



Universidade Federal de Ouro Preto  
Escola de Farmácia  
Laboratório de Química Medicinal e Bioensaios



TALITA FERREIRA MOTA

**SÍNTESE DE DERIVADOS SULFONAMÍDICOS DO BENZNIDAZOL PARA  
ACOPLAMENTO À NANOESFERAS DE OURO E COM POTENCIAL  
TRIPANOCIDA**

Ouro Preto, MG

2024

Talita Ferreira Mota

**Síntese de derivados sulfonamídicos do benzimidazol para acoplamento à nanoesferas de ouro e com potencial tripanocida**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Farmácia pela Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil

Setembro de 2024

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

M917s Mota, Talita Ferreira.

Síntese de derivados sulfonamídicos do benznidazol para  
acoplamento à nanoesferas de ouro e com potencial tripanocida.  
[manuscrito] / Talita Ferreira Mota. - 2024.

126 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto.  
Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Chagas, Doença de. 2. Chagas, Doença de - Medicamentos. 3.  
Nanopartículas. 4. Sulfonamidas. I. Braga, Saulo Fehelberg Pinto. II.  
Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 616.937

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
REITORIA  
ESCOLA DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Talita Ferreira Mota**

**Síntese de derivados sulfonamídicos do benznidazol para acoplamento à nanoesferas de ouro e com potencial tripanocida**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia

Aprovada em 24 de setembro de 2024

### Membros da banca

Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Dr. Thiago Belarmino de Souza (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Augusto Vieira Pontes Silva (Universidade Federal de Ouro Preto)

Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 01/10/2024



Documento assinado eletronicamente por **Saulo Fehelberg Pinto Braga, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 01/10/2024, às 21:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0784448** e o código CRC **92226D3B**.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial a minha mãe, Marta, minha primeira professora! A mulher mais incrível, forte e persistente que conheço, que me ensina que viver é semelhante ao curso d'água. Às minhas irmãs Carol e Bia pelo amor, apoio, parceria e cuidado. Tamo junto, manas!

Aos meus amigos pela paciência, fraternidade, companhia e trocas. À Ju, pela amizade sincera, apoio e acolhimento em dias de luta e de glória. Aos amigos da graduação, especialmente os amigos do LQMB, Anderson, Daniel e Isadora, pelo apoio, ensinamentos e parceria. Entre tantas mesas de botecos há de concordarmos com Freud: “É impossível enfrentar a realidade o tempo todo sem nenhum mecanismo de fuga”.

Agradeço a todos os professores que tive oportunidade de conhecer ao longo da vida e que mostraram que ser professor é ensinar além da lousa, da métrica, diria um dom. Especialmente Saulo, Thiago, Nancy, Tânia e Geraldo, pela imensa paciência, ensinamentos e cuidado. À Samantha, pela confiança e apoio durante o projeto de Iniciação Científica, o qual propiciou oportunidades e incentivo ao conhecimento técnico e crítico de qualidade, subsidiados pelo Ministério da Educação (MEC), alvo constante de sucateamento em épocas de crise da sociedade.

À Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP pelo ensino público de qualidade e auxílios de permanência, que, apesar dos percalços, demonstra ser uma instituição que busca pela integração entre conhecimento acadêmico e realidade socioeconômica.

Enfim, dedico este trabalho a todos que cruzaram meu caminho e que de alguma forma contribuíram para sua realização.

*“Quando a educação não é libertadora, o sonho do oprimido é ser o opressor”*

*Paulo Freire, 1987.*

## RESUMO

O benznidazol (bzn) é o fármaco de primeira escolha no tratamento da doença de Chagas, porém apresenta baixa eficácia no tratamento da fase crônica da doença, quando a forma amastigota do *T. cruzi* se encontra majoritariamente no interior das células. Um dos mecanismos de ação propostos ao bzn se dá através da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem formar ligações covalentes com macromoléculas do parasita ou levar ao estresse oxidativo, culminando em sua lise e fagocitose. Além disso, há redução do metabolismo do parasita, pois utiliza o NADH para a sua ativação como um pró-fármaco, inibindo seu crescimento. Todavia, os derivados reativos do metabolismo do bzn são espécies tóxicas tanto para o parasita quanto para o hospedeiro, podendo levar aos diversos efeitos adversos do fármaco. Essas reações, somadas ao uso prolongado do bzn, podem levar a um abandono de tratamento, dificultando o controle e erradicação da doença. Considerando esse cenário, melhorias nas propriedades farmacotécnicas do fármaco é uma alternativa promissora, e nesse sentido, a nanotecnologia tem sido uma grande aliada no desenvolvimento de técnicas terapêuticas inovadoras e nanopartículas metálicas como ouro e prata exibem diversas características atraentes, a exemplo a biocompatibilidade e baixa toxicidade, demonstrando ser bons candidatos a carregadores de fármacos. Os derivados sulfonamídicos, além de poderem atuar como ligantes em acoplamentos de fármacos à nanopartículas de ouro, também apresentam potencial terapêutico em infecções parasitológicas. Neste trabalho, funcionalizamos a estrutura do bzn a vários derivados sulfonamídicos, que podem conter um grupo amino livre para incorporação à nanopartículas de ouro, visando aplicação sobre o *T. cruzi*, ou ainda, podem ser testados *in-vitro* para avaliação de potencial tripanocida. Com a possibilidade futura de conjugação fármaco-nanoesfera de ouro, acreditamos que possa ser otimizado a eficácia desse medicamento, uma vez que se espera que o fármaco tenha maior solubilidade, biodistribuição, estabilidade e menor toxicidade, além do possível bônus do grupo sulfonamídico na estrutura do fármaco.

**Palavras-chave:** Benznidazol, Doença de Chagas, nanopartículas, derivados sulfonamídicos, *Trypanosoma cruzi*, doença negligenciada.

## ABSTRACT

The benznidazol (bnz) is the first-choice drug for treating Chagas disease, but it exhibits low efficacy in treating the chronic phase of the disease, where the amastigote form of *T. cruzi* is predominantly located inside of the cells. One proposed mechanism of action for bnz involves the formation of reactive oxygen species (ROS), which can covalently bind to parasite macromolecules or induce oxidative stress, ultimately leading to parasite lysis and phagocytosis. Additionally, there is a reduction in the parasite's metabolism as it utilizes NADH for activation as a pro-drug, inhibiting its growth. However, the reactive derivatives from BZN metabolism are toxic to both the parasite and the host, potentially causing various drug-related adverse effects. These reactions, combined with prolonged BZN use, may lead to treatment abandonment, hindering disease control and eradication. Considering this scenario, improvements in the pharmacotechnical properties of the drug are a promising alternative. In this regard, nanotechnology has proven to be a valuable ally in the development of innovative therapeutic techniques, with metallic nanoparticles such as gold and silver exhibiting attractive characteristics, including biocompatibility and low toxicity, making them suitable candidates for drug carriers. Sulfonamide derivatives, besides acting as ligands in drug-gold nanoparticle couplings, also show therapeutic potential in parasitological infections. In this study, we functionalized the structure of BZN with various sulfonamide derivatives, that can potentially incorporate a free amino group for attachment to gold nanoparticles, aiming for application against *T. cruzi* or testing in vitro for tripanocidal therapeutic potential. Through this drug-nanosphere conjugation with gold in the future, we believe the efficacy of this medication could be optimized. This approach is expected to enhance drug solubility, biodistribution, stability, and reduce toxicity. Additionally, the sulfonamide group in the drug's structure may provide additional benefits.

Key-words: Benznidazol, Chagas disease, nanoparticles, sulfonamide derivatives, *Trypanosoma cruzi*.

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> Resultados de sulfonação no anel benzílico do btn. ....      | 55 |
| <b>Tabela 2:</b> Resultados da clorossulfonação no anel benzílico do btn..... | 56 |
| <b>Tabela 3:</b> Resultados da proteção das diaminas. ....                    | 63 |
| <b>Tabela 4:</b> Resultados dos derivados sulfonamídicos - monoaminas .....   | 67 |
| <b>Tabela 5:</b> Resultados dos derivados sulfonamídicos N-protegidos.....    | 71 |
| <b>Tabela 6:</b> Resultados dos derivados sulfonamídicos desprotegidos.....   | 79 |

## LISTA DE ESQUEMAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Esquema 1:</b> Rota sintética para obtenção de compostos sulfonamídicos.....   | 42 |
| <b>Esquema 2:</b> Mecanismo de proteção da etilenodiamina. ....   | 62 |
| <b>Esquema 3:</b> Mecanismo geral de formação do derivado sulfonamídico.....  | 66 |
| <b>Esquema 4:</b> Mecanismo de desproteção da piperazina, de acordo com o Greenes' proteção de grupos em síntese orgânica (WUTS, 2014)..... | 78 |

## LISTAS DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Recorrência do encontro anual de triatomíneos de importância epidemiológica, por município, Brasil, 2015 a 2019.....             | 17 |
| <b>Figura 2:</b> Distribuição dos índices de vulnerabilidade para a DCC, por Unidade Federativa e o Distrito Federal.....                         | 19 |
| <b>Figura 3:</b> Formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> .....   | 24 |
| <b>Figura 4:</b> Ilustração do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> nos dois hospedeiros.....   | 25 |
| <b>Figura 5:</b> Estrutura química do benznidazol e do nifurtimox.....  | 31 |
| <b>Figura 6:</b> Mecanismo de biotivação do benznidazol mediado por TcNTR.....  | 34 |
| <b>Figura 7:</b> Estrutura química geral da sulfonamida.....  | 36 |
| <b>Figura 8:</b> Estrutura química geral de derivado sulfonamídico de bzn.....  | 37 |
| <b>Figura 9:</b> Representação de funcionalização da superfície de uma nanopartícula de ouro.....   | 38 |
| <b>Figura 10:</b> Estrutura química e dados do composto <b>2</b> .....  | 44 |
| <b>Figura 11:</b> Estrutura química e dados do composto <b>A</b> .....  | 45 |
| <b>Figura 12:</b> Estrutura química e dados do composto <b>B</b> .....  | 45 |
| <b>Figura 13:</b> Estrutura química do composto <b>3a</b> .....   | 47 |
| <b>Figura 14:</b> Estrutura química do composto <b>3b</b> .....   | 47 |
| <b>Figura 15:</b> Estrutura química do composto <b>3c</b> .....   | 48 |
| <b>Figura 16:</b> Estrutura química do composto <b>4a</b> .....   | 49 |
| <b>Figura 17:</b> Estrutura química do composto <b>4b</b> .....   | 50 |
| <b>Figura 18:</b> Estrutura química do composto <b>5b</b> .....   | 51 |
| <b>Figura 19:</b> Estruturas de ressonância para GRE genérico.....  | 53 |
| <b>Figura 20:</b> Estruturas de ressonância para GDE genérico.....  | 53 |
| <b>Figura 21:</b> Mecanismo geral de clorossulfonação do anel benzílico do bzn.....   | 54 |
| <b>Figura 22:</b> Estrutura química do cloreto orto e para substituído.....   | 57 |
| <b>Figura 23:</b> Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do cloreto de sulfonila orto e para substituído.....                              | 58 |
| <b>Figura 24:</b> Expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup> C (120-135 ppm) do cloreto de sulfonila orto e para substituído.....               | 59 |
| <b>Figura 25:</b> Expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup> C do cloreto de sulfonila orto e para substituído – Carbonos não hidrogenados..... | 60 |
| <b>Figura 26:</b> Exemplo de dímero de bzn que poderia ser formado em reação com etilenodiamina.....  | 61 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 27:</b> Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da etilenodiamina diprotetida.....                                  | 63 |
| <b>Figura 28:</b> Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da etilenodiamina monoprotetida.....                                | 64 |
| <b>Figura 29:</b> Estrutura química da etilenodiamina .....   | 64 |
| <b>Figura 30:</b> Estrutura química da piperazina. ....   | 65 |
| <b>Figura 31:</b> Estrutura química do derivado sulfonamídico para-substituído (Composto <b>3a</b> )...68                         |    |
| <b>Figura 32:</b> Estrutura química do derivado sulfonamídico para-substituído (Composto <b>3b</b> )...69                         |    |
| <b>Figura 33:</b> Estrutura química do derivado sulfonamídico para-substituído. (Composto <b>3c</b> ).. 70                        |    |
| <b>Figura 34:</b> Estrutura química do derivado sulfonamídico para-N-protetido (Composto <b>4a</b> ).<br>.....                    | 72 |
| <b>Figura 35:</b> Estrutura química do derivado sulfonamídico para-N-protetido (Composto <b>4b</b> ). 74                          |    |
| <b>Figura 36:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ da amostra 22.....   | 75 |
| <b>Figura 37:</b> Estrutura química do derivado sulfonamídico orto-N-protetido (Composto <b>4b-orto</b> ).<br>.....               | 75 |
| <b>Figura 38:</b> Expansão do espectro de $^{13}\text{C}$ de 133 ppm a 124 ppm.....   | 76 |
| <b>Figura 39:</b> Expansão do espectro de $^{13}\text{C}$ 170 ppm a 132,5 ppm. ....   | 76 |
| <b>Figura 40:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ de 7 a 1 ppm.....  | 79 |
| <b>Figura 41:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ de 7 a 1 ppm.....  | 80 |
| <b>Figura 42:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ de 4,0 a 2,0 ppm.....  | 81 |
| <b>Figura 43:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ de 8,0 a 7,0 ppm.....  | 81 |
| <b>Figura 44:</b> Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de 150 a 120 ppm.....   | 82 |
| <b>Figura 45:</b> Expansão do espectro de HSQC da amostra 25. Eixo X: RMN de $^1\text{H}$ . Eixo Y: RMN de $^{13}\text{C}$ . .... | 83 |
| <b>Figura 46:</b> Estrutura química do derivado sulfonamídico orto-substituído desprotetido.....                                  | 83 |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>12</b> |
| <b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>   | <b>14</b> |
| 2.1 A doença de Chagas.....   | 14        |
| 2.2 Epidemiologia .....   | 16        |
| 2.3 O vetor .....   | 20        |
| 2.4 Agente etiológico .....   | 22        |
| 2.4.1 Formas evolutivas, ciclo de vida e transmissão.....   | 24        |
| 2.5 Patologia e diagnóstico .....   | 26        |
| 2.5 O tratamento .....  | 30        |
| 2.5.1 Benznidazol .....   | 33        |
| 2.5.2 Derivados sulfonamídicos de bzn e nanotecnologia .....  | 35        |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>   | <b>40</b> |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>   | <b>41</b> |
| 4.1 Proposta de rota sintética para modificação estrutural da molécula de benznidazol<br>41   |           |
| 4.1.1 Procedimento para a obtenção do derivado de bzn clorossulfonado.....  | 43        |
| 4.1.1.1 Síntese do cloreto de 4-((2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida)metil)benzenossulfonila e do cloreto de 2-((2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida)metil)benzenossulfonila ( <b>Composto 2</b> ) ..... | 43        |
| 4.1.2 Procedimento geral para obtenção de diaminas protegidas .....   | 44        |
| 4.1.2.1 Obtenção do tert-butil (2-aminoetil)carbamato ( <b>Composto A</b> ) .....   | 45        |
| 4.1.2.2 Obtenção do tert-butil-piperazina-1-carboxilato ( <b>Composto B</b> ) .....   | 45        |
| 4.1.3 Procedimento geral para a obtenção de derivados sulfonamídicos .....  | 46        |
| 4.1.3.1 Síntese do derivado sulfonamídico – 2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-N-(4-(piperidin-1-ilsulfonil)benzil)acetamida. ( <b>Composto 3a</b> ) .....  | 46        |
| 4.1.3.2 Obtenção do derivado sulfonamídico – N-(4-(N,N-dietilsulfamoil)benzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida ( <b>Composto 3b</b> ) .....   | 47        |
| 4.1.3.3 Síntese do derivado sulfonamídico– N-(4-(morfolinosulfonil)benzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida. ( <b>Composto 3c</b> ) .....  | 48        |
| 4.1.3.4 Obtenção da tert-butil (2-((4-((2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida)metil)fenil) sulfonamida)etil)carbamato ( <b>Composto 4a</b> ).....   | 48        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 4.1.3.5    | Obtenção do <i>tert</i> -butil 4-((4-((2-(2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il) acetamina) metil) fenil) sulfonil) piperazina-1-carboxilato ( <b>Composto 4b</b> )..... | 49        |
| 4.1.4      | Procedimento geral de desproteção do grupo amino dos compostos <b>4b</b> .....   | 50        |
| 4.1.4.1    | Obtenção do trifluoroacetato de 2-(2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)- <i>N</i> -(4-(piperazin-1-ilsulfonil)benzil)acetamida ( <b>Composto 5b</b> ) .....            | 50        |
| <b>5.</b>  | <b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>   | <b>52</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Derivado clorossulfonado .....</b>  | <b>52</b> |
| 5.1.1      | Sulfonação do anel benzílico .....   | 54        |
| 5.1.2      | Clorossulfonação do anel benzílico .....   | 55        |
| 5.1.3      | Proteção das diaminas.....   | 61        |
| 5.1.4      | Síntese dos derivados sulfonamídicos .....   | 66        |
| 5.1.4.1    | Derivados sulfonamídicos <i>para</i> -substituídos .....   | 66        |
| 5.1.4.3    | Desproteção dos derivados sulfonamídios .....  | 77        |
| <b>6.</b>  | <b>CONCLUSÃO.....</b>  | <b>85</b> |

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## ANEXOS

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, e sua transmissão típica para seres humanos ocorre através do triatomíneo infectado, popularmente conhecido como “barbeiro”, durante o repasto sanguíneo (BRASIL, 2023). Além da forma vetorial de transmissão, a infecção também pode ocorrer por via oral (alimentos contaminados), transfusão de sangue e órgãos, vertical (gestação), acidentes de laboratório e, ainda, possível transmissão sexual, dependente do grau de parasitemia e competência do sistema imune do hospedeiro (BRASIL, 2018; MORENO, 2017).

De acordo com Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi – América Latina), há de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas no mundo, sendo a maior parte concentrada na América Latina, onde calcula-se que 75 milhões de pessoas estejam em regiões de risco de contrair a doença. Além disso, da população infectada pelo protozoário, apenas cerca de 30% recebem diagnóstico, com taxa de detecção inferior a 10%, visto que a doença se apresenta oligossintomática e a maioria dos casos agudos passam despercebidos. A DC apresenta, ainda, incidência anual de 30 mil casos, com cerca de 14 mil mortes/ano na América Latina (DNDi, 2023; OPAS, 2023).

A DC é caracterizada por possuir duas fases distintas: uma aguda e outra crônica. A fase aguda pode ser assintomática e dificilmente consegue-se diagnóstico nesse período, o que leva ao paciente descobrir a doença somente durante a fase crônica. Esta, pode se manifestar nas formas indeterminada, digestiva, cardíaca ou cardiodigestiva, sendo a forma crônica cardíaca a mais preponderante (BRASIL, 2023). Essa forma é caracterizada pelo comprometimento cardíaco causado por cardiomiopatia inflamatória e fibrosante, que leva a arritmias, fenômenos tromboembólicos, insuficiência cardíaca e morte (ARAÚJO *et al.*, 2014).

Atualmente, dois fármacos anti-chagásicos estão disponíveis no Brasil, o benznidazol (bnz) e o nifurtimox (nfx). O bnz é o fármaco de primeira linha no tratamento e o nifurtimox é utilizado quando o bnz não é bem tolerado pelo paciente, devido aos efeitos colaterais ou quando o parasito não responde ao tratamento pelo bnz. Apesar de ambos apresentarem eficácia semelhante, o benznidazol é a primeira opção devido a sua maior disponibilidade, com apresentações pediátricas, melhor experiência no manejo terapêutico e melhor adesão. Com o uso de benznidazol, a frequência de eventos adversos é de cerca de 53%, enquanto o nifurtimox possui frequência de eventos adversos gerais na ordem de 85% (BRASIL, 2018).

O mecanismo de ação do bzn ainda é bastante discutido, porém importantes estudos surgiram entre 2010 e 2021, e indicam que a sua metabolização é realizada por nitroreductase do tipo I presente no *T. cruzi*, responsável por ativar o pró-fármaco e desencadear sucessivas reduções, liberando metabólitos altamente reativos que podem se ligar covalentemente a biomoléculas, alterando estrutura e função celular. Entretanto, esses metabólitos também são citotóxicos ao hospedeiro e contribui para os efeitos colaterais observados no tratamento dos pacientes (WILKINSON, *et al.*, 2011; PATTERSON e WYLLIE, 2014; CIRQUEIRA, 2019; MOLINA, *et al.*, 2021). Também foi proposto que o bzn atua aumentando a fagocitose e lise do parasita, através de um mecanismo dependente de interferon-gamma (IFN-g), além de inibir o crescimento celular através da enzima NADH-fumarato redutase (COURA; DE CASTRO, 2002; ROMANHA *et al.*, 2002; DIAS *et al.*, 2009).

Nesse contexto, a nanotecnologia tem sido uma ciência muito útil na área da saúde, contribuindo para pesquisas e desenvolvimentos de técnicas terapêuticas avançadas. As nanopartículas de ouro possuem diversas características interessantes no âmbito farmacêutico, como biocompatibilidade, estabilidade, fácil manipulação, baixa toxicidade e dimensão nanométrica. Elas atuam melhorando os perfis de liberação de fármacos, aumentando a farmacocinética, biodistribuição e diminuindo a toxicidade (CANCINO *et al.*, 2014). A possibilidade de alcançar alvos específicos e com maior eficácia fazem das nanopartículas excelentes candidatas para o desenvolvimento de terapias avançadas mais seletivas.

Acredita-se que a utilização de nanopartículas de ouro acopladas ao benznidazol possa melhorar seus perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos, podendo atuar na biodistribuição e permeabilidade a membrana celular, além da possível redução de toxicidade. No entanto, para incorporação do fármaco à nanoesferas de ouro é necessária uma modificação estrutural na molécula de benznidazol, a fim de gerar um sítio de ligação específico para o acoplamento, sem interferir no grupo farmacofórico, atribuído ao anel nitroimidazólico (TROUXINE, *et al.*, 2014, *apud* WILKINSON *et al.*, 2011).

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

As doenças endêmicas parasitárias representam um grave problema de saúde pública e a sua prevenção, controle e tratamento são um grande desafio mundial. Por outro lado, as oportunidades de estudos na área de planejamento de fármacos são promissoras, especialmente nas últimas décadas com os avanços tecnológicos da biologia molecular e estrutural, bem como da química medicinal e computacional, da síntese orgânica planejada e dos ensaios biológicos em larga escala (BRAGA, 2016). Portanto, do ponto de vista prático, acredita-se que o tratamento adequado da DC não seja uma realidade tão distante, devido ao apoio tecnológico cada vez mais inovador. Entretanto, passados 114 anos da descoberta da doença de Chagas, o acervo de fármacos disponíveis para tratamento dessa doença é limitado a apenas dois fármacos e por vezes considerado inadequado. Esse panorama coloca a DC no rol das doenças negligenciadas, que marcam a desigualdade social e a crise sanitária presentes em áreas endêmicas de países subdesenvolvidos. A seguir, será abordado sua etiopatologia, desafios do tratamento na fase crônica, pesquisas, desenvolvimentos e inovações na área e a contextualização epidemiológica e socioeconômica.

### 2.1 A doença de Chagas

Em 1907, o sanitarista e pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1879-1934), conhecido como Carlos Chagas, foi a uma expedição de combate à epidemia de malária que se espalhava pela região de Lassance, cidade de Minas Gerais. Durante sua estadia ele percebeu que a população era acometida por uma doença desconhecida que, após uma autópsia, observou grandes lesões no músculo cardíaco da vítima. Em 1908, ele encontrou formas flageladas de um protozoário no intestino do barbeiro, inseto encontrado em matas e habitações de áreas rurais de várias regiões do país, mas a associação com a doença veio somente no ano seguinte, em 1909, com o caso de Berenice, uma menina de dois anos que apresentava febre, edema no olho, lesão de pele arredondada, quente e edemaciada. Ele identificou no sangue de Berenice formas flageladas de um protozoário, em número não muito grande, semelhantes às formas que ele havia encontrado no intestino do barbeiro. Esse foi considerado o primeiro caso clínico humano identificado da doença (MONTALTI, 2020; ROCHA, 2019; CALDAS 2008, FRAZÃO, 2019).

Carlos Chagas era pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), atual FIOCRUZ, e junto a outros pesquisadores, inclusive alguns professores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), identificou e caracterizou o inseto vetor (triatomíneo), o agente etiológico

(*Trypanosoma cruzi*) e a patologia da doença de Chagas, que carrega seu nome em homenagem ao pioneirismo. Chagas descobriu que o inseto hematófago conhecido como barbeiro, infectado pelo protozoário, contamina o ser humano quando se alimenta dele, ao defecar e/ou urinar após picar o indivíduo, liberando formas tripomastigota do parasito nas fezes, que em contato com lesão na pele ou mucosas infecta o ser humano. Fez experimentos utilizando barbeiros infectados que se alimentavam de saguis de laboratório, o que lhe permitiu encontrar uma nova espécie de tripanossoma, batizada de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem ao Oswaldo Cruz. Ele descreve também resultados de estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do protozoário nos diferentes animais de laboratório infectados: cães, coelhos e macacos (FRAZÃO, 2019; CALDAS, 2008; ROCHA, 2019).

Nesses estudos descobriu que a doença acometia principalmente o coração, mas que outros órgãos como intestino e esôfago também podiam ser atingidos e que possuía duas fases distintas, que dependiam do tempo da infecção: a fase aguda, que ocorre durante as primeiras semanas ou meses desde a infecção e pode ser assintomática, ou apenas apresentar quadro moderado de febre, fadiga, dor no corpo e os sinais no local da picada, caracterizado pelo edema das pálpebras (sinal de Romana) e inchaço (chamado chagoma); e a fase crônica, que dura o resto da vida do paciente, pois o parasito, apresentando uma forma intracelular, escapa do sistema imune, levando a lesões na musculatura cardíaca e/ou danos ao sistema digestório (megacólon e megaesôfago) (FRAZÃO, 2019; ROCHA, 2019; HUNT, 2017).

Em 1940, Amílcar Vianna descobre um foco endêmico de doença de Chagas, relatando 368 casos em fase aguda e cerca de dez mil casos crônicos na cidade de Bambuí-MG. Na busca de uma forma de eliminação dos barbeiros, foram então usados diversos produtos químicos, como gás cianídrico, querosene e pesticidas. Porém, a melhor solução para o controle do surto foi obtida com o composto de hexaclorocicloexano (CHC), também conhecido como BHC ou Lindano. No entanto, esse pesticida organoclorado potencialmente tóxico ao meio ambiente e aos animais acabou proibido no Brasil em 1995 (ROCHA, 2019; MANEO, MONDELLI e TEIXEIRA, 2013).

Com o uso do BHC foi possível eliminar o barbeiro da região de Bambuí e a campanha foi implementada pelo poder público em diversas outras regiões do país, antes do pesticida ser proibido. A campanha marcou a fase inicial de combate ao vetor triatomíneo e a transmissão vetorial, que foi aplicada em diversos países latino-americanos que continham surtos da doença, como Argentina, Uruguai, Chile e Venezuela. Dessa forma, o Brasil foi reconhecido por estabelecer as bases para o controle e interrupção da transmissão vetorial da DC, certificado pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) em 2006 (ROCHA, 2019).

Desde então, com a ajuda mútua dos países da América Latina (Iniciativa do Cone Sul, Iniciativa dos Países Andinos, Iniciativa da América Central e México e a Iniciativa de Países Amazônicos) com suporte da OPAS/OMS, foi possível implementar políticas de controle vetorial, triagem sanguínea e diagnóstico, a fim de diminuir a incidência de casos por transmissão vetorial, horizontal (transusão de sangue e órgãos) e vertical, além de visar à amplificação dos diagnósticos, que ainda é um grande desafio no combate a DC (DIAS e SCHOFIELD, 2017; BRASIL, 2023 ). Ainda, a DC é uma doença de notificação compulsória e imediata para todos os casos suspeitos ou confirmados de doença de Chagas, aguda ou crônica, visto a persistência e formas de transmissão do *T. cruzi*, além do potencial da fase crônica para a expressiva morbimortalidade observada nos últimos anos (BRASIL, 2023).

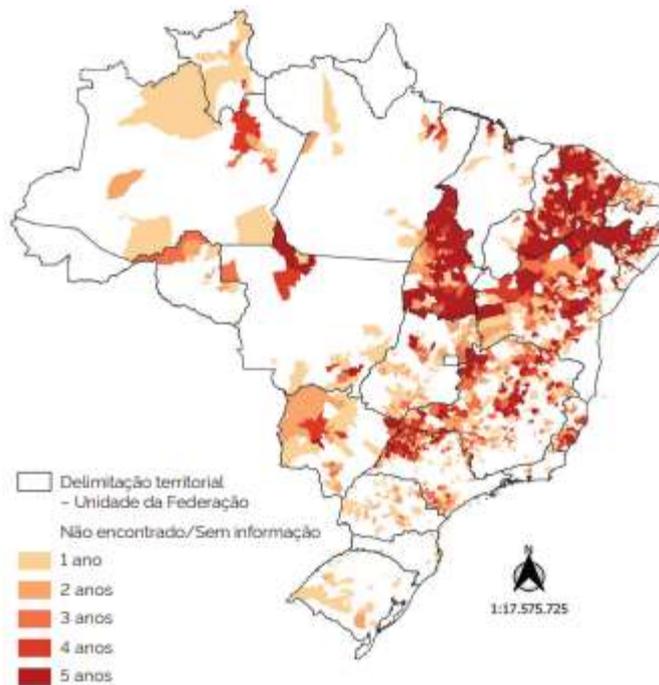
## 2.2 Epidemiologia

Estima-se que existam aproximadamente 12 milhões de portadores da doença crônica nas Américas, cerca de três milhões no Brasil (OPAS, 2023). De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), houve uma mudança no perfil epidemiológico da doença, que passou a ser tratada de acordo com os padrões de transmissão da área geográfica: I) Regiões originalmente de risco para a transmissão vetorial (AL, BA, CE, DF, GO, MA, MG, MS, MT, PB, PE, PI, PR, RN, RS, SE, SP, TO); II) Amazônia Legal (AC, AM, AP, RO, RR, PA, parte do TO, MA e do MT). Retrata-se ocorrência de casos e surtos na Amazônia Legal por transmissão oral e vetorial (sem colonização e extradomiciliar).

Já nas regiões originalmente de risco para a transmissão vetorial, devido ao controle químico utilizado para redução do *T. infestans*, essa transmissão mante-se controlada, entretanto, ações de vigilância epidemiológica, entomológica e ambiental devem ser realizadas, visando a manutenção da interrupção da transmissão da doença pelo *T. infestans* e por outros vetores passíveis de domiciliação (OPAS, 2023; SESA, 2023).

A FIG 1 mostra a recorrência do encontro anual de triatomíneos de importância epidemiológica, por município, entre 2015 e 2019. Foi observado nesse intervalo de tempo que 30 % dos municípios relataram presença de triatomíneos. Ceará, Pernambuco, Piauí, Bahia e Tocantins possuem o maior número de municípios com recorrência de triatomíneos, e 20% dos municípios com presença do inseto possuem uma infestação domiciliar acima de 10%. Ainda, a taxa de infecção domiciliar nacional é de 5% (BRASIL, 2023).

**Figura 1:** Recorrência do encontro anual de triatomíneos de importância epidemiológica, por município, Brasil, 2015 a 2019.



**Fonte:** Brasil, 2023.

Por outro lado, a ocorrência de doença de Chagas aguda (DCA) tem sido observada na região da Amazônia Legal, com surtos de DCA relacionados à ingestão de alimentos contaminados (caldo de cana, açaí, bacaba, entre outros) e casos isolados por transmissão vetorial extradomiciliar. Nos últimos 10 anos (2012 a 2021) foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), 38.987 casos suspeitos de DC aguda e 2.809 (7%) foram confirmados para a doença, sendo que 80,3% (2.263) desses casos foram por transmissão oral (BRASIL, 2023; SESA, 2023).

Estima-se que cerca de 1,1 milhão e mulheres em idade fértil são infectadas pelo *T. cruzi* na América Latina e que nove mil crianças contraem a doença de Chagas por transmissão de mãe para filho a cada ano (OPAS, 2023; SESA, 2023). A infecção congênita da doença de Chagas, apesar de hoje ser uma forma de transmissão menos comum no Brasil, apresenta um cenário epidemiológico preocupante. As estimativas de prevalência no ano de 2010, eram de 34.629 gestantes com a infecção pelo *T. cruzi*, a uma taxa de transmissão 1,7%, que equivale a 589 crianças nascidas com infecção congênita no país (BRASIL, 2023).

Entre 2012 e 2021, segundo dados do Sinan, foram notificadas 39 gestantes diagnosticadas com DCA, sendo registrados 10 casos de transmissão vertical (BRASIL, 2023). Dentre as várias intervenções que podem ser realizadas na transmissão vertical, o tratamento das mulheres infectadas em idade fértil (antes da gestação) parece ser uma boa estratégia,

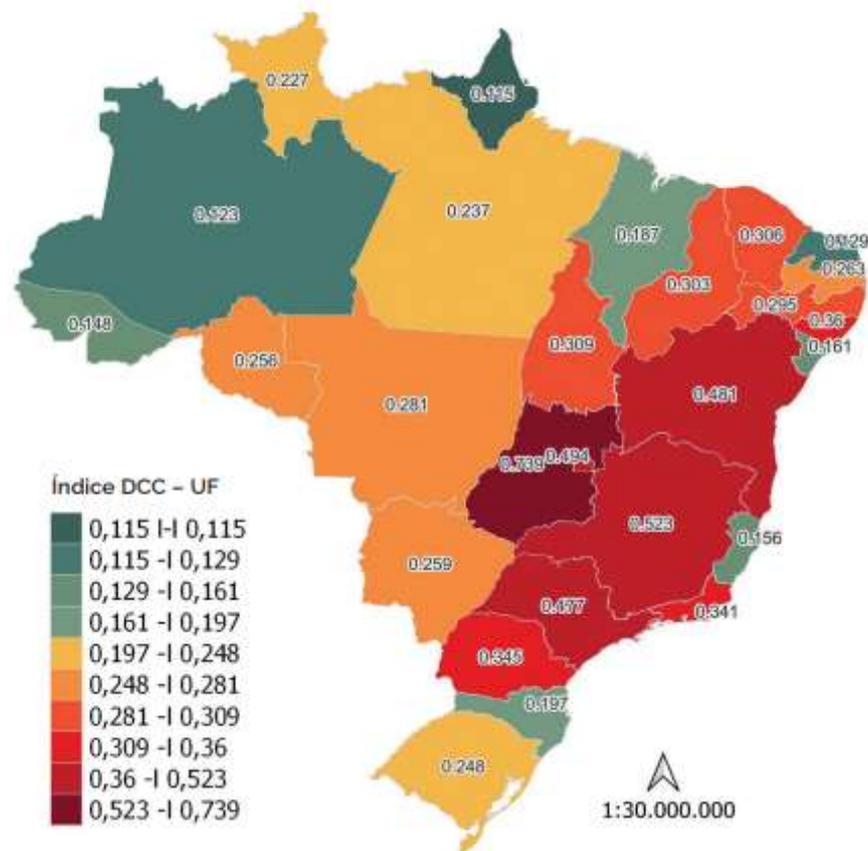
contudo a dificuldade do diagnóstico é um fator limitante, e essas mulheres acabam por serem diagnosticadas durante a gestação, onde os fármacos disponíveis são contraindicados. Entretanto, o tratamento dos bebês tem uma elevada taxa de cura, próxima dos 100%, com boa tolerância clínica, visto os baixíssimos efeitos colaterais observados (BRASIL, 2023).

Atualmente predominam os casos crônicos de doença de Chagas decorrentes de infecções adquiridas no passado, com uma coorte de aproximadamente três milhões de indivíduos infectados (OPAS, 2023; BRASIL, 2022). Consequência disso é a elevada mortalidade por DC no país, representando uma das quatro maiores causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias. Nos últimos 10 anos foram registrados em média 4.000 óbitos/ano com causa básica a DC e estimativas por meio de modelos matemáticos mostram que os óbitos pela doença ainda devem persistir por décadas, visto a cronicidade da doença e raros casos de morte aguda (BRASIL, 2022).

O último Boletim Epidemiológico da DC (2022), emitido pela Secretária de Vigilância em Saúde, traz o Índice de Vulnerabilidade para a Doença de Chagas Crônica (DCC), como resposta à necessidade de apurar a prevalência e incidência da DCC, reconhecendo as áreas de maior potencial de morbimortalidade da doença em sua fase crônica, associadas a fatores socioeconômicos e epidemiológicos regionais, como limitações de acesso aos serviços de saúde e desfecho da cronicidade da doença. O índice é resultado das análises de três subítemos; Chagas: construído por indicadores epidemiológicos diretamente relacionados a DCC; sentinelas: por indicadores relacionados a doenças/agravos decorrentes da evolução da doença de Chagas, e acesso: com indicadores relacionados ao acesso aos serviços de saúde. É representado por um valor numeral de intervalo entre 0 e 1, e quanto mais próximo de 1, mais vulnerável a DCC (BRASIL, 2022, 2023).

A FIG 2 traz a distribuição do índice de vulnerabilidade para a DCC, por estado, e observa-se que o Goiás - GO possui o maior índice (0,739), seguido por Minas Gerais - MG (0,523) e o Distrito Federal - DF (0,494). Ainda, o estado do Amapá - AP (0,115), Amazonas - AM (0,123) e Rio Grande do Norte - RN (0,129) aparecem com os menores índices de vulnerabilidade para a DCC. Em relação ao estado do Amazonas o índice pode refletir a região que antes era de baixa ocorrência de DC e atualmente encontra-se em surtos de DCA, demonstrando baixa prevalência de DCC. Contudo, se não houver controle da ocorrência dos surtos e tratamento adequado aos infectados dessa nessa região, pode aumentar o a prevalência da DCC ao longo dos anos (BRASIL, 2023).

**Figura 2:** Distribuição dos índices de vulnerabilidade para a DCC, por Unidade Federativa e o Distrito Federal.



**Fonte:** Brasil, 2023.

Os índices observados para Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal, corroboram as maiores taxas médias anuais de mortalidade encontradas para esses estados, o que pode ser atrelado a intensa transmissão vetorial em décadas passadas, visto MG uma das últimas regiões a certificar-se livre da transmissão pelo *Triatoma infestans* (BRASIL, 2022, 2023). Mesmo que o índice de vulnerabilidade para o DCC possa não refletir diretamente o risco de transmissão do parasito, permite o reconhecimento territorial para compreensão da dinâmica da doença, bem como traçar perfis clínicos dos pacientes e sua interação com o parasito e o vetor, colaborando para melhoria das estratégias e fluxos dos programas de combate a DC, sejam por melhores diagnósticos, controle de transmissão ou melhores tratamentos, além de medidas profiláticas e conscientização da sociedade sobre o autocuidado e prevenção (BRASIL, 2022, 2023).

### 2.3 O vetor

Os triatomíneos, também conhecidos como barbeiro, chupão, percevejo, dentre outros nomes populares, são os principais vetores do *Trypanosoma cruzi*. (GALVÃO, 2017, 2021). Até o ano de 2023, foram identificadas 158 espécies (três fósseis) distribuídas em 18 gêneros e cinco tribos, sendo que dos 18 gêneros descritos, três são de grande importância, do ponto de vista de transmissão da doença de Chagas: *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (DALE *et al.*, 2021; GALVÃO, 2021; GIL-SANTANA *et al.*, 2022; FIOCRUZ, 2021).

Estão distribuídos por todo o continente americano, principalmente na América Latina, mas também podem ser encontrados em regiões da América do Norte, África, Ásia e Austrália, porém nessas regiões não foi identificada presença do agente causador da doença, o *Trypanosoma cruzi*, portanto, o inseto não apresenta risco a população (FIOCRUZ, 2021). No Brasil, eles são amplamente distribuídos com 68 espécies nativas descritas até o momento (GALVÃO, *et al.*, 2020; MULLER, *et al.*, 2023).

No Brasil, a transmissão vetorial foi responsável por boa parte da incidência de casos no passado e, depois da diminuição considerável da transmissão do *T. cruzi* pelo *Triatoma infestans*, principal espécie de triatomíneo responsável pela transmissão vetorial, essa forma de transmissão mostrou-se mais controlada. Contudo, o país possui 66 espécies de triatomíneos capazes de transmitir o *T. cruzi*, sendo quatro espécies de maior importância: *T. brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* (BRASIL, 2018, 2023; MORENO, 2017; OPAS, 2023).

Teoricamente, todas as espécies de triatomíneos são potenciais vetores do *T. cruzi*, contudo a capacidade vetorial das diferentes espécies de vetores varia em decorrência de alguns atributos, como a capacidade de domiciliação ou capacidade de formar colônias intradomiciliares, a produção e a eliminação de um maior número de formas infectantes do protozoário e o tempo entre o repasto sanguíneo e a defecação/urina, pois algumas espécies de triatomíneos defecam e/ou urinam longe do local da picada, o que diminui consideravelmente as chances de infecção do hospedeiro vertebrado (ROSA *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2013; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Os triatomíneos costumam viver próximos as suas fontes alimentares e podem ser encontrados em diferentes ecótopos, como cavidades e cascas de árvores (diversas espécies de palmeiras), abaixo de rochas e troncos caídos, raízes expostas, ninhos de aves e em tocas de mamíferos, como fendas de casas feitas de barro, madeira e até alvenaria. Em resumo, um abrigo adequado é um lugar estreito, escuro, com microclima constante e invariável, e que eles

consigam sentir e enviar sinais químicos (feromônios) para outros insetos, bem como sentir a presença de potenciais hospedeiros (LENT; WYGODZINSKY, 1979; GAUNT; MILES, 2000; LIMA *et al.*, 2012; LAZZARI, 2014; GALVÃO, 2014; LORENZO *et al.* 2000; REISENMAN, LAZZARI e GIURFA, 1998).

São insetos fotofóbicos e com hábitos noturnos, porém, já foi observado alguma atração por fontes pontuais de luz artificial em formas adultas, que são capazes de realizar longos voos dispersivos a procura de alimento (MINOLI e LAZZARI 2006; CARBAJAL DE LA FUENTE *et al.* 2007). Além disso, a dispersão desses insetos também pode ocorrer de forma passiva, ou seja, serem transportados por outros animais ou em objetos levados pelo humano, contudo, a principal forma de dispersão é por voo ou por caminhada, visto em algumas espécies a caminhada como principal forma de dispersão, como por exemplo alguns membros do complexo *Triatoma brasiliensis* (ALMEIDA *et al.*, 2012).

A fonte alimentar principal dos triatomíneos são os animais vertebrados (raramente invertebrados) e eles localizam esses animais através de diversos sinais, como calor e produtos químicos eliminados pela pele ou pela respiração, ou ainda, associados aos habitats do hospedeiro (LAZZARI, 2009, 2014). Contudo, a característica mais marcante do barbeiro é a sua alta sensibilidade ao calor e à radiação infravermelha, que possibilita que ele detecte um potencial hospedeiro de sangue quente a vários metros de distância (WIGGLESWORTH E GILLET 1934, LAZZARI e NÚÑEZ 1989, FLORES e LAZZARI 1996, 2014; LORENZO *et al.*, 1999).

São insetos hematófagos essenciais, ou seja, em todos os estágios de desenvolvimento, da ninfa até a fase adulta, tanto os machos quanto as fêmeas, realizam a hematofagia. Do ponto de vista epidemiológico, este fato é muito importante na transmissão da doença, pois a infecção do inseto pelo *T. cruzi* ocorre após a alimentação de um animal infectado, transmitindo-o através das fezes ao indivíduo ou animal que será sugado posteriormente (TEVES, 2018; JORGE e CASTRO, 2000).

## 2.4 Agente etiológico

O protozoário unicelular flagelado *Trypanosoma cruzi* existe a cerca de 100 milhões de anos e seu habitat natural consiste em associações ou biocenoses com vetores e hospedeiros naturais, como mamíferos, invertebrados e animais silvestres. Uma das teorias defendidas, é que insetos predadores desenvolveram a hematofagia e adquiriram o protozoário, possibilitando a transmissão do parasito a distintos hospedeiros que fossem sua fonte alimentar. Evolutivamente, a espécie *T. cruzi* adaptou-se bem a hemípteros hematófagos e mamíferos de médio e pequeno porte (marsupiais e roedores), com tendência a baixa patogenicidade, configurando o ciclo enzoótico silvestre primitivo, no âmbito do continente americano (PRATA, DIAS E COURA, 2011).

Existem diversas hipóteses para surgimento do ser humano no ciclo de vida do parasito, e uma dessas hipóteses estima que a infecção humana pelo protozoário ocorra há, no mínimo, 5 mil anos a.C, sendo encontrado resquícios moleculares do *T. cruzi* na região do deserto do Atacama. Acredita-se que os povos originários das Américas ao domesticar roedores silvestres (preá) tenham trazido o parasito para o domínio humano, assim como, também é aceita, a hipótese de que as sucessivas migrações levaram os humanos a locais onde os insetos vetores se domiciliavam e diferentes reservatórios estavam em contato com os assentamentos humanos (PRATA, DIAS E COURA, 2011; MARTINS, 2010).

O *Trypanosoma cruzi* é uma espécie pertencente à ordem Kinetoplastidae, gênero *Trypanosoma*, clado *Trypanosoma cruzi*. Considerado heteroxênico, por possuir dois hospedeiros, um invertebrado e um vertebrado, possui ampla diversidade de hospedeiros mamíferos, como espécies isoladas de morcegos neotropicais, marsupiais australianos e morcegos africanos, e pode ser transmitido por diversas espécies de triatomíneos hematófagos (família Reduviidae, subfamília Triatominae) (JANSEN *et al.*, 2015; DARIO, 2017; LIMA *et al.*, 2015; HAMILTON, 2012; LANURA, 1995).

O *T. cruzi* é representado por um conjunto de populações multiclonais, denominadas de isolados ou cepas, que se diferenciam em características genéticas, biológicas e patológicas, demonstrando grande heterogeneidade na interação com hospedeiros vertebrados. Podem apresentar diferentes graus de virulência para animais experimentais, humanos e animais silvestres, implicando em variações na sensibilidade a drogas e no tropismo tissular, além do fator inato do hospedeiro, o sistema imune (ZINGALES, 2017; DARIO, 2017; ANDRADE *et al.*, 1997). De acordo com Bianca Zingales (2017), essa diversidade é explicada pelo fato do *T.*

*cruzi* ser um organismo diplóide que se reproduz por divisão binária, e cada genoma isolado evolui independentemente.

Desde a descoberta do *T. cruzi*, diversos estudos sobre a estrutura morfológica, bioquímica e genética do protozoário foram e são realizados e, em 2009, no segundo consenso brasileiro de doença de Chagas, foi definida as nomenclaturas para as linhagens filogenéticas encontradas, denominadas de Unidades Discretas de Tipagem – DTUs, onde cada grupo corresponde a uma coleção de cepas que são geneticamente semelhantes e com padrão de marcadores moleculares, genéticos e imunológicos comuns. Foram classificados 6 grupos de DTUs: TcI (TcI), TcII (TcIIb), TcIII (IIa), TcIV (IIc), TcV (IId) e TcVI (IIe), e, em 2012 foi descrito um novo genótipo, denominado TcBat, associado aos morcegos (TIBAYRENC, *et al.*, 1988, 1986 e 1995; SOUTO *et al.*, 1996; FERNANDES *et al.*, 1988; *Recommendations from a satellite meeting*, 1999; BRISSE, *et al.*, 2000, 2001; FREITAS, *et al.*, 2006; VALADARES, 2007; DE LEON, *et al.*, 1998; MARTINEZ, *et al.*, 1998; CAMPETELLA, *et al.*, 1992; ZINGALES, *et al.*, 2009; ZINGALES, 2017).

Em 2022, Cunha e colaboradores (CUNHA, *et al.*, 2022) publicaram uma revisão sistemática de DTUs presentes em infecções humanas no Brasil, onde, de 936 cepas de *T. cruzi* isoladas de pacientes, foi observado um predomínio de TcII nas regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul e o TcIV predominou no Norte, principalmente no estado do Amazonas. O Nordeste foi a região que apresentou o maior número de cepas híbridas. Ainda em 2022, Matos e equipe, (MATOS *et al.*, 2022) descobriram que a formação híbrida inicialmente resulta em parasitas tetraploides e, que com o tempo, sofrem erosão no genoma de forma variável e gradual, levando a triploidia. Além disso, também observaram que a progênie híbrida mostrou novas mutações que não eram atribuíveis a nenhum dos pais (diploides). Essas evidências corroboram as hipóteses levantadas na década de 90 (DE LEON, *et al.*, 1998; MARTINEZ, *et al.*, 1998; CAMPETELLA, *et al.*, 1992; FERNANDES *et al.*, 1998), sobre as deleções identificadas no genoma e da poliploidia encontrada em alguns genomas estudados.

