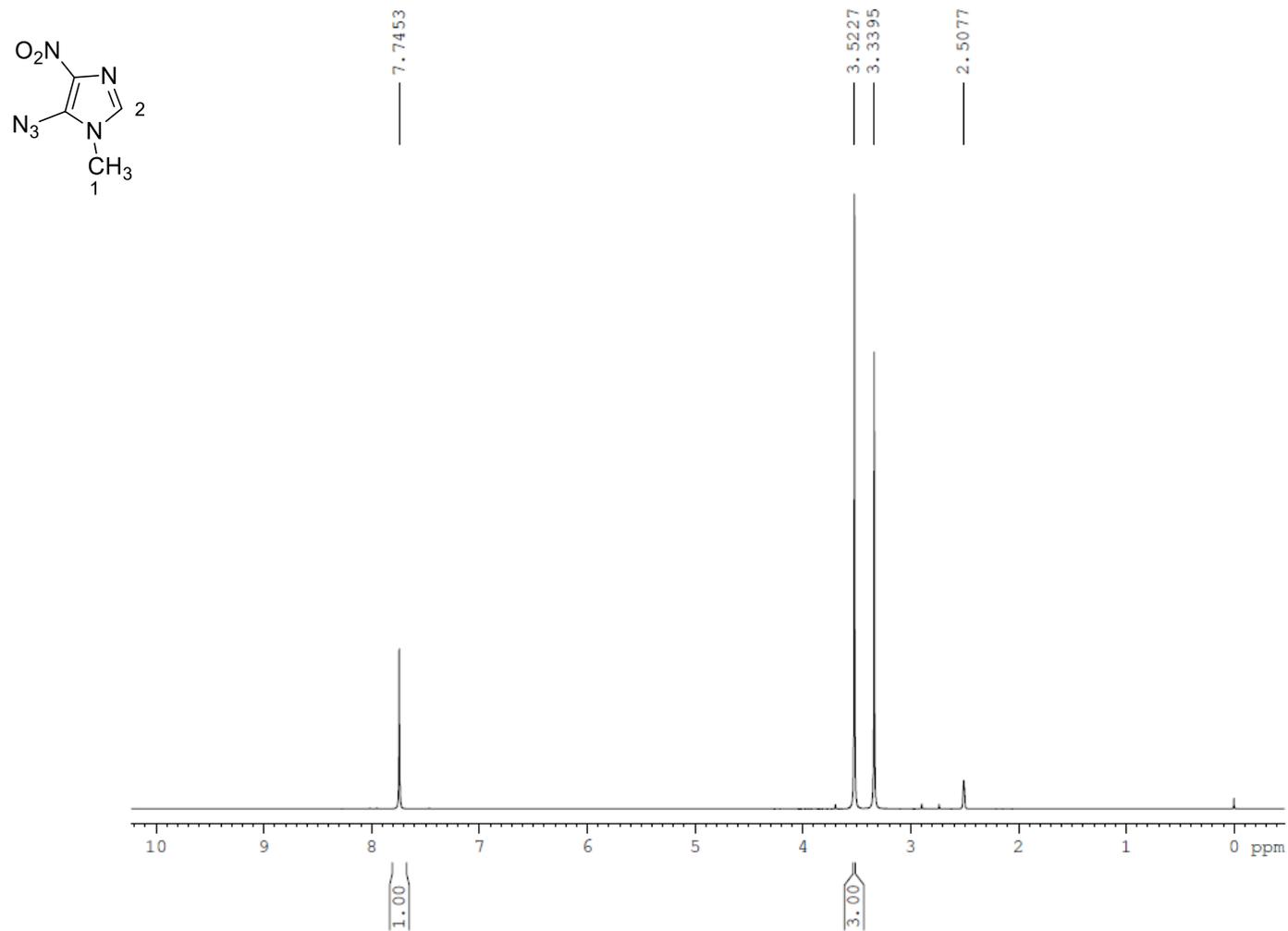


Figura 54: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) em DMSOd₆ de **47**.

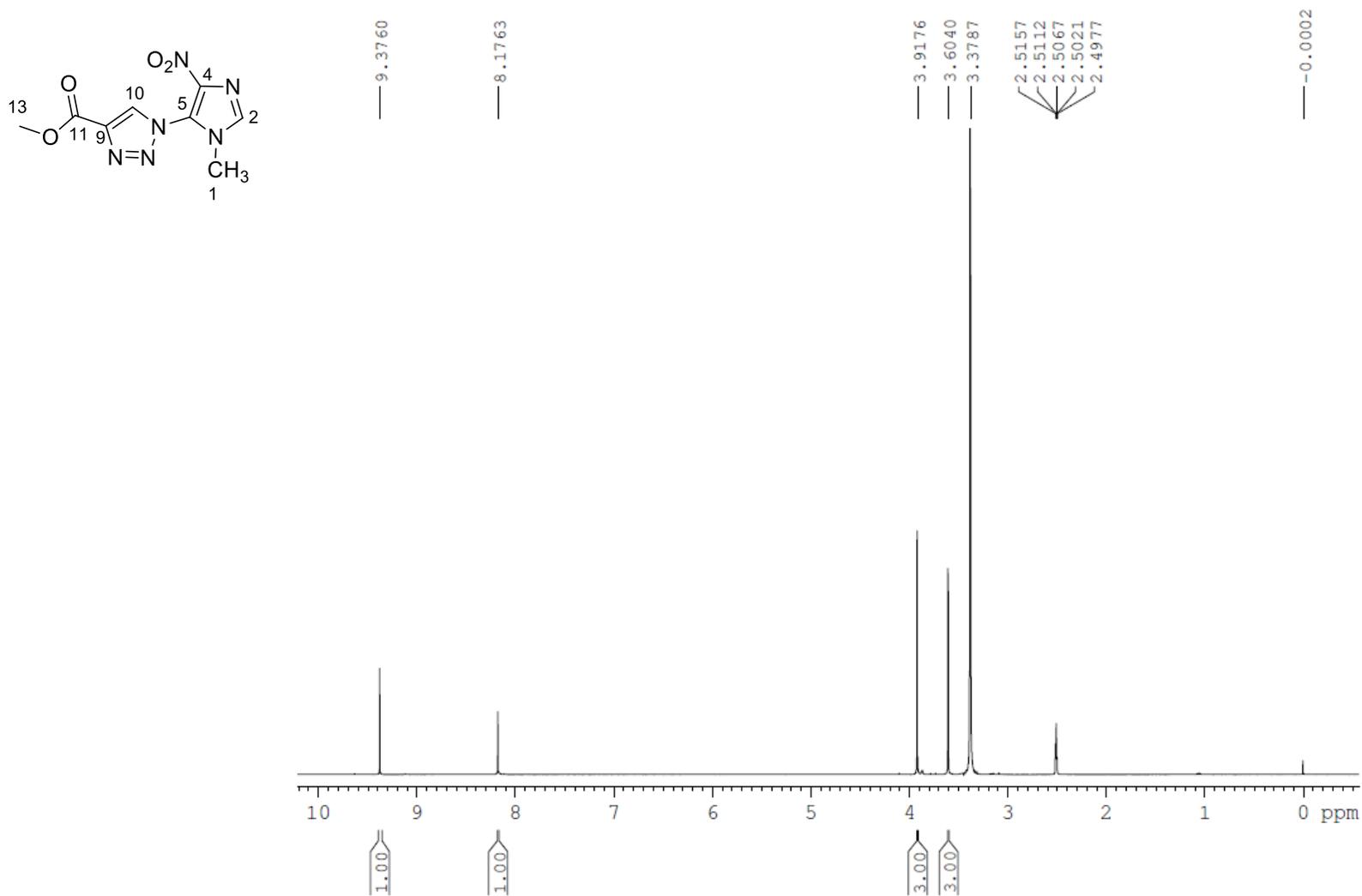


Figura 55: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **41c**.

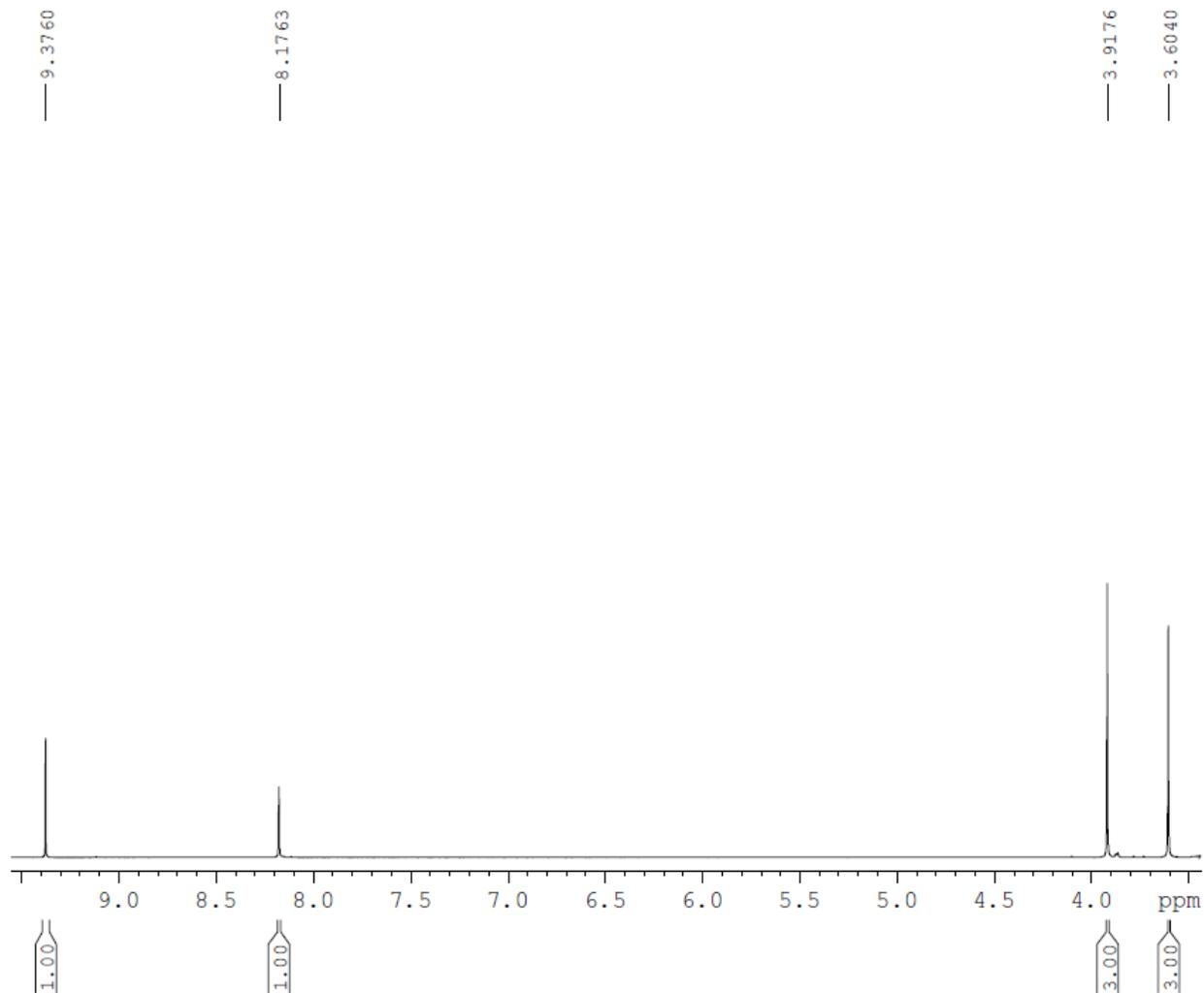
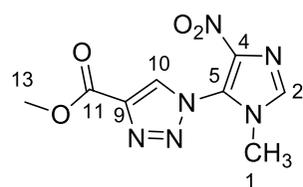


Figura 56: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de **41c**.

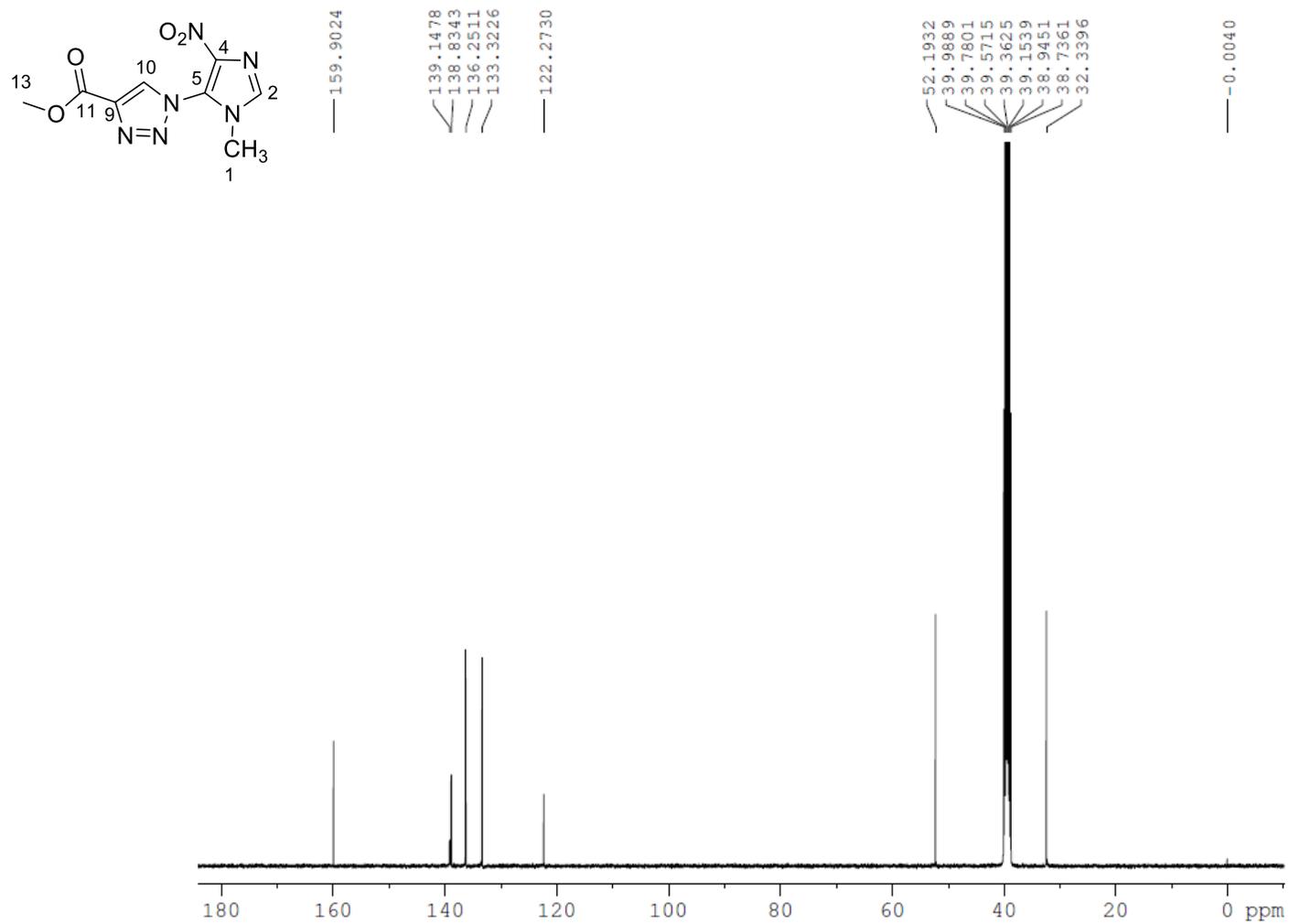


Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em DMSO-d_6 de **41c**.

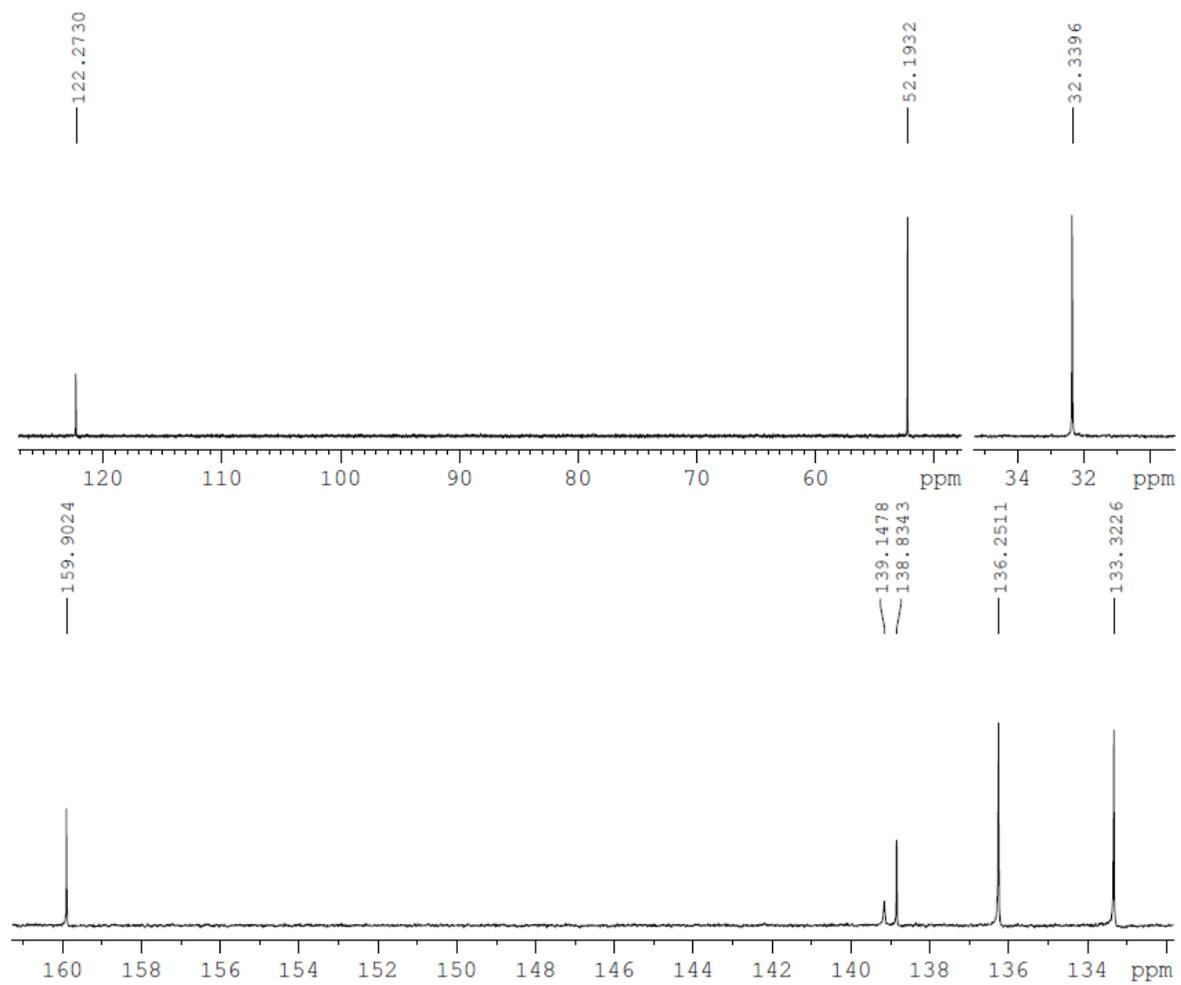
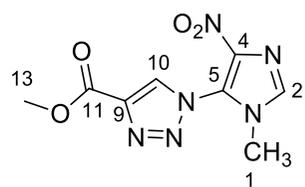


Figura 58: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em DMSO-d_6 de **41c**.

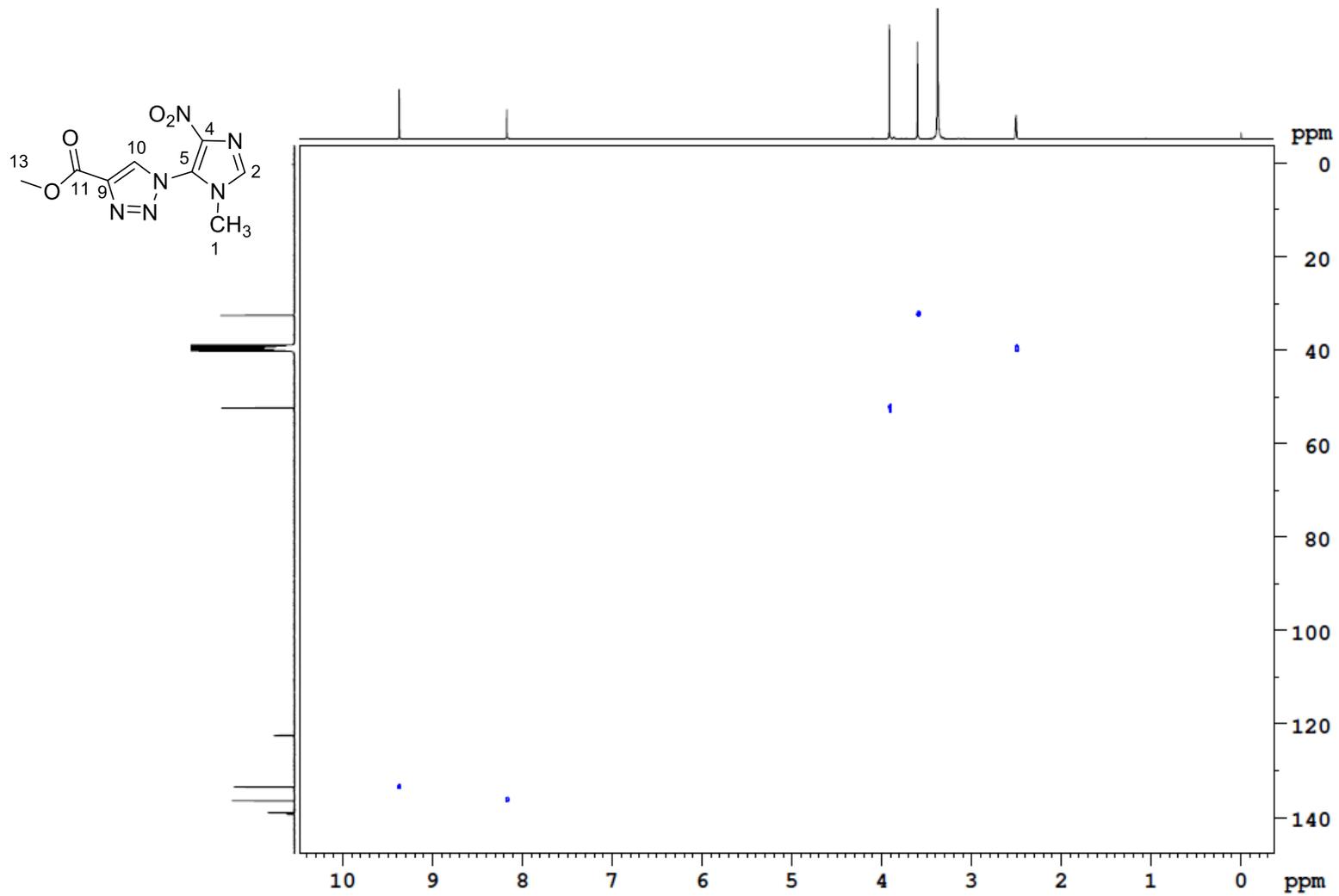


Figura 59: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO₆ de **41c**.

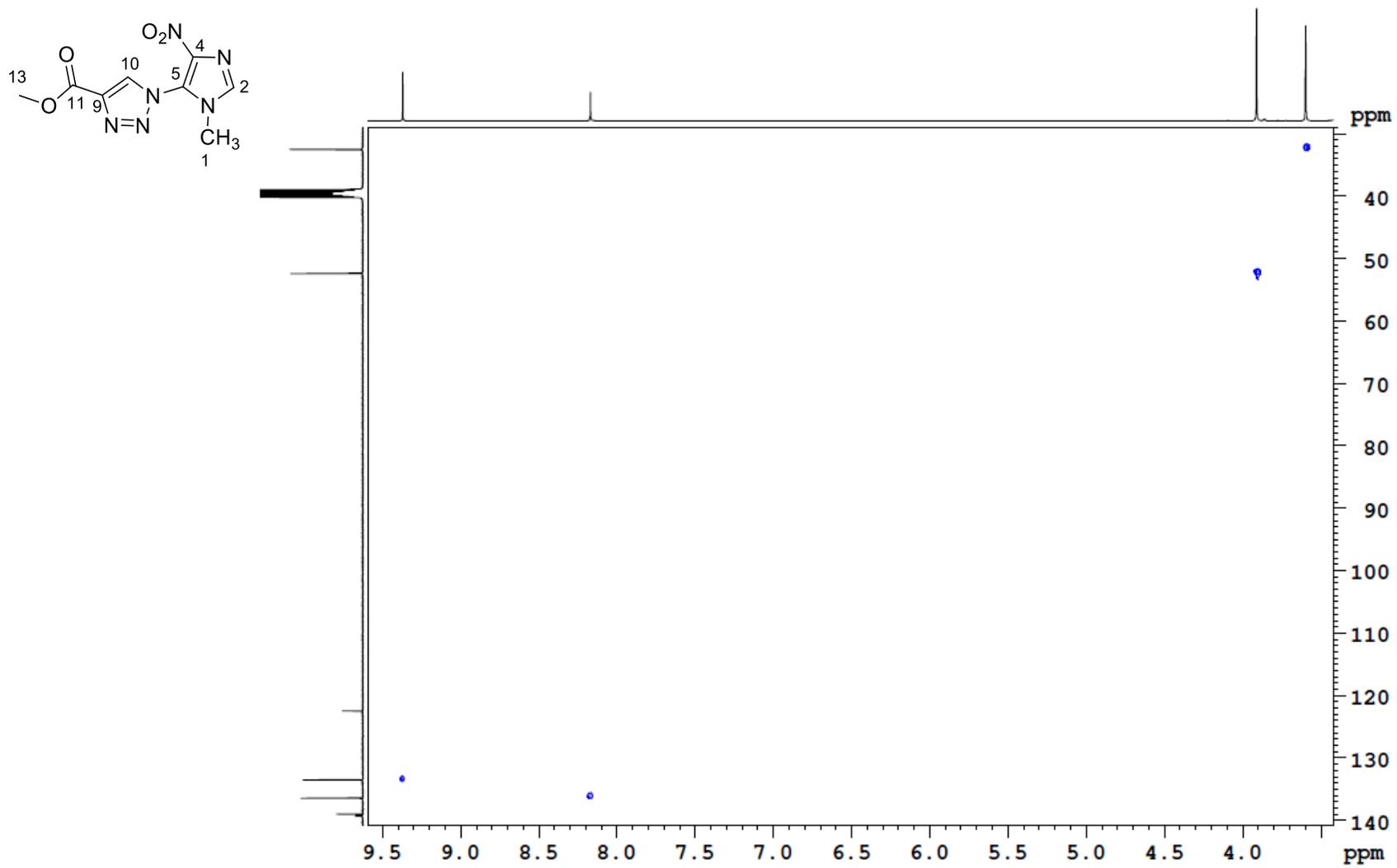


Figura 60: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO₆ de **41c**.

