

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Planejamento de fármacos anti-*T. cruzi*:
Síntese de compostos nitrofurânicos, avaliação da atividade
biológica *in vitro* e estudos de relações estrutura-atividade

Fanny Palace-Berl

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Tit. **Leoberto Costa Tavares**

Co-orientadora:
Prof. Dra. **Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto**

SÃO PAULO
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Planejamento de fármacos anti-*T. cruzi*:
Síntese de compostos nitrofurânicos, avaliação da atividade
biológica *in vitro* e estudos de relações estrutura-atividade

Fanny Palace-Berl

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018. O original encontra-se disponível no
Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Tit. **Leoberto Costa Tavares**

Co-orientadora:
Prof. Dra. **Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto**

SÃO PAULO
2016

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Palace-Berl, Fanny
P153pl Planejamento de fármacos anti-*T. cruzi* : síntese de compostos nitrofurânicos, avaliação da atividade biológica *in vitro* e estudos, de relações estrutura-atividade / Fanny Palace-Berl. -- São Paulo, 2016.
375p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Tavares, Leoberto Costa
Co-orientador: Pasqualoto, Kerly Fernanda Mesquita

1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 2. Síntese : Química orgânica
3. Ensaio biológico: Farmacologia 4. Quimiometria 5. QSAR I. T. II. Tavares, Leoberto Costa, orientador III. Pasqualoto, Kerly Fernanda Mesquita, co-orientador.

615.19 CDD

Fanny Palace-Berl

Planejamento de fármacos anti-*T. cruzi*:
Síntese de compostos nitrofurânicos, avaliação da atividade
biológica *in vitro* e estudos de relações estrutura-atividade

Comissão Julgadora
da

Tese para obtenção do título de
Doutor

Prof. Tit. **Leoberto Costa Tavares**
orientador/presidente

Prof. Emérito **Walter Colli**
IQ/USP

Profa. Tit. **Márcia Miguel Castro Ferreira**
IQ/UNICAMP

Prof. Dr. **José Angelo Lauletta Lindoso**
IMT/FM/USP

São Paulo, 13 de dezembro de 2016.

"The state of mind which enables a man to do work of this kind ... is akin to that of the religious worshipper or the lover; the daily effort comes from no deliberate intention or program, but straight from the heart." Albert Einstein (1879-1955)

—From "Principles of Research," a speech delivered at Max Planck's 60th birthday celebration, 1918; published in *Mein Weltbild*, by Albert Einstein (Amsterdam: Querido Verlag, 1934); reprinted in *Ideas and Opinions*, by Albert Einstein (New York: Crown, 1954), pp. 224-227; *Expanded*, p. 235.

*Dedico este trabalho ao Johann H. Berl por
toda nossa história de amor, amizade e
aprendizado.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Tit. Leoberto Costa Tavares pela orientação e oportunidade dada em fazer parte do grupo de pesquisa LPDF. Agradeço o apoio e confiança durante estes anos, pois foram fundamentais para o desenvolvimento pessoal e acadêmico-científico em mais uma etapa de minha formação. Agradeço principalmente a paciência, atenção e conselhos em momentos de dificuldades profissionais e pessoais. Obrigada por possibilitar alcançar mais esta conquista!

À Profa. Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto (Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan), co-orientadora deste trabalho, pelos ensinamentos na área de modelagem molecular, análise exploratória, estudos de relações estrutura-atividade, entre outros. Sua orientação e colaboração foi muito importante, muito obrigada por esta oportunidade de aprendizado! Agradeço também a permissão de utilização das licenças dos programas *MOLSIM 3.2. (The Chem21 Group)* e *Leadit 2.1.8*, essenciais para realização deste trabalho.

À Profa. Tit. Bianca Zingales (Laboratório de Biologia Molecular de Tripanosomatídeos, Departamento de Bioquímica/IQ/USP), colaboradora deste trabalho (co-orientadora extra-oficial). Essa oportunidade de aprendizado tanto na parte técnica quanto acadêmica foi única! Agradeço toda a compreensão, carinho, ensinamentos repassados e oportunidades geradas durante este trabalho. Agradeço também pela disponibilização das cepas Silvio X10 c11, Bug 2149 c110 e Colombiana na forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*.

Ao químico João Sussumu Murayama pelo apoio profissional como técnico responsável do LPDF e colaboração nas sínteses e ensaios. Agradeço também sua sincera amizade, por todo o carinho e altruísmo que possui.

Ao grupo LPDF: Adelson, Aline (*padawan*), Ana Carolina, Carolina, Laura e Leonardo (*nerd-desc.*) pela oportunidade de trabalhar com vocês, pelo companheirismo e amizade!

Aos amigos Dr. Salomão Dória Jorge e Profa. Dra. Marina Ishii por todas as conversas divertidas, apoio, ensinamentos e valiosos conselhos profissionais e pessoais. Vocês são amigos maravilhosos!

Ao Dr. Adilson Kleber Ferreira, Dr. Ricardo Alexandre de Azevedo, a Me. Sarah Fernandes Teixeira e ao professor Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto do Departamento de Imunologia (ICB/USP) pela disponibilidade de realização dos ensaios de citotoxicidade frente a células LL-24 (fibroblastos) (dados reportados em artigo Palace-Berl, 2015).

Ao grupo do Laboratório de Biologia Molecular de Tripanosomatídeos: Mariana, Solange, Pamela (*berries*) e Marcelo por toda a atenção, amizade e diversos ensaios que realizamos juntos, sempre aprendendo coisas novas!

À professora Dra. Cristina Northfleet de Albuquerque pela amizade e aprendizado durante a realização do estágio de aprimoramento didático (PAE) na disciplina FBT0526 - Síntese Orgânica Aplicada à Obtenção de Fármacos.

À Dra. Maria Inês de Almeida Gonçalves, FCF/USP, pela atenção e realização dos espectros de RMN. Assim como ao Prof. Dr. Paulo Moreno (IQ-USP) pelo auxílio na interpretação do espectro de HMBC e NOESY.

À Dra. Carolina Borsoi Moraes e Dr. Lúcio Holanda Gondim de Freitas Junior do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Plataforma de Química, Biologia e Triagem (CBSP - *Chemical Biology and Screening Platform*), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) por realizarem os ensaios frente a forma amastigota do *T. cruzi* e, principalmente ao Caio Haddad Franco pela atenção e execução dos ensaios.

Ao Professor Assoc. Mário Steindel do Laboratório de Protozoologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) por possibilitar a realização dos ensaios de determinação da inibição das enzimas tripanotiona redutase de *T. cruzi* e glutathione redutase humana, além da realização dos ensaios de determinação do potencial de redução da membrana mitocondrial do *T. cruzi*. Agradeço também o acompanhamento da Dra. Milene Hoehr de Moraes.

À Professora Dra. Maria Júlia Manso Alves do Laboratório do Instituto de química, IQ/USP, pela disponibilização da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e meio de cultura utilizados neste trabalho. À técnica responsável pelo laboratório, Célia Aparecida Ludio Braga, IQ/USP, pelo auxílio no manuseio e preparo destes materiais.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela oportunidade de realização deste trabalho. Aos membros da Secretária do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - FCF/USP e Secretaria de Pós-Graduação da FCF/USP pela atenção e solicitude.

A todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Elizabete e Jerônimo (*in memorian*). À Miriam Billerbeck Berl pelo apoio. Aos amigos Elisângela e Vagner por sempre estarem presentes em horas boas e ruins, sempre nos apoiando.

À CAPES pela bolsa concedida, essencial para realização deste trabalho. Ao CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro.

RESUMO

A doença de Chagas afeta cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo, principalmente América Latina. A busca de alternativas terapêuticas para esta enfermidade tem grande relevância para a sociedade, já que as opções atuais são limitadas, sendo disponível apenas o benznidazol (BZD) e nifurtimox. Os derivados nitroheterocíclicos são considerados compostos bioativos com número crescente de estudos na comunidade científica contra seu agente etiológico, o *Trypanosoma cruzi*. Neste sentido, o presente trabalho tem por objetivo a identificação de derivados do 5-nitrofurano com atividade frente a diferentes cepas do *T. cruzi*, assim como estudar possíveis modo de ação desta classe de compostos. Esta investigação envolve estudos computacionais com o propósito de construir modelos quantitativos de relações estrutura-atividade (QSAR multivariado) que possam auxiliar na previsão de novas estruturas com perfil farmacológico otimizado. No presente trabalho foram realizadas as etapas de planejamento, síntese e identificação de 36 compostos com resultados satisfatórios quanto à identificação estrutural, pureza e rendimento, que foi da ordem de 70%. A determinação da atividade anti-*T. cruzi in vitro* dos compostos obtidos foi realizada frente às cepas Silvio X10 c11, Y, Bug 2149 c110 e Colombiana na forma epimastigota do parasito. A maioria dos compostos analisados apresentou maior capacidade de inibição de crescimento do parasito, comparado ao BZD: Silvio X10 c11 - $IC_{50} = 29,16 \pm 2,90 \mu M$, Y - $IC_{50} = 40,40 \pm 3,37 \mu M$, Bug 2149 c110 - $IC_{50} = 30,63 \pm 3,21 \mu M$, Colombiana - $IC_{50} = 47,91 \pm 4,96 \mu M$. O composto mais ativo (BSF-35) apresentou os seguintes valores: Silvio X10 c11 - $IC_{50} = 3,17 \pm 0,32 \mu M$, Y - $IC_{50} = 1,17 \pm 0,12 \mu M$, Bug 2149 c110 - $IC_{50} = 1,81 \pm 0,18 \mu M$ e Colombiana - $IC_{50} = 3,06 \pm 0,23 \mu M$. Foram realizados cálculos de propriedades moleculares das estruturas tridimensionais dos compostos, seguido pela análise exploratória de dados por análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) e análise de componentes principais (PCA), possibilitando o reconhecimento de padrões do conjunto. Considerando esta análise prévia, foram obtidos modelos QSAR com abordagem multivariada, aplicando algoritmo OPS e método de regressão por quadrados mínimos parciais, PLS. Os melhores modelos gerados foram obtidos considerando os compostos benzenos substituídos para as quatro cepas estudadas. Os descritores que mais influenciaram na análise foram o ClogP (coeficiente de partição) e cargas CHELPG. Considerando as informações obtidas, foram planejados e sintetizados quatro novos compostos com objetivo de obter compostos mais ativos e validar os modelos QSAR. Estes compostos apresentaram alta atividade frente a forma epimastigota das quatro cepas estudadas. Os compostos mais ativos foram avaliados quanto a citotoxicidade frente células LLC-MK₂ e apresentaram seletividade até 25 vezes superior ao BZD. Estudos *in vitro* frente a forma amastigota da cepa Y em células U2OS foram realizados com metodologia fenotípica de análise de alto conteúdo (HCA') e os compostos apresentaram atividade até 64 vezes superior ao BZD e com seletividade de até 50 vezes superior a este fármaco. Quanto à determinação da atividade dos compostos frente às enzimas tripanotiona redutase (*TcTR*) e glutaciona redutase (GR), os compostos analisados não apresentaram atividade relevante, indicando não ser este o mecanismo desta classe de compostos. Com finalidade de explorar outro possível mecanismo de ação dos compostos 5-nitrofurânicos, foi realizada a análise de potencial de redução da membrana mitocondrial, porém a morte parasitária não foi atribuída à despolarização da membrana em estudos simultâneos com iodeto de propídio.

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*, tripanotiona redutase, amastigota, nitro-compostos, quimiometria, QSAR multivariado.

ABSTRACT

Chagas disease affects approximately 6-7 millions people worldwide, especially Latin America. The search for therapeutic alternatives for this disease is of great relevance to society, as current options are limited and there are only two available drugs: benznidazole (BZD) and nifurtimox. The nitroheterocyclic derivatives are considered bioactive compounds with increasing number of studies in the scientific community against its etiologic agent, *Trypanosoma cruzi*. In this sense, this work aims to identify derivatives of 5-nitrofuran with activity against different strains of *T. cruzi*, and to study possible mode of action of this compounds. This research involves computational studies to obtain models of quantitative structure-activity relationships (QSAR multivariate) that can help predict new structures with optimized pharmacological profile. In this work were carried out the design, synthesis and identification of 36 compounds with satisfactory results regarding the structural identification, purity and yield (approximately 70%). The determination of anti-*T. cruzi* activity *in vitro* of the compounds obtained was carried out with Silvio X10 cl1, Y, Bug 2149 CL10 and Colombiana strains of epimastigote form of the parasite. Most of the compounds examined showed greater capacity of growth inhibition of the parasite compared to the BZD (Silvio X10 CL1 - IC 50 = 29.16 ± 2.90 uM, Y - IC50 = $40.40 \pm 3,37$ uM, 2149 CL10 Bug - IC 50 = 30.63 ± 3.21 uM, Colombiana - IC 50 = 47.91 ± 4.96 uM). The most active compound (BSF-35) showed the following values: Silvio X10 cl1 - IC 50 = 3.17 ± 0.32 uM, Y - IC 50 = 1.17 ± 0.12 uM, Bug 2149 CL10 - IC50 = $1, 81 \pm 0.18$ uM and Colombiana - IC 50 = 3.06 ± 0.23 uM. Calculations were performed for the molecular properties of three-dimensional structures of the compounds, followed by exploratory data analysis by hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA), allowing the recognition of the set. Considering this preliminary analysis were obtained QSAR models with multivariate approach, using OPS algorithm and regression method of partial least squares, PLS. The best generated models were obtained considering the benzyl substituted compounds for the four strains. The descriptors that most influenced the analysis were ClogP (partition coefficient) and CHELPG charges. Considering the information obtained, four new compounds were designed and synthesized to obtain more active compounds and validate QSAR models. These compounds showed high activity against epimastigote form of the four strains studied. The most active compounds were evaluated for cytotoxicity against LLC-MK₂ cells and the compounds selectivity values were up to 25 times higher than BZD. *In vitro* studies against amastigote form of the Y strain in U2OS cells were performed with phenotypic method of high content analysis (HCA') and the compounds showed activity to 64 times higher than BZD and selectivity of up to 50 times. The activity of the compounds against trypanothione reductase enzymes (*TcTR*) and glutathione reductase (GR) showed no significant activity, indicating that this is not the mechanism of this class of compounds. In order to exploit another possible mechanism of action of 5-nitrofuran derivatives, analysis reduction of mitochondrial membrane potential was held, however the cell death was not attributed to membrane depolarization in simultaneous studies with propidium iodide.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, trypanothione reductase, amastigote, nitro compounds, chemometrics, QSAR multivariate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
Figura 2. Alinhamento das sequências de proteínas primárias de glutathione redutase humano (GR) e <i>T. cruzi</i> tripanotiona redutase (<i>Tc</i> TR).	10
Figura 3. Comparação entre as estruturas da glutathione e tripanotiona, substratos da GR e <i>Tc</i> TR, respectivamente.	11
Figura 4. Estruturas químicas dos fármacos de referência benznidazol e nifurtimox e outros compostos e fármacos relatados em literatura quanto à anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
Figura 5. Fármacos nitrofurânicos utilizados na terapêutica humana. Em destaque porção em comum das estruturas dos fármacos.	18
Figura 6. Redução de nitrofuranos por nitrorredutases do tipo I e tipo II.	19
Figura 7. Planejamento experimental das principais etapas do trabalho.	27
Figura 8. Estruturas dos compostos planejados e composto-protótipo nifuroxazida.	31
Figura 9. Rota sintética para obtenção de derivados 5-nitrofurânicos.	32
Figura 10. Obtenção de hidrazidas por esterificação de Fischer seguida de hidrazinólise.	32
Figura 11. Obtenção de bases de Schiff por formação de ligação imina entre hidrazidas e 5-nitrofuraldeído.	33
Figura 12. Esquema de montagem da microplaca no ensaio de determinação de atividade anti- <i>T. cruzi</i> na forma epimastigota frente a compostos, fármacos de referência e composto protótipo.	37
Figura 13. Esquema de montagem da microplaca no ensaio de determinação de citotoxicidade dos compostos e fármacos de referência frente a células LLC-MK ₂	51
Figura 14. Esquema de montagem da microplaca no ensaio de determinação de inibição da enzima <i>Tc</i> TR frente a compostos e composto protótipo.	55
Figura 15. Esquema de montagem da microplaca no ensaio de determinação de inibição da enzima GR frente a compostos e composto protótipo.	56
Figura 16. Gráficos de dispersão dos principais descritores utilizados no planejamento da série de 40 compostos.	62
Figura 17. Mecanismo de esterificação de Fischer.	64
Figura 18. Mecanismo de reação de hidrazinólise.	65

Figura 19. Espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do intermediário hidrazídico do composto BSF-20 purificado (300 MHz / 75 MHz / DMSO- d_6 / TMS).....	66
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do intermediário hidrazídico do composto BSF-2 purificado (300 MHz / 75 MHz / DMSO- d_6 / TMS).....	67
Figura 21. Mecanismo de reação de obtenção de bases de Schiff.....	70
Figura 22. Espectro de RMN de ^1H dos compostos BSF-8 e BSF12 (300 MHz / DMSO- d_6 / TMS).....	89
Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C dos compostos BSF-8 e BSF-12 (75 MHz / DMSO- d_6 / TMS).....	90
Figura 24. Possíveis isômeros geométricos de <i>N</i> -acilidrazonas e representação da estrutura cristalográfica da nifuroxazida.....	91
Figura 25. Espectro de efeito nuclear Overhauser (NOESY-2D) do composto BSF-3 (500 MHz / DMSO- d_6 / TMS).....	92
Figura 26. Espectro de correlação quântica única heteronuclear de deslocamentos químicos (HSQC) do composto BSF-3 (^1H 500 MHz / ^{13}C 125 MHz / DMSO- d_6 / TMS).....	93
Figura 27. Espectro de correlação heteronuclear de deslocamentos químicos de múltiplas ligações (HMBC) do composto BSF-3 (^1H 500 MHz / ^{13}C 125 MHz / DMSO- d_6 / TMS).....	94
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H do composto BSF-20 (300 MHz / DMSO- d_6 / TMS).....	95
Figura 29. Espectro de RMN de ^{13}C do composto BSF-20 (75 MHz / DMSO- d_6 / TMS).....	95
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H do composto BSF-6 (300 MHz / DMSO- d_6 / TMS).....	96
Figura 31. Espectro de correlação homonuclear de deslocamentos químicos (COSY-2D) do composto BSF-6 (300 MHz / DMSO- d_6 / TMS / 2 h de aquisição).....	97
Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C do composto BSF-6 (75 MHz / DMSO- d_6 / TMS).....	98
Figura 33. Espectro de correlação heteronuclear de deslocamentos químicos (HETCOR- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do composto BSF-6 (300 MHz / 75 MHz / DMSO- d_6 / TMS / 7 h de aquisição).....	98
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H do composto BSF-10 (300 MHz / DMSO- d_6 / TMS).....	99
Figura 35. Espectro de correlação homonuclear de deslocamentos químicos (COSY-2D) do composto BSF-10 (300 MHz / DMSO- d_6 / TMS / 2 h de aquisição).....	100

Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C do composto BSF-10 (75 MHz / DMSO- d_6 / TMS).	101
Figura 37. Espectro de correlação heteronuclear de deslocamentos químicos (HETCOR- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do composto BSF-10 (300 MHz / 75 MHz / DMSO- d_6 / TMS / 7h de aquisição).....	102
Figura 38. Curva de calibração para cepa Silvio X10 c11 de <i>T. cruzi</i>	104
Figura 39. Curva de calibração para cepa Y de <i>T. cruzi</i>	104
Figura 40. Curva de calibração para cepa Bug 2149 c110 de <i>T. cruzi</i>	105
Figura 41. Curva de calibração para cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i>	105
Figura 42. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco benznidazol e valor de IC_{50} para a cepa Silvio X10 c11.	108
Figura 43. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco benznidazol e valor de IC_{50} para a cepa Y.....	108
Figura 44. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco benznidazol e valor de IC_{50} para a cepa Bug 2149 c110.	109
Figura 45. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco benznidazol e valor de IC_{50} para a cepa Colombiana na forma epimastigota	109
Figura 46. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do BSF-35 e valor de IC_{50} para a cepa Silvio X10 c11.	110
Figura 47. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do BSF-35 e valor de IC_{50} para a cepa Bug 2149 c110.....	110
Figura 48. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto BSF-35 e valor de IC_{50} para a cepa Bug 2149 c110.	111
Figura 49. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do BSF-35 e valor de IC_{50} para a cepa Colombiana.....	111
Figura 50. Comparativo da atividade anti- <i>T. cruzi</i> dos compostos e fármacos de referência frente às cepas Silvio X10 c11, Y, Bug 2149 c110 e Colombiana do <i>T. cruzi</i> . 115	
Figura 51. Ângulos de torção, diedros, representados na estrutura química da porção comum dos compostos estudados.....	122
Figura 52. Atividade anti- <i>T. cruzi</i> convertida em potência ($\log 1/\text{IC}_{50}$), dos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos e fármacos de referência frente a forma epimastigota das cepas Silvio X10 c11, Y, Bug 2149 c110 e Colombiana do <i>T. cruzi</i>	123

Figura 53. Gráficos de dispersão das variáveis independentes x_{25} , diedro ϕ_1 (C9-N8-N7=C6) e x_{29} , $ClogP_{WM}$, em relação atividade anti- <i>T. cruzi</i> da forma epimastigota da cepa Y.....	124
Figura 54. Resultados da análise exploratória do conjunto de 34 compostos derivados furfurilidênicos (BSF-1 a BSF-36) e nifuroxazida.....	127
Figura 55. Gráfico da distância residual das amostras em relação à distância de Mahalanobis do conjunto de 34 compostos 5-nitrofurfurilidênicos e nifuroxazida (N = 35).	129
Figura 56. Resultados da análise exploratória do conjunto de 13 compostos derivados furfurilidênicos, não benzeno substituídos.....	130
Figura 57. Gráfico da distância residual das amostras em relação à distância de Mahalanobis do conjunto de 13 compostos 5-nitrofurfurilidênicos e nifuroxazida (N = 13).	131
Figura 58. Resultados da análise exploratória do conjunto de 21 compostos derivados furfurilidênicos benzeno substituídos e nifuroxazida.....	132
Figura 59. Gráfico da distância residual das amostras em relação à distância de Mahalanobis do conjunto de 21 compostos 5-nitrofurfurilidênicos e nifuroxazida (N = 22).	134
Figura 60. Visualização de propriedades estereoquímicas / geométrico e hidrofóbicas para os compostos BSF-2 e BSF35.	135
Figura 61. Distribuição dos dados de atividade anti- <i>T. cruzi</i> , convertida em potência (\log_1/IC_{50}), de 34 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota das cepas Silvio X10 c11, Y, Bug 2149 c110 e Colombiana.....	137
Figura 62. Dendrograma do HCA de amostras: compostos benzeno substituídos indicados com quadrados pretos (■) ao final das linhas do dendrograma.....	140
Figura 63. Distribuição dos dados de atividade anti- <i>T. cruzi</i> , convertida em potência (\log_1/IC_{50}), de 21 compostos benzeno substituídos e nifuroxazida frente a forma epimastigota das cepas Silvio X10 c11, Y, Bug 2149 c110 e Colombiana.	141
Figura 64. Dispersão da atividade linearizada experimental ($\text{Log}_1/IC_{50} \text{ (exp)}$) e calculada pelo modelo ($\text{Log}_1/IC_{50} \text{ (cal)}$) de 21 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota da cepa Silvio X10 c11.	144
Figura 65. Resultados da validação cruzada do modelo PLS retirando N compostos (LNO), gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Silvio X10 c11.	145
Figura 66. Testes de aleatorização do Log_1/IC_{50} do modelo PLS gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Silvio X10 c11.	146
Figura 67. Dispersão da atividade linearizada experimental ($\text{Log}_1/IC_{50} \text{ (exp)}$) e calculada pelo modelo ($\text{Log}_1/IC_{50} \text{ (cal)}$) de 21 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota da cepa Y.....	149

Figura 68. Resultados da validação cruzada do modelo PLS retirando N compostos (LNO), gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Y.....	150
Figura 69. Testes de aleatorização do Log1/IC ₅₀ do modelo PLS gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Y.....	151
Figura 70. Dispersão da atividade linearizada experimental (Log1/IC ₅₀ (exp)) e calculada pelo modelo (Log1/IC ₅₀ (cal)) de 21 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota da cepa Bug 2149 cl10.....	154
Figura 71. Resultados da validação cruzada do modelo PLS retirando N compostos (LNO), gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Bug 2149 cl10.	155
Figura 72. Testes de aleatorização do Log1/IC ₅₀ do modelo PLS gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Bug 2149 cl10.....	156
Figura 73. Dispersão da atividade linearizada experimental (Log1/IC ₅₀ (exp)) e calculada pelo modelo (Log1/IC ₅₀ (cal)) de 21 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota da cepa Colombiana.....	159
Figura 74. Resultados da validação cruzada do modelo PLS retirando N compostos (LNO), gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Colombiana.	160
Figura 75. Testes de aleatorização do Log1/IC ₅₀ do modelo PLS gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Colombiana.....	161
Figura 76. Visualização de descritores eletrônicos e hidrofóbicos para os compostos BSF-25, BSF-27, BSF-34 e NF	164
Figura 77. Composto tetrazólico MTT, de coloração amarela, reduzido a formazan, de coloração roxa.	167
Figura 78. Curva de calibração para as células LLC-MK ₂	168
Figura 79. Dedrograma utilizado para seleção de compostos para ensaio com a forma amastigota de <i>T. cruzi</i>	170
Figura 80. Imagens obtidas da metodologia de análise de alto conteúdo (HCA') e etapas de reconhecimento de membrana e núcleo celular para as células U2OS e forma amastigota do <i>T. cruzi</i>	171
Figura 81. Atividade anti- <i>T. cruzi</i> dos compostos selecionados por HCA e fármacos de referência frente às formas epimastigota e amastigota da cepa Y.....	174
Figura 82. Imagens obtidas pela metodologia de análise de alto conteúdo (HCA') do composto BSF-39 e benznidazol nas concentrações de 1,56 e 0,39 µM.	175
Figura 83. Teste de atividade da enzima tripanotona redutase de <i>T. cruzi</i> (TcTR)	176
Figura 84. Inibição da enzima tripanotona redutase de <i>T. cruzi</i> (TcTR) e glutatona redutase humana dos compostos e composto-protótipo na concentração de 50 µM.	178

Figura 85. Histogramas das análises de citometria de fluxo para avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i>	185
Figura 86. Histogramas das análises de citometria de fluxo para avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i>	186
Figura 87. Histogramas das análises de citometria de fluxo para avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> e morte celular.	187
Figura 88. Histogramas das análises de citometria de fluxo para avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> e morte celular.	188
Figura 89. Dados prévios dos ensaios de tempo de morte (<i>Time-kill</i>) dos compostos BSF-39 e BSF-40. Ensaios realizados com a cepa Y _(ama) , em células U2OS.	194

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Associação entre as Discretas Unidades de Tipagem (DTUs) de <i>T. cruzi</i> e a distribuição geográfica e manifestações da doença de Chagas	7
Tabela 2. Parâmetros estatísticos fornecidos no programa QSAR modeling	47
Tabela 3. Descritores considerados no planejamento da série de compostos.....	59
Tabela 4. Dados experimentais das hidrazidas intermediárias: rendimento, faixa de fusão e massa molar	68
Tabela 5. Dados experimentais dos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos	72
Tabela 6. Rendimentos parciais e totais da etapa de preparação de derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos	74
Tabela 7. Dados da análise elementar dos derivados do 5-nitrofurano	76
Tabela 8. Principais sinais de RMN ¹ H (ppm) em DMSO – d ₆ de derivados do 5-nitrofurano	78
Tabela 9. Principais sinais de RMN ¹³ C (ppm) em DMSO – d ₆ de derivados do 5-nitrofurano	83
Tabela 10. Dados de absorvância ($\lambda = 562$ nm) e número de parasitos da cepa Silvio X10 c11 de <i>T. cruzi</i>	104
Tabela 11. Dados de absorvância ($\lambda = 562$ nm) e número de parasitos da cepa Y de <i>T. cruzi</i>	104
Tabela 12. Dados de absorvância ($\lambda = 562$ nm) e número de parasitos da cepa Bug 2149 c110 de <i>T. cruzi</i>	105
Tabela 13. Dados de absorvância ($\lambda = 562$ nm) e número de parasitos da cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i>	105
Tabela 14. Avaliação da variação de absorvância em três condições: controle de solvente (1 % e 0,5 % de DMSO) e controle positivo para as cepas Silvio X10 c11, Y, Bug 2149 c110 e Colombiana	106
Tabela 15. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do BZD para a cepa Silvio X10 c11.	108
Tabela 16. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do BZD para a cepa Y.....	108
Tabela 17. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do BZD para a cepa Bug 2149 c110.	109

Tabela 18. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do BZD para a cepa Colombiana.	109
Tabela 19. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações BSF-35 para a cepa Silvio X10 c11.	110
Tabela 20. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do BSF-35 para a cepa Y.	110
Tabela 21. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto BSF-35 para a cepa Bug 2149 c110.	111
Tabela 22. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do BSF-35 para a cepa Colombiana.	111
Tabela 23. Atividade anti- <i>T. cruzi</i> dos compostos, fármacos de referência e composto-protótipo frente às cepas Silvio X10 c11, Y, Bug 2149 c110 e Colombiana....	112
Tabela 24. Valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para os confôrmeros de energia mais baixa selecionados do PAC para cada composto investigado	117
Tabela 25. Propriedades moleculares calculadas para o conjunto de compostos derivados do 5-nitrofurano.....	119
Tabela 26. Parâmetros estatísticos da análise QSAR multivariada para 34 compostos derivados do 5-nitrofurano e nifuroxazida frente às cepas Silvio X10 c11, Y, Bug 2149 c110 e Colombiana da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i>	139
Tabela 27. Atividade linearizada experimental e calculada pelo modelo de 21 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota da cepa Silvio X10 c11	144
Tabela 28. Resultados da validação cruzada do modelo PLS retirando N compostos (LNO) gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Silvio X10 c11	145
Tabela 29. Coeficientes lineares de Pearson e coeficientes dos descritores do modelo PLS gerado para 21 compostos e NF frente a cepa Silvio X10 c11	147
Tabela 30. Matriz de correlação linear cruzada dos descritores do modelo PLS gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Silvio X10 c11	147
Tabela 31. Atividade linearizada experimental e calculada pelo modelo de 21 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota da cepa Y.....	149
Tabela 32. Resultados da validação cruzada do modelo PLS retirando N compostos (LNO) gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Y	150
Tabela 33. Coeficientes lineares de Pearson e coeficientes dos descritores do modelo PLS gerado para 21 compostos e NF frente a cepa Y	152
Tabela 34. Matriz de correlação linear cruzada dos descritores do modelo PLS gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Y.....	152

Tabela 35. Atividade linearizada experimental e calculada pelo modelo de 21 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota da cepa Bug 2149 cl10.....	154
Tabela 36. Resultados da validação cruzada do modelo PLS retirando N compostos (LNO) gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Bug 2149 cl10.....	155
Tabela 37. Coeficientes lineares de Pearson e coeficientes dos descritores do modelo PLS gerado para 21 compostos e NF frente a cepa Bug 2149 cl10.....	157
Tabela 38. Matriz de correlação linear cruzada dos descritores do modelo PLS gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Bug 2149 cl10.....	157
Tabela 39. Atividade linearizada experimental e calculada pelo modelo de 21 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota da cepa Colombiana.....	159
Tabela 40. Resultados da validação cruzada do modelo PLS retirando N compostos (LNO) gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Colombiana.....	160
Tabela 41. Coeficientes lineares de Pearson e coeficientes dos descritores do modelo PLS gerado para 21 compostos e NF frente a cepa Colombiana.....	162
Tabela 42. Matriz de correlação linear cruzada dos descritores do modelo PLS gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Colombiana.....	162
Tabela 43. Dados de atividade linearizada, experimental e prevista, dos compostos planejados a partir do modelo PLS gerado para as cepas Silvio X10 cl1, Y, Bug 2140 cl10 e Colombiana.....	166
Tabela 44. Dados de absorvância ($\lambda = 595 \text{ nm}$) e número de células LLC-MK ₂	168
Tabela 45. Citotoxicidade dos compostos, fármacos de referência e composto-protótipo frente às células LLC-MK ₂ e atividade anti- <i>T. cruzi</i> frente às cepas Silvio X10 cl1, Y, Bug 2149 cl10 e Colombiana.....	169
Tabela 46. Atividade anti- <i>T. cruzi</i> dos compostos selecionados por HCA e fármacos de referência frente a forma amastigota da cepa Y, parcialmente resistente ao benznidazol.....	172
Tabela 47. Atividade anti- <i>T. cruzi</i> dos compostos selecionados por HCA e fármacos de referência frente a amastigota da cepa Y, susceptível a benznidazol.....	173
Tabela 48. Inibição da enzima tripanotona redutase de <i>T. cruzi</i> (TcTR) e glutaciona redutase humana dos compostos e composto-protótipo na concentração de 50 μM	179
Tabela 49. Energias de ligação do ancoramento, eficiência do ligante e inibição da enzima tripanotona redutase de <i>T. cruzi</i> (TcTR) e glutaciona redutase humana dos compostos e fármacos.....	182

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A: Absorbância

AB: Atividade biológica

AM1: *Austim model 1*

ANOVA: *Analysis of variance* (análise de variância)

ASA: Superfície acessível à solvente

ASA+: Superfície acessível à solvente de todos os átomos com carga parcial positiva

ASA-: Superfície acessível à solvente de todos os átomos com carga parcial negativa

ASA_h: Superfície acessível à solvente de todos os átomos hidrofóbicos

ASA_p: Superfície acessível à solvente de todos os átomos hidrofílicos

A_{vdw}: Área de superfície molecular de van der Waals

ATP: Trifosfato de adenosina

BENEFIT: *BENZnidazol Evolution For Interrupting Trypanosomiasis* (evolução do benznidazol para interrupção de tripanossomíases)

BZD: benznidazol

CADD: *Computer-aided Drug Design* (planejamento de fármacos auxiliado por computador)

CHELPG : *Charges from electrostatic potentials using a grid based method* (cargas de potencial eletrostático baseado no método *grid*)

ClogP: Coeficiente de partição calculado pelo método de contribuição de fragmentos

CP: Controle positivo

DFT = *Density Functional Theory* (teoria do funcional de densidade)

DM: Dinâmica molecular

DMF: *N,N*-dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMSO-*d*₆: Dimetilsulfóxido deuterado

DNDi: *Drugs for Neglected Diseases initiative* (iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas)

DP: Desvio-padrão

DTU: *Discrete Typing Units* (discretas unidades de tipagem)

E_{HOMO}: *Highest occupied molecular orbital*, orbital molecular ocupado de maior energia

E_{LUMO}: *Lowest unoccupied molecular orbital*, orbital molecular desocupado de menor

E_{STRETCH}: Contribuição de energia intramolecular de deformação axial

E_{BEND}: Contribuição de energia intramolecular de deformação angular

E_{TORS} : Contribuição de energia intramolecular de deformação torsional
 E_{1-4} : Contribuição de energia intramolecular do tipo 1-4
 E_{vdW} : Contribuição de energia intramolecular de van der Waals
 E_{CHARGE} : Contribuição de energia intramolecular de carga ou eletrostática
 E_{solv} : Contribuição de energia intramolecular de solvatação
 E_{ligH} : Contribuição de energia intramolecular de ligação de hidrogênio intramolecular
 E_{TOTAL} : Energia potencial total (soma de todas as contribuições de energia)
GAP: Diferença entre as energias E_{HOMO} e E_{LUMO}
GR: Enzima glutathione redutase
GSSG: glutathione oxidada
HBA: *Hydrogen Bond Acceptors* (número de receptores de ligação hidrogênio)
HBD: *Hydrogen Bond Donors* (número de doadores de ligação hidrogênio)
HCA: *Hierarchical cluster analysis* (análise hierárquica de agrupamentos)
HCA': *High-content analysis* (análise de alto conteúdo)
IC: Intervalo de confiança
IC (%): Porcentagem de inibição do crescimento
IC₅₀: Concentração de composto que inibe o crescimento de 50% das células ou parasitos
IS: Índice de seletividade razão entre o IC₅₀ de células e IC₅₀ de parasitos
IS': Índices de similaridade utilizado nos dendrogramas
J: Constante de acoplamento
LIT: *Liver Infusion Triptose* (Infusão de fígado e triptose)
LOO: *Leave one out* (Retirada de uma amostra na validação cruzada)
LNO: *Leave N out* (Retirada de N amostra na validação cruzada)
MLPs: *Maps of Lipophilicity Potential* (Mapas de potencial lipofílico)
MLS: *Multiple Linear Regression* (Regressão linear múltipla)
MM: massa molar
MM2: Campo de força empírico
MM+: Campo de força derivado do MM2
MR: Refratividade molar
NAD: Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (oxidada)
NF: nifuroxazida

NFX: nifurtimox

OPS: *Ordered predictors selection* (Seleção de preditores ordenados)

PA: *Pro-analyse* (reagente grau analítico)

PAC: Perfil de amostragem conformacional

PC: *Principal component* (Componente principal)

PCA: *Principal component analysis* (análise de componente principal)

PDB: Protein Data Bank (banco de dados de proteínas)

PLS: *Partial Least Squares* (Regressão por mínimos quadrados parciais)

PRESS_{cal}: Soma dos quadrados dos erros de predição da calibração

PRESS_{cv}: Soma dos quadrados dos erros de predição da validação cruzada

PSA: Área de superfície polar

Q²: Coeficiente de validação cruzada

QSAR: *Quantitative structure-activity relationships* (Relações quantitativas estrutura-atividade)

R²: Coeficiente de determinação múltipla

r²: Coeficiente de determinação

R: Coeficiente de correlação de Pearson

RB: Número de ligações rotáveis presentes na molécula

R_{cal}: Coeficiente de correlação de Pearson da validação cruzada

R_{cv}: Coeficiente de correlação de Pearson da calibração

R_{fator}: Fator de refinamento em cristalografia utilizando-se de todas as reflexões, medido em Å e proporcional à resolução da estrutura

RM: Refratividade molar

RMN ¹³C: Ressonância magnética nuclear de carbono

RMN ¹H: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMSD: *Root-mean square deviation* (Desvio médio quadrático)

RMSECV ou SEV: Raíz quadrada do erro da validação cruzada

RMSEC: Raíz quadrada do erro da calibração

RO5: *Rule of 5* (Regra dos Cinco de Lipinski)

SAR: *Structure-activity Relationships* (relações estrutura-atividade)

SFB: Soro fetal bovino

S.O.D.: Superóxido Desmutase

SS: Soma dos quadrados

T(SH₂): Tripanotiona ditiol

TMS: Tetrametilsilano

TcTR: Enzima Tripanotiona Redutase de *Trypanosoma cruzi*

TS₂: Dissulfeto de tripanotiona

VL: Variável latente

V_{vdw}: Volume de van der Waals

η%: Porcentagem de rendimento

δ : Deslocamentos químicos em ressonância magnética nuclear

λ : Comprimento de onda

μ: Momento de dipolo

φ: Ângulo de torsão ou diedro

ΔG: Energia livre de Gibbs (interação ligante-receptor)

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xxi
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xxv
SUMÁRIO.....	xxix
APRESENTAÇÃO.....	1
1 FUNDAMENTAÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1 Doença de Chagas.....	3
1.1.1 Características da doença e epidemiologia.....	3
1.1.2 Agente etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.2 Alvos terapêuticos em tripanosomatídeos.....	7
1.3 Tratamentos da doença de Chagas.....	11
1.4 Compostos nitroheterocíclicos.....	16
1.5 Planejamento e desenvolvimento de fármacos – estudos das relações estrutura-atividade.....	19
2 JUSTIFICATIVA.....	24
3 OBJETIVO.....	25
4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	27
5 METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	29
5.1 Planejamento da série de compostos.....	29
5.2 Obtenção dos derivados do 5-nitrofurano.....	32
5.2.1 Obtenção de hidrazidas.....	32
5.2.2 Obtenção dos derivados do 5-nitrofurano.....	33
5.2.3 Identificação dos compostos.....	34
5.3 Determinação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> frente a forma epimastigota.....	35

5.3.1 Cultivo das cepas para determinação da atividade anti- <i>T. cruzi</i>	35
5.3.2 Construção das curvas de calibração para determinação da atividade anti- <i>T. cruzi</i>	36
5.3.3 Determinação da atividade anti- <i>T. cruzi</i>	36
5.3.4 Tratamento dos dados obtidos para determinação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> ...	38
5.4 Estudos de relações entre estrutura química e atividade biológica e construção de modelos matemáticos de previsão (QSAR).....	39
5.4.1 Construção dos modelos moleculares tridimensionais (3D).....	39
5.4.2 Cálculos dos descritores ou variáveis independentes	41
5.4.3 Análise exploratória de dados (HCA e PCA)	43
5.4.4 Análise QSAR multivariada	45
5.5 Determinação da citotoxicidade in vitro em células de linhagem LLC-MK ₂	49
5.5.1 Cultura das células LLC-MK ₂	49
5.5.2 Construção das curvas de calibração para determinação da citotoxicidade de compostos em células LLC-MK ₂	49
5.5.3 Determinação da citotoxicidade dos compostos e fármacos em células LLC-MK ₂	50
5.5.4 Tratamento dos dados obtidos para determinação da citotoxicidade em células LLC-MK ₂	52
5.6 Determinação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> frente a forma amastigota do parasita.....	52
5.7 Determinação da inibição das enzimas <i>Tc</i> TR e GR.....	54
5.7.1 Determinação da inibição da enzima <i>Tc</i> TR.....	54
5.7.2 Determinação da inibição da enzima GR.....	55
5.7.3 Tratamento dos dados obtidos para determinação da inibição das enzimas <i>Tc</i> TR e GR	56
5.7.4 Ancoramento de compostos na estrutura 3D das enzimas <i>Tc</i> TR e GR	57
5.8 Avaliação do potencial de redução da membrana mitocondrial (ψ_m) em formas epimastigotas por citometria de fluxo.....	57
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
6.1 Planejamento dos compostos	59

6.2	Obtenção dos compostos derivados do 5-nitrofurano.....	63
6.2.1	Obtenção e identificação das hidrazidas substituídas	63
6.2.2	Obtenção e identificação dos derivados do 5-nitrofurano	70
6.3	Determinação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> frente a forma epimastigota.....	102
6.4	Estudos de relações entre estrutura química e atividade biológica e construção de modelos matemáticos de previsão (QSAR)	116
6.4.1	Construção dos modelos moleculares 3D	116
6.4.2	Cálculos dos descritores ou variáveis independentes	119
6.4.3	Análise exploratória dos dados	124
6.4.4	Análise QSAR multivariada	136
6.5	Determinação da citotoxicidade in vitro em células de linhagem LLC-MK ₂	166
6.6	Determinação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> frente a forma amastigota do parasita....	169
6.7	Determinação da inibição das enzimas <i>TcTR</i> e <i>GR</i>	176
6.7.1	Ancoramento de compostos na estrutura 3D das enzimas <i>TcTR</i> e <i>GR</i>	180
6.8	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (ψ_m) em formas epimastigotas por citometria de fluxo.....	182
7	CONCLUSÕES	189
8	CONSIDERAÇÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	193
	REFERÊNCIAS.....	195
Anexo 1	Espectros de RMN ¹ H e RMN ¹³ C dos compostos de 1 a 40 e HETCOR ¹ H/ ¹³ C	209
Anexo 2	Espectros de RMN ¹ H e RMN ¹³ C do composto-protótipo nifuroxazida.....	259
Anexo 3	Espectros de RMN ¹ H e RMN ¹³ C dos fármacos benznidazol e nifurtimox	263
Anexo 4	Curvas dose-resposta da inibição de crescimento parasitário para as cepas Silvio X10 cl1, Y, Bug 2149 cl10 e Colombiana.....	267
Anexo 5	Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional da simulação de dinâmica molecular	329
Anexo 6	Descritores calculados e obtidos experimentalmente dos compostos sintetizados	339

Anexo 7 Gráficos de dispersão para seleção de descritores mais correlacionados com a atividade biológica	345
Anexo 8 Dados de citotoxicidade frente a células LLC-MK ₂ dos compostos e fármacos	359
Anexo 9 Imagens obtidas nos ensaios de atividade frente a forma amastigota do parasito pelo método de análise de alto conteúdo (HCA': <i>High Content Analysis</i>).....	363
Anexo 10 Curvas dose-resposta obtidas nos ensaios de atividade frente a forma amastigota do parasito pelo método de análise de alto conteúdo (HCA': <i>High Content Analysis</i>)...	371

APRESENTAÇÃO

A demanda por novas opções terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas é alta, uma vez que há apenas dois fármacos disponíveis para o tratamento, benznidazol e nifurtimox. Estudos de planejamento de compostos com atividade frente ao *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, possui grande relevância social, pois direcionam a busca por novos fármacos.

A tese aqui apresentada foi conduzida com o objetivo principal de planejar e obter compostos derivados do 5-nitrofurano com atividade anti-*T. cruzi*.

O estudo dos compostos análogos à nifuroxazida envolveu as etapas de planejamento, síntese, identificação e avaliação da atividade frente a diferentes cepas de *T. cruzi*, além da construção de modelos quantitativos de relações estrutura química e atividade biológica com abordagem multivariada (QSAR) para auxiliar na previsão de novas estruturas com atividade otimizada.

O trabalho aborda fundamentação bibliográfica, com breve relato sobre a doença de Chagas, alvos terapêuticos estudados em tripanosomatídeos, compostos, fármacos e tratamentos utilizados e em estudo para a doença, utilização dos compostos nitroheterocíclicos como potenciais fármacos anti-*T. cruzi* e planejamento e desenvolvimento de fármacos com ênfase em estudos de relações estrutura química e atividade biológica.

O planejamento experimental foi embasado de literatura referente a nitrocompostos frente ao *T. cruzi* e com continuidade aos estudos iniciados no grupo de pesquisa. Foram sintetizados e identificados 36 compostos e avaliada a atividade frente a forma epimastigota das cepas Silvio X10 c11, Y, Bug 2148 c110 e Colombiana, representativas das DTU mais frequentes em pacientes.

Em segunda etapa do trabalho estão descritos estudos de relações estrutura-atividade, utilizando métodos quimiométricos como análise exploratória de dados e construção de modelos matemáticos de previsão (QSAR), com abordagem multivariada. Dos resultados gerados foi possível planejar novos compostos otimizados que apresentaram maior atividade frente as cepas da forma epimastigota.

Os estudos foram direcionados para avaliar a citotoxicidade destes compostos frente a célula LLC-MK₂, assim como a atividade frente forma amastigota intracelular, utilizando metodologia de análise de alto conteúdo.

Foram investigadas algumas propostas de modo de ação desta classe de compostos encontrados em literatura. Verificou-se neste estudo a inibição da enzima tripanotona redutase e a avaliação de ação na redução do potencial de membrana da mitocôndria.

Desta forma, este trabalho abrangeu as etapas planejamento, síntese, avaliação de atividade biológica, estudos de relações estrutura-atividade para construção de modelos com capacidade preditiva e avaliação de dois possíveis modo de ação destas estruturas químicas.

1 FUNDAMENTAÇÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Doença de Chagas

1.1.1 Características da doença e epidemiologia

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas é classificada em um conjunto de doenças denominadas negligenciadas, que inclui também a leishmaniose, a esquistossomose além de outras 20 enfermidades. A doença de Chagas é considerada endêmica em 21 países da América Latina (DNDi, 2016). Estudos epidemiológicos desta doença estimam que existam cerca de 7 a 8 milhões de pessoas contaminadas no mundo e a mortalidade anual decorrente da doença de Chagas é de 12.000 pessoas (DNDi, 2016, WHO, 2014). No Brasil estima-se que 4,6 milhões (intervalo de confiança, IC de 95 %: 2,9-7,2 milhões) de pessoas estejam contaminadas (DIAS *et al.*, 2016, MARTINS-MELO *et al.*, 2012).

Atualmente está ocorrendo aumento do número de casos em regiões não endêmicas devido, principalmente, ao crescente índice da migração de indivíduos contaminados de regiões endêmicas para outras regiões. As principais regiões não endêmicas que apresentam casos da doença estão na América do Norte, na região do Pacífico ocidental (principalmente Japão e Austrália) e na Europa. Estima-se que haja mais de 300.000 pessoas portadoras desta doença nos Estados Unidos, no Canadá mais de 5.500, na Europa e na região do Pacífico ocidental mais de 80.000 (DNDi, 2012, WHO, 2010, COURA, VIÑAS, 2010). Em revisão sistemática realizada por Connors *et al.*, (2016), foi verificada evidências de que a prevalência da doença de Chagas é maior do que o esperado em alguns grupos de migrantes e que estimativas de prevalência na triagem de doadores de sangue subestima o impacto da doença.

A transmissão vetorial é a causa mais comum de infecção, contudo, a doença pode ser transmitida ao homem por vias alternativas, como a contaminação laboratorial acidental, a via oral, o transplante de órgãos, a transmissão congênita, a transfusão sanguínea e o leite materno (JACKSON *et al.*, 2009, NOBREGA *et al.*, 2009, LUNARDELLI *et al.*, 2007).

Os sintomas da doença de Chagas podem ser divididos em três estágios principais, a fase aguda, fase latente ou intermediária e a fase crônica. A primeira é caracterizada por elevada parasitemia e poucas manifestações clínicas, como febre, linfadenopatia e hepato-

esplenomegalia. Esta fase pode apresentar manifestações locais indicando local da porta de entrada do parasito, como o sinal de Romana, o qual ocorre quando o parasito penetra pela conjuntiva ocular formando edema bpalpebral unilateral, ou quando o parasito penetra por lesões na pele, apresentando o chagoma de inoculação. Estas manifestações aparecem em 50% dos casos agudos dentro de 4 a 10 dias após contágio (BRASIL, 2010, REY, 2002, BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000). A fase latente ou intermediária perdura de 5 a 10 anos ou até por mais anos de forma assintomática. Esta fase ocorre após as manifestações da fase aguda e o parecimento das manifestações da forma cardíaca ou digestiva (BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

A fase crônica corresponde à lenta destruição das células infectadas pelo parasito, ocorrendo diminuição da parasitemia e tropismo por tecidos ricos em macrófagos, fibras musculares esqueléticas, miocardiócitos, sendo dependente do tipo de cepa parasitária e imunidade do hospedeiro (REY, 2002, BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000). De acordo com sua evolução, pode ser dividida em indeterminada e determinada. Inicialmente, essa fase é assintomática, sendo denominada fase indeterminada, não apresentando sinais de comprometimento cardíaco e/ou digestivo. A fase determinada, sendo esta a fase crônica ou tardia com manifestações da doença, desenvolve-se em 30 a 40% dos pacientes infectados. É uma fase altamente incapacitante e pode levar à falência do órgão acometido, tendo a morte como consequência. Pode se apresentar principalmente como crônica cardíaca, provocando alterações cardíacas, como arritmias e cardiomiopatias, ou como crônica digestiva, afetando o esôfago (megaesôfago) ou o intestino (megacólon) (RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010, BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

A forma crônica da doença de Chagas resulta em grande impacto social e econômico, incluindo o desemprego e diminuição da capacidade produtiva. Estima-se que no Brasil R\$ 2,9 bilhões são perdidos em salários e produtividade industrial devido à incapacidade de trabalhadores com doença de Chagas (DNDi, 2016, MARTINS-MELO *et al.*, 2012). Em contexto global, a morbidade e mortalidade associadas a doença de Chagas tem um impacto econômico anual de US \$ 7,2 bilhões (LEE *et al.*, 2013).

1.1.2 Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas é uma infecção tecidual e hematológica causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Trypanosoma* (CHAGAS, 1909). Este parasito apresenta-se em três formas distintas durante seu ciclo evolutivo (figura 1): amastigota, epimastigota e tripomastigota. A forma amastigota é caracterizada pela pequena dimensão, contorno circular, ovóide ou fusiforme, núcleo excêntrico e flagelo contido no bolso flagelar não ultrapassando a borda celular. A forma epimastigota, apresenta-se alongada (fusiforme), cinetoplasto discóide próximo ao núcleo, bolso flagelar estreito abrindo-se lateralmente, flagelo longo com membrana flagelar. A forma tripomastigota possui característica alongada e achatada, cinetoplasto arredondado e distante do núcleo, bolso flagelar próximo ao núcleo. O flagelo percorre toda extensão celular (REY, 2002, BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

Seus vetores naturais pertencem ao grupo de insetos da ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae*, sendo o *Triatoma infestans* o vetor mais importante da doença, popularmente conhecido por “barbeiro” (ANTUNES, 1992). O ciclo evolutivo do *T. cruzi* apresenta as formas do parasito em seus diferentes estágios, como ilustrado na figura 1. A forma infectante encontrada no inseto, tripomastigota metacíclico, é introduzida no hospedeiro mamífero a partir das fezes do inseto. Estas formas penetram nas células do hospedeiro definitivo, transformam-se em amastigotas que se reproduzem por fissão binária no citoplasma. As formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que, após ruptura celular, migram para a corrente sanguínea e invadem novas células. Quando os tripomastigotas são ingeridos por um inseto triatomíneo, transformam-se em epimastigotas que se multiplicam no tubo digestivo do vetor. As formas epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos na porção terminal do tubo digestivo, sendo aptos a contaminar outro hospedeiro (CDC, 2014, REY, 2002, BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

O *T. cruzi* é um organismo diplóide que se multiplica por divisão binária. Como consequência de sua evolução, estes parasitos apresentam grande diversidade genotípica que se manifesta por diferenças no comportamento biológico como, por exemplo, adaptação a diversas espécies de triatomíneos, variações na sensibilidade aos fármacos, diferentes graus de virulência em animais experimentais e humanos, tropismo tissular

preferencial e indução de manifestações clínicas da doença (WHO, 2010, ZINGALES *et al.*, 2009, ANDRADE, 1985).

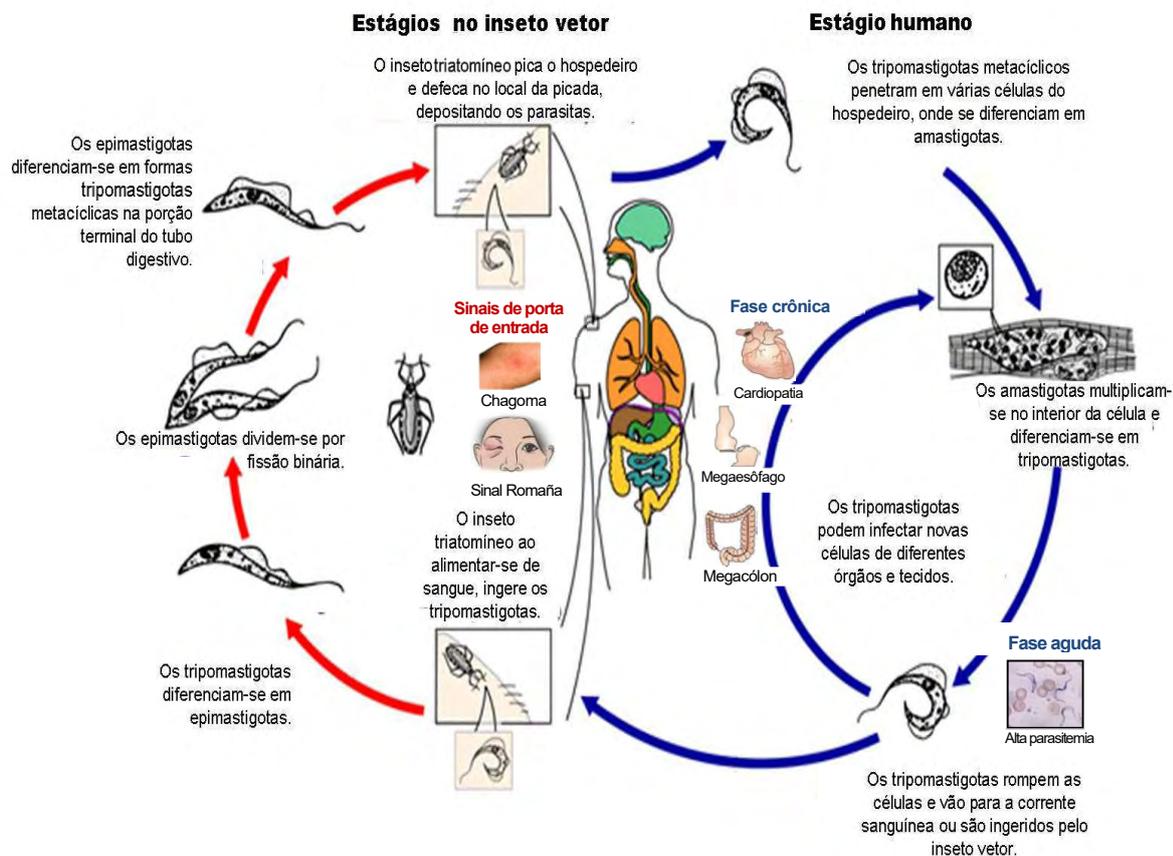


Figura 1. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*.

Reproduzido com a permissão de CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 05 Mar 2014.

O conceito de cepas para os estudos de amostras dos parasitos isolados de casos humanos, de animais naturalmente infectados e do inseto vetor foi estabelecido com objetivo de sistematizar os dados acumulados de literatura. As amostras mantidas em laboratório, por meio de passagens em animais susceptíveis ou em culturas *in vitro* foram designadas cepas. Hoje podemos definir as cepas do *T. cruzi* como populações multiclonais complexas, que diferem nas suas características fenóticas e biológicas e no comportamento no hospedeiro infectado (BRENER, ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2000).

Diante da diversidade genética foi estabelecido em consenso internacional a subdivisão de *T. cruzi* em seis grupos filogenéticos principais, nomeados como Discretas Unidades de Tipagem, DTUs (*Discrete Typing Units*), e classificados de *TcI* a *TcVI*

(ZINGALES *et al.*, 2012, ZINGALES *et al.*, 2009). Estudos realizaram a associação entre as DTUs, as manifestações clínicas da doença e a prevalência em diferentes regiões, conforme exposto na tabela 1. Uma das observações destes estudos foi que as DTUs *TcI*, *TcII*, *TcV* e *TcIV* são as mais prevalentes em humanas em várias regiões da América Latina (ZINGALES *et al.* 2012, GUHL, RAMÍREZ 2011, MILES *et al.* 2009).

Tabela 1. Associação entre as Discretas Unidades de Tipagem (DTUs) de *T. cruzi* e a distribuição geográfica e manifestações da doença de Chagas

DTUs	Distribuição Geográfica	Manifestação da doença de Chagas
<i>TcI</i>	Américas do Sul, Norte e Central	Cardiomiopatia
<i>TcII</i>	Cone Sul e casos esporádicos ao Norte	Cardiomiopatia e megassíndromes
<i>TcIII</i>	América do Sul	Raro em humanos; forma clínica pouco conhecida
<i>TcIV</i>	Américas do Sul e do Norte	Causa secundária de doença de Chagas na Venezuela; casos esporádicos em outras regiões da América do Sul
<i>TcV</i> e <i>TcVI</i>	Cone Sul	Cardiomiopatia e megassíndromes

DTU: *Discrete Typing Units* / Discretas Unidades de Tipagem; (ZINGALES *et al.* 2012, GUHL, RAMÍREZ 2011, MILES *et al.* 2009).

Entretanto estes estudos salientam que associações entre DTUs, características epidemiológicas e apresentação clínica da doença de Chagas são circunstanciais, devido dificuldades apresentadas na identificação de DTUs em ocorrências de infecções mistas, assim como a coleta de DTUs em tecidos, além de interações complexas com a resposta imune do hospedeiro (ZINGALES *et al.* 2012, GUHL, RAMÍREZ 2011, MILES *et al.* 2009). Apesar das dificuldades encontradas nestes estudos, os dados obtidos destas associações realizadas com DTUs são de grande valia para o entendimento da doença e busca de novos tratamentos.

1.2 Alvos terapêuticos em tripanosomatídeos

Com os avanços no conhecimento genético do *T. cruzi* (ZINGALES *et al.* 2012, GUHL, RAMÍREZ 2011, MILES *et al.* 2009, EL-SAYED *et al.*, 2005), a busca por quimioterápicos vem se embasando em enzimas como alvos para afetar vias metabólicas específicas e vitais ao parasito. Alguns alvos enzimáticos estudados, visando esta estratégia, são as enzimas da via glicolítica, da biossíntese de poliaminas, da biossíntese de

esteróis, do metabolismo do folato, da biossíntese de microtubúlos, a DNA topoisomerase, a hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, a cisteína protease, a peróxido dismutase e a tripanotiona redutase (*Tc*TR) (MELOS, ECHEVARRIA, 2012), como descritos abaixo:

Dentre as enzimas da via glicolítica de tripanosomatídeos, destaca-se a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH) e a glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), pois as formas de *T. cruzi* são altamente dependentes da glicólise para a produção de ATP, e muitas enzimas glicolíticas apresentam características próprias, o que as diferenciam do hospedeiro (VERLINDE *et al.*, 2001).

Enzimas da biossíntese de poliaminas atuam regulando o crescimento e diferenciação celular. Na síntese destas moléculas, encontra-se a ação de duas enzimas, que mostram-se alvos interessantes: a ornitina descarboxilase e a *S*-adenosil-*L*-metionina descarboxilase. Outra função das poliaminas em tripanosomatídeos é servirem como substrato para a síntese da tripanotiona (BRUN *et al.*, 1996).

As enzimas da biossíntese de esteróis mais estudadas em tripanosomatídeos são: hidroximetilglutaril-coenzima A redutase, esqualeno epoxidase, C14 α -esterol desmetilase e esteroil 24-C-metiltransferas. O *T. cruzi*, de forma similar aos fungos, sintetiza ergosterol, mas não colesterol. Esta característica os diferencia de mamíferos, e torna essas enzimas alvos quimioterápicos (URBINA, 2009).

A enzima di-hidrofolato redutase (DHFR), outro alvo de interesse nos tripanosomatídeos, está relacionada ao metabolismo dos folatos. A inibição da via dos folatos impede a formação do tetra-hidrofolato, que é essencial para a síntese das bases nitrogenadas, sendo que a deficiência desses compostos purínicos e pirimidínicos pode levar a inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas (SOARES-BEZERRA, LEON, GENESTRA, 2004).

Enzimas da biossíntese de microtúbulos possuem papel importante para os tripanosomatídeos, uma vez que sua forma celular particular é definida por seu citoesqueleto interno. A diferença estrutural entre as tubulinas de parasitos e mamíferos é de aproximadamente 18%, destacando que estas enzimas são bastante abundantes em tripanosomatídeos e sua inibição é vital aos parasitos (LIBUSOVÁ *et al.*, 2004).

DNA topoisomerasas são enzimas que catalisam mudanças na topologia da molécula de DNA. O DNA do cinetoplasto dos tripanosomatídeos tem gerado grande interesse no meio científico como um alvo quimioterápico, sendo a enzima mais estudada a DNA topoisomerase I, envolvida no relaxamento de rede do DNA do cinetoplasto (SLUNT *et al.*, 1996).

A hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase exerce papel importante para os tripanosomatídeos, pois recuperam purinas em seu ciclo de vida, uma vez que estes parasitos são autotróficos para purino-nucleotídeos, não sendo capazes de sintetizá-los (FREYMANN *et al.*, 2000).

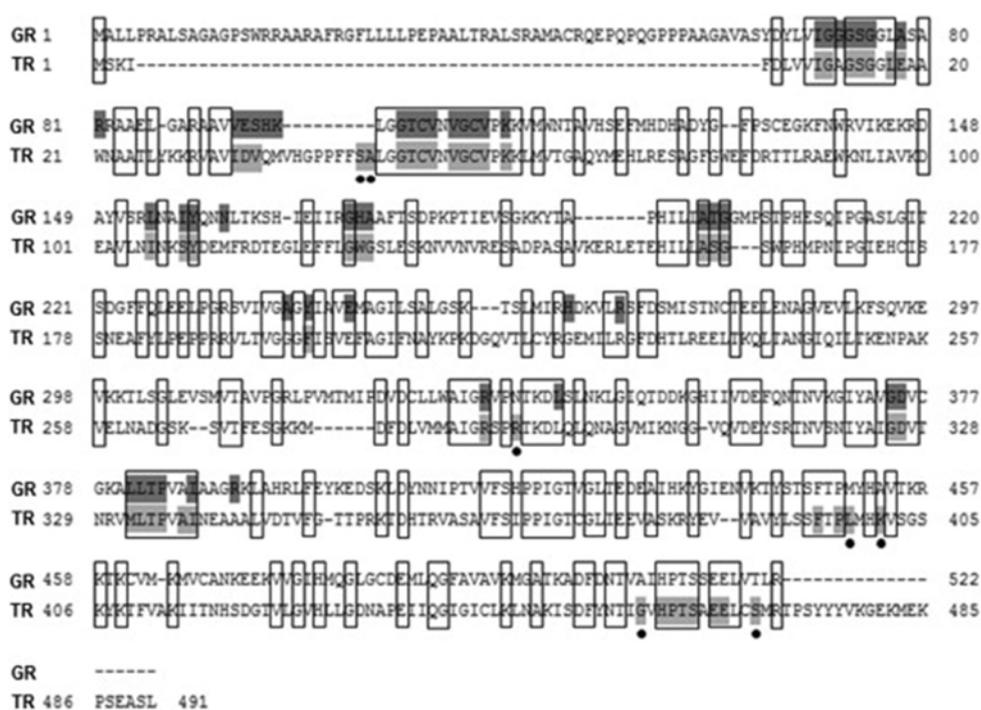
A inibição de enzimas cisteína-proteases é bastante estudada na busca de quimioterápicos. No *T. cruzi* é chamada especificamente de cruzaina e apresenta importante papel no ciclo de desenvolvimento do parasito, pois está envolvida na penetração do parasito dentro das células hospedeiras, além de participar de sua nutrição e de mecanismos de escape contra o sistema imune do hospedeiro (STEERT *et al.*, 2010).

Outro alvo quimioterápico é a enzima superóxido dismutase, a qual catalisa a formação de oxigênio e peróxido de hidrogênio proveniente de radical superóxido através de reações alternadas de redução e de oxidação do metal em seu sítio ativo. Assim, a inibição desta enzima provoca um estresse oxidativo no parasito pelo acúmulo do íon superóxido (TURRENS, 2004).

A enzima *TcTR*, código EC 1.8.1.1, descrita em 1985, é exclusiva em tripanosomatídeos e desempenha um importante papel na defesa antioxidante destes parasitos (FAIRLAMB *et al.*, 1985). A *TcTR* é uma flavoproteína dissulfeto redutase, classificada como oxirredutases, dependente de NADPH e catalisa a redução da tripanotiona dissulfeto T(S)₂ em tripanotiona ditiol T(SH)₂, desencadeando assim, uma cascata de eventos responsáveis pela neutralização de espécies reativas de oxigênio. Desta forma, a *TcTR* mantém um ambiente redutor no interior do parasito, protegendo-o do estresse oxidativo. Inicialmente foi realizado um estudo comparando-se as enzimas do parasito e a humana verificando-se que há 42% de identidade entre estas enzimas (ncbi: gi|307133762:5001-54909 – GR – Homo sapiens; gi|71405344:2956-4434 Trypanosoma cruzi strain CL Brener). Porém estas enzimas possuem diferenças em seus sítios ativo, sendo que a *TcTR* apresenta a cavidade mais lipofílica que a GR. A *TcTR* apresenta

resíduos carregados negativamente e regiões hidrofóbicas em seu sítio ativo, a GR apresenta resíduos de arginina, carregados positivamente (PITA, PASCUTTI, 2011, OLIVEIRA *et al.*, 2008). A figura 2 ilustra os aminoácidos de ligação com o substrato das enzimas e na figura 3 ilustra os substratos das duas enzimas e principais diferenças.

Blumenstiel *et al.* (1999) determinou a inibição das enzimas *TcTR* e GR frente a compostos derivados nitrofuranos e naftoquinonas. Dentre os compostos avaliados pelos autores encontra-se o composto-protótipo, NF, apresentando inibição na concentração de 100 μ M de 85 % para a enzima *TcTR* e 75 % para a GR.



- Sequência idêntica
 ■ Aminoácidos de ligação com substrato da GR
 ● Aminoácidos de ligação apenas com substrato da TR
 ■ Aminoácidos de ligação com substrato da TR

Figura 2. Alinhamento das seqüências de proteínas primárias de glutatona redutase humano (GR) e *T. cruzi* tripanotona redutase (*TcTR*). Os aminoácidos idênticos são indicados por caixas em torno das seqüências. As linhas tracejado representam os aminoácidos que não são encontrados na seqüência comparada. Os destaques cinzentas escuras e claras representam prováveis regiões de ligação nas enzimas GR e *TcTR*, respectivamente. Os pontos pretos representam os resíduos de aminoácidos que são os locais de ligação prováveis ou são os sítios de ligação não-ligante para a enzima humana. (JORGE *et al.*, 2013)

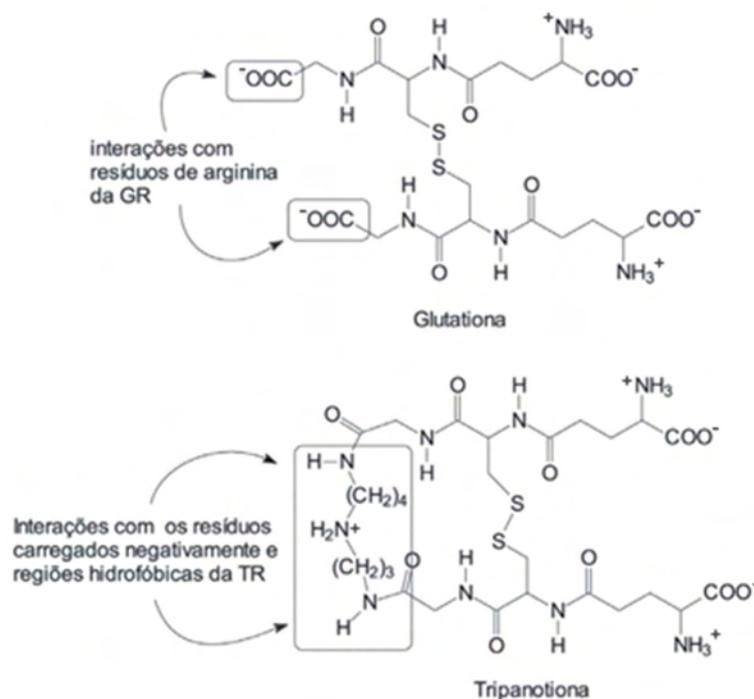


Figura 3. Comparação entre as estruturas da glutathione e tripanotona, substratos da GR e *TcTR*, respectivamente (Oliveira *et al.*, 2008).

Outros alvos terapêuticos vêm sendo estudados e revisados em literatura (MELOS, ECHEVARRIA, 2012), assim como a busca de compostos estruturalmente específicos ou inespecíficos, mas com alta capacidade antiparasitária (GONZÁLEZ, CERECETTO, 2011).

1.3 Tratamentos da doença de Chagas

Para o tratamento da doença de Chagas são disponíveis atualmente apenas dois fármacos, benznidazol (BZD) e nifurtimox (NFX) figura 2. No entanto, o benznidazol, *N*-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida, apresenta eficácia somente na fase aguda da doença, onde prevalece a forma tripomastigota do parasito e seus estudos na fase crônica da doença foram avaliados no programa BENEFIT (*BENZnidazol Evolution For Interrupting Trypanosomiasis*) organizado pela iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi: *Drugs for Neglected Diseases initiative*) (DNDi, 2016). O BZD apresenta reações adversas, como dermatite por hipersensibilidade, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica que, muitas vezes, limita ou até impede o seu uso (SOARES SOBRINHO *et al.*, 2007). Outro fármaco disponível é o nifurtimox, 4-(5-nitrofurfurilideno)-amino-1,1-dióxido-3-etiltiomorfolina, porém seu uso foi descontinuado no Brasil devido a reações adversas mais graves. Acredita-se que o nifurtimox atue por biorredução do grupo nitro, por ação de nitrorredutases, formando radical instável, o nitro

ânion, que reage e produz metabólitos de oxigênio, como o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (WILKINSON *et al.*, 2011, SOARES SOBRINHO *et al.*, 2007, URBINA *et al.*, 2003). O *T. cruzi* é parcialmente deficiente em mecanismos de desintoxicação de radicais livres, tornando-o susceptível a tais intermediários (PIACENZA *et al.*, 2013, WILKINSON *et al.*, 2011).

Com objetivo de apoiar atividades de pesquisa e desenvolvimento (P&D) em doença de Chagas, a DNDi estabeleceu uma Plataforma em Pesquisa Clínica de Chagas (CCRP: *Chagas Clinical Research Platform*). A plataforma reúne parceiros, especialistas e partes interessadas para prestar apoio na avaliação e desenvolvimento de novos tratamentos para a doença de Chagas. Dentre os parceiros, destacam-se a Organização Pan America de Saúde, (PAHO: *Pan American Health Organization*) e o Departamento de Controle de Doenças Negligenciadas Tropicais da Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO: *World Health Organization*) (DNDi, 2015 – Portifólio).

Uma das conquistas realizadas pelo CCRP foi a pesquisa de implementação para melhorar as características desfavoráveis do BZD, desenvolvida por meio de uma parceria entre a DNDi e o LAFEPE, em que gerou uma nova formulação para uso pediátrico deste medicamento. A nova formulação possui dose do comprimido reduzida de 100 mg para 12,5 mg e é desintegrado rapidamente em líquido, o que facilita sua administração em crianças de até dois anos. Estas crianças adquirem a doença, normalmente, por transmissão congênita e, em 90% dos casos, podem eliminar o parasito se tratadas no primeiro ano de vida (DNDi, 2016). Outra parceria da DNDi foi realizada com a empresa farmacêutica Eisai (Eisai Company, Ltda., Tóquio, Japão), tendo como resultado um composto denominado E1224, um pró-fármaco do ravuconazol (antifúngico triazólico de nova geração) e inibidor da biossíntese de ergosterol, assim como o posaconazol, de mesma classe química, figura 4. Estudos clínicos em pacientes crônicos foram concluídos com estes dois derivados, porém pouco eficiente em testes clínicos com pacientes (MORAES *et al.*, 2014, DNDi, 2016). Outras classes químicas citadas no portifólio DNDi, incluso no CCPR, são: o K777, um derivado vinilsulfona que inibe cisteína proteases (cruzipaina) (KERR *et al.*, 2009); os derivados de nitroimidazol; e derivados de fenarimol (fungicida), figura 4, (DNDi, 2015 – Portifólio).

Na busca de tratamento ou controle da doença de Chagas, outra abordagem bastante reportada é o estudo de vacinas. Estes estudos abrangem desde a imunização com parasitas

atenuados de cepas não patogênicas a vacinas de proteínas recombinantes, além disso há estratégias multivalentes com a combinação de vários candidatos antigênicos. Estes estudos foram reportados, até o momento, em fase pré-clínica de desenvolvimento (BEAUMIER *et al.*, 2016).

Na literatura encontram-se vários estudos com estruturas químicas diferenciadas para o combate do *T. cruzi*. Dentre elas, o alopurinol (figura 4), um derivado da hipoxantina, apresentou atividade frente ao *T. cruzi* (GALLERANO *et al.*, 1990, COURA, CANÇADO, 2007, SOUZA *et al.*, 1998). Um estudo foi realizado para avaliar os efeitos do tratamento da fase crônica da doença de Chagas com a associação dos antiparasitários alopurinol e BZD, demonstrando que a combinação dos fármacos induziu resposta imunológica, indicado por uma redução da carga parasitária e redução de efeitos adversos (PEREZ-MAZLIAH *et al.*, 2013). Outro estudo com esta característica foi a associação do BZD com a clomipramina (figura 4), fármaco utilizado no tratamento da depressão e com alto poder de inibição da enzima tripanotona redutase (JONES *et al.*, 2010). Neste estudo a associação BZN e clomipramina apresentou menos efeitos colaterais do que o tratamento apenas com BZN, porém o efeito protetor da clomipramina nos tecidos estudados não foi explicado, sendo necessárias investigações experimentais específicas (STRAUSS *et al.*, 2013).

O medicamento amiodarona, figura 4, um agente antiarrítmico utilizado para o tratamento sintomático de pacientes chagásicos crônicos, também foi estudado contra a proliferação das formas amastigotas de *T. cruzi*, sem afetar a viabilidade da célula hospedeira. Esta atividade resulta de um duplo mecanismo de ação, com a interrupção da homeostase do Ca^{2+} e bloqueio da biossíntese do lanosterol (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2012).

Outra estrutura analisada frente à *T. cruzi* é a naftoquinona triazólica. Um de seus derivados (figura 4) apresentou atividade contra a forma tripomastigota de *T. cruzi* com IC_{50} de $17,3 \mu\text{M}$, sendo mais potente que a quinona sem o núcleo triazólico (JUNIOR *et al.*, 2008). Em outro trabalho com naftoquinonas obteve-se atividade tripanocida contra forma tripomastigota de *T. cruzi* de um de seus derivados (figura 4) com IC_{50} de $7,8 \mu\text{M}$ (DA SILVA *et al.*, 2013).

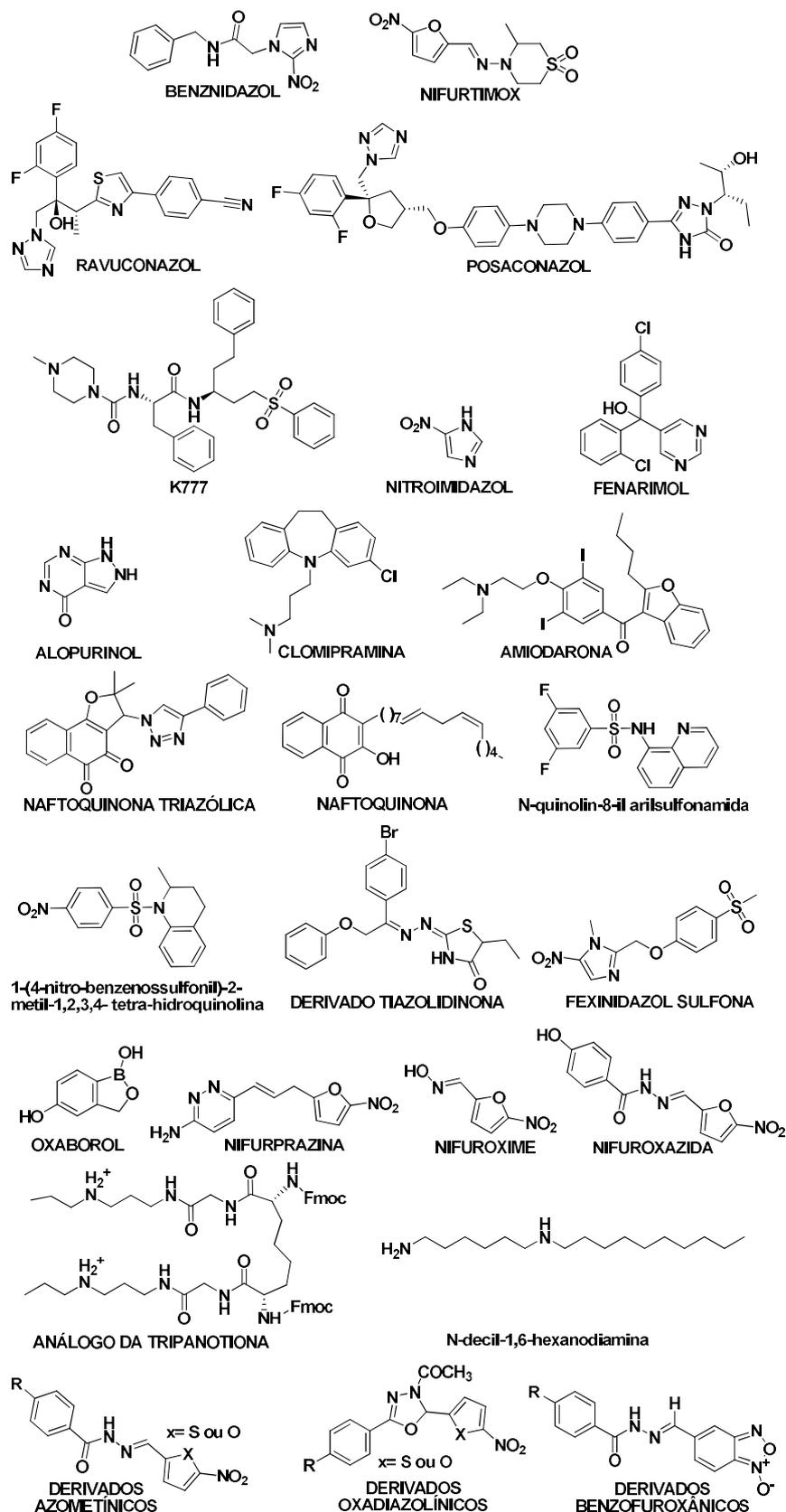


Figura 4. Estruturas químicas dos fármacos de referência benznidazol e nifurtimox e outros compostos e fármacos relatados em literatura quanto à atividade anti-*Trypanosoma cruzi*.

Derivados sulfonamidas têm sido descritos como potenciais agentes tripanocida. DA SILVA *et al.* (2007) sintetizou o derivado *N*-quinolin-8-il-arilsulfonamida (figura 4), que exibiu atividade tripanocida sobre *T. cruzi*. Em outro trabalho, Pagliero e colaboradores (2010) relataram o derivado 1-(4-nitro-benzenossulfonil)-2-metil-1,2,3,4-tetra-hidroquinolina (figura 2), com atividade anti-*T. cruzi* com IC₅₀ de 11,44 μM (PAGLIERO *et al.*, 2010).

Moreira *et al.* (2014), relatam atividade frente as formas tripomastigotas e epimastigota de *T. cruzi* de derivados tiazolidinonas. O derivado mais ativo (figura 4) apresentou IC₅₀ de 4 μM frente a forma tripomastigota da cepa Y e 3,9 μM frente a forma epimastigota da cepa Dm28c. Estes derivados foram avaliados quanto à inibição da enzima cruzipaína, porém sem resultados promissores deste derivado.

Moraes e colaboradores (2014) avaliaram alguns nitroheterocíclicos, BZD, NFX (figura 4A), fexinidazol sulfona (figura 4) e um derivado do oxaborol AN4169 (grupo oxaborol - figura 4) em comparação com inibidores da biossíntese do ergosterol, entre eles o posaconazol e ravuconazol (figura 4). Neste estudo as avaliações biológicas compreenderam dois ensaios frente a um painel de *T. cruzi* com representatividade em cada DTU. Assim foram avaliadas a potência e eficácia da dose-resposta *in vitro* contra o painel de *T. cruzi* e um ensaio de tempo de morte (*time-kill*). Os compostos nitroheterocíclicos e o derivado do oxaborol demonstraram efeito tripanocida rapidamente, com capacidade de erradicação da infecção, porém com menor potência. Diferente dos inibidores do ergosterol, que apesar de mais potentes, não erradicou a infecção (MORAES *et al.*, 2014).

Considerando a busca de compostos anti-*T. cruzi* baseado em um alvo, Holloway *et al.* (2009) realizaram um estudo de busca sistemática, *high-throughput screening* (HTS), para identificar inibidores da *TcTR*. Dentre os compostos reportados como inibidores da *TcTR* na literatura encontram-se análogos do substrato tripanotiona, análogos da espermidina, peptídeos poliaminas, derivados de imipraminas, derivados de fenotiazinas, derivados de mepacrina, derivados de aminodifenil sulfide, carmustina, ajoene, derivados do nitrofurano, derivados de naftoquinonas e complexos tricíclicos de platina. Foram destacados neste trabalho cinco classes químicas como potenciais inibidores da *TcTR*: aril/alquil piperidinas, benzidril, heterociclos nitrogenados, indols conjugados e iminobenzimidazol (HOLLOWAY *et al.*, 2009). Considerando este mesmo alvo, Blumenstiel e colaboradores (1999) realizaram uma triagem de nitrocompostos frente as

enzimas *TcTR* e lipoamida desidrogenase de *T. cruzi*. Os fármacos mais promissores encontrados na época foram a nifurprazina, nifuroxime (figura 4) e nifuroxazida (NF), (figura 4) (BLUMENSTIEL *et al.*, 1999). Mais recentemente Duyzend *et al.* (2012) sintetizou análogos da tripanotiona, substrato da *TcTR*. O mais ativo (figura 4) apresentou K_i de 2 μM , sendo inibidores da *TcTR* muito promissores (DUYZEND *et al.*, 2012). Yamanaka *et al.* (2013) analisou derivados de diaminas alifáticas frente a leishmania e *T. cruzi*. Obtiveram um análogo promissor anti-*T. cruzi*, o *N*-decil-1,6-hexanodiamina (figura 4), o qual apresentou IC_{50} de 1,6 μM frente a forma amastigota intracelular da cepa Y. Foi verificado para este mesmo composto a inibição da *TcTR*, porém sem atividade significativa. Outro aspecto avaliado foi o potencial de despolarização da membrana mitocondrial da forma epimastigota de *T. cruzi*, constatando-se que houve a despolarização em 6 h de exposição ao composto, indicando um possível mecanismo pelo qual atua este composto (YAMANAKA *et al.*, 2013).

