



Universidade Federal de Ouro Preto

Escola de Farmácia



Igor Matheus de Melo

**SÍNTESE DE ANÁLOGOS DO BENZNIDAZOL E AVALIAÇÃO DE  
SUA ATIVIDADE ANTI-*Trypanosoma cruzi***

OURO PRETO

2024

Igor Matheus de Melo

**SÍNTESE DE ANÁLOGOS DO BENZNIDAZOL E AVALIAÇÃO DE  
SUA ATIVIDADE ANTI-*Trypanosoma cruzi***

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. Thiago Belarmino de Souza.

OURO PRETO

2024



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Igor Matheus de Melo**

Síntese de análogos do Benznidazol e avaliação de sua atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

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

Aprovada em 11 de Outubro de 2024

### Membros da banca

Dr. Thiago Belarmino de Souza - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Dra. Rute Cunha Figueiredo - (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Dr. Cleydson Finotti Cordeiro - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Thiago Belarmino de Souza, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 18/10/2024



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Belarmino de Souza, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 18/10/2024, às 10:08, 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 **0797090** e o código CRC **DC2A1222**.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por iluminar meu caminho e me proteger em toda a minha jornada até aqui.

Ao meu pai, Júlio, e à minha mãe, Fabiana, pelo apoio que me foi dado, pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim.

À minha irmã, Gabriela, pelos conselhos e pela amizade.

Aos meus amigos Fabricio, Letícia, Gabriela e Mateus Alapone, por estarem ao meu lado nessa rotina desgastante da graduação e por terem compartilhado momentos difíceis e momentos felizes durante todo esse tempo.

Ao prof. Thiago Belarmino, pela amizade, pelos ensinamentos e pela confiança durante esse período de iniciação científica. A execução do seu trabalho com excelência e empenho sempre será uma referência para mim.

A todos os integrantes da família Távola Redonda pelos bons momentos que passamos juntos, pela amizade e compreensão.

Aos professores Glenda, Saulo, Celinho e Thiago pelo grande trabalho realizado na pesquisa, ensino e extensão.

Aos integrantes e ex-integrantes do LQMB pelos momentos felizes e pela ajuda quando precisei, em especial Mariana, Rafael, Augusto, Breno, Gabrielly, Rubia, Adriana Cotta, Aline, Vinicius Peret, Vivian.

Aos técnicos Hygor Mezdri, Amanda Quaresma e Quênia, por realizarem com empenho suas atribuições, que são essenciais para a pesquisa.

À FAPEMIG (APQ-00490-22; RED-00110-23), ao CNPq (405032/2021-8) e à PROPPI-UFOP, pela concessão de bolsas de iniciação científica e recursos financeiros.

*“A Ship in Harbor Is Safe, But that Is Not What Ships Are Built For”*

*John A. Shedd*

## RESUMO

A doença de Chagas é uma doença tropical que tem como agente causador o *Trypanosoma cruzi*. Os dois fármacos disponíveis para o tratamento da doença são benznidazol e nifurtimox, porém ambos apresentam problemas relacionados à toxicidade e resistência. Além disso, o panorama reduzido de pesquisas com intuito de descoberta de um novo tratamento faz com que essa doença seja classificada como negligenciada. Por outro lado, diversos grupos de pesquisa têm descrito o eugenol como um potente protótipo contra formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. Tendo em vista, esses aspectos, o presente estudo visou a síntese de novos análogos do benznidazol, derivados do eugenol, na forma de híbridos moleculares. Dez substâncias inéditas, análogas ao benznidazol e propostas nesse trabalho foram obtidas, purificadas e devidamente caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho e de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os produtos obtidos foram inicialmente avaliados contra formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Sua citotoxicidade foi investigada contra células Vero e H9C2 saudáveis. Três híbridos (**8**, **10** e **15**) apresentaram atividade contra forma epimastigotas, e o mais promissor foi o derivado nitrado do eugenol **8** ( $\text{CI}_{50}$ : 24,7  $\mu\text{M}$ ), que apresentou potencial semelhante ao benznidazol ( $\text{CI}_{50}$ : 29,9  $\mu\text{M}$ ). As substâncias **8**, **10** e **15** foram então avaliadas contra as formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*, como resultado, o derivado **8** foi o mais potente contra as formas tripomastigota ( $\text{CI}_{50}$ : 1,8  $\mu\text{M}$ ) e amastigota ( $\text{CI}_{50}$  : 1,6  $\mu\text{M}$ ), com índices de seletividade promissores, considerando ambas as células saudáveis avaliadas. Portanto, neste trabalho foram obtidas substâncias inéditas com atividade biológica contra formas evolutivas do *tripanossoma cruzi*.

Palavras-chave: Eugenol, benznidazol, doença de Chagas, hibridização molecular, fármacos.

## ABSTRACT

Chagas disease is a tropical disease caused by the *Trypanosoma cruzi* parasite. The two drugs available for its treatment are benznidazole and nifurtimox; however, both present issues related to toxicity and resistance. Furthermore, the limited scope of research aimed at discovering new treatments contributes to this disease being classified as neglected. On the other hand, several research groups have described eugenol as a potent prototype against evolutionary forms of *Trypanosoma cruzi*. Considering these aspects, the present study aimed to synthesize new benznidazole analogs, derived from eugenol, in the form of molecular hybrids. Ten novel substances, analogous to benznidazole and proposed in this work, were obtained, purified, and duly characterized by infrared spectroscopy and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. The obtained products were initially evaluated against epimastigote, trypomastigote, and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Their cytotoxicity was investigated against healthy Vero and H9C2 cells. Three hybrids (8, 10, and 15) showed activity against epimastigote forms, and the most promising one was the nitrated derivative of eugenol 8 ( $\text{IC}_{50}$ : 24.7  $\mu\text{M}$ ), which presented a potential similar to benznidazole ( $\text{IC}_{50}$ : 29.9  $\mu\text{M}$ ). Compounds 8, 10, and 15 were then evaluated against trypomastigote and intracellular amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. As a result, derivative 8 was the most potent against trypomastigote ( $\text{IC}_{50}$ : 1.8  $\mu\text{M}$ ) and amastigote ( $\text{IC}_{50}$ : 1.6  $\mu\text{M}$ ) forms, with promising selectivity indices, considering both healthy cell lines evaluated. Therefore, in this study, novel substances with biological activity against evolutionary forms of *Trypanosoma cruzi* were obtained.

Keywords: Eugenol, benznidazole, Chagas disease, molecular hybridization, drugs.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Estruturas químicas dos produtos <b>7-16</b> e atividade tripanocida contra as formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	46
<b>Tabela 2:</b> Atividade das substâncias <b>8, 9 e 15</b> contra as formas tripomastigotas e amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e índices de seletividade .....	47
<b>Tabela 3:</b> Toxicidade do derivado <b>8</b> contra células cardíacas H9c2 de ratos neonatos e índice de seletividade (IS).....	48

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	14
<b>Figura 2:</b> Mapa da doença de Chagas.....	15
<b>Figura 3:</b> Estruturas químicas do benznidazol e nifurtimox.....	17
<b>Figura 4:</b> Mecanismo de ação proposto para o Benznidazol .....	17
<b>Figura 5:</b> Derivados de eugenol ativos contra <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	19
<b>Figura 6:</b> Estrutura geral dos novos análogos estruturais do benznidazol propostos .....	20
<b>Figura 7:</b> Síntese dos híbridos eugenol-benznidazol propostos .....	22
<b>Figura 8:</b> Esquema de retrossíntese das substâncias propostas .....	38
<b>Figura 9:</b> Proposta de mecanismo para formação do eugenol e diidroeugenol orto-nitrados ....	40
<b>Figura 10:</b> Mecanismo proposto para a síntese da cloroacetamida ( <b>6</b> e <b>6'</b> ) .....	41
<b>Figura 11:</b> Proposta de mecanismo para a síntese dos produtos finais ( <b>7–16</b> ) .....	43

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>11</b>
2.1 Doenças tropicais negligenciadas.....	11
2.2 Doença de Chagas.....	12
2.3 Tratamento da doença de chagas.....	16
2.4 A Química Medicinal e a obtenção de novos derivados do eugenol.....	18
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 Procedimentos gerais.....	21
4.2 Síntese das substâncias propostas.....	21
4.2.1 Procedimento geral para a síntese dos derivados nitrados do eugenol (3) e di-hidroeugenol (4).....	22
4.2.2 Procedimento geral para a obtenção das cloroacetamidas (6 e 6').....	23
4.2.3 Procedimento geral para a síntese dos produtos finais de interesse 7-16.....	24
4.2.3.1 Dados de caracterização 2-(4-alil-2-metoxifenoxi)- <i>N</i> -benzilacetamida (7).....	25
4.2.3.2 Dados de caracterização 2-(4-alil-2-metoxi-6-nitrofenoxi)- <i>N</i> benzilacetamida (8)....	26
4.2.3.3 Dados de caracterização 3 <i>N</i> -benzil-2-(2-metoxi-4-propilfenoxi)acetamida (9).....	27
4.2.3.4 Dados de caracterização <i>N</i> -benzil-2-(2-metoxi-6-nitro-4-propilfenoxi) acetamida (10)28	
4.2.3.5 Dados de caracterização 5 <i>N</i> -benzil-2-fenoxiacetamida (11).....	29
4.2.3.6 Dados de caracterização <i>N</i> -benzil-2-(2-nitrofenoxi) acetamida (12).....	30
4.2.3.7 Dados de caracterização <i>N</i> -benzil-2-(2-metoxifenoxi) acetamida (13).....	31
4.2.3.8 Dados de caracterização <i>N</i> -benzil-2-(4-formil-2-metoxifenoxi)acetamida (14).....	32
4.2.3.9 Dados de caracterização 2-(4-alil-2-metoxi-6-nitrofenoxi)- <i>N</i> -fenilacetamida (15)....	33
4.2.3.10 Dados de caracterização 2-(4-alil-2-methoxifenoxi)- <i>N</i> -fenilacetamida (16).....	34
4.3 Avaliação da atividade tripanocida das substâncias sintetizadas.....	34
4.3.1 Formas epimastigotas.....	35
4.3.2 Formas tripomastigotas.....	35
4.3.3 Formas amastigotas.....	36
4.3.4 Citotoxicidade contra células Vero e H9c2.....	36
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
5.1 Planejamento sintético das substâncias propostas.....	37
5.2 Síntese das substâncias planejadas.....	39
5.2.1 Obtenção dos fenóis nitrados (3 e 4).....	39
5.2.2 Síntese da cloroacetamida (6 e 6').....	40

5.2.3 Síntese dos produtos finais (7–16).....	42
5.3 Caracterização química das substâncias sintetizadas .....	43
5.4 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade tripanocida dos produtos 7-16 e relações estrutura-atividade .....	45
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>55</b>
Espectros na região do infravermelho e de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ das substâncias .....	55
Substância 7:.....	55
Substância 8:.....	57
Substância 9:.....	59
Substância 10:.....	61
Substância 11:.....	63
Substância 12:.....	65
Substância 13:.....	67
Substância 14:.....	69
Substância 15:.....	71
Substância 16:.....	73

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana é uma doença potencialmente fatal causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, com cerca de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo. A doença possui áreas endêmicas em países do continente americano, sendo formada por duas fases distintas: a fase aguda (FA) e a fase crônica (FC) (MEDEIROS CA et al., 2022).

A fase aguda, na maioria dos casos é assintomática, sendo marcada por uma alta parasitemia. Nessa fase ocorre a detecção do *Trypanosoma cruzi* na corrente sanguínea. É estimado que apenas 1 a 2% dos casos tenha diagnóstico nessa fase. Por outro lado, a fase crônica da doença é determinada pelo período em que os seres humanos que resistiram à fase aguda, se mantêm assintomáticos por um período maior, entre 10 e 30 anos. Durante essa fase, exames sorológicos e/ou parasitológicos comprovam que há presença da infecção, entretanto sinais ou sintomas clínicos não se manifestam. Em alguns casos, após a fase aguda da doença, os pacientes podem desenvolver alguns sintomas que se relacionam com sistema cardíaco e digestivo, dando o início da fase crônica da doença (LIMA et al., 2024).

O custo exorbitante associado à pesquisa que envolve o desenvolvimento de fármacos, faz com que se distancie da realidade a criação de novos medicamentos para doenças parasitárias, em especial as que são consideradas negligenciadas. Nesse sentido, existe apenas dois fármacos que estão disponíveis para tratar a doença de Chagas: benznidazol e nifurtimox, porém, ambos enfrentam problemas de toxicidade e resistência crescente do parasita, o que compromete sua eficácia (SILVA et al., 2014).

Levando em consideração a busca de novos candidatos a fármacos que sejam capazes de combater o *trypanossoma cruzi* e consiga ser úteis para o tratamento da doença de Chagas. Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado no desenvolvimento de novas substâncias derivadas do eugenol, que é um alilfenol com inúmeras propriedades biológicas comprovadas, com objetivo de se obter substâncias inovadoras que sejam ativas e atóxicas para o tratamento da doença de Chagas. Dessa forma, o fato do nosso grupo de pesquisa apresentar resultados promissores nos últimos anos envolvendo a manipulação química do eugenol e análogos, planejamos aqui, híbridos moleculares entre

o eugenol e o benznidazol, que é o principal fármaco disponível atualmente para o tratamento da doença de Chagas.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Doenças tropicais negligenciadas**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e os Médicos Sem Fronteiras classificam as doenças em três categorias: globais (presentes em todo o mundo), negligenciadas (mais comuns em países em desenvolvimento) e mais negligenciadas (restritas aos países em desenvolvimento). A classificação que foi apresentada é um avanço no termo “doenças negligenciadas”. Mudando o contexto histórico de que as doenças são fruto do ambiente geográfico e exaltando a importância de buscar o enfrentamento dessas enfermidades que afetam principalmente as populações marginalizadas (MOREL et al., 2006).

Os tratamentos disponíveis para as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são escassos, não são adequados, tem baixa eficácia, efeitos colaterais que na maioria dos casos são graves e apresentam resistência pelo parasito. Essa condição advém do baixo investimento em desenvolvimento de novas opções terapêuticas e como consequência uma baixa de soluções mais seguras e eficientes para as populações afetadas (NWAKA et al., 2009).

Entre 850 produtos terapêuticos que teve seu lançamento entre 2000 e 2011, apenas 37 (4%) foram para o tratamento de doenças negligenciadas, do qual 25 tiveram problemas na formulação. Além disso, foram lançadas oito vacinas ou produtos biológicos. É importante mencionar que 4 novas entidades químicas foram aprovadas para tais doenças (três voltadas para a malária e uma para doenças diarreicas), isso representa um número baixo, cerca de 1%, dos 336 novos medicamentos aprovados durante o período que foi analisado. Dos 148.445 ensaios clínicos que foram registrados até dezembro de 2011, apenas 2016 (1%) eram direcionados par as doenças negligenciadas (PEDRIQUE et al., 2013).

Outra informação importante dentro deste contexto é que uma grande parte da população que é portadora de DTNs vive em países subdesenvolvidos ou em

desenvolvimento, local onde predominam doenças infecciosas e condições congênitas em recém-nascidos. O presente cenário contrasta com o desenvolvimento de novas opções terapêuticas, uma vez que a maioria está voltada para o tratar doenças que acometem o sistema nervoso central (15,8% dos novos fármacos aprovados entre 1975 e 2011), sistema cardiovasculares (12,0%) e câncer (11,1%). É perceptível que grande parte dos pacientes que são acometidos pelas DTNs geralmente possuem renda baixa e o resultado observado é que as grandes indústrias farmacêuticas mostram um baixo interesse no controle dessas enfermidades (BARRENHO et al., 2019).

Apesar de todos os impasses, é perceptível um avanço na luta contra as DTNs, porém o caminho para erradicação dessas doenças ainda é longo e desafiador. As organizações internacionais, governos e parceiros têm tido resultados promissores na eliminação de DTNs em vários países. Assim sendo, é importante a continuidade nos esforços atuais e a superação de desafios persistentes, incluindo lacunas em infraestrutura de saúde, recursos financeiros limitados e a necessidade da conscientização e envolvimento comunitário (WHO, 2023).

## 2.2 Doença de Chagas

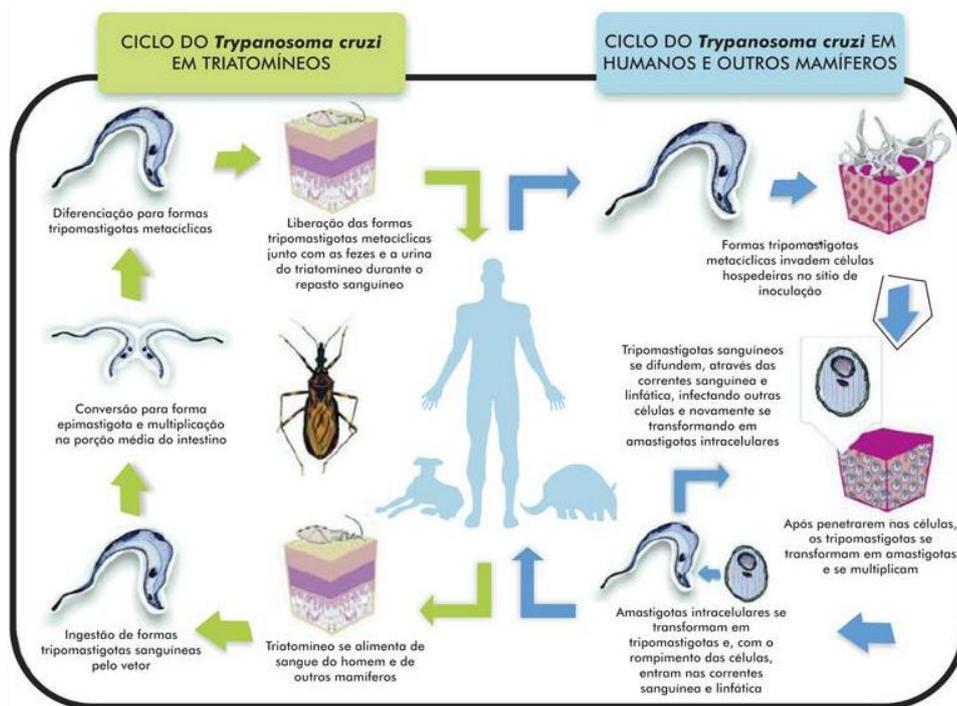
A doença de Chagas é uma enfermidade tropical causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que afeta milhões de pessoas, principalmente na América Latina. A descoberta desta doença ocorreu em 17 de dezembro de 1908, quando o médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas identificou pela primeira vez o protozoário causador da doença, que ele nomeou de *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao seu mentor, Oswaldo Cruz. Além disso, o Carlos Chagas identificou o inseto barbeiro como o agente transmissor da doença. Suas descobertas em 1909 marcaram um momento crucial na história da medicina tropical (KAWAGUCHI et al., 2019).

A principal via de transmissão do protozoário para humanos e outros mamíferos ocorre através da contaminação da pele e das mucosas com fezes infectadas de insetos hematófagos pertencentes à subfamília *Triatominae* (*Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae*) (GIL et al., 2021). Os triatomíneos têm uma baixa capacidade de se deslocar e um ciclo biológico prolongado, o que ocasiona em uma reposição lenta de suas populações. Além disso, todos os estágios do desenvolvimento desses insetos ocorrem no

mesmo habitat, o que não é comum nas outras espécies (SILVEIRA et al., 2011). Esses insetos, comumente referidos como 'triatomíneos', são conhecidos no Brasil pelo nome popular de 'barbeiros'. Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (2021), cerca de 7 milhões de pessoas nas américas estão infectados pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Na América Latina, surgem aproximadamente 30 mil novos casos por ano, com uma taxa de mortalidade anual de cerca de 14 mil pessoas. Além disso, cerca de 70 milhões vivem em regiões onde o risco de infecção é elevado. A transmissão ao ser humano pode ocorrer de várias formas: através de vetores, quando o triatomíneo (barbeiro) defeca sobre a pele ou mucosa lesionada durante a alimentação; por transfusões de sangue ou transplantes de órgãos de doadores infectados; de mãe para filho durante a gestação, conhecida como transmissão vertical ou congênita; por acidentes em laboratórios e por ingestão oral (DIAS; NETO; LUNA, 2011).

Somente mamíferos podem ser infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, pois o parasita não consegue se desenvolver no sangue de aves, répteis ou anfíbios, embora esses animais possam servir como fonte de alimento para os barbeiros. O ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* começa quando o parasita, na forma tripomastigota metacíclica, é liberado nas fezes do inseto. Ao entrar em contato com a corrente sanguínea humana, ele se espalha nos tecidos, especialmente no coração, pulmão e intestino, se diferenciando na forma amastigota. Logo em seguida ocorre a replicação, até se converterem novamente em tripomastigotas, rompendo a célula hospedeira e voltando à circulação sanguínea. Já no hospedeiro invertebrado, quando o triatomíneo ingere o sangue infectado de mamíferos, adquire tanto formas tripomastigotas sanguíneas quanto algumas amastigotas. No intestino médio do inseto, essas formas se diferenciam em epimastigotas, o que acarreta o aumento da parasitemia. As epimastigotas, ao chegarem à última porção do intestino, aderem à parede do tubo digestivo, quando se transformam em tripomastigotas metacíclicas, no processo de metaciclogênese.

**Figura 1:** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*



Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz.

As manifestações dessa doença podem ocorrer em três estágios: a fase aguda, a fase crônica sem sintomas e a fase crônica com sintomas. A fase aguda dura de 6 a 8 semanas e é caracterizada pela presença de tripomastigotas no sangue, febre prolongada, cefaleia, fraqueza intensa e inchaço na face e nas pernas; as alterações fisiológicas incluem edema, linfadenopatia, anemia, hepatoesplenomegalia, anormalidades no eletrocardiograma (ECG), comprometimento do sistema nervoso central e risco de morte (NGUYEN et al., 2020).

A fase indeterminada, fase assintomática da fase crônica, é caracterizada por pacientes com sorologia positiva para *Trypanosoma cruzi*, podendo durar até 40 anos. Alguns pacientes, cerca de 30-40%, evoluem para a forma cardíaca. Os demais permanecem em fase assintomática, exceto em casos de imunossupressão (reativação da fase crônica). Se houver progressão, os sintomas observados são: febre, anormalidades



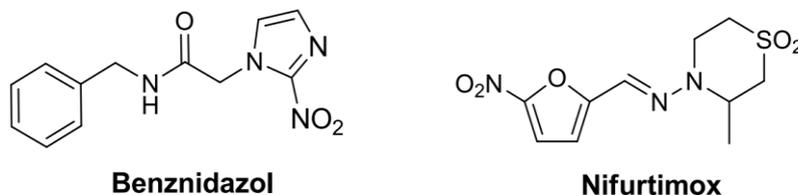
Em relação à epidemiologia da Doença de Chagas no Brasil, estima-se que entre 1,9 e 4,6 milhões de pessoas estão infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, representando 1,0% a 2,4% da população. A DC é uma das quatro principais causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias no país, com uma média de 4.000 óbitos anuais nos últimos 10 anos. Considerando o período de 2023 a 2024, foram identificados 5.460 casos da doença em 710 municípios. A maioria dos casos (63%) ocorreu em áreas urbanas, com 39% em cidades de médio e grande porte, refletindo a transição demográfica da doença devido à migração populacional. Em 19% dos casos, o local de notificação era diferente do de residência, o que sugere dificuldades no acesso ao diagnóstico e acompanhamento em municípios de origem, com o tratamento concentrado em locais com maior infraestrutura de saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

Com a criação do Fundo de Investimento Social (FINSOCIAL) em 1983, foi possível, por meio de programas de controle vetorial e a triagem sorológica nos bancos de sangue reduzir significativamente as transmissões vetorial e transfusional (SILVEIRA, 2011). No entanto, foi possível observar um aumento na transmissão oral no Brasil, com a maioria dos casos ocorrendo na região amazônica, que se deve ao consumo de alimentos como açaí e caldo de cana contaminados com *Trypanosoma cruzi*. É válido ressaltar que apesar da certificação da OPAS em 2006, a transmissão vetorial ainda está presente (PACHECO et al., 2021).

### **2.3 Tratamento da doença de chagas**

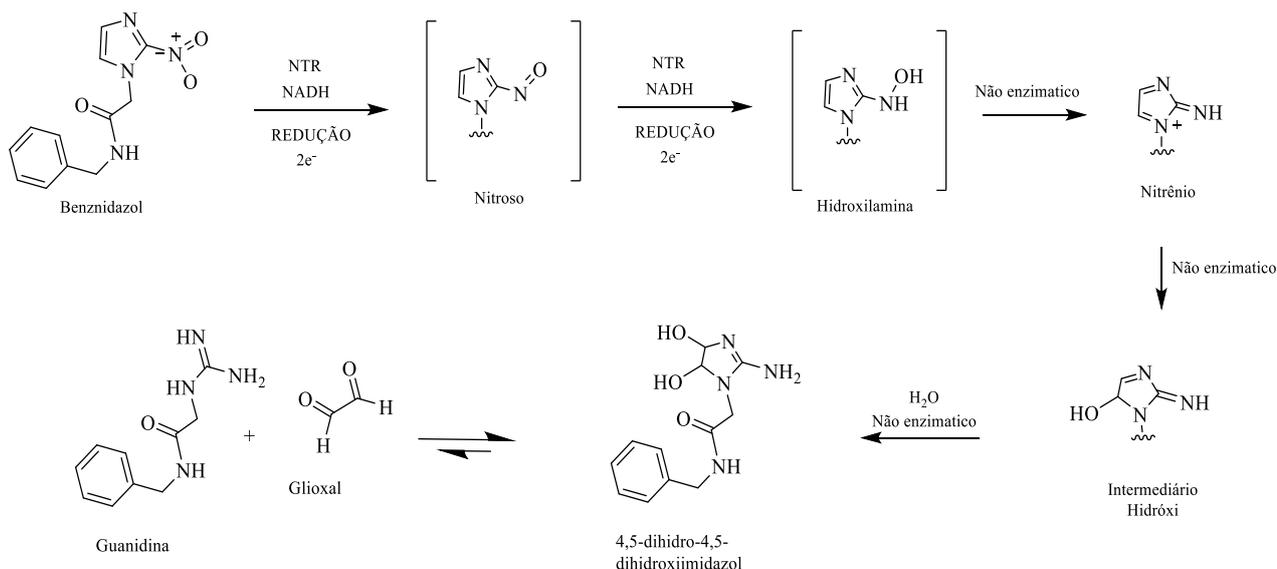
Atualmente, apenas dois fármacos estão disponíveis clinicamente para o tratamento da doença de Chagas: o benznidazol e o nifurtimox, cujas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 3. Estes dois fármacos são derivados nitro-heterocíclicos com elevada toxicidade, sendo o benznidazol considerado o fármaco de primeira escolha, enquanto o nifurtimox é recomendado apenas em casos de resistência natural e/ou efeitos colaterais graves associados ao benznidazol (ALDASORO et al., 2018; CRESPILO et al., 2018).