Atualmente, a classificação em DTUs tem sido a que melhor caracteriza geneticamente os grupos de populações de *T. cruzi*, e acredita-se que a heterogeneidade genética do parasito esteja correlacionada a fatores de virulência e patogenicidade, que culmina em diversas manifestações clínicas da doença, resistência ao tratamento e a predominância de DTUs em determinadas regiões geográficas. (JANSEN *et al.*, 2017; VALADARES, 2007; CUNHA, *et al.*, 2022). Dessa forma, um grande desafio para a comunidade científica vem sendo identificar marcadores genéticos dos isolados, visando a caracterização do ponto de vista epidemiológico, de patogenia e inovação de tratamentos.

### 2.4.1 Formas evolutivas, ciclo de vida e transmissão

Como citado anteriormente, o *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo, estendendo-se a dois hospedeiros, um invertebrado (insetos) e um vertebrado (mamíferos), e apresenta três formas evolutivas; formas tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas (FIG. 3). As formas tripomastigotas são flageladas e possuem membranas ondulantes ao longo do corpo, que levam ao efeito de prolongação do flagelo, semelhante a letra S ou C. Já a forma epimastigota possui um flagelo mais alongado e não apresenta membranas ondulantes. As formas amastigotas são arredondadas e apresentam resquício de flagelo que não visível em microscopia ótica (PINTO, GRISARD e ISHIDA, 2011; OCHAYA, *et al.*,2019; CORDEIRO, *et al.*,2019; PATINO e RAMIREZ, 2017).

**Figura 3:** Formas evolutivas do *T. cruzi*.



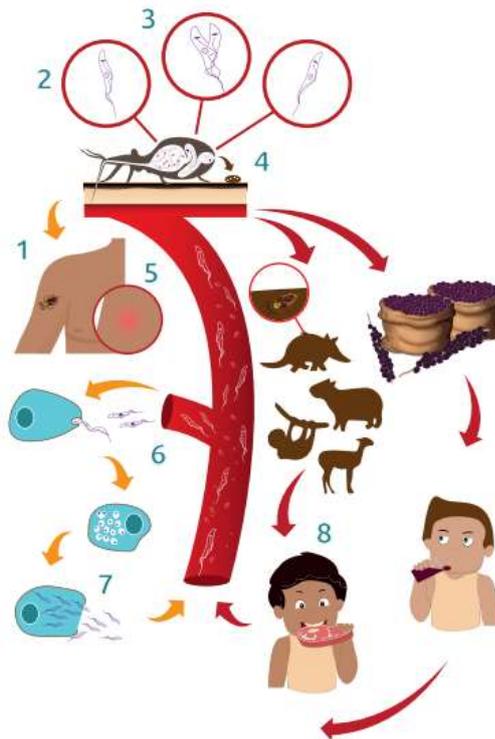
**Legenda:** A) formas tripomastigotas; B) formas amastigotas e C) formas epimastigotas. **Fonte:** A) MAGALHÃES, 2023; B) BARONE e FERNANDES, 2023 e C) CARVALHO, 2017.

Ainda, os tripomastigotas podem ser diferenciados em formas sanguíneas e metacíclicas, onde, a primeira, também chamada de tripomastigotas de cultura de tecidos, é resultado da diferenciação de amastigotas intracelulares, que se replicam e utilizam mecanismos bioquímicos diversos para romperem o vacúolo parasitóforo, extravasando-os para o meio intercelular, caindo na corrente sanguínea e infectando outras células/tecidos. Já a segunda forma, os tripomastigotas metacíclicos, provém de epimastigotas, portanto, são originadas ainda no vetor e quando na infecção, configuram a forma primária do parasito no hospedeiro secundário, e podem apresentar alto grau de virulência, dependendo da cepa (GRELLIER, *et al.*,2001; WEISBARTH, *et al.*,2018; BONFIM-MELO, *et al.*,2018; SILVA, TEIXEIRA e SILVA, 2019).

Os triatomíneos, principal vetor, são os hospedeiros invertebrados e abrigam em seu tubo intestinal mediano as formas epimastigotas do protozoário, que são formas replicativas e não infectantes, contudo, ao migrarem para a parte posterior do intestino o parasito sofre o

processo de metaciclogênese e se diferencia em formas tripomastigotas metacíclicas, que são altamente infectantes e não se replicam, e, quando eliminadas pela urina e fezes do inseto podem infectar animais vertebrados e contaminar alimentos (FIG. 4) (AZAMBUJA e GARCIA, 2017; WEISBARTH, *et al.*, 2018). Embora as aves e os répteis sirvam de fonte de alimentação para os triatomíneos, eles não se infectam, pois, o *T. cruzi* não sobrevive nesses animais, portanto, não são reservatórios (MEIS e CASTRO, 2017).

**Figura 4:** Ilustração do ciclo de vida do *T. cruzi* nos dois hospedeiros.



**Legenda:** 1) repasto sanguíneo do triatomíneo; 2 e 3) formas epimastigotas e tripomastigotas; 4) formas tripomastigotas sendo excretados nas fezes, contaminando alimentos e infectando animais; 5) Inflamação no local da picada do inseto; 6) formas tripomastigotas na corrente sanguínea; 7) formas amastigotas intracelulares e 8) lise celular e extravasamento de formas tripomastigotas. **Fonte:** MEIS e CASTRO, 2017.

Os tripomastigotas metacíclicos não conseguem penetrar a pele intacta, mas podem infectar através de mucosa e lesões na pele e, uma vez dentro do hospedeiro vertebrado, invadem as primeiras células que encontram, como macrófagos, fibroblastos e células epiteliais, e diferenciam-se em formas amastigotas, estágio evolutivo onde são intracelulares, replicativas e infectantes (FIG. 4). Até pouco tempo acreditava-se que as formas amastigotas fossem intracelulares obrigatórias, mas já foram relatadas formas extracelulares (FERNANDES, *et al.*, 2013; FRITZSCHE, *et al.*, 2017; BONFIM-MELO, *et al.*, 2018). As formas amastigotas apresentam miotropismo característico, relacionado diretamente com a patologia da doença, onde observa-se danos a órgãos como coração, esôfago e intestino (MEIS e CASTRO, 2017; PINTO, GRISARD e ISHIDA, 2011; DE SOUZA e BARRIAS, 2017).

As amastigotas também podem se diferenciar em formas tripomastigotas sanguíneas, forma não replicante, que são liberadas na corrente em decorrência da ruptura da célula, e podem infectar outros tecidos e órgãos. Os triatomíneos adquirem as formas tripomastigotas sanguíneas do parasito no momento do repasto sanguíneo em hospedeiros infectados em fase aguda ou reagudização, diferenciando-se no inseto em formas epimastigotas replicativas no intestino médio e o colonizam por sucessivas divisões binárias, mantendo a infecção no vetor (MEIS e CASTRO, 2017; PINTO, GRISARD e ISHIDA, 2011)

Devido a heterogeneidade natural do parasito, observa-se ampla patogênese nas infecções pelo *T. cruzi*, com o tropismo por células musculares lisa, cardíaca e esquelética, velocidade de infecção, virulência, sensibilidade as drogas, evasão do sistema imune, diferenciação (metaciclogênese) e parasitemia distintas (DE SOUZA, CARVALHO e BARRIAS, 2010; DE SOUZA e BARRIAS, 2017; BUSCAGLIA e Di NOIA, 2003; WEISBARTH, *et al.*, 2018).

Ressalta-se, que a transmissão do *T. cruzi* não ocorre pelos ovos dos triatomíneos, pois o parasito não consegue atravessar a camada espessa do ovo, portanto, as ninfas não são contaminadas e, só serão, caso se alimentem de um animal vertebrado infectado com o parasito (JORGE e CASTRO, 2000). Por outro lado, as fezes de triatomíneos infectados, quando em ambiente com elevada umidade, podem apresentar potencial infectante por algumas horas, favorecendo a contaminação de alimentos e carreadores secundários como moscas e baratas (DIAS *et al.*, 2015).

Alguns estudos demonstraram que o parasito se manteve viável por até 24 horas à temperatura ambiente em leite ou caldo de cana, já outros estudos demonstraram a capacidade do *T. cruzi* de sobreviver a longos períodos de congelamento (-80°C) (MARTINS, *et al.*, 2014). Além disso, possuem mecanismos químicos de proteção externa, que permite o parasito evadir-se do ambiente ácido do estômago e penetrar a mucosa intestinal (SHIKANAI-YASUDA, CARVALHO, 2012; DIAS *et al.*, 2015).

## **2.5 Patologia e diagnóstico**

A DC é a manifestação clínica causada pela infecção do *T. cruzi*, que pode ser assintomática e latente, mas também pode manifestar sinais e sintomas inflamatórios, como o chagoma (inchaço, edema), sinal de Romanã (inchaço das pálpebras), febre de intensidade variável, inflamação dos gânglios linfáticos e inchaço do fígado e do baço. Isso, porque, os parasitos depositados sobre a pele lesionada ou a mucosa estimulam uma reação inflamatória local com resposta celular, onde os tripomastigotas circulantes são tomados por macrófagos e

transportados para o fígado, baço, gânglios linfáticos, músculos esqueléticos e cardíacos, formando ninhos de amastigotas (COURA e BORGES-PEREIRA, 2010; MEIS e CASTRO, 2017).

O caminho de entrada dos tripomastigotas nas células se dá por fagocitose, realizada por macrófagos através de receptores de membrana específicos, e por endocitose, realizada pelas demais células, que culmina na formação de vacúolo fagocitário, responsável por isolar o parasito dentro da célula hospedeira. Dentro do vacúolo fagocitário os tripomastigotas transformam-se em amastigotas, e por diversos mecanismos de escape, rompem o vacúolo e passam ao citosol onde se multiplicam (BRENER, 1997; DE CARVALHO e BARRIAS, 2017). O quadro clínico da infecção surge após período de incubação que são de 5 a 14 dias após a transmissão vetorial, 3 a 21 dias por transmissão oral e 30 a 40 dias para as infecções por transfusão sanguínea, mas as manifestações crônicas da doença de Chagas aparecem mais tarde, entre 10 e 40 anos depois da infecção original (JORGE, 2013; MEIS e CASTRO, 2017). Além disso, a transmissão congênita pode acontecer em qualquer momento da gestação até durante o parto, e o feto pode sofrer aborto, maceração, prematuridade, lesões em órgãos de pele, coração, pulmão, tubo digestório, bexiga, tecido muscular e esquelético (RAMOS, *et al.*, 2021).

A doença caracteriza-se por duas fases clínicas bem definidas, uma aguda e outra crônica. A fase aguda possui duração de dois a três meses em média, e pode desencadear síndromes clínicas severas, decorrente do processo inflamatório exacerbado, da carga parasitária, tipo de cepa e susceptibilidade do indivíduo ao parasito (MONTGOMERY *et al.*, 2014; MALIK *et al.*, 2015). Podem surgir sinais mais brandos e desaparecer em dias ou persistir e culminar em manifestações fatais, como miocardite aguda, meningoencefalite ou ainda complicações secundárias, como a broncopneumonia. Poucos indivíduos desenvolvem síndromes severas nessa fase, mas quando acontece, a miocardite é a mais comum, caracterizada por intensa e difusa inflamação linfohistiocitária, miocitólise e edema, além da presença de parasitos nos tecidos. (ANDRADE, *et al.*, 2017; JORGE, 2013).

Também pode acometer intestino e esôfago, e, observa-se, parasitismo muscular e do plexo de Auerbach, além de infiltrado linfomononuclear ao longo dos plexos nervosos intramurais com destruição dos neurônios mioentéricos, causando denervação e relaxamento da musculatura lisa, com aumento progressivo do diâmetro dos órgãos afetados, determinando as chamadas megalias (ANDRADE, *et al.*, 2017). As formas digestivas acometem cerca de 10% dos pacientes sintomáticos, e, é encontrada majoritariamente em países ao sul da bacia amazônica (Brasil, Chile, Argentina e Bolívia), devido a distribuição geográfica das cepas do parasito (JORGE, 2013; PINTO, GRISARD e ISHIDA, 2011).

Cerca de 90% dos indivíduos infectados apresentam manifestações clínicas de fase aguda que se resolvem espontaneamente, mesmo se a infecção não for tratada com drogas tripanocidas, culminando em baixo diagnóstico precoce, que favorece a cronicidade da doença. Ainda assim, aproximadamente 60% destes indivíduos não manifestarão as formas clínicas cardíaca, neurológica, mista ou digestiva definidas, apresentando a forma indeterminada da DC que é caracterizada por ausência de sintomatologia clínica, com sorologia positiva para *T. cruzi*, e eletrocardiograma e radiografias de tórax e abdômen normais ou com isolados focos de agressão miocárdica e/ou discreta inflamação do miocárdio e/ou tecido gastrointestinal (DIAS, 1995; RASSI-Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010; HIGUCHI, 2017).

De acordo com Barrias, Carvalho e Souza (2013), 30 a 40% dos pacientes podem desenvolver uma forma crônica e sintomática da doença, com lesões irreversíveis no coração, esôfago e intestino grosso com alteração na condução nervosa desses órgãos, caracterizando as formas clínicas: cardíaca, digestiva e neurológica. Ainda, há forte correlação entre a morbimortalidade presente na fase crônica e as lesões teciduais que ocorrem na fase aguda, assim como a resposta imunológica do hospedeiro, visto que o sistema imune está envolvido tanto na redução da carga parasitária quanto nas lesões teciduais encontradas na fase crônica da doença (CUNHA-NETO, CHEVILLARD, 2014; RASSI-Jr; RASSI e MARIN-NETO, 2010; MALIK *et al.*, 2015; COURA, BORGES-PEREIRA, 2010; HIGUCHI, 2017).

A fase cardíaca crônica apresenta sinais e sintomas caracterizados por lesões teciduais, com aumento do volume do coração, alterações do ritmo de contração, fenômenos tromboembólicos e insuficiência cardíaca congestiva. Do ponto de vista histopatológico, observa-se miocardite crônica por células mononucleares, fibrose com afilamento de ponta e/ou da porção basal da parede póstero-lateral do ventrículo esquerdo e considerável hipertrofia de cardiomiócitos, sendo raro encontro de ninhos do *T. cruzi* (MCCORNICK, ROWLAND 1989; CUNHA-NETO *et al.*, 1995; MALIK *et al.*, 2015; FILIGHEDDU *et al.*, 2017; HIGUCHI, 2017). A perda de cardiomiócitos e a sua substituição por tecido fibrótico aumenta a força de trabalho e induz a desordens eletrofisiológicas, resultando em mau funcionamento do ritmo cardíaco, predispondo ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca (IC), bloqueios intra e atrioventriculares, além de taquiarritmias ventriculares, fatores com impacto prognóstico na DC (LIMA, TEIXEIRA e LIMA, 2018).

A desproporcionalidade da resposta imune do hospedeiro em relação a quantidade de parasito presente no tecido, durante a fase crônica, sugere a teoria da autoimunidade celular e humoral, devido aos infiltrados linfocitários multifocais encontrados agredindo fibras cardíacas não parasitadas, além da presença de antígenos do parasito e anticorpos anti-*T. cruzi*

(CORREA-OLIVEIRA *et al.*, 1999; CUNHA-NETO, 2014; HIGUCHI, 2017; ROFFE e MURPHY, 2018). Também foi encontrado desequilíbrio do sistema nervoso autônomo, visto em alguns pacientes uma hiperatividade beta adrenérgica incomum, decorrente da ativação de anticorpos contra receptores muscarínicos e adrenérgicos cardíacos, além disso, alguns estudos sugerem que outros microrganismos primitivos vivam em simbiose com o *Trypanosoma cruzi*, como clamídia e arqueias, e teriam participação ativa na resposta inflamatória intensa e difusiva. (PEREZ, LYMBERY e THOMPSON, 2014; HIGUCHI, 2017).

A resposta imune exacerbada, principalmente na fase aguda, foi observada ainda por Carlos Chagas (1909), e com o passar dos anos, estudos e técnicas inovadoras foram e estão sendo utilizadas para investigação, e, observaram que existe uma correlação positiva, mas não direta, entre a intensidade da resposta imune e a quantidade de parasito, em outras palavras, antígenos do parasito seriam um disparador da resposta inflamatória e que por uma provável alteração imunológica intrínseca do hospedeiro, essa resposta agride também fibras cardíacas não infectadas, e que, passado a fase aguda, essa resposta imune toma forma mais branda e persistente, caracterizando a fase crônica.

Há, ainda, estudos que indicam possível imunodepressão causada pelo *T. cruzi*, visto as concentrações de linfócitos T CD4+ baixos e altos linfócitos T CD8+ observados em animais e humanos, além do robusto mecanismo de evasão do sistema imune, com excreção de toxinas, antígenos e proteínas (TEIXEIRA, NASCIMENTO e STURM, 2006; ROFFE e MURPHY, 2018). Também são encontrados casos de reativação ou reagudização da DC, onde encontra-se numerosos ninhos de parasitos além de intensa inflamação e necrose, principalmente em indivíduos imunossuprimidos (ODA, *et al.*, 2021).

Os mecanismos fisiopatológicos dos distúrbios gastrointestinais crônicos ainda são pouco estudados, se comparados com a forma cardíaca crônica, mas observa-se danos causados às inervações motoras entéricas excitatórias e inibitórias, que ocasionam o megaesôfago e megacólon, além de vários distúrbios fisiológicos funcionais, que acredita ser decorrente da grande perda neuronal que ocorre tanto na fase aguda como progressivamente ao longo da fase crônica da doença (ODA, *et al.*, 2021). Assim, a desnervação pode estar relacionada a diferentes fatores próprios do hospedeiro, sua interação com o parasito ou persistência do parasito no tecido do hospedeiro, além da possibilidade da autoimunidade, visto alguns estudos que demonstraram interação citotóxica acelerada entre linfócitos T reativos ao *T. cruzi* com células alogênicas não parasitadas, destruindo neurônios dos plexos entéricos e fibras musculares (CUNHA-NETO, 2014; MATSUDA *et al.*, 2009; PINAZO *et al.*, 2014; CAMPOS *et al.*, 2016; RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 1979).

A forma cardíaca crônica foi e é amplamente estudada, visto sua prevalência nos casos diagnosticados, e de acordo com a última atualização da Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Diagnóstico e Tratamento de Pacientes com Cardiomiopatia da Doença de Chagas (CDC) que aconteceu em 2022, os mecanismos patogênicos e fisiopatológicos da CDC foram profundamente revisitados e, de forma epistemológica e pragmática, foi concluído que a necrose e fibrose são causadas pela persistência parasitária tissular e reação imune exacerbada, classificadas como os principais mecanismos de lesão, coadjuvados por distúrbios autonômicos e microvasculares.

Entretanto, as demais formas crônicas da doença permanecem com patogenia inconclusiva e diversas teorias tentam elucidar os mecanismos que levam a lesões teciduais e provocam as disfunções fisiológicas observadas, estudando e entendendo a interação parasito hospedeiro, persistência do parasito, a proposta neurogênica e a autoimunidade (TEIXEIRA *et al.*, 2011; ODA, *et al.*, 2021).

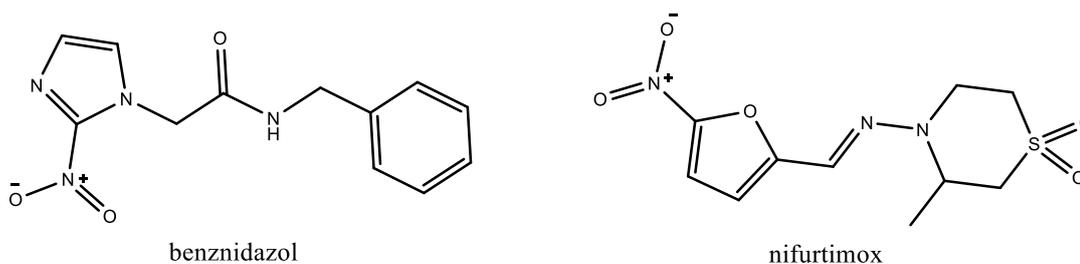
O diagnóstico da DC tem como base três parâmetros: sinais e sintomas de doença (anamnese), antecedentes epidemiológicos e os métodos analíticos de diagnóstico, que permite confirmar ou excluir a suspeita. As análises de sangue são as mais realizadas, sendo que o diagnóstico do agente causador poderá ser identificado por meio de métodos laboratoriais de visualização do parasito direto ou indiretamente, e por presença de anticorpos no soro. Também podem ser utilizados testes mais específicos e mais sensíveis, como Hemaglutinação Indireta (HAI), enzimas (ELISA) e Imunofluorescência Indireta (IFI). Testes moleculares utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) acoplado à hibridização com sondas moleculares, e o “western blot” (WB), são utilizados principalmente quando o paciente apresenta baixa carga parasitária ou quando não respondem aos métodos citados anteriormente, e podem ser utilizados como teste confirmatório em qualquer fase da doença. Contudo, o custo desses testes mais sensíveis é relativamente alto, se comparado com métodos tradicionais, como parasitológicos e sorológicos, por isso são pouco utilizados. (MEIS e CASTRO, 2017; GOMES, 2017; ALVES, *et al.*, 2018).

## **2.5 O tratamento**

O tratamento etiológico para a doença de Chagas teve início no final da década de 60, com o surgimento do nifurtimox (nfx) e do benznidazol (bnz), fármacos nitroheterocíclicos tripanocidas (FIG. 5). O nfx foi produzido no Brasil pela Bayer (Nif, LAMPIT) até a década de 80, e foi descontinuado devido à baixa demanda, retomando sua produção em 2000 na fábrica situada em El Salvador (Ilopango Bayer), mas como tratamento de primeira linha para *T. brucei*

*gambiense*. Até 2003 a Roche (Rochagan® e Radanil®) era responsável pela produção do bzn, quando passou para o governo brasileiro os direitos e a tecnologia de fabricação do Rochagan®, assumida pela companhia farmacêutica de economia mista, Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe), responsável até então pela produção (CASTRO e SOEIRO, 2017).

**Figura 5:** Estrutura química do benznidazol e do nifurtimox.



**Fonte:** autor

Em 2006, o Lafepe passou a ser o fabricante mundial deste produto, registrando-o no Ministério da Saúde com o nome Lafepe Benznidazol® (apresentação de 100mg comprimido). O medicamento é vendido a organizações de saúde, ao Ministério da Saúde do Brasil e para instituições e centros de pesquisas, com fins comprovadamente científicos. (LAFEPE, 2021; ELEA, 2023). Foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso em crianças de 2 a 12 anos, em 2017, sendo este o primeiro tratamento para doença de Chagas aprovado nos EUA (FDA, 2017).

O medicamento de primeira escolha para tratamento da DC no Brasil é o bzn, sendo fornecido gratuitamente pelas Secretarias Estaduais de Saúde, indicado principalmente para tratamento da doença na fase aguda, quando há elevada parasitemia e sua ação tripanocida é eficaz, com potencial chance de cura. Contudo, na fase crônica sua eficiência diminui muito, visto que não consegue solubilizar bem em fluidos biológicos, permear as células e atingir as formas amastigotas de forma satisfatória, portanto sua utilização nessa fase é realizada com delicada avaliação do risco/benefício, principalmente em gestantes, idosos e pacientes com sequelas maiores. Dessa forma, pacientes assintomáticos e com exames sem alterações (forma indeterminada) ou em formas clínicas iniciais, possuem potencial terapêutico maior. Em casos de intolerância aos efeitos adversos ou resistência de cepas do *T. cruzi*, o Ministério da Saúde disponibiliza o nifurtimox como alternativa de tratamento (CASTRO e SOEIRO, 2017; LIMA; TEIXEIRA e LIMA, 2018).

O mecanismo de ação dos dois fármacos é bastante parecido, porém com algumas singularidades. O benznidazol é um 2-nitroimidazol e o nifurtimox um 5-nitrofurano e ambos são considerados pró-fármacos, pois acredita-se que sejam ativados por nitroredutases dos parasitos, que reduz o grupo nitro a metabólitos citotóxicos responsáveis pelo efeito tripanocida observado. O nfx gera radicais livres e metabólitos eletrolíticos que causam danos oxidativos ao parasito e ao hospedeiro, justificando os intensos efeitos colaterais encontrados para esse fármaco (WILKINSON *et al.*, 2008; HALL; BOT; WILKINSON, 2011; DAVANÇO, 2016; OLIVEIRA, *et al.*, 2018). Também já foi demonstrado que o bzn aumenta a atividade do interferon gama (IFN- $\gamma$ ), que otimiza a fagocitose, além de inibir a enzima NADH-fumarato redutase do *T. cruzi* (DÍAZ DE TORANZO *et al.*, 1988; DIAS, *et al.*, 2009; MAYA *et al.*, 2007).

Apesar de ambos os medicamentos serem nitroheterocíclicos, o bzn é um 2-nitroimidazol com menor potencial de redução quando comparado com o grupo 5-nitrofurânico de nifurtimox, levando a uma menor taxa de formação de radical nitroânion e de espécies reativas, permitindo uma melhor resposta de detoxificação tanto para *T. cruzi*, quanto para o paciente, acarretando em menores eventos adversos, visto a não seletividade dos metabólitos para células do parasito (HALL *et al.*, 2011).

Estudos realizados por Wilkinson, Hall, Wyllie, Molina e outros pesquisadores, demonstraram que a perda induzida da enzima nitroredutase tipo I do *T. cruzi* (TcNTR) diminuiu a taxa de crescimento dos parasitas em sua forma epimastigota e impediu a diferenciação para a forma infecciosa (tripomastigotas metacíclicos). Além disso, induziu uma maior resistência ao benznidazol, nifurtimox e outros nitrocompostos, indicando um importante papel metabólico da TcNTR no parasita. As NTRs tipo I são encontradas principalmente em bactérias e algumas espécies de fungos, embora protozoários como *Trypanosoma sp.* e *Leishmania sp.* expressem-nas. Não é encontrada em mamíferos e acredita-se que o *T. cruzi* tenha adquirido essa enzima por transferência horizontal de genes (DE OLIVEIRA; HENRIQUES; BONATTO, 2007). Assim, acredita-se que esta enzima seja o principal ativador de nitrocompostos utilizados como pró-fármacos para a doença de Chagas (WILKINSON, *et al.*, 2011; HALL; WILKINSON, 2012; WYLLIE *et al.*, 2013; PATTERSON e WYLLIE, 2014; MOLINA, *et al.*, 2021).

Em geral, a tolerabilidade é melhor nas crianças do que nos adultos, e acredita-se que seja porque o sistema imunológico, bem como a resposta de detoxificação nesse público, sejam mais fortes. Em adultos, reações adversas ocorrem em média entre 20 e 30 % dos pacientes, podendo afetar até mais 60% em esquemas terapêuticos prolongados. As reações adversas mais

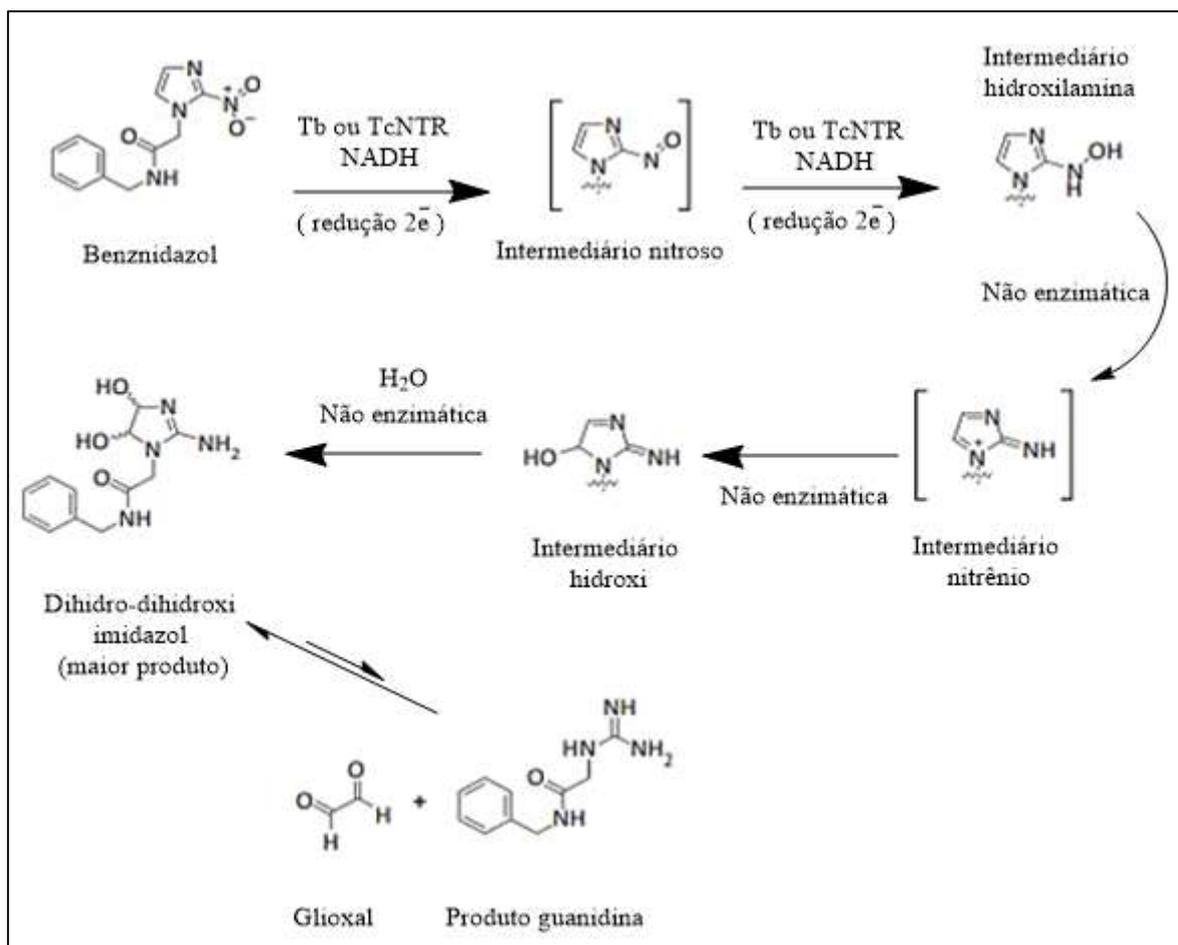
frequentes são dermatopatias por hipersensibilidade, não dose dependente e distúrbios gastrintestinais, como náuseas, vômitos, diarreia, cólica intestinal, podendo ocorrer em aproximadamente 10% dos casos, e pode ser tratado os sintomas sem interrupção do tratamento. Polineuropatia periférica, dose dependente, também é comum ocorrer, principalmente em tratamentos crônicos, sendo aconselhável interromper o tratamento até melhora dos sintomas. Sintomas menos comuns são cefaleia, vertigem, anorexia, alterações de enzimas hepáticas e hipoplasia medular (LAFEPE, 2018).

Em 2015 foi publicado os resultados do estudo BENEFIT (Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis), o primeiro estudo randomizado, duplamente cego, controlado por placebo e multicêntrico a avaliar a eficácia do benznidazol na evolução clínica da doença de Chagas crônica em pacientes com avançado comprometimento cardíaco. Este foi considerado o estudo mais relevante dos últimos anos, sendo o maior ensaio clínico já realizado para a doença de Chagas. O estudo reforça o alto risco/benefício de tratamento com bzn na DCC, visto as complicações cardíacas comumente encontradas, destacando a importância de tratar os pacientes de forma precoce. Além disso, foi observado um alto nível de mortalidade entre os pacientes voluntários, expondo as complexidades sérias e desafios a serem enfrentados (BATISTA *et al.*, 2017)

### 2.5.1 Benznidazol

O mecanismo proposto para o bzn traz que a TcNTR do tipo I promova uma redução consecutiva de 2 elétrons no grupo nitro, resultando no intermediário hidroxilamina, que sofre uma série de transformações não enzimáticas que a convertem em 4,5-dihidro-4,5-dihidroxiimidazol, que em solução aquosa existe em equilíbrio com o glioxal + produto guanidina substituído (FIG. 6). O glioxal é um dialdeído altamente reativo, capaz de se ligar covalentemente a proteínas, lipídios e nucleotídeos, alterando estruturas moleculares e a função fisiológica, portanto, foi levantada a hipótese de que o glioxal fosse o maior responsável pela ação antitripanossômica do benznidazol. No entanto, a produção de glioxal a partir de dihidrodiidroxiiimidazóis é muito lenta, o que significa que é pouco provável que a produção de glioxal seja o único mecanismo citotóxico, além disso, a guanidina também participa da ação tripanocida, com a formação de adutos de guanosineglioxal. (WILKINSON, *et al.*, 2011; WYLLIE *et al.*, 2013; PATTERSON e WYLLIE, 2014; CIRQUEIRA, 2019; MOLINA, *et al.*, 2021).

**Figura 6:** Mecanismo de biotivação do benznidazol mediado por TcNTR.



**Fonte:** Adaptado de PATTERSON e WYLLIE, 2014.

Atualmente, o bzn pertence a classificação biofarmacêutica de classe II, caracterizada por baixa solubilidade em água e fluidos aquosos e alta permeabilidade (SOBRINHO *et al.*, 2007; FERRAZ, 2017). Entretanto, Maximiano e colaboradores (2010) propuseram a inclusão do fármaco na classe IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade), trazendo valores de LogP<sub>ow</sub> de 0,772, solubilidade aquosa e em fluídos gástricos em torno de 0,236 mg/mL e fluídos entéricos em torno 0,244 mg/mL (MAXIMIANO, *et al.*, 2010). A absorção do bzn por via digestiva é rápida e quase total, atingindo concentrações plasmáticas máximas entre 2 a 4 horas. O tempo de meia-vida de eliminação plasmática ( $t_{1/2\beta}$ ) é de aproximadamente 12 horas, e encontra-se no organismo principalmente sob a forma inalterada, sendo os metabólitos rapidamente eliminados pela urina e fezes (LAFEPE, 2018). A dose diária recomendada para o tratamento adulto, com exceção dos grupos de risco, é de 5 a 7 mg/kg de peso corpora e deve ser mantido entre 30 e 60 dias consecutivos (FAFEPE, 2018).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, 6<sup>o</sup> Edição, Volume 2; o bzn é praticamente insolúvel em água e de solubilidade limitada em álcoois comuns como metílico, etílico,

isopropílico e glicerol (BRASIL, 2010). Mesmo em condições básicas (hidróxido de sódio 0,1 M) ou ácidas (ácido clorídrico 0,1 M) é muito pouco solúvel. Ainda, estudos realizados por Maximiano *et al.*, (2010) apontou uma Velocidade Intrínseca de Dissolução (VID) para bnz de 0,18 mg/cm<sup>2</sup>/min, valor bastante inferior ao mínimo recomendável de 1 mg/cm<sup>2</sup>/ min, e um valor de Coeficiente de partição [LogP<sub>ow</sub>] em torno de 0,7, sugerindo que tanto a dissolução deste fármaco como a sua capacidade de permear as membranas celulares são baixas.

Mendes e colaboradores (2019), estudaram a distribuição tecidual do bnz em diferentes esquemas terapêuticos no modelo camundongo e os resultados obtidos foram uma distribuição não uniforme e não dose ou tempo-dependente, demonstrada pela aleatoriedade da penetração do fármaco nos órgãos analisados, com razão de 1-95% no baço, duodeno, estômago, pulmão e rim (MENDES *et al.*, 2010). O somatório das recentes descobertas sobre a farmacocinética e farmacodinâmica do bnz corroboram a baixa eficácia observada na fase crônica da doença, influenciada pelas características farmacotécnicas do fármaco intrínsecas a solubilidade em fluídos aquosos e lipofilicidade, comprometendo a biodisponibilidade, culminando em maiores dosagens e tempo de tratamento, que leva a maiores efeitos adversos.

### **2.5.2 Derivados sulfonamídicos de bnz e nanotecnologia**

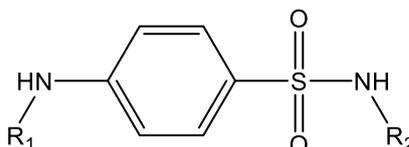
Duas abordagens têm sido comumente empregadas no desenvolvimento de fármacos para doenças negligenciadas: o reposicionamento de fármacos já conhecidos e a combinação de fármacos. Utilizar medicamentos conhecidos com perfis de segurança e farmacocinética já avaliados para uso humano, bem como a combinação desses fármacos, são estratégias promissoras para o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas. Além disso, um melhor conhecimento da distribuição genômica e aspectos bioquímicos de *T. cruzi* e diversas abordagens pré-clínicas, permitiram a identificação de potenciais alvos do parasito como, por exemplo: metabolismo de esteróis, DNA, cisteína protease, síntese de nucleotídeos e via de salvamento de purinas, dihidofolato redutase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase e metabolismo de pirofosfato (OLIVEIRA, 2017, apud, SANCHEZ-SANCHEZ *et al.* (2016), SALOMÃO *et al.* (2016), MENNA-BARRETO & DE CASTRO (2017), SALOMÃO & DE CASTRO (2017), SUETH-SANTIAGO *et al.* (2017), FIELD *et al.* (2017); SALES-JUNIOR *et al.* (2017).

Com base nisso, diversos compostos foram lançados candidatos e, entre eles, os compostos azólicos, derivados fenoxifenoxietilcianato, tiazóis, nitrocompostos e derivados sulfonamídicos tem-se demonstrados promissores em estudos pré-clínicos. (FERREIRA, 2018; BERMUDEZ *et al.*, 2016; CASTRO e SOEIRO, 2017). Derivados sulfonamídicos são agentes

antimicrobianos e apresentam elevada eficácia em tratamentos de infecções por bactérias, fungos e protozoários (IBRAHIM *et al.*, 2014), ao interferirem no desenvolvimento e crescimento dos microorganismos. O grupo sulfonamídico desempenha considerável função na atividade tripanocida (BOCANEGRA-GARCIA, *et al.*, 2012) e destaca-se como um importante grupo funcional no planejamento e síntese de medicamentos com atividade antiparasitária (BARBOSA, 2017).

As sulfonamidas são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido para-aminobenzóico (PABA), inibindo enzimas responsáveis pelo metabolismo de ácido fólico, vitamina precursora da síntese de DNA, RNA e proteínas em bactérias, fungos e protozoários (SEGUNDO, 2016). A estrutura química geral das sulfonamidas está representado na FIG. 7 e os substituintes relacionados com a atividade farmacológica são o grupo 4-amino e o grupo 1-sulfonamida monossustituído. Sua relação estrutura-atividade indica necessidade do anel aromático apresentar orientação para dos grupos amino e sulfonamida para sua atividade, com ênfase para o grupo amino livre, que possui maior atividade quando não tem substituições no R<sub>1</sub>. Além disso, os melhores substituintes do R<sub>2</sub> são anéis aromáticos ou heterocíclios (SEYDEL, 1968; BARBOSA, 2017).

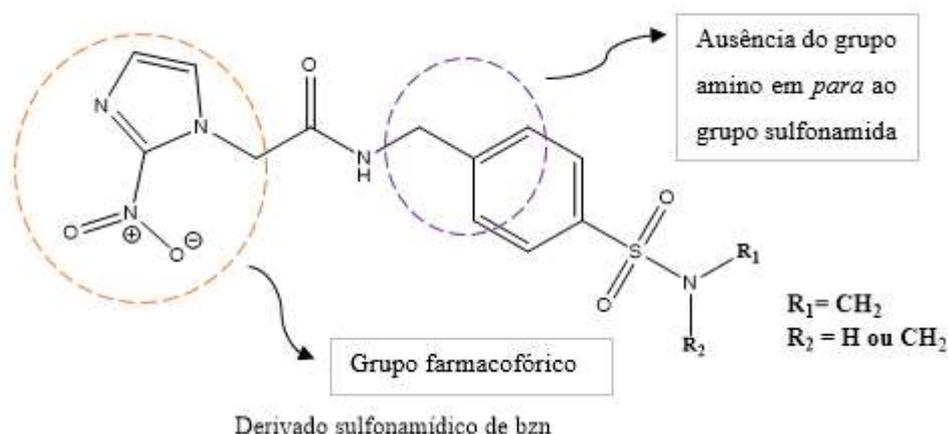
**Figura 7:** Estrutura química geral da sulfonamida.



**Fonte:** autor.

Como discutido anteriormente, o grupo nitroimidazólico do bzn parece ser o grupo farmacofórico responsável por importante resposta tripanocida (FIG. 8). Dessa forma, o anel benzílico torna-se a porção da molécula do benznidazol candidata a modificações, sem interferir em sua atividade de maneira deletéria. A princípio, a inserção de um grupo sulfonamida no anel benzílico não tornaria o derivado de bzn uma sulfonamida propriamente dita, visto a ausência do grupo amino livre em posição *para* ao grupo sulfonamida, apontado como R<sub>1</sub> na FIG. 7. No entanto, a inserção deste grupo possibilita a modulação das propriedades físico-químicas, bem como levaria a exposição de um sítio de ligação para nanocarreadores.

**Figura 8:** Estrutura química geral de derivado sulfonamídico de bzn.



**Fonte:** autor.

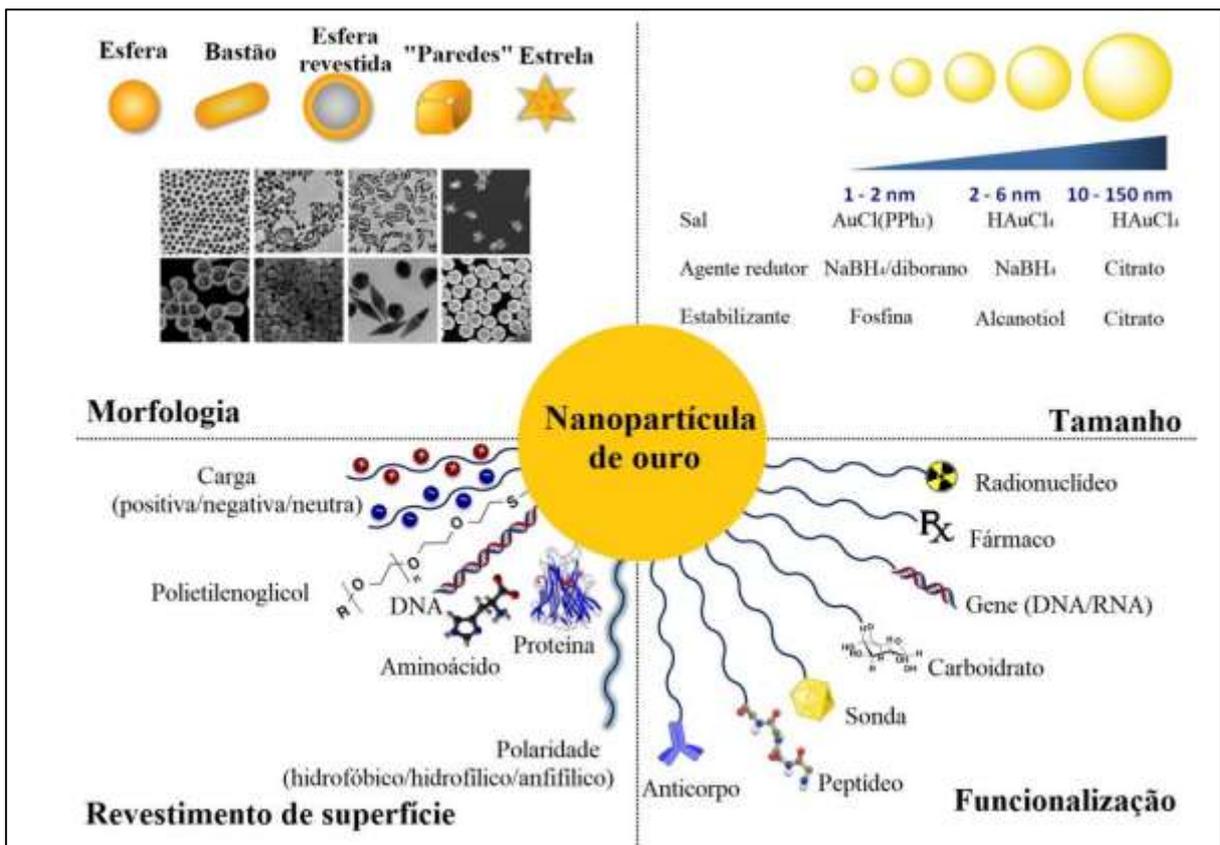
Nesse contexto, a nanotecnologia tem despertado bastante interesse da tecnologia farmacêutica, com o desenvolvimento de nanomateriais de dimensões físicas entre 0,1 e 100 nanômetros, que podem auxiliar em diagnósticos e tratamentos de enfermidades, atuando, por exemplo, como carreadores/vetores, reservatório (cápsulas) ou matricial (matriz polimérica) de fármacos, permitindo controlar e direcionar a liberação destes dentro do organismo (ROSSI-BERGMANN, 2008; PIMENTAL, *et al.*, 2007; FAHNING, *et al.*, 2011; PROENÇA, 2017; REIS, *et al.*, 2012). Lamas, *et al.* (2006) com o intuito de melhorar o perfil de dissolução do bzn, delineou lipossomas que carregam o fármaco, demonstrando aumento da solubilidade em fluídos aquosos, melhora da seletividade e diminuição da toxicidade. Entretanto, a forma farmacêutica é parenteral, impactando na adesão a tratamentos diários e extensos, além do custo para a implementação comercial dessa forma farmacêutica.

A nanotecnologia traz inúmeras possibilidades do uso de fármacos nanoestruturados em carreadores como nanobastões, nanoesferas, nanopartículas e nanotubos, e, dentre os materiais utilizados para esse fim, tem-se os compostos inorgânicos, como platina, ouro e prata, que cada vez mais tem-se destacado na nanotecnologia farmacêutica. As nanopartículas de ouro (AuNPs) são bastante utilizadas na construção de sensores, catalizadores, e como carreadores de fármacos, melhorando o diagnóstico e tratamento de tumores, inflamações crônicas, infecções, doenças degenerativas e autoimunes.

Possuem propriedades interessantes como propriedades magnéticas, térmicas, ópticas, eletrônicas e catalíticas, além de serem biocompatíveis, possuem alta taxa superfície/volume e serem pouco tóxicas em relação a outros nanomateriais, entretanto, a toxicidade deve ser minuciosamente avaliada. As AuNPs são frequentemente utilizadas em sua forma funcionalizada, ou seja, são ancoradas a moléculas de interesse, mas para isso precisam ser

estabilizadas. A forma mais tradicional é por estabilização estérica, utilizando glutationa ou cisteamina, que se ancoram a superfície da nanopartícula por ligação covalente, a fim de manter sua estabilidade coloidal e evitar que elas agreguem, sejam degradadas ou sofram reações não-específicas com componentes do meio (CAO, 2004; XIAO, *et al.*, 2019; BATISTA, 2020; KNITTEL, 2021). A Figura 9 mostra os tipos de morfologia e tamanho das nanopartículas de ouro, além dos tipos de revestimentos e funcionalização desta.

**Figura 9:** Representação de funcionalização da superfície de uma nanopartícula de ouro.



**Fonte:** Oliveira, 2020.

Portanto, alternativas tecnológicas podem ser exploradas para obtenção de formas farmacêuticas mais seguras e eficazes contendo benznidazol, visto o melhor entendimento acerca do mecanismo de ação do fármaco, a importância fisiológica da TcNTR para o *T. cruzi* e o bônus dela não ser expressa em mamíferos (DE OLIVEIRA; HENRIQUES; BONATTO, 2007).

Em amplo espectro, o presente projeto propõe a funcionalização do benznidazol com grupos sulfonamida, visando não só o melhoramento das suas características farmacocinéticas e farmacológicas, mas também a possibilidade futura de acoplamento desses derivados a nanopartículas de ouro, a fim de melhorar o alcance do parasito *T. cruzi* durante a fase crônica

da doença e o seu perfil toxicológico. Para o acoplamento do fármaco com as AuNPs torna-se necessário que essa funcionalização do bzn leve a exposição de um grupo funcional amino, responsável por ligar covalentemente com o grupo carboxila da glutathione, ligante utilizado para estabilizar as AuNPs, bem como unir as nanoesferas de ouro ao bzn.

### 3. OBJETIVOS

**Objetivo geral:** Obtenção de derivados sulfonamídicos do benznidazol com potencial ação contra *T. cruzi* e com sítio de ligação para acoplamento com nanopartículas de ouro.