No grupo de pesquisa de Tavares e colaboradores foram avaliados análogos da NF (figura 4) frente formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Paula *et al.* (2009) relatou que análogos da NF, derivados azometínicos, com a porção 5-nitrofurano foram mais ativos do que os compostos com a porção 5-nitrotiofeno (figura 4) frente a formas epimastigotas de *T. cruzi*. Em outro trabalho, Ishii *et al.* (2011) demonstrou que derivados oxadiazolínicos com porção 5-nitrotiofeno (figura 4) foram ativos frente ao *T. cruzi*. Derivados benzofuroxânicos (figura 4) foram planejados, sintetizados e avaliados frente ao *T. cruzi*, cepa Y, por Jorge *et al.*, 2013. Estes derivados demonstraram atividade anti-*T. cruzi* superior ao BZD (JORGE *et al.*, 2013). Derivados oxadiazolínicos e azometínicos com porção 5-nitrofurano, figura 4, foram investigados frente a forma epimastigota da cepa Y de *T. cruzi* obtendo-se atividade superior ao BZD para as duas variações estruturais. Foi identificado um composto com atividade anti-*T. cruzi* promissora, o 4-butil-[*N'*-(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida com IC_{50} de 1,05 μM , o qual teve seu estudo continuado no presente trabalho (PALACE-BERL *et al.*, 2013).

1.4 Compostos nitroheterocíclicos

Derivados nitroheterocíclicos apresentam atividade antimicrobiana de amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias Gram-negativas, Gram-positivas além de apresentarem atividade frente a fungos, *T. cruzi*, micobactéria e utilização como anti-hipertensivo (ZORZI *et al.*, 2014, ZHU *et al.*, 2014, JORGE *et al.*, 2013, ISHII *et al.*, 2011,

SRIRAM *et al.*, 2010, TAVARES *et al.*, 1998, CERECETTO *et al.*, 1998, BRENER, 1961). Muitos fármacos contendo o grupo nitro em sua estrutura são utilizados na terapêutica humana e veterinária. Destacando-se os nitrofuranos, verifica-se que alguns fármacos possuem em comum as porções azometínica e 5-nitro-2-furano em suas estruturas, como o NFX (Lampit[®], Roche), utilizado no tratamento da doença de Chagas e estudado frente ao *Trypanosoma brucei*, agente etiológico da doença do sono (DND, 2014, WHO/OMS, 2014); nitrofurantoína (Macrofantina[®], Mantecorp), fármaco antibacteriano oral utilizado no tratamento de infecção urinária; nitrofurazona, (Furacin[®], Mantecorp) antibacteriano tópico; nifuroxazida (NF) (Passifuril[®], Millet Roux), antibacteriano oral utilizado principalmente para infecções intestinais; furazolidona (Giarlam[®], UCI-Pharma), antibacteriano utilizado para infecções intestinais, possuindo também atividade contra o parasito *Giardia lamblia* (LEMKE, WILLIAMS, 2008, MERCK, 1996, KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1988). Estes fármacos se encontram ilustrados da figura 5.

Os efeitos tóxicos mais comuns relacionados aos nitrocompostos são estomatite, anorexia, diarreia e náuseas além de dermatites, polineurites e discrasias sanguíneas, quadros que podem ser agravados em decorrência de hipersensibilidade e da dose empregada (KOROLKOVAS, FRANÇA, 2011, PAULA, SERRANO, TAVARES, 2009, COURA, CASTRO, 2002). Apesar de tais características, esta classe de compostos vem sendo estudada com a finalidade de identificação de análogos terapêuticamente promissores que apresentem maior seletividade e redução da toxicidade (ZORZI *et al.*, 2014, ZHU *et al.*, 2014, JORGE *et al.*, 2013, ISHII *et al.*, 2011, SRIRAM *et al.*, 2010). Muitas vezes, devido à falta de opções terapêuticas, os nitrocompostos são eleitos como fármacos de primeira escolha, apesar de seus efeitos adversos, como o BZD para a doença de Chagas (DNDi, 2015). Neste contexto, recentemente o NFX foi utilizado com sucesso no tratamento de casos terminais da doença do sono e foi incluso na Lista de Medicamentos Essenciais (WHO/OMS, 2014).

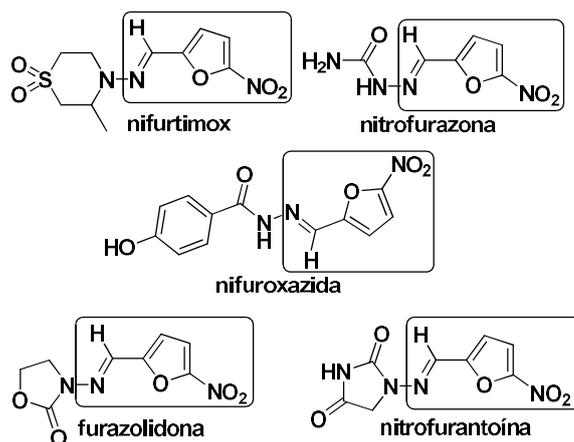


Figura 5. Fármacos nitrofurânicos utilizados na terapêutica humana. Em destaque porção em comum das estruturas dos fármacos.

O interesse por nitroheterocíclicos no combate de tripanosomatídeos data da década de 50, em que identificaram a nitrofurazona (figura 5) como um composto-protótipo promissor para tratamento da doença de Chagas e da doença do sono (EVENS, NIEMEGEREERS, PACKCHANIAN, 1957, PACKCHANIAN, 1955, DODD, 1946). O fármaco NFX foi introduzido na terapêutica em 1965 pela Bayer e o BZD na década seguinte como alternativa para o tratamento da doença de Chagas. Recentemente a ação destes compostos foi esclarecida, verificando-se que compostos nitroheterocíclicos possuem características de pró-fármacos (WILKINSON *et al.*, 2011).

Anteriormente o mecanismo citotóxico do NFX foi atribuído à produção de ânions, de superóxido e de nitro radicais, enquanto que o modo de ação do BZD era mais obscuro (POZAS *et al.*, 2005, VIODÉ *et al.*, 1999, SQUELLA *et al.*, 1996). A atividade tripanocida de compostos nitro-heterocíclico é agora conhecido por depender de uma enzima nitrorredutase presente em parasitos (NTR). Esta enzima está ausente nas células de mamífero, sendo esta uma diferença que constitui a base para a seletividade desta classe de compostos. O papel desta enzima na ativação do fármaco tem sido geneticamente e bioquimicamente validado pela supressão do gene da NTR em tripanosomatídeos e verificação da suscetibilidade destes aos fármacos NFX e BZD (WILKINSON *et al.*, 2008). A NTR catalisa a redução de 2 elétrons de compostos nitroheterocíclicos no interior do parasito, produzindo metabólitos tóxicos sem significativa geração de superóxido (WILKINSON *et al.*, 2011, WILKINSON *et al.*, 2008). Na figura 6 encontra-se o

mecanismo de redução de nitrofuranos pela ação de NTR do tipo I e II presentes em tripanosomatídeos.

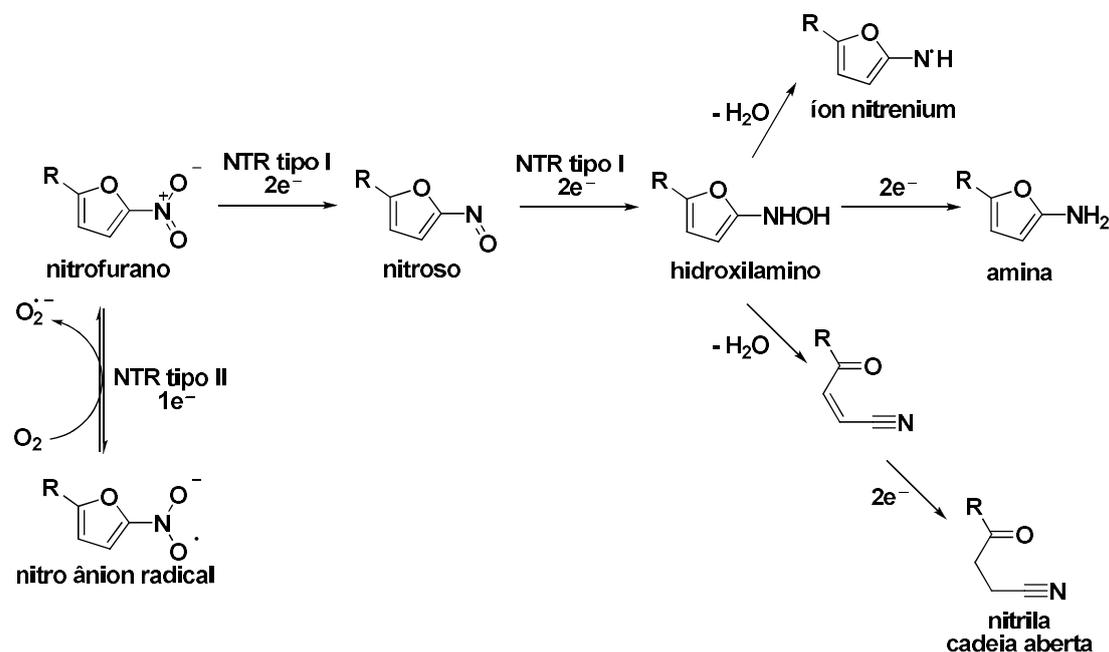


Figura 6. Redução de nitrofuranos por nitrorredutases do tipo I e tipo II.

Adaptado de Wilkinson *et al.* 2011.

A redução de nitrofuranos por nitrorredutases do tipo I e tipo II ocorre por reações mediadas por nitrorredutases tipo I (NTR I), em que, inicialmente, o grupo nitro, no caso nitrofurano (ArNO_2), sofre uma série de reduções de dois elétrons, originando o derivado hidroxilamino (ArNHOH) por meio de um intermediário instável nitroso (ArNO). A hidroxilamina pode ser metabolizada por várias vias propostas: (i) Formação de um íon nitrenium (ArN^+H), (ii) redução para a forma de amina (ArNH_2), ou (iii) clivagem do anel furano e formando, em seguida, nitrilas ($-\text{C}\equiv\text{N}$) saturados e insaturados de cadeia aberta. Em contraste, as NTRs tipo II efetuam a redução de um elétron do grupo nitro (ArNO_2), levando à formação de um radical nitro instável ($\text{ArNO}_2^{\bullet-}$). Na presença de oxigênio, esta, em seguida, reage e conduz à geração de superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e a regeneração do pró-fármaco nitrofurano (WILKINSON *et al.*, 2011, WILKINSON *et al.*, 2008).

1.5 Planejamento e desenvolvimento de fármacos – estudos das relações estrutura-atividade

A pesquisa de novos princípios biologicamente ativos vem se desenvolvendo ao longo das décadas e abordagens ao nível molecular enriquecem e direcionam os estudos. Desde o século XIX o desafio de relacionar características de íons, átomos e moléculas e suas respostas biológicas originou os estudos de relações entre a estrutura-química e

atividade biológica (MONTANARI, 2011, BORMAN, 1990). Considera-se de extrema relevância entender as forças de interação entre fármacos que se ligam em seus respectivos alvos moleculares (receptores, enzimas, proteínas transportadoras, DNA, canais iônicos, etc) e desencadeiam a resposta biológica. Entre as forças envolvidas nas interações fármaco-receptor, ou ligante-alvo, que são as mesmas que ocorrem entre compostos orgânicos, estão as ligações covalentes (pouco comuns em fármacos; entre 40 a 110 kcal/mol); interações iônicas (eletrostáticas; 5 a 10 kcal/mol); ligações de hidrogênio (2 a 10 kcal/mol); interações íon-dipolo e dipolo-dipolo (1 a 7 kcal/mol); interações hidrofóbicas (1 kcal/mol) e interações de van der Waals (0,5 a 1 kcal/mol). Para o entendimento de tais interações, propriedades moleculares, relacionadas diretamente à estrutura química, são utilizadas nos estudos das relações estrutura-atividade envolvidos no processo de desenvolvimento de fármacos. As propriedades moleculares podem ser de caráter constitucional, intrínseco, físico-químico, topológico, geométrico, eletrônico, hidrofóbico, misto, e são expressas por descritores calculados e obtidos experimentalmente (FERREIRA, KIRALJ, 2011).

A descoberta de novos fármacos pode ocorrer ao acaso (intuitivamente), ou a partir de estratégias mais direcionadas, como o planejamento racional de fármacos, que considera as bases moleculares da doença no processo de desenvolvimento e utilizam-se as informações estruturais do alvo terapêutico e do efector para direcionar à resposta biológica desejada (BARREIRO, FRAGA, 2005, SILVERMAN, 2004, (WERMUTH, 2008, BARREIRO, FRAGA, 2005, SILVERMAN, 2004).

No desenvolvimento de fármacos baseado em um composto-protótipo, com finalidade de otimização, são realizadas modificações na estrutura considerando-se a atividade biológica já conhecida. Estas alterações podem ser realizadas por modificação de volume e forma e da conformação do composto, alterando-se, por exemplo, o tamanho de cadeias alquílicas ou os anéis (ciclos), o grau de insaturações ou a quantidade de grupos cíclicos ou anéis (BARREIRO, FRAGA, 2008, LEMKE, WILLIAMS, 2008, THOMAS, 2003).

Considerando-se as estratégias para o desenvolvimento de fármacos baseada nas relações entre estrutura química e atividade biológica, pode-se seguir abordagens qualitativas ou quantitativas. A abordagem qualitativa compreende os estudos das relações estrutura entre estrutura química e atividade biológica (REA ou SAR, *structure-activity*

relationships) e considera a influência de modificações na estrutura química de compostos sobre a resposta biológica em questão. Os estudos quantitativos (*Quantitative structure-activity relationships*), por sua vez, envolvem a construção de modelos matemáticos de previsão, para direcionar as modificações moleculares de interesse na resposta biológica (LEMKE, WILLIAMS, 2008, BARREIRO, FRAGA, 2008, WERMUTH, 2008, THOMAS, 2003).

Os modelos de Hansch-Fujita foram os precursores da abordagem quantitativa, onde se verificou a relação da atividade biológica de compostos orgânicos com parâmetros físico-químicos. O modelo de Free-Wilson demonstrou que, em uma série de compostos, a contribuição para a atividade biológica é aditiva e dependente somente do tipo e da posição do substituinte (LEMKE, WILLIAMS, 2008, WERMUTH, 2008, KUBINYI, 1993). A análise de Hansch, ou QSAR-2D, ou QSAR clássico, se aplica em estudos de séries de compostos que apresentam estruturas químicas semelhantes e as modificações estruturais são realizadas por grupos substituintes em posições definidas (KUBINYI, 1993). Já os estudos de relações quantitativas estrutura-atividade em três dimensões (QSAR-3D) consideram as propriedades moleculares 3D relacionadas à estereoquímica e configuração de conjuntos de compostos e suas possíveis interações com a biomacromolécula alvo (sítio de interação hipotético) (CRAMER *et al*, 1988). Isso implica no fato de que a conformação selecionada para o estudo de QSAR passa a exercer papel fundamental na obtenção dos dados finais (KUBINYI, 1997).

Outro avanço foi a abordagem quantitativa na quarta dimensão, QSAR-4D, descrita por Hopfinger e colaboradores (HOPFINGER *et al.*, 1997), em que se utiliza como descrição da estrutura molecular um perfil de amostragem conformacional (PAC) ao invés de apenas uma única conformação e os descritores são de ocupação, não campos moleculares. Tal abordagem contempla a liberdade conformacional aos modelos de QSAR-3D.

Nos estudos de SAR e QSAR a utilização de métodos multivariados é bastante aplicada. Em estudos de SAR, métodos de análise exploratória não supervisionados são utilizados com a finalidade de reconhecimento de padrões no conjunto de dados, como exemplo a análise de componentes principais (*principal component analysis*, PCA) e análise de agrupamentos hierárquicos (*hierarchical clusters analysis* – HCA) (FERREIRA, 2002).

Para a construção dos modelos matemáticos nos estudos de QSAR podem ser utilizados diferentes métodos de regressão. O método de regressão linear múltipla (MLR, *Multiple Linear Regression*), por exemplo, apesar de sua simplicidade e facilidade de interpretação dos resultados, apresenta a desvantagem de ser sensível à presença de colinearidade entre as variáveis independentes (descritores). Este método se adapta ao tratamento de dados através do método clássico descrito por Hansch-Fujita (HANSCH, LEO, 1995; KUBINYI, 1993). Como alternativa, os métodos de regressão que utilizam a análise de componentes principais como fundamento não apresentam a limitação relacionada à colinearidade, como ocorre no método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, *Partial Least Square*) (FERREIRA, 2002). Na análise QSAR multivariada por PLS o número de descritores ou variáveis independentes é maior ou igual ao número de compostos do conjunto investigado. O método de regressão PLS agrupa os descritores que apresentam informações semelhantes em uma única variável latente (VL), ou componente PLS, e utiliza as VL disponíveis e não intercorrelacionadas para a construção do modelo de QSAR. Assim, além de evitar a colinearidade o método de regressão PLS auxilia também como ferramenta prévia de seleção de variáveis para a construção de modelos QSAR (FERREIRA, 2002).

Para auxiliar no processo de desenvolvimento de fármacos utilizam-se os métodos de modelagem molecular. Modelagem molecular é definida como “a investigação das estruturas e das propriedades moleculares utilizando a química computacional e as técnicas de visualização gráfica a fim de fornecer uma representação tridimensional do sistema estudado” (SANT’ANNA, 2002). A aplicação dos métodos e programas de modelagem molecular na pesquisa farmacêutica de novos fármacos contribuiu para o desenvolvimento do campo de estudo denominado planejamento racional auxiliado por computador, CADD (*Computer-Aided Drug Design*), onde a informação estrutural 3D do alvo, do ligante, ou do complexo, são consideradas no processo de planejamento e desenvolvimento de novos candidatos a fármacos (COHEN, 1996, SANT’ANNA, 2002, WERMUTH, 2008). As estratégias do CADD são definidas de acordo com a disponibilidade ou não da informação estrutural 3D da biomacromolécula alvo. De forma geral, quando a estrutura 3D do alvo está disponível desenvolve-se o planejamento direto, que se subdivide em: (i) SBDD (*structure-based drug design*) ou, planejamento baseado na estrutura (estruturas 3D do efetor e o alvo disponíveis); e (ii) planejamento *de novo* (somente estrutura 3D do alvo disponível). Quando não se tem a informação 3D do alvo, a abordagem é denominada

indireta e a estratégia mais utilizada é o planejamento baseado na estrutura de análogos, LBDD (*ligand-based drug design*) (COHEN, 1996; WERMUTH, 2008).

A escolha das estratégias do CADD e a aplicação de métodos de modelagem molecular e abordagens de QSAR adequados contribuem para direcionar o processo de planejamento e desenvolvimento de fármacos, reduzindo (*i*) o número de compostos a serem sintetizados, (*ii*) a quantidade de ensaios experimentais e (*iii*) a utilização de animais de experimentação, além de agregar valor ao produto final.

2 JUSTIFICATIVA

Diante das informações expostas, devido à considerável parcela da população acometida pela doença de Chagas e às reduzidas opções terapêuticas, a busca por novos agentes quimioterápicos deve ser incentivada com a finalidade de encontrar alternativas para o tratamento da doença e com redução de efeitos adversos. Os investimentos destinados à pesquisa e desenvolvimento (P&D) de fármacos para doenças negligenciadas, em 2015, foi de US\$ 3,377 bilhões, porém, este valor representa apenas 6,59% do investimento total em P&D de fármacos neste mesmo ano (US\$ 51,2 bilhões em P&D em 2015), o que ilustra o baixo interesse financeiro direcionado para estas doenças (PhRMA, 2015, MORAN *et al.*, 2015). Do montante de US\$ 3,377 bilhões, apenas US\$ 8,3 milhões foram destinados à doença de Chagas, o que representa 0,25 % do investimento em doenças negligenciadas e 0,016% do investimento total em P&D de novos fármacos (MORAN *et al.*, 2015). Como resultado, nos últimos 25 anos apenas 1% de todos os medicamentos desenvolvidos no mundo foram para tratar as doenças negligenciadas (DNDi, 2016). Estes dados evidenciam a necessidade de investimento na busca de alternativas terapêuticas para a doença de Chagas. Diante do cenário de investimento mundial em doenças negligenciadas, estudos acadêmicos voltados à busca de alternativas terapêuticas para a doença de Chagas possui grande relevância nacional, uma vez que, estima-se que aproximadamente 4 milhões de brasileiros estejam contaminados, dados levantados em consenso científico no II consenso brasileiro de doença de Chagas em 2016 (DIAS *et al.*, 2016). Considerando que os dois fármacos disponíveis para o tratamento desta doença são nitrocompostos, BZD e NFX, a busca de compostos otimizados desta classe é visada no meio científico, principalmente tratando-se de anti-tripanosomatídeos (MORAES *et al.*, 2014).

3 OBJETIVO

Este trabalho visa estudar compostos nitrofurânicos com estrutura análoga à nifuroxazida com atividade anti-*T. cruzi*, envolvendo as etapas de planejamento, síntese, identificação e avaliação da atividade frente a diferentes cepas de *T. cruzi*, construção de modelos quantitativos de relações estrutura química e atividade biológica com abordagem multivariada (QSAR multivariado) para auxiliar na previsão de novas estruturas com perfil farmacológico otimizado, além de investigar possíveis mecanismos de ação destes compostos, a fim de identificar compostos com potencial aplicação no tratamento da doença de Chagas.

Objetivos específicos:

- Planejar a modificação molecular de compostos nitrofurânicos;
- Sintetizar e identificar os compostos planejados;
- Determinar a atividade anti-*T. cruzi in vitro* dos compostos obtidos frente às cepas Silvio X10 cl1, Y, Bug 2149 cl10 e Colombiana do parasito em sua forma epimastigota;
- Construir as estruturas tridimensionais e calcular as decritores de cda composto do conjunto estudado;
- Construir, avaliar e interpretar os modelos QSAR com abordagem multivariada, aplicando algoritmo OPS e método de regressão por quadrados mínimos parciais, PLS;
- Prever compostos mais ativos baseados nos modelos QSAR, obtê-los e avaliar quanto a atividade biológica;
- Determinar a atividade anti-*T. cruzi in vitro* dos compostos obtidos frente à cepa Y da forma amastigota do parasita;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos frente às células LLC-MK₂;
- Determinar a atividade dos compostos frente às enzimas tripanotiona redutase e glutationa redutase;
- Avaliar ação dos compostos e fármacos quanto a despolarização da membrana mitocondrial por citometria de fluxo.

4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Direcionado à identificação de estruturas químicas com atividade anti-*T. cruzi*, as principais etapas deste trabalho estão ilustradas na figura 7:

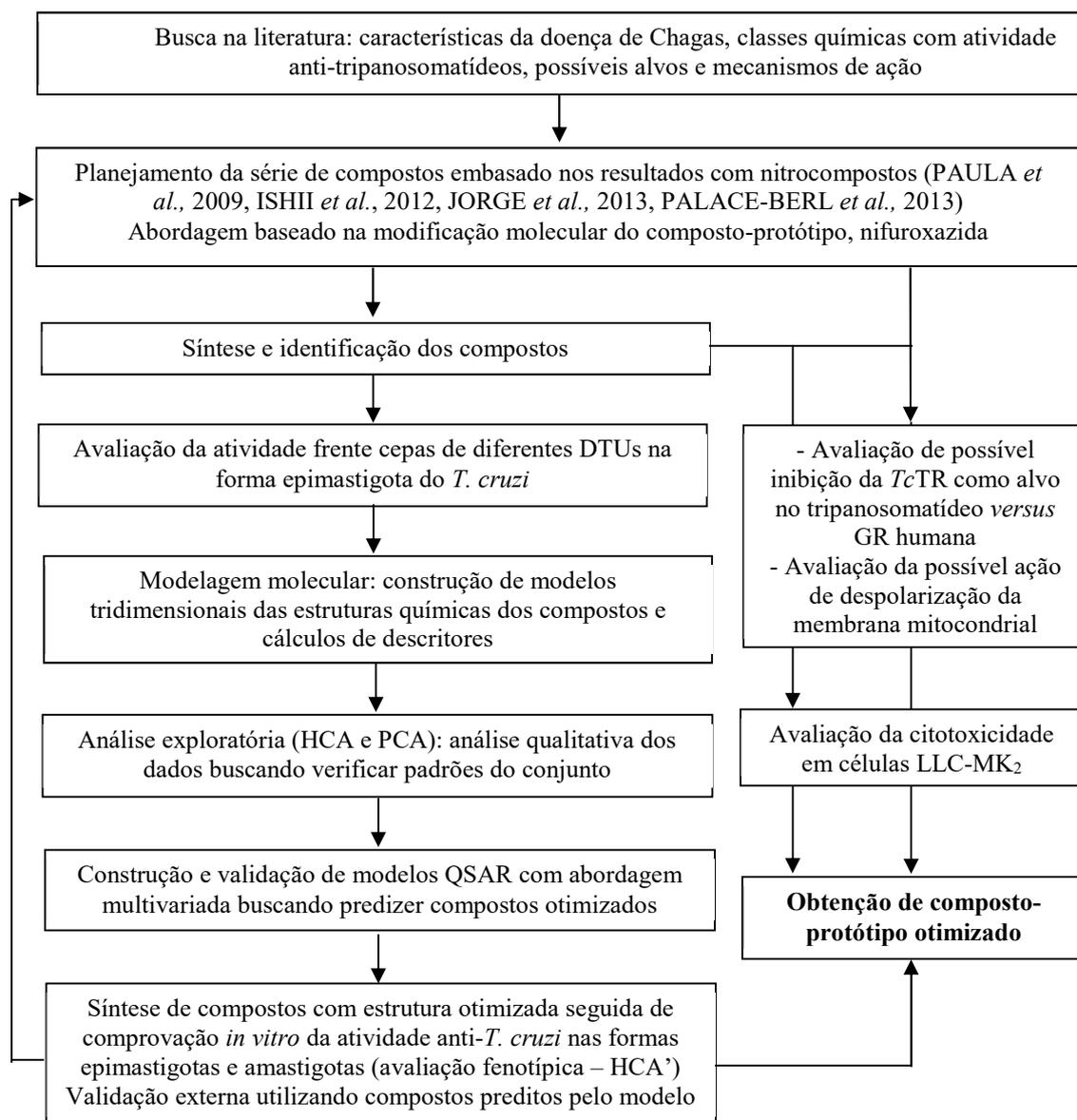


Figura 7. Planejamento experimental das principais etapas do trabalho.

5 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

5.1 Planejamento da série de compostos

O planejamento dos compostos neste trabalho foi fundamentado na modificação molecular do fármaco NF, elegido como composto-protótipo devido sua atividade anti-parasitária previamente reportada por nosso grupo de pesquisa (PAULA *et al.*, 2009) e sua semelhança estrutural com o NFX. As modificações estruturais foram embasadas em resultados de trabalhos anteriores (PALACE-BERL *et al.*, 2013, JORGE *et al.*, 2013, ISHII *et al.*, 2012, PAULA *et al.*, 2009). Em trabalho recente (PALACE-BERL, 2012), verificamos a atividade anti-*T. cruzi* em formas epimastigotas da cepa Y do parasito, além da citotoxicidade frente a macrófagos murinos de linhagem J774 de compostos 5-nitro-furfurilidênicos com estruturas azometínicas e oxadiazolínicas. Os resultados obtidos demonstraram que todos os compostos planejados apresentavam atividade anti-*T. cruzi* superior ao fármaco de referência BZD, sendo cinco compostos com atividade superior ao NFX. O composto mais ativo encontrado foi 4-butil-[*N'*-(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida ($IC_{50} = 1,05 \pm 0,07 \mu M$) frente a cepa Y de *T. cruzi* em sua forma epimastigota na fase estacionária de crescimento. Nos estudos de relações estrutura-atividade, utilizando a análise exploratória de dados, os resultados indicaram uma forte influência dos descritores ClogP (logaritmo do coeficiente de partição calculado pelo método de contribuição de fragmentos) e momento dipolo (propriedade eletrônica). Os resultados indicaram a necessidade de um equilíbrio entre lipofilicidade e hidrofilicidade para uma melhor atividade frente ao parasito em sua forma epimastigota (PALACE-BERL *et al.*, 2013, PALACE-BERL, 2012).

Assim, para o planejamento da série de compostos, foi considerado o composto mais ativo encontrado em trabalhos anteriores, o 4-butil-[*N'*-(5-nitrofurano-2-il)metileno]benzidrazida, realizando-se modificações estruturais na busca de intervalos maiores de atividade anti-*T. cruzi* para posterior construção de modelos de QSAR multivariado. Neste aspecto foi considerado a propriedade lipofilicidade representada pelo descritor ClogP para se obter esta variabilidade. O ClogP é um descritor que se mostrou relevante nos estudos anteriores e altamente correlacionado com a atividade biológica (PALACE-BERL *et al.*, 2013).

Outros aspectos foram considerados no planejamento com vistas à obtenção dos compostos com melhor biodisponibilidade. Em 1996, Lipinski e colaboradores relataram

alguns parâmetros que auxiliam na identificação de compostos conforme características farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Os parâmetros associados com a solubilidade e a permeabilidade dadas como relevantes foram: massa molecular, ClogP (descriptor de lipofilicidade), número de doadores de ligação hidrogênio (HBD – *Hydrogen Bond Donors*), número de receptores de ligação hidrogênio (HBA – *Hydrogen Bond Acceptors*). A preconização destes parâmetros ficou conhecida pelo mnemônico “Regra dos Cinco” (RO5 – *rule of 5*), pois para cada um dos quatro parâmetros, os valores encontrados estavam próximos a cinco ou múltiplos de cinco. A RO5 estabelece que absorção ou permeação reduzida será mais comum quando houver mais do que 5 doadores de ligação hidrogênio (expresso pela soma de -OH e -NH na molécula); massa molecular for maior do que 500 Da; o ClogP for maior do que 5; e quando houver mais do que 10 receptores de ligação hidrogênio (expresso pela soma de átomos de N e O) (LIPINSKI, 2004, LIPINSKI *et al.*, 1996).

Ghose, Viswanadhan e Vendolok, em 1998, complementaram estes estudos estabelecendo outros parâmetros como importantes na triagem de compostos com maior biodisponibilidade, sendo estes a modificação do intervalo de valores de ClogP entre -0,4 a 5,6, a inclusão do parâmetro de refratividade molar (MR), variando de 40 a 130, a massa molar variando de 180 a 500 (Da ou U ou g), o número de átomos na molécula entre 20 e 70 e a inclusão do parâmetro área de superfície polar (PSA) sendo $< 140 \text{ \AA}^2$ (GHOSE, VISWANADHAN, VENDOLOSK, 1998).

Outra extensão da RO5 foi formulada após o estudo de uma série de compostos ensaiados *in vivo*, utilizando modelo murino. Neste trabalho, compostos com o número de ligações rotáveis menor do que dez (10) e área de superfície polar (PSA) menor ou igual a 140 \AA^2 (ou a soma do número de receptores e de doadores de ligação hidrogênio menor do que 12) apresentam melhor biodisponibilidade oral neste modelo animal. Também foi observado que o aumento no número de ligações rotáveis possui um efeito desfavorável na velocidade de permeação (VEBER *et al.*, 2002).

Desta forma, seguindo tais diretrizes, os descritores citados (ClogP, HBA, HBD, PSA, MR, massa molar, ligações rotáveis e número de átomos) foram considerados no planejamento dos compostos e calculados utilizando-se o programa *Marvin Beans* (*Marvin Beans*, version 5.0.4.1; ChemAxon Ltd.: 1998-2010, Budapeste, Hungria). Os compostos possuem substituições na porção fenólica da molécula, retirando-se o grupo fenila e

incluindo-se grupos benzeno substituídos, alifáticos, cicloalquil e heterocíclicos, a fim de obter uma diversidade estrutural que apresente variações não só na hidrofobicidade, mas também no efeito eletrônico e topológico. As estruturas planejadas encontram-se na figura 8. O planejamento dos compostos foi realizado ao longo do trabalho, sendo os últimos compostos (BSF-37, BSF-38, BSF-39 e BSF-40) planejados com auxílio dos modelos de QSAR gerados.

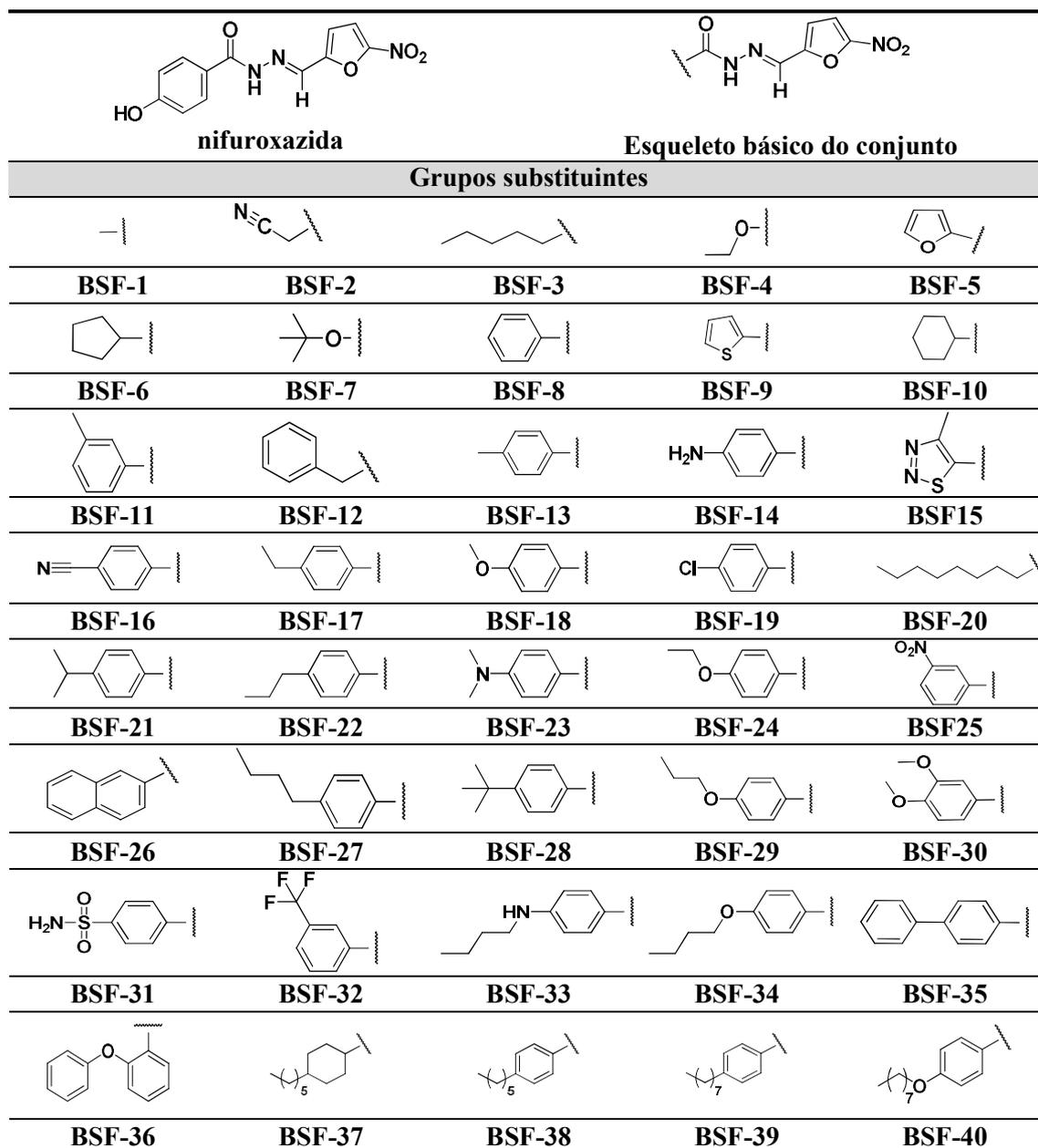
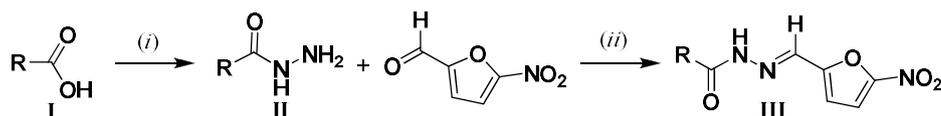


Figura 8. Estruturas dos compostos planejados e composto-protótipo nifuroxazida.

5.2 Obtenção dos derivados do 5-nitrofurano

A rota de síntese adotada para obtenção dos compostos planejados foi constituída de duas etapas: esterificação seguida da hidrazinólise, para obtenção de hidrazidas substituídas, e reação de condensação com formação de ligação imina para obtenção de bases de Schiff. Estas etapas estão representadas na figura 9 e foram realizadas no Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos (LPDF) da FCF/USP.



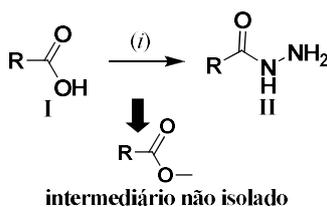
R: grupos alquila, cicloalquila, fenila e heterocíclicos

Condições de reação: (i): CH₃OH, H₂SO₄/refluxo/4 h; N₂H₄ 80 % aq/refluxo/30 min; (ii): H₂O, H₂SO₄, CH₃COOH, C₂H₅OH/refluxo/1 h ou C₂H₅OH t.a./12h.

Figura 9. Rota sintética para obtenção de derivados 5-nitrofurânicos.

5.2.1 Obtenção de hidrazidas

A obtenção de hidrazidas, figura 10, apresentou como primeira etapa uma reação de esterificação (SOLOMONS, FRYHLE, 2004, CAREY, SUNDBERG, 2000, MARCH, 2001), em que 0,01 mol dos ácidos carboxílicos substituídos com pureza de 98 % (Sigma-Aldrich Chemical Company, Inc), **I**, foram dissolvidos em álcool metílico PA anidro (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório), em excesso (1:50, 20 mL), ao qual adicionou-se pequeno volume de ácido sulfúrico PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório), 0,5 mL (1,0 mmol), para agir como catalisador. Este sistema foi mantido sob refluxo por quatro horas. Em seguida, sem isolar o intermediário éster formado, adicionou-se a este meio reacional, 10 mL de hidrato de hidrazina aquosa 80 % (v/v) (Merck Chemicals) por gotejamento com pipeta de Pasteur de vidro, mantendo-se refluxo por 1h ou até formação da hidrazida, ocorrendo a reação de hidrazinólise. Após este período, resfriou-se o sistema e manteve-se temperatura entre -10 e -6 °C até formação de cristais.



R: grupos alifático, cicloalquila, fenila e heterocíclicos

Condições de reação: (i): CH₃OH, H₂SO₄/refluxo/4 h; N₂H₄ 80 % aq/refluxo/30 min

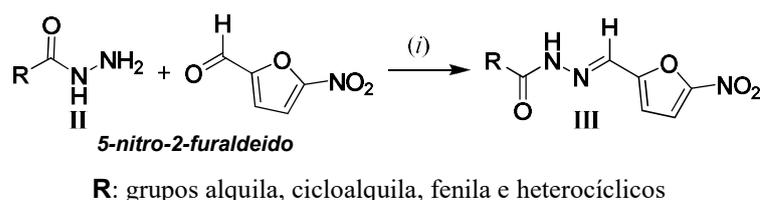
Figura 10. Obtenção de hidrazidas por esterificação de Fischer seguida de hidrazinólise.

A hidrazida precipitada, **II**, foi filtrada e seca em presença de pentóxido de fósforo PA (Vetec Química Fina) (JORGE *et al.*, 2011, SOLOMONS, CAREY, SUNDBERG, 1996, MORRISON, BOYD, 1994, MARCH, 2001). A benzidrazida do composto BSF-25, 3-NO₂ substituído, teve sua hidrazinólise realizada em temperatura ambiente, reagindo com hidrato de hidrazina em solução aquosa 80 % (v/v) por 1h (JORGE *et al.*, 2011). Para a obtenção das hidrazidas dos compostos BSF-26, BSF-35, BSF-39 e BSF-40 foi necessário adicionar DMSO PA na etapa de esterificação com a finalidade de solubilização dos respectivos ácidos carboxílicos na quantidade de 0,5 mL de DMSO para 10 mL de Metanol PA.

As hidrazidas intermediárias correspondentes aos compostos BSF-1, BSF-2, BSF-4, BSF-5, BSF-7, BSF-9, BSF-15 e BSF-20 foram obtidas comercialmente (Sigma - Aldrich Corporation) com pureza entre 97 e 99 %, exceto a hidrazida correspondente ao composto BSF-20, que foi adquirida com pureza de 80 % e purificada por recristalização de acetato de etila PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório).

5.2.2 Obtenção dos derivados do 5-nitrofurano

Para obtenção dos compostos **III**, figura 11, ocorre a reação de condensação entre a hidrazida, **II**, e o 5-nitro-2-furfuraldeído com pureza de 99 % (Sigma - Aldrich Chemical Company, Inc), com formação de ligação imina (CAREY, SUNDBERG, 2000, SOLOMONS, FRYHLE, 2004, MARCH, 2001).



Condições de reação: (i): H₂O, H₂SO₄, CH₃COOH, C₂H₅OH/refluxo/1 h ou C₂H₅OH t.a./4-12h.

Figura 11. Obtenção de bases de Schiff por formação de ligação imina entre hidrazidas e 5-nitrofuraleído.

Adicionou-se o 5-nitro-2-furfuraldeído (0,01 mol) sobre solução de água, ácido sulfúrico PA, ácido acético PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório) e álcool metílico PA na proporção 8:7:8:20 v/v, respectivamente (TAVARES, 1996, EL-OBEID, ELNIMA, AL-BADR, 1984). O meio reacional foi aquecido até temperatura de refluxo adicionando-se a hidrazida substituída **II**, lentamente e sob agitação magnética constante.

Adicionou-se água destilada a baixa temperatura com formação imediata de sólido amorfo, que foi filtrado, lavado com água destilada gelada e recristalizado de *N,N*-dimetilformamida PA, DMF, ou acetonitrila PA, ambos aquecidos e mantidos à temperatura ambiente até formação de precipitados (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório). O sólido obtido foi filtrado e seco em presença de pentóxido de fósforo (CAREY, SUNDBERG, 2000, SOLOMONS, FRYHLE, 2004, MARCH, 2001).

A síntese dos compostos BSF-1, BSF-2, BSF-3, BSF-4, BSF-6, BSF-7, BSF-8, BSF-10, BSF-20, BSF-26, BSF-35 e BSF-37 derivados do 5-nitrofurano foi realizada por outra metodologia sintética em que 1 mmol das hidrazidas, **II**, e 1 mmol de *5-nitro-2-furfuraldeído* foram dissolvidas em 10 mL de etanol mantendo-se agitação por 4 a 12 h, ou até formação de precipitado, em temperatura ambiente (COSTA *et al.*, 2012). Observou-se a formação de sólido amorfo, que foi filtrado sob pressão reduzida, lavado com água destilada gelada e recristalizado de acetonitrila PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório). O sólido obtido foi filtrado e seco em presença de pentóxido de fósforo. Esta metodologia foi realizada para os compostos BSF-8, BSF-26 e BSF-35 de forma comparativa com a metodologia de mistura de ácidos. Para a solubilização das hidrazidas correspondentes aos compostos BSF-26 e BSF-35 em etanol, foi necessária a adição de 1 mL de DMSO para 10 mL de etanol e 1 mmol das hidrazidas.

O composto-protótipo NF foi sintetizado seguindo o mesmo protocolo de obtenção dos compostos **III**, partindo-se de benzidrazida comercialmente disponível *4-hidroxibenzidrazida* 97 % (Sigma - Aldrich Corporation).

5.2.3 Identificação dos compostos

A estrutura química dos compostos sintetizados foi comprovada utilizando-se análise de espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono (RMN ¹³C) e a pureza foi verificada por determinação da faixa de fusão e análise elementar.

A faixa de fusão dos compostos obtidos foi determinada em capilar utilizando aparelho digital de modelo M-560, marca Büchi. A identificação dos compostos intermediários, hidrazidas, **II**, foi baseada na comparação das faixas de fusão obtidas com a descrita em literatura.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e de carbono foram realizados em espectrômetro Brüker, modelo Advance DPX-300 Mhz, no Laboratório de Análise Instrumental/FCF/USP. Utilizou-se dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) com 0,05 % tetrametilsilano (TMS) (Cambridge Isotope Laboratories Inc) como solvente e padrão de referência interna, respectivamente. Os espectros foram analisados com auxílio do programa *MestRe-C* (versão 5.0, MestreLab Research, Trial, Inc: 2006, Santiago de Compostela, Spain). Para alguns compostos foram realizadas análises de correlação heteronuclear de deslocamentos químicos (HETCOR – $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ - 75 MHz - aquisição de sinais em 7h) e correlação homonuclear de deslocamentos químicos (COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ - 300 MHz - aquisição de sinais em 2h), ambos utilizando DMSO- d_6 como solvente.

Para o composto BSF-3 foram realizados estudos bidimensionais de *Overhauser* (NOESY - *nuclear overhauser effect spectroscopy*), correlação quântica única heteronuclear de deslocamentos químicos (HSQC - *heteronuclear single quantum coherence*), correlação heteronuclear de deslocamentos químicos de múltiplas ligações (HMBC - *heteronuclear multiple bond correlation*) em espectrômetro Bruker AIII, 500 MHz na Central Analítica, IQ/USP.

Para a determinação da pureza, os compostos sólidos foram submetidos à análise elementar em analisador CHN modelo Elementar Analyser 2400 série II, Perkin-Elmer, disponível na Central Analítica, IQ/USP.

5.3 Determinação da atividade anti-*T. cruzi* frente a forma epimastigota

A determinação da suscetibilidade das formas epimastigotas de *T. cruzi* frente aos compostos e fármacos de referência foi realizada seguindo as etapas de cultivo parasitário, construção de curvas de calibração em leitora de microplacas, determinação da atividade em leitora de microplaca e tratamento dos dados, como se descreve a seguir.

5.3.1 Cultivo das cepas para determinação da atividade anti-*T. cruzi*

Neste ensaio foram utilizadas formas epimastigota de quatro cepas do *T. cruzi*. Os clones das cepas Bug 2149 cl10, Silvio X10 cl1 e Colombiana foram identificados, isolados e disponibilizados pela Professora Dra. Bianca Zingales do Laboratório de Biologia Molecular de Tripanosomatídeos, Departamento de Bioquímica/IQ/USP (ARAÚJO, 2011).

A cepa Y, isolada pela primeira vez por Silva e Nussenszweig em 1953, foi disponibilizada pela Professora Dra. Maria Júlia Manso Alves do Laboratório de Bioquímica Parasitária, Departamento de Bioquímica/IQ/USP.

O meio de cultivo utilizado no ensaio foi o meio LIT (*liver infusion tryptose*)¹ enriquecido com 10 % de soro fetal bovino (SFB) estéril (Vitrocell, S0011) (CASTELLANI, RIBEIRO, FERNANDES, 1967). Este meio foi cedido pela Professora Dra. Maria Júlia Manso Alves do Laboratório de Bioquímica Parasitária, Departamento de Bioquímica/IQ/USP.

As culturas parasitárias foram mantidas a 28 °C em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD, *biochemical oxygen demand*, Tecnal modelo TE 391) e repicadas em fase exponencial de crescimento.

5.3.2 Construção das curvas de calibração para determinação da atividade anti-*T. cruzi*

Para cada cepa, Silvio X10 c11, Y, Bug 2149 c110 e Colombiana foram construídas curvas de calibração em leitora de microplacas (EZ Read 400 Research – Vis, Biochrom, Cambridge, UK) para posterior determinação da atividade.

As curvas foram construídas com pelo menos 10 pontos e cada ponto corresponde a densidade da suspensão parasitária na fase exponencial de crescimento, obtida por contagem em câmara de Neubauer espelhada (NewOptik) em microscópio óptico com aumento de 400x, e sua respectiva absorbância, realizada em triplicata, usando leitora de microplaca com comprimento de onda (λ) de 562 nm e microplaca de 96 poços com volume de 200 μ L. Os dados obtidos foram analisados no programa IBM SPSS Statistic, versão 17 (licença institucional) por regressão linear e teste estatístico ANOVA.

5.3.3 Determinação da atividade anti-*T. cruzi*

A determinação da atividade anti-*T. cruzi* foi realizada utilizando-se 10^7 parasitos/mL na forma epimastigota de *T. cruzi*. O ensaio iniciou-se com as diluições dos compostos, fármacos de referência e composto-protótipo partindo-se de massa equivalente a

¹ Composição meio LIT: NaCl – 0,4 %, KCl – 0,04 %, Na₂HPO₄.7H₂O – 1,5 %, Triptose – 0,5 %, Dextrose, Pelicilina G – 0,015 %, Estreptomicina – 0,015 %, Infusão de fígado sólido – 0,5 %, lisado de eritrócitos tratado.

40.000 μmol , calculada e pesada em balança analítica digital de 4 casas decimais (marca Ohaus) de acordo com a massa molar de cada composto ou fármaco analisado e foram diluídos em 1 mL de dimetilsulfóxido PA, (DMSO) (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório). A partir desta solução estoque a 40.000 μM foi realizada diluição seriada em microplacas de 96 poços com poço profundo para obter o dobro das concentrações desejadas dos compostos, fármacos de referência e composto-protótipo, variando-se as diluições para obter concentração final entre 400 e 0,39 μM , dependendo do composto ou fármaco analisado. Utilizou-se 1 % de DMSO no volume final de 200 μL em meio LIT com 10 % de SFB, sendo que essa concentração foi constante para todas as diluições dos compostos e fármacos. Foi realizado controle de solvente com 1 % de DMSO, controle de crescimento do parasito e brancos contendo apenas compostos em meio de cultura, conforme figura 10. Em cada microplaca foi realizado controles com os fármacos de referência, BZD e NFX. No final desta etapa, os poços da microplaca apresentam volume de 100 μL com as respectivas diluições dos compostos e fármacos, exceto os poços com o branco completados com meio LIT com 10 % de SFB e o seu controle, totalizando o volume final de 200 μL para estes poços. Figura 12 está representada a distribuição dos compostos e fármacos em microplata.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100,0	50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	BZD 20 μM	CS 1%	Controle meio LIT	Controle cultura parasitária
B	100,0	50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	BZD 20 μM	CS 1%		
C	100,0	50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	BZD 20 μM	CS 1%		
D	Bco 100	Bco 50	Bco 25	Bco 12,5	Bco 6,25	Bco 3,12	Bco 1,56	Bco 0,8	Bco	Bco		
E	200,0	100,0	50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	1,6	NFX 10 μM	CS 0,5 %		
F	200,0	100,0	50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	1,6	NFX 10 μM	CS 0,5 %		
G	200,0	100,0	50,0	25,0	12,5	6,3	3,1	1,6	NFX 10 μM	CS 0,5 %		
H	Bco 200	Bco 100	Bco 50	Bco 25	Bco 12,5	Bco 6,25	Bco 3,12	Bco 1,56	Bco	Bco		

Figura 12. Esquema de montagem da microplaca no ensaio de determinação de atividade anti-*T. cruzi* na forma epimastigota frente a compostos, fármacos de referência e composto protótipo. Coloração cinza representa as diluições dos compostos, BZD: benznidazol, NFX: nifurtimox, CS: controle de solvente (DMSO) Bco: controle da diluição dos compostos a cada concentração no meio utilizado, sem parasito.

A preparação da suspensão parasitária se deu por contagem em câmara de Neubauer do inóculo em fase exponencial de crescimento (3 dias), além da verificação de absorbância

em leitora de microplaca ($\lambda = 562 \text{ nm}$) para comparação com a curva de calibração construída. Preparou-se a suspensão com $2,0 \cdot 10^7$ parasitos/mL e foram distribuídos 100 μL nos respectivos poços das microplacas, obtendo-se 10^7 parasitos/mL em volume final de 200 μL por poço. Em seguida foram homogeneizadas com homogeneizador de microplacas (*Ciencor Scientific Industries, Microplate Genie*) e incubadas em BOD a 28 °C por 72 h em atmosfera úmida. Após incubação, as microplacas foram homogeneizadas e analisadas em leitora de microplacas com λ de 562 nm (JORGE *et al.*, 2013, ISHII *et al.*, 2011, CERECETTO *et al.*, 1998). Os ensaios foram realizados em triplicata com repetição de pelo menos dois ensaios independentes.

5.3.4 Tratamento dos dados obtidos para determinação da atividade anti-*T. cruzi*

Os dados de absorvância obtidos em λ de 562 nm, ABS_{562} , foram tratados a fim de obter porcentagens de inibição de crescimento (%IC). Neste cálculo foi considerado a razão da absorvância após a exposição dos parasitos aos compostos e fármacos e o controle da cultura parasitária, aplicando-se a equação 1:

$$\%IC = \{1 - [(A_p - A_{p-bco}) / (A_c - A_{c-bco})]\} * 100 \quad [\text{equação 1}]$$

Em que:

- A_p = ABS_{562} da cultura contendo composto;
- A_{p-bco} = ABS_{562} do branco da diluição do composto;
- A_c = ABS_{562} da cultura na ausência de qualquer composto;
- A_{c-bco} = ABS_{562} do branco equivalente ao meio LIT.

Os dados obtidos da %IC das triplicatas dos ensaios independentes foram tratados realizando-se sua média e desvio padrão para posterior utilização no cálculo da IC_{50} com auxílio do programa *OriginPro8.0* (versão 8.0 SR00 - Trial, OriginLab Corporation: 2007, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA, USA, licença institucional) empregando-se o modelo não linear sigmoidal de dose-resposta. Para comparações entre os valores de IC_{50} obtidos para as cepas Silvio X10 c11, Y, Bug 2149 c110 e Colombiana foi empregado o teste estatístico paramétrico de análise de variância de um fator, *one-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste (*post-hoc*) de Tukey de comparações múltiplas com intervalo de confiança de 95 %.

5.4 Estudos de relações entre estrutura química e atividade biológica e construção de modelos matemáticos de previsão (QSAR)

O estabelecimento das relações entre propriedades moleculares (diretamente relacionadas à estrutura química) de compostos nitrofurânicos e atividade biológica frente a *T. cruzi* envolveram a construção dos modelos moleculares tridimensionais dos compostos e o cálculo de descritores moleculares (variáveis independentes). Métodos quimiométricos como análise exploratória de dados e construção de modelos matemáticos de previsão (QSAR), com abordagem multivariada, foram considerados para avaliar o conjunto de dados.

Utilizou-se computador com o sistema operacional *Windows* de configuração Intel® Core i7™ 2.40 GHz, RAM 8.0 GB, NVIDIA® GeForce® GT 310M 512 MB e computador com sistema *Red Hat Enterprise Linux* de configuração Intel® Core 2™ QUAD Q6600, 2,40GHz, RAM 4.0G, NVIDIA® GeForce® 9600GT 512MB para rodar os cálculos e desenvolver as análises. A licença colaborativa do programa MOLSIM 3.2 (DOHERTY 2002), concedida à co-orientadora deste trabalho pelo Prof. Dr. Anton J. Hopfinger (University of New Mexico, Albuquerque, EUA; coordenador do The Chem21 Group, Inc.) foi instalada na estação de trabalho do Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos, LPDF, FCF/USP, para desenvolver os processos de minimização de energia e de simulação de dinâmica molecular dos compostos nitrofurânicos.

5.4.1 Construção dos modelos moleculares tridimensionais (3D)

Os modelos moleculares 3D dos compostos foram construídos, inicialmente, no programa *HyperChem Professional 8.0* (Hypercube, Inc: 2008. Gainesville, FL, EUA). Utilizou-se como geometria de referência a estrutura cristalográfica do fármaco NF (código LEQTAC, $R_{\text{fator}} = 0,11$) (PNIEWSKA, JANUCHOWSKI, 1998), depositada no banco de dados de estruturas Cambridge, CSD, (*Cambridge Structural Database*). As informações cristalográficas do fármaco BZD também foram utilizadas como referência (resolução 0,14 Å⁻³ e $R_{\text{fator}} = 0,03$) (SOARES-SOBRINHO *et al.*, 2008). Para o fármaco NFX, as coordenadas cartesianas de um de seus análogos foram utilizadas como partida para a construção do modelo molecular 3D (resolução 0,24 Å⁻³ e $R_{\text{fator}} = 0,04$) (CARACELLI *et al.*, 1996).

Após a construção dos modelos moleculares, procedeu-se a otimização de geometria dos compostos em método de campo de força empírico MM+ (derivado do MM2) (ALLINGER, 1977) (programa *HyperChem Professional 8.0*), aplicando o método de Polak-Ribière (gradiente RMS 0,1 kcal/Å mol, POLAK, RIBIÈRE, 1969). Calcularam-se as cargas atômicas parciais de ponto único com o método de mecânica quântica semi-empírico Hamiltoniano AM1 (AustimModel 1) (DEWAR *et al.*, 1985). A minimização de energia foi, também, desenvolvida com o programa *MOLSIM 3.2* (DOHERTY, 2002; *The Chem21 Group, Inc*: 1997, Lake Forest, IL, EUA). Utilizaram-se os métodos de declive máximo (*steepest descent*) e de gradientes conjugados (*conjugated gradient*) com critério de convergência de 0,01 kcal/mol.

Realizaram-se, então, simulações de dinâmica molecular (DM) de 1ns (1.000.000 passos; cada passo de 1 fs) a 301 K (28 °C), temperatura utilizada nos ensaios *in vitro* frente à forma epimastigota de *T. cruzi*, a fim de gerar o perfil de amostragem conformacional (PAC) de cada composto do conjunto. Constante dielétrica de 3,5 foi utilizada para simular o ambiente das membranas biológicas e o do sítio de interação de biomacromoléculas (SPERELAKIS, 2001). Restrições de posição para alguns átomos foram necessárias a fim de manter a integridade estrutural dos modelos moleculares durante a simulação de DM. Atribuíram-se massas fictícias de 5.000 u.m.a. aos átomos de carbono e oxigênio do grupo 5-nitrofurano e aos carbonos e nitrogênios da porção *N*-acilidrazona da molécula. Arquivos trajetória foram salvos a cada 20 passos de simulação, resultando em 50.000 confôrmeros (PAC) para cada composto. Selecionaram-se confôrmeros de energia mais baixa do PAC, a partir da região de equilíbrio, que foram comparados ao modelo molecular inicial e ao minimizado, a fim de verificar se a integridade estrutural foi mantida na simulação. O critério utilizado foi o valor do desvio quadrático médio de posições atômicas (RMSD, *root-mean-square deviation*). Quanto menor o valor de RMSD mais semelhante são as estruturas. Para pequenas moléculas que tenham a estrutura experimental (difração de raios-X ou RMN) definida, o valor de RMSD não deve ultrapassar 0,1 Å (LEACH, 2001). Esta medida auxiliou a escolha do confôrmero de energia mais baixa para prosseguir os estudos. Os confôrmeros de energia mais baixa selecionados nesta etapa foram novamente minimizados de acordo com o protocolo previamente mencionado, utilizando o programa *MOLSIM 3.2*. Procedeu-se também a otimização de geometria dos compostos aplicando o método de mecânica molecular Polak-Ribière (gradiente RMS 0,1 kcal/Å mol, POLAK, RIBIÈRE, 1969) e, em seguida, calcularam-se as cargas atômicas parciais de ponto único

com o método quântico semi-empírico Hamiltoniano AM1 (AustimModel 1) (DEWAR *et al.*, 1985) (*HyperChem Professional 8.0*; Hypercube, Inc., 2008).

5.4.2 Cálculos dos descritores ou variáveis independentes

Dentre as propriedades termodinâmica obtidas para os confôrmeros selecionados nos PACs utilizando o programa MOLSIM 3.2 (DOHERTY, 2002), estão a energia potencial total (E_{tot}) bem como as contribuições intramoleculares de energia, que somadas correspondem a E_{tot} , como deformação axial ou de estiramento ($E_{stretch}$), deformação angular (E_{bend}), deformação torsional (E_{tors}), do tipo 1-4 (E_{1-4}), de van der Waals (E_{vdw}), de carga ou eletrostática (E_{charge}), de solvatação (E_{solv}) e de ligação de hidrogênio (E_{hb}). As contribuições de energia de solvatação e de ligação de H foram obtidas em simulação curta (0,005 ps) a 301 K do confôrmero selecionado do PAC de cada composto. Para o cálculo de E_{solv} utilizou-se o modelo de camada de hidratação proposto por Forsythe e Hopfinger (1973).

As propriedades eletrônicas foram calculadas com o programa *Gaussian 03W* (*Gaussian 03W for Windows*, version 6; Gaussian Inc.: 1995-2003, Pittsburgh, PA, EUA). Calcularam-se as cargas parciais atômicas de potencial eletrostático, CHELPG (*Charges from Electrostatic Potentials using a Grid based method*) (BRENEMAN, WIBERG, 1990), momento de dipolo total e nos eixos (x, y, z) e energia de orbitais moleculares de fronteira, E_{HOMO} (*highest occupied molecular orbital, orbital molecular ocupado de maior energia*) e E_{LUMO} (*lowest unoccupied molecular orbital, orbital molecular desocupado de menor energia*). O método empregado foi o método o funcional híbrido B3LYP (BECKE, 1988, LEE, YANG, PARR, 1988), que combina a teoria *Hartree-Fock* com o funcional de densidade (DFT, *density functional theory*). O conjunto de base utilizado foi o 6-311G⁺⁺ (d,p) (PETERSSON, AL-LAHAM, 1991). As cargas CHELPG foram consideradas para gerar os mapas de potencial eletrostático (MPE), calculados em superfície molecular de Connolly (CONNOLLY, 1983).

Os mapas de potencial lipofílico (MPL) e os valores do coeficiente de partição *n*-octanol/água calculado (ClogP) foram obtidos com o programa *Sybyl 8.0* (*Sybyl 8.0 for Linux*; Tripos, Inc.: 2007. St. Louis, EUA). Os mapas foram calculados em superfície molecular Connolly (CONNOLLY, 1983) obtida com sonda de raio de 1,4 Å, utilizando o

método SLN (*Sybyl line notation*; ClogP_{SG-SLN}) (GHOSE *et al.*, 1998), implementado no programa.

No programa *Marvin Beans* (*Marvin Beans*, version 5.0.4.1; ChemAxon Ltd.: 1998-2010, Budapeste, Hungria) foram calculadas as propriedades estereoquímicas, topológicas e o coeficiente de partição (lipofilicidade), ClogP_{WM}, calculado pelo método de pesos do programa, que atribui pesos iguais para os métodos de VISWANADHAN *et al.*, 1989, KLOPMAN *et al.*, 1994 e PHYSPROP[®] database. Adicionalmente foi verificado o pKa neste programa, para verificação das estruturas nas formas ionizada ou molecular (não ionizada) na faixa de pH utilizada nos ensaios biológicos (entre 7,2 e 7,4).

Ângulos de torção (diedros) foram obtidos com o programa *HyperChem Professional 8.0* e os diedros selecionados foram C9-N8-N7=C6 (ϕ_1), O9=C9-N8-H8 (ϕ_2), N8-N7=C6-H6 (ϕ_3), N8-N7=C6-C2 (ϕ_4).

Calculadas as propriedades moleculares, gerou-se uma tabela com 56 colunas (variáveis independentes ou descritores ou propriedades calculadas) mais a atividade biológica linearizada (\log_1/C) avaliada frente *T. cruzi* (variável dependente). As análises foram conduzidas para cada cepa de *T. cruzi* separadamente. A atividade linearizada dos compostos foi classificada quanto alta, média e baixa atividade, identificando cada composto com as letras H, M e L, respectivamente.

Os filtros utilizados para auxiliar na seleção das propriedades moleculares mais representativas (variáveis independentes) foram: (i) o coeficiente de correlação linear de Pearson entre cada propriedade, ou descritor, e o dado biológico (variável dependente) e (ii) a distribuição ou dispersão de cada descritor calculado em relação à variável dependente (*scattering plots*, gráficos de dispersão) (FERREIRA, 2002). Descritores com distribuição ampla e tendência linear foram considerados como mais representativos, já que o programa utilizado para a análise quimiométrica apresenta somente função linear para o tratamento dos dados. A tabela final obtida (linhas = amostras ou compostos; colunas = descritores (variáveis independentes), sendo a última coluna os valores de atividade biológica, variável dependente, \log_1/IC_{50}) foi utilizada para a análise exploratória dos dados e análise QSAR multivariada.

5.4.3 Análise exploratória de dados (HCA e PCA)

A etapa de análise exploratória foi realizada com o programa *Pirouette 3.11* (*Pirouette 3.11*, Infometrix Inc., 1990-2003, Woodinville). Os dados da tabela correspondentes às propriedades moleculares calculadas, previamente selecionadas (filtros), e aos valores de atividade biológica, foram autoescalados, devido às diferentes ordens de magnitude das variáveis, além de utilizar unidades adimensionais. Tal pré-processamento de dados consiste em subtrair de cada elemento de determinada coluna (variável) o valor médio da respectiva coluna e dividir o resultado pelo desvio padrão daquela coluna (MOITA NETO, MOITA, 1998), conforme a equação 2.

$$X_{ij} = (X_{ij} - \bar{X}_j) / \sigma_j \quad [\text{equação 2}]$$

Onde:

X_{ij} é o valor do descritor j para o composto i ; \bar{X}_j é a média dos valores para o descritor j e σ_j é o desvio padrão dos valores para o descritor j .

A análise de HCA foi desenvolvida com método de agrupamento completo e as distâncias entre as amostras foram calculadas por meio da distância Euclideana. Os dados foram apresentados em gráfico bidimensional, denominado dendrograma. As distâncias calculadas entre as amostras foram definidas em uma matriz de similaridade cujos elementos são os chamados índices de similaridade (IS') que variam entre 0 e 1, sendo o valor de 1 equivalente à similaridade máxima. O método matemático utilizado foi agrupar os pares de pontos que estão mais próximos, usando a distância Euclideana (FERREIRA, KIRALJ, 2011, FERREIRA, 2002), vide equação 3.

$$d_{kl} = \left[\sum_j^m (x_{kj} - x_{lj})^2 \right]^{1/2} \quad [\text{equação 3}]$$

Onde:

d_{kl} é a distância entre dois vetores de amostras, k e l são as amostras, m é o número total de variáveis, M é a ordem da distância, sendo $M = 2$ para distância Euclideana, j é o descritor.

Os valores de distância entre pares de amostras são transformados em uma matriz de similaridade S cujos elementos correspondem aos índices de similaridade, representado na equação 4 (FERREIRA, 2002).

$$S_{kl} = 1 - (d_{kl}/d_{max}) \quad [\text{equação 4}]$$

Onde:

S_{kl} é o índice de similaridade entre duas amostras k e l ,
 d_{kl} é a distância entre duas amostras, d_{max} é a maior
distância no conjunto de dados.

A análise HCA foi desenvolvida para as amostras ou compostos, para se obter agrupamentos por similaridade entre os compostos do conjunto investigado (FERREIRA, 2002, MOITA NETO, MOITA, 1998, BEEBE, PELL, SEASHOLTZ, 1998).

Cabe ressaltar, no entanto, que na análise exploratória de dados (métodos HCA e PCA), a variável dependente (valores do vetor y) não é considerada na modelagem matemática dos dados. A interpretação dos resultados obtidos considerando a relação com os valores de y diz respeito ao usuário.

Para o método PCA, os dados foram decompostos, segundo a definição do método, em duas matrizes: uma de escores, que é relacionada às amostras (compostos), e outra de pesos (*loadings*), que se refere descritores calculados (FERREIRA, 2002, BEEBE, PELL, SEASHOLTZ, 1998). O número de componentes principais (PC), ou fatores, que explica a maior parte dos dados foi determinado. As análises realizadas foram interpretadas de forma a estabelecer as relações entre as propriedades moleculares calculadas e atividade biológica, obtida experimentalmente, dos compostos sob investigação.

Para diagnosticar possíveis amostras atípicas (*outliers*), foi avaliado o gráfico da distância residual das amostras em relação à distância de Mahalanobis. A distância Mahalanobis é uma medida de distância baseada nas correlações entre variáveis e é invariante à escala, ou seja, não depende da escala das medições. Neste caso, corresponde à distância calculada a partir do número de k fatores (PCs) (Pirouette, 2003), representada na equação 5.

$$MD_i = (t_i - \bar{t})^T S_k^{-1} (t_i - \bar{t}) \quad [\text{equação 5}]$$

Onde: S é a matriz de pontuações de covariância e \bar{t} é o vetor de escores médio.

A distância Mahalanobis é normalmente distribuída, e um valor crítico (MDcrit) pode ser determinado a partir de uma distribuição qui-quadrado com k graus de liberdade. Se uma amostra excede MDcrit, significa que a amostra pode ser uma amostra crítica.

5.4.4 Análise QSAR multivariada

A análise QSAR com abordagem multivariada foi realizada no programa QSAR *modeling* (MARTINS, FERREIRA, 2013). A matriz de 56 descritores com valores de atividade biológica linearizados (variável dependente; $-\log IC_{50}$ ou $\log 1/IC_{50}$), para o conjunto de 35 compostos, incluindo o composto NF, foi utilizada como dado de entrada (*input*). Foram avaliados os gráficos de dispersão (*scattering plots*) entre atividade biológica e cada propriedade calculada e excluídos descritores que não apresentaram correlação linear com a atividade (FERREIRA, 2002). Para avaliar a faixa (gradiente) e a dispersão dos valores de atividade biológica linearizada foram construídos histogramas e gráficos de dispersão.

Neste trabalho, o conjunto de treinamento foi considerado o conjunto total de dados e o conjunto de avaliação foi obtido a partir da validação do conjunto de treinamento, utilizando o modelo validado para desenhar novos compostos, conjunto de avaliação.

No programa QSAR *modeling* (MARTINS, FERREIRA, 2013), os dados da tabela de entrada (*input*) foram autoescalados. Descritores que apresentaram valores absolutos de correlação linear com a atividade biológica abaixo de 0,3 foram descartados nesta etapa (KIRALJ, FERREIRA, 2009). A seleção de variáveis foi realizada com o algoritmo de seleção de preditores ordenados (OPS, *ordered predictors selection*) (TEÓFILO, MARTINS, FERREIRA, 2009), implementado no programa. Os modelos QSAR foram gerados com o método de regressão por quadrados mínimos parciais, PLS (*partial least squares*) (FERREIRA, 2002). O algoritmo OPS classifica os descritores com um vetor informativo, na ordem de importância, de tal forma que sucessivas regressões PLS, com número crescente de descritores, é realizada até obter melhores modelos (MARTINS, FERREIRA, 2013, TEÓFILO, MARTINS, FERREIRA, 2009).

As condições consideradas na análise foram as seguintes: (i) número máximo de variáveis latentes (VL) de 7 para as quatro cepas, utilizando $N = 35$, e de 4 para as quatro cepas, utilizando $N = 22$; (ii) número de VL para o modelo, determinado após a verificação das medidas estatísticas RMSEC e Q^2_{LOO} (coeficiente de correlação da validação cruzada), na validação cruzada removendo uma amostra de cada vez (LOO, *leave-one-out*); (iii) janela de 3 descritores (número inicial de descritores considerados no algoritmo OPS) com incremento de 1; (iv) 90 % das variáveis analisadas; (v) escolha de todos os vetores para

ordenar os descritores; e (vi) classificação do modelo por Q^2_{LOO} . Geraram-se, então, dez modelos QSAR sendo analisado aquele com melhor valor de Q^2 e sem presença de amostra atípica. As medidas estatísticas de validação interna utilizadas para avaliação dos modelos estão listadas na tabela 2.

Os valores dos coeficientes de correlação de validação cruzada *leave-one-out* (Q^2_{LOO}) e de determinação múltipla (R^2) foram considerados para a triagem inicial dos melhores modelos neste estudo. Os valores para modelos de regressão aceitáveis em QSAR são $Q^2_{LOO} > 0,5$ e $R^2 > 0,6$ (TROPSHA, GRAMATICA, GOMBAR, 2003, GOLBRAIKH, TROPSHA, 2002) e a diferença entre as duas medidas estatísticas não deve ultrapassar 0,3. Valores maiores que 0,3 indicam que o modelo QSAR está superajustado, ou seja, descritores do modelo estão intercorrelacionados e não fornecem informação independente ao modelo (KIRALJ, FERREIRA, 2009, FERREIRA, KIRALJ, 2011). Os valores de erros, representados por RMSEC (Raíz quadrada do erro da calibração) e RMSECV (ou SEV, Raíz quadrada do erro da validação cruzada), devem ser os menores possíveis. Além disso, os valores de $PRESS_{cv}$ (Soma dos quadrados dos erros de predição da validação cruzada) devem ser menores do que a soma dos quadrados dos valores de resposta (SSY) (TIMMERMAN *et al.*, 2009).

A robustez dos modelos de QSAR foi avaliada considerando a abordagem de validação cruzada múltipla (LNO, *leave-N-out*), retirando subconjuntos de N amostras ($N = 2, 3, \dots, N$), em triplicata (FERREIRA, 2002). Neste estudo, retirou-se até 50 % das amostras em busca do N crítico, o qual é o valor máximo de retirada de amostras em que o valor de Q^2_{LNO} é similar ao valor do Q^2_{LOO} do modelo original. Espera-se que o valor médio de cada Q^2_{LNO} seja próximo ao Q^2_{LOO} do modelo original, com valores de desvio padrão menores que 0,1 (KIRALJ, FERREIRA, 2009). Também é estabelecido que a retirada de 20 a 30 % das amostras do conjunto sem alterações significativas entre os valores de Q^2_{LNO} e Q^2_{LOO} , indica robustez do modelo (KIRALJ, FERREIRA, 2009).

Tabela 2. Parâmetros estatísticos fornecidos no programa QSAR modeling

Descrição dos parâmetros estatísticos	Equações
Soma dos quadrados dos erros de predição da validação cruzada	$PRESS_{cv} = \sum_{i=1}^I [y(i) - \hat{y}_{cv}(i)]^2$
Soma dos quadrados dos erros de predição da calibração	$PRESS_{cal} = \sum_{i=1}^I [y(i) - \hat{y}_{cal}(i)]^2$
Coefficiente de correlação de Pearson da validação cruzada	$R_{cv} = \frac{\sum_{i=1}^I [y(i) - \bar{y}] * [\hat{y}_{cv}(i) - \hat{y}_{cv}]}{\sigma_y \sigma_{\hat{y}_{cv}}}$
Coefficiente de correlação de Pearson da calibração	$R_{cal} = \frac{\sum_{i=1}^I [y(i) - \bar{y}] * [\hat{y}_{cal}(i) - \hat{y}_{cal}]}{\sigma_y \sigma_{\hat{y}_{cal}}}$
Coefficiente de correlação da validação cruzada	$Q^2 = 1 - \frac{PRESS_{cv}}{\sum_{i=1}^I [y(i) - \bar{y}]^2}$
Coefficiente de determinação múltipla	$R^2 = 1 - \frac{PRESS_{cal}}{\sum_{i=1}^I [y(i) - \bar{y}]^2}$
Raíz quadrada do erro da validação cruzada	$RMSECV \text{ ou } SEV = \sqrt{\frac{PRESS_{cv}}{I}}$
Raíz quadrada do erro da calibração	$RMSEC = \sqrt{\frac{PRESS_{cal}}{I}}$
Soma dos quadrados dos valores de resposta	$SSY = \sum_{i=1}^I [y(i) - \bar{y}]^2$

I é o número de amostras do conjunto de treinamento; A é o número de variáveis latentes no modelo; $\hat{y}_{cv}(i)$ e $\hat{y}_{cal}(i)$ são valores previstos para $y(i)$ na validação cruzada e no modelo final, respectivamente; \bar{y} , \bar{y}_{cv} e \bar{y}_{cal} são os valores médios de $y(i)$, $\hat{y}_{cv}(i)$ e $\hat{y}_{cal}(i)$, respectivamente.

A aleatorização da atividade linearizada (vetor y ; y -randomization) indica a possibilidade dos modelos serem obtidos por chance, ou seja, de ocorrerem correlações ao acaso. Em tal abordagem, os valores dos descritores originais são mantidos intactos na tabela de dados, mas os valores da variável dependente, $\log 1/IC_{50}$ são aleatorizados ou embaralhados. Assim, os valores de Q^2 e R^2 do modelo original (valores reais) devem ser bem maiores do que os valores obtidos para os modelos obtidos com o vetor y embaralhado. Neste estudo, o procedimento foi desenvolvido em 50 corridas e em triplicata. A abordagem de Eriksson e Wold (KIRALJ, FERREIRA, 2009, TIMMERMAN *et al.*, 2008 WOLD, ERIKSSON, CLEMENTI, 1995) foi considerada neste estudo para avaliar se o modelo

original (real) foi obtido por chance, baseando-se nas medidas estatísticas Q^2_{yal} e R^2_{yal} e na relação $R^2_{\text{yal}} > Q^2_{\text{yal}}$, como segue:

- $Q^2_{\text{yal}} < 0,2$ e $R^2_{\text{yal}} < 0,2$: não há correlação ao acaso;
- Q^2_{yal} quaisquer e $< 0,2$; $R^2_{\text{yal}} < 0,3$: correlação ao acaso é desprezível;
- Q^2_{yal} quaisquer e $< 0,3$; $R^2_{\text{yal}} < 0,4$: correlação ao acaso é tolerável;
- Q^2_{yal} quaisquer e $R^2_{\text{yal}} > 0,4$: há correlação ao acaso.

Outra maneira de se avaliar se o modelo foi obtido por chance é levando-se em conta o coeficiente de correlação de Pearson (R) entre os valores de atividade do modelo original (Log1/IC_{50}) e dos modelos obtidos com y embaralhado ($\text{Log1/IC}_{50(\text{al})}$, 50 corridas) (KIRALJ, FERREIRA, 2009, ERIKSSON *et al.*, 2003). Gráficos para demonstrar a regressão linear entre Q^2_{yal} *versus* $R_{(\text{yal},y)}$ e entre R^2_{yal} *versus* $R_{(\text{yal},y)}$ foram gerados para os modelos obtidos com os valores de y embaralhados e para os modelos originais (reais). Os valores dos interceptos para tais regressões ($yQ^2_{\text{al}} = aQ^2 + bQ^2x$; $yR^2_{\text{al}} = aR^2 + bR^2x$) são os indicadores dos modelos de serem ou não obtidos ao acaso. Valores de $\alpha Q^2 < 0,05$ e de $\alpha R^2 < 0,3$ indicam que o modelo não foi obtido por chance.

Neste estudo, foram consideradas como amostras atípicas (*outliers*) do modelo gerado com o conjunto de treinamento os compostos cuja diferença entre os valores de AB_{calc} e AB_{exp} (resíduos) excedeu dois desvios padrão da média dos resíduos (limite de confiança de 95 %).

A validação externa dos modelos gerados (conjunto de avaliação) foi conduzida utilizando compostos desenhados (planejados) a partir das informações estruturais obtidas com o modelo construído com o conjunto de treinamento. A atividade biológica de tais compostos foi calculada utilizando o melhor modelo selecionado, substituindo os valores das propriedades calculadas na equação do modelo QSAR. Os compostos foram sintetizados e experimentalmente ensaiados. O poder de previsão externa do modelo QSAR foi determinado considerando um limite de confiança de 99 %. Compostos do conjunto de avaliação com valores de resíduo superior a um desvio padrão da média dos resíduos foram considerados não previstos pelo modelo gerado com o conjunto de treinamento.

5.5 Determinação da citotoxicidade *in vitro* em células de linhagem LLC-MK₂

Os ensaios de determinação de citotoxicidade foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular de Tripanosomatídeos, Departamento de Bioquímica/IQ/USP sob coordenação da Professora Dra. Bianca Zingales. A manutenção das células e ensaios de citotoxicidade foram realizados juntamente com Mariana Bury, aluna de iniciação científica à época e, atualmente, aluna de Mestrado.

5.5.1 Cultura das células LLC-MK₂

O cultivo da linhagem LLC-MK₂, derivada de células renais de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) (HULL, CHERRY, TRICH, 1962), foi realizado em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com fenolftaleína (Grand Island Biological Co. - GIBCO), preparado com água deionizada ultrapura (Milli-Q), suplementado com 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 0,13 g/L de estreptomicina, 0,19 g/L de penicilina e esterilizado por filtração com membrana de 0,22 μ M (TPP, 99722). Utilizou-se frasco de cultura de poliestireno com área de crescimento de 75 cm² e o meio DMEM foi suplementado com 10 % de SFB (Vitrocell). As células foram incubadas em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida, 5 % de CO₂. A manutenção das culturas ocorreu a cada 3 dias iniciando-se com 2*10⁴ células/cm², atingindo confluência com 0,7*10⁶ células/cm². Para a obtenção da suspensão celular utilizada na manutenção e ensaio de citotoxicidade, as monocamadas foram lavadas três vezes com solução salina tamponada (PBS), e incubadas com solução de tripsina (Tripsina 2,5g/L EDTA) por 5 minutos a 37 °C, com atmosfera úmida, 5 % de CO₂. As células foram ressuspensas em meio de cultura com auxílio de pipeta; foi realizada a contagem em câmara de Neubauer espelhada em microscópio óptico com aumento de 400 vezes e, por fim, ajustada a concentração da suspensão celular.

5.5.2 Construção das curvas de calibração para determinação da citotoxicidade de compostos em células LLC-MK₂

Foram construídas curvas de calibração variando-se o número de células LLC-MK₂ e realizando-se a determinação da viabilidade celular aplicando o método colorimétrico pela redução mitocondrial do *brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio*, MTT, a um composto corado, denominado formazan (FRESHNEY, 2010, PARDO, 2010, GERPE *et al.*, 2010, ROMEIRO *et al.*, 2009, MUELAS *et al.*, 2001).

As curvas foram construídas com 8 pontos variando-se a suspensão celular de 1 a 8×10^5 células/mL sempre em triplicata. O meio utilizado foi o RPMI 1640 sem fenol e suplementado com 10 % de SFB. O volume final nos poços foi de 200 μ L. A microplaca foi incubada por 3 h, para adesão celular, em estufa (37 °C, atmosfera úmida, com 5 % de CO₂).

Após incubação, a microplaca foi centrifugada a 1200 rpm a 20 °C por 10 min e retirado 100 μ L do meio sobrenadante. Foi preparada solução de MTT a 1 mg/mL em RPMI 1640 sem fenol e sem SFB a partir da solução estoque de MTT a 20 mg/mL. Adicionou-se 100 μ L da solução de MTT a 1 mg/mL, obtendo-se concentração final de MTT de 0,4 mg/mL nos poços com 200 μ L total. A microplaca foi incubada por 2 horas e 30 minutos em estufa (37 °C, em atmosfera úmida, com 5 % de CO₂). Após incubação foi novamente centrifugada (1200 rpm a 20 °C por 10 min) e retirado 150 μ L do meio sobrenadante. Adicionou-se 150 μ L de DMSO pré-aquecido a 57 °C em cada poço e a microplaca foi agitada, protegida da luz, em agitador de microplacas (Ciencor Scientific Industries, Microplate Genie) até completa lise celular e solubilização do formazan. A coleta de dados foi realizada em leitora de microplacas (Epoch™, BioTek) no comprimento de onda de 590 nm (TWENTYMAN, LUSCOMBE, 1987).

Os dados obtidos foram analisados no programa IBM SPSS Statistic, versão 17 (licença institucional) por regressão linear e teste estatístico ANOVA.

5.5.3 Determinação da citotoxicidade dos compostos e fármacos em células LLC-MK₂

Para a determinação da citotoxicidade utilizou-se microplaca de 96 poços com fundo plano e meio RPMI 1640 sem fenol (GIBCO), suplementado com 10 % de SFB. Foi distribuída suspensão das células LLC-MK₂ a 5×10^5 células/poço ($\sim 3 \times 10^6$ células/mL), contendo 160 μ L em cada poço. Nos poços destinados aos brancos foram adicionados 160 μ L de RPMI 1640 sem fenol com 10 % de SFB. A microplaca foi incubada em estufa (37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂), no período de 24 h para aderência e confluência das células. Após esta etapa, de estabelecimento da cultura celular na microplaca, adicionou-se as soluções de compostos e fármacos para o estudo de citotoxicidade. Os poços das colunas 1 e 12 da microplaca não foram utilizados e foram preenchidos com 200 μ L de PBS.

A diluição dos compostos foi realizada a partir de solução estoque a 40.000 μ M em DMSO, armazenada a -80 °C. Foi realizada diluição seriada em microplacas de 96 poços

com poço profundo para obter valores 5 vezes mais concentrados do desejado para os compostos, fármacos de referência e composto-protótipo, variando-se as diluições para obter concentração final entre 200 e 0,78 μM , dependendo do composto ou fármaco analisado. Utilizou-se 0,5 % de DMSO no volume final de 200 μL em meio RPMI 1640 sem fenol com 10 % de SFB, sendo que essa concentração foi constante para todas as diluições dos compostos e fármacos. Foi realizado controle de solvente com 0,5 % de DMSO e brancos contendo apenas compostos em meio de cultura, conforme figura 13.