**Figura 3:** Estruturas químicas do benznidazol e nifurtimox.



O principal mecanismo de ação tripanocida do benznidazol, representado na figura 4, consiste na formação de metabólitos tóxicos ao parasita, pela ação inicial de enzimas nitroredutases presentes no *Trypanosoma cruzi*. A redução do grupo nitro presente no fármaco leva à formação de um intermediário nitroso, que é convertido em uma hidroxilamina. Este último metabólito, por sua vez, é convertido, após várias modificações químicas, em um grupo glioxal, um dialdeído altamente reativo, capaz de formar adutos com proteínas e ácidos nucleicos do parasita. (KRATZ et al.,2018).

**Figura 4:** Mecanismo de ação proposto para o Benznidazol



Fonte: Adaptado de Patterson e Willie, 2014.

Além de problemas de toxicidade, estes fármacos vêm enfrentando limitações crescentes relacionadas à resistência por parte do parasita. A resistência natural do *Trypanosoma cruzi* aos referidos fármacos é sugerida como um fator para a baixa taxa de eficácia e de cura detectadas em pacientes chagásicos, acarretando mais riscos do que benefícios aos mesmos. Além disso, dentre os efeitos adversos mais graves associados ao benznidazol, destaca-se a depressão da medula óssea e polineuropatia periférica que, em muitos casos, pode levar à interrupção do tratamento (CRESPILLO et al.,2018; KRATZ et al.,2018).

#### **2.4 A Química Medicinal e a obtenção de novos derivados do eugenol**

Para WERMUTH (2008), a Química Medicinal é uma disciplina que foca na criação e desenvolvimento de substâncias bioativas com potencial terapêutico. Ela é responsável por determinar como a estrutura molecular dos compostos influencia sua eficácia e outras características farmacológicas, abordando a relação entre a estrutura química e a atividade biológica (REA).

Nas últimas décadas, a Química Medicinal teve avanços notáveis com o aparecimento de novas doenças e a paralela introdução de medicamentos inovadores. As melhorias nas áreas da Química Orgânica, Biologia Molecular e Estrutural, Bioinformática e Biotecnologia permitiram um entendimento mais aprofundado dos processos patológicos e a criação de fármacos mais seguros e eficazes (AMARAL et al.,2017).

No contexto de descoberta de novos medicamentos, a Química Medicinal é essencial para explorar e modificar o espaço químico, a fim de identificar e desenvolver moléculas promissoras. Para otimizar essas moléculas e garantir sua interação eficaz com alvos moleculares, como enzimas ou receptores, são empregadas diversas estratégias, que incluem técnicas de modificação molecular, como a homologação linear e ramificada, a introdução de grupos funcionais específicos, a hibridação molecular, o bioisosterismo, dentre outras (VERLI et al., 2005).

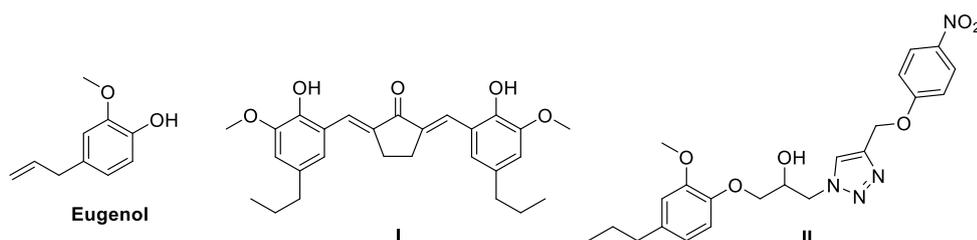
Levando em consideração as estratégias utilizadas na Química Medicinal, nosso grupo de pesquisa tem focado no desenvolvimento de novas substâncias derivadas do

eugenol, uma substância natural bioativa. Dentre as atividades biológicas já descritas para o eugenol, destaca-se a sua atividade tripanocida (GONÇALVES-SANTOS et al.2023).

Dentre as substâncias derivadas do eugenol com potencial tripanocida, podemos citar o derivado di-hidroeugenol  $\alpha,\beta$ -insaturado (composto **I**, Figura 4) que foi ativo contra formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* a 5,2 nM, sendo 700 vezes mais potente que o benznidazol (REIS et al., 2022).

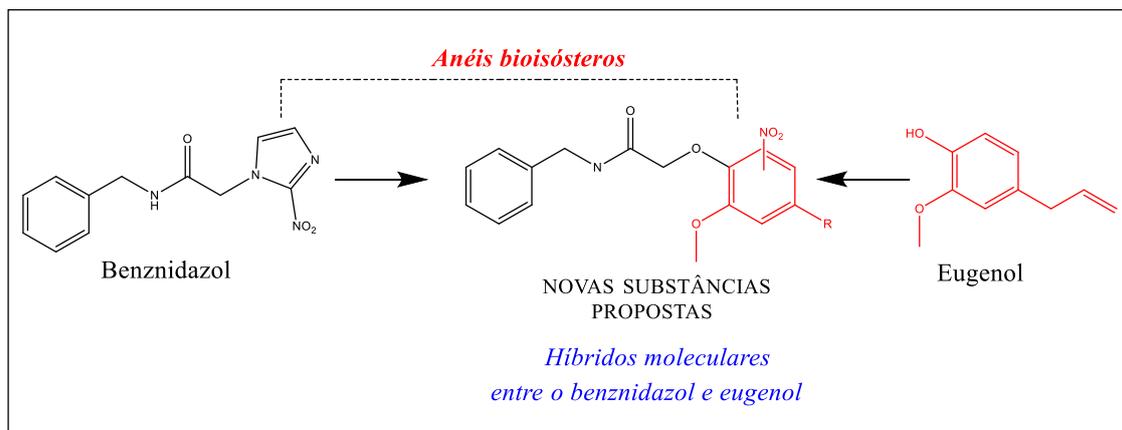
Outra substância descoberta que também podemos destacar é o 1,2,3-triazol derivado do di-hidroeugenol (composto **II**, Figura 4), ativo a 7,3  $\mu$ M contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, com um índice de seletividade muito interessante ( $>77$ ), considerando células H9c2 saudáveis. Uma redução na parasitemia foi observada entre os animais tratados com este triazol, em estudo *in vivo*, mostrando uma redução de 99,4% no pico de parasitemia (REIS et al., 2023).

**Figura 5:** Derivados de eugenol ativos contra *Trypanosoma cruzi*



Considerando o potencial tripanocida dos derivados do eugenol recentemente descobertos por nosso grupo (compostos **I-III** apresentados na Figura 5), foi proposta aqui a síntese e avaliação biológica de novos derivados do eugenol e fenóis correlatos, agora com um padrão estrutural análogo ao benznidazol (Figura 6). As substâncias planejadas possuem em uma única estrutura o núcleo proveniente do eugenol (assim como outros análogos estruturais: di-hidroeugenol, fenol, guaicol, vanilina) além da unidade benzil-acetamida presente no benznidazol, de forma que as novas substâncias possam representar híbridos moleculares entre as duas unidades potencialmente ativas contra o *Trypanosoma cruzi*.

**Figura 6:** Estrutura geral dos novos análogos estruturais do benznidazol propostos



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Síntese, caracterização química e a avaliação das atividades tripanocida e citotóxica de novos híbridos do eugenol e benznidazol.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar, purificar e caracterizar as estruturas químicas de novos híbridos eugenol-benznidazol.
- Avaliar a atividade tripanocida das substâncias sintetizadas *in vitro*, em colaboração com o Prof. Dr. Ivo Santana Caldas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).
- Analisar a citotoxicidade das substâncias em células normais e estabelecer o índice de seletividade das substâncias ativas, também em colaboração com o Prof. Dr. Ivo Santana Caldas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Procedimentos gerais

As faixas de fusão das substâncias sintetizadas foram determinadas no Laboratório de Química Medicinal e Bioensaios da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP-MG), utilizando o aparelho Reichert Austria.

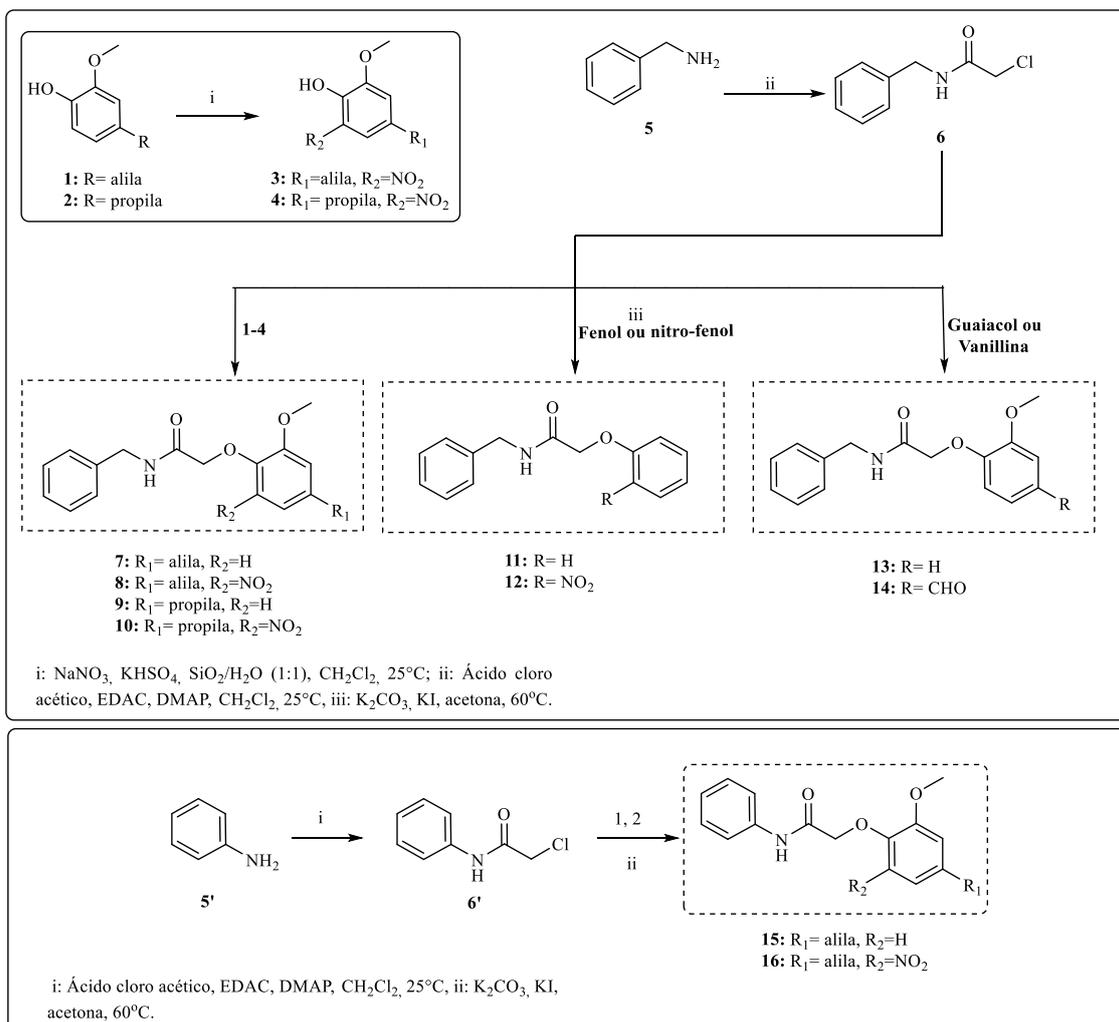
As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Moléculas da UFOP-MG, utilizando um espectrômetro Bruker AC-400 MHz. O tetrametilsilano (TMS) foi empregado como padrão interno, e o solvente utilizado foi clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), com os sinais descritos em deslocamento químico ( $\delta$ , ppm).

No Laboratório Multiusuário do departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP-MG), foram realizadas as análises por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando o espectrômetro ABB Bomem MB 3000 FTIR, com dispositivo ATR, na faixa de 650 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

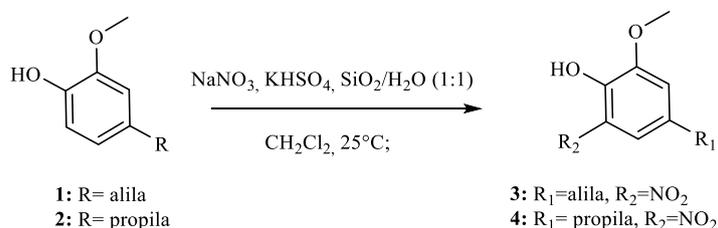
### 4.2 Síntese das substâncias propostas

A síntese das substâncias propostas foi efetuada no Laboratório de Química Medicinal e Bioensaios da UFOP-MG, seguindo a rota sintética ilustrada na Figura 7 a seguir. Para isso, foram utilizadas técnicas tradicionais de química orgânica, bem como adaptações dessas técnicas nas diferentes etapas dos processos de síntese.

**Figura 7: Síntese dos híbridos eugenol-benznidazol propostos**



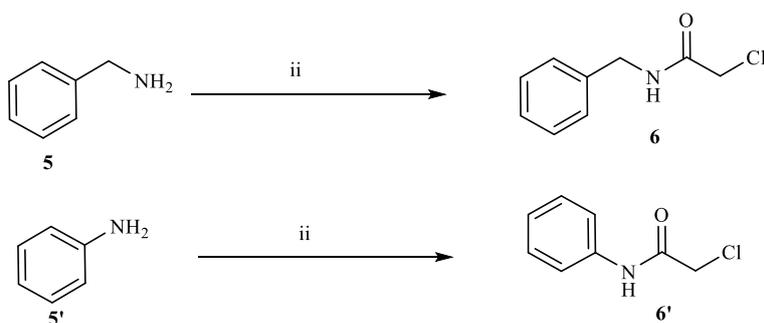
#### 4.2.1 Procedimento geral para a síntese dos derivados nitrados do eugenol (3) e di-hidroeuogenol (4)



Em um balão de fundo redondo contendo 1 equivalente do fenol correspondente (7,9 mmol de **1** e 6,24 mmol de **2**) solubilizados em 15 mL de diclorometano, foram adicionados 1,5 eq. de KHSO<sub>4</sub> (1,625 g para a síntese do derivado **3** e 1,7 g para a síntese

do derivado **4**), 1,5 eq. de  $\text{NaNO}_3$  (0,817 g para obter **3** e 0,558 g para obter **4**) e 3,3 eq. de gel de sílica previamente tratado com água destilada (2,14 g para obter **3** e 1,23 g para obter **4**). A mistura foi agitada magneticamente a  $25^\circ\text{C}$  por 48 horas e o final da reação foi observado por cromatografia em camada delgada (CCD) em gel de sílica (eluente: hexano/acetato de etila 8:2, revelador: iodo). Em seguida, a mistura reacional foi filtrada e lavada com mais 60 mL de diclorometano, e a fração orgânica obtida foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório resultando em um óleo marrom escuro correspondente aos derivados **3** (1,2 g; 72% de rendimento) e **4** (1,02 g; 77% de rendimento), após purificação por cromatografia em coluna de sílica.

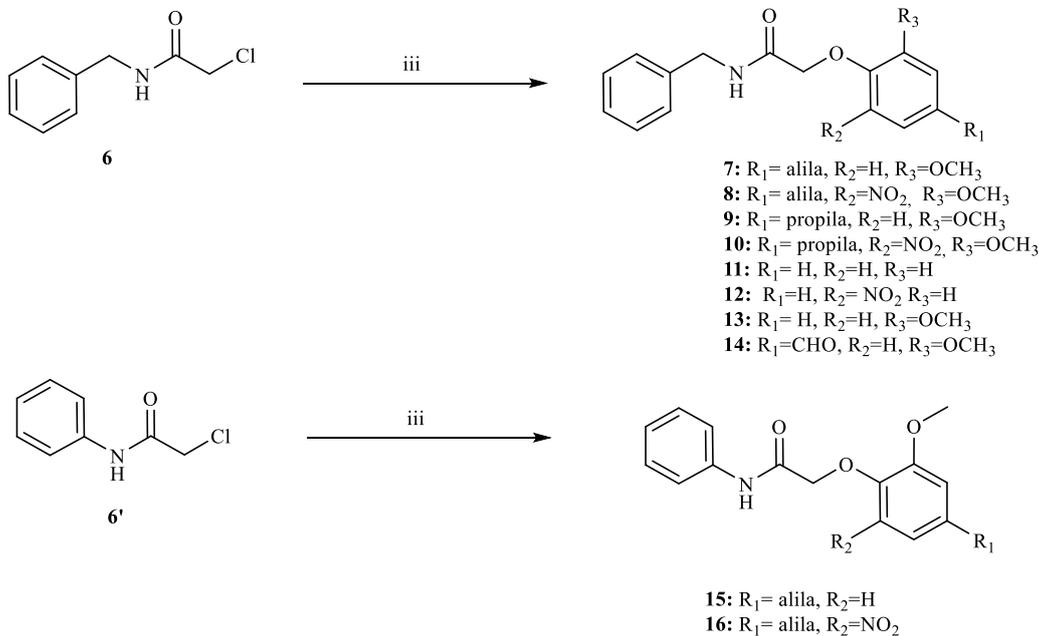
#### 4.2.2 Procedimento geral para a obtenção das cloroacetamidas (**6** e **6'**)



ii: Ácido cloroacético, EDAC, DMAP, 48 h,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $25^\circ\text{C}$

Em um balão de fundo redondo contendo 1,2 equivalente de ácido cloroacético solubilizados em 10 mL de diclorometano, foram adicionados 1,3 equivalentes de cloridrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC). Após a completa solubilização dos reagentes, foi adicionado 1 equivalente de benzilamina **5** (0,170 g) ou anilina **5'** (0,250 g) solubilizados em diclorometano à mistura de reação, seguido pela adição de uma quantidade catalítica de 4-dimetilaminopiridina (DMAP; 20 mg). A reação foi submetida a agitação magnética a  $25^\circ\text{C}$  por 48 horas, quando o término da reação foi observado por CCD (eluentes: hexano/acetato de etila 7:3, revelador: molibdato cérico amoniacal (CAM)). A mistura de reação foi então lavada com solução aquosa de HCl 1M (3 x 25 mL) e água destilada (2 x 50 mL). A fase orgânica resultante foi seca utilizando sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. Foram obtidos 0,200 g do produto **6** (59% de rendimento) e 0,157 g do produto **6'** (31% de rendimento).

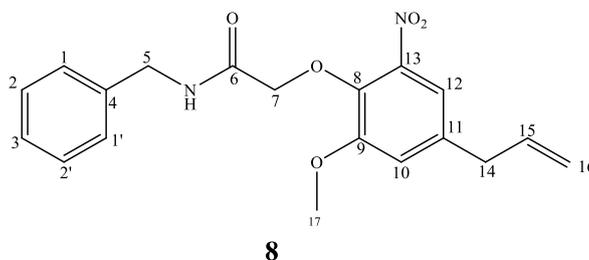
### 4.2.3 Procedimento geral para a síntese dos produtos finais de interesse 7-16



O fenol correspondente (1-4, guaiacol, vanilina, fenol ou 2-nitrofenol; 1 eq.) foi solubilizado em 20 mL de acetona anidra e 2 eq. de carbonato de potássio foram adicionados a esta solução, que em seguida foi submetida a uma atmosfera de nitrogênio por 30 minutos a  $25^\circ C$ , sob agitação magnética. Em seguida, 1 eq. das cloroacetamidas **6** ou **6'**, previamente sintetizadas, foi adicionado à reação, seguido pela adição de uma quantidade catalítica de iodeto de potássio (10 mg). A reação foi mantida sob agitação magnética constante a  $55^\circ C$  por 48 horas. Após a conclusão da reação, observada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila (7/3), revelador: molibdato cérico) a acetona foi removida, o produto bruto foi ressolubilizado em clorofórmio (15 mL) e lavado com solução aquosa de NaOH a 10% (3 x 25 mL) e água destilada (2 x 50 mL). A camada orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotatório. Os produtos brutos foram purificados por cromatografia em coluna usando sílica como fase estacionária.



**4.2.3.2 Dados de caracterização 2-(4-alil-2-metoxi-6-nitrofenoxi)-*N* benzilacetamida (8)**



**Massa obtida:** 21 mg (0,058 mmol; 11%; óleo amarelado)

**Eluente utilizado para a coluna cromatográfica:** hexano/acetato de etila 9:1

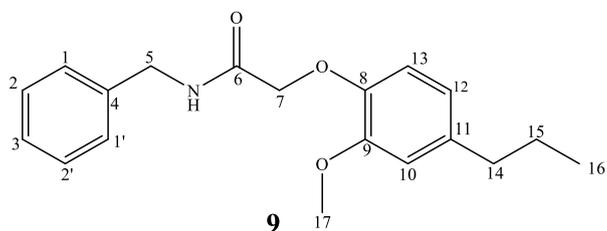
**F.M.:** C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>    **M.M.:** 356,1372 g/mol

**IV-ATR (cm<sup>-1</sup>):** 3396 (N-H), 3064 (sp<sup>2</sup> C-H), 2937,2848 (sp<sup>3</sup> C-H), 1666 (C=O), 1533,1352 (NO<sub>2</sub>), 1267 (C-O-C).

**RMN de <sup>1</sup>H (δ; CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz):** 7,22-7,16 (m; 5H; H-1; H-1'; H-2; H-2' e H-3); 7,04 (d; 1H; <sup>4</sup>J=1,8 Hz; H-10); 6,91 (d; 1H; <sup>4</sup>J=1,3 Hz; H-12); 5,95-5,85 (m; 1H; H-15); 5,19 (dd; 1H; <sup>3</sup>J=10 Hz; <sup>4</sup>J=1,2 Hz; H-16); 5,12 (dd; 1H; <sup>3</sup>J = 18 Hz; <sup>4</sup>J=1,4, Hz; H-16'); 4,78-4,71 (m; 2H; H-5); 3,96- 3,72 (m; 2H; H-7); 3,64 (s; 3H; H-17 ); 3,42 (d, 2H, <sup>3</sup>J=7,6 Hz; H-14).

**RMN de <sup>13</sup>C (δ; CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz):** 172,9 (1C; C-6); 156,5 (1C; C-9); 148,6 (1C; C-13); 143,8 (1C; C-8); 134,9 (1C; C-4); 134,6 (1C; C-15); 129,7 (1C; C-11); 128,2 (2C; C-2 e C-2'); 128,0 (3C; C-1, C-1' e C-3); 118,2 (1C; C-10); 116,5 (1C; C-12); 116,1 (C-1; C-16); 60,7 (1C; C-2); 56,4 (1C; C-17); 52,2 (1C; C-5); 39,8 (1C; C-14).

#### 4.2.3.3 Dados de caracterização 3 *N*-benzil-2-(2-metoxi-4-propilfenoxi)acetamida (9)



**Massa obtida:** 147 mg (0,469 mmol; 84%; sólido incolor)

**Eluente utilizado para a coluna cromatográfica:** hexano/acetato de etila 98:2

**F.F:** 45-48 °C

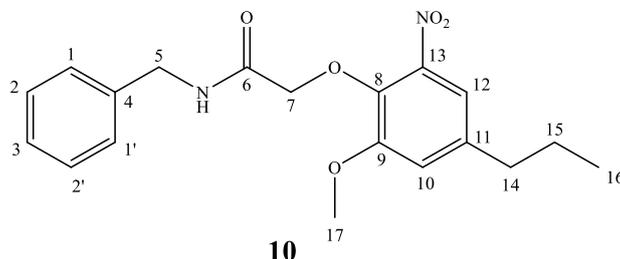
**F.M.:** C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>      **M.M.:** 313,1678g/mol

**IV-ATR (cm<sup>-1</sup>):** 3327 (N-H), 3062 (sp<sup>2</sup> C-H), 2962, 2929 (sp<sup>3</sup> C-H), 1654 (C=O), 1257, 1217 (C-O-C).

**RMN de <sup>1</sup>H (δ; CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz):** 7,50 (s; 1H; N-H); 7,34-7,25 (m; 6H; H-1; H-1'; H-2; H-2' e H-3); 6,84 (d; 1H; <sup>3</sup>J=8 Hz; H-13); 6,70(d; 1H; H-12; <sup>3</sup>J= 8.1 Hz); 6,66(d; 1H; H-10; <sup>4</sup>J= 1.4 Hz); 4,59 (s; 2H; H-7); 4,51 (d; 2H; H-5; <sup>3</sup>J=5.8 Hz); 3,63 (s; 3H; H-17); 2,52 (t; 2H; H-14; <sup>3</sup>J=7.6Hz); 1,66 (sest; 2H; H-15; <sup>3</sup>J =7.3 Hz); 0,93 (t; 3H; H-16; <sup>3</sup>J =7.3Hz).