**Objetivos específicos:**

- Síntese e caracterização do derivado de benznidazol clorossulfonado;
- Síntese e caracterização de diaminas protegidas;
- Síntese e caracterização de derivados sulfonamídicos;
- Ensaios *in vitro* contra o *T. cruzi*.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

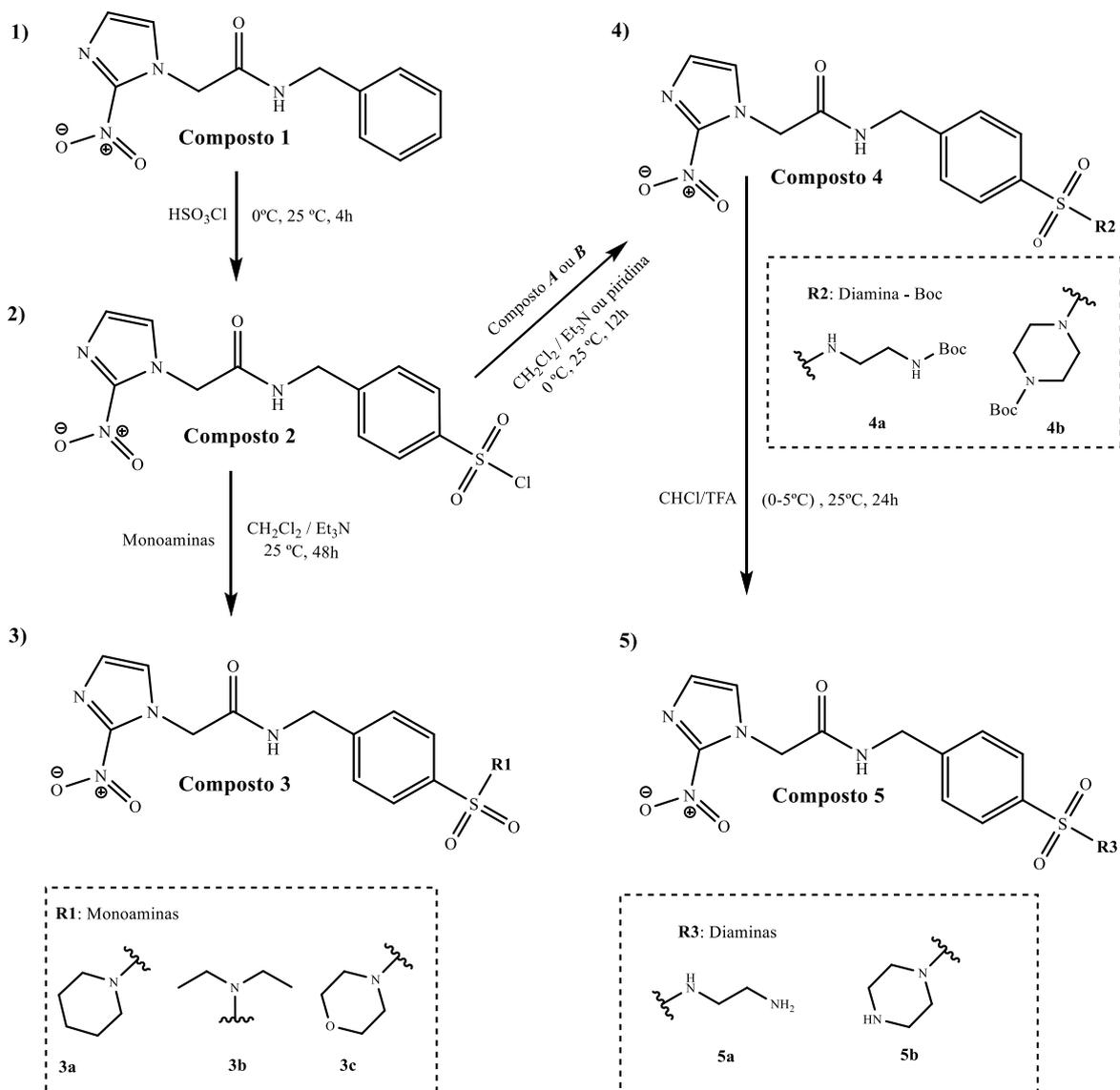
A análise dos produtos obtidos foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando sílica gel VETEC 60 a 230 mesh e sílica gel Merck 60 a 230 mesh com revelador UV (HF<sub>254</sub>). Como reveladores foram utilizados vapor de iodo, solução ninidrina 0,3%, molibdato cérico de amônio (CAM) verde de bromocresol, reagente de Dragendorff e luz ultravioleta (UV). Para cromatografia em coluna de sílica (CCS) foi utilizada a sílica gel VETEC 250 mesh. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, foram obtidos em espectrômetro Bruker AC-400 MHz em experimentos realizados no Laboratório Multiusuário da UFOP-MG. Foi utilizado como padrão interno o tetrametilsilano (TMS) e os solventes clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*<sub>6</sub>), e os sinais descritos em deslocamento químico ( $\delta$ , ppm). Todas as substâncias foram sintetizadas no Laboratório de Química Medicinal e Bioensaios da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto sob a supervisão do Prof. Saulo Braga. Foram utilizados materiais de partida e solventes disponíveis comercialmente, sem prévia purificação.

##### 4.1 Proposta de rota sintética para modificação estrutural da molécula de benznidazol

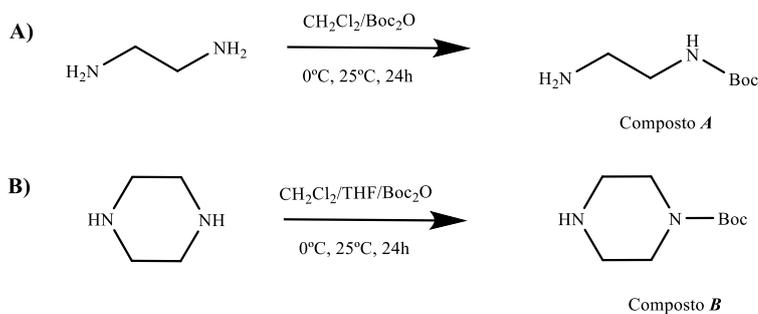
Para funcionalização do benznidazol foi proposta uma rota sintética visando a obtenção de um derivado clorossulfônico para reação com diferentes aminas, resultando em derivados sulfonamídicos. Foram utilizadas monoaminas, que levaram a derivados sulfonamídicos sem a presença de um grupo amino livre, e as díaminas, que contemplam um grupo amino livre para posterior acoplamento à nanopartículas de ouro. A rota foi planejada seguindo técnicas adaptadas de Trouxine e colaboradores (TROUXINE, *et al*, 2014), Braga (2016), (SCHWEINITZ, *et al*, 2004) Souza (2016), Oliveira (OLIVEIRA, 2005), Lopes (LOPES, 2018) e Martinho (MARTINHO, 2021) e está ilustrada no Esquema 1.

**Esquema 1: Rota sintética para obtenção de compostos sulfonamídicos.**

**I) Rota sintética para obtenção de derivados sulfonamídicos de bzn**



**II) Rota sintética para proteção das diaminas**



**Legenda:** I) Rota sintética descrita para a obtenção dos derivados sulfonamídicos propostos nesse trabalho. II) Obtenção das diaminas piperazina (A) e etilenodiamina (B) monoprotetidas por di-carbonato de di-*tert*-butila ( $\text{Boc}$ )<sub>2</sub>O. **Fonte:** autor

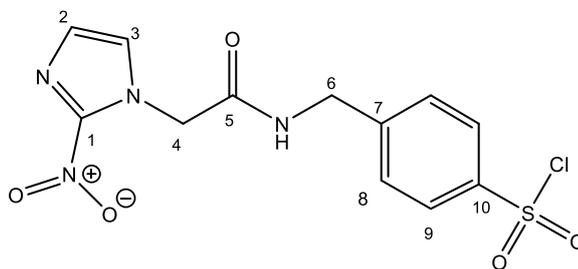
Na primeira etapa da rota sintética **I** (esquema 1), o bzn reage com o ácido clorossulfônico à baixa temperatura, via Substituição Eletrofílica Aromática (SEAr), produzindo o derivado clorossulfonado. O derivado obtido seria acoplado a diferentes aminas, utilizando a trietilamina (base fraca) como aceptor de prótons, via reação de adição seguida de eliminação, resultando em derivados sulfonamídicos. Para as diaminas é necessária a proteção prévia de uma das aminas, e utilizando o dicarbonato de di-*tert*-butila como grupo protetor, à baixa temperatura, obteriam-se as diaminas monoprotetidas, conforme demonstrado na rota sintética **II**, esquema 1. O grupo protetor *N*-Boc seria removido ao final da síntese utilizando ácido trifluoracético (TFA), como demonstrada na rota sintética **II**.

#### 4.1.1 Procedimento para a obtenção do derivado de bzn clorossulfonado

Para a clorossulfonação no anel benzílico do bzn, foi utilizada a técnica descrita por Trouxine e colaboradores, porém com modificações, a fim de otimizar o rendimento e a purificação do produto. O procedimento e condições utilizados para obtenção desse composto está descrito a seguir.

##### *4.1.1.1 Síntese do cloreto de 4-((2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida)metil)benzenossulfonila e do cloreto de 2-((2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida)metil)benzenossulfonila (Composto 2)*

Em um balão de fundo redondo contendo 390 mg (1 eq., 1,5 mmol) de bzn, sob agitação magnética e banho de gelo (0°C), adicionou-se gota a gota 3 mL (30 eq., 45,05 mmol) de ácido clorossulfônico. Após adição do ácido manteve-se a mistura reacional sob banho de gelo e agitação magnética por 30 minutos, e após remoção do banho de gelo permaneceu sob agitação magnética a 25°C por 4 horas. O fim da reação foi acompanhado por CCD (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH - 9:1) e uso de reveladores (vapor de iodo, CAM e luz UV). Após o consumo do bzn o líquido viscoso amarelado foi vertido lentamente em um béquer com 10 mL de água destilada gelada, sob banho de gelo e agitação magnética. O precipitado formado foi filtrado à vácuo, lavado com água destilada gelada e seco no dessecador, levando a obtenção do produto bruto, na forma de sólido branco com 75% de rendimento.

**Figura 10:** Estrutura química e dados do composto 2

Formula química:  $C_{16}H_{20}N_6O_5S$   
 Peso molecular: 408,43 g/mol

**Fonte:** autor.

**Anexo A - RMN de  $^1H$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 400 MHz):** 8,9 (m;  $^3J=5,6$  Hz; 1H; N-H), 7,7 (d;  $^3J=0,8$ ; 1H; H-3), 7,5 (d;  $^3J = 8,0$ ; 2H; H-9), 7,2 (d;  $^3J = 8,0$ ; 2H; H-8); 7,2 (d; 1H; H-2), 5,1 (s; 2H; H-4), 4,3 (d;  $^3J = 5,6$ ; 2H; H-6).

**Anexo B - RMN de  $^{13}C$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 100 MHz):** 166,1 (C-5), 148,4 (C-1), 147,1 (C-10), 139,6 (C-7), 129,3 (C-3), 127,9 (C-2), 125,9 (C-9), 127,1 (C-8), 52,0 (C-4), 42,6 (C-6).

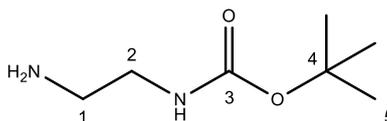
#### 4.1.2 Procedimento geral para obtenção de diaminas protegidas

Utilizando técnicas adaptadas de Braga (BRAGA, 2016), (SCHWEINITZ, *et al.*, 2004) e Lopes (LOPES, 2018), fez-se a proteção das aminas etilenodiamina e piperazina, utilizando 1 equivalente de dicarbonato de di-*terc*-butila ( $Boc_2O$ ) para 6 equivalentes de amina, em baixa temperatura (0-5°C) (Esquema 1 – Rota sintética II). Utilizou-se diclorometano para diluição da etilenodiamina, THF para dissolução da piperazina e diclorometano para solubilizar o dicarbonato de di-*terc*-butila. O controle da adição do  $Boc_2O$  foi ajustado de forma a durar de 2 a 3 horas, tempo na qual a temperatura da reação foi elevada à temperatura ambiente gradativamente, permanecendo sob agitação magnética vigorosa por mais 24 horas. O término da reação foi acompanhado por CCD ( $CH_2Cl_2/MeOH - 9:1$ ) e solução ninidrina 0,3% utilizada como revelador. Para ambas, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente retirado no rotaevaporador, obtendo um sólido amarelado que foi purificado por CCS ( $CH_2Cl_2/MetOH - 95:5$ ). Ressalta-se que a CCS foi eluída com polaridade gradativamente crescente, ou seja, iniciou a purificação com diclorometano e aumentou-se a polaridade do solvente até 5% de metanol.

#### 4.1.2.1 Obtenção do *tert*-butil (2-aminoetil)carbamato (**Composto A**)

Utilizando 500 mg de etilenodiamina (8,3 mmol) e 300 mg de Boc<sub>2</sub>O (1,4 mmol), obteve-se 67 mg da amina monoprotetida após purificação por CCS (35,5 % de rendimento). Para a elaboração lavou-se a mistura reacional com solução aquosa de carbonato de potássio 1M (3x20mL).

**Figura 11:** Estrutura química e dados do composto **A**



Fórmula química: C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Peso molecular: 160,22 g/mol

**Fonte:** autor

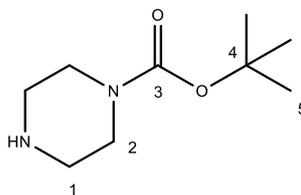
**Anexo D - RMN de <sup>1</sup>H (δ; CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz):** 5,0 (sl; 1H; H-N (carbamato)), 3,1 (d; <sup>3</sup>J = 5,2; 2H; H-2), 2,8 (d; <sup>3</sup>J = 4,4; 2H; H-1), 2,5 (sl; 1H; N-H (amina)), 1,4 (s; 9H; H-5).

**Anexo E - RMN de <sup>13</sup>C (δ; CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz):** 156,3 (C-3), 79,3 (C-4), 42,7 (C-1 ou C-2), 41,6 (C-1 ou C-2), 28,4 (C-5).

#### 4.1.2.2 Obtenção do *tert*-butil-piperazina-1-carboxilato (**Composto B**)

Utilizando 790 mg (9,2 mmol) de piperazina e 350 mg de Boc<sub>2</sub>O (1,6 mmol), obteve-se 124 mg da amina monoprotetida (41,5 % de rendimento). Foi necessário retirar os solventes (THF e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) no rotaevaporador, para posterior solubilização do produto (semissólido resultante) em solução aquosa de carbonato de potássio 1M (3x20mL), que foi extraída 3 x com 20mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

**Figura 12:** Estrutura química e dados do composto **B**



Fórmula química: C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Peso molecular: 186,26 g/mol

**Fonte:** autor.

**Anexo G - RMN de <sup>1</sup>H (δ; CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz):** 4,8 (sl; 1H; N-H), 3,4 (t; <sup>3</sup>J = 4,8; 4H; H-2), 2,8 (sl; 4H; H-1), 1,4 (s; 9H; H-5).

**Anexo H - RMN de <sup>13</sup>C (δ; CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz):** 154,1 (C-3), 79,9 (C-4), 51,4 (C-2), 45,7 (C-1), 28,5 (C-5).

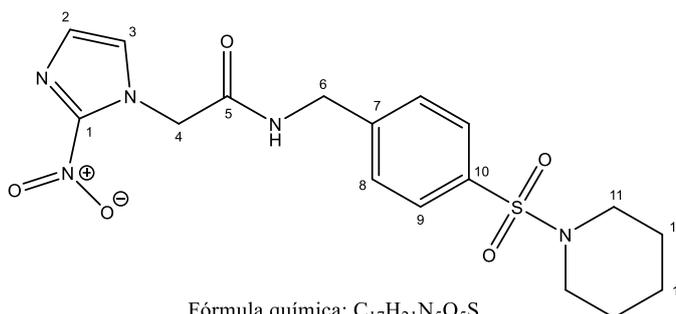
### 4.1.3 Procedimento geral para a obtenção de derivados sulfonamídicos

Utilizando técnica adaptada de Trouxine *et al.* (2014), Oliveira (2005) e Cassiano *et al.* (2022), foram sintetizados derivados sulfonamídicos partindo do bzn clorossulfonado, sem prévia purificação. Para os derivados sulfonamídicos de monoaminas (Esquema 1 - Rota sintética I, compostos **3a**, **3b** e **3c**), após adição do nucleófilo a reação permaneceu sob agitação magnética por 48 horas em temperatura ambiente. O término das reações foi acompanhado por CCD (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MetOH – 9,5:0,5) e reveladores (vapor de iodo, CAM e luz UV). A elaboração se deu por lavagem da fase orgânica com água destilada gelada (3 x 10mL), seguida de solução ácida de HCl (3M) gelada (1 x 10 mL) até pH aproximadamente 5. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente removido em rotaevaporador, obtendo produtos em forma de sólidos ou semissólidos amarelos que foram purificados por CCS (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MetOH – 98:2). Assim como na purificação das diaminas protegidas, a eluição da CCS foi realizada com polaridade gradativamente crescente, ou seja, iniciou a purificação com diclorometano e aumentou-se a polaridade do solvente até 2% de metanol.

Os derivados obtidos de diaminas (Esquema 1 i Rota I, compostos **4a** e **4b**) previamente protegidas, tiveram as condições reacionais controladas, com adição vagarosa da diamina (compostos **A** e **B**) em meio reacional (acetato de etila) contendo o derivado clorossulfonado (composto **2**), sob banho de gelo (0-5°C) e agitação magnética, utilizando a trietilamina ou piridina como aceptor de prótons. O término da reação foi acompanhado por CCD (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MetOH - 9:1) utilizando como revelador solução ninidrina 0,3% e luz UV. A mistura reacional foi extraída com solução carbonato de sódio 1M (3 x 10 mL), a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente retirado no rotaevaporador. Foram obtidos mistura de dois regioisômeros do derivado de piperazina (Composto **4b**) em posição *para* e em posição *orto*, e o isômero *para* isolado.

#### 4.1.3.1 Síntese do derivado sulfonamídico – 2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-N-(4-(piperidin-1-ilsulfonil)benzil)acetamida. (Composto **3a**)

Em um balão de fundo redondo contendo 56 mg (1 eq., 0,15 mmol) do produto **2**, sob agitação magnética e banho de gelo, foi adicionado gota a gota 30 µL (2 eq., 0,3 mmol) de piperidina, previamente diluída em 2 mL de diclorometano. Obteve-se 19,7 mg de produto após purificação por CCS (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MetOH: 1:0; 9:1; 8:2) (31 % de rendimento).

**Figura 13:** Estrutura química do composto **3a**Fórmula química: C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S

Peso molecular: 407,44 g/mol

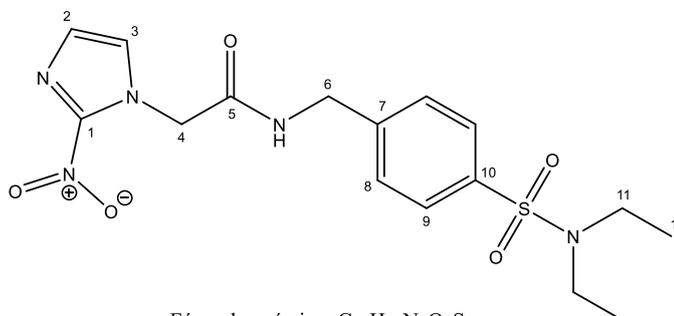
Fonte: autor

**Anexo J - RMN de <sup>1</sup>H (δ; CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz):** 7,5 (d; <sup>3</sup>J = 7,8; 2H; H-9), 7,3 (d; <sup>3</sup>J = 7,8; 2H; H-8), 7,2 (sl; 1H; H-2), 7,8 (sl; 1H; H-3), 5,2 (s; 2H; H-4), 4,5 (d; <sup>3</sup>J = 3,88; 2H; H-6), 2,9 (t; <sup>3</sup>J = 5,32; 4H; H-11), 1,6 (sl; 4H; H-12), 1,4 (sl; 2H; H-13).

**Anexo L - RMN de <sup>13</sup>C (δ; CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz):** 165,4 (C-5), 142,96 (C-10), 134,8 (C-7), 128,3 (C-2), 127,8 (C-9), 127,7 (C-8), 127,4 (C-3), 53,2 (C-4), 46,9 (C-11), 42,9 (C-6), 25,1 (C-12), 23,3 (C-13).

#### 4.1.3.2 Obtenção do derivado sulfonamídico – *N*-(4-(*N,N*-dietilsulfamoil)benzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (**Composto 3b**)

Em um balão de fundo redondo contendo 50 mg (1 eq., 0,14 mmol) do produto **2** sob agitação, foram adicionados 43 μL (3 eq., 0,42 mmol) de dietilamina previamente diluída em 3 mL de diclorometano. Obteve-se 23,1 mg de produto após purificação por CCS (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MetOH: 1:0; 9:1; 8:2) (42% de rendimento).

**Figura 14:** Estrutura química do composto **3b**.Fórmula química: C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S

Peso molecular: 395,43 g/mol

Fonte: autor

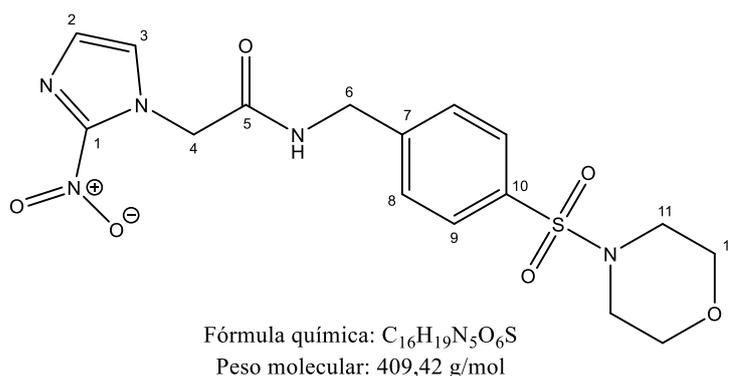
**Anexo N- RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz):** 7,5 (d;  $^3J = 8,08$ ; 2H; H-9), 7,3 (d;  $^3J = 8,08$ ; 2H; H-8), 7,2 (m; 2H; H-2 e H-3), 5,1 (s; 2H; H-4), 4,5 (d;  $^3J = 7,2$ ; 2H; H-6), 3,1 (q;  $^3J = 7,12$ ; 4H; H-11), 1,1 (t;  $^3J = 7,1$ ; 6H; H-12).

**Anexo O - RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz):** 165,3 (C-5), 142,5 (C-7), 138,7 (C-10), 128,4 (C-3), 127,9 (C-9), 127,4 (C-2), 127,0 (C-8), 52,2 (C-4), 42,9 (C-6), 42,1 (C-11), 14,1 (C-12).

#### 4.1.3.3 Síntese do derivado sulfonamídico– *N*-(4-(morfolinosulfonil)benzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida. (Composto 3c)

Em um balão de fundo redondo contendo 60 mg (1 eq., 0,16 mmol) do produto **2**, sob agitação magnética, foram adicionados 45  $\mu\text{L}$  (3 eq., 0,5 mmol) de morfolina, previamente diluída em 5 mL de diclorometano. Obteve-se 42 mg de produto após purificação por CCS ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MetOH}$ : 1:0; 9:1; 8:2) (61% de rendimento).

**Figura 15:** Estrutura química do composto **3c**.



**Fonte:** autor

**Anexo Q - RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz):** 7,6 (d;  $^3J = 7,6$ ; 2H; H-9), 7,4 (d;  $^3J = 7,6$ ; 2H; H-8), 7,2 (sl; 1H; H-2), 7,1 (sl; 1H; H-3), 5,1 (s; 2H; H-4), 4,4 (s; 2H; H-6), 3,7 (s; 4H; H-11), 2,9 (s; 4H; H-12).

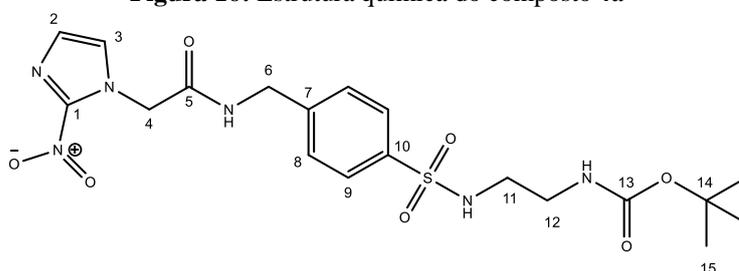
**Anexo R - RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz):** 165,7 (C-5), 143,5 (C-10), 133,7 (C-7), 128,1 (C-9 e C-2), 128,0 (C-8 e C-3), 66,0 (C-12), 52,2 (C-4), 45,9 (C-11), 43,0 (C-6).

#### 4.1.3.4 Obtenção da *tert*-butil (2-((4-((2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida)metil)fenil) sulfonamida)etil)carbamato (Composto 4a)

Em um balão de fundo redondo, sob banho de gelo, agitação magnética, contendo 80 mg (1 eq., 0,22 mmol) do produto **2** em 20 mL de diclorometano e 0,2 mL (10 eq., 2,1 mmol) de piridina, foi adicionado gota-a-gota 70 mg (2 eq., 0,44 mmol) do produto **A** solubilizada em

15 mL de diclorometano. Após adição completa, o banho de gelo foi retirado e a mistura reacional ficou sob agitação magnética a temperatura ambiente por 2 horas. O término da reação foi acompanhado por CCD ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  – 100%) utilizando como revelador solução ninidrina 0,3% e luz UV. Lavou-se a mistura reacional com água destilada gelada (3 x 5 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi retirado no rotaevaporador. Obteve-se um 100 mg de sólido amarelo, que foi purificado por CCS (EtOAc/Hex – 1:1) resultando em 30mg de produto final após purificação por CCS ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MetOH}$ : 1:0; 9:1; 8:2) ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MetOH}$ : 1:0; 9:1; 8:2) (28% de rendimento).

**Figura 16:** Estrutura química do composto **4a**



Fórmula química:  $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}$   
 Peso molecular: 482,51 g/mol

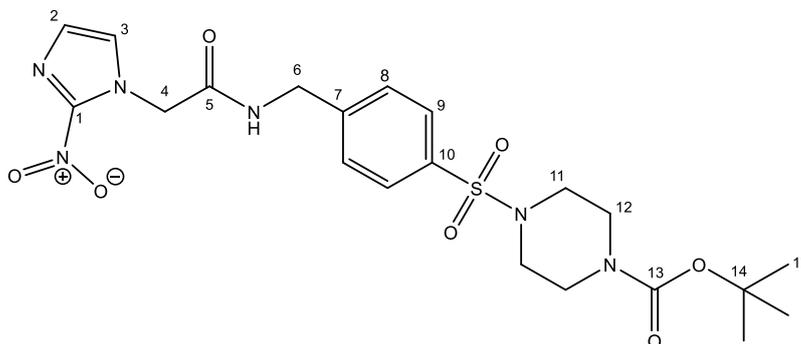
**Fonte:** autor

**Anexo T - RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz):** 8,3 (sl; 1H; N-H), 7,7 (d;  $^3J = 7,96$ ; 2H; H-9), 7,3 (d;  $^3J = 8,04$ ; 2H; H-8), 7,1 (sl; 2H; H-2 e H-3), 5,0 (s; 2H; H-4), 4,4 (d;  $^3J = 4,6$ ; 2H; H-6), 3,0 (sl; 2H; H-12); 2,8 (sl; 2H; H-11), 1,9 (s; 2H; N-H), 1,3 (s; 9H; H15).

**Anexo U - RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz):** 173,2 (C-13); 165,4 (C-5); 142,8 (C-1), 139,5 (C-10 ou C-7), 139,1 (C-7 ou C-10), 129,0 (C-3), 128,0 (C-9), 127,0 (C-8), 125,5 (C-2), 79,2 (C-14), 51,9 (C-4), 43,2 (C-11 ou C-12), 43,1 (C-12 ou C-11), 42,8 (C-6), 28,2 (C-15).

#### **4.1.3.5 Obtenção do tert-butil 4-((4-((2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetamina) metil) fenil) sulfonil) piperazina-1-carboxilato (Composto 4b)**

Utilizando 119 mg (0,33 mmol) do produto **2** e 70 mg (0,37 mmol) da amina protegida **B**, obteve-se 70 mg de um líquido viscoso, que foi purificado por CCS ( $\text{CHCl}_3/\text{MetOH}$  – 97:3), obtendo 59% de rendimento.

**Figura 17:** Estrutura química do composto **4b**

Formula química: C<sub>12</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S  
 Peso molecular: 508,55 g/mol

Fonte: autor

**Anexo X - RMN de <sup>1</sup>H (δ; DMSO-*d*<sub>6</sub>; 400 MHz):** 7,5 (d; <sup>3</sup>J = 8,0 Hz; 2H; H-9), 7,3 (d; <sup>3</sup>J = 8,0 Hz; 2H; H-8), 7,2 (s; 1H; H-3), 7,1 (s; 1H; H-2), 5,1 (s; 2H; H-4), 4,5 (d; <sup>3</sup>J = 5,2 Hz; 2H; H-6), 3,4 (sl; 4H; H-11), 2,9 (sl; 4H; H-12), 1,4 (s; 9H; H-13).

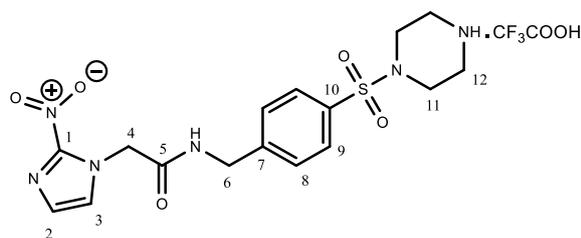
**Anexo Z - RMN de <sup>13</sup>C (δ; DMSO-*d*<sub>6</sub>; 100 MHz):** 165,5 (C-5), 154,3 (C-13), 145,0 (C-1); 143,6 (C-10), 134,4 (C-7), 128,7 (C-3), 128,4 (C-9), 128,1 (C-8), 127,6 (C-2), 80,7 (C-14), 52,4 (C-4), 46,0 (C-11 e 12), 43,2 (C-6), 28,5 (C-15).

#### 4.1.4 Procedimento geral de desproteção do grupo amino dos compostos **4b**

Para a desproteção da amina presente no derivado sulfonamídico, composto **4b**, utilizou-se técnica adaptada de Souza (SOUZA, 2014), e a remoção do grupo *N*-Boc do anel de piperazina se deu em meio reacional contendo diclorometano, em banho de gelo e em condições ácidas, utilizando ácido trifluoroacético (TFA) em excesso. Após adição do ácido, o banho de gelo foi retirado e a mistura reacional ficou sob agitação magnética a temperatura ambiente *overnight*. O término da reação foi acompanhado por CCD (AcOEt 100%) utilizando como revelador solução ninidrina 0,3% e luz UV. Por meio da adição e evaporação com éter etílico, fez-se a cristalização do produto final, o composto **5b**.

##### 4.1.4.1 Obtenção do trifluoroacetato de 2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-N-(4-(piperazin-1-ilsulfonil)benzil)acetamida (Composto **5b**)

Utilizando 27 mg (0,05mmol) do composto **4b** e 0,125 mL (1,6mmol) de TFA, obteve-se 22 mg de um sólido marrom (rendimento quantitativo).

**Figura 18:** Estrutura química do composto **5b**

Fórmula química:  $C_{16}H_{20}N_6O_5S$   
 Peso molecular: 408,43 g/mol

**Fonte:** autor

**Anexo Y - RMN de  $^1H$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 400 MHz):** 9,0 (sl; 1H; H-N (amida)), 7,7 (d;  $^3J = 8,3$  Hz; 2H, H-9), 7,6 (s; 1H; H-3), 7,5 (d;  $^3J = 8,3$  Hz; 2H; H-8), 7,2 (s; 1H; H-2), 5,2 (s; 2H; H-6), 4,4 (d;  $^3J = 5,88$ ; 2H; H-4), 3,3 (sl; 4H; H-11), 3,1 (sl; 4H; H-12).

**Anexo AA - RMN de  $^{13}C$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 100 MHz):** 166,7 (C-5), 145,8 (C-1), 145,4 (C-10), 133,1 (C-7), 129,3 (C-3), 128,3 (C-8 e C-9), 128,0 (C-2), 52,0 (C-4), 43,4 (C-11), 42,7 (C-12), 42,3 (C-6).

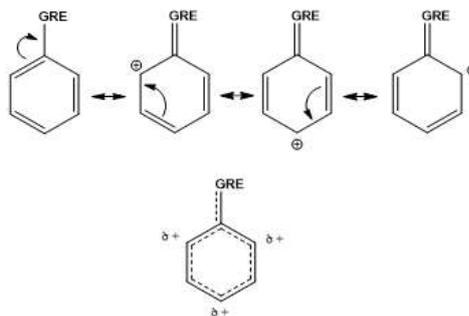
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O benznidazol apresenta como grupo farmacofórico o anel nitroimidazólico, portanto, essa região da estrutura deve ser preservada (PATTERSON e WYLLIE, 2014). Dessa forma, visando um sítio de ligação para acoplamento com AuNSs foi escolhido o anel benzílico para a funcionalização da molécula. Partindo da técnica descrita por Trouxine e colaboradores (TROUXINE, *et al.*, 2014), com adaptações, planejou-se uma substituição eletrofílica aromática (SEAr) no anel benzílico, que poderia acontecer nas posições *para* e/ou *orto*, preferencialmente, utilizando o ácido clorossulfônico como eletrófilo. Após a reação de clorossulfonação do anel benzílico obtém-se o cloreto de sulfonila, que por mecanismo de adição da amina seguida de eliminação do cloreto, reage com aminas variadas formando derivados sulfonamídicos. Dessa forma, foi sintetizado o derivado sulfonamídico com um segundo grupo amino livre para futuro acoplamento com as AuNSs, e também derivados sem o grupo amino livre que podem ser testados e avaliados quanto ao seu potencial tripanocida. Ainda, como foram obtidas várias amostras para um mesmo produto, decidiu-se enumera-las como amostra 1, 2, 3..., sucessivamente, a fim de organizar a ordem cronológica dos experimentos. Os resultados obtidos na síntese desses derivados são detalhados nos itens a seguir.

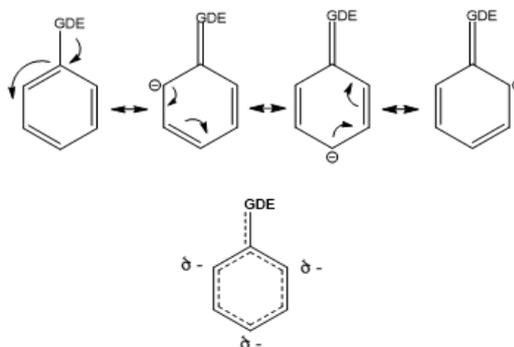
### 5.1 Derivado clorossulfonado

A clorossulfonação do anel benzílico se dá por SEAr, e acontece quando o anel aromático é exposto, em condições adequadas, a um eletrófilo forte o suficiente para que a reação aconteça. Em um anel monossustituído a clorossulfonação pode acontecer em três posições; *orto*, *meta* e *para*, em relação ao substituinte do anel aromático. A reatividade de cada posição dependerá da natureza do substituinte.

Grupos retiradores de elétrons (GRE) seja por ressonância ou efeito indutivo diminuem a reatividade do anel aromático, principalmente nas posições *para* e *orto*, pois, o deslocamento da nuvem eletrônica na direção do grupo substituinte, torna essas posições menos nucleofílicas. Além disso, verifica-se baixa estabilidade do íon arênio gerado em substituições nessas posições, visto que a carga positiva de umas das estruturas de ressonância estaria sobre o carbono diretamente ligado ao grupo substituinte. Portanto, a posição mais nucleofílica e com maior estabilidade do carbocátion gerado é a posição *meta*, para grupos retiradores de densidade eletrônica. Exemplo de GRE: NO<sub>2</sub>, C(O)R, C(O)OR e CN (SOLOMONS, 2001; BRUICE, 2006). A FIG. 18 mostra as estruturas de ressonância com o GRE genérico e as posições do anel aromático deficientes em elétrons.

**Figura 19:** Estruturas de ressonância para GRE genérico**Fonte:** autor

Os grupos doadores de elétrons (GDE) são ativadores do anel, pois aumentam a densidade eletrônica seja por ressonância ou efeito indutivo. A FIG. 19 mostra as estruturas de ressonância com GDE genérico, e pode-se observar que as regiões mais ricas em elétrons são em *para* e *orto*, visto a distribuição da nuvem eletrônica. Dessa forma, os GDE orientam substituições em posição *para* e *orto*. O efeito doador do tipo indutivo perde a força conforme a distância, portanto a posição *orto* é um pouco mais nucleofílica que a posição *para*, sob efeito indutivo. Exemplos de GDE: alquila, OH, OR, NH<sub>2</sub>, NR<sub>2</sub> (SOLOMONS, 2001; BRUICE, 2006)

**Figura 20:** Estruturas de ressonância para GDE genérico**Fonte:** autor

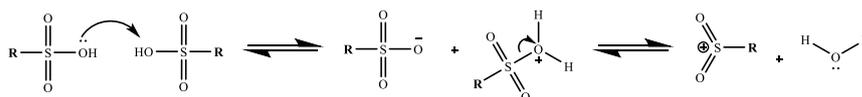
Portanto, para o anel benzílico do bzn, devido ao substituinte benzila ser um doador de densidade eletrônica do tipo indutivo, espera-se que as substituições ocorram nas posições *orto* e *para*, entretanto, devido ao impedimento estérico na posição *orto* e a região espacial livre da posição *para*, espera-se como produto majoritário das substituições aconteça na posição *para*.

Dessa forma, conforme FIG. 21, o mecanismo de reação proposto para a clorossulfonação do anel benzílico inicia na etapa **A**, onde acontece a dissociação espontânea do ácido clorossulfônico por meio da protonação da hidroxila, que forma o íon oxônio, e este sai como água formando o eletrófilo. Frente ao eletrófilo o anel benzílico realiza o ataque ao

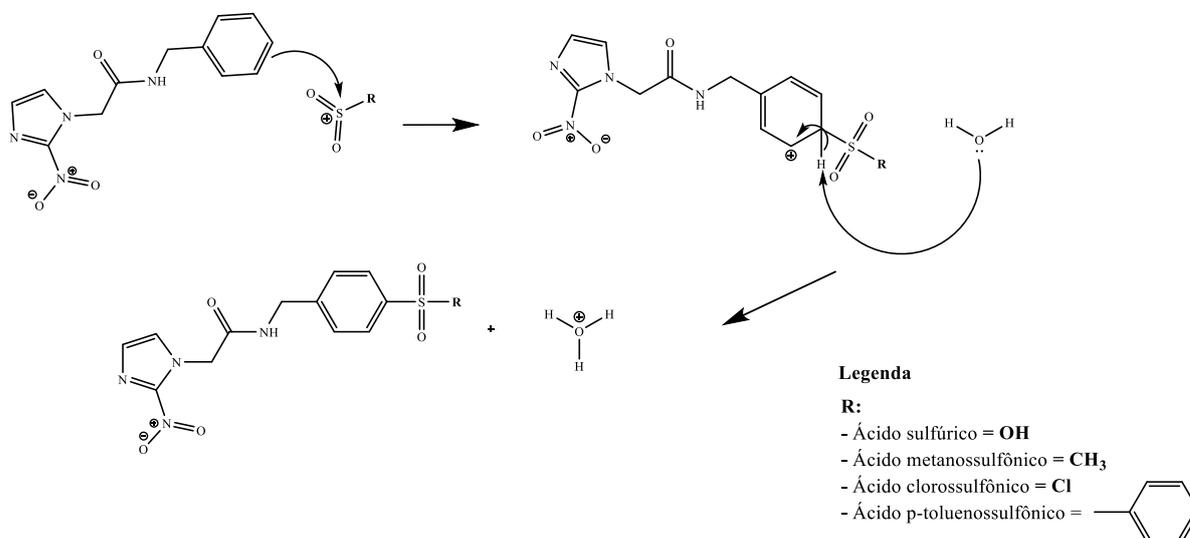
enxofre formando o íon arênio, que em seguida é desprotonado pela água ou a base conjugada do ácido restabelecendo a aromaticidade do anel, como observado na etapa **B** (SILVEIRA, 2023).

**Figura 21:** Mecanismo geral de clorossulfonação do anel benzílico do bzn.

**A) Formação do eletrófilo**



**B) Substituição eletrofílica aromática**



**Legenda:** A) Mecanismo de formação do eletrófilo. B) Mecanismo de substituição eletrofílica aromática. **Fonte:** autor

### 5.1.1 Sulfonação do anel benzílico

O ácido clorossulfônico não estava disponível no laboratório no início das atividades e outros ácidos sulfônicos foram utilizados como teste; o ácido *p*-toluenossulfônico e o ácido metanossulfônico. Ambos com estequiometria 1:15 (bzn/ácido), foram adicionados lentamente ao meio reacional contendo bzn, sob banho de gelo e agitação, e após adição ficaram em agitação a temperatura ambiente por 24 horas (TROUXINE *et al*, 2014). No entanto, não apresentaram reatividade frente ao bzn, conforme análise por CCD.

O ácido sulfúrico 98% também foi utilizado sob diversas condições, porém, os resultados apresentaram vários subprodutos, conforme análise por CCD e por RMN. A primeira tentativa utilizou banho de gelo para adição do ácido ao bzn, e após adição manteve-se em agitação em temperatura ambiente por 7 horas. Como não houve formação de produto, decidiu

adicionar o ácido a temperatura ambiente e deixar mais tempo agitando, além disso, foi feita tentativa de aquecimento da reação até 98°C. Em todas as reações foi utilizado estequiometria 1:10 (bnz/ácido). Os resultados e as condições das reações estão sumarizados na TAB. 1.

**Tabela 1:** Resultados de sulfonação no anel benzílico do bzn.

| Amostra | Reagentes e condição de reação                               | Aspecto físico do produto formado | Técnica analítica | Conclusão das análises               |
|---------|--|-----------------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| 01      | TsOH, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , MeOH, 0°C, 25°C, 24h | Semi-sólido                       | CCD               | Não consumiu material de partida     |
| 02      | MsOH, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 0°C, 25°C, 24h       | Semi-sólido                       | CCD               | Não consumiu material de partida     |
| 03      | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0°C, 25°C, 7h               | Sólido amarelo                    | CCD e RMN         | Não consumiu material de partida     |
| 04      | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 25°C, 98°C, 17h             | Óleo                              | CCD               | Produto de degradação e/ou impurezas |
| 05      | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 25°C, 28h                   | Óleo                              | CCD               | Produto de degradação e/ou impurezas |
| 06      | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MeOH, 25°C, 72h             | Semi-sólido                       | CCD               | Produto de degradação e/ou impurezas |

Fonte: autor

Atribui-se o insucesso das reações ao fato de que os ácidos sulfônicos e o sulfúrico, sob as condições utilizadas, não produzam eletrófilos suficientemente fortes para que a reação aconteça. Correlacionando tal efeito com os pKa's dos ácidos, temos em ordem crescente de força: 1,92 para o ácido sulfúrico<sup>1</sup>; -1,34 para o ácido *p*-tolueanosulfônico<sup>1</sup>; -1,86 para o ácido metanosulfônico<sup>1</sup> e -6 para o ácido clorossulfônico<sup>2</sup>, portanto, observa-se concordância entre os resultados de reatividade encontrados e a força dos ácidos.

### 5.1.2 Clorossulfonação do anel benzílico

Com a obtenção do ácido clorossulfônico, iniciou-se a reação conforme rota sintética inicialmente planejada (TROUPINE, *et al.*, 2014). Nas primeiras tentativas as reações aconteceram em atmosfera ambiente, utilizando uma relação estequiométrica de 1:15 equivalentes de bzn/ácido clorossulfônico em diclorometano, com adição do ácido clorossulfônico em banho de gelo e agitação magnética e, após adição, deixado o sistema em temperatura ambiente por 4 horas. A elaboração se deu por adição de solução tampão fosfato pH 7 e extração com diclorometano; utilizando-se éter de petróleo para cristalização. Nestas condições, o produto clorossulfonado foi obtido com 53% de rendimento bruto, contudo,

<sup>1</sup> Valores retirados do banco de dados PubChem – National Library of Medicine – National Center for Biotechnology Information, 2023.

<sup>2</sup> Valor retirado da ficha técnica do produto produzido pelo laboratório Sigma Aldrich, disponibilizado pela Merck KgaA, 2023.

análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da molécula revelaram a presença de impurezas que não foram identificadas.

Foram feitos então ajustes na equivalência molar, diminuindo para 6 equivalentes de ácido clorossulfônico e adicionando aquecimento de  $60^\circ\text{C}$ , porém o rendimento ficou abaixo dos 10%, além da presença de impurezas, conforme análises por CCD. Aumentou-se para 12 equivalentes, com adição do ácido em banho de gelo e trocou-se o solvente de diclorometano para acetato de etila. Obteve-se melhora no rendimento, com 30% de produto bruto. No entanto, observou-se que a elaboração da reação com extração líquido-líquido com solução tampão fosfato pH 7 e diclorometano/acetato de etila levava a perda de produto na fase aquosa, possivelmente por hidrólise do cloreto de sulforila recém-formado. Portanto, decidiu-se remover esta etapa, precipitando o produto em água destilada gelada. Com a modificação da elaboração, foi necessário retirar o solvente do meio reacional, a fim de evitar formação de fases e obter o máximo possível de produto na precipitação em água destilada. Como foi retirado o solvente do meio reacional, decidiu-se estender o tempo total de reação para 24 horas.

Assim, decidiu-se retornar com a estequiometria para 1:15 (bzn/ácido clorossulfônico) sendo o ácido agora o solvente da reação. Com essas modificações e precipitação em água destilada gelada foi possível obter o produto mais puro com 40% de rendimento, conforme análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Anexo CC, DD e EE – amostra 10)

Ainda na expectativa de melhorar o rendimento, visto que o cloreto é material de partida para as próximas etapas da rota sintética, submeteu-se a reação à atmosfera de nitrogênio, mas não houve diferença significativa no rendimento. Modificou-se novamente a estequiometria da reação, aumentando a proporção do ácido para 1:30 (bzn/ácido), diminuindo o tempo de reação para 4 horas. Com essas condições foi possível obter um rendimento de 76 % (Anexo A, B e C – amostra 11). A TAB. 2 traz o resumo das reações de clorossulfonação do bzn.

**Tabela 2:** Resultados da clorossulfonação no anel benzílico do bzn.

| Amostra/<br>n° do<br>composto | Reagentes e<br>condição de<br>reação   | Estequiometria<br>(bzn:ácido) | Aspecto<br>físico do<br>produto<br>formado | Elaboração/pu<br>rificação   | Rendimento<br>(%) | Técnica<br>analítica | Conclusão<br>das análises                      |
|-------------------------------|--|-------------------------------|--|--|-------------------|----------------------|--|
| 07/2                          | $\text{HSO}_3\text{Cl}$ ,<br>$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , $0^\circ\text{C}$ ,<br>$25^\circ\text{C}$ , 4h | 1:15                          | Sólido<br>branco                           | Extração<br>líquido-líquido<br>com solução<br>tampão fosfato<br>pH 7 | 53                | CCD e<br>RMN         | Derivado<br>clorossulfona<br>do +<br>impurezas |
| 08/2                          | $\text{HSO}_3\text{Cl}$ ,<br>$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , $0^\circ\text{C}$ ,<br>$60^\circ\text{C}$ , 2h | 1:6                           | Semi-sólido<br>amarelo                     | Extração<br>líquido-líquido<br>com solução<br>tampão fosfato<br>pH 7 | 9                 | CCD                  | Derivado<br>clorossulfona<br>do +<br>impurezas |

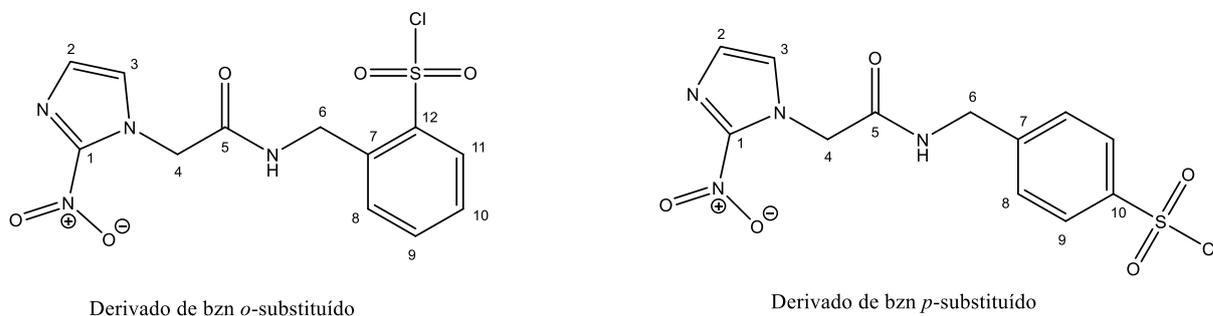
|       |   |      |                  |   |         |              |                                 |
|-------|---|------|------------------|---|---------|--------------|---------------------------------|
| 09/2  | HSO <sub>3</sub> Cl,<br>Acetato de etila, 0°C,<br>25°C, 48h | 1:12 | Sólido<br>branco | Precipitação em<br>solução tampão<br>fosfato pH 7 | 30%     | CCD          | Derivado<br>clorossulfona<br>do |
| 10/2  | HSO <sub>3</sub> Cl, 0°C,<br>25°C, 24h                      | 1:15 | Sólido<br>branco | Precipitação em<br>água destilada<br>gelada       | 40      | CCD e<br>RMN | Derivado<br>clorossulfona<br>do |
| *11/2 | HSO <sub>3</sub> Cl, 0°C,<br>25°C, 4h                       | 1:30 | Sólido<br>branco | Precipitação em<br>água destilada<br>gelada       | 53 - 76 | CCD e<br>RMN | Derivado<br>clorossulfona<br>do |

\*Foi realizado um *pool* de amostras obtidas das mesmas condições reacionais. **Fonte:** autor

Após a obtenção do derivado de bzn clorossulfonado, as reações para formação de sulfonamidas seguiram em paralelo as reações de melhorias da clorossulfonação, dessa forma, os primeiros produtos clorossulfonados e ainda com presença de impurezas foram utilizados nas reações subsequentes. Assim, nas últimas reações da rota sintética de modificação da molécula de bzn, foi observado que alguns sinais de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C a mais do que o esperado, julgados como possíveis impurezas, repetiam parâmetros de comportamento, como deslocamento químico e desdobramento de sinal. Foi então levantada a hipótese da obtenção de uma mistura de isômeros *orto* e *para* na formação do derivado clorossulfonado em algumas reações.