Os compostos foram incubados por 72 horas em estufa (37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO_2). Após incubação a microplaca foi centrifugada a 1200 rpm a 20 °C por 10 min, 150 μL do meio sobrenadante foi removido cuidadosamente com pipeta multicanal e adicionado 150 μL de RPMI 1640 sem fenol com 10 % de SFB para retirada do composto. A microplaca foi novamente centrifugada (1200 rpm a 20 °C por 10 min) e retirado 100 μL do meio sobrenadante. Adicionou-se 100 μL da solução de MTT a 1 mg/mL, obtendo-se concentração final de MTT de 0,4 mg/mL nos poços com 200 μL total. A microplaca foi incubada por 2 horas e 30 minutos em estufa (37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO_2). Após incubação foi novamente centrifugada (1200 rpm a 20 °C por 10 min) e retirado 150 μL do meio sobrenadante. Adicionou-se 150 μL de DMSO pré-aquecido a 57 °C em cada poço e a microplaca foi agitada, protegida da luz, em agitador de microplacas (Ciencor Scientific Industries, Microplate Genie) até completa lise celular e solubilização do formazan. A coleta de dados foi realizada em leitora de microplacas (Epoch™, BioTek) no comprimento de onda de 590 nm (TWENTYMAN, LUSCOMBE, 1987).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	Bco CS	Bco CP	Bco 200	Bco 100	Bco 50	Bco 25	Bco 12,5	Bco 6,25	Bco 3,12	Bco 1,56	PBS
B	PBS	CS	CP	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	PBS
C	PBS	CS	CP	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	PBS
D	PBS	CS	CP	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	PBS
E	PBS	CS	CP	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	PBS
F	PBS	CS	CP	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	PBS
G	PBS	CS	CP	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	PBS
H	PBS	Bco CS	Bco CP	Bco 200	Bco 100	Bco 50	Bco 25	Bco 12,5	Bco 6,25	Bco 3,12	Bco 1,56	PBS

Figura 13. Esquema de montagem da microplaca no ensaio de determinação de citotoxicidade dos compostos e fármacos de referência frente a células LLC-MK2. CS: controle de solvente DMSO, Bco: controle da diluição dos compostos a cada concentração no meio utilizado, sem células. Coloração cinza representa a diluição dos compostos e respectivos brancos.

5.5.4 Tratamento dos dados obtidos para determinação da citotoxicidade em células LLC-MK₂

Os dados de absorvância obtidos em $\lambda = 590$ nm, ABS₅₉₀, foram tratados a fim de obter porcentagens de inibição de crescimento celular (%IC). Neste cálculo foi considerada a razão da absorvância após a exposição das células LLC-MK₂ aos compostos e fármacos e o controle da cultura celular, aplicando-se a equação 6:

$$\%IC = \{1 - [(A_{cc} - A_{cc-bco}) / (A_c - A_{c-bco})]\} * 100 \quad \text{[equação 6]}$$

Em que:

A_{cc} = ABS₅₉₀ da cultura celular contendo composto;

A_{cc-bco} = ABS₅₉₀ do branco da diluição do composto;

A_c = ABS₅₉₀ da cultura na ausência de qualquer composto;

A_{c-bco} = ABS₅₉₀ do branco equivalente ao meio RPMI 1640 com 10 % de SFB.

Os dados obtidos da %IC das triplicatas dos ensaios independentes foram tratados realizando-se sua média e desvio padrão para posterior utilização no cálculo da IC₅₀ com auxílio do programa *OriginPro8.0*, empregando-se o modelo não linear sigmoidal de dose-resposta, quando aplicável.

5.6 Determinação da atividade anti-*T. cruzi* frente a forma amastigota do parasita

Os ensaios frente a forma amastigota do *T. cruzi* foram realizados pelo aluno de Doutorado Caio Haddad Franco, orientado pelo Dr. Lúcio Holanda Gondim de Freitas Junior e coordenado pela Dra. Carolina Borsoi Moraes no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Plataforma de Química, Biologia e Triagem (CBSP - *Chemical Biology and Screening Platform*), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Este ensaio não foi realizado pelos autores deste trabalho e maiores detalhes deste protocolo foi descrito pelo grupo do LNBio e está disponível na literatura (MORAES *et al.*, 2014).

As formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram obtidas do sobrenadante de células LLC-MK₂ mantidas em garrafas de cultura com meio DMEM com baixo teor de glicose, suplementado com 2 % de SFB, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, incubadas a 37 °C, em atmosfera úmida, com 5 % de CO₂. As células U2OS foram mantidas em cultura com meio DMEM com alto teor de glicose suplementado com

10 % de SFB, 100 U/ml de penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina, incubadas a 37 °C, em atmosfera úmida, com 5 % de CO_2 .

Foram distribuídas 700 células/poço (40 μL) em microplaca de 384 poços (poliestireno, preta, fundo plano incolor, μClear – Greiner Bio-One) com auxílio de dispensadora automática Wellmate Liquid Handler (Thermo-Scientific) e incubada por 24 h a 37 °C e 5 % de CO_2 . Após este período foram adicionados 2800 parasitos na forma tripomastigotas/poço (10 μL) para infecção das células U2OS, sendo incubada por 24 h a 37 °C e 5 % de CO_2 . Os compostos foram diluídos em microplaca de 384 poços em 100 % de DMSO com pipeta multicanal de forma seriada, partindo-se de solução a 40 mM para obter concentrações 6 vezes maiores que as concentrações desejadas, entre 100 e 0,4 μM . Transferiram-se 10 μL das soluções dos compostos para as microplacas com U2OS infectadas, obtendo-se 1 % de DMSO no volume final de 60 μL nos poços. O ensaio foi realizado em duplicatas com três repetições. Após incubação por 72 h a 37 °C e 5 % de CO_2 , fixaram-se as células nas microplacas com adição de 30 μL de solução de *para*-formaldeído, incubadas por 15 minutos, seguida por três lavagens com PBS e coradas com Draq5 (diluição de 1/1000 em DPBS, 10 μL por poço). Na etapa de leitura (HCA'), as imagens foram obtidas no aparelho Operetta (Perkin Elmer, USA), utilizando aumento de 200 vezes. As imagens foram tratadas com o programa *Harmony* para identificação, segmentação e quantificação de núcleos e citoplasma de células hospedeiras e parasitas intracelulares (MOON, SIQUEIRA-NETO *et al.*, 2014). As imagens foram obtidas de todos os poços, considerando o número total de células, número total de células infectadas, número total de parasitas intracelulares e o número médio de parasitas por célula infectada. Para se determinar a atividade antiparasitária normalizada, foi definido a taxa de infecção como a razão entre o número total de células infectadas em todas as imagens do poço e o número total de células, em todas as imagens do mesmo poço. Os valores de taxa de infecção foram normalizados em relação aos controles negativos para atividade (células infectadas com meio contendo 1 % de DMSO, somente) e positivos para atividade (células não infectadas). As equações 7 demonstram o tratamento dos dados realizados por Moraes e colaboradores:

$$\text{Atividade normalizada} = \{1 - [(Av.IRn - Av.IRt) / (Av.IRn - Av.IRp)]\} * 100$$

$$\text{Taxa de infecção normalizada} = (Av.IRn - Av.IRt) / (Av.IRn - Av.IRp) * 100$$

[equações 7]

Em que: Av.IRn: taxa de infecção média dos poços com controle negativo;
 Av.IRp: taxa de infecção média dos poços com controle positivo;
 Av.IRt: taxa de infecção média dos poços com o composto a ser testado.

Processaram-se os valores de atividade normalizada com o programa GraphPad Prism, versão 6, para a construção da curva sigmoideal dose-resposta e determinação dos valores de EC₅₀ e CC₅₀ por interpolação. Neste estudo, definiu-se EC₅₀ como a concentração de composto correspondente a 50 % da atividade normalizada após 72 horas de incubação com os compostos e fármacos.

5.7 Determinação da inibição das enzimas TcTR e GR

Os ensaios para determinação da inibição das enzimas tripanotiona redutase de *T. cruzi* (TcTR) e glutathion redutase humana (GR) frente aos compostos foram realizados no Laboratório de Protozoologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob acompanhamento da Dra. Milene Hoehr de Moraes e coordenação do Professor Assoc. Mario Steindel.

5.7.1 Determinação da inibição da enzima TcTR

O ensaio enzimático com a TcTR foi realizado em microplacas de 96 poços de fundo plano e a leitura realizada em leitora de microplacas (Infinite M200 RCHISTO TECAN), baseando-se na absorbância do DTNB em λ de 412 nm (JONES *et al.*, 2010, EGER, 2010, FAIRLAMB, CERAMI, 1992). Os compostos na concentração de 40 mM em DMSO foram diluídos em microplaca para obter soluções intermediárias 25 vezes mais concentradas (1250 μ M, 25 % de DMSO e 10 % de etanol PA) em volume final de 200 μ M de tampão. A microplaca utilizada para a determinação da inibição enzimática foi preparada para obter volume final de 240 μ L por poço contendo: 40 mM de HEPES (pH 7,5), 1 mM de EDTA, 150 μ M de NADPH, 1 μ M de tripanotiona (T[S]₂) (Bachem, Torrance), 460 ng da enzima (TcTR), 10 μ L dos compostos 25 vezes concentrados. Os compostos foram avaliados na concentração de 50 μ M contendo 1 % de DMSO e 0,4 % de etanol como solventes. Para o controle de inibição enzimática foi utilizado a clomipramina na mesma concentração

(Sigma-Aldrich, Saint Louis) e o controle de solvente foi realizado na concentração de 1 % de DMSO e 0,4 % de etanol, ambos em triplicata. Foram realizados brancos correspondentes a cada composto, a clomipramina e ao tampão enzimático. A microplaca foi incubada a 27 °C durante 30 minutos e a leitura iniciada após a adição de 25 μ M de DTNB (Sigma-Aldrich, Saint Louis), correspondente a 10 μ L por poço (solução a 625 μ M) em leitora de microplacas com λ de 412 nm a 27 °C, medindo-se a inclinação da curva durante 30 minutos com registros a cada 5 minutos (δ Abs/ δ t). Este valor foi comparado com o controle DMSO 1 % com 0,4 % de etanol e o controle da enzima para fornecer o percentual de inibição da enzima. Os ensaios para esta triagem foram realizados em duplicata dos compostos, como demonstrado na figura 14.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2	2	Bco	12	12	Bco	21	21	Bco	clomipramina		
B	4	4	Bco	14	14	Bco	22	22	Bco	Controle DMSO 1%		
C	5	5	Bco	15	15	Bco	23	23	Bco	Controle da enzima		
D	6	6	Bco	16	16	Bco	24	24	Bco	Branco tampão		
E	7	7	Bco	17	17	Bco	25	25	Bco			
F	9	9	Bco	18	18	Bco	NF	NF	Bco			
G	10	10	Bco	19	19	Bco						
H	11	11	Bco	20	20	Bco						

Figura 14. Esquema de montagem da microplaca no ensaio de determinação de inibição da enzima TcTR frente a compostos e composto protótipo. Bco: controle da diluição dos compostos a cada concentração no meio utilizado, sem enzima. Coloração cinza representam os compostos e respectivos brancos a 50 μ M.

5.7.2 Determinação da inibição da enzima GR

Os testes de inibição da GR de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, Saint Louis) foram realizados em microplacas de 96 poços e a leitura realizada em leitora de microplacas, baseando-se na absorvância do NADPH em λ de 340 nm. A microplaca foi preparada para obter volume de 250 μ L por poço contendo: 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 1 mM de EDTA, 400 μ M de NADPH, 1 mM de glutathiona oxidada (GSSG) (Sigma-Aldrich, Saint Louis), 10 mU da enzima (GR – Sigma-Aldrich, Saint Louis). Os compostos foram avaliados na concentração de 50 μ M contendo 1 % de DMSO e 0,4 % de etanol como solventes. Foram realizados brancos correspondentes a cada composto e ao tampão enzimático. A diluição dos compostos foi realizada como descrito para o ensaio com a TcTR. A microplaca foi incubada a 30 °C durante 30 minutos. A leitura

foi iniciada em leitora de microplacas com λ de 340 nm a 27 °C, iniciando-se com 10 ciclos em 20 minutos (leitura a cada 2 minutos) e após a adição de 1 mM de GSSG (Sigma-Aldrich, Saint Louis), correspondente a 10 μ L por poço (solução a 25 mM), foi realizada leituras a cada 1 minuto por 20 minutos, medindo-se a inclinação da curva durante as leituras após GSSG ($\delta\text{Abs}/\delta t$). Este valor foi comparado com o controle DMSO 1 %, 0,4 % etanol e controle da enzima para fornecer o percentual de inibição da enzima. Os ensaios para esta triagem foram realizados em duplicata dos compostos, como demonstrado na figura 15 (EGER, 2010, CARLBERG, MANNERVIK, 1985).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2	2	Bco	12	12	Bco	21	21	Bco	Controle DMSO 1%		
B	4	4	Bco	14	14	Bco	22	22	Bco	Controle da enzima		
C	5	5	Bco	15	15	Bco	23	23	Bco	Branco tampão		
D	6	6	Bco	16	16	Bco	24	24	Bco			
E	7	7	Bco	17	17	Bco	25	25	Bco			
F	9	9	Bco	18	18	Bco	NF	NF	Bco			
G	10	10	Bco	19	19	Bco						
H	11	11	Bco	20	20	Bco						

Figura 15. Esquema de montagem da microplaca no ensaio de determinação de inibição da enzima GR frente a compostos e composto protótipo. Bco: controle da diluição dos compostos a cada concentração no meio utilizado, sem enzima. Coloração cinza representam os compostos e respectivos brancos a 50 μ M.

5.7.3 Tratamento dos dados obtidos para determinação da inibição das enzimas *TcTR* e *GR*

Os dados de absorvância obtidos em λ de 412 nm para enzima *TcTR* e 340 nm para *GR*, foram tratados a fim de obter porcentagens de inibição enzimática. Neste cálculo foi considerado a razão da absorvância após incubação dos parasitos com os compostos e fármacos e o controle da cultura parasitária, aplicando-se a equação 8:

$$\% \text{ Inibição} = \{1 - [(I_{ec} - I_{ec-bco}) / (I_c - I_{c-bco})]\} * 100 \quad [\text{equação 8}]$$

Em que:

I_{ec} = inclinação da curva ($\delta\text{Abs}/\delta t$) da enzima na presença de composto;

I_{ec-bco} = inclinação da curva do branco da diluição do composto;

I_c = inclinação da curva da enzima na ausência de qualquer composto (controle da enzima e controle de DMSO 1 % e 0,4 % de etanol);

I_{c-bco} = inclinação da curva do branco equivalente ao tampão enzimático.

Os dados obtidos da porcentagem de inibição enzimática das duplicatas dos ensaios independentes foram tratados realizando-se sua média e desvio padrão. Para comparações

entre os resultados obtidos de cada enzima (*TcTR* e *GR*) foi empregado o teste estatístico paramétrico teste-*t* de *Student*, com intervalo de confiança de 95 %.

5.7.4 Ancoramento de compostos na estrutura 3D das enzimas *TcTR* e *GR*

Selecionaram-se para realizar os estudos de ancoramento os compostos BSF-2, BSF-27 e BSF-35, além dos fármacos BZD, NFX e NF, e os modelos moleculares 3D utilizados foram aqueles obtidos com os protocolos descritos no item 5.4.1. Os alvos moleculares considerados foram as estruturas 3D das enzimas *TcTR* (obtida por difração de raio-X em complexo com a quincrina; PDB ID 1GXF, resolução de 2,7 Å; BOND *et al.*, 2004) e *GR* (obtida por difração de raios-X em complexo com um derivado de xantina; PDB 1XAN, resolução de 2,0 Å; SAVVIDES, KARPLUS, 1996) depositadas no banco de dados PDB. O ancoramento molecular foi realizado no programa *LeadIT* 2.1.8, BioSolveIT GmbH. Utilizaram-se as seguintes condições de cálculo: 200 como número máximo de soluções por interação e por fragmentação; raio de 9,5 Å para o sítio de ancoramento das enzimas *TcTR* e *GR*; 10 poses selecionadas para visualização e posterior análise das interações. A melhor conformação foi selecionada considerando a pontuação (score) de ancoramento e a ferramenta “*HYDE assessment*” do programa foi utilizada para visualizar a classificação. Utilizaram-se como parâmetros de avaliação, a energia livre de interação de Gibbs (ΔG) e a eficiência do ligante (*LE*, *ligante efficiency*) (HOPKINS *et al.*, 2014).

5.8 Avaliação do potencial de redução da membrana mitocondrial (ψ_m) em formas epimastigotas por citometria de fluxo

Os ensaios para avaliação do potencial de redução de membrana (ψ_m) foi realizado no Laboratório de Protozoologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob coordenação do Professor Assoc. Mario Steindel e acompanhamento da Dra. Milene Hoehr de Moraes. Este estudo foi baseado em trabalho anterior do grupo do Professor Steindel (YAMANAKA *et al.*, 2013).

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços com fundo plano, utilizando formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi* a $2,0 \times 10^6$ parasitos/mL. Foram realizados dois ensaios, primeiramente uma triagem com os compostos BSF-1, BSF-3, BSF-10, BSF-16, BSF-32, BSF-33, BSF-34, BSF-35, BSF-36 e os fármacos NF, BZD e NFX incubados por 24 e 48 h a 27 °C na concentração de 15 μM , utilizando no máximo 1 % do solvente DMSO.

Foram realizados controle do solvente e controle de cultivo parasitário. O ensaio posterior foi mais detalhado e realizado para o composto BSF-34 e NFX os quais foram ensaiados nas concentrações de 3, 6 e 12 μM e em tempos de leitura de 1, 2, 4, 6, 18 e 26 h. A etapa de incubação dos compostos e fármacos com a forma epimastigota foi realizada conforme descrito no item 5.3 deste trabalho.

As análises subsequentes foram realizadas por citometria de fluxo utilizando como marcador a rodamina R123 (CHAZOTTE *et al.*, 2011). Após incubação de 24 e 48 h, coletou-se 10^6 parasitos em microtubos de centrifugação e foram centrifugados a 2.000 g por 5 minutos e incubados com 500 μL da solução de R123 (9 $\mu g/mL$) em PBS por 15 minutos a 27 °C. Após 3 lavagens com PBS, os parasitos foram transferidos para tubos de citometria e a marcação de R123 foi quantificada por citometria de fluxo utilizando o equipamento FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). No ensaio para verificar a morte parasitária, 2 μL do iodeto de propídio (solução a 1 mg/mL) foi adicionado após transferência para o tubo de citometria no momento da leitura em citômetro. Um total de 50.000 eventos foram adquiridos na região de espalhamento de luz (FSCxSSC) correspondente aos parasitos e detectados em FL1-H. Os dados foram analisados posteriormente com auxílio do programa Flowing versão 2.5.1 (utilização gratuita – *freeware*) (YAMANAKA *et al.*, 2013).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Planejamento dos compostos

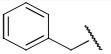
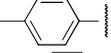
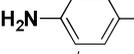
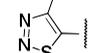
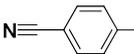
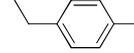
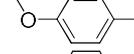
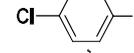
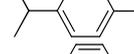
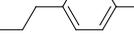
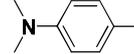
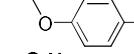
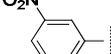
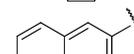
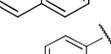
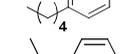
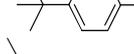
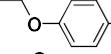
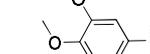
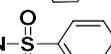
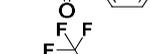
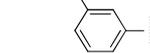
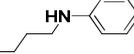
Como citado anteriormente, o planejamento dos compostos foi baseado na modificação estrutural da NF, considerada como composto-protótipo. Para auxiliar o planejamento foram calculados descritores estabelecidos em literatura para triagem de compostos com melhor biodisponibilidade, RO5 (LIPINSKI, 2004, VEBER *et al.*, 2002, GHOSE, VISWANADHAN, VENDOLOSK, 1998, LIPINSKI *et al.*, 1996). Na tabela 3 estão listados os descritores de ClogP_{WM}, massa molar, HBD, HBA, MR, número de átomos que constituem a molécula, RB e PSA, calculadas no programa *Marvin Beans*. O planejamento dos 40 compostos foi realizado ao longo do trabalho considerando os resultados de atividade biológica e sempre observando os descritores mencionados acima. É importante salientar que os compostos BSF-37, BSF-36, BSF-39 e BSF-40 foram planejados no final do trabalho, baseado nos dados do conjunto de 36 compostos, sendo estes os compostos mais ativos nos ensaios frente as formas epimastigota e amastigota do parasito.

Tabela 3. Descritores considerados no planejamento da série de compostos

Compostos	ClogP _{WM}	MM (g)	HBD	HBA	RB	n ^o átomos	MR	PSA (Å ²)	
BSF-1		0,20	197,15	1	4	3	21	45,53	97,75
BSF-2		0,15	222,16	1	5	4	22	50,85	121,53
BSF-3		2,23	253,26	1	4	7	33	63,96	97,74
BSF-4		1,17	227,18	1	4	5	25	51,90	106,97
BSF-5		1,11	249,18	1	4	4	25	58,59	110,88
BSF-6		1,87	251,24	1	4	4	31	62,13	97,74
BSF-7		1,87	255,23	1	4	5	31	60,96	106,97
BSF-8		2,05	259,22	1	4	4	28	66,20	97,74
BSF-9		1,97	265,25	1	4	4	25	63,09	125,98
BSF-10		2,13	265,27	1	4	4	34	66,73	97,74
BSF-11		2,57	273,25	1	4	4	31	71,24	97,74

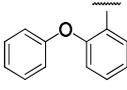
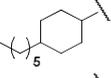
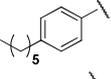
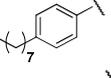
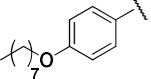
(cont.)

Tabela 3: Descritores considerados no planejamento da série de compostos (continuação)

Compostos	ClogP _{MP}	MM (g)	HBD	HBA	RB	n° átomos	MR	PSA (Å ²)
BSF-12 	2,03	273,25	1	4	5	31	70,25	97,74
BSF-13 	2,57	273,25	1	4	4	31	71,24	97,74
BSF-14 	2,03	274,24	2	5	4	30	70,25	97,74
BSF-15 	0,91	281,25	1	6	4	26	64,87	151,76
BSF-16 	1,91	284,23	1	5	4	29	71,92	121,53
BSF-17 	3,01	287,28	1	4	5	34	75,84	97,74
BSF-18 	1,89	289,25	1	5	5	32	72,66	106,97
BSF-19 	2,66	293,66	1	5	4	28	71,00	97,74
BSF-20 	3,57	295,34	1	4	10	42	77,76	97,74
BSF-21 	3,30	301,30	1	4	5	37	80,39	97,74
BSF-22 	3,46	301,30	1	4	6	37	80,44	97,74
BSF-23 	2,16	302,29	1	5	5	36	80,63	100,98
BSF-24 	2,25	303,27	1	5	6	35	77,41	106,97
BSF-25 	1,99	304,22	1	6	5	30	73,52	143,56
BSF-26 	3,04	309,28	1	4	4	34	82,65	97,74
BSF-27 	3,90	315,33	1	4	7	40	85,04	97,74
BSF-28 	3,60	315,33	1	4	5	40	84,87	97,74
BSF-29 	2,77	317,30	1	5	8	38	81,94	106,97
BSF-30 	1,74	319,27	1	6	6	36	79,13	116,20
BSF-31 	0,66	338,29	2	6	5	33	78,36	166,28
BSF-32 	2,93	327,22	1	7	5	31	72,17	97,74
BSF-33 	2,85	330,34	2	5	8	42	90,27	109,77
BSF-34 	3,22	331,33	1	5	8	41	86,54	106,97
BSF-35 	3,70	335,32	1	4	5	38	91,34	97,74

(cont.)

Tabela 3: Descritores considerados no planejamento da série de compostos (continuação)

Compostos	ClogP _{MP}	MM (g)	HBD	HBA	RB	n° átomos	MR	PSA (Å ²)
BSF-36 	3,55	351,32	1	4	6	39	92,44	106,97
BSF-37 	4,38	335,40	1	4	8	49	89,68	97,74
BSF-38 	4,34	329,36	1	4	8	43	89,65	97,74
BSF-39 	5,23	357,41	1	4	10	49	98,85	97,74
BSF-40 	4,55	373,41	1	5	11	50	100,34	106,97
BZD	1,32	260,25	1	7	68,12	31	5	92,74
NFX	-0,27	287,29	0	8	66,78	32	3	108,71

Considerado como requisitos para o planejamento dos compostos => Lipinski "Regra dos 5": ClogP < 5, MM < 500, HBD < 5, HBA < 10; GHOSE, VISWANADHAN, WENDOLOSKI, 1999: ClogP entre -0.4 a 5.6, MR de 40 a 130, MM de 180 a 500, n° de átomos de 20 a 70, PSA < 140 Å²; VEBER *et al.*, 2002: ligações rotáveis < 10, PSA < 140 Å². Descritores calculados no programa Marvin Beans versão 5.0.4.1, ChemAxon. ClogP: logaritmo do coeficiente de partição calculado pelo método ponderado, considerando pesos iguais aos métodos VISWANADHAN *et al.*, 1989, KLOPMAN *et al.*, 1993 e banco de dados PHYSPROP[®]; MM: massa molar (Da, u.m.a. ou g); HBA: número de átomos receptores de ligação hidrogênio; HBD: número de átomos doadores de ligação hidrogênio; MR: refratividade molar; n° átomos: número de átomos que constituem a molécula; RB, ligações rotáveis: número de ligação rotáveis presentes na molécula; PSA: área de superfície polar (Å²), BZD: benzimidazol, NFX: nifurtimox.

Os descritores estão apresentados em gráficos de dispersão, o que permite observar características do conjunto de 40 compostos planejados (figura 16). Os compostos BSF-15, BSF-25 e BSF-31 apresentaram valor de PSA fora do limite de 140 Å², porém estes compostos não excedem o valor de 12 na soma de HBA e HBD, sendo ainda considerado dentro dos limites dos parâmetros ideais em moléculas com boa biodisponibilidade (VEBER *et al.*, 2002). O composto BSF-39 teve valor de ClogP limítrofe, porém decidiu-se continuar os estudos com este composto, pois este foi planejado com objetivo de otimizar a atividade baseado nos dados de atividade biológica das estruturas previamente sintetizadas. O composto BSF-40 também apresentou valor limítrofe de RB, seguindo-se o mesmo atributo do composto BSF-39 para continuidade dos ensaios. Estudos mostram que a RO5 apresenta ressalvas, uma delas é o valor de ClogP, pois há muitas variações no cálculo desta propriedade, o que pode influenciar na seleção de estruturas. Outro aspecto é que a RO5 se baseia nos valores de percentil 90 da distribuição dos descritores aplicada apenas por absorção por difusão passiva em membrana, desconsiderando compostos que possam ter absorção ativa por transportador

(LEESON, 2012; LEESON, SPRINGTHORPE, 2007). Apesar das considerações e ressalvas na utilização da RO5, esta ferramenta é utilizada como auxílio no planejamento de compostos.

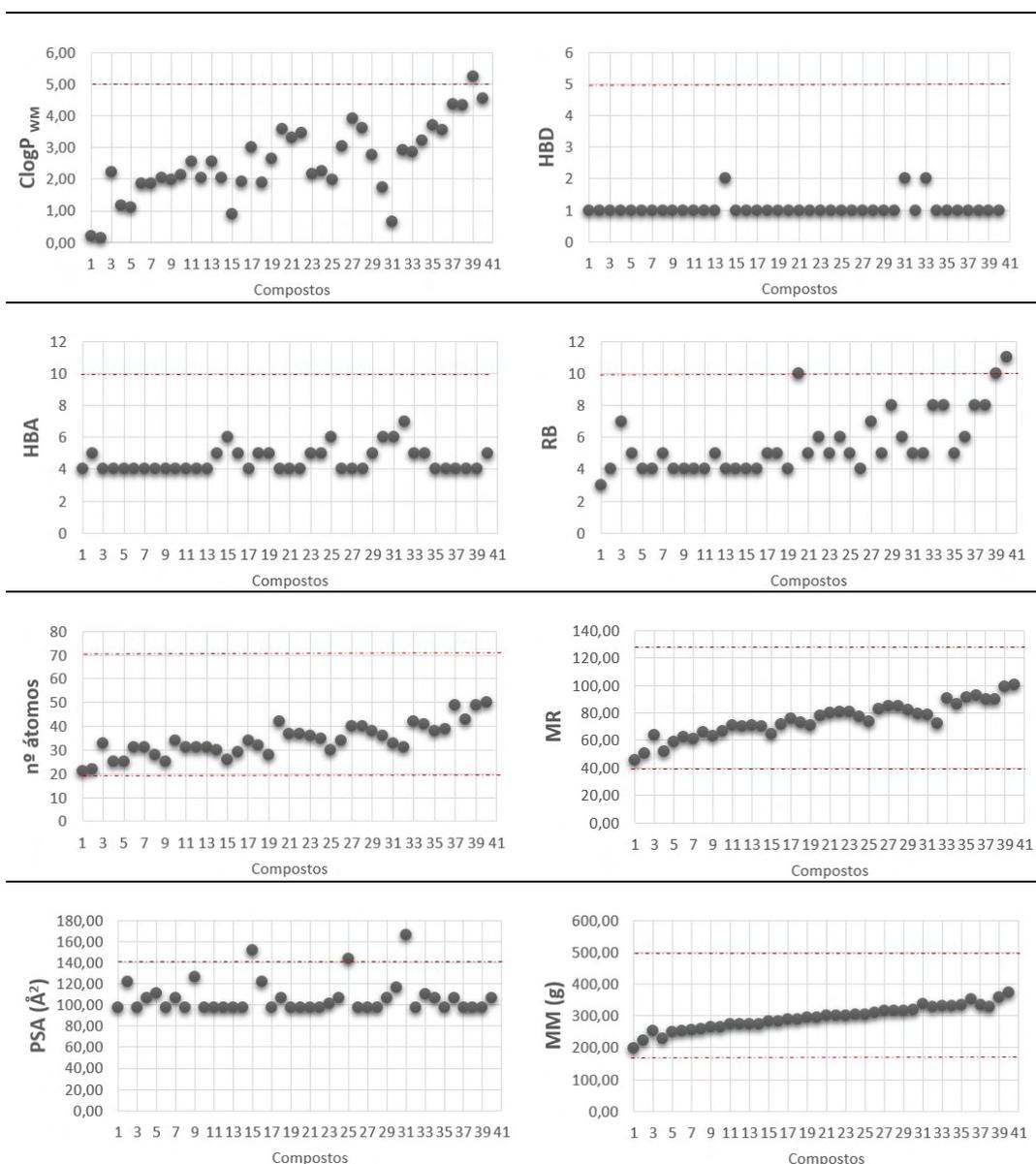


Figura 16. Gráficos de dispersão dos principais descritores utilizados no planejamento da série de 40 compostos. ClogP: logaritmo do coeficiente de partição calculado pelo método ponderado, considerando pesos iguais aos métodos VISWANADHAN *et al.*, 1989, KLOPMAN *et al.*, 1993 e banco de dados PHYSPROP[®]; MM: massa molar (Da, u.m.a. ou g); HBA: número de átomos receptores de ligação hidrogênio; HBD: número de átomos doadores de ligação hidrogênio; MR: refratividade molar; nº átomos: número de átomos que constituem a molécula; ligações rotáveis: número de ligação rotáveis presentes na molécula; PSA: área de superfície polar (Å²). Descritores calculados no programa Marvin Beans versão 5.0.4.1, ChemAxon. Linha pontilhada representa valores limites indicados na “Regra dos 5”, postulada por Lipinski (LIPINSKI, 2004, LIPINSKI *et al.*, 1997).

6.2 Obtenção dos compostos derivados do 5-nitrofurano

Para obtenção dos compostos nitrofurânicos a rota sintética foi constituída de duas etapas, o que viabiliza o aumento de escala para obtenção de maior quantidade de composto, devido rendimento ser mais expressivo com a redução de etapas sintéticas (PALACE-BERL, 2012, JORGE, 2011). As etapas sintéticas utilizadas foram direcionadas para obtenção dos intermediários hidrazídicos, envolvendo mecanismo de esterificação de Fisher seguido de hidrazinólise, e a etapa de adição nucleofílica para obtenção dos compostos de interesse, derivados do 5-nitrofurano.

6.2.1 Obtenção e identificação das hidrazidas substituídas

As hidrazidas substituídas foram obtidas por caminho sintético envolvendo a reação de esterificação seguida da hidrazinólise, sem o isolamento dos respectivos ésteres intermediários, como descrito em literatura (PALACE-BERL, 2012, JORGE *et al.*, 2011, JORGE, 2011). Neste procedimento a reação de hidrazinólise tem como facilitador o álcool, proveniente da esterificação, mantendo o éster solúvel, e, associado ao meio ácido, favorecem a protonação do carbono carbonílico do éster, tornando-o mais susceptível ao ataque nucleofílico pela hidrazina, promovendo a hidrazinólise e, conseqüentemente, a formação das hidrazidas (MORRISON, BOYD, 1994).

O mecanismo da esterificação de Fischer, figura 17, inicia-se pela protonação do oxigênio carbonílico do ácido carboxílico (**I**). Este próton é proveniente da transferência do metanol (**A**), o qual se apresenta protonado devido ao meio reacional ácido. Em seguida ocorre ataque nucleofílico do metanol (**B**) no carbono carbonílico do intermediário protonado (**I-a**). Após este ataque, o intermediário formado (**I-b**) perde um próton formando intermediário tetraédrico neutro (**I-c**). Posteriormente este intermediário sofre protonação em uma de suas hidroxilas, desencadeando a perda de uma molécula de água (**I-d**). Por fim, ocorre a perda de um próton deste intermediário (**I-e**) obtendo-se assim o éster (**I/II**) (SOLOMONS, FRYHLE, 2004, MARCH, 2001, CAREY, SUNDBERG, 2000).

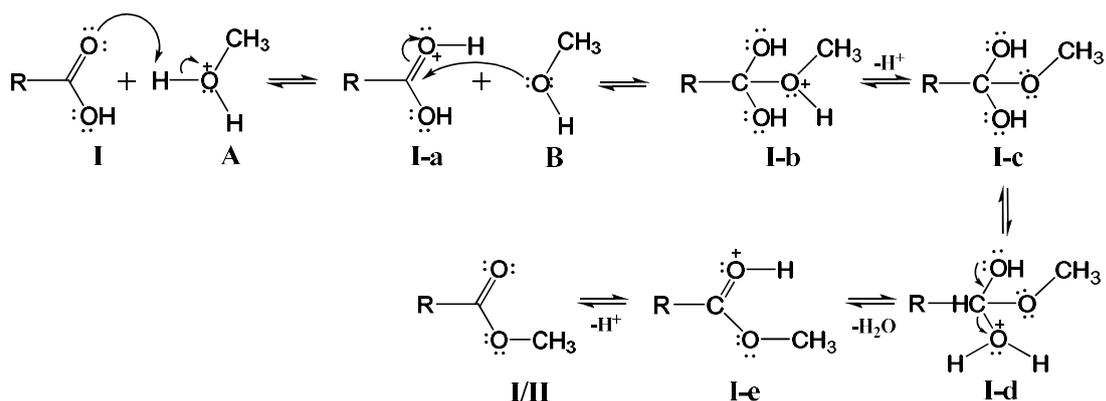


Figura 17. Mecanismo de esterificação de Fischer (adaptado de MARCH, 2001).
R: grupos alquila, cicloalquila, fenila e heterocíclicos.

A reação de esterificação de Fischer é caracterizada por ser reversível e o ácido catalisa tanto a reação direta, a formação de éster, como a reação inversa, que consiste na hidrólise do éster formado. Assim, quando o equilíbrio é atingido, permanece no meio reacional uma considerável quantidade dos reagentes (SOLOMONS, FRYHLE, 2004). Para deslocar o equilíbrio no sentido da formação dos produtos, pode-se remover um dos produtos ou utilizar excesso de um dos reagentes. Levando-se em consideração estas condições, optou-se pela utilização de excesso de metanol, por ter baixo custo, além de ser favorável a reação subsequente, a hidrazinólise (MARCH, 2001, CAREY, SUNDBERG, 2000).

A hidrazinólise, segunda etapa da rota sintética dos compostos, consiste em reação de substituição nucleofílica por adição-eliminação, figura 18. Esta reação ocorre quando o carbono carbonílico do éster (I/II), deficiente em elétrons, sofre ataque nucleofílico da hidrazina (A), formando intermediário instável (I/II-a), que resulta no intermediário (I/II-b). Este é dissociado, (I/II-c), ocorrendo eliminação de alcóxila (B) obtendo-se assim a hidrazida (II) (SOLOMONS, FRYHLE, 2004, MARCH, 2001, CAREY, SUNDBERG, 2000).

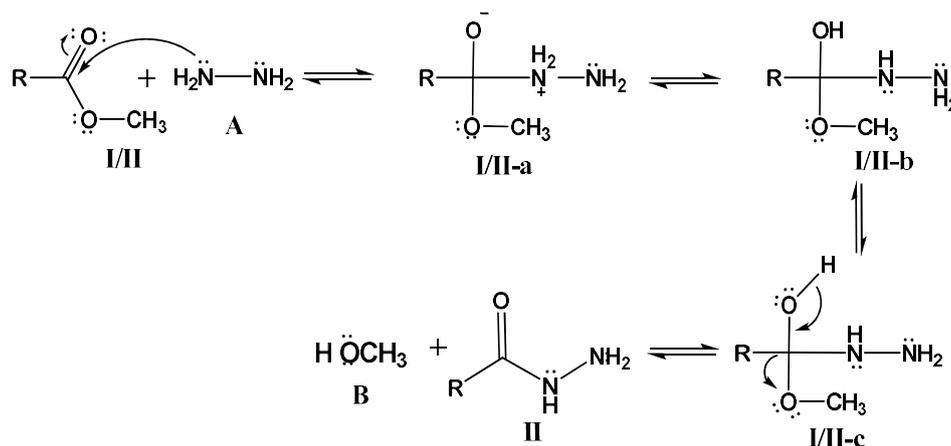


Figura 18. Mecanismo de reação de hidrazinolise (adaptado de MARCH, 2001).
R: grupos alquila, cicloalquila, fenila e heterocíclicos.

As hidrazidas substituídas foram identificadas por meio da faixa de fusão determinada experimentalmente e comparada com dados da literatura, sendo verificado que para todas as hidrazidas o intervalo da faixa de fusão foi estreito e compatível com o da literatura, o que indica pureza destes intermediários. O rendimento encontrado nesta etapa apresentou para o intermediário **II-26** menor rendimento, 57 %, e para o **II-33** e **II-35**, maior rendimento, ambos com 98 %. Os dados experimentais referentes a esta etapa sintética estão descritos na tabela 4. Os intermediários hidrazídicos **II-1, 2, 4, 5, 7, 9, 15 e 20** foram obtidos comercialmente (Sigma - Aldrich Chemical Company, Inc) com pureza entre 97 e 99 %, exceto a hidrazida correspondente ao composto BSF-20, que foi adquirida com pureza de 80 % e purificada por recristalização de acetato de etila PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório) para evitar impurezas interferentes na próxima etapa sintética. Observou-se que a hidrazida comercial do composto BSF-2 (97 % de pureza) apresentou mudança de coloração, verificando-se também mudança na faixa de fusão de 108-109 °C para 109-112 °C. Desta forma também se procedeu a purificação por recristalização de acetato de etila PA sob aquecimento a 70 °C e resfriamento em temperatura ambiente, seguido de armazenamento a -6 °C até formação dos cristais. Nas figuras 19 e 20 encontram-se os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das hidrazidas purificadas.

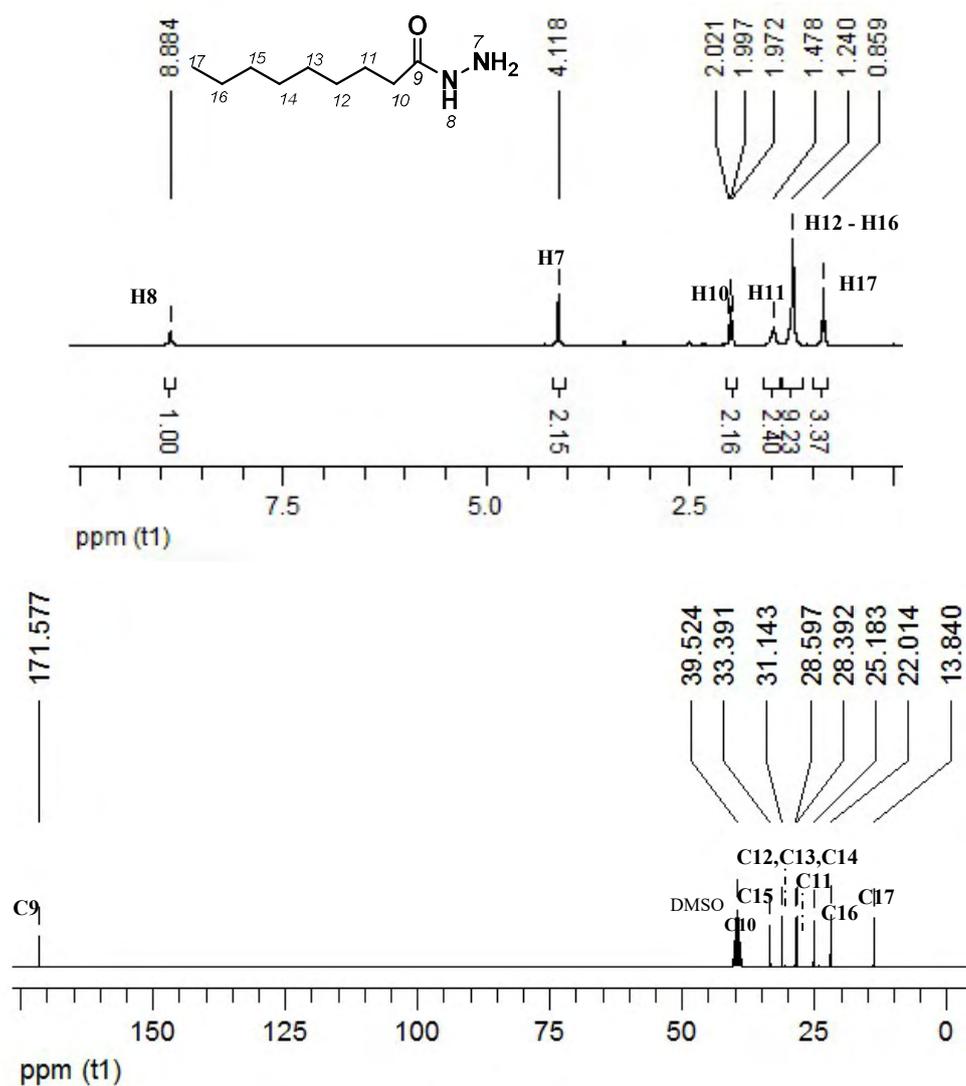


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do intermediário hidrazídico do composto BSF-20 purificado (300 MHz / 75 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / TMS).

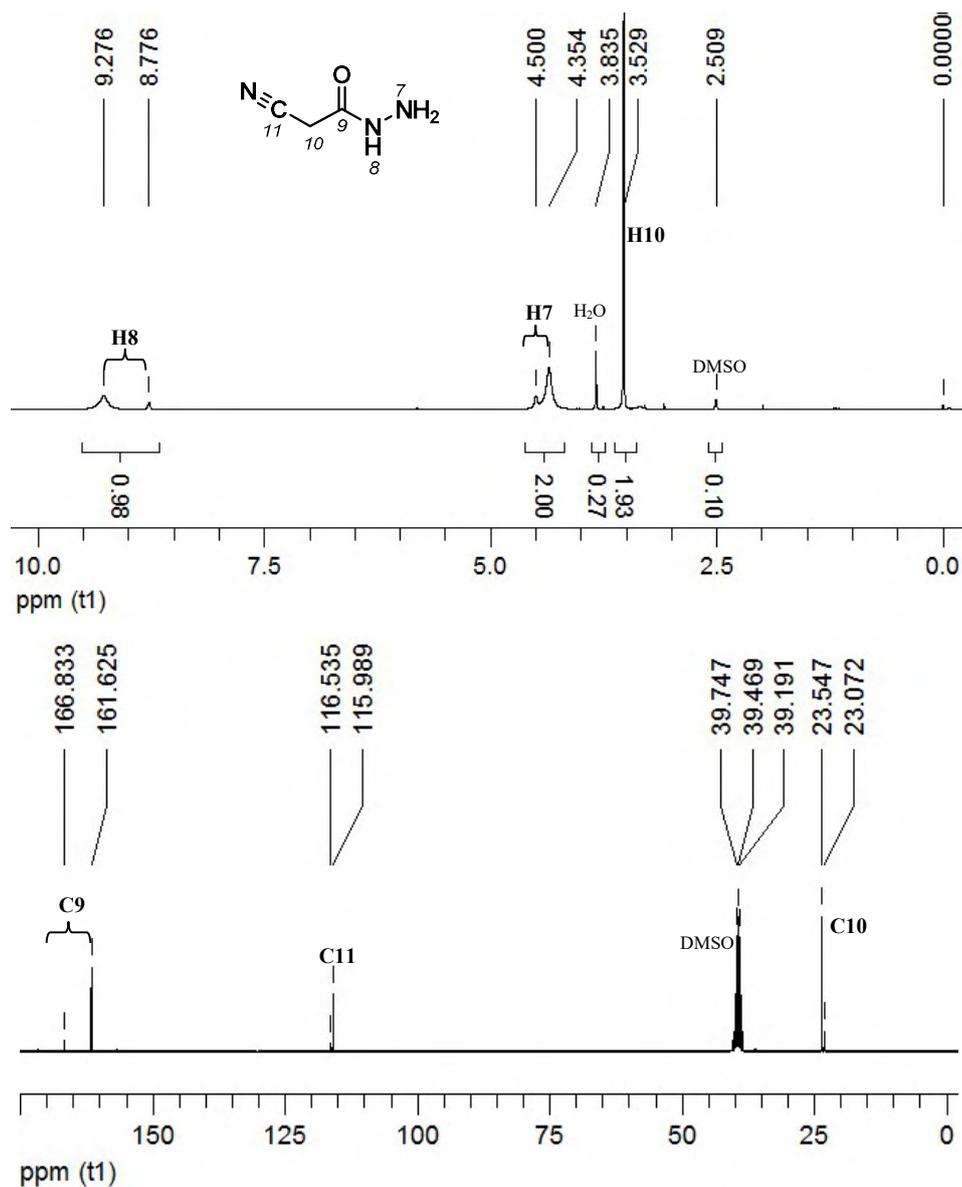


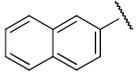
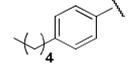
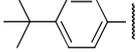
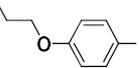
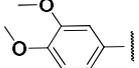
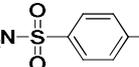
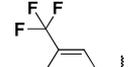
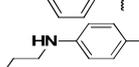
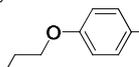
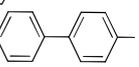
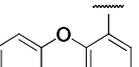
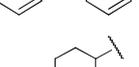
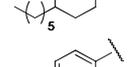
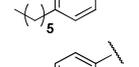
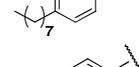
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do intermediário hidrazídico do composto BSF-2 purificado (300 MHz / 75 MHz / DMSO- d_6 / TMS).

Tabela 4. Dados experimentais das hidrazidas intermediárias: rendimento, faixa de fusão e massa molar

Compostos (II)	Rendimento (η %)		Faixa de fusão ($^{\circ}\text{C}$)		Massa molar (g)	
	Exp.	Lit. ^a	Exp.	Lit. ^a		
BSF-1	- ^b	90	- ^b	58-68	74,08	
BSF-2		- ^b	98	- ^b	108-110	99,09
BSF-3		96	98	76-77	76-78	130,19
BSF-4		- ^b	98	- ^b	44-47	104,11
BSF-5		- ^b	98	- ^b	77-79	126,11
BSF-6		70	76	113-115	117-118	128,17
BSF-7		- ^b	98	- ^b	39-42	132,16
BSF-8		95	88 ^c	112-113	113-117 ^c	136,15
BSF-9		- ^b	98	- ^b	136-139	142,18
BSF-10		75	78	153-155	158-159	142,20
BSF-11		86	78	98-99	99-100	150,18
BSF-12		73	68	116-117	116-117	150,18
BSF-13		82	56	115-116	114-116 ^d	150,18
BSF-14		84	69 ^d	228-230	225-227 ^d	151,17
BSF-15		- ^b	97	- ^b	143-145	158,18
BSF-16		81	90	197-198	195-197	161,16
BSF-17		- ^c	80	- ^c	119-118	164,20
BSF-18		93	90 ^a	137-139	136-140 ^a	166,18
BSF-19		85	85 ^d	164-165	164-165 ^d	170,60
BSF-20		- ^b	80	- ^b	87-89	158,24
BSF-21		75	75	82-83	87-90	178,23
BSF-22		91	71	86-88	86-87	178,23
BSF-23		69	36 ^c	173-174	170-171 ^c	179,22
BSF-24		90	92 ^a	92-94	91-93 ^a	180,20
BSF-25		82	80	153-154	153-154	181,15

(cont.)

Tabela 4. Dados experimentais das hidrazidas intermediárias: rendimento, faixa de fusão e massa molar (cont.)

Compostos (II)	Rendimento (η %)		Faixa de fusão ($^{\circ}$ C)		Massa molar (g)
	Exp.	Lit. ^a	Exp.	Lit. ^a	
BSF-26 	57	72	147-148	147-148	186,21
BSF-27 	97	82	79-70	74-76	192,26
BSF-28 	86	78	126-127	127-128	192,26
BSF-29 	95	20	111-113	110-113	194,23
BSF-30 	84	79	143-144	145-146	196,20
BSF-31 	62	58	230-231	226-228	215,23
BSF-32 	92	83	108-109	110-111	204,15
BSF-33 	98	69	137-138	140-141	207,27
BSF-34 	90	20	109-110	111-113	208,26
BSF-35 	98	88	193-194	189-190	212,25
BSF-36 	85	78	110-111	107-108	228,25
BSF-37 	98	-	151-152	-	212,33
BSF-38 	94	-	89-90	-	216,28
BSF-39 	97	-	98-99	-	234,34
BSF-40 	93	-	93-94	-	250,34

a: Beilstein's Handbuch der Organischen Chemie; b: obtido comercialmente (Sigma-Aldrich); c: Rodrigues, 2000; d: Tavares, Penna, Amaral, 1996; e: Jorge, 2011.

A benzidrazida 3-nitro (-NO₂) substituída teve sua hidrazinólise realizada em banho de gelo, devido à característica redutora do hidrato de hidrazina frente a grupos nitro aromáticos, reduzindo-os a grupo amino, como já evidenciado em trabalhos anteriores (PALACE-BERL, 2012, JORGE, 2011, CAI, ZHOU, YUE, 2009, CAI *et al.*, 2007).

6.2.2 Obtenção e identificação dos derivados do 5-nitrofurano

A síntese dos compostos planejados (**III**) consistiu na obtenção de bases de Schiff (MORRISON, BOYD, 1994) a partir de compostos carbonílicos, *5-nitro-2-furfuraldeído*, e aminas, hidrazida substituída, envolvendo reação de adição nucleofílica (MARCH, 2001, CAREY, SUNDBERG, 2000, MORRISON, BOYD, 1994), figura 21.

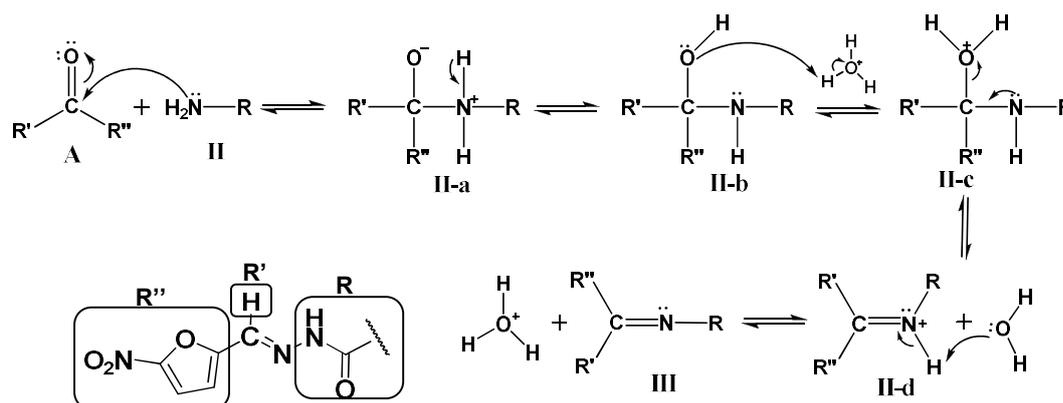


Figura 21. Mecanismo de reação de obtenção de bases de Schiff (adaptado de MARCH, 2001). R: amida substituída com grupos alquila, cicloalquila, fenila e heterocíclicos; R': hidrogênio; R'': 5-nitro-2-furano.

Nesta reação ocorre, primeiramente, ataque nucleofílico da amina primária (**II**), proveniente da hidrazida, no carbono carbonílico deficiente em elétrons, proveniente do *5-nitro-2-furfuraldeído* (**A**). Em seguida os intermediários hemiaminal *N*-protonado tetraédrico (**II-a** e **II-b**) com a transferência rápida do próton do nitrogênio positivo para o oxigênio, resulta na liberação de uma molécula de água (**II-c**). A reação se completa com a desprotonação do intermediário imina (**II-d**), obtendo-se sua forma neutra (**III**) correspondente aos compostos de interesse derivados do 5-nitrofurano. (MARCH, 2001, CAREY, SUNDBERG, 2000).

Neste mecanismo de adição nucleofílica o meio reacional utilizado para a obtenção da maioria dos compostos da série foi a mistura de ácidos (água, ácido sulfúrico PA, ácido acético PA e álcool metílico PA na proporção 8:7:8:20 v/v, respectivamente), o qual deve estar suficientemente ácido para que ocorra a protonação do composto carbonílico, sem permitir decréscimo da concentração de composto nitrogenado livre (TAVARES *et al.*, 1998, TAVARES, PENNA, AMARAL, 1996, EL-OBEID, ELNIMA, AL-BADR, 1984).

Assim, se o meio reacional apresentar acidez elevada, a amina pode se converter em sua forma protonada, perdendo sua capacidade nucleofílica e consequentemente reduzindo a velocidade da reação (MORRISON, BOYD, 1994).

A síntese dos compostos BSF-1, BSF-2, BSF-3, BSF-4, BSF-5, BSF-6, BSF-7, BSF-10, BSF-20 e BSF-37 derivados do 5-nitrofurano (**III**) foi realizada por outra metodologia sintética, em que as hidrazidas (**II**) e 5-nitro-2-furfuraldeído foram dissolvidos em etanol em temperatura ambiente sob agitação constante até a formação de sólido amorfo, evidenciado por RMN e faixa de fusão a formação dos compostos de interesse (COSTA *et al.*, 2012). Esta metodologia sintética foi adotada pois observou-se que compostos com grupos substituintes alquila e cicloalquila apresentaram dificuldades sintéticas, pela metodologia usada como rotina. Desta forma, o isolamento destes compostos em meio reacional com mistura de ácidos foi prejudicado, pois este meio possui água e estes compostos têm caráter hidrofílico. Outro aspecto é que o meio reacional ácido, utilizado para os demais compostos, pode ocasionar perda de caráter nucleofílico da porção amídica destas hidrazidas com substituintes doadores de elétrons, devido sua maior facilidade de protonação neste meio em relação a grupos com caráter receptor de elétrons (SOLOMONS, FRYHLE, 2004, MORRISON, BOYD, 1994). Esta metodologia foi utilizada de forma comparativa com a metodologia de mistura de ácidos para os compostos BSF-8, BSF-26 e BSF-35. Não foi observada diferenças grandes no rendimento entre as duas metodologias sintéticas para estes compostos: BSF-8 – 91 % e 92 %; BSF-26 – 93 % e 93 %; BSF-35 – 92 % e 91 % para a metodologia de mistura de ácidos e a metodologia em etanol à temperatura ambiente, respectivamente. Observou-se que a metodologia utilizando etanol obteve-se produtos mais puros, com faixas de fusão mais estreitas antes da etapa de purificação por recristalização.

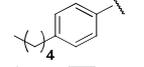
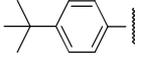
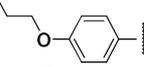
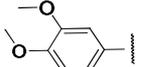
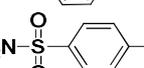
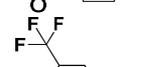
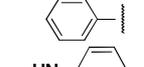
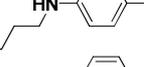
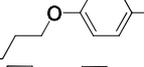
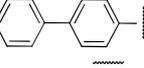
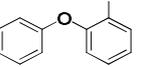
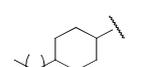
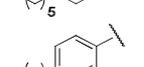
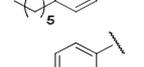
Os compostos derivados do 5-nitrofurano (**III**) foram identificados, primeiramente, pela faixa de fusão determinada experimentalmente e comparada com dados da literatura, sendo verificado que, para todos os compostos, o intervalo de faixa de fusão foi estreito, o que indica pureza destes compostos. O rendimento encontrado nesta etapa ficou entre 65 e 98 %. Os dados experimentais referente a esta etapa sintética estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Dados experimentais dos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos:
rendimento, faixa de fusão e massa molar.

Compostos	Rendimento (η %)		Faixa de fusão (°C)		Massa molar (g)	
	Exp.	Lit. ^a	Exp.	Lit. ^a		
BSF-1	78	90	251-252	249-250	197,15	
BSF-2		78	80	201-202	207-208	222,16
BSF-3		93	-	152-154	-	222,28
BSF-4		87	-	183-185	-	227,17
BSF-5		92	-	249-250	-	249,18
BSF-6		70	-	206-207	-	251,24
BSF-7		65	-	177-178	-	255,23
BSF-8		91	86 ^b	211-212	214-215 ^b	259,22
BSF-9		92	82	114-115	128-129	265,25
BSF-10		84	-	202-203	-	265,27
BSF-11		80	88 ^c	200-201	-	273,24
BSF-12		91	-	195-196	-	273,24
BSF-13		96	95	230-231	233-235	273,07
BSF-14		83	50	280-282	280-283	274,23
BSF-15		98	-	245-248	-	281,25
BSF-16		89	88	217-220	217-220	284,23
BSF-17		88	92 ^e	249-250	250-252 ^e	287,27
BSF-18		95	93 ^e	246-247	241-243 ^e	289,24
BSF-19		79	90	228-229	225-227	293,66
BSF-20		75	-	140-141	-	295,33
BSF-21		98	-	268-269	-	301,11
BSF-22		85	89 ^e	244-245	442-243 ^e	301,30
BSF-23		82	97 ^b	255-257	257-259 ^b	302,29
BSF-24		97	91 ^b	228-230	229-230 ^b	303,27
BSF-25		81	83 ^c	225-227	-	304,22
BSF-26		93	-	249-250	-	309,28

(Cont.)

Tabela 5. Dados experimentais dos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos: rendimento, faixa de fusão e massa molar (cont.)

Compostos	Rendimento (η %)		Faixa de fusão (°C)		Massa molar (g)	
	Exp.	Lit. ^a	Exp.	Lit. ^a		
BSF-27		97	87	198-199	203-204	315,32
BSF-28		88	92	304-305	306-308	315,32
BSF-29		97	88	204-205	198-200	317,30
BSF-30		88	-	216-218	-	319,27
BSF-31		85	83 ^b	269-270	270-271 ^b	323,28
BSF-32		83	86 ^c	217-218	-	327,22
BSF-33		82	-	210-215	-	330,34
BSF-34		97	62 ^b	204-205	193-195	331,32
BSF-35		92	-	239-240	-	335,31
BSF-36		87	-	197-198	-	351,09
BSF-37		93	-	169-170	-	335,40
BSF-38		94	-	200-201	-	329,35
BSF-39		95	-	178-179	-	357,40
BSF-40		95	-	172-173	-	373,40
nifuroxazida		98	83 ^b	293-294	298	275,05

Exp.: dados obtidos experimentalmente; Lit.: dados coletados de literatura; a: Beilstein's Handbuch der Organischen Chemie; b: Tavares, Penna, Amaral, 1996; c: Rando *et al.*, 2008; d: Rodrigues, 2000; e: Zorzi *et al.*, 2014. Valores não encontrados na literatura (-). Compostos 5, 16, 20, 25, 27 e 30 não possuem número CAS registrado.

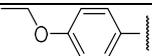
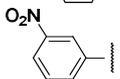
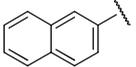
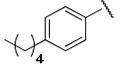
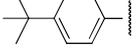
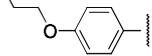
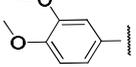
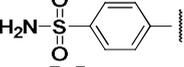
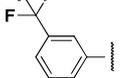
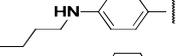
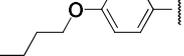
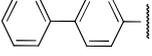
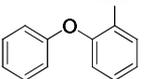
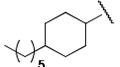
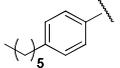
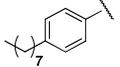
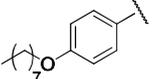
Em sequência, na tabela 6, estão demonstrados os rendimentos parciais e totais obtidos na preparação dos intermediários e dos compostos **II**. Observou-se que o rendimento alto na maioria dos compostos foi favorecido pela obtenção das hidrazidas com redução de uma etapa sintética (PALACE-BERL, 2012, JORGE, 2011). O rendimento total encontrado ficou entre 49 e 96 %. Os compostos BSF-26 e BSF-31 foram os que apresentaram menor rendimento total, e o de maior rendimento foi o fármaco NF 96 %.

Tabela 6. Rendimentos parciais e totais da etapa de preparação de derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos

Compostos	Rendimento (η %)		
	Hidrazida	<i>N</i> -acilidrazona	Total ^a
BSF-1	- ^b	78	-
BSF-2	- ^b	78	-
BSF-3	96	93	89
BSF-4	- ^b	87	-
BSF-5	- ^b	92	-
BSF-6	70	70	49
BSF-7	- ^b	65	-
BSF-8	95	91	86
BSF-9	- ^b	92	-
BSF-10	75	84	63
BSF-11	86	80	69
BSF-12	73	91	66
BSF-13	82	95	78
BSF-14	84	83	70
BSF-15	- ^b	98	-
BSF-16	81	89	72
BSF-17	- ^c	88	-
BSF-18	93	95	88
BSF-19	85	79	67
BSF-20	- ^b	75	-
BSF-21	75	98	74
BSF-22	91	85	77
BSF-23	69	82	57

(cont.)

Tabela 6. Rendimentos parciais e totais da etapa de preparação de derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos (cont.).

Compostos	Rendimento (η %)		
	Hidrazida	N-acilidrazona	Total ^a
BSF-24 	90	97	87
BSF-25 	82	81	66
BSF-26 	57	93	53
BSF-27 	97	97	94
BSF-28 	86	88	76
BSF-29 	95	97	92
BSF-30 	84	88	74
BSF-31 	62	85	53
BSF-32 	92	83	76
BSF-33 	98	82	80
BSF-34 	90	97	87
BSF-35 	98	92	90
BSF-36 	85	87	74
BSF-37 	98	93	91
BSF-38 	94	94	88
BSF-39 	97	95	92
BSF-40 	93	95	88
nifuroxazida	98	98	96

a: η % total = (η % hidrazida x η % N-acilidrazona) / 10²

b: obtido comercialmente (Sigma-Aldrich); c: Jorge, 2011.

A síntese do composto-protótipo NF segue o mesmo protocolo de obtenção dos derivados planejados, sendo que seu composto intermediário hidrazídico, foi obtido comercialmente. Assim, foi realizada apenas a etapa sintética para adição nucleofílica para obtenção da base de Schiff. O rendimento sintético de 96 % comparado com literatura no

valor de 88 % (TAVARES, PENNA, AMARAL, 1996), foi bastante satisfatório. Sua identificação inicial foi a determinação da faixa de fusão, estando a experimental situada na faixa entre 293-294 °C e a encontrada em literatura 298 °C (MERCK, 1996), apresentando-se próxima e com intervalo da faixa estreito. A confirmação da pureza dos compostos por análise elementar foi determinada pela composição centesimal dos principais átomos constituintes da molécula, carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N) e estão apresentados na tabela 7.

Foram realizadas também a espectrometria de RMN ¹H e RMN ¹³C, apresentando correspondência dos sinais a estrutura química deste fármaco, sendo estes dados apresentados nas tabelas 8 e 9 e os espectros obtidos no anexo 2 "Espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C do composto-protótipo nifuroxazida".

Tabela 7. Dados da análise elementar dos derivados do 5-nitrofurano

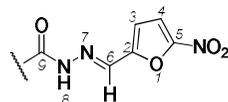
Comp.	Fórmula molecular	Massa molar (g)	% C			% H			% N		
			Exp.	Calc.	Δ	Exp.	Calc.	Δ	Exp.	Calc.	Δ
BSF-1	C ₇ H ₇ N ₃ O ₄	197,15	42,77	42,65	0,12	3,56	3,58	0,02	21,57	21,31	0,26
BSF-2	C ₈ H ₆ N ₄ O ₄	222,16	43,64	43,25	0,39	2,37	2,72	0,35	25,04	25,22	0,18
BSF-3	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₂	222,28	64,61	64,84	0,23	8,56	8,16	0,40	12,84	12,60	0,24
BSF-4	C ₈ H ₉ N ₃ O ₅	227,17	42,32	42,30	0,02	3,79	3,99	0,20	18,27	18,50	0,23
BSF-5	C ₁₀ H ₇ N ₃ O ₅	249,18	48,25	48,20	0,05	2,83	2,83	0,00	16,62	16,86	0,24
BSF-6	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₄	251,24	52,34	52,29	0,05	5,04	5,22	0,18	16,78	16,73	0,05
BSF-7	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₄	239,23	50,76	50,21	0,55	5,52	5,48	0,04	17,94	17,56	0,38
BSF-8	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₄	259,06	55,33	55,60	0,27	3,60	3,50	0,10	16,08	16,21	0,13
BSF-9	C ₁₀ H ₇ N ₃ O ₄ S	265,25	45,16	45,28	0,12	2,74	2,66	0,08	15,72	15,84	0,12
BSF-10	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₄	265,27	54,51	54,33	0,18	5,68	5,70	0,02	15,96	15,84	0,12
BSF-11	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O ₄	273,24	57,32	57,14	0,18	3,97	4,06	0,09	15,53	15,38	0,15
BSF-12	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O ₄	273,24	57,46	57,14	0,32	4,07	4,06	0,01	15,52	15,38	0,14
BSF-13	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O ₄	273,24	57,52	57,14	0,38	4,41	4,06	0,35	15,35	15,38	0,03
BSF-14	C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₄	274,23	52,19	52,56	0,37	3,53	3,68	0,15	20,10	20,43	0,33
BSF-15	C ₉ H ₇ N ₅ O ₄ S	281,25	38,63	38,43	0,20	2,80	2,51	0,29	24,55	24,90	0,35
BSF-16	C ₁₃ H ₈ N ₄ O ₄	284,05	54,52	54,93	0,41	3,08	2,84	0,24	19,39	19,71	0,32
BSF-17	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₄	287,27	58,54	58,53	0,01	4,52	4,56	0,04	14,66	14,63	0,03
BSF-18	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O ₅	289,24	53,57	53,98	0,41	3,80	3,83	0,03	14,15	14,53	0,38
BSF-19	C ₁₂ H ₈ ClN ₃ O ₄	293,02	48,95	49,08	0,13	2,82	2,75	0,07	14,18	14,31	0,13
BSF-20	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₄	295,15	56,90	56,94	0,04	6,77	7,17	0,40	14,57	14,23	0,34

(cont.)

Tabela 7. Dados da análise elementar dos derivados do 5-nitrofurano (cont.)

Comp.	Fórmula molecular	Massa molar (g)	% C			% H			%N		
			Exp.	Calc.	Δ	Exp.	Calc.	Δ	Exp.	Calc.	Δ
BSF-21	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₄	301,30	59,58	59,79	0,21	4,86	5,02	0,16	13,93	13,95	0,02
BSF-22	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₄	301,30	59,39	59,79	0,40	5,00	5,02	0,02	13,98	13,95	0,03
BSF-23	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ O ₄	302,29	55,85	55,63	0,22	4,58	4,67	0,09	18,58	18,53	0,05
BSF-24	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₅	303,27	55,14	55,45	0,31	4,18	4,32	0,14	13,64	13,86	0,22
BSF-25	C ₁₂ H ₈ N ₄ O ₆	304,22	47,38	47,38	0,00	2,80	2,65	0,15	18,22	18,42	0,20
BSF-26	C ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₄	309,07	62,47	62,14	0,33	3,70	3,58	0,12	13,49	13,59	0,10
BSF-27	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄	315,32	60,61	60,94	0,33	5,41	5,43	0,02	13,32	13,33	0,01
BSF-28	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄	315,32	60,56	60,94	0,38	5,72	5,43	0,29	13,34	13,33	0,01
BSF-29	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₅	317,30	56,48	56,78	0,30	4,78	4,76	0,02	13,60	13,24	0,36
BSF-30	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₆	319,27	52,26	52,67	0,41	4,18	4,10	0,08	13,54	13,16	0,38
BSF-31	C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₆ S	338,30	42,37	42,60	0,23	2,97	2,98	0,01	16,48	16,56	0,08
BSF-32	C ₁₃ H ₈ F ₃ N ₃ O ₄	327,05	47,53	47,72	0,19	2,49	2,46	0,03	12,96	12,84	0,12
BSF-33	C ₁₆ H ₁₈ N ₄ O ₄	330,13	58,06	58,17	0,11	5,46	5,49	0,03	16,94	16,96	0,02
BSF-34	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₅	331,12	52,66	52,37	0,29	3,37	3,30	0,07	14,87	15,27	0,40
BSF-35	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O ₄	335,31	64,24	64,47	0,23	3,88	3,91	0,03	12,60	12,53	0,07
BSF-36	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O ₅	351,31	61,54	61,54	0,00	3,72	3,73	0,01	12,19	11,96	0,23
BSF-37	C ₁₇ H ₂₅ N ₃ O ₄	335,40	60,58	60,88	0,30	7,20	7,51	0,31	12,16	12,53	0,37
BSF-38	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₄	329,35	61,94	62,00	0,06	5,73	5,81	0,08	12,45	12,76	0,31
BSF-39	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₄	357,40	63,58	63,85	0,27	6,39	6,49	0,10	11,38	11,76	0,38
BSF-40	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₅	373,40	60,99	61,11	0,12	5,96	6,21	0,25	10,87	11,25	0,25
NF	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₅	275,05	52,66	52,37	0,29	3,37	3,30	0,07	14,87	15,27	0,40

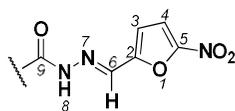
$$\Delta = |\text{experimental} - \text{calculado}|$$

Tabela 8. Principais sinais de RMN ¹H (ppm) em DMSO – d₆ de derivados do 5-nitrofurano

Compostos	N-H (s,1H ₈) δ (ppm)	N=CH (s,1H ₆) δ (ppm)	Ar-H _{furano}			Ar-H _{fenil}				Ar, NAr e Al H10-H20 δ (ppm) J (Hz)	
			(d,H ₄) δ (ppm)	J (Hz)	(d,H ₃) δ (ppm)	J (Hz)	(d,H ₁₁ e H ₁₅) δ (ppm)	J (Hz)	(d,H ₁₂ e H ₁₄) δ (ppm)		J (Hz)
BSF 1	11,74/11,63	8,14/7,93	7,76	3,9	7,19	3,7	-	-	-	-	H10: 2,21 /2,01(s,1H)
BSF 2	12,14/12,06	8,14/7,95	7,77	3,8	7,25	3,9	-	-	-	-	H10: 4,20/3,88 (s,1H)
BSF 3	11,70/11,59	8,16/7,92	7,76	3,9	7,17	4,2	-	-	-	-	H10: 2,60(t, 1H) J= 7,2/2,24 (t, 1H) J=7,2; H11: 1,58 (t, 2H) J=7,2, H12 e H13: 1,31 (s); H14: 0,88 (t, 3H) J=6,6
BSF 4	11,53	7,98	7,75	3,9	7,15	3,9	-	-	-	-	H11: 4,19 (d, 2H) J= 6,9; H12: 1,26 (s, 3H)
BSF 5	12,23	7,99	7,79	3,9	7,27	3,9	-	-	-	-	H12: 8,39 (s, 1H); H13: 6,74 (q, 1H) J= 1,8; H14: 7,39 (s, 1H)
BSF 6	11,71/11,57	8,19/7,93	7,76	3,8	7,19	3,8	-	-	-	-	H10: 3,45 (t) J=6,9, 1H/ 2,68 (t) J= 7,5, 1H; H11-14: 1,86-1,59 (m, 8H) - Hax./eq.
BSF 7	11,34	7,97	7,74	3,9	7,12	3,9	-	-	-	-	H11-13: 1,49 (s, 9H)
BSF 8	12,22	8,42	7,79	3,9	7,27	3,4	7,92	7,3	7,66-7,53 (m)	-	H12-14: 7,66-7,53 (m, 3H)
BSF 9	12,03	8,01	7,71	3,9	7,24-7,20 (m)	-	-	-	-	-	H14: 8,00 (d) J= 2,8; H12: 7,90 (dd) J= 4,8; H13 e H3: 7,24-7,20(m, 2H)
BSF 10	11,66/11,49	8,18/7,93	7,76	3,9	7,19	3,7	-	-	-	-	H10: 3,09 (s) / 2,24 (t) J=11,1; H11-15: 1,43-1,25 (m, 10H) - Hax./eq.
BSF 11	12,18	8,41	7,79	3,9	7,26	3,7	7,72 (t)	5	H12 e 13: 7,44	4,9	H16: 2,40 (s, 3H)

Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz. Sinais em: s: singlete; d: duplete, dd: duplo duplete; t: tripleto; m: multiplete; Ar: anéis aromáticos; NAr: anéis não aromáticos; Al: grupos alifáticos.

Tabela 8. Principais sinais de RMN ¹H (ppm) em DMSO – d₆ de derivados do 5-nitrofurano (cont.)



Compostos	N-H (s,1H ₈) δ (ppm)	N=CH (s,1H ₆) δ (ppm)	Ar-H _{furano}			Ar-H _{fenil}				Ar, NAr e Al H10-H20 δ (ppm) J (Hz)	
			(d,H ₄) δ (ppm)	J (Hz)	(d,H ₃) δ (ppm)	J (Hz)	(d,H ₁₁ e H ₁₅) δ (ppm)	J (Hz)	(d,H ₁₂ e H ₁₄) δ (ppm)		J (Hz)
BSF 12	11,97/11,78	8,22/7,95	7,78	3,9	7,32-7,22 (m)		7,32-7,22 (m)		7,32-7,22 (m)		H11-15 e H3: 7,32-7,22 (m, 6H); H16: 3,97, 3,61 (s, 2H)
BSF 13	12,15	8,40	7,75	3,9	7,22	3,9	7,83	8,1	7,33	8,0	H16: 2,37 (s, 3H)
BSF 14	11,86	8,38	7,78	3,9	7,2	3,9	7,69	8,7	6,64	8,4	H16: 5,74 (s, 2H - NH ₂)
BSF 15	12,75	8,09	7,80	3,8	7,36	3,8	-	-	-	-	H16: 2,96 (s, 3H)
BSF 16	12,40	8,41	7,79	3,3	7,31	(s)	8,06	-	8,06	-	-
BSF 17	12,15	8,41	7,79	3,9	7,26	3,8	7,85	8,1	7,39	8,1	H16: 2,69 (q, 2H) J=6,0; H17: 1,22 (s, 3H)
BSF 18	11,92	8,44	7,71	3,9	7,18	3,9	7,92	8,4	7,06	8,4	H16: 3,85 (s, 3H)
BSF 19	12,30	8,43	7,77	3,9	7,27	3,4	7,97	8,3	7,61	8,5	-
BSF 20	11,69/11,59	8,16/7,92	7,76	3,9	7,17	4,0	-	-	-	-	H10: 2,62-2,58, 2,27-2,22 (2H); H12-H16: 1,28 (9H); H17: 0,86 (3H)
BSF 21	12,16	8,43	7,78	3,9	7,26	3,8	7,87	8,1	7,41	8,1	H17: 3,02-2,91 (m, 1H); H16: 1,25 (s, 3H); H18: 1,23 (s, 3H);

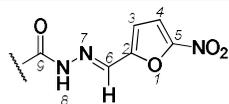
Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz. Sinais em: s: singlete; d: duplete, dd: duplo duplete; t: tripleto; m: multiplete; Ar: anéis aromáticos; NAr: anéis não aromáticos; Al: grupos alifáticos.

Tabela 8. Principais sinais de RMN ¹H (ppm) em DMSO – d₆ de derivados do 5-nitrofurano (cont.)

Compostos	N-H	N=CH	Ar-H _{furano}			Ar-H _{fenil}				Ar, NAr e Al H10-H20 δ (ppm) <i>J</i> (Hz)	
	(s,1H ₈) δ (ppm)	(s,1H ₆) δ (ppm)	(d,H ₄) δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)	(d,H ₃) δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)	(d,H ₁₁ e H ₁₅) δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)	(d,H ₁₂ e H ₁₄) δ (ppm)		<i>J</i> (Hz)
BSF 22	12,16	8,42	7,79	3,9	7,26	3,9	7,85	8,1	7,36	8,2	H16:2,63 (t, 2H) <i>J</i> =7,2; H17: 1,66-159 (m, 2H); H18:0,91 (s, 3H)
BSF 23	11,93	8,40	7,78	3,9	7,21	3,9	7,83	8,9	6,76	9,0	H16, H17: 3,01 (s, 6H)
BSF 24	11,91	8,45	7,72	3,9	7,19	3,9	7,91	8,6	7,05	8,7	H16: 4,16 (q, 2H) <i>J</i> = 6,9; H17: 1,35 (t, 3H) <i>J</i> =6,8
BSF 25	12,50	8,75	7,80	3,8	7,31	2,9	H11,13,15: 8,48-8,36 (m)		H12: 7,87 (t)	H12: 7,9	-
BSF 26	12,20	8,49	7,72	3,9	7,22	3,9	-	-	-	-	H19:8,55 (s, 1H); H11, H12, H14 e H17: 8,08-7,99 (m, 4H); H15, H16: 7,65-7,62 (m, 2H)
BSF 27	12,17	8,44	7,78	3,9	7,26	3,6	7,86	8,1	7,36	7,8	H16: 2,66 (t, 2H) <i>J</i> = 7,5; H17:1,63-1,53 (m, 2H); H18:1,38-1,25 (m, 2H); H19:0,91 (t, 3H), <i>J</i> =7,2
BSF 28	12,16	8,43	7,79	3,9	7,26	3,8	7,87	8,2	7,56	8,2	H17-19: 1,32 (s, 9H)
BSF 29	12,07	8,67	8,11	4,2	7,55	4,2	7,88	8,6	7,06	8,7	H17: 4,01 (t, 2H) <i>J</i> = 6,6; H18: 1,82-1,73 (m, 2H); H19: 1,06-0,97 (m, 3H)
BSF 30	12,06	8,42	7,71	3,9	7,18	3,9	H15: 7,58 (dd); H11: 7,53	H15: 8,4; H11: 1,9	H12: 7,08	H12: 8,4	H16, H17: 3,85 (s, 3H)/ 3,31 (s, 3H)

Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (*J*) em Hz. Sinais em: s: singlete; d: duplete, dd: duplo duplete; t: tripleto; m: multiplete; Ar: anéis aromáticos; NAr: anéis não aromáticos; Al: grupos alifáticos.

Tabela 8. Principais sinais de RMN ¹H (ppm) em DMSO – d₆ de derivados do 5-nitrofurano (cont.)



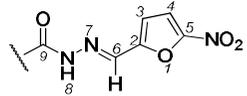
Compostos	N-H	N=CH	Ar-H _{furano}				Ar-H _{fenil}				Ar, NAr e Al H10-H20 δ (ppm) <i>J</i> (Hz)
	(s,1H ₈) δ (ppm)	(s,1H ₆) δ (ppm)	(d,H ₄) δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)	(d,H ₃) δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)	(d,H ₁₁ e H ₁₅) δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)	(d,H ₁₂ e H ₁₄) δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)	
BSF 31	12,36	8,43	7,80	3,8	7,30	2,8	8,10	7,80	7,99	8,20	H17: 7,54 (s, 2H)
BSF 32	12,39	8,42	7,84-7,80	(t, 2H)	7,32	(s)	8,24 (s, 2H)		H12: 7,84-7,80 (t, 2H)		H13: 8,00 (d, <i>J</i> =7,4)
BSF 33	11,84	8,37	7,78	3,63	7,20	3,74	7,72	8,44	6,62	8,46	H16: 6,38 (t, 1H); H17: 3,11-3,07 (t, 2H); H18: 1,42-1,37 (t, 2H); H19: 1,57-1,52 (t, 2H); H20: 0,94-0,90 (t, 3H)
BSF 34	12,09	8,41	7,79	3,9	7,24	3,9	7,91	8,8	7,01	8,8	H17: 4,06 (t, 2H) <i>J</i> =6,6; H18: 1,82-1,73 (m, 2H) <i>J</i> =6,5; H19: 1,46 (m, 2H); H20: 0,94 (t, 3H) <i>J</i> =7,2
BSF 35	12,08	8,47	H17, H21 e H4: 7,75-7,71 (m)		7,21	3,9	8,02	8,4	7,82	8,3	H17, H21 e H4: 7,75-7,71 (m, 3H); H18, H19 e H20: 7,53-7,39 (m, 3H)
BSF 36	12,14	8,30	7,70	3,6	7,29-7,23 (m)		-	-	-	-	H11: 7,77 (d, 1H, <i>J</i> =7,8 Hz); H12, H13, H14: 7,56-7,37 (m, 3H); H18, H20: 7,32- 7,23 (m, 2H); H3, H17, H19, H21: 7,17- 6,97 (m, 4H)
BSF 37	11,67/ 11,50	8,17/ 7,93	7,76	3,8	7,18	3,20	-	-	-	-	H10: 3,04 (t) <i>J</i> =12,0/ 2,18 (t) <i>J</i> =12,0; H11-15: 1,79 (d, 4H) <i>J</i> =10,5- Hax./eq.; H3, H18-H19 ax., H16-H17 ax./eq. 1,47-1,19 (m, 11H); H19-H20: 0,95-0,84 (m, 5H) eq. H18, H19 e H20 (CH ₃)

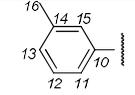
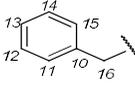
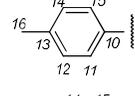
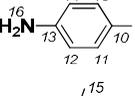
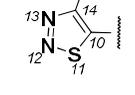
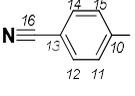
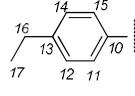
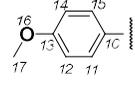
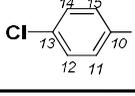
Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (*J*) em Hz. Sinais em: s: singlete; d: duplete, dd: duplo duplete; t: tripleto; m: multiplete; Ar: anéis aromáticos; NAr: anéis não aromáticos; Al: grupos alifáticos.

Tabela 8. Principais sinais de RMN ^1H (ppm) em DMSO – d_6 de derivados do 5-nitrofurano (cont.)

Compostos	N-H	N=CH	Ar-H _{furano}			Ar-H _{fenil}				Ar, NAr e Al H10-H20 δ (ppm) J (Hz)	
	(s,1H ₈) δ (ppm)	(s,1H ₆) δ (ppm)	(d,H ₄) δ (ppm)	J (Hz)	(d,H ₃) δ (ppm)	J (Hz)	(d,H ₁₁ e H ₁₅) δ (ppm)	J (Hz)	(d,H ₁₂ e H ₁₄) δ (ppm)		J (Hz)
BSF 38	12,15	8,41	7,79	3,7	7,26	3,3	7,84	7,7	7,36	7,9	H16: 2,65 (t, 2H) $J=7,5$; H17: 1,60 (t, 2H) $J=6,9$; H18, H19: 1,3 (d, 4H); H20: 0,86 (t, 3H) $J=6,6$
BSF 39	12,15	8,42	7,79	3,0	7,26	(s)	7,85	7,6	7,35	7,7	H16: 2,65 (t, 2H) $J=7,2$; H17: 1,59 (s, 2H); H18-H21: 1,28 (s, 8H); H22: 0,85 (s, 3H)
BSF 40	12,09	8,41	7,79	3,9	7,24	3,9	7,91	8,80	7,06	8,80	H17: 4,05 (t, 2H), $J=6,3$; H18: 1,78-1,71 (m, 2H); H19-H22: 1,42-1,28 (m, 8H); H23: 0,87 (t, 3H) $J=6,9$
Nifuroxazida	12,02	8,39	7,78	3,9	7,23	3,9	7,82	8,8	6,89	8,7	OH: 10,17 (s)

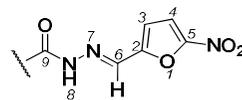
Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz. Sinais em: s: singleto; d: dupletto, dd: duplo dupletto; t: triplete; m: multipletto; Ar: anéis aromáticos; NAr: anéis não aromáticos; Al: grupos alifáticos.

Tabela 9. Principais sinais de RMN ^{13}C (ppm) em DMSO – d_6 de derivados do 5-nitrofurano (cont.)


Compostos	C2	C3	C4	C5	C6	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16-C20
BSF 11 	151,8	114,6	115,1	151,8	135,3	163,6	135,3	128,2	128,4	132,8	137,9	132,8	C16: 20,9
BSF 12 	151,8	114,5	115,0	151,8	134,5/ 130,9	172,6/ 167,1	135,1	129,5	128,3	126,5	128,2	129,1	C16: 41,2
BSF 13 	151,9	114,9	114,6	151,8	135,1	163,3	129,8	127,8	129,0	142,3	129,0	127,8	C16: 21,0
BSF 14 	152,6	114,3	114,8	152,4	133,5	163,3	118,8	129,7	112,7	151,7	112,7	129,7	-
BSF 15 	152,0	116,4	114,4	152,0	132,3	163,5/ 160,5	150,6	-	-	-	135,0	15,0	
BSF 16 	152,0	114,5	114,5	151,4	136,5	162,1	136,5	128,6	132,6	115,8	132,6	128,6	C16: 118,1
BSF 17 	151,8	115,1	114,6	151,8	135,2	163,4	130,2	127,9	127,9	148,4	127,9	127,9	C16: 28,1; C17: 15,2
BSF 18 	152,2	114,2	113,8	151,8	134,7	162,4	129,9	125,0	114,4	163,4	125,0	114,4	C16: 55,5
BSF 19 	151,8	114,5	115,2	151,6	135,7	162,3	131,3	129,6	128,5	137,0	128,5	129,6	-

Deslocamentos químicos (δ) em ppm.