**RMN de <sup>13</sup>C (δ; CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz):** 169,2 (1C; C-6); 149,7 (1C; C-9); 145,6 (1C; C-8); 138,4 (1C; C-4); 138,1 (1C; C-11); 128,9 (2C; C-2 e C-2'); 128 (2C; C-1 e C-1'); 127,7 (1C; C-3); 121 (1C; C-12); 116,5 (1C; C-13); 112,4 (1C; C-10); 70,8 ( 1C; C-7); 55,6 (1C; OCH<sub>3</sub>); 43,3 (1C; C-5); 38 (1C; C-14); 24,9 (1C; C-15), 14 (1C; C-16).

#### 4.2.3.4 Dados de caracterização *N*-benzil-2-(2-metoxi-6-nitro-4-propilfenoxi)acetamida (**10**)



**Massa obtida:** 63 mg (0,175 mmol; 29%; óleo amarelado)

**Eluente utilizado para a coluna cromatográfica:** hexano/acetato de etila 98:2

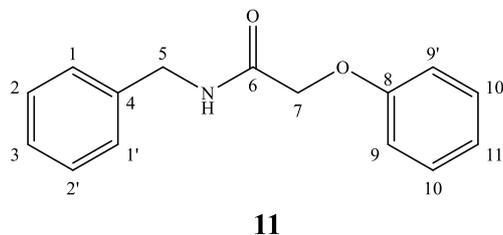
**F.M.:** C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>    **M.M.:** 358,1529g/mol

**IV-ATR (cm<sup>-1</sup>):** 3446 (N-H), 3066 (C-H sp<sup>2</sup>), 2958, 2869 (C-H sp<sup>3</sup>), 1654 (C=O), 1527, 1350 (NO<sub>2</sub>), 1282, 1203 (C-O-C).

**RMN de <sup>1</sup>H (δ; CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz):** 7,35-7,16 (m; 6H; H-1; H-1'; H-2; H-2' e H-3) 7,04 (d; 1H; H-12; <sup>4</sup>J=1,4 Hz); 6,88 (d; 1H; H-10; <sup>4</sup>J=1,4 Hz); 4,75 (s; 2H; H-7); 3,96 (d; 1H; H-5; <sup>3</sup>J=15,4 Hz); 3,76 (d; 1H; H-5'; <sup>3</sup>J=15,4 Hz); 3,63 (s; 3H; H-17); 2,62 (t; 2H; H-14; <sup>3</sup>J=7,8Hz); 1,65 (sest; 2H; H-15; <sup>3</sup>J =7,6 Hz); 0,94 (t; 3H; H-16; <sup>3</sup>J =7,3Hz).

**RMN de <sup>13</sup>C (δ; CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz):** 172,3 (1C; C-6); 156,3 (1C; C-9); 148,9 (1C; C-13); 146,4 (1C; C-8); 134,9 (1C; C-4); 129,7 (1C; C-11); 128,1 (2C; C-2 e C-2'); 127,9 (3C; C-1 e C-1' e C-3); 116,2 (1C; C-10); 116 (1C; C-12); 60,7 (1C; C-7); 56,2 (1C; OCH<sub>3</sub>); 52,2 (1C; C-5); 37,8 (1C; C-14); 23,8 (1C; C-15), 13,5(1C; C-16).

#### 4.2.3.5 Dados de caracterização 5 *N*-benzil-2-fenoxiacetamida (11)



**Massa obtida:** 112mg (0,464 mmol; 69%; sólido incolor)

**Eluente utilizado para a coluna cromatográfica:** hexano/acetato de etila 98:2

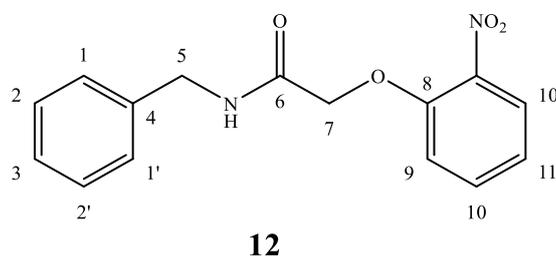
**F.M.:** C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>    **M.M.:** 241,1103 g/mol

**IV-ATR (cm<sup>-1</sup>):** 3404 (N-H), 3110 (C-H sp<sup>2</sup>), 2925,2850 (C-H sp<sup>3</sup>), 1674 (C=O),1510(C=C), 1286,1255(C-O-C).

**RMN de <sup>1</sup>H (δ; CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz):** 7,36-7,26 (m; 7H; H-1; H-1'; H-2; H-2'; H-1'; H-9; H-9'; H-11); 7,02 (t, 1H; <sup>3</sup>J=7,4 Hz; H-3); 6,60 (d; 2H; <sup>3</sup>J=8,0 Hz; H-10 e H-10'); 4,56 (s; 2H; H-7); 4,55 (d; 2H; <sup>3</sup>J=5,0 Hz; H-5).

**RMN de <sup>13</sup>C (δ; CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz):** 168,4 (1C; C-6); 157,3 (1C; C-8); 138,0 (1C; C-4); 130,0 (2C; C-10 e C-10'); 129,0 (2C; C-2, C-2'); 127,9 (1C; C-1, C-1'); 127,9 (1C; C-3); 122,4 (1C; C-11); 114,9 (1C; 1C; C-9 e C-9'); 67,6 (1C; C-7); 43,2 (1C; C-5).

#### 4.2.3.6 Dados de caracterização *N*-benzil-2-(2-nitrofenoxi) acetamida (12)



**Massa obtida:** 57mg (0,201 mmol; 33%; sólido amarelado)

**Eluente utilizado para a coluna cromatográfica:** hexano/acetato de etila 9:1

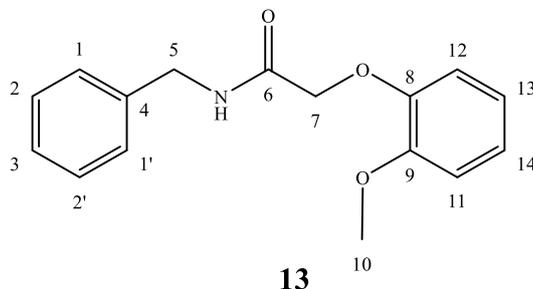
**F.M.:** C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>    **M.M.:** 286,0954 g/mol

**IV-ATR (cm<sup>-1</sup>):** 3273 (NH), 3053 (C-H sp<sup>2</sup>), 2929,2854 (C-H sp<sup>3</sup>), 1664 (C=O), 1541 e 1357 (NO<sub>2</sub>), 1245 (C-O-C).

**RMN de <sup>1</sup>H (δ; CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz):** 8,0 (dd; 1H; <sup>3</sup>J=8,0 Hz e <sup>4</sup>J=1,2 Hz; H-10); 7,62-7,54 (m; 2H; H-11 e H-10'); 7,34-7,33 (m; 3H; H-9'; H-1 e H-1'); 7,29-7,25 (m; 1H; H-2); 7,13 (t; 1H; <sup>3</sup>J=7,7Hz; H-3); 7,06(d; 1H; <sup>3</sup>J=8,0 Hz; H-2'); 4,67 (s; 2H; H-7); 4,57(d; 2H; <sup>3</sup>J=8,0 Hz; H-5).

**RMN de <sup>13</sup>C (δ; CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz):** 166,8 (1C; C-6); 151,2 (1C; C-8); 137,8 (1C; C-9); 135,5 (2C; C-4 e C-10); 129 (2C; C-2 e C-2'); 127,9 (2C; C-1 e C-1'); 127,8(1C; C-10); 126,9 (1C; C-3); 122 (1C; C-11); 114,9 (1C; C-9); 68,1 (1C; C-7); 43,4 (1C; C-5).

#### 4.2.3.7 Dados de caracterização *N*-benzil-2-(2-metoxifenoxi) acetamida (**13**)



**Massa obtida:** 137mg (0,507 mmol; 83%; sólido incolor)

**Eluente utilizado para a coluna cromatográfica:** hexano/acetato de etila 85:15

**F.M.:** C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>     **M.M.:** 271,1208 g/mol

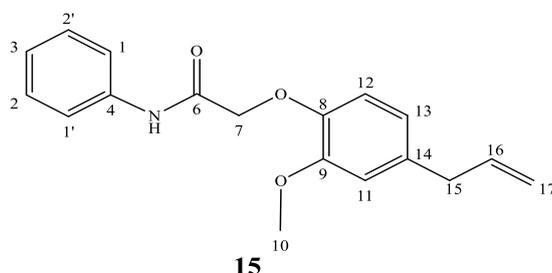
**IV-ATR (cm<sup>-1</sup>):** 3307 (N-H), 3066 (C-H sp<sup>2</sup>), 2939,2837 (C-H sp<sup>3</sup>), 1649 (C=O),1245,1209 (C-O-C)

**RMN de <sup>1</sup>H (δ; CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz):** 7,45 (s; 1H; N-H); 7,35-7,27 (m; 5H; H-1; H-1'; H-2; H-2' e H-3); 7,03-6,99 (m; 1H; H-14); 6,93-6,91 (m; 2H; H-11 e H-13); 6,86 (dd; 1H; <sup>3</sup>J=8,1 Hz e <sup>4</sup>J= 1,2 Hz; H-12); 4,61 (s; 2H; H-7); 4,52 (d; 2H; H-5; <sup>3</sup>J=5,8 Hz); 3,66 (s; 3H; H-10).

**RMN de <sup>13</sup>C (δ; CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz):** 168,7 (1C; C-6); 149,7 (1C; C-9); 147,3 (1C; C-8); 137,7 (1C; C-4); 128,7 (2C; C-2 e C-2'); 127,8 (2C; C-1 e C-1'); 127,5 (1C; C-3); 123,3 (1C; C-13); 121,1 (1C; C-14); 116,2 (1C; C-12); 111,9 (1C; C-11); 70,2 (1C; C-7); 55,4 (1C; OCH<sub>3</sub>); 43 (1C; C-5).



#### 4.2.3.9 Dados de caracterização 2-(4-alil-2-metoxi-6-nitrofenoxi)-*N*-fenilacetamida (15)



**Massa obtida:** 40 mg (0,135 mmol; 26%; óleo amarelado)

**Eluente utilizado para a coluna cromatográfica:** hexano/acetato de etila 92:8

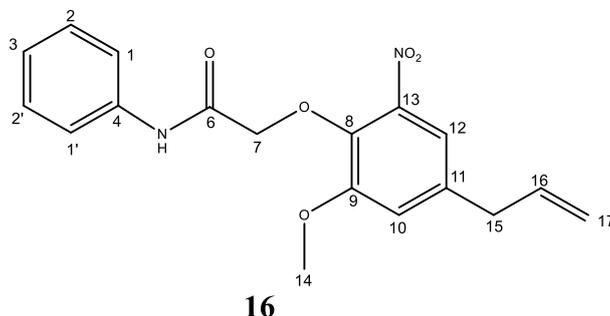
**F.M.:** C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>     **M.M.:** 297,1365 g/mol

**IV-ATR (cm<sup>-1</sup>):** 3278 (N-H), 3066 (C-H sp<sup>2</sup>), 2937,2846 (C-H sp<sup>3</sup>), 1674 (C=O), 1508(C=C), 1259,1222(C-O-C).

**RMN de <sup>1</sup>H (δ; CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz):** 7,46 (s; 1H; N-H); 7,59 (dd; 2H; <sup>3</sup>J = 8,6 Hz e <sup>4</sup>J = 1,5 Hz; H-1 e H-1'); 7,36-7,32 (m; 2H; H-2 e H-2'); 7,15-7,11 (m; 1H; H-3); 6,86 (d; 1H; <sup>3</sup>J = 8,1 Hz; H-12); 6,77-6,74 (m; 2H; H-13 e H-11); 5,99-5,89 (m; 1H; H-16); 5,11-5,06 (m; 2H; H-17 e H-17'); 4,63 (s; 2H; H-7); 3,64 (s; 3H; H-10); 3,33 (d; 2H; <sup>3</sup>J = 6,7 Hz; H-15).

**RMN de <sup>13</sup>C (δ; CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz):** 167,1 (1C; C-6); 149,6 (1C; C-9); 145,6 (1C; C-8); 137,2 (1C; C-4); 137,1(1C; C-16); 135,7 (1C; C-14); 129 (2C; C-1 e C1'); 124,5 (1C; C-3); 121,1 (1C; C-13); 119,8 (1C; C-2 e C-2'); 116,7 (1C; C-17); 116 (1C; C-11); 112 (1C; C-12); 70,7 (1C; C-7); 55,8 (1C; OCH<sub>3</sub>); 43,3 (1C; C-15).

#### 4.2.3.10 Dados de caracterização 2-(4-alil-2-metoxifenoxi)-*N*-fenilacetamida (16)



**Massa obtida:** 46 mg (0,134 mmol; 23%; óleo amarronzado)

**Eluente utilizado para a coluna cromatográfica:** hexano/acetato de etila 9:1

**F.M.:** C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>    **M.M.:** 342,1216 g/mol

**RMN de <sup>1</sup>H (δ; CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz):** 8,91 (s; 1H; N-H); 7,65 (s; 1H; C-12); 7,37-7,33 (m; 4H; H-1; H-1'; H-2 e H-2'); 7,41 (t; 1H; <sup>3</sup>J=7,4 Hz; H-3); 7,00 (d; 1H; <sup>4</sup>J=1,7 Hz; H-10); 5,97-5,87 (m; 1H; H-16); 5,19-5,12 (m; 2H; H-17 e H-17'); 4,75 (s; 2H; H-7); 3,92 (s; 3H; H-14); 3,33 (d; 2H; <sup>3</sup>J=6,7 Hz; H-15).

**RMN de <sup>13</sup>C (δ; CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz):** 166,2 (1C; C-6); 153,0 (1C; C-9); 142,9 (1C; C-13); 139,3 (1C; C-8); 137,2 (1C; C-4); 137,1 (1C; C-16); 135,3 (1C; C-11); 129,0 (2C; C-2 e C2'); 124,5 (1C; C-3); 119,8 (1C; C-1 e C-1'); 117,6 (1C; C-10); 117,1 (1C; C-12); 116,5 (1C; C-17); 72,9 (1C; C-7); 56,5 (1C; OCH<sub>3</sub>); 39,5 (1C; C-15).

### 4.3 Avaliação da atividade tripanocida das substâncias sintetizadas

### 4.3.1 Formas epimastigotas

As soluções estoque das novas substâncias sintetizadas, bem como do benznidazol foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 5 mg/mL. Para a análise dos efeitos contra as formas epimastigotas (cepa Y), a concentração máxima foi de 200 µg/mL para cada substância e benznidazol, com um perfil de sete pontos utilizando diluições seriadas em duplicata. Em seguida, os epimastigotas foram adicionados à placa ( $1,5 \times 10^6$ /mL) em um ensaio de 72 horas. Após incubação em estufa BOD a 28°C por 72 horas, resazurina (1 mM) foi adicionada às placas. Após incubação por 12 horas, os resultados foram lidos a 570 e 600 nm. A porcentagem de inibição da proliferação induzida pelas substâncias foi calculada usando a fórmula: % inibição =  $100 - [A570 - (A600 \times R0) \text{ Tratado} / A570 - (A600 \times R0) \text{ Controle+}] \times 100$ , onde A570 = Absorbância a 570 nm, A600 = Absorbância a 600 nm, e onde Controle+ representa o poço contendo epimastigotas, meio e resazurina, na ausência da substância. R0 é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo (C-), que contém apenas meio de cultura e resazurina na ausência de parasitas [ $R0 = (A570/A600)C-$ ]. Os valores de CI<sub>50</sub> foram calculados a partir da porcentagem de inibição das substâncias utilizando o software CompuSyn (Biosoft, UK). Cada uma delas foi avaliada em triplicata, e dois experimentos independentes foram conduzidos.

### 4.3.2 Formas tripomastigotas

Os tripomastigotas (cepa Y) foram obtidos a partir do sangue periférico de camundongos previamente infectados. Os parasitas foram propagados em monocamadas de células Vero em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com 2% de soro fetal bovino (SFB), e os tripomastigotas foram colhidos conforme descrito anteriormente (MAZZETI et al.,2019). Tripomastigotas ( $5 \times 10^5$  por poço/mL) foram adicionados a uma placa estéril de poliestireno de 96 poços, contendo sete diluições seriadas dos novos compostos sintetizados e do benznidazol (concentração inicial = 200 µg/mL). Controles negativos (apenas meio DMEM) e controles positivos (meio DMEM com o parasita, sem tratamento) foram adicionados à placa. Após incubação a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas, os parasitas foram quantificados utilizando uma câmara de

Neubauer e um microscópio de campo claro. Para calcular a viabilidade dos parasitas, a seguinte fórmula foi utilizada: % viabilidade = Média das réplicas ÷ Média dos controles × 100. Os valores de  $CI_{50}$  foram calculados utilizando o software CompuSyn (Biosoft, UK).

#### **4.3.3 Formas amastigotas**

Para a análise dos efeitos contra as formas amastigotas intracelulares, foram utilizadas as concentrações de 60, 30, 15, 7,5 e 3,75  $\mu\text{M}$  para as novas substâncias sintetizadas e benznidazol, em um ensaio de 72 horas. As células Vero foram cultivadas em meio DMEM (suplementado com 10% de SFB, 1% de glutamina 2 nM e 0,2% de gentamicina 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Após um período de 24 horas, as células foram expostas a tripomastigotas (derivados das células Vero) na proporção de 20 parasitas por célula. Em seguida, as culturas foram incubadas por mais 24 horas antes de serem tratadas com as substâncias por um período de 3 dias. Todas as placas de cultura foram mantidas a 37°C em uma atmosfera de ar com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 72 horas, as culturas foram fixadas com metanol, coradas com Giemsa e examinadas ao microscópio para avaliar as proporções de células infectadas nas culturas tratadas e não tratadas. Um mínimo de 200 células foi examinado para determinar o percentual de infecção, enquanto a porcentagem de inibição do crescimento foi calculada dividindo-se o número de células infectadas nas culturas tratadas pela média das culturas de controle infectadas. Esse valor foi então multiplicado por 100 (BAHIA et al., 2014). Os valores de  $CI_{50}$  foram calculados utilizando o software CalcuSyn (Biosoft, UK).

#### **4.3.4 Citotoxicidade contra células Vero e H9c2**

As linhagens celulares Vero e H9c2 foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB, 1% de glutamina (2 nM) e 0,2% de gentamicina (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Mil células Vero ou H9c2 foram semeadas e incubadas a 37°C com 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas. O meio de cultura foi então substituído, e para a análise de toxicidade, a

concentração máxima de cada substância e do benznidazol foi ajustada para 200 µg/mL. Um perfil de sete pontos com diluições seriadas em triplicata por 72 horas. Após a incubação, foi adicionada resazurina (1 mM) e a leitura foi realizada a 570 nm e 600 nm após 12 horas (ROLÓN et al.,2006). A porcentagem de inibição da proliferação induzida pelas substâncias foi calculada usando a mesma fórmula empregada nos ensaios contra formas epimastigotas. A inibição percentual e a CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica para 50%) foram calculadas utilizando o software CalcuSyn (Biosoft, UK).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Planejamento sintético das substâncias propostas

Baseado na estrutura química do benznidazol, foi proposto um novo padrão estrutural para a obtenção de substâncias inéditas híbridas a partir deste fármaco e o eugenol, diidroeugenol, guaiacol, vanilina ou fenol. Na figura 7 abaixo está apresentada uma retrosíntese que permitiu a obtenção das substâncias planejadas.

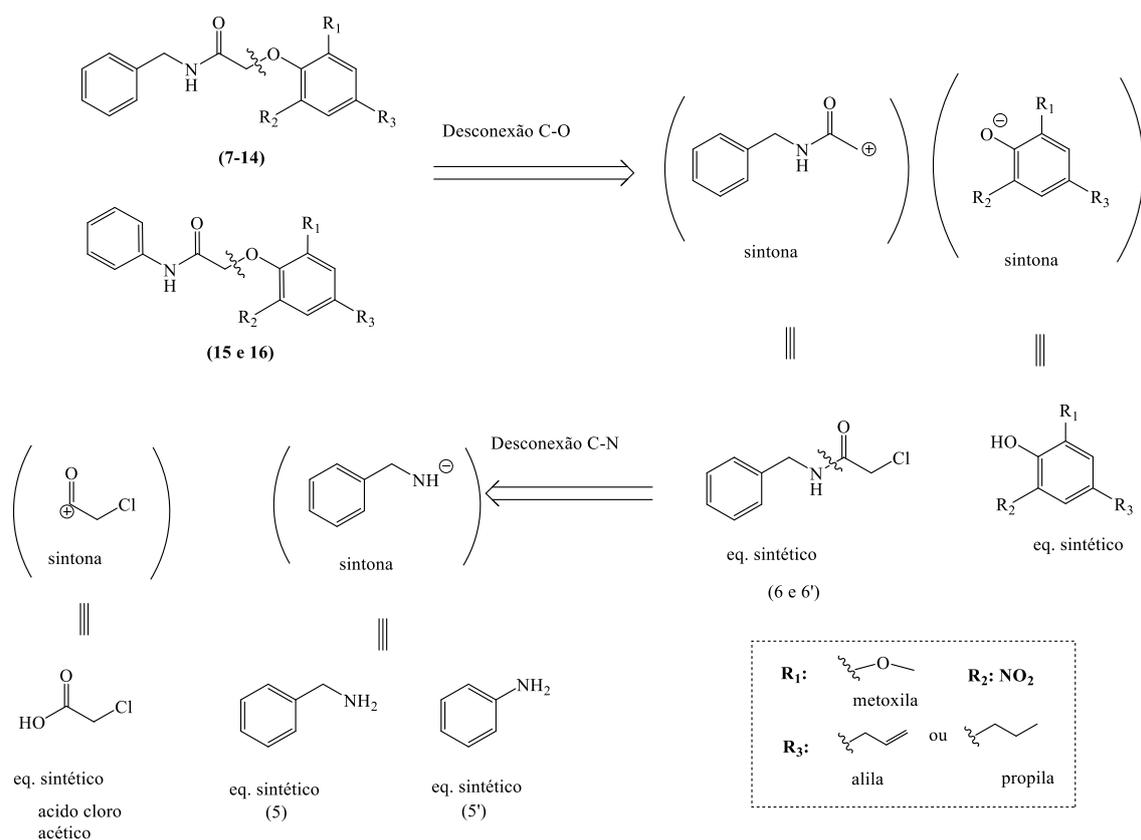
Inicialmente, o eugenol (**1**) ou seu análogo propílico di-hidroeugenol (**2**) foram convertidos nos respectivos derivados nitrados **3-4** após a reação desses fenóis com nitrato de sódio e bissulfato de potássio. Paralelamente, a benzilamina (**5**) foi submetida a uma reação com ácido cloroacético para fornecer a cloroacetamida **6**. A reação entre os fenóis **1-4** com a amida **6** forneceu os compostos de interesse **7-10**.

Para avaliar a importância dos grupos metoxila, alila ou propila do eugenol e di-hidroeugenol para a atividade tripanocida, sintetizamos os análogos simplificados **11-12**, a partir da reação da amida **6** com fenol ou 2-nitrofenol.

Os análogos **13** e **14** foram planejados para tentarmos entender a importância do grupo metoxila ou de um grupo diferente dos grupos alila ou propila nessa posição. Para obter esses compostos, a cloroacetamida **6** foi submetida a uma reação com guaiacol ou vanilina, sob as mesmas condições reacionais empregadas anteriormente.

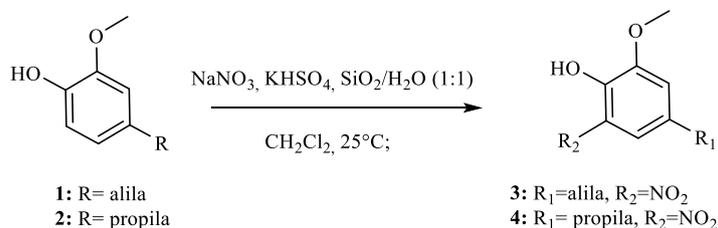
Finalmente, os compostos **15** e **16** foram sintetizados a partir da anilina como ponto de partida para comparar a influência dos grupos benzila e fenila para a atividade antiparasitária dessas substâncias. A reação da cloroacetamida **6** com eugenol (**1**) ou nitroeugenol (**3**) permitiu a obtenção destes derivados.