O grupo sulfonila na posição *para* gera simetria dos carbonos do anel, implicando em dois dupletos, e a substituição em *orto* não apresenta simetria, portanto, os 4 hidrogênios são quimicamente e magneticamente diferentes, e aparecem com perfis de sinais diferentes. O perfil esperado para o espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o isômero *orto* é de dois duplos tripletos com integral para 1 cada, referente aos hidrogênios 9 e 10; um duplo duplete para o hidrogênio 11 e um duplo duplete para o hidrogênio 8 (FIG. 22).

**Figura 22:** Estrutura química do cloreto *orto* e *para* substituído.

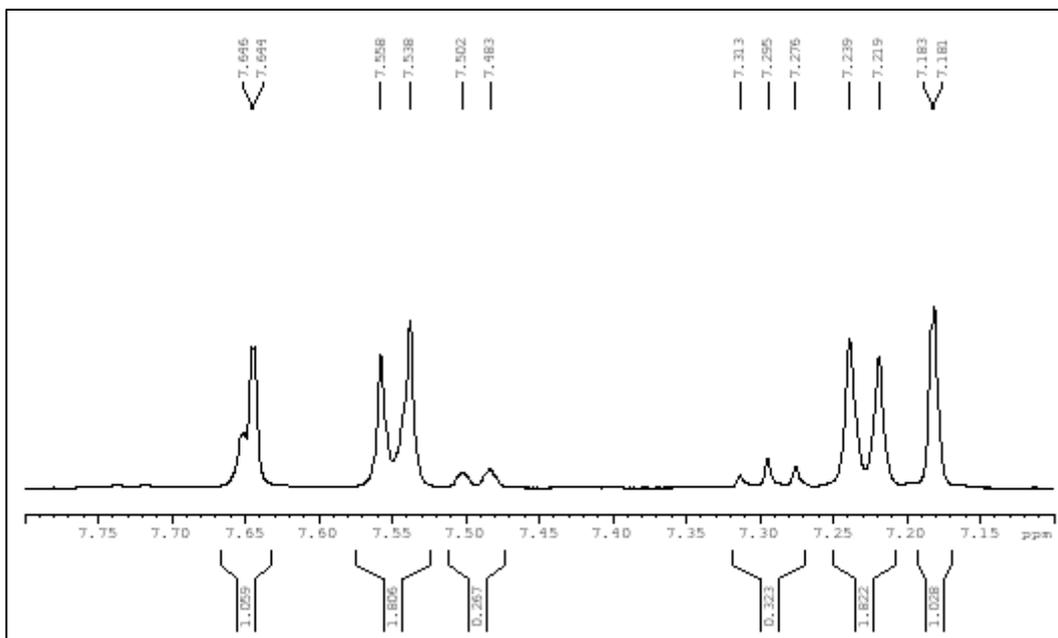


**Fonte:** autor

A FIG. 23 mostra o espectro de <sup>1</sup>H da amostra 11 no qual foi observado sinais característicos de uma substituição em *para* no anel benzílico: os dupletos em 7,2 e em 7,5 ppm com integral para dois hidrogênios cada, referentes aos hidrogênios H-8 e H-9. No entanto, a

presença de um tripleto em 7,3 ppm ( $^3J = 7,56$ ) e um duplete em 7,5 ppm ( $^3J = 7,48$ ) com integral de 0,3 hidrogênios cada, sugere a presença de uma pequena quantidade do isômero *orto*, porém devido à baixa concentração na amostra e a possível sobreposição dos sinais não foi possível observar todos os hidrogênios.

**Figura 23:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do cloreto de sulfonila *orto* e *para* substituído

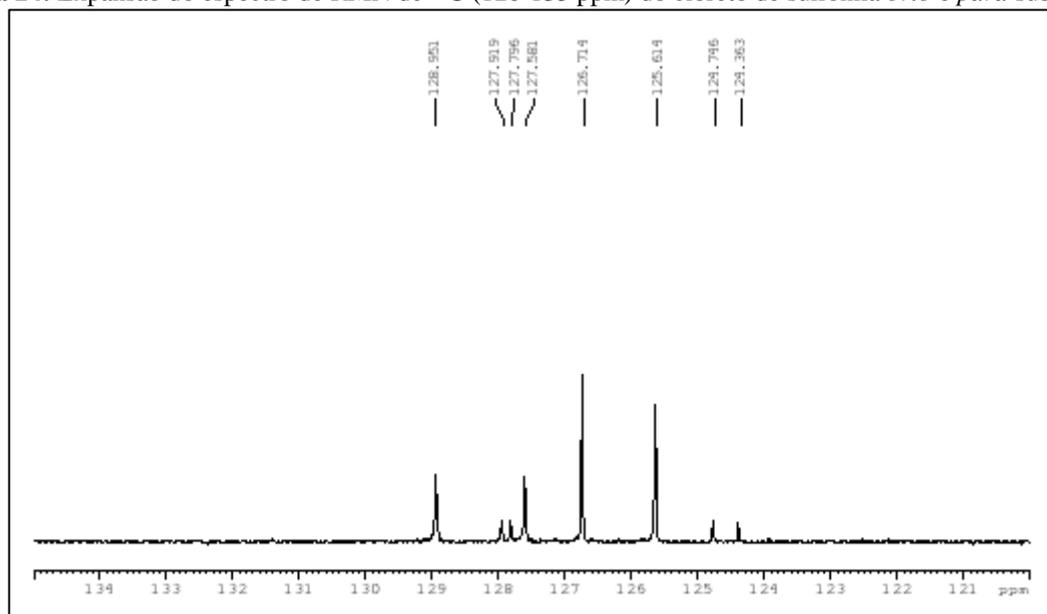


**Fonte:** autor

Os valores das constantes de acoplamento ( $^3J$ ) estão dentro da faixa esperada para acoplamento entre hidrogênios aromáticos (entre 6 e 10 Hz). Salienta-se que esse padrão de sinais foi também detectado nas primeiras reações, no entanto, devido à menor intensidade e ausência de alguns sinais característicos da posição *orto*, foi considerado como impurezas ou até mesmo resquícios do bzn.

No espectro de  $^{13}\text{C}$  (FIG. 24) a separação dos sinais do isômero *orto* os tornam mais nítidos, sendo observados quatro sinais de menor intensidade na região de carbonos aromáticos ((124-128 ppm); (Anexo C), sendo os dois sinais em 124,7 e 124,4 ppm atribuídos aos carbonos 8 e 10 e dois sinais em 127,9 e 127,8 ppm aos carbonos 9 e 11. Como discutido anteriormente, um grupo retirador de elétrons, como o grupo sulfonila, retira densidade eletrônica do anel por ressonância e deixa os carbonos 7, 11 e 9 com carga parcial positiva, diminuindo a anisotropia diamagnética local e desblindando os carbonos do campo magnético aplicado, que culmina em deslocamentos químicos maiores.

**Figura 24:** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (120-135 ppm) do cloreto de sulfonila *orto* e *para* substituído.

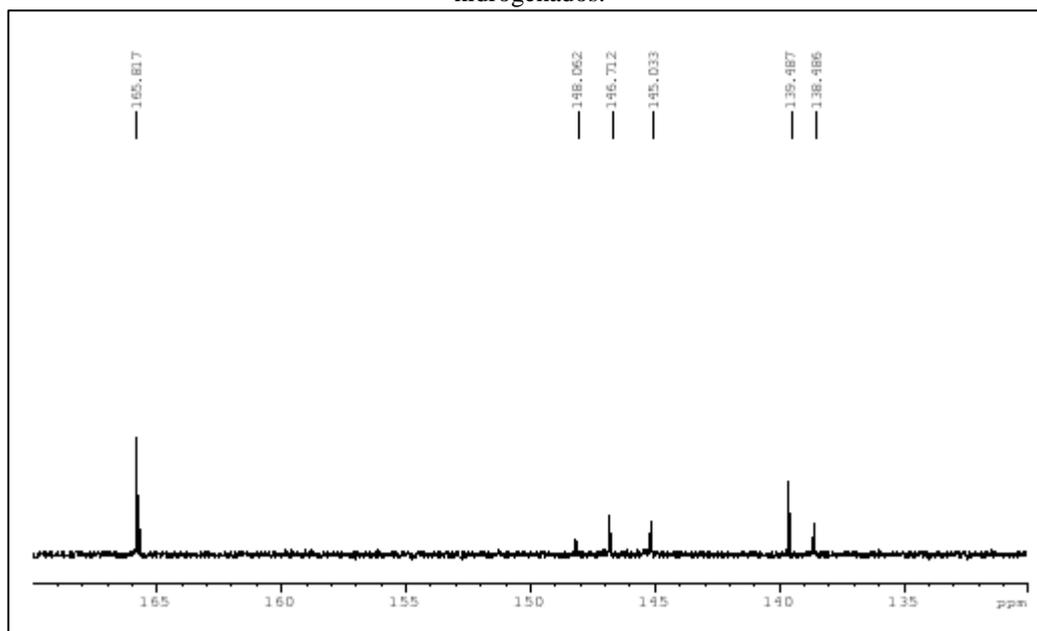


**Fonte:** autor

Já os carbonos 8 e 10, apresentam carga parcial negativa que contribui com anisotropia diamagnética local, blindando os carbonos e consequentemente apresentando deslocamentos químicos menores. A cadeia alquila pode contribuir com densidade eletrônica para os carbonos 12, 10 e 8, por efeito indutivo, porém o grupo sulfonila é um forte retirador de densidade eletrônica por ressonância, deslocando-a em sua direção. Os demais sinais, em 128,7 e 125,5 ppm foram atribuídos aos carbonos 9 e 8 do cloreto em *para*, enquanto os sinais em 128,9 e 127,6 ppm foram atribuídos aos carbonos do anel imidazólico, C-3 e C-2, respectivamente.

A FIG. 25 traz os sinais para os carbonos não hidrogenados (170 a 130 ppm); (Anexo C) e observa-se 6 sinais, sendo o sinal da carbonila (C-5) e do carbono do imidazol (C-1) o mesmo para as dois isômeros, em 165,8 e 148,1 ppm, respectivamente. O carbono 7 apresenta ligeira diferença no deslocamento, pois o grupo sulfonila na posição *orto* retira densidade eletrônica por ressonância, mas o grupo metileno doa densidade eletrônica por efeito indutivo, deixando esse carbono levemente mais blindado que o carbono 7 do isômero *para*, caracterizado por um sinal em 138,5 ppm para o isômero *orto* e um sinal em 139,5 ppm para o isômero *para*.

**Figura 25:** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do cloreto de sulfonila *orto* e *para* substituído – Carbonos não hidrogenados.



Fonte: autor.

O carbono substituído no isômero *orto* também apresenta deslocamento diferente do carbono substituído no isômero *para*, apresentando pequena blindagem, devido a doação de densidade eletrônica via efeito indutivo da cadeia alquila. O sinal em 145,0 ppm foi atribuído ao carbono 12 no isômero *orto* e o sinal em 146,7 ppm refere-se ao carbono 10 no isômero *para*.

Os outros sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  são comuns aos dois isômeros, sendo observado um simpleto em 5,2 ppm e um duplete em 4,3 ppm referente aos hidrogênios 4 e 6, respectivamente; o multiplete em 8,9 ppm o hidrogênio da amida, e os outros dois dupletos aparente em 7,6 e 7,2 ppm, com integral para um hidrogênio cada, foram atribuídos aos hidrogênios 3 e 2, respectivamente. Também são observados os sinais dos carbonos metilênicos referentes aos dois isômeros, com o carbono 6 apresentando dois sinais muito próximos em 42,4 e 42,1 ppm e o carbono 4 com um sinal em 51,7 ppm (Anexo B e C).

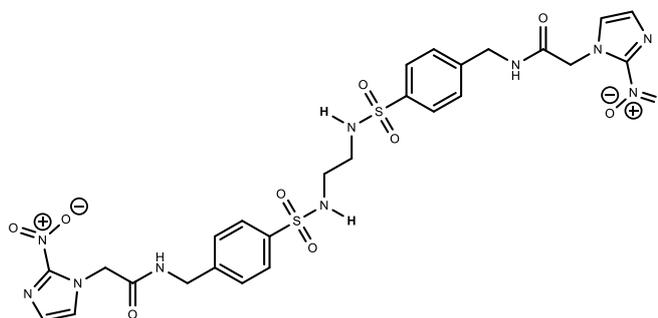
Em análises retrospectivas e comparativas de todos os espectros dos produtos formados, pode-se observar que as condições praticadas na amostra 09 (TAB. 2), foram as mais adequadas para obter como produto majoritário o derivado de bzn *para*-substituído. No entanto, como não foi realizada análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da amostra 9 (derivado de bzn clorossulfonado) a atribuição do isolamento do derivado *p*-substituído isolado se dá de forma indireta, através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da amostra 21 (TAB.5), derivado sulfonamídico protegido (Composto 4), que não apresenta sinais do isômero *orto*.

Cabe ressaltar que os dois isômeros do cloreto de sulfonila (*orto* e *para*) apresentam o mesmo aspecto físico (sólido branco), Rf e padrão de revelação, sendo possível a diferenciação somente pelo RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Além disso, a separação dos isômeros seria inviável por CCS.

### 5.1.3 Proteção das diaminas

Para a síntese das sulfonamidas foi preciso a proteção prévia das diaminas utilizadas, a etilenodiamina e a piperazina. Essa proteção se faz necessária pois, havendo dois grupos amino igualmente reativos poderia resultar na formação de um dímero de bzn com a diamina (FIG. 26), portanto, a etapa proteção se torna de suma importância. Grupos protetores são utilizados em síntese orgânica quando o grupo funcional a ser modificado não apresenta quimiosseletividade adequada, dessa forma, deve-se inativar os possíveis grupos funcionais que não são de interesse sofrer modificações. Bons grupos protetores precisam reagir com seu substrato de forma fácil, rápida e com alto rendimento, devem ser resistentes as reações subsequentes e facilmente removíveis (BRUICE, 2007).

**Figura 26:** Exemplo de dímero de bzn que poderia ser formado em reação com etilenodiamina.



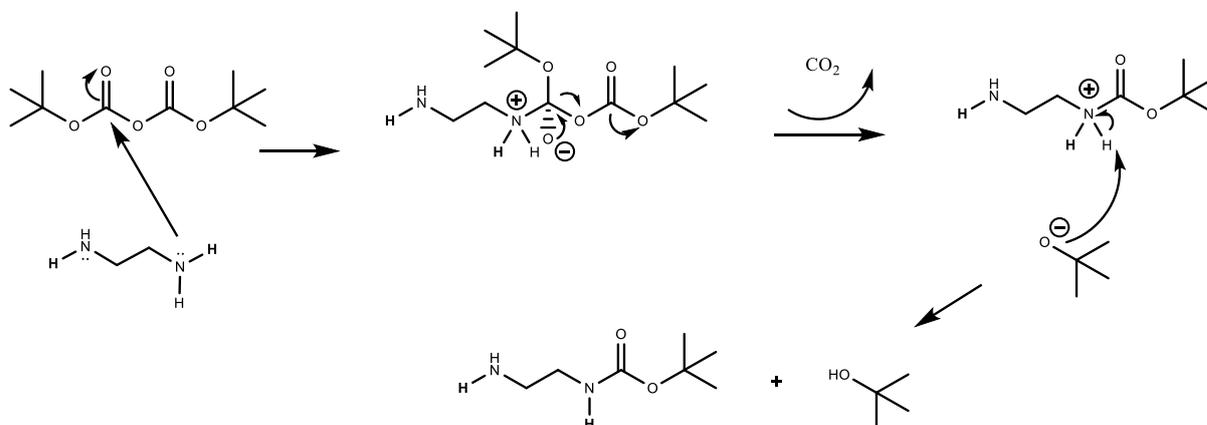
**Fonte:** autor

Um grupo protetor bastante utilizado na proteção de amins é o dicarbonato de di-*terc*-butila ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ), um anidrido que ao reagir com amins gera grupos carbamatos, compostos relativamente estáveis devido a ressonância, sendo possível a remoção do grupo com ácidos fortes (BRUICE, 2007; ARCOVERDE, 2022).

O mecanismo geral dessa proteção se dá pelo ataque nucleofílico por parte de uma das amins da amina ao carbono carbonílico do  $\text{Boc}_2\text{O}$ , culminando em um intermediário tetraédrico, que em seguida reconstitui a ligação dupla carbono-oxigênio e elimina o grupo *terc*-butóxido e  $\text{CO}_2$ . Por fim, o íon alcóxido capta o hidrogênio da amina e neutraliza-os, resultando na amina monoprottegida (LOPES, 2018; SCHWEINITZ, *et al*, 2004). O esquema 2 ilustra o mecanismo de ação de proteção da etilenodiamina. Um ponto crítico dessa reação é que, ao

realizar a proteção com duas aminas igualmente reativas, deve-se ajustar a velocidade de adição do eletrófilo ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ) à reação, bem como o número de equivalentes.

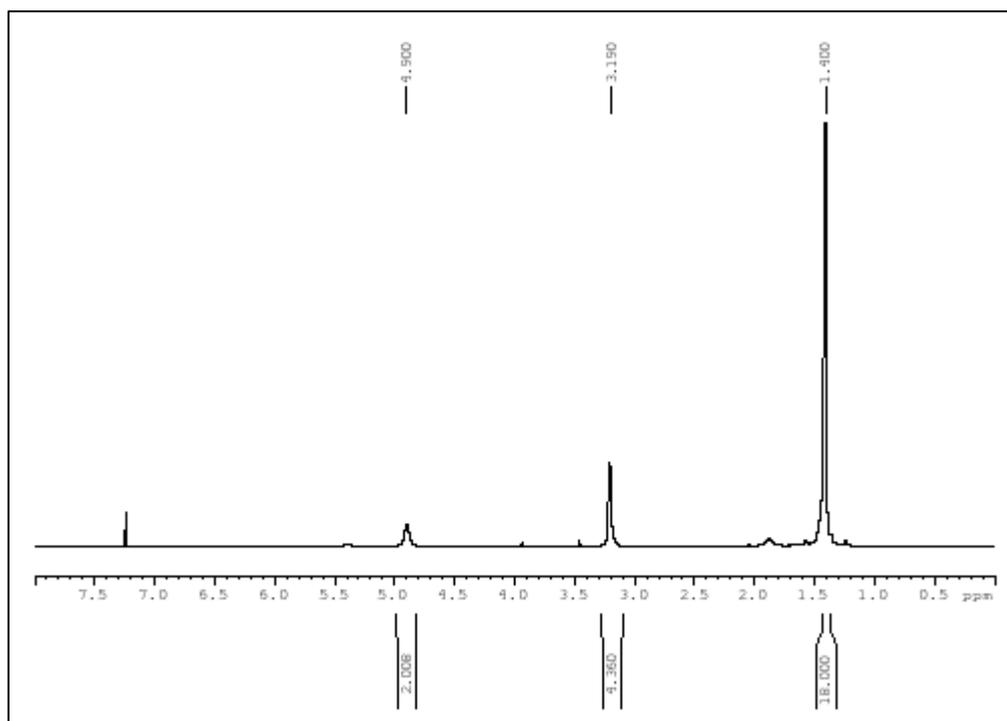
**Esquema 2:** Mecanismo de proteção da etilenodiamina.



**Fonte:** autor

Assim como na clorossulfonação do anel benzílico do bzn, foram feitas diversas alterações nas condições de reação de proteção das diaminas, a fim de obter melhores rendimentos e facilitar a purificação. Foram utilizadas técnicas descritas por Braga (2016) e Schweinitz *et al.* (2004), com adaptações.

Inicialmente, foram feitas reações no solvente tetraidrofurano (THF), previamente seco com peneiras moleculares, com estequiometria de 1:1,1 (amina/  $\text{Boc}_2\text{O}$ ) e o resultado foram aminas diprotegidas. Aumentou-se a proporção do  $\text{Boc}_2\text{O}$  para 3 equivalentes e depois tentou-se diminuindo para 0,5 equivalentes com adição lenta do mesmo; trocou-se o solvente da etilenodiamina para  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Todas as elaborações foram feitas com extração líquido-líquido em água destilada ou solução aquosa de NaOH. Contudo, todas essas tentativas ainda formavam aminas diprotegidas, conforme espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A FIG. 27 traz o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da etienodiamina diprotegida onde observa-se um simpleto em 1,4 ppm com integral para dezoito hidrogênios, atribuído aos hidrogênios metílicos do grupo *tert*-butílico; um simpleto em 3,2 ppm com integral para quatro hidrogenicos e um sinal largo em 4,9 ppm com integral para dois hidrogênios, referente aos hidrogênios da amina.

**Figura 27:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da etilenodiamina diprotegida.

Fonte: autor

Decidiu-se então aumentar a quantidade de amina, mantendo a reação com uma estequiometria de 1:6 ( $\text{Boc}_2\text{O}$ /amina) (LOPES, 2018), sendo a adição do  $\text{Boc}_2\text{O}$  gota-a-gota, em meio reacional com diclorometano ou THF. A elaboração foi realizada com extração líquido-líquido utilizando solução de carbonato de potássio, e como resultado obteve-se aminas monoprotegidas com rendimento entre 35 e 42%, conforme espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  (Anexo D ao I). A TAB. 3 apresenta os resultados das reações de proteção.

**Tabela 3:** Resultados da proteção das diaminas.

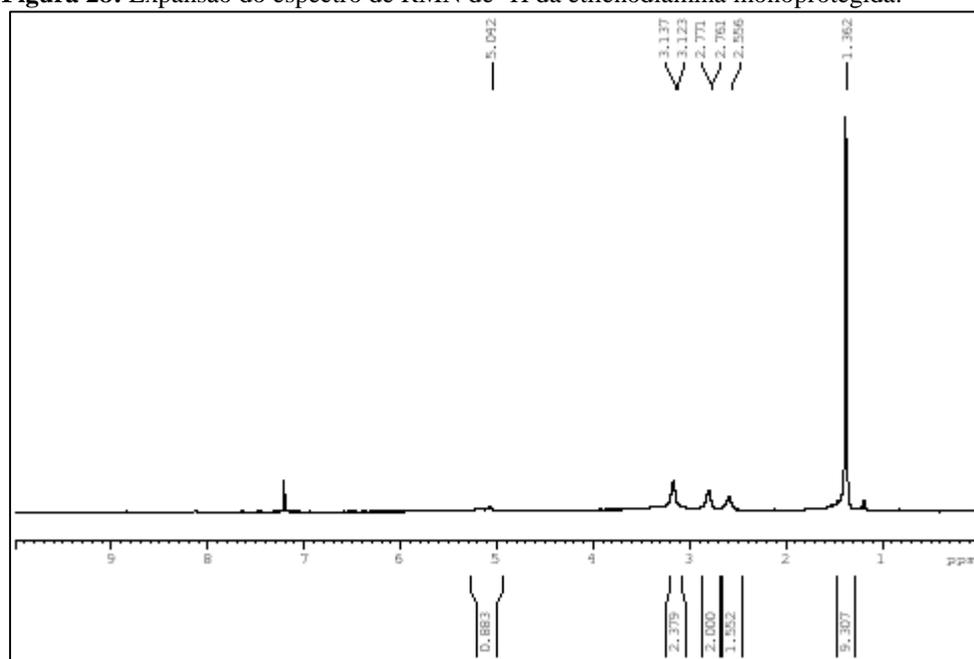
| Amostra/<br>código do<br>composto | Reagentes e<br>condição de<br>reação   | Estequi<br>ometria<br>(amina:<br>$\text{Boc}_2\text{O}$ ) | Aspecto<br>físico do<br>produto<br>formado | Elaboração<br>/purificação   | Rendimento<br>(%) | Técnica<br>analític<br>a | Conclusão<br>das análises  |
|-----------------------------------|--|---|--|--|-------------------|--------------------------|----------------------------|
| 11/A                              | $\text{Boc}_2\text{O}$ , THF,<br>etilenodiamina,<br>$0^\circ\text{C}$ , $25^\circ\text{C}$ , 48h                       | 1:1   | Sólido<br>amarelo                          | Extração<br>líquido-<br>líquido<br>(solução<br>aquosa<br>de<br>$\text{NaOH}$ ) | 68%               | CCD e<br>RMN             | Amina<br>diprotegida       |
| 12/B                              | $\text{Boc}_2\text{O}$ , THF,<br>piperazina,<br>$0^\circ\text{C}$ , $25^\circ\text{C}$ , 3h                            | 1:1,1   | Sólido<br>amarelo                          | Extração<br>líquido-<br>líquido (água<br>destilada<br>gelada)                  | 81,37             | CCD e<br>RMN             | Amina<br>diprotegida       |
| 13/A                              | $\text{Boc}_2\text{O}$ , $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,<br>etilenodiamina,<br>$0^\circ\text{C}$ , $25^\circ\text{C}$ , 24h | 6:1   | Sólido<br>amarelo                          | Extração<br>líquido-<br>líquido<br>(solução<br>aquosa<br>de                    | 35,5              | CCD e<br>RMN             | Amina<br>monoprotegi<br>da |

|      |   |     |                |  |                        |           |                     |  |
|------|---|-----|----------------|--|------------------------|-----------|---------------------|--|
|      |   |     |                |  | carbonato de potássio) |           |                     |  |
| 14/B | Boc <sub>2</sub> O, THF, piperazina, 0°C, 25°C, 24h | 6:1 | Sólido amarelo | Extração líquido-líquido (solução aquosa de carbonato de potássio) | 42                     | CCD e RMN | Amina monoprotetida |  |

**Fonte:** autor

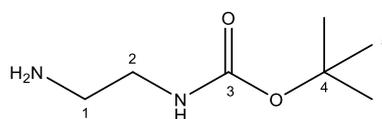
A caracterização das aminas monoprotetidas **A** e **B** se deu a partir de seus espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. No espectro de RMN <sup>1</sup>H da etilenodiamina protegida (FIG.28), composto **A** (amostra 13; TAB. 3; FIG. 29), observa-se um sinal largo em 5,0 ppm com integral para um hidrogenio, atribuido o hidrogênio do carbamato; um sinal largo em 3,1 ppm com integral para dois hidrogênios, atribuído ao H-2; outro sinal largo em 2,8 ppm com integral para dois hidrogênios, atribuído ao H-1; um sinal em 1,4 com integral para nove hidrogênios, atribuído ao H-5, caracterizando a formação da amina protegida

**Figura 28:** Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da etilenodiamina monoprotetida.



**Fonte:** autor

**Figura 29:** Estrutura química da etilenodiamina



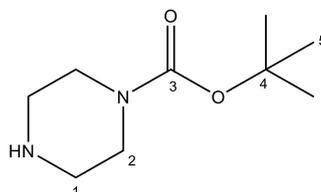
**Fonte:** autor

A amina livre possui dois hidrogênios, mas devido ao momento quadrupolar do nitrogênio e as trocas químicas que podem ocorrer com o solvente deuterado, só foi observado um sinal em 2,5 ppm com integral para pouco mais de um hidrogênio. Ainda, pela proporção das integrais, conclui-se que a amina se apresenta monoprotetida, conforme anexo D.

O espectro de RMN do  $^{13}\text{C}$  também apresentou os sinais característicos da amina protegida, com um sinal em 156,3 ppm, atribuído ao carbono da carbonila do carbamato (C-3); um sinal em 79,3 ppm, atribuído ao carbono quaternário do grupo protetor Boc (C-4); um sinal em 42,7 ppm, atribuído ao carbono metilênico ligado ao carbamato (C-2); um sinal em 41,6 ppm, atribuído ao carbono ligado à amina livre (C-1) e um sinal em 28,4 ppm, atribuído aos carbonos das metilas do Boc (C-5), conforme anexo E e F.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da piperazina protegida, composto **B** (amostra 14; TAB. 3; FIG. 30), apresentou um sinal em 4,8 ppm com integral para um hidrogênio, atribuído ao hidrogênio da amina livre; um tripleto em 3,4 ppm com integral para quatro hidrogênios, atribuído ao H-2; um simpleto largo em 2,8 ppm com integral para quatro hidrogênios, atribuído ao H-1, e um sinal em 1,4 ppm com integral para nove hidrogênios, atribuído as metilas do grupo Boc, comprovando a formação do produto (Anexo G).

**Figura 30:** Estrutura química da piperazina.



**Fonte:** autor

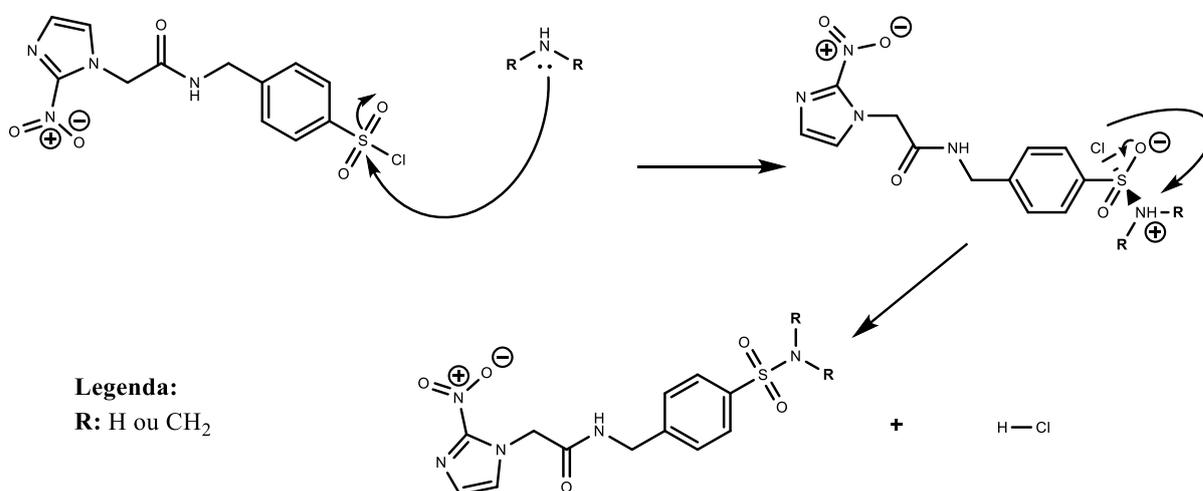
O espectro de RMN do  $^{13}\text{C}$  também condiz com a obtenção da piperazina monoprotetida, apresentando um sinal em 154,9 ppm, atribuído ao carbono carbonila (C-3); um sinal em 79,9 ppm, atribuído ao carbono quaternário do grupo protetor Boc (C-4); um sinal em 51,4 ppm, atribuído ao carbono da piperazina (C-2); um sinal em 45,7 ppm, atribuído ao carbono da amina livre (C-1) e um sinal em 28,5 ppm, atribuído aos carbonos das metilas do grupo Boc (C-5) conforme anexo H e I.

### 5.1.4 Síntese dos derivados sulfonamídicos

Para a síntese das sulfonamidas, foram utilizadas inicialmente as aminas dietilamina, morfolina e piperidina. As diaminas etilenodiamina e piperazina foram utilizadas após etapa de proteção de um de seus grupos amina, conforme discutido na secção 5.1.3. A estratégia para obtenção dos compostos foi embasada por técnicas descritas por Trouxine *et al.* (2014), Oliveira (2005) e Souza (2014).

A reação consiste em uma substituição no enxofre do grupo clorossulfonila iniciada pelo ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio da amina, seguido de eliminação sincronizada do átomo de cloro via estado de transição trigonal bipiramidal, com a subsequente captura do hidrogênio da amina por prototropismo (MARTINS, 2015). Uma base adicional ou excesso da amina é utilizada como catalisador para neutralizar o HCl formado e evitar a protonação e consequente desativação da amina. O esquema 3 ilustra o mecanismo geral da reação. A confirmação da obtenção desses produtos se deu pela análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , com sinais característicos para as aminas juntamente com os sinais já observados para o benzimidazol.

**Esquema 3:** Mecanismo geral de formação do derivado sulfonamídico



Fonte: autor

#### 5.1.4.1 Derivados sulfonamídicos *para*-substituídos

Inicialmente foram utilizadas monoaminas (piperidina, dietilamina e morfolina) para adequar as condições de reação, e partiu-se com adição da amina, em diclorometano, ao cloreto de sulfonila, sob banho de gelo e agitação magnética, e elaboração com extração líquido-líquido

em água destilada gelada (técnica adaptada de SOUZA, 2014). Os produtos esperados foram obtidos, contudo, apresentaram impurezas de natureza alifática aparentemente advindas do excesso das aminas, conforme espectros de  $^1\text{H}$  de RMN. Decidiu-se, então, adicionar solução de HCl (3M) na elaboração da reação, intercalando; água destilada gelada e solução ácida (pH ~5) na extração líquido-líquido (OLIVEIRA, 2005), e obteve-se produtos mais puros do que na condição anterior.

Utilizando um sistema com atmosfera de nitrogênio (TROUPINE, *et al.*, 2014), não houve diferença significativa no rendimento nem na purificação das reações. Experimentou-se retirar o banho de gelo e diminuir o tempo de reação, mas também não impactou significativamente na obtenção e purificação do produto. Por fim, foram testadas algumas estequiometrias para cada produto e as melhores proporções encontradas estão na TAB. 4. As técnicas analíticas utilizadas foram CCD e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

**Tabela 4:** Resultados dos derivados sulfonamídicos - monoaminas

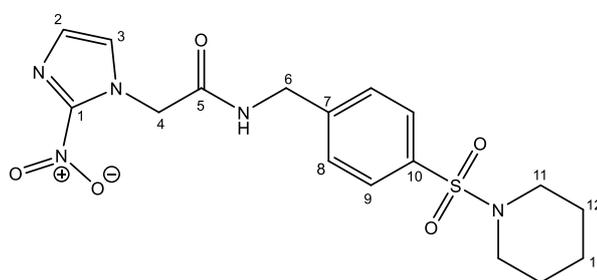
| Amostra /Nº do composto | Reagentes e condição de reação                        | Estequiometria <sup>1</sup> | Aspecto físico do produto formado | Elaboração /purificação  | Rendimento (%) | Conclusão das análises               |
|-------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------------|--|----------------|--------------------------------------|
| 15/3a                   | Piperidina, $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0°C, 25°C, 20h | 1:4                         | Semissólido amarelo               | Extração líquido-líquido (água destilada gelada)                     | 80             | Derivado sulfonamídico com impurezas |
| 16/3a                   | Piperidina, $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0°C, 25°C, 48h | 1:2                         | Sólido amarelo                    | Extração líquido-líquido (água destilada gelada e solução ácida)/CCS | 31             | Derivado sulfonamídico               |
| 17/3b                   | Dietilamina, $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25°C, 48h     | 1:3                         | Semissólido amarelo               | Extração líquido-líquido (água destilada gelada e solução ácida)/CCS | 42             | Derivado sulfonamídico               |
| 18/3c                   | Morfolina, $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25°C, 48h       | 1:3                         | Semissólido amarelado             | Extração líquido-líquido (água destilada gelada e solução ácida)/CCS | 61             | Derivado sulfonamídico               |

**Fonte:** autor

Para o espectro do derivado sulfonamídico, composto **3a** (amostra 16; TAB. 4; FIG. 31), sulfonamida derivada de piperidina, observa-se um tripleto em 2,9 ppm com integral para quatro hidrogênios, atribuído ao hidrogênio 11, um multipletto em 1,6 ppm com integral para quatro hidrogênios, atribuído ao hidrogênio 12 e um multipletto em 1,4 ppm com integral para dois hidrogênios, atribuído ao hidrogênio 13 (Anexo J). Pelo cálculo das integrais é possível afirmar que os sinais referentes aos hidrogênios provenientes da amina estão em uma proporção 1:1 com a molécula do bzn-cloreto de sulfonila em posição *para* caracterizada pelos dupletto em 7,5 ppm com integral para dois hidrogênios, atribuído ao hidrogênio 9, outro dupletto em 7,3 ppm com integral para dois hidrogênios, atribuído ao hidrogênio 8, um sinal largo em 7,2

ppm com integral para dois hidrogênios, atribuído aos hidrogênios imidazólicos 1 e 2, um sinal em 5,2 ppm com integral para dois hidrogênios, atribuído ao hidrogênio 4, e um sinal largo em 4,5 ppm com integral para dois hidrogenios, atribuído ao hidrogênio 6. Ainda, na região dos aromáticos aparece um sinal largo entre 7,43 e 7,38 ppm junto ao duplete atribuído ao hidrogênio 8, com integral para um hidrogênio, atribuído ao hidrogênio da amida. O simpleto registrado em 5,3 ppm é proveniente dos sinais de hidrogênio do diclorometano residual utilizado durante a purificação<sup>3</sup>. No espectro de RMN de <sup>13</sup>C sua presença é confirmada pelo sinal característico em 53,4 ppm.

**Figura 31:** Estrutura química do derivado sulfonamídico *para*-substituído (Composto **3a**).



**Fonte:** autor

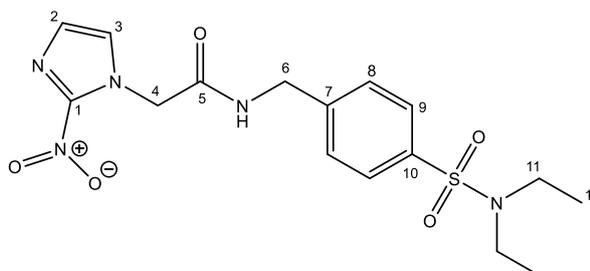
No espectro de RMN de <sup>13</sup>C é possível observar sinais referentes a piperidina: um sinal 46,9 ppm, atribuído aos dois carbonos 11, um sinal em 25,0 ppm, atribuído aos carbonos 12 e um sinal em 23,3 ppm atribuído ao carbono 13. Os sinais para os carbonos do bzn aparecem em 165,4 ppm, atribuído ao carbono 5, um sinal em 143,0 ppm atribuído ao carbono 10 e um sinal em 134,8 ppm atribuído ao carbono 7, além disso, não foi possível observar o carbono 1. Os sinais dos carbonos aromáticos também aparecem com um sinal em 128,3 ppm, atribuído ao carbono 3, um sinal em 127,9 ppm atribuído aos carbonos 9, um sinal em 127,7 ppm atribuído aos carbonos 8 e um sinal em 127,4 ppm atribuído ao carbono 2 (Anexo L e M). Ainda, aparece um sinal em 52,3 ppm que pode ser oriundo de impurezas de solvente.

No espectro do composto **3b** (amostra 17; TAB. 4; FIG. 32), sulfonamida derivada de dietilamina, observa-se um sinal (quarteto) em 3,1 ppm com integral para quatro hidrogênios, atribuído ao hidrogênio 11 da amina. Observa-se também um sinal (triplete) em 1,1 ppm com integral para seis hidrogênios, atribuído ao hidrogênio 12. Pelo cálculo das integrais é possível afirmar que os sinais referentes aos hidrogênios provenientes da amina estão em uma proporção

<sup>3</sup> Gráficos de deslocamentos químicos de impurezas por RMN. © 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha e/ou suas filiais. Disponível em: < <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/nuclear-magnetic-resonance/1h-nmr-and-13c-nmr-chemical-shifts-of-impurities-chart> >

1:1 com a molécula do bzn-cloreto de sulfonila na posição *para*, caracterizado pelos sinais em 7,5 (d; 2H; H-9), 7,3 (d; 2H; H-8). Os demais sinais são referentes a porção proveniente no bzn (Anexo N).

**Figura 32:** Estrutura química do derivado sulfonamídico *para*-substituído (Composto **3b**).



**Fonte:** autor

Além disso, há um sinal (simpleto) intenso em 5,3 ppm com integral para um hidrogênio, que podem ser os hidrogênios do diclorometano residual utilizado durante a purificação. Há também um sinal largo entre 1,5 e 2 ppm com integral para 2 H, que pode ser água do solvente (CDCl<sub>3</sub>)<sup>4</sup>. Ainda, de acordo com o PubChem<sup>5</sup> o pKa do anel nitro-imidazólico é 2,7, o que enfraquece a possibilidade do sinal se referir a protonação do anel, devido as condições da reação (elaboração em solução ácida, pH ~5). O sinal do hidrogênio da amida, esperado como o próton mais desblindado, na região de 8 a 9 ppm, não aparece.

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C também foi possível observar sinais referentes a amina: um sinal em 42,1 ppm, atribuído aos carbonos 11, e um sinal em 14,1 ppm, atribuído aos carbonos 12 (Anexo O e P). Também é possível observar os sinais dos carbonos do derivado sulfonamídico *para*-substituído: um sinal em 127,9 ppm e 127,0 ppm atribuído aos carbonos aromáticos 9 e 8, respectivamente. Ainda, observa-se um sinal em 53,4 ppm para carbono metilênico e atribui-se tal sinal ao solvente residual da amostra. Os demais sinais são referentes a porção proveniente no bzn.

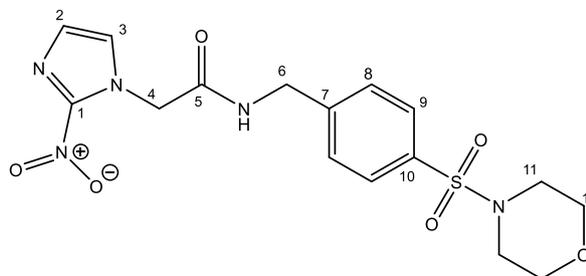
Já no espectro do composto **3c** (amostra 18; TAB. 4; FIG. 33), sulfonamida derivada de morfolina, observa-se um simpleto em 3,7 ppm com integral para quatro hidrogênios, atribuído ao hidrogênio 11 e um simpleto em 2,9 ppm com integral para quatro hidrogênios, atribuído ao hidrogênio 12, comprovando a presença do anel morfolínico na estrutura (Anexo Q). Assim como para os derivados sulfonamídicos anteriores, pelo cálculo das integrais, é possível afirmar que os sinais referentes aos hidrogênios provenientes da amina estão em uma proporção 1:1

<sup>4</sup> NMR Solvent Data Chart. Cambridge Isotope Laboratories, Inc. 1.800.322.1174 (N. America).

<sup>5</sup> National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 10701, 2-Nitroimidazole. Retrieved December 31, 2023 from <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Nitroimidazole>>.

com a molécula do bzn-cloreto de sulfonila em posição *para*, caracterizado pelos dupletos provenientes dos hidrogênios aromáticos em 7,6 e 7,4 ppm.

**Figura 33:** Estrutura química do derivado sulfonamídico *para*-substituído. (Composto **3c**).



**Fonte:** autor

Também foi identificado um simpleto em 5,2 ppm com integral para 1 H, que pode ser os hidrogênios do diclorometano, solvente utilizado na síntese. Não foi observado o sinal do hidrogênio da amida, mas observa-se sinais largos com baixa intensidade na região dos sinais aromáticos, que podem ser sinal desse hidrogênio, de hidrogênios em posição *orto*, ou impurezas da síntese.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  também foi possível observar sinais referentes a amina, um sinal 65,9 ppm, atribuído aos carbonos 11 e um sinal em 45,9 ppm, atribuído aos carbonos 12. Os sinais da carbonila, carbonos metilênicos e carbonos aromáticos do bzn saíram desdobrados, com perfil de misturas de isômeros *orto* e *para*, ainda que não foi possível observá-los no espectro de RMN  $^1\text{H}$ . Ainda, devido a presença da amida, pode haver conformações *cis/trans* da amida com alta barreira conformacional, causando duplicidade em alguns sinais, principalmente aqueles próximos a esse grupo. Ainda, aparece um septeto em 49,5 ppm, característico do carbono do metanol- $d_4$ <sup>6</sup>, utilizado (1 gota) para aumentar a solubilidade da amostra para análise de RMN. Os demais sinais são referentes ao bzn *para*-substituído. (Anexo R e S).

#### 5.1.4.2 Derivados sulfonamídicos *N*-protegidos

As primeiras reações com as diaminas monoprotetidas foram realizadas seguindo as mesmas condições utilizadas para as monoaminas, entretanto não foi observado formação de produto, conforme análises de CCD. Dessa forma, foi utilizado a trietilamina para neutralizar o HCl formado (TROUXINE, *et al.*, 2014) no lugar de um excesso da amina de partida e, a partir

<sup>6</sup> NMR Solvente Data Chart. Cambridge Isotope Laboratories, Inc. 1.800.322.1174 (N. America).

disso, foi possível observar formação de produto, mas ainda com presença significativa de material de partida.

O uso do solvente polar prótico metanol demonstrou não ser adequado, visto não haver formação de produto, possivelmente devido à solvatação do nucleófilo (amina). Os solventes polares apróticos (acetato de etila, THF e diclorometano) foram mais adequados, apresentando formação de produto. Ainda, tentou-se aquecimento até 50°C; utilizou-se piridina no lugar de trietilamina e testou-se elaboração com solução tampão fosfato ou solução de carbonato de cálcio 1 M e água destilada gelada. Tentou-se atmosfera de nitrogênio, mas não houve diferença significativa. A utilização de solução de carbonato de sódio para elaboração foi realizada no intuito de retirar impurezas advindas do cloreto, entretanto, não foi bem sucedida. A melhor condição observada, em relação ao maior rendimento do produto, foi utilizando solvente polar aprótico (diclorometano e clorofórmio), em banho de gelo e agitação, trietilamina ou piridina comoceptor de prótons e elaboração via extração líquido-líquido com água destilada gelada. As técnicas analíticas utilizadas foram CCD e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Por fim, foram testadas algumas estequiometrias para cada produto e as melhores proporções encontradas estão na tabela 5.

**Tabela 5:** Resultados dos derivados sulfonamídicos *N*-protegidos

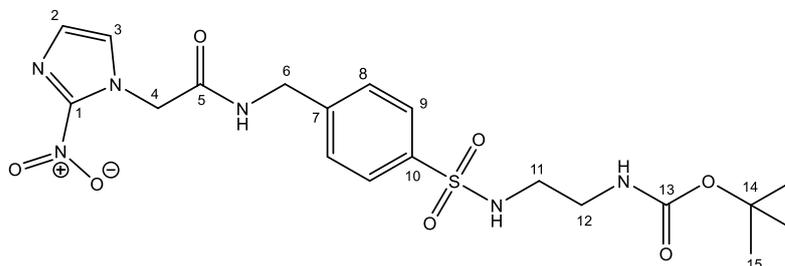
| Amostra /Nº do composto | Reagentes e condição de reação  | Estequiometria <sup>1</sup> | Aspecto físico do produto formado | Elaboração /purificação   | Rendimento (%) | Conclusão das análises             |
|-------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------------|---|----------------|------------------------------------|
| 19/4a                   | Etilenodiamina (Boc), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , piridina, 0°C, 25°C, 24h. | 1:2                         | Sólido amarelo                    | Extração líquido-líquido (destilada gelada)/CCS                                       | 28             | Derivado sulfonamídico e impurezas |
| 20/4b                   | Piperazina (Boc), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , trietilamina, 0°C, 25°C, 96h. | 1:1,5                       | Semissólido amarelo               | Extração líquido-líquido (solução tampão fosfato)/CCS                                 | 58             | Derivado sulfonamídico e impurezas |
| 21/4b                   | Piperazina (Boc), AcOEt, trietilamina, 0°C, 25°C, 24h.                            | 1:1,1                       | Líquido viscoso amarelo           | Extração líquido-líquido (solução de carbonato de sódio (CaCO <sub>3</sub> ) 1 M)/CCS | 20             | Derivado sulfonamídico             |
| 22 <sup>2</sup> /4b     | Piperazina (Boc), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , trietilamina, 0°C, 25°C, 24h. | 1:1,1                       | Sólido branco                     | Extração líquido-líquido (destilada gelada)/CCS                                       | 40 - 60        | Derivado sulfonamídico             |

<sup>1</sup> Cloreto de sulforila : amina.