Tabela 9. Principais sinais de RMN ¹³C (ppm) em DMSO – d₆ de derivados do 5-nitrofurano (cont.)



Compostos	C2	C3	C4	C5	C6	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16-C20
BSF 20	151,8	114,2	114,7	151,6	133,7/ 130,5	174,7/ 169,2	34,2/ 31,5	24,8/ 23,9	28,6	28,5	28,4	31,1	C16: 22,0; C17: 13,8
BSF 21	151,9	114,6	115,0	151,8	135,2	163,4	130,4	127,9	126,4	152,9	126,4	127,9	C16: 33,4; C17, 18: 23,5
BSF 22	151,9	114,6	115,0	151,8	135,1	163,3	130,2	127,8	128,4	146,8	128,4	127,8	C16: 37,0; C17: 23,7; C18: 13,5
BSF 23	152,4	114,4	114,7	151,7	133,6	163,2	118,6	129,4	110,8	152,7	110,8	129,4	C16, 17: 41,5
BSF 24	152,2	114,3	114,2	151,8	134,7	163,4	124,9	129,9	114,4	161,7	114,4	129,9	C16: 63,5; C17: 14,4
BSF 25	152,0	114,5	114,5	151,4	134,2	161,3	136,5	130,4	126,6	122,4	147,8	115,8	
BSF 26	151,9	115,2	114,6	151,8	135,4	163,5	134,5	124,2	128,1	132,0	127,7	128,2	C18: 135,5; C17: 130,1; C19: 128,9; C16: 126,9
BSF 27	151,9	114,6	114,9	151,8	135,1	163,3	130,2	127,8	128,3	147,0	128,3	127,8	C16: 34,7; C17: 32,7; C18: 21,7; C19: 13,6

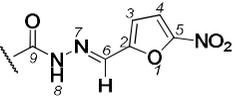
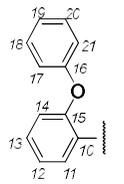
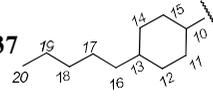
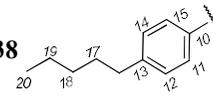
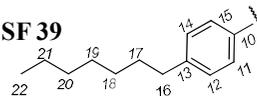
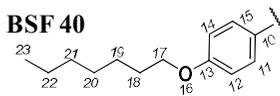
Deslocamentos químicos (δ) em ppm.

Tabela 9. Principais sinais de RMN ^{13}C (ppm) em DMSO – d_6 de derivados do 5-nitrofurano (cont.)

Compostos	C2	C3	C4	C5	C6	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16-C20
BSF 28	151,9	114,6	115,0	151,9	135,2	163,4	130,0	127,7	125,3	155,1	125,3	127,7	C16: 34,7; C17, 18, 19: 30,8
BSF 29	147,0	114,2	114,2	147,0	140,4	161,7	129,2	130,4	124,6	150,6	124,6	129,8	C17: 69,3; C18: 21,9; C19: 10,3
BSF 30	151,9	114,5	114,5	151,8	134,8	162,9	124,8	121,3	111,1	152,1	148,5	114,9	C16, 17: 55,7
BSF 31	152,0	114,5	115,6	151,5	135,7	162,4	136,2	128,6	125,8	147,0	125,8	128,5	-
BSF 32	152,0	114,5	115,6	151,5	136,2	162,0	133,7	131,9	129,9	128,7	132,0	124,2	C16: 125,7
BSF 33	152,4	114,3	114,8	152,3	133,4	163,3	118,3	129,7	110,9	151,7	110,7	129,6	C17: 42,0; C18: 30,6; C19: 19,7; C20: 13,7
BSF 34	151,9	114,2	114,8	151,8	134,6	162,8	124,5	129,8	114,6	161,8	114,6	129,8	C17: 67,5; C18: 30,6; C19: 18,6; C20: 13,6
BSF 35	151,9	115,2	114,6	151,8	135,5	170,5	131,5	129,0	128,2	143,2	128,2	129,0	C16: 138,9; C18 e C20: 128,5; C17 e C21: 126,9; C19: 126,7

Deslocamentos químicos (δ) em ppm.

Tabela 9. Principais sinais de RMN ¹³C (ppm) em DMSO – d₆ de derivados do 5-nitrofurano (cont.)

Compostos	C2	C3	C4	C5	C6	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16-C20
													
BSF 36 	151,9	115,3	114,5	151,6	132,3/ 130,0	169,5/ 162,4	119,0	126,7	122,9	135,3	117,5	153,9	C16: 156,4; C18, 20: 123,7; C19: 122,9; C17, C21: 118,6
BSF 37 	152,0	114,0	114,6	151,9	133,8/ 130,5	177,3/ 172,2	43,1/ 36,4	28,8	32,0	36,6	31,9	28,3	C16: 36,7; C18: 31,6; C17: 25,9; C19: 22,1, C20: 13,9
BSF 38 	151,9	114,6	115,0	151,9	135,1	163,3	130,2	128,4	127,8	147,0	127,8	128,4	C16:34,9; C17: 30,8; C18: 30,3; C19: 21,9; C20: 13,8
BSF 39 	151,9	114,6	115,0	151,8	135,2	163,3	130,2	128,3	127,9	147,0	127,8	128,3	C16: 35,0, C20: 31,2; C17: 30,6, C18: 28,5, C19: 28,4, C21: 22,0, C22: 13,8
BSF 40 	152,0	114,6	114,8	151,8	134,7	161,8	124,5	129,9	114,2	160,0	114,2	129,8	C17: 67,8, C21: 31,2, C18: 28,5, C20: 28,4, C19: 25,4, C22: 22,0, C23: 13,9
Nifuroxazida	152,0	114,6	114,6	151,7	134,4	161,1	123,1	129,9	115,1	163,1	115,1	129,9	-

Deslocamentos químicos (δ) em ppm.

No anexo 1 "Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos compostos ", encontram-se os espectros dos compostos. Os compostos derivados do 5-nitrofurano em análise de RMN apresentaram deslocamentos químicos (δ) correspondentes às estruturas químicas propostas. Evidencia-se a formação destes compostos pela presença dos sinais característicos de RMN ^1H em $\approx 12,20$ ppm - 1H, singlete, referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio imídico; em $\approx 8,40$ ppm - 1H, singlete, hidrogênio ligado ao carbono azometínico; $\approx 7,20$ e $7,70$ ppm - dupletos correspondentes aos hidrogênios do anel furânico apresentando cada um - 1H; duplete em $\approx 8,30$ - $7,00$ ppm correspondentes aos hidrogênios do grupo fenila, apresentando 4H, para os demais substituintes foram descritos individualmente na tabela. Na figura 22 encontram-se os espectros de RMN de ^1H dos compostos BSF-8 e BSF-12, evidenciando-se os hidrogênios H8 e H6 da porção *N*-acilidrazona, característicos da formação dos compostos de interesse e a peculiaridade da duplicidade dos deslocamentos químicos destes mesmos hidrogênios H8 e H6.

Os sinais característicos no RMN ^{13}C são: ≈ 132 - 114 ppm dos carbonos do anel aromático (fenila); ≈ 163 - 162 ppm carbono do grupo carbonílico de amida; ≈ 136 - 134 ppm carbono azometínico; ≈ 152 - 151 ppm carbono do anel furano ligado à porção azometínica da molécula. Os demais substituintes (alquila, cicloalquila e heterocíclicos) foram descritos individualmente na tabela. Na figura 23 encontram-se os espectros de RMN de ^{13}C , dos compostos BSF-8 e BSF-12, evidenciando-se os carbonos C9 e C6 da porção *N*-acilidrazona, característicos da formação dos compostos de interesse e a peculiaridade da duplicidade dos deslocamentos químicos para estes mesmos carbonos C9 e C6.

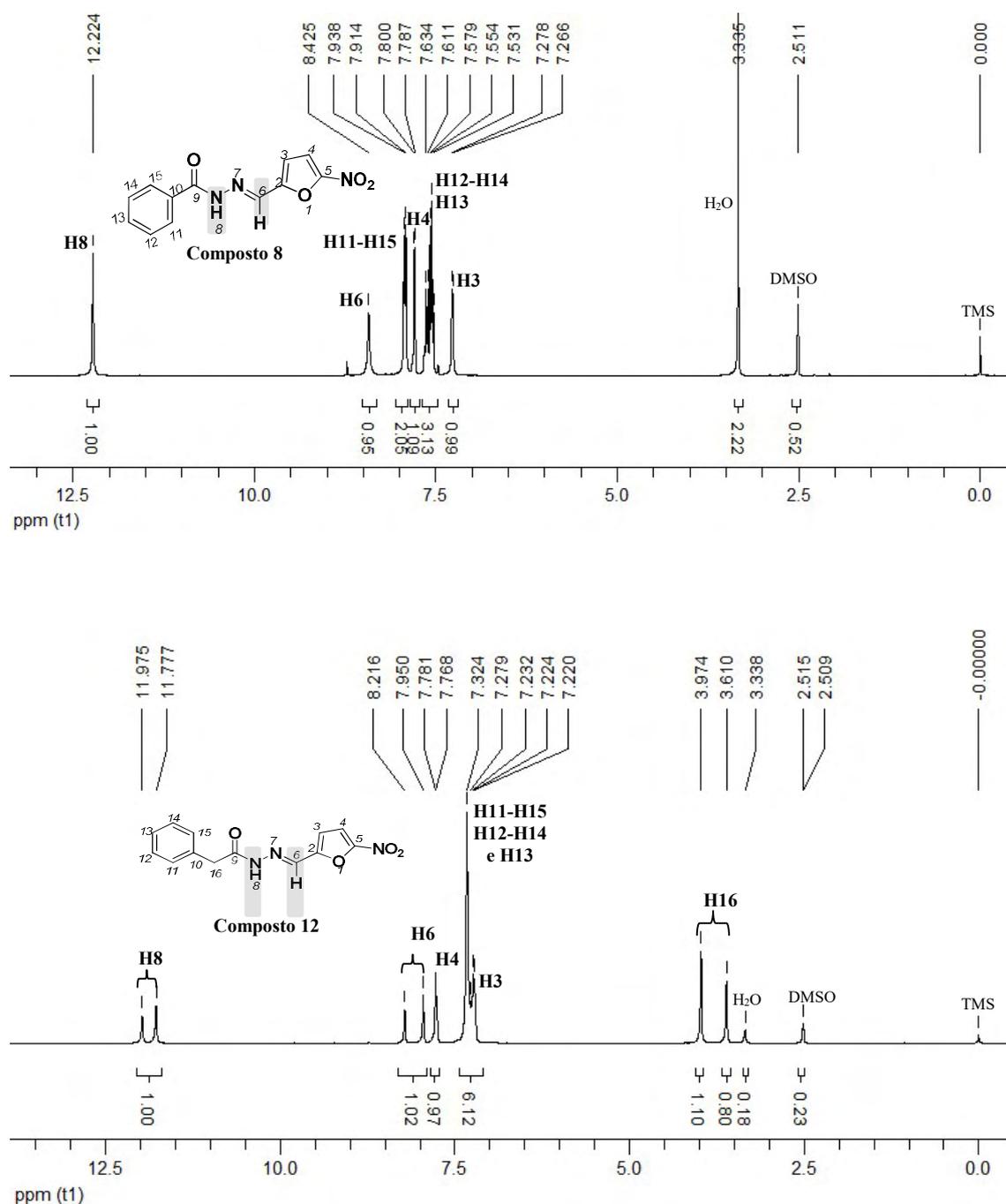


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H dos compostos BSF-8 e BSF12 (300 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / TMS). Principais deslocamentos químicos dos hidrogênios H6 e H8 que evidenciam a formação dos derivados do 5-nitrofurano, destacando os deslocamentos químicos duplicados para o composto 12.

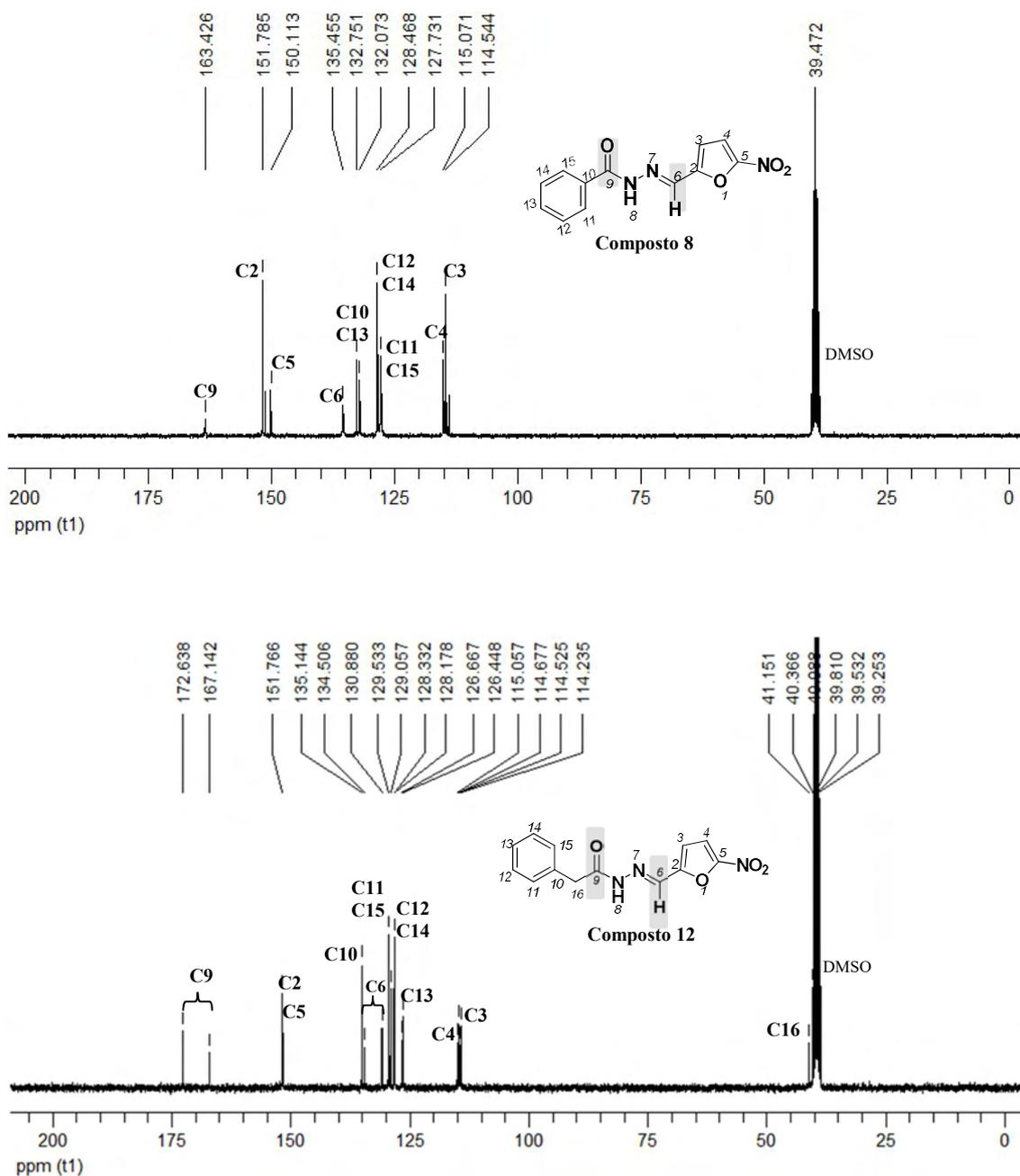


Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C dos compostos BSF-8 e BSF-12 (75 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / TMS). Principais deslocamentos químicos dos carbonos C6 e C9 que evidenciam a formação dos derivados do 5-nitrofurano, destacando os deslocamentos químicos duplicados para o composto 12.

No conjunto de compostos avaliados neste trabalho, observou-se que os compostos BSF1, BSF-2, BSF-3, BSF-4, BSF-6, BSF-10, BSF-12 (figuras 22 e 23), BSF-20 e BSF-37 apresentaram duplicidade de deslocamento químico no RMN de ^1H correspondentes às posições H6, H8 e H10, quando existente; e para RMN ^{13}C , duplicidade dos deslocamentos químico em C6, C9 e C10, quando existente.

Considerando as duplicações de deslocamentos químicos, em literatura é estabelecido que estruturas *N*-acilidrazonas podem existir como isômeros geométricos (*E/Z*) em relação à porção azometínica (HC=N) e como rotâmeros sobre a porção amídica (C=O-NH) (GU *et al.*, 2012, PALLA *et al.*, 1986, PALLA, PREDIERI, VIGNALI, 1982). Na figura 24 encontram-se as possíveis configurações geométricas para *N*-acilidrazona. Palla e colaboradores mostraram que *N*-acilidrazonas derivados de aldeídos aromáticos, neste caso o nitro-furaldeído, em solução encontram-se predominantemente ou completamente na configuração *E*, devido à rotação impedida na ligação imina, o que é observado na estrutura cristalográfica da nifuroxazida (PALLA *et al.*, 1986, PALLA, PREDIERI, VIGNALI, 1982).

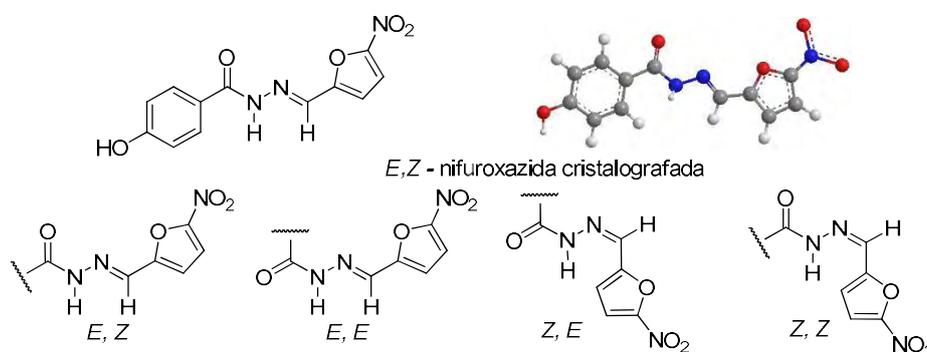


Figura 24. Possíveis isômeros geométricos de *N*-acilidrazonas e representação da estrutura cristalográfica da nifuroxazida.
Adaptado de GU *et al.*, 2012.

Com objetivo de explorar se os compostos que apresentaram duplicidade de deslocamentos químicos são isômeros geométricos ou se mantiveram a configuração *E*, *Z* da NF, o composto BSF-3 foi selecionado para realizar estudos de RMN bidimensionais de efeito nuclear NOESY, HSQC e HMBC.

O efeito nuclear *Overhauser* (*Nuclear Overhauser Effect*, NOE) consiste na interação de dipolos magnéticos de dois prótons à distância, um efeito diferente do efeito de acoplamento, que é mediado pela polarização das ligações da molécula (KAISER, 2000). No espectro de NOESY, observam-se as correlações entre os átomos de hidrogênio da molécula, similar ao espectro de correlação homonuclear de deslocamentos químicos (COSY - *homonuclear correlation spectroscopy*), e também as interações (NOE) entre átomos de hidrogênio com distância interatômica entre 2,5 e 5 Å (PAVIA, 2009, SILVERSTEIN, BASSLER, MORRIL, 2007). Observa-se que para o composto BSF-3

apresentou efeito *Overhauser* entre os H3, H6 e H4, assim como entre o H6 e H8 e entre o H8 e H10. Houve efeito *Overhauser* entre os hidrogênios da porção alifática da molécula, porém o que nos direciona para a análise das configurações *E/Z* foram os hidrogênios mencionados, os quais indicam a mesma configuração da NF (*E, Z*), como ilustrado na figura 25.

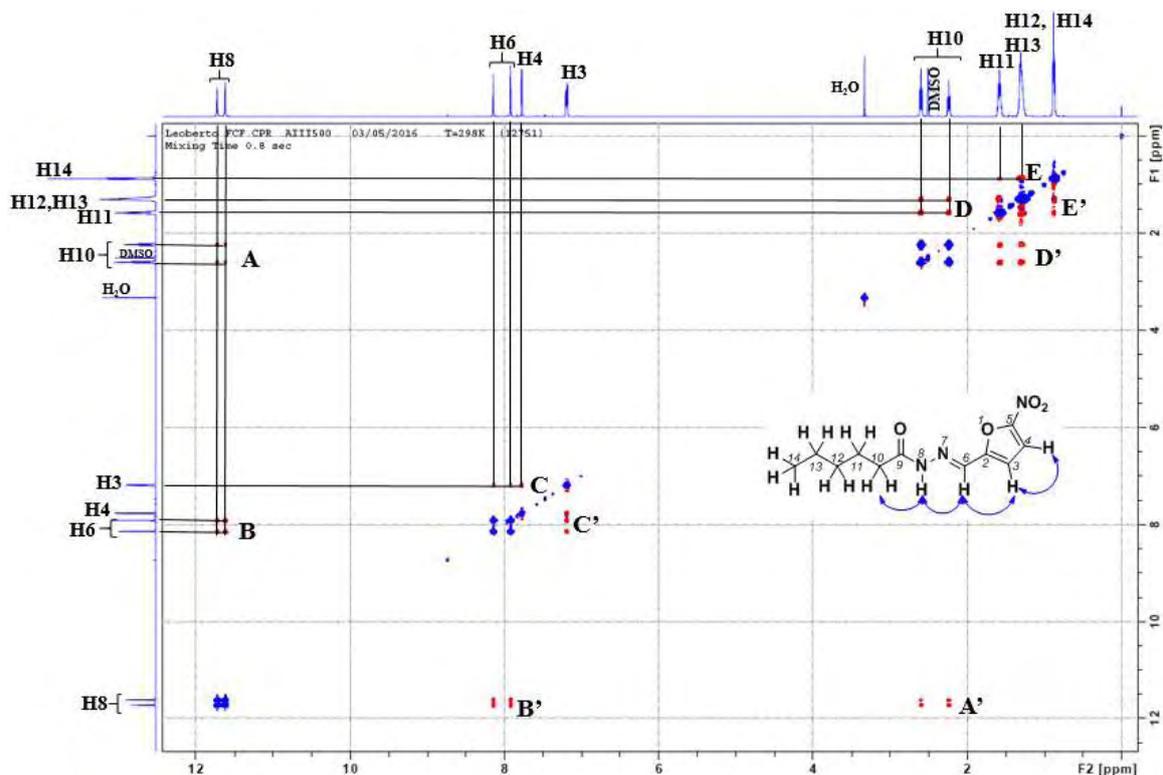


Figura 25. Espectro de efeito nuclear *Overhauser* (NOESY-2D) do composto BSF-3 (500 MHz / DMSO- d_6 / TMS). Linhas contínuas representam correlações dos deslocamentos químicos. Letras A – E representam as principais interações e A' – E' representam sua simetria.

No espectro de HSQC, observam-se os acoplamentos entre carbono e hidrogênio a uma ligação de distância (acoplamentos $^1J_{C-H}$). Este espectro foi realizado em 500 MHz, assim como o NOESY e HMBC, facilitando as atribuições no espectro de HMBC. Segue na figura 26 o espectro HSQC para o composto BSF-3. No espectro de HSQC observou-se mais claramente as correlações entre as ligações de C e H na estrutura do composto BSF-3.

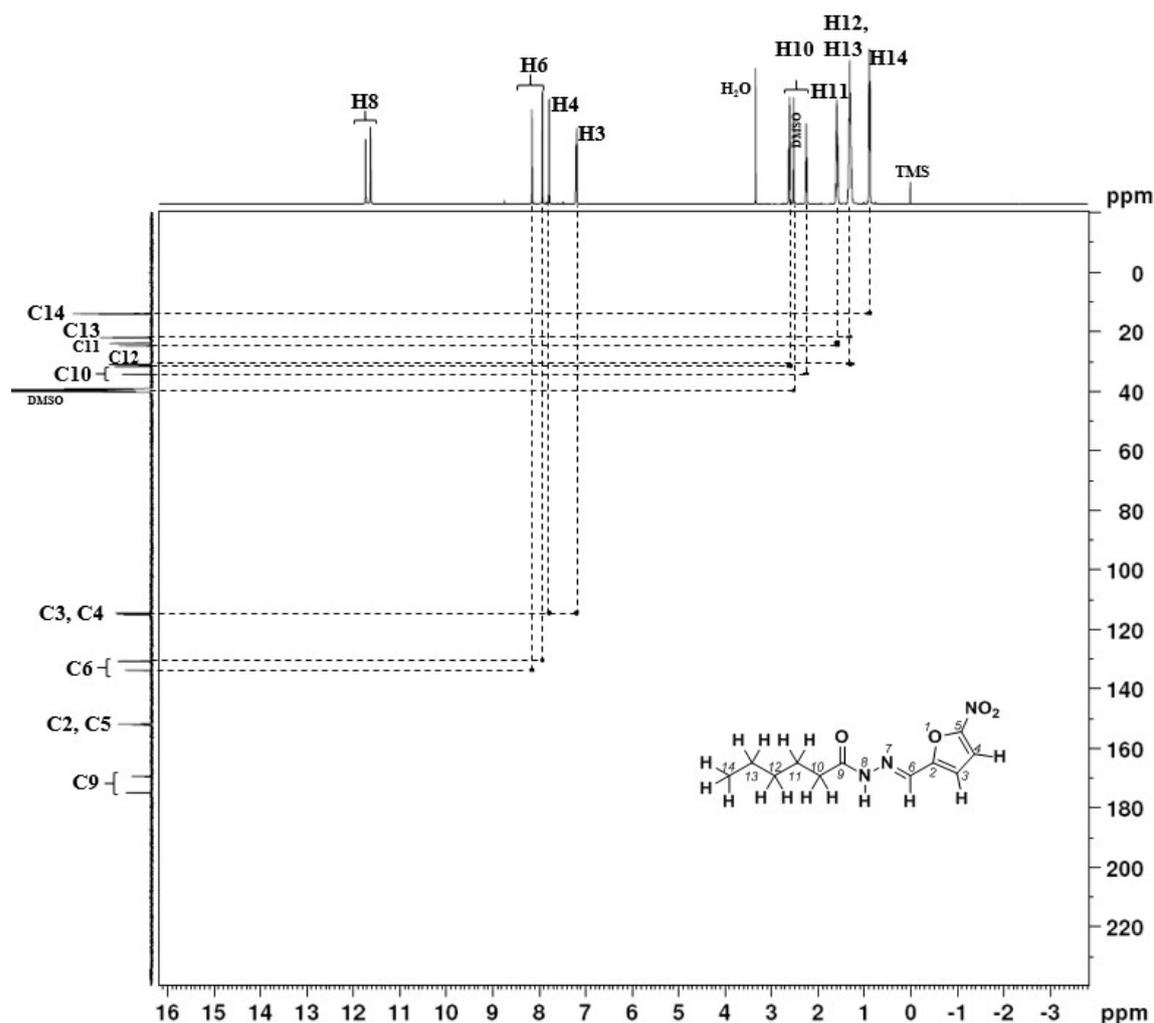


Figura 26. Espectro de correlação quântica única heteronuclear de deslocamentos químicos (HSQC) do composto BSF-3 (^1H 500 MHz / ^{13}C 125 MHz / DMSO- d_6 / TMS). Linhas pontilhadas representam correlações dos deslocamentos químicos.

O método de HMBC verifica os acoplamentos entre carbono e hidrogênio a duas e três ligações de distância, e em certas exceções, pode-se chegar a quatro ligações (acoplamentos $^2\text{J}_{\text{C-H}}$, $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ e $^4\text{J}_{\text{C-H}}$) (PAVIA, 2009, KAISER, 2000). Na porção comum da estrutura química dos análogos da NF, observa-se correlações ortogonais de $^2\text{J}_{\text{C-H}}$, $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ e $^4\text{J}_{\text{C-H}}$. As correlações ortogonais entre os H8 e H8', representadas com setas azuis na figura 27, com os C6, C6', C9, C9' e C10' demonstram a conectividade da molécula na porção *N*-acilhidrazona em acoplamentos $^2\text{J}_{\text{C-H}}$ e $^3\text{J}_{\text{C-H}}$. A correlação ortogonal entre H8' e C10' não se observa para o H8 e C10, sendo uma possibilidade a ocorrência de rotâmeros sobre a porção amídica (C=O-NH). Esse fenômeno não ocorre na porção azometínica (HC=N), passível de isomeria geométrica (GU *et al.*, 2012, PALLA *et al.*, 1986, PALLA, PREDIERI, VIGNALI, 1982).

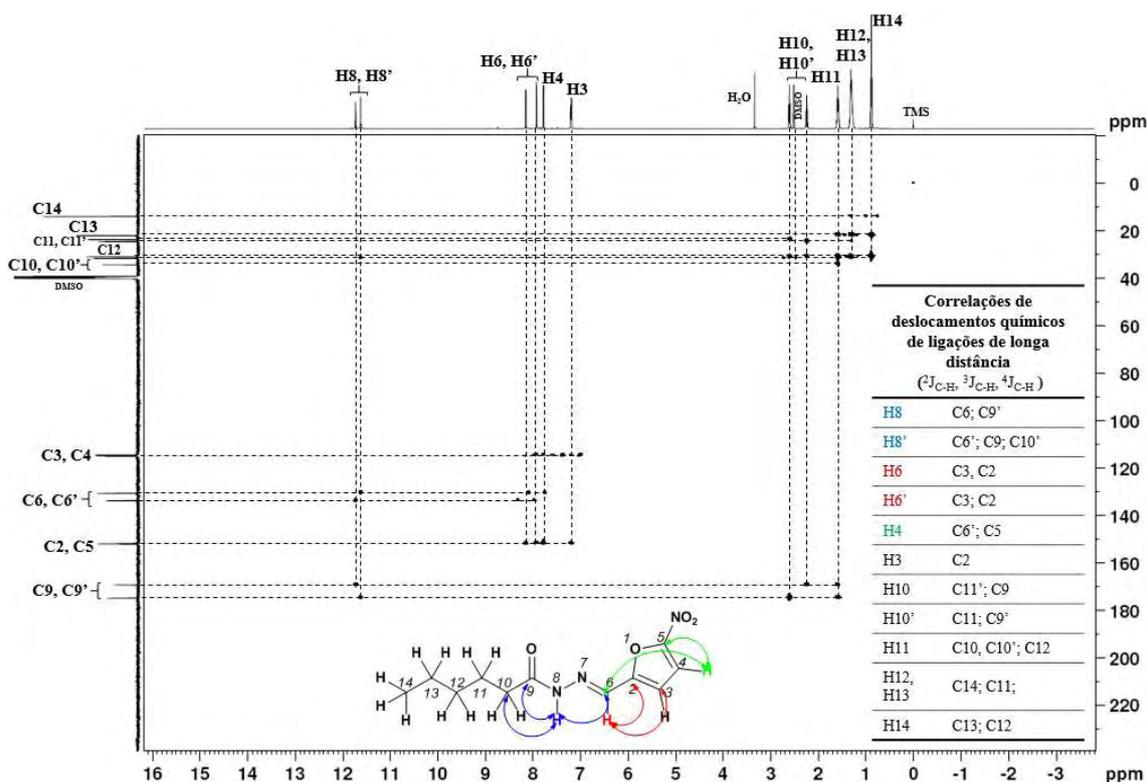


Figura 27. Espectro de correlação heteronuclear de deslocamentos químicos de múltiplas ligações (HMBC) do composto BSF-3 (^1H 500 MHz / ^{13}C 125 MHz / DMSO- d_6 / TMS). Linhas pontilhadas representam correlações dos deslocamentos químicos.

Considerando os RMN bidimensionais para o composto BSF-3, propõem-se que a duplicação dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C são atribuídas aos rotâmeros da porção amídica (C=O-NH) da molécula. Outro aspecto considerado nesta hipótese é que em compostos com a rotação da carbonila mais bloqueada, como no caso dos compostos com substituintes fenílicos, não é observada a duplicação dos deslocamentos químicos. No RMN de ^1H e ^{13}C do composto BSF-8 comparado com o composto BSF-12 (figuras 22 e 23 desta seção), verifica-se essa hipótese com a inclusão de um carbono espaçando o anel fenílico, o que favoreceu a rotação da carbonila, apresentando rotâmeros na porção amídica, evidenciado pela duplicação de sinais.

Os compostos BSF-1, BSF-2, BSF-3, BSF-4, BSF-6, BSF-7, BSF-10, BSF-12, BSF-20 e BSF-37 também apresentaram duplicidade de sinais e possuem em comum os grupos substituintes alifáticos, cicloalquil que proporcional maior liberdade conformacional. Como exemplo, nas figuras 28 e 29 os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto BSF-20 estão detalhados.

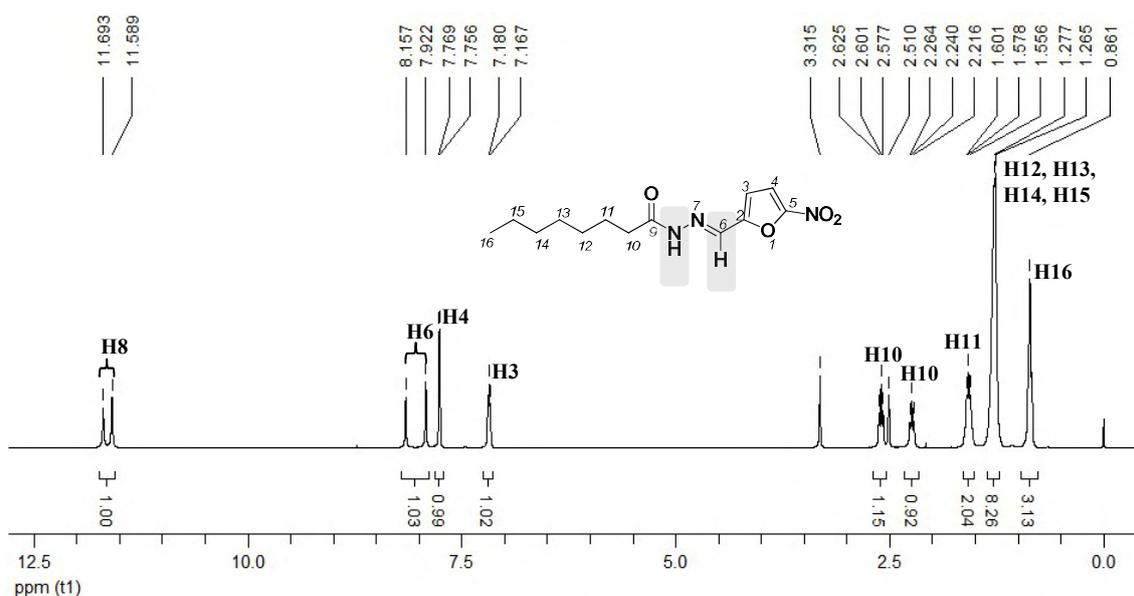


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H do composto BSF-20 (300 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / TMS). Indicação dos hidrogênios com deslocamentos químicos duplicados.

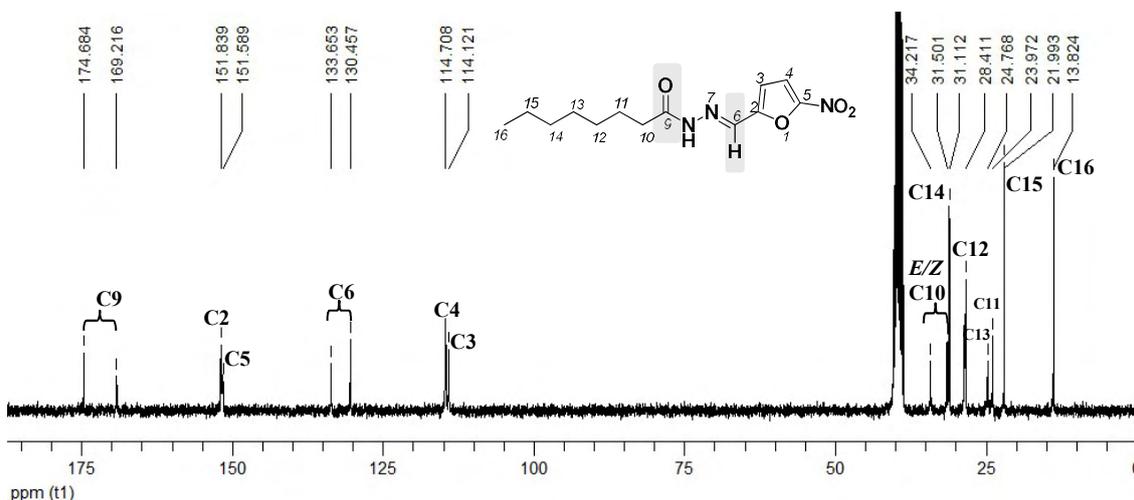


Figura 29. Espectro de RMN de ^{13}C do composto BSF-20 (75 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / TMS). Indicação dos carbonos com deslocamentos químicos duplicados.

Na identificação dos compostos BSF-6 e BSF-10 foram utilizados como recursos análises de RMN de ^1H e ^{13}C além de COSY e correlação heteronuclear de deslocamentos químicos (HETCOR - *heteronuclear correlation spectroscopy*).

As atribuições das posições dos hidrogênios nos compostos BSF-6 e BSF-10 foram auxiliadas pelo espectro de COSY-2D, o qual estabelece correlações entre os hidrogênios com acoplamentos geminais e vicinais, considerando o espectro de RMN ^1H em seus eixos horizontal e vertical. O espectro de HETCOR auxiliou na correlação dos hidrogênios e carbonos, principalmente com deslocamentos químicos não correlacionados nos espectros de uma dimensão (PAVIA, 2009).

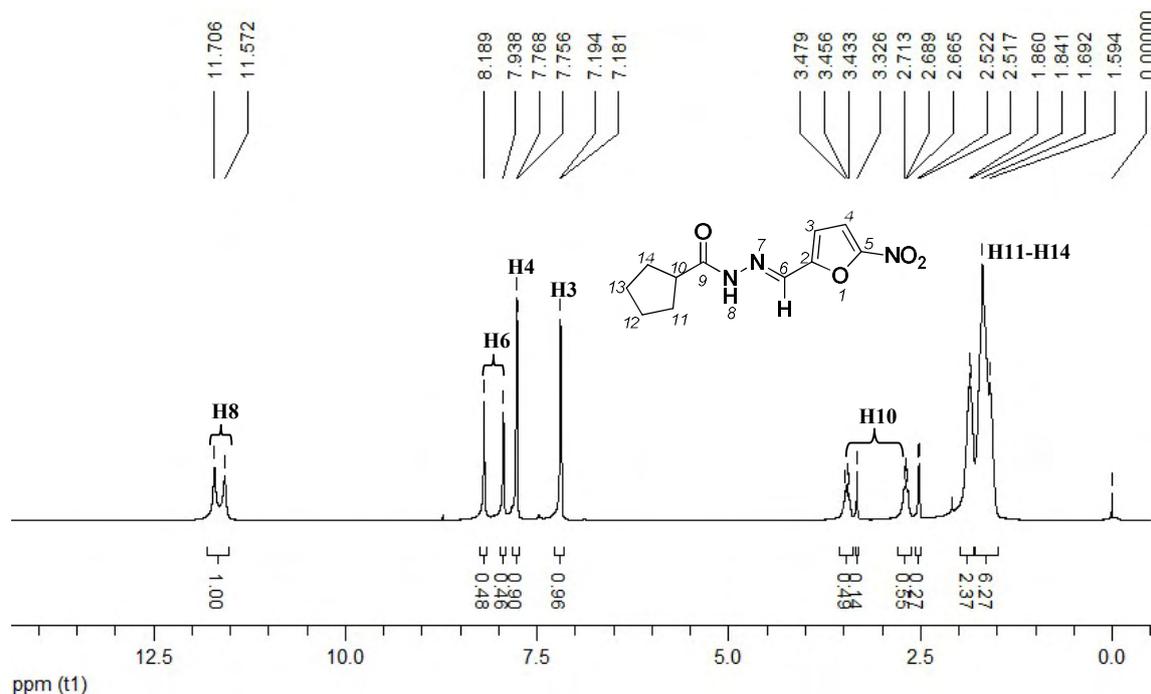


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H do composto BSF-6 (300 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / TMS). Indicação dos hidrogênios com deslocamentos químicos duplicados.

No espectro de RMN ^1H do composto BSF-6, figura 30, verifica-se que os hidrogênios do grupo ciclopentila totalizam 8 hidrogênios, porém sem separação que possibilita a distinção de suas posições. Observa-se também a duplicidade dos deslocamentos químicos dos hidrogênios H6, H8 e H10. Complementando a análise de atribuição de hidrogênios o COSY-2D foi realizado, figura 31, onde também se observou as interações do H10 duplicado com os demais hidrogênios do grupo ciclopentila (H11 ao H14).

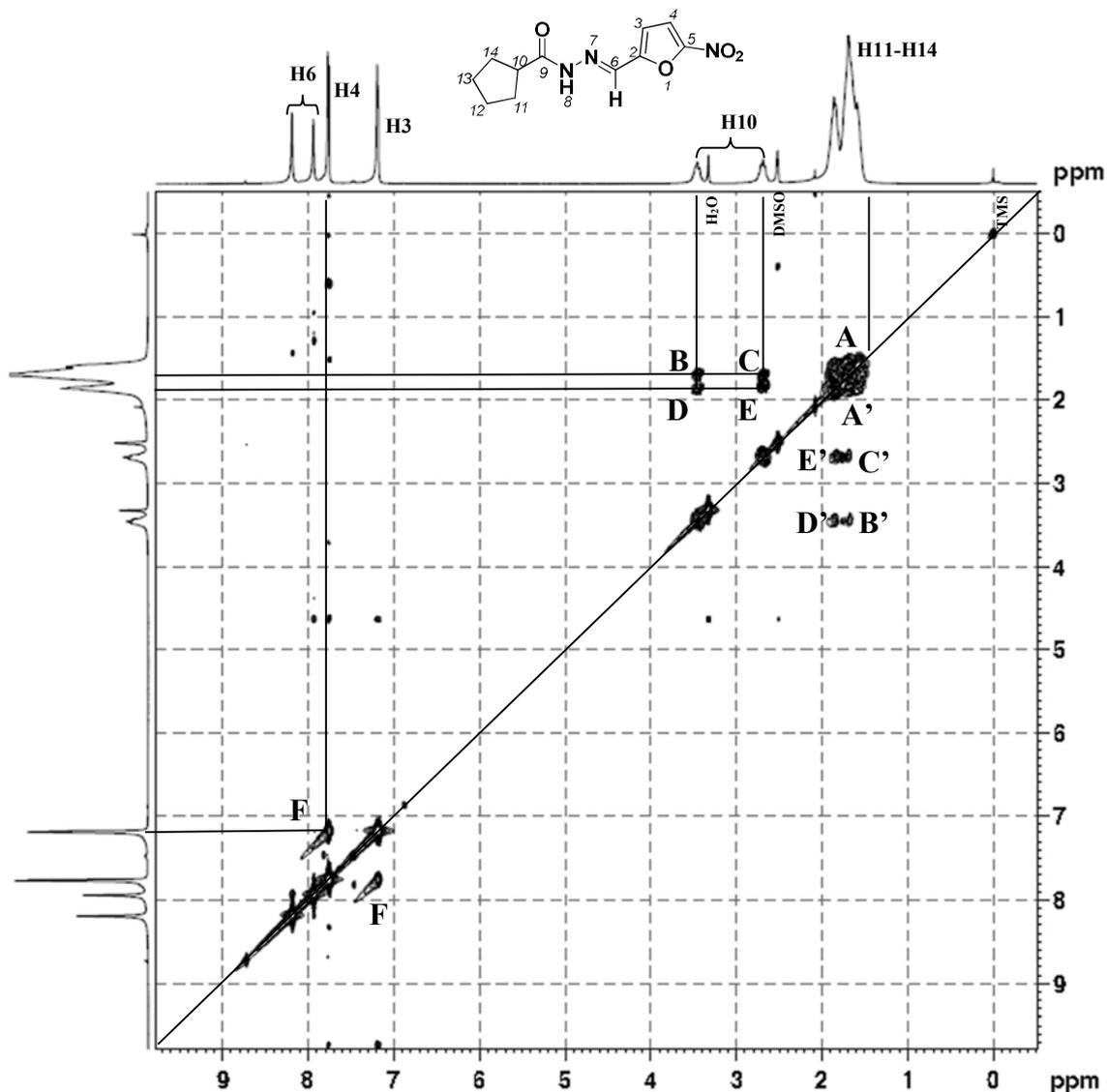


Figura 31. Espectro de correlação homonuclear de deslocamentos químicos (COSY-2D) do composto BSF-6 (300 MHz / DMSO- d_6 / TMS / 2 h de aquisição). Linhas contínuas representam correlações dos deslocamentos químicos. Letras A – F representam as principais interações e A' – F' representam sua simetria.

Quanto as atribuições dos carbonos na estrutura do composto BSF-6, foram utilizados o RMN ^{13}C (figura 32) e o HETCOR ($^1\text{H} / ^{13}\text{C}$) (figura 33) para auxiliar na confirmação final da estrutura e atribuição dos deslocamentos químicos, além de permitir visualizar o carbono C10 correspondentes ao H10 duplicado.

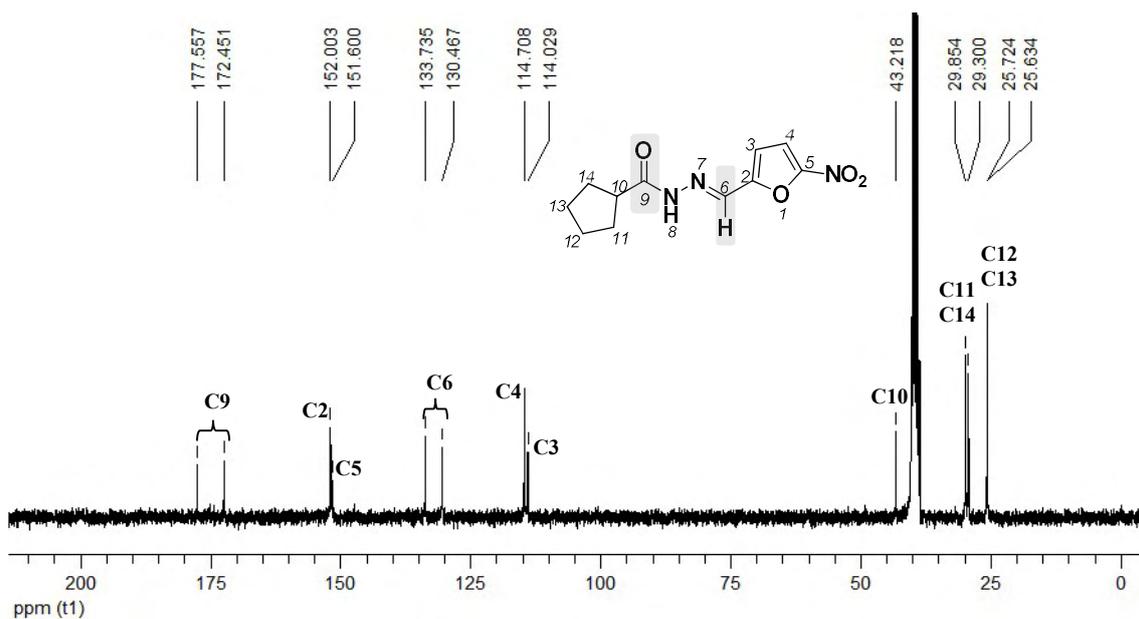


Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C do composto BSF-6 (75 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / TMS). Indicação dos carbonos com deslocamentos químicos duplicados.

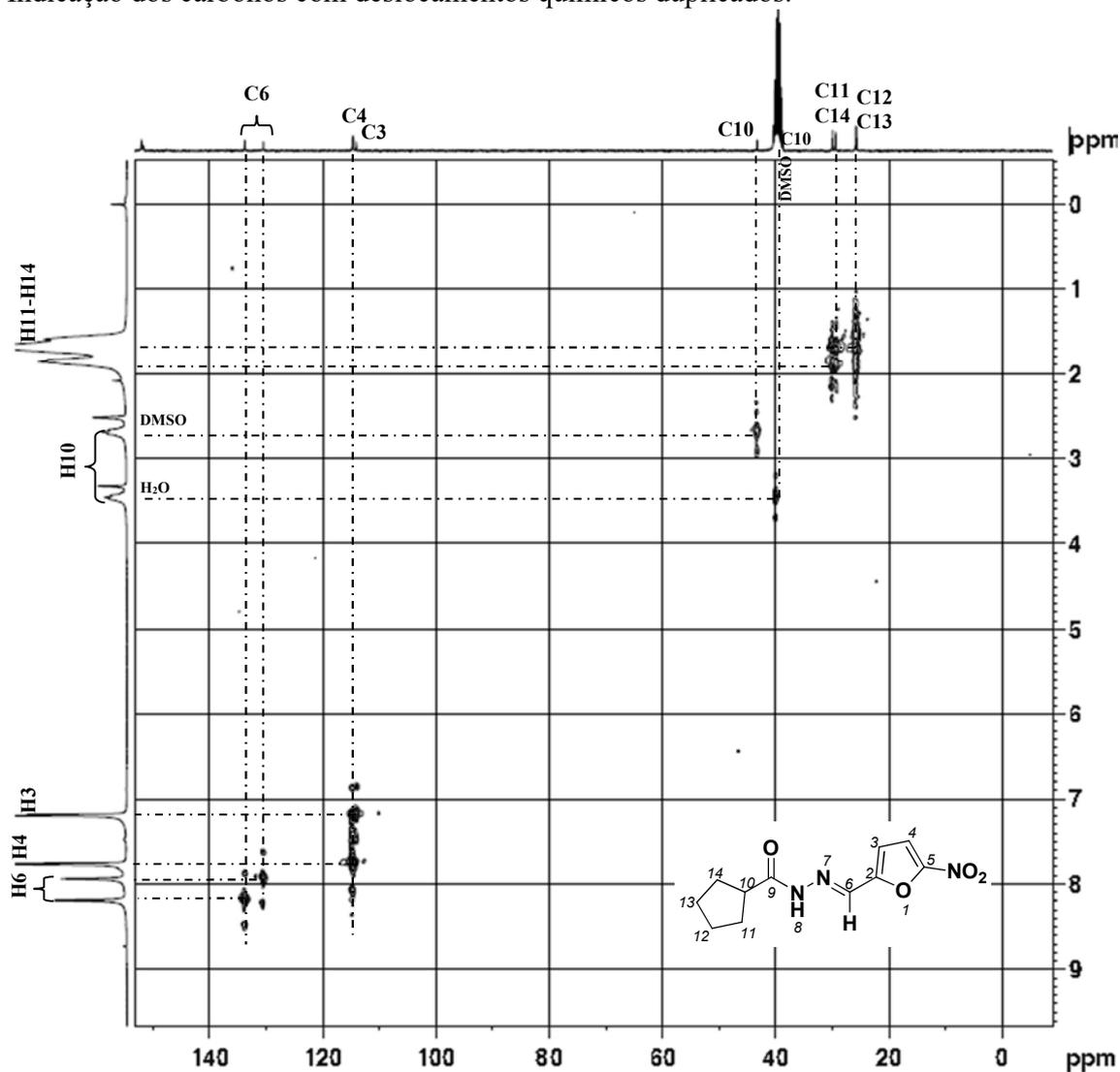


Figura 33. Espectro de correlação heteronuclear de deslocamentos químicos (HETCOR- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do composto BSF-6 (300 MHz / 75 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / TMS / 7 h de aquisição). Linhas pontilhadas representam interações dos deslocamentos químicos.

Para as atribuições dos hidrogênios do composto BSF-10 foi considerado que os hidrogênios equatoriais estariam desblindados, devido efeito anisotrópico do grupo cicloexila com a proximidade da carbonila (figuras 34 e 35). Os hidrogênios axiais estariam mais bloqueados, correlacionados com interações geminais observadas no COSY-2D (linha A, figura 24). O hidrogênio 10 deste composto assumiria duas posições, sendo que foi possível distinguir no RMN ^1H , figura 34, a posição axial devido tripleto de $\delta = 2,24$ ppm e $J=11,1$ Hz, o qual corresponde com a constante de acoplamento entre 10 e 14 Hz de ângulo $\alpha = 180^\circ$, encontrada em literatura como característica de acoplamento vicinal dos hidrogênios axiais H10 ax. e H15 ax. do grupo cicloexila (PAVIA, 2009).

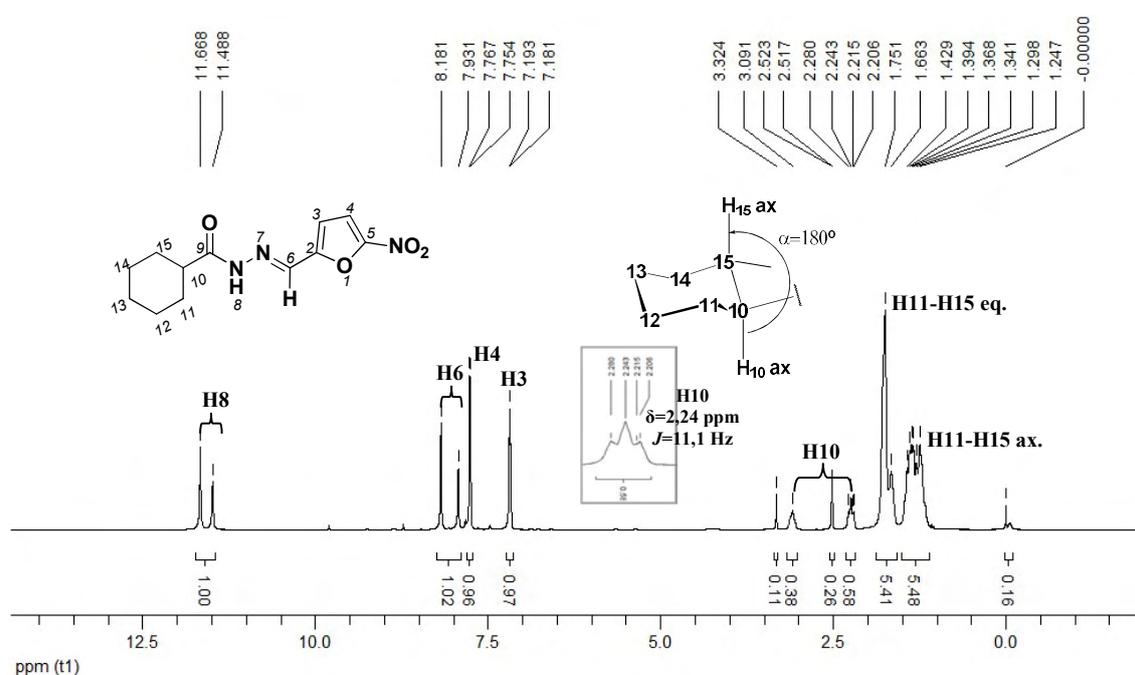


Figura 34. Espectro de RMN de ^1H do composto BSF-10 (300 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / TMS). Ilustração do cicloexil indicando a posição axial do H10 com constante de acoplamento (J) de 11,1 Hz.

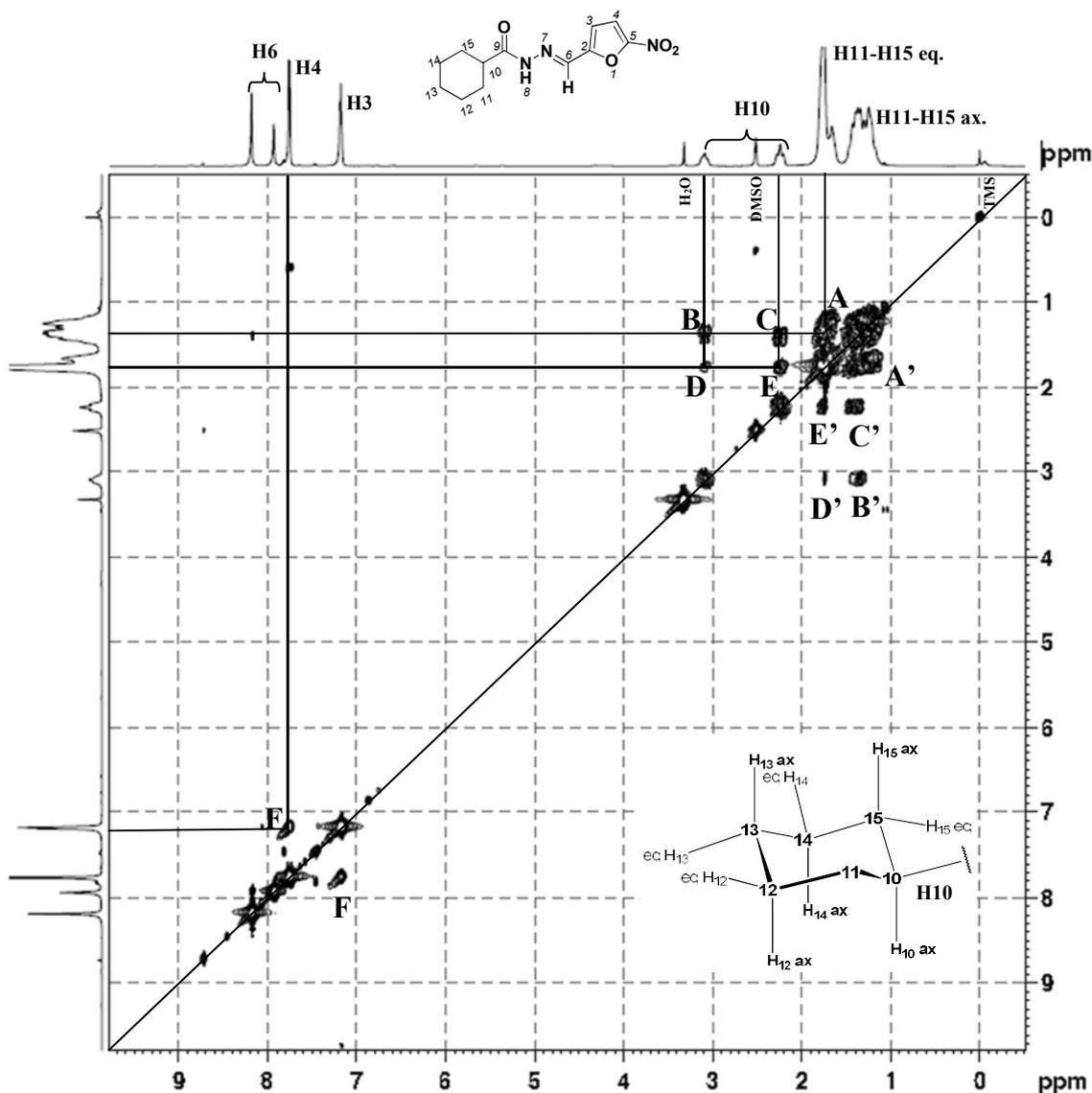


Figura 35. Espectro de correlação homonuclear de deslocamentos químicos (COSY-2D) do composto BSF-10 (300 MHz / DMSO- d_6 / TMS / 2 h de aquisição). Linhas contínuas representam correlações dos deslocamentos químicos. Letras A – F representam as principais interações e A' – F' representam simetria das correlações.

Quanto as atribuições dos carbonos na estrutura do composto BSF-10, foram utilizados o RMN ^{13}C (figura 36) e o HETCOR ($^1\text{H} / ^{13}\text{C}$) (figura 37) para auxiliar na confirmação final da estrutura e visualizar a duplicação do sinal do carbono C10.

Quanto aos fármacos utilizados como referência no ensaio de determinação de atividade anti-*T. cruzi* ressalta-se que o benznidazol (BZ) encontrava-se disponível no LPDF - FBT/FCF - USP e o nifurtimox (NFX) foi gentilmente disponibilizado pela Professora Bianca Zingales, responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular de Tripanosomatídeos - IQ/USP. Para a identificação destes fármacos foi determinada a faixa de fusão, sendo que para o BZD obteve-se a faixa de fusão de 188-189 °C e a

encontrada em literatura foi de 188-190 °C (MERCK, 1996). Para o NFX foi de 180-181 °C, sendo a encontrada em literatura de 180-182 °C (MERCK, 1996). Os fármacos apresentaram faixas de fusão compatíveis com os da literatura e com estreito intervalo, indicando grau pureza satisfatório. Foram realizadas também análises de RMN ^1H e RMN ^{13}C , apresentando correspondência dos sinais com a estrutura química destes fármacos. Os espectros obtidos estão apresentados no anexo 3 "Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos fármacos benzimidazol e nifurtimox".

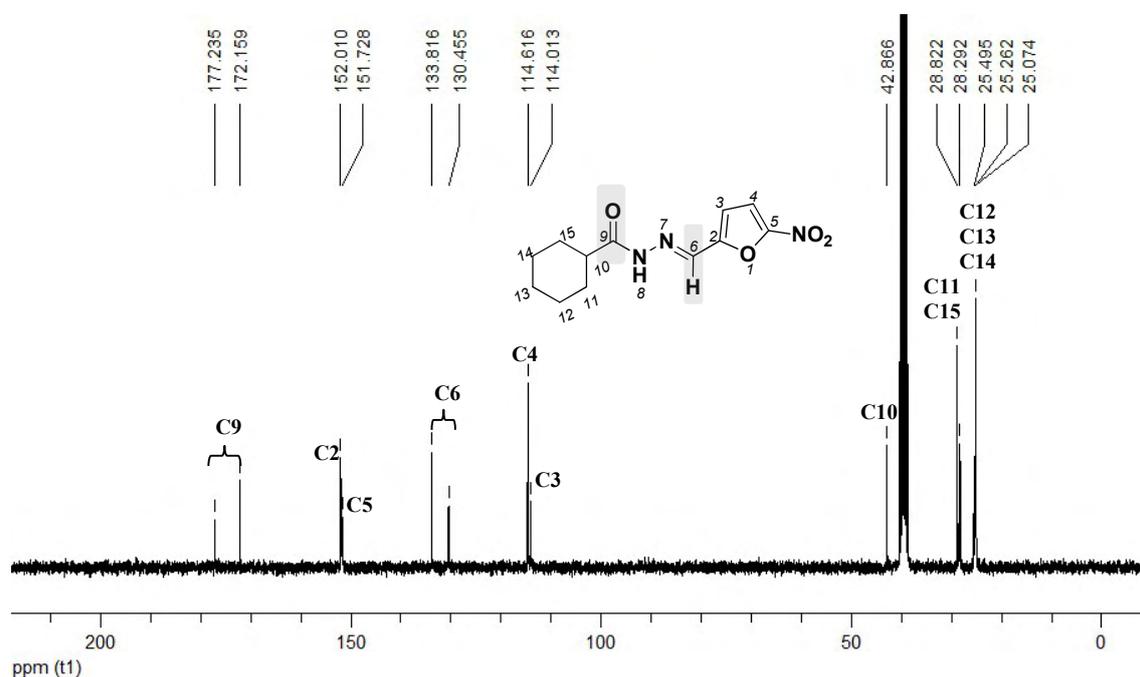


Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C do composto BSF-10 (75 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / TMS). Indicação dos carbonos com deslocamentos químicos duplicados.

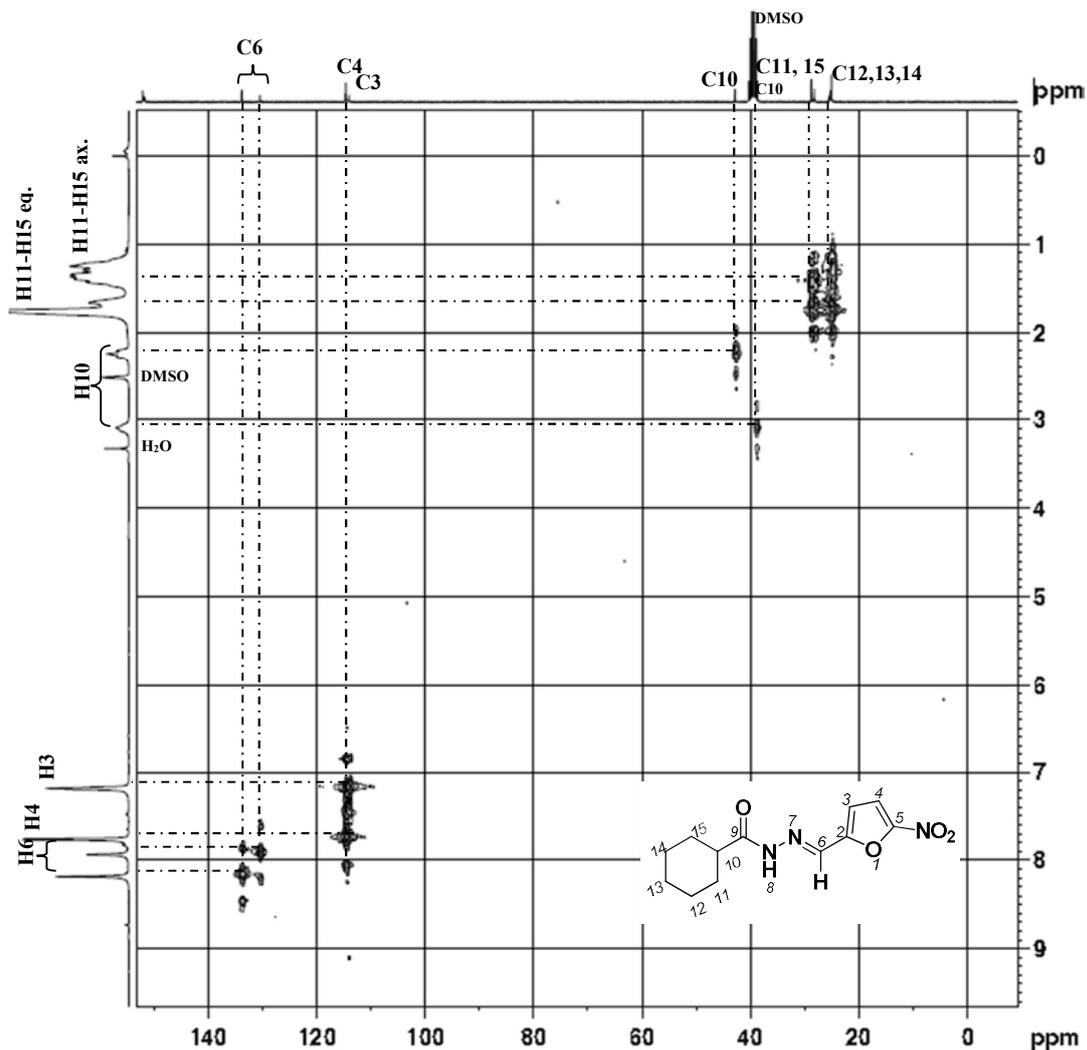


Figura 37. Espectro de correlação heteronuclear de deslocamentos químicos (HETCOR- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do composto BSF-10 (300 MHz / 75 MHz / DMSO- d_6 / TMS / 7h de aquisição). Linhas pontilhadas representam interações dos deslocamentos químicos.

6.3 Determinação da atividade anti-*T. cruzi* frente a forma epimastigota

A determinação da atividade biológica neste trabalho frente a forma epimastigota do *T. cruzi* foi realizada a fim de fornecer dados para os estudos de relações estrutura-atividade neste tipo morfológico em razão de tratar-se de triagem preliminar de compostos. A forma epimastigota é considerada como forma não infectante do parasito encontrada, predominantemente, no intestino do vetor triatomíneo (barbeiro). Porém, foi identificado e reportado em literatura a presença de epimastigotas em pequenas quantidades, menos que 1 %, em células de mamíferos (TYLER, ENGMAN, 2001, ALMEIDA-DE-FARIA *et al.*, 1999, FAUCHER, BALTZ, PETRY, 1995).

A atividade anti-*T. cruzi* frente à forma epimastigota do parasito foi avaliada frente a quatro cepas de DTUs distintas, caracterizadas por terem alta prevalência em humanas. Foram avaliados clones provenientes das cepas Bug 2149 c110 (*TcV*) e Silvio X10 c11 (*TcI*), os quais foram identificados, isolados e disponibilizados pela Professora Bianca Zingales do Laboratório de Biologia Molecular de Tripanosomatídeos, Departamento de Bioquímica/IQ/USP para realização dos ensaios com os compostos planejados (ARAÚJO, 2011), além da cepa Colombiana (*TcI*), disponibilizada pelo mesmo grupo. A cepa Y (*TcII*), isolada pela primeira vez por Silva e Nussenszweig em 1953, foi disponibilizada pela Professora Maria Júlia Manso Alves do Laboratório de Bioquímica Parasitária, Departamento de Bioquímica/IQ/USP. Em trabalho de Filardi e Brener (1987) a cepa Silvio X10 foi classificada como suscetível após ensaios em camundongos monitorando-se a porcentagem de cura após 20 dias de tratamento com BZD e NFX de maneira alternada. Porém esta cepa não era caracterizada como clone, diferente do clone da cepa Silvio X10 (c11), a qual foi considerada resistente (BZD: $IC_{50} = 26,1 \pm 2,5 \mu M$) por Araújo (2011) em trabalho anterior desenvolvido no grupo de pesquisa de Zingales e colaboradores (ARAÚJO, 2011). A cepa Colombiana é classificada como resistente ao BZD (ARAÚJO, 2011, FILARDI, BRENER, 1987). No presente trabalho foi utilizado o mesmo clone Silvio X10 c11 e Colombiana e obteve-se valor correspondente ao demonstrado na literatura (BZD – Silvio X10 c11: $IC_{50} = 29,16 \pm 2,90 \mu M$; BZD – Colombiana: $IC_{50} = 58,6 \pm 5,7 \mu M$), considerando-se assim cepas resistente ao BZD.

O protocolo utilizado para estes ensaios foi baseado em Ishii e colaboradores (2011), Jorge (2011), modificado e adaptado a partir de Cerecetto e colaboradores, 1998. Inicialmente foram realizadas curvas de calibração para cada cepa analisada (Silvio X10 c11, Y e Bug 2149 c110), sendo construídas com a quantidade de parasitos em relação à absorbância no λ de 562 nm. Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 38 e tabela 10, referentes aos dados para cepa Silvio X10 c11, figura 39 e tabela 11 para a cepa Y, figura 40 e tabela 12 para a cepa Bug 2129 c110 e figura 41 e tabela 13 para a cepa Colombiana.

Tabela 10. Dados de absorbância ($\lambda = 562$ nm) e número de parasitos da cepa Silvio X10 cl1 de *T. cruzi*

Silvio X10 cl1		
nº de parasitos (*10 ⁶ /mL)	Absorbância ($\lambda = 562$ nm) (média \pm dp)	
0,0	0,000	$\pm 0,001$
6,9	0,031	$\pm 0,001$
7,8	0,044	$\pm 0,002$
10,3	0,056	$\pm 0,004$
13,8	0,077	$\pm 0,003$
17,5	0,091	$\pm 0,012$
24,0	0,116	$\pm 0,013$
29,8	0,145	$\pm 0,009$
33,8	0,175	$\pm 0,018$
38,3	0,191	$\pm 0,016$
48,0	0,261	$\pm 0,019$

Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata.

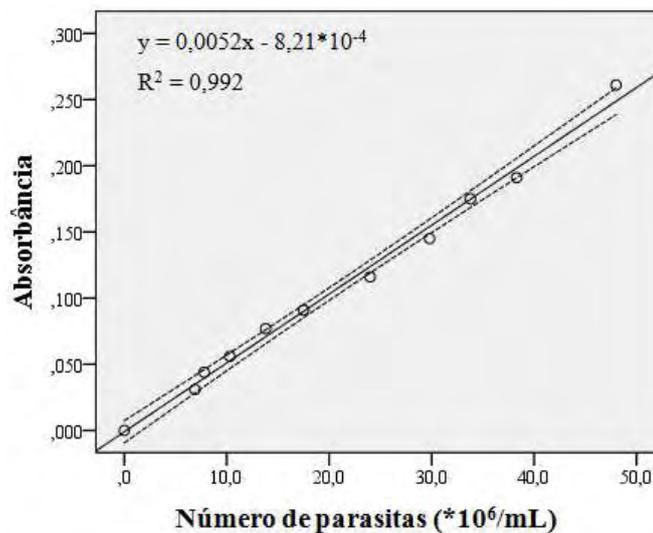


Figura 38. Curva de calibração para cepa Silvio X10 cl1 de *T. cruzi*. Regressão linear da absorbância ($\lambda = 562$ nm) e número de parasitos (linha contínua). Intervalo de confiança da média de 95 % (linhas pontilhadas). Teste ANOVA: $F = 1266,2$; $P < 0,001$.

Tabela 11. Dados de absorbância ($\lambda = 562$ nm) e número de parasitos da cepa Y de *T. cruzi*

Y		
nº de parasitos (*10 ⁶ /mL)	Absorbância ($\lambda = 562$ nm) (média \pm dp)	
0,0	0,007	$\pm 0,001$
10	0,020	$\pm 0,001$
20	0,044	$\pm 0,002$
28	0,047	$\pm 0,003$
38	0,076	$\pm 0,002$
46	0,087	$\pm 0,008$
54	0,111	$\pm 0,010$
72	0,144	$\pm 0,009$
78	0,152	$\pm 0,011$
86	0,183	$\pm 0,012$
116	0,250	$\pm 0,015$

Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata.

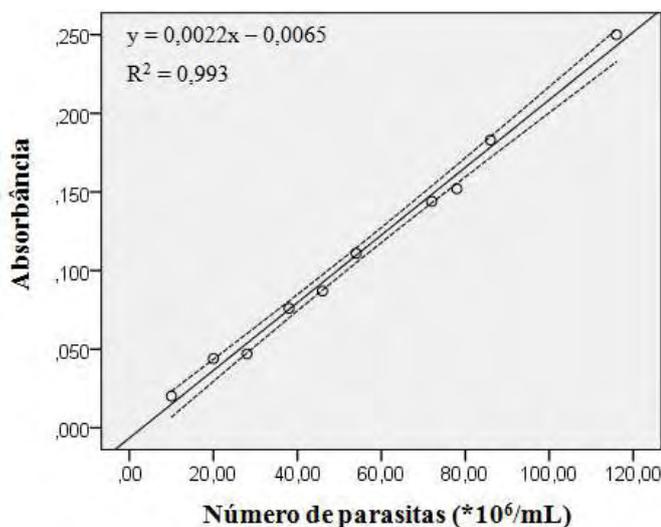


Figura 39. Curva de calibração para cepa Y de *T. cruzi*. Regressão linear da absorbância ($\lambda = 562$ nm) e número de parasitos (linha contínua). Intervalo de confiança da média de 95 % (linhas pontilhadas). Teste ANOVA: $F = 1578,9$; $P < 0,001$.

Tabela 12. Dados de absorbância ($\lambda = 562$ nm) e número de parasitos da cepa Bug 2149 cl10 de *T. cruzi*

Bug 2149 cl10	
nº de parasitos (*10 ⁶ /mL)	Absorbância ($\lambda = 562$ nm) (média \pm dp)
0,00	0,000 \pm 0,001
3,90	0,016 \pm 0,007
4,60	0,019 \pm 0,005
8,75	0,025 \pm 0,010
10,00	0,029 \pm 0,002
13,38	0,049 \pm 0,012
17,00	0,058 \pm 0,016
19,50	0,062 \pm 0,005
24,00	0,083 \pm 0,018
30,25	0,108 \pm 0,012
37,00	0,115 \pm 0,019
40,50	0,127 \pm 0,021
44,25	0,140 \pm 0,026

Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata.

Tabela 13. Dados de absorbância ($\lambda = 562$ nm) e número de parasitos da cepa Colombiana de *T. cruzi*

Colombiana	
nº de parasitos (*10 ⁶ /mL)	Absorbância ($\lambda = 562$ nm) (média \pm dp)
0,0	0,000 \pm 0,000
5,0	0,022 \pm 0,002
5,5	0,014 \pm 0,003
6,0	0,027 \pm 0,004
10,0	0,034 \pm 0,005
13,0	0,035 \pm 0,009
17,5	0,042 \pm 0,010
20,5	0,058 \pm 0,006
28,5	0,071 \pm 0,009
31,5	0,094 \pm 0,002
52,0	0,156 \pm 0,002
76,0	0,213 \pm 0,002

Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata.

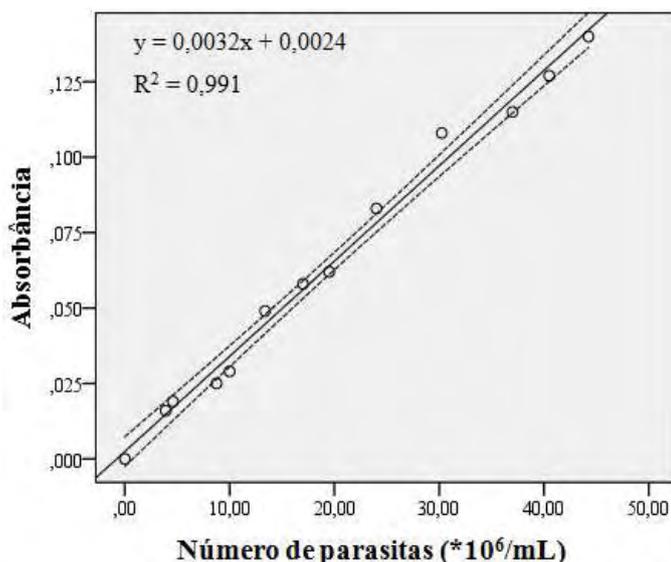


Figura 40. Curva de calibração para cepa Bug 2149 cl10 de *T. cruzi*. Regressão linear da absorbância ($\lambda = 562$ nm) e número de parasitos (linha contínua). Intervalo de confiança da média de 95 % (linhas pontilhadas). Teste ANOVA: $F = 1153,6$; $P < 0,001$.

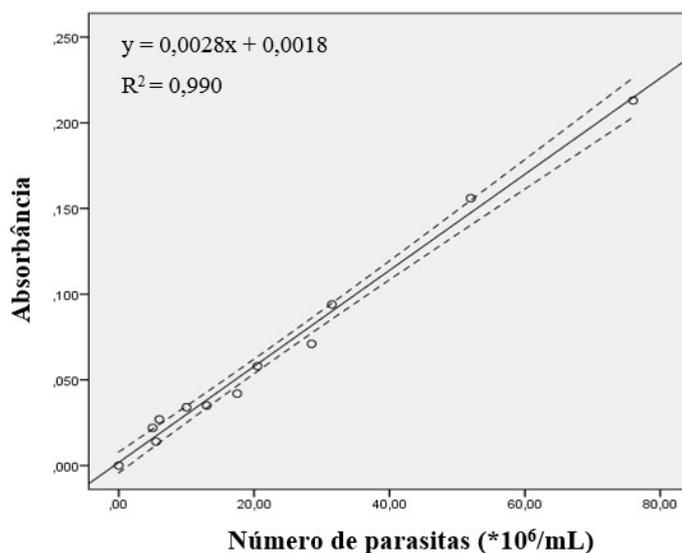


Figura 41. Curva de calibração para cepa Colombiana de *T. cruzi*. Regressão linear da absorbância ($\lambda = 562$ nm) e número de parasitos (linha contínua). Intervalo de confiança da média de 95 % (linhas pontilhadas). Teste ANOVA: $F = 1016,1$; $P < 0,001$.

As curvas de calibração obtidas indicaram ajuste à regressão linear com alto valor do coeficiente de determinação (r^2 acima de 0,99) e o teste ANOVA indicou que os

modelos de regressão são apropriados para predições, uma vez que o valor de F é excedente e a inclinação da reta é diferente de 0 ($P < 0,001$). As regressões foram utilizadas durante os ensaios para avaliação do número de parasitos correspondentes a absorbância obtida, tanto no preparo do inóculo para realização do ensaio, quanto na leitura final em microplacas após tratamento com os compostos e fármacos.

Esta metodologia para quantificação de parasitos em suspensões por espectroscopia UV/VIS para posterior determinação da porcentagem de inibição de crescimento (%IC) e do IC_{50} é bastante empregada em estudos relacionados ao *T. cruzi*, indicando reprodutibilidade dos ensaios (JORGE, 2011, ISHII *et al.*, 2011, GERPE *et al.*, 2010, CERECETTO *et al.*, 1998).

Em todos os ensaios foram realizados o controle do solvente DMSO nas concentrações de 1,0 % e 0,5 %, sendo que a máxima concentração utilizada para a solubilização dos compostos e fármacos não ultrapassou 1,0 % de DMSO. Na tabela 14 se encontram as absorbâncias nas concentrações de 1 % e 0,5 % de DMSO realizadas como controle de solvente e o controle positivo (controle de crescimento parasitário) para as cepas Bug 2149 Cl10 e Silvio X10 cl1. Verificou-se que não houve diferenças significantes ($P < 0,05$) nas três condições, duas variações de DMSO e controle positivo, indicando que até 1 % de DMSO não interfere no crescimento parasitário.

Tabela 14. Avaliação da variação de absorbância em três condições: controle de solvente (1 % e 0,5 % de DMSO) e controle positivo para as cepas Silvio X10 cl1, Y, Bug 2149 cl10 e Colombiana

Cepas	Absorbâncias nas condições de cultivo parasitário			P
	$(\lambda = 562\text{nm})$ (média \pm dp)			
	CP	CS (1 %)	CS (0,5 %)	
Silvio X10 cl1	0,500 \pm 0,009	0,508 \pm 0,008	0,501 \pm 0,009	0,368
Y	0,445 \pm 0,008	0,432 \pm 0,009	0,443 \pm 0,007	0,367
Bug 2149 cl10	0,458 \pm 0,004	0,453 \pm 0,014	0,452 \pm 0,018	0,369
Colombiana	0,429 \pm 0,006	0,425 \pm 0,004	0,426 \pm 0,008	0,366

Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) das réplicas e de pelo menos dois ensaios independentes. Teste estatístico de Kruskal-Wallis. Intervalo de confiança de 95 %. CP: Controle positivo; CS - 1 %: Controle do DMSO a 1 %; CS - 0,5 %: Controle do DMSO a 0,5 %.

Em todas as microplacas foram realizados os controles dos fármacos de referência na concentração de 20 μM para o BZD e 10 μM para o NFX, sendo as porcentagens de inibição de crescimento parasitário nestas concentrações comparadas às curvas obtidas

para cálculo do IC₅₀ de cada fármaco. Em todos os ensaios realizados não houve discrepância da inibição de crescimento para os dois fármacos de referência.

Os valores de IC₅₀ foram obtidos utilizando-se modelo não-linear, dose-resposta, sigmoidal realizados no programa OriginPro 8.0. Para a construção das curvas de obtenção dos IC₅₀ dos compostos e fármacos foram utilizadas até 10 concentrações diferentes, variando entre 300 e 0,8 μM . As porcentagens de IC apresentadas nas tabelas se referem aos dados calculados após as leituras de absorbância realizadas no ensaio biológico e obtidos empregando-se a equação 1 apresentada no item “5.3.4 Tratamento dos dados obtidos para determinação da atividade anti-*T. cruzi*”. Os ensaios foram realizados em triplicata com pelo menos uma repetição independente e assim calcularam-se os respectivos desvios-padrões para cada concentração. Para determinação do IC₅₀ do fármaco BZD o modelo matemático utilizado foi o exponencial no programa *OriginPro 8.0*, o qual demonstrou melhor correspondência aos dados obtidos e melhor coeficiente de determinação, r^2 .

O fármaco de referência BZD, único fármaco disponível no Brasil para o tratamento da doença de Chagas, apresentou menor capacidade de inibição de crescimento do parasito, comparado com os compostos sintetizados (BZD: Silvio X10 c11 - IC₅₀ = 29,16 \pm 2,90 μM , Y - IC₅₀ = 40,40 \pm 3,37 μM , Bug 2149 c110 - IC₅₀ = 30,63 \pm 3,21 μM , Colombiana - IC₅₀ = 47,91 \pm 4,96 μM). Os compostos BSF-27 (Silvio X10 c11 - IC₅₀ = 4,75 \pm 0,36 μM , Y - IC₅₀ = 3,10 \pm 0,29 μM , Bug 2149 c110 - IC₅₀ = 4,41 \pm 0,46 μM , Colombiana - IC₅₀ = 2,45 \pm 0,27 μM), BSF-33 (Silvio X10 c11 - IC₅₀ = 4,34 \pm 0,33 μM , Y - IC₅₀ = 3,39 \pm 0,31 μM , Bug 2149 c110 - IC₅₀ = 4,22 \pm 0,49 μM , Colombiana - IC₅₀ = 3,94 \pm 0,43 μM), BSF-34 (Silvio X10 c11 - IC₅₀ = 5,07 \pm 0,28 μM , Y - IC₅₀ = 3,47 \pm 0,20 μM , Bug 2149 c110 - IC₅₀ = 4,25 \pm 0,40 μM , Colombiana - IC₅₀ = 2,86 \pm 0,31 μM) e BSD-35 (Silvio X10 c11 - IC₅₀ = 3,17 \pm 0,32 μM , Y - IC₅₀ = 1,17 \pm 0,12 μM , Bug 2149 c110 - IC₅₀ = 1,81 \pm 0,18 μM , Colombiana - IC₅₀ = 3,06 \pm 0,23 μM) apresentaram IC₅₀ inferior ao NFX (Silvio X10 c11 - IC₅₀ = 6,02 \pm 0,32 μM , Y - IC₅₀ = 12,84 \pm 1,30 μM , Bug 2149 c110 - IC₅₀ = 7,32 \pm 0,75 μM , Colombiana - IC₅₀ = 9,93 \pm 1,01 μM) para as cepas analisadas. Os gráficos e dados de obtenção do IC₅₀ do composto BSF-35 e BZD para as quatro cepas se encontram nas tabelas 15 a 22 e figuras 42 a 49. Os compostos planejados mostraram-se mais ativos que o composto-protótipo NF, o que indica que as modificações moleculares realizadas na etapa de planejamento dos compostos foram pertinentes.