**Figura 8:** Esquema de retróssíntese das substâncias propostas



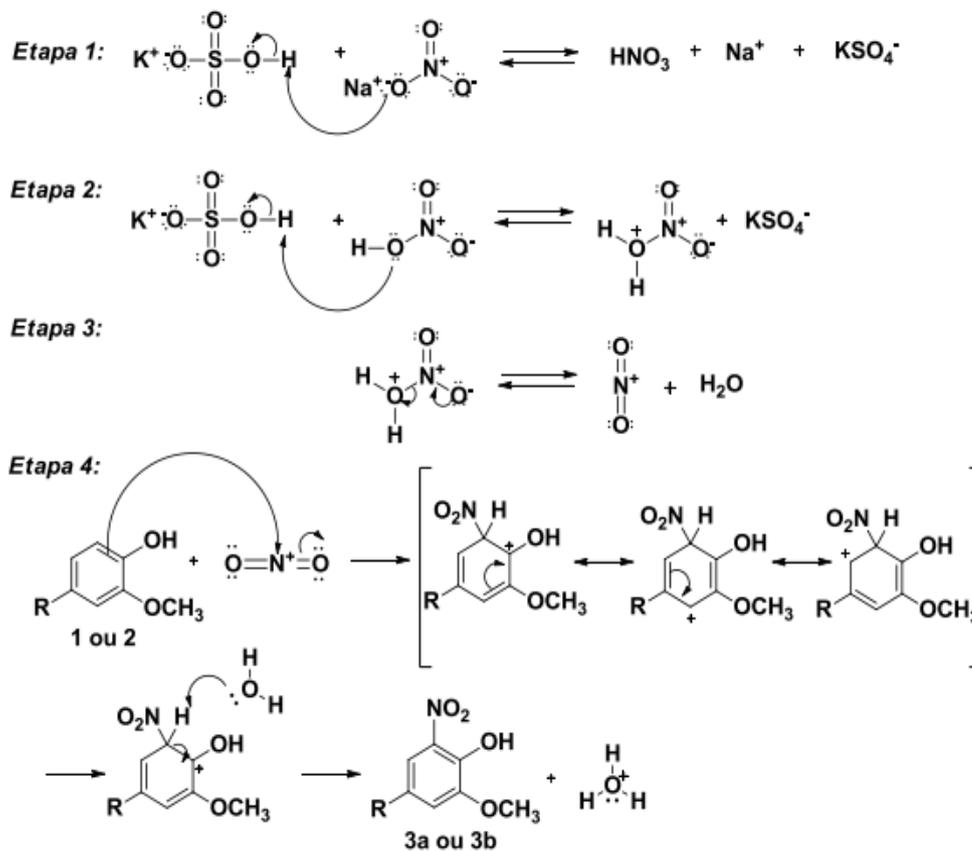
## 5.2 Síntese das substâncias planejadas

### 5.2.1 Obtenção dos fenóis nitrados (3 e 4)



A reação de nitração aromática para a obtenção dos derivados **3** e **4** foi realizada conforme descrito por (ZOLFIGOL; GHAEMI; MADRAKIAN, 2001). Trata-se de uma reação de substituição eletrofílica aromática, em que o grupo nitro (NO<sub>2</sub>) é inserido no anel aromático. Inicialmente, ocorre a formação da espécie eletrofílica (íon nitrônio). Esse eletrófilo é gerado a partir da reação entre bissulfato de potássio com o nitrato de sódio, conforme ilustrado no mecanismo apresentado na Figura 9. Durante a reação, o ácido nítrico é formado e, ao reagir com outra molécula de bissulfato de potássio, que produz a espécie eletrofílica. Devido à sua alta reatividade, esse íon sofre o ataque do nucleófilo presente no meio (ligação C=C do anel aromático), o que resulta na formação do íon arênio, que é estabilizado por ressonância. A formação desse íon é a etapa lenta do processo, pois envolve a conversão para um intermediário de menor estabilidade. Logo em seguida, a água, que provavelmente foi formada durante a dissociação do ácido nítrico, captura um próton do íon arênio e reestabelece a aromaticidade do anel. Esta última etapa da reação ocorre rapidamente. É importante ressaltar que a sílica gel (SiO<sub>2</sub>) atua promovendo uma catálise heterogênea, na qual os reagentes que estão presentes em fases distintas, interagem com sua superfície por adsorção ou por meio de ligações covalentes, promovendo aumento no rendimento da reação.

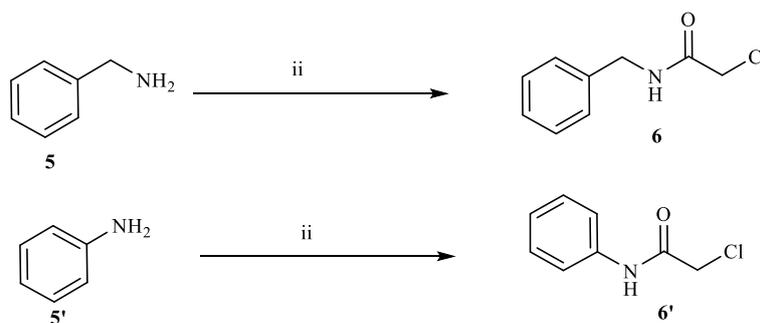
**Figura 9:** Proposta de mecanismo para formação do eugenol e diidroeugenol *orto*-nitrados



Fonte: (BARBOSA, H. A., 2017)

Os derivados nitrados (**3** e **4**) foram obtidos na forma de óleo, com rendimentos de 72 e 77%, respectivamente.

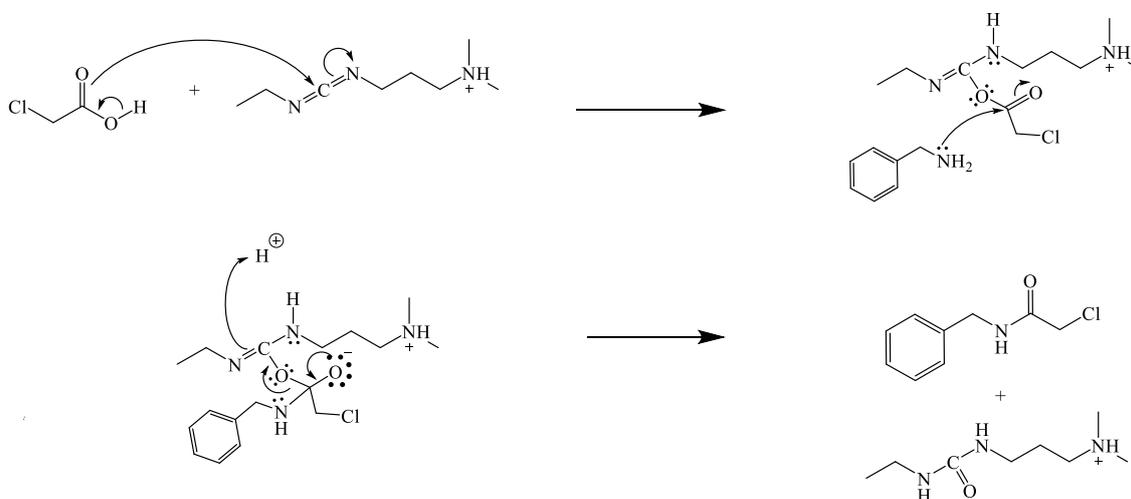
### 5.2.2 Síntese da cloroacetamida (**6** e **6'**)



ii: Ácido cloroacético, EDAC, DMAP, 48 h, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25°C

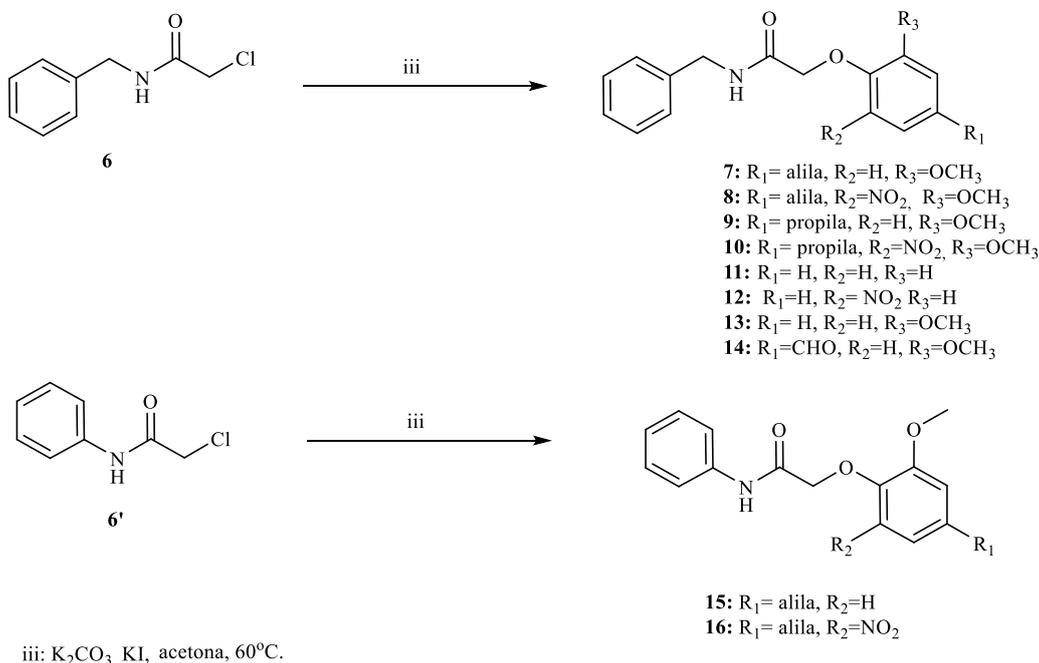
Para a síntese da cloroacetamida (**6** e **6'**), intermediário chave para a obtenção das substâncias finais propostas, foi utilizada uma técnica de acilação que utiliza uma carbodiimida (no caso, o EDAC) como agente de acoplamento e o DMAP como catalisador (NEISES; STEGLICH, 1978). Esta reação ocorre em duas etapas, conforme demonstrado na Figura 10 a seguir. Em um primeiro momento, o EDAC (cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida) sofre ataque do ácido cloroacético formando um carboxilato. Posteriormente, os elétrons livres do nitrogênio da benzilamina atacam o carbono carbonílico eletrofilico deslocando a ligação  $\pi$  e formando um intermediário tetraédrico. O oxigênio carregado negativamente regenera a carbonila com a consequente saída do reagente de acoplamento na forma de uma uréia, possibilitando a formação da amida esperada (NEISES; STEGLICH, 1978).

**Figura 10:** Mecanismo proposto para a síntese da cloroacetamida (**6** e **6'**)

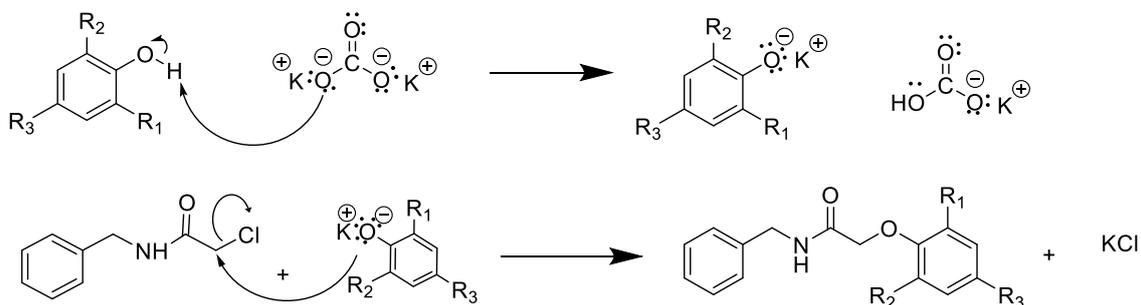


Os derivados **6** e **6'** foram obtidos na forma de um produto sólido incolor, com rendimentos de 59% e 31%, respectivamente.

### 5.2.3 Síntese dos produtos finais (7–16)



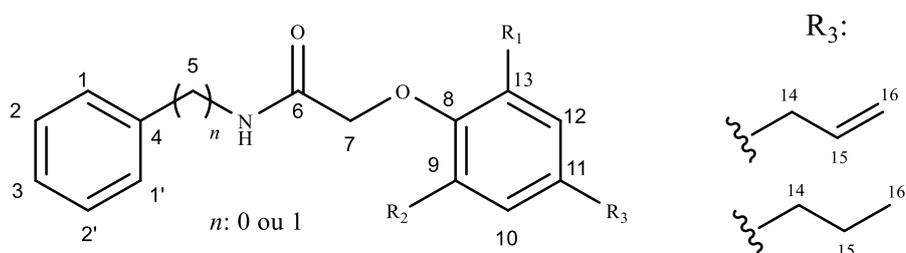
Para a obtenção dos produtos finais **7-16**, foi utilizada acetona anidra como solvente, em atmosfera de nitrogênio. Os fenóis **1-4**, **fenol**, **2-nitrofenol**, **guaiacol** ou **vanilina** foram submetidos a uma reação com carbonato de potássio e cloroacetamida (**6** e **6'**) previamente sintetizada. Inicialmente, o fenol é desprotonado pelo carbonato de potássio, que foi escolhido por ser uma base não nucleofílica. É fundamental que o meio reacional permaneça anidro, para evitar que moléculas de água atuem como nucleófilos ou ácidos, comprometendo o rendimento da reação. O mecanismo químico envolve uma reação de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ). Primeiramente, o carbonato de potássio remove o próton do fenol, gerando o íon fenóxido correspondente. A maior reatividade do oxigênio, agora carregado negativamente, facilita o ataque nucleofílico ao carbono eletrofílico da cloroacetamida, rompendo a ligação C—Cl e resultando na formação dos produtos desejados. Esse mecanismo está ilustrado na Figura 10 a seguir.

**Figura 11:** Proposta de mecanismo para a síntese dos produtos finais (7–16)

Os derivados de **7-16** foram obtidos como óleos amarelados ou como sólidos incolores, com rendimentos que variam de 11 a 84%.

### 5.3 Caracterização química das substâncias sintetizadas

Todas as substâncias sintetizadas foram caracterizadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, além de espectroscopia na região do infravermelho. Os espectros obtidos estão disponíveis no ANEXO 1.



Nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dos derivados sintetizados, os hidrogênios aromáticos do grupo benzila ou fenila (H-1, H-1', H-2, H-2', H-3) foram observados como um multipeto com integral 5 entre 7,34 ppm e 7,25 ppm. O sinal referente ao H-5 apareceu como um dupeto próximo de 4,50 ppm, com integral 2 e constante de acoplamento (<sup>3</sup>*J*) entre 5,6-8,0 Hz. Já o sinal de H-7 foi identificado como um simpleto com integral 2 próximo de 4,70 ppm para todas as substâncias. Em alguns espectros, foi observado um simpleto largo em uma região mais desblindada, próximo a 7,40 ppm, que

é referente ao hidrogênio da função amida. Vale destacar que os sinais de H-5 não foram detectados nos derivados **15** e **16**, confirmando o sucesso na síntese tanto dos derivados benzílicos quanto dos fenílicos.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos derivados, foram identificados sinais correspondentes aos carbonos aromáticos C-1, C-1', C-2, C-2' e C-3, que estão situados na região entre 126 e 130 ppm. O carbono carbonílico da amida apareceu em uma região mais desblindada, próxima a 167 ppm. Os carbonos ligados a dois hidrogênios, observados em fase inversa no subespectro DEPT-135 (C-5 e C-7), foram detectados entre 40 e 70 ppm. Vale ressaltar que o C-5 não foi identificado nos derivados **15** e **16**, conforme esperado. De maneira geral, todas as estruturas apresentaram um padrão semelhante de sinais nas análises por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , com variações nos deslocamentos químicos devido à presença do grupo nitro e dos diferentes substituintes em R<sub>1</sub> e R<sub>3</sub>.

Os hidrogênios da cadeia alílica dos derivados do eugenol (**7**, **8**, **15** e **16**) foram identificados como um multipletto com integral 1 na região de 5,8 a 6 ppm para H-15. Um multipletto com integral 2 entre 5,0 e 5,10 ppm para H-14, e um dupletto com constante de acoplamento de 6,7 Hz e integral 2 entre 3,40 e 3,30 ppm para H-16. Nos derivados do diidroeuogenol (**9** e **10**), os hidrogênios da cadeia propílica foram observados da seguinte maneira: um tripleto com integral 2 em torno de 2,50 ppm, correspondente a H-14; um multipletto com integral 2 próximo a 1,65 ppm, referente a H-15; e um tripleto próximo a 1 ppm, com integração de 3 hidrogênios, correspondente a H-16. Os hidrogênios do grupo metoxila apareceram como simpletos com integral 3 em torno de 3,6 ppm. Vale destacar que o hidrogênio do grupo aldeído no derivado **14** foi o mais desblindado, sendo detectado como um simpleto em 9,87 ppm, referente a H-15.

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos derivados do eugenol, os carbonos C-15 e C-16, pertencentes ao grupo alila, foram detectados na região dos carbonos aromáticos, conforme esperado, devido à desblindagem provocada pelo efeito anisotrópico em alcenos. No caso dos derivados do di-hidroeuogenol, os carbonos C-14, C-15 e C-16 apresentaram deslocamentos químicos próximos de 50 ppm. Utilizando o subespectro DEPT-135, foi possível identificar o sinal de C-14, registrado em fase inversa, tanto para os derivados de eugenol quanto di-hidroeuogenol. O carbono do grupo metoxila, presente na maioria dos derivados, também apareceu próximo de 50 ppm, enquanto o carbono carbonílico da função aldeído, encontrado no derivado **14**, foi registrado em torno de 190 ppm.

Nos espectros no infravermelho das substâncias, foi identificada a banda correspondente à amida em  $3300\text{ cm}^{-1}$ , além disso amidas apresentam absorção referente à deformação axial do grupo carbonila (C=O) larga próximo  $1674\text{ cm}^{-1}$  evidenciando a formação correta do intermediário **6'**. Adicionalmente, todos os espectros exibiram bandas típicas das vibrações de deformação axial das ligações C=C nos anéis aromáticos, localizadas na faixa de  $1509$  a  $1597\text{ cm}^{-1}$ .

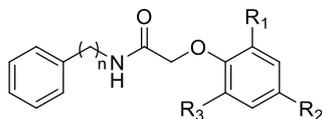
Nos espectros na região do infravermelho dos derivados nitrados, a banda referente ao grupo nitro formado foi observada  $1350$  e  $1315\text{ cm}^{-1}$  e  $1550$ - $1490$  indicativo do sucesso da nitração. Por fim é importante destacar a presença de uma banda referente ao grupo carbonila do aldeído no derivado **14**, registrada em  $2746\text{ cm}^{-1}$ .

#### **5.4 Avaliação *in vitro* da atividade tripanocida dos produtos 7-16 e relações estrutura-atividade**

Os novos produtos sintetizados foram inicialmente avaliados contra as formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (parcialmente resistente ao benznidazol), com os resultados expressos como concentração inibitória mínima (CI<sub>50</sub>), conforme mostrado na Tabela 1.

Conforme o Portal da Doença de Chagas (FIOCRUZ, 2024), as formas epimastigotas estão presentes no intestino do parasito, sofrendo uma baixa disponibilidade de nutrientes que desencadeiam um processo de diferenciação, que é denominado metaciclogênese. Nesse processo são geradas as formas infectantes para o ser humano, que são conhecidas como tripomastigotas metacíclicas, e são eliminadas junto com os dejetos do inseto vetor. Essa forma do parasita, que está presente no inseto vetor, primeiro foi testada para selecionar os produtos mais ativos, com intuito de serem avaliados contra outras formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* (tripomastigota e amastigota).

**Tabela 1:** Estruturas químicas dos produtos **7-16** e atividade tripanocida contra as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



Compostos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	n	Formas Epimastigotas CI <sub>50</sub> (μM)
<b>7</b>	OMe		H	1	> 642,7
<b>8</b>	OMe		NO <sub>2</sub>	1	24,7
<b>9</b>	OMe		H	1	341,0
<b>10</b>	OMe		NO <sub>2</sub>	1	88,5
<b>11</b>	H	H	H	1	763,1
<b>12</b>	H	H	NO <sub>2</sub>	1	353,4
<b>13</b>	OMe	H	H	1	> 737,7
<b>14</b>	OMe	CHO	H	1	276,5
<b>15</b>	OMe		H	0	88,5
<b>16</b>	OMe		NO <sub>2</sub>	0	154,8
<b>Benznidazol</b>	-	-	-	-	29,9

O derivado nitrado do eugenol **8** destacou-se como o mais eficaz contra essas formas evolutivas do parasita, apresentando um CI<sub>50</sub> de 24,7 μM, comparável ao benznidazol (CI<sub>50</sub> de 29,9 μM). A ausência do grupo nitrado nesta posição resultou na perda total da atividade tripanocida, como evidenciado pelo alto valor de CI<sub>50</sub> do análogo não nitrado **7** (> 642,7 μM). Além disso, o grupo alila do eugenol provou ser crucial para a atividade tripanocida, pois o derivado nitrado do dihidroeuogenol (composto **10**), que possui um grupo propila no lugar do grupo alila, mostrou-se mais de três vezes menos potente (CI<sub>50</sub>: 88,5 μM) em comparação ao composto **8**. As outras substâncias ativas contra esta forma evolutiva foram o derivado nitrado benzilado do di-hidroeuogenol (**10**) e o derivado fenílico do eugenol não nitrado (**15**).

Considerando a maior atividade das substâncias **8**, **10** e **15** contra as formas epimastigotas, elas foram selecionadas para avaliação de seu potencial contra as formas tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. A citotoxicidade desses compostos

também foi avaliada em células Vero saudáveis (células epiteliais renais extraídas de macacos-verdes africanos), e o índice de seletividade dessas substâncias foi determinado pela razão  $CC_{50}/CI_{50}$  (Tabela 2).

**Tabela 2:** Atividade das substâncias **8**, **9** e **15** contra as formas tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi* e índices de seletividade

Composto	Células Vero CC <sub>50</sub> (µM)	Formas tripomastigotas CI <sub>50</sub> (µM)	IS	Formas amastigotas CI <sub>50</sub> (µM)	IS
<b>8</b>	114,6	1,8	63	1,6	73
<b>10</b>	227,1	10,4	22	4,8	47
<b>15</b>	282,2	11,2	25	8,3	34
<b>Benznidazol</b>	> 768,6	6,1	>126	3,1	>247

Dentre os produtos avaliados, o derivado nitrado do eugenol (**8**) mostrou-se o mais promissor contra as formas infectantes (tripomastigotas) e intracelulares (amastigotas) do agente causador da doença de Chagas. Este demonstrou maior atividade do que o benznidazol nos estudos com as formas tripomastigota (CI<sub>50</sub>: 1,8 µM) e amastigota (CI<sub>50</sub>: 1,6 µM), apresentando índices de seletividade de 63 e 73, respectivamente, em células Vero saudáveis infectadas com as formas amastigotas do parasita.

O ciclo de vida do parasito dentro do hospedeiro vertebrado começa com a infecção, quando o parasita na forma de tripomastigota metacíclica, que possui um flagelo longo, adentra em áreas de mucosa ou em feridas na pele. A forma tripomastigota, muito infectante e pode ser encontrada no inseto vetor (na parte posterior do intestino, especificamente no reto), no sangue e no espaço intercelular dos hospedeiros vertebrados, e em culturas de células infectadas. A investigação das formas tripomastigotas no sangue de animais infectados demonstrou a presença de dimorfismo ou polimorfismo em *Trypanosoma cruzi*, com variantes largas, finas e intermediárias, semelhante a tripanossomos africanos. (BELLEW et al., 2017).

A forma amastigota apresenta-se em uma forma esférica, em que o núcleo e o cinetoplasto não são visíveis ao microscópio óptico e não possui flagelo. A forma amastigota está presente na fase crônica da infecção que é caracterizada pela presença de *Trypanosoma cruzi* no sangue. Na fase crônica a apresentação clínica da Doença de

Chagas pode variar significativamente, e dependendo, pode ocorrer comprometimento das estruturas e funções cardíacas.

Devido ao potencial tripanocida observado para o derivado **8**, sua toxicidade também foi avaliada contra células cardíacas H9c2 de ratos neonatos, para se entender melhor sua segurança para futuros estudos *in vivo*. Os resultados de citotoxicidade e os índices de seletividade (Tabela 3) foram semelhantes aos observados para as células Vero, reforçando o composto **8** como um candidato promissor para estudos adicionais, incluindo estudos farmacocinéticos e estudos *in vivo*.

**Tabela 3:** Toxicidade do derivado **8** contra células cardíacas H9c2 de ratos neonatos e índice de seletividade (IS).

Compostos	Células H9c2 CC <sub>50</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> (µM) / IS (tripomastigotas)	IC <sub>50</sub> (µM) / IS (amastigotas)	ClogP
<b>8</b>	127,8	1,8 / 71	1,6 / 79	3,25
<b>Benznidazol</b>	> 768,6	6,1 / > 126	3,1 / >247	0,77

Citotoxicidade contra células H9c2, índices de seletividade (IS) e logP calculado do derivado **8**.

Os valores de logP foram calculados para o derivado **8** e benznidazol, para tentarmos entender a maior eficácia do derivado **8** em comparação ao fármaco referência contra as formas amastigotas do parasito. O derivado **8** apresentou maior lipofilicidade (clogP: 3,25) em relação ao benznidazol (clogP: 0,77), o que pode explicar sua melhor capacidade de atravessar as membranas celulares infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*.

## CONCLUSÃO

Neste estudo, foram sintetizadas 10 novas substâncias análogas ao benznidazol, híbridos moleculares entre este fármaco e o eugenol (e análogos). As substâncias foram sintetizadas, purificadas e caracterizadas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectroscopia no infravermelho o que possibilitou a confirmação de suas estruturas químicas. A atividades tripanocidas dessas substâncias foram testadas contra as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, e o derivado **8** demonstrou os melhores resultados, apresentando valores de  $\text{CI}_{50}$  mais baixos que o benznidazol.

## REFERÊNCIAS

ALDASORO, Emiliano; POSADA, Eva; REQUENA-MÉNDEZ, Ana; CALVO-CANO, Antonia; SERRET, Natalia; CASELLAS, Anna; SANZ, Sara; SOY, Dolors; PINAZO, Maria-Jesus; GASCON, Joaquim. What to expect and when: benznidazole toxicity in chronic Chagas' disease treatment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 4, p. 1060-1067, 2018. DOI: 10.1093/jac/dkx516.

AMARAL, Antonia Tavares do; ANDRADE, Carolina Horta; KÜMMERLE, Arthur E.; GUIDO, Rafael V. C. A evolução da química medicinal no Brasil: avanços nos 40 anos da Sociedade Brasileira de Química. **Química Nova**, 2017.

BAHIA, M. T.; NASCIMENTO, A. F.; MAZZETI, A. L.; MARQUES, L. F.; GONÇALVES, K. R.; MOTA, L. W. R.; DINIZ, L. F.; CALDAS, I. S.; TALVANI, A.; SHACKLEFORD, D. M.; KOLTUN, M.; SAUNDERS, J.; WHITE, K. L.; SCANDALE, I.; CHARMAN, S. A.; CHATELAIN, E. Atividade antitripanossomal de metabólitos de fexinidazol, potenciais novos candidatos a medicamentos para a doença de Chagas. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2014, p. 02754-13, 2014.

BARBOSA, Helloana Azevedo. Síntese e avaliação in vitro do potencial antimicrobiano, antiproliferativo e tripanocida de derivados sulfonamídicos do eugenol e diidroeugenol. 2017. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2017.

BARRENHO, Eliana; MIRALDO, Marisa; SMITH, Peter C. Does global drug innovation correspond to burden of disease? The neglected diseases in developed and developing countries. **Health Economics**, v. 28, n. 1, p. 123-143, jan. 2019. DOI: 10.1002/hec.3833.