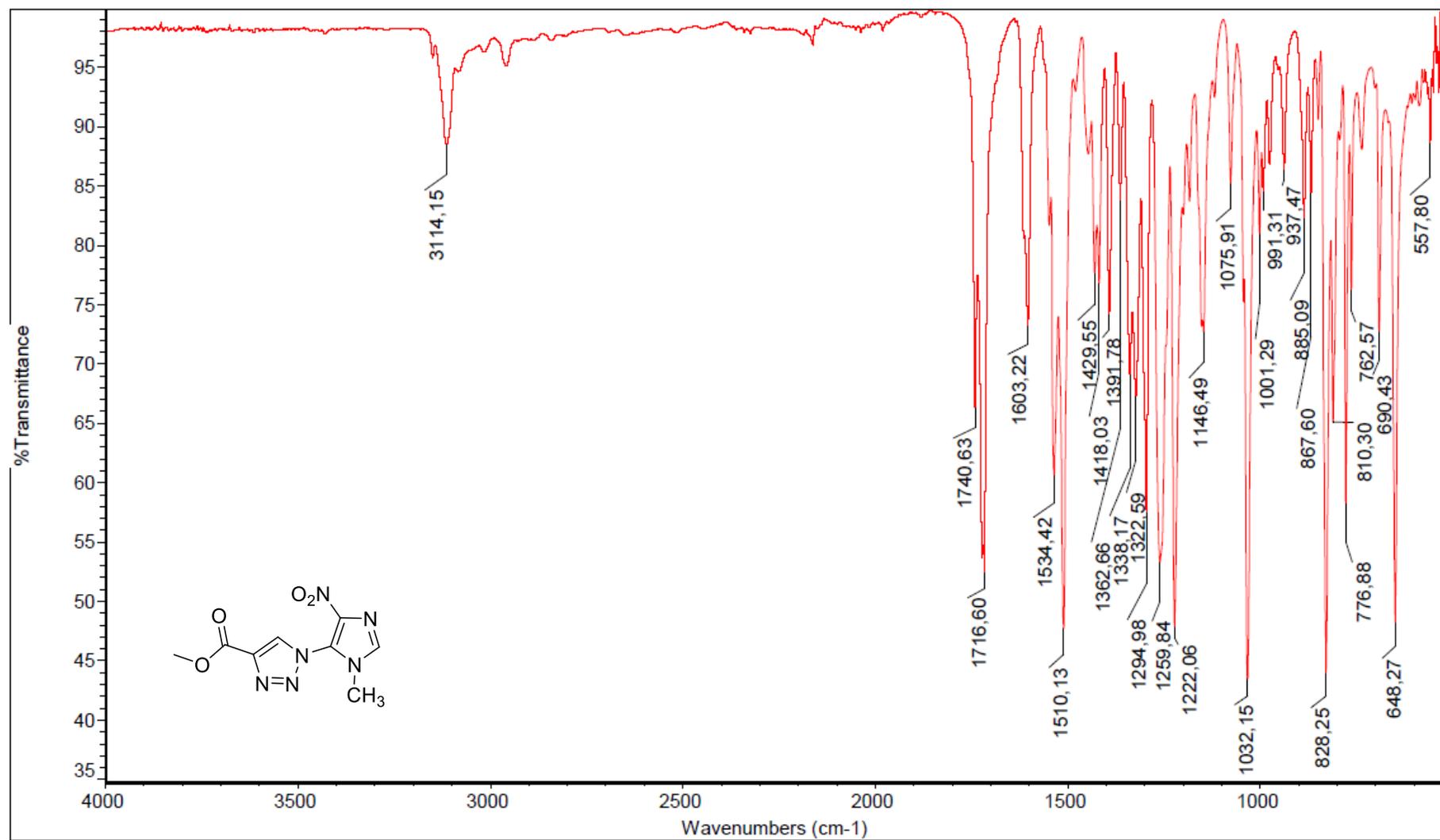


Figura 61: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto **41c** em ATR.

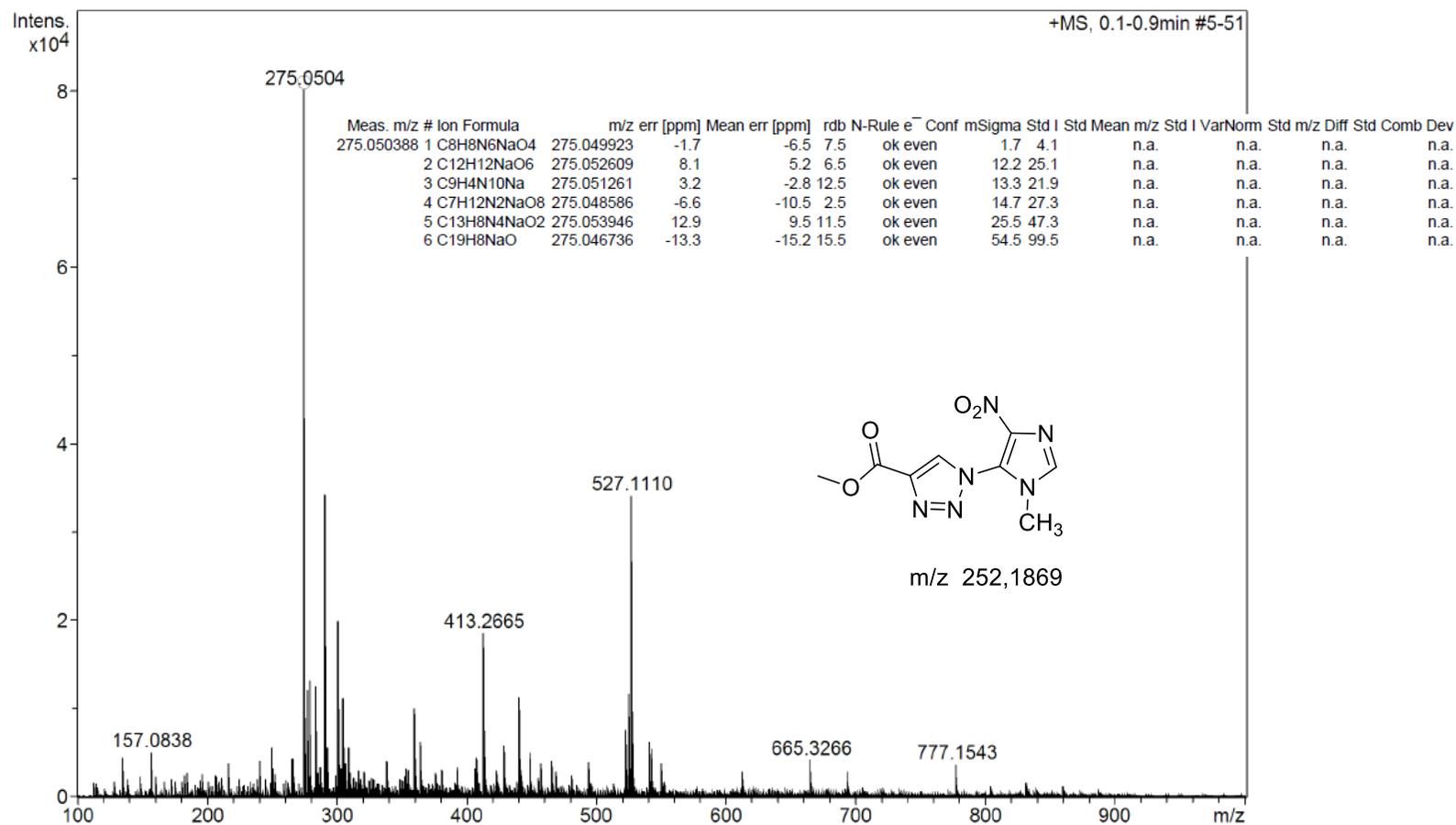


Figura 62: Espectro de Massa de alta resolução do composto **41c**.

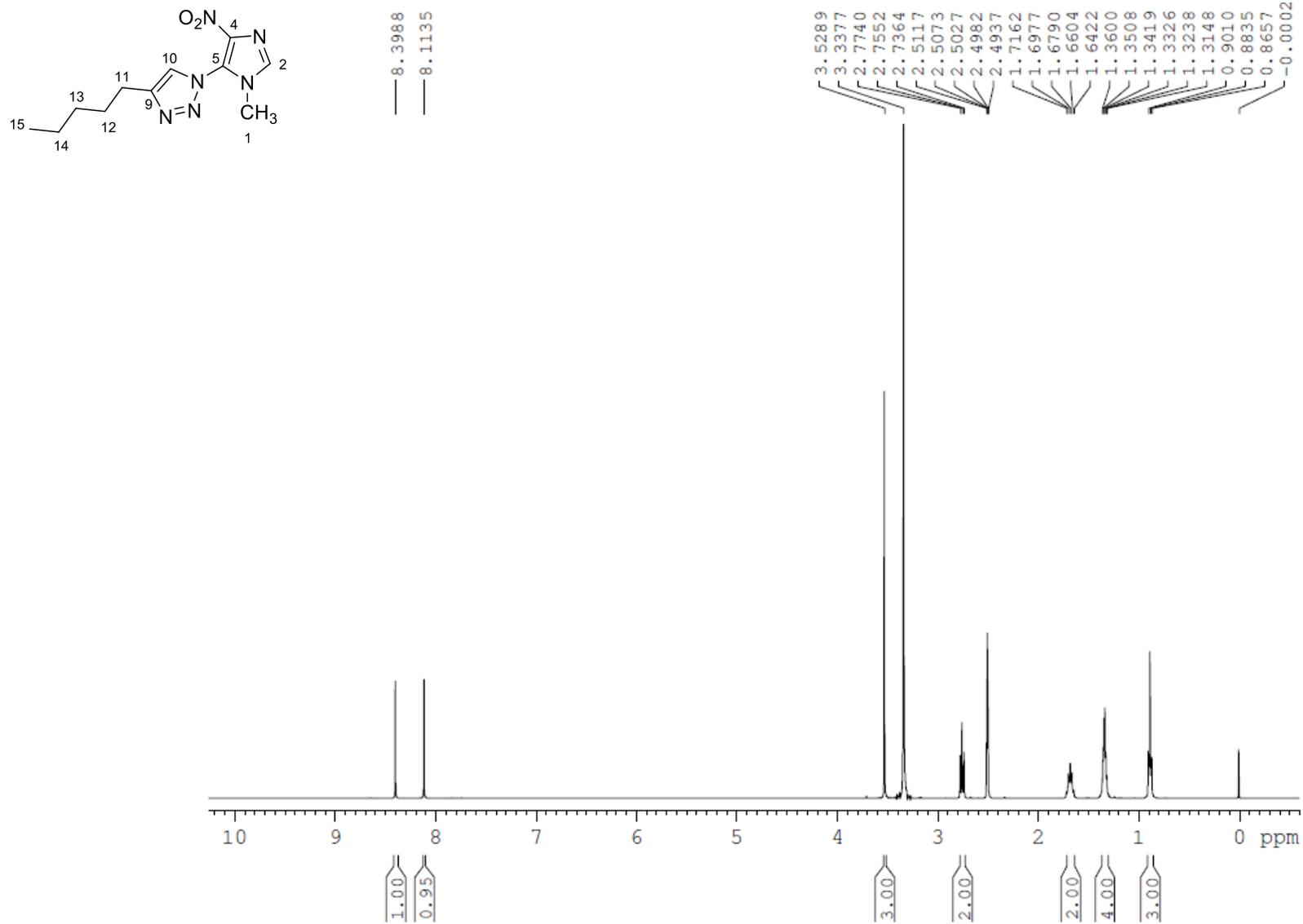


Figura 63: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO-d_6 de **41d**.

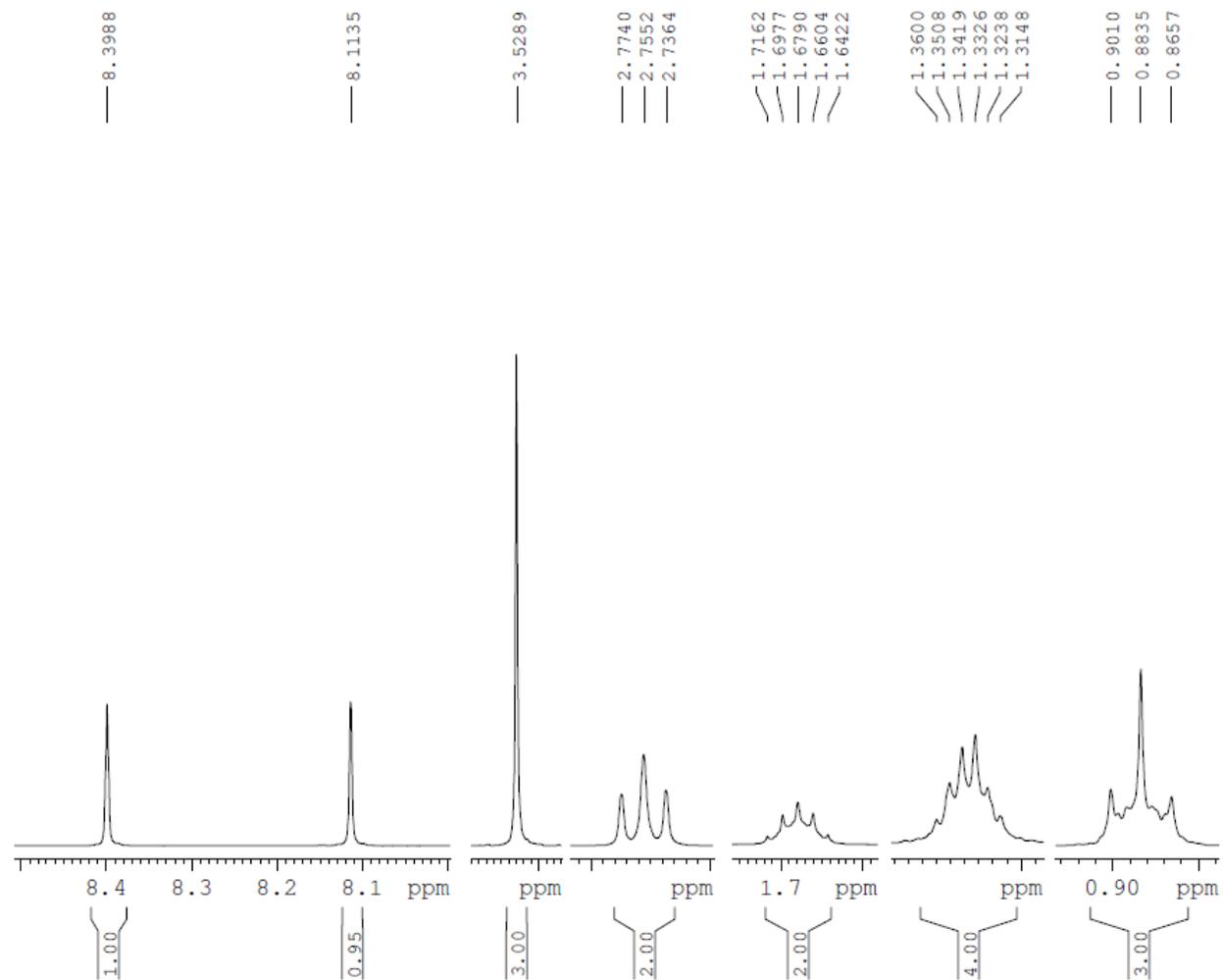
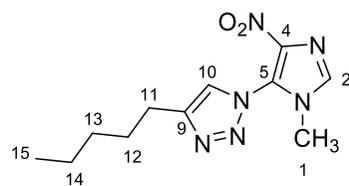


Figura 64: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **41d**.

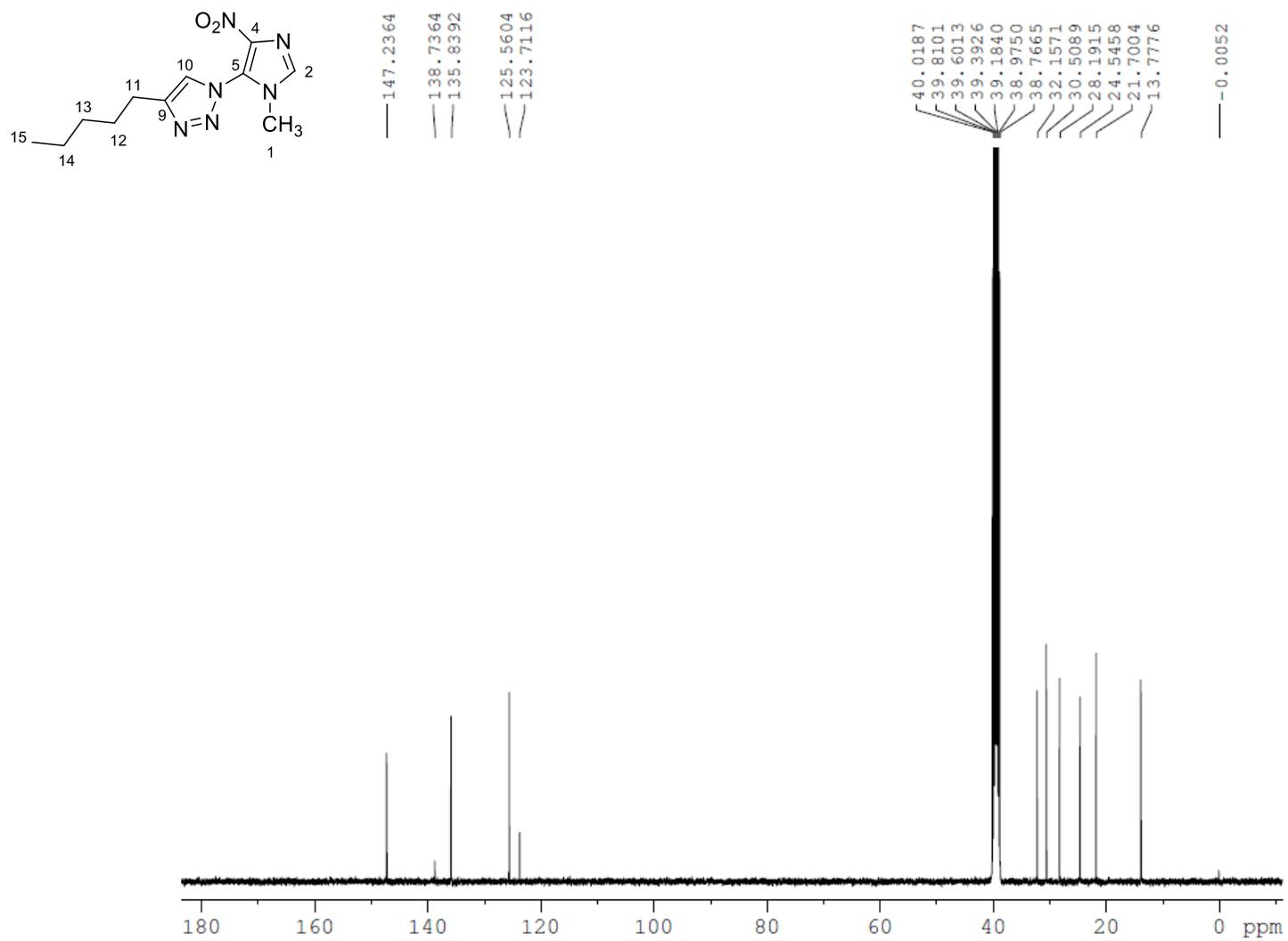


Figura 65: Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz) em DMSO₆ de **41d**.

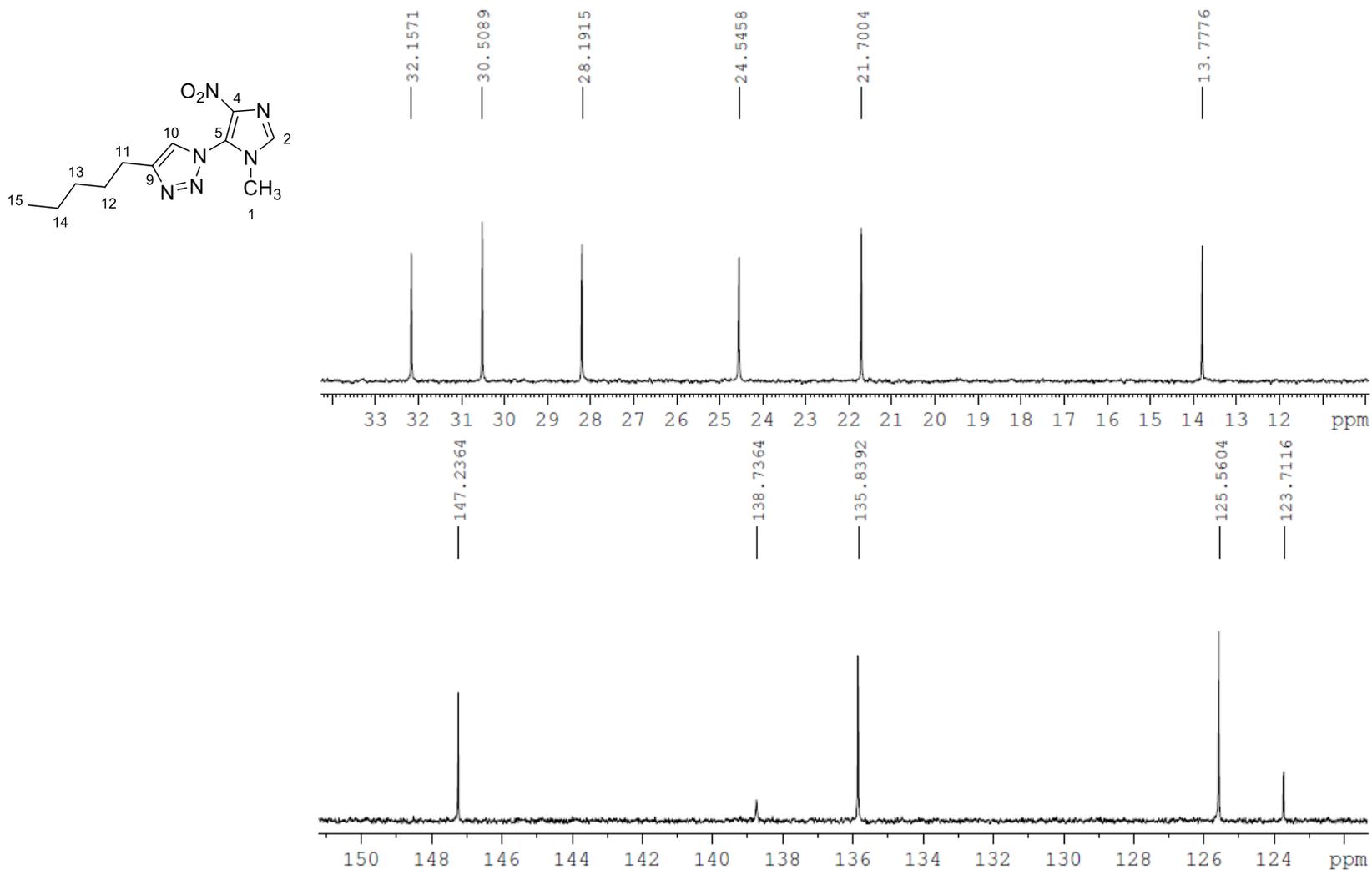


Figura 66: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em DMSO_d_6 de **41d**.

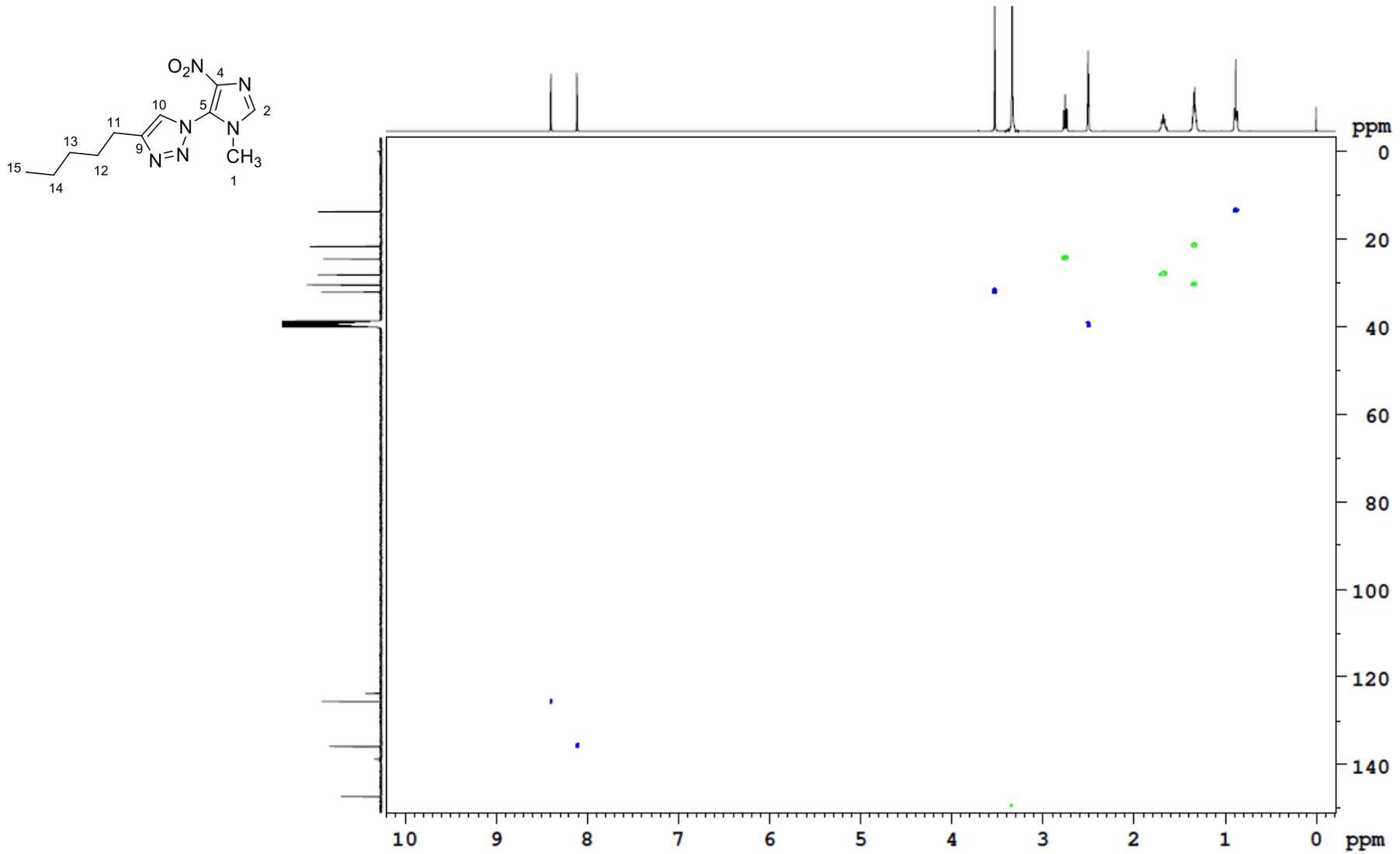


Figura 67: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO₆ de **41d**.