Tabela 15. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do BZD para a cepa Silvio X10 c11

BZD - Silvio X10 c11		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
50,0	1,699	70,1 \pm 0,5
25,0	1,398	46,3 \pm 3,8
12,5	1,097	31,6 \pm 4,0
6,2	0,796	21,6 \pm 9,0
3,1	0,495	8,3 \pm 4,6
1,6	0,194	7,6 \pm 2,9
0,8	-0,107	5,8 \pm 2,2
0,4	-0,408	4,5 \pm 4,4

Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata e de pelo menos dois ensaios independentes.

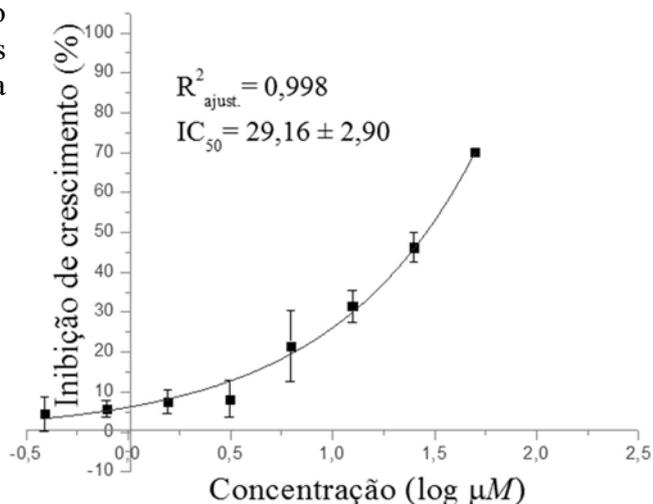


Figura 42. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco benznidazol e valor de IC_{50} para a cepa Silvio X10 c11.

Tabela 16. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do BZD para a cepa Y

BZD - Y		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,0	2,000	58,10 \pm 2,89
50,0	1,699	40,95 \pm 5,07
25,0	1,398	20,95 \pm 4,86
12,5	1,097	7,38 \pm 7,90
6,2	0,796	0,71 \pm 7,07
3,1	0,495	0,00 \pm 8,03
1,6	0,194	0,00 \pm 7,86
0,8	-0,107	0,00 \pm 7,57

Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata e de pelo menos dois ensaios independentes.

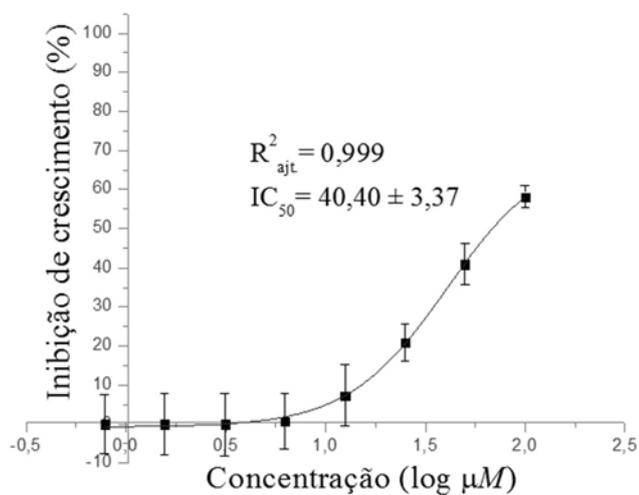


Figura 43. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco benznidazol e valor de IC_{50} para a cepa Y.

Tabela 17. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do BZD para a cepa Bug 2149 c110

BZD - Bug 2149 c110		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
50,00	1,699	61,81 \pm 1,05
25,00	1,398	45,57 \pm 2,41
12,50	1,097	32,08 \pm 0,70
6,25	0,796	22,93 \pm 3,24
3,12	0,495	14,92 \pm 2,99
1,56	0,194	8,06 \pm 4,17
0,39	-0,408	3,95 \pm 9,53

Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata e de pelo menos dois ensaios independentes.

Tabela 18. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do BZD para a cepa Colombiana

BZD - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	67,34 \pm 4,90
100,00	2,000	58,73 \pm 2,26
50,00	1,699	50,87 \pm 3,30
25,00	1,398	36,51 \pm 2,67
12,50	1,097	29,47 \pm 5,85
6,25	0,796	24,07 \pm 4,05
3,13	0,495	22,09 \pm 2,71
1,56	0,194	17,43 \pm 3,39
0,78	-0,107	16,44 \pm 3,73

Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata e de pelo menos dois ensaios independentes.

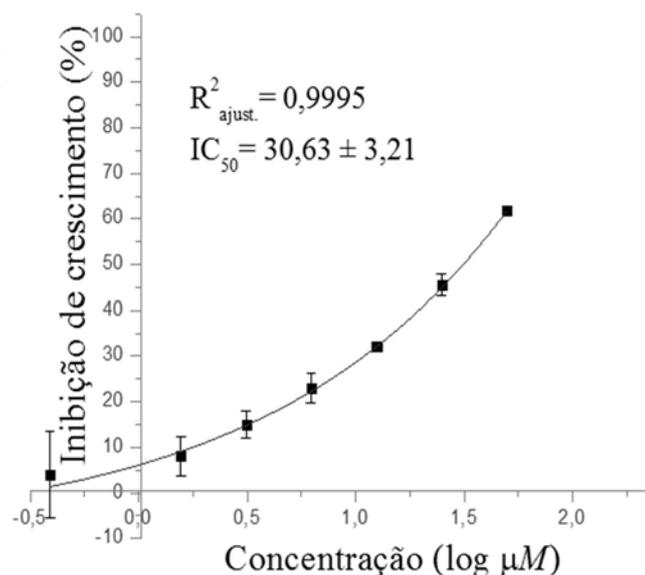


Figura 44. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco benznidazol e valor de IC_{50} para a cepa Bug 2149 c110.

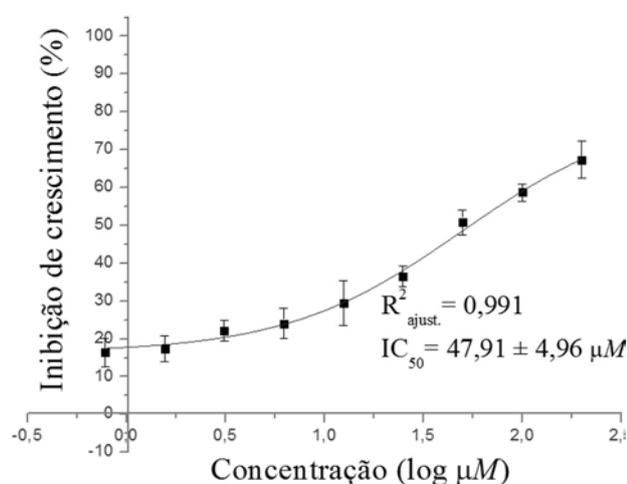


Figura 45. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do fármaco benznidazol e valor de IC_{50} para a cepa Colombiana.

Tabela 19. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações **BSF-35** para a cepa Silvio X10 c11

BSF-35 - Silvio X10 c11			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu M$	(média \pm dp)	
100,0	2,000	82,84	$\pm 7,99$
50,0	1,699	81,04	$\pm 7,34$
25,0	1,398	77,25	$\pm 7,37$
12,5	1,097	75,83	$\pm 6,00$
6,2	0,796	69,19	$\pm 3,01$
3,1	0,495	45,73	$\pm 7,71$
1,6	0,194	14,69	$\pm 3,42$
0,8	-0,107	8,77	$\pm 2,86$

Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata e de pelo menos dois ensaios independentes.

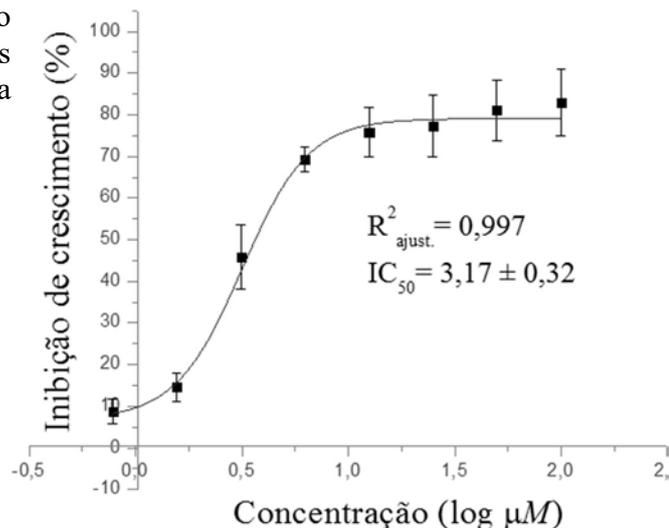


Figura 46. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do **BSF-35** e valor de IC_{50} para a cepa Silvio X10 c11.

Tabela 20. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do **BSF-35** para a cepa Y

BSF-35 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu M$	(média \pm dp)	
50,0	1,699	100,00	$\pm 3,00$
25,0	1,398	100,00	$\pm 4,00$
12,5	1,097	99,71	$\pm 5,22$
6,2	0,796	95,03	$\pm 3,82$
3,1	0,495	93,87	$\pm 3,84$
1,6	0,194	84,52	$\pm 2,53$
0,8	-0,107	44,21	$\pm 3,96$
0,4	-0,398	36,00	$\pm 2,00$

Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata e de pelo menos dois ensaios independentes.

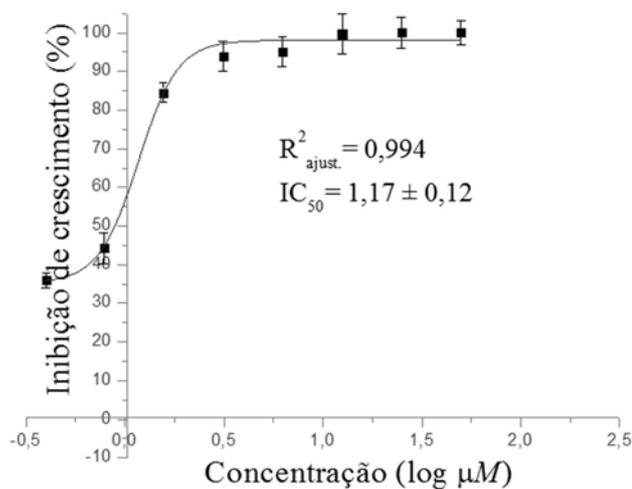


Figura 47. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do **BSF-35** e valor de IC_{50} para a cepa Bug 2149 c110.

Tabela 21. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **BSF-35** para a cepa Bug 2149 c110

BSF-35 - Bug 2149 c110			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
100,0	2,000	88,93	$\pm 7,23$
50,0	1,699	88,41	$\pm 9,46$
25,0	1,398	86,30	$\pm 9,13$
12,5	1,097	84,49	$\pm 5,99$
6,2	0,796	83,14	$\pm 9,51$
3,1	0,495	75,05	$\pm 5,22$
1,6	0,194	38,34	$\pm 8,17$
0,8	-0,107	13,57	$\pm 6,74$

Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata e de pelo menos dois ensaios independentes.

Tabela 22. Inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do **BSF-35** para a cepa Colombiana

BSF-35 - Colombiana			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
100,00	2,000	95,81	$\pm 1,98$
50,00	1,699	95,65	$\pm 2,34$
25,00	1,398	95,34	$\pm 3,36$
12,50	1,097	86,50	$\pm 3,29$
6,25	0,796	75,16	$\pm 5,30$
3,13	0,495	54,68	$\pm 3,27$
1,56	0,194	28,75	$\pm 1,98$
0,78	-0,107	14,78	$\pm 3,29$
0,39	-0,408	11,06	$\pm 1,98$

Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata e de pelo menos dois ensaios independentes.

As curvas de dose-resposta para determinação do IC_{50} encontram-se no anexo 4 “Curvas dose-resposta da inibição de crescimento parasitário para as cepas Silvio X10 cl, Y e Bug 2149 c110”.

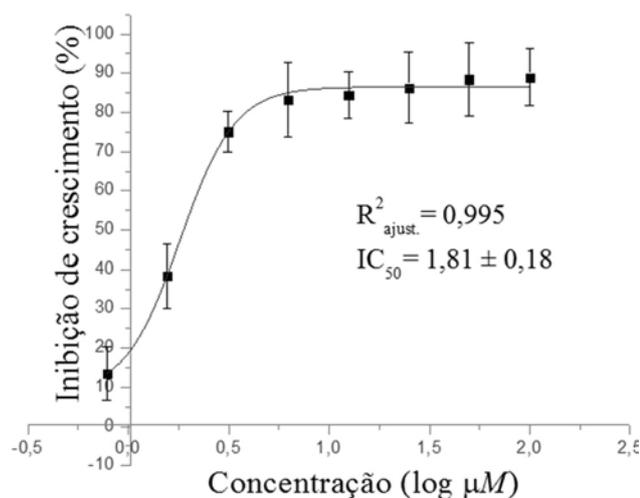


Figura 48. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do composto **BSF-35** e valor de IC_{50} para a cepa Bug 2149 c110.

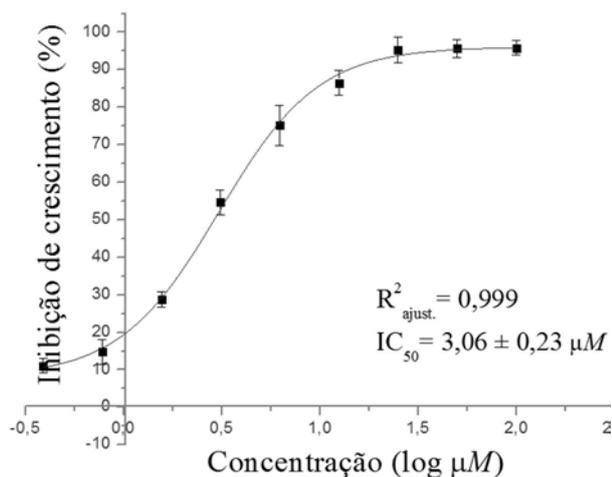
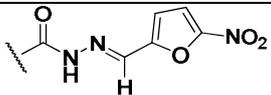
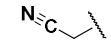
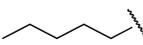
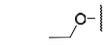
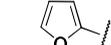
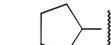
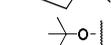
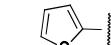
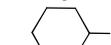
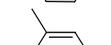
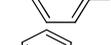
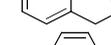
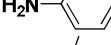


Figura 49. Curva exponencial da inibição do crescimento parasitário em diferentes concentrações do **BSF-35** e valor de IC_{50} para a cepa Colombiana.

Na tabela 23 e figura 50 encontra-se a relação dos dados de IC₅₀ determinados para as cepas Silvio X10 cl1, Y, Bug 2149 cl10 e Colombiana. Os compostos planejados apresentaram valores de IC₅₀ mais elevados para cepa Silvio X10 cl1, indicando maior resistência desta cepa a estes compostos. Dentre os 40 compostos analisados a maioria dos compostos apresentaram atividade superior ao BZD para as quatro cepas. É importante salientar que os compostos BSF-37, BSF-36, BSF-39 e BSF-40 foram sintetizados e avaliados quanto sua atividade frente epimastigotas no final do trabalho, pois foram planejados com os dados do conjunto de 36 compostos.

Tabela 23. Atividade anti-*T. cruzi* dos compostos, fármacos de referência e composto-protótipo frente às cepas Silvio X10 cl1, Y, Bug 2149 cl10 e Colombiana

Compostos		Silvio X10 cl1	Y	Bug 2149 cl10	Colombiana
		(TcI)	(TcII)	(TcV)	(TcI)
		IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
		(média ±dp)	(média ±dp)	(média ±dp)	(média ±dp)
BSF-1		27,96 ±2,18	13,77 ±1,04	14,39 ±1,23	9,52 ±1,03
BSF-2		40,51 ±1,75	80,23 ±8,54	27,40 ±2,67	60,61 ±6,17
BSF-3		10,08 ±0,89	10,26 ±1,05	12,20 ±1,33	7,58 ±0,76
BSF-4		11,31 ±1,04	9,28 ±0,93	6,92 ±0,70	7,07 ±0,74
BSF-5		17,95 ±1,31	24,86 ±2,54	9,99 ±0,99	13,14 ±1,07
BSF-6		18,15 ±1,84	12,45 ±0,83	14,58 ±1,15	9,67 ±0,93
BSF-7		14,49 ±1,15	10,59 ±1,10	12,29 ±1,30	7,41 ±0,73
BSF-8		31,10 ±2,21	12,77 ±1,03	14,39 ±1,23	11,30 ±1,14
BSF-9		12,82 ±1,11	5,51 ±0,59	6,87 ±0,62	15,12 ±1,32
BSF-10		13,91 ±1,51	14,37 ±1,50	12,69 ±1,08	10,19 ±0,78
BSF-11		27,69 ±2,53	10,58 ±1,03	25,35 ±1,92	8,53 ±0,80
BSF-12		18,78 ±1,59	10,97 ±1,05	12,36 ±1,20	10,06 ±0,99
BSF-13		15,04 ±1,50	11,85 ±1,04	11,03 ±1,17	11,92 ±1,21
BSF-14		nd	nd	nd	nd
BSF-15		34,13 ±1,01	17,28 ±1,02	18,74 ±0,88	14,24 ±1,45

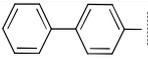
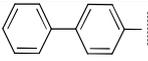
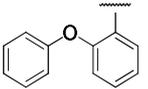
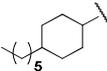
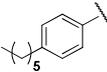
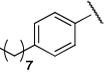
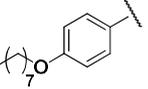
(cont.)

Tabela 23. Atividade anti-*T. cruzi* dos compostos, fármacos de referência e composto-protótipo frente às cepas Silvio X10 cl1, Y, Bug 2149 cl10 e Colombiana (cont.)

Compostos		Silvio X10 cl1	Y	Bug 2149 cl10	Colombiana
		IC ₅₀ (μM) (média ±dp)			
BSF-16		37,14 ±2,90	24,29 ±1,05	25,26 ±1,41	20,24 ±2,04
BSF-17		12,35 ±1,05	9,11	±0,91 9,53	±0,9 5 6,55
BSF-18		14,43 ±1,03	11,63 ±1,17	6,91 ±0,69	8,08 ±0,85
BSF-19		20,20 ±1,45	9,15 ±0,95	14,27 ±1,07	8,64 ±0,92
BSF-20		14,73 ±1,50	13,49 ±0,93	14,40 ±1,23	8,07 ±0,78
BSF-21		6,09 ±0,67	3,91 ±0,33	9,04 ±0,49	6,08 ±0,65
BSF-22		10,28 ±0,36	7,01 ±0,70	9,80 ±0,39	7,25 ±0,75
BSF-23		100,00 ±5,27	100,00 ±6,87	50,96 ±3,90	85,53 ±9,36
BSF-24		13,85 ±1,05	9,74 ±1,00	6,26 ±0,35	11,55 ±1,15
BSF-25		52,34 ±1,16	44,13 ±1,01	30,42 ±3,02	40,64 ±4,24
BSF-26		9,59 ±0,89	7,15 ±0,70	9,90 ±1,06	7,58 ±0,28
BSF-27		4,77 ±0,48	3,10 ±0,29	4,70 ±0,50	2,45 ±0,27
BSF-28		13,68 ±1,36	9,43 ±1,00	13,67 ±1,40	6,10 ±0,64
BSF-29		12,78 ±0,62	7,74 ±0,75	5,71 ±0,57	5,26 ±0,55
BSF-30		27,31 ±2,43	14,22 ±1,05	17,21 ±1,03	26,59 ±2,63
BSF-31		nd	nd	nd	nd
BSF-32		25,50 ±2,25	10,58 ±1,03	14,62 ±0,96	9,98 ±1,06
BSF-33		4,34 ±0,33	3,39 ±0,31	4,44 ±0,32	3,94 ±0,43
BSF-34		5,07 ±0,28	3,47 ±0,20	4,25 ±0,40	2,86 ±0,31

(cont.)

Tabela 23. Atividade anti-*T. cruzi* dos compostos, fármacos de referência e composto-protótipo frente às cepas Silvio X10 cl1, Y, Bug 2149 cl10 e Colombiana (cont.)

Compostos		Silvio X10 cl1	Y	Bug 2149 cl10	Colombiana
		IC ₅₀ (μM) (média ±dp)			
BSF-35		1,97 ±0,14	1,17 ±0,12	1,81 ±0,18	3,06 ±0,23
BSF-36		12,34 ±0,18	7,79 ±0,80	12,22 ±0,86	5,79 ±0,43
BSF-37		2,30 ±0,25	2,50 ±0,22	1,27 ±0,13	1,47 ±0,16
BSF-38		3,77 ±0,12	2,55 ±0,20	1,99 ±0,18	1,76 ±0,19
BSF-39		1,98 ±0,19	1,37 ±0,13	0,67 ±0,06	1,05 ±0,12
BSF-40		1,99 ±0,19	1,47 ±0,14	0,85 ±0,07	1,09 ±0,11
NF		≈ 300,00	≈ 300,00	≈ 300,00	187,78 ±9,91
BZD		27,15 ±2,75	40,23 ±4,07	29,23 ±3,09	47,91 ±4,96
NFX		6,02 ±0,32	12,84 ±1,30	7,32 ±0,68	9,93 ±1,01

Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata e de pelo menos dois ensaios independentes. BZD: benznidazol; NFX: nifurtimox; NF: nifuroxazida (composto-protótipo); nd: concentração não determinada dentro da concentração máxima utilizada no ensaio sem ocorrer precipitação do composto.

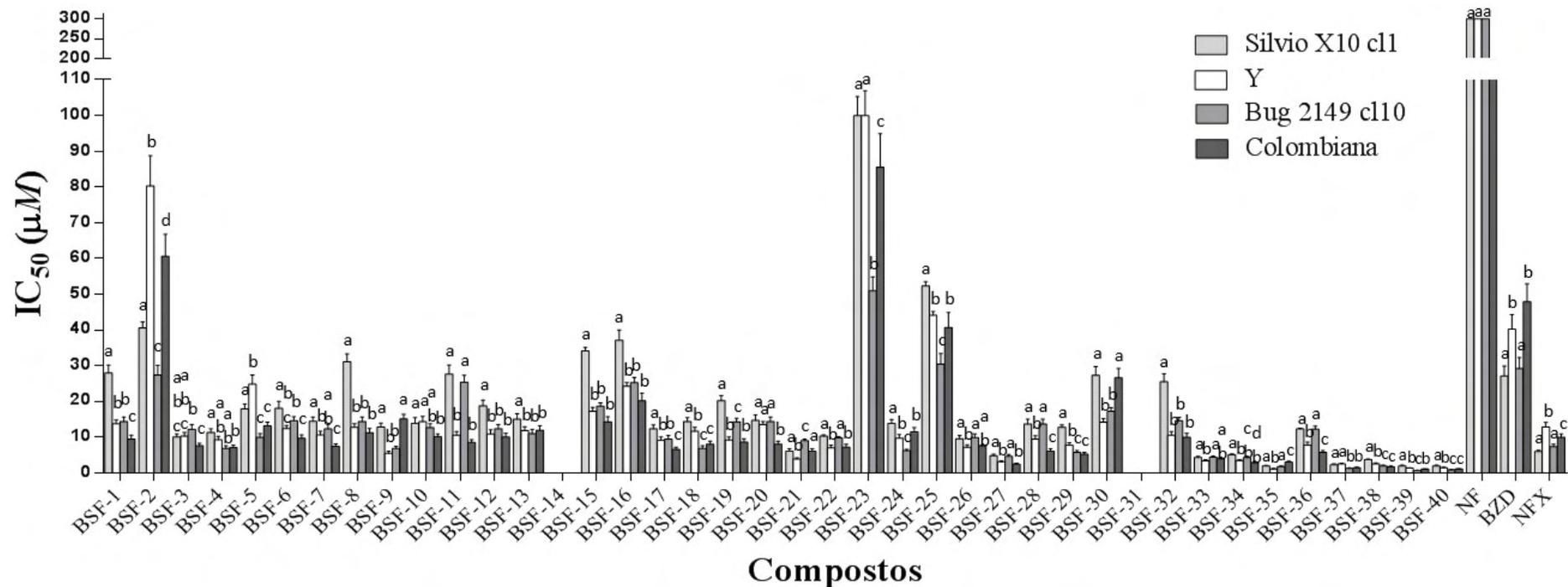


Figura 50. Comparativo da atividade anti-*T. cruzi* dos compostos e fármacos de referência frente às cepas Silvio X10 c11, Y, Bug 2149 c110 e Colombiana do *T. cruzi*. Dados apresentados em média e desvio padrão (\pm) da triplicata e de pelo menos dois ensaios independentes. Teste estatístico de análise de variância de um fator, *one way*-ANOVA, seguido pelo pós-teste (*post-hoc*) de Tukey de comparações múltiplas (intervalo de confiança de 95 %). Todos os compostos apresentaram $P < 0,05$. Letras indicam diferenças entre as cepas para um mesmo composto; BZD: benznidazol; NFX: nifurtimox; NF: nifuroxazida. Não foi possível determinar o IC_{50} dentro da concentração máxima utilizada no ensaio para os compostos BSF-14 e BSF-31, sem precipitação dos mesmos.

No tratamento dos dados, após a obtenção do IC_{50} , foi realizado teste estatístico para identificar compostos que apresentaram atividade igual para as duas cepas. O teste estatístico aplicado foi o teste de análise de variância de um fator, *one way*-ANOVA, seguido pelo pós-teste (*post-hoc*) de Tukey de múltiplas comparações, considerado intervalo de confiança de 95 %. Os compostos apresentaram IC_{50} diferentes entre as cepas, em geral, os compostos mais ativos apresentaram valores menores para cepa Colombiana, indicando atividade para a cepa mais resistente à BZD dentre as quatro cepas estudadas. Dentre os 40 compostos obtidos no final deste trabalho, obteve-se apenas 5 compostos com atividade inferior ao benznidazol, BSF-2, BSF-23 e BSF 25, além dos compostos BSF-14 e BSF-31 que não foi possível obter o IC_{50} pois não demonstrou atividade na máxima concentração permitida no ensaio, sem que houvesse precipitação do composto. Os compostos BSF-27, BSF-33, BSF-34, BSF-35, como mencionados anteriormente, assim como os compostos obtidos com auxílio dos estudos de QSAR, BSF-37, BSF-38, BSF-39 e BSF-40, foram mais ativos que o NFX. Estes dados representam que 87 % dos compostos sintetizados apresentaram atividade superior ao BZD e 20 % do total de compostos apresentaram atividade superior ao NFX.

6.4 Estudos de relações entre estrutura química e atividade biológica e construção de modelos matemáticos de previsão (QSAR)

O estudo das propriedades moleculares (diretamente relacionadas à estrutura química) que mais influenciam na atividade anti-*T. cruzi*, como descrito no item 5.4, envolveram a construção dos modelos moleculares tridimensionais dos compostos e o cálculo de descritores moleculares (variáveis independentes). Métodos quimiométricos como análise exploratória de dados e construção de modelos matemáticos de previsão (QSAR), com abordagem multivariada, foram considerados para avaliar o conjunto de dados.

6.4.1 Construção dos modelos moleculares 3D

A construção dos modelos moleculares, como descrito no item 5.4.1, iniciou com a estrutura cristalográfica do composto-protótipo NF (PNIEWSKA, JANUCHOWSKI, 1998), utilizada como molde, mantendo-se as coordenadas cartesianas (x, y, z) na construção dos análogos, principalmente do grupo 5-nitrofurano. Nas simulações de DM atribuíram-se massas fictícias de 5.000 u.m.a. aos átomos de carbono e oxigênio do grupo

5-nitrofurano e aos carbonos e nitrogênios da porção *N*-acilidrazona, com objetivo de manter a integridade estrutural em relação à estrutura cristalográfica (molde). Obtiveram-se 50.000 confôrmeros para cada composto (PAC) e selecionaram-se dos PAC os confôrmeros de energia mais baixa na região de equilíbrio da simulação, gráficos apresentados no anexo 5. Os confôrmeros de energia mais baixa foram investigados quanto à manutenção de integridade estrutural em relação à estrutura inicial da simulação de DM (*output* da minimização), utilizando como critério os valores de RMSD (sobreposição). Quanto menor o valor de RMSD, menor a distância em Å entre as posições atômicas dos confôrmeros, indicando a manutenção de integridade estrutural (BABER *et. al.*, 2009). Nenhum composto ultrapassou o valor de RMSD de 0,10 Å, como apresentado na tabela 24.

Os valores das contribuições de energia resultantes da simulação de DM para o confôrmero de energia mais baixa selecionado da região de equilíbrio do PAC de cada composto estão na tabela 24. As contribuições de energia intramolecular de solvatação (E_{solv}) e de ligação de hidrogênio (E_{Hb}) foram consideradas no cálculo da contribuição de energia total (E_{TOT}), conforme mencionado na seção Materiais e Métodos. Para a maioria dos compostos investigados, os valores de E_{TOT} foram na faixa de 40 a 60 kcal/mol. Os confôrmeros selecionados foram minimizados e considerados para o cálculo das propriedades moleculares, utilizando diferentes programas computacionais.

Tabela 24. Valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para os confôrmeros de energia mais baixa selecionados do PAC para cada composto investigado

Compostos	E_{STRETCH}	E_{BEND}	E_{TORS}	E_{1-4}	E_{vdw}	E_{CHARGE}	E_{solv}	E_{Hb}	E_{TOT}	RMSD (Å)
BSF-1	8,82	12,36	2,15	-12,97	-0,37	5,32	-10,26	-0,83	4,22	0,02
BSF-2	3,32	15,52	0,73	-2,31	-2,25	1,90	-9,87	-1,97	5,07	0,07
BSF-3	11,00	17,92	1,65	0,88	-3,34	1,57	-6,63	-2,16	20,89	0,01
BSF-4	7,37	18,25	11,64	-3,62	-2,17	-0,53	-8,17	-1,89	20,88	0,02
BSF-5	17,84	28,02	22,27	-0,85	-0,63	3,67	-13,86	0,33	56,79	0,07

(cont).

Tabela 24. Valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para os confôrmeros de energia mais baixa selecionados do PAC para cada composto investigado (cont.)

Compostos	E _{STRETCH}	E _{BEND}	E _{TORS}	E _{I-4}	E _{VdW}	E _{CHARGE}	E _{solv}	E _{Hb}	E _{TOT}	RMSD (Å)
BSF-1	8,82	12,36	2,15	-12,97	-0,37	5,32	-10,26	-0,83	4,22	0,02
BSF-2	3,32	15,52	0,73	-2,31	-2,25	1,90	-9,87	-1,97	5,07	0,07
BSF-3	11,00	17,92	1,65	0,88	-3,34	1,57	-6,63	-2,16	20,89	0,01
BSF-4	7,37	18,25	11,64	-3,62	-2,17	-0,53	-8,17	-1,89	20,88	0,02
BSF-5	17,84	28,02	22,27	-0,85	-0,63	3,67	-13,86	0,33	56,79	0,07
BSF-6	33,63	23,61	-1,70	16,03	3,44	-0,71	-10,83	0,76	64,23	0,01
BSF-7	5,38	20,16	-0,20	12,51	-2,66	-6,73	-5,91	-1,63	20,92	0,02
BSF-8	19,84	17,05	9,70	9,01	-0,15	2,69	-10,71	0,77	48,20	0,02
BSF-9	17,64	36,75	24,24	-10,86	-0,91	5,81	-11,27	0,76	62,16	0,01
BSF-10	5,99	24,03	3,13	5,78	-4,35	-1,37	-6,01	-1,94	25,26	0,07
BSF-11	17,27	19,80	10,44	8,62	-0,60	1,78	-9,87	0,77	48,21	0,02
BSF-12	5,11	15,11	-1,84	-12,33	-3,84	8,42	-7,16	-1,99	11,48	0,07
BSF-13	18,91	18,9	6,76	3,46	-0,93	3,69	-10,03	0,77	41,53	0,01
BSF-14	19,70	19,25	10,87	-11,30	-1,16	6,21	-11,71	-3,60	28,26	0,01
BSF-15	18,91	23,33	44,07	-16,05	-0,58	7,43	-9,50	0,25	67,86	0,01
BSF-16	16,40	19,02	7,03	11,71	-0,13	-0,50	-10,93	0,77	43,37	0,03
BSF-17	19,4	18,04	11,43	8,73	-2,07	-0,75	-9,41	0,77	46,14	0,01
BSF-18	19,67	21,53	9,95	3,65	-0,89	0,62	-11,65	0,31	43,19	0,01
BSF-19	16,68	18,60	9,69	9,54	0,46	1,87	-11,70	0,77	45,91	0,01
BSF-20	14,67	22,49	1,15	1,07	-2,99	1,59	-6,76	-1,27	29,95	0,01
BSF-21	17,57	22,75	9,72	11,05	-0,21	0,09	-8,79	0,77	52,95	0,02
BSF-22	29,74	20,01	8,48	10,51	-1,13	2,58	-9,20	0,75	61,74	0,01
BSF-23	17,23	24,26	12,93	5,55	-1,84	2,45	-9,46	-0,11	51,01	0,03
BSF-24	27,24	19,55	8,93	3,09	-0,32	-0,69	-10,59	0,30	47,51	0,01
BSF-25	19,11	19,75	10,96	10,73	-0,15	-4,76	-15,83	0,02	39,83	0,01
BSF-20	14,67	22,49	1,15	1,07	-2,99	1,59	-6,76	-1,27	29,95	0,01
BSF-26	20,37	19,16	-0,45	14,71	-1,16	-1,07	-10,64	0,77	41,69	0,01
BSF-27	21,70	21,13	10,29	11,19	-1,87	3,26	-8,88	0,77	57,59	0,01
BSF-28	23,40	21,80	10,82	8,17	0,55	1,82	-8,40	0,77	58,93	0,02
BSF-29	22,48	24,27	12,01	8,57	0,13	1,14	-10,08	0,21	58,73	0,01
BSF-30	16,81	24,4	15,79	18,12	0,46	-3,01	-11,81	-0,51	60,25	0,02
BSF-31	21,59	18,32	12,23	-3,93	-0,92	-14,39	-19,37	-1,84	11,69	0,01
BSF-32	19,82	21,38	6,82	7,03	-0,80	-2,99	-12,59	0,77	39,44	0,02
BSF-33	30,15	21,25	11,94	-1,42	-1,55	8,14	-8,94	-3,17	56,40	0,01
BSF-34	19,98	23,77	11,90	9,56	0,12	3,41	-9,54	0,22	59,42	0,02
BSF-35	33,63	23,61	-1,70	16,03	3,44	-0,71	-10,83	0,76	64,23	0,01

(cont).

Tabela 24. Valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para os confôrmeros de energia mais baixa selecionados do PAC para cada composto investigado (cont.)

Compostos	E_{STRETCH}	E_{BEND}	E_{TORS}	E_{1-4}	E_{vdW}	E_{CHARGE}	E_{solv}	E_{Hb}	E_{TOT}	RMSD (Å)
BSF-36	21,72	21,22	4,39	2,99	-3,43	8,08	-10,53	-3,39	41,05	0,04
BSF-37	13,27	27,46	5,36	8,46	-4,71	-0,18	-4,89	-2,03	42,74	0,03
BSF-38	25,48	20,55	10,37	8,14	-2,36	0,23	-8,75	0,76	54,42	0,03
BSF-39	23,86	26,32	10,21	8,82	-1,67	1,14	-8,26	0,77	61,19	0,03
BSF-40	25,88	22,19	12,15	6,52	-1,49	4,40	-9,20	0,29	60,74	0,02
NF	8,82	12,36	2,15	-12,97	-0,37	5,32	-10,26	-0,83	4,22	0,02

Energias em kcal/mol. E_{STRETCH} (contribuição de energia de deformação axial), E_{BEND} (contribuição de energia de deformação angular), E_{TORS} (contribuição de energia de deformação torsional), E_{1-4} (contribuição de energia de interações do tipo 1-4), E_{vdW} (contribuição de energia de van der Waals), E_{CHARGE} (contribuição de energia eletrostática), E_{solv} (contribuição de energia de solvatação), E_{ligH} (contribuição de energia de ligação H), E_{TOT} (energia total). RMSD: valor do desvio quadrático médio de posições atômicas (*root-mean-square deviation*) comparado com a nifuroxazida, estrutura cristalográfica.

6.4.2 Cálculos dos descritores ou variáveis independentes

As propriedades moleculares calculadas e representativas dos compostos estão apresentadas na tabela 25 e foram de natureza termodinâmica, eletrônica, mista, geométrica, hidrofóbica, topológica, intrínseca, constitucional e espectrofotométrica.

Tabela 25. Propriedades moleculares calculadas para o conjunto de compostos derivados do 5-nitrofurano

Códigos	Descritores	Propriedades	Descrições	Programas
x1	E_{STRETCH}	termodinâmica	contribuição de energia intramolecular de deformação axial	MOLSIM 3.2 (DOHERTY, 2002)
x2	E_{BEND}	termodinâmica	contribuição de energia intramolecular de deformação angular	
x3	E_{TORS}	termodinâmica	contribuição de energia intramolecular de deformação torsional	
x4	E_{1-4}	termodinâmica	contribuição de energia intramolecular do tipo 1-4	
x5	E_{vdW}	termodinâmica	contribuição de energia intramolecular de van der Waals	
x6	E_{CHARGE}	termodinâmica	contribuição de energia intramolecular de carga ou eletrostática	
x7	E_{solv}	termodinâmica	contribuição de energia intramolecular de solvatação	
x8	E_{Hb}	termodinâmica	contribuição de energia intramolecular de ligação de hidrogênio intramolecular	
x9	E_{TOTAL}	termodinâmica	Energia potencial total (soma de todas as contribuições de energia)	

(cont.)

Tabela 25. Propriedades moleculares calculadas para o conjunto de compostos derivados do 5-nitrofurano (cont.)

Códigos	Descritores	Propriedades	Descrições	Programas
x10	E _{HOMO}	eletrônica	energia do orbital de fronteira HOMO (<i>highest occupied molecular orbital</i> , orbital molecular ocupado de maior energia)	GAUSSIAN 03W
x11	E _{LUMO}	eletrônica	energia do orbital de fronteira LUMO (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i> , orbital molecular desocupado de menor energia)	
x12	GAP	eletrônica	diferença entre as energias E _{HOMO} e E _{LUMO}	
x13	μ _x	eletrônica	momento de dipolo no eixo x	
x14	μ _y	eletrônica	momento de dipolo no eixo y	
x15	μ _z	eletrônica	momento de dipolo no eixo z	
x16	μ	eletrônica	momento de dipolo total	
x17	CHELPG_N (-NO ₂)	eletrônica	carga CHELPG do átomo de nitrogênio do grupo nitro	
x18	CHELPG_C2	eletrônica	carga CHELPG do átomo de carbono 2	
x19	CHELPG_C5	eletrônica	carga CHELPG do átomo de carbono 5	
x20	CHELPG_C6	eletrônica	carga CHELPG do átomo de carbono 6	
x21	CHELPG_N7	eletrônica	carga CHELPG do átomo de nitrogênio 7	
x22	CHELPG_N8	eletrônica	carga CHELPG do átomo de nitrogênio 8	
x23	CHELPG_C9	eletrônica	carga CHELPG do átomo de carbono 9	
x24	CHELPG_O1 0	eletrônica	carga CHELPG do átomo de oxigênio 10	
x25	φ ₁	estereoquímica	ângulos de torção (diedros) dos átomos (C9-N8-N7=C6)	
x26	φ ₂	estereoquímica	ângulos de torção (diedros) dos átomos (O9=C9-N8-H8)	
x27	φ ₃	estereoquímica	ângulos de torção (diedros) dos átomos (N8-N7=C6-H6)	
x28	φ ₄	estereoquímica	ângulos de torção (diedros) dos átomos (N8-N7=C6-C2)	
X29	ClogP _{WM}	hidrofóbica	coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa, considerado pesos iguais para os métodos de VISWANADHAN <i>et al.</i> , 1989, KLOPMAN <i>et al.</i> , 1993 e PHYSPROP [®] database	Marvin Beans 16.5.30.0
x30	I _{Platt}	topológica	índice que descreve a soma dos graus de contorno da superfície molecular (PLATT, 1947, 1952)	
x31	I _{Randic}	topológica	índice que descreve a soma harmônica das médias geométricas dos graus dos vértices (RANDIC, 1993)	
x32	I _{Balaban}	topológica	índice que descreve a média da somatória da distância de conectividade da molécula (BALABAN, 1982)	
x33	I _{Harary}	topológica	índice que descreve a metade da somatória da diagonal externa, distância matricial recíproca, dos elementos da molécula (PLAVSIC <i>et al.</i> , 1993)	
x34	I _{Hiper Wiener}	topológica	descreve uma variação do índice de Wiener. estende o índice de Wiener para gráficos cíclicos pela contagem do número de átomos em ambos os lados de cada ligação (considera aqueles átomos que estão mais perto de um lado da ligação do que do outro) (KHADIKAR <i>et al.</i> , 1995)	
x35	I _{Szeged}	topológica	índice que descreve a distância atômica topológica média (metade da soma de todas as distâncias atômicas) na molécula (WIERNER, 1947)	
x36	I _{Wiewer}	topológica	índice que descreve a distância atômica topológica média (metade da soma de todas as distâncias atômicas) na molécula (WIERNER, 1947)	

(cont.)

Table 25. Descrição das propriedades moleculares dos compostos derivados do 5-nitrofurano (cont.)

Códigos	Descritores	Propriedades	Descrições	Programas
x37	I Wiewer Polarity	topológica	considera a distância 3 ligações na molécula	
x38	Dreiding	termodinâmico	energia calculada em campo de força Dreiding da estrutura 3D da molécula	
x39	V _{vdw}	estereoquímica	cálculo do volume de van der Waals	
x40	PSA	estereoquímica	área de superfície polar	
x41	A _{vdw}	estereoquímica	área de superfície molecular de van der Waals	
x42	ASA	estereoquímica	superfície de acessibilidade ao solvente, calculada usando o raio equivalente a uma molécula de água (1,4 Å)	<i>Marvin Beans</i>
x43	ASA+	estereoquímica	superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos com carga parcial positiva	<i>16.5.30.0</i>
x44	ASA-	estereoquímica	superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos com carga parcial negativa	
x45	ASA_H	estereoquímica	superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos hidrofóbicos	
x46	ASA_P	estereoquímica	superfície acessibilidade ao solvente de todos os átomos hidrofílicos	
x47	RM	estereoquímica / hidrofóbica	refratividade molar	
x48	Pi energy	estereoquímica / eletrônica	calcula a energia π do anel aromático (s) (dimensão β) com o método de orbital molecular de Hückel	
x49	HBD	constitucionais	HBD: número de átomos doadores de ligação hidrogênio	
x50	HBA	constitucionais	HBA: número de átomos receptores de ligação hidrogênio	
x51	RB	constitucionais	número de ligação rotáveis presentes na molécula	
x52	Nº átomos	constitucionais	número de átomos que constituem a molécula	
x53	MM	constitucionais	massa molar (Da, u.m.a. ou g)	
x54	RMN ¹³ C_C9	espectrométrica	ressonância magnética nuclear de ¹³ C do átomo de carbono na posição 9	
x55	RMN ¹ H_H6	espectrométrica	ressonância magnética nuclear de ¹ H do átomo de hidrogênio na posição 6	dados experimentais
x56	RMN ¹ H_H8	espectrométrica	ressonância magnética nuclear de ¹ H do átomo de hidrogênio na posição 8	

Com intuito de verificar se as estruturas se apresentavam na forma ionizada ou molecular (não ionizada) na faixa de pH utilizada nos ensaios biológicos (entre 7,2 e 7,4), foi verificado o pKa no programa *MarvinBeans 16.5.30.0*. Os resultados demonstraram que as estruturas estudadas não ionizaram nesta faixa de pH, mantendo entre 99,2 % e 100 % sua forma molecular em proporção às demais estruturas ionizadas. Neste mesmo programa foram obtidos descritores topológicos, estereoquímicos, mistos e constitucionais da molécula.

Como descrito na seção de métodos, as propriedades eletrônicas foram calculadas com método semiempírico B3LYP (FOCK, 1930, MORGON, COUTINHO, 2007) em conjunto de base 6-311G++ (d,p). Esta metodologia de cálculo foi adotada baseada em estudos de Mobli e Abraham, que demonstraram que as condições acima resultam em dados mais reais das cargas de grupos nitros ligados a anéis aromáticos, ao comparar com

deslocamentos químicos obtidos experimentalmente e outras abordagens de métodos *ab initio* e semiempírico (MOBLI, ABRAHAM, 2005). As cargas atômicas parciais CHELPG (BRENNEMAN, WIBERG, 1990) foram obtidas pelo método B3LYP, 6-311G++ (d,p). Estas cargas atômicas pontuais representam o potencial eletrostático molecular em um conjunto de pontos pré-definidos ao redor da molécula (GUADAGNINI, BRUNS, SOUZA, 1996).

Ângulos de torção (diedros) foram obtidos com o programa *HyperChem Professional 8.0* e estão representados na figura 51. Os átomos correspondentes aos 4 diedros selecionados na estrutura são: C9-N8-N7=C6 (ϕ_1), O9=C9-N8-H8 (ϕ_2), N8-N7=C6-H6 (ϕ_3), N8-N7=C6-C2 (ϕ_4).

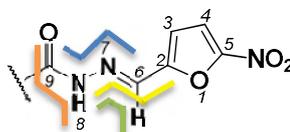


Figura 51. Ângulos de torção, diedros, representados na estrutura química da porção comum dos compostos estudados. C9-N8-N7=C6 (ϕ_1 – linha azul), O9=C9-N8-H8 (ϕ_2 – linha laranja), N8-N7=C6-H6 (ϕ_3 – linha verde), N8-N7=C6-C2 (ϕ_4 – linha amarela).

Deslocamentos químicos obtidos experimentalmente, por RMN (item 5.2.3), também foram considerados como descritores. Consideraram-se os seguintes deslocamentos químicos como descritores: RMN ^{13}C para o carbono C9, RMN ^1H para hidrogênios H6 e H8, seguindo numeração apresentada na figura 51.

Calculadas as propriedades, gerou-se uma tabela com 57 colunas (56 variáveis independentes ou descritores + a coluna da atividade biológica avaliada frente a forma epimastigota do *T. cruzi*). Cabe ressaltar que para cada cepa do parasita foram realizados estudos independentes (análises separadas). Inicialmente, o conjunto obtido foi de 34 compostos planejados e sintetizados, com valores de IC_{50} determinados experimentalmente. A NF foi incluída no conjunto de dados, obtendo-se $N = 35$.

Os valores de atividade biológica foram transformados em potência da atividade (\log_1/IC_{50}) e correspondem à variável dependente. Valores mais altos de \log_1/IC_{50} correspondem aos compostos mais ativos. Na figura 52 está apresentada a distribuição da atividade, convertida em potência, dos compostos e fármacos de referência para cada cepa estudada. A tabela com os valores dos descritores obtidos e calculados, além de valores em potência da atividade biológica encontra-se no anexo 6.

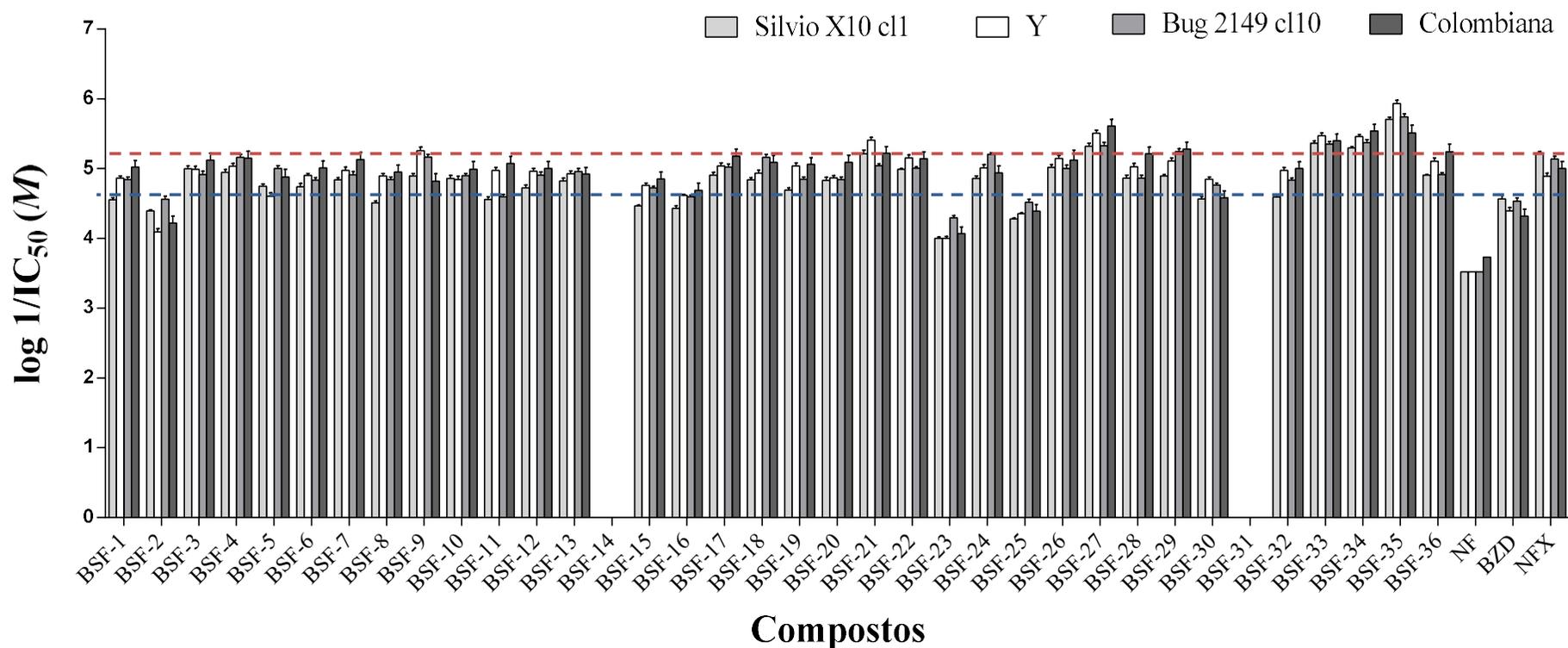


Figura 52. Atividade anti-*T. cruzi* convertida em potência ($\log 1/IC_{50}$), dos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos e fármacos de referência frente a forma epimastigota das cepas Silvio X10 cl1, Y, Bug 2149 cl10 e Colombiana do *T. cruzi*. Dados apresentados em média e desvio padrão (τ) da triplicata e de pelo menos dois ensaios independentes. BZD: benznidazol; NFX: nifurtimox; NF: nifuroxazida; linha vermelha pontilhada indica a atividade em potência do fármaco NFX; linha azul pontilhada indica a atividade em potência do fármaco BZD. Não foi possível determinar o IC_{50} dentro da concentração máxima utilizada no ensaio para os compostos BSF-14 e BSF-31.

Observa-se que os compostos BSF-27, BSF-33, BSF-34 e BSF-35 apresentaram maior atividade para todas as cepas em relação ao NFX (linha vermelha pontilhada na figura 53). Dentre os 36 compostos demonstrados no gráfico da figura 53, 31 compostos apresentaram atividade superior ao BZD para as 4 cepas (linha pontilhada azul), equivalente a 86 % do conjunto. A faixa de dispersão dos valores linearizados de atividade biológica variou entre 5,71 a 3,52 unidades logarítmicas para cepa Silvio X10 c11, 5,93 a 3,52 para Y, 5,74 a 3,52 para Bug 2149 c110 e de 5,61 a 3,73 para Colombiana. A variação da atividade para estudos de relações estrutura atividade é aceitável geralmente acima de duas unidades logarítmicas (ABRAHAM, 1994).

6.4.3 Análise exploratória dos dados

Previamente à análise exploratória realizou-se uma triagem de descritores (variáveis independentes) considerando dois filtros (FERREIRA, KIRALJ, 2011, FERREIRA, 2002), a saber: (i) coeficiente de correlação linear de Pearson entre cada descritor e a atividade biológica linearizada; (ii) gráficos de dispersão (*scatter plots*) para verificar a distribuição/dispersão de cada descritor em relação à atividade biológica (Gráficos apresentados no anexo 7 “Gráficos de dispersão para seleção de descritores mais correlacionados com a atividade biológica”). Na figura 53 encontram-se dois exemplos de gráficos de dispersão de descritores em relação a atividade, um sem correlação e outro com alta correlação.

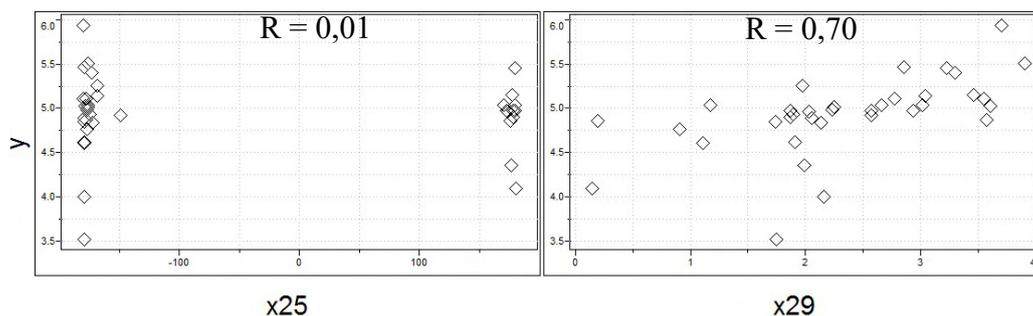


Figura 53. Gráficos de dispersão das variáveis independentes x25, diedro ϕ 1 (C9-N8-N7=C6) e x29, ClogP_{WM}, em relação atividade anti-*T. cruzi* da forma epimastigota da cepa Y. Valores do coeficiente de correlação de Person, R.

Nesta etapa, verificou-se que os valores de atividade linearizada das quatro cepas apresentaram coeficientes lineares de Pearson superiores a 0,85, quando comparadas

entre si. Adicionalmente, os descritores sem correlação, ou com distribuição inadequada, foram os mesmos retirados para as quatro cepas. Como na análise exploratória de dados a variável dependente não é considerada na modelagem dos dados, uma só análise, considerando as propriedades selecionadas foi representativa para o conjunto de dados.

A etapa de análise exploratória tem como objetivo principal reconhecer padrões em um conjunto de dados. As análises de HCA e PCA foram desenvolvidas no programa *Pirouette 3.11* (Infometrix, Ltd., 2003). As tabelas geradas após a triagem prévia dos descritores foram utilizadas como dado de entrada (*input*). Houve necessidade de realizar pré-processamento dos dados devido às distintas ordens de grandeza entre os descritores calculados. Assim, a tabela gerada teve seus dados autoescalados para serem utilizados comparativamente na análise.

Avaliou-se também a distribuição dos valores de atividade biológica linearizados. Analisaram-se os intervalos de atividade para cada cepa e foram atribuídos intervalos de \log_1/IC_{50} comuns entre elas, classificando-os em atividade alta (H), os valores de 6,00 a 5,40; em atividade moderada (M), os valores entre 5,40 e 4,60, e em atividade baixa (L), os valores entre 4,60 e 3,50.

A análise não supervisionada HCA tem a finalidade de agrupar um conjunto de dados considerando atributos semelhantes de forma sistemática. Nestes cálculos, o método matemático mais utilizado para o cálculo de distância é o da distância Euclideana. O método utilizado para o agrupamento sistemático foi o método completo, considerando no cálculo de agrupamento os “vizinhos mais distantes” (FERREIRA, 2002; *Pirouette 3.11*, Infometrix, Ltd., 2003). Os índices de similaridade (IS) gerados com o conjunto de dados variam entre 0 e 1. O valor igual a 1 equivale ao máximo de similaridade. A matriz de similaridade gera o dendrograma, que é um mapa em forma de árvore construído a partir das distâncias de dados (FERREIRA, 2002, MOITA NETO, MOITA, 1998, BEEBE, PELL, SEASHOLTZ, 1998).

O método não supervisionado de análise de componentes principais (PCA) tem como objetivo reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados. A redução do número de descritores se dá projetando-se descritores redundantes em um novo conjunto de variáveis, de forma ortogonal, denominadas componentes principais (PC), ou fatores, que

conservam as informações do conjunto de dados original (FERREIRA, 2002, MOITA NETO, MOITA, 1998, BEEBE, PELL, SEASHOLTZ, 1998).

Inicialmente, realizou-se a análise exploratória do conjunto de 34 compostos (BSF-1 a BSF-36), incluindo a nifuroxazida. Os compostos BSF-14 e BSF-31 foram retirados do conjunto porque não tiveram os valores de IC_{50} determinados. A matriz obtida após a triagem prévia de descritores apresentava 15 colunas e 35 linhas ($N = 35$). O valor absoluto de corte utilizado para o coeficiente linear de Pearson na seleção dos descritores foi de 0,35. Os resultados da análise exploratória estão apresentados na figura 54.

Na análise de HCA, os compostos do conjunto de dados ($N = 35$) foram agrupados em dois grupos maiores: grupo A e B, com similaridade de 33,9 % e 61,2 %, respectivamente (figura 54A). O agrupamento A é constituído por compostos com valores de ClogP (lipofilicidade) mais baixos, ou seja, mais hidrofílicos. Encontram-se neste grupo os compostos com baixa atividade frente à forma epimastigota do *T. cruzi*, com exceção do composto BSF-23 [-C₆H₄-4-N(CH₃)₂], que se agrupou em B com o composto BSF-21 [-C₆H₄-4-*iso*-C₃H₇], devido à similaridade topológica. Ainda em A, agruparam-se os compostos que possuem substituintes não fenílicos (BSF-1 a BSF-7; BSF-9, BSF-10, BSF-12 e BSF-15). Os compostos BSF-20 [-C₈H₁₇] e BSF-26 [2-naphthyl], no entanto, provavelmente por apresentarem maior volume e serem mais hidrofóbicos foram agrupados em B.

Os compostos de maior atividade, em geral, foram agrupados no subgrupo B', compartilhando 80,7 % de similaridade. O composto BSF-27 [-C₆H₄-4-C₄H₉], no entanto, com alta atividade, foi agrupado com o composto BSF-28 [-C₆H₄-4-*terc*-C₄H₉], de atividade moderada, no subgrupo B'', provavelmente por serem isômeros constitucionais com alteração na cadeia.

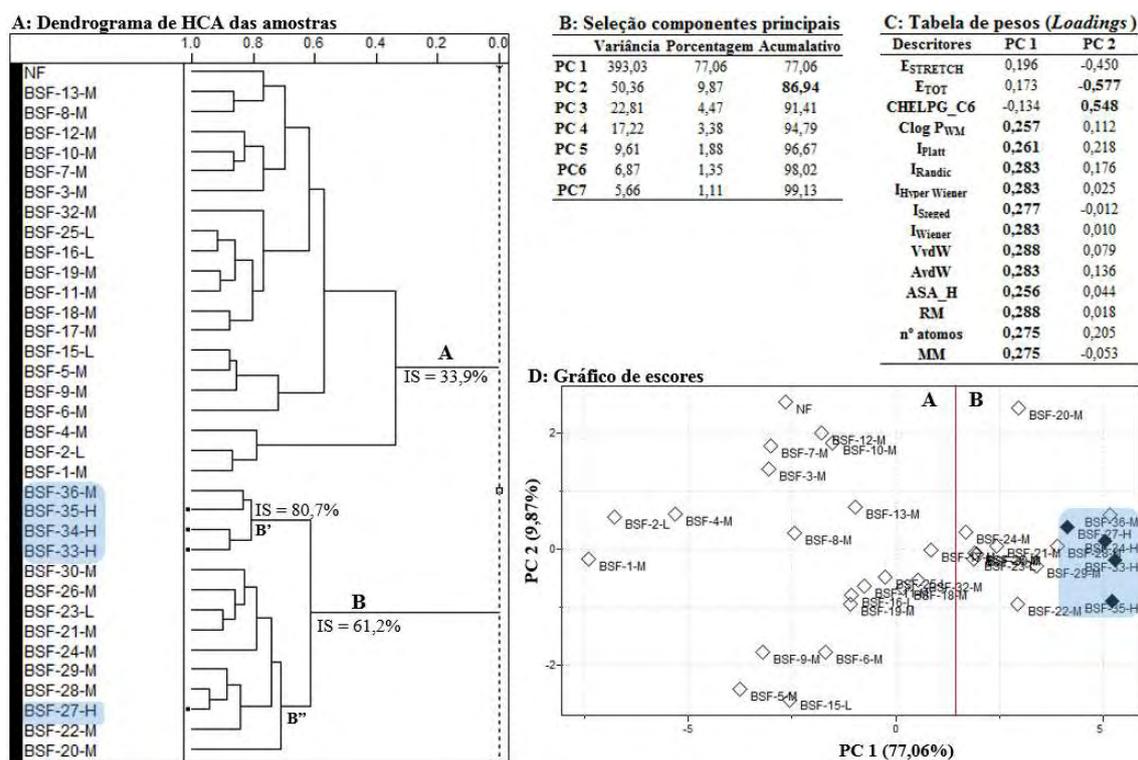


Figura 54. Resultados da análise exploratória do conjunto de 34 compostos derivados furfurilidênicos (BSF-1 a BSF-36) e nifuroxazida. (A) Dendrograma do HCA de amostras: compostos agrupados em dois grandes grupos: A (IS de 0,34, compostos menos volumosos, hidrofílicos, substituintes alifáticos, heterocíclicos e ciclo alquil) e B (IS = 0,61, compostos volumosos e hidrofóbicos). Quadrados pretos (■) ao final das linhas do dendrograma indicam os compostos mais ativos. IS: índices de similaridade; H: compostos com alta atividade frente a forma epimastigota de *T. cruzi*; M: compostos com atividade mediana; L: compostos com baixa atividade. Resultados da análise de PCA: (B) seleção de fatores ou de PC; (C) tabela de pesos (*loadings*), em destaque descritores com alto valor de pesos; (D) gráfico de escores entre PC1 e PC2, que somaram 86,9 % da variância total dos dados originais. A linha contínua vermelha divide os compostos de forma correspondente aos agrupados no HCA, grupos A e B. Os compostos mais ativos estão em losango preto (◆).

De acordo com a seleção de componentes principais (figura 54B), as duas primeiras PC descrevem 86,94 % da variância total dos dados originais, sendo que PC1 discrimina 77,06 % dos dados e PC2, 9,87 %. A tabela de pesos ou *loadings* (figura 54C) indica quais descritores mais influenciaram na separação dos compostos. Os valores (absolutos) de pesos mais altos para os descritores geométricos e intrínscio (ASA_H, A_{vdW} e V_{vdW}), índices topológicos (I_{platt}, I_{Randic}, I_{Hyper Wiener}, I_{Szeged} e I_{Wiener}), hidrofóbico (ClogP_{WM}), misto (RM) e descritores constitucionais (n° de átomos e MM) ressaltam a influência de tais descritores no processo de separação dos compostos em PC1 e variaram

de 0,25 e 0,29. Em PC2, os descritores E_{TOT} (termodinâmico) e CHELPG_C6 (eletrônico) influenciaram mais a discriminação dos dados e apresentaram valores (absolutos) de peso 0,57 e 0,55, respectivamente.

Quanto ao gráfico de escores (Figura 54D), os resultados foram complementares aos dados obtidos no HCA de amostras. Os compostos com valores mais positivos em PC1, ou Fator 1, são os mesmos compostos agrupados em B no HCA de amostras (ver linha vermelha separando compostos dos grupos A e B, figura 54D).

O fato de PC1 explicar 77 % dos dados originais e das propriedades moleculares com maior peso serem de natureza geométrica, topológica, hidrofóbica, mista, intrínseca e constitucional, permitem inferir que compostos mais volumosos e hidrofóbicos favorecem a atividade frente à forma epimastigota do *T. cruzi*, corroborando com estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (PALACE-BERL, 2012).

O diagnóstico de amostras atípicas (*outliers*) foi realizado por meio do gráfico de residual de amostras *versus* distância de Mahalanobis (MAHALANOBIS, 1936), 7 componentes (figura 55). O limite residual da amostra foi baseado em noventa e cinco por cento de intervalo de confiança definido internamente no programa *Pirouette* 3.11 e as linhas limítrofes encontram-se em vermelho na figura 55. O composto BSF-6 e a NF ultrapassaram pouco apenas uma das linhas limítrofes, o que não é suficiente para serem considerados amostras atípicas. O composto BSF-6 possui substituinte cicloalquila de cinco membros e apresentou atividade moderada. A NF, por outro lado, possui estrutura muito similar aos compostos benzeno substituídos e apresentou baixa atividade. Tratando-se de um conjunto com variedade estrutural e considerando-se que tais amostras podem estar dentre os 5 % das amostras consideradas normais, em 95 % de confiança, já que excederem apenas uma das linhas limítrofes, optou-se por mantê-las no conjunto de dados e não as considerá-las como atípicas.

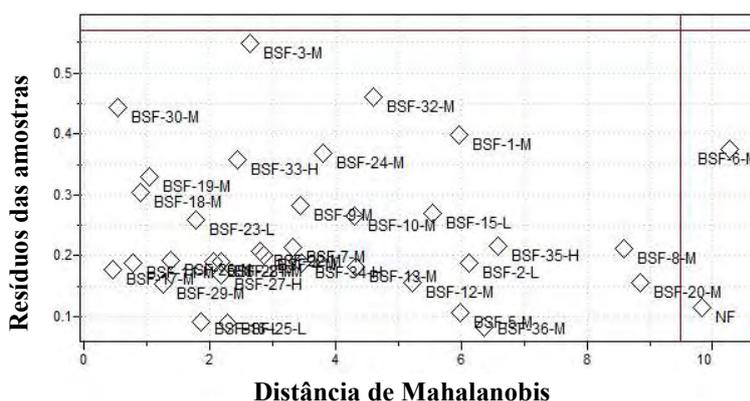


Figura 55. Gráfico da distância residual das amostras em relação à distância de Mahalanobis do conjunto de 34 compostos 5-nitrofurfurilidênicos e nifuroxazida (N = 35). Considerado 7 componentes principais na análise.

Visto que houve um padrão do conjunto de dados indicando que substituintes volumosos e hidrofóbicos favorecem a atividade frente a forma epimastigota do *T. cruzi*, foi desenvolvida a análise exploratória para o conjunto de dados dividido em compostos benzeno substituídos (21 compostos e NF) e compostos não benzeno substituídos (13 compostos com substituintes alifáticos, cicloalquila, heterocíclicos e naftila).

O subconjunto de compostos não benzeno substituídos, após a seleção de descritores, foi constituído de uma matriz composta por 7 descritores e 13 amostras (N = 13). O valor absoluto de corte utilizado para o coeficiente linear de Pearson na seleção dos descritores foi de 0,35.

A análise de HCA apresentou dois grupos de compostos: grupo (A) com 69% de similaridade e apenas 2 compostos, e grupo (B) com 34,1% (figura 56A). O grupo (A) é constituído pelos compostos BSF-20 [-C₈H₁₇] e BSF-26 [2-naphthyl], agrupados na análise anterior do conjunto de N = 35 em meio aos compostos benzeno substituídos. Estes dois compostos apresentam propriedades de volume e lipofilicidade mais elevadas em relação aos demais compostos deste subconjunto N = 13. O grupo (B) foi dividido em dois subgrupos, (B') com 36,7% de similaridade e subgrupo (B''), com 52,8%. No subgrupo (B'') encontra-se o composto de baixa atividade BSF-2[-CH₂CN], agrupando-se com compostos de volume menor deste conjunto, BSF-1 [-CH₃] e BSF-4 [-OC₂H₅].

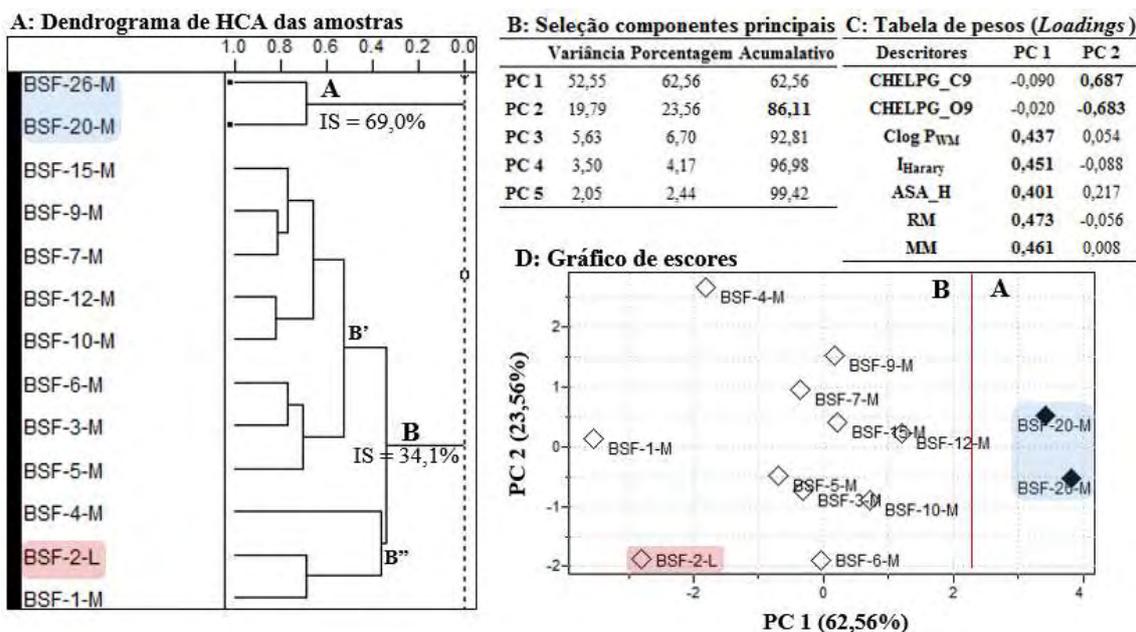


Figura 56. Resultados da análise exploratória do conjunto de 13 compostos derivados furfuralidênicos, não benzeno substituídos. (A) Dendrograma do HCA de amostras: compostos agrupados em dois grandes grupos: A (SI de 0,69, compostos mais volumosos) e B (IS de 0,34, compostos menos volumosos). Quadrados pretos (■) ao final das linhas do dendrograma indicam os compostos mais volumosos. IS: índices de similaridade; M: compostos com atividade mediana frente a forma epimastigota de *T. cruzi*; L: compostos com baixa atividade. Resultados da análise de PCA: (B) seleção de fatores ou de PC; (C) tabela de pesos (*loadings*), em destaque descritores com alto valor de pesos; (D) gráfico de escores entre PC1 e PC2, que somaram 86,11% da variância total dos dados originais. A linha contínua vermelha divide os compostos de forma correspondente aos agrupados no HCA, grupos A e B. Os compostos mais volumosos estão em losango preto (◆).

Na análise de componentes principais (figura 56B), as duas primeiras PC descreveram 86,11 % da variância total dos dados originais, sendo 65,56 % para PC1 e 23,56 % para PC2. De acordo com a tabela de pesos ou *loadings* (figura 56C), os descritores geométrico (ASA_H), topológico (I_{Harary}), hidrofóbico (ClogP_{WM}), misto (RM, hidrofóbico/estereoquímico) e constitucional (MM) apresentaram maiores valores absolutos em PC1, variando entre 0,40 e 0,47. Em PC2, os descritores que mais influenciaram a separação dos dados foram os eletrônicos, CHELPG_O9 (0,68) e CHELPG_C9 (0,68). As cargas CHELPG, na posição 9, correspondem aos átomos do grupo carbonila dos compostos (oxigênio e carbono), porção da estrutura onde é realizada a substituição molecular.

Quanto ao gráfico de escores (Figura 56D), os resultados foram complementares aos obtidos no HCA de amostras. Os compostos com valores mais positivos em PC1, ou

Fator 1, são os mesmos compostos agrupados em A (HCA de amostras) (ver linha vermelha separando compostos dos grupos A e B, figura 56D). Verificou-se que para o subconjunto de compostos não benzeno substituídos o padrão de discriminação foi semelhante à análise realizada para o conjunto completo ($N = 35$), em que propriedades geométricas, topológicas, de hidrofobicidade e constitucionais, além de eletrônica, são relevantes para atividade biológica.

O diagnóstico de amostras atípicas, realizado por meio da distância de Mahalanobis (MAHALANOBIS, 1936), está apresentado na figura 57. Considerou-se o intervalo de confiança de 95 %, implementado internamente no programa *Pirouette* 3.11. Observa-se que os compostos não ultrapassaram o limite considerado, ou seja, os descritores selecionados foram suficientes para descrever as características estruturais do conjunto de dados.

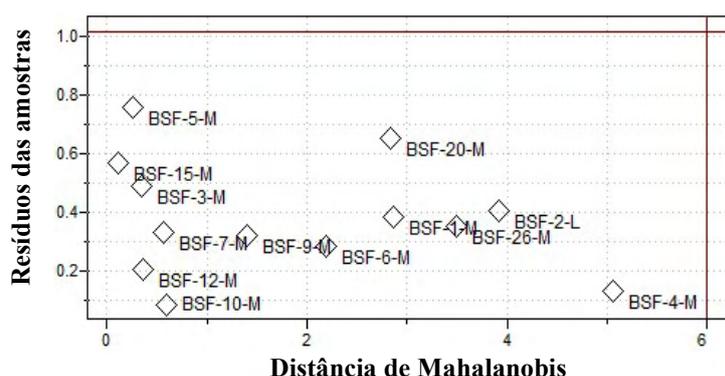


Figura 57. Gráfico da distância residual das amostras em relação à distância de Mahalanobis do conjunto de 13 compostos 5-nitrofurfurilidênicos e nifuroxazida ($N = 13$). Considerado 5 componentes principais na análise.

A análise exploratória do conjunto de 21 compostos, incluindo a nifuroxazida foi desenvolvida com a tabela de dados, após a seleção de descritores, composta por 16 colunas (15 descritores e atividade biológica) e 22 linhas ($N = 22$). O valor de corte utilizado para o coeficiente linear de Pearson na seleção de descritores foi de 0,55 (valor absoluto). Os dados estão apresentados na figura 58.

Na análise de HCA os compostos do conjunto foram separados em dois grupos: A, com 33,8 % de similaridade, e B, com 48,8 % de similaridade (figura 58A).

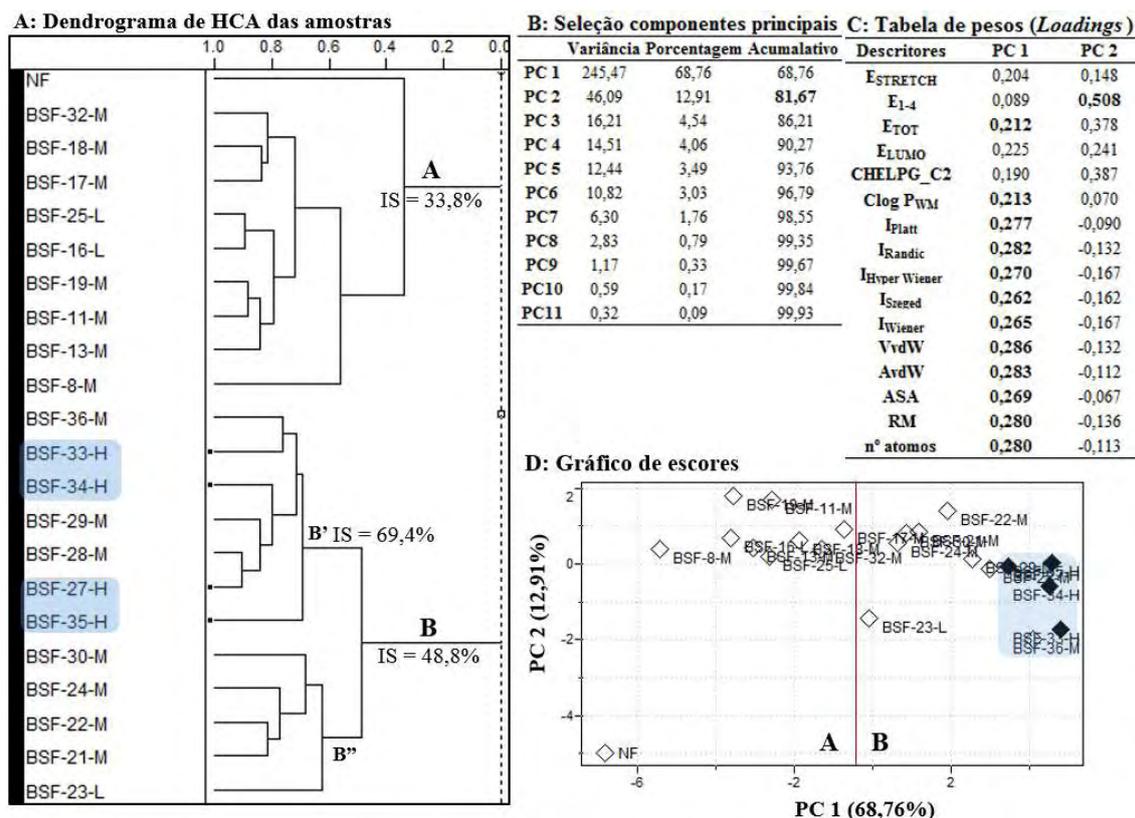


Figura 58. Resultados da análise exploratória do conjunto de 21 compostos derivados furfuralidênicos benzeno substituídos e nifuroxazida. (A) Dendrograma do HCA de amostras: compostos agrupados em dois grandes grupos: A (IS de 33,8%, compostos menos volumosos e menos ativos) e B (IS = 48,8%, compostos volumosos e hidrofóbicos). Quadrados pretos (■) ao final das linhas do dendrograma indicam os compostos mais ativos. IS: índices de similaridade; H: compostos com alta atividade frente a forma epimastigota de *T. cruzi*; M: compostos com atividade mediana; L: compostos com baixa atividade. Resultados da análise de PCA: (B) seleção de fatores ou de PC; (C) tabela de pesos (*loadings*), em destaque descritores com alto valor de pesos; (D) gráfico de escores entre PC1 e PC2, que somaram 81,67% da variância total dos dados originais. A linha contínua vermelha divide os compostos de forma correspondente aos agrupados no HCA, grupos A e B. Os compostos mais ativos estão em losango preto (◆).

O agrupamento A é constituído por compostos com valores de ClogP (lipofilicidade) mais baixos, mais hidrofílicos. Neste grupo encontram-se compostos de baixa atividade frente à forma epimastigota do *T. cruzi*, além da NF. Exceção foi o composto BSF-23 [-C₆H₄-4-N(CH₃)₂], que se agrupou em B, no subgrupo B'', provavelmente devido à similaridade topológica, principalmente com o composto BSF-21 [-C₆H₄-4-*iso*-C₃H₇], como verificado na análise realizada do conjunto de N = 35.

No agrupamento B, os compostos de maior atividade foram agrupados no subgrupo B', compartilhando 69,4 % de similaridade. O composto BSF-28 [-C₆H₄-4-*terc*-C₄H₉], de atividade biológica moderada, foi agrupado com o composto BSF-27 [-C₆H₄-4-C₄H₉] (IS = 0,907), por serem isômeros constitucionais com alteração na cadeia, como observado na análise para N = 35. O composto BSF-29 [-C₆H₄-4-OC₃H₇] se agrupou com os compostos BSF-27 e BSF-28 (IS = 0,798) devido à semelhança estrutural.

De acordo com a seleção de componentes principais (figura 58B) as duas primeiras PC descreveram 81,67 % da variância total dos dados originais, sendo 68,76 % para a PC1 e 12,91 % para a PC2. Na tabela de pesos ou *loadings* (figura 58C) os valores de pesos para os descritores termodinâmicos (E_{TOT}), geométricos e intrínseco (ASA, A_{vdW} e V_{vdW}), topológicos (I_{Platt}, I_{Randic}, I_{Hyper Wiener}, I_{Szeged} e I_{Wiener}), de hidrofobicidade (ClogP_{WM}), mistos (RM) e constitucionais (n° de átomos) foram maiores em PC1 (valores absolutos entre 0,21 e 0,29), salientando sua influência no processo de separação dos compostos. Para PC2, o descritor termodinâmico E₁₋₄ apresentou o maior valor de peso (0,508) tendo papel importante na discriminação das amostras.

No gráfico de escores (Fig. 58D), os compostos com valores mais positivos em PC1 correspondem aos compostos agrupados no grupo B do HCA de amostras (ver linha vermelha separando compostos dos grupos A e B). Os compostos mais ativos correspondem aos losangos em preto na figura 58D. Os demais compostos do subgrupo B' estão destacados em azul.

Considerando que PC1 explica 68,76 % dos dados originais e os descritores que influenciaram mais o processo de separação, pode-se inferir que compostos mais volumosos e hidrofóbicos favorecem a atividade frente à forma epimastigota do *T. cruzi*, como observado na análise do conjunto com N = 35.

O diagnóstico de amostras atípicas para este conjunto de N = 22, considerando o intervalo de confiança de 92 %, está apresentado na figura 60. Os compostos não ultrapassaram o limite considerado, indicando que as propriedades moleculares consideradas na análise foram suficientes para descrever os compostos do conjunto de dados.

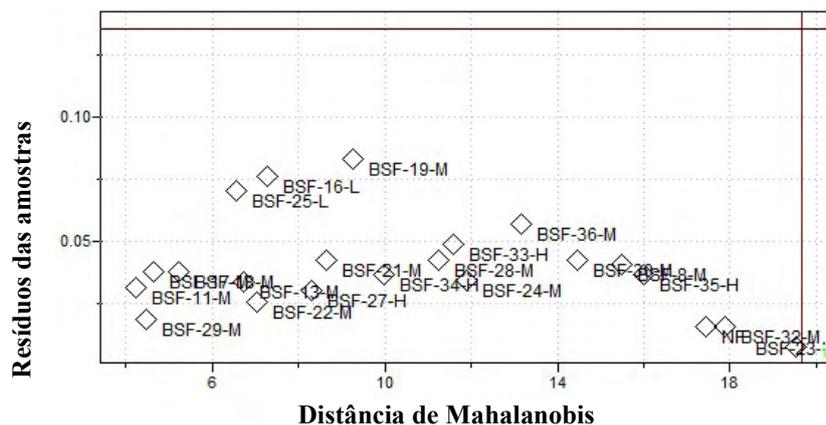


Figura 59. Gráfico da distância residual das amostras em relação à distância de Mahalanobis do conjunto de 21 compostos 5-nitrofurfurilidênicos e nifuroxazida (N = 22). Considerado 11 componentes principais na análise.

Comparando os dados obtidos na análise exploratória do conjunto total de compostos com N = 35 e dos subconjuntos com e sem substituintes fenila, N = 22 e N = 13, é observado que os descritores ASA e ASA_H (geométricos), índices topológicos, RM (misto; estereoquímico/hidrofóbico) e ClogP_{WM} (hidrofobicidade) foram selecionados como importantes no processo de separação, com valores altos de pesos em PC1, e estariam relacionados à atividade anti-*T. cruzi*. As propriedades estereoquímicas e de partição (ClogP) de dois compostos, BSF-2 [-CH₂CN] (não benzeno substituído com baixa atividade biológica) e BSF-35 [-C₆H₄-4-C₆H₄] (entre os mais ativos), podem ser visualizadas nas figuras 60A e 60B, respectivamente.

Na figura 60A, a superfície de acessibilidade ao solvente foi calculada e gerada com o programa *ViewerLite 5.0*, utilizando uma molécula de água, de 1,4 Å de raio, como sonda. A superfície molecular traduz a forma molecular dos compostos. A diferença de forma (relacionada ao volume) entre os dois compostos é evidente. O composto mais ativo (BSF-35) é mais volumoso. Os valores dos descritores de área superficial de acessibilidade ao solvente, ASA e ASA_H, também apresentaram valores mais elevados para o composto BSF-35. As regiões das estruturas salientadas com pontos pretos correspondem às áreas de átomos hidrofóbicos, que equivale ao descritor ASA_H ($|qi| < 0.125$; $|qi|$ é o valor absoluto de cargas parciais dos átomos).

Os mapas de potencial lipofílico (MPL) (figura 60B) foram calculados sobre a superfície molecular dos compostos (*SYBYL 8.0*) e fornece a informação do balanço hidrófilo/lipófilo na estrutura molecular. A cor azul corresponde às regiões mais

hidrofílicas e a cor marrom às regiões mais hidrofóbicas. Para o composto BSF-35 (mais ativo), a cor marrom está concentrada principalmente na região do grupo substituinte.