BASILE, L.; JANSÁ, J. M.; CARLIER, Y.; SALAMANCA, D. D.; ANGHEBEN, A.; BARTOLONI, A.; SEIXAS, J.; VAN GOOL, T.; CAÑAVATE, C.; FLORES-CHÁVEZ, M.; JACKSON, Y.; CHIODINI, P. L.; ALBAJAR-VIÑAS, P.; WORKING GROUP ON CHAGAS DISEASE COLLECTIVE. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. **Euro Surveillance**, v. 16, n. 37, p. pii=19968, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2807/ese.16.37.19968-en>.

BELEW, A. T.; JUNQUEIRA, C.; RODRIGUES-LUIZ, G. F.; VALENTE, B. M.; OLIVEIRA, A. E. R.; et al. Comparative transcriptome profiling of virulent and non-virulent *Trypanosoma cruzi* underlines the role of surface proteins during infection. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 12, p. e1006767, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006767>.

CRESPILLO-ANDÚJAR, C.; CHAMORRO-TOJEIRO, S.; NORMAN, F.; MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; PÉREZ-MOLINA, J. A. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 24, n. 12, p. 1344.e1-1344.e4, 2018.

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. DE A.. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 375–379, maio 2011.

FIOCRUZ. Ciclo evolutivo. **Chagas: Informação e Conhecimento**. Disponível em: <https://chagas.fiocruz.br/parasita/ciclo-evolutivo/>.

GIL-SANTANA, HR et al.. Primeiro relato de *Microtriatoma borbai* Lent & Wygodzinsky, 1979 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) no estado do Espírito Santo, Brasil: *M. borbai* estaria vivendo em lavouras de eucalipto?. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, pág. e0147–2021, 2021 .

GONÇALVES-SANTOS, Elda; CALDAS, Ivo S.; FERNANDES, Valquiria Â.; FRANCO, Lucas L.; PELOZO, Mônica F.; FELTRIM, Fernando; MACIEL, Juliana S.; MACHADO, Jose Vaz C.; GONÇALVES, Reggiani V.; NOVAES, Rômulo D. Potencial farmacológico de novos híbridos de metronidazol/eugenol/dihidroeugenol contra *Trypanosoma cruzi* *in vitro* e *in vivo*. **International Immunopharmacology**, v. 121, 2023. 110416. ISSN 1567-5769. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110416>.

KAWAGUCHI, Wilton Hideki; LEONART, Larissa Pereira; FACHI, Mariana Müller; BÖGER, Bruna; PONTAROLO, Roberto. Doença de Chagas: do surgimento ao tratamento – revisão da literatura. **J Health Sci Inst**, v. 37, n. 2, p. e182-e189, 2019.

KRATZ, J. M.; BOURNISSEN, F. G.; FORSYTH, C. J.; SOSA-ESTANI, S. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, v. 11, n. 10, p. 943-957, 2018.

LIMA, A. B. R.; CARVALHO, C. V. C.; VIEIRA, V. E. S.; CAVALCANTE, E. da S.; SOUZA, A. L. de S. e; SOUZA, E. R. de; BORGES, A. de S.; VASCONCELOS, E. C.; COSTA, F. P.; BETT, F.; VERRI, J. T.; QUEIROZ, L. R. F.; CARLOS, P. de O.; TOMAS, B. C.; CARVALHO, R. G. dos S.; PASCHOA, A.; CALTRAN, L. B.; GUILHON, L. A. EVOLUÇÃO DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E CLÍNICO DA DOENÇA DE CHAGAS AGUDA NO BRASIL: ESTUDO DE UMA DÉCADA. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, [S. l.], v. 6, n. 8, p. 1447–1458, 2024. DOI: 10.36557/2674-8169.2024v6n8p1447-1458.

MEDEIROS, C. DE A. et al.. Mapping the morbidity and mortality of Chagas disease in an endemic area in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 64, p. e5, 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Boletim Epidemiológico**. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, v. 55, 16 abr. 2024.

MOREL, C. M.. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 8, p. 1522–1523, ago. 2006.

MAZZETI, A. L.; DINIZ, L. F.; GONÇALVES, K. R.; WONDOLLINGER, R. S.; ASSÍRIA, T.; RIBEIRO, I.; BAHIA, M. T. Efeito sinérgico do alopurinol em combinação com compostos nitroheterocíclicos contra *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 2019, p. 02264-18, 2019.

NEISES, Bernhard; STEGLICH, Wolfgang. Método simples para a esterificação de ácidos carboxílicos. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 522-524, jul. 1978. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/anie.197805221>.

NGUYEN, T.; WASEEM, M. *Chagas Disease (American Trypanosomiasis)*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing, 2020.

NWAKA, Solomon; RAMIREZ, Benjamin; BRUN, Reto; MAES, Louis; DOUGLAS, Faith; RIDLEY, Robert. Advancing drug innovation for neglected diseases: criteria for lead progression. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, p. e440, 25 ago. 2009. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000440.

PACHECO, L. V.; SANTANA, L. S. .; BARRETO, B. C.; SANTOS, E. de S. .; MEIRA, C. S. . Oral transmission of Chagas disease: A literature review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. e31910212636, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i2.12636.

PATTERSON, Stephen et al. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 289-298, 2014.

PEDRIQUE, Belen et al. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment. **The Lancet Global Health**, v. 1, n. 6, p. e371-e379, 2013.

REIS, Rúbia Castro Fernandes Melo; REIS, Adriana Cotta Cardoso; TORCHELSEN, Fernanda Karoline Vieira Silva; LANA, Marta de; SALES JUNIOR, Policarpo Ademar; BRANDÃO, Geraldo Celio; BRAGA, Saulo Fehelberg Pinto; SOUZA, Thiago Belarmino de. Synthesis, trypanocidal and cytotoxic activities of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones derived from eugenol and analogues. **Medicinal Chemistry Research**, v. 31, n. 2, p. 278-289, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00044-022-02976-x>.

REIS, Rúbia Castro Fernandes Melo; SANTOS, E. G.; BENEDETTI, M. D.; REIS, Adriana Cotta Cardoso; BRANDÃO, Geraldo Celio; SILVA, G. N.; DINIZ, L. A.; FERREIRA, R. S.; CALDAS, I. S.; BRAGA, Saulo Fehelberg Pinto; SOUZA, Thiago Belarmino de. Design e síntese de novos 1,2,3-triazóis derivados de eugenol e análogos com atividade *in vitro* e *in vivo* contra *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 258, p. 115622, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115622>.

ROCHA, Maria I. F.; MARANHÃO, Thamires A.; DA FROTA, Maria M. C.; DE ARAUJO, Thayse K. A.; VERAS E SILVA, Willianne W. S.; SOUSA, Geraldo J. B.; DUARTE PEREIRA, Maria L.; DE ARAUJO FILHO, Antonio C. A. Mortalidade por doenças tropicais negligenciadas no Brasil no século XXI: análise de tendências espaciais e temporais e fatores associados. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 47, p. e146, 24 out. 2023. DOI: 10.26633/RPSP.2023.146.

ROLÓN, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Desenvolvimento de ensaio de microtitulação de resazurina para testes de sensibilidade a drogas de *Trypanosoma cruzi* epimastigotas. **Parasitology Research**, v. 99, p. 103-107, 2006.

SILVA JÚNIOR, E. N. da; JARDIM, G. A. M.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; CASTRO, S. L. de. Anti-*Trypanosoma cruzi* compounds: our contribution for the evaluation and insights on the mode of action of naphthoquinones and derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 10, p. 1780–1798, 2014.

SIMÕES, M. V. et al.. Chagas Disease Cardiomyopathy. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 31, n. 2, p. 173–189, mar. 2018.

VERLI, Hugo; BARREIRO, Eliezer J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química Nova**, v. 28, n. 1, fevereiro 2005. DOI: 10.1590/S0100-40422005000100018.

VIEIRA, J. L.; TÁVORA, F.; SOBRAL, M.; VASCONCELOS, G. G.; ALMEIDA, G.; FERNANDES, J. R.; DA ESCÓSSIA MARINHO, L. L.; DE MENDONÇA TROMPIERI, D. F.; DE SOUZA NETO, J. D.; MEJIA, J. Chagas Cardiomyopathy in Latin America Review. **Current Cardiology Reports**, v. 21, p. 8, 2019. doi: 10.1007/s11886-019-1095-y.

WERMUTH, C. G. (Org.). **The Practice of Medicinal Chemistry**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier Ltd., 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Report on Neglected Tropical Diseases 2023**. Geneva: WHO, 2023. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/365729/9789240067295-eng.pdf?sequence=1>

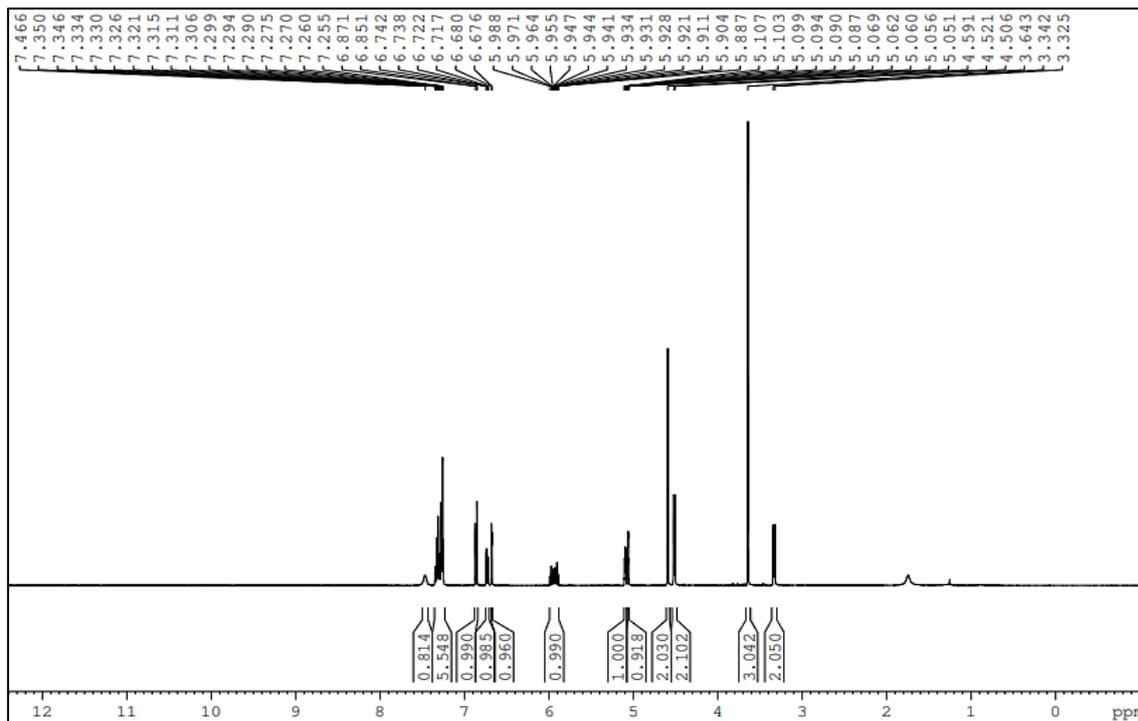
ZOLFIGOL, M. A.; GHAEMI, E.; MADRAKIAN, E. Nitração de fenóis sob condições suaves e heterogêneas. *Molecules*, v. 6, p. 614-620, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/60700614>.

## ANEXO 1

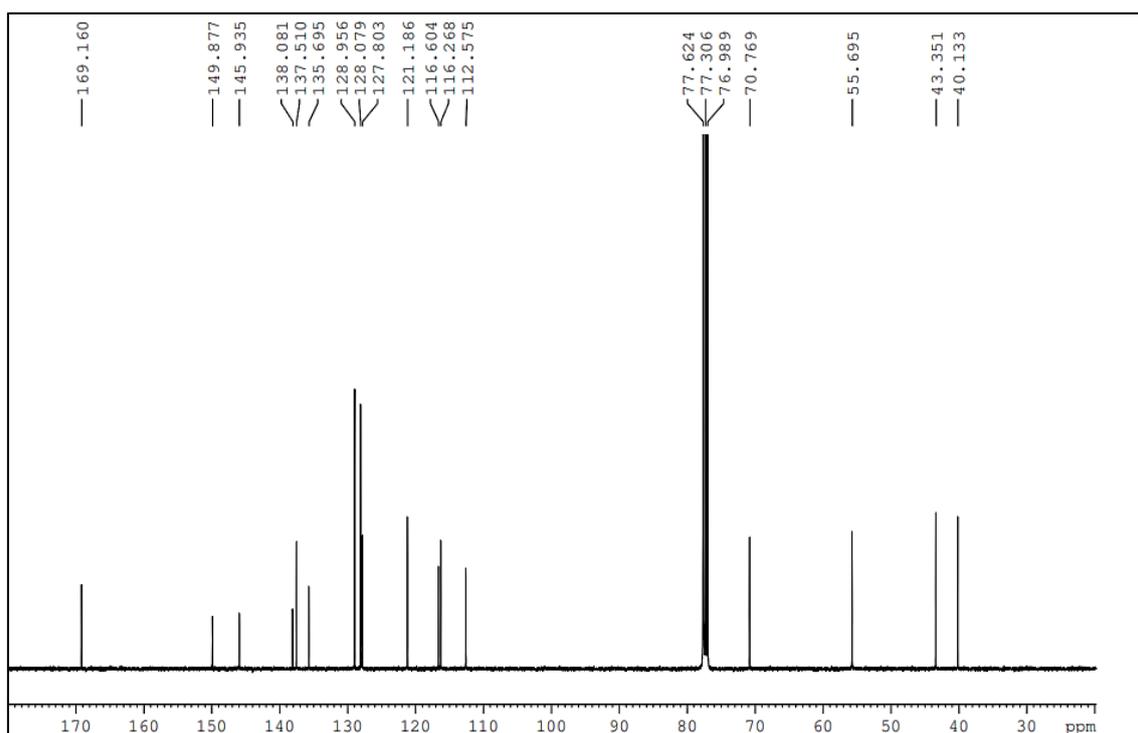
Espectros na região do infravermelho e de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das substâncias

**Substância 7:**

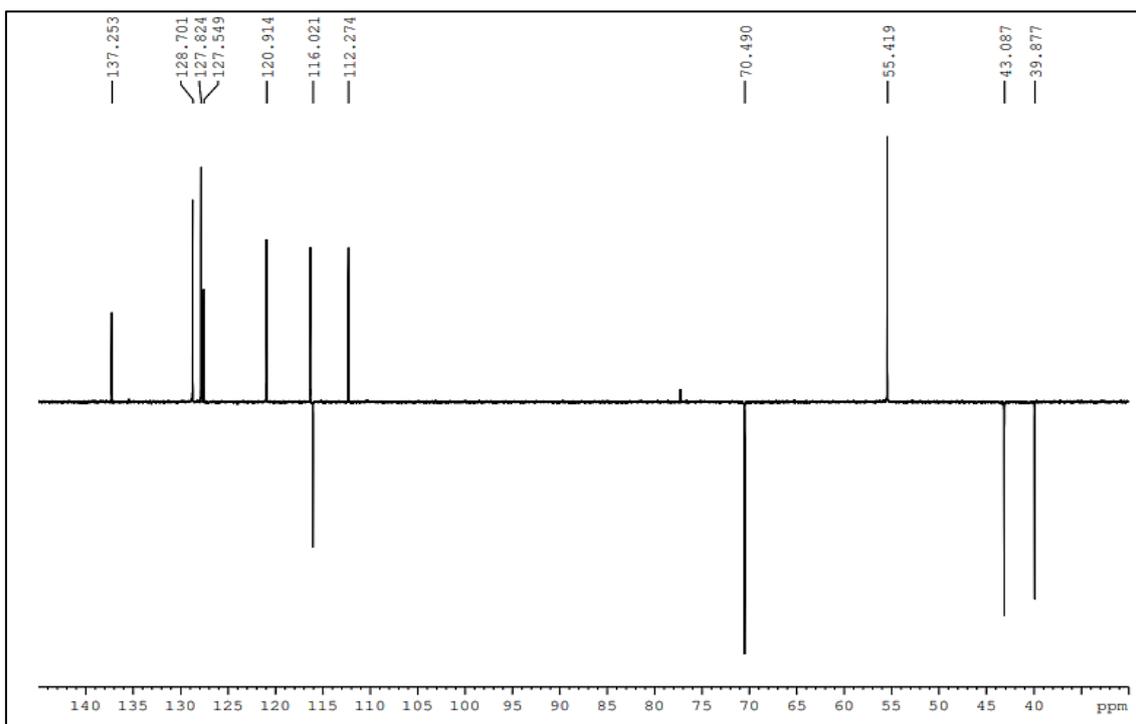
7.1: Espectro de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



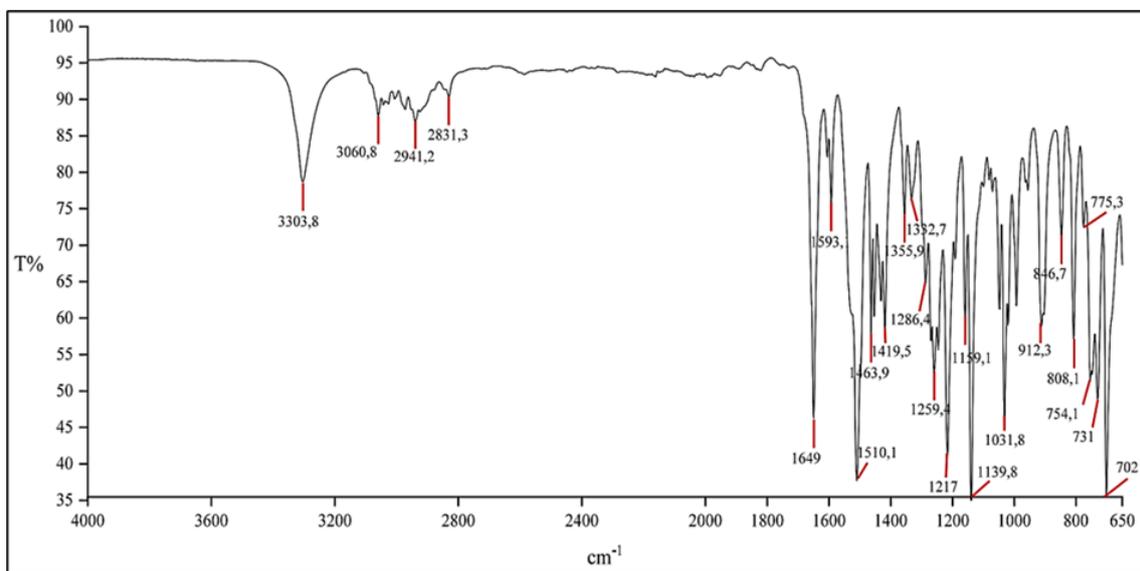
7.2 Espectro de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

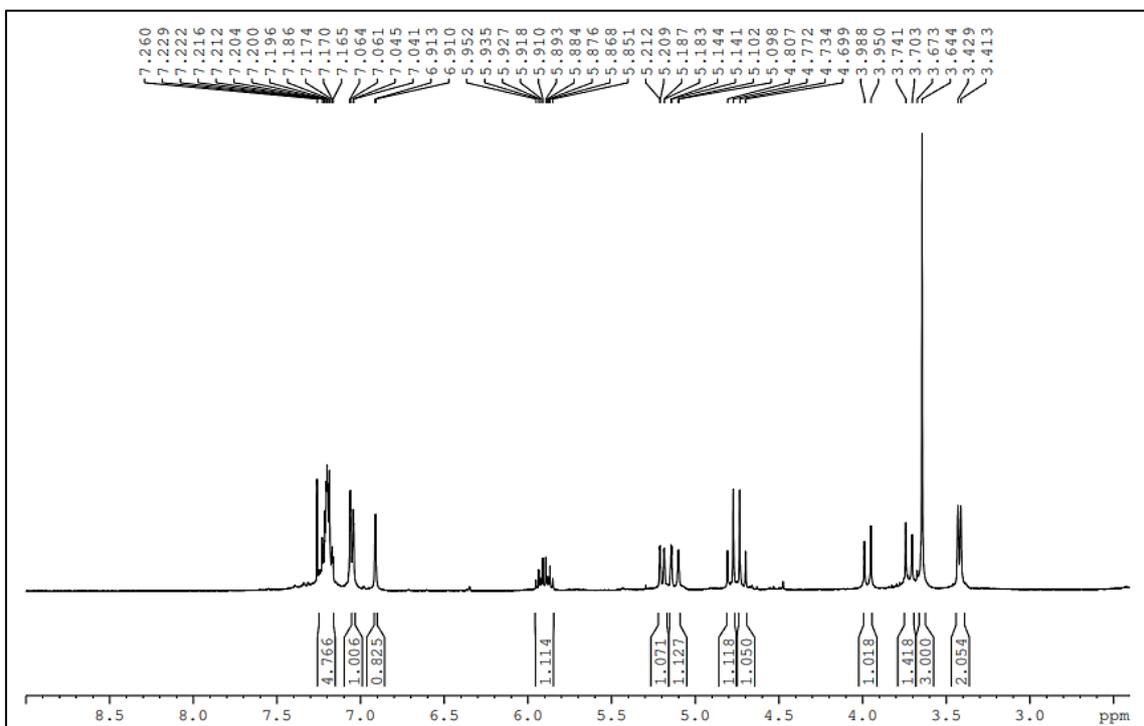
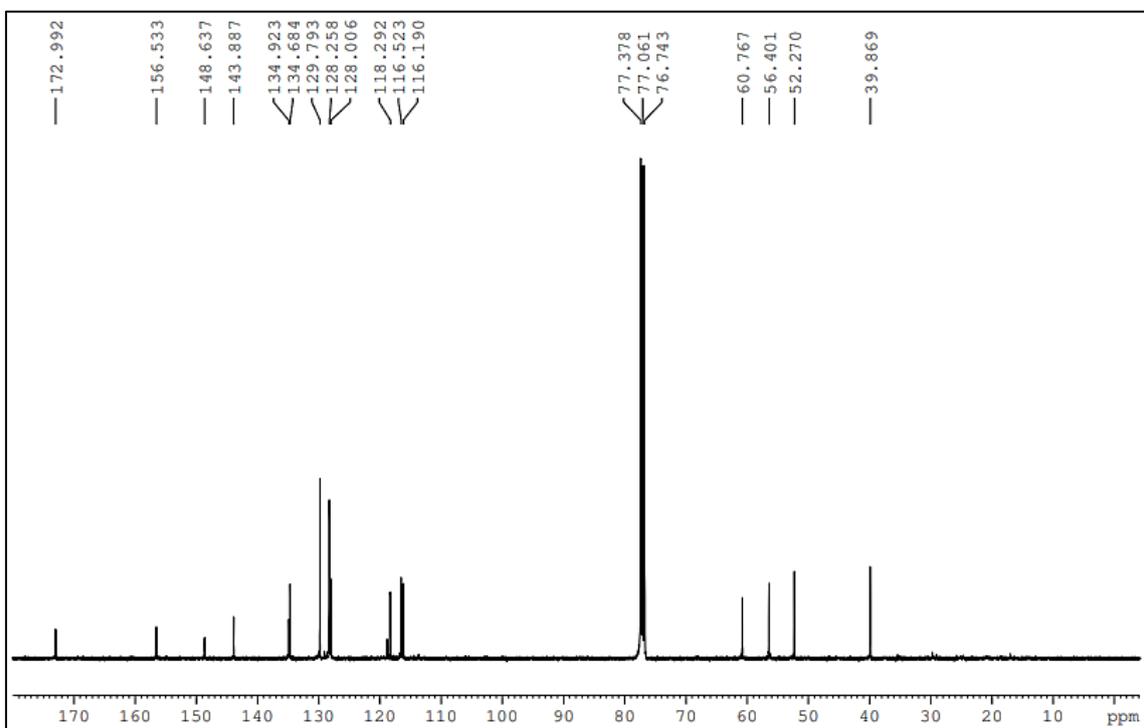