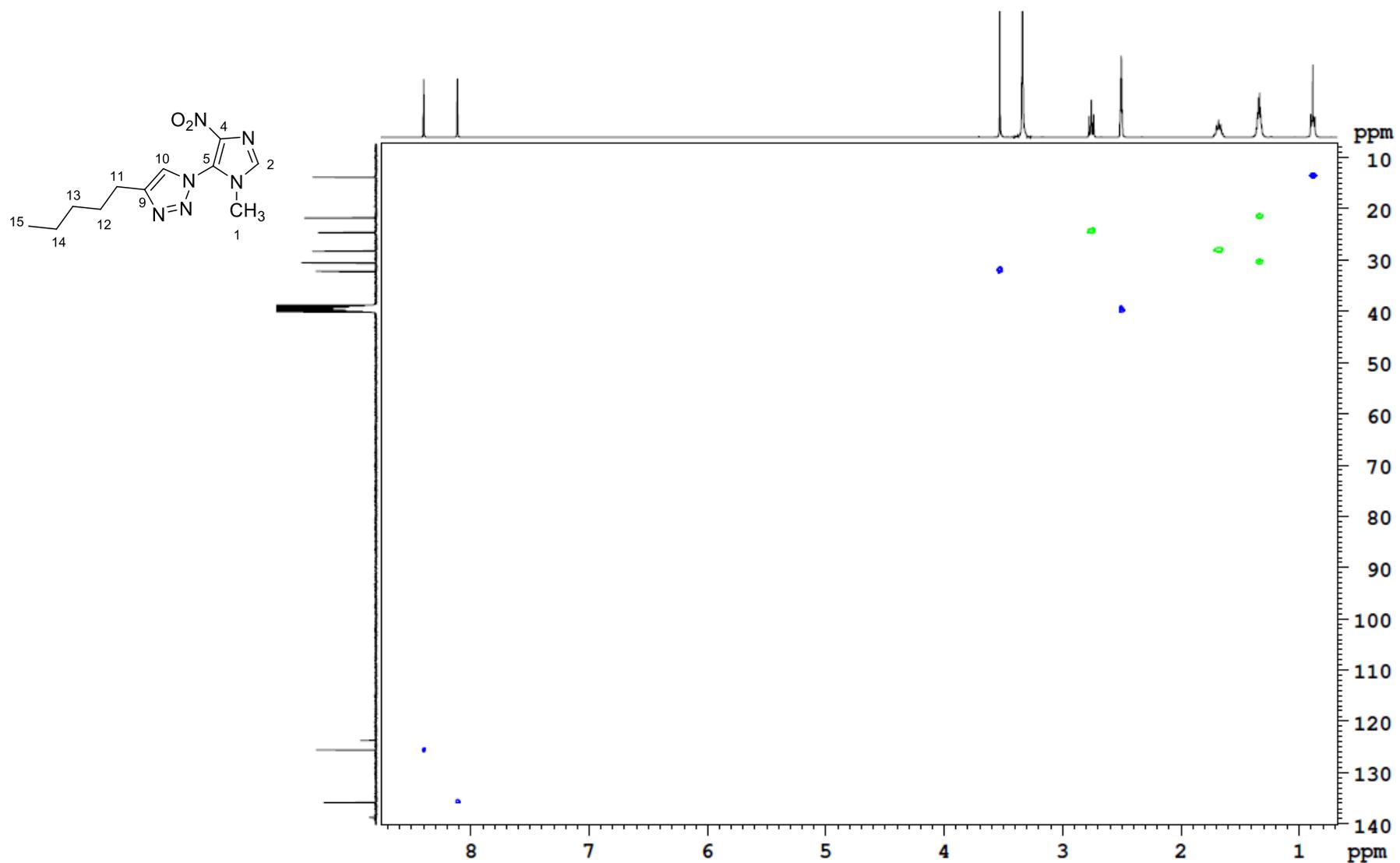


Figura 68: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO_d_6 de 41d.

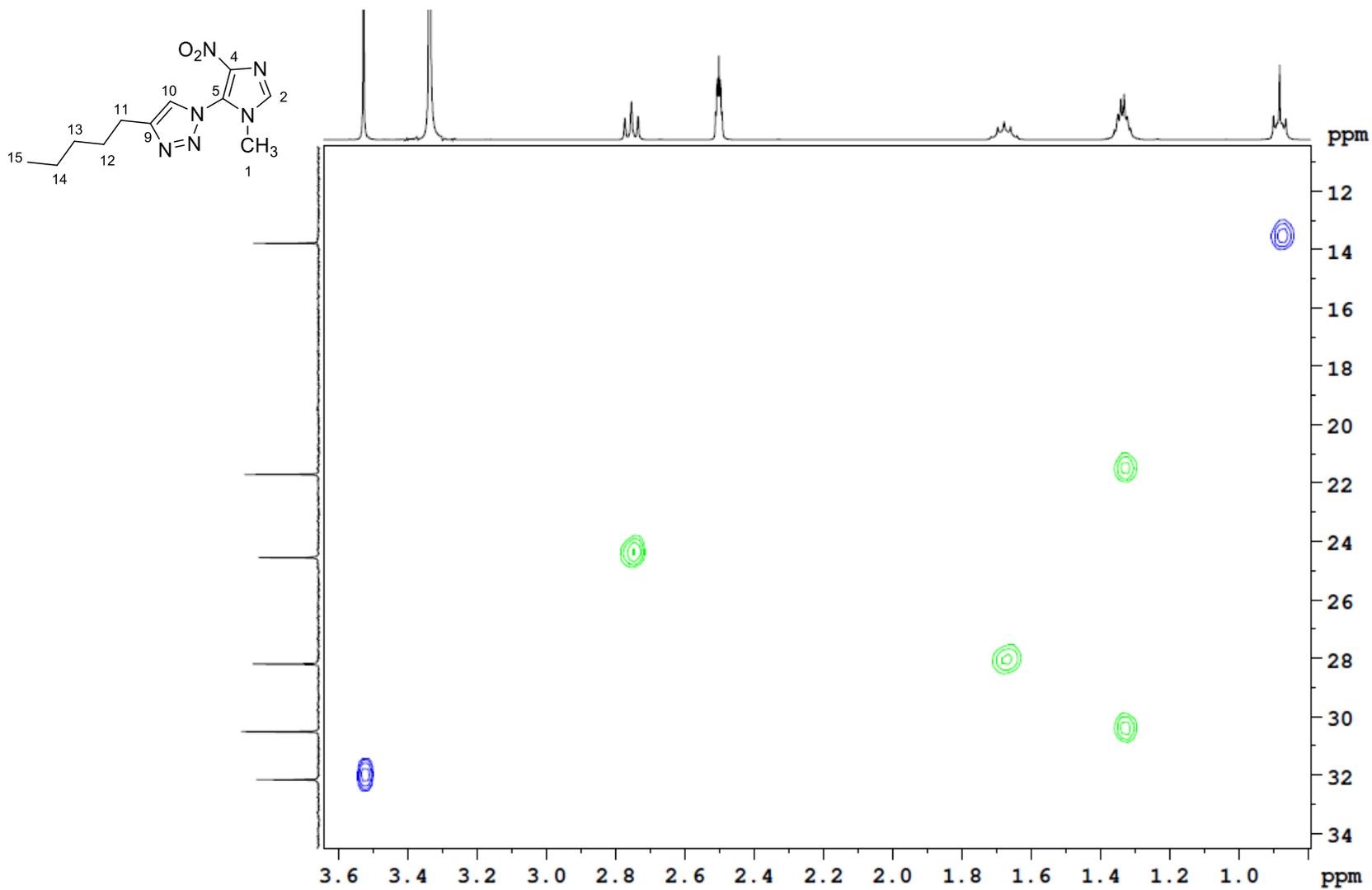


Figura 69: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO₆ de **41d**.

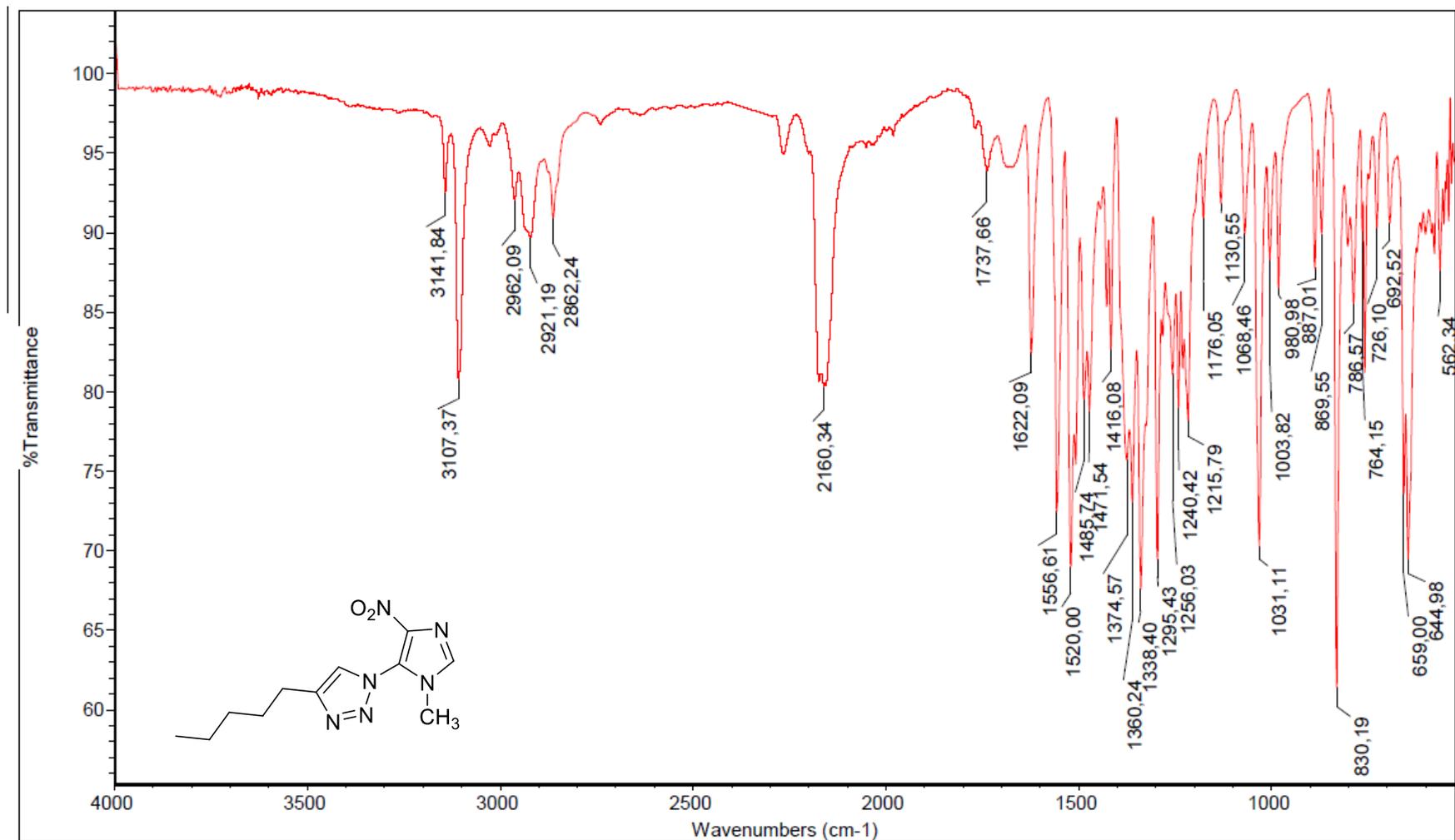


Figura 70: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto **41d** em ATR.

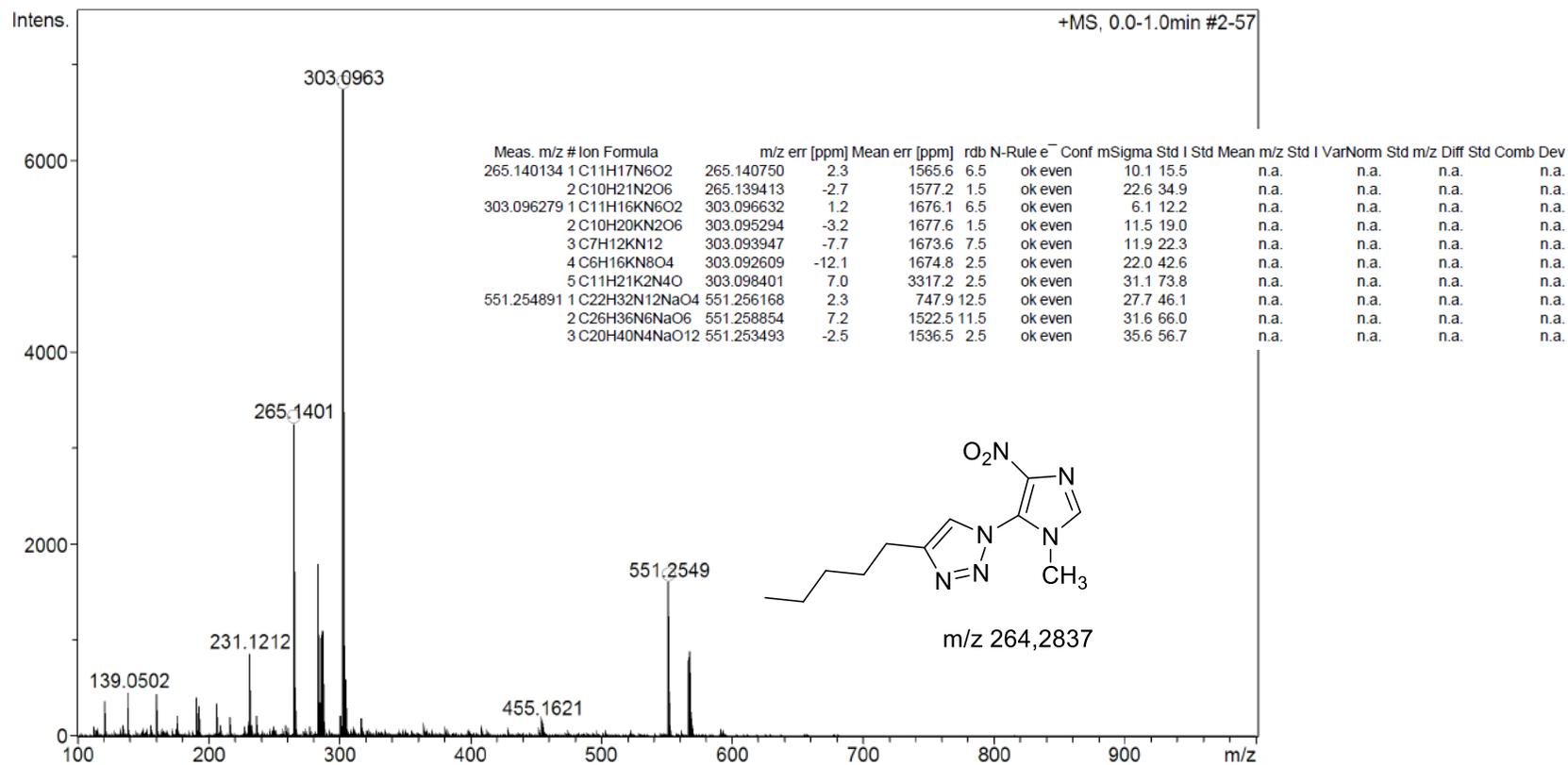


Figura 71: Espectro de Massa de alta resolução do composto **41d**.

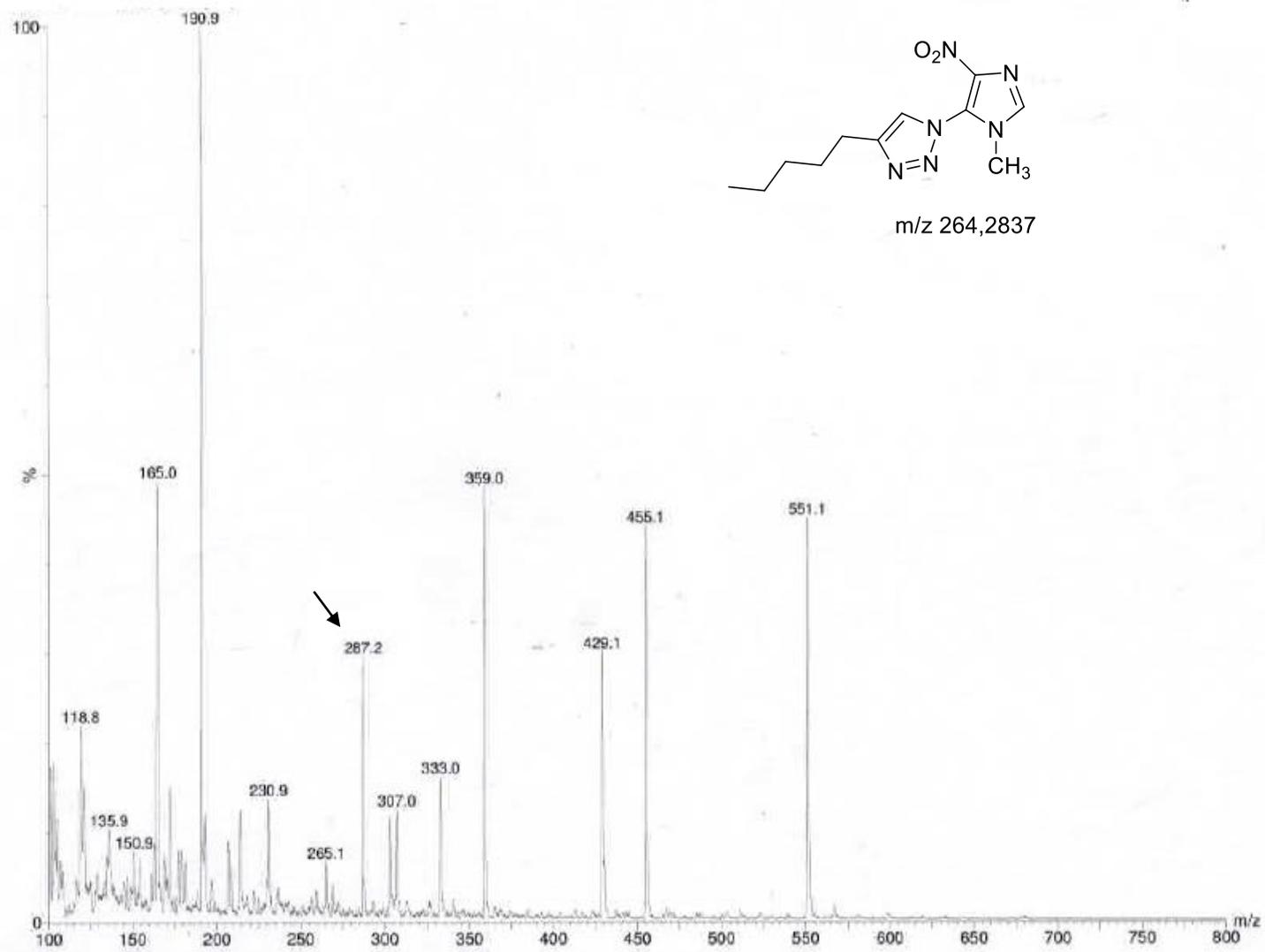


Figura 72: Espectrometria de Massa com Ionização por Eletrospray [ESI-MS (+)] em modo positivo de composto **41d**.

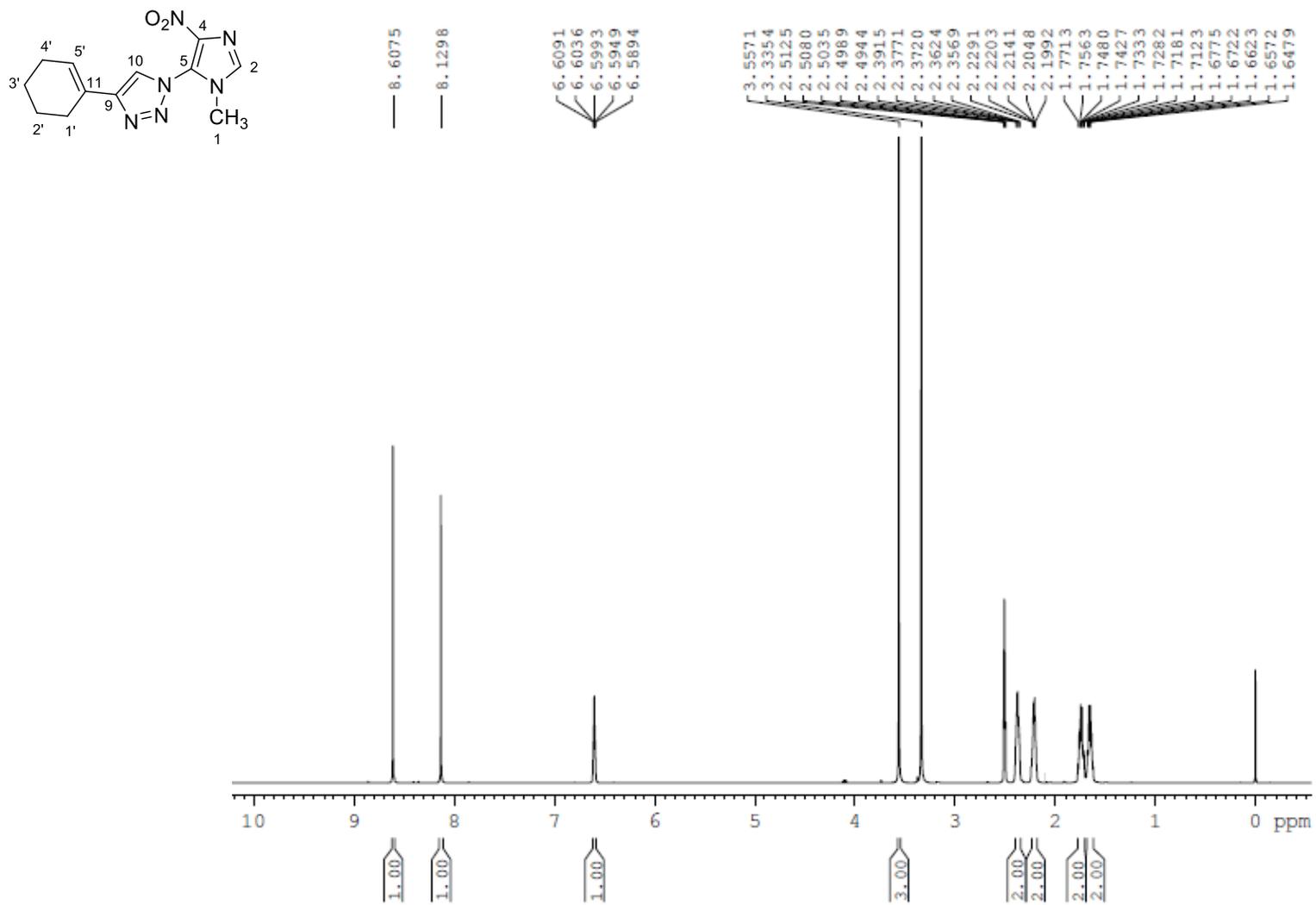


Figura 73: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) em DMSO₆ de **41e**.

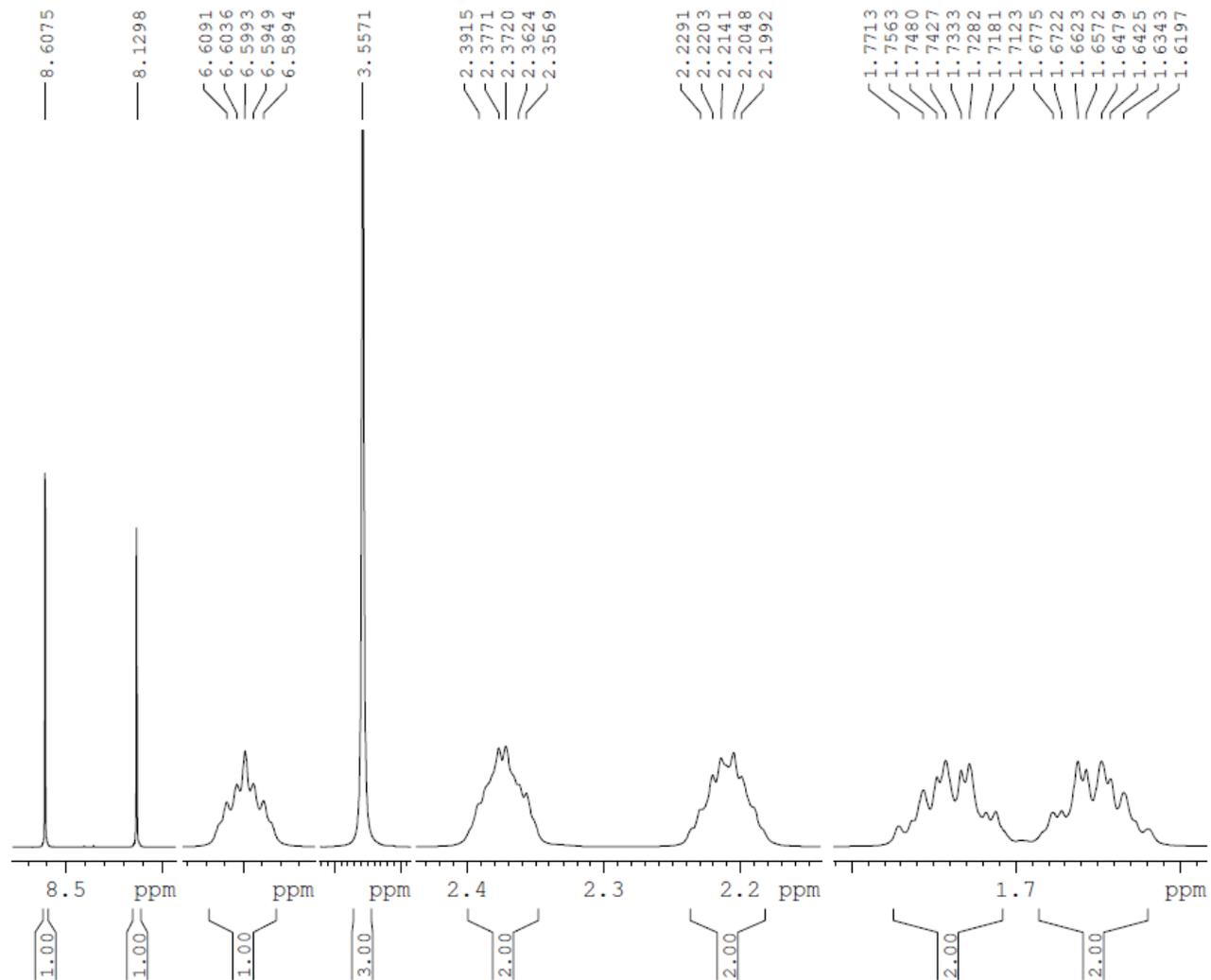
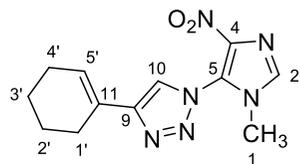


Figura 74: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **41e**.