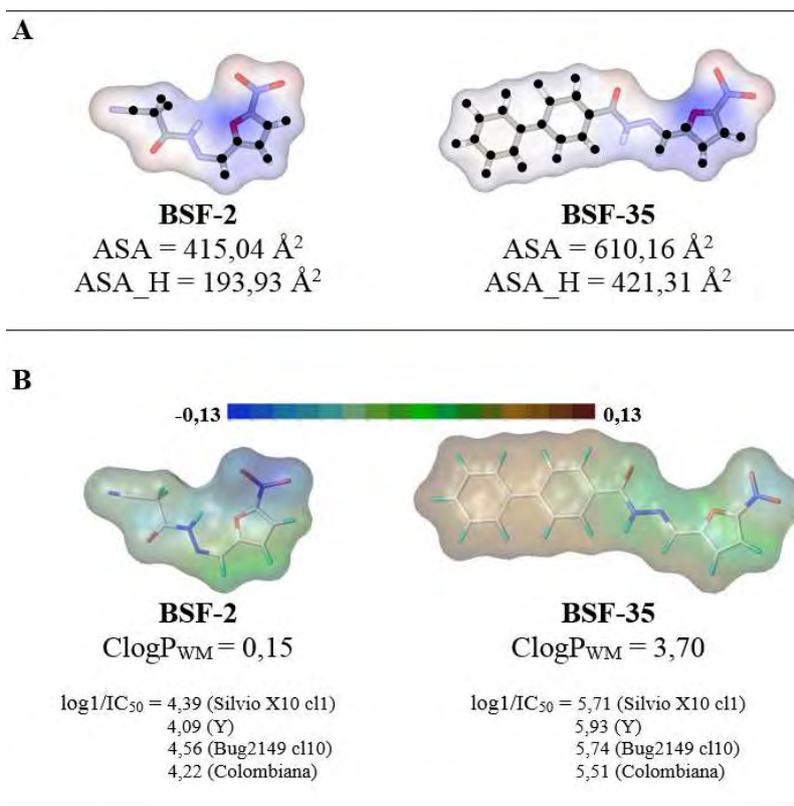


Figura 60. Visualização de propriedades estereoquímicas / geométricas e hidrofóbicas para os compostos BSF-2 e BSF35: (A) A propriedade ASA e ASA_H foi visualizada no programa ViewerLite 5.0 (superfície ASA gerada com solvente de raio 1,4 Å, água) e apresentada em formato transparente. Pontos pretos (●) correspondem aos átomos hidrofóbicos, referente a ASA_H ($|q_i| < 0.125$; em que $|q_i|$ é o valor absoluto de cargas parciais dos átomos). Os compostos são apresentados na forma de bastão (átomos de carbono em cinza, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul e hidrogênio são mostrados em branco), log₁/IC₅₀ (M) das quatro cepas na forma epimastigota do *T. cruzi*; (B) Mapa de potencial lipofílico foi calculado no programa SYBYL 8.0 e o esquema de cores mostra regiões hidrofóbicas em marrom (0,13) e regiões hidrofílicas na cor azul (-0,13); os valores Clog P foram calculados usando o software Os compostos são apresentados no modelo bastão (átomos de carbono estão na cor cinza claro, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio em verde).

Os dados obtidos na análise exploratória foram de grande valia pois permitiram visualizar padrões entre o conjunto total de compostos e respectivos subconjuntos, salientando descritores e características moleculares para os compostos que apresentaram

diferentes gradientes de atividade (mais e menos ativos) frente à forma epimastigota do *T. cruzi*.

6.4.4 Análise QSAR multivariada

Assim como na análise exploratória, os dados considerados para a construção dos modelos QSAR foram tratados e selecionados previamente, como descrito na seção Materiais e Métodos. Provedo-se dos dados de distribuição de descritores em relação à atividade biológica (gráficos de dispersão; programa *Pirouette 3.11*), apenas descritores que não apresentaram correlação (por ex. descritor x25, figura 53) foram descartados. Tal análise foi realizada para cada cepa, de forma independente. Os descritores retirados foram os mesmos para as 4 cepas e estão listados a seguir: GAP, CHELPG_N (-NO₂), CHELPG_C5, ϕ 1 (C9-N8-N7=C6), ϕ 2 (O9=C9-N8-H8), ϕ 3 (N8-N7=C6-H6), ϕ 4 (N8-N7=C6-C2), Dreiding, PSA, HBD, HBA e RB. Os gráficos de dispersão estão disponíveis no Anexo 7.

Com objetivo de visualizar a frequência dos valores de \log_1/IC_{50} para cada cepa de *T. cruzi* estudada, assim como a faixa de variação da atividade em unidades logarítmicas para o conjunto de compostos, mais a nifuroxazida (N = 35), construíram-se histogramas e gráficos de dispersão, que estão apresentados na figura 61. Observa-se que os histogramas se apresentam de forma simétrica, para as cepas Silvio X10 cl1 e Y, e assimétrica para as demais cepas. Nenhum deles apresentou distribuição bimodal.

Quanto aos intervalos de \log_1/IC_{50} , na cepa Silvio X10 cl1 a variação foi entre 5,71 a 3,52, na cepa Y entre 5,93 a 3,52, na cepa Bug 2149 cl10 entre 5,74 a 3,52 e a na cepa Colombiana variou entre 5,61 a 3,73. Preconiza-se que a obtenção de modelos de previsão é facilitada em conjuntos de dados que apresentam maiores intervalos de atividade, geralmente de 2 ou mais unidades de logarítmicas (ABRAHAM, 1994). A única cepa que ficou abaixo do valor de duas unidades logarítmicas foi a cepa Colombiana, com diferença de 1,88. As demais cepas apresentaram diferenças superiores a 2 unidades logarítmicas.

A classificação dos intervalos de atividade linearizada foi realizada na etapa de análise exploratória de dados e foi considerada na etapa de construção de modelos QSAR.

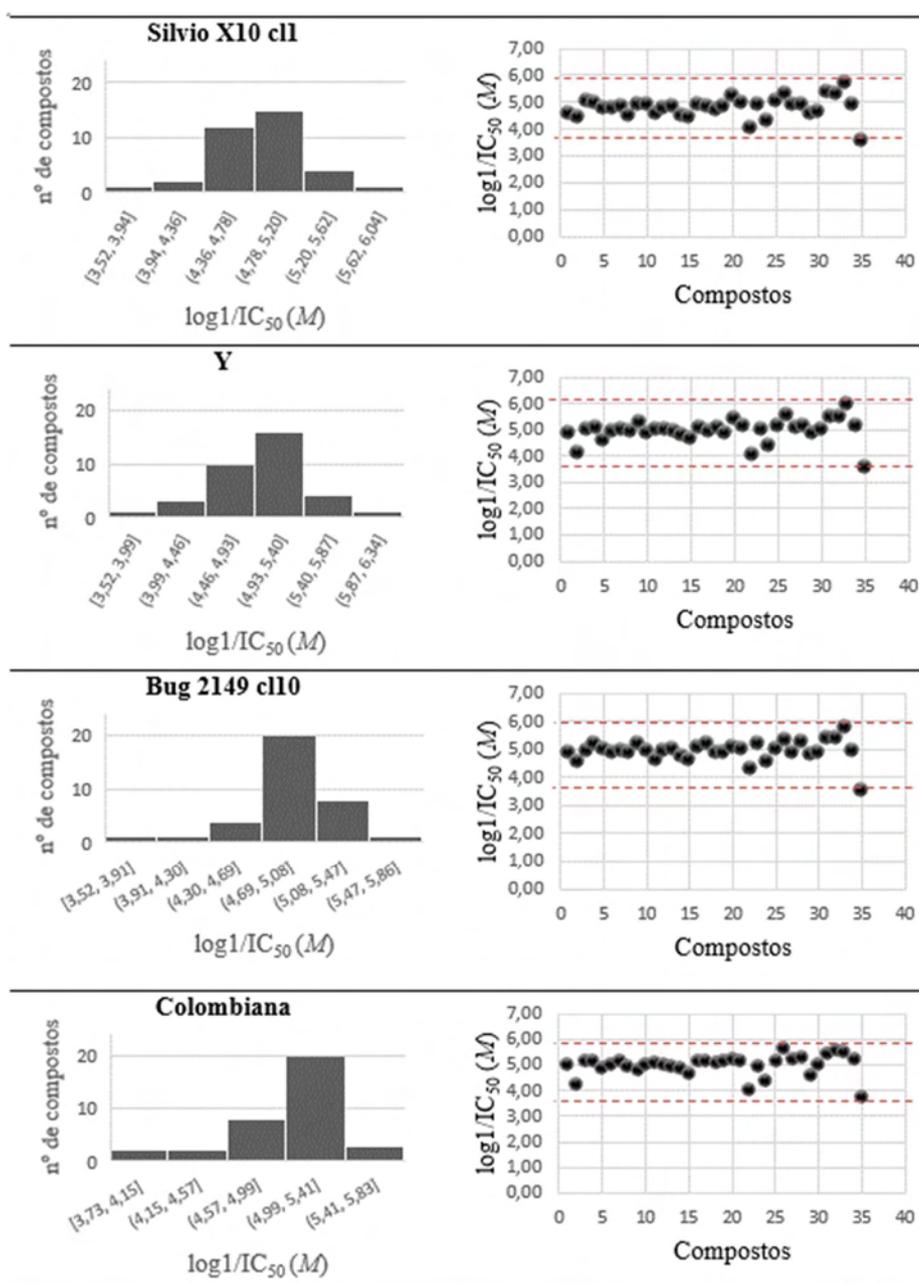


Figura 61. Distribuição dos dados de atividade anti-*T. cruzi*, convertida em potência ($\log 1/IC_{50}$), de 34 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota das cepas Silvio X10 cl1, Y, Bug 2149 cl10 e Colombiana. Histogramas demonstram a distribuição de frequências de compostos em relação a $\log 1/IC_{50}$. Gráficos apresentam a dispersão dos valores de $\log 1/IC_{50}$, linhas pontilhadas vermelhas delimitam a faixa de dispersão.

Outras etapas de seleção de variáveis foram realizadas no programa QSAR modeling (MARTINS, FERREIRA, 2013). Com o filtro inicial, restaram 44 descritores

(variáveis independentes). Como foram utilizados descritores de diferentes naturezas, os dados foram autoescalados (pré-processamento).

Os valores absolutos dos coeficientes de correlação linear de Pearson entre descritores e atividade linearizada, para as quatro cepas independentes, variaram entre 0,5 e 0,1.

No programa QSAR *modeling* foram retirados descritores considerando como valor (absoluto) de corte, referente à correlação linear com a atividade biológica, abaixo de 0,3, que é o valor de corte mínimo indicado para gerar modelos QSAR (KIRALJ, FERREIRA, 2009). Como resultado deste corte, obtiveram-se 19 descritores selecionados para a cepa Silvio X10 c11, 22 para a cepa Y, e 17 descritores para as cepas Bug 2149 c110 e Colombiana. As matrizes de dados resultantes foram submetidas à etapa de seleção de variáveis (com método de seleção de preditores ordenados, OPS) e de construção de modelos QSAR (regressão por quadrados mínimos parciais, PLS). As condições utilizadas para gerar os modelos foram as descritas na seção Materiais e Métodos. Os dados estatísticos de validação interna para cada cepa estão apresentados na tabela 26.

Valores estatísticos mínimos para modelos de regressão aceitáveis em QSAR são $Q^2_{LOO} > 0,5$ e $R^2 > 0,6$ (TROPSHA, GRAMATICA, GOMBAR, 2003; GOLBRAIKH, TROPSHA, 2002) e a diferença entre as duas medidas estatísticas não deve ultrapassar 0,2 ou 0,3. Os valores de R^2 indicam o ajuste do modelo e de Q^2_{LOO} a capacidade de previsão interna do modelo gerado com o conjunto de treinamento (FERREIRA, KIRALJ, 2011, KIRALJ, FERREIRA, 2009). De acordo com tais parâmetros de validação de modelos QSAR, não se obteve modelos válidos (tabela 26). A diferença entre os valores de R^2 e de Q^2_{LOO} ultrapassou 0,2, indicando o não sobreajuste do modelo. Além do mais, os valores de Q^2_{LOO} ficaram abaixo do valor limite de 0,5 e os de R^2 foram iguais (cepa Silvio X10 c11) ou abaixo de 0,6.

Tabela 26. Parâmetros estatísticos da análise QSAR multivariada para 34 compostos derivados do 5-nitrofurano e nifuroxazida frente às cepas Silvio X10 cl1, Y, Bug 2149 cl10 e Colombiana da forma epimastigota do *T. cruzi*

Parâmetros ^a	Dados da cepa Silvio X10 cl1	Dados da cepa Y	Dados da cepa Bug 2149 cl10	Dados da cepa Colombiana
N ^b	35	35	35	35
Q ² _{LOO} ^c	0,36	0,29	0,25	0,36
R ^{2d}	0,60	0,53	0,51	0,57
R ² -Q ² _{LOO} ^e	0,25	0,24	0,27	0,21
RMSECV ^f	0,31	0,37	0,31	0,31
RMSEC ^g	0,25	0,30	0,25	0,26
R _{cv} ^h	0,64	0,58	0,53	0,62
R _{cal} ⁱ	0,78	0,73	0,72	0,75
PRESS _{cv} ^j	3,41	4,71	3,46	3,36
PRESS _{cal} ^k	2,10	3,11	2,22	2,28
VL ^l	4	4	3	4

Equações não escaladas:

$$\text{Log1/IC}_{50} \text{ Silvio X10 cl1} = 7,89 + 0,00 I_{\text{Hyper Wiener}} - 0,01 \text{ MM} + 0,00 I_{\text{Szedged}} - 0,03 I_{\text{Harary}} + 0,31 \text{ ClogP}_{\text{WM}} - 0,01 V_{\text{vdW}} + 0,03 E_{\text{BEND}}$$

$$\text{Log1/IC}_{50} \text{ Y} = 3,63 + 0,04 I_{\text{Szedged}} + 0,00 I_{\text{Hyper Wiener}} - 0,16 I_{\text{Hyper Polarity}} + 0,27 \text{ClogP}_{\text{WM}} + 0,02 \text{ MM} - 0,01 I_{\text{Wiener}}$$

$$\text{Log1/IC}_{50} \text{ Bug 2149 cl10} = 7,09 + 0,01 \text{ ASA}_H - 0,07 \text{ RM} + 0,00 I_{\text{Hyper Wiener}} - 0,01 \text{ ASA} + 0,04 E_{\text{BEND}}$$

$$\text{Log1/IC}_{50} \text{ Colombiana} = 6,80 + 0,39 \text{ ClogP}_{\text{WM}} - 0,01 \text{ RM} + 0,00 I_{\text{Hyper Wiener}} - 0,01 \text{ MM} + 0,00 E_{\text{TOT}} + 0,29 E_{\text{LUMO}}$$

a: validação cruzada removendo uma amostra por vez (seleção OPS e regressão PLS);

b: número de variáveis independentes do conjunto;

c: coeficiente de correlação de validação cruzada;

d: coeficiente de determinação múltipla;

e: diferença entre R² e Q²_{LOO};

f: raiz quadrada do erro médio da validação cruzada;

g: raiz quadrada do erro da calibração;

h: coeficiente de correlação de Pearson da validação cruzada;

i: coeficiente de correlação de Pearson da calibração;

j: soma dos quadrados dos erros de predição da validação cruzada;

k: soma dos quadrados dos erros de predição da calibração;

l: número de variáveis latentes.

Na etapa de análise exploratória de dados, observou-se a separação dos compostos benzeno e não-benzeno substituídos. Então, optou-se na presente etapa do estudo de realizar a análise QSAR multivariada para o subconjunto de compostos benzeno substituídos (N = 22; 21 compostos + NF). No dendrograma do HCA de amostras (figura 62), destacam-se os compostos com substituintes fenila dentre o conjunto total.

A construção de modelos QSAR para conjunto completo (N = 35) não se mostrou adequada, provavelmente, porque as propriedades moleculares calculadas (2D; limitação)

não foram suficientes para traduzir a variedade estrutural dos compostos do conjunto investigado.

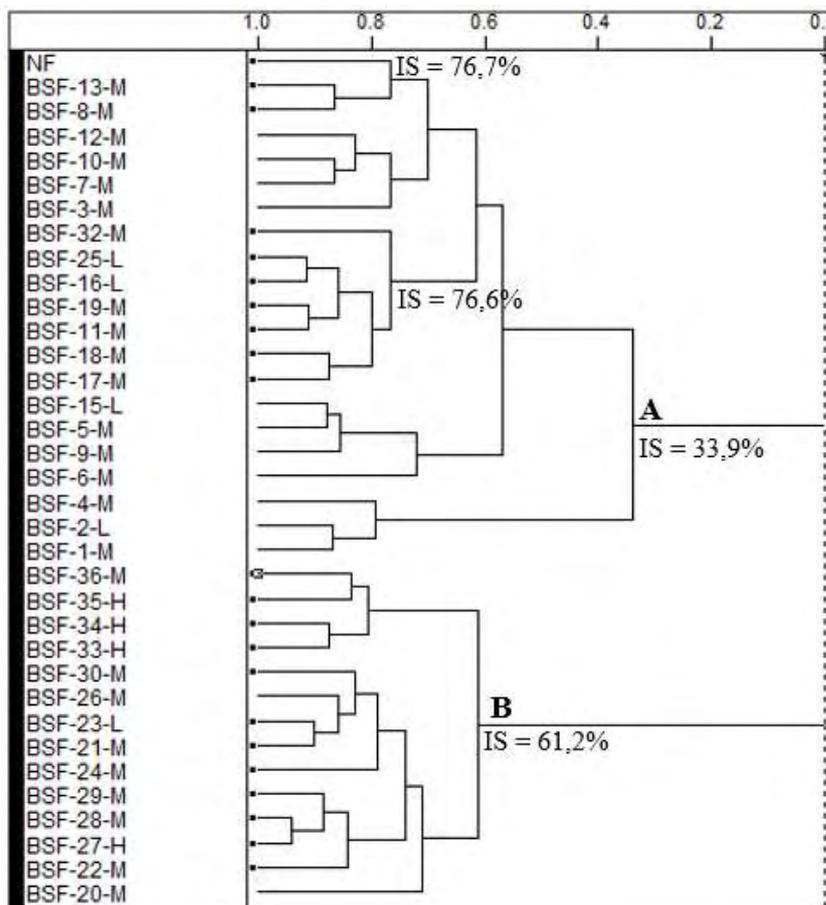


Figura 62. Dendrograma do HCA de amostras: compostos benzeno substituídos indicados com quadrados pretos (■) ao final das linhas do dendrograma. IS: índice de similaridade; H: compostos com alta atividade frente a forma epimastigota de *T. cruzi*; M: compostos com atividade mediana; L: compostos com baixa atividade.

A análise QSAR multivariada para o conjunto $N = 22$ iniciou-se com a análise de distribuição da atividade biológica linearizada. Construíram-se os histogramas e gráficos de dispersão (figura 63). Os histogramas se apresentaram de forma simétrica para a cepa Silvio X10 c11 e assimétrica para as demais cepas. Quanto aos intervalos de \log_1/IC_{50} as faixas (valores) não foram alteradas em relação ao conjunto total. A classificação dos intervalos de atividade linearizada (compostos mais ativos, de atividade moderada e menos ativos) foi mantida para todas as análises de relações estrutura-atividade.

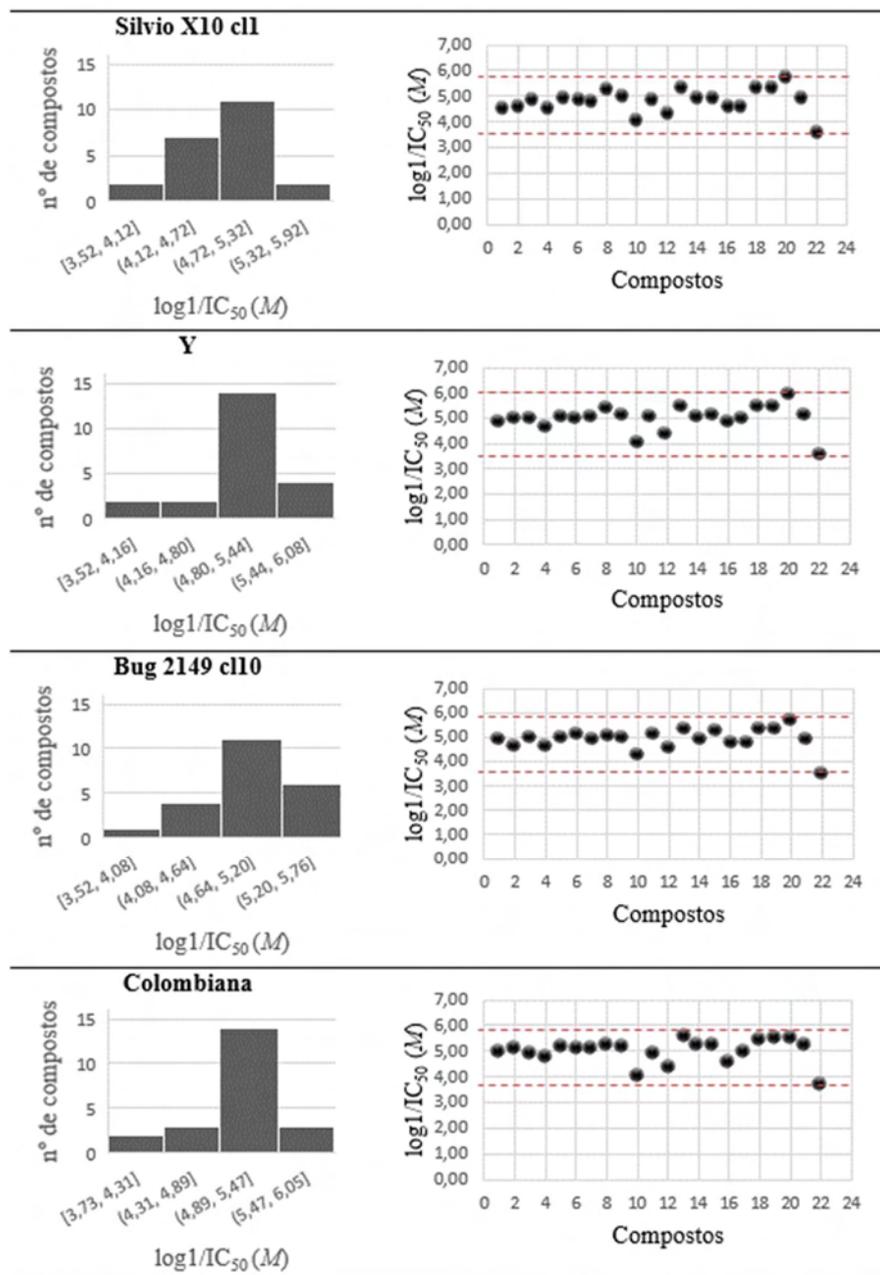


Figura 63. Distribuição dos dados de atividade anti-*T. cruzi*, convertida em potência ($\log 1/IC_{50}$), de 21 compostos benzeno substituídos e nifuroxazida frente a forma epimastigota das cepas Silvio X10 cl1, Y, Bug 2149 cl10 e Colombiana. Histogramas demonstram a distribuição de frequências de compostos em relação a $\log 1/IC_{50}$. Gráficos apresentam a dispersão dos valores de $\log 1/IC_{50}$, linhas pontilhadas vermelhas delimitam a faixa de dispersão.

A seleção de descritores por gráficos de dispersão (cada descritor em relação à atividade biológica) para os conjuntos de $N = 22$ foi realizada na etapa de análise exploratória, conforme já descrito, e os descritores retirados foram iguais para as 4 cepas

[E_{Hb} , GAP, CHELPG_N (-NO₂), CHELPG_C5, ϕ_1 (C9-N8-N7=C6), ϕ_2 (O9=C9-N8-H8), ϕ_3 (N8-N7=C6-H6), ϕ_4 (N8-N7=C6-C2), Pi-energy, PSA, HBD, HBA e RB]. A tabela final de dados continha 43 descritores (variáveis independentes), que foram autoescaladas no programa QSAR *modeling*.

Os valores de correlação linear de Pearson entre descritores e atividade linearizada para as quatro cepas independentes variaram entre 0,5 e 0,1 para a cepa Colombiana e entre 0,7 e 0,1 para as demais cepas. Realizou-se o corte de correlação linear no valor absoluto de 0,3 para todas as cepas. Como resultado, obtiveram-se 32 descritores selecionados para a cepa Silvio X10 c11 e 30 descritores para as demais cepas.

As matrizes de dados resultantes foram submetidas às etapas de seleção de variáveis (método de seleção de preditores ordenados, OPS) e construção de modelos QSAR (regressão por quadrados mínimos parciais, PLS). Consideraram-se as seguintes condições: número máximo de VL = 4, para as quatro cepas (N = 22); número de VL para o modelo = 3, para todas as cepas, que foi atribuído após verificação dos parâmetros de RMSEC e Q² na validação cruzada removendo uma amostra; janela de 3 descritores (número inicial de descritores considerados no OPS), com incremento de 1; 90 % das variáveis analisadas; escolha de todos os vetores para ordenar os descritores; e classificação dos dez melhores modelos por Q²_{LOO}.

A escolha do melhor modelo considerou os valores de Q²_{LOO}, que se refere à capacidade de previsão interna do modelo gerado com o conjunto de treinamento referente a capacidade preditiva, bem como os valores de R², a fim de verificar o ajuste do modelo. A diferença entre Q²_{LOO} e R² (Q²_{LOO} - R² < 0,2) também foi considerada, além de presença de amostras atípicas.

O melhor modelo gerado para a cepa Silvio X10 c11 (equação 9) apresentou 3 descritores e 1 VL, com 71,7 % da informação original. Os descritores selecionados foram o coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa *Marvin Beans 16.5.30.0* (ClogP_{WM}) e os parâmetros termodinâmicos ESTRECTCH (contribuição intramolecular de energia de deformação axial e E_{TOT} (energia potencial total).

Modelo PLS gerado para cepa Silvio X10 c11:

$$\text{Log1/IC}_{50} = 2,86 + 0,24(\text{ClogP}_{\text{WM}}) + 0,03(\text{ESTRECTCH}) + 0,01(\text{E}_{\text{TOT}})$$

[Equação 9]

$N = 22$; $Q^2_{\text{LOO}} = 0,72$; $\text{RMSECV} = 0,25$; $R_{\text{cv}} = 0,85$; $\text{PRESS}_{\text{cv}} = 1,36$ ($\text{SS}_Y = 4,82$);

$R^2 = 0,77$; $\text{RMSEC} = 0,23$; $R_{\text{cal}} = 0,88$; $\text{PRESS}_{\text{cal}} = 1,12$.

Outliers = 0 (limite de confiança de 95 %)

Os valores de Q^2_{LOO} e R^2 foram 0,72 e 0,77, respectivamente, e a diferença entre tais medidas foi 0,05, o que indica que não há sobreajuste no modelo. Os valores de RMSEC e RMSECV , ou SEV , foram 0,23 e 0,25, respectivamente. Os valores de PRESS_{cv} devem ser menores do que a soma dos quadrados dos valores de resposta (SS_Y) (WOLD, ERIKSSON, 1995): $\text{PRESS}_{\text{cv}} = 1,36$ e $\text{SS}_Y = 4,82$.

Na tabela 27 encontram-se as diferenças da atividade linearizada calculada pelo modelo ($\text{pIC}_{50\text{calc}}$) e a atividade experimental ($\text{pIC}_{50\text{exp}}$) (resíduos), que não excederam dois desvios padrão da média dos resíduos do modelo (limite de confiança de 95 %). Logo, não houve amostras atípicas (*outliers*). O gráfico de valores de atividades calculada e experimental está apresentado na figura 64.

Tabela 27. Atividade linearizada experimental e calculada pelo modelo de 21 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota da cepa Silvio X10 cl1

Compostos	Log1/IC ₅₀ (cal)	Log1/IC ₅₀ (exp)	Resíduos
BSF-8-M	4,58	4,51	0,08
BSF-11-M	4,63	4,56	0,07
BSF-13-M	4,59	4,82	0,23
BSF-16-L	4,38	4,43	0,05
BSF-17-M	4,77	4,91	0,14
BSF-18-M	4,47	4,84	0,37
BSF-19-M	4,60	4,69	0,09
BSF-21-H	4,88	5,22	0,34
BSF-22-M	5,40	4,99	0,41
BSF-23-L	4,27	4,00	0,27
BSF-24-M	4,85	4,86	0,01
BSF-25-L	4,44	4,28	0,16
BSF-27-H	5,21	5,32	0,12
BSF-28-M	5,20	4,86	0,34
BSF-29-M	4,97	4,89	0,08
BSF-30-M	4,57	4,56	0,01
BSF-32-M	4,68	4,59	0,09
BSF-33-H	5,20	5,36	0,17
BSF-34-H	5,01	5,29	0,28
BSF-35-H	5,61	5,71	0,10
BSF-36-M	4,91	4,91	0,00
NF	3,60	3,52	0,08
		DP	0,20
		2DP	0,40

Modelo obtido no programa QSAR *modeling* utilizando como métodos de seleção e regressão OPS e PLS. Log1/IC₅₀ (exp): atividade linearizada experimental; Log1/IC₅₀ (cal): atividade linearizada calculada; DP: desvio padrão dos resíduos; 2DP: duas vezes o desvio padrão dos resíduos.

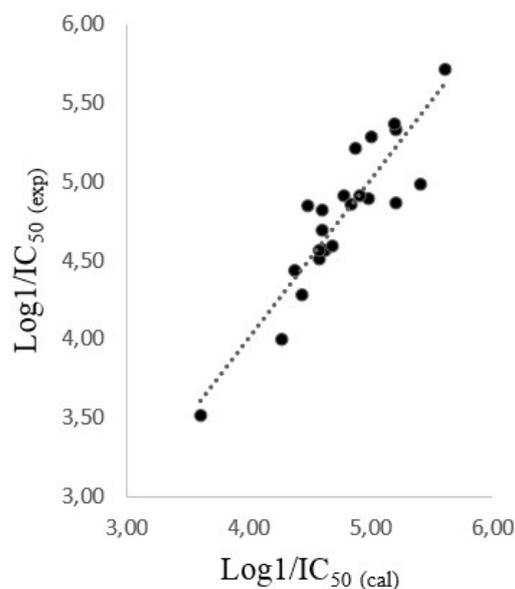


Figura 64. Dispersão da atividade linearizada experimental (Log1/IC₅₀ (exp)) e calculada pelo modelo (Log1/IC₅₀ (cal)) de 21 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota da cepa Silvio X10 cl1. Modelo obtido no programa QSAR *modeling* utilizando como métodos de seleção e regressão OPS e PLS. Linha pontilhada representa a linha de tendência linear dos dados.

No procedimento de validação cruzada LNO, recomenda-se que pelo menos até 20 a 30 % das amostras do conjunto de dados sejam retiradas para verificar a robustez do modelo, em conjuntos pequenos. No caso de réplicas, o valor de dois desvios padrão da média das réplicas não deve ultrapassar 0,1, incluindo o N crítico (KIRALJ, FERREIRA, 2009). No presente conjunto de dados, o processo foi desenvolvido em triplicata e o N crítico foi alcançado quando 50 % das amostras (11 compostos) foram retiradas. Ainda, os valores médios de Q²_{LNO} e Q²_{LOO} foram próximos. Os dados obtidos estão apresentados na tabela 28. Na figura 65, encontram-se ilustrados os valores médios de Q²_{LNO} à medida

que as amostras foram retiradas ($N = 2$ a 12 ; $N = 1$ corresponde ao modelo original, LOO; $Q^2_{LOO} = 0,72$, primeira linha da tabela 28).

Tabela 28. Resultados da validação cruzada do modelo PLS retirando N compostos (LNO) gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Silvio X10 cl1

N	Q^2_{LNO} (I)	Q^2_{LNO} (II)	Q^2_{LNO} (III)	Q^2_{LNO} média	2DP
Q^2_{LOO}	0,72	0,72	0,72	0,72	0,00
2	0,72	0,72	0,72	0,72	0,01
3	0,72	0,70	0,73	0,72	0,03
4	0,73	0,71	0,71	0,71	0,02
5	0,70	0,70	0,71	0,70	0,02
6	0,66	0,69	0,68	0,68	0,03
7	0,74	0,73	0,66	0,71	0,08
8	0,70	0,74	0,65	0,70	0,09
9	0,72	0,71	0,69	0,71	0,03
10	0,75	0,74	0,71	0,73	0,04
11	0,60	0,68	0,58	0,62	0,10
12	0,71	0,60	0,69	0,67	0,12

Valor crítico de retirada de compostos indicado em negrito. N: número de compostos removidos de cada vez na validação cruzada; Q^2_{LNO} : média da triplicata do coeficiente de correlação de validação cruzada retirando N compostos; LNO: *leave-N-out*; DP: desvio padrão da triplicata dos valores de Q^2_{LNO} ; 2DP: duas vezes o desvio padrão.

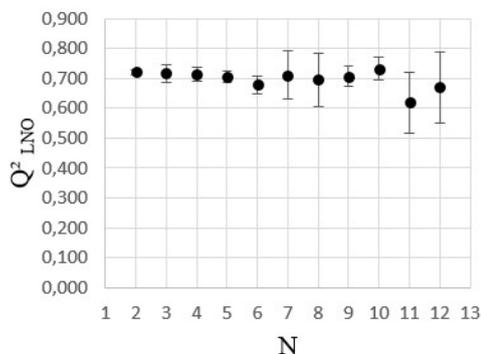


Figura 65. Resultados da validação cruzada do modelo PLS retirando N compostos (LNO), gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Silvio X10 cl1. Resultados apresentados em triplicata e desvio padrão; N: número de compostos removidos de cada vez na validação cruzada; Q^2_{LNO} : coeficiente de correlação de validação cruzada retirando N compostos; LNO: *leave-N-out*.

O procedimento de aleatorização da atividade linearizada (vetor y), no programa QSAR *modeling*, foi conduzido em 50 corridas ou aleatorizações, em triplicata, para verificar a se o modelo original (“real”) foi obtido por chance ou ao acaso. Os resultados foram avaliados de acordo com os critérios descritos na seção Materiais e Métodos, item 5.4.4. Os dados obtidos estão apresentados na figura 66. Os valores de $R^2_{y_{rand}}$ e $Q^2_{LOO_{y_{rand}}}$ foram menores de 0,4 e de 0,1, respectivamente (figura 66A), o que indica correlação tolerável (TIMMERMAN *et al.*, 2008, ERIKSSON *et al.*, 2003). Todos os valores obtidos na aleatorização referem-se a modelos de má qualidade e inferiores ao modelo original (dados do modelo original destacado em vermelho na figura 66A).

Na figura 66B estão apresentados os dados relacionados ao coeficiente de correlação de Pearson entre os dados de resposta embaralhados e do modelo original para 50 corridas. Nos gráficos $Q^2_{(y_{rand})}$ versus $R_{(y_{rand},y)}$ e $R^2_{(y_{rand})}$ versus $R_{(y_{rand},y)}$, os valores de

interceptos foram de $-0,41$ e $0,06$, respectivamente, e portanto, dentro dos valores considerados aceitáveis (ERIKSSON *et al.*, 2003).

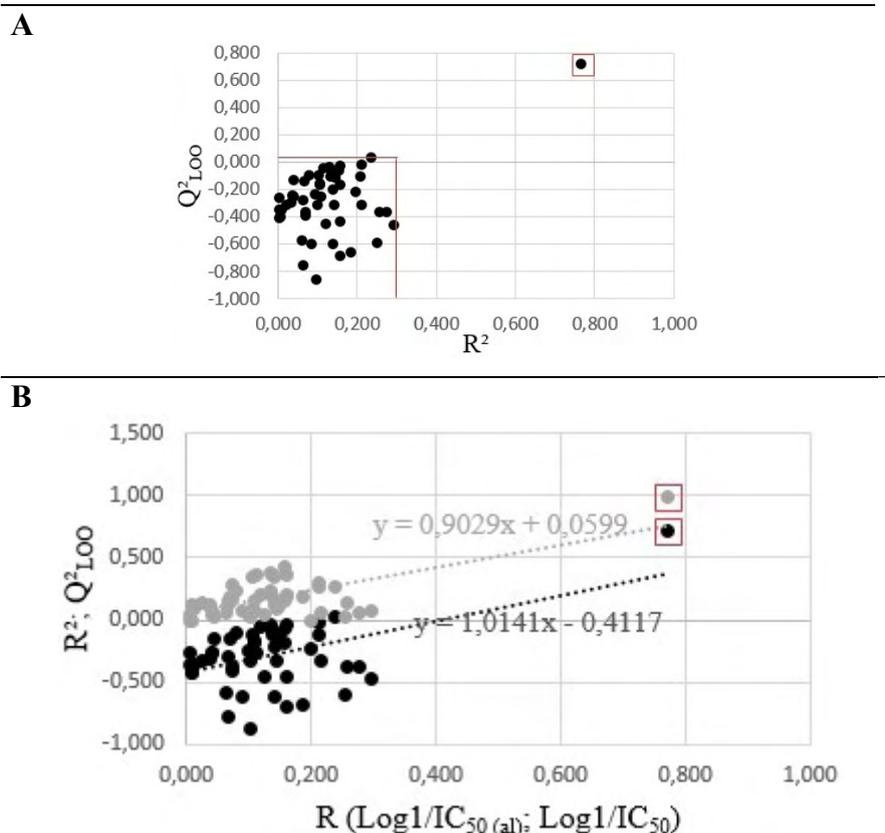


Figura 66. Testes de aleatorização do Log1/IC_{50} do modelo PLS gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Silvio X10 cl1. Gráfico (A): R^2 versus Q^2_{LNO} ; gráfico (B): $R(\text{log1/IC}_{50(\text{al})}; \text{log1/IC}_{50})$ versus R^2 e Q^2_{LOO} . R^2 : coeficiente de determinação múltipla; Q^2_{LOO} : coeficiente de correlação de validação cruzada retirando um composto; R : coeficiente de correlação linear; $\text{Log1/IC}_{50(\text{al})}$: atividade linearidade e aleatorizada. Linha vermelha em (A) delimita os valores de R^2 e Q^2_{LOO} encontrados após aleatorização da atividade. Dispersão do R^2 em cinza e Q^2_{LOO} em preto. Valores destacados com quadrados vermelho são os valores obtidos no modelo original.

Outro aspecto a ser considerado na avaliação dos modelos de QSAR é a compatibilidade entre os sinais de R (coeficiente de correlação de Pearson) de cada descritor com os sinais dos respectivos coeficientes no modelo. Sinais inversos indica falta de consistência do modelo. De acordo com a tabela 29, os valores de R e dos coeficientes do modelo para cada descritor foram compatíveis quanto aos sinais. Tal dado também foi observado nos sinais dos valores de pesos na análise de PCA (figura 58C).

Então, o modelo gerado é consistente em termos de informação conferida pelas propriedades moleculares presentes na equação.

Tabela 29. Coeficientes lineares de Pearson e coeficientes dos descritores do modelo PLS gerado para 21 compostos e NF frente a cepa Silvio X10 cl1

	R	Coeficientes do modelo
ESTRETCH^a	0,748	0,031
ETOT^b	0,737	0,013
ClogP_{WM}^c	0,739	0,240

R: correlação linear de Pearson; a: contribuição de energia intramolecular de deformação axial; b: Energia potencial total (soma de todas as contribuições de energia intramolecular); e c: coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa, considerado pesos iguais para os métodos de VISWANADHAN *et al.*, 1989, KLOPMAN *et al.*, 1993 e PHYSPROP[®] database.

Com objetivo de identificar se os descritores fornecem informações independentes ao modelo calculou-se a matriz de correlação cruzada entre pares de descritores do modelo (tabela 29). Os valores absolutos de R foram menores que 0,7 (TIMMERMAN *et al.*, 2009), indicando que cada descritor fornece informação única ao modelo.

Tabela 30. Matriz de correlação linear cruzada dos descritores do modelo PLS gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Silvio X10 cl1

	ESTRETCH	ETOT	ClogP _{WM}
ESTRETCH^a	1		
ETOT^b	0,665	1	
ClogP_{WM}^c	0,553	0,509	1

a: contribuição de energia intramolecular de deformação axial; b: Energia potencial total (soma de todas as contribuições de energia intramolecular); c: coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa, considerado pesos iguais para os métodos de VISWANADHAN *et al.*, 1989, KLOPMAN *et al.*, 1993 e PHYSPROP[®] database.

O melhor modelo gerado para a cepa Y (equação 10) apresentou 4 descritores e 2 VL, com 72,57 % da informação original. Os descritores selecionados foram o coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa *Marvin Beans 16.5.30.0* (ClogP_{WM}) e os parâmetros termodinâmicos E_{ESTRETCH} (contribuição intramolecular de

energia de deformação axial e E_{1-4} (contribuição de energia intramolecular do tipo 1-4) e CHELPG_C2 (carga CHELPG do átomo de carbono 2).

Modelo PLS gerado para cepa Y:

$$\text{Log1/IC}_{50} = 1,67 + 0,23(\text{ClogP}_{\text{WM}}) + 0,02(E_{1-4}) + 0,03(\text{ESTRETCH}) + 5,23(\text{CHELPG_C2})$$

[Equação 10]

$N = 22$; $Q^2_{\text{LOO}} = 0,67$; $\text{RMSECV} = 0,29$; $R_{\text{cv}} = 0,82$; $\text{PRESS}_{\text{cv}} = 1,81$ ($\text{SS}_Y = 5,62$);

$R^2 = 0,74$; $\text{RMSEC} = 0,25$; $R_{\text{cal}} = 0,86$; $\text{PRESS}_{\text{cal}} = 1,42$.

Outliers = 0 (limite de confiança de 95 %)

Os valores de Q^2_{LOO} e R^2 foram 0,67 e 0,74, respectivamente, e a diferença entre tais medidas foi 0,04, o que indica que não há sobreajuste no modelo. Os valores de RMSEC e RMSECV, ou SEV, foram 0,25 e 0,29, respectivamente. Os valores de PRESS_{cv} devem ser menores do que a soma dos quadrados dos valores de resposta (SS_Y) (WOLD, ERIKSSON, 1995): $\text{PRESS}_{\text{cv}} = 1,81$ e $\text{SS}_Y = 5,62$.

Na tabela 31 encontram-se as diferenças da atividade linearizada calculada pelo modelo ($\text{pIC}_{50\text{calc}}$) e a atividade experimental ($\text{pIC}_{50\text{exp}}$) (resíduos), que não excederam dois desvios padrão da média dos resíduos do modelo (limite de confiança de 95 %). Logo, não houve amostras atípicas (*outliers*). O gráfico de valores de atividades calculada e experimental está apresentado na figura 67.

Tabela 31. Atividade linearizada experimental e calculada pelo modelo de 21 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota da cepa Y

Compostos	Log1/IC ₅₀ (cal)	Log1/IC ₅₀ (exp)	Resíduos
BSF-8-M	4,71	4,89	0,19
BSF-11-M	4,90	4,98	0,07
BSF-13-M	4,66	4,93	0,27
BSF-16-L	4,66	4,61	0,05
BSF-17-M	5,04	5,04	0,00
BSF-18-M	4,70	4,93	0,24
BSF-19-M	4,88	5,04	0,16
BSF-21-H	5,21	5,41	0,19
BSF-22-M	5,59	5,15	0,43
BSF-23-L	4,25	4,00	0,25
BSF-24-M	5,15	5,01	0,14
BSF-25-L	4,77	4,36	0,41
BSF-27-H	5,34	5,51	0,17
BSF-28-M	5,25	5,03	0,23
BSF-29-M	5,12	5,11	0,01
BSF-30-M	4,76	4,85	0,09
BSF-32-M	5,03	4,98	0,05
BSF-33-H	5,23	5,47	0,24
BSF-34-H	5,21	5,46	0,25
BSF-35-H	5,73	5,93	0,20
BSF-36-M	5,16	5,11	0,05
NF	3,49	3,50	0,01
		DP	0,21
		2DP	0,42

Modelo obtido no programa QSAR *modeling* utilizando como métodos de seleção e regressão OPS e PLS. Log1/IC₅₀ (exp): atividade linearizada experimental; Log1/IC₅₀ (cal): atividade linearizada calculada; DP: desvio padrão dos resíduos; 2DP: duas vezes o desvio padrão dos resíduos.

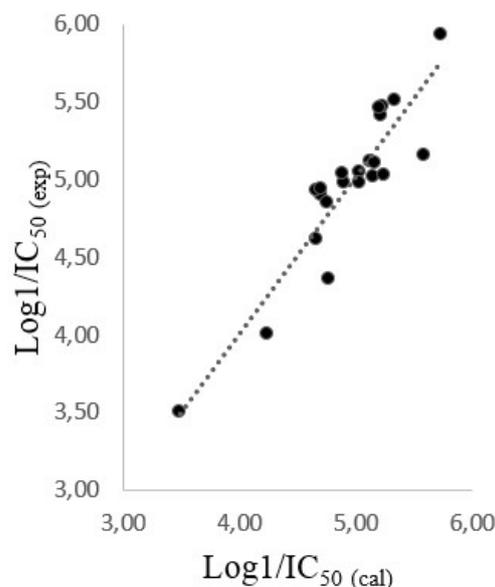


Figura 67. Dispersão da atividade linearizada experimental (Log1/IC₅₀ (exp)) e calculada pelo modelo (Log1/IC₅₀ (cal)) de 21 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota da cepa Y. Modelo obtido no programa QSAR *modeling* utilizando como métodos de seleção e regressão OPS e PLS. Linha pontilhada representa a linha de tendência linear dos dados.

No presente conjunto de dados, o processo foi desenvolvido em triplicata e o N crítico foi alcançado quando 36 % das amostras (8 compostos) foram retiradas. Ainda, os valores médios de Q²_{LNO} e Q²_{LOO} foram próximos. Os dados obtidos estão apresentados na tabela 32. Na figura 68, encontram-se ilustrados os valores médios de Q²_{LNO} à medida que as amostras foram retiradas (N = 2 a 11; N = 1 corresponde ao modelo original, LOO; Q²_{LOO} = 0,67, primeira linha da tabela 32).

Tabela 32. Resultados da validação cruzada do modelo PLS retirando N compostos (LNO) gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Y

N	Q ² _{LNO} (I)	Q ² _{LNO} (II)	Q ² _{LNO} (III)	Q ² _{LNO} média	2DP
Q ² _{LOO}	0,67	0,67	0,67	0,67	0,00
2	0,68	0,67	0,67	0,67	0,01
3	0,65	0,67	0,68	0,67	0,03
4	0,63	0,68	0,65	0,65	0,05
5	0,66	0,67	0,72	0,68	0,07
6	0,68	0,65	0,60	0,64	0,08
7	0,67	0,68	0,62	0,66	0,07
8	0,65	0,49	0,59	0,58	0,16
9	0,60	0,66	0,70	0,65	0,10
10	0,63	0,70	0,73	0,69	0,11
11	0,74	0,59	0,68	0,67	0,15

Valor crítico de retirada de compostos indicado em negrito. N: número de compostos removidos de cada vez na validação cruzada; Q²_{LNO}: média da triplicata do coeficiente de correlação de validação cruzada retirando N compostos; LNO: *leave-N-out*; DP: desvio padrão da triplicata dos valores de Q²_{LNO}; 2DP: duas vezes o desvio padrão.

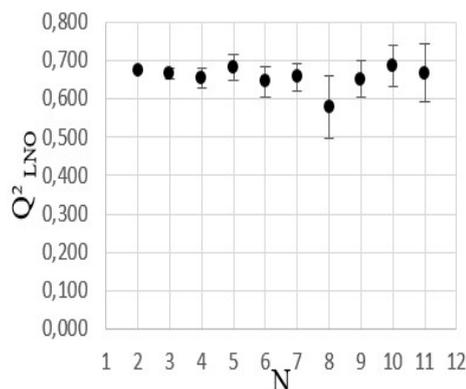


Figura 68. Resultados da validação cruzada do modelo PLS retirando N compostos (LNO), gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Y. Resultados apresentados em triplicata e desvio padrão; N: número de compostos removidos de cada vez na validação cruzada; Q²_{LNO}: coeficiente de correlação de validação cruzada retirando N compostos; LNO: *leave-N-out*.

Os dados obtidos no procedimento de aleatorização da atividade linearizada (vetor *y*) para este conjunto estão apresentados na figura 69. Os valores de R²_{yrand} e Q²_{LOOyrand} foram menores de 0,3 e de 0,1, respectivamente (figura 66A), o que indica correlação desprezível ao acaso (ERIKSSON *et al.*, 2003, TIMMERMAN *et al.*, 2008). Todos os valores obtidos na aleatorização referem-se a modelos de má qualidade e inferiores ao modelo original (dados do modelo original destacado em vermelho na figura 69A).

Na figura 69B estão apresentados os dados relacionados ao coeficiente de correlação de Pearson entre os dados de resposta embaralhados e do modelo original para 50 corridas. Nos gráficos Q²_(yrand) versus R_(yrand,y) e R²_(yrand) versus R_(yrand,y), os valores de interceptos foram de -0,55 e 0,05, respectivamente, e portanto, dentro dos valores considerados aceitáveis (ERIKSSON *et al.*, 2003).

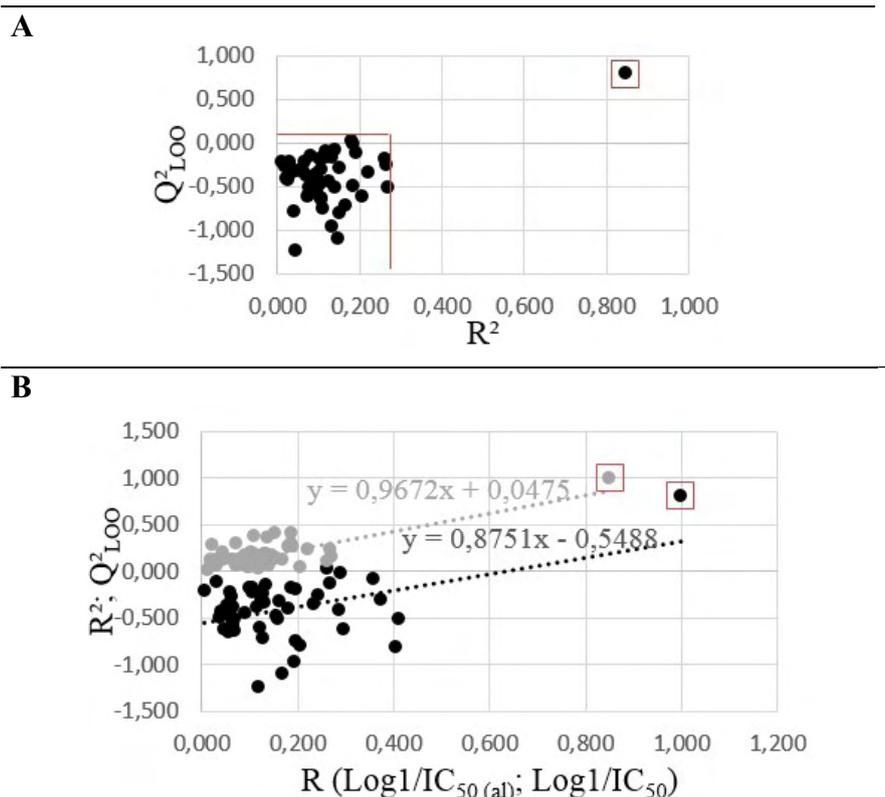


Figura 69. Testes de aleatorização do Log1/IC_{50} do modelo PLS gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Y. Gráfico (A): R^2 versus Q^2_{LNO} ; gráfico (B): $R(\text{log1/IC}_{50(\text{al})}; \text{log1/IC}_{50})$ versus R^2 e Q^2_{LOO} . R^2 : coeficiente de determinação múltipla; Q^2_{LOO} : coeficiente de correlação de validação cruzada retirando um composto; R: coeficiente de correlação linear; $\text{Log1/IC}_{50(\text{al})}$: atividade linearidade e aleatorizada. Linha vermelha em (A) delimita os valores de R^2 e Q^2_{LOO} encontrados após aleatorização da atividade. Dispersão do R^2 em cinza e Q^2_{LOO} em preto. Valores destacados com quadrados vermelho são os valores obtidos no modelo original.

Outro aspecto a ser considerado na avaliação dos modelos de QSAR é a compatibilidade entre os sinais de R (coeficiente de correlação de Pearson) de cada descritor com os sinais dos respectivos coeficientes no modelo. Sinais inversos indica a falta de consistência do modelo. De acordo com a tabela 33, os valores de R e dos coeficientes do modelo para cada descritor foram compatíveis quanto aos sinais. Tal dado também foi observado nos sinais dos valores de pesos na análise de PCA (figura 58C). Então, o modelo gerado é consistente em termos de informação conferida pelas propriedades moleculares presentes na equação.

Tabela 33. Coeficientes lineares de Pearson e coeficientes dos descritores do modelo PLS gerado para 21 compostos e NF frente a cepa Y

	R	Coeficientes do modelo
ESTRETCH ^a	0,707	0,029
E ₁₋₄ ^b	0,519	0,018
ClogP _{WM} ^c	0,720	0,232
CHELPG_C2 ^d	0,668	5,231

R: correlação linear de Pearson; a: contribuição de energia intramolecular de deformação axial; b: contribuição de energia intramolecular do tipo 1-4; c: coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa, considerado pesos iguais para os métodos de VISWANADHAN *et al.*, 1989, KLOPMAN *et al.*, 1993 e PHYSPROP© database; d: carga CHELPG do átomo de carbono 2.

Com objetivo de identificar se os descritores fornecem informações independentes ao modelo calculou-se a matriz de correlação cruzada entre pares de descritores do modelo (tabela 34). Os valores absolutos de R foram menores que 0,7 (TIMMERMAN *et al.*, 2009), indicando que cada descritor fornece informação única ao modelo.

Tabela 34. Matriz de correlação linear cruzada dos descritores do modelo PLS gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Y

	ESTRETCH	E ₁₋₄	CHELPG_C2	ClogP _{WM}
ESTRETCH ^a	1			
E ₁₋₄ ^b	0,271	1		
CHELPG_C2 ^c	0,619	0,488	1	
ClogP _{WM} ^d	0,553	0,257	0,453	1

a: contribuição de energia intramolecular de deformação axial; b: contribuição de energia intramolecular do tipo 1-4; c: carga CHELPG do átomo de carbono 2; d: coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa, considerado pesos iguais para os métodos de VISWANADHAN *et al.*, 1989, KLOPMAN *et al.*, 1993 e PHYSPROP© database.

O melhor modelo gerado para a cepa Bug 2149 c110 (equação 11) apresentou 5 descritores e 3 VL, com 85,2 % da informação original. Os descritores selecionados foram o coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa *Marvin Beans 16.5.30.0* contribuição de energia intramolecular de deformação axial (ESTRETCH); energia potencial total (soma de todas as contribuições de energia intramolecular) (E_{TOT}); coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa, considerado pesos iguais para os métodos de VISWANADHAN *et al.*, 1989, KLOPMAN *et al.*, 1993 e

PHYSPROP[©] database (ClogP_{WM}); superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos com carga parcial negativa (ASA⁻); superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos hidrofóbicos (ASA_H).

Modelo PLS gerado para cepa Bug 2149 cl10:

$$\text{LogI/IC}_{50} = 2,22 + 0,02(\text{ESTRECTCH}) + 0,01(\text{ETOT}) + 0,01(\text{ASA}^-) + 0,15(\text{ClogP}_{\text{WM}}) + 0,002(\text{ASA}_H) \quad [\text{Equação 11}]$$

$N = 22$; $Q^2_{\text{LOO}} = 0,65$; $\text{RMSECV} = 0,26$; $R_{\text{cv}} = 0,81$; $\text{PRESS}_{\text{cv}} = 1,48$ ($\text{SS}_Y = 4,27$);

$R^2 = 0,75$; $\text{RMSEC} = 0,22$; $R_{\text{cal}} = 0,87$; $\text{PRESS}_{\text{cal}} = 1,05$.

Outliers = 0 (limite de confiança de 95 %)

Os valores de Q^2_{LOO} e R^2 foram 0,65 e 0,5, respectivamente, e a diferença entre tais medidas foi 0,10, o que indica que não há sobreajuste no modelo. Os valores de RMSEC e RMSECV , ou SEV , foram 0,22 e 0,26, respectivamente. Os valores de PRESS_{cv} devem ser menores do que a soma dos quadrados dos valores de resposta (SS_Y) (WOLD, ERIKSSON, 1995): $\text{PRESS}_{\text{cv}} = 1,48$ e $\text{SS}_Y = 4,27$.

Na tabela 35 encontram-se as diferenças da atividade linearizada calculada pelo modelo ($\text{pIC}_{50\text{calc}}$) e a atividade experimental ($\text{pIC}_{50\text{exp}}$) (resíduos), que não excederam dois desvios padrão da média dos resíduos do modelo (limite de confiança de 95 %). Logo, não houve amostras atípicas (*outliers*). O gráfico de valores de atividades calculada e experimental está apresentado na figura 70.

Tabela 35. Atividade linearizada experimental e calculada pelo modelo de 21 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota da cepa Bug 2149 cl10

Compostos	Log1/IC ₅₀ (cal)	Log1/IC ₅₀ (exp)	Resíduos
BSF-8-M	4,67	4,84	0,17
BSF-11-M	4,69	4,60	0,10
BSF-13-M	4,74	4,96	0,22
BSF-16-L	4,50	4,60	0,10
BSF-17-M	4,90	5,02	0,12
BSF-18-M	4,71	5,16	0,45
BSF-19-M	4,76	4,85	0,09
BSF-21-H	5,04	5,04	0,01
BSF-22-M	5,43	5,01	0,43
BSF-23-L	4,74	4,29	0,45
BSF-24-M	5,10	5,20	0,10
BSF-25-L	4,66	4,52	0,14
BSF-27-H	5,32	5,33	0,01
BSF-28-M	5,23	4,86	0,36
BSF-29-M	5,14	5,24	0,10
BSF-30-M	4,68	4,76	0,09
BSF-32-M	4,73	4,84	0,11
BSF-33-H	5,28	5,35	0,07
BSF-34-H	5,19	5,37	0,18
BSF-35-H	5,64	5,74	0,10
BSF-36-M	5,06	4,91	0,15
NF	3,79	3,52	0,27
		DP	0,22
		2DP	0,45

Modelo obtido no programa QSAR *modeling* utilizando como métodos de seleção e regressão OPS e PLS. Log1/IC₅₀ (exp): atividade linearizada experimental; Log1/IC₅₀ (cal): atividade linearizada calculada; DP: desvio padrão dos resíduos; 2DP: duas vezes o desvio padrão dos resíduos.

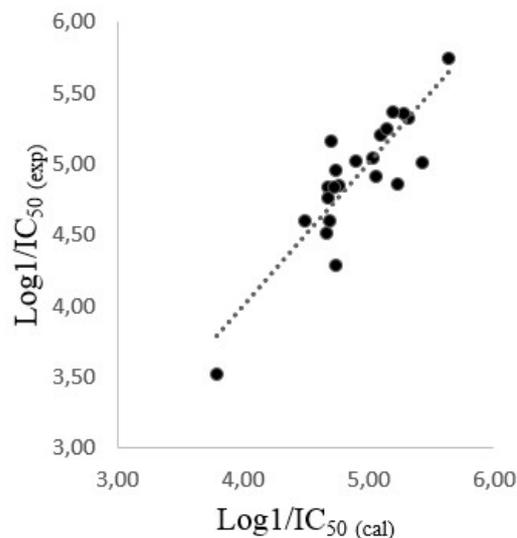


Figura 70. Dispersão da atividade linearizada experimental (Log1/IC₅₀ (exp)) e calculada pelo modelo (Log1/IC₅₀ (cal)) de 21 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota da cepa Bug 2149 cl10. Modelo obtido no programa QSAR *modeling* utilizando como métodos de seleção e regressão OPS e PLS. Linha pontilhada representa a linha de tendência linear dos dados.

No presente conjunto de dados, o processo foi desenvolvido em triplicata e o N crítico foi alcançado quando 32 % das amostras (7 compostos) foram retiradas. Ainda, os valores médios de Q²_{LNO} e Q²_{LOO} foram próximos. Os dados obtidos estão apresentados na tabela 36. Na figura 71, encontram-se ilustrados os valores médios de Q²_{LNO} à medida que as amostras foram retiradas (N = 2 a 11; N = 1 corresponde ao modelo original, LOO; Q²_{LOO} = 0,65, primeira linha da tabela 36).

Tabela 36. Resultados da validação cruzada do modelo PLS retirando N compostos (LNO) gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Bug 2149 cl10

N	Q ² _{LNO} (I)	Q ² _{LNO} (II)	Q ² _{LNO} (III)	Q ² _{LNO} média	2DP
Q ² _{LOO}	0,65	0,65	0,65	0,65	0,00
2	0,64	0,64	0,66	0,66	0,02
3	0,69	0,65	0,65	0,70	0,04
4	0,70	0,70	0,68	0,66	0,05
5	0,67	0,70	0,62	0,67	0,05
6	0,64	0,70	0,67	0,64	0,06
7	0,60	0,62	0,70	0,62	0,10
8	0,66	0,60	0,60	0,63	0,07
9	0,72	0,52	0,65	0,70	0,21
10	0,65	0,70	0,75	0,69	0,09
11	0,64	0,75	0,55	0,65	0,11

Valor crítico de retirada de compostos indicado em negrito. N: número de compostos removidos de cada vez na validação cruzada; Q²_{LNO}: média da triplicata do coeficiente de correlação de validação cruzada retirando N compostos; LNO: *leave-N-out*; DP: desvio padrão da triplicata dos valores de Q²_{LNO}; 2DP: duas vezes o desvio padrão.

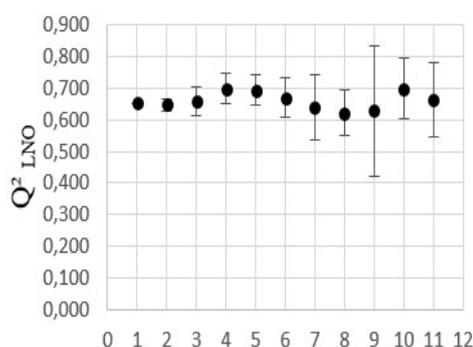


Figura 71. Resultados da validação cruzada do modelo PLS retirando N compostos (LNO), gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Bug 2149 cl10. Resultados apresentados em triplicata e desvio padrão; N: número de compostos removidos de cada vez na validação cruzada; Q²_{LNO}: coeficiente de correlação de validação cruzada retirando N compostos; LNO: *leave-N-out*.

Os dados obtidos no procedimento de aleatorização da atividade linearizada (vetor y) para este conjunto estão apresentados na figura 72. Os valores de $R^2_{y_{rand}}$ e $Q^2_{LOOy_{rand}}$ foram menores de 0,4 e de 0,2, respectivamente (figura 66A), o que indica correlação toleráveis (ERIKSSON *et al.*, 2003, TIMMERMAN *et al.*, 2008). Todos os valores obtidos na aleatorização referem-se a modelos de má qualidade e inferiores ao modelo original (dados do modelo original destacado em vermelho na figura 72A).

Na figura 72B estão apresentados os dados relacionados ao coeficiente de correlação de Pearson entre os dados de resposta embaralhados e do modelo original para 50 corridas. Nos gráficos $Q^2_{(y_{rand})}$ versus $R_{(y_{rand},y)}$ e $R^2_{(y_{rand})}$ versus $R_{(y_{rand},y)}$, os valores de interceptos foram de -0,45 e 0,03, respectivamente, e portanto, dentro dos valores considerados aceitáveis (ERIKSSON *et al.*, 2003).

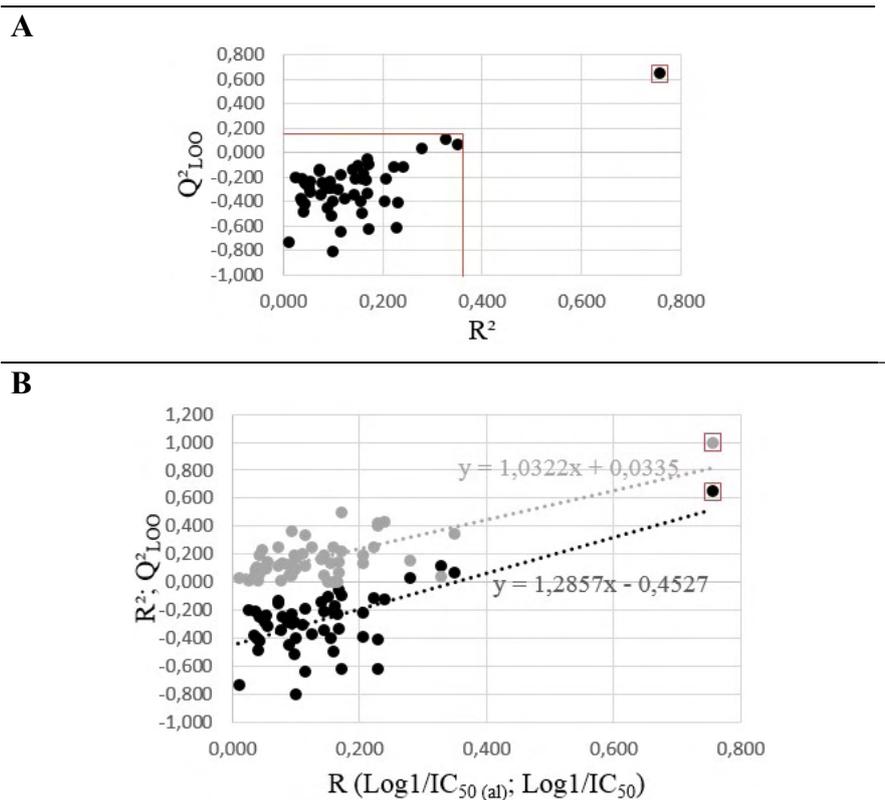


Figura 72. Testes de aleatorização do Log1/IC_{50} do modelo PLS gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Bug 2149 cl10. Gráfico (A): R^2 versus Q^2_{LNO} ; gráfico (B): $R(\text{log1/IC}_{50(\text{al})}; \text{log1/IC}_{50})$ versus R^2 e Q^2_{LOO} . R^2 : coeficiente de determinação múltipla; Q^2_{LOO} : coeficiente de correlação de validação cruzada retirando um composto; R : coeficiente de correlação linear; $\text{Log1/IC}_{50(\text{al})}$: atividade linearidade e aleatorizada. Linha vermelha em (A) delimita os valores de R^2 e Q^2_{LOO} encontrados após aleatorização da atividade. Dispersão do R^2 em cinza e Q^2_{LOO} em preto. Valores destacados com quadrados vermelho são os valores obtidos no modelo original.

Outro aspecto a ser considerado na avaliação dos modelos de QSAR é a compatibilidade entre os sinais de R (coeficiente de correlação de Pearson) de cada descritor com os sinais dos respectivos coeficientes no modelo. Sinais inversos indica falta de consistência do modelo. De acordo com a tabela 37, os valores de R e dos coeficientes do modelo para cada descritor foram compatíveis quanto aos sinais. Tal dado também foi observado nos sinais dos valores de pesos na análise de PCA (figura 58C). Então, o modelo gerado é consistente em termos de informação conferida pelas propriedades moleculares presentes na equação.

Tabela 37. Coeficientes lineares de Pearson e coeficientes dos descritores do modelo PLS gerado para 21 compostos e NF frente a cepa Bug 2149 cl10

	R	Coeficientes do modelo
ESTRETCH^a	0,772	0,024
ETOT^b	0,770	0,010
ClogP_{WM}^c	0,345	0,003
ASA-^c	0,593	0,145
ASA_H^d	0,607	0,002

R: correlação linear de Pearson; a: contribuição de energia intramolecular de deformação axial; b: energia potencial total (soma de todas as contribuições de energia intramolecular); c: superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos com carga parcial negativa; d: coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa, considerado pesos iguais para os métodos de VISWANADHAN *et al.*, 1989, KLOPMAN *et al.*, 1993 e PHYSPROP© database; e: superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos hidrofóbicos.

Com objetivo de identificar se os descritores fornecem informações independentes ao modelo calculou-se a matriz de correlação cruzada entre pares de descritores do modelo (tabela 38). Os valores absolutos de R foram menores que 0,7 (TIMMERMAN *et al.*, 2009), indicando que cada descritor fornece informação única ao modelo.

Tabela 38. Matriz de correlação linear cruzada dos descritores do modelo PLS gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Bug 2149 cl10

	ESTRETCH	ETOT	ASA-	ClogP _{WM}	ASA_H ^d
ESTRETCH^a	1				
ETOT^b	0,665	1			
ASA-^c	0,329	0,038	1		
ClogP_{WM}^d	0,553	0,509	0,408	1	
ASA_H^e	0,519	0,630	-0,296	0,475	1

a: contribuição de energia intramolecular de deformação axial; b: energia potencial total (soma de todas as contribuições de energia intramolecular); c: superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos com carga parcial negativa; d: coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa, considerado pesos iguais para os métodos de VISWANADHAN *et al.*, 1989, KLOPMAN *et al.*, 1993 e PHYSPROP© database; e: superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos hidrofóbicos.

O melhor modelo gerado para a cepa Colombiana (equação 12) apresentou 3 descritores e 1 VL, com 65,48% da informação original. Os descritores selecionados

foram o coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa *Marvin Beans 16.5.30.0* (ClogP_{WM}). Os descritores selecionados para este modelo da cepa Colombiana foram: energia potencial total (soma de todas as contribuições de energia intramolecular) (E_{TOT}); carga CHELPG do átomo de carbono 2 (CHELPG_C2); o coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa *Marvin Beans 16.5.30.0* (ClogP_{WM}).

Modelo PLS gerado para cepa Colombiana:

$$\text{Log1/IC}_{50} = 1,87 + 0,24(\text{ClogP}_{\text{WM}}) + 5,08(\text{CHELPG_C2}) + 0,01(E_{\text{TOT}})$$

[Equação 12]

$N = 22$; $Q^2_{\text{LOO}} = 0,64$; $\text{RMSECV} = 0,27$; $R_{\text{cv}} = 0,80$; $\text{PRESS}_{\text{cv}} = 1,63$ ($\text{SS}_Y = 4,53$);

$R^2 = 0,69$; $\text{RMSEC} = 0,25$; $R_{\text{cal}} = 0,832$ $\text{PRESS}_{\text{cal}} = 1,39$.

Outliers = 0 (limite de confiança de 95 %)

Os valores de Q^2_{LOO} e R^2 foram 0,64 e 0,69, respectivamente, e a diferença entre tais medidas foi 0,05, o que indica que não há sobreajuste no modelo. Os valores de RMSEC e RMSECV , ou SEV , foram 0,25 e 0,27, respectivamente. Os valores de PRESS_{cv} devem ser menores do que a soma dos quadrados dos valores de resposta (SS_Y) (WOLD, ERIKSSON, 1995): $\text{PRESS}_{\text{cv}} = 1,63$ e $\text{SS}_Y = 4,53$.

Na tabela 39 encontram-se as diferenças da atividade linearizada calculada pelo modelo ($\text{pIC}_{50\text{calc}}$) e a atividade experimental ($\text{pIC}_{50\text{exp}}$) (resíduos), que não excederam dois desvios padrão da média dos resíduos do modelo (limite de confiança de 95 %). Logo, não houve amostras atípicas (*outliers*). O gráfico de valores de atividades calculada e experimental está apresentado na figura 73.

Tabela 39. Atividade linearizada experimental e calculada pelo modelo de 21 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota da cepa Colombiana

Compostos	Log1/IC ₅₀ (cal)	Log1/IC ₅₀ (exp)	Resíduos
BSF-8-M	4,72	4,95	0,23
BSF-11-M	5,00	5,07	0,07
BSF-13-M	4,72	4,92	0,20
BSF-16-L	4,66	4,69	0,03
BSF-17-M	5,05	5,18	0,14
BSF-18-M	4,75	5,09	0,34
BSF-19-M	4,95	5,06	0,11
BSF-21-H	5,32	5,22	-0,10
BSF-22-M	5,46	5,14	-0,32
BSF-23-L	4,50	4,07	-0,43
BSF-24-M	5,04	4,94	-0,11
BSF-25-L	4,67	4,39	-0,28
BSF-27-H	5,38	5,61	0,23
BSF-28-M	5,32	5,21	-0,10
BSF-29-M	5,19	5,28	0,08
BSF-30-M	4,83	4,58	-0,26
BSF-32-M	4,98	5,00	0,02
BSF-33-H	5,23	5,40	0,17
BSF-34-H	5,34	5,54	0,20
BSF-35-H	5,42	5,51	0,09
BSF-36-M	5,15	5,24	0,08
NF	3,71	3,73	0,02
		DP	0,20
		2DP	0,41

Modelo obtido no programa QSAR *modeling* utilizando como métodos de seleção e regressão OPS e PLS. Log1/IC₅₀ (exp): atividade linearizada experimental; Log1/IC₅₀ (cal): atividade linearizada calculada; DP: desvio padrão dos resíduos; 2DP: duas vezes o desvio padrão dos resíduos.

No presente conjunto de dados, o processo foi desenvolvido em triplicata e o N crítico foi alcançado quando 36 % das amostras (8 compostos) foram retiradas. Ainda, os valores médios de Q²_{LNO} e Q²_{LOO} foram próximos. Os dados obtidos estão apresentados na tabela 40. Na figura 74, encontram-se ilustrados os valores médios de Q²_{LNO} à medida que as amostras foram retiradas (N = 2 a 11; N = 1 corresponde ao modelo original, LOO; Q²_{LOO} = 0,64, primeira linha da tabela 32).

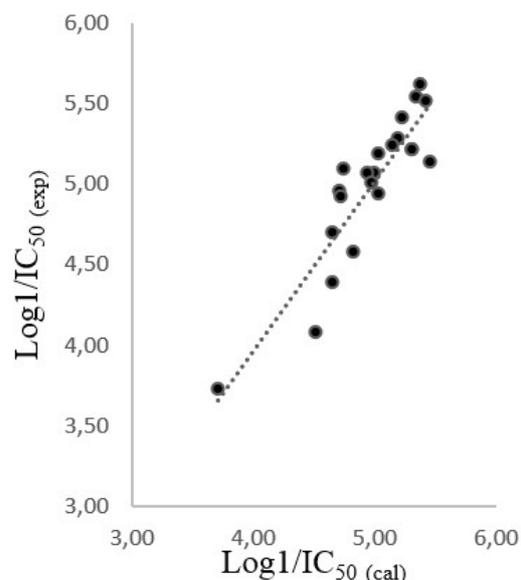


Figura 73. Dispersão da atividade linearizada experimental (Log1/IC₅₀ (exp)) e calculada pelo modelo (Log1/IC₅₀ (cal)) de 21 compostos e nifuroxazida frente a forma epimastigota da cepa Colombiana. Modelo obtido no programa QSAR *modeling* utilizando como métodos de seleção e regressão OPS e PLS. Linha pontilhada representa a linha de tendência linear dos dados.

Tabela 40. Resultados da validação cruzada do modelo PLS retirando N compostos (LNO) gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Colombiana

N	Q ² _{LNO} (I)	Q ² _{LNO} (II)	Q ² _{LNO} (III)	Q ² _{LNO} média	2DP
Q ² _{LOO}	0,64	0,64	0,64	0,64	0,00
2	0,64	0,63	0,63	0,63	0,00
3	0,63	0,61	0,65	0,63	0,04
4	0,67	0,63	0,60	0,63	0,07
5	0,62	0,66	0,59	0,62	0,07
6	0,60	0,65	0,63	0,63	0,05
7	0,63	0,64	0,65	0,64	0,01
8	0,52	0,67	0,58	0,59	0,16
9	0,63	0,63	0,68	0,65	0,06
10	0,56	0,56	0,56	0,56	0,01
11	0,64	0,68	0,59	0,63	0,09

Valor crítico de retirada de compostos indicado em negrito. N: número de compostos removidos de cada vez na validação cruzada; Q²_{LNO}: média da triplicata do coeficiente de correlação de validação cruzada retirando N compostos; LNO: *leave-N-out*; DP: desvio padrão da triplicata dos valores de Q²_{LNO}; 2DP: duas vezes o desvio padrão.

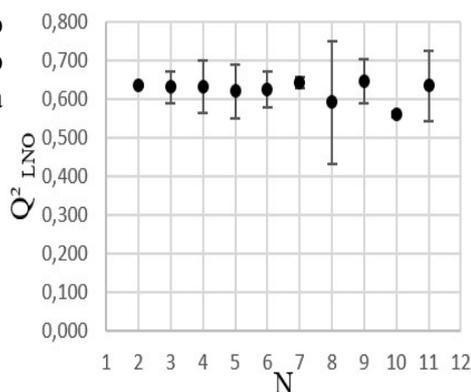


Figura 74. Resultados da validação cruzada do modelo PLS retirando N compostos (LNO), gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Colombiana. Resultados apresentados em triplicata e desvio padrão; N: número de compostos removidos de cada vez na validação cruzada; Q²_{LNO}: coeficiente de correlação de validação cruzada retirando N compostos; LNO: *leave-N-out*.

Os dados obtidos no procedimento de aleatorização da atividade linearizada (vetor y) para este conjunto estão apresentados na figura 75. Os valores de R^2_{yrand} e $Q^2_{LOOyrand}$ foram menores de 0,3 e de 0,1, respectivamente (figura 75A), o que indica correlação desprezível ao acaso (ERIKSSON *et al.*, 2003, TIMMERMAN *et al.*, 2008). Todos os valores obtidos na aleatorização referem-se a modelos de má qualidade e inferiores ao modelo original (dados do modelo original destacado em vermelho na figura 75A).

Na figura 75B estão apresentados os dados relacionados ao coeficiente de correlação de Pearson entre os dados de resposta embaralhados e do modelo original para 50 corridas. Nos gráficos $Q^2_{(yrand)}$ versus $R_{(yrand,y)}$ e $R^2_{(yrand)}$ versus $R_{(yrand,y)}$, os valores de interceptos foram de -0,49 e 0,08, respectivamente, e portanto, dentro dos valores considerados aceitáveis (ERIKSSON *et al.*, 2003).

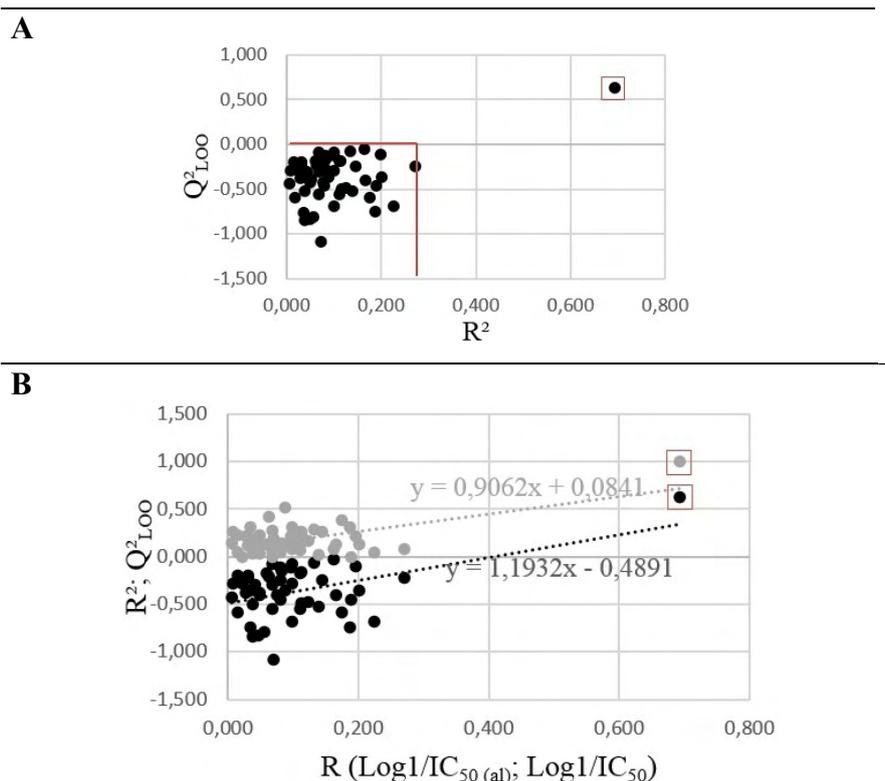


Figura 75. Testes de aleatorização do Log1/IC_{50} do modelo PLS gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Colombiana. Gráfico (A): R^2 versus Q^2_{LNO} ; gráfico (B): $R(\text{log1/IC}_{50(\text{al})}; \text{log1/IC}_{50})$ versus R^2 e Q^2_{LOO} . R^2 : coeficiente de determinação múltipla; Q^2_{LOO} : coeficiente de correlação de validação cruzada retirando um composto; R : coeficiente de correlação linear; $\text{Log1/IC}_{50(\text{al})}$: atividade linearidade e aleatorizada. Linha vermelha em (A) delimita os valores de R^2 e Q^2_{LOO} encontrados após aleatorização da atividade. Dispersão do R^2 em cinza e Q^2_{LOO} em preto. Valores destacados com quadrados vermelho são os valores obtidos no modelo original.

Outro aspecto a ser considerado na avaliação dos modelos de QSAR é a compatibilidade entre os sinais de R (coeficiente de correlação de Pearson) de cada descritor com os sinais dos respectivos coeficientes no modelo. Sinais inversos indica falta de consistência do modelo. De acordo com a tabela 41, os valores de R e dos coeficientes do modelo para cada descritor foram compatíveis quanto aos sinais. Tal dado também foi observado nos sinais dos valores de pesos na análise de PCA (figura 58C). Então, o modelo gerado é consistente em termos de informação conferida pelas propriedades moleculares presentes na equação.

Tabela 41. Coeficientes lineares de Pearson e coeficientes dos descritores do modelo PLS gerado para 21 compostos e NF frente a cepa Colombiana.

	R	Coefficientes do modelo
E_{TOT}^a	0,683	0,012
CHELPG_C2^b	0,654	5,077
ClogP_{WM}^c	0,758	0,241

R: correlação linear de Pearson; a: Energia potencial total (soma de todas as contribuições de energia intramolecular); b: carga CHELPG do carbono 2; c: coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa, considerado pesos iguais para os métodos de VISWANADHAN *et al.*, 1989, KLOPMAN *et al.*, 1993 e PHYSPROP[®] database.

Com objetivo de identificar se os descritores fornecem informações independentes ao modelo calculou-se a matriz de correlação cruzada entre pares de descritores do modelo (tabela 42). Os valores absolutos de R foram menores que 0,7 (TIMMERMAN *et al.*, 2009), indicando que cada descritor fornece informação única ao modelo.

Tabela 42. Matriz de correlação linear cruzada dos descritores do modelo PLS gerado para 21 compostos e nifuroxazida frente a cepa Colombiana.

	E _{TOT}	GAP	ClogP _{WM}
E_{TOT}^a	1		
CHELPG_C2^b	0,699	1	
ClogP_{WM}^c	0,509	0,453	1

a: Energia potencial total (soma de todas as contribuições de energia intramolecular); b: carga CHELPG do carbono 2; c: coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa, considerado pesos iguais para os métodos de VISWANADHAN *et al.*, 1989, KLOPMAN *et al.*, 1993 e PHYSPROP[®] database.

Para demonstrar a interpretação dos descritores mais relevantes dos modelos gerados, para as diferentes cepas, consideraram-se os compostos mais (BSF-27 [-C₆H₄-4-C₄H₉] e BSF-34 [-C₆H₄-4-OC₄H₉]) e menos (BSF-25 [-C₆H₄-3-NO₂]) ativos, além do protótipo NF. Os descritores hidrofóbico (ClogP_{WM}) e eletrônica (distribuição de cargas parciais atômicas de potencial eletrostático; CHELPG_C2) foram considerados na visualização de propriedades (figura 76).

Considerar a propriedade de lipofilicidade (que pode ser expressa pelos valores de ClogP), em estudos de SAR e QSAR, é importante e amplamente aceito, uma vez que está relacionada à capacidade de um composto transpor as barreiras biológicas para alcançar o sítio de ação e, assim, desencadear a resposta desejada, bem como influenciar

no estabelecimento de interações intermoleculares do composto com transportadores e alvos moleculares (WERMUTH, 2008). A atividade biológica frente ao *T. cruzi* tem sido relacionada a descritores hidrofóbicos em estudos de conjuntos de compostos com estruturas semelhantes (PALACE-BERL *et al*, 2015; PALACE-BERL *et al*, 2013, JORGE *et al*, 2013) às dos compostos investigados no presente estudo. Os mapas de potencial lipofílico foram calculados em superfície molecular de Connolly e foram analisados de acordo com o esquema de cores, que varia em uma faixa de marrom (0,13; região mais lipofílica) a azul (-0,13; região mais elevada hidrofílica). Para os compostos mais ativos, observou-se que o substituinte alquila contribui para a maior lipofilicidade da molécula como um todo, sendo mais evidenciada a região hidrofóbica em marrom na região do próprio substituinte. Os compostos NF e BSF-25 apresentaram maior hidrofilicidade, principalmente as regiões do grupo nitro.

Com relação às propriedades eletrônicas, os MPE calculados em superfície molecular de Connolly estão demonstrados na figura 76. A interpretação também é por meio de esquema de cores, neste caso, em uma faixa de -0,08 (vermelho intenso; regiões de maior distribuição de densidade eletrônica) a 0,08 (azul intenso; regiões de menor distribuição de densidade eletrônica). Observa-se na figura 76C que a região de maior densidade eletrônica é a porção da N-acilidrazona, região superior ao oxigênio carbonílico, e a região do 5-nitrofurano, próximo ao grupo nitro. Nota-se que para os compostos BSF-27 e BSF-34 esta região possui coloração vermelha mais intensa, ou seja, maior densidade eletrônica em relação às estruturas de menor atividade. As cargas de potencial eletrostático, ESP (CHELPG; BRENEMAN, WIBERG, 1990), estão representadas por coloração das representações dos átomos nas estruturas variando de vermelho, cargas negativas de -1,0, a verde, cargas positivas 1,0. Observa-se que no grupo furano em todas as estruturas há carbonos com cargas positivas e negativas opostas. Considerando as cargas CHELPG no carbono 2 do grupo furano (carbono ligado a porção N-acilidrazona; CHELPG_C) são positivas para os 3 compostos (NF = 0,263; BSF-25 = 0,363; BSF-27 = 0,372 e BSF-34 = 0,392), um pouco mais positivas para os compostos mais ativos (BSF-27 e BSF-34).