<sup>2</sup> Amostra obtida de um *pool* de derivados sulfonamídicos.

O espectro RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da sulfonamida derivada de etilenodiamina, composto **4a** (amostra 19; TAB. 5; FIG. 34), aponta para presença de subprodutos na amostra. Na região dos aromáticos do espectro RMN de  $^1\text{H}$  é possível observar os sinais esperados para os hidrogênios do anel benzílico *para*-substituído: um duplete ( $^3J = 7,96$ ) em 7,7 ppm, atribuído ao hidrogênio 9 e um duplete em 7,3 ppm ( $^3J = 8,04$ ) atribuído ao hidrogênio 8; entretanto, a integral para cada duplete é de um hidrogênio. Ainda, ao lado desses dupletos aparecem outros dupletos aparente em menor intensidade, com contantes de acoplamento ( $J$ ) entre 8 e 10 (Anexo T).

**Figura 34:** Estrutura química do derivado sulfonamídico *para-N*-protegido (Composto **4a**).



**Fonte:** autor

Também se observa os sinais referentes aos dois hidrogênios do anel imidazólico: dois sinais largos com integral para um hidrogênio cada. Os sinais do grupo sulfonamídica *N*-protegida também aparecem, com um sinal largo em 3,1 ppm, com integral para dois hidrogênios, atribuído ao hidrogênio 11; um sinal em 2,9 ppm, na forma de um tripleto aparente, com integral para dois hidrogênios, atribuído ao hidrogênio 12, e um sinal largo em 1,3 ppm, com integral para nove hidrogênios, atribuído aos hidrogênios do grupo *tert*-butila. Ainda, há um sinal em 1,9 ppm, com integral para dois hidrogênios que pode ser água do clorofórmio- $d^7$ , esperada na região de 1,5 ppm, visto que os carbonos para tais hidrogênios não são encontrados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto. Os sinais dos hidrogênios NH da sulfonamida e do carbamato não aparecem na região esperada (8 e 9 ppm). Já o sinal do hidrogênio da amida do bzn aparece em 8,3 ppm.

Para os sinais de baixa intensidade encontrados na região dos aromáticos foram levantadas a hipóteses de: material de partida, produto de degradação, piridina (aceptora de prótons), isômero *orto*-substituído, conformações diferentes por causa da rotação da amida, acoplamento em  $^4J$  do hidrogênios do anel benzílico, visto que se considerar toda a área do multipletos obtêm-se integral para 2 hidrogênios, resultando em concordância com a proporção dos sinais encontrados para a molécula.

<sup>7</sup> NMR Solvente Data Chart. Cambridge Isotope Laboratories, Inc. 1.800.322.1174 (N. America).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi possível observar os sinais do grupo sulfonamida e carbamato, aparecendo um sinal em 173,2 ppm atribuído ao carbono 13; um sinal 79,2 ppm atribuído ao carbono 14; um sinal em 43,2 ppm, atribuído ao carbono 11, um sinal em 43,1 ppm, atribuído ao carbono 12 e um sinal em 28,2 ppm, atribuído ao carbono 15. Entretanto, na região dos aromáticos há um sinal a mais e na região dos carbonos não hidrogenados também. Os outros sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  são característicos da molécula derivada do bzn (Anexo U e V).

Devido a dificuldade de obtenção dessa molécula, uma das hipóteses levantada é a diferença de reatividade da etilenodiamina, pois, apesar de ser uma diamina de cadeia carbônica curta ( $\text{C}_2\text{H}_4(\text{NH}_2)_2$ ), alifática aberta e que apresenta uma amina primária livre, parece mais reativa em relação a piperazina, que apresenta cadeia carbônica maior ( $\text{C}_4\text{H}_8(\text{NH}_2)_2$ ), alifática cíclica e uma amina secundária livre.

Considerando o pKas encontrados para o primeiro nitrogênio da etilenodiamina de 10,71<sup>8</sup> e para a piperazina é 9,73<sup>9</sup>; e o pKa para o segundo nitrogênio da etilenodiamina é 7,56<sup>5</sup> e para a piperazina é 5,33<sup>6</sup>, frente as condições da reação de formação de sulfonamida impostas, faz-se pensar que a etilenodiamina é mais reativa em relação a piperazina, visto o pKa do íon amínio do segundo nitrogênio ser maior (7,56) do que o segundo nitrogênio da piperazina (5,33), inferindo maior basicidade da amina primária da etilenodiamina do que amina secundária da piperazina. Este fato pode ser explicado pelos grupos alquílicos a mais presentes na piperazina, que por efeito indutivo podem gerar maior estabilidade o íon alquilamínico, devido à dispersão de carga (esquema 4) (SOLOMONS, 2018). Deve-se também considerar fatores estéricos que podem diminuir a reatividade da piperazina, como sua estrutura ciclíca, tornando a reação mais dinâmica e com menos subprodutos, na condição de reação praticada.

Além do mais, deve ser considerado a hipótese de impurezas da reação (como piridina e solvente) e de material de partida. Dessa forma, necessita-se de ajustes nas condições da reação afim de obter amostras mais puras e em maior quantidade de massa, para ter clareza a cerca dos sinais que aparecem em menor intensidade.

O espectro RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da sulfonamida derivada de piperazina, composto **4b** (amostra 21, TAB.5, FIG.35) trazem sinais característicos de uma *para*-substituição, caracterizados pelos dupletos em 7,5 e 7,3 ppm com integral para dois hidrogênios cada, além dos sinais referentes a piperazina: um tripleto em 3,4 ppm com integral para quatro hidrogênios,

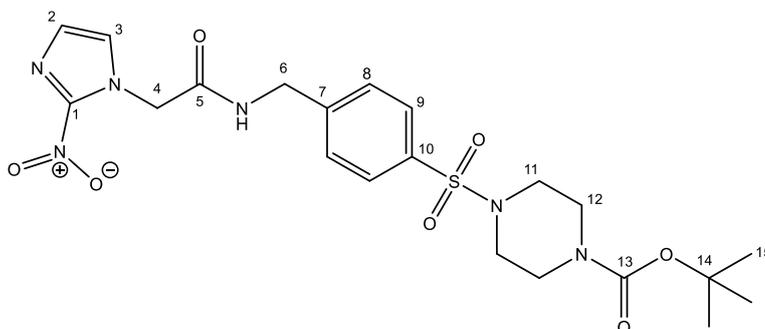
---

<sup>8</sup> Valores retirados do banco de dados PubChem – National Library of Medicine – National Center for Biotechnology Information, 2023. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethylenediamine>>

<sup>9</sup> Valores retirados do banco de dados PubChem – National Library of Medicine – National Center for Biotechnology Information, 2023. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Piperazine>>

atribuído aos hidrogênios 11; um sinal largo em 2,9 ppm com integral para quatro hidrogênios, atribuído aos hidrogênios 12 e e um simpleto em 1,4 ppm, com integral para nove hidrogênios, referente as metilas do grupo *tert*-butílico (Anexo X).

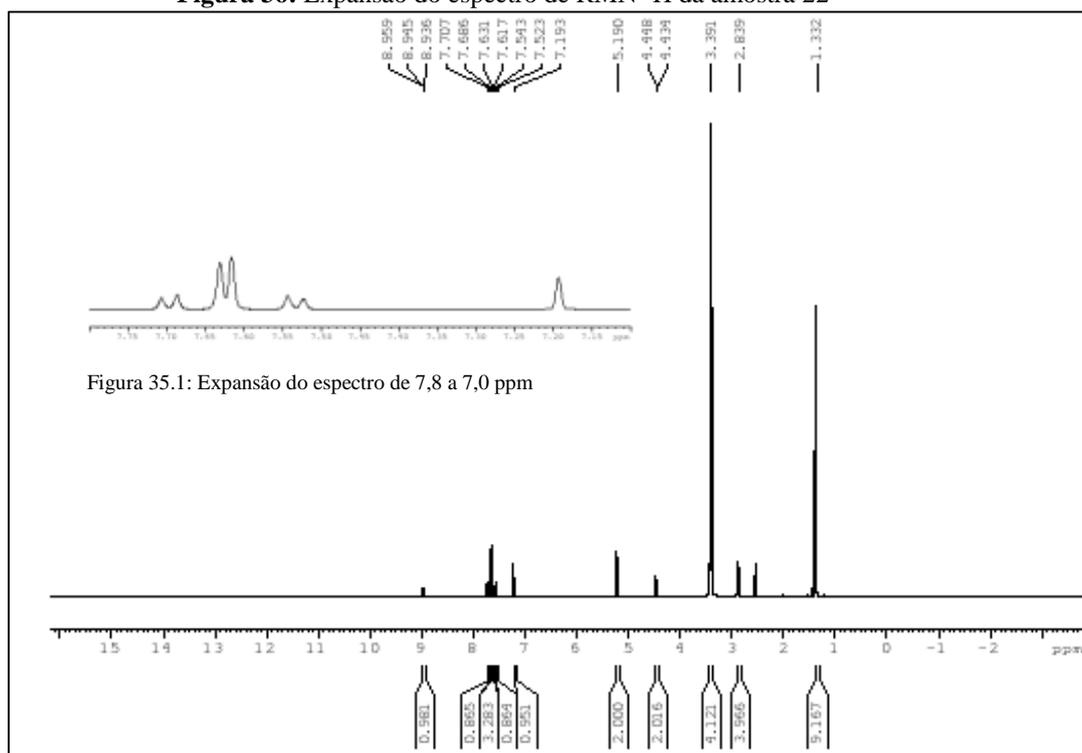
**Figura 35:** Estrutura química do derivado sulfonamídico *para-N*-protegido (Composto **4b**).



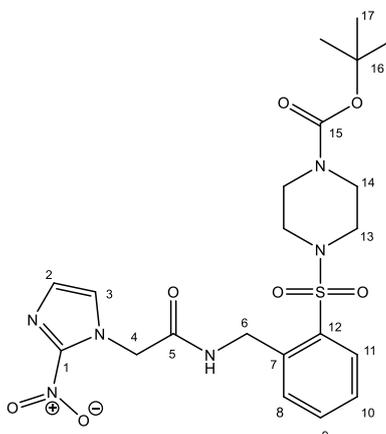
**Fonte:** autor

Além disso, todos os sinais e integrais de hidrogênio, bem como os sinais de carbono estão conforme o esperado para uma *para*-substituição, com proporção 1:1 da porção do bzn e o grupo da sulfonamida *N*-protegida, confirmando a obtenção do produto protegido (Anexo Z e W).

Foi obtida uma amostra de sulfonamida derivada de piperazina (amostra 22; TAB.5) com perfil de sinais diferentes do padrão esperado para derivados sulfonamídicos *para*-substituídos. O espectro RMN de  $^1\text{H}$  da amostra 22, traz na região dos aromáticos um duplete em 7,7 ppm ( $^3J = 8,2$  Hz) com integral para um hidrogênio; um duplete em 7,5 ppm ( $^3J = 8,2$  Hz) com integral para um hidrogênio; um sinal em 7,6 ppm, na forma de duplete aparente, com integral para três hidrogênios, conforme FIG. 36.

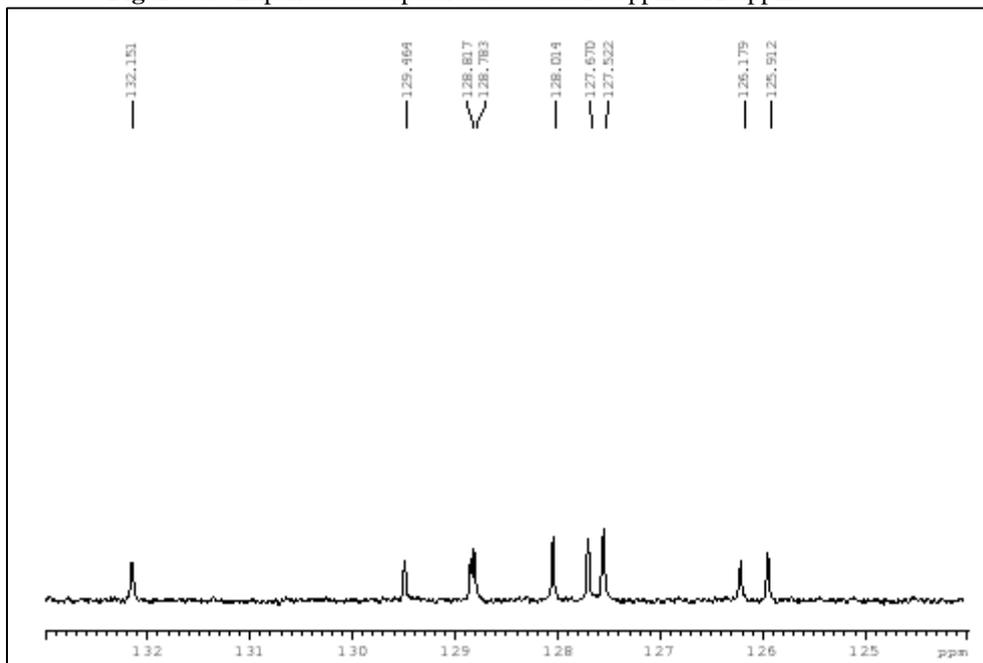
**Figura 36:** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da amostra 22**Fonte:** autor

Esse perfil de sinais sugerem uma substituição em *orto* no anel benzílico do bzn, visto que esse padrão de substituição não há simetria no anel e os hidrogênios 8 e 9 passam a ter ambiente químico diferente dos hidrogênios 8 e 9 de uma substituição em *para* (FIG. 37). Dessa forma, sugere-se a sobreposição dos sinais dos hidrogênios 9 e 10 e o hidrogênio 3 do anel imidazólico. Além desses sinais, também foi possível observar um sinal em 7,2 ppm (sinal largo), com integral para um hidrogênio, atribuído ao hidrogênio 2 do anel imidazólico. Os outros sinais de  $^1\text{H}$  são característicos do restante da molécula de bzn e da sulfonamida protegida, apresentando a proporção 1:1 (Anexo FF).

**Figura 37:** Estrutura química do derivado sulfonamídico *orto-N*-protegido (Composto **4b-orto**).**Fonte:** autor

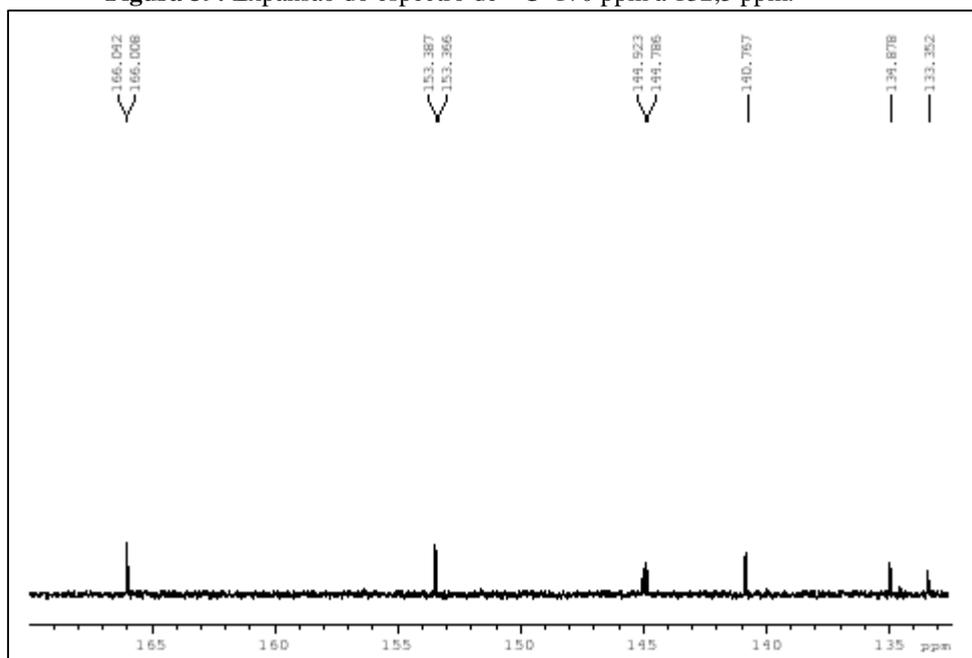
No entanto, o espectro de  $^{13}\text{C}$  mostra uma duplicidade dos sinais dos carbonos aromáticos hidrogenados e quaternários, apresentando nove sinais de carbono metínicos (CH), sendo sete sinais para os carbonos benzílicos e dois sinais para os carbonos do anel imidazólico (FIG. 38), e nove sinais para os carbonos quaternários (FIG. 39) (Anexo GG e HH).

**Figura 38:** Expansão do espectro de  $^{13}\text{C}$  de 133 ppm a 124 ppm.



Fonte: autor

**Figura 39:** Expansão do espectro de  $^{13}\text{C}$  170 ppm a 132,5 ppm.



Fonte: autor

Este perfil de sinais sugere uma mistura de isômeros *orto* e *para*, entretanto, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  não apresenta sinais e integrais para isômero *para*-substituído. Ainda, o perfil de sinais pode ser somente da molécula em *orto*-substituída, devido aos isômeros conformacionais da amida, visto que as ligações  $\text{O}=\text{C}-\text{N}$  possui uma elevada barreira rotacional devido a deslocalização do par de elétrons do nitrogênio.

Ressalta-se que a amostra foi obtida de um *pool* de derivados sulfonamídicos oriundos das mesmas condições reacionais (exceto a condição de reação de obtenção do cloreto), que foram submetidos à purificação por CCS. A primeira amostra de derivado sulfonamídico (análise em CCD) obtida da coluna, apresentou aspecto físico de pó branco, característica diferente da amostra de derivado sulfonamídico *para-N*-protegido obtido e caracterizado anteriormente, de aspecto físico de semissólido amarelo.

A TAB. 5 traz a comparação das condições de reação utilizadas na obtenção do derivado sulfonamídico *para*-substituído (amostra 21) e para amostra do suposto isômero *orto* isolado (amostra 22). Observa-se que o solvente da reação e a elaboração diferem-se entre si, entretanto, apesar dos solventes apresentarem polaridade diferentes<sup>10</sup>, ambos são solventes polares apróticos e não impactariam significativamente na proporção de obtenção dos isômeros. O que pode influenciar na proporção de isômeros obtidos na amostra é a elaboração/purificação, visto que o isômero *para*-substituído pode apresentar polaridade diferente do isômero *orto*-substituído, e, portanto, contribuir para amostras com maior concentração do isômero *orto*-substituído. Ainda assim, tal hipótese se contradiz nas análises de CCD, visto que não se encontra  $R_f$  diferentes para os isômeros e não tem como diferenciá-los por essa técnica. Salienta-se que a comparação das condições de reação para obtenção da amostra de cloreto *para*-substituído e da amostra de mistura de isômeros encontra-se na seção 5.1.2.

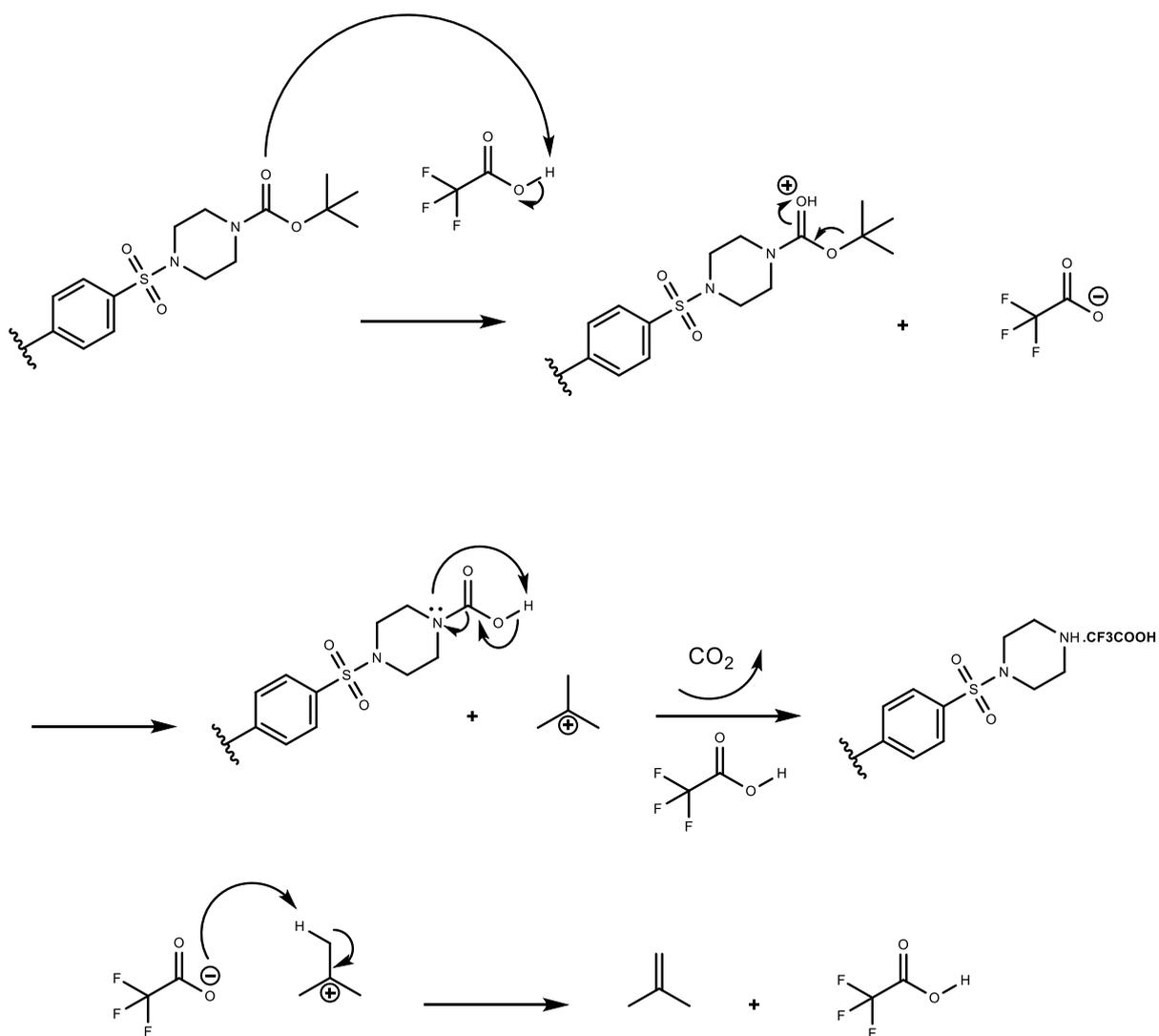
#### 5.1.4.3 Desproteção dos derivados sulfonamídios

O ácido trifluoracético (TFA) é comumente utilizado para desproteção de aminas, pois promove a desproteção dos grupos carbamatos de forma rápida e sua remoção é feita por evaporação do meio reagente, resultando em ótimos rendimentos e alto grau de pureza (WUTS, 2014). O mecanismo de reação para a desproteção da piperazina está ilustrado no esquema 5, e inicia-se com a protonação do grupo carbonila do grupo carbamato pelo TFA, que leva a

---

<sup>10</sup> W. Trappe Biochem. Z. 305, 150 (1940); 306, 316 (1940).

eliminação do grupo terc-butila na forma de carbocátion terciário, relativamente estável. O ácido carbâmico formado é então descarboxilado via prototropismo, realizado pelo par de elétrons não ligante da amida, liberando  $\text{CO}_2$  e a amina livre. O carbocátion formado tem um de seus prótons subtraídos pelo íon trifluoracetato e converte-se em isobuteno, ao passo que é restabelecido o TFA. Por causa do excesso de TFA no meio reacional, há a protonação da amina pelo TFA, formando um sal com o ânion trifluoracetato (Esquema 4) (SOUZA, 2014).



**Esquema 4:** Mecanismo de desproteção da piperazina, de acordo com o Greenes' proteção de grupos em síntese orgânica (WUTS, 2014).

Foi realizada a desproteção do grupo amino somente do derivado sulfonamídico oriundo da piperazina, visto que o derivado de etilenodiamina protegida, além de apresentar impurezas na amostra analisada, foi obtido com rendimento baixo, cerca de 20mg de produto, inviabilizando a desproteção da molécula.

Para tal, utilizou-se TFA em excesso, inicialmente na proporção de 12 equivalentes da sulfonamida protegida (TROUXINE, *et al.*, 2014), mas não houve formação de produto. Então, decidiu-se aumentara proporção de TFA para 30 equivalentes, sendo observada a formação do produto por CCD. Além disso, para elaboração, testou-se solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M, mas a melhor condição foi precipitar o produto com éter etílico (BRAGA, 2016). A TAB. 6 traz os detalhes das reações.

**Tabela 6:** Resultados dos derivados sulfonamídicos desprotegidos.

| Amostra/<br>N° do<br>composto | Reagentes<br>e condição<br>de reação | Estequio<br>metria<br>(derivado<br>:ácido) | Aspecto<br>físico do<br>produto<br>formado | Elaboração<br>/purificação                              | Rendimento<br>(%) | Técnica<br>analítica | Conclusão das<br>análises                                |
|-------------------------------|--------------------------------------|--|--|---|-------------------|----------------------|--|
| 23 <sup>1</sup> /5            | TFA, 0°C,<br>25°C, 24h               | 1:12                                       | Semissólido<br>amarelado                   | Extração<br>líquido/líquid<br>o (solução de<br>NaOH 1M) | 50                | CCD e<br>RMN         | Derivado<br>sulfonamídico<br>desprotegido +<br>impurezas |
| 24 <sup>2</sup> /5            | TFA, 0°C,<br>25°C, 24h               | 1:30                                       | Sólido<br>marrom                           | Cristalização<br>com éter<br>etílico                    | 95                | CCD e<br>RMN         | Derivado<br>sulfonamídico<br>desprotegido                |
| 25 <sup>3</sup> /5            | TFA, 0°C,<br>25°C, 72h               | 1:30                                       | Sólido<br>marrom                           | Cristalização<br>com éter<br>etílico                    | 96                | CCD e<br>RMN         | Derivado<br>sulfonamídico<br>desprotegido<br>(TF26)      |

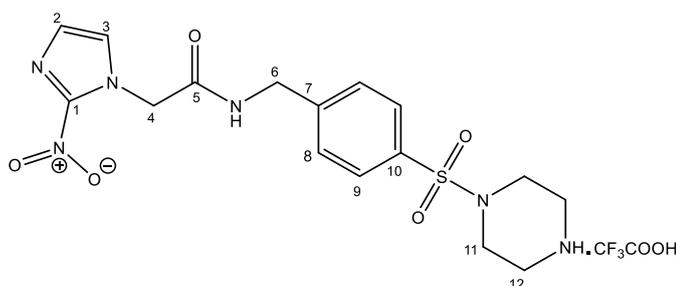
1 Amostra derivada da amostra 20;

2 Amostra derivada da amostra 21

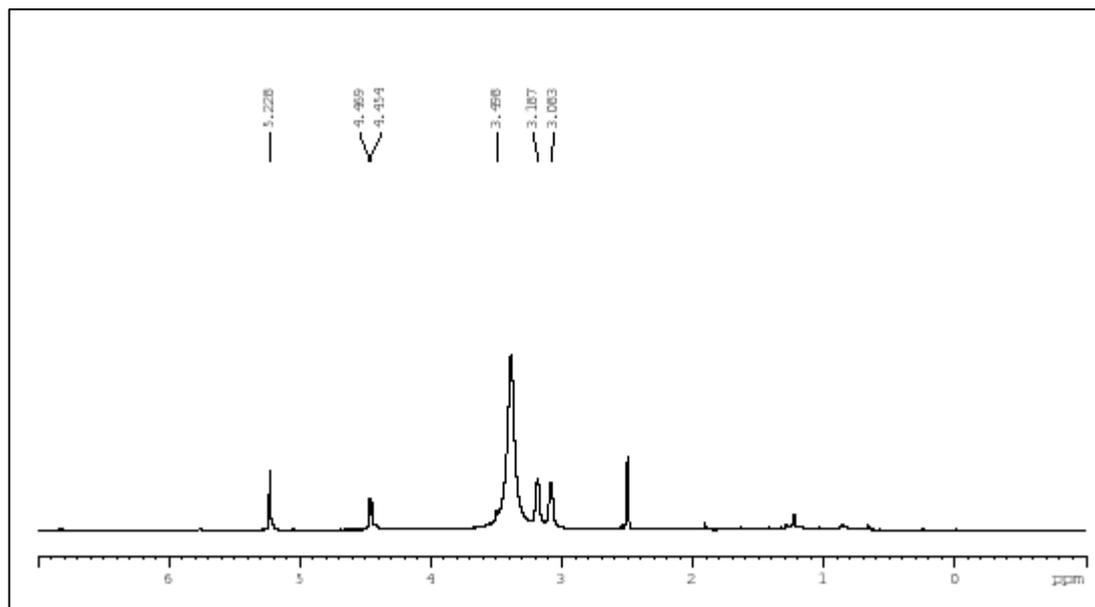
3 Amostra derivada da amostra 22.

Para o derivado sulfonamídico de piperazina desprotegida foram obtidas três amostras, conforme TAB. 7. No espectro de <sup>1</sup>H do composto **5a** (amostra 24; TAB. 6; FIG.40), observa-se que os sinais que caracterizam o grupo piperazina da sulfonamida desprotegida foram registrados coincidindo com a região onde aparecem os sinais dos hidrogênios da água do solvente utilizado, DMSO-*d*<sub>6</sub> (3,3 ppm), o que levou a parcial sobreposição dos sinais (FIG. 41) (Anexo II).

**Figura 40:** Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de 7 a 1ppm



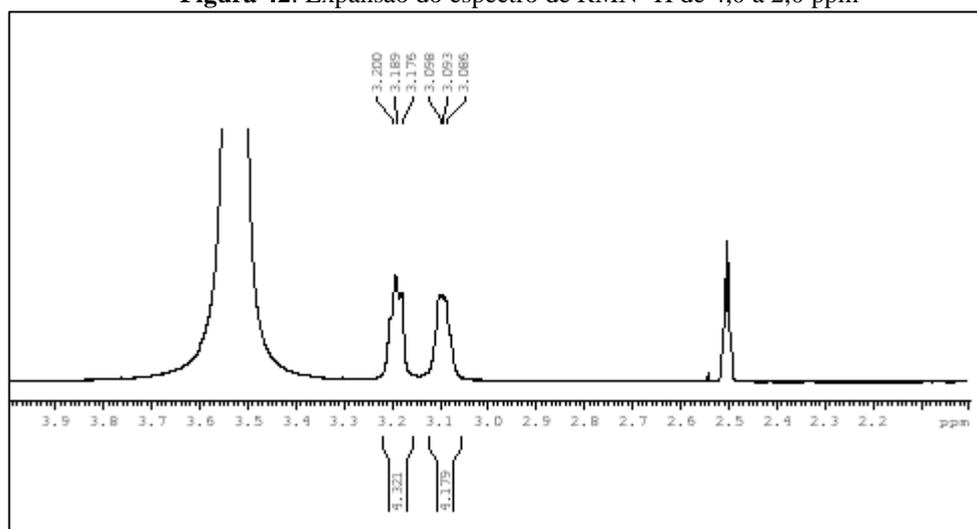
Fonte: autor

**Figura 41:** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 7 a 1 ppm

No entanto, é possível observar os sinais correspondentes aos hidrogênios metilênicos da piperazina, com integral para quatro hidrogênios em 3,3 e 3,1 ppm, atribuídos aos hidrogênios 11 e 12, respectivamente (FIG. 41). Outra característica que confirma a desproteção da amina é ausência do sinal com integral para nove hidrogênios do grupo *terc*-butílico, esperados na região entre 2 e 1 ppm, conforme demonstrado nos espectros de  $^1\text{H}$  das amostras 21 e 22 (derivados sulfonamídicos protegidos).

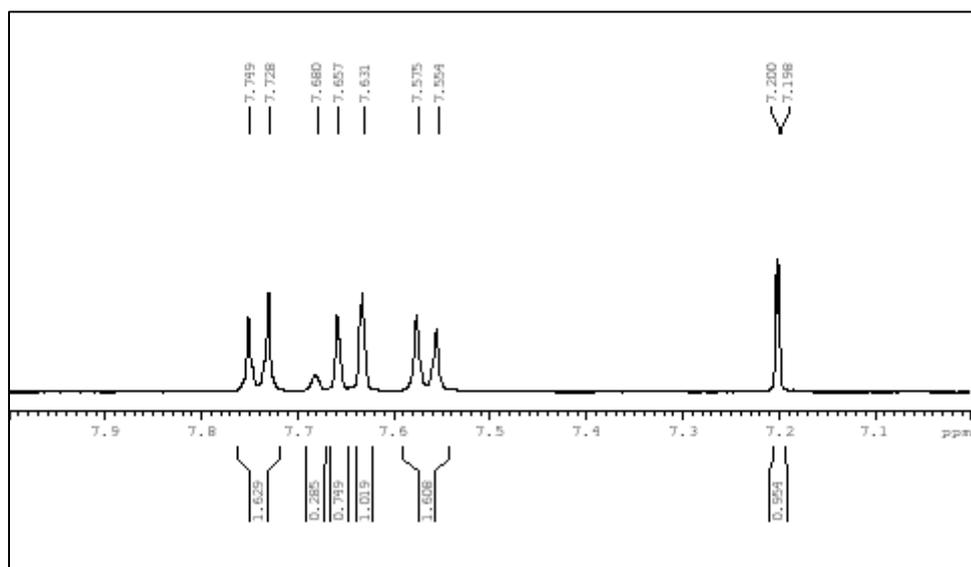
No espectro de  $^{13}\text{C}$ , foi possível observar sinais referentes aos carbonos metilênicos da sulfonamida, aparecendo um sinal em 43,4 ppm, atribuído ao carbono 11, um sinal em 42,7 ppm, atribuído ao carbono 12 (Anexo JJ e LL). Além disso, não foi identificado no espectro de  $^{13}\text{C}$  os sinais referentes aos carbonos do grupo carbamato. Os demais sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  são característicos da molécula derivada do bzn *para*-substituído.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra 25 (TAB. 6), foi possível identificar os sinais referentes a piperazina desprotegida, com um tripleto aparente em 3,2 ppm com integral para quatro hidrogênios e um tripleto aparente em 3,1 ppm com integral para quatro hidrogênios, além da ausência do simpleto entre 2 e 1 ppm com integral para nove hidrogênios, referente ao grupo protetor *terc*-butílico (FIG. 42) (Anexo MM).

**Figura 42:** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 4,0 a 2,0 ppm

Fonte: autor

Entretanto, na região dos aromáticos, o perfil de sinais e respectivas integrais aparecem um pouco diferente do esperado para o isômero *para*-substituído. É possível observar dois sinais semelhantes a dupletos em 7,7 e 7,5 ppm, com constante de acoplamento ( $^3J$ ) entre 8,0 e 8,7 Hz e integral para 1,6 hidrogênios cada. Também há um sinal largo em 7,68 ppm com integral para 0,3 hidrogênios e um simpleto aparente em 7,65 ppm com integral para um hidrogênio. Ainda, os sinais dos hidrogênios 2 e 3 do anel imidazólico aparecem em 7,2 e 7,6 ppm, respectivamente.

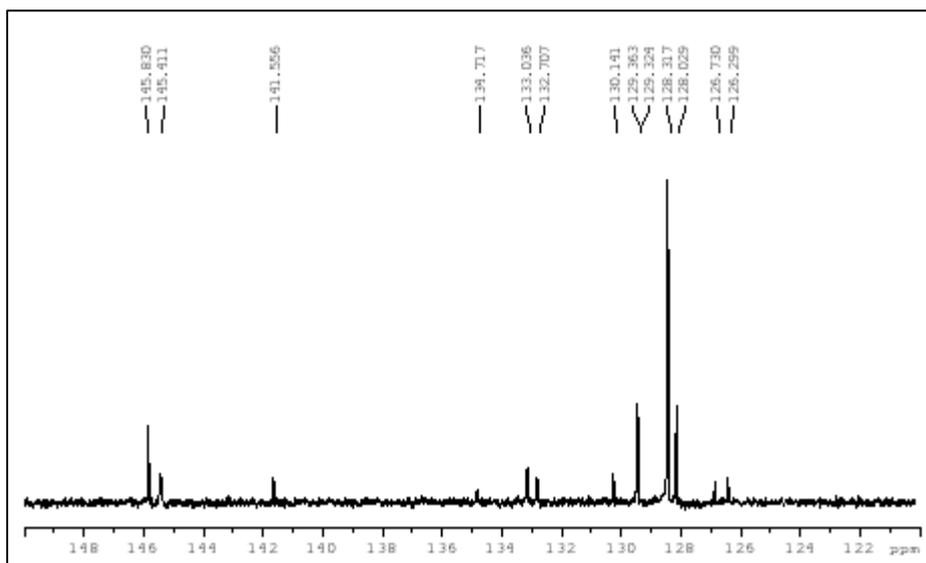
**Figura 43:** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 8,0 a 7,0 ppm

Fonte: autor

Também foi possível identificar os sinais da desproteção do grupo amino no espectro de  $^{13}\text{C}$  pela ausência do sinal do carbono não, do carbono da carbonila os carbonos dos grupos

metilas, referentes ao grupo Boc. Os sinais referentes aos carbonos da amina livre do grupo sulfonamida foram observados em 42,7 ppm, atribuído ao carbono 12, e em 43,3 ppm, atribuído ao carbono 11 (Anexo NN). Ainda, foi possível observar no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  sinais semelhantes ao perfil de sinais atribuídos ao composto **4b-orto** (amostra 22), com duplicação dos carbonos aromáticos e quartenários (FIG. 44).

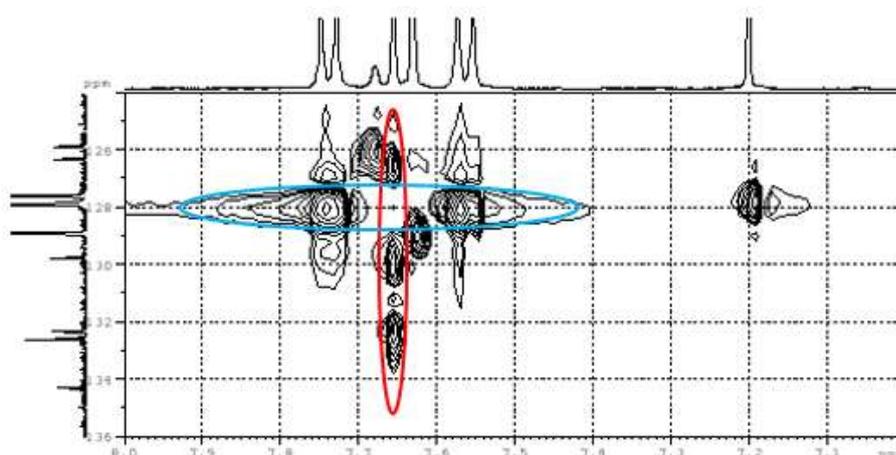
**Figura 44:** Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 150 a 120 ppm



Fonte: autor

Dessa forma, no intuito de entender melhor os sinais dessa molécula, visto que ela descende da amostra 22, foram realizados experimentos bidimensionais dessa amostra, como o de HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*); onde mostra a correlação carbono-hidrogênio entre o simpleto aparente em 7,6 ppm com integral para um hidrogênio e três carbonos aromáticos em 126,7, 130,1 e 132,7 ppm (FIG. 45; destaque vermelho); correlação entre o dupletto aparente em 7,7 e 7,5 ppm, com integral para 1,6 hidrogenios cada, e o sinal de carbono em 128,3 ppm (FIG. 45; destaque azul). Ainda, o sinal largo em 7,7 ppm com integral para 0,3 hidrogênios correlaciona-se com o sinal de carbono em 126,3 ppm. (Anexo OO).

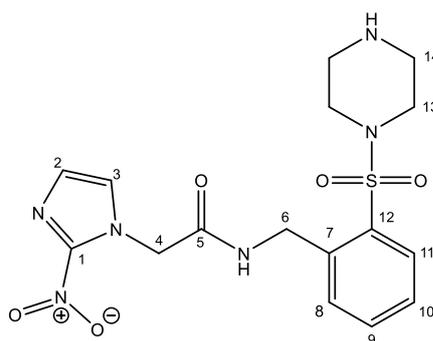
**Figura 45:** Expansão do espectro de HSQC da amostra 25. Eixo X: RMN de  $^1\text{H}$ . Eixo Y: RMN de  $^{13}\text{C}$ .



Fonte: autor

Como discutido na seção 5.1.4.2.1, os hidrogênios do anel benzílico na posição *orto* são quimicamente e magneticamente diferentes, portanto espera-se sinais distintos para cada carbono e hidrogênio do anel benzílico, no entanto, pode acontecer dos sinais dos hidrogênios 8 e 10 (FIG. 46) acoplarem, visto a ressonância do anel que desloca a nuvem eletrônica, deixando esses carbonos com carga parcial negativa e os carbonos 9 e 11, com carga parcial positiva. Entretanto, o hidrogênio 11 experimenta um campo magnético maior, devido a blindagem provocada pelo grupo sulfonila à 3 ligações, que pode ser a correlação observada na interseção dos pontos 7,68 ( $^1\text{H}$ ); 126,30 ( $^{13}\text{C}$ ) ppm.

**Figura 46:** Estrutura química do derivado sulfonamídico *orto*-substituído desprotegido



Fonte: autor

Ainda, a rotação da amida do bzn pode gerar confôrmeros (arranjos) espaciais diferentes no isômero *orto*, estáveis o bastante para serem detectados pelo espectrômetro de 400 MHz e gerar mais sobreposições de sinais. Salienta-se que as somas das integrais dos hidrogênios aromáticos são proporcionais (1:1) ao restante da molécula. Ainda, os experimentos de COSY

(*Homonuclear Correlation Spectroscopy*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) estão em acordo com o HSQC e podem ser consultados nos anexos PP e QQ.

Considerando as modificações discutidas nesse trabalho, bem como os experimentos de RMN das amostras, acredita-se que a formação do isômero *orto* foi majoritária após aumentar a molalidade do ácido clorossulfônico para 30 equivalentes, o que tornou o meio reacional mais reativo e favorável à substituição em *orto*. Também deve ser avaliada a rotação da amida e seus confôrmeros, principalmente em posição *orto*, pois, caso haja ao menos dois confôrmeros estáveis o bastante para serem detectados pelo espectrômetro, pode gerar duplicidade de sinais. Não foi feita a remoção do grupo *N*-Boc do derivado sulfonamídico **4a** (derivado de etilenodiamina), devido ao baixo rendimento e impurezas identificadas na análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do produto final.

## 6. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foram sintetizados sete derivados de benznidazol, seis apresentam grupo sulfonamídico e, dentre eles um apresenta o sítio de ligação (grupo amino livre) para acoplamento com as nanoesferas de ouro. Também foram sintetizados isômeros de posição do benznidazol; os isômeros *orto* e *para* substituídos, entretanto, necessita-se de amostras mais puras e análises mais robustas para assertividade. Como o grupo sulfonamida encontra-se em uma região afastada do grupo farmacofórico, a utilização desse regioisômero não traria prejuízo para o resultado da aplicação em nanopartículas de ouro. No entanto, se faz necessário compreender melhor como o produto foi formado, em qual proporção e como realizar a separação dos produtos *orto* e *para* de maneira eficiente e, posteriormente, os ensaios *in vitro*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDANA, E.; LIZANO, E.; CONTRERAS, F.; VALDERRAMA, A.; VIERA, D. Estudio morfológico de estádios ninfales de várias espécies del género *Rhodnius* (*Hemiptera:Reduviidae*). *Caldasia*, v. 22, p. 347-351, 2000.
- ALMEIDA, C. E.; OLIVEIRA, H. L.; CORREIA, N.; DORNAK, L. L.; GUMIEL, M.; NEIVA, V. L.; et al. Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory-bred hybrids. *Acta Tropica*, v. 122, p. 71-79, 2012.
- ALTCHEH, J.; MOSCATELLI, G.; MASTRANTONIO, G.; MORONI, S.; GIGLIO, N.; MARSON, M. E.; BALLERING, G.; BISIO, M.; KOREN, G.; GARCÍA-BOURNISSEN, F. Population pharmacokinetic study of benznidazole in pediatric Chagas disease suggests efficacy despite lower plasma concentrations than in adults. *PLoS Negl Trop Dis*. v. 8, n. 5, p. e2907. doi: 10.1371/journal.pntd.0002907. PMID: 24853169; PMCID: PMC4031103.
- ALVES, A. E. G. Obtenção de sistema microparticulado benznidazol:zif-8 para liberação prolongada otimizando o tratamento da doença de Chagas. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. 2016. 129 p.
- ALVES, F. D; MUNIZ, C, S, A; ABREL, R, D, C; FREITAS, R, N; TEIXEIRA, B, A e FERREIRA, S, E. Métodos de diagnóstico para a doença de Chagas: uma atualização. *Revista Brasileira de Análises Clínicas – RBAC*. ISSN (online): 2448-3877, 2018. DOI: 10.21877/2448-3877.201800726.
- ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; ANDRADE, S. G. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*, *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 77, n. 6, p. 796–799, 1996. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(83\)90292-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90292-4).
- ANDRADE, Z. A; JORGE, T. C. de A; VIEIRA, J. L; HIGUCHI, M. de L. Portal da doença de Chagas – Patologia – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/doenca/patologia/>>. Acesso em: fev. 2023.
- ARAÚJO, S. Doença de Chagas. In: CETRUS – Centro de Ensino em Tomografia, Ressonância e Ultrassonografia. Ano VI – Edição 52 – Janeiro 2014. Disponível em: <<https://www.cetrus.com.br/aluno-artigos/doenca-de-chagas>>. Acesso em: set. 2020.
- AZAMBUJA, P; GARCIA, E. S. Portal da doença de Chagas – Fisiologia – O ciclo do *trypanossoma cruzi* no inseto vetor. Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos. Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/vetor/fisiologia/>>. Acesso: abr. 2023.
- BARBOSA, H. A. Síntese e avaliação in vitro do potencial antimicrobiano, antiproliferativo e tripanocida de derivados sulfonamídicos do eugenol e diidroeuogenol. 2017. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2017.
- BARONE, A.; FERNANDES, P, A. *Trypanossoma cruzi*. PROFBIO. Disponível em: <[http://www.profbio.com.br/aulas/ac2\\_08.pdf](http://www.profbio.com.br/aulas/ac2_08.pdf)>. Acesso em: mai. 2023.
- BARRIAS, E.S.; CARVALHO, T.M.U.; SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Frontiers Immunology*, v. 4, p. e186, 2013.

BARTZACK, D.; ANTONIOS, G. K. Preparations of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles Using One Pot EDC /Sulfo-NHS Coupling. *Langmuir*, v. 27, n. 16, p. 10119-10123, 2011. DOI: 10.1021/la2022177

BATISTA, C; CERTO, M; ALAPENHA, J; MARCHIOL, A. DNDi – Drugs for Neglected Diseases *initiative*. Portal da doença de Chagas – Tratamento – Desafios e oportunidades ao tratamento da doença de Chagas – perspectivas da DNDi. Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/pessoas-afetadas/tratamento-2/>>. Acesso em: abr. 2023.

BATISTA, J. G. DOS S. Nanopartículas de ouro para terapia e diagnóstico de câncer utilizando nanotecnologia verde. 2020. 127f. Tese (Doutorado em Tecnologia nuclear). Instituto de Pesquisas Energeticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo.

BERMUDEZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; REAL, J. P.; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop.*, v. 156, p. 1-16, 2016. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.12.017.

BONFIM-MELO, A.; FERREIRA, E. R.; FLORENTINO, P. T.; MORTARA, R. A. Amastigote synapse: the tricks of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. *Frontiers in microbiology*, v. 9, n. 1341, 2018.