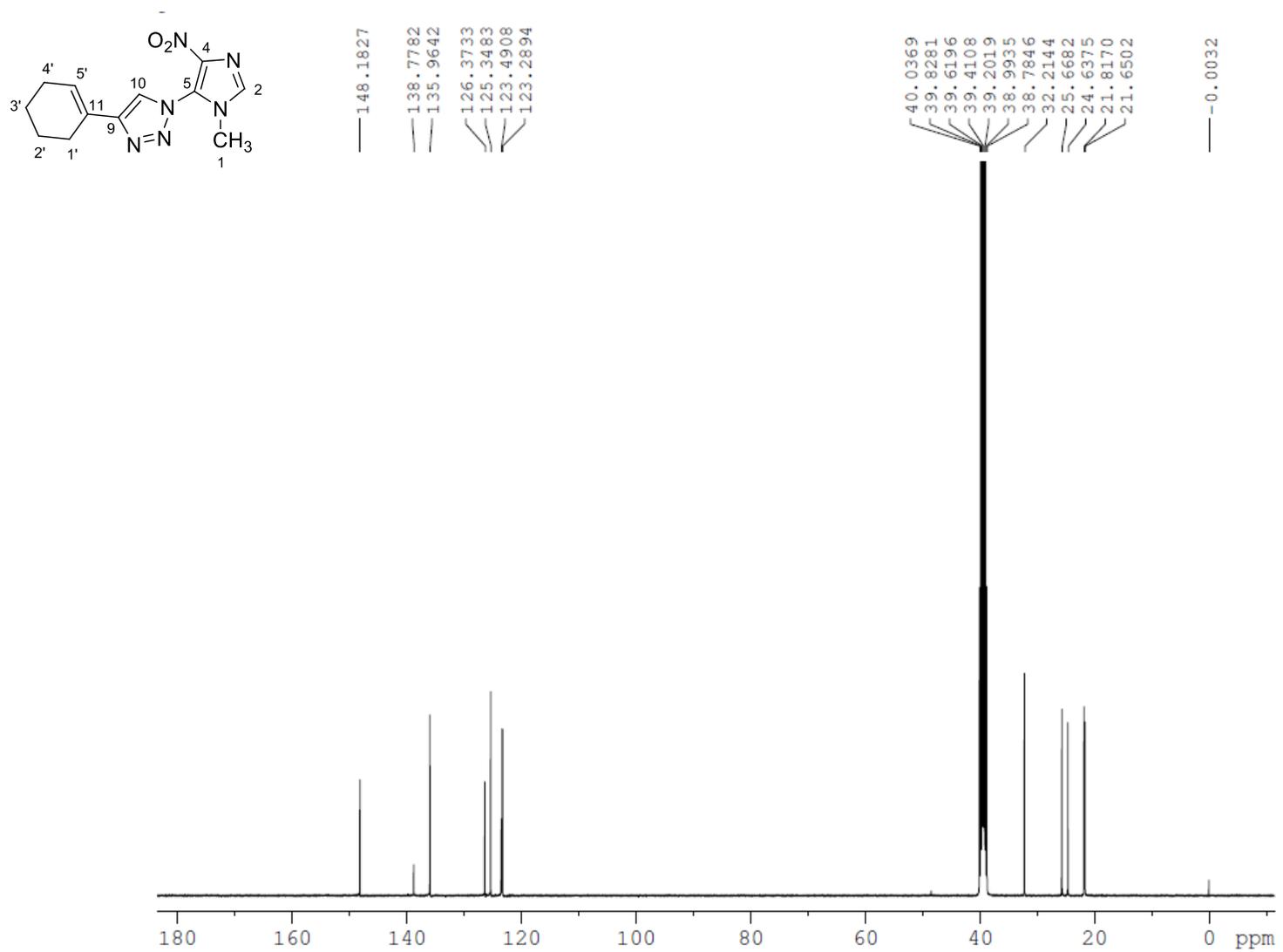


Figura 75: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em DMSO-d_6 de **41e**.

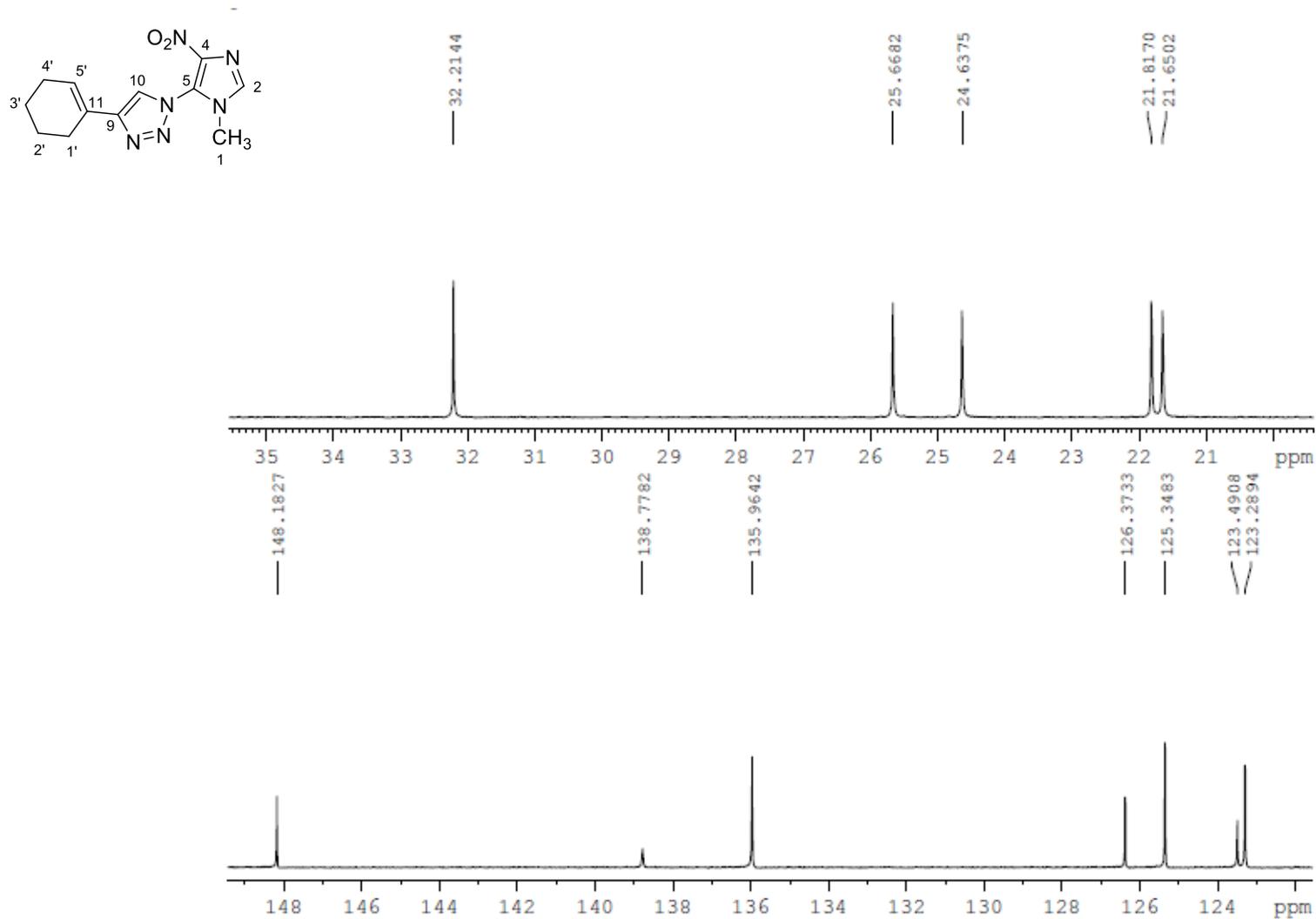


Figura 76: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em DMSO_d_6 de **41e**.

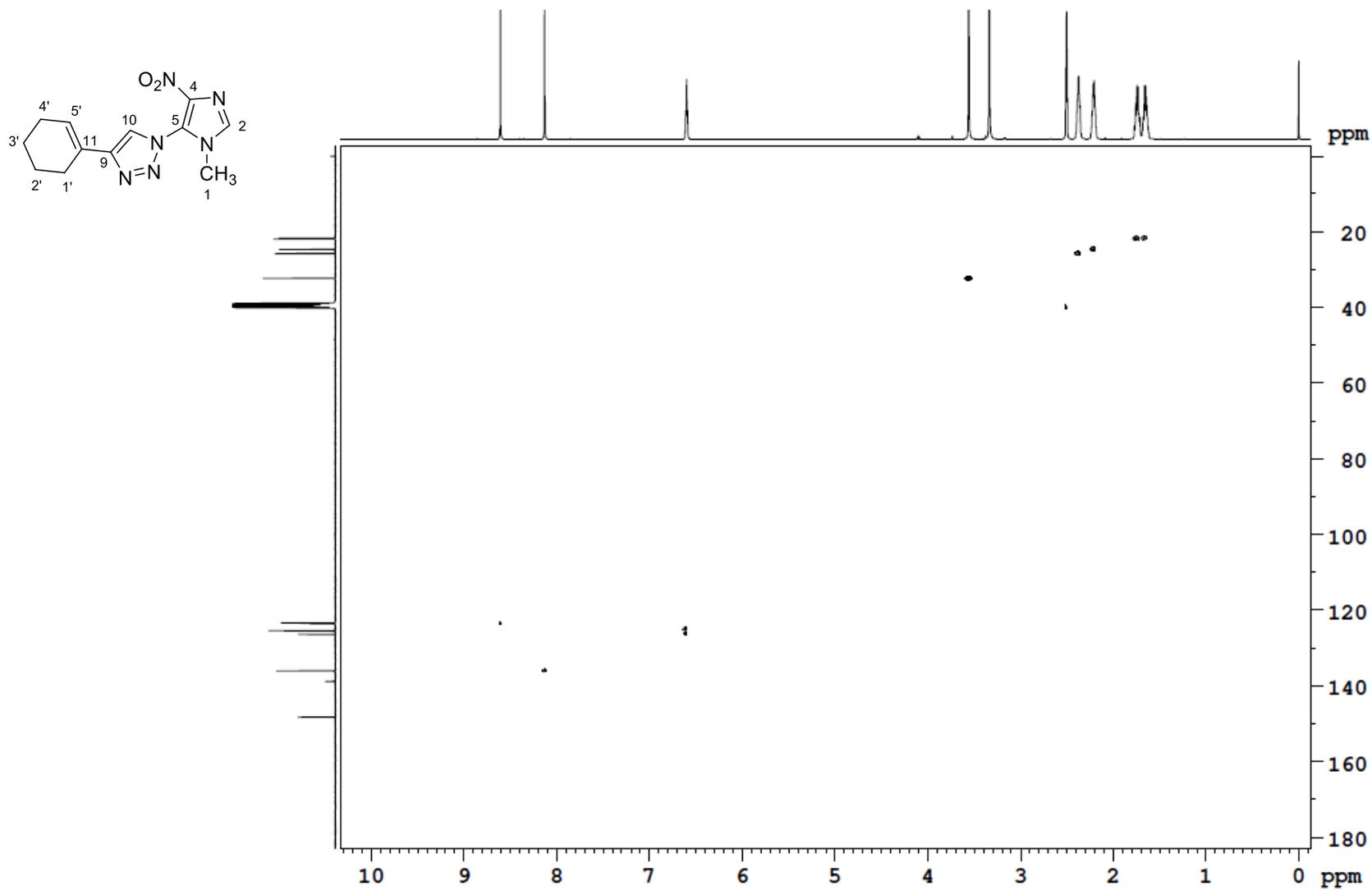


Figura 77: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO-d_6 de 41e.

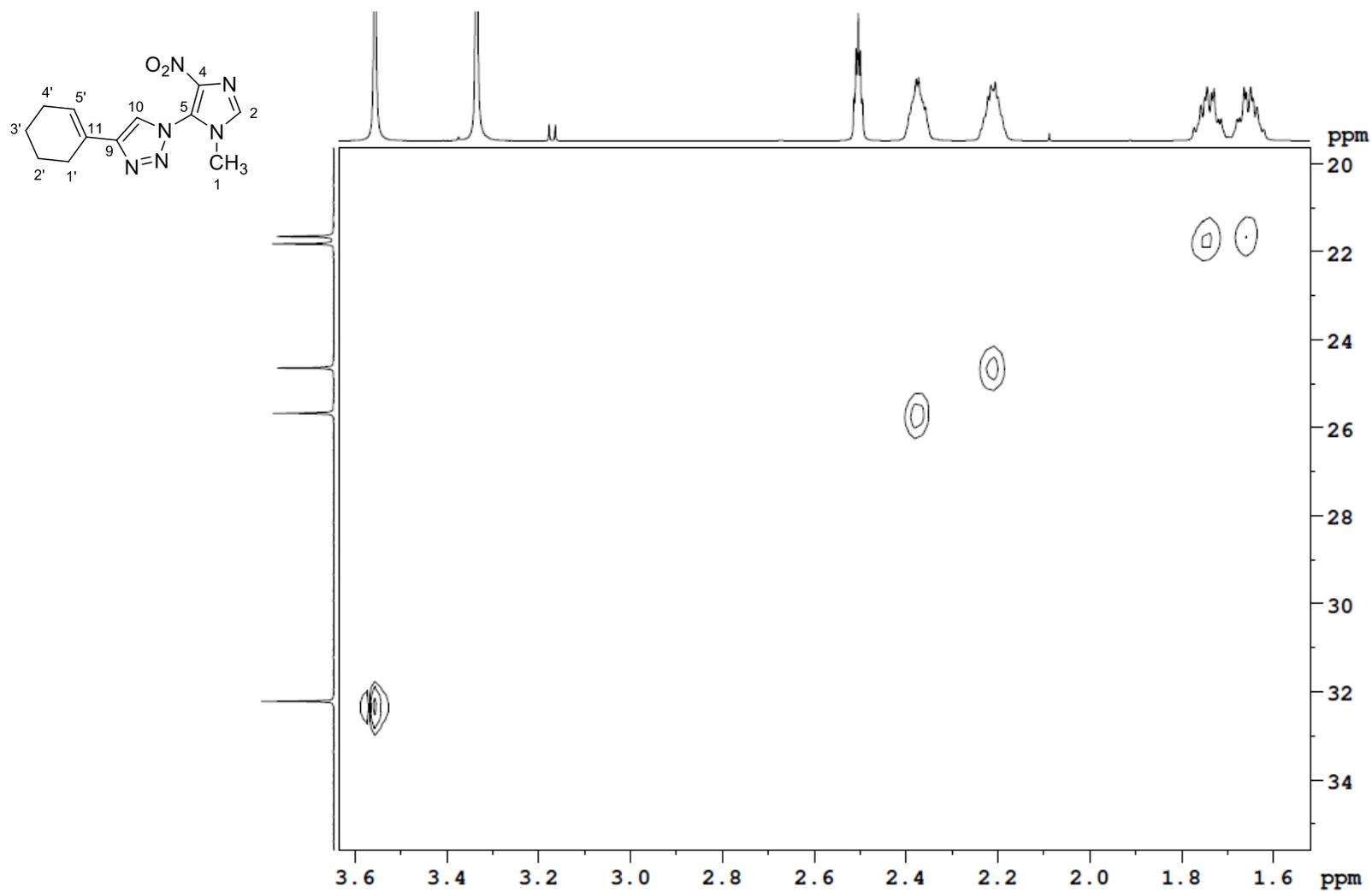


Figura 78: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO₆ de **41e**.

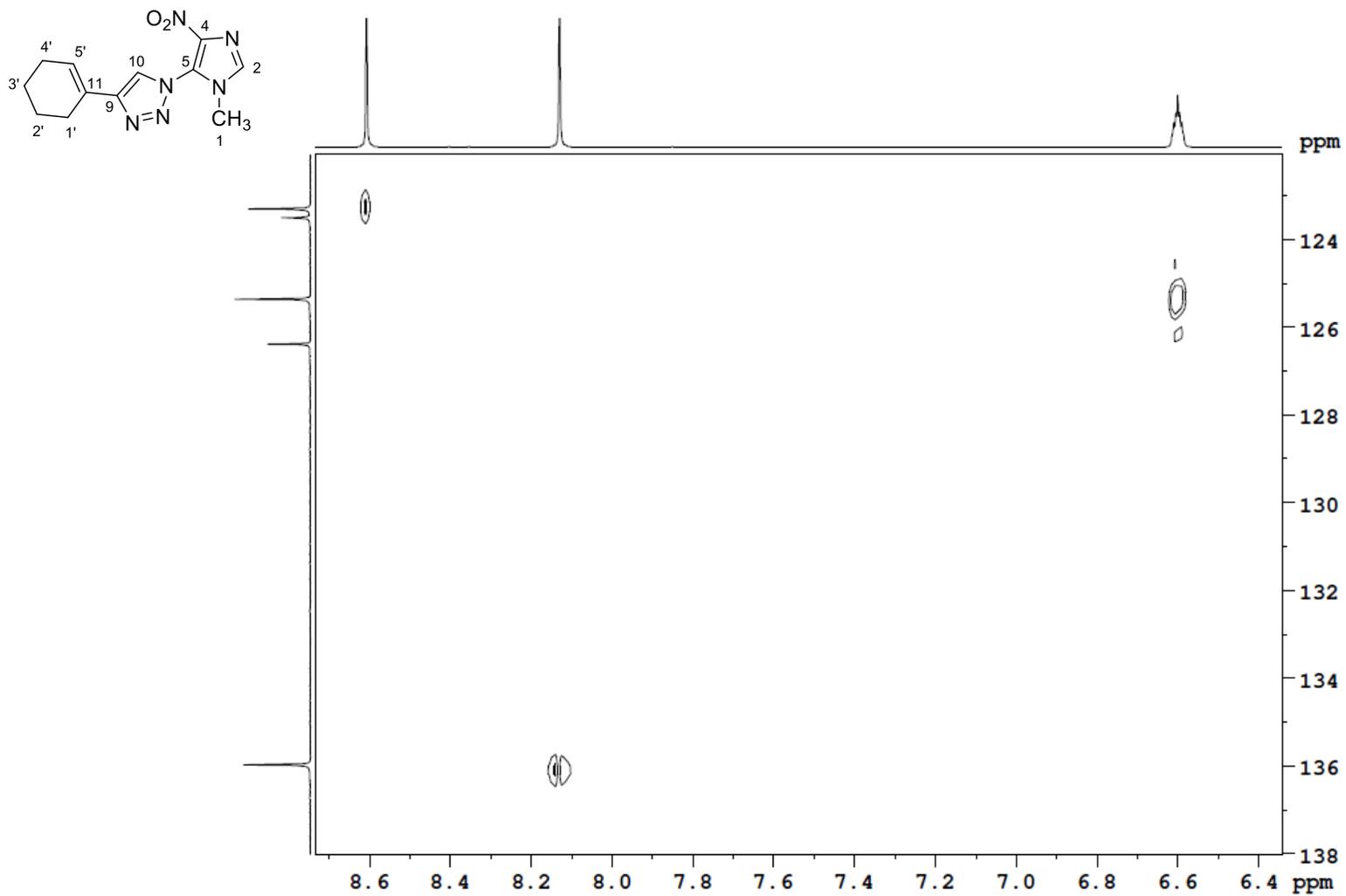


Figura 79: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO₆ de **41e**.

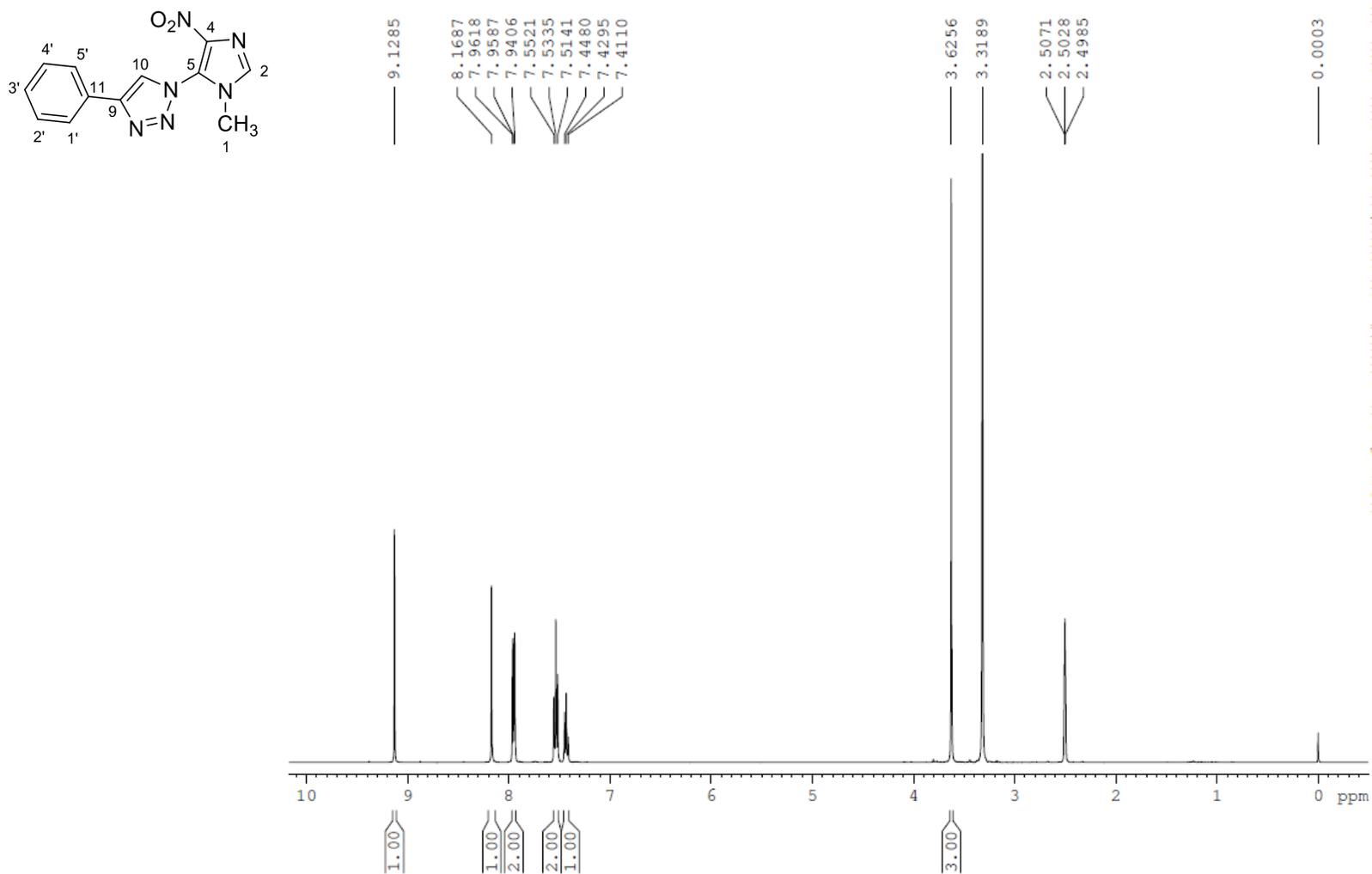


Figura 80: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) em DMSOd₆ de **41f**.

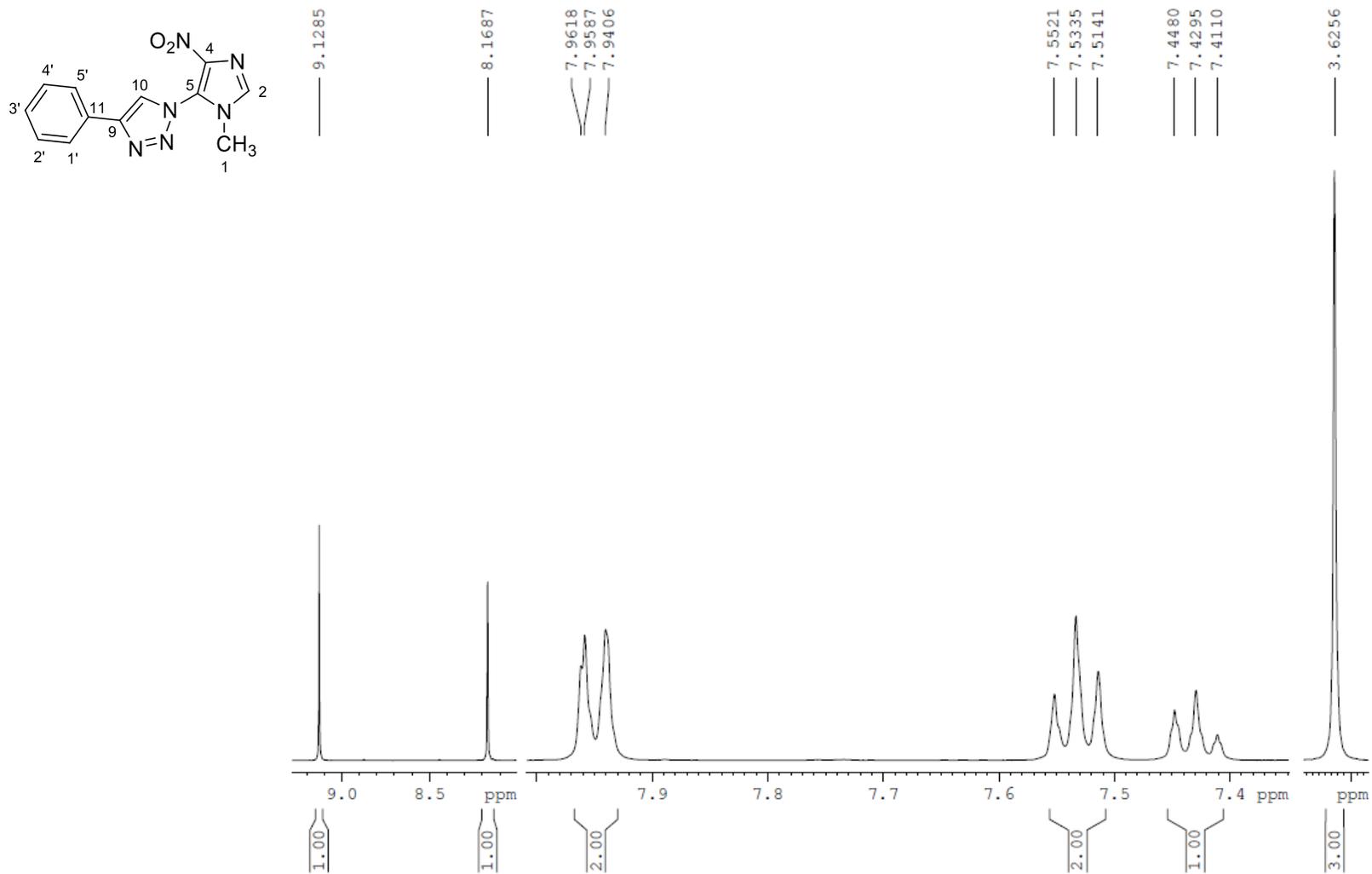


Figura 81: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **41f**.