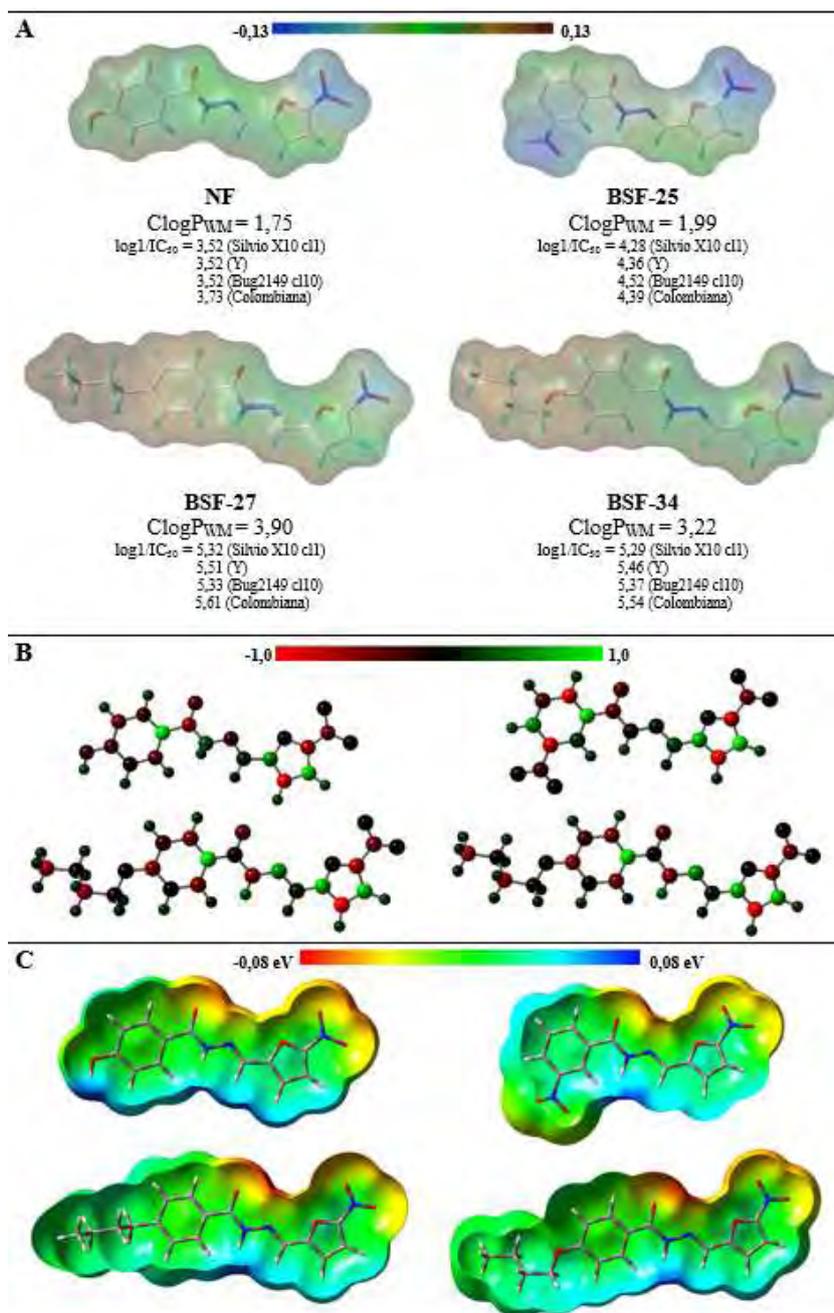


Figura 76. Visualização de descritores eletrônicos e hidrofóbicos para os compostos BSF-25, BSF-27, BSF-34 e NF: (A) Mapa de potencial lipofílico, MLP, foi calculado no programa *SYBYL 8.0* e o esquema de cores mostra regiões hidrofóbicas em marrom (0,13) e regiões hidrofílicas na cor azul (-0,13); os valores ClogP foram calculados no programa *MarvinBeans* com método de pesos, considerado pesos iguais para os métodos de VISVANADHAN *et al.*, 1989, KLOPMAN *et al.*, 1993 e PHYSPROP[®] database; compostos apresentados no modelo bastão (átomos de carbono estão na cor cinza claro, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio em verde). (B) Potencial eletrostático de cargas atômicas apresentadas por cor na estrutura (ESP, CHELPG), cargas atômicas de -1,0 (vermelho) a 1,0 verde. (C) Mapas de potencial eletrostático, MPE, obtidos no programa *GAUSSIAN 03W* [B3LYP, 6-311++(d,p)]; Coloração vermelha indica regiões de maior distribuição de densidade eletrônica (-0,08) e coloração azul, menor distribuição de densidade eletrônica (0,08); compostos apresentados no modelo bastão (átomos de carbono estão na cor cinza claro, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio em branco).

Diante dos resultados obtidos quanto aos descritores mais estão relacionados à atividade frente à forma epimastigota do *T. cruzi*, quatro novos compostos foram planejados e sintetizados e utilizados para compor o conjunto de avaliação, a fim de validar a capacidade de previsão externa do modelo obtido com o conjunto de treinamento. Os dados obtidos para tais compostos encontram-se na tabela 43.

Os compostos BSF-38 [-C₆H₄-4-C₅H₁₁] e BSF-39 [-C₆H₄-4-C₇H₁₅] foram os melhores previstos pelo modelo, considerando um intervalo de confiança de 99 %. O composto BSF-40 [-C₆H₄-4-OC₇H₁₅] não foi bem previsto provavelmente devido ao grande volume estrutural e presença do oxigênio, diferenciando-o dos compostos BSF-39 e BSF-38. O composto BSF-37 [-cicloexil-4-C₅H₁₁], não benzeno substituído e com grande semelhança ao composto BSF-38, também não teve boa a previsão pelo modelo, com erro de quase uma unidade logarítmica, o que indica que o modelo gerado não é capaz de prever compostos com substituições do anel fenílico por ciclo alquila.

Cabe ressaltar, no entanto, que os compostos planejados com base nos descritores do modelo QSAR apresentaram atividade superior frente às quatro cepas da forma epimastigota do *T. cruzi*. Os compostos foram também avaliados frente à forma amastigota intracelular do parasito.

Tabela 43. Dados de atividade linearizada, experimental e prevista, dos compostos planejados a partir do modelo PLS gerado para as cepas Silvio X10 cl1, Y, Bug 2140 cl10 e Colombiana.

	Log1/IC ₅₀ (prev)	Log1/IC ₅₀ (exp)	Resíduos	
Silvio X10 cl1				
BSF-38	5,40	5,42	0,03	
BSF-39	5,65	5,70	0,06	
BSF-40	5,54	5,70	0,16	DP 0,06
BSF-37	4,88	5,64	0,76	
Y				
BSF-38	5,54	5,59	0,05	
BSF-39	5,71	5,86	0,15	
BSF-40	5,59	5,83	0,24	DP 0,10
BSF-37	4,91	5,60	0,69	
Bug 2149 cl10				
BSF-38	5,69	5,70	0,00	
BSF-39	6,08	6,17	0,08	
BSF-40	5,95	6,07	0,12	DP 0,06
BSF-37	5,48	5,90	0,83	
Colombiana				
BSF-38	5,65	5,75	0,10	
BSF-39	5,87	5,98	0,11	
BSF-40	5,70	5,96	0,26	DP 0,09
BSF-37	5,48	5,83	0,35	

Composto BSF-37 (4-C₅H₁₁-cicloexila) não é benzeno substituído, porém tem grande semelhança estrutural com os planejados, BSF-38 [-C₆H₄-4-C₅H₁₁], BSF-39 [-C₆H₄-4-C₇H₁₅] e BSF-40 [-C₆H₄-4-OC₇H₁₅]. Log1/IC₅₀ (exp): atividade linearizada experimental; Log1/IC₅₀ (prev): atividade linearizada prevista; DP: desvio padrão dos resíduos dos compostos BSF-38 a BSF-40 para cada cepa.

6.5 Determinação da citotoxicidade *in vitro* em células de linhagem LLC-MK₂

A determinação da citotoxicidade em células LLC-MK₂ foi realizada com intuito de identificar a seletividade dos compostos mais ativos entre formas epimastigotas do parasito e células de mamíferos, além de verificar a viabilidade de realização dos ensaios frente a forma amastigota intracelular. A linhagem LLC-MK₂ é muito utilizada para determinar a citotoxicidade de compostos anti- *T. cruzi*, pois tem grande aplicação na cultura da forma amastigota e tripomastigota do parasita. A metodologia de avaliação da viabilidade celular por colorimetria baseada na redução metabólica do MTT pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase a formazan (coloração azul), já está bem estabelecida em literatura, figura 77 (FRESHNEY, 2010, PARDO, 2010, GERPE *et al.*, 2010, ROMEIRO *et al.*, 2009, MUELAS *et al.*, 2001).

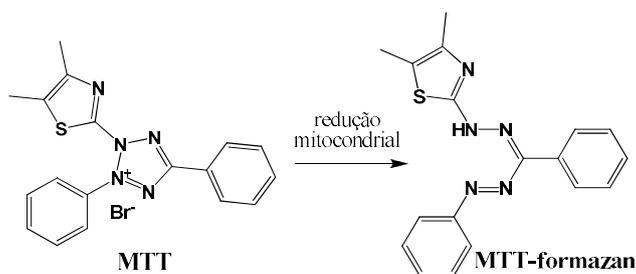


Figura 77. Composto tetrazólico MTT, de coloração amarela, reduzido a formazan, de coloração roxa.

Na etapa de lise celular e solubilização do formazan, foram testadas algumas soluções, como a solução a 0,04 N de ácido clorídrico PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório) em álcool isopropílico PA (Labsynth Produtos Químicos para Laboratório) e soluções de 10 % de dodecil sulfato de sódio (SDS) e ácido clorídrico, HCl, a 0,01M. Porém estas soluções foram menos eficazes que o DMSO pré-aquecido (57 °C) quanto à capacidade de lisar as células e solubilizar o formazan, mantendo-se este último para realização dos ensaios (TWENTYMAN, LUSCOMBE, 1987).

Foi construída curva de calibração com 8 pontos (1 a $8 \cdot 10^5$ células/mL) com objetivo de avaliar os resultados desta metodologia frente à variação do número de células LLC-MK₂. Os dados demonstraram linearidade da metodologia ao variar a concentração celular de forma crescente. O gráfico foi obtido com modelo de regressão linear com intervalo de confiança de 95 % e está detalhado na tabela 44, figura 78.

Tabela 44. Dados de absorvância ($\lambda = 595 \text{ nm}$) e número de células LLC-MK₂

LLC-MK ₂		
Número células (*10 ⁵ /poço)	Absorvância ($\lambda = 595\text{nm}$) (média \pm dp)	
0	0,070	0,007
1,0	0,294	0,020
2,0	0,376	0,023
3,0	0,460	0,008
4,0	0,554	0,023
5,0	0,649	0,033
6,0	0,742	0,026
8,0	0,892	0,056

Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata.

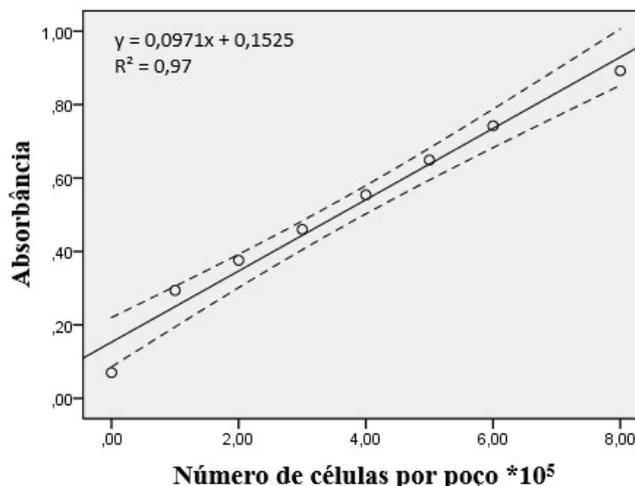


Figura 78. Curva de calibração para as células LLC-MK₂. Regressão linear da absorvância ($\lambda = 595 \text{ nm}$) e número de parasitos (linha contínua). Intervalo de confiança da média de 95 % (linhas pontilhadas). Teste ANOVA: $F = 271,75$; $P < 0,001$.

A determinação da citotoxicidade foi realizada para alguns compostos que mostraram maior atividade frente à forma epimastigota de *T. cruzi*. As tabelas com os valores de inibição celular para cada composto estão no anexo 8 “Dados de citotoxicidade frente a células LLC-MK₂ dos compostos e fármacos”.

É importante salientar que os compostos BSF-36, BSF-37, BSF-39 e BSF-40 foram sintetizados e avaliados quanto sua citotoxicidade no final do trabalho, pois foram planejados com os dados do conjunto de 36 compostos, sendo estes os compostos mais ativos.

Com a finalidade de comparação dos dados obtidos de citotoxicidade com os dados de atividade anti-*T. cruzi*, calculou-se a razão dos valores de IC₅₀ dos dois ensaios, obtendo-se assim o índice de seletividade (IS). Na tabela 45 encontram-se os valores de citotoxicidade para a linhagem LLC-MK₂. Os valores indicados como maior que (>) correspondem àqueles avaliados na maior concentração utilizada no ensaio, sem precipitação dos compostos no meio de cultura. Para os compostos esta concentração foi de 100 μM e para os fármacos, 200 μM . O cálculo de seletividade é amplamente utilizado na literatura e em estudos de compostos com atividade anti-*T. cruzi*. Apesar de não haver uma regra amplamente estabelecida, costuma-se utilizar um valor de corte de IS acima de 10 para indicar compostos com boa seletividade (WEISS, TANOWITZ, KIRCHHOFF,

2011). Os dados apresentados na tabela 45 indicam que todos os compostos, exceto o composto BSF-26 (naftil substituído), apresentaram IS superior a 10. Considerando as cepas mais resistentes a BZD e NFX, Y e Colombiana, os valores de IS foram maiores para os compostos BSF-39 e BSF-40. De um modo geral, os valores de IS da maioria dos novos compostos superaram os valores de IS dos fármacos de referência, destacando-se os compostos BSF-35, BSF-39 e BSF-40.

Tabela 45. Citotoxicidade dos compostos, fármacos de referência e composto-protótipo frente às células LLC-MK₂ e atividade anti-*T. cruzi* frente às cepas Silvio X10 c11, Y, Bug 2149 c110 e Colombiana na forma epimastigota

Cpd	LLC-MK ₂	Silvio X10 c11 (TcI)		Y (TcII)		Bug 2149 c110 (TcV)		Colombiana (TcI)	
	IC ₅₀ (μM) (média ±dp)	IC ₅₀ (μM) (média ±dp)	IS	IC ₅₀ (μM) (média ±dp)	IS	IC ₅₀ (μM) (média ±dp)	IS	IC ₅₀ (μM) (média ±dp)	IS
BSF-26	18,58 ±1,03	9,59 ±0,89	1,66	7,15 ±0,70	2,60	9,90 ±1,06	1,88	7,58 ±0,28	2,45
BSF-27	>100	4,77 ±0,48	>20,96	3,10 ±0,29	>32,26	4,70 ±0,50	>21,28	2,45 ±0,27	>40,82
BSF-33	>100	4,34 ±0,33	>23,04	3,39 ±0,31	>29,50	4,44 ±0,32	>22,52	3,94 ±0,43	>25,38
BSF-34	>100	5,07 ±0,28	>19,72	3,47 ±0,20	>28,82	4,25 ±0,40	>23,53	2,86 ±0,31	>34,96
BSF-35	>100	1,97 ±0,14	>50,76	1,17 ±0,12	>85,47	1,81 ±0,18	>55,25	3,06 ±0,23	>32,68
BSF-37	>100	2,30 ±0,25	>43,48	2,50 ±0,22	>40,00	1,27 ±0,13	>78,74	1,47 ±0,16	>68,03
BSF-38	>100	3,77 ±0,12	>26,53	2,55 ±0,20	>39,22	1,99 ±0,18	>50,25	1,76 ±0,19	>56,81
BSF-39	>100	1,98 ±0,19	>50,51	1,37 ±0,13	>72,99	0,67 ±0,06	>149,25	1,05 ±0,12	>95,23
BSF-40	>100	1,99 ±0,19	>50,25	1,47 ±0,14	>68,03	0,85 ±0,07	>117,65	1,09 ±0,11	>91,74
BZD	>200	27,15 ±2,75	>7,37	40,23 ±4,07	>4,97	29,23 ±3,09	>6,84	47,91 ±4,96	>4,17
NFX	>200	6,02 ±0,32	>33,22	12,84 ±1,30	>15,58	7,32 ±0,68	>27,32	9,93 ±1,01	>20,14

LLC-MK₂: células renais de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*). Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata e de pelo menos dois ensaios independentes. BZD: benznidazol; NFX: nifurtimox; IS: índice de seletividade (IS = IC₅₀ das células LLC-MK₂/IC₅₀ do *T. cruzi*).

6.6 Determinação da atividade anti-*T. cruzi* frente a forma amastigota do parasita

A forma amastigota intracelular é considerada a forma mais relevante para ensaios de atividade em buscas de compostos anti-*T. cruzi*, por representar *in vitro* a forma crônica da doença de Chagas. Neste trabalho, após a triagem em formas epimastigota, foram selecionados compostos para representarem o conjunto total estudado, assim identificar as estruturas com características que promovam a atividade nesta forma parasitária. Para auxiliar a seleção dos compostos para os ensaios frente a forma amastigota do parasito, foi aplicada a análise exploratória de dados com a ferramenta de HCA, considerando os descritores obtidos como demonstrado na metodologia (itens 5.4.2 e 5.4.3, deste trabalho). Na figura 79 encontra-se o dendrograma realizado previamente, como descrito no item 6.4.3 deste trabalho (figura 79 A) e o dendrograma com a inclusão dos compostos planejados baseados no conjunto inicial (figura 79 B). No dendrograma

da figura 79 B os descritores selecionados foram aqueles com coeficiente de correlação linear de Pearson, $R > 0,35$. A seleção dos compostos foi realizada priorizando-se a representação de cada agrupamento obtido no HCA e a inclusão dos compostos que se apresentaram mais ativos frente a forma epimastigota, como ilustrado no dendrograma da figura 79 B, com a inclusão dos compostos BSF-37, BSF-38, BSF-39, BSF-40, agrupados com outros compostos classificados como mais ativos com similaridade de 82,4%, com exceção do composto BSF-37 [-cicloexil-4- C_5H_{11}] que se assemelha ao composto BSF-20 [$-C_8H_{17}$].

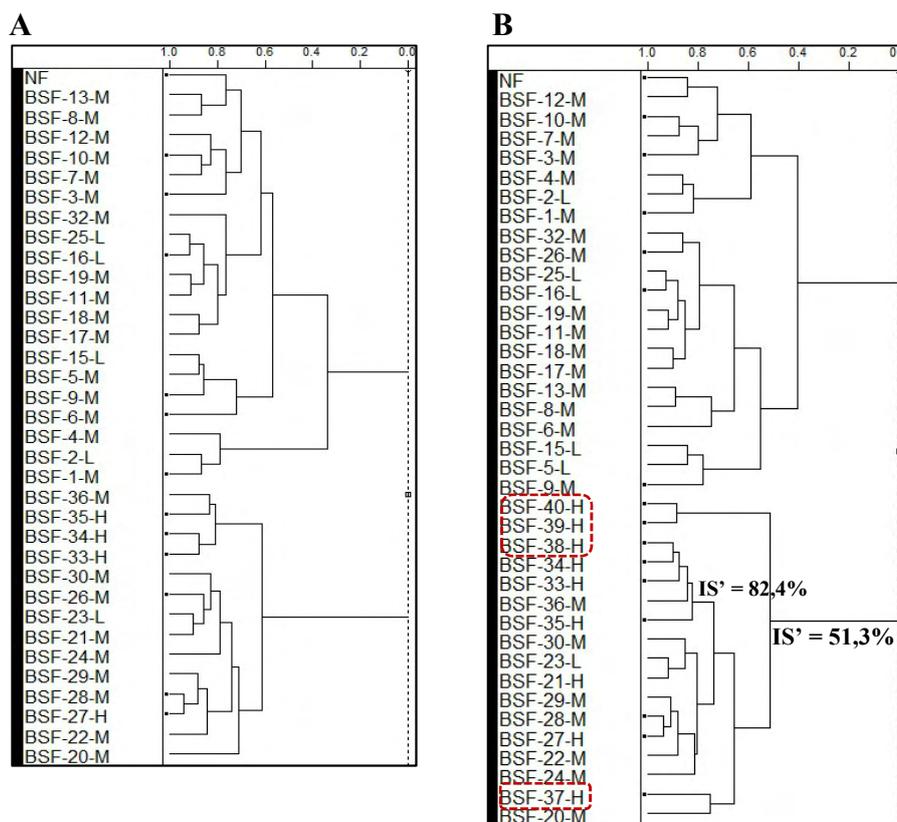


Figura 79. Dendrograma utilizado para seleção de compostos para ensaio com a forma amastigota de *T. cruzi*. Dendrograma (A): seleção dos compostos na primeira etapa dos ensaios frente a forma amastigota (HCA realizado no item 6.4.3 deste trabalho); dendrograma (B): inclusão dos compostos planejados posteriormente (BSF-37, BSF-38, BSF-39, BSF-40; linhas vermelhas pontilhadas). Quadrados pretos (■) ao final das linhas do dendrograma representam os compostos selecionados.

Os ensaios frente a forma amastigota, como citado anteriormente, foram realizados pelo doutorando Caio Haddad Franco, coordenado pela Dra. Carolina Borsoi Moraes (LNBio - CNPEM) com metodologia fenotípica de análise de alto conteúdo (HCA', *high content analysis*). A metodologia HCA' diferencia-se por utilizar a imagem como "endpoint" fenotípico, o que auxilia a interpretação dos dados. Esta metodologia é

aplicada em estudos de sinalização celular, fisiologia celular, ensaios *in vitro* toxicológicos, avaliação de alvos enzimáticos, entre outros (ZOCK, 2009). Neste trabalho a aplicação do HCA' se deu por avaliação da ação de compostos frente amastigotas intracelulares, permitindo a visualização do parasita intracelular e da célula hospedeira.

Esta metodologia, como descrito no item 5.6 deste trabalho, é avaliada com o programa *Harmony*, o qual realiza o reconhecimento de imagens definindo núcleos e membrana celular da célula hospedeira (U2OS) e das formas amastigotas intracelulares, como ilustrado na figura 80 (MOON, SIQUEIRA-NETO *et al.*, 2014, MORAES *et al.*, 2014).

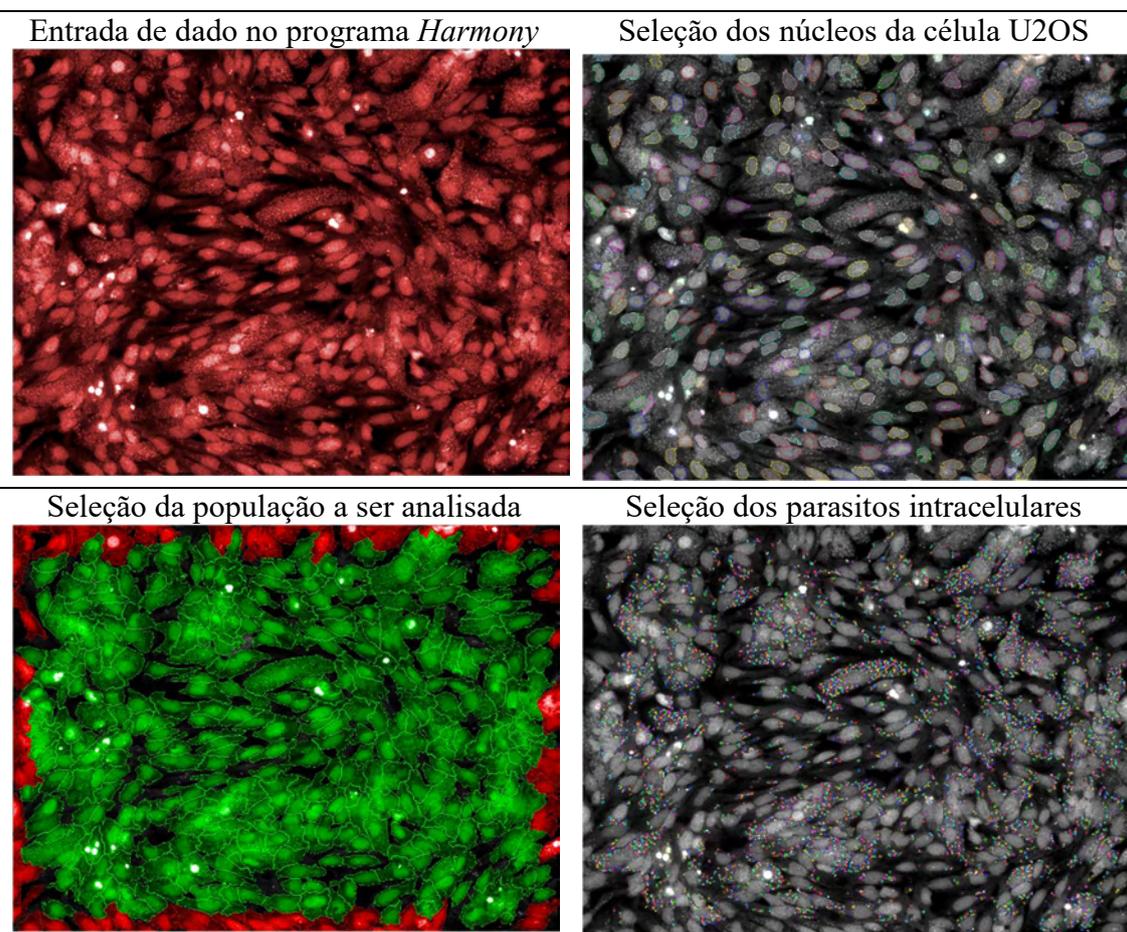


Figura 80. Imagens obtidas da metodologia de análise de alto conteúdo (HCA') e etapas de reconhecimento de membrana e núcleo celular para as células U2OS e forma amastigota do *T. cruzi*. Imagens fornecidas por Dra. Carolina Borsoi Moraes e Caio Haddad Franco (LNBio – CNPEM). Equipamento utilizado: Operetta (Perkin Elmer, USA) (MOON, SIQUEIRA-NETO *et al.*, 2014, MORAES *et al.*, 2014).

Os ensaios foram realizados com a cepa Y, uma com caráter de resistência parcial ao BZD, Y_(ama-R), e outra mais susceptível ao BZD, Y_(ama-S). Nas tabelas 46 e 47

encontram-se os dados de IC₅₀ tratados para as duas variações da cepa Y, além da ação dos compostos na célula hospedeira U2OS e a seletividade dos compostos, IS.

Os IS indicaram que os compostos mais ativos foram muito seletivos para as formas amastigotas das cepas Y_(ama-R), e Y_(ama-S), apresentando valores entre 107,36 e >567, em contraste aos valores dos fármacos de referência, os quais apresentaram IS de 16,45 e 50,38 para o NFX, e IS de 6,22 e > 89 para o BZD, respectivamente (tabelas 46 e 47).

Tabela 46. Atividade anti-*T. cruzi* dos compostos selecionados por HCA e fármacos de referência frente a forma amastigota da cepa Y, parcialmente resistente ao benznidazol

Compostos	Y _(ama-R) IC ₅₀ (μM)		U2OS CC ₅₀ (μM)		IS	Atividade Máx. (%)
	(média ±dp)		(média ±dp)			
BSF-1	4,62	±1,48	15,23	±6,15	8,50	98,68
BSF-3	2,61	±0,15	56,37	±22,92	7,40	114,96
BSF-9	1,06	±0,11	329,00	±14,14	54,20	94,53
BSF-10	2,90	±0,09	nd	nd	8,78	119,43
BSF-16	1,77	±0,27	29,97	±1,36	12,08	95,51
BSF-26	1,87	±1,54	31,97	±10,35	34,33	97,05
BSF-27	1,33	±0,19	12,28	±1,70	14,75	114,96
BSF-28	1,43	±0,40	13,50	±3,87	139,54	98,37
BSF-33	0,35	±0,20	168,00	±66,47	34,40	101,80
BSF-34	1,46	±0,39	27,79	±4,99	32,04	114,96
BSF-35	0,71	±0,11	159,00	±15,56	154,70	97,80
BSF-37	1,66	±0,62	19,68	9,13	> 241	102,60
BSF-38	0,96	±0,10	42,53	±2,05	218,23	104,24
BSF-39	0,82	±0,12	nd	nd	303,07	103,06
BSF-40	0,88	±0,30	22,53	12,49	> 457	98,26
NF	4,26	±1,02	74,05	±3,05	10,72	91,94
BZD	64,34	±39,52	19,51	3,00	> 6,22	85,16
NFX	5,18	±1,15	nd	nd	16,45	96,60

Y_(ama-R): forma amastigota da cepa Y, parcialmente resistente ao BZD. IC₅₀: concentração de compostos que inibe 50% das amastigotas, comparado com o controle. CC₅₀: concentração de compostos que inibe 50% das células U2OS, comparado com o controle infectado. U2OS: células de osteosarcoma de *Homo sapiens*. IS: índice de seletividade, [IS = CC₅₀ de U2OS / IC₅₀ de Y_(ama)]. Atividade Máx.: máxima atividade de inibição de amastigotas de cada composto em comparação com os controles. Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata e de pelo menos dois ensaios independentes. BZD: benznidazol; NFX: nifurtimox; NF: nifuroxazida (composto-protótipo); nd: concentração não determinada.

Os compostos BSF-33, BSF-34, BSF35, BSF-37, BSF-38, BSF39 e BSF-40 apresentaram valores de IC₅₀ estatisticamente iguais frente a forma amastigota

parcialmente resistente e sensível a BZD [$Y_{(ama-R)}$; $Y_{(ama-S)}$], com valores de P na ordem crescente de identificação dos compostos: P = 0,142, P = 0,444, P = 0,124, P = 0,353, P = 0,938, P = 0,480, P = 0,181 (teste estatístico *t* de *Student*, intervalo de confiança de 95 %).

Tabela 47. Atividade anti-*T. cruzi* dos compostos selecionados por HCA e fármacos de referência frente a amastigota da cepa Y, susceptível a benznidazol

Compostos	$Y_{(ama-S)}$		U2OS CC ₅₀		IS	Atividade Máx. (%)
	IC ₅₀ (μ M) (média \pm dp)		(μ M) (média \pm dp)			
BSF-1	1,06	\pm 0,25	19,29	\pm 7,48	40,12	97,45
BSF-3	0,84	\pm 0,06	19,55	\pm 7,47	14,70	104,09
BSF-9	0,78	\pm 0,16	209,50	\pm 120,92	38,66	90,44
BSF-10	2,23	\pm 0,08	85,19	\pm 21,08	8,75	104,34
BSF-16	0,94	\pm 0,07	nd	nd	29,56	105,61
BSF-26	0,80	\pm 0,18	57,18	\pm 9,12	39,96	93,49
BSF-27	0,91	\pm 0,21	198,84	\pm 102,05	14,91	110,66
BSF-28	0,93	\pm 0,09	46,62	\pm 11,80	181,62	97,19
BSF-33	0,14	\pm 0,05	12,04	\pm 1,90	112,81	104,49
BSF-34	1,25	\pm 0,16	45,69	\pm 23,60	18,02	102,16
BSF-35	0,53	\pm 0,12	109,07	\pm 23,95	107,36	96,68
BSF-37	1,20	\pm 0,45	25,43	\pm 1,01	> 334	99,57
BSF-38	0,95	\pm 0,18	21,39	\pm 3,90	167,37	105,1
BSF-39	0,70	\pm 0,23	nd	nd	> 571	96,63
BSF-40	0,58	\pm 0,08	247,00	\pm 111,72	567,24	97,57
NF	0,97	\pm 0,41	64,20	\pm 12,32	20,24	101,8
BZD	4,49	\pm 0,59	13,24	nd	>89	98,71
NFX	1,47	\pm 0,18	39,21	\pm 0,66	50,38	103,55

$Y_{(ama-S)}$: forma amastigota da cepa Y, susceptível ao BZD. IC₅₀: concentração de compostos que inibe 50% das amastigotas, comparado com o controle. CC₅₀: concentração de compostos que inibe 50% das células U2OS, comparado com o controle infectado. U2OS: células de osteosarcoma de *Homo sapiens*. IS: índice de seletividade, [IS = CC₅₀ de U2OS / IC₅₀ de $Y_{(ama)}$]. Atividade Máx.: máxima atividade de inibição de amastigotas de cada composto em comparação com os controles. Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da triplicata e de pelo menos dois ensaios independentes. BZD: benznidazol; NFX: nifurtimox; NF: nifuroxazida (composto-protótipo); nd: concentração não determinada.

Na figura 81 encontra-se gráfico de barras com as atividades dos compostos selecionados por HCA frente as formas amastigota (parcialmente resistente e susceptível a BZD) e a forma epimastigota da cepa Y. Os compostos BSF-33, BSF-34, BSF-35, BSF-37, BSF-38, BSF-39 e BSF-40 apresentaram valores de IC₅₀ estatisticamente iguais frente

a forma amastigota parcialmente resistente e sensível a BZD [$Y_{(ama-R)}$; $Y_{(ama-S)}$], com valores de P na ordem crescente de identificação dos compostos: $P = 0,142$, $P = 0,444$, $P = 0,124$, $P = 0,353$, $P = 0,938$, $P = 0,480$, $P = 0,181$ (teste estatístico *t* de Student, intervalo de confiança de 95 %). Estes compostos foram os mais ativos na forma epimastigota para as cepas Silvio X10 c11, Y, Bug 2149 c110 e Colombiana, sendo verificado na forma amastigota sua atividade, mesmo em cepa Y parcialmente resistente a BZD.

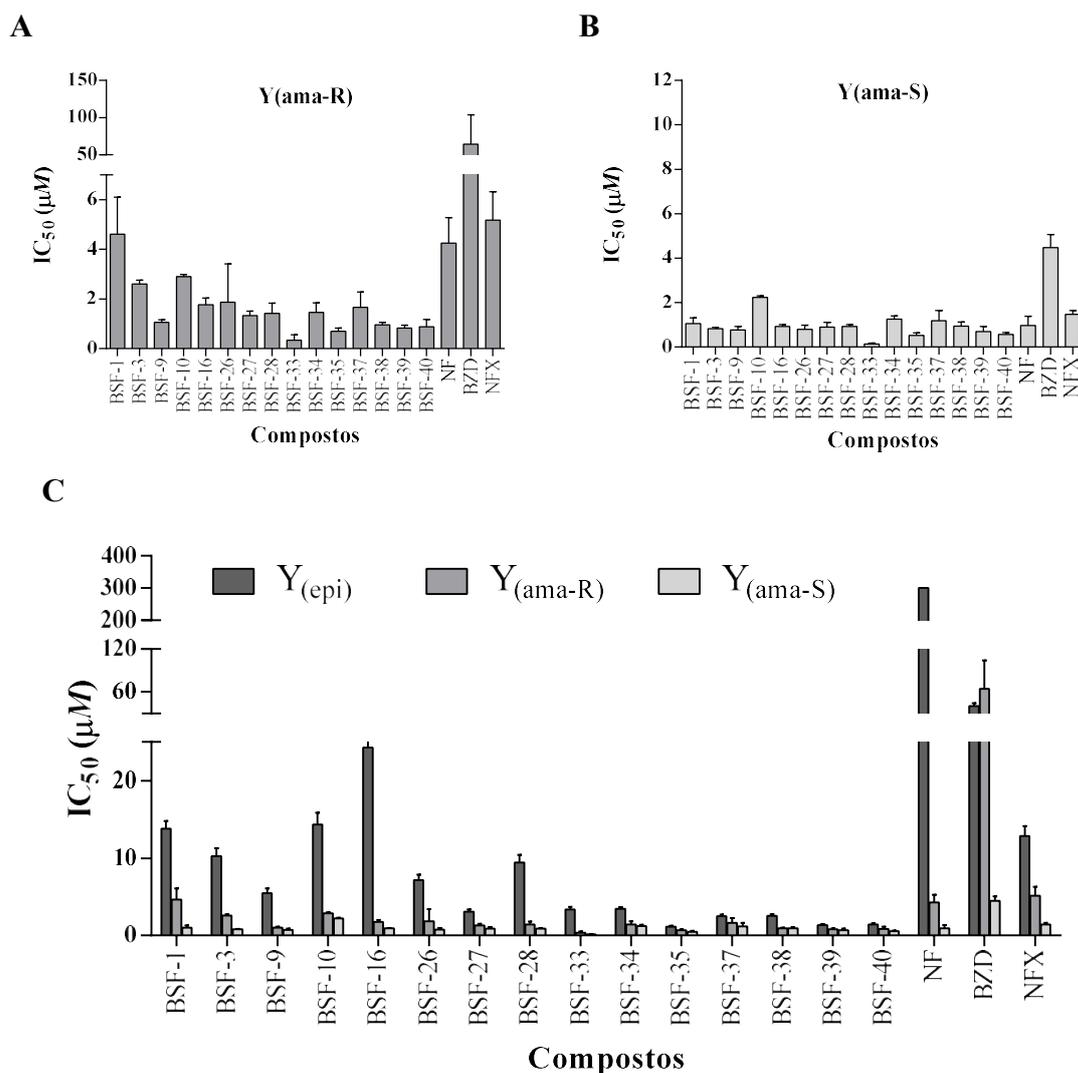


Figura 81. Atividade anti-*T. cruzi* dos compostos selecionados por HCA e fármacos de referência frente às formas epimastigota e amastigota da cepa Y. Dados apresentados em média e desvio padrão (τ) da triplicata e de pelo menos dois ensaios independentes. (A): atividade frente a forma amastigota da cepa Y parcialmente resistente a BZD [$Y_{(ama-R)}$]; (B): atividade frente a forma amastigota da cepa Y susceptível a BZD [$Y_{(ama-S)}$]; (C) atividade frente às formas epimastigota e amastigota da cepa Y. BZD: benznidazol; NFX: nifurtimox; NF: nifuroxazida.

As imagens obtidas no ensaio de HCA foram selecionadas para os compostos mais ativos (BSF-27, BSF-37, BSF-39 e BSF-40), além dos fármacos de referência NF,

BZD e NFX nas concentrações de 50, 12,5, 1,56 e 0,39 μM e se encontram no anexo 9 deste trabalho. Dentre os compostos mais ativos, o composto BSF-39 apresentou boa seletividade à amastigota em relação à célula hospedeira. Na figura 82 encontra-se as imagens obtidas para este compostos e observa-se que, em concentração de 1,56 μM , manteve-se a morfologia característica da célula U2OS e sem presença de formas amastigotas, diferente do observado para a concentração de 0,39 μM , a qual não foi suficiente para inibir o parasita. Para o fármaco BZD, observa-se a baixa inibição parasitária pela presença da forma amstigota na concentração de 1,56 μM , uma vez que esta cepa é parcialmente resistente a este fármaco. As curvas dose-resposta obtidas para cada composto selecionado nos ensaios frente a forma amastigota se encontram no anexo 10 deste trabalho.

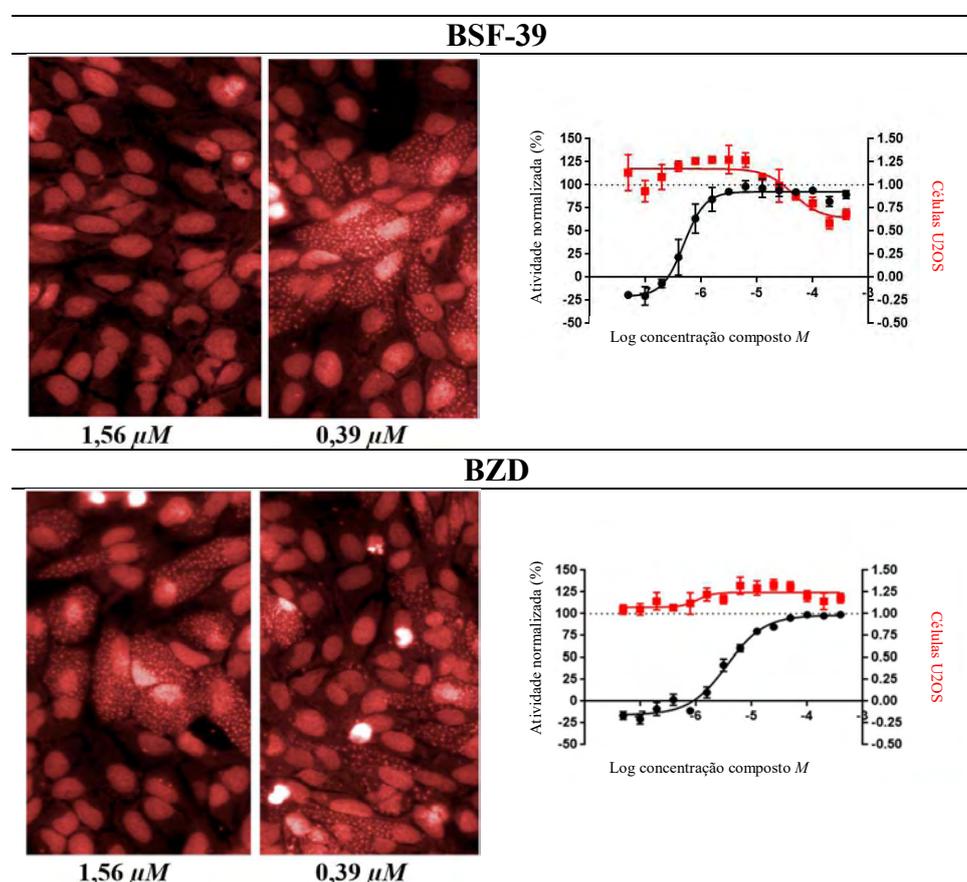


Figura 82. Imagens obtidas pela metodologia de análise de alto conteúdo (HCA') do composto BSF-39 e benznidazol nas concentrações de 1,56 e 0,39 μM . Ensaio realizado com a cepa Y_(ama-R), parcialmente resistente ao benznidazol, em células U2OS e incubação por 72h nas concentrações indicadas. Leituras realizadas no equipamento Operetta (Perkin Elmer, USA). Dados fornecidos por Dra. Carolina Borsoi Moraes e Caio Haddad Franco (LNBio – CNPEM).

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho demonstram que os compostos BSF-37 a BSF-40, planejados a partir dos modelos QSAR, obtiveram a atividade desejada mais pronunciada frente ao *T. cruzi*, tanto frente a forma epimastigota, utilizada como triagem e geração dos modelos QSAR, como frente a forma amastigota do parasita.

6.7 Determinação da inibição das enzimas *TcTR* e GR

Neste trabalho, a enzima *TcTR* heteróloga foi expressa e purificada pela Dra. Patrícia Hermes Stoco e Dra. Iriane Eger no Laboratório de Protozoologia (Universidade Federal de Santa Catarina). Para avaliação da atividade enzimática após purificação, as autoras identificaram boa atividade quando utilizada a 230 ng, pois manteve uma reação linear ($r = 0,9964$) com delta de absorbância de 0,014/minuto, representado na figura 83 (EGER, 2010).

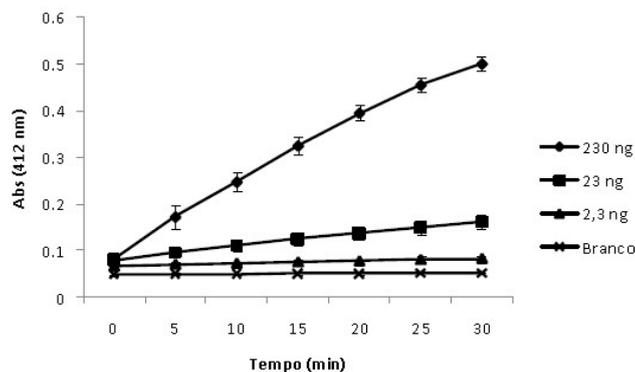


Figura 83. Teste de atividade da enzima tripanotona redutase de *T. cruzi* (*TcTR*) realizado pelo grupo de Steindel, M. (EGER, 2010).

Os ensaios foram conduzidos na concentração de 50 μM para todos os compostos devido baixa solubilidade no tampão enzimático. Utilizou-se concentração de 1% de DMSO e 0,4 % de etanol, o qual não interferiu na atividade enzimática da *TcTR* e da GR, pois apresentou valores iguais aos controles enzimáticos atribuídos no ensaio. Para o controle enzimático sem solventes da GR, a inclinação da curva durante as leituras ($\delta Abs/\delta t$) foi de -0,059, e com presença de solventes, foi de -0,058. Para a *TcTR*, o controle enzimático sem solventes da *TcTR*, a $\delta Abs/\delta t$ apresentou -0,014, e com presença de solventes, -0,013. Foram avaliados 30 compostos, além da NF, BZD e NFX.

Na figura 84 e tabela 48 encontram-se os valores de inibição enzimática nas duas enzimas frente aos compostos. O resultado obtido para o fármaco NF não foi condizente

com a literatura no valor de inibição de 85 % da *Tc*TR a 100 μ M de NF (BLUMENSTIEL *et al.*, 1999), obtendo-se neste trabalho 52% de inibição a 100 μ M e 25 % a 50 μ M. No teste estatístico *t* de *Student* (intervalo de confiança de 95 %) verificou-se que os compostos BSF-7, $P = 0,242$ e BSF-27, $P = 0,226$, além do BZD, $P = 0,129$, apresentaram valores semelhantes na comparação entre as duas enzimas, não possuindo seletividade. A maioria dos demais compostos analisados e o NFX apresentaram $P < 0,05$ e maior atividade frente a enzima humana GR, indicando não ser o mecanismo de ação desta classe de compostos.

Apenas os compostos BSF-33 e BSF-35 apresentaram valores de porcentagem de inibição frente a *Tc*TR superiores à GR nas concentrações de 50 μ M, sendo obtido para o composto BSF-33 valor de porcentagem de inibição da *Tc*TR de $27,62\% \pm 3,37$ e para a enzima GR $6,17\% \pm 2,54$. Para o composto BSF-35, obteve-se porcentagem de inibição da *Tc*TR de $23,90\% \pm 7,07$ e para a enzima GR, $4,08\% \pm 1,12$. Estes compostos estão entre os mais ativos frente ao *T. cruzi*.

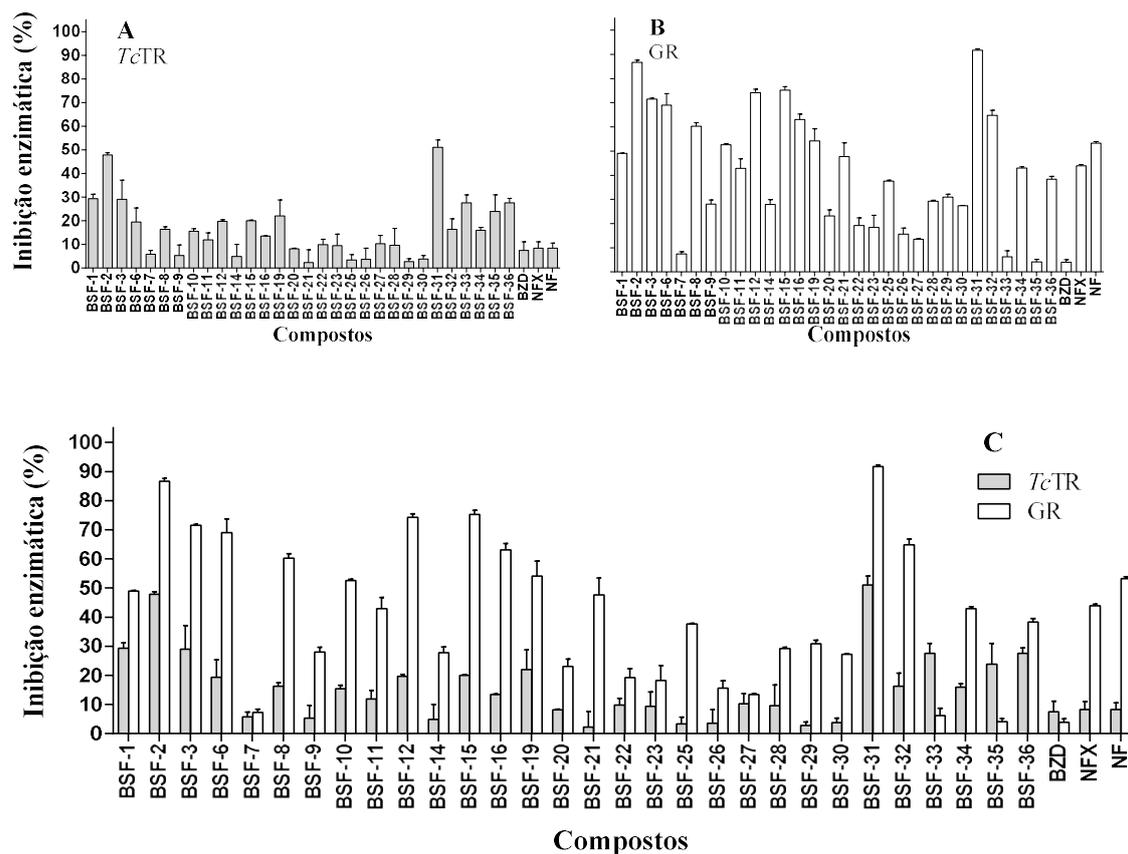
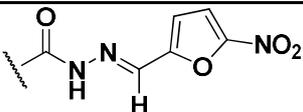


Figura 84. Inibição da enzima tripanotona redutase de *T. cruzi* (TcTR) e glutationa redutase humana dos compostos e composto-protótipo na concentração de $50 \mu\text{M}$. Dados apresentados em média e desvio padrão (σ) da duplicata. Gráficos: A – distribuição da porcentagem de inibição enzimática da enzima tripanotona redutase de *T. cruzi* (TcTR); B – distribuição da porcentagem de inibição da enzima glutationa redutase humana (GR); C – comparativo da porcentagem de inibição enzimática de cada composto entre as duas enzimas (cinza – TcTR, branco – GR). Concentração dos compostos utilizada no ensaio foi de $50 \mu\text{M}$. Teste estatístico *t de Student*: BSF-7 – $P = 0,242$, BZD – $P = 0,129$, demais compostos e fármacos $P < 0,05$, intervalo de confiança de 95 %.

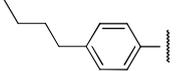
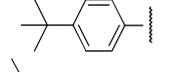
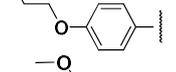
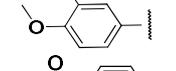
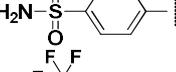
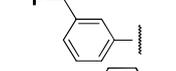
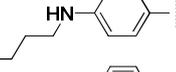
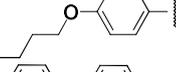
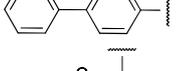
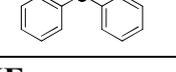
Tabela 48. Inibição da enzima tripanotona redutase de *T. cruzi* (TcTR) e glutationa redutase humana dos compostos e composto-protótipo na concentração de 50 μ M



Compostos (50 μ M)	Inibição da <i>TcTR</i> (%) (média \pm dp)	Inibição da <i>GR</i> (%) (média \pm dp)
BSF-1	29,38 \pm 1,77	48,99 \pm 0,17
BSF-2	47,83 \pm 0,91	86,67 \pm 1,00
BSF-3	28,98 \pm 8,17	71,50 \pm 0,41
BSF-6	19,40 \pm 6,00	69,07 \pm 4,68
BSF-7	5,81 \pm 1,62	7,34 \pm 1,05
BSF-8	16,36 \pm 1,09	60,21 \pm 1,59
BSF-9	5,31 \pm 4,38	28,07 \pm 1,66
BSF-10	15,47 \pm 1,18	52,64 \pm 0,37
BSF-11	11,87 \pm 3,03	42,86 \pm 3,93
BSF-12	19,71 \pm 0,66	74,26 \pm 1,30
BSF-14	4,87 \pm 5,12	27,87 \pm 1,94
BSF-15	19,99 \pm 0,30	75,20 \pm 1,45
BSF-16	13,52 \pm 0,16	63,06 \pm 2,29
BSF-19	22,00 \pm 6,80	54,18 \pm 5,10
BSF-20	8,16 \pm 0,24	23,13 \pm 2,52
BSF-21	2,33 \pm 5,36	47,66 \pm 5,80
BSF-22	9,86 \pm 2,26	19,22 \pm 3,11
BSF-23	9,46 \pm 4,86	18,30 \pm 5,12
BSF-25	3,38 \pm 2,29	37,62 \pm 0,24
BSF-26	3,58 \pm 4,73	15,66 \pm 2,42

(cont.)

Tabela 48. Inibição da enzima tripanotona redutase de *T. cruzi* (*TcTR*) e glutationa redutase humana dos compostos e composto-protótipo na concentração de 50 μ M (cont.)

Compostos (50 μ M)	Inibição da <i>TcTR</i> (%) (média \pm dp)	Inibição da GR (%) (média \pm dp)
BSF-27 	10,28 \pm 3,54	13,40 \pm 0,41
BSF-28 	9,61 \pm 7,16	29,21 \pm 0,45
BSF-29 	2,77 \pm 1,20	30,87 \pm 1,21
BSF-30 	3,80 \pm 1,47	27,30 \pm 0,21
BSF-31 	10,71 \pm 0,50	27,16 \pm 0,07
BSF-32 	16,30 \pm 4,45	64,85 \pm 2,00
BSF-33 	27,62 \pm 3,37	6,17 \pm 2,54
BSF-34 	15,92 \pm 1,19	42,97 \pm 0,60
BSF-35 	23,90 \pm 7,07	4,08 \pm 1,12
BSF-36 	27,62 \pm 1,81	38,35 \pm 1,13
NF	25,66 \pm 2,23	53,29 \pm 0,62
BZD	7,50 \pm 3,60	3,92 \pm 1,12
NFX	8,33 \pm 2,75	43,89 \pm 0,55

Dados apresentados em média e desvio padrão (dp) da duplicata. Teste estatístico *t* de Student: BSF-7 – P = 0,242, BSF-27 – P = 0,226, BZD – P = 0,129, demais compostos e fármacos P < 0,05, intervalo de confiança de 95 %. Concentração dos compostos no ensaio de 50 μ M; BZD: benznidazol; NFX: nifurtimox; NF: nifuroxazida (composto-protótipo); *TcTR*: enzima tripanotona redutase de *T. cruzi*; GR: glutationa redutase humana.

6.7.1 Ancoramento de compostos na estrutura 3D das enzimas *TcTR* e GR

Nos ensaios de inibição enzimática, para a *TcTR* foi utilizado o fármaco clomipramina como controle de inibição, uma vez que sua ação inibitória nesta enzima já é conhecida (JONES *et al.*, 2010). Para facilitar a definição do sítio de interação, as estruturas tridimensionais dos alvos em complexo com ligantes de estrutura similar a clomipramina foram selecionadas no PDB, de acordo com as informações já descritas no item 5.7.4 deste trabalho.

Os compostos BSF-27 e BSF-35 foram selecionados para realização do ancoramento com a enzima *TcTR* e GR, além dos fármacos de referência e da NF. Os compostos selecionados apresentam alta atividade frente ao parasito, tanto na forma epimastigota como amastigota. No entanto, as porcentagens de inibição na *TcTR*, obtidas experimentalmente (*in vitro*), foram baixas e o composto BSF-35 foi mais seletivo para a *TcTR* em comparação com a GR nos dados experimentais. No ancoramento, o composto BSF-35 também apresentou os melhores resultados que o BSF-27 e o valor de ΔG foi mais negativo (mais energeticamente favorável) para a *TcTR* do que para a GR humana (tabela 49). No entanto, tal diferença (4 kcal.mol^{-1}) não pode ser considerada significativa.

Observaram-se valores positivos de energia livre de interação de Gibbs nos dados de ancoramento para o composto BSF-27 (tabela 49), que traduzem que a formação dos complexos enzima-ligante não seria energeticamente favorável. Ainda, obtiveram-se valores baixos de LE, que representa o índice de comparação entre moléculas de acordo com a energia média de ligação, considerando os átomos individualmente (HOPKINS *et al.*, 2014).

Como mencionado anteriormente, o resultado experimental de inibição esperado para o fármaco NF (BLUMENSTIEL *et al.*, 1999) não foi obtido, reforçando a hipótese de que esta classe de compostos não possuiria como alvo a *TcTR*. Nos estudos de ancoramento, a NF apresentou valores energeticamente favoráveis em relação à formação do complexo enzima-NF (ΔG negativo; -7 (*TcTR*) e -11 (GR humana) kcal.mol^{-1}), mas menos favoráveis em comparação ao composto BSF-35 e ao fármaco clomipramina.

De acordo com a tabela 49, o fármaco de referência, BZD, apresentou baixa afinidade calculada para as duas enzimas. Já o fármaco NFX apresentou baixa afinidade para a *TcTR* (-3 kcal.mol^{-1}) e maior afinidade para a GR humana ($-21 \text{ kcal.mol}^{-1}$), o que reforçaria a explicação para sua toxicidade.

O fármaco de controle de inibição da *TcTR*, clomipramina, apresentou afinidade calculada adequada para a enzima ($\Delta G = -43 \text{ kcal/mol}$), com boa eficiência ($LE = 0,46$), corroborando com os dados experimentais de inibição obtidos.

Tabela 49. Energias de ligação do ancoramento, eficiência do ligante e inibição da enzima tripanotona redutase de *T. cruzi* (TcTR) e glutatona redutase humana dos compostos e fármacos

Compostos	TcTR			GR		
	Energias de ligação ΔG (kcal/mol)	LE	% de inibição (50 μM)	Energias de ligação ΔG (kcal/mol)	LE	% de inibição (50 μM)
BSF-27	16	0,00	10,28	6	0,00	13,40
BSF-35	-14	0,13	23,90	-10	0,09	4,08
NF	-7	0,08	25,26	-11	0,14	53,29
BZD	15	0,00	7,5	-1	0,01	3,92
NFX	-3	0,03	8,33	-21	0,26	43,89
Clomipramina	-43	0,46	84,20			

Energias de ligação calculadas no programa LeadIT 2.1.8, BioSolveIT GmbH para a tripanotona redutase de *T. cruzi* (TcTR – PDB 1GXF) e para a glutatona redutase humana (GR – PDB 1XAN). LE: eficiência do ligante.

Cabe ressaltar que o método de ancoramento molecular apresenta limitações importantes, uma vez que considera somente a flexibilidade dos resíduos de aminoácido do sítio de interação definido pelo raio, em Angstroms, indicado pelo usuário nos cálculos (MORGON, COUTINHO, 2007; LEACH, 2001).

Resultados mais fidedignos seriam obtidos se os melhores complexos (escore) do procedimento de ancoramento fossem submetidos a simulações de dinâmica molecular. Neste estudo, tal procedimento não foi desenvolvido devido à limitação de tempo e prioridade de síntese e ensaio dos compostos planejados. A realização dos ensaios *in vitro* de inibição, no entanto, descartou a necessidade de se prosseguir com a exploração da TcTR como potencial alvo molecular do conjunto de compostos investigados.

6.8 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (ψ_m) em formas epimastigotas por citometria de fluxo

As mitocôndrias são organelas essenciais para produção energética celular. Em diversos modelos de morte celular, a mitocôndria representa o verificador central do apoptose. Semelhante ao que ocorre no ciclo celular, o processo apoptótico é controlado por alguns pequenos eventos, um dos quais é a permeabilização da membrana mitocondrial (KROEMER, GALLUZZI, BRENNER, 2007). A eficiência da produção de energia mitocondrial é dependente principalmente do $\Delta\psi_m$ que é gerado metabolicamente

pela bomba de prótons da cadeia de transporte mitocondrial. Desta maneira, a integridade da membrana mitocondrial é estritamente controlada para manter a osmolaridade, facilitar o transporte de nucleotídeos de adenina e preservar o $\Delta\psi_m$ que é requerido para a produção de ATP. A perda do controle sobre a membrana mitocondrial implica na formação de poros ou canais que neutralizam o potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) através da membrana mitocondrial interna. Diferentes marcadores fluorescentes catiônicos podem ser utilizados para determinar o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), tais como rodamina 123, DIOC6 (3,3-diexiloxacarbocianina iodada) e JC-1 (KROEMER, GALLUZZI, BRENNER, 2007).

Neste ensaio foi utilizada a rodamina 123 (R123) como marcador, a qual é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. Esse fluorocromo tem características lipofílicas e catiônicas, que permitem sua atração pelo alto potencial elétrico presente na membrana mitocondrial e assim acumulando-se preferencialmente na matriz dessa organela. Devido a essa propriedade, a R123 tem sido utilizada para quantificar o potencial de membrana em diferentes tipos celulares (KOOPMANN *et al.*, 2005).

Os ensaios foram conduzidos para verificar se os compostos atuavam na integridade do potencial de membrana mitocondrial, uma vez que classe de compostos semelhante foi verificado como agente despolarizador da membrana mitocondrial (BOIANI *et al.*, 2010). Inicialmente foi realizado triagem selecionando-se alguns compostos representativos do conjunto, assim como na seleção para os ensaios frente amastigotas, foi utilizado a ferramenta de HCA. Os compostos selecionados foram BSF-1, BSF-3, BSF-10, BSF-16, BSF-32, BSF-33, BSF-34, BSF-35, BSF-36 e os fármacos NF, BZD e NFX. Todos os compostos e fármacos foram analisados a $15 \mu M$ nos tempos de 24 e 48 h frente a forma epimastigota da cepa Y de *T. cruzi*. Os resultados, figuras 83 e 84, demonstraram que a maioria dos compostos mais ativos induzem despolarização da membrana comparado ao controle, com exceção do composto BSF-33. Os compostos BSF-3, BSF-16 e BSF-36, apresentaram despolarização da membrana mitocondrial, porém não foram ativos nos ensaios frente a epimastigotas (IC_{50} de $\sim 25 \mu M$ para o BSF-16 e $\sim 10 \mu M$ para BSF-3 e BSF-36). No caso dos fármacos, NF e BZD, não apresentaram diferenças em relação ao controle, por outro lado o NFX apresentou indicação de

despolarização da membrana mitocondrial de forma semelhante aos compostos mais ativos.

Em outra etapa do estudo, o composto BSF-34 e o NFX foram analisados com mais detalhes quanto alterações no potencial de membrana e avaliação da morte celular com iodeto de propídio, figuras 85 e 86. Este composto BSF-34 foi escolhido pois segue a tendência do conjunto quanto a maior atividade na primeira etapa de ensaios frente a forma epimastigota, sendo este substituinte, 4-butoxi-benzil, representante dos mais ativos e que provocou despolarização da membrana nos ensaios preliminares em 24 e 48h. O iodeto de propídio é utilizado como corante vital, sendo que, nas células inviáveis, há uma forte marcação do corante ao DNA, de maneira que a intensidade da fluorescência é inversamente proporcional à viabilidade celular (KROEMER *et al*, 2009). Os resultados das 3 concentrações (3, 6 e 12 μM) e tempos de leitura de 1, 2, 4, 6, 18 e 26 h, indicam que o composto BSF-34 iniciou despolarização da membrana na primeira leitura de 1h de incubação, sendo gradativa nos demais tempos analisados. Por outro lado, o NFX apresentou despolarização apenas na leitura após 26 h de incubação. Quanto a morte relacionada a marcação com iodeto de propídio, o BSF-34 e NFX não apresentaram população significativa de parasitos mortos. Os resultados se encontram nas figuras 87 e 88 e foram analisados com auxílio do grupo de pesquisa coordenado pelo Professor Mario Steindel, baseado no trabalho de YAMANAKA *et al.*, 2013.

Considerando os dados obtidos por citometria, não é possível propor que a despolarização da membrana mitocondrial por compostos nitrofuranos ocasiona a morte de formas epimastigotas do parasito nas condições do ensaio, uma vez que compostos com baixa atividade provocaram despolarização da membrana e um composto com alta atividade não provocou esse fenômeno.

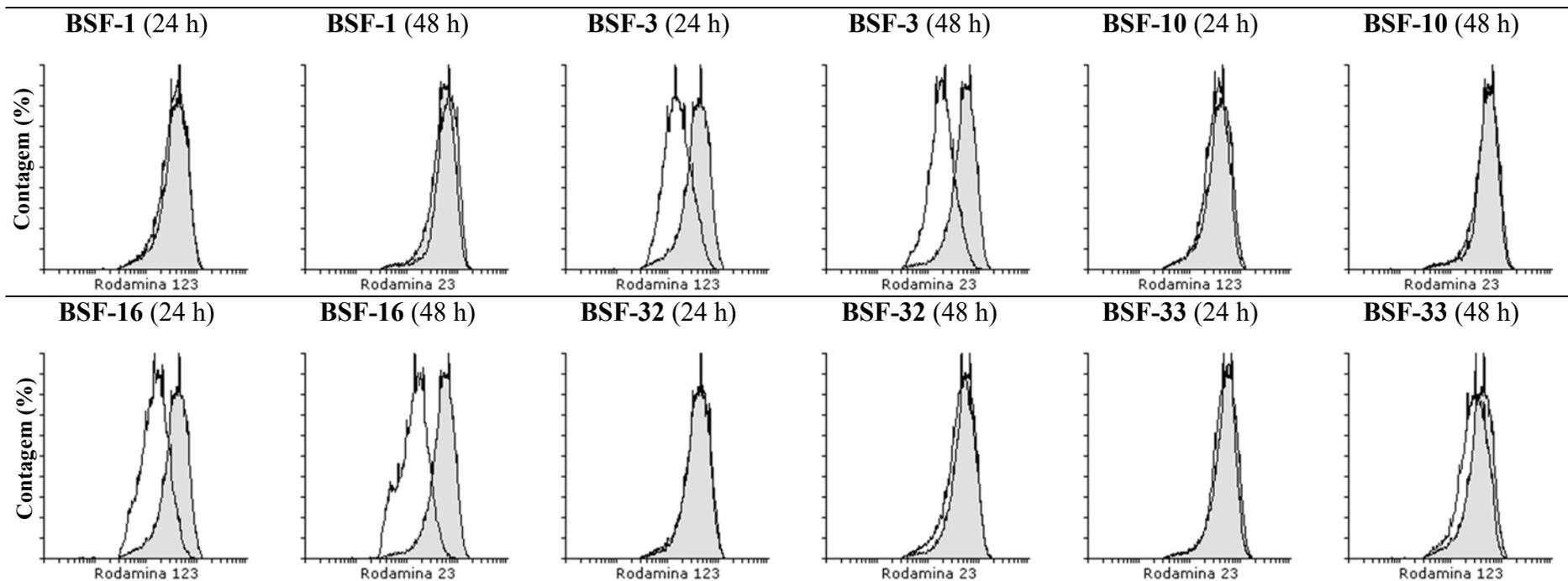


Figura 85. Histogramas das análises de citometria de fluxo para avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Formas epimastigotas da cepa Y tratadas com os compostos 1, 3, 10, 16, 32 e 33 na concentração de $15 \mu M$, leituras após 24 e 48 h com marcação por rodamina 123. Controle do solvente DMSO a 1% (região cinza clara ■).

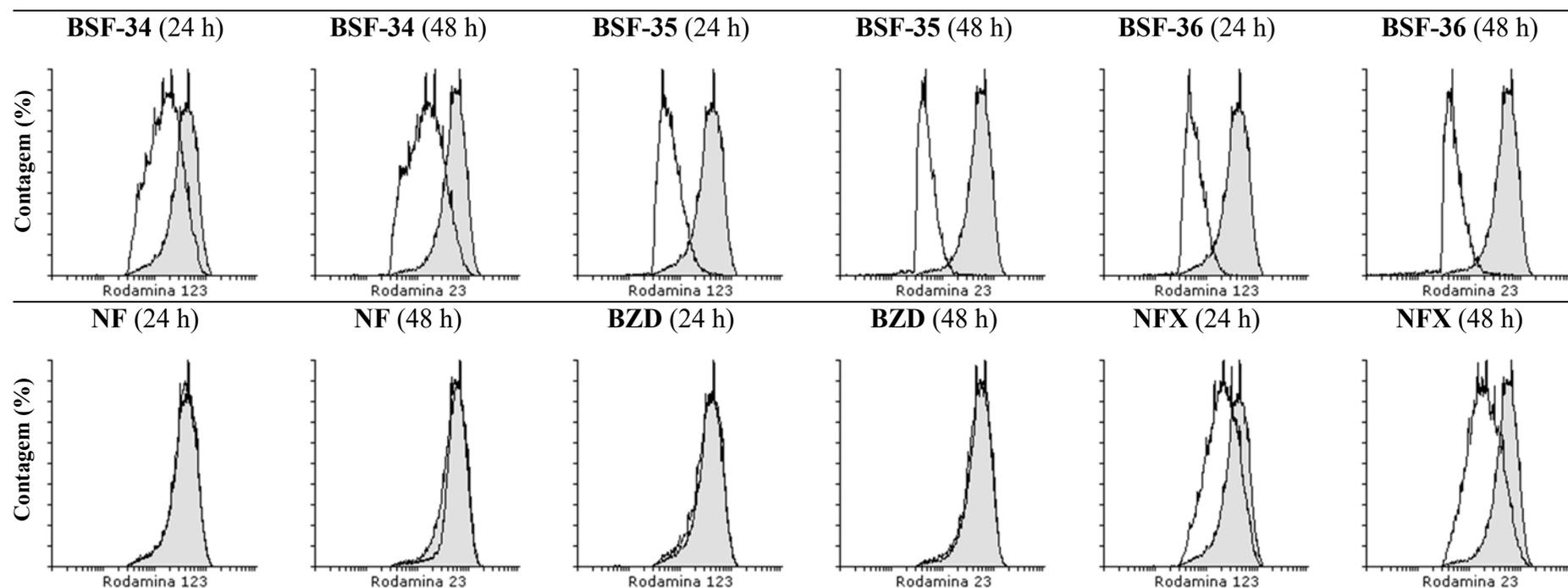


Figura 86. Histogramas das análises de citometria de fluxo para avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Formas epimastigotas da cepa Y tratadas com os compostos 34, 35, 36 e fármacos nifuroxazida (NF), benznidazol (BZD) e nifurtimox (NFX) na concentração de $15 \mu\text{M}$, leituras após 24 e 48 h com marcação por rodamina 123. Controle do solvente DMSO a 1% (região cinza clara ■).

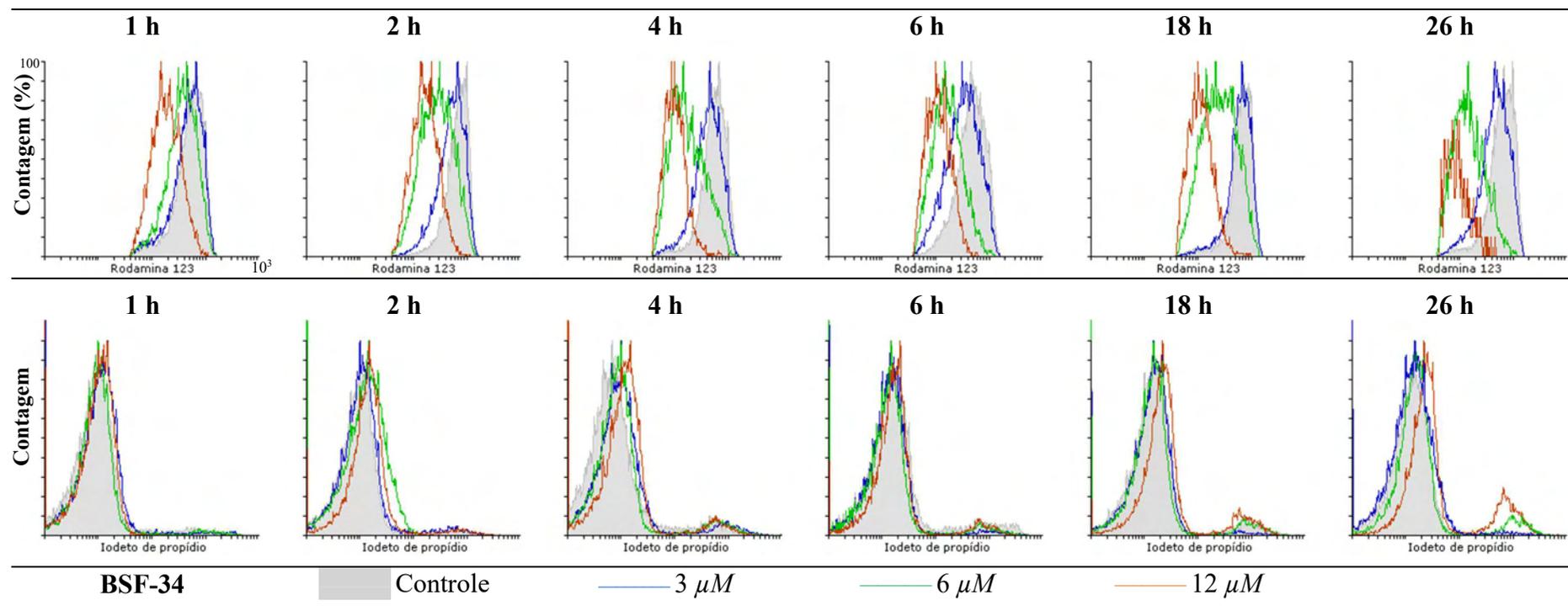


Figura 87. Histogramas das análises de citometria de fluxo para avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e morte celular. Formas epimastigotas da cepa Y tratadas com o composto 34 (BSF-34) nas concentrações de 3 μM (linha azul —), 6 μM (linha verde —) e 12 μM (linha laranja —), leituras após 1, 2, 4, 6, 18, e 26 h com marcação por rodamina 123 e iodeto de propídio. Controle do solvente DMSO a 1% (região cinza clara ■).

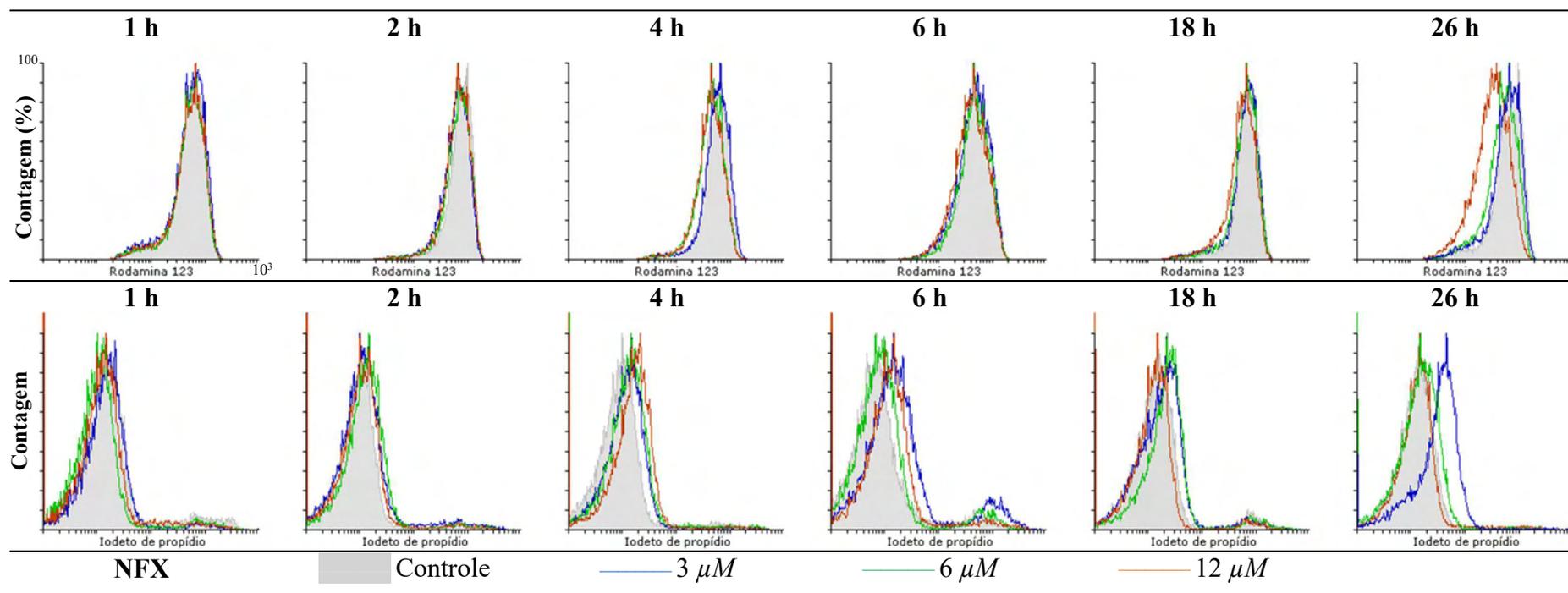


Figura 88. Histogramas das análises de citometria de fluxo para avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e morte celular. Formas epimastigotas da cepa Y tratadas com nifurtimox (NFX) nas concentrações de 3 μM (linha azul —), 6 μM (linha verde —) e 12 μM (linha laranja —), leituras após 1, 2, 4, 6, 18, e 26 h com marcação por rodamina 123 e iodeto de propídio. Controle do solvente DMSO a 1% (região cinza clara ■).

7 CONCLUSÕES

Diante dos objetivos deste trabalho de estudar derivados furfurilidênicos com estrutura análoga à nifuroxazida frente a *T. cruzi*, foram planejados, sintetizados e identificados 36 compostos com resultados satisfatórios quanto a identificação estrutural, pureza e rendimento, que foi da ordem de 70 %.

A determinação da atividade anti-*T. cruzi in vitro* dos compostos obtidos foi realizada frente às cepas Silvio X10 c11, Y, Bug 2149 c110 e Colombiana do parasito em sua forma epimastigota, com objetivo de triagem dos compostos. A maioria dos compostos analisados apresentou maior capacidade de inibição de crescimento do parasito, comparado ao benznidazol, com os seguintes valores: Silvio X10 c11 - $IC_{50} = 29,16 \pm 2,90 \mu M$, Y - $IC_{50} = 40,40 \pm 3,37 \mu M$, Bug 2149 c110 - $IC_{50} = 30,63 \pm 3,21 \mu M$ e Colombiana - $IC_{50} = 47,91 \pm 4,96 \mu M$. O composto mais ativo, composto BSF-35, 4-bifenil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno) carbohidrazida, apresentou os seguintes valores frente às cepas de *T. cruzi*: Silvio X10 c11 - $IC_{50} = 3,17 \pm 0,32 \mu M$, Y - $IC_{50} = 1,17 \pm 0,12 \mu M$, Bug 2149 c110 - $IC_{50} = 1,81 \pm 0,18 \mu M$ e Colombiana - $IC_{50} = 3,06 \pm 0,23 \mu M$. Esta etapa do trabalho de triagem frente a forma epimastigota demonstrou que no conjunto de 36 compostos, 87% apresentaram atividade superior ao BZD e 20% apresentaram atividade superior ao NFX.

Para identificar propriedades moleculares que mais influenciam na atividade, foram realizados estudos de relações estrutura química e atividade biológica abordando construção dos modelos moleculares tridimensionais dos compostos, obtenção de propriedades representativas da molécula, análise exploratória dos dados e estudos de QSAR com abordagem multivariada.

Os dados obtidos na análise exploratória possibilitaram o reconhecimento de padrões do conjunto de dados de 36 compostos além de identificar características de subconjuntos, separando-os em compostos benzenos substituídos e sem este substituinte. Observou-se que o descritor ClogP e descritores de natureza topológica e estereoquímica foram os mais relevantes neste estudo, pois indicam a tendência de compostos mais volumosos e lipofílicos como os mais ativos frente a forma epimastigota.

Os estudos QSAR com abordagem multivariada neste trabalho geraram modelos com capacidade preditiva. Os melhores modelos foram obtidos com compostos benzeno substituídos e realizados para cada cepa de *T. cruzi*. Os modelos foram validados internamente com parâmetros estatísticos e todos apresentaram os requisitos preconizados em literatura para esta validação. O procedimento de validação cruzada LNO indicou que os modelos são robustos, uma vez que a retirada de até 30 % das amostras não influenciou o modelo. Da mesma maneira, a aleatorização da atividade linearizada não indicou correlações ao acaso em nenhum modelo obtido. Não foi encontrado nenhuma amostra atípica no conjunto de compostos. Os descritores apontados como os que mais influenciam na atividade frente a forma epimastigota foram o ClogP e cargas CHELPG, estando presentes em todos os modelos das diferentes cepas. A partir destas informações foram planejados e sintetizados 4 novos compostos, utilizados na validação externa dos modelos. Os compostos BSF-38 e BSF-39 foram os melhores previstos pelos modelos QSAR. Estes novos compostos obtidos apresentaram elevada atividade frente a forma epimastigota, de 10 a 40 vezes superior ao BZD, dependendo da cepa avaliada.

A determinação da citotoxicidade em células LLC-MK₂ propiciou informações para identificar a seletividade dos compostos mais ativos entre formas epimastigotas do parasito comparado a células de mamíferos, além de verificar a viabilidade de realização dos ensaios frente a forma amastigota intracelular. Todos os compostos, exceto o composto BSF-26 (naftil substituído), apresentaram índice de seletividade superior ao BZD. Considerando as cepas mais resistentes a BZD e NFX (Y e Colombiana), os valores de IS foram maiores para os compostos BSF-39 e BSF-40. De um modo geral, os valores de IS da maioria dos novos compostos superaram os valores dos fármacos de referência, destacando-se os compostos BSF-35, BSF-39 e BSF-40.

Considerando que a forma amastigota intracelular é a mais representativa em estudos *in vitro* para a doença de Chagas, os ensaios com metodologia fenotípica de análise de alto conteúdo (HCA', *high content analysis*) foram realizados com conjunto de compostos selecionados a partir dos estudos de relação estrutura-atividade frente a forma epimastigota. Os compostos mais ativos frente a forma epimastigota se mantiveram ativos frente a forma amastigota da cepa Y parcialmente resistente ao BZD, sendo até 100 vezes mais ativos (BSF-35 $Y_{(ama-R)}$ - $IC_{50} = 0,35 \pm 0,20 \mu M$; BSF-39 $Y_{(ama-R)}$ - $IC_{50} = 0,88 \pm 0,30 \mu M$ e BZD $Y_{(ama-R)}$ - $IC_{50} = 64,34 \pm 39,52 \mu M$). Quanto ao índice de seletividade

obtido nos ensaios em amastigotas intracelulares (células U2OS), observou-se que os compostos mais ativos foram muito seletivos, apresentando valores de IS entre 107,36 e >567, em contraste aos valores dos fármacos de referência, os quais apresentaram IS de 16,45 e 50,38 para o NFX, e IS de 6,22 e > 89 para para o BZD, respectivamente.

Quanto à determinação da atividade dos compostos frente às enzimas tripanotona redutase *TcTR* e glutathiona redutase GR, os compostos analisados apresentaram baixa capacidade inibitória, indicando não ser este o mecanismo de ação desta classe de compostos. Dois compostos (BSF-34 e BSF-35) apresentaram valores maiores de porcentagem de inibição a 50 μM para a *TcTR*, comparados à GR: compostos BSF-34 (*TcTR* = 27,62 \pm 3,37, GR= 6,17 \pm 2,54) e BSF-35 (*TcTR* = 23,90 \pm 7,07 e GR = 4,08 \pm 1,12), o que indica pequena seletividade a *TcTR*. Análises de ancoramento nas estruturas cristalográficas das enzimas *TcTR* e GR foram realizados e as energias de interação obtidas para estes compostos foi muito alta e baixos valões do índice de eficácia do ligante, o que corrobora com os dados experimentais.

Com finalidade de explorar outro possível mecanismo de ação dos compostos 5-nitrofurânicos, foi realizada a análise de potencial de membrana mitocondrial, demonstrando despolarização para alguns compostos ativos e para o nifurtimox, porém não foi possível associar este efeito à morte parasitária no período de avaliação do ensaio de 26h.

A possibilidade de planejar e obter compostos mais ativos a partir dos estudos de relações estrutura-atividade foi o resultado mais relevante deste estudo. Os dados explorados neste trabalho indicam que os novos compostos planejados a partir de modelos QSAR são ativos e seletivos tanto para forma epimastigota, considerando diferentes cepas, como para forma amastigota do parasito. No quadro resumo abaixo encontram-se os dados obtidos para os compostos mais ativos. Estes resultados podem direcionar a continuidade da busca por compostos nitroheterocíclicos como potenciais a fármacos no combate a doença de Chagas.

Resumo dos dados obtidos dos compostos mais ativos frente ao *T. cruzi* obtidos neste trabalho, comparados aos fármacos de referência para o tratamento da doença de Chagas:



Compostos	FORMA EPIMASTIGOTA		CITOTOXICIDADE		FORMA AMASTIGOTA		U2OS		SI
	Cepa Y		LLC-MK ₂		Cepa Y		CC ₅₀ (μ M)		
	IC ₅₀ (μ M) (média \pm dp)		IC ₅₀ (μ M) SI		IC ₅₀ (μ M) (média \pm dp)		(média \pm dp)		
BSF-37	2,50	\pm 0,22	>100	>40,00	1,66	\pm 0,62	19,68	\pm 9,13	> 241
BSF-38	2,55	\pm 0,20	>100	>39,22	0,96	\pm 0,10	42,53	\pm 2,05	218,23
BSF-39	1,37	\pm 0,13	>100	>72,99	0,82	\pm 0,12	nd	nd	303,07
BSF-40	1,47	\pm 0,14	>100	>68,03	0,88	\pm 0,30	22,53	\pm 12,49	> 457
BZD	40,23	\pm 4,07	>200	>4,97	64,34	\pm 39,52	19,51	\pm 3,00	> 6,22
NFX	12,84	\pm 1,30	>200	>15,58	5,18	\pm 1,15	nd	nd	16,45

8 CONSIDERAÇÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando a demanda por novas opções terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas, foram colocadas algumas considerações e perspectivas a partir dos resultados obtidos neste trabalho.