### 7.3 Subespectro de DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

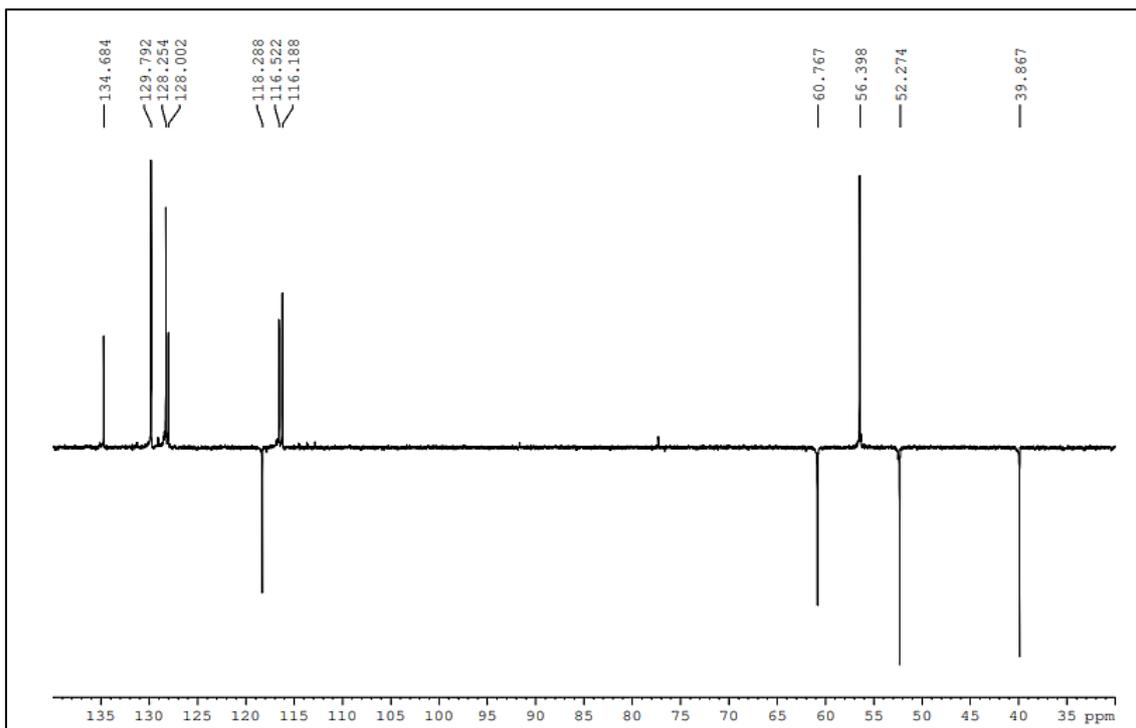


### 7.4 Espectro no infravermelho

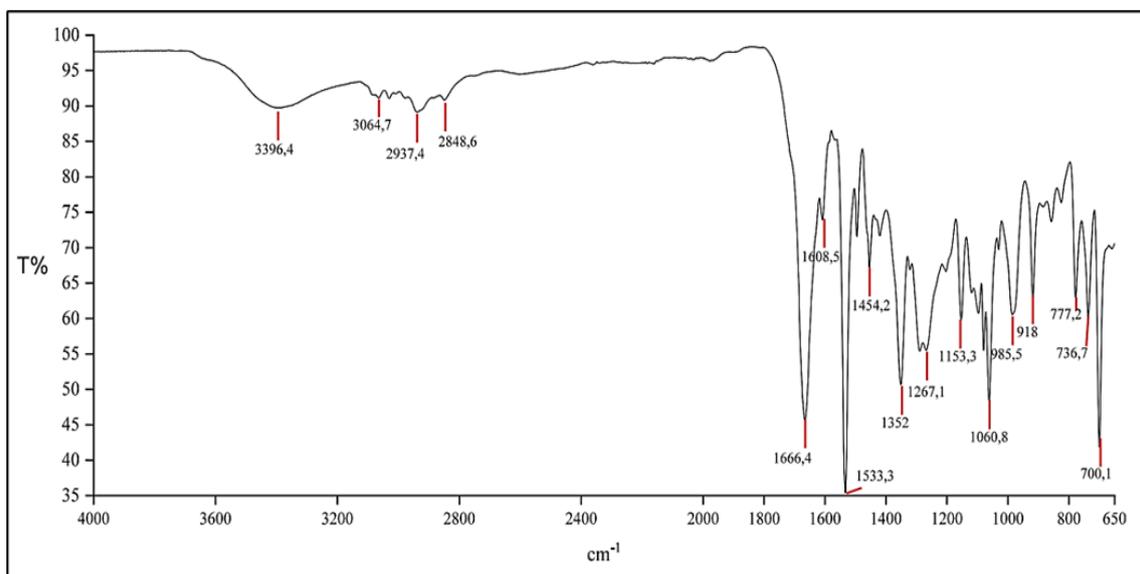


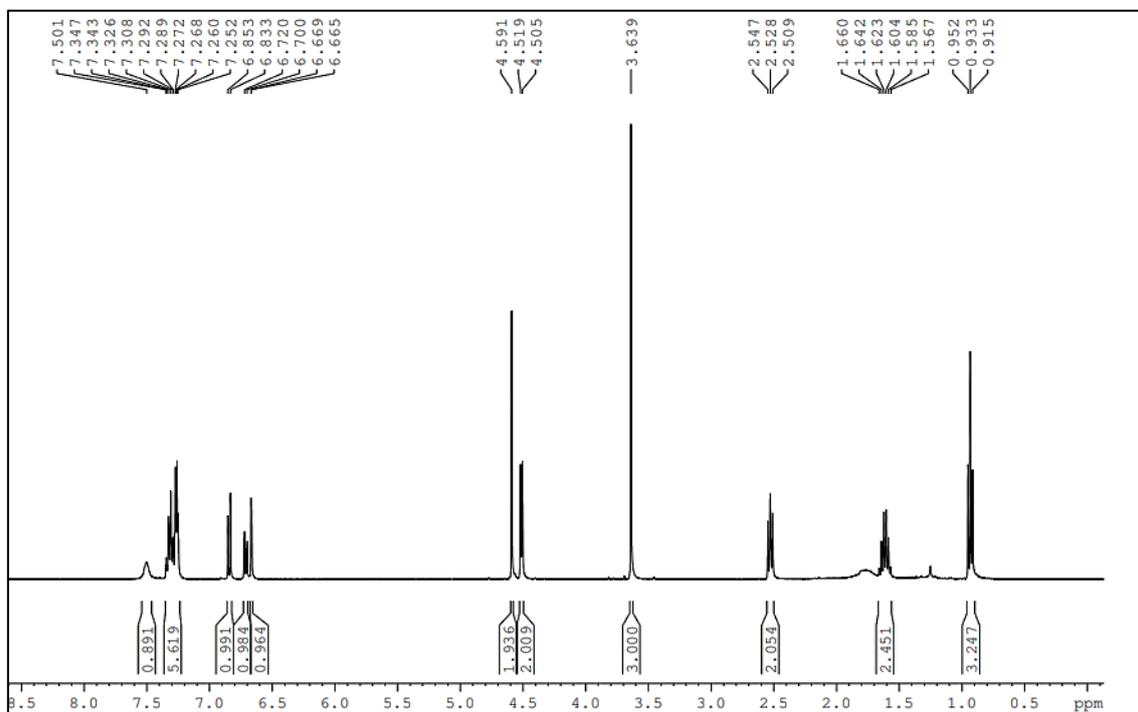
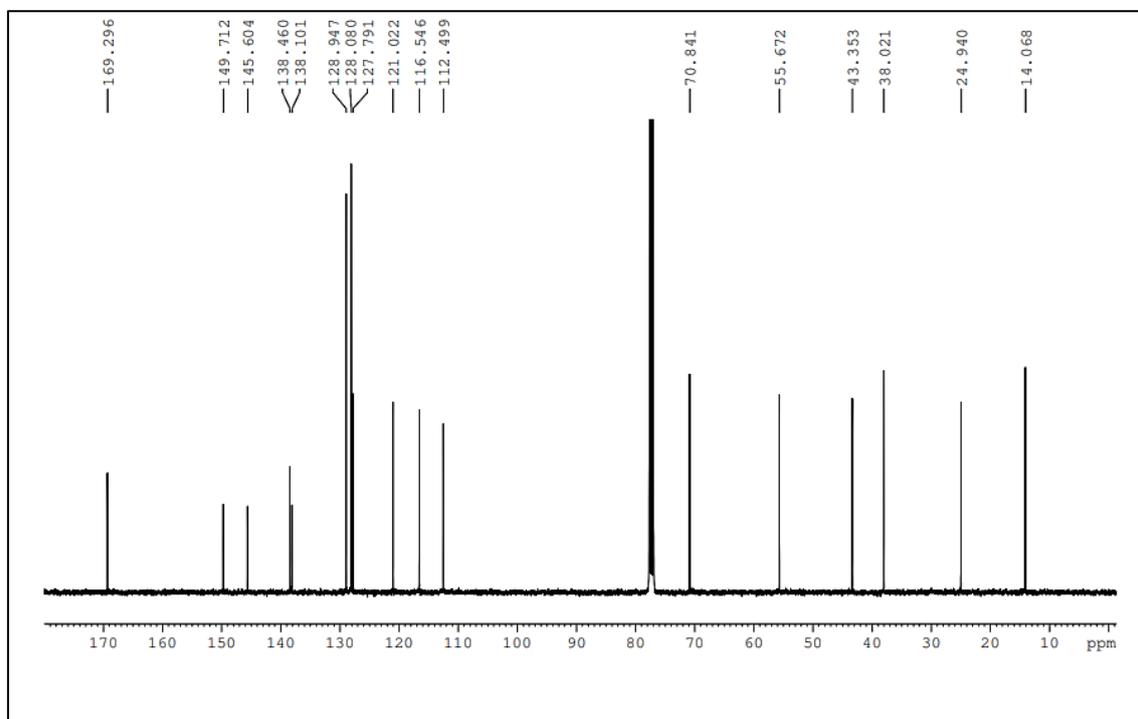
**Substância 8:**8.1: Espectro de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)8.2 Espectro de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

### 8.3 Subespectro de DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

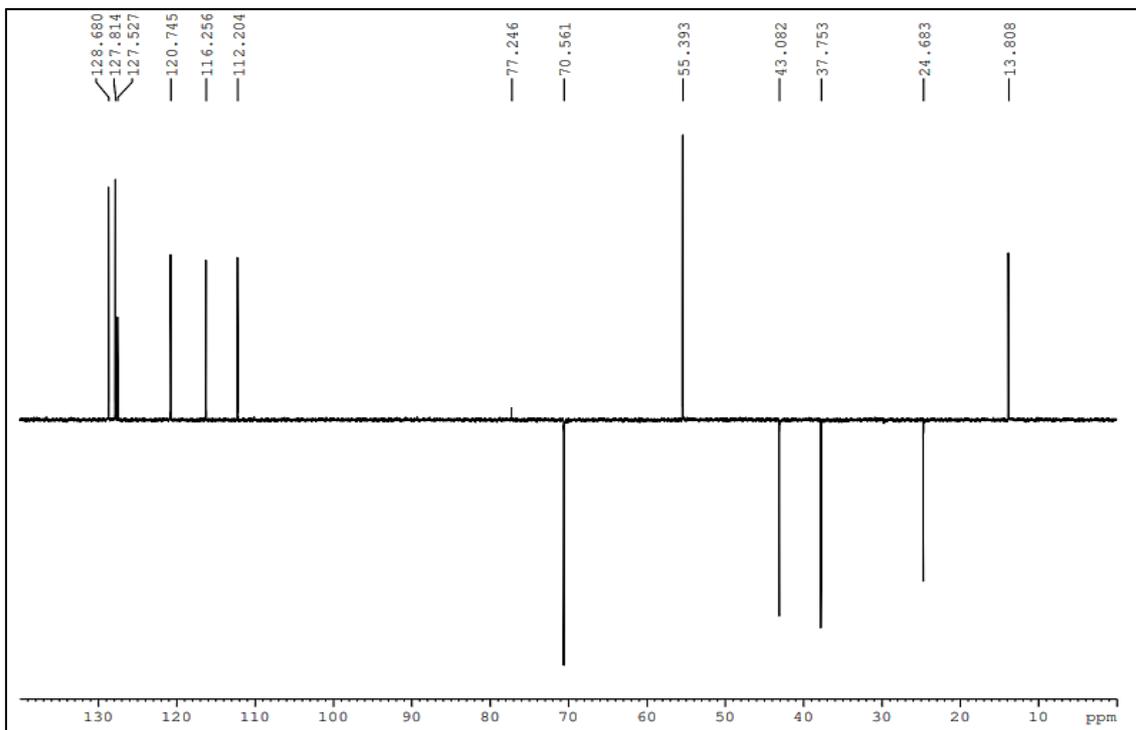


### 8.4 Espectro no infravermelho

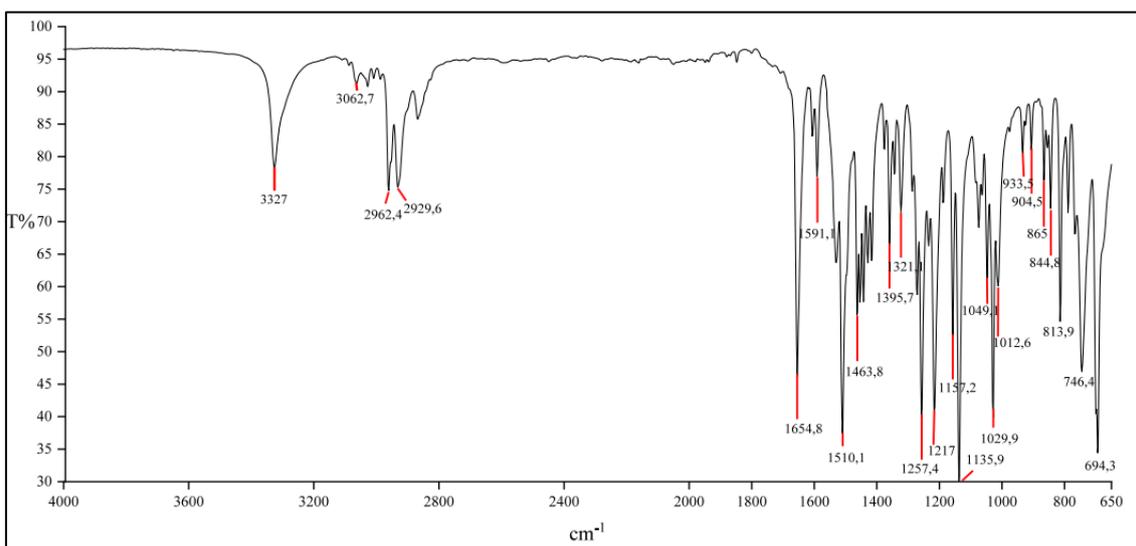


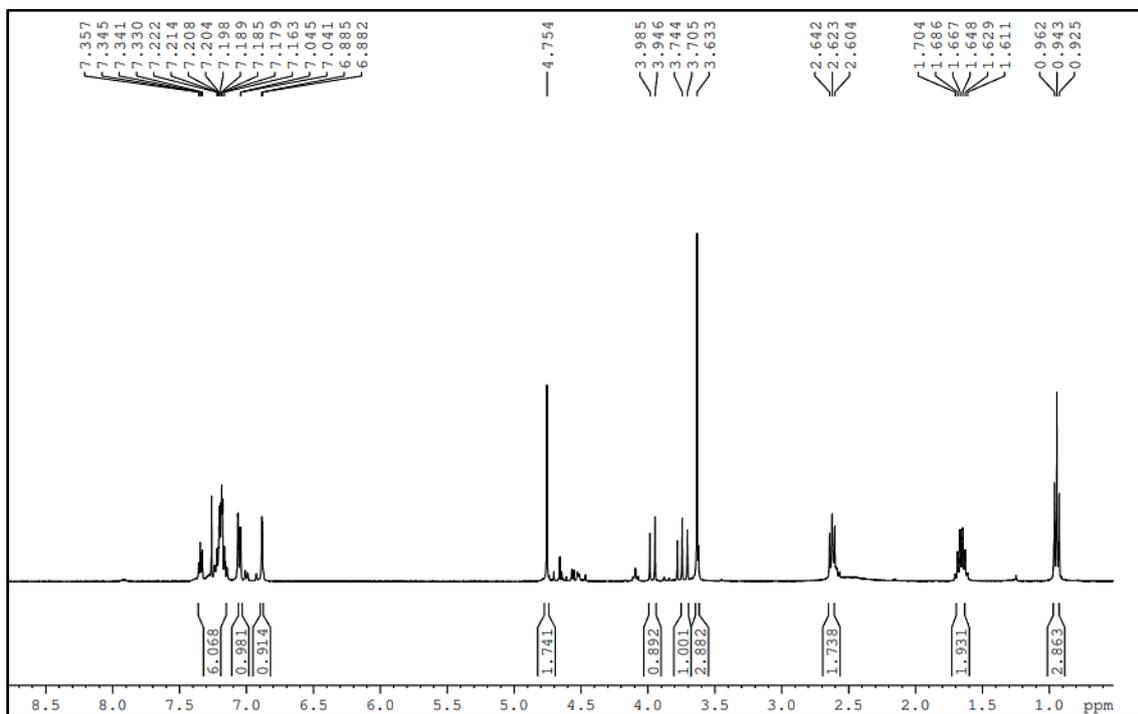
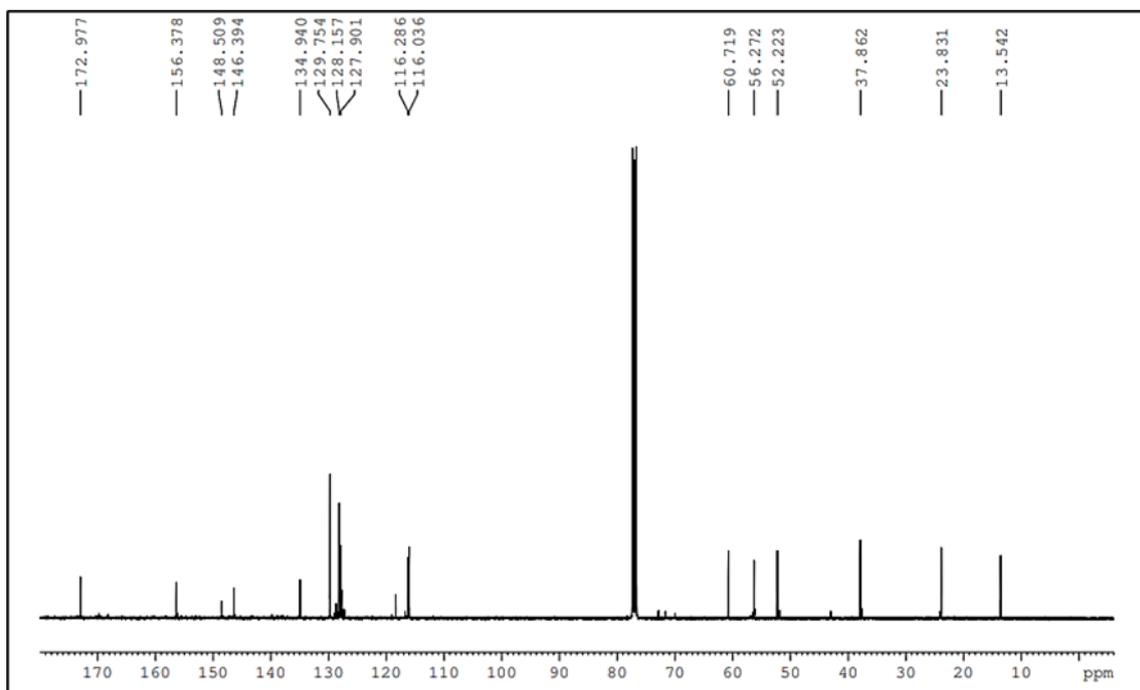
**Substância 9:**9.1: Espectro de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)9.2 Espectro de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

### 9.3 Subespectro de DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

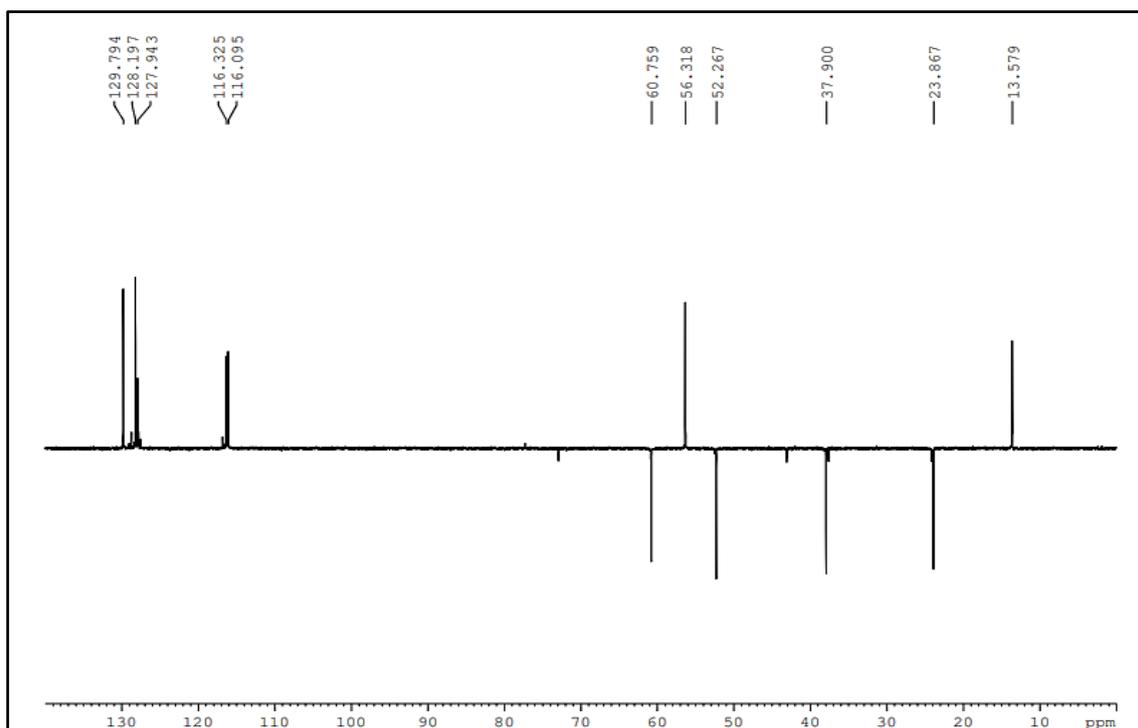


### 9.4 Espectro no infravermelho

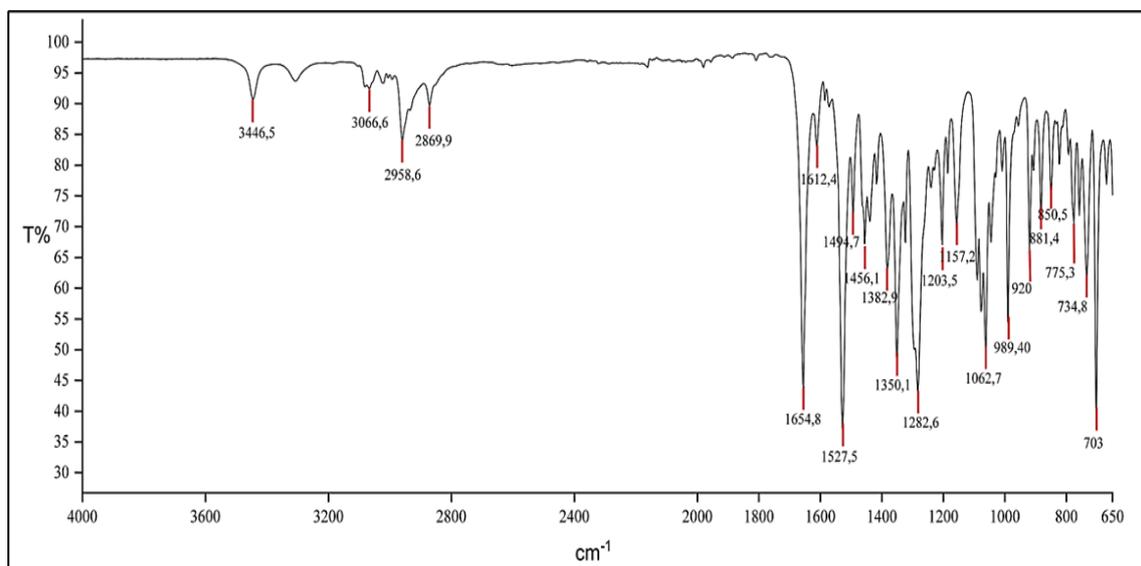


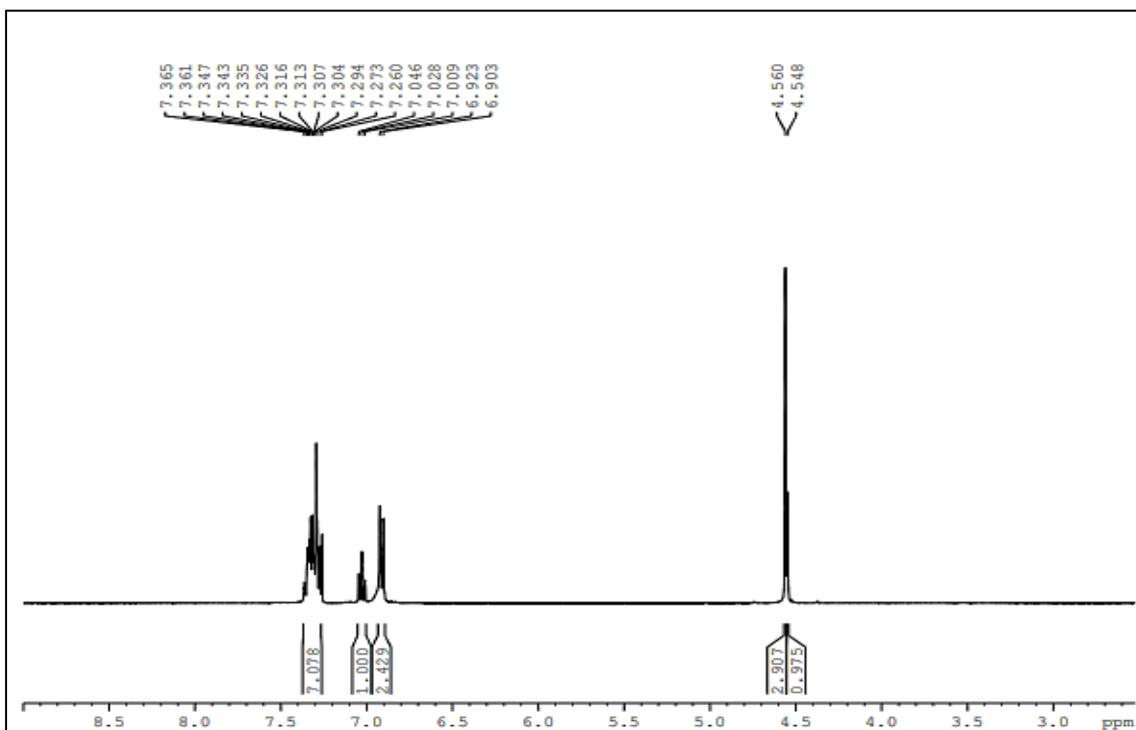
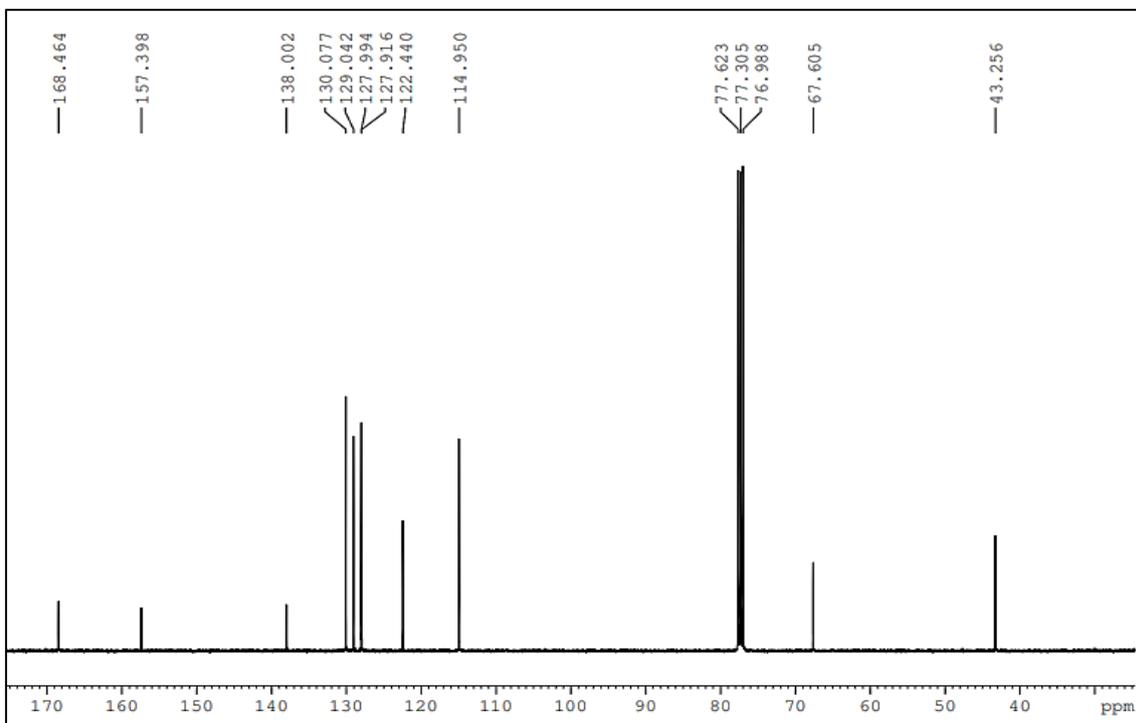
**Substância 10:**10.1: Espectro de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)10.2 Espectro de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