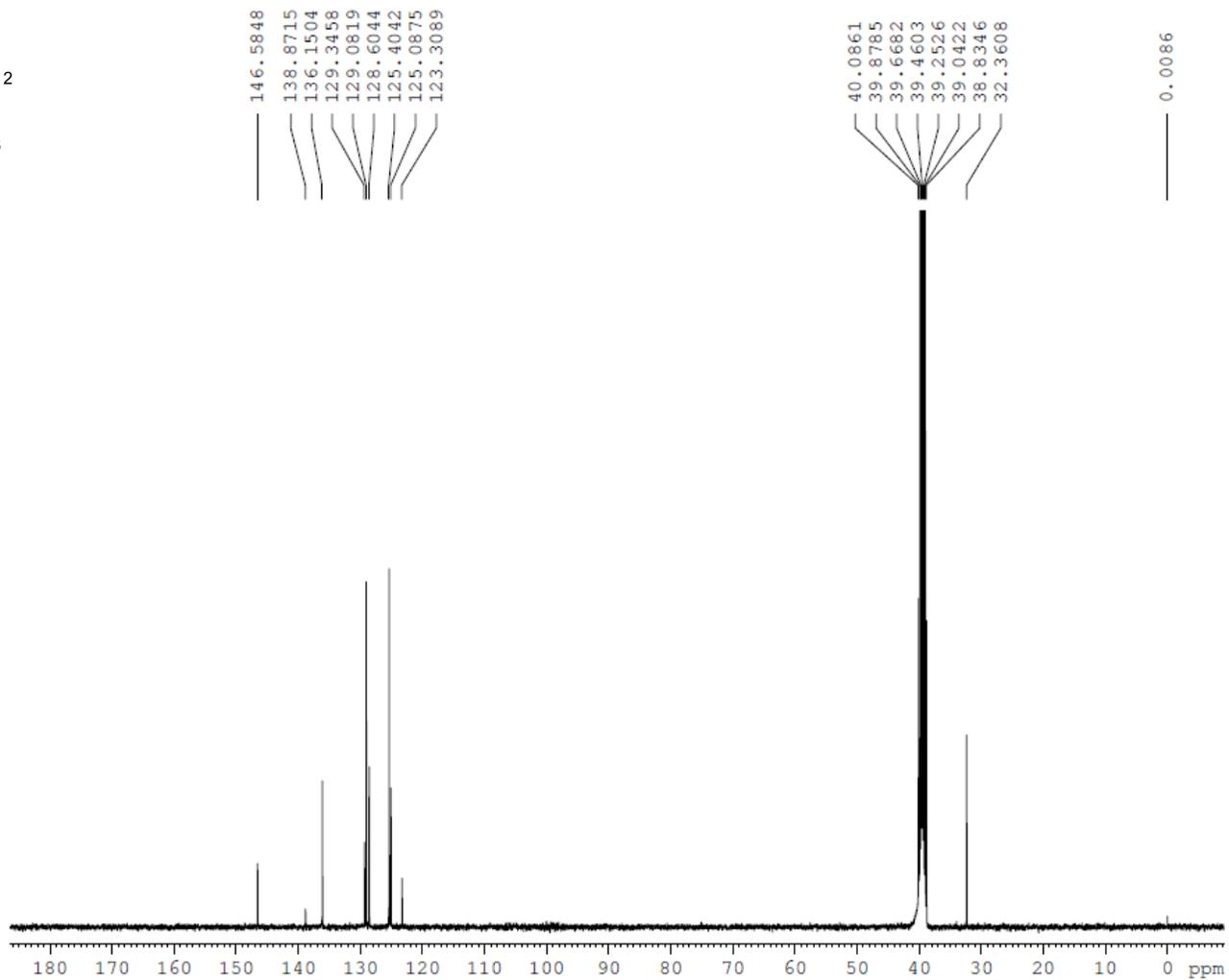
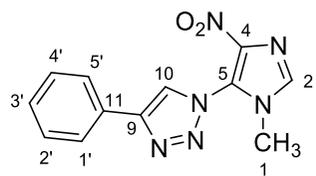


Figura 82: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em DMSO_d_6 de **41f**.

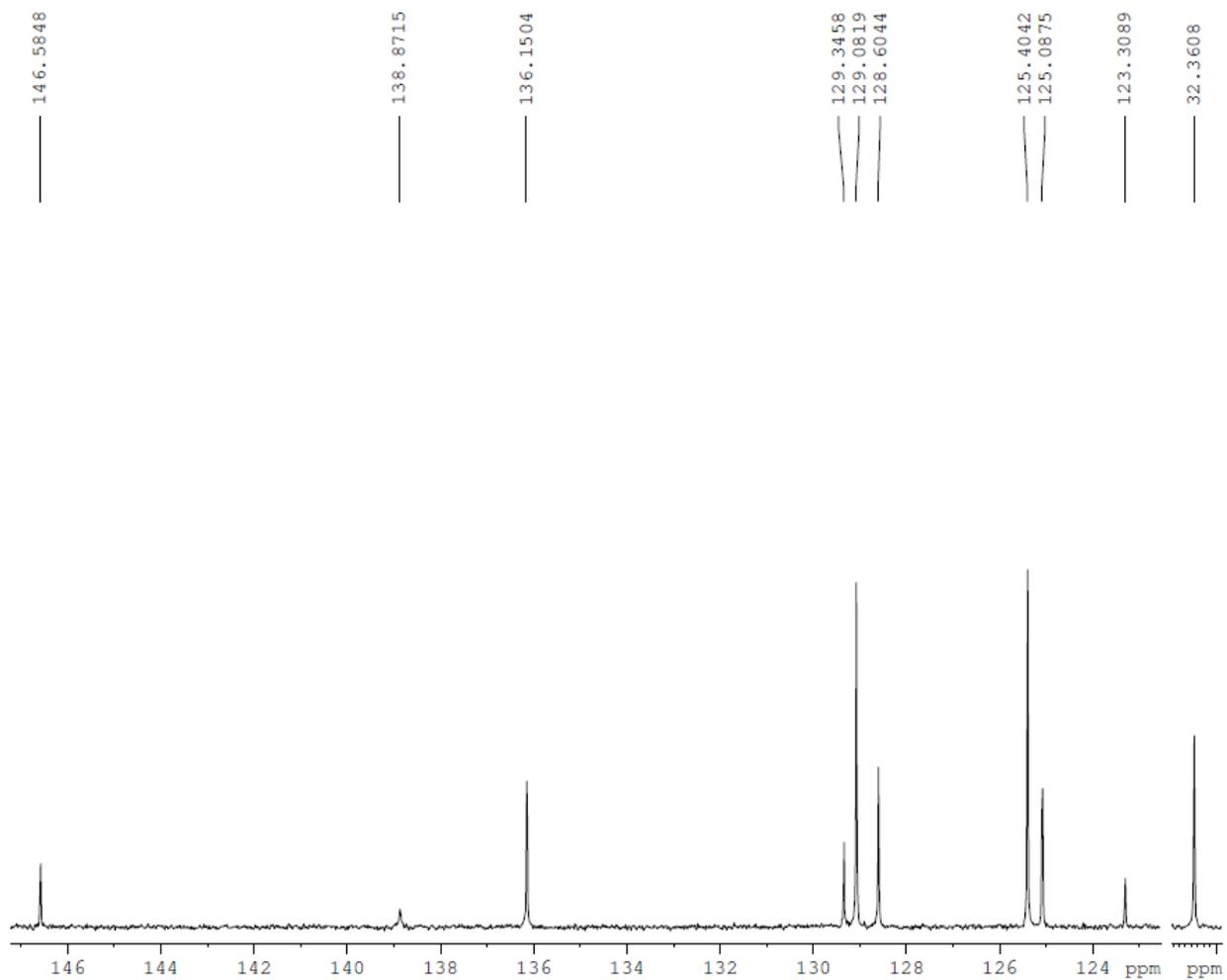
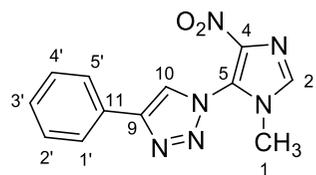


Figura 83: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em DMSO-d_6 de **41f**.

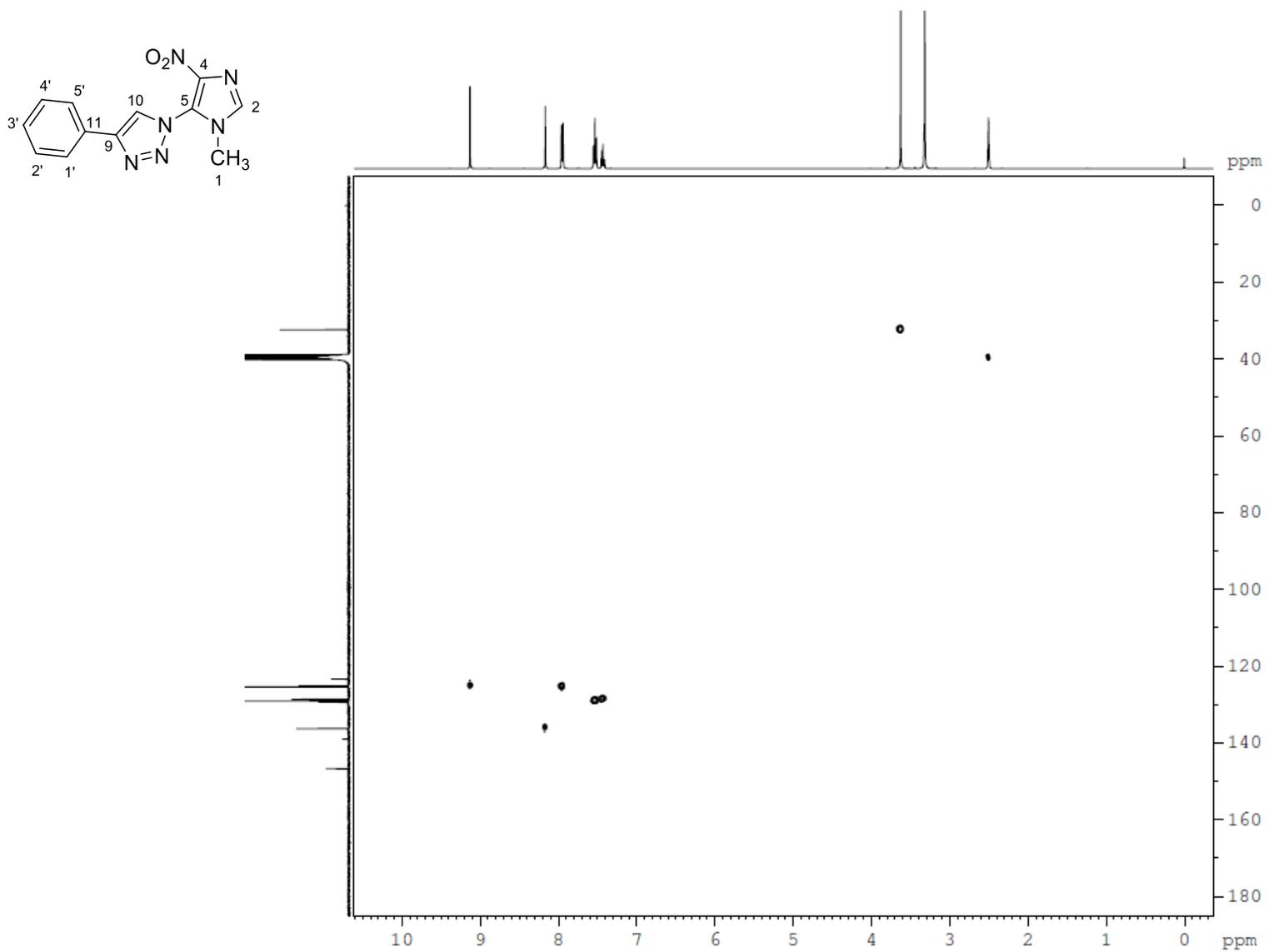


Figura 84: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO₆ de **41f**.

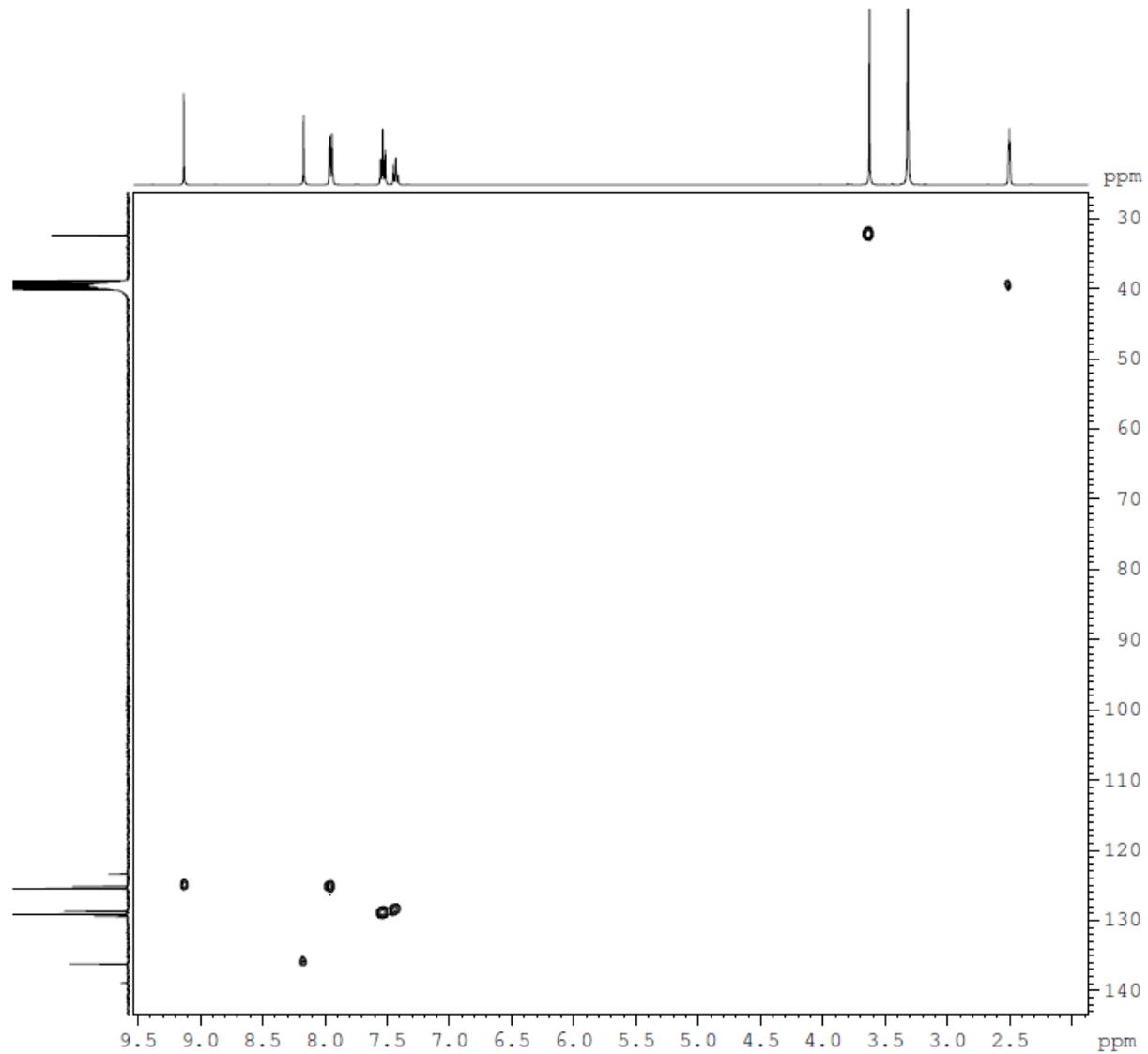
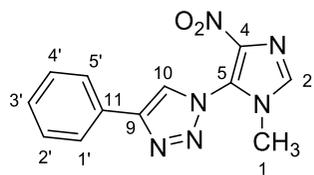


Figura 85: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO₆ de **41f**.

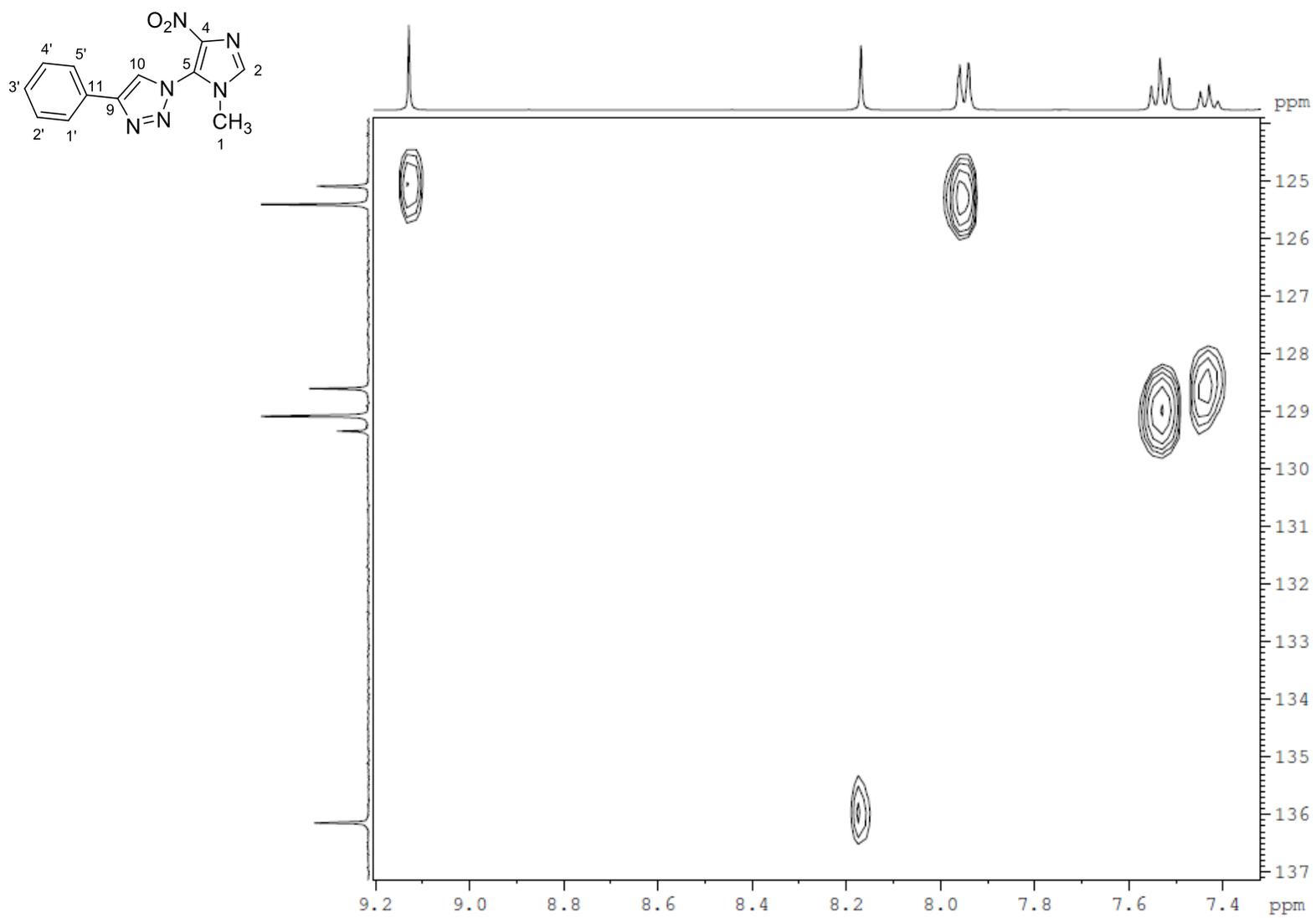


Figura 86: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO₆ de **41f**.

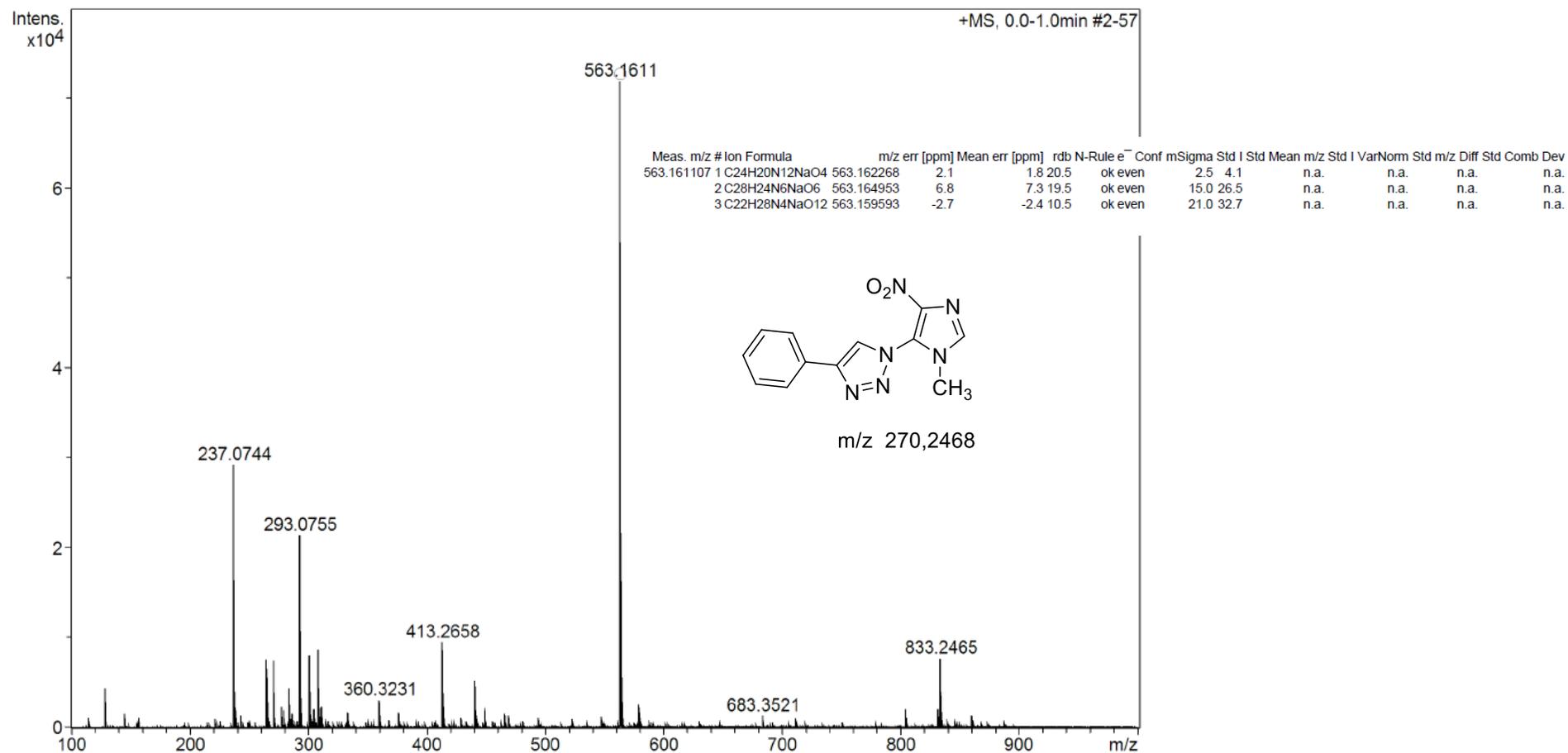


Figura 87: Espectro de Massa de alta resolução do composto **41f**.