BORSATTO, K. C. et al. Cytotaxonomy of *Dipetalogaster máxima* Uhler, 1894 (*Hemiptera, Reduviidae, Triatominae*). *Brazilian Journal of Biology* [online], v. 80, n. 2, p. 330-335, 2020. ISSN 1678-4375. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.204384>. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1519-6984.204384>>. Acesso em: abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, volume 2. Brasília: Anvisa, 2010. 904 p., 2 v. ISBN 978-85-88233-41-6.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doença de Chagas: o que é, causas, sintomas, tratamento e prevenção. Disponível em: < <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas> >. Acesso em: set. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – CONITEC. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Da Doença de Chagas, nº 397. 2018. Brasília – DF. 141 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais Rename 2022 [recurso eletrônico]. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 181 p. ISBN 978-65-5993-140-8.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Saúde do Ceará. Nota técnica. Fluxo de solicitação e liberação do benznidazol para tratamento da doença de chagas. Secretaria Executiva de Vigilância e Regulação em Saúde – SEVIR, Ceará, 2021. 12p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Territorialização e vulnerabilidade para a doença de Chagas crônica. 14 de abril. Dia mundial de combate à doença de chagas. MEDEIROS, A. C. – SVS/MS; FERNANDES, C. F. R. – Deidt/SVS/MS. (Org.). Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Número especial. Abril de 2022. 2022. 53 p. ISSN 9352-7864.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico, v. 46, n. 21, 2015. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. Brasília: Ministério da Saúde. 2015. 9 p. ISSN 2358-9450.

BRASIL. Secretária de Estado da Saúde do Espírito Santo – SESA. Doença de Chagas. 2023. Disponível em: <<https://saude.es.gov.br/doenca-de-chagas#:~:text=Por%20tratar-se%20de%20doen%C3%A7a,qualquer%20forma%20prov%C3%A1vel%20de%20transmiss%C3%A3o.>>. Acesso em: ago. 2023.

BRENER, Z. et al. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BRISSE, S.; DUJARDIN, J.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. Mol. Biochem. Parasitol. v. 111, p. 95-105, 2000.

BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterization of large of small subunit rRNA and mine-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. Int. J. Parasitol. v. 31, p. 1218-26, 2001.

BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. Microbes Infect., v. 5, n. 5, p. 419-427, 2003. doi: 10.1016/s1286-4579(03)00050-9. PMID: 12737998.

CALDAS, Cristina. Há cem anos doença de Chagas foi descoberta. Cienc. Cult., São Paulo, v. 60, n. 2, p. 10-11, 2008.

CAMPETELLA, O.; HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; FRASCH, A. C.; PETTERSSON, U.; CAZZULO, J. J. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. Mol Biochem Parasitol. v. 50, n. 2, p. 225-234, 1992. doi: 10.1016/0166-6851(92)90219-a. PMID: 1311053.

CAMPOS, C. F.; CANGUSSÚ, S. D.; DUZ, A. L. C.; CARTELLE, C. T.; NOVIELLO, M.; VELOSO, V. M. et al. Enteric Neuronal Damage, Intramuscular Denervation and Smooth Muscle Phenotype Changes as Mechanisms of Chagasic Megacolon: Evidence from a Long-Term Murine Model of *Tripanosoma cruzi* Infection. Plos ONE, v. 11, n. 4, p. e0153038, 2016.

CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTO, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. Química Nova, v. 37, n. 3, p. 521–526, 2014.

CARBAJAL DE LA FUENTE, A. L.; MINOLI, S. A.; LOPES, C. M.; NOIREAU, F.; LAZZARI, C. R.; LORENZO, M. G. Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. Acta Trop, v. 101, p. 115-119, 2007.

CARDOSO, E. Efeitos da administração de nanopartículas de ouro sobre parâmetros bioquímicos em cérebro de ratos. 2014. 212 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2014.

CARVALHO, U. T. Organização estrutural do *Trypanosoma cruzi*. Estudo microscopia optica. Programa de Biofísica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Portal da Doença de Chagas – FIOCRUZ. 2017. Acesso em: mai. 2023.

CASTRO, S.; SOEIRO, M. Drogas tripanossomicidas: Estudos pré-clínicos da doença de Chagas. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/tratamento/>>. Acesso em: set. 2020.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 1, p. 159–218, 1909.

CHEN, F.; EHLERDING, E.B; CAI, W. Theranostic nanoparticles. Journal of Nuclear Medicine. V55, n. 12, p. 1919-1922, 2014.

CIRQUEIRA, M. L. Estudos estruturais sobre *Trypanosoma cruzi* Enzima nitroreductase: Caracterização do mecanismo de ativação de pró-fármacos para benznidazol e nifurtimox. Ribeirão Preto, 2019. 75 p.; 30 cm. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Física Química e Biológica.

CORDERO, E. M.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N.; DA SILVEIRA, J. F. Signal peptide recognition in *Trypanosoma cruzi* GP82 adhesin relies on its localization at protein N-terminus. Scientific reports, v. 9, n. 1, p. 7325, 2019.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. Acta Tropica, v. 115 p. 5-13, 2010.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

COURA, J. R. Portal da doença de Chagas – Histórico – A história da terapêutica da doença de Chagas. Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/doenca/tratamento/>>. Acesso em: ago. 2023.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L.; LEONARDI, D.; LAMAS, M. C.; SALOMÓN, C. J. Recentes avanços no tratamento da doença de Chagas. Brasília Med v. 49, n. 4, p. 279-283, 2012.

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. Mediators of Inflammation, v. 2014, p. e683230, 2014.

CRUZ, C. A. B. DA; SILVA, A. L. S.; ALENCAR, E. M. D. DE; SANTOS, N. DE J. B. DOS; MOREIRA, J. DE J. DA S.; PAIXÃO, A. E. A.; GOMES, I. M. DE A. Tecnologias Que Empregam Fármacos Antiparasitários Para Tratamento Da Doença Chagas. RECIIS, Revista Eletrônica De Comunicação, Informação & Inovação Em Saúde, v. 10, n.1, 2016.

DAI, N.; ZHAO, H.; QI, R.; CHEN, Y.; LV, F.; LIU, L. Fluorescent and Biocompatible Ruthenium-Coordinated Oligo(p-phenylenevinylene) Nanocatalyst for Transfer Hydrogenation in Mitochondria of Living Cells. Chemistry - A European Journal, Weinheim, 2020.

DALE, C.; JUSTI, S. A.; GALVÃO, C. *Belminus santosmalletae* (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae): new species from Panama, with an updated key for *Belminus* Stål, 1859 species. Insects, v. 12, n. 8, p. e686, 2021. <https://doi.org/10.3390/insects12080686>

DANIEL, M.; CHRISTINE, M.C.; DIDIER, A. Gold Nanoparticules: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology. Chemical Reviews., v. 104, p. 293-346, 2004.

DARIO, M. A. Caracterização molecular de isolados de *Trypanosoma cruzi* provenientes de triatomíneos silvestres coletados no estado do Espírito Santo, Brasil. 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) - Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

DAVANÇO, M. Farmacocinética do Benznidazol administrado em coelhos na forma de comprimidos de liberação imediata e comprimidos de liberação prolongada. 2015. 153 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2015.

DE CARVALHO, T. U; BARRIAS, E. S. Portal da doença de Chagas – Ciclo evolutivo – Cultivo Celular. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/parasita/ciclo-evolutivo/>>. Acesso: abril de 2023.

DE CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. C. Portal da doença de Chagas – Tratamento. Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/doenca/tratamento/>>. Acesso em: ago. 2023.

DE FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J. R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONÇALVES, V. F., et al. Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. Plos Pathogens, v.2, n.3, e24, 10p, Mar. 2006. ISSN 1553-7366

DE LEON, M. P.; YANAGI, T.; KIKUCHI, M.; UM, J.; AYAU, O.; MATTA, V.; PAZ, M.; JUAREZ, S.; KANBARA, H.; TADA, I.; HIRAYAMA, K. Characterisation of *Trypanosoma cruzi* populations by DNA polymorphism of the cruzipain gene detected by single-stranded DNA conformation polymorphism (SSCP) and direct sequencing. Int J Parasitol., v. 28, n. 12, p. 1867-1874, 1998. doi: 10.1016/s0020-7519(98)00154-4. PMID: 9925265.

DE MOURA FERRAZ, L. R.; AÉGA, T.; DA SILVA NASCIMENTO, D. D. S.; FERREIRA, A. S.; SILVA, J. Y. R.; JUNIOR, S. A.; ROLIM, L. A.; ROLIM-NETO, P. J. Benznidazole in vitro dissolution release from a pH-sensitive drug delivery system using Zif-8 as a carrier. J Mater Sci Mater Med., v. 32, n. 6, p. 59, 2021. doi: 10.1007/s10856-021-06530-w. PMID: 33999312; PMCID: PMC8128829.

DE OLIVEIRA, I. M; HENRIQUES, J. A. P; BONATTO, D. In silico identification of a new group of specific bacterial and fungal nitroreductases-like proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 355, n. 4, p. 919-925, 2007.

DE PAULA, A. S.; DIOTAIUTI, L.; SCHOFIELD, C. J. Testing the sister-group relationship of the *Rhodniini* and *Triatomini* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 35, n. 3, p. 712-718, 2005. doi:10.1016/j.ympev.2005.03.003

DE SOUZA, W; BARRIAS, E. S. Portal da doença de Chagas – Ciclo evolutivo – Hospedeiro Vertebrado. Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/parasita/ciclo-evolutivo/>>. Acesso em: abr. 2023.

DÍAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M., CAZZULO, J. J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. Experientia, v.44, n. 10, p. 880-881, 1988.

DIAS, J. C. P. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, v. 25, n. esp, p. 7-86, jun. 2016.

DIAS, J. C. P. Os primórdios do controle da doença de Chagas (em homenagem a Emmanuel Dias, pioneiro do controle, no centenário de seu nascimento). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2011, v. 44, suppl 2, p. 12-18. ISSN 1678-9849.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES initiative – DNDi – América Latina. Doença de Chagas. Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>>. Acesso em: 15 set. 2020.

DUDA, N. Estresse oxidativo. Seminário apresentado pela aluna NAILA CRISTINA BLATT DUDA na disciplina BIOQUÍMICA DO TECIDO ANIMAL, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no primeiro semestre de 2013. 09 f.

FAHNING, B. M.; LOBÃO, E. B. Nanotecnologia aplicada a fármacos. Vitória: Faculdade Católica Salesiana, 2011. 98 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Faculdade Católica Salesiana, Espírito Santo, Vitória, 2011.

FERNANDES, M. C.; FLANNERY, A. R.; ANDREWS, N.; MORTARA, R. A. Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. Cellular microbiology, v. 15, n. 6, p. 977-991, 2013.

FERNANDES, O.; STURM, N.; DENE, R.; CAMPBELL, D.A. The mini-exon gene: A genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 95, p. 129-133, 1998.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. Nature Reviews Cancer. v. 5, n. 3, p. 161-171, 2005.

FERRAZ, L. R. M. Desenvolvimento e avaliação da liberação in vitro de drug delivery system pH-dependente à base de benznidazol e ZIF-8 visando a obtenção de uma terapia alternativa para a doença de Chagas. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

FILIGHEDDU M.T.; GÓRGOLAS M.; RAMOS J.M. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. Medicina Clinica, v. 148, p. 125–131, 2017.

FLORENTINO, P. T.; REAL, F.; ORIKAZA, C. M.; DA CUNHA, J. P.; VITORINO, F. N.; CORDERO, E. M., et al. A carbohydrate moiety of secreted stage-specific glycoprotein 4 participates in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. Frontiers in microbiology, v. 9, n. 693, 2018.

FLORES, G. B.; LAZZARI, C. R. The role of the antennae in *Triatoma infestans*: Orientation towards thermal sources. J Insect Physiol, v. 42, p. 433-440, 1996.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. FDA approves first U.S treatment for Chagas disease. 2017. Disponível em: <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-us-treatment-chagas-disease>>. Acesso em: abr. 2023.

FRAZAO, D. Biografia de Carlos Chagas. Ebiografia. 2019. Disponível em: <[https://www.ebiografia.com/carlos\\_chagas/](https://www.ebiografia.com/carlos_chagas/)>. Acesso em: abr. 2023.

FRITZSCHE, M.; FERNANDES, R. A.; CHANG, V. T.; COLIN-YORK, H.; CLAUSEN, M. P.; FELCE, J. H., et al. Cytoskeletal actin dynamics shape a ramifying actin network underpinning immunological synapse formation. *Science advances*, v. 3, n. 6, p. e1603032, 2017.

GALÍNDEZ GIRÓN, I.; ROCHA, D. S.; LENT, H.; CARCAVALLO, R. U.; JURBERG, J.; GALVÃO, C.; BARBOSA, H. S.; MARTINEZ, A.; BARATA, J. M. S.; ROSA, J. A. Nymphal stages. In: CARCAVALLO, R. U.; GALÍNDEZ GIRÓN, I.; JURBERG, J.; LENT, H. (Eds.). *Atlas of Chagas disease vectors in the Americas/Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas*, vol. II, Editora Fiocruz: Rio de Janeiro, 1998. p. 449-514.

GALVÃO, C.; GURGEL-GONÇALVES, R. Vetores conhecidos no Brasil. In: *Vetores da doença de Chagas no Brasil. Série Zoológica: Guias e Manuais de identificação*. Curitiba, p. 88-170, 2015.

GALVÃO, C. Portal da Doença de Chagas. Sistemática Clássica. Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/vetor/sistemática-2/#sis-molecular>>. Acesso em: abr. 2023.

GALVÃO, C., org. *Vetores da doença de chagas no Brasil* [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, 289 p. ISBN 978-85-98203-09-6.

GALVÃO, C. Taxonomia dos vetores da doença de Chagas: da forma à molécula, quase três séculos de história. In: *Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores*. Rio Branco, Brazil: Stricto Sensu editora; 2020. p. 9–37.

GALVÃO, C. Taxonomy. In: Guarneri A, Lorenzo M, editors. *Triatominae—the biology of Chagas disease vectors, entomology in focus*. Cham (Switzerland): Springer; 2021. p. 15–8.

GALVÃO, C; JURBERG, J. *Vetores da doença de chagas no Brasil*. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. 289 p.

GAUNT, M.; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (*Triatominae*) and their associated trypanosomes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, n. 4, p. 557- 565, 2000.

GIL-SANTANA, H. R.; CHAVEZ, T.; PITA, S.; PANZERA, F.; GALVÃO, C. *Panstrongylus noireauï*, a remarkable new species of *Triatominae* (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. *ZooKeys*, v. 1104, p. 203-225, 2022.

GOMES, A.B.; SILVA, I.G. Influência da Temperatura na biologia de triatomíneos. XXI. *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 (Hemiptera, Reduviidae). *Revista de Patologia Tropical*, v. 29, n. 1, p. 85-93, 2000.

GONÇALVES, T. C. M.; TEVES-NEVES, S. C.; SANTOS-MALLET, J. R.; CARBAJAL-DELA-FLUENTE, A. L.; LOPES, C. M. *Triatoma jatai* sp. nov. in the State of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, p. 429- 437, 2013.

GRELLIER, P.; VENDEVILLE, S.; JOYEAU, R.; BASTOS, I. M.; DROBECQ, H.; FRAPPIER, F.; TEIXEIRA, A. R.; SCHRÉVEL, J.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SERGHERAERT, C.; SANTANA, J. M. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is

involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *J Biol Chem.*, v. 276, p. 47078-47086, 2001. doi: 10.1074/jbc.M106017200. PMID: 11598112.

HAMILTON, P. B.; TEIXEIRA, M. M.; STEVENS, J. R. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the “bat seeding” hypothesis. *Trends Parasitol*, v. 28, p. 136-41, 2012.

HALL, B. S. et al. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J. Biol. Chem.*, v. 286, p. 13088–13095, 2011.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of benzidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 5, p. 115–123, 2012.

HILGERT, S. S.; LIMA, S. C. P.; SALVIANO, S. F.; TEFÉ-SILVA, C. Para uma doença tão antiga, o vislumbre de novos tratamentos promissores na doença de Chagas. *Uningá Journal*, v. 58, eUJ4087, 2021. doi: 10.46311/2318-0579.58.eUJ4087.

HWANG, W.S.; WEIRAUCH, C. Evolutionary history of assassin bugs (*Insecta: Hemiptera: Reduviidae*): insights from divergence dating and ancestral state reconstruction. *PLos One*, v. 7, n. 9, p. e45523, 2012.

HYPISA, V.; TIETZ, D. F.; ZRZAVÝ, J.; REGO, R. O.; GALVAO, C.; JURBERG, J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (*Hemiptera: Reduviidae*): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol Phylogenet Evol*, v. 23, p. 447–457, 2002.

IBRAHIM, H. S.; ELDEHNA, W. M.; ABDEL-AZIZ, H. A.; ELAASSER, M. M.; ABDEL-AZIZ, M. M. Improvement of antibacterial activity of some sulfa drugs through linkage to certain phthalazin-1(2H)-one scaffolds. *Eur J Med Chem.*, v. 6, n. 85, p. 480-486, 2014. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.08.016. PMID: 25113876.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C.; ROQUE, A. L. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop* v. 151, p. 1- 15, 2015.

JORGE, T. C. A.; CASTRO, S. L. (Org.). Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85- 85676-75-2.

JURBERG, J.; GALVÃO, C. Biology, ecology, and systematics of Triatominae (*Heteroptera, Reduviidae*), vectors of Chagas disease, and implications for human health. *Denisia* 19, zugleich Kataloge der OÖ. Landesmuseen, Neue Serie, v. 50, p. 1096-1116, 2006.

KASIM, N. A. . et al. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol. Pharm.*, v. 1, p. 85– 96, 2004.

LABORATORIO ELEA PHOENIX S.A. GRAL. Juan Gregorio Lemos 2809 - B1613AUE. Los Polvorines, Buenos Aires, Argentina. Phone: (+54 11) 4489-8300. Disponível em: <https://elea.com/en/products/abarax/> . Acesso em: mai. 2023.

LAFEPE BENZNIDAZOL [Bula de remédio]. Recife – PE. Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco S/A – LAFEPE.

LAMARTINE, J.; SOBRINHO, S.; PATRÍCIA, F.; MEDEIROS, M.; FELTS, M.; ROCA, L.; RAMOS DA SILVA, K. E.; NEIVA, L.; LIMA, A.; JOSÉ, P.; NETO, R.; PARA, E.

Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de chagas. *Revista de Patologia Tropical*. v. 36, n. 2, p. 103-118, 2007.

LANURA, P. N. B., et al. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de doentes nos quais foi realizado transplante de coração. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* [online], v. 28, n. 4, pp. 351-356, 1995. ISSN 1678-9849. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0037-86821995000400008>>. Acesso em: abr. 2023.

LAZZARI, C. R. Biologia e Comportamento. In: Galvão, C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Série Zoológica: Guias e Manuais de identificação. 1ed, Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014.

LAZZARI, C. R.; NÚÑEZ, J. A. The response to radiant heat and the estimation of the temperature of distant sources in *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol*, v. 35, p. 525-529, 1989.

LAZZARI, C. R. Orientation towards hosts in haematophagous insects: an integrative perspective. *Adv Insect Physiol*, v. 37, p. 1-58, 2009.

LENT, H.; JURBERG, J. O gênero *Psammolestes Bergroth*, 1911, com um estudo sobre a genitália das espécies (*Hemiptera, Reduviidae, Triatominae*). *Rev Brasil Biol*, v. 25, p. 349-376, 1965.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (*Hemiptera: Reduviidae*) and their significance as vector of Chagas's disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 163, p. 123-520, 1979.

LEONARDI, D.; SALOMÓN, C. J.; LAMAS, M. C.; OLIVIERI, A. C. Development of novel formulations for Chagas' disease: Optimization of benznidazole chitosan microparticles based on artificial neural networks. *International Journal of Pharmaceutics*, v.367, n.1-2, p.140-147, 2009.

LIMA, A. F. R.; JERALDO, V. L. S.; SILVEIRA, M. S.; MADI, R. R. SANTANA, T. B. K.; MELO, C. M. Triatomines in dwellings and outbuildings in na endemic área of Chagas disease in northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 6, p. 701-706, 2012.

LIMA, L., ESPINOSA-ÁLVAREZ, O., PINTO, C.M. *et al.* New insights into the evolution of the *Trypanosoma cruzi* clade provided by a new trypanosome species tightly linked to Neotropical *Pteronotus* bats and related to an Australian lineage of trypanosomes. *Parasites Vectors*, v. 8, n. 657, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1255-x>

LORENZO, M. G.; FLORES, G. B.; LAZZARI, C. R.; REISENMAN, C. E. Sensory Ecology. A: Orientation In: Carcavallo RU, Galindez-Giron I, Jurberg J & Lent H (Eds.). Atlas of Chagas disease vectors in America/Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas, Vol III, Fiocruz, Rio de Janeiro, 1999. p. 1071-1087

LORENZO, M. G.; GUARNERI, A. A.; PIRES, H. H.; DIOTAIUTI, L.; LAZZARI, C. R. Microclimatic properties of the *Triatoma brasiliensis* habitat. *Cad Saúde Publ*, v. 16, n. 2, p. 69-74, 2000.

LOUSA, I. "Nanopartículas de ouro aplicadas à terapia do cancro da mama". 2019. 73 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2019.

MAGALHÃES, L. M. D.; VIANA, A.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis, v. 9, n. 7, p. e0003816, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003816>.

MAGALHÃES, L. *Trypanosoma cruzi*. Toda Matéria, [s.d.]. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/trypanosoma-cruzi/>. Acesso em: mai. 2023.

MALIK, L.H.; GAGAN D.; SINGH, E. A. Amsterdam. The Epidemiology, Clinical Manifestations, and Management of Chagas Heart Disease. Clinical Cardiology, v. 38, n. 9, p. 565-69, 2015.

MANÉO, F. P.; MONDELLI, G.; ECHEVENGUÁ TEIXEIRA, C. O uso do hexaclorociclohexano como pesticida e os passivos ambientais: um estudo exploratório. Águas Subterrâneas, 2013.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI JR, A.; RASSI, A. Universidade de São Paulo (USP), campus Ribeirão Preto, SP. Hospital do coração Anis Rassi, Goiania, GO. Portal da doença de Chagas – Fase crônica – Tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/doenca/tratamento/>>. Acesso em: ago. 2023.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI JR., A.; MORAES OLIVEIRA, G. M.; LEMOS CORREIA, L. C.; NOVAES RAMOS JR., A. ; HASSLOCHER-MORENO, A. M.; LUQUETTI OSTERMAYER, A.; SOUSA, A. S. de; AMATO VINCENZO DE PAOLA, A.; SOBRAL DE SOUSA, A. C.; PINHO RIBEIRO, A. L.; CORREIA FILHO, D.; MORAES DE SOUZA, D. do S.; CUNHA-NETO, E.; J. A. RAMIRES, F.; BACAL, F.; PEREIRA NUNES, M. do C.; MARTINELLI FILHO, M.; IBRAHIM SCANAVACCA, M.; MAGALHÃES SARAIVA, R.; ALVES DE OLIVEIRA JÚNIOR, W.; M. LORGA-FILHO, A.; DE JESUS BENEVIDES DE ALMEIDA GUIMARÃES, A.; LOPES LATADO BRAGA, A.; SARMENTO DE OLIVEIRA, A.; V. L. SARABANDA, A.; YECÊ DAS NEVES PINTO, A.; ASSIS LOPES DO CARMO, A.; SCHMIDT, A.; COSTA, A. R. da; IANNI, B. M.; MARKMAN FILHO, B.; EDUARDO ROCHITTE, C.; THÉ MACEDO, C.; MADY, C.; CHEVILLARD, C.; BITTENCOURT DAS VIRGENS, C. M.; NERY DE CASTRO, C.; DE PAOLI DE CARVALHO BRITTO, C. F.; PISANI, C.; DO CARMO RASSI, D.; C. SOBRAL FILHO, D.; RODRIGUES ALMEIDA, D.; A. BOCCHI, E.; T. MESQUITA, E.; DE SOUZA NOGUEIRA SARDINHA MENDES, F.; PEREIRA, F. T.; SPERANDIO DA SILVA, G. M.; DE LIMA PEIXOTO, G.; GLOTZ DE LIMA, G.; H. VELOSO, H.; TURIN MOREIRA, H.; BELLOTTI LOPES, H.; MASCIARELLI FRANCISCO PINTO, I.; PINTO DIAS, J. C.; BEMFICA, J. M.; SILVA-NUNES, J. P.; SOARES BARRETO-FILHO, J. A.; KERR SARAIVA, J. F.; LANNES-VIEIRA, J.; MENEZES OLIVEIRA, J. L.; V. ARMAGANIJAN, L.; MARTINS, L. C.; C. SANGENIS, L. H.; BARBOSA, M. P.; ALMEIDA-SANTOS, M. A.; SIMÕES, M. V.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; VIEIRA MOREIRA, M. da C.; HIGUCHI, M. de L.; COSTA MONTEIRO, M. R. de C.; FELIX MEDIANO, M. F.; MAIA LIMA, M.; T. OLIVEIRA, M.; MOREIRA DIAS ROMANO , M.; NITZ, N.; DE TARSO JORGE MEDEIROS, P.; VIEIRA ALVES, R.; ALKMIM TEIXEIRA, R.; COURY PEDROSA, R.; ARAS, R.; MORAIS TORRES, R.; DOS SANTOS POVOA, R. M.; RASSI, S. G.; SALLES XAVIER, S.; MARINHO MARTINS ALVES , S.; B. N. TAVARES, S.; LIMA PALMEIRA, S.; DA SILVA JUNIOR, T. L.; DA ROCHA RODRIGUES, T.; MADRINI JUNIOR, V.; MAIA DA COSTA , V.; DUTRA, W. Guideline of the Brazilian Society of Cardiology on Diagnosis and Treatment of Patients with Chagas Disease Cardiomyopathy. SciELO Preprints, 2022. DOI: 10.1590/SciELOPreprints.4820.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI JR, A.; AVEZUM JR, A.; MATTOS, A. C.; RASSI, A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 319–324, jul. 2009.

MARTÍNEZ, J.; HENRIKSSON, J.; RIDÅKER, M.; PETTERSSON, U.; CAZZULO, J. J. Polymorphisms of the genes encoding cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, in the region encoding the C-terminal domain. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 1, n. 159, p. 35-39, 1998. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12838.x. PMID: 9485592.

MARTINS, P. R.; NASCIMENTO, R. D.; LISBOA, A. S.; MARTINELLI, P. M.; REIS, D. d'Á. Neuroimmunopathology of *Trypanosoma cruzi*-induced megaesophagus: Is there a role for mast cell proteases? *Hum Immunol*, v. 75, p. 302-305, 2014.

MARTINS, V. R. O papel dos pequenos roedores e marsupiais no ciclo de transmissão de *Trypanosoma Cruzi* e *T. Evansi* em áreas com diferentes características ambientais no Pantanal Sul- Matogrossense. 2010. 102 f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. B. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. *Clinics*, v. 64, n. 12, p. 1219- 1224, 2009.

MAXIMIANO, F. P. Hidrossolubilização e avaliação biológica do fármaco antichagásico benznidazol. 2011. 150 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

MAXIMIANO, F. P. et al. Benznidazole microcrystal preparation by solvent change precipitation and in vivo evaluation in the treatment of Chagas disease. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 78, p. 377–384, 2011.

MAXIMIANO, F. P. et al. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. *Quim. Nova*, v. 33, n. 8, p. 1714-1719, 2010.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative biochemistry and physiology. Part A*, v. 146, n. 4, p. 601– 20, 2007.

MCCORMICK, T.S.; ROWLAND, E.C. *Trypanosoma cruzi*: cross-reactive anti-heart autoantibodies produced during infection in mice. *Experimental Parasitology*, v. 69, n. 4 p. 393-401, 1989.

MEIS, J.; CASTRO, S. DA S. R. Manual para diagnósticos em doença de Chagas para microscopistas de base nos estados do Pará. Biblioteca de Ciências Biomédicas/ICICT/FIOCRUZ: Rio de Janeiro, 2017. 110 pg.

MELO JR., M. A. et al.. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Química Nova*, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.

MENDES, T. F. R. B. Estudos da distribuição tecidual do benznidazol em camundongos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. Monografia - Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto – MG. 2019. 38 p.

- MILES, M. A.; LANHAN, S. M.; SOUZA, A. A., et al. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 74, p. 221-237, 1980.
- MILES, M. A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; TOYÉ, P. J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*, v. 272, p. 819-821, 1978.
- MILES, M. A.; TOYÉ, P. J.; OSWALD, S. C.; GODFREY, D. G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 71, p. 217-225, 1977.
- MINOLI, A. S.; LAZZARI, C. R. Take-off activity and orientation of triatomines (*Heteroptera: Reduviidae*) in relation to the presence of artificial lights. *Acta Trop*, v. 97, p. 324-330, 2006.
- MOLINA, J, A, P; ANDUJAR, C, C; NICOLAU, P, B; MOLINA, I. Trypanocidal treatment of Chagas disease. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 39, n. 9, p. 458-470, 2021. DOI: 10.1016/j.eimce.2020.04.012
- MONTALTI, E. Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Assessoria de Relações Públicas e Imprensa. Sala de imprensa. Doença de Chagas continua negligenciada 111 anos após sua descoberta. 2020. Disponível em: <<https://www.fcm.unicamp.br/fcm/en/relacoes-publicas/saladeimprensa/doenca-de-chagas-continua-negligenciada-111-anos-apos-sua-descoberta>>. Acesso em: 15 abril 2023.
- MONTGOMERY, S.P.; STARR, M.C.; CANTEY, P.T.; EDWARDS, M.S.; MEYMANDI, S.K. Neglected parasitic infections in the United States: Chagas disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 90, n. 5, p. 814-818, 2014.
- MORENO, A. Mecanismos de transmissão: Mecanismos de transmissão da doença de Chagas. Laboratório de Pesquisa Clínica em doenças de Chagas/ Instituto Nacional de Infectologia Evando Chagas/Fiocruz, 2017. Disponível em: < <http://chagas.fiocruz.br/transmissao/> >. Acesso em: 15 set. 2020.
- MORENO, A. M. H. Portal da doença de Chagas – Transmissão – Mecanismos de transmissão da doença de Chagas. Laboratório de Pesquisa Clínica em doenças de Chagas. Instituto Nacional de Infectologia. Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/doenca/transmissao/>>. Acesso: mai. 2023.
- MORI, L. As doenças negligenciadas pela indústria farmacêutica que afetam milhões de pessoas no mundo e no Brasil. *BBC News Brasil*, São Paulo, 2019. Disponível em: < <https://www.bbc.com/portuguese/geral-46961306> >. Acesso em: 16 set. 2020.
- MORILLA, M. J.; MONTANARI, J. A.; PRIETO, M. J.; LOPEZ, M. O.; PETRAY, P.B.; ROMERO, E. L. Intravenous liposomal benzimidazole as trypanocidal agente: increasing drug delivery to liver is not enough. *International Journal of Pharmaceutics*, v.278, n.2, p.311 – 318, 2004.
- MÜLLER, J. N.; FREITAS, S. P. C.; TEVES, S. C.; SANTOS-MALLET, J. R.; LOPES, C. M.; GONÇALVES, T. C. M. Species-specific differences in the egg exochorium of the sympatric taxa *Triatoma costalimai* and *Triatoma jatai* (*Hemiptera: Reduviidae: Triatominae*). *J Med Entomol.*, v. 60, n. 4, p. 680-689, 2023. doi: 10.1093/jme/tjad032. PMID: 37094884; PMCID: PMC10337858.

NOGUEIRA, F. B. Estudos dos genes que codificam as proteínas antioxidantes em populações do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao Benzonidazol. 2009. 151 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde na área de concentração de Biologia Celular e Molecular) - Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2009

OCHAYA, S.; FRANZÉN, O.; BUHWA, D. A.; FOYN, H.; BUTLER, C. E.; STOVE, S. I.; et al. Characterization of evolutionarily conserved *Trypanosoma cruzi* NatC and NatA-N-terminal acetyltransferase complexes. *Journal of parasitology research*, v. 6, p. 6594212, 2019. doi: 10.1155/2019/6594212. PMID: 30956813; PMCID: PMC6431383.

ODA, J.; ULIANA, C.; SILVA, A.; MACHADO, ALEX. Doença de chagas e o sistema nervoso entérico. In: MARQUES, N. S. F.; COSTA, R. S. L. (Org.). Ciências biológicas e da saúde: pesquisas básicas e aplicadas. Rio Branco: Stricto Sensu, 2021. 271 p.: il. ISBN: 978-65-86283-49-5. DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283495.

OLIVEIRA, J., et al (Org.) Atualidades em medicina tropical na América do Sul: vetores. Rio Branco: Stricto Sensu, 2021. 345 p. ISBN: 978-65-86283-58-7. DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283587

OLIVEIRA, I. M. Estudos sobre interação entre nanopartículas de ouro para o desenvolvimento de nanoestruturas planejadas geradas por automontagem. 2020. 126 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2020.

OLIVEIRA, K. Síntese, caracterização e avaliação biológica de sulfonamidas e sulfonilidrazonas. 2005. 129 f. Dissertação - Curso de Pós-graduação em Química, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Menos de 10% das pessoas com Chagas recebem um diagnóstico. 13 de Abril de 2023. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2023-menos-10-das-pessoas-com-chagas-recebem-um-diagnostico>>. Acesso em: ago. 2023.

PATTERSON, J. S.; GAUNT, M. W. Phylogenetic multi-locus codon models and molecular clocks reveal the monophyly of haematophagous reduviid bugs and their evolution at the formation of South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*., v. 56, n. 2, p. 608–621, 2010. doi:10.1016/j.ympev.2010.04.038

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends Parasitol.*, v. 30, n. 6, p. 289-298, 2014. doi: 10.1016/j.pt.2014.04.003. PMID: 24776300; PMCID: PMC4045206.

PATINO, L. H.; RAMÍREZ, J. D. RNA-seq in kinetoplastids: A powerful tool for the understanding of the biology and host-pathogen interactions. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 49, p. 273-282, 2017.

PAVIA, Donald L.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, George S.; VYVYAN, James R. Introdução à espectroscopia. Cengage Learning Brasil, 2016. E-book. ISBN 9788522123391. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788522123391/>. Acesso em: 28 out. 2022.

- PEREZ, C.J.; LYMBERY, A.J.; THOMPSON, A. Chagas disease: the challenge of polyparasitism? *Trends in Parasitology*, v. 30, n. 4, p. 176-182, 2014.
- PÉRES-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas Disease. *The Lancet*, v. 391, n. 10115, p. 82- 94, 2018.
- PIMENTEL, L. F.; JÁCOME JÚNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 4, p. 503–514, out. 2007.
- PINAZO, M.J.; LACIMA, G.; ELIZALDE, J.I. et al. Characterization of digestive involvement in patients with chronic *T. cruzi* infection in Barcelona, Spain. *PLoS Negl Trop Diseases*, v. 8, n. 8, p. e3105, 2014.
- PINTO, C. *Biologia do Triatoma brasiliensis* Neiva. *Sci Med*, v. 2, p. 541-543, 1924.
- PINTO, C. J. C.; GRISARD, E. C.; ISHIDA, M. M. I. *Parasitologia*. Florianópolis: CCB/EAD/UFSC. 2011. 136 p.
- PRATA, A.; DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Os primórdios da doença. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2011, v. 44, suppl 2, p. 6-11. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000800002>>. Acesso em: abr. 2023.
- PROENÇA, V. Nanotecnologia: aplicações na medicina e indústria farmacêutica. Instituto Biomédico de Aprimoramento Profissional (IBAP). Blog. 2017. Disponível em: <<https://ibapcursos.com.br/nanotecnologia-aplicacoes-na-medicina-e-industria-farmaceutica/>>. Acesso em: jul. 2023.
- RAMOS, C. L. P.; CONCEIÇÃO, F. G.; TELES, E. S.; CUNHA, J. Y. P. da; LIMA, A. B. M. TRANSMISSÃO CONGÊNITA DA DOENÇA DE CHAGAS. *Revista Multidisciplinar em Saúde*, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 51, 2021. DOI: 10.51161/remss/728.
- RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *Lancet*, v. 375, p.1388-402, 2010.
- RECOMMENDATIONS FROM A SATELLITE MEETING. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 429–432, set. 1999.
- REIS, C. P.; PINTO, P. C.; GOMES, A.; CANDEIAS, S. Nanotechnology applied to drug delivery – formulation, development and characterization studies. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, v. 9, n. 1, p. 103-109, 2012.
- REISENMAN, C. E.; LAZZARI, C. R.; GIURFA, M. Circadian control of photonegative sensitivity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J Comp Physiol A*, v. 183, p. 533-541, 1998.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; MARQUEZ, J. O.; VON GAL FURTADO, C. C.; RAMOS DE OLIVEIRA, J. C.; MARTINS, A. R.; KOBERLE, F. Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. *Tropenmed Parasitol*, v. 30, p. 19-23, 1979.
- RIBEIRO, V. Tratamento farmacológico da doença de Chagas e suas perspectivas. 2017. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade De Brasília – UNB - Faculdade de Ciências da Saúde/Curso de Farmácia.

ROCHA, C. O, M. 14.04. Dia Mundial da Doença de Chagas. Centro de Comunicação Social da Faculdade de Medicina da UFMG. 2019. Disponível em: <<https://www.medicina.ufmg.br/chagas/>>. Acesso em: 15 abr. 2023.

ROCHA, D. S.; SANTOS, C. M. Morfologia de ovos e ninfas. In: Vetores da doença de Chagas no Brasil. Série Zoológica: Guias e Manuais de identificação. Curitiba, 2014, p. 40 – 63.

ROCHAGAN, L. G. L. Bula de remédio. Recife: LAFEPE, 2018.

ROFFE, E.; MURPHY, P.M. Autoimmunity and the Paradox of Chagas Disease. In: RAGAB, G.; ATKINSON, T.; STOLL, M. The Microbiome in Rheumatic Diseases and Infection, Springer, Cham, 2018.

ROMANHA, A. J. et al. Experimental Chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* Infection: Essential Role of Endogenous Interferon-g in Mediating Parasitologic Cure. J Infect Dis, v. 186, n. 6, p. 823-828, 2002

ROMANHA, A. J. Heterogeneidade Enzimática em *Trypanosoma cruzi*. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1982. 110 pp.

ROSA, J. A.; ROCHA, C. S.; GARDIM, S.; PINTO, M. C.; MENDONÇA, V. J.; FERREIRAFILHO, J. C. R.; et al. Description of *Rhodius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the State of Rondônia, Brazil. Zootaxa, v. 3478, p. 62-76, 2012.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. Cienc. Cult. v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.

SANCHES, T. Um guia global para doença de Chagas, 2018. Boletim UFMG N° 2037 – 2018. Disponível em: < <https://ufmg.br/comunicacao/publicacoes/boletim/edicao/2037/um-guia-global-para-a-doenca-de-chagas>>. Acesso em: 22 ago. 2020.

SAN FRANCISCO, J.; ASTUDILLO, C.; VEJA, J. L.; CATALÁN, A.; GUTIÉRREZ, B.; ARAYA, J. E.; ZAILBERGER, A.; MARINA, A.; GARCÍA, C.; SANCHEZ, N.; OSUNA, A.; VILCHEZ, S.; RAMÍREZ, M. I.; MACEDO, J.; FEIJOLI, V. S.; PALMISANO, G.; GONZÁLEZ, J. *Trypanosoma cruzi* pathogenicity involves virulence factor expression and upregulation of bioenergetic and biosynthetic pathways. Virulence, v. 13, n. 1, p. 1827-18948, 2022. doi: 10.1080/21505594.2022.2132776. PMID: 36284085; PMCID: PMC9601562.

SCHOFIELD, C. J. Biosystematics of Triatominae. In: Biosystematics of Haematophagous Insects (M. W. Service, ed.), Oxford: Systematics Association/ Clarendon Press, v. 37, p. 284-312, 1988.

SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. Acta Tropica, v. 110, p. 88–100, 2009. doi:10.1016/j.actatropica.2009.01.010.

SEYDEL, J. K. Sulfonamides, structure-activity relationship, and mode of action. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 57, n. 9, p. 1455-1478, 1968.

SHIKANAI-YASUDA M.A.; CARVALHO N.B. Oral transmission of Chagas disease. Clinical Infection Disease, v. 54, n. 6, p. 845-52, 2012.

SILVA, H. G., TEIXEIRA, C. S., SILVA, V. C. Molecules involved in mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a literature overview. 2019. 28 f. Revista Médica de Minas Gerais. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade

Federal de Uberlândia (UFU) - Uberlândia - MG –Brasil. Laboratório de Tripanossomatídeos (LATRI), Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM).

SILVA, J. J. N.; PAVANELLI, W. R.; GUTIERREZ, F. R.; LIMA, F. C. A.; SILVA, A. B. F.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. Complexation of the anti-*Trypanosoma cruzi* drug benzimidazole improves solubility and efficacy. *J Med Chem.*, v. 24, n. 51(14), p. 4104-4114, 2008. doi: 10.1021/jm701306r. PMID: 18570370.

SOARES, J. C. de A. V. Planejamento, síntese e avaliação da atividade antichagásica de novos derivados 1H-pirazolo[3,4-b]piridina. 2018. 122 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2018.

SOARES, M. B. P.; SOUSA, B. S de F.; SANTOS, R. R. Portal da doença de Chagas – Terapia celular no tratamento da doença de Chagas: estado atual e perspectivas. Instituto Gonçalo Moniz, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/doenca/tratamento/>>. Acesso em: ago. 2023.

SOARES, R. P. P.; GONTIJO, N. F.; ROMANHA, A. J.; DIOTAIUTI, L.; PEREIRA, M. H. Salivary heme proteins distinguish *Rhodnius prolixus* from *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Acta Tropica*, v. 73, n. 3, p. 285-291, 1998.

SOARES SOBRINHO, J. L.; MEDEIROS, F. P. de M.; DE LA ROCA, M. F.; SILVA, K. E. R.; LIMA, L. N. A.; ROLIM NETO, P. J. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. *Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology*, Goiânia, v. 36, n. 2, p. 103–118, 2007. DOI: 10.5216/rpt.v36i2.1783. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/iptsp/article/view/1783>. Acesso em: ago. 2023.

SOBRINHO, J., *et al.* Doença de Chagas: 100 anos de descoberta. 258/566 *Farmacoepidemiologia – Revisão. Rev. Bras. Farm.*, v. 90, n. 4, p. 283-289, 2009.

SOEIRO, M., *et al.* Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from in vivo and in vitro studies. In: *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104(Suppl. I): 301-310, 2009.

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* v. 83, p. 141-152, 1996.

SOUTO, R. P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* v. 62, p. 45-52, 1993.

SOUSA, A. A.; MORGAN, J. T.; BROWN, P. H.; ADAMS, A.; JAYASEKARA, M. P.; ZHANG, G.; ACKERSON, C. J.; KRUEHLAK, M. J.; LEAPMAN, R. D. Synthesis, characterization, and direct intracellular imaging of ultrasmall and uniform glutathione-coated gold nanoparticles. *Small.*, v. 8, n. 14, p. 2277-2286, 2012. doi: 10.1002/sml.201200071. PMID: 22517616; PMCID: PMC3715615.

SOUZA, A. S de. Portal da doença de Chagas – Fase crônica – Tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. 2017. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/doenca/tratamento/>>. Acesso em: ago. 2023.

SOUZA, P. S.; OLIVEIRA, J.; GALVÃO, C.; ROCHA, D. S.; RAVAZI, A.; ALEVI, K. C. C. Eggkeys: chaves de identificação para os vetores da doença de chagas desenvolvidas a partir das características dos ovos. In: OLIVEIRA, J., et al (Org.) Atualidades em medicina tropical na América do Sul: vetores. Rio Branco: Stricto Sensu, 2021. p. 21-38. ISBN: 978-65-86283-58-7. DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283587.

SOUZA, T. B. de. Planejamento, síntese e avaliação da atividade citotóxica de benzamidas e arilguanidinas derivadas de carboidratos. 2023. 141 f. Tese (Doutorado em Síntese Orgânica) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2023.

SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. Int J Cell Biol., v. 2010, p. 295394, 2010. doi: 10.1155/2010/295394. PMID: 20811486; PMCID: PMC2926652.

TEIXEIRA, A.R.L.; HECHT, M.M.; GUIMARO, M.C.; SOUZA, A.O.; NITZ, N. Pathogenesis of Chagas disease: parasite persistence and autoimmunity. Clinical Microbiology Reviews, v. 24, p. 592-630, 2011.

TEIXEIRA, A.R.L.; NASCIMENTO, R.J.; STURM, N.R. Evolution and pathology in Chagas disease – a Review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 101, n. 5, p. 463-491, 2006.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P. H.; DE SOUZA, W. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. PLoS Negl Trop Dis, v. 6, n. 8, p. e1749, 2012.

TEVES, S. C. Aspectos Biológicos, Morfológicos e Moleculares de *Triatoma jatai* Gonçalves, Teves-Neves, Carbajal-de-la Fuente, Santos-Mallet, Lopes, 2013 e *Triatoma costalimai* Verano & Galvão, 1959 (*Hemiptera: Reduviidae: Triatominae*). 2018. 126 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2018.

TIBAYRENC, M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. Adv. Parasitol. v. 36, p. 48-115, 1995.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. Evolution, v. 42, p. 277-292, 1988.

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F. J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. Proc Natl Acad Sci U S A., v. 83, n. 1, p. 115-9, 1986. doi: 10.1073/pnas.83.1.115. PMID: 3510428; PMCID: PMC322802.

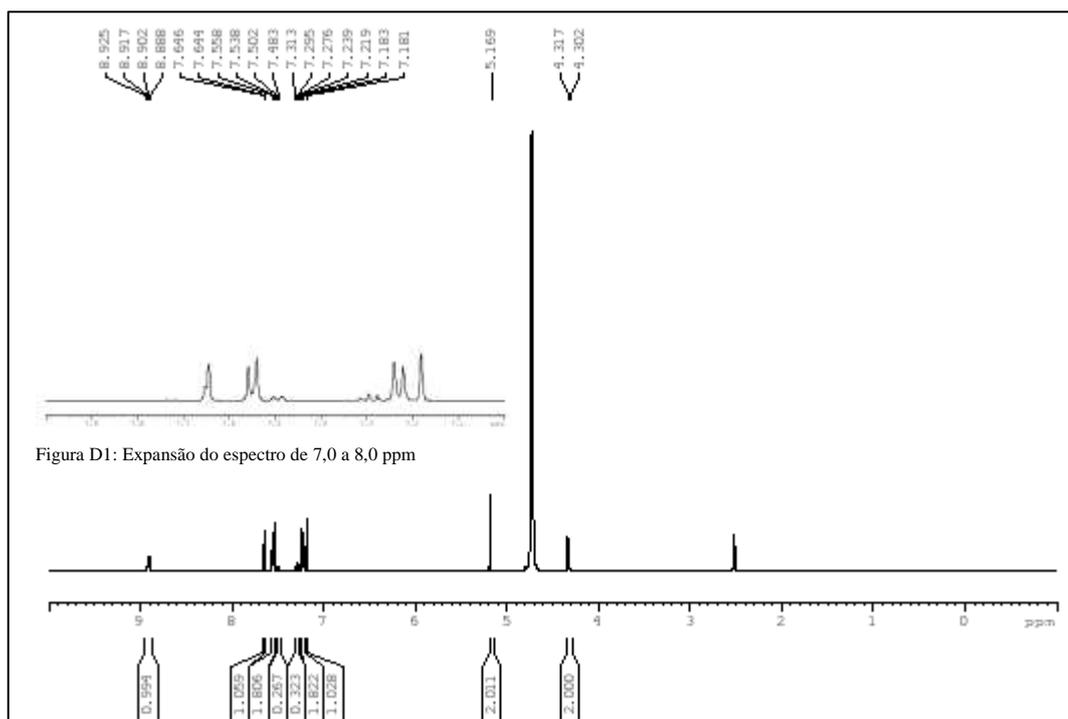
TROUXINE, A., et al. *Trypanosoma cruzi* chemical proteomics using immobilized benzimidazole. Experimental Parasitology, v. 140, p. 33-38, 2014.