### 10.3 Subespectro de DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

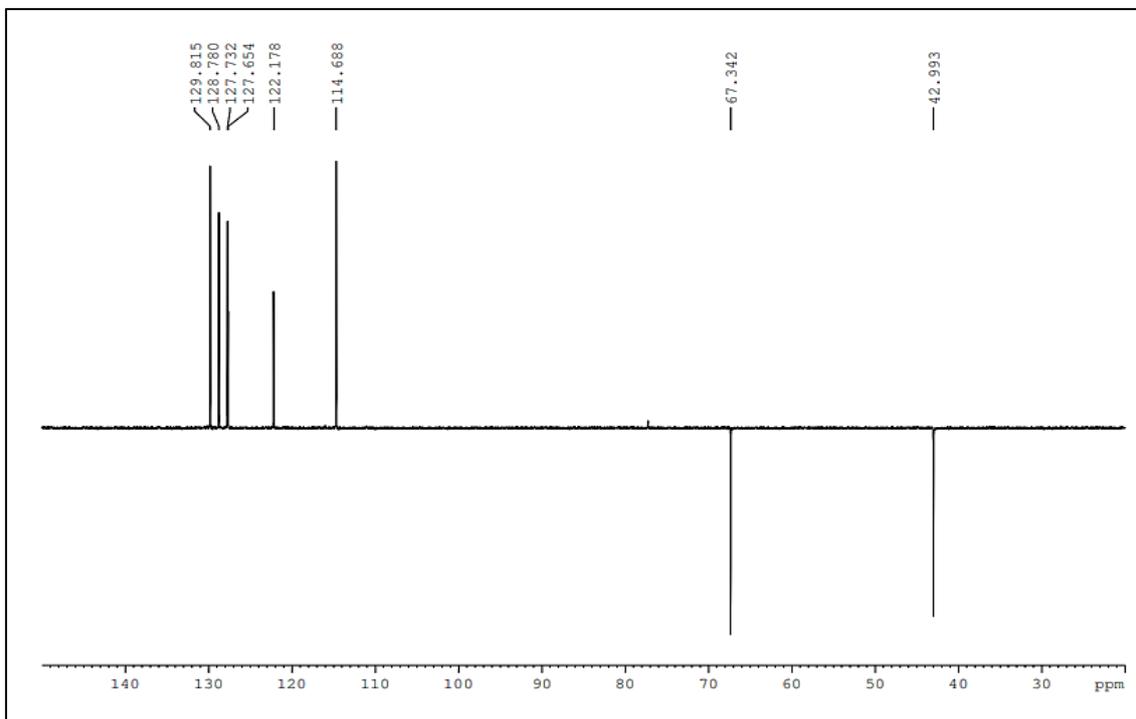


### 10.4 Espectro no infravermelho

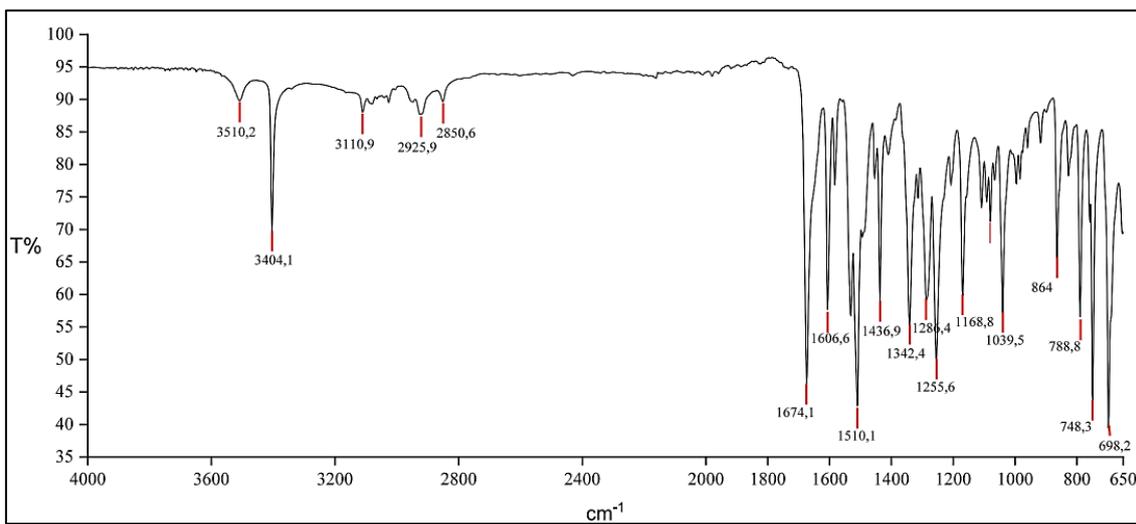


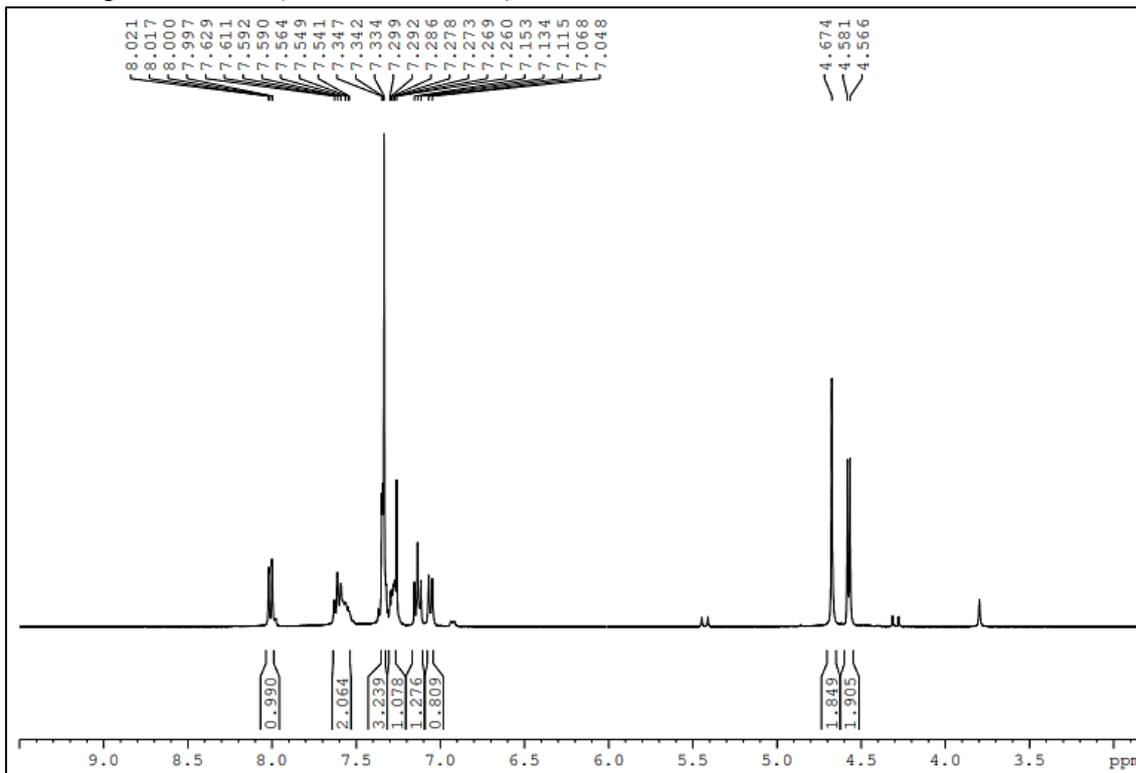
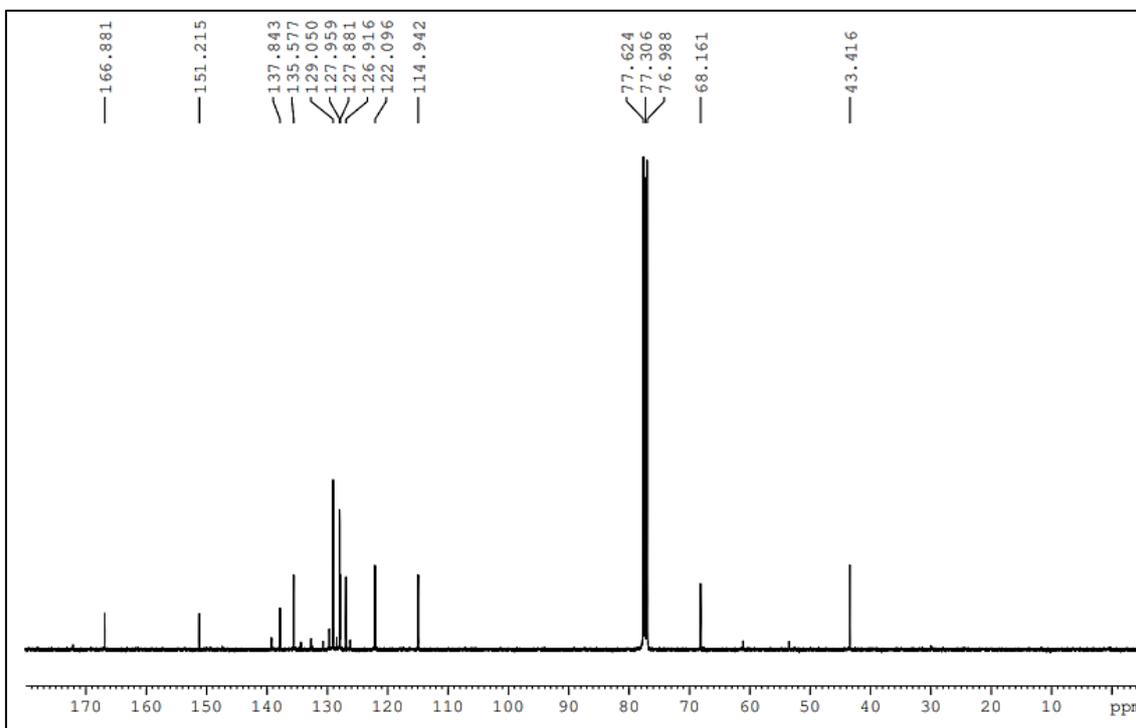
**Substância 11:**11.1: Espectro de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)11.2 Espectro de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

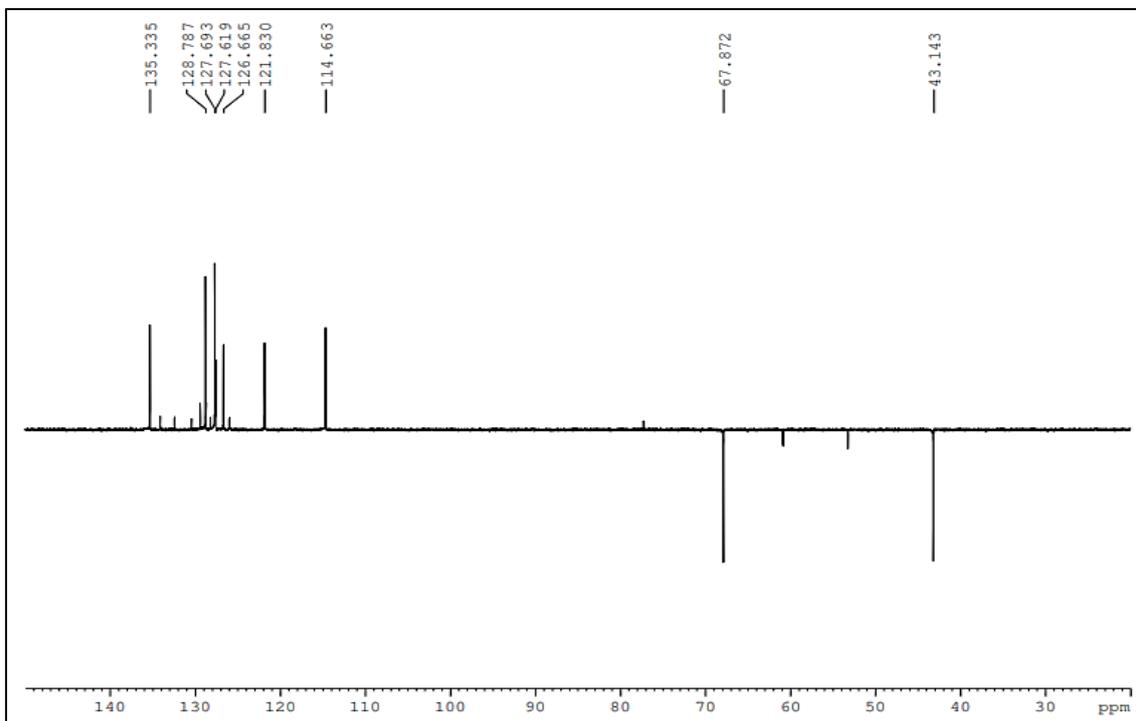
### 11.3 Subespectro de DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)



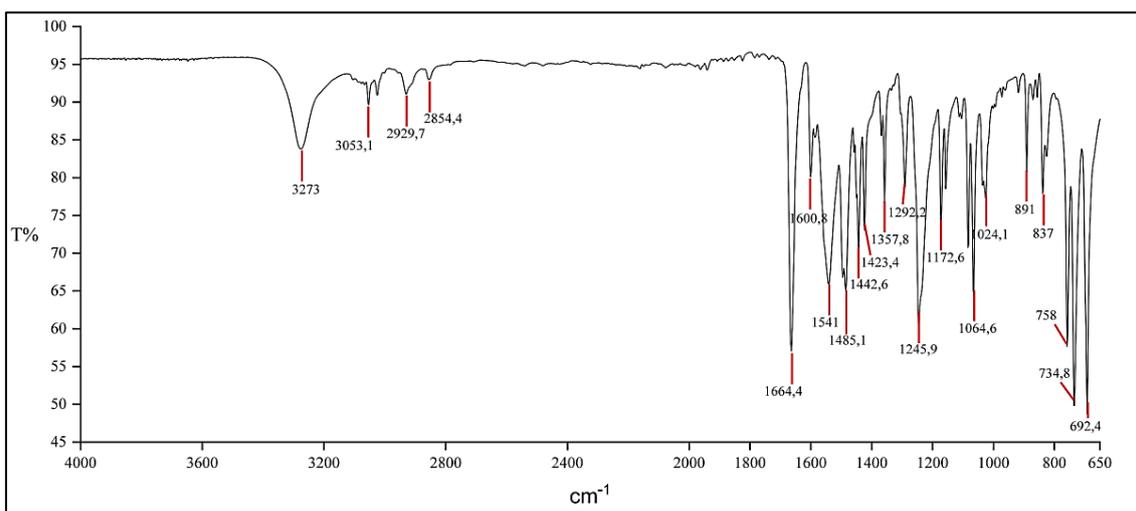
### 11.4 Espectro no infravermelho

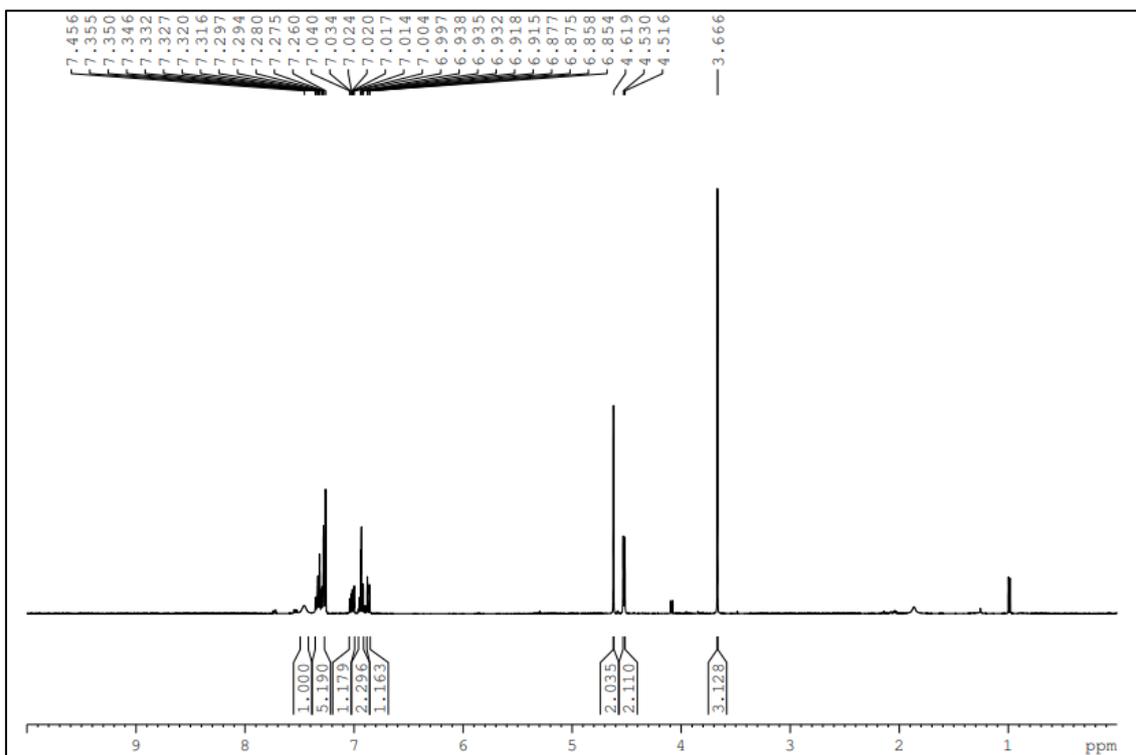
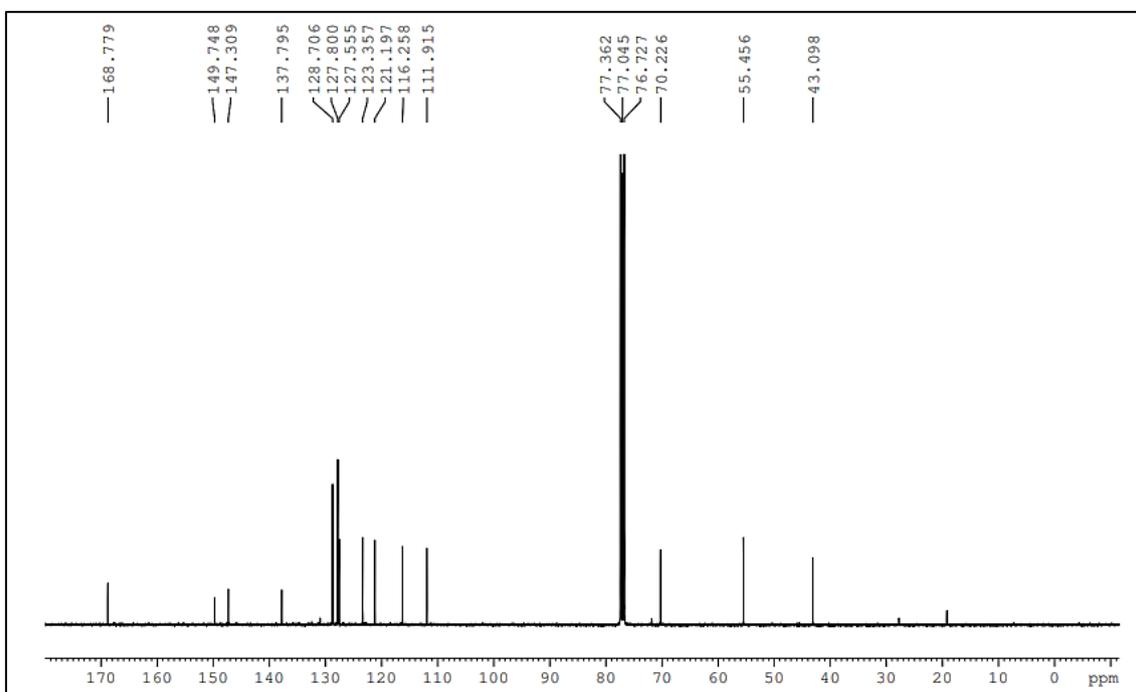


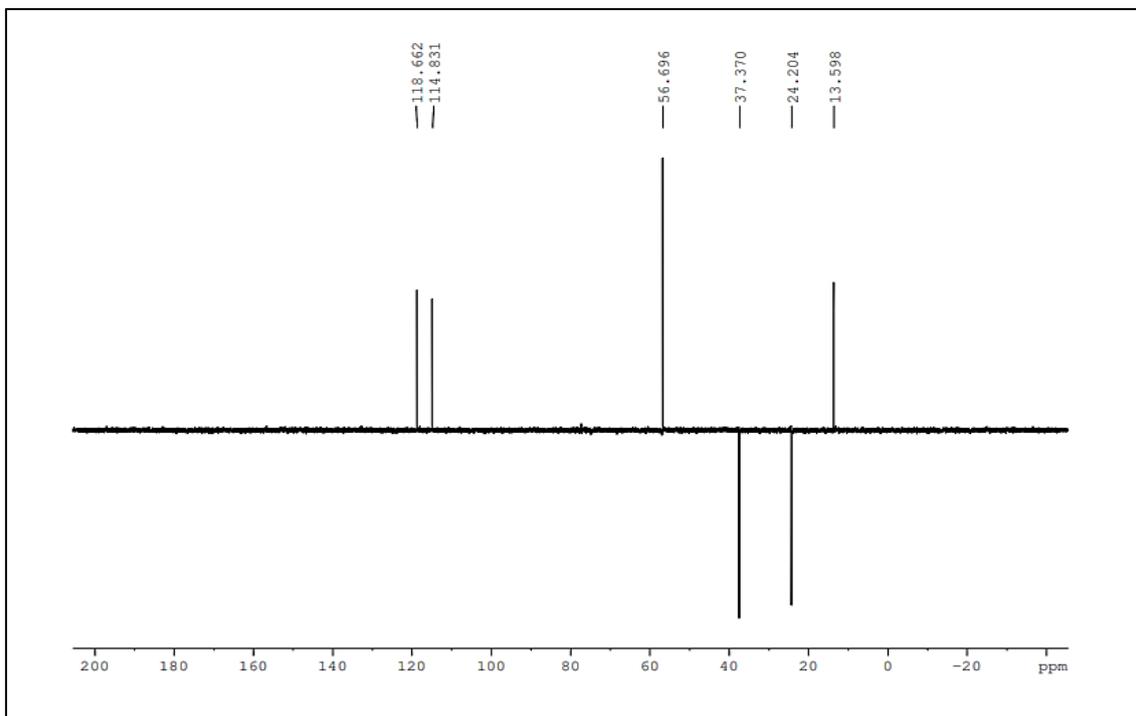
**Substância 12:**12.1: Espectro de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)12.2 Espectro de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