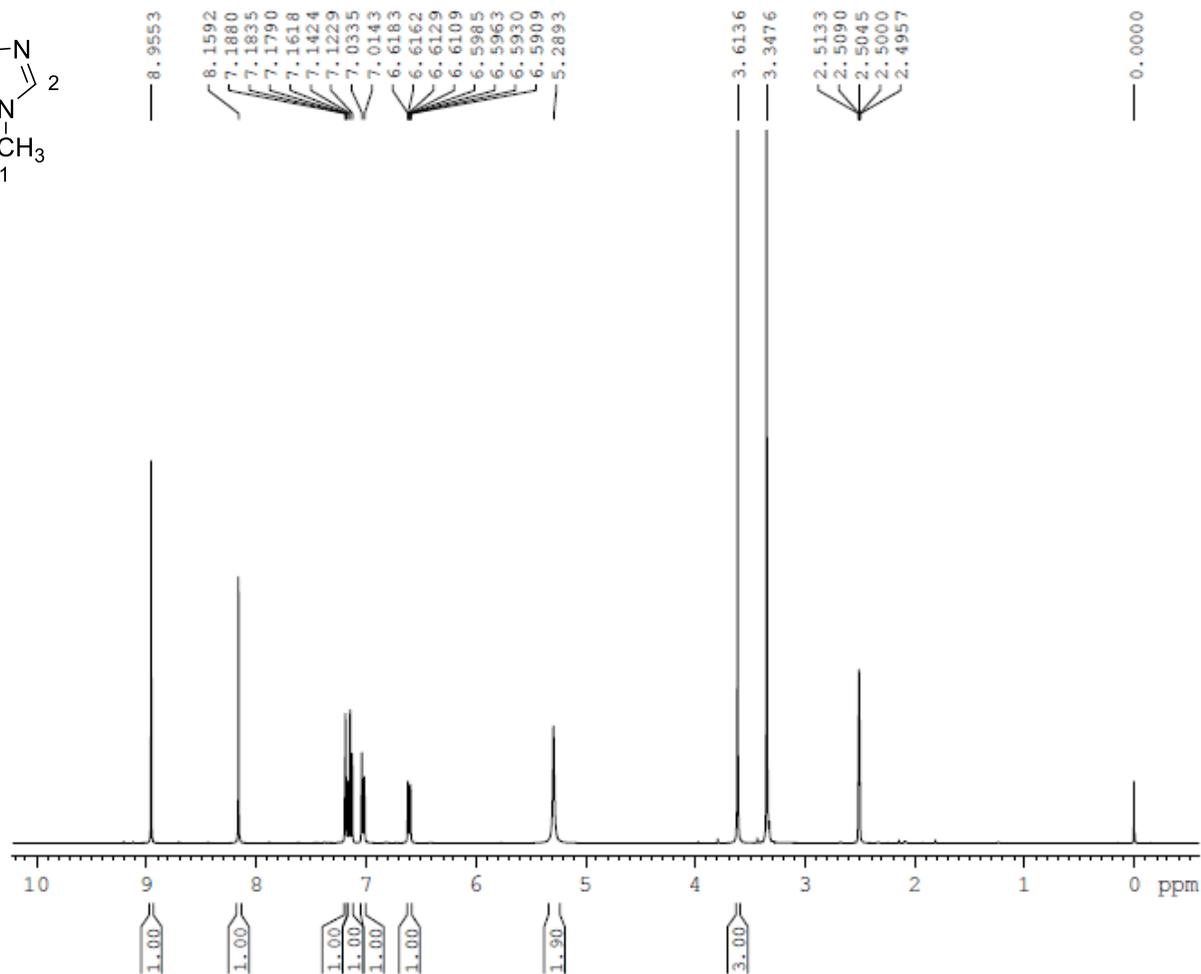
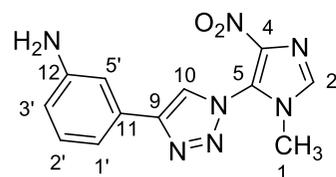


Figura 88: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **41g**.

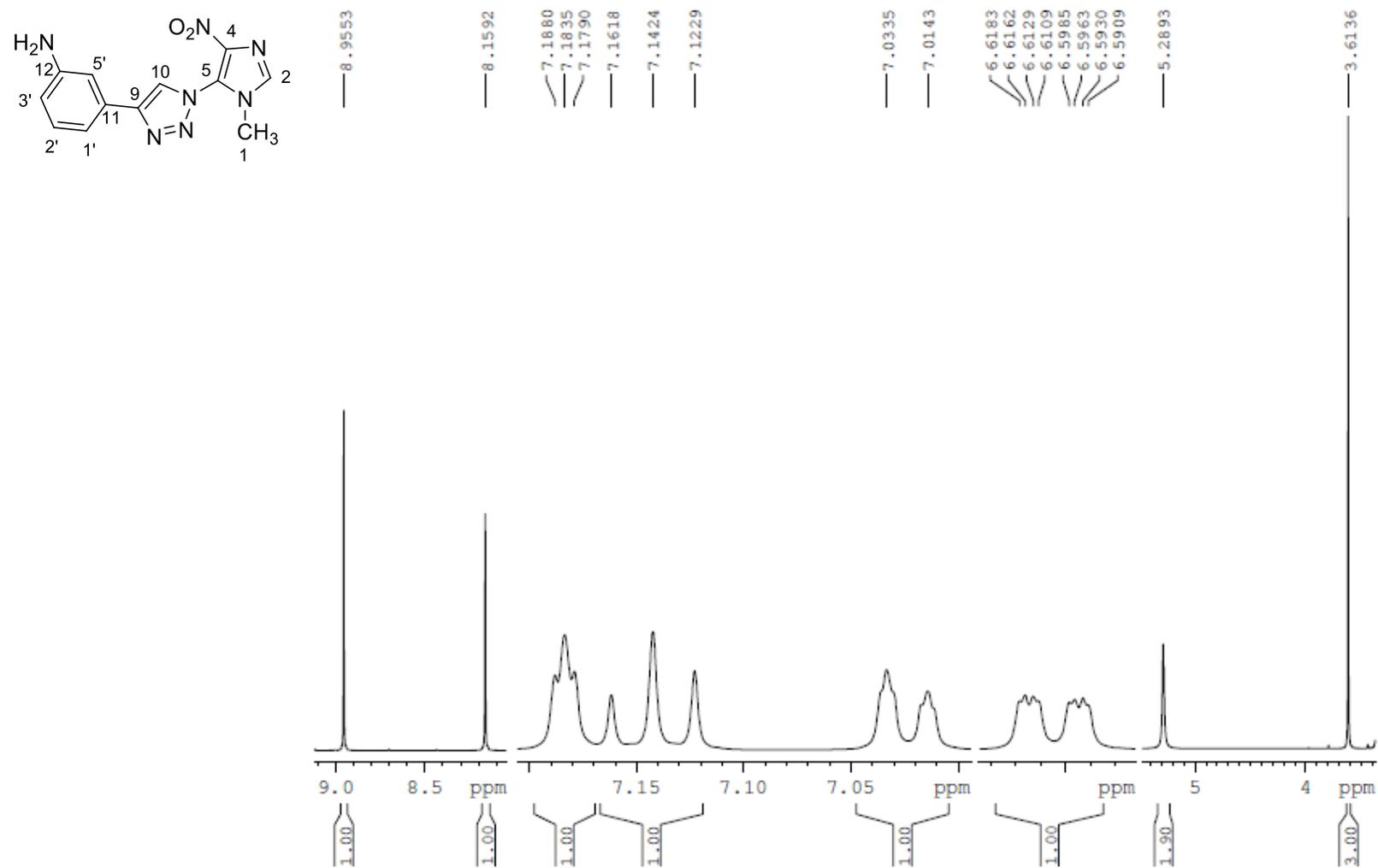


Figura 89: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) em DMSOd₆ de **41g**.

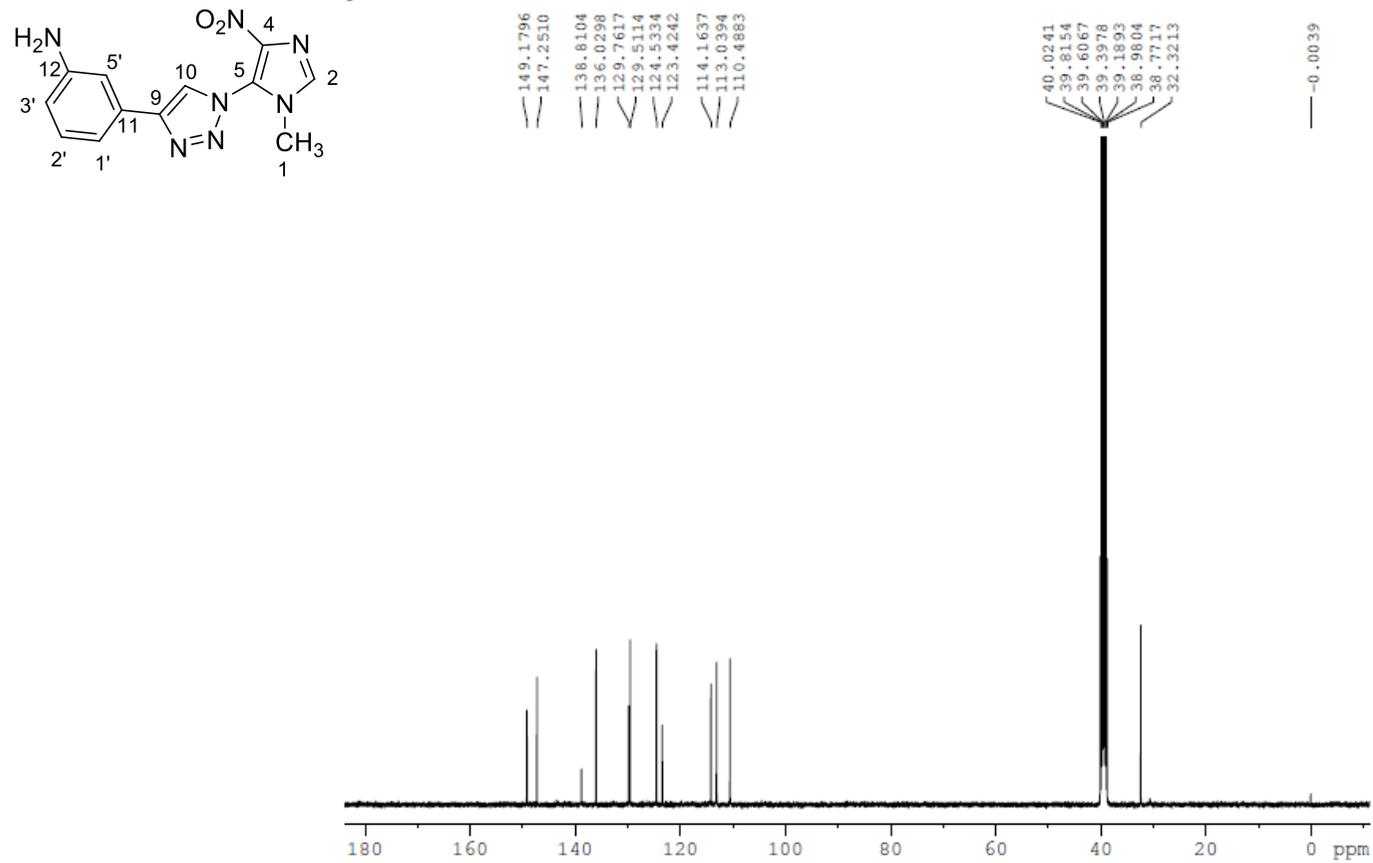


Figura 90: Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz) em DMSOd₆ de **41g**.

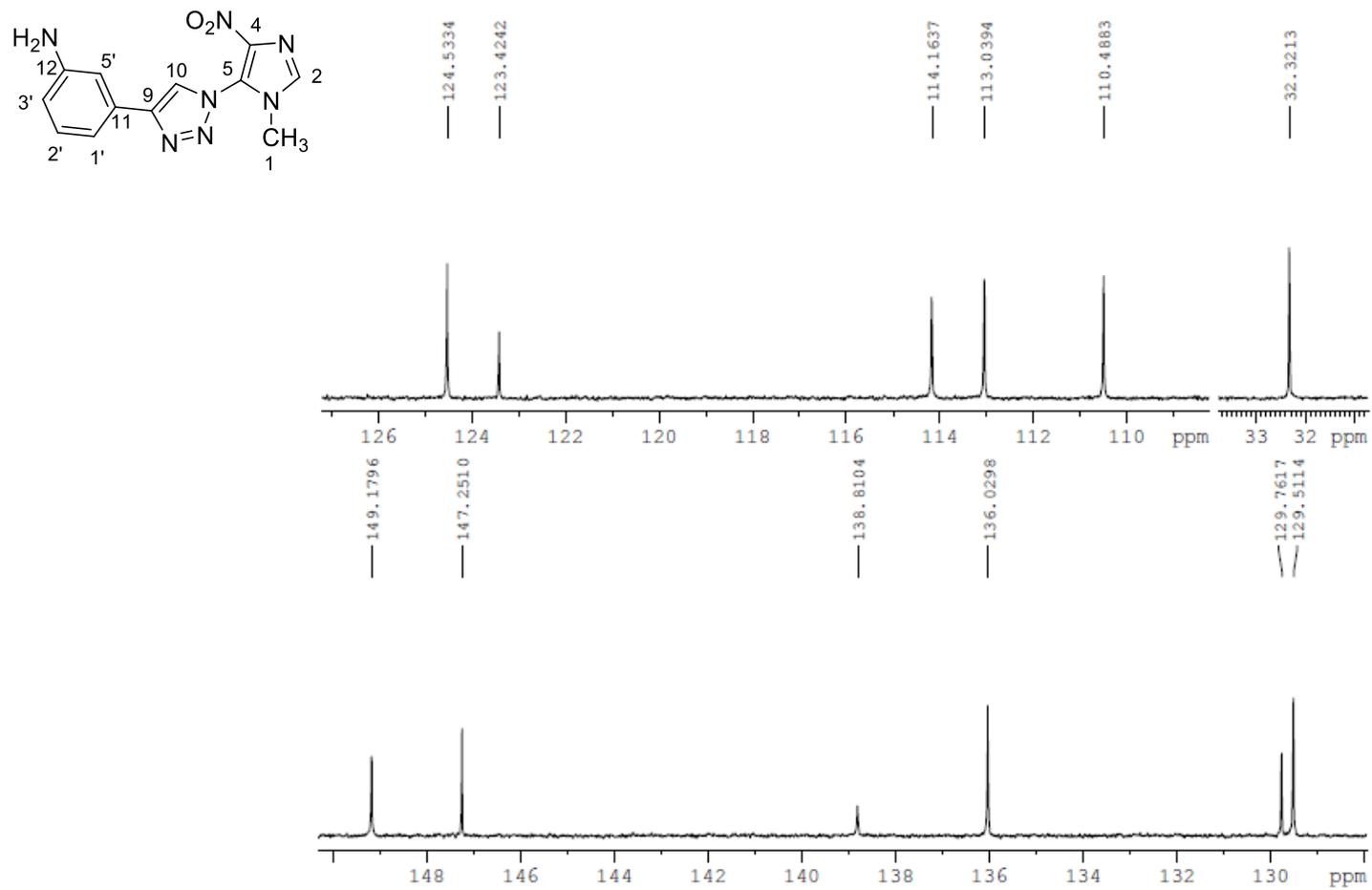


Figura 91: Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz) em DMSO₆ de **41g**.

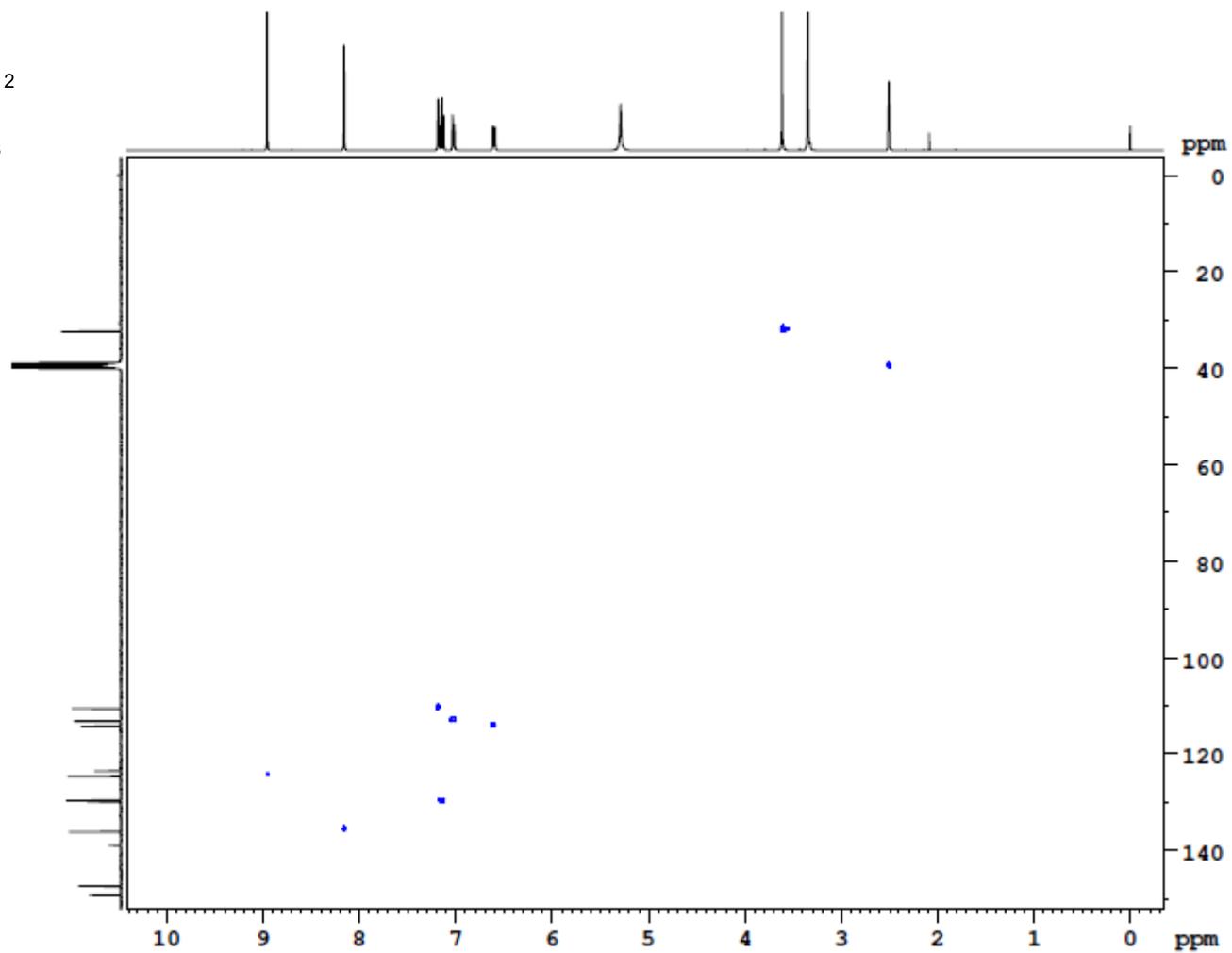
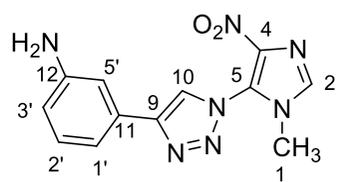


Figura 92: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO₆ de **41g**.

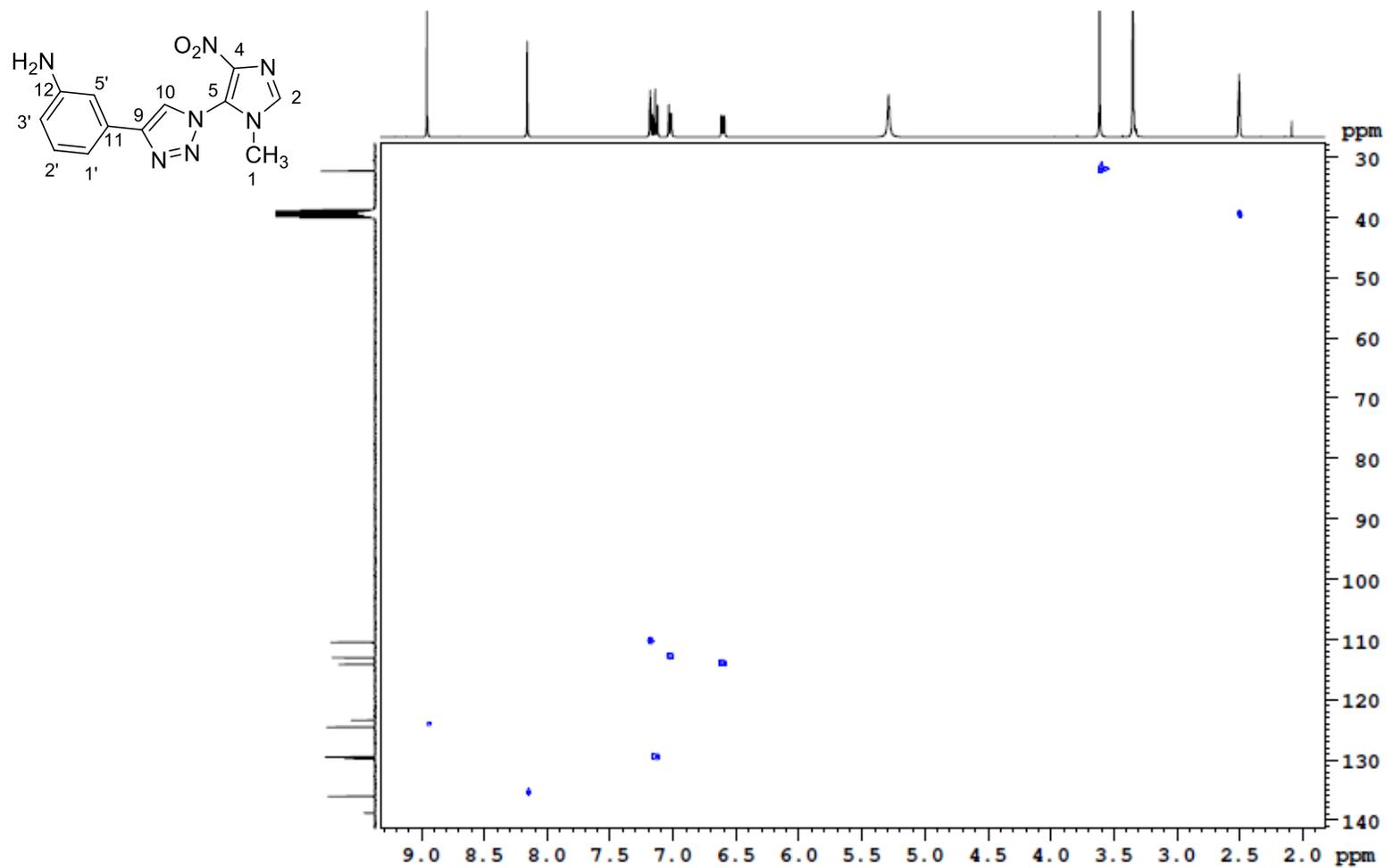


Figura 93: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO₆ de 41g.

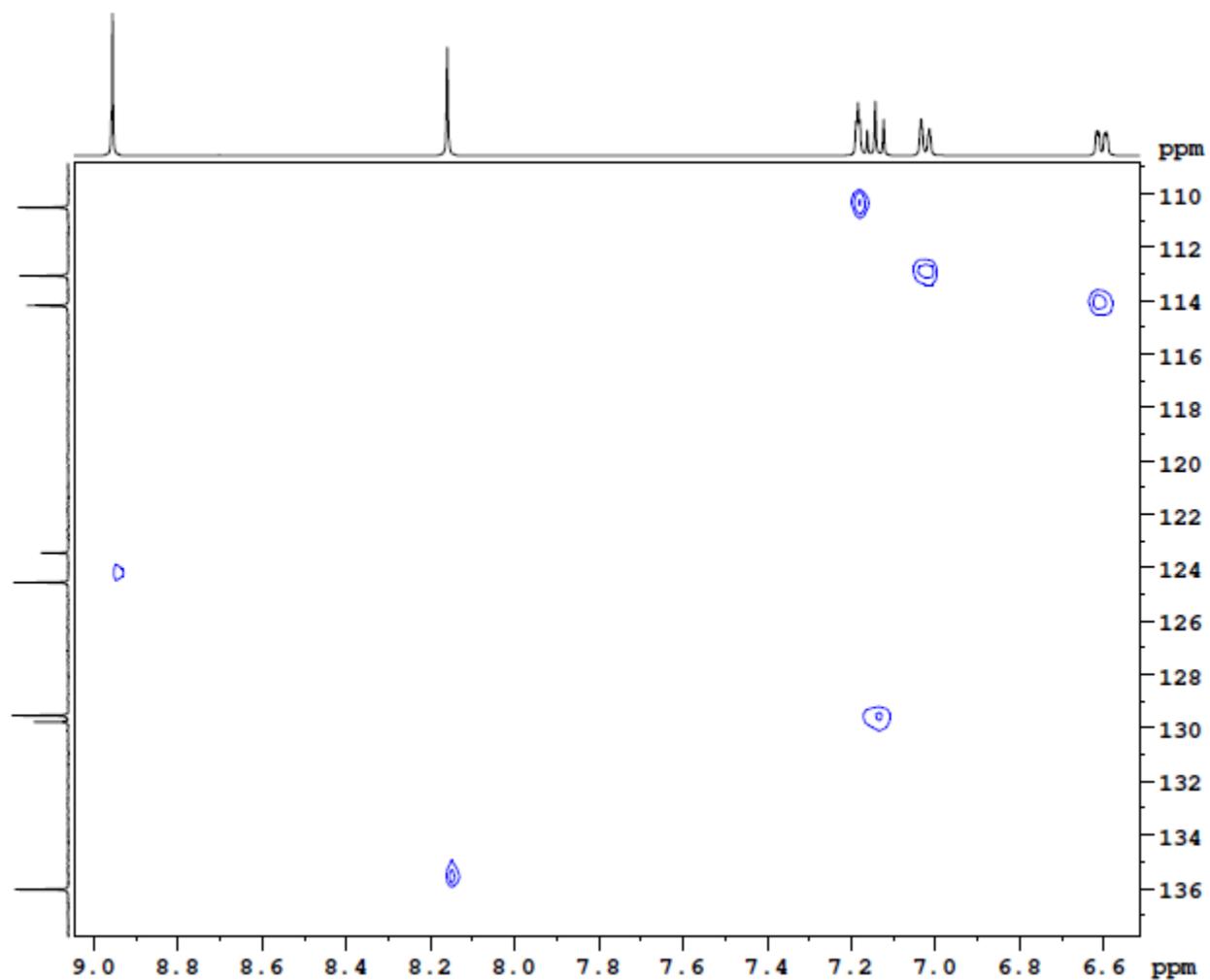
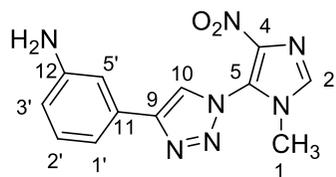


Figura 94: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO₆ de **41g**.