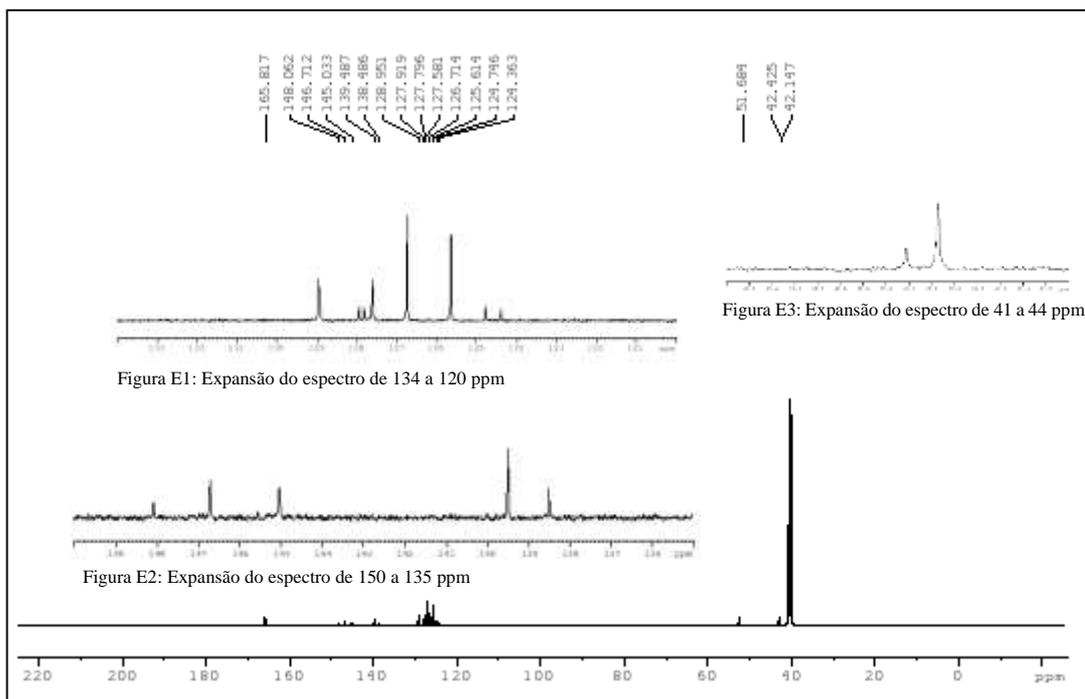
VALADARES, H. M. S. Análises populacionais em *Trypanosoma cruzi* baseadas em microsatélites polimórficos de DNA [manuscrito] / Helder Magno Silva Valadares. – 2007. 178 f.: il. ; 29,5 cm. Orientadora: Andrea M. Macedo. Co-orientador: Sérgio D.J. Pena. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Bioquímica e Imunologia.

WEIRAUCH, C.; MUNRO, J.B. Molecular phylogeny of the assassin bugs (*Hemiptera: Reduviidae*), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 53, n. 1, p. 287-299, 2009.

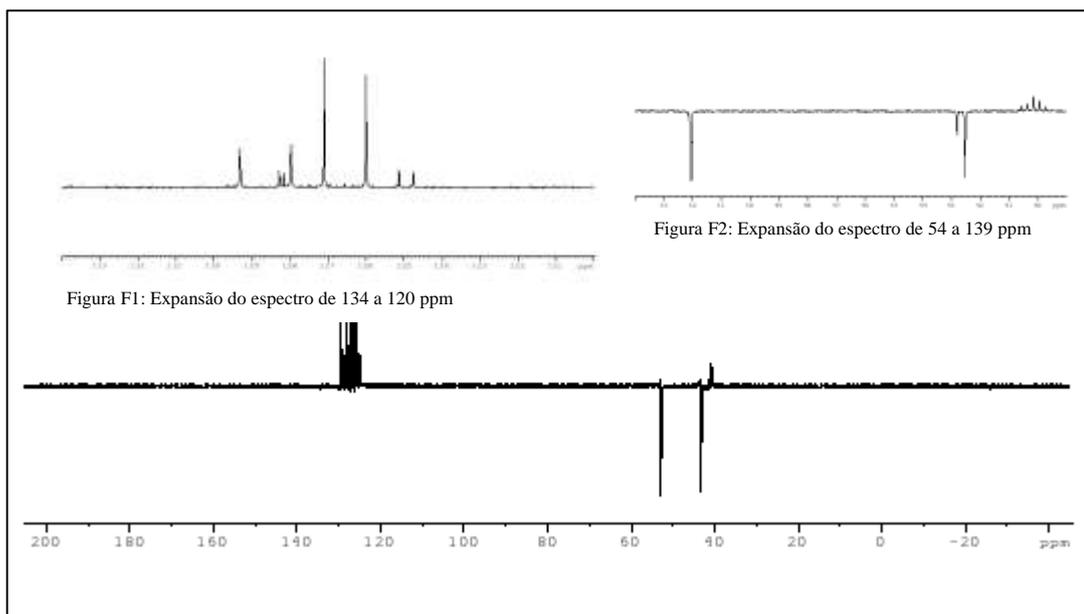
- WEIRAUCH, C. Cladistic analysis of *Reduviidae* (*Heteroptera: Cimicomorpha*) based on morphological characters. *Systematic Entomology*, v. 33, p. 229-274, 2008.
- WEISBARTH, R. T.; DAS, A.; CASTELLANO, P.; FISHER, M. A.; WU, H.; BELLOFATTO, V. The *Trypanosoma cruzi* RNA-binding protein RBP42 is expressed in the cytoplasm throughout the life cycle of the parasite. *Parasitology research*, v. 117, n. 4, p 1095-1104, 2018.
- WIGGLESWORTH, V. B.; GILLET, J. D. The function of the antennae in *Rhodnius prolixus* (*Hemiptera*) and the mechanism of orientation to the host. *J Exp Biol*, v. 11, p. 120-138, 1934.
- WILKINSON, S. R. et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 105, p. 5022–5027, 2008.
- WILKINSON, S. R. et al. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. *Curr. Top. Med. Chem.*, v. 11, p. 2072–2084, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Home. Newsroom. Fact sheets. Detail. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). 2023. Disponível em: <[https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: abr. 2023.
- WYLLIE, S. et al. Assessing the essentiality of *Leishmania donovani* nitroreductase and its role in nitro drug activation. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 57, p. 901–906, 2013.
- YU, C.; IRUDAYARAJ, J. Quantitative evaluation of sensitivity and selectivity of multiplex nanoSPR biosensor assays. *Biophys J.*, v. 15, n. 93(10), p. 3684-3692, 2007. doi: 10.1529/biophysj.107.110064. PMID: 17660314; PMCID: PMC2072052.
- WUTS, PETER G. M. Greene's protective groups in organic synthesis. – Fifth edition / Peter G.M. Wuts. pages cm Includes index. ISBN 978-1-118-05748-3.
- ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M.; SCHIJMAN, A. G.; LLEWELLYN, M. S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C. R.; ANDRADE, S. G.; STURM, N. R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.*, v. 12, n. 2, p. 240-253, 2012. doi: 10.1016/j.meegid.2011.12.009.

## ANEXOS

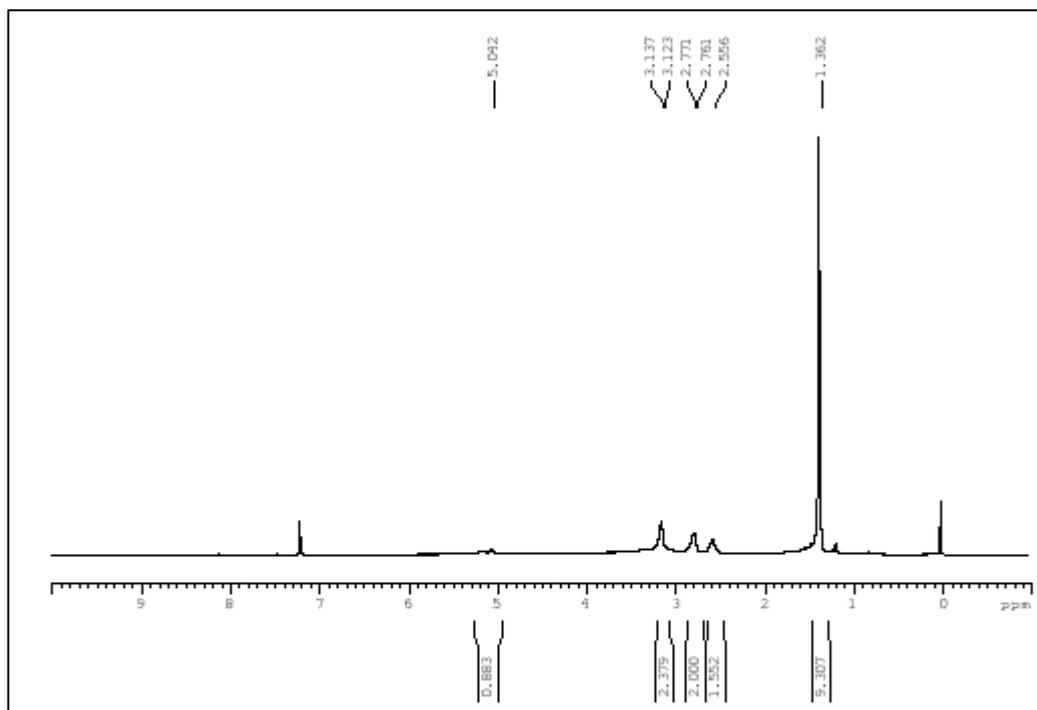
ANEXO A: ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ;  $\text{DMSO}_6$ ; 400 MHz) DO COMPOSTO 2 (AMOSTRA 11).ANEXO B: ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ;  $\text{DMSO}_6$ ; 400 MHz) DO COMPOSTO 2 (AMOSTRA 11).



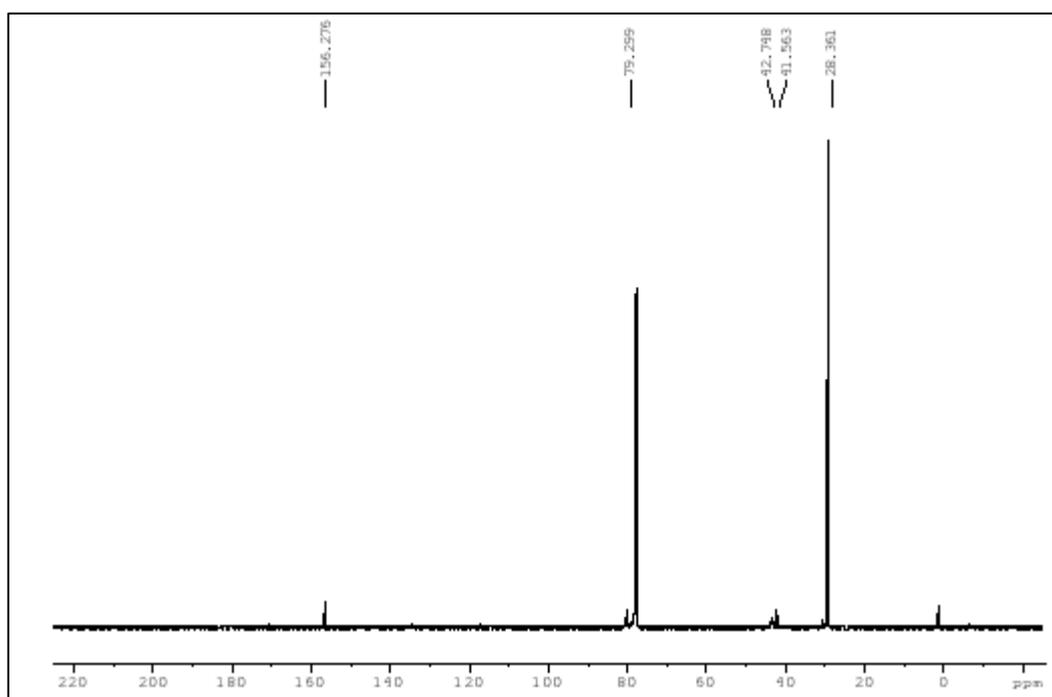
**ANEXO C: ESPECTRO DE RMN DE DEPT-135 ( $\delta$ ; DMSO<sub>6</sub>; 400 MHz) DO COMPOSTO 2 (AMOSTRA 11).**



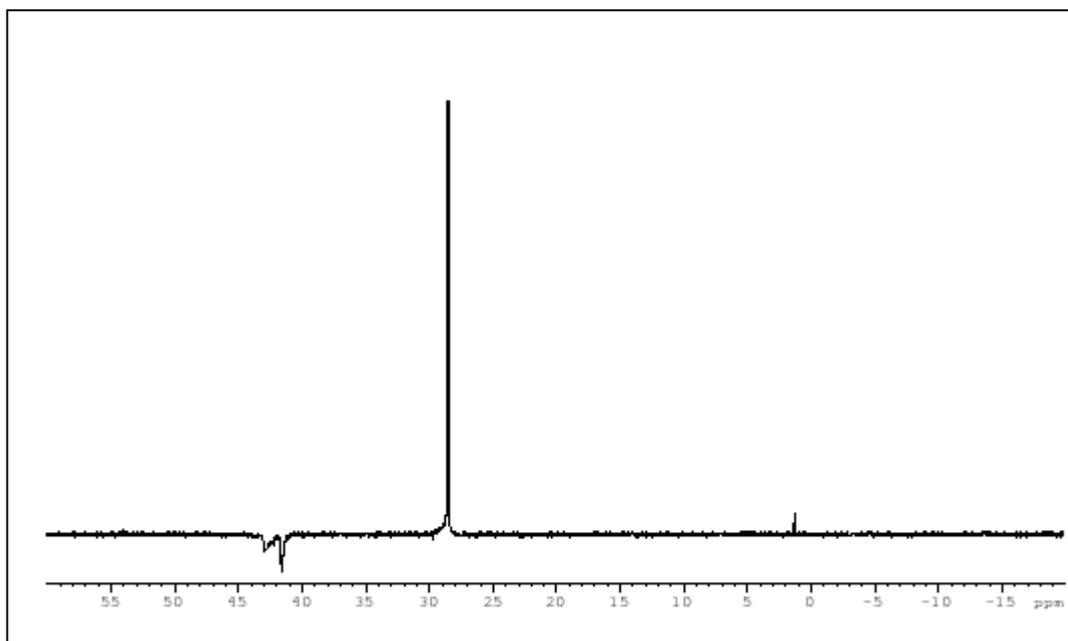
**ANEXO D: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup>H ( $\delta$ ; CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz) DO COMPOSTO A**



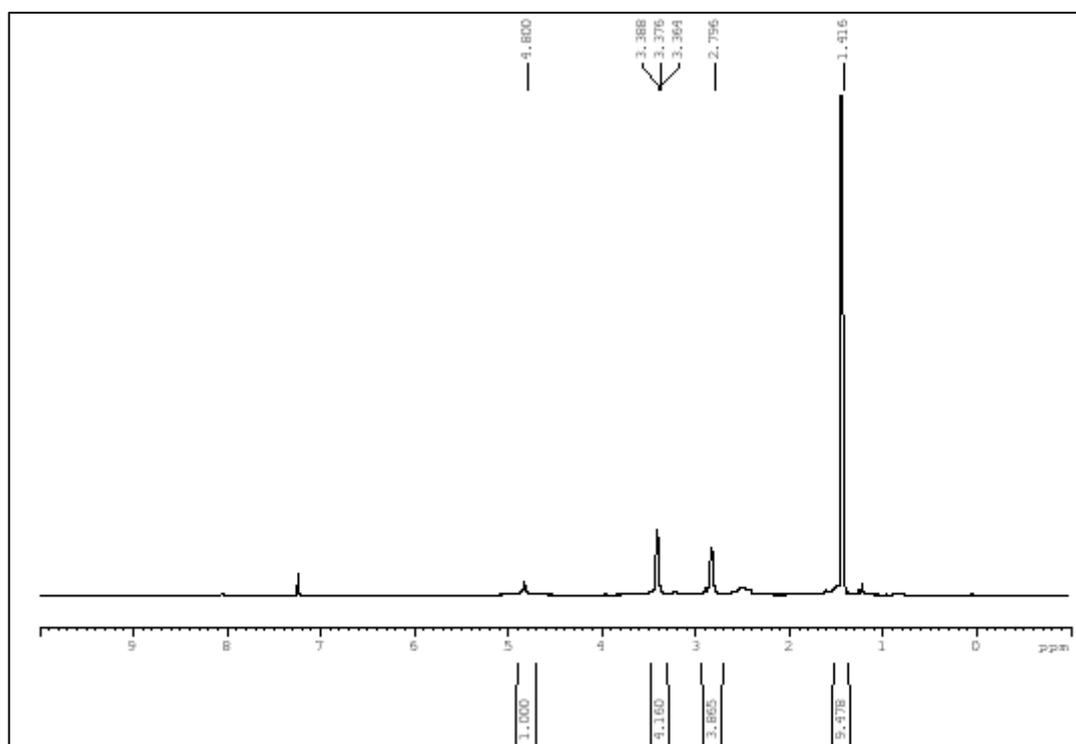
**ANEXO E: ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup>C (δ; CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz) DO COMPOSTO A**

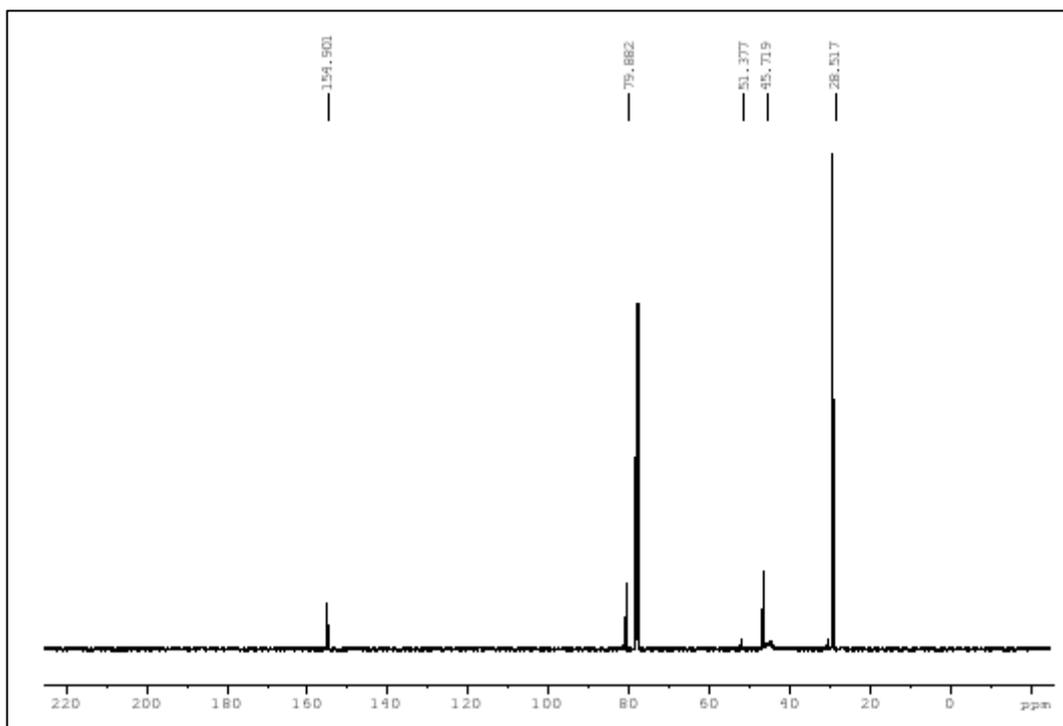
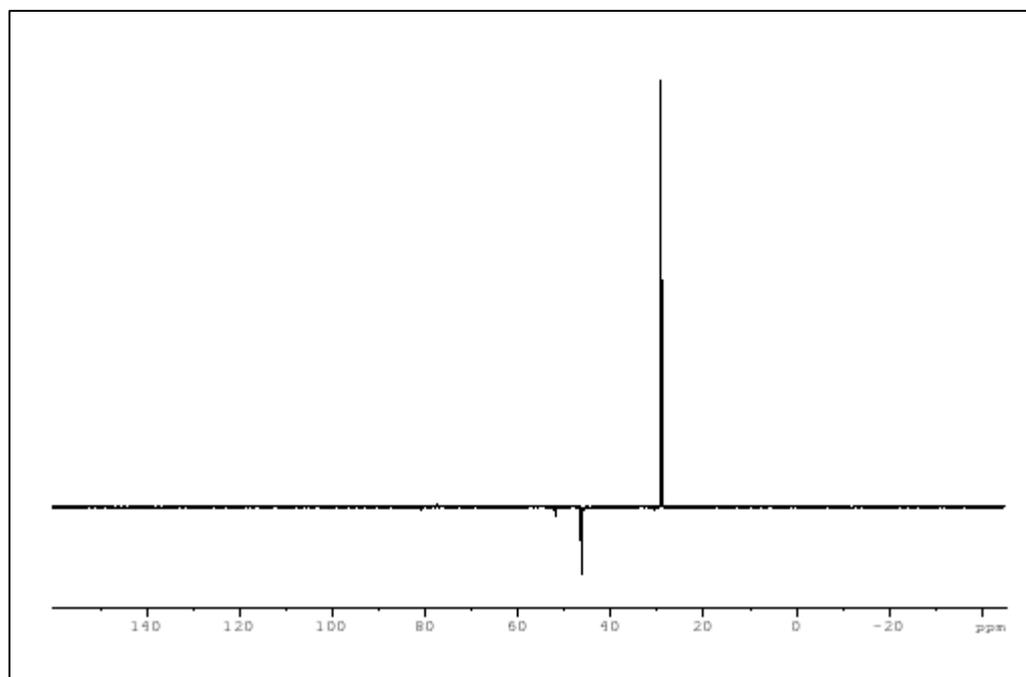


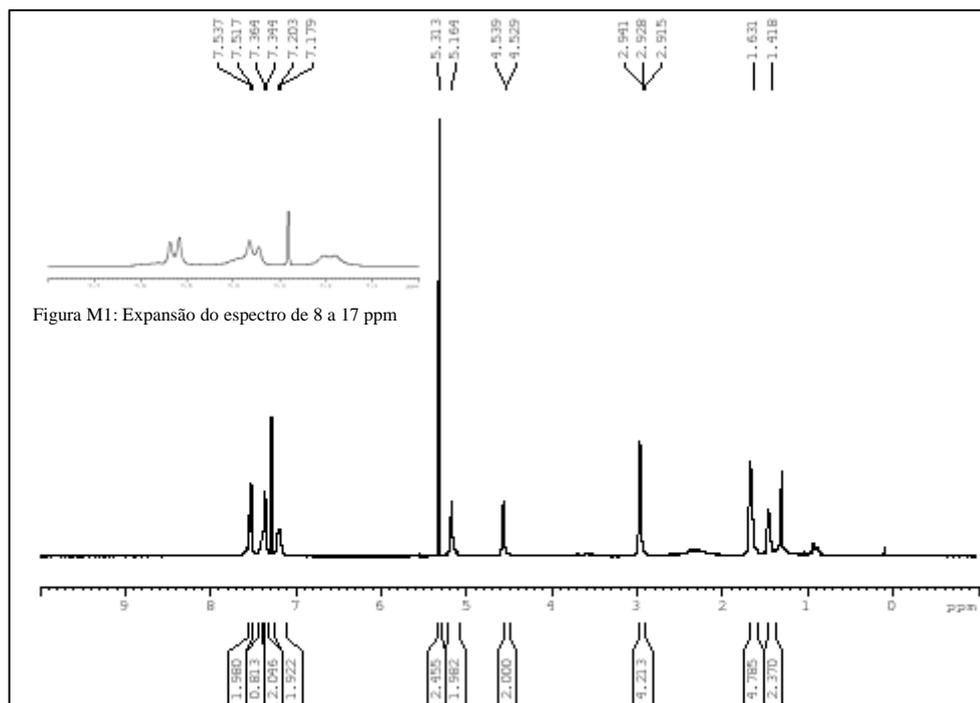
**ANEXO F: ESPECTRO DE RMN DETP-135 (δ; CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz) DO COMPOSTO A**



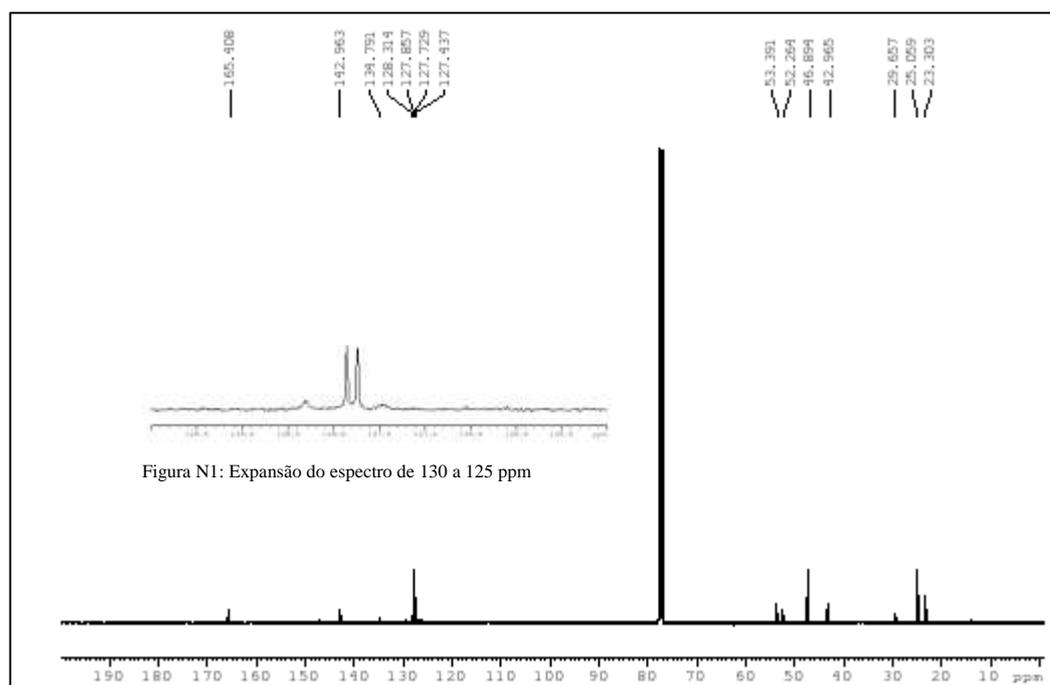
**ANEXO G: ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz) DO COMPOSTO B**



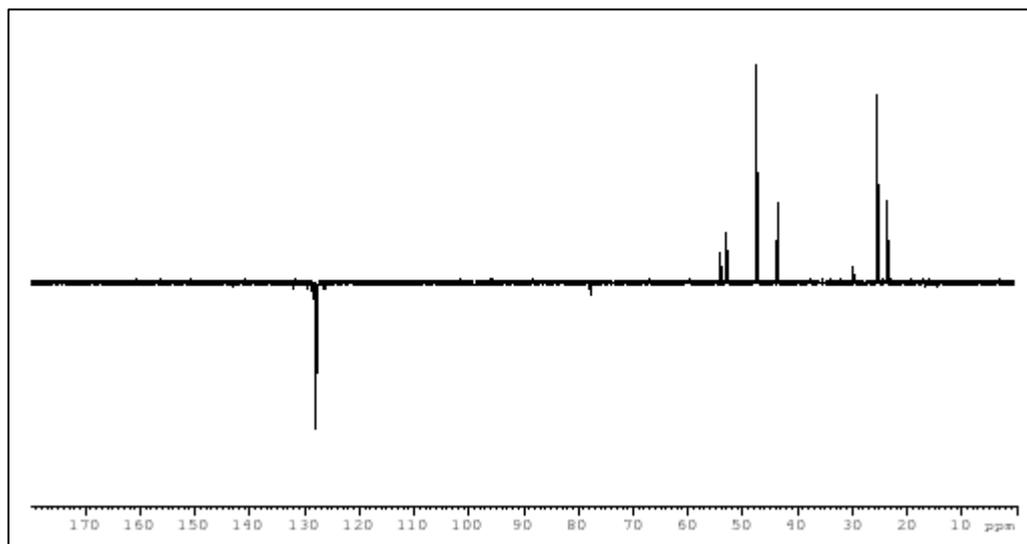
**ANEXO H: ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz) DO COMPOSTO B****ANEXO I: ESPECTRO DE RMN DETP-135 ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz) DO COMPOSTO B****ANEXO J: ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz) DO COMPOSTO 3a**



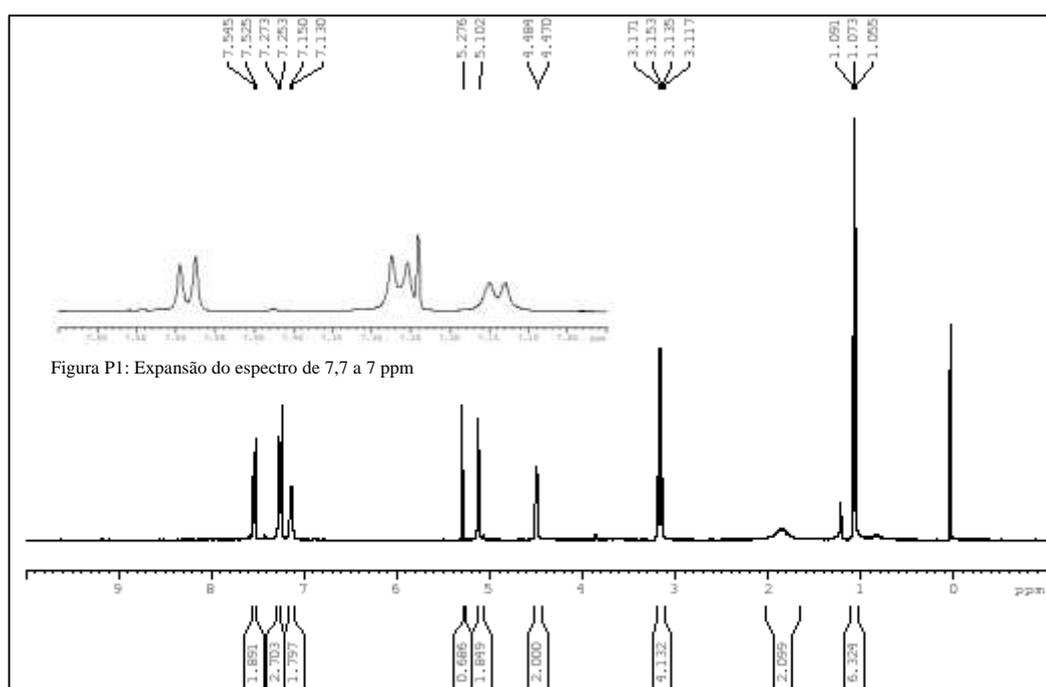
### ANEXO L: ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ; $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz) DO COMPOSTO 3a

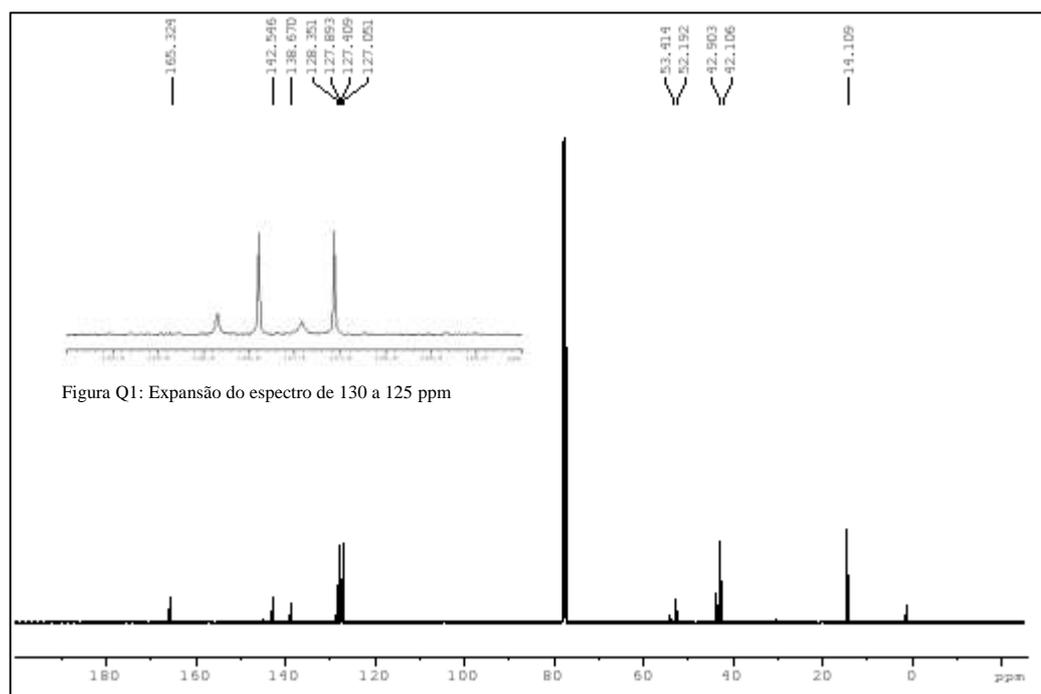
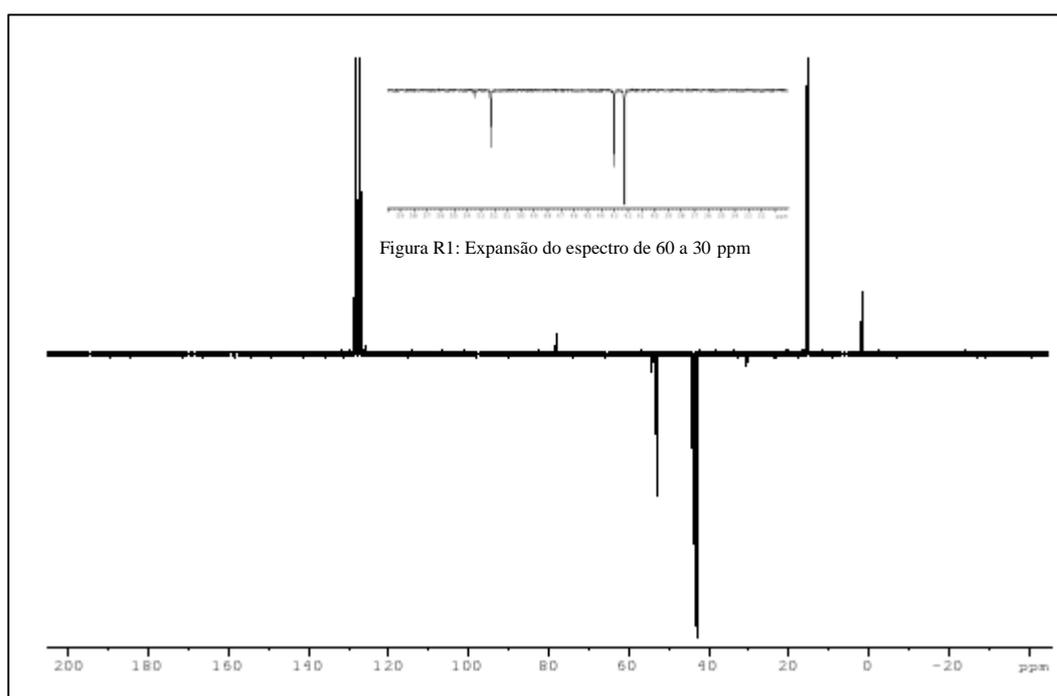


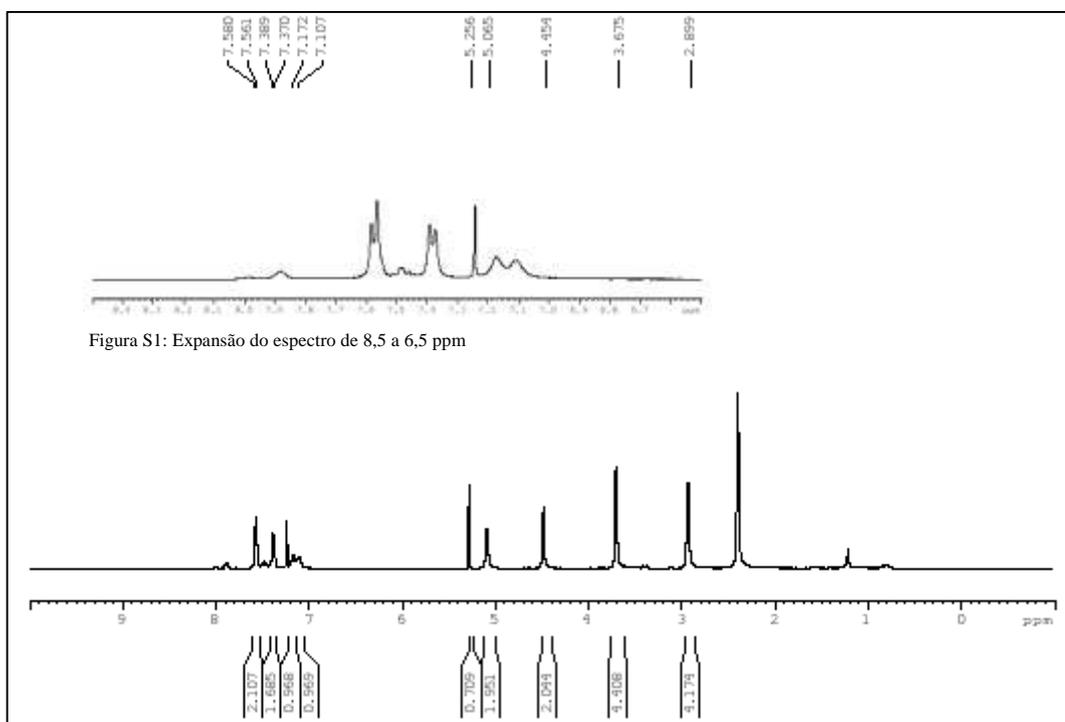
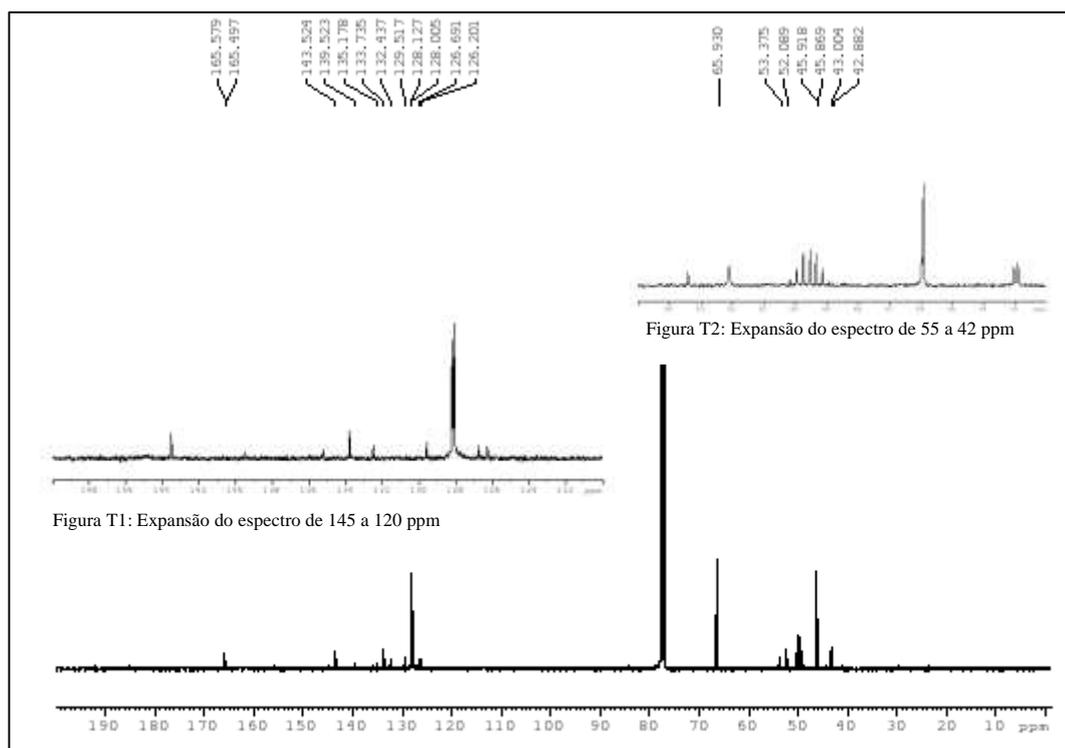
**ANEXO M: ESPECTRO DE RMN DETP-135 ( $\delta$ ; CDC13; 100 MHz) DO COMPOSTO 3a**



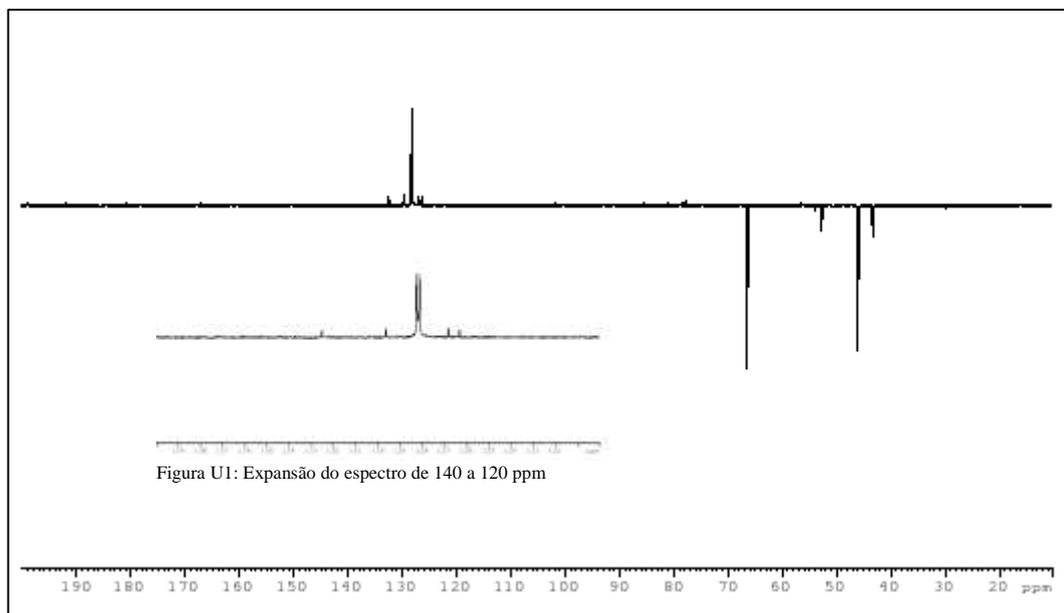
**ANEXO N: ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ; CDC13; 400 MHz) DO COMPOSTO 3b**



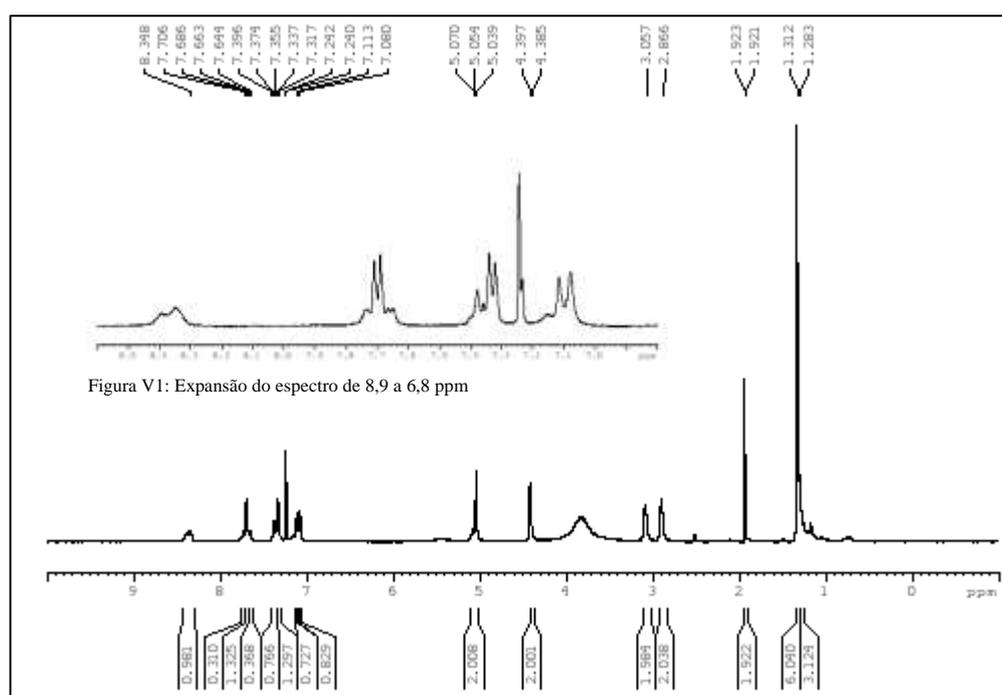
**ANEXO O: ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz) DO COMPOSTO 3b****ANEXO P: ESPECTRO DE RMN DETP-135 ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz) DO COMPOSTO 3b**

**ANEXO Q: ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz) DO COMPOSTO 3c**

**ANEXO R: ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz) DO COMPOSTO 3c**


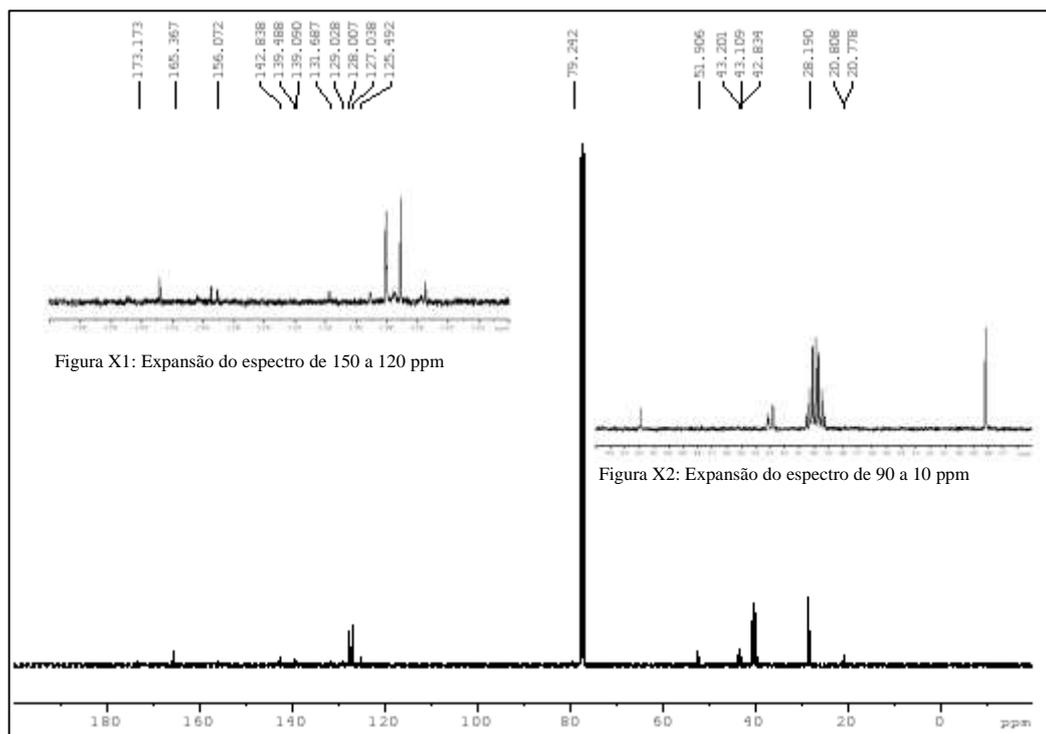
**ANEXO S: ESPECTRO DE RMN DETP-135 ( $\delta$ ; CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz) DO COMPOSTO 3c**



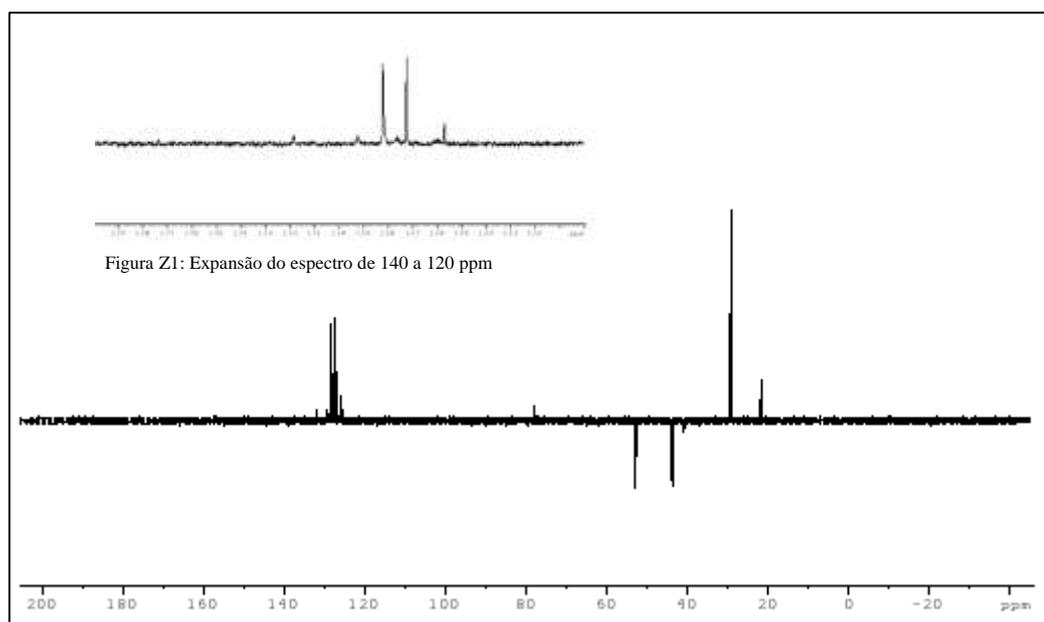
**ANEXO T: ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ ; CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz) DO COMPOSTO 4a**