O estudo da farmacocinética dos compostos mais ativos também é bastante relevante, sendo interessante realizar ensaios *in vitro* de permeabilidade em células Caco-2, pois podem fornecer muitos dados, uma vez que o objetivo é obter um fármaco via oral para o tratamento da doença de Chagas, o que possibilita investir em estudos de pré-formulação.

Quanto ao mecanismo de ação, trabalhos recentes demonstraram que a resistência de cepas de *T. cruzi* aos fármacos NFX e BZD é associada à mutação da *TcNTR* ocorrendo a inativação desta enzima. A *TcNTR*, como mencionado no decorrer deste trabalho, é responsável pela ativação de estruturas com grupo nitro, como ocorre com estes pró-fármacos. Considerando que os dados obtidos neste trabalho apontam para compostos nitrofuranos com atividade frente a cepas resistentes, é viável, em estudos próximos, considerar a investigação da hipótese destes compostos serem ativos em cepas com baixa expressão desta enzima, além disso verificar se eles inativam a própria *TcNTR*, uma vez que foi relatado a função desta enzima no processo de invasão do parasito em células hospedeiras e, mutantes sem sua expressão, perdeu a capacidade de transformação à forma tripomastigota metacíclica (WILKINSON *et al.*, 2008). Algumas destas abordagens já se iniciaram no Laboratório da Profa. Bianca Zingales, colaboradora deste trabalho.

Estudos *in vitro* com foco na avaliação da atividade frente ao parasita podem fornecer informações relevantes, como nos estudos de tempo de morte (TK, *Time-kill*). Esta abordagem foi verificada em trabalho de Moraes e colaboradores (2014) frente ao *T. cruzi*, e avaliaram alguns nitroheterocíclicos, BZD, NFX, fexinidazol sulfona e um derivado do oxaborol AN4169 em comparação com inibidores da biossíntese do ergosterol, entre eles o posaconazol e ravuconazol. Os dados obtidos destes fármacos e compostos no ensaio de tempo de morte indicou que os compostos nitroheterocíclicos e o derivado do oxaborol demonstraram efeito tripanocida em menor tempo, com

capacidade de erradicação da infecção, porém com menor potência, diferente dos inibidores do ergosterol, que apesar de mais potentes, não erradicou a infecção (MORAES *et al.*, 2014). Estas informações são de grande valia para o planejamento de estudos *in vivo*, além de avaliar o verdadeiro potencial de compostos para o seguimento dos estudos.

Alguns estudos prévios de ensaios de tempo de morte com os compostos mais ativos obtidos neste trabalho foram conduzidos pelo grupo coordenado pela Dra. Carolina Borsoi Moraes (LNBio – CNPEM) e se encontram na figura 89.

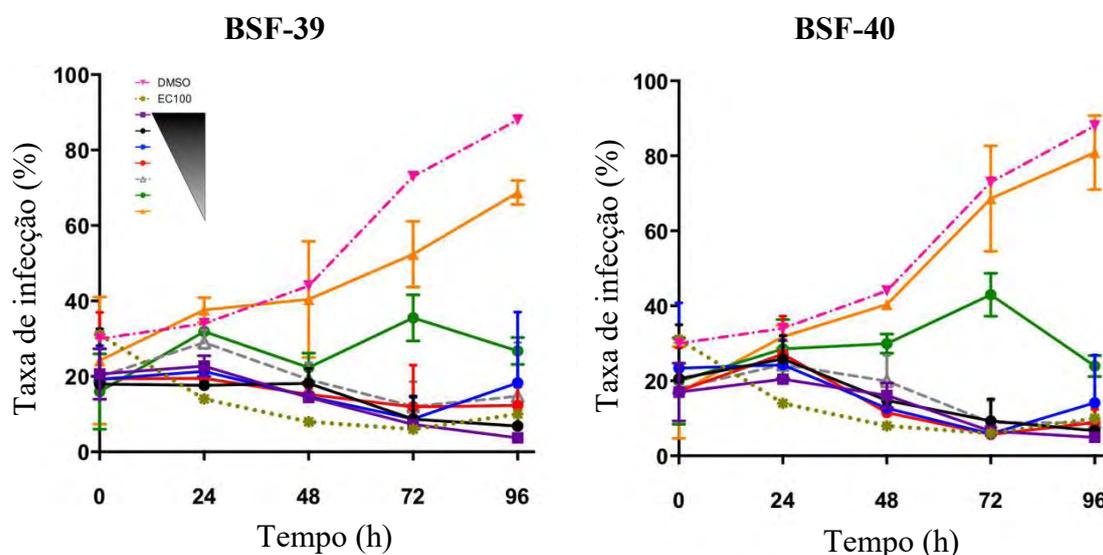


Figura 89. Dados prévios dos ensaios de tempo de morte (*Time-kill*) dos compostos BSF-39 e BSF-40. Concentrações indicadas em escala de preto (mais concentrado) a cinza claro (menor concentração). Ensaios realizados com a cepa $Y_{(ama)}$, em células U2OS. Leituras realizadas no equipamento Operetta (Perkin Elmer, USA). Dados fornecidos por Dra. Carolina Borsoi Moraes e Caio Haddad Franco (LNBio – CNPEM).

A identificação de compostos com alta atividade e seletividade *in vitro* frente a forma amastigota do parasito direciona a avaliação *in vivo* destes compostos. Os ensaios *in vivo* são de grande relevância para a continuidade dos estudos destas estruturas com finalidade de identificar a dose letal, dose eficaz, avaliação da ação na fase crônica da doença, além de amplo estudo quanto a toxicidade em diferentes tecidos.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, D.J. *Burger's Medicinal Chemistry*. 5ed. New York: Willey-Interscience, 1994, 1088 p.
- ALLINGER, N.L. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force Field utilizing V1 and V2 torsional terms. *J Am Chem Soc.* v. 99, p. 8127 – 8134, 1977.
- ALMEIDA-DE-FARIA, M., FREYMULLER, E., COLLI, W., ALVES, M.J.M. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Experim Parasitol.* v. 92, p.263-274, 1999.
- ANDRADE, S.G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev Soc Bras Med.* v. 18, p. 39-46, 1985.
- ANDRADE, L.O., ANDREWS, N.W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology Online*, 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n10/pdf/nrmicro1249.pdf>>. Acesso em: 16 Jan 2012.
- ANVISA/MS, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Medicamentos Novos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 14 Out 2010.
- BALABAN, A. T. Distance Connectivity Index. *Chem. Phys. Lett.*, v. 89, p. 399-404, 1982.
- BARREIRO, E.J., FRAGA, Z.A.M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (PRONFAR). *Quim nova.* v.28, p. S53-S63, 2005.
- BARREIRO, E.J., FRAGA, Z.A.M. *Química Medicinal: as bases moleculares de ação dos fármacos*. 1 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2008. 536 p.
- BEAUMIER, C.M., GILLESPIE, P.M., STRYCH, U., HAYWARD, T., HOTEZ, P.J., BOTTAZZI, M.E. Status of vaccine research and development of vaccines. *Vaccine.* v. 34, p. 2996-3000, 2016.
- BEILSTEIN'S *Handbuch der Organischen Chemie*. 5 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1979.
- BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A.*, v. 38, p. 3098-3100, 1988.
- BLUMENSTIEL, K., SCHÖNECK, R., YARDLEY, V., CROFT, S. L., KRAUFT-SIEGEL, R. L., Nitrofurans as Common Subversive Substrates of *Trypanosoma cruzi* Lipoamine Dehydrogenase and Trypanothione Reductase. *Biochem Pharmacol.* v. 58, p.1791-1799, 1999.
- BOND, C.S., PETERSON, M.R., VICKERS, T.J., FAIRLAMB, A.H., HUNTER, W.N. Crystal structure of trypanosoma cruzi trypanothione reductase in complex with the inhibitor quinacrine mustard. *J Biol Chem.* v. 279, p. 294-293, 2004. (PDB: 1GXF)
- BRENEMAN, C.M., WIBERG, K.B. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. *J Comp Chem.* v. 11, p. 361 – 373, 1990.
- BRENER, Z. Chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection. *Adv Pharmacol Chemother.* v. 13, p.1-44, 1975.
- BRENER, Z. Therapeutic activity of furaltadone, furazolidine, and furadantin in experimental *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Hospital.* v. 60, p. 947-951, 1961.
- BRENER, Z., ANDRADE, Z.A., BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 431 p.

BRUN, R., BUHLER, Y., SANMAIER, U., KAMINSKY, R., BACHI, C. J., RATTENDI, D., LANE, S., CROFT, S., SNOWDON, D., YARDLEY, V., CARAVATTI, G., FREI, J., STANEK, J., METT, H. In Vitro Trypanocidal Activities of New S-Adenosylmethionine Decarboxylase Inhibitors. *Antimicrob Agents Ch.* v. 40, p. 1442-1447, 1996.

CAI, K., DING, M., ZONG, Z., WEI, X. Study on reduction of nitro aromatic compounds with hydrazine hydrate in water. *Huaxue Shijie.* v. 48, p. 232-234, 2007.

CAI, K., ZHOU, Y., YUE, W. FeO(OH)/C-catalyzed reduction of aromatic nitro compounds to anilines with hydrazine hydrate. *Huaxue Shijie.* v. 50, p. 418-420, 2009.

CAREY, F.A., SUNDBERG, R.J. *Advanced Organic Chemistry.* 4 ed. New York: Plenum Press, 2000. 1275 p.

CARLBERG, I., MANNERVIK, B. Glutathione reductase. *Meth Enzymol.* v.113, p.484-490, 1985.

CASTELLANI, O., RIBEIRO, L.V., FERNANDES, J.F. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J. Protozool.* v.14, p. 447-451, 1967.

CARACELLI, I., STAMATO, F. M. L. G., MESTER, B., PAULINO M., CERECETTO, H. A New Analogue of Nifurtimox. *Acta Cryst. Sect C.* v.52, p. 1281 - 1282, 1996.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 04 Jan 2012.

CERECETTO, H., DI MAIO, R., IBARRURI, G., SEOANE, G., DENICOLA, A., PELUFFO, G., QUIJANO, C., PAULINO, M. Synthesis and anti-trypanosomal activity of novel 5-nitro-2-furaldehyde and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde semicarbazone derivatives. *IFarmaco.* v. 53, p. 89-94, 1998.

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

CHAZOTTE, B. Labeling mitochondria with rhodamine 123. *Cold Spring Harb. Protoc.*, v. 7, p. 892-894, 2011.

COHEN, N.C. *Guidebook on molecular modeling in drug design.* San Diego: Academic Press, 1996. 361p.

CONNERS, E. E., VINETZ, J. M., WEEKS, J.R., BROUWER, K.C. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. *Acta Tropica.* v. 156 p. 68-78, 2016.

CONNOLLY, M. L. Analytical molecular surface calculation. *J Appl Cryst* v.16, p. 548-558, 1983

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

COURA, J.R., CANÇADO, J.R. A história da terapêutica da doença de Chagas. Portal da Doença de Chagas da Fiocruz, 2007. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/>>. Acesso em: 20 Nov 2010.

COURA, J.R., CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 97, p. 3-24, 2002.

COURA, J.R., VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature Outlook.* v.465, p. S6-S7, 2010.

CRAMER III, R.D., PATERSON, D.E., BUNCE, J.D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J Am Chem Soc.* v.110, p. 5959-5967, 1988.

- DA COSTA, F.C., PINHEIRO, A.C., DE ALMEIDA, M.V., LOURENÇO, M.C.S, DE SOUZA, M.V.N. Synthesis and Antitubercular Activity of Novel Amino Acid Derivatives. *Chem Biol Drug Des.* v.79, p.216–222, 2012
- DA SILVA, A., LOPES, R., LIMA, R., TOZATTI, C., MARQUES, M., ALBUQUERQUE, S., BEATRIZ, A., LIMA, D. Synthesis and biological activity against *Trypanosoma cruzi* of substituted 1,4-naphthoquinones. *Eur J Med Chem.* v.60, p.51-56, 2013.
- DA SILVA JR., E. N. S., MENNA-BARRETO, R. F. S., PINTO, M. C. F. R., SILVA, R. S. F., TEIXEIRA, D. V., SOUZA, M.C.B.V., SIMONE, C. A., CASTRO, S. L., FERREIRA, V.F., PINTO, A, V. Naphthoquinoidal [1,2,3]-triazole, a new structural moiety active against *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Med Chem*, v.43, p.1774-1780, 2008.
- DA SILVA, L.E., JOUSSEF A.C., PACHECO, LK., DA SILVA, D.G., STEINDEL, M., REBELO R.A. Synthesis and in vitro evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of N-quinolin-8-yl-arylsulfonamides. *Bioorg Med Chem.* v.15, p.7553-7560, 2007.
- DENIZOT, F., LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol Methods.* v. 89, p. 271-277, 1986.
- DEWAR, M.J.S.E., ZOEBISCH, G., HEALY, E.F., STEWART, J.J.P. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J Am Chem Soc.* v. 107, p. 3902 3909, 1985.
- DIAS, J.C.P., RAMOS JR., A.N., GONTIJO, E.D., LUQUETTI, A., SHIKANAI-YASUDA, M.A., COURA, J.R., TORRES, R.M., ALMEIDA, E.A, OLIVEIRA, W., SILVEIRA, A.C., REZENDE, J.M., PINTO, F.S., FERREIRA, A.W., RASSI, A., FRAGATTA FILHO, A.A., SOUZA, A.S., CORREIA FILHO, D., JANSEN, A.M., ANDRADE, G.M.Q., BRITTO, C.F.P.C., PINTO, A.Y.N., RASSI JR., A., CAMPOS, D.E., ADAD-FRANCH, F., SANTOS, S.E., CHIARI, E., HASSLOCHER-MORENO, A.M., MOREIRA, E.F., SILVA, E.L., MARIN-NETO, J.A., GALVÃO, L.M.C., XAVIER, S.S., VALENTE, S.A.S., CARVALHO, N.B., CARDOSO, A.V., SILVA, R.A, COSTA, V.M., VIVALDINI, S.M., OLIVEIRA, S.M., VALENTE, V.C., LIMA, M.M., ALVES, R.V. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 7 Brasília, 25(núm. esp.): 7-86, 2016.
- DNDi, DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES *initiative*. Disponível em: <<http://www.dndi.org.br/>>. Acesso em: 10 Ago 2016.
- DNDi, DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES *initiative* – América Latina. Portifólio de P&D. Um Modelo Colaborativo de P&D para Doenças Negligenciadas Orientado pelas Necessidades dos Pacientes. Disponível em: < <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio.html>>. Acesso em: 02 Mar 2014.
- DNDi, DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES *initiative* – From neglected diseases to neglected patients and populations. Anual report – 2015. Disponível em: < <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio.html>>. Acesso em: 02 Set 2016.
- DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free readical damage by antiparasitic drugs. *Chem Biol Interact.* v.73, p.1-27, 1990.
- DODD, M.C. The chemotherapeutic properties of 5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone (Furacin). *J Pharm Exp Therap.* v. 86 (4), p. 311-323, 1946.
- DOHERTY, D. *MOLSIM: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software*, version 3.2 – User’s Guide. The Chem21 Group Inc., 1780 Wilson Dr., Lake Forest, IL, 60045, EUA, 2002.
- DUYZEND, M.H., CLARK, C.T., SIMMONS, S.L., JOHNSON, W.B., LARSON, A.M., LCONTE, A.M., WILLS, A.W., GINDER-VOGEL, M., WILHELM, A.K., CZECHOWICZ, J.A., ALBERG, D.G.

Synthesis and evaluation of substrate analogue inhibitors of trypanothione reductase. *J Enz Inhib Med Chem.* v. 27, p. 784-794, 2012.

EGER, I. Potencial quimioterapêutico de diferentes derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: avaliação *in vitro* e *in vivo*. 2010. 105 p. (Tese de Doutorado em Biotecnologia - Universidade Federal de Santa Catarina. Orientador: Mário Steindel).

EL-OBEID, H.A., ELNIMA, E.I., AL-BADR, A.A. Synthesis and antimicrobial activity of new furan derivatives. *Pharm. Research*, nº1, p. 42-43, 1984.

EL-SAYED NM, MYLER PJ, BARTHOLOMEU DC, NILSSON D, AGGARWAL G, TRAN AN, *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, v. 15;309(5733), p. 409-415, 2005.

ERIKSSON, L., JAWORSKA, J., WORTH, A. P., CRONIN, M. T. D., MCDOWELL, R. M., Gramatica, P. Methods for reliability and uncertainty assessment and for applicability evaluations of classification- and regression-based QSARs. *Environ Health Perspect.* v. 111, p. 1361-1375, 2003.

EVENS, F., NIEMEGERES, K., PACKCHANIAN, A. Nitrofurazone therapy of *Trypanosoma gambiense* sleeping sickness in man. *Am J Trop Med Hyg.* v. 6, p. 655-678, 1957.

FAIRLAMB, A.H., CERAMI, A. Metabolism and functions of tripanothione in the kinetoplastida. *Ann Rev Microbiol.* v. 46, p. 695-759, 1992.

FAUCHER, J.F., BALTZ, T., PETRY, K.G. Detection of an "epimastigote-like" intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol research.* v. 81, p. 441-443, 1995.

FERREIRA, M.M.C. Multivariate QSAR. *J Braz Chem Soc.* v. 13, nº 6, p. 742-753, 2002.

FERREIRA, M.M.C., KIRALJ, R. Métodos quimiométricos em relações estrutura-atividade (QSAR), In: FERREIRA, KIRALJ, C.A. *Química Medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos*. 1 ed. São Paulo: Edusp, 2011; capítulo 12, pp. 387-453.

FILARDI, L.S., BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v.81, p. 755-759, 1987.

FIOCRUZ, Agência FIOCRUZ de notícias. *Glaxo Smith Kline e Fiocruz ampliam colaboração para doenças negligenciadas.* (2010) Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>>. Acesso em: 09 Jan 2012.

FOCK, V. A. Näherungsmethode zur Lösung des quantenmechanischen Mehrkörperproblems. *Z. Phys.* v. 61, p. 126-148, 1930.

FORSYTHE, K.H.; HOPFINGER, A. J. The Influence of Solvent on the Secondary Structures of Poly(L-alanine) and Poly(L-proline). *Macromolecules.* v. 6, p. 423-437, 1973.

FRESHNEY, I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 6 ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 2010. 732 p.

GALLERANO, R., MARR, J., SOSA, R. Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* v. 43 p.159-166, 1990.

Gaussian 03W (*Gaussian 03W for Windows*, version 6; Gaussian Inc.: 1995-2003, Pittsburgh, PA, EUA. Disponível em: <<http://www.gaussian.com>> . Acesso em: 24 Jan 2011.

GERPE, A., BOIANI, L., HERNÁNDEZ, P., SORTINO, M., ZACCHINO, S., GONZÁLEZ, M., CERECETTO, H. Naftifine-analogues as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Eur J Med Chem.* v. 45, p. 2154-2164, 2010.

- GHOSE, A.K., VISWANADHAN, V.N., WENDOLOSKI, J.J. Prediction of Hydrophobic (Lipophilic) Properties of Small Organic Molecules Using Fragmental Methods: An Analysis of ALOGP and CLOGP Methods. *J Phys Chem. A*. v. 102, p. 3762-3772, 1998.
- GONZÁLEZ, M., CERECETTO, H. Novel compounds to combat trypanosomatid infections: a medicinal chemical perspective. *Expert Opin. Ther. Patents*. v. 21, p. 699-715, 2011.
- GOLBRAIKH, A., TROPSHA, A. Beware of q^2 ! *J Mol Graphics Mod*. v. 20, p. 269-276, 2002.
- GU, WEN; WU, RONGRONG; QI, SHILONG; GU, CHENHAI; SI, FANJUNNAN; CHEN, ZHUHUI. Synthesis and Antibacterial Evaluation of New N-acylhydrazone Derivatives from Dehydroabietic Acid. *Molecules* v.17, p.4634-4650, 2012.
- GUADAGNINI, P.H., BRUNS, R.E., SOUZA, A.A. Cargas atômicas em moléculas. *Quim Nova*. v. 19, p. 148-155, 1996.
- GUHL, F., RAMÍREZ, J.D. *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision? *Acta Trop*. v.119, p. 1-4, 2011.
- HAMMETT, L.P.J. The effect of structure upon the reactions of organic compounds. *Am Chem Soc*.v.59, p.96-103, 1937.
- HANSCH, C., FUJITA, T. ρ - σ - π analysis: a method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J Am Chem Soc*. v.86, p.1616-1626, 1964.
- HANSCH, C., LEO, A., *Exploring QSAR: fundamental and applications in chemistry and biology*. Washington: American Chemical Society, 1995.580 p.
- HOLLOWAY, G.A., CHARMAN, W.N., FAIRLAMB, A.H., BRUN, R., KAISER, M., KOSTEWICZ, E., NOVELLO, P.M., PARISOT, J.P., RICHARDSON, J., STREET, I.P., WATSON, K.G., BAELL, J.B. Trypanothione Reductase High-Throughput Screening Campaign Identifies Novel Classes of Inhibitors with Antiparasitic Activity. *Antimicrob. Agents Chemother*. v. 53, p. 2824–2833, 2009.
- HOPKINS, A.L., KESERÜ, G.M., LEESON, P.D., REES, D.C., REYNOLDS, C.H. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. v. 2, p. 105-121, 2014.
- HULL, R.N., CHERRY, W.R., TRITCH, O.J. Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK₁, LLC-MK₂, AND LLC-MK₂(NCTC-3196) and their utility in virus research. *E. Exp. Med*. v.115, n.5, p.903-918, 1962.
- HyperChem Professional 8.0* (Hypercube, Inc: 2008. Gainesville, FL, EUA). Licença 2016.
- IMS, HEALTH CONSULTORIA. *IMS Health Forecasts Global Pharmaceutical Market Growth*, 2010. Disponível em: <<http://www.imshealth.com/portal/site/imshealth>>. Acesso em:12 Nov 2010.
- ISHII, M., JORGE, S.D., OLIVEIRA, A.A., PALACE-BERL, F., CECHINEL, C.A., SONEHARA, I.Y., PASQUALOTO, K.F.M., TAVARES, L.C. Synthesis, molecular modeling and preliminary biological evaluation of a set of novel 3-acetyl-2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazolines as potential antibacterial, anti-*T. cruzi*, and antifungal agents *Bioorg. Med. Chem*. v. 19, p. 6292-6301, 2011.
- JONES, D.C., ARIZA, A., CHOW, W.H., OZA, S.L., FAIRLAMB, A.H. Comparative structural, kinetic and inhibitor studies of *Trypanosoma brucei* trypanothione reductase with *T. cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. v. 169, p. 12-19, 2010.
- JORGE, S.D. Planejamento, desenvolvimento e estudos de QSAR de derivados benzofuroxânicos com atividade frente *Staphylococcus aureus* e *Trypanosoma cruzi*. São Paulo, 2011. 328p. (Tese de Doutorado

em tecnologia químico-farmacêutica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Orientador: Leoberto Costa Tavares).

JORGE, S.D., MASUNARI, A., RANGEL-YAGUI, C.O., PASQUALOTO, K.F.M., TAVARES, L. C. Design, synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling studies of novel benzofuroxan derivatives against *Staphylococcus aureus*. *Bioorg Med Chem*. v.17, p. 3028-3036, 2009.

JORGE, S.D., PALACE-BERL, F., MASUNARI, A., CECHINEL, C.A., ISHII, M., PASQUALOTO, K.F.M., TAVARES, L.C. Novel benzofuroxan derivatives against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains: design using Topliss' decision tree, synthesis and biological assay. *Bioorg Med Chem*. v.19, p. 5031-5038, 2011.

JORGE, S.D., PALACE-BERL, F., PASQUALOTO, K.F.M., ISHII, M., FERREIRA, A.K., BERRA, C.M., BOSCH, R.V., MARIA, D.A., TAVARES, L.C. Ligand-based design, synthesis, and experimental evaluation of novel benzofuroxan derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Europ J Med Chem*. v. 64, p. 200-214, 2013.

KAISER, C.R. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Química Nova*, v.23, p.231-236, 2000.

KERR, I.D., LEE, J.H., FARADY, C.J., MARION, R., RICKERT, M., SAJID, M., PANDEY, K.C., CAFFREY, C.R., LEGAC, J., HANSELL, E., MCKERROW, J.H., CRAIK, C.S., ROSENTHAL, P.J., BRINEN, L.S. Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. *J Biol Chem*. v. 284, p. 25697-25703, 2009.

KHADIKAR, P. V., DESHPANDE, N. V., KALE, P. P., DOBRYNIN, A., GUTMAN, I., DOMOTOR, G. The Szeged Index and an Analogy with the Wiener Index. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, v. 35, n. 3, p. 547-550, 1995.

KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J.H. *Química Farmacêutica*. Rio de Janeiro: ABDR, 1988. 783 p.

KOROLKOVAS, A., FRANÇA, F.F.C. *Dicionário Terapêutico Guanabara*. 18 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2011. 716 p.

KLOPMAN, G., LI, J.Y., WANG, S., DIMAYUGAT, M. Computer Automated log P Calculations Based on an Extended Group Contribution Approach. *J Chem Inf Comput Sci*. v.34, p. 752-781, 1994.

KIRALJ, R., FERREIRA, M.M. Basic Validation Procedures for Regression Models in QSAR and QSPR Studies: Theory and Application. *J Braz Chem Soc*. v. 20, p. 770-787, 2009.

KROEMER, G., GALLUZZI, L., BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev*. v.87, p.99-163, 2007.

KUBINYI, H. *QSAR: Hansch analysis and related approaches*. New York: VCR, 1993. 240 p.

LEACH, A.R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. 2 ed. Pearson Education, Londres, 2001, 768p.

LeadIT. 2.1.8 - BioSolveIT GmbH, Germany. Disponível em: <<http://www.biosolveit.de/>> Acesso em: 20 Ago 2016.

LEE, B.Y., BACON, K.M., BOTTAZZI, M.E., HOTEZ, P.J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect. Dis*. v. 13, p. 342-348, 2013.

LEE, C., YANG, W., PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, v. 37, p. 785-789, 1988.

LEESON, P. D., SPRINGTHORPE, B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nature*. v.6, p.881-890, 2012.

- LEESON, P. D. Drug discovery: Chemical beauty contest. *Nature*. v.481, p.455-456, 2012.
- LEMKE, T.L., WILLIAMS, D.A. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 6 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2008. 1377 p.
- LI, C.-K., MA, Y.-J., CAO, L.-H. Synthesis of Novel 3-Acetyl-2-aryl-5-(3-aryl-1-phenyl-pyrazol-4-yl)-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazoles. *J Chin Chem Soc*. v. 56, p. 182-185, 2009.
- LIPINSKI, C.A. Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 1, p. 337-341, 2004.
- LIPINSKI, C.A., LOMBARDO, F., DOMINY, B.W., FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv. Rev*. v. 23, p. 3-25, 1996.
- LUNARDELLI, A., BORGES, F.P., MELLO, K.F., ZEFERINO, A.S.A. Soroprevalência da doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue. *RBAC*, v. 39, n.2, p. 139-141, 2007.
- MAHALANOBIS, P C. On the generalised distância in statistics. *Proceedings of the National Institute of Sciences of India* v. 2, p. 49-55, 1936.
- MARCH, J. *Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structures*. 4 ed. New York: John Wiley, 2001. 1512 p.
- MARTINS, J. A. M., FERREIRA, M. M. C. "QSAR modeling: um novo pacote computacional open source para gerar e validar modelos QSAR". *Quím. Nova*, v.36, 4, p. 554-560, 2013.
- MARTINS-MELO, F.R., ALENCAR, C.H., RAMOS, A.N. JR., HEUKELBACH, J. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. v. 6, e1508, p.1-8, 2012.
- MarvinBeans* (*MarvinBeans*, version 5.0.4.1; ChemAxon Ltd.: 1998-2010, Budapeste, Hungria. Disponível em: <<http://www.chemaxon.com>> . Acesso em: 26 Jan 2011.
- MASUNARI, A. Planejamento, desenvolvimento e estudos de QSAR-2D e QSAR-3D de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade frente *Staphylococcus aureus* multirresistente (CEB-Clone Endêmico Brasileiro). São Paulo, 2005. 282p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).
- MASUNARI, A., TAVARES, L.C. Aplicação de estudos de QSAR-2D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* multiresistente (MRSA.) *Braz J Pharm Sci*.v.42, n.3, p.461-471, 2006.
- MELOS, J. L. R.; ECHEVARRIA, A. Trypanosomatids Metabolic Systems as Potential Chemotherapeutic Targets. *Rev Virtual Quim*. v. 4, p. 374-392, 2012.
- MERCK INDEX, Merck & Company, Inc. 12 ed. New York: White House Station, 1996. 360 p.
- MestRe-C* versão 5.0, MestreLab Research, Trial, Inc: 2006, Santiago de Compostela, Spain.
- MILES, M.A., LLEWELLYN, M.S., LEWIS, M.D., YEO, M., BALEELA, R., FITZPATRICK, S., GAUNT, M.W., MAURICIO, I.L. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitol*. v. 136, p.1509-1528, 2009.
- MOBLI, M., ABRAHAM, R.J. Quantum vs. Classical Models of the Nitro Group for Proton Chemical Shift Calculations and Conformational Analysis. *J Comput Chem*. v. 26, p. 389-398, 2005.

MOITA NETO, J.M., MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Quim Nova*. v. 21, p. 467-469, 1998.

MOON, S., SIQUEIRA-NETO, J.L., MORAES, C.B., YANG, G., KANG, M., FREITAS-JUNIOR, L.H., HANSEN, M.A.E. An Image-Based Algorithm for Precise and Accurate High Throughput Assessment of Drug Activity against the Human Parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLOS one*. v.9, p. e87188, 2014.

MORAN, M., CHAPMAN, M., ABELA-OVERSTEEGEN, L., CHOWDHARY, V., DOUBELL, A., WHITTALL, C., HOWARD, R., FARRELL, P., HALLIDAY, D., HIRST, C. *Neglected Disease Research & development: The Ebola effect G-FINDER. - Report 2015*. Policy Cures, The George Institute for International Health, 2011. Disponível em: <<http://www.thegeorgeinstitute.org/>>. Acesso em: 04 Jun 2016.

MORAES, C.B., GIARDINI, M., KIM, H., FRANCO, C.H., ARAUJO-JUNIOR, A.M., SCHENKMAN, S., CHATELAIN, E., FREITAS-JUNIOR, L.H. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Sci Rep* 4: doi:10.1038/srep04703, 2014.

MOREIRA, D.R.M., LEITE, A.C.L., CARDOSO, M.V.O., SRIVASTAVA, R.M., HERNANDES, M.Z., RABELLO, M.M., DA CRUZ, L.F., FERREIRA, R.S., DE SIMONE, C.A., MEIRA, C.S., GUIMARAES, E.T., DA SILVA, A.C., DOS SANTOS, T.A.R., PEREIRA, R.A., SOARES, M.B.P. Structural Design, Synthesis and Structure–Activity Relationships of Thiazolidinones with Enhanced Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity. *Chem Med Chem*. v. 9, p. 177-188, 2014

MORGON, N.H., COUTINHO, K. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. 1 ed. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007. 539 p.

MORRISON, R., BOYD, R. *Química orgânica*. 11 ed. Lisboa: Fundação Caloust Gulbenkian, 1994. 1360 p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*. v.65, p.55-63, 1983.

MUELAS, S., DI MAIO, R., CERECETTO, H., SEOANE, G., OCHOA, C., ESCARIO, J.A., GÓMEZ-BARRIO, A. New thiazidine derivatives with activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Folia Parasitol*. v. 48, p. 105, 108, 2001.

NOBREGA, A.A., GARCIA, M.H., TATTO, E., OBARA, M.T., COSTA, E., SOBEL, J., ARAUJO, W.N. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. *Emerg Infect Disease*. 15, p. 653-655, 2009.

OLIVEIRA, R.B., ZANI, C.L., FERREIRA, R.S., LEITE, R.S., ALVES, T.M.A. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotona redutase. *Quim Nova*, v. 31, n.2, p. 261-267, 2008.

OriginPro versão 8.0 SR00 - Trial, OriginLab Corporation: 2007, One Roundhouse Plaza, Northhampton, MA, USA. Disponível em: <<http://www.originlab.com/>> Acesso em: 15 Junho 2010.

PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of African sleeping sickness. I. Chemotherapy of experimental *Trypanosoma gambiense* infection in mice (*Mus musculus*) with nitrofurazone. *Am J Trop Med Hyg*. v. 4, p. 705-711, 1955.

PAGLIERO, R.J., LUSVARGHI, S., PIERINI, A.B., BRUN, R., MAZZIERI, MR. Synthesis, stereoelectronic characterization and antiparasitic activity of new 1-benzenesulfonyl-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquino-lines. *Bioorg Med Chem.*, v.18, p.142-150, 2010.

PALACE-BERL, F., Planejamento, síntese e avaliação da atividade anti-*T. cruzi* de derivados furfuralidênicos com estruturas azometínica e oxadiazolínica. São Paulo, 2012. 235p. (Dissertação de Mestrado em tecnologia químico-farmacêutica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Orientador: Leoberto Costa Tavares).

PALACE-BERL, F., JORGE, S. D., PASQUALOTO, K. F. M., FERREIRA, A. K., MARIA, D. A., ZORZI, R. R., BORTOLOZZO, L. D. S., LINDOSO, J. Â. L., TAVARES, L. C., 5-Nitro-2-Furfuriliden Derivatives as Potential Anti-Trypanosoma cruzi Agents: Design, Synthesis, Bioactivity Evaluation, Cytotoxicity and Exploratory Data Analysis. *Bioorgan Med Chem.*, v. 21, p. 5395-5406, 2013.

PALLA, G. P., C.; PREDIERI, G.; VIGNALI, C. Conformational study on *N*-acylhydrazones of aromatic aldehydes by nmr spectroscopy. *Gazzetta Chimica Italiana*, v. 112, 1982.

PALLA, G. P., G.; DOMIANO, P.; VIGNALI, C.; TURNER, W. Conformational behaviour and *e/z* isomerization of *n*-acyl and naroylhydrazones. *Tetrahedron*, v. 42, n. 13, p. 3649-3654, 1986.

PARDO, C.C. Determination of the cytotoxic effects of extracts, fractions, or substances, by means of the MTT test. 1 de dezembro de 2006. Disponível em: <http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/>. Acesso em: 10 Set 2010.

PAULA, F.R., JORGE, S.D., ALMEIDA, L.V., PASQUALOTO, K.F.M., TAVARES, L.C. Molecular modeling studies and in vitro bioactivity evaluation of a set of novel 5-nitro-heterocyclic derivatives as anti-*T. cruzi* agents. *Bioorg Med Chem.*v.17, p. 2673-2679, 2009.

PAULA, F.R., SERRANO, S.H.P., TAVARES, L.C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Quim Nova.* v.32, p. 1013-1020, 2009.

PAVIA, D.L. LAMPMAN, G. M., KRIZ , G. S., VYVYAN, J. R. Introduction to spectroscopy. 4 ed. Washington: Brooks/Cole-Cengage Learning, 2009. 656 p.

PEREZ-MAZLIAH, D., ALVAREZ, M., COOLEY, G., LOCOCO, B., BERTOCCHI, G., PETTI, M., ALBAREDA, M., ARMENTI, A., TARLETON, R., LAUCELLA, S., VIOTTI, R.. Sequential combined treatment with allopurinol and benznidazole in the chronic phase of Trypanosoma cruzi infection: a pilot study. *J Antimicrob Chemother*, v.68, p. 424–437, 2013.

PETERSSON, G. A., AL-LAHAM, M. A. A complete basis set model chemistry. II. Open-shell systems and the total energies of the first-row atoms. *J Chem Phys.* v. 94, p. 6081-6090, 1991.

PHYSPROP© database. Disponível em: <<http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>>. Acesso em: 10 Abril 2012.

PhRMA, PHARMACEUTICAL RESEARCH AND MANUFACTURERS OF AMERICA. Pharmaceutical Industry Profile 2015. Washington, DC: PhRMA.Abril, 2015. Disponível em: <http://www.phrma.org/profiles_and_reports>. Acesso em: 15 Out 2016.

PIACENZA, L., PELUFFO, G., ALVAREZ, M.N., MARTÍNEZ, A., RADI, R. Trypanosoma cruzi antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas Disease. *Antiox Redox Signal.* v. 19, p. 723-734, 2013.

PITA, S. S. DA R., PACUTTI, P. G. Alvos Terapêuticos na Doença de Chagas: a Tripanotiona Redutase como Foco. *Rev. Virtual Quim.* v. 3, p. 307, 2011.

PLATT, J. R. Influence of neighbor bonds on aditive bond properties in paraffins, *J. Chem. Phys.*,v. 15, p. 419-420, 1947.

PLATT, J. R. Prediction of isomeric differences in paraffin properties. *J. Phys. Chem.*, v. 56, p. 328-336, 1952.

PLAVSIC, D., NIKOLIC, S., TRINAJSTIC, N., MIHALIC, Z. *J.* On the Harary Index for the chacaracterization of chemical graphs. *Math. Chem.*, v. 12, p. 235–250, 1993.

PNIEWSKA, B., JANUCHOWSKI, M. Structural Investigations of Nifuroxazide, *p*- Hydroxy-N'-(5-nitrofurfurylidene)benzhydrazide. *Pol J Chem.* v.72, p. 2629-2634, 1998.

POZAS, R., CARBALLO, J., CASTRO, C., RUBÍO, J., Synthesis and in vitro antitrypanosomal activity of novel Nifurtimox analogues. *Bioorg Med Chem Lett.* v.15, p. 1417 – 1421, 2005.

POLAK, E., RIBIÈRE, G. Note sur la convergence de méthodes de directions conjuguées. *ESAIM: Mathematical Modelling and Numerical Analysis - Modélisation Mathématique et Analyse Numérique* v.3, p.35-43, R1, 1969.

QSAR modeling, programa gratuito, LQTA-UNICAMP. Disponível em: <<http://www.lqta.iqm.unicamp.br>>.

RANDIC, M. Novel molecular descriptor for structure-property studies. *Chem. Phys. Lett.*, v 211, p. 478-483, 1993.

RANDO, D.G, SATO, D.N., SIQUEIRA, L., MALVEZZI, A., LEITE, C.Q.F., AMARAL, A.T., FERREIRA, E.I., TAVARES, L.C. Potential Tuberculostatic Agents. Topliss Application on Benzoic Acid [(5-Nitro-thiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide Series. *Bioorg Med Chem.* v.10, p. 557-560, 2002.

RANDO, D.G, AVERY, M.A., TEKWANI, B.L., KHAN, S.I., FERREIRA, E.I. Antileishmanial activity screening of 5-nitro-2-heterocyclic benzylidene hydrazides. *Bioorg Med Chem.* v.16, p. 6724-6731, 2008.

RASSI JR, A., RASSI, A., MARIN-NETO, J.M. Chagas disease. *Lancet.* v. 375, p. 1388-1402, 2010.

REY, L. *Bases da Parasitologia Médica.* 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 379 p.

REZENDE, P. Relações quantitativas estrutura-atividade de derivados de 5-nitro-2-tiofilidênicos: planejamento, síntese e determinação da atividade antimicrobiana frente cepas de *Staphylococcus aureus*. São Paulo, 2002. 182p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).

RODRIGUES, A.M. Síntese e determinação da concentração inibitória mínima frente *S. aureus* de 5-nitro-2-furfurilideno hidrazidas substituídas. São Paulo, 2000. 101p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).

SANT'ANNA, C.M. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). *Quim. Nova*, v. 25, p. 505-512, 2002.

SAVVIDES, S.N., KARPLUS, P.A. Human glutathione reductase in complex with a xanthine inhibitor. *J Biol Chem.* v. 271, p. 8101-8107, 1996. (PDB: 1XAN).

SCHMIDT, A., KRAUTH-SIEGEL, R.L. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. *Curr Topics Med Chem.* v. 2, p. 1239-1259, 2002.

SILVA, L.H.P., NUSSENSZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol.* v.20, p.191, 1953.

SILVERMAN, R.B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action.* 2 ed. Califórnia: Elsevier Academic Press, 2004.

SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. *Spectrometric identification of organic compounds.* 7 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.

SLUNT, K. M., GRACE, J. M., MACDONALD, T. L., PEARSON, R. D. Effect of mitonafide analogs on topoisomerase II of *Leishmania chagasi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 40, p. 706-709, 1996.

SOARES-BEZERRA, R. J., LEON, L., GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Braz. J. Pharm. Sci.* v. 40, p. 139-149, 2004.

- SOARES SOBRINHO, J.L., MEDEIROS, F.P.M., LA ROCA, M.F., SILVA, K.E.R., LIMA, L.N.A., NETO, P.J. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de chagas. *Rev Pat Trop.* v. 36, p. 103-118, 2007.
- SOARES-SOBRINHO, J. L., CUNHA-FILHO, M. S. S., ROLIM NETO, P. J., TORRES-LABANDEIRA, J. J., DACUNHA-MARINHO, B. Benznidazole. *Acta Cryst, Sect. E*, v. 64, p.634 - 645, 2008.
- SOLOMONS, G., FRYHLE, C. *Organic Chemistry*. 8 ed. New York: John Wiley & Sons, 2004.1344 p.
- SOUZA, E.R., AMATO NETO, V., BRAZ, L.M.A., CARIGNANI, F.L., OKUMURA, M. Tratamento, por meio do alopurinol, da infecção aguda de camundongos pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Cin Terap.* v. 24, p. 50-52, 1998.
- SPERELAKIS, N. *Cell Physiology Sourcebook: A Molecular Approach*. 3 ed. San Diego, California: Academic Press, 2001. 1234 p.
- STEERT, K., BERG, M., MOTTRAM, J. C., WESTROP, G. D., COOMBS, G. H., COS, P., MAES, L., JOOSSENS, J., VAN DER VEKEN, P., HAEMERS, A., AUGUSTYNS, K. α -ketoheterocycles as inhibitors of *Leishmania mexicana* cysteine protease CPB. *Chem Med Chem.* v. 53, p. 1734-1748, 2010.
- STRAUSS, M., LO PRESTI, M., BAZÁN, P., BAEZ, A., FAURO, R., ESTEVES, B., NEGRETE, O., CREMONEZZI, D., PAGLINI-OLIVA, P., RIVAROLA, H. Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology International* , v.62, p.293-299, 2013.
- Sybyl 8.0 (Sybyl 8.0 for Linux*; Tripos, Inc.: 2007. St. Louis, EUA.
- TAVARES, L.C., FERREIRA, E.I. *Quantitative Structure Activity Relationships: Fundamental and application of the Hansch Analysis*. In: MONGE, A., GANELLING, R.C. (Org.). *Practical Studies for Medicinal Chemistry: An integrating approach for developing countries*. Pamplona: Editorial Universidade Nacional de Rio Cuarto, 2011. p. 143-170.
- TAVARES, L.C. QSAR: A abordagem de Hansch. *Quim Nova.* v. 27, p. 631-639, 2004.
- TAVARES, L.C., CHISTÉ, J.J., SANTOS, M.G.B., PENNA, T.C.V. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. *Boll Chim Farm.* v. 138, pt. 2, p. 432-436, 1998.
- TAVARES, L.C., PENNA, T.C.V., AMARAL, A.T. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. *Boll Quim Farm.* v.136, pt. 1, p.244-249, 1996.
- TEÓFILO, R. F.; MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C. Sorting variables by using informative vectors as a strategy for feature selection in multivariate regression. *J Chemom.*v.23, p. 32-48, 2009.
- THOMAS, G. *Química Medicinal: Uma introdução*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.432 p
- TIMMERMAN, H., MANNHOLD, R., KROGSGAARD-LARSEN, P., van de WATERBEEMD, H. *Chemometric Methods in Molecular Design*. Weinheim: Wiley-VCH, 2009, 318 p.
- TWENTYMAN, P.R., LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer*, v. 56, p. 278-285, 1987.
- TROPSHA, A., GRAMATICA, P. GOMBAR, V. K. The importance of being earnest: validation is the absolute essential for successful application and interpretation of QSPR models. *QSAR Comb. Sci.*, v. 22, p. 69-77, 2003.
- TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol. Aspects Med.* v. 25, p. 211-220, 2004.

TYLER, K.M., ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Internat J Parasitol.* v. 31, p. 472-481, 2001.

URBINA, J.A., DOCAMPO, Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *TRENDS Parasitol.* v.19, 495-501, 2003.

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

VEBER, D.F.; JOHNSON, R.S.; CHENG, H-Y; SMITH, B.R.; WARD, K.W.; KOPPLE, K.D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.*, v. 45, p. 2615-2623, 2002.

VERLINDE, C. L. M. J.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILLSON, M.; PÉRIÉ, J. J.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; OPPERDOES, F. R.; GELB, M. H.; HOL, W. G. J.; MICCHELS, P. A. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist Updat.* v. 4, p.50, 2001.

Viewerlite 5.0, Accelrys Inc., 2000.

VIODÉ, C., BETTACHE, N., CENAS, N., KRAUTH-SIEGEL, R.L., CHAVIÉRE, G., BALAKARA, N., PÉRIÉ, J. Enzymatic Reduction Studies of Nitroheterocycles. *Biochem Pharmacol.* v. 57, p. 549-557, 1999.

VISWANADHAN, V.N., GHOSE, A.K., REYANKAR, G.R., ROBINS, R.K. Atomic Physicochemical Parameters for Three Dimensional Structure Directed Quantitative Structure-Activity Relationships. 4. Additional Parameters for Hydrophobic and Dispersive Interactions and Their Application for an Automated Superposition of Certain Naturally Occurring Nucleoside Antibiotics. *J Chem Inf Comput Sci.* v. 29, p. 163-172, 1989.

WEISS, L.M., TANOWITZ, H.B, KIRCHHOFF, L.V. Advances in parasitology. Chagas disease, Part A. London: Elsevier, 2011. 367p.

WERMUTH, C.G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3 ed. Oxford: Elsevier, 2008. 942 p.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet N° 340 (Updated March 2014). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> Acesso em: 05 Jun 2014.

WOLD, S., ERIKSSON, L., CLEMENTI, S. In: Chemometric Methods in Molecular Design; H. WATERBEEMD, Ed. Wiley: Weinheim, 1995; Chapter 5, pp. 309–338.

WILKINSON, S. R., BOT, C., KELLY, J.M., HALL, B.S. Trypanocidal Activity of Nitroaromatic Prodrugs: Current Treatments and Future Perspectives *Curr Top Med Mhem* v.11, p. 2072-2084, 2011.

WILKINSON, S.R., TAYLOR, M.C., HORN, D., KELLY, J.M., CHEESEMAN, I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *PNAS.* v. 105, p. 5022-5027, 2008.

YAMANAKA, C.N., GIORDANI, R.B., REZENDE JR, C.O., EGER, I., KESSLER, R.L, TONINI, M.L., MORAES, M.H., ARAUJO, D.P., ZUANAZZI, J.A., ALMEIDA, M.V., STEINDEL, M. Assessment of Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Aliphatic Diamine Derivatives. *Chem Biol Drug Des.* v. 82, p. 697-704, 2013.

YEHYE, W.A., ARIFFIN, A., RAHMAN, N.A., Ng, S. W. 2-[4-Acetyl-5-(biphenyl-4-yl)-4,5-dihydro-1,3,4-oxadiazol-2-yl]phenyl acetate. *Acta Cryst. Sect. E*, v.66, p. 878 - 886, 2010.

ZOCK, J.M. Applications of High Content Screening in Life Science Research. *Comb Chem & Througput Screening.* v.12, p. 870-876, 2009.

ZORZI, R.R, JORGE, S.D., PALACE-BERL, F., PASQUALOTO, K.F.M, BORTOLOZZO, L.S., SIQUEIRA, A.M.C., TAVARES, L.C. Exploring 5-nitrofurán derivatives against nosocomial pathogens: Synthesis, antimicrobial activity and chemometric analysis. *Bioog Med Chem.* v. 22, p.2844-2854, 2014.

ZHU, W., DA, Y., WU, D., ZHENG, H., ZHU, L., WANG, L., YAN, Y., CHEN, Z. Design, synthesis and biological evaluation of new 5-nitro benzimidazole derivatives as AT₁ antagonists with anti-hypertension activities. *Bioorg Med Chem.* v. 22, p. 2294-2302, 2014.

ZINGALES, B., ANDRADE, S.G., BRIONES, M.R.S., CAMPBELL, D.A., CHIARI, E., FERNANDES, O., GUHL, F., LAGES-SILVA, E., MACEDO, A.M., MACHADO, C.R., MILES, M.A., ROMANHA, A.J., STURM, N.R., TIBAYRENC, M., SCHIJMAN, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, p.1051-1054, 2009.

ZINGALES, B., MILES, M.A., CAMPBELL, D.A., TIBAYRENC, M., MACEDO, A.M., TEIXEIRA, M.M.G., SCHIJMAN, A.G., LLEWELLYN, M.S., LAGES-SILVA, E., MACHADO, C.R., ANDRADE, S.G., STURM, N.R., The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* v.12, p. 240-253, 2012.

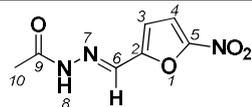
Anexo 1

Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos compostos de 1 a 40 e

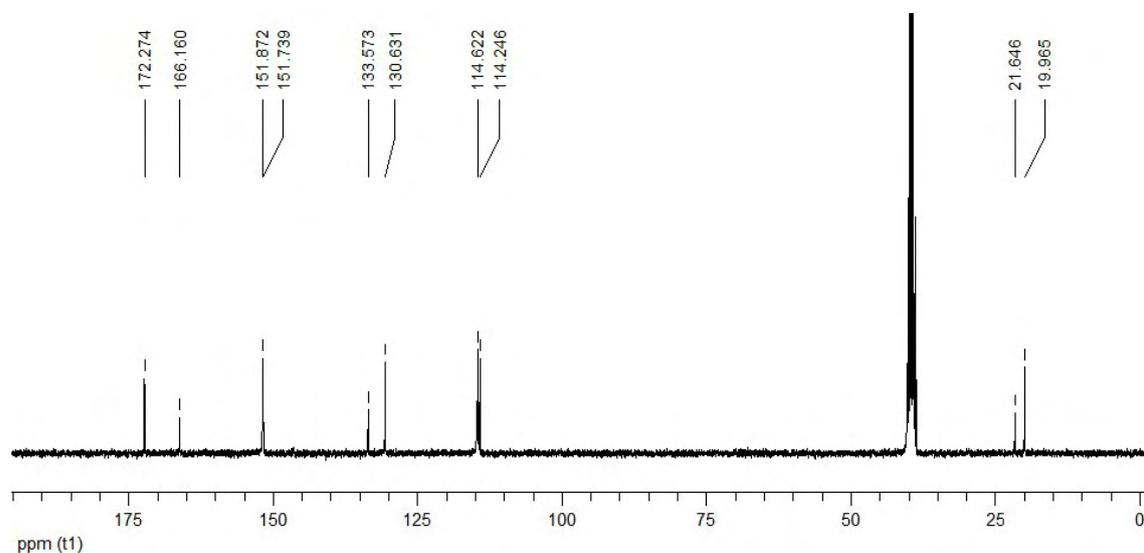
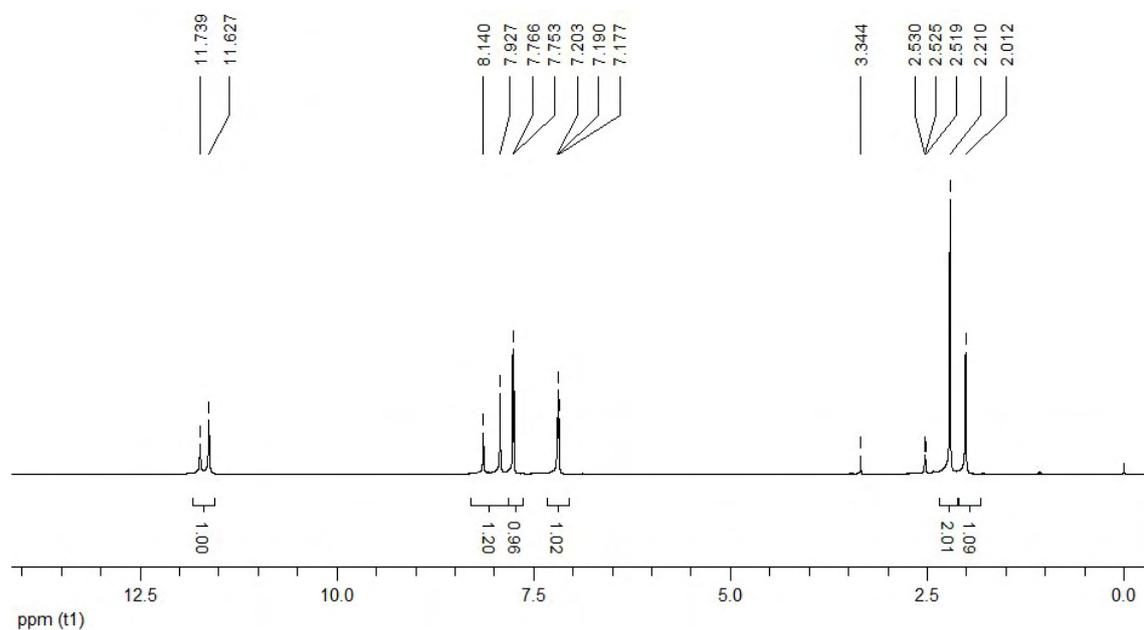
HETCOR $^1\text{H}/^{13}\text{C}$

Parâmetros: RMN ^1H **300 MHz** / RMN ^{13}C **75 MHz** /
solvente **DMSO d_6** / padrão interno **TMS**

COMPOSTOS		páginas
BSF-1	<i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida	211
BSF-2	ciano- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida	213
BSF-3	<i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)hexanohidrazida	215
BSF-4	etil- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno) hidrazida carboxilato	217
BSF-5	furano-2- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida	218
BSF-6	ciclopentano- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno) carbohidrazida	219
BSF-7	<i>terc</i> -butil- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno) hidrazida carboxilato	220
BSF-8	<i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	221
BSF-9	2-tiofeno- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida	222
BSF-10	ciclohexano- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida	223
BSF-11	3-metil- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	224
BSF-12	2-fenil- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida	225
BSF-13	4-metil- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	226
BSF-14	4-amino- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	227
BSF-15	4-metil- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)- 1,2,3-tiodiazol-5-carbohidrazida	228
BSF-16	4-ciano- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	229
BSF-17	4-etil- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	230
BSF-18	4-metoxi- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	231
BSF-19	4-cloro- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	232
BSF-20	<i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)nonanohidrazida	233
BSF-21	4- <i>iso</i> -propil- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	235
BSF-22	4-propil- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	236
BSF-23	4-dimetilamino- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	237
BSF-24	4-etoxi- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	238
BSF-25	3-nitro- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	239
BSF-26	<i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)naftohidrazida	240
BSF-27	4-butil- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	242
BSF-28	4- <i>terc</i> -butil- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	243
BSF-29	4-propoxi- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	244
BSF-30	3,4-metoxi- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	245
BSF-31	4-sulfamoi- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	246
BSF-32	3-trifluoro-metil- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	247
BSF-33	4-butilamino- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	248
BSF-34	4-butoxi- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	249
BSF-35	4-bifenil- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida	250
BSF-36	2-fenoxi- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	253
BSF-37	4-pentil-cicloexano- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida	255
BSF-38	4-pentil- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	256
BSF-39	4-heptil- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	257
BSF-40	4-heptoxi- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida	258



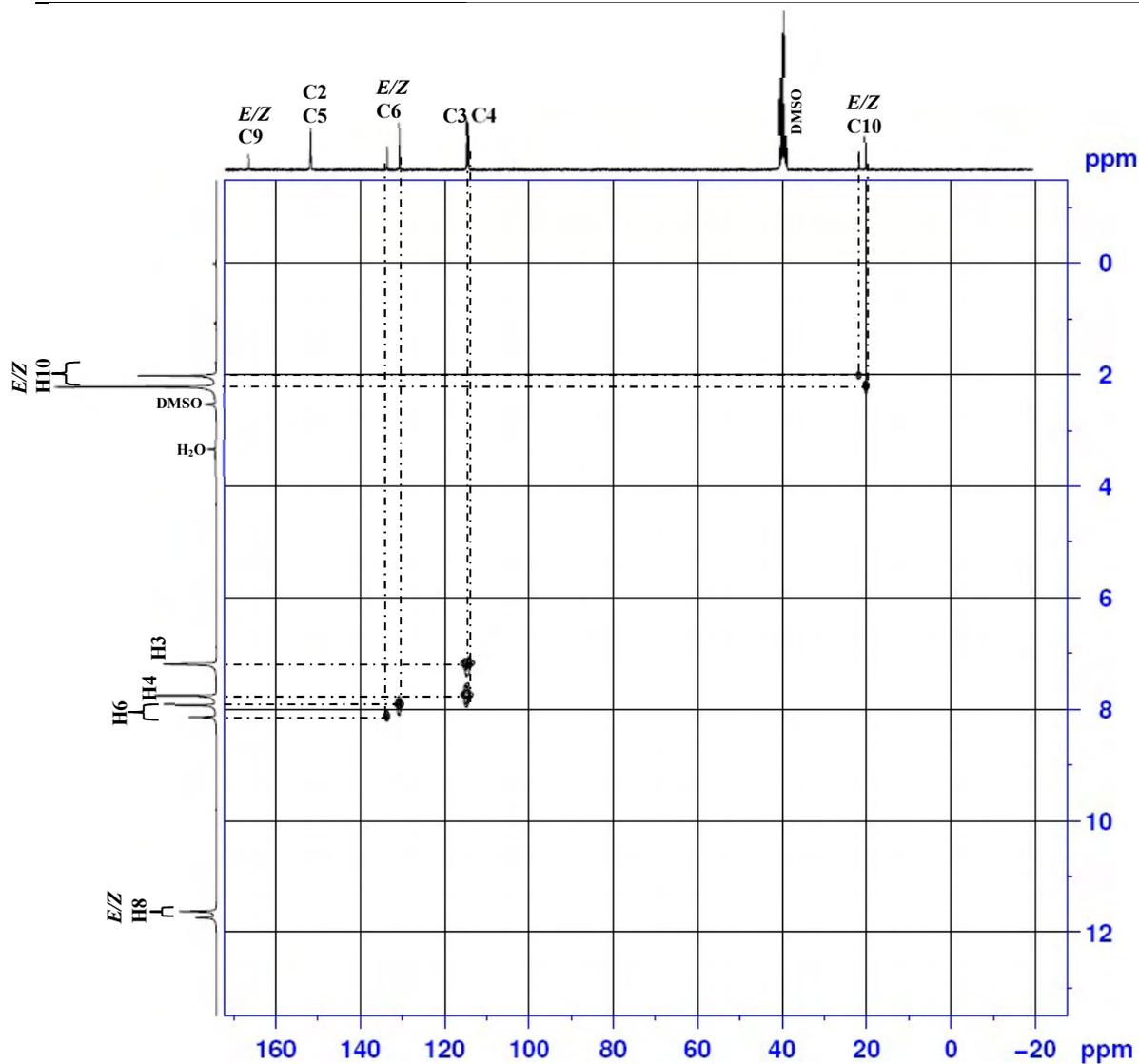
Composto 1
N'-((5-nitrofur-2-il)metileno)acetohidrazida



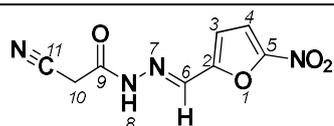
Sólido amarelo claro (η 78%); F.F. 251,0 – 252,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11,74/11,63 (s, 1H, H8), 8,14/7,93 (s, 1H, H6), 7,76 (d, 1H, $J = 3,9\text{Hz}$, H4), 7,19 (d, 1H, $J = 3,7\text{Hz}$, H3), 2,21/2,01 (s, 1H, H10); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 172,27/166,16 (C9), 151,9 (C2), 151,7 (C5), 133,6/130,6 (C6), 114,6 (C4), 114,2 (C3), 21,6/20,0 (C10); Anal. Calc. para (C₇H₇N₃O₄, 197,15 g): C, 42,65%; H, 3,58%; N, 21,31%. Exp.: C, 42,77%; H, 3,56%; N, 21,57%.

Espectro de correlação heteronuclear de deslocamentos químicos (HETCOR- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do composto 1 (300 MHz / 75 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / 20 h de aquisição)

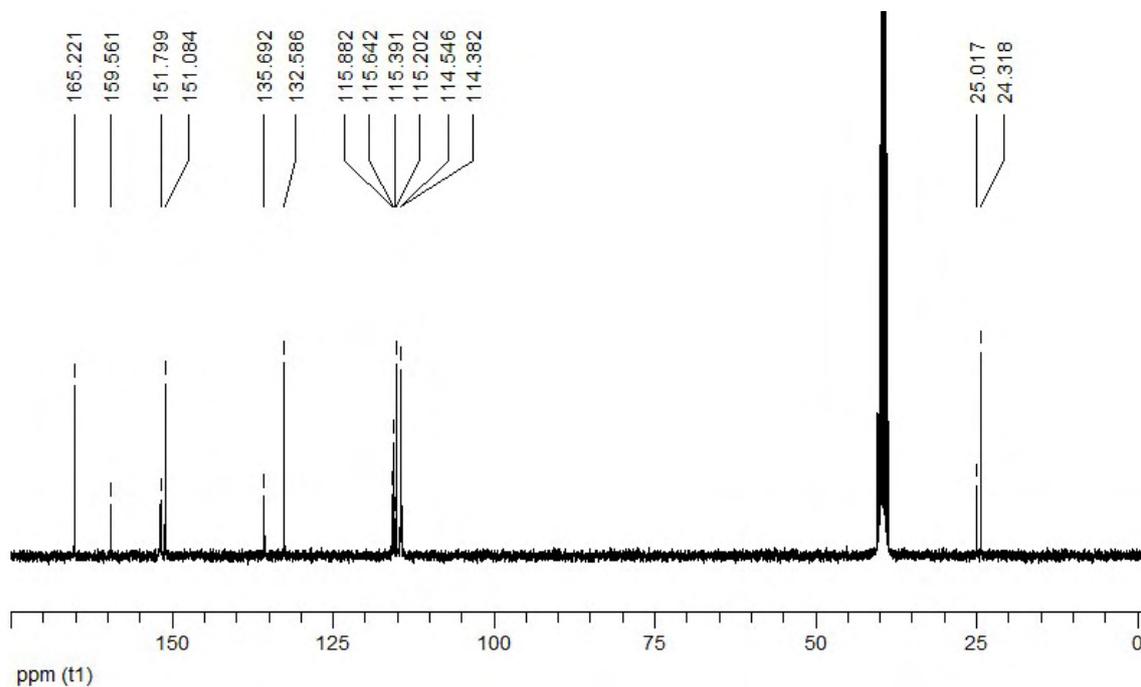
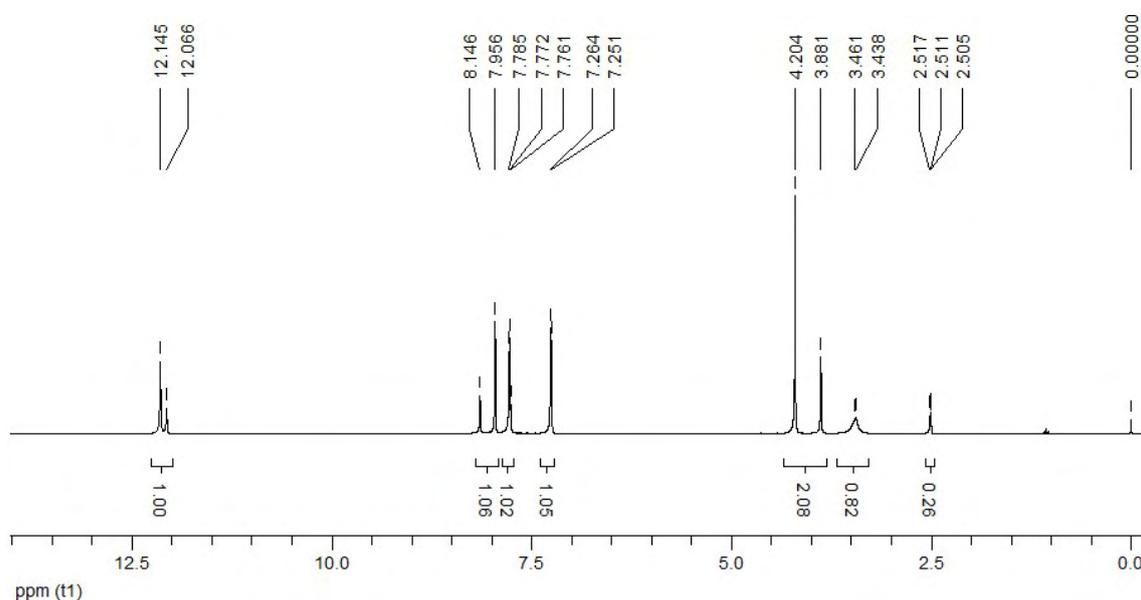
Composto 1
N-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida



Linhas pontilhadas representam interações dos deslocamentos químicos.



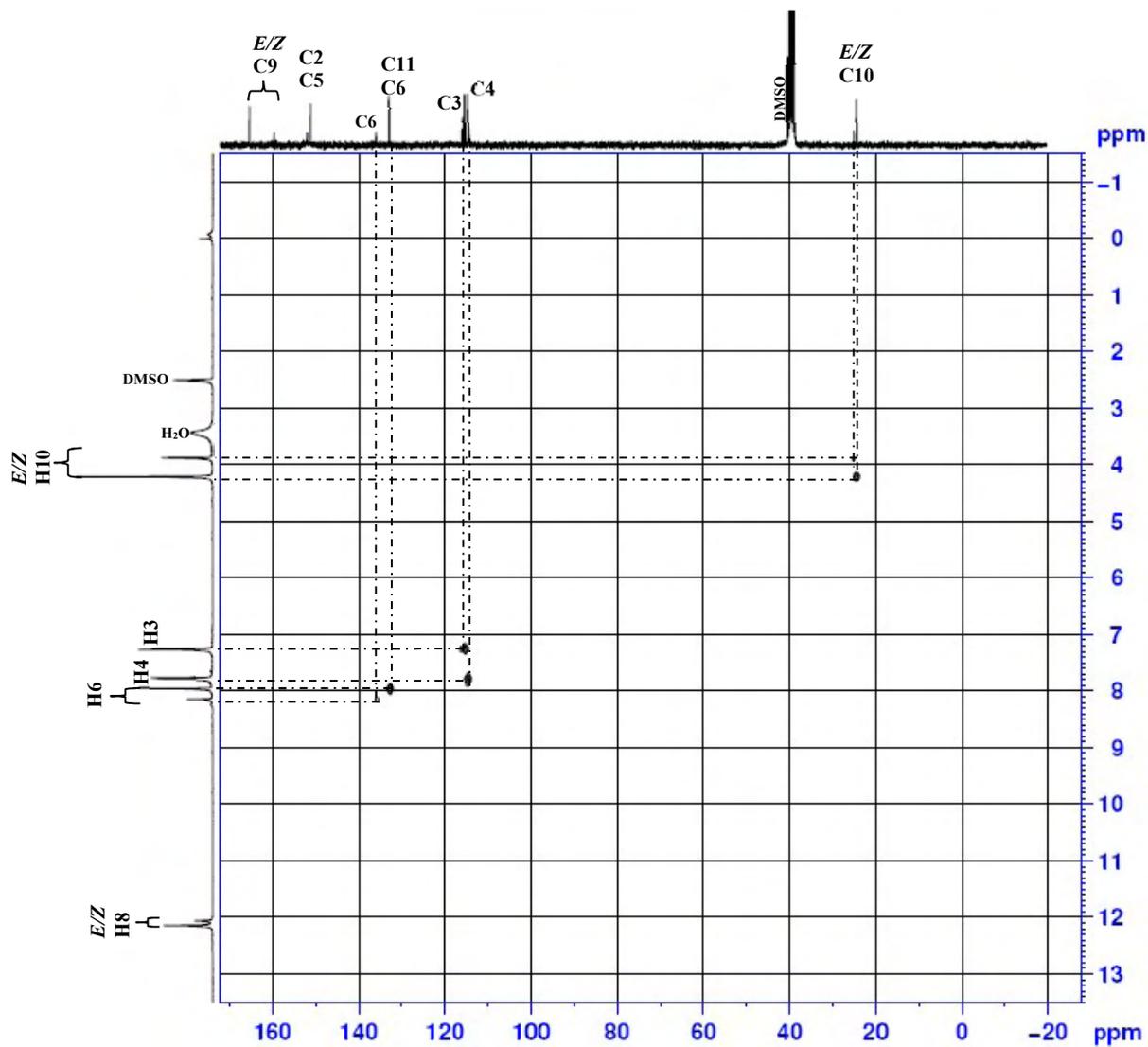
Composto 2
ciano-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida



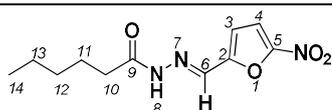
Sólido bege claro (η 78%); F.F. 201,0 – 202,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,14/12,06 (s, 1H, H8), 8,14/7,95 (s, 1H, H6), 7,77 (d, 1H, $J = 3,8\text{Hz}$, H4), 7,25 (d, 1H, $J = 3,9\text{Hz}$, H3), 4,20/3,88 (s, 1H, H10); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 170,3/106,3 (C9), 152,8 (C2), 151,2 (C5), 149,2/136,3 (C6), 121,9/106,3 (C11), 114,4 (C4), 113,9 (C3), 28,6/28,5 (C10); Anal. Calc. para (C₈H₆N₄O₄, 222,16 g): C, 43,25 %; H, 2,72%; N, 25,22%. Exp.: C, 43,64%; H, 2,37%; N, 25,04%.

Espectro de correlação heteronuclear de deslocamentos químicos (HETCOR- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do composto 2 (300 MHz / 75 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / 11 h de aquisição).

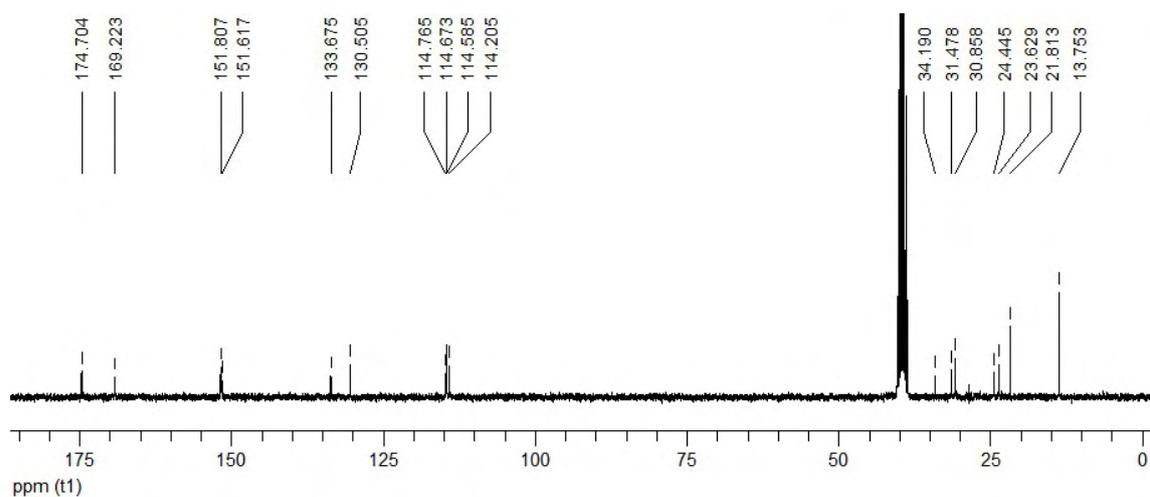
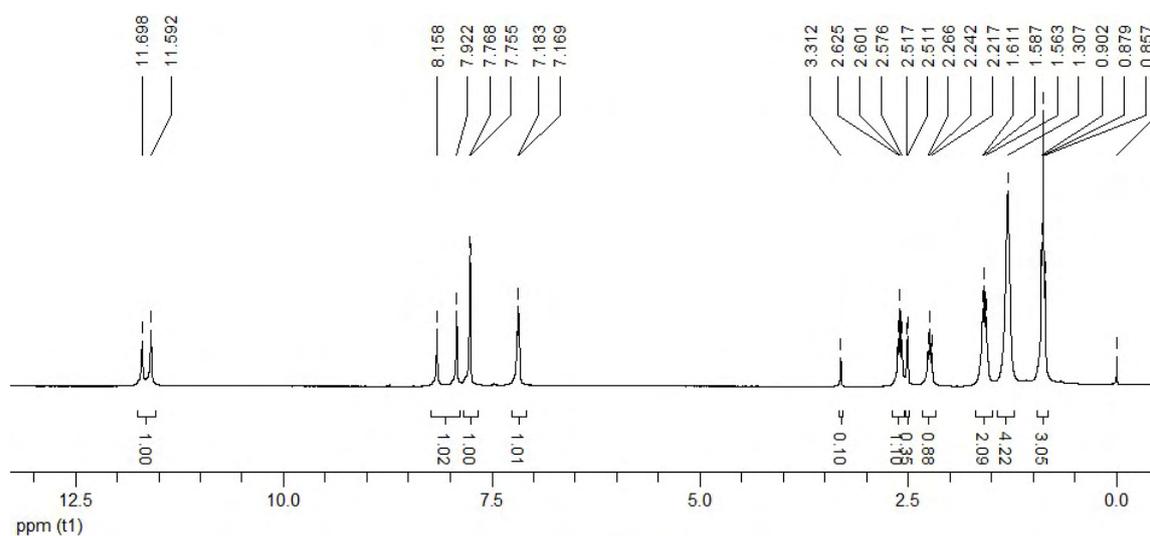
Composto 2
ciano- N' -((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida



Linhas pontilhadas representam interações dos deslocamentos químicos.

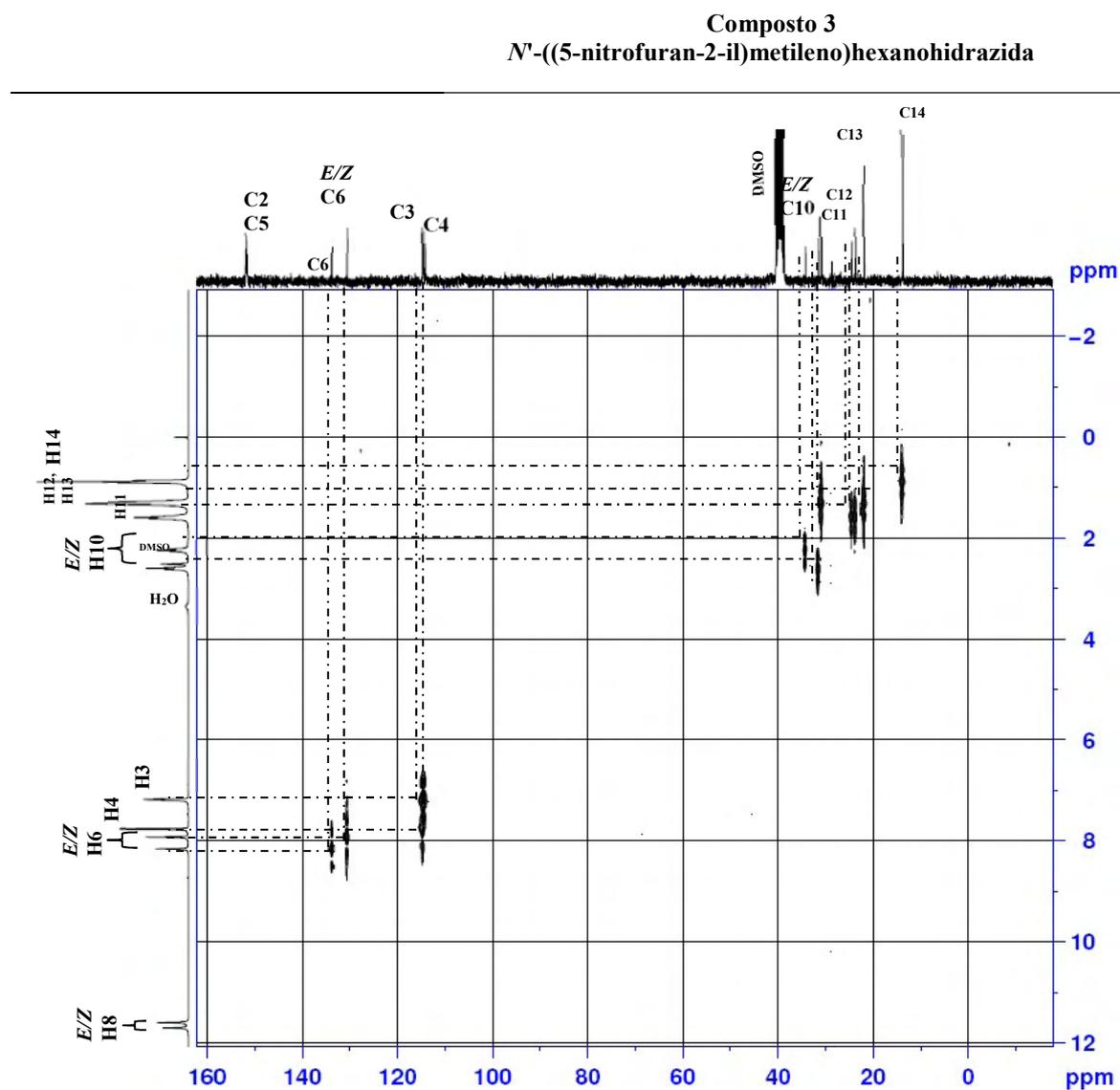


Composto 3
N'-((5-nitrofuran-2-yl)mileno)hexanohidrazida

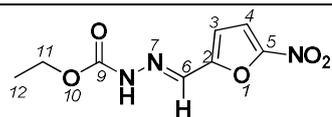


Sólido amarelo claro (η 89%); F.F. 152,0 – 154,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11,70/11,59 (s, 1H, H8), 8,16/7,92 (s, 1H, H6), 7,76 (d, 1H, $J = 3,9\text{Hz}$, H4), 7,17 (d, 1H, $J = 4,2\text{Hz}$, H3), 2,60 (t, 1H, $J = 7,2/2,24\text{Hz}$, H10), 2,60 (t, 1H, $J = 7,2\text{Hz}$, H10), 1,58 (t, 2H, $J = 7,2\text{Hz}$, H11), 1,31 (s, 2H, H12 e H13), 0,88 (t, 3H, $J = 6,6\text{Hz}$, H14); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 174,7/169,2 (C9), 151,8 (C2), 151,6 (C5), 133,7/130,5 (C6), 114,8 (C4), 114,6 (C3), 34,2/31,5 (C10), 30,8 (C12), 24,4/23,6 (C11), 21,8 (C13), 13,8 (C14); Anal. Calc. para (C₁₂H₁₈N₂O₂, 228,28 g): C, 64,84%; H, 8,16%; N, 12,60%. Exp.: C, 64,61%; H, 8,56%; N, 12,84%.

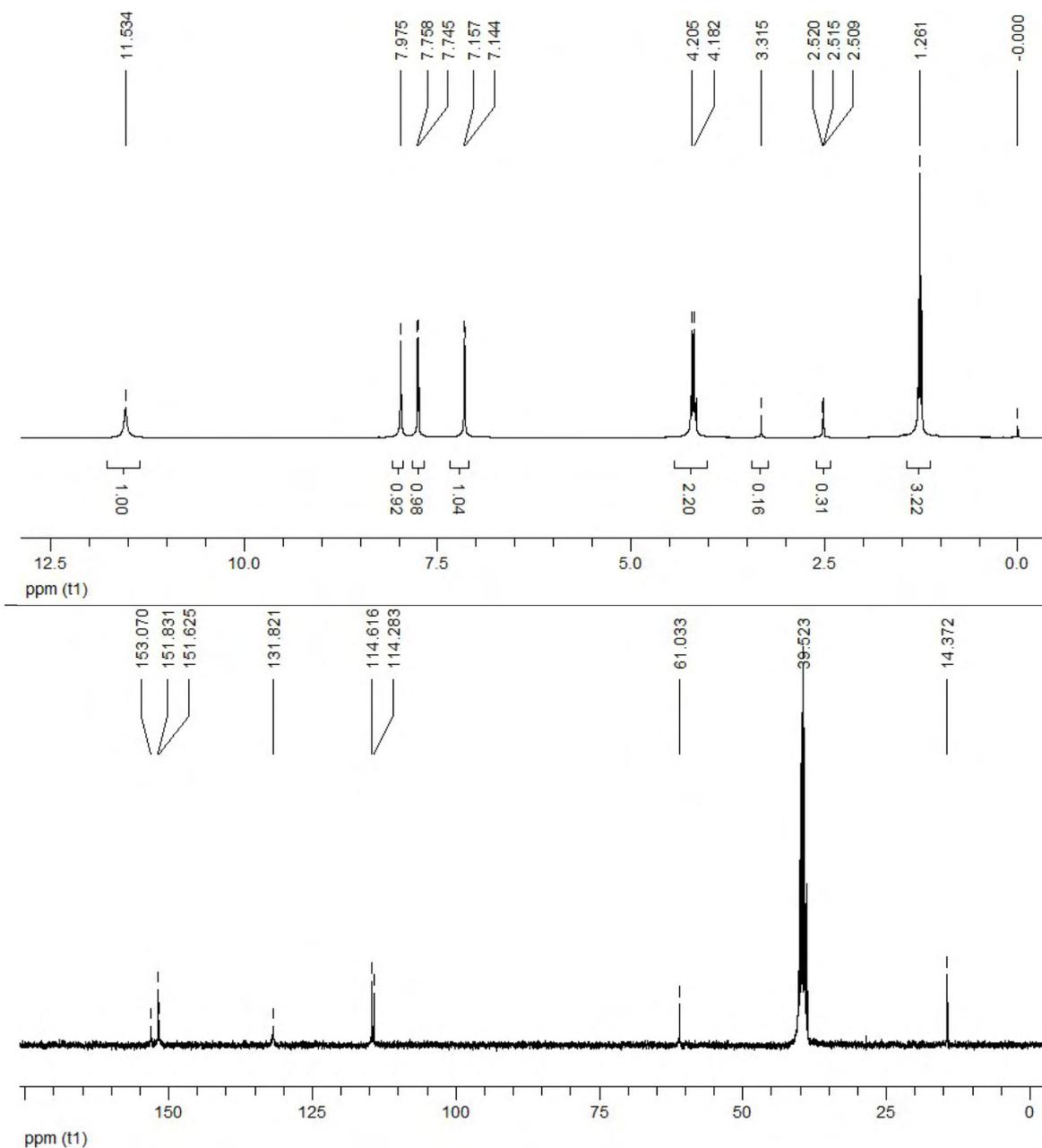
Espectro de correlação heteronuclear de deslocamentos químicos (HETCOR- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do composto 3 (300 MHz / 75 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / 19 h de aquisição).



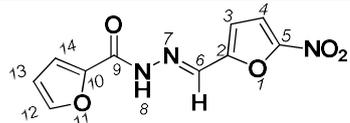
Linhas pontilhadas representam interações dos deslocamentos químicos.



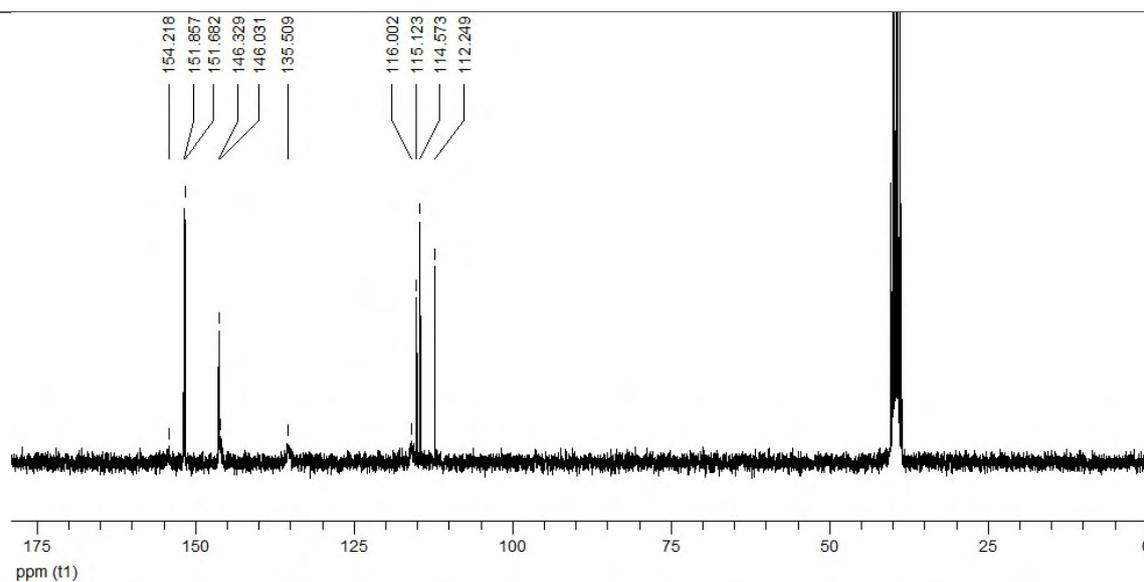