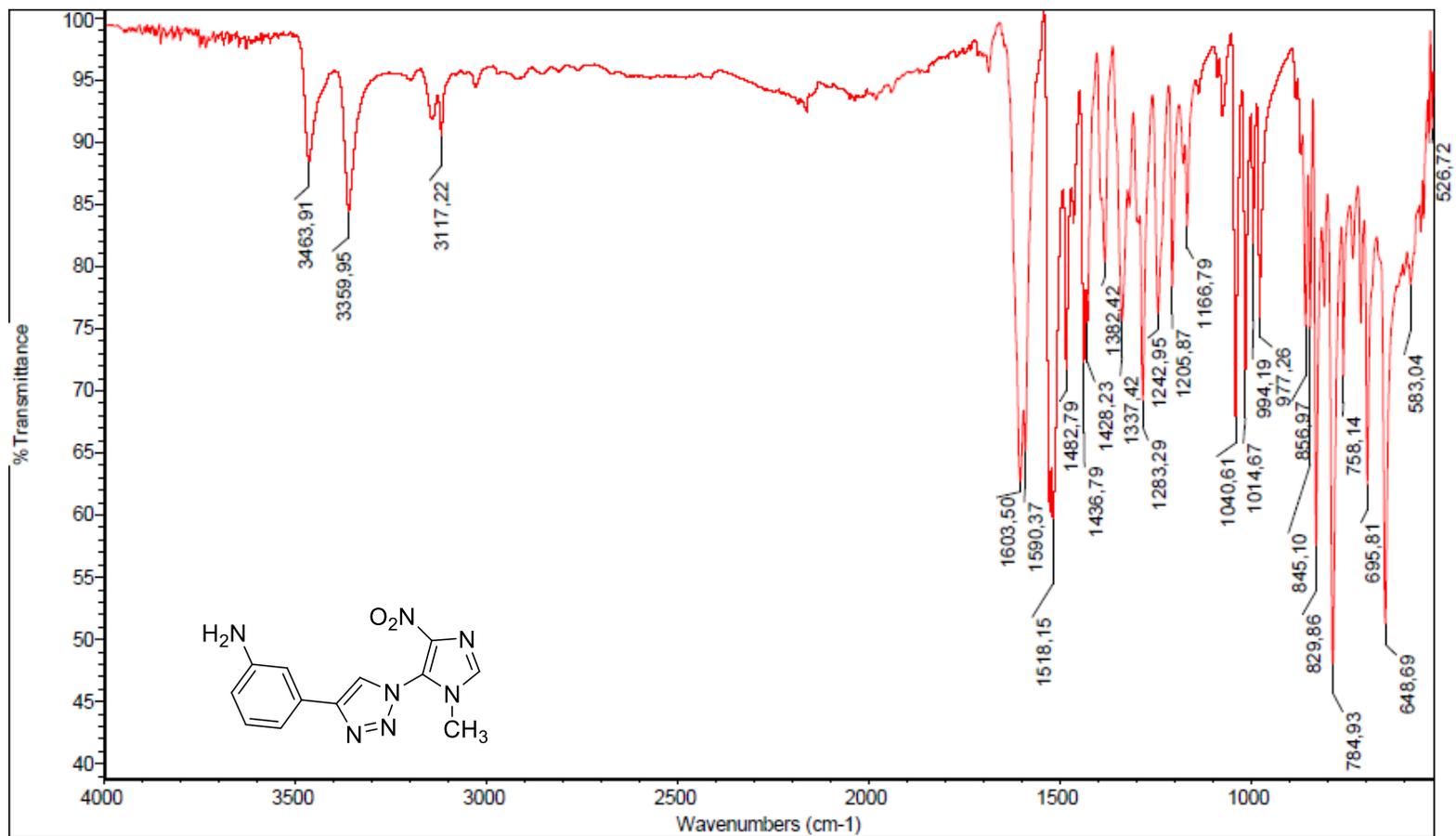


Figura 95: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto **41g** em ATR.

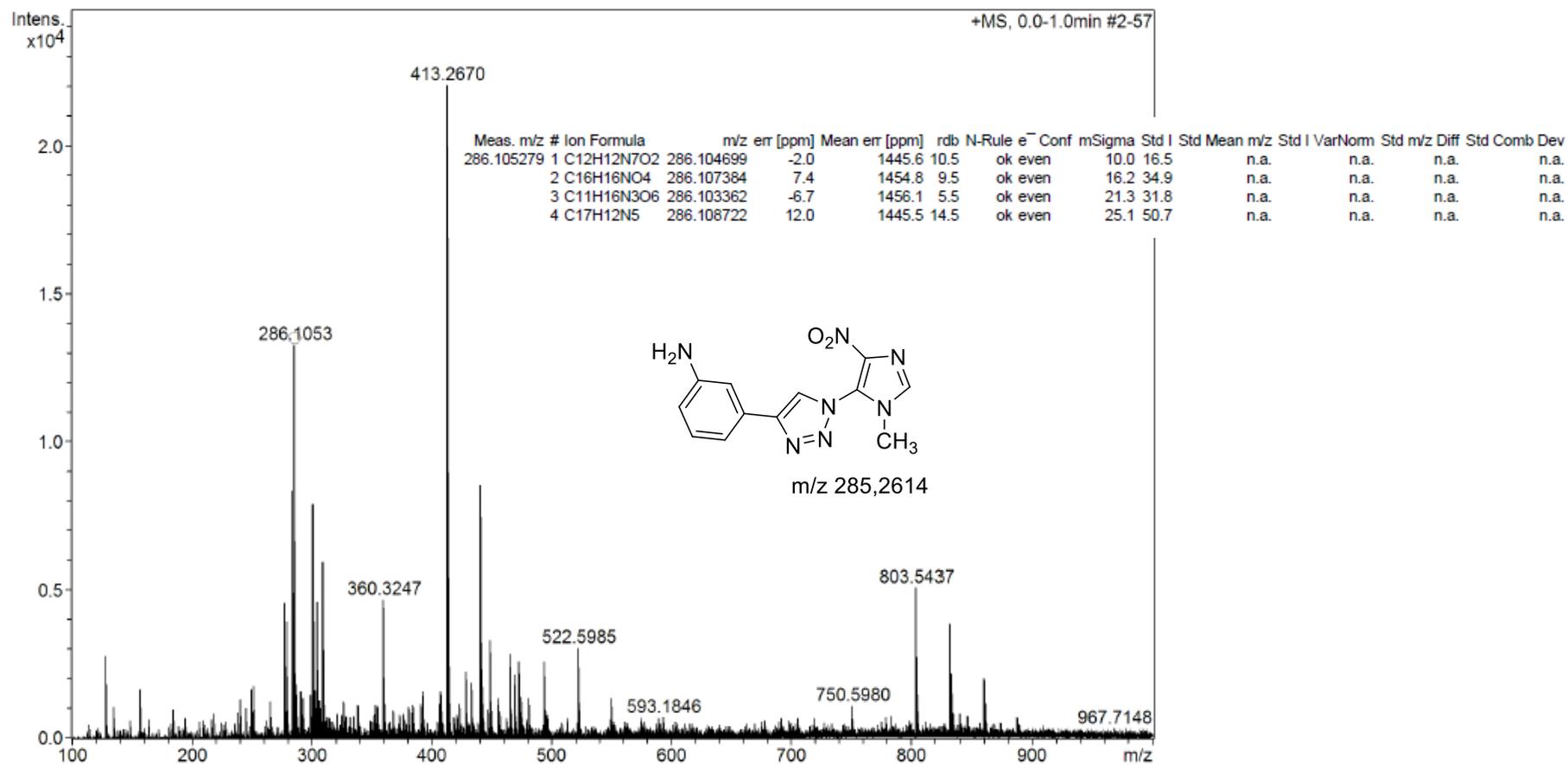


Figura 96: Espectro de Massa de alta resolução do composto **41g**.

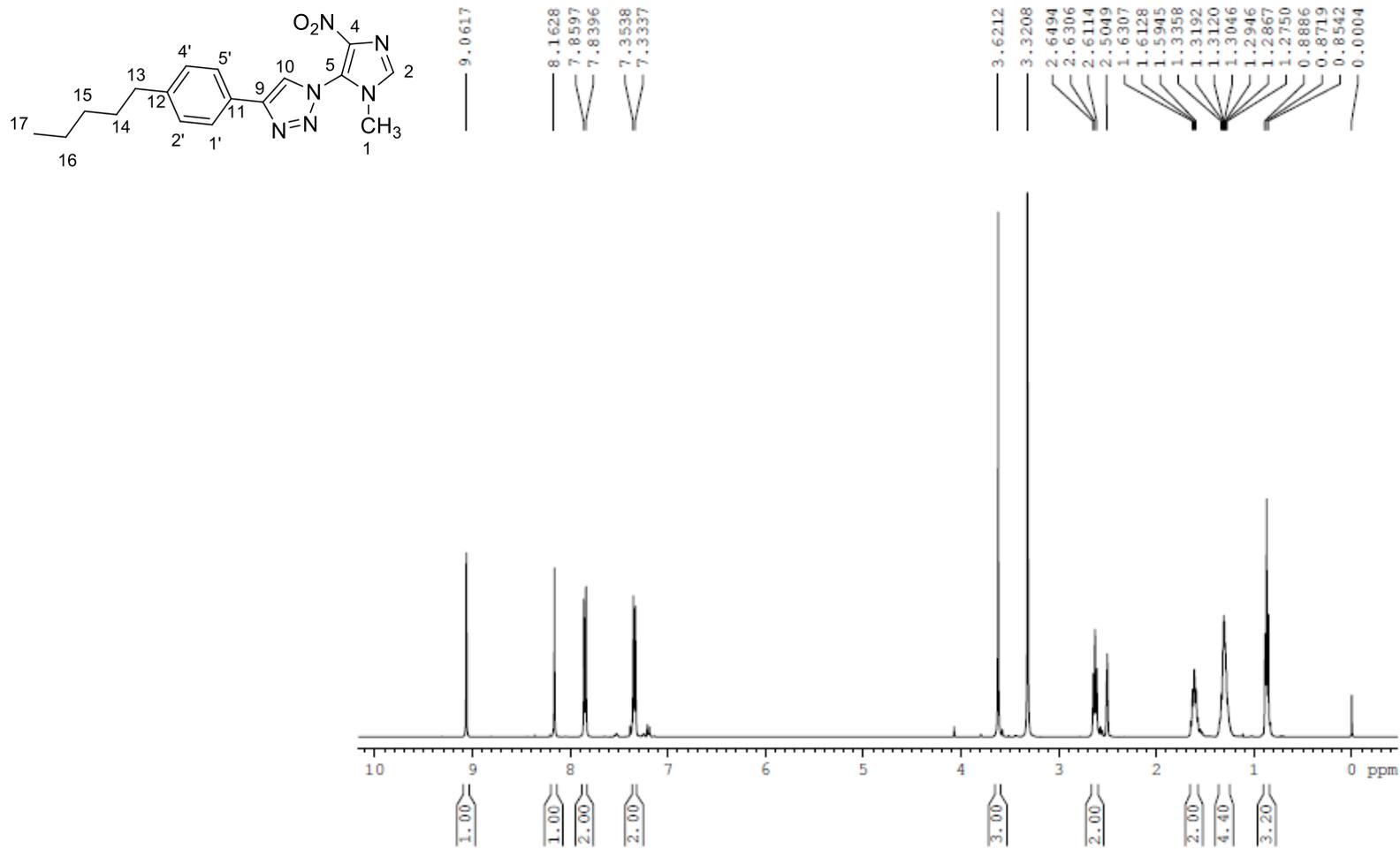


Figura 97: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) em DMSO₆ de **41h**.

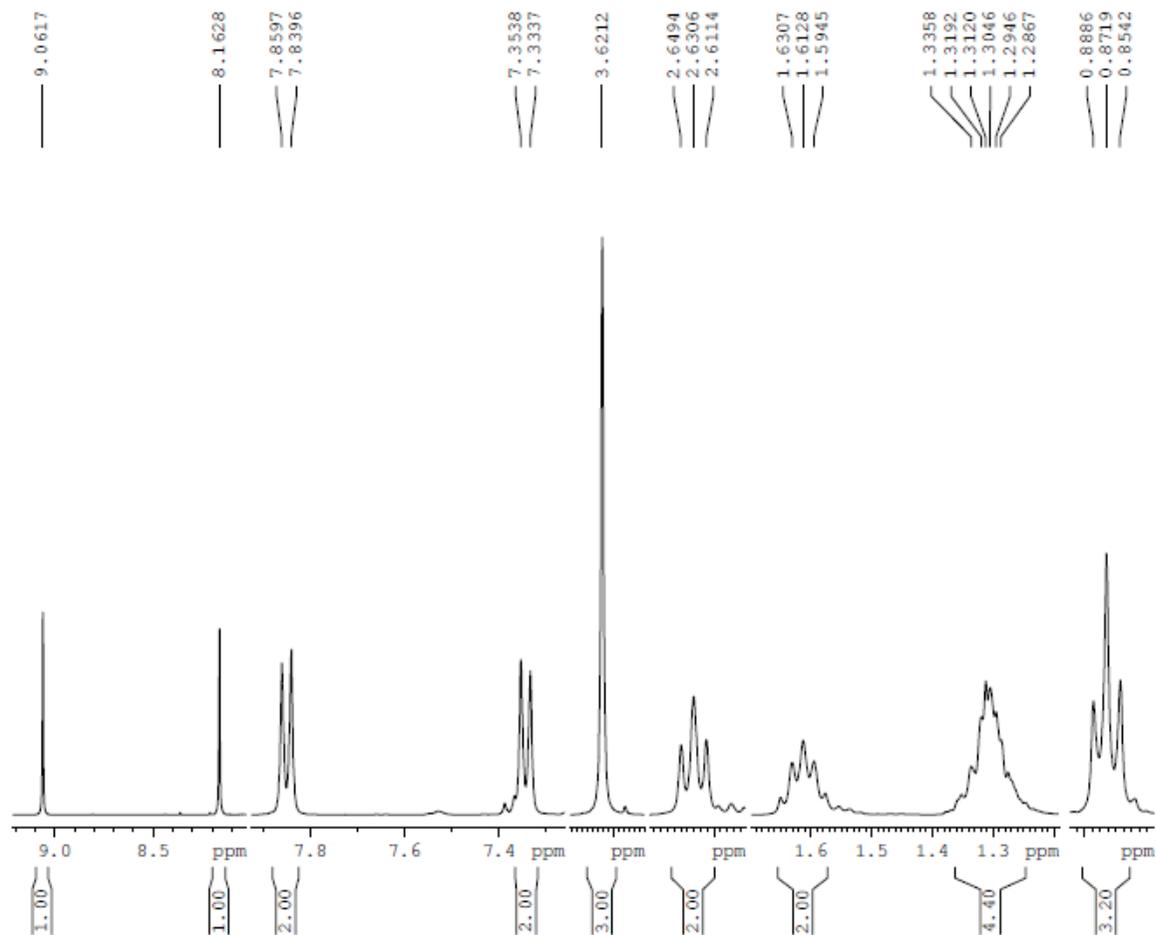
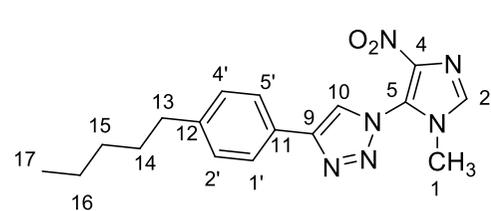


Figura 98: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em DMSO_d_6 de **41h**.

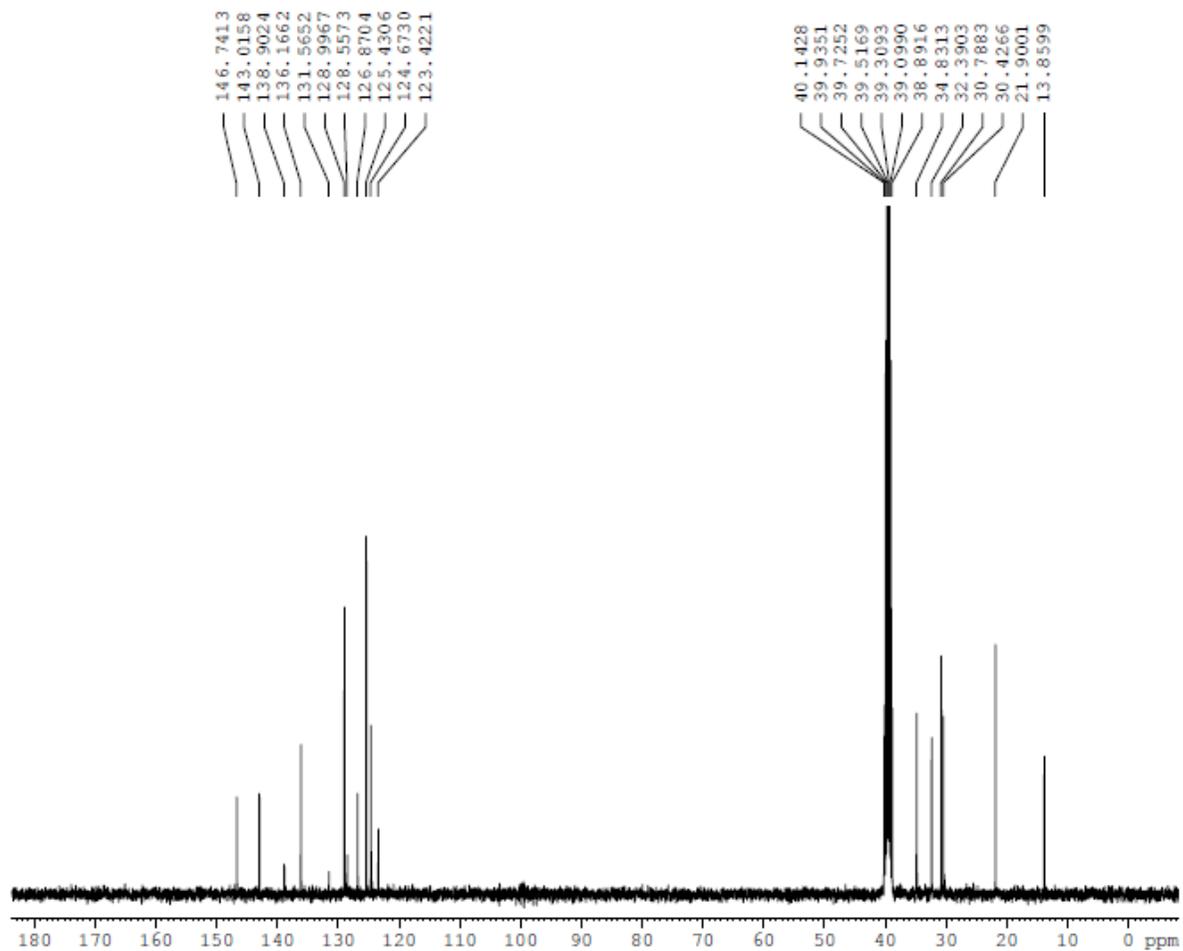
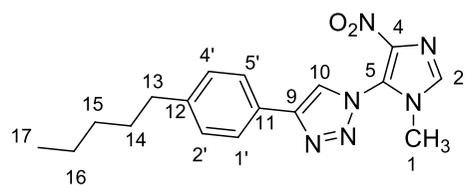


Figura 99: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em DMSO-d_6 de **41h**.

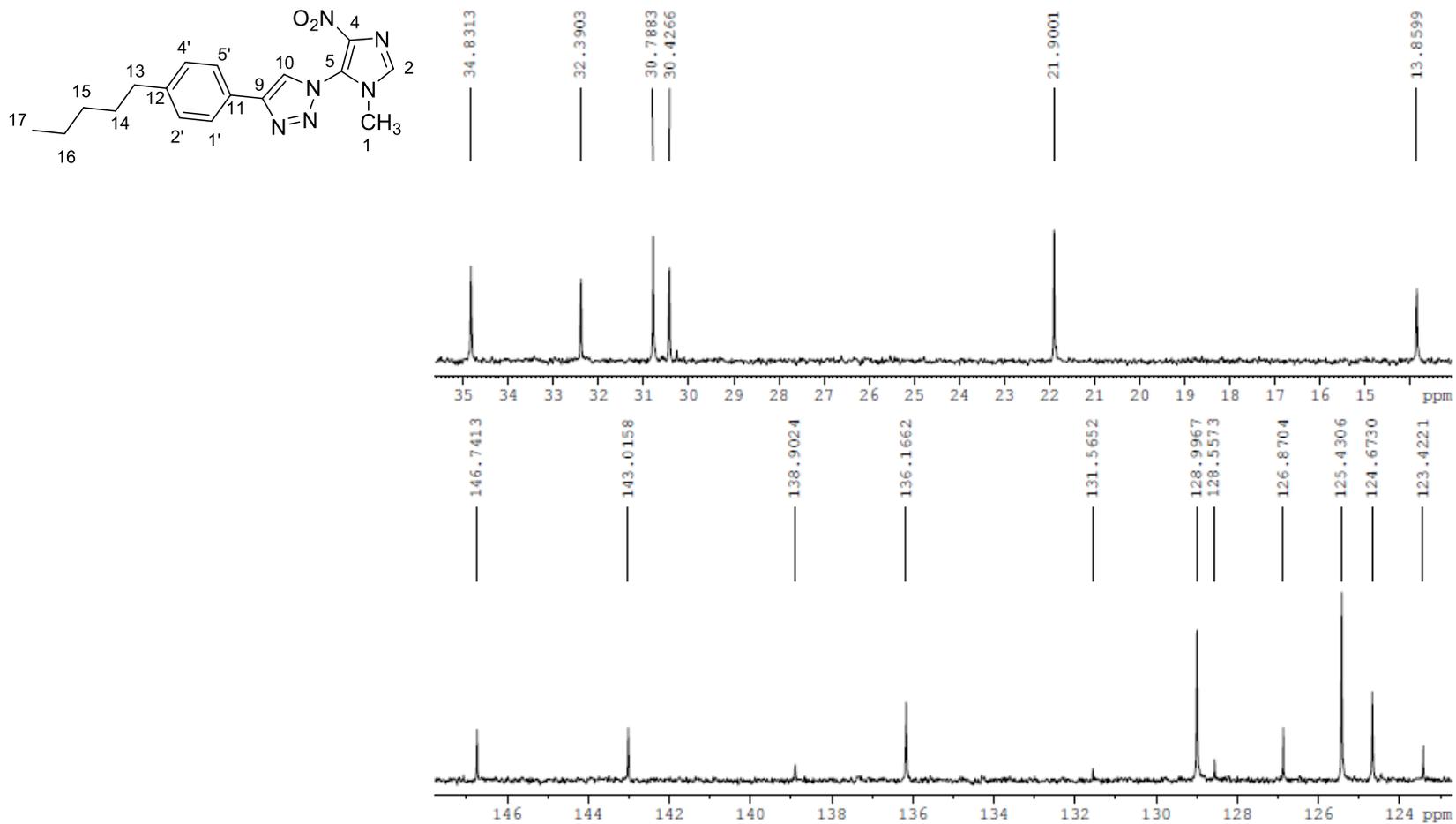


Figura 100: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) em DMSO_d_6 de **41h**.

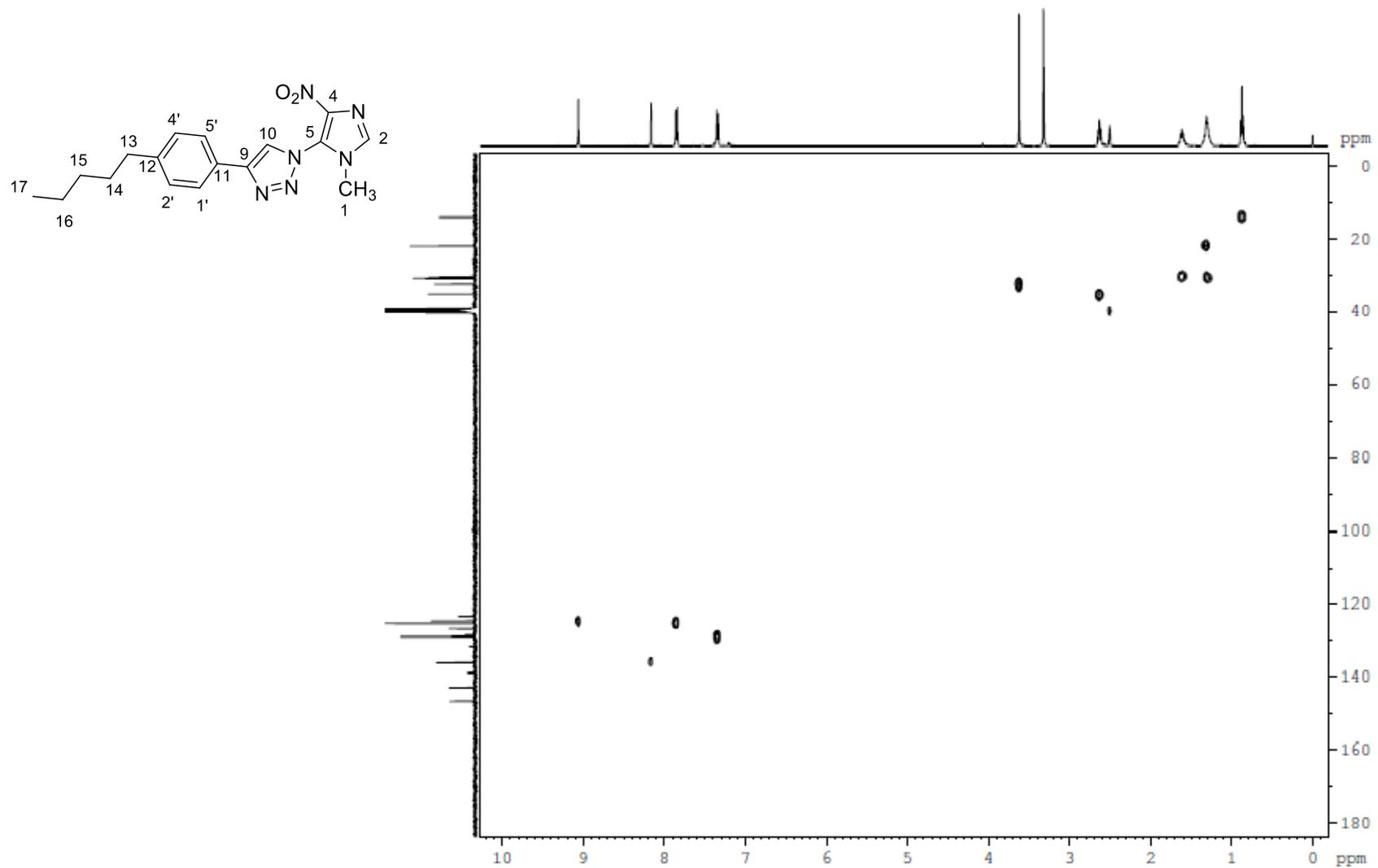


Figura 101: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO₆ de 41h.