12.3 Subespectro de DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

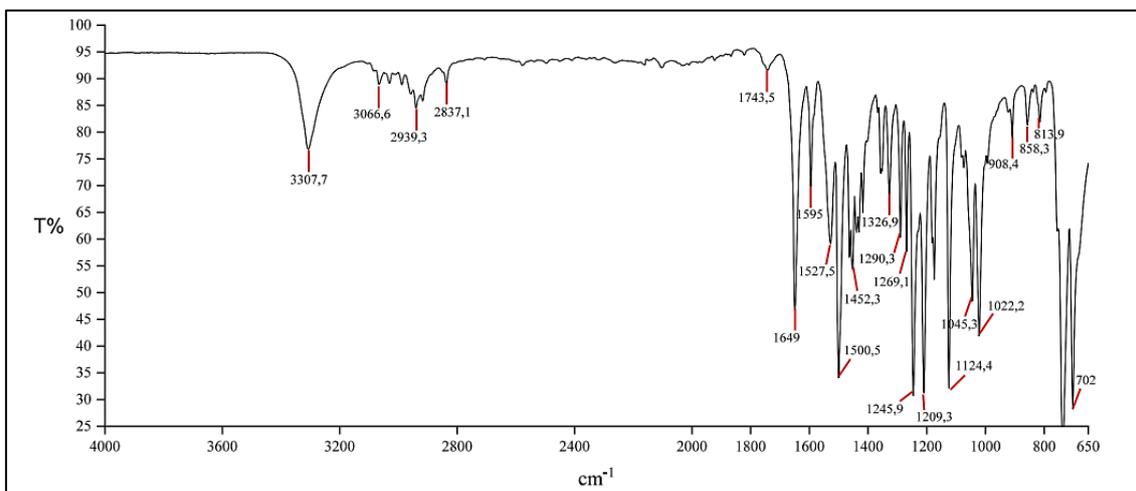
## 12.4 Espectro no infravermelho

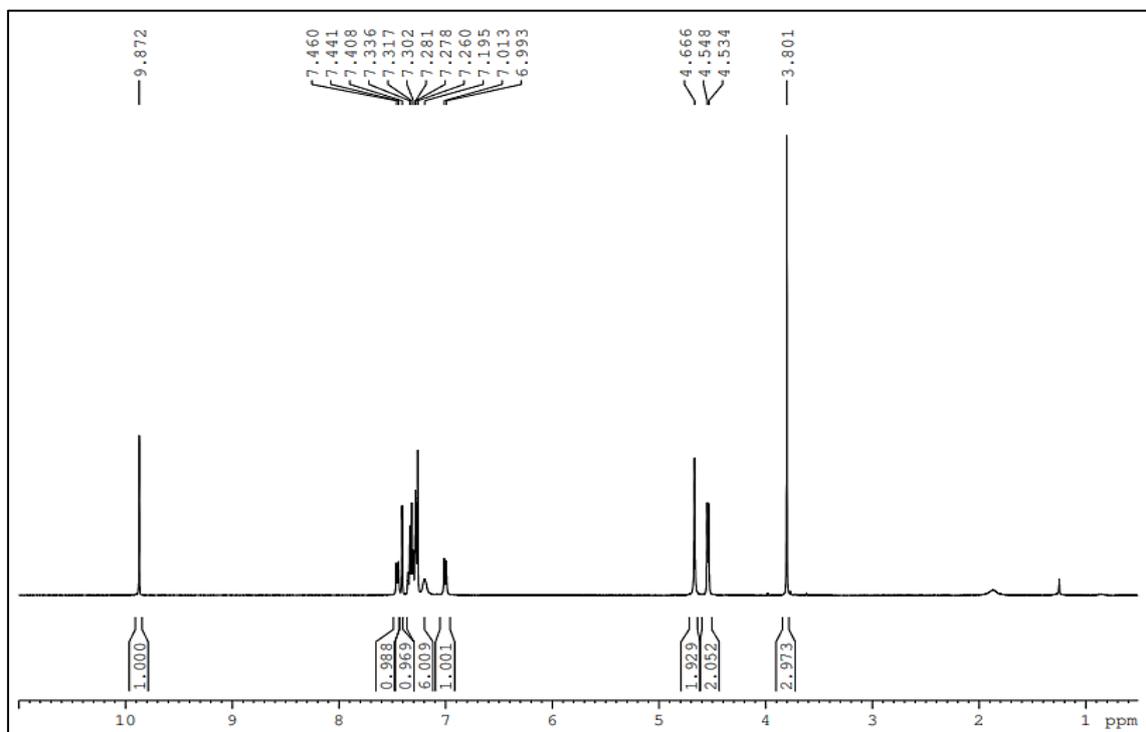
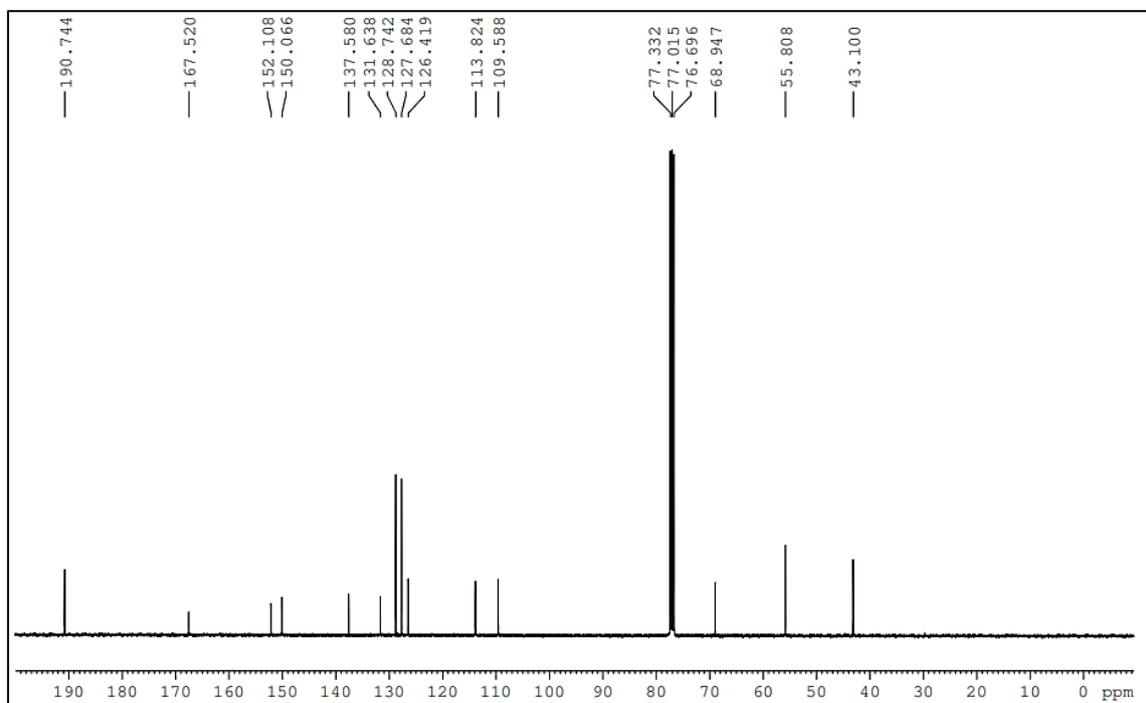


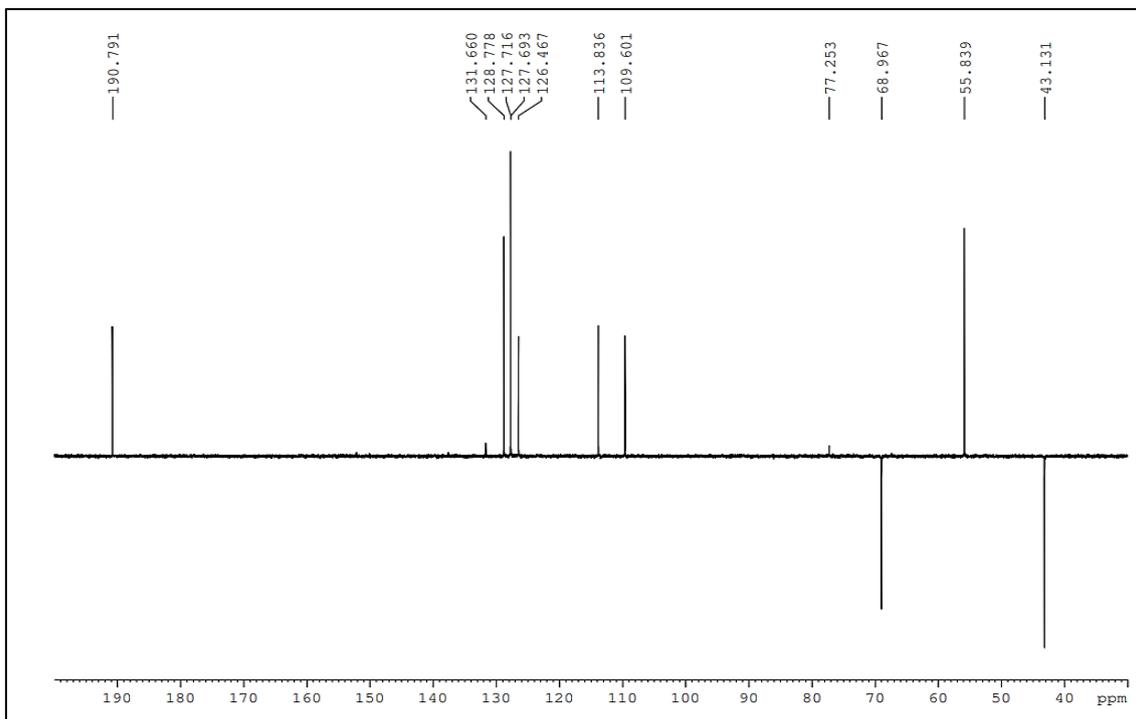
**Substância 13:**13.1: Espectro de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)13.2 Espectro de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

13.3 Subespectro de DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

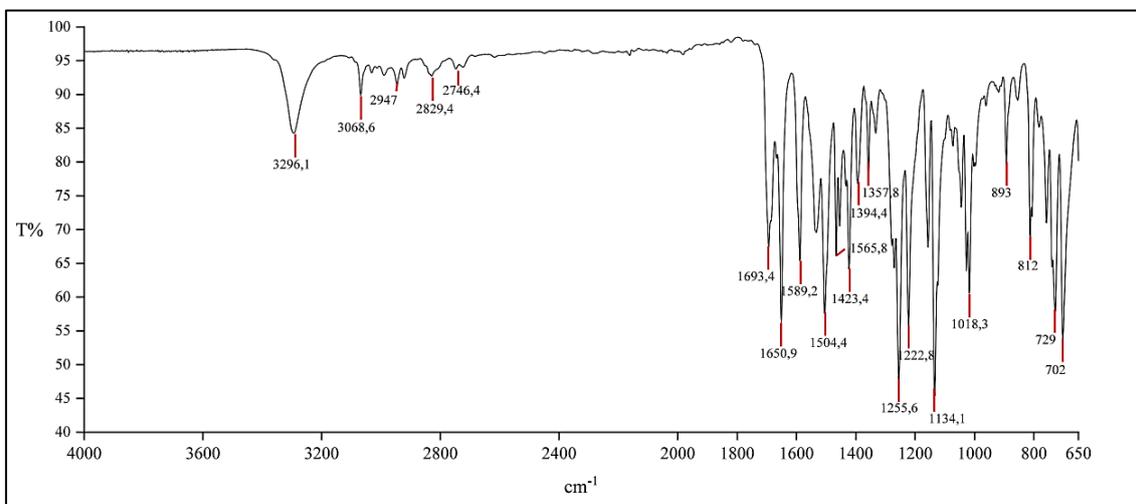
## 13.4 Espectro no infravermelho

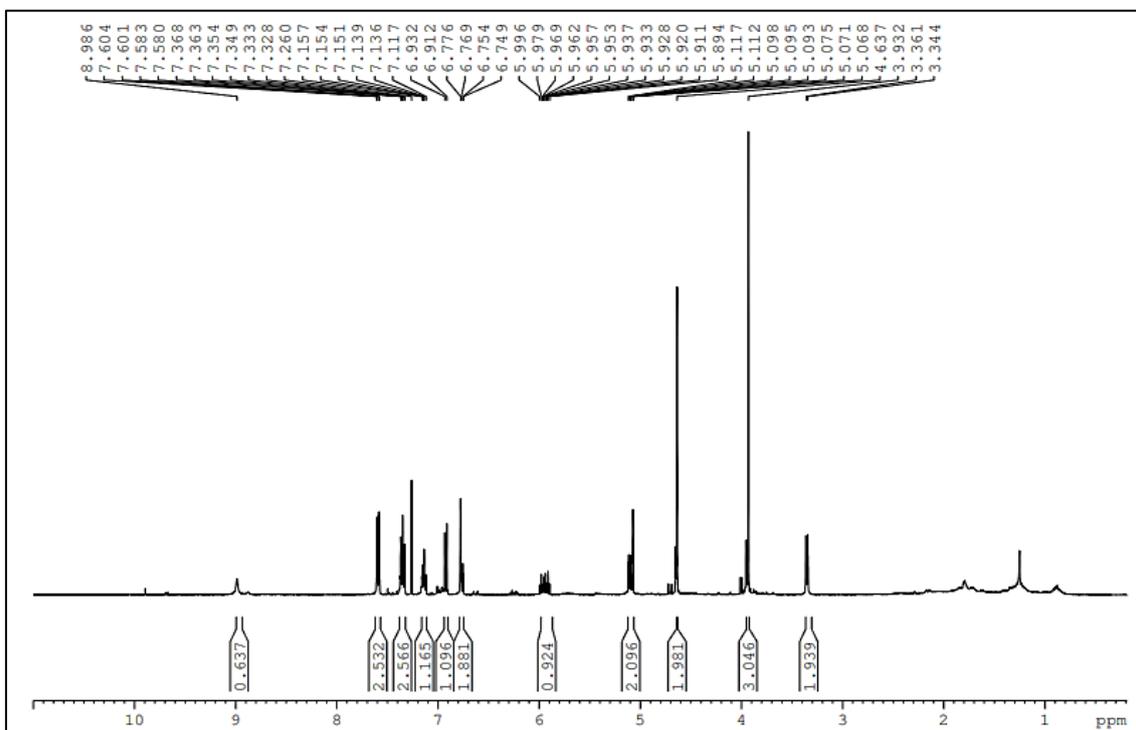
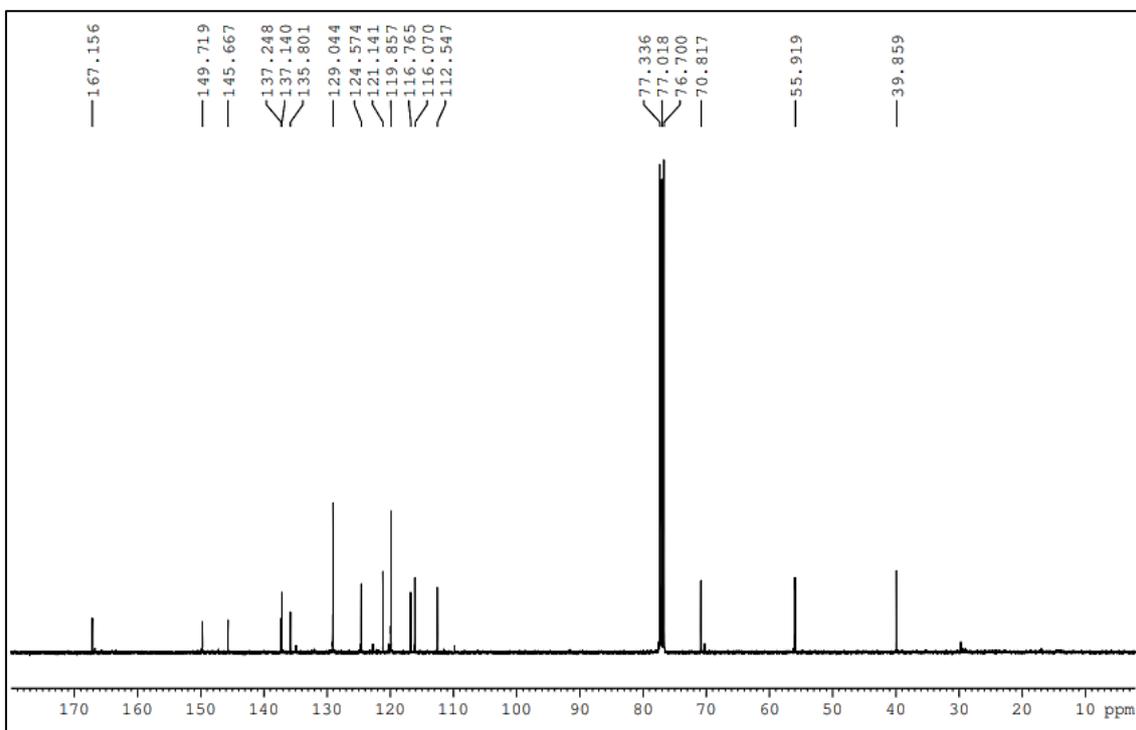


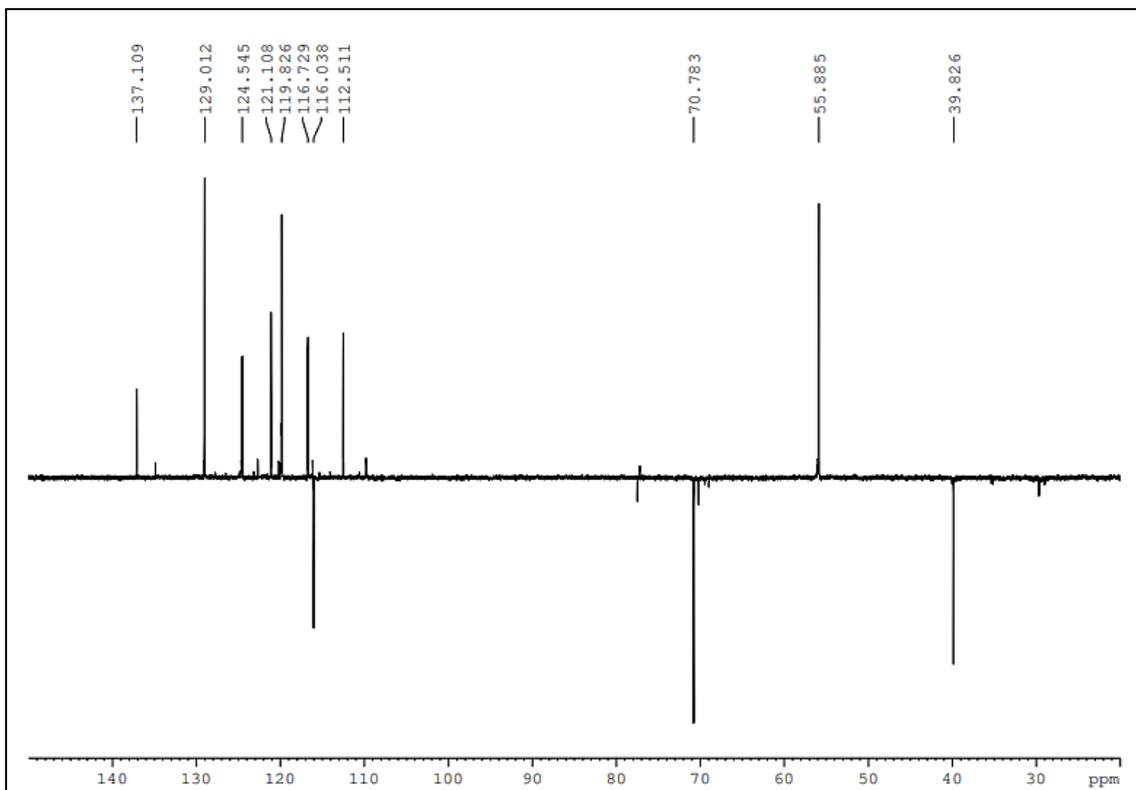
**Substância 14:**14.1: Espectro de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)14.2 Espectro de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

14.3 Subespectro de DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

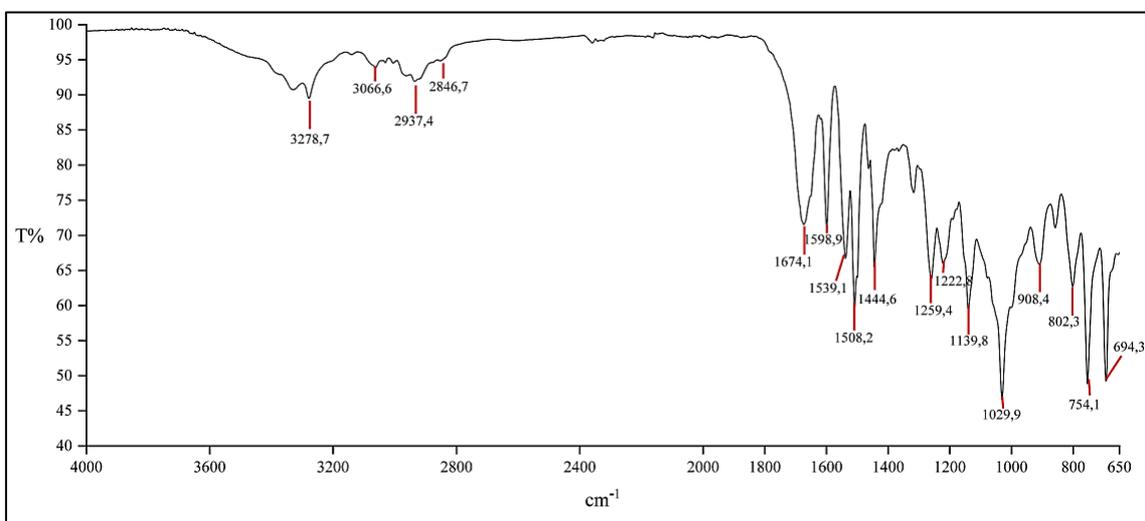
## 14.4 Espectro no infravermelho

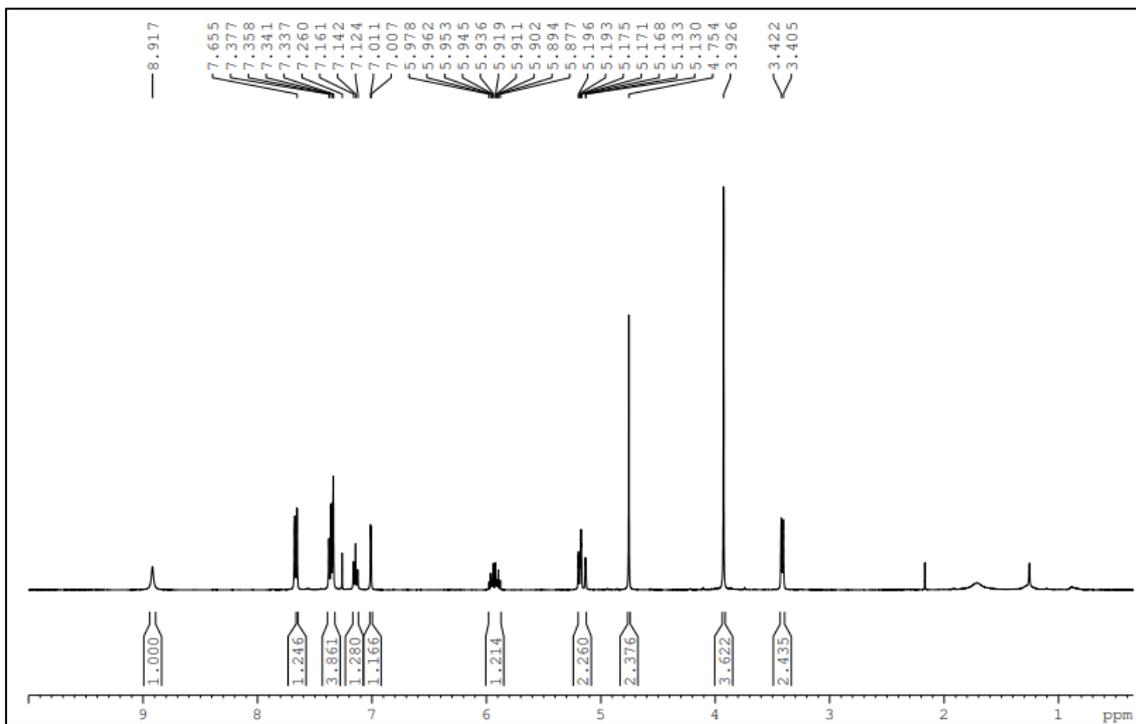
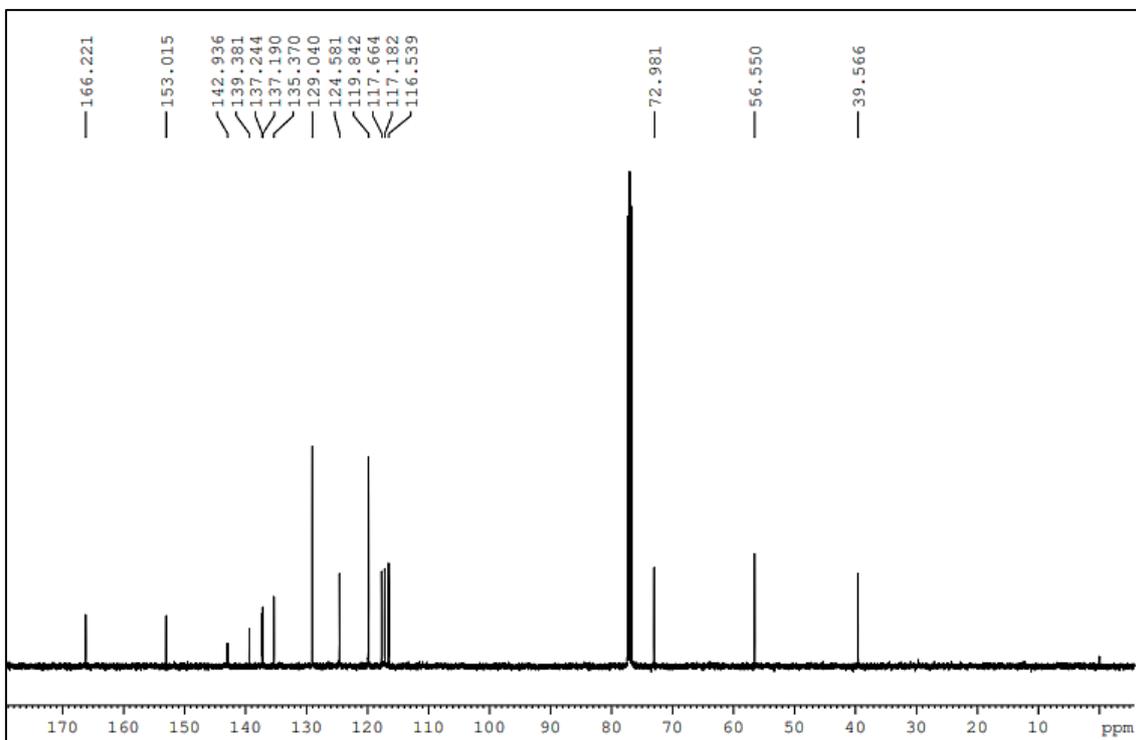


**Substância 15:**15.1: Espectro de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)15.2 Espectro de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

15.3 Subespectro de DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

## 15.4 Espectro no infravermelho



**Substância 16:**16.1: Espectro de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)16.2 Espectro de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

16.3 Subespectro de DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)