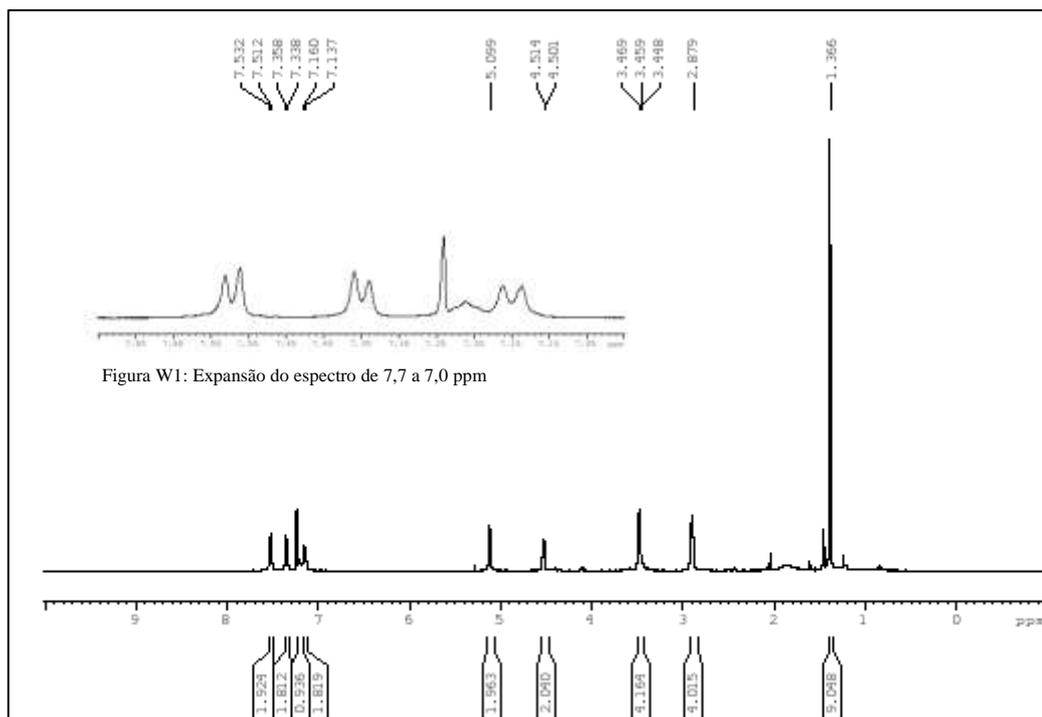
**ANEXO U: ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz) DO COMPOSTO 4a**



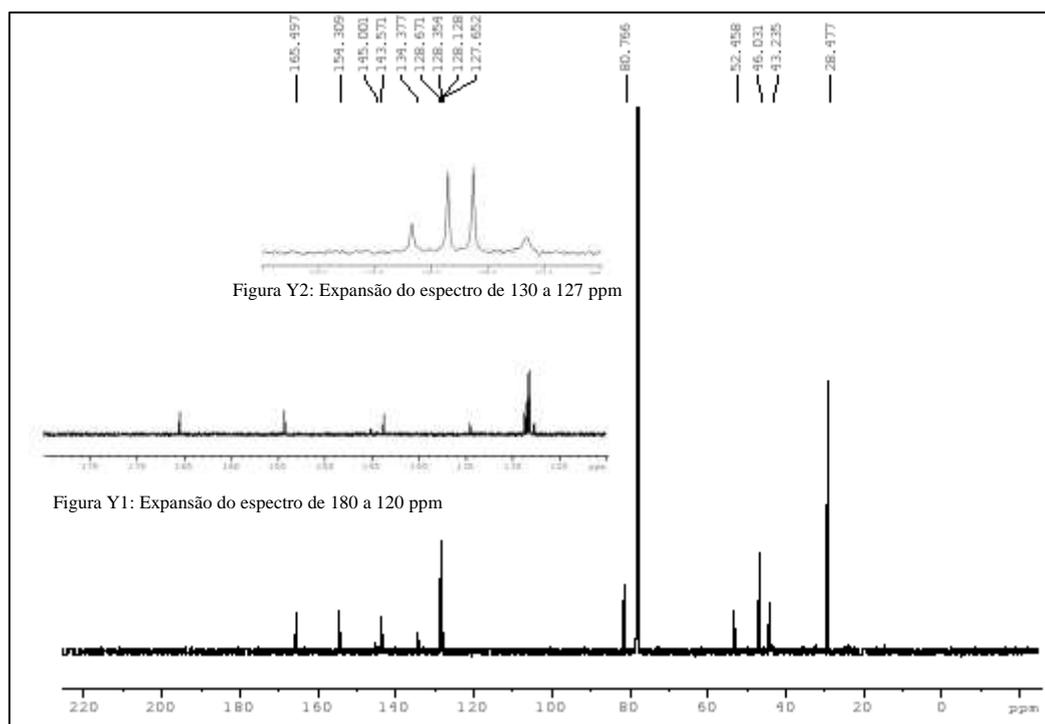
**ANEXO V: ESPECTRO DE RMN DETP-135 ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz) DO COMPOSTO 4a**



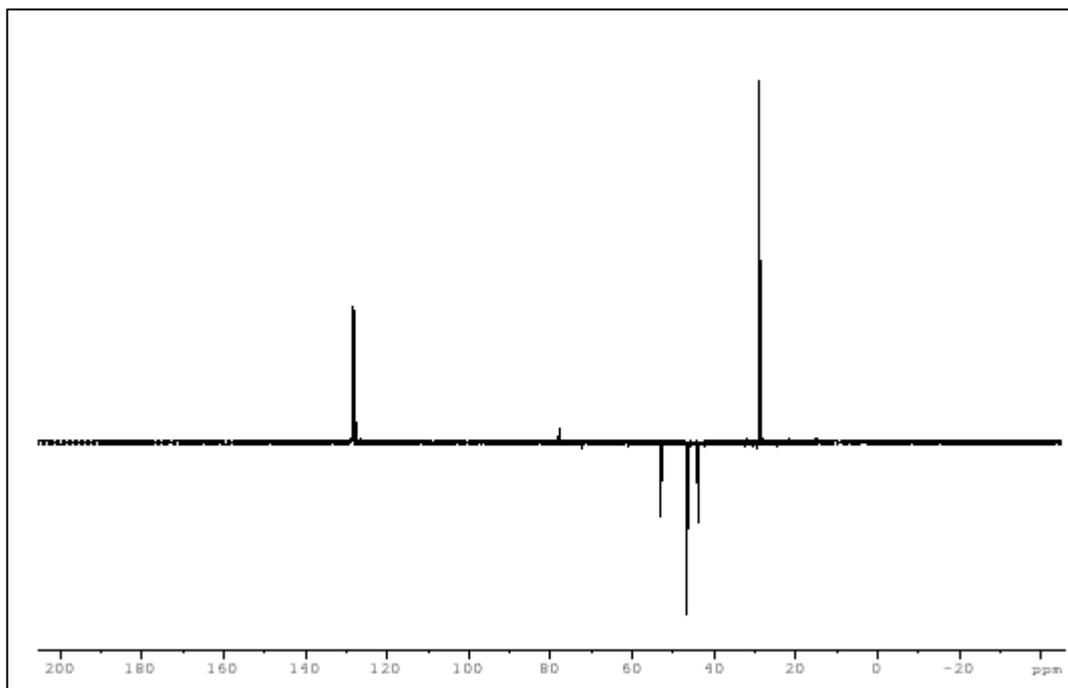
**ANEXO X: ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ;  $\text{DMSO-d}_6$ ; 400 MHz) DO COMPOSTO 4b**



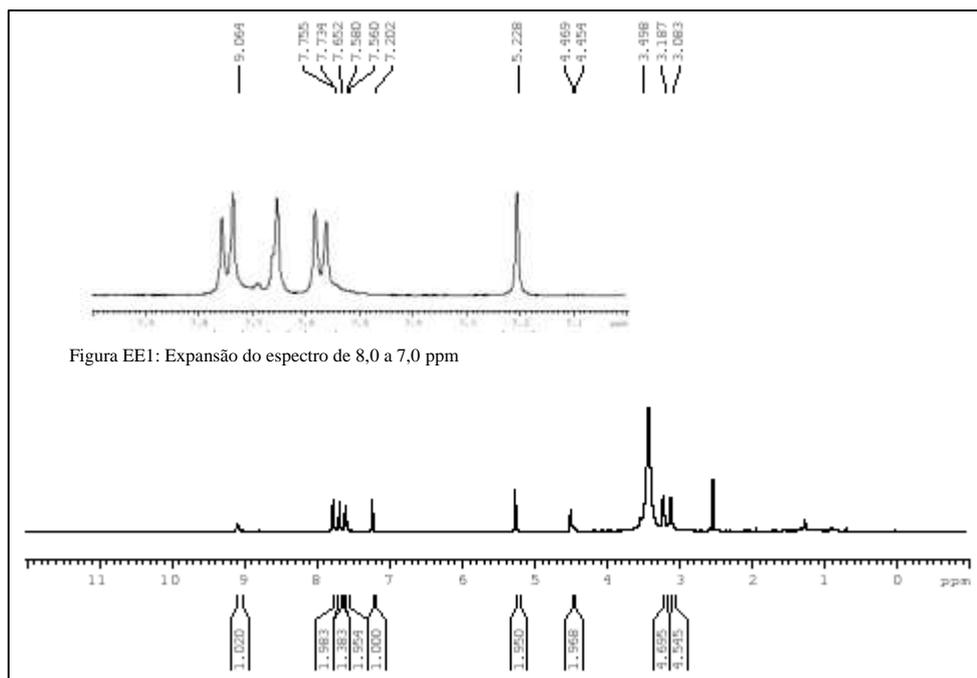
### ANEXO Z: ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ; DMSO- $\text{d}_6$ ; 100 MHz) DO COMPOSTO 4b

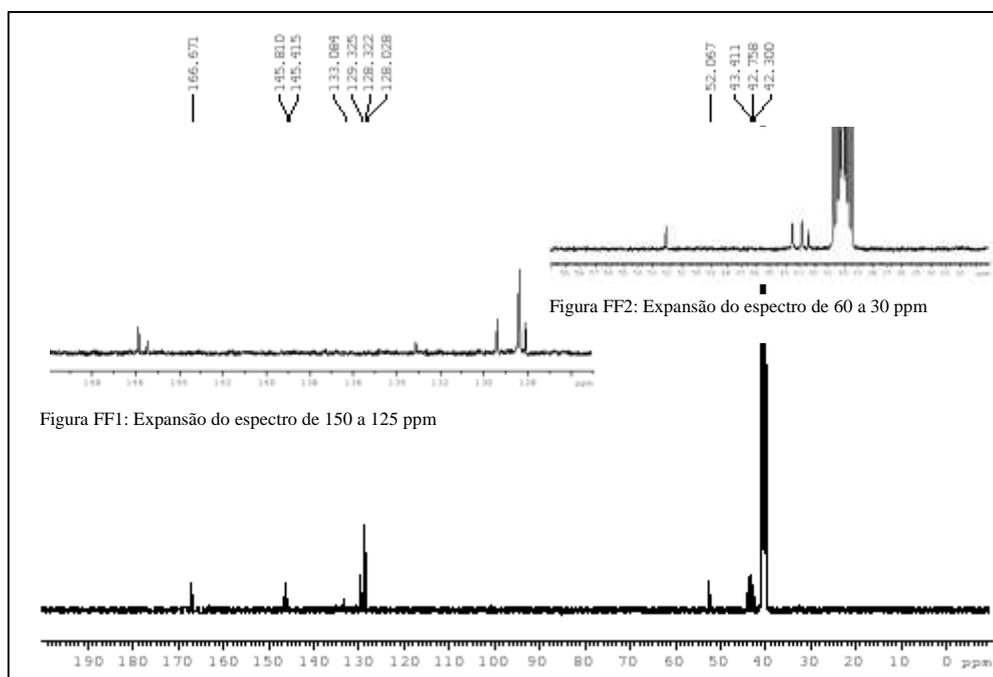
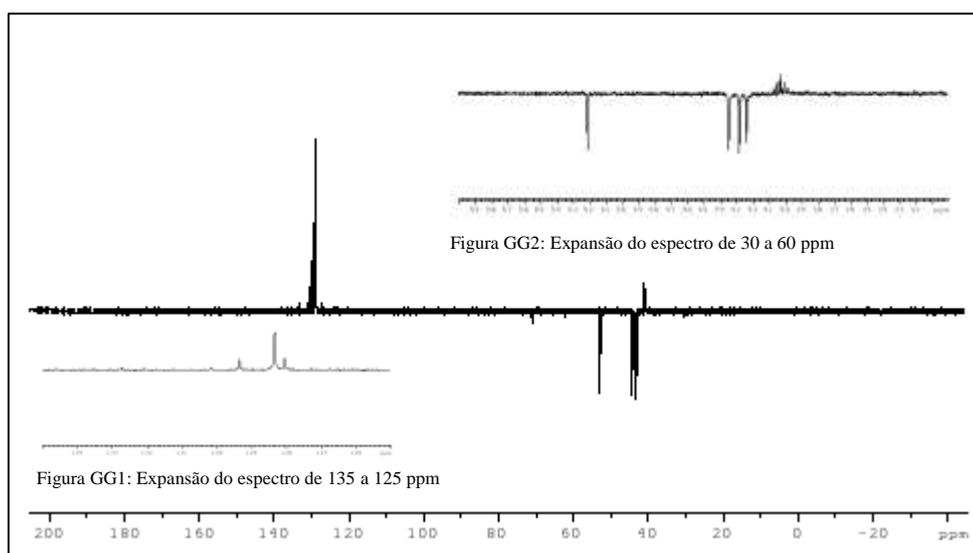


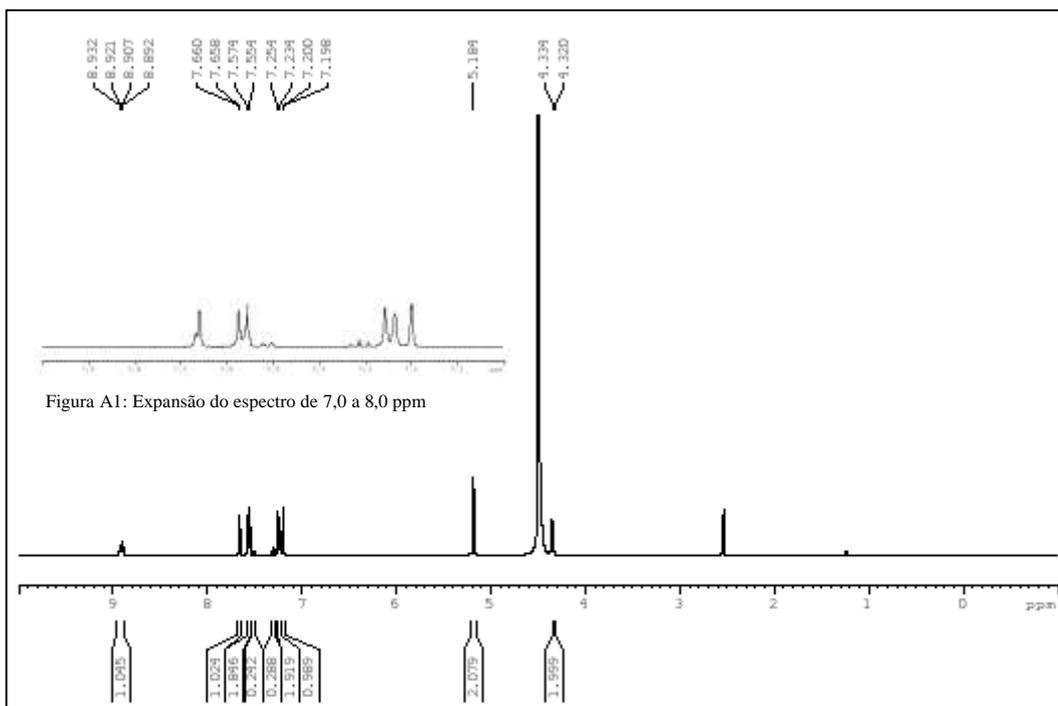
**ANEXO W: ESPECTRO DE RMN DETP-135 ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 100 MHz) DO COMPOSTO 4b**



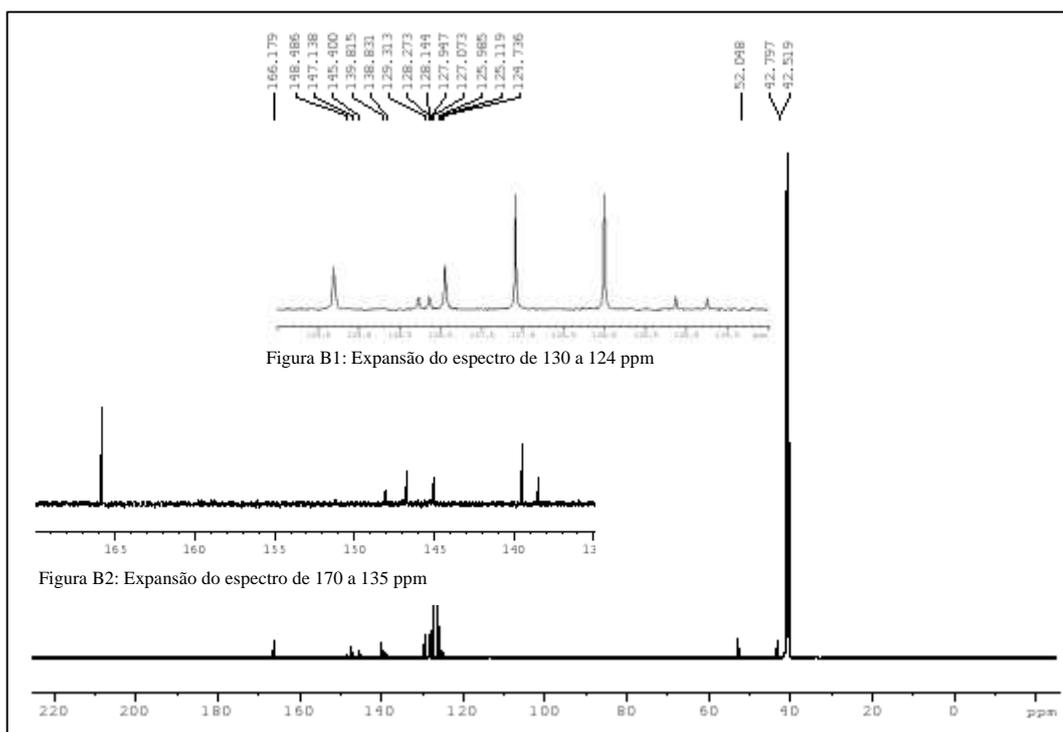
**ANEXO Y: ESPECTRO DE RMN  $^1H$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 400 MHz) DO COMPOSTO 5b**



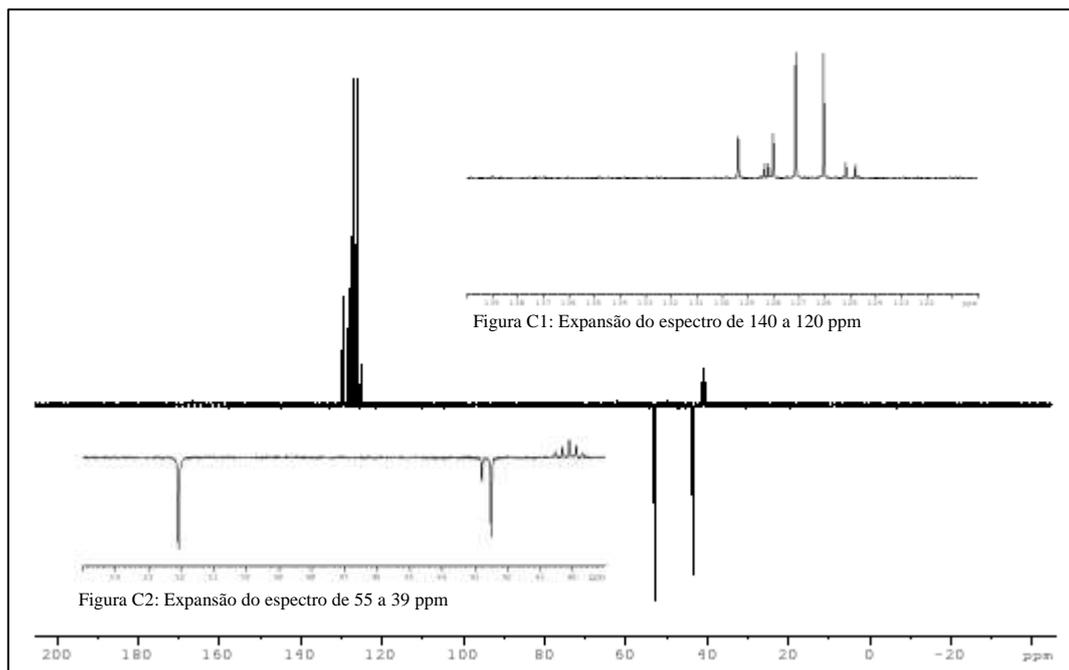
**ANEXO AA: ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 100 MHz) DO COMPOSTO 5b****ANEXO BB: ESPECTRO DE RMN DETP-135 ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 100 MHz  $\delta$ ; CDCL $_3$ ; 100 MHz) DO COMPOSTO 5b****ANEXO CC: ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 400 MHz) DO COMPOSTO 2 (AMOSTRA 10)**



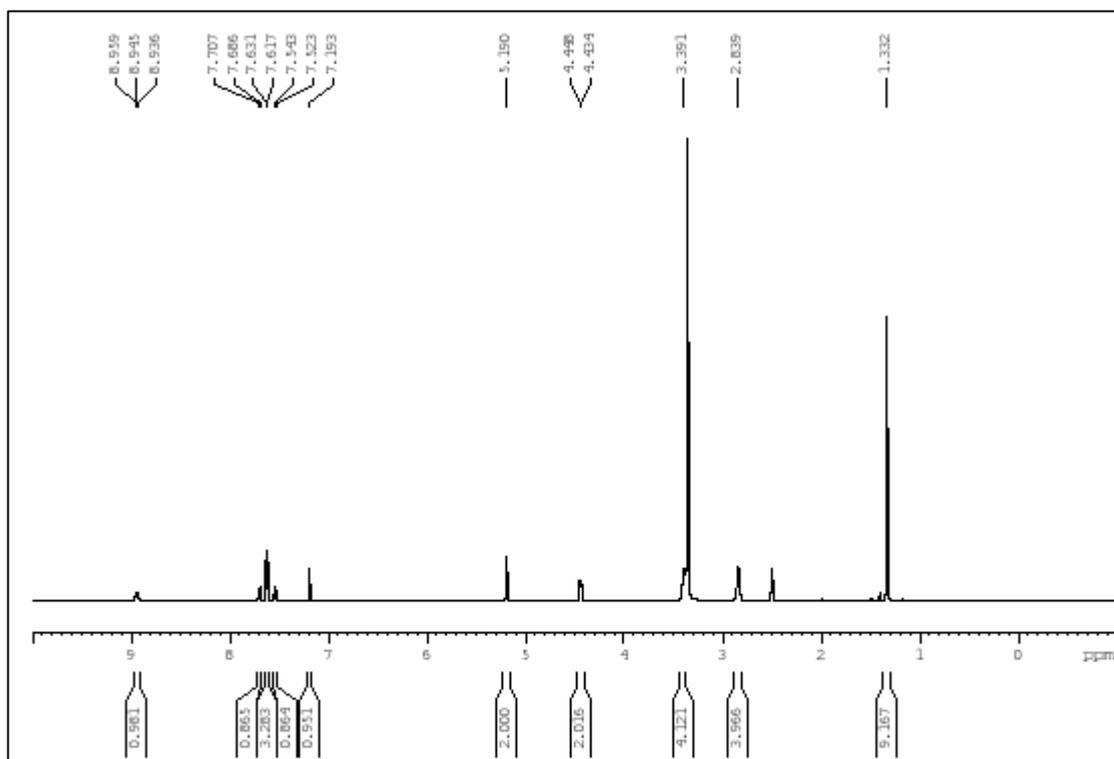
**ANEXO DD: ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ;  $\text{DMSO}_6$ ; 400 MHz) DO COMPOSTO 2 (AMOSTRA 10)**



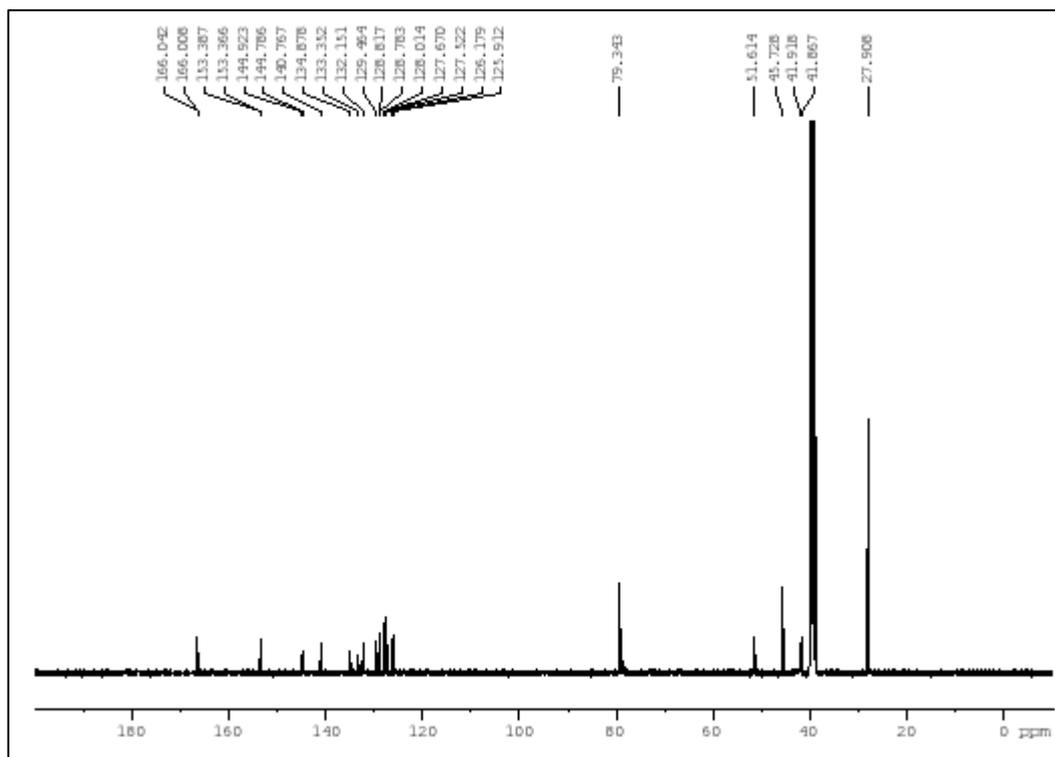
**ANEXO EE: ESPECTRO DE RMN DE DEPT-135 ( $\delta$ ; DMSO<sub>6</sub>; 400 MHz) DO COMPOSTO 2 (AMOSTRA 10)**



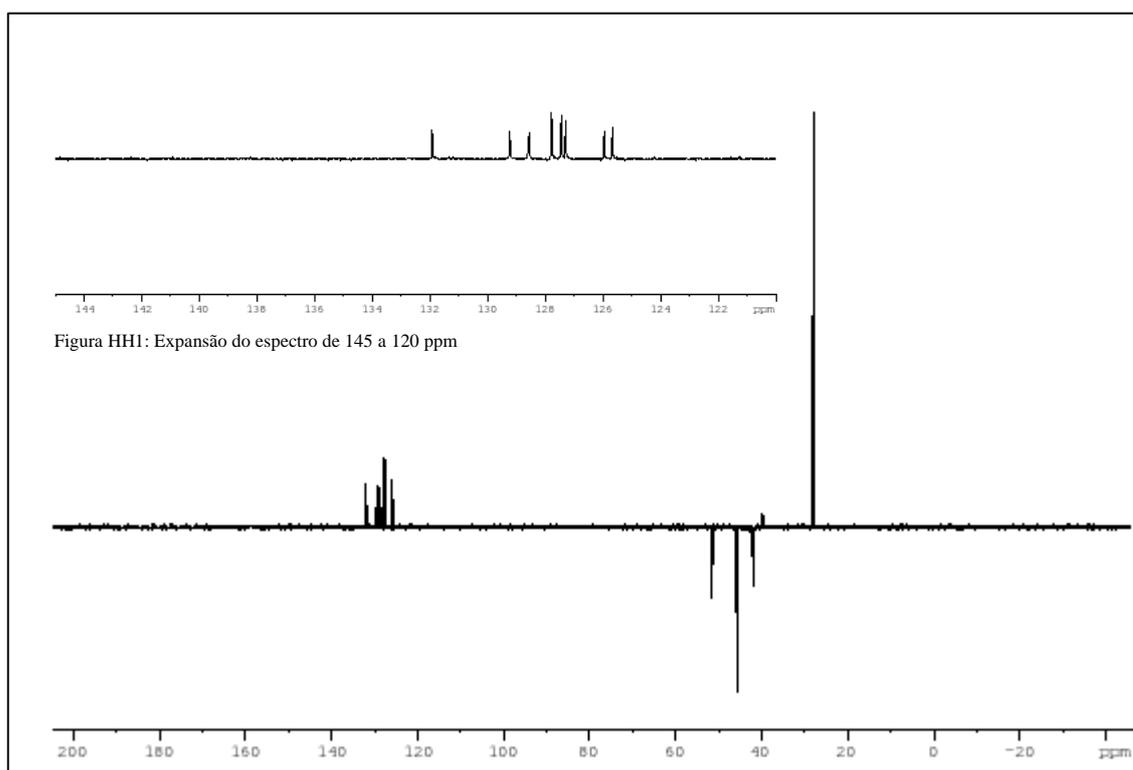
**ANEXO FF: ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ ; DMSO-d<sub>6</sub>; 100 MHz) DA AMOSTRA 22**



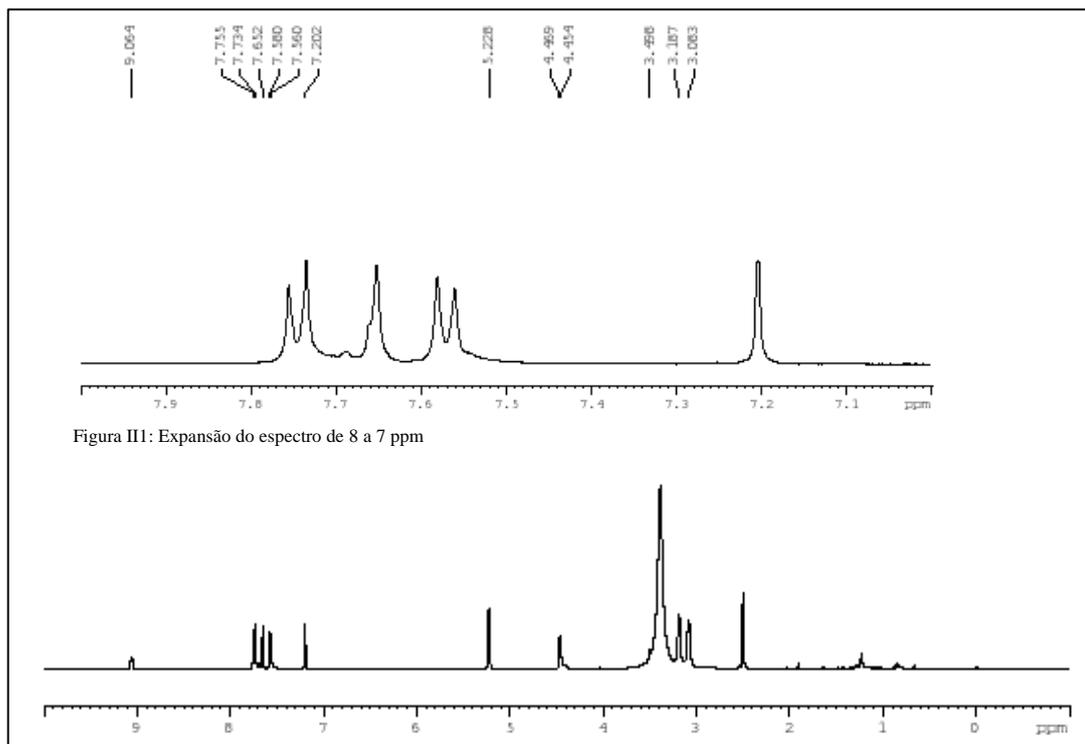
**ANEXO GG: ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ ; DMSO-d<sub>6</sub>; 100 MHz) DA AMOSTRA 22**



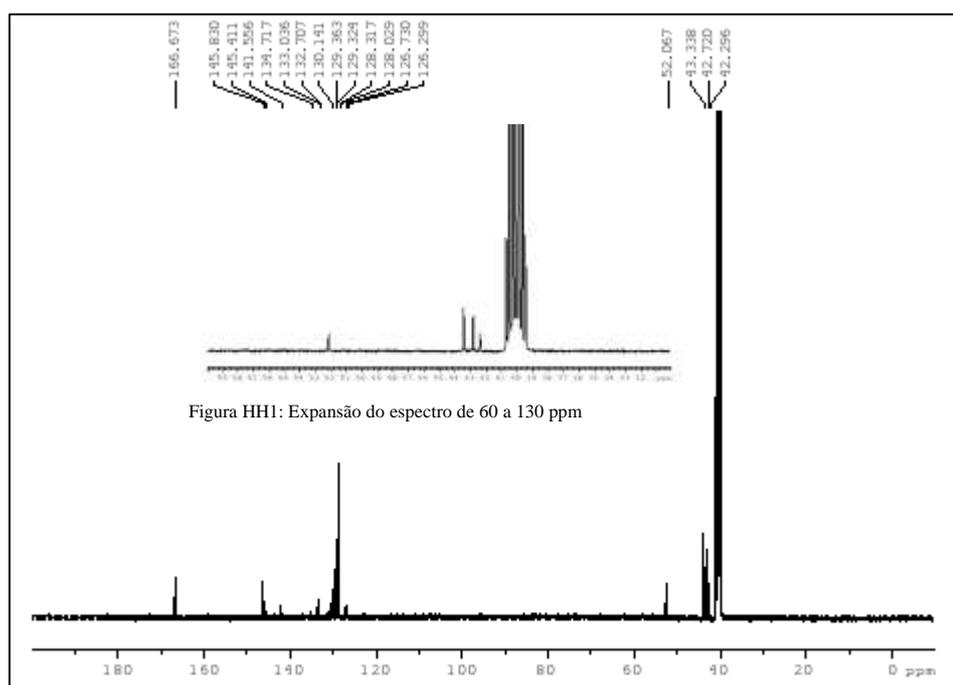
**ANEXO HH: ESPECTRO DE RMN DETP-135 ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 100 MHz) DA AMOSTRA 22**



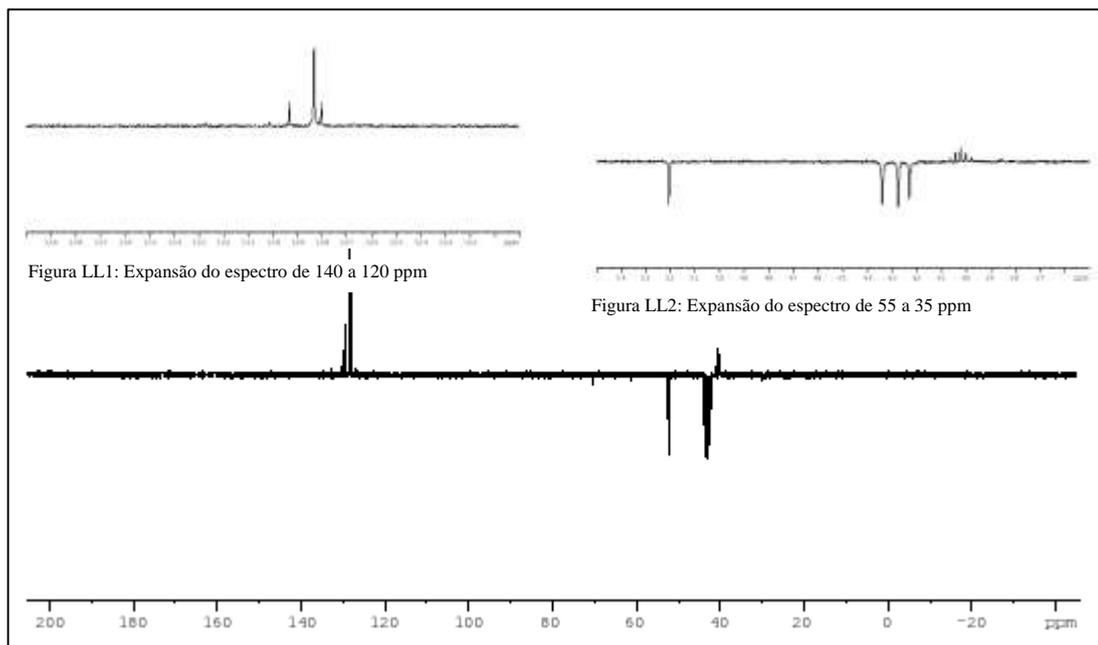
**ANEXO II: ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 400 MHz) DO COMPOSTO 5a – AMOSTRA 24**



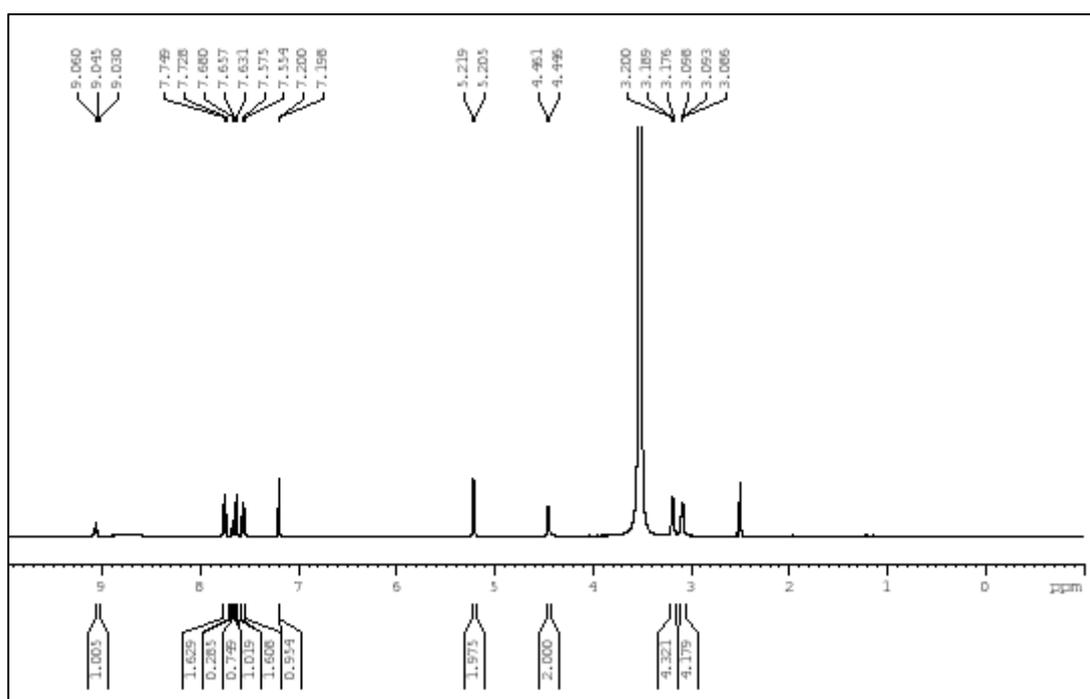
**ANEXO JJ: ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 100 MHz) DO COMPOSTO 5a – AMOSTRA 24**



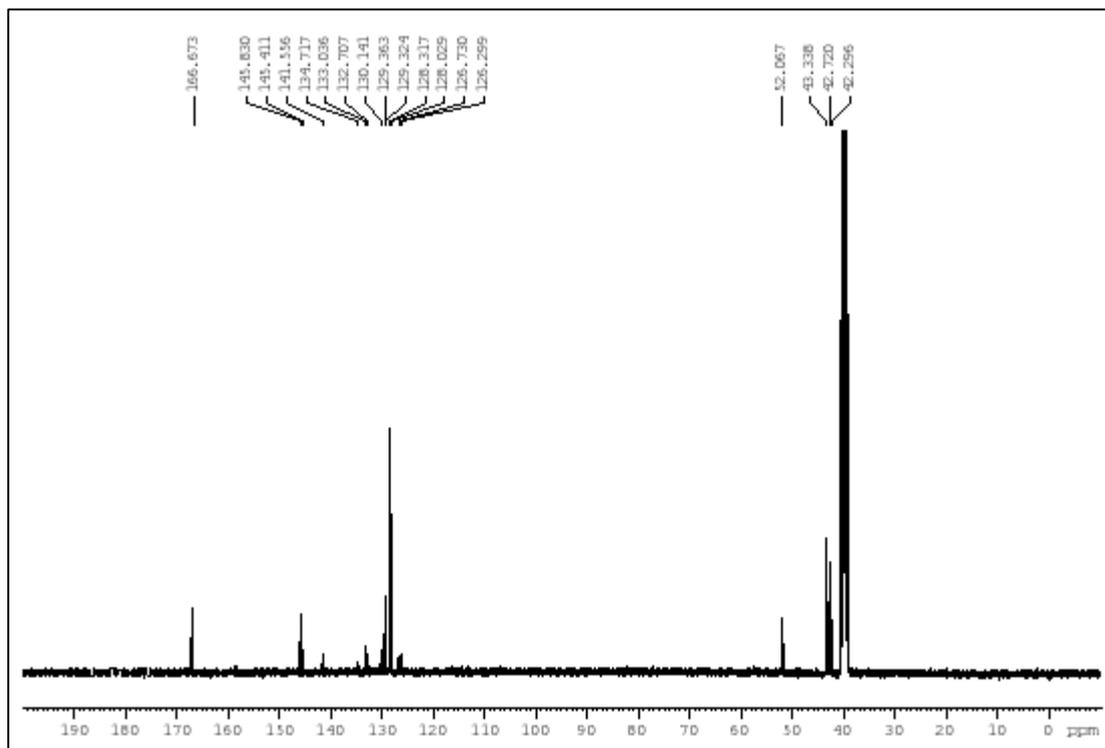
**ANEXO LL: ESPECTRO DE RMN DEPT-135 ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 100 MHz) DO COMPOSTO 5a – AMOSTRA 24**



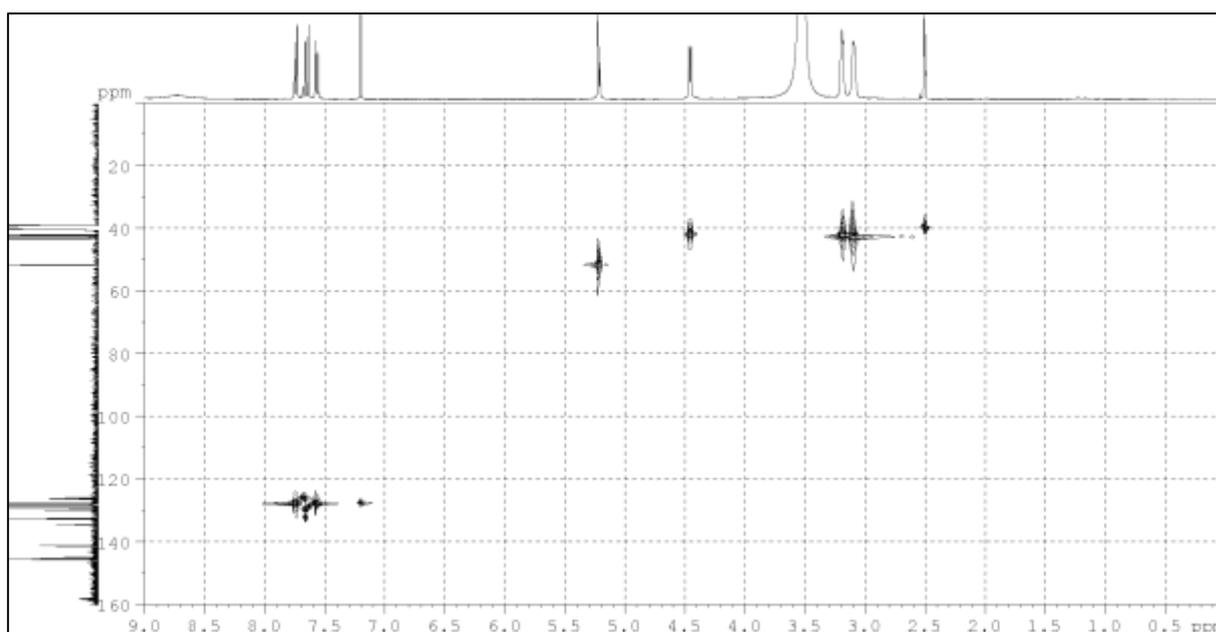
**ANEXO MM: ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 100 MHz) DO COMPOSTO 5a – AMOSTRA 25**



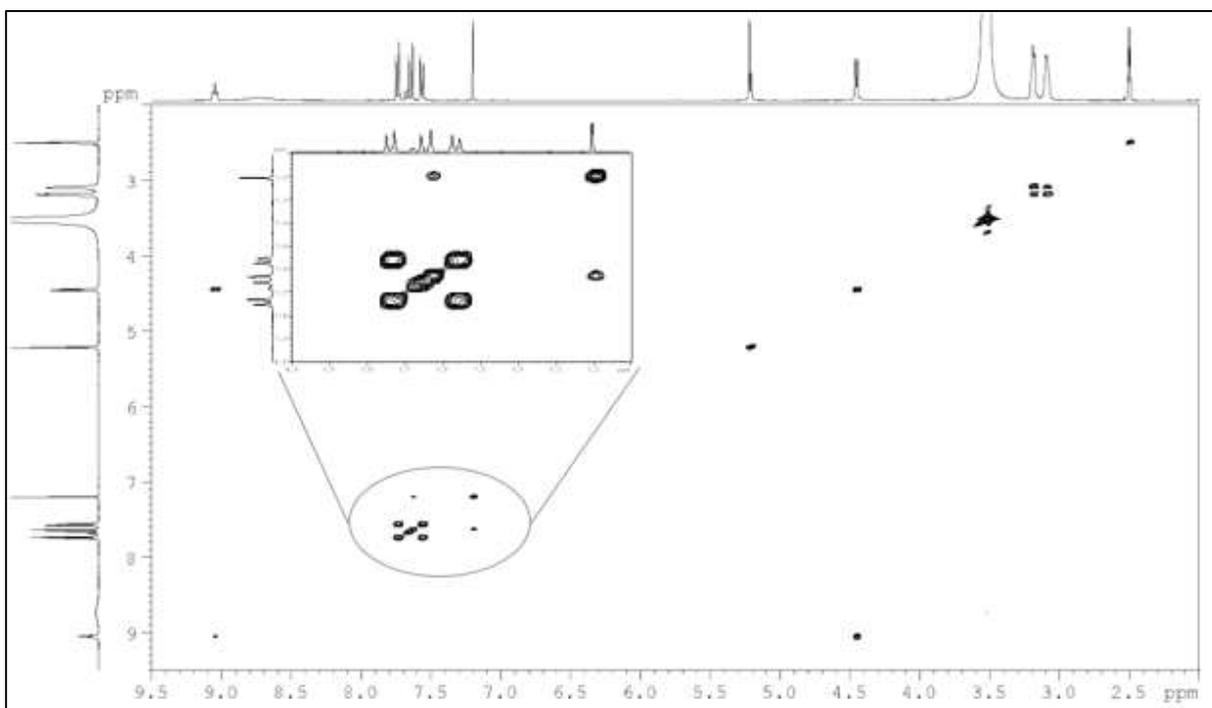
**ANEXO NN: ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 100 MHz) DO COMPOSTO 5a – AMOSTRA 25**



**ANEXO OO: ESPECTRO DE RMN BIDIMENSIONAL – HSQC- ( $\delta$ ; DMSO- $d_6$ ; 100 MHz) AMOSTRA 25**



**ANEXO PP: ESPECTRO DE RMN BIDIMENSIONAL – COSY- ( $\delta$ ; DMSO-d<sub>6</sub>; 100 MHz) AMOSTRA 25**



**ANEXO QQ: ESPECTRO DE RMN BIDIMENSIONAL – HMBC- ( $\delta$ ; DMSO-d<sub>6</sub>; 100 MHz) AMOSTRA 25**