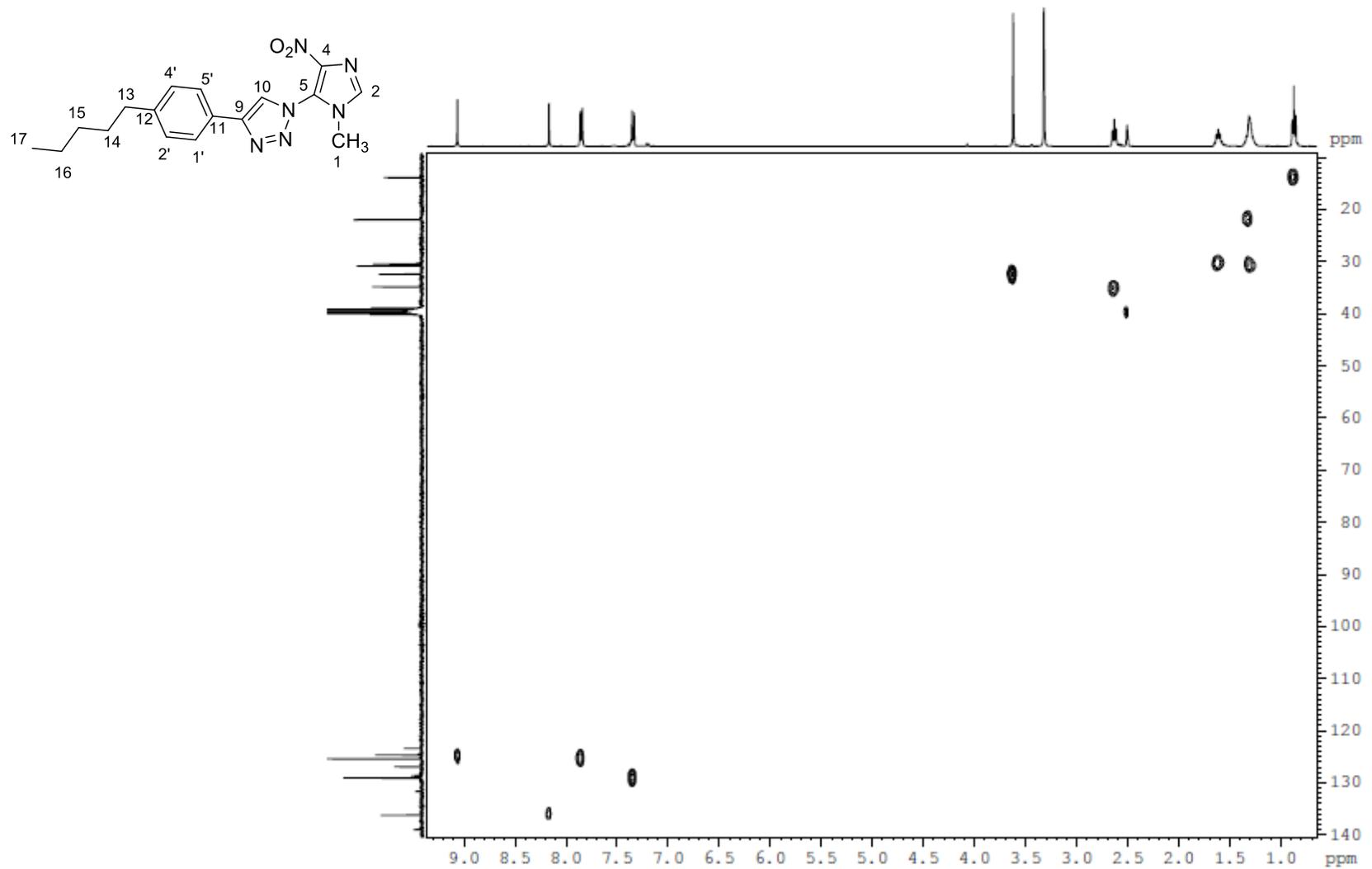


Figura 102: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO₆ de 41h.

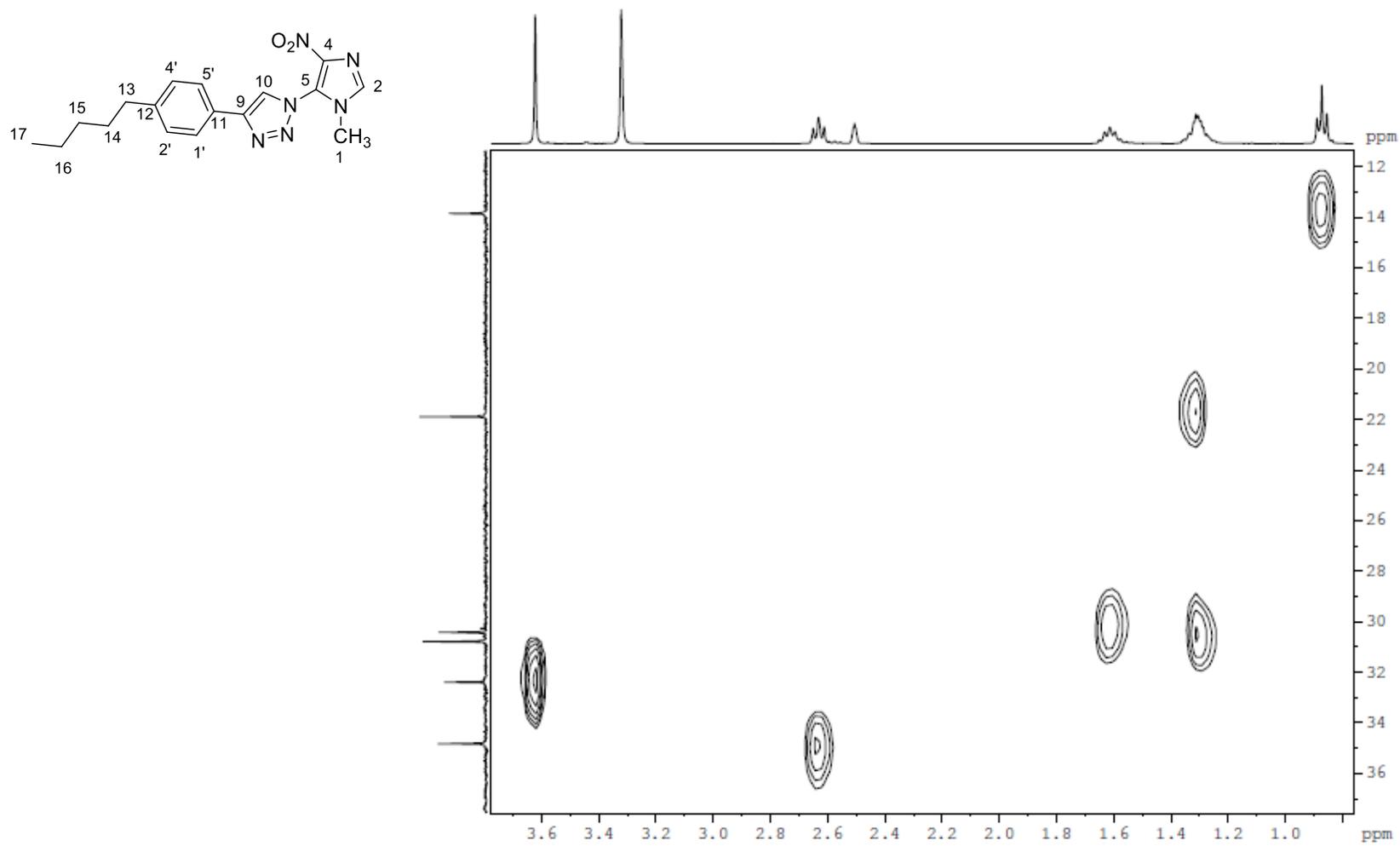


Figura 103: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSOd₆ de **41h**.

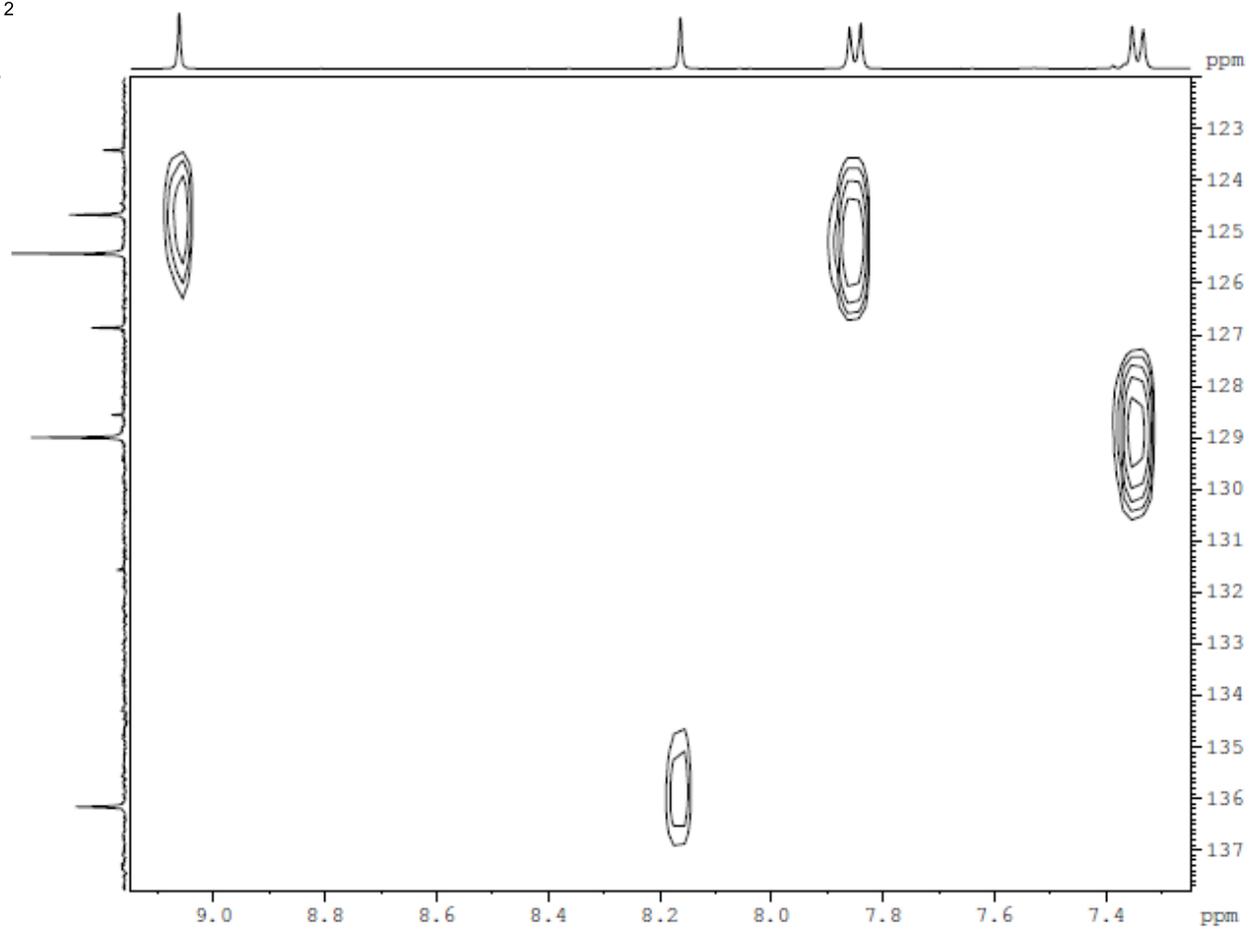
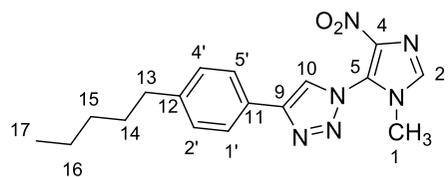


Figura 104: Espectro de RMN bidimensional HSQC (400 x 100 MHz) em DMSO₆ de **41h**.

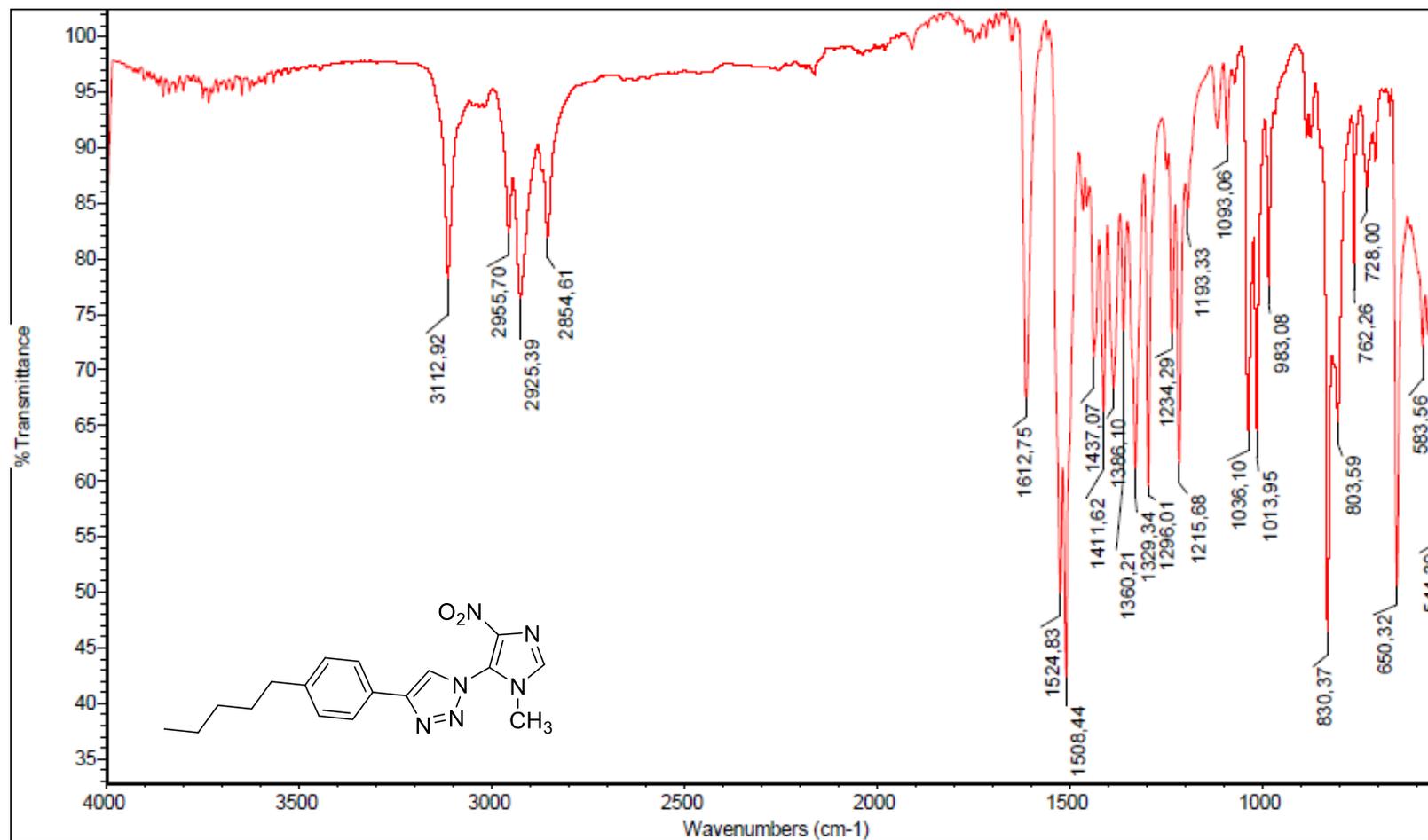


Figura 105: Espectro de absorção na região de infravermelho (IV) do composto **41h** em ATR.

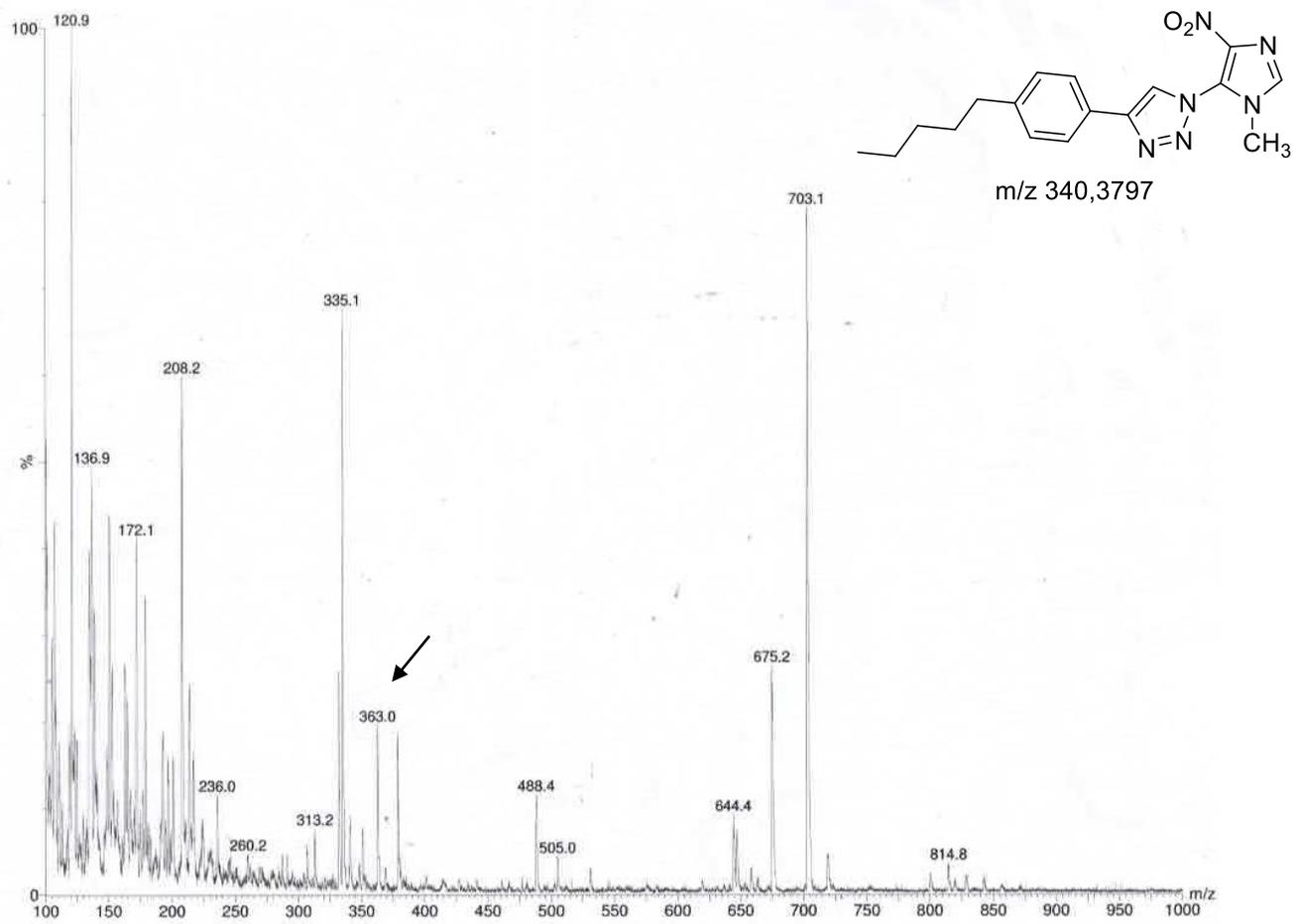


Figura 106: Espectrometria de Massa com Ionização por Eletrospray [ESI-MS (+)] em modo positivo de composto **41h**.

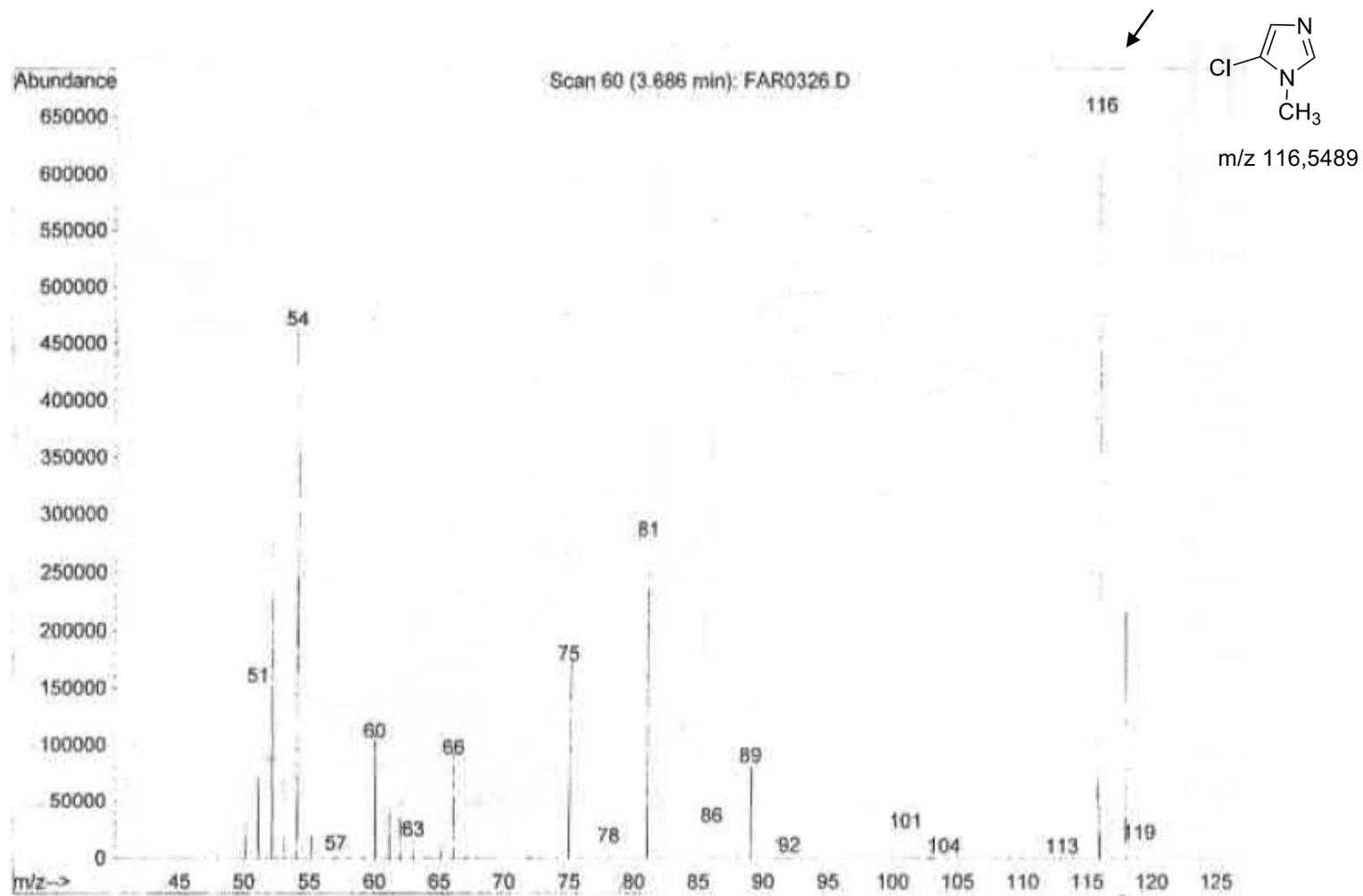


Figura 107: Espectro de Massa (EM) do Composto **50** em MeOH.

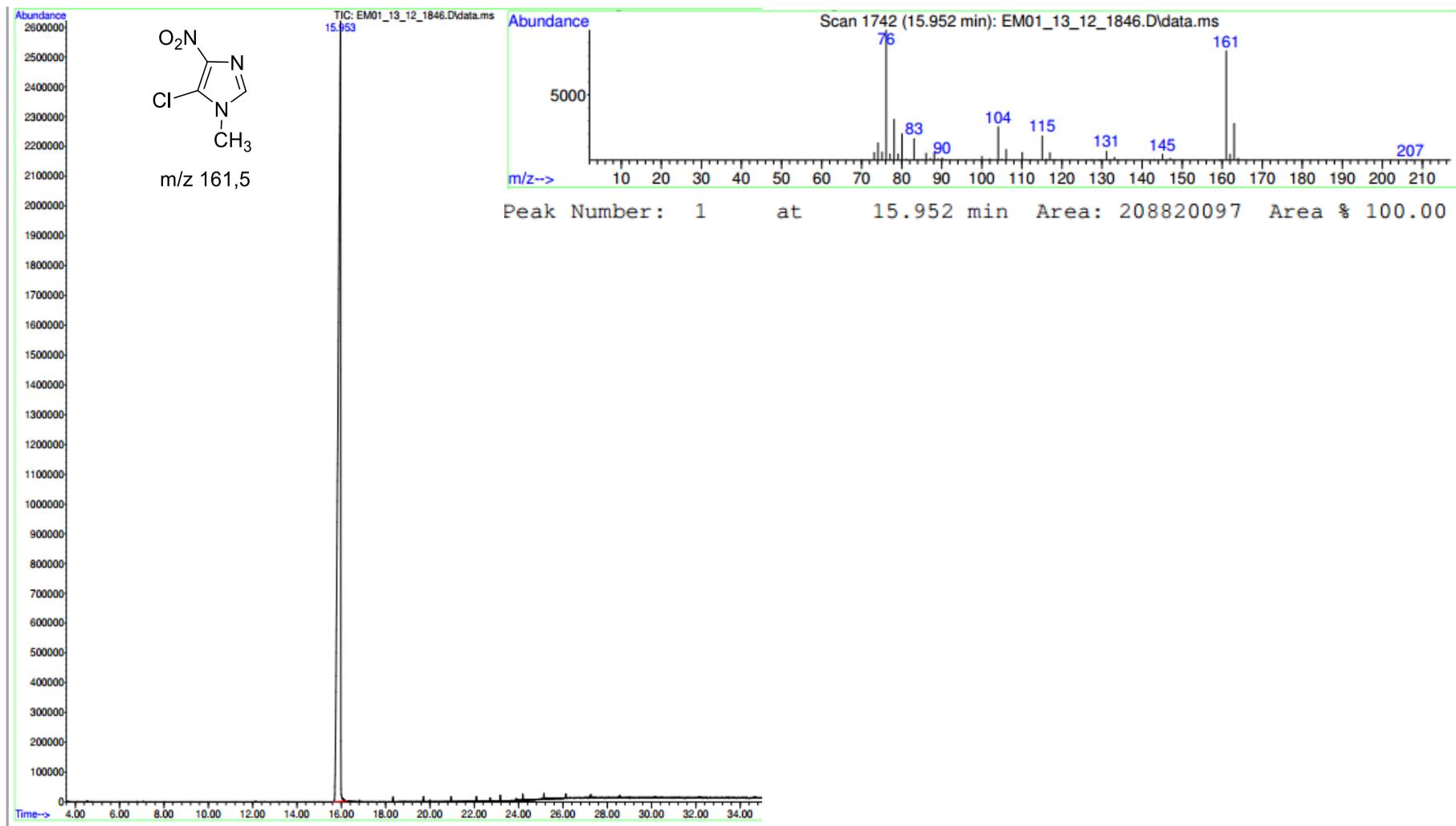


Figura 108: Espectro de Massa (EM) do Composto **42** em MeOH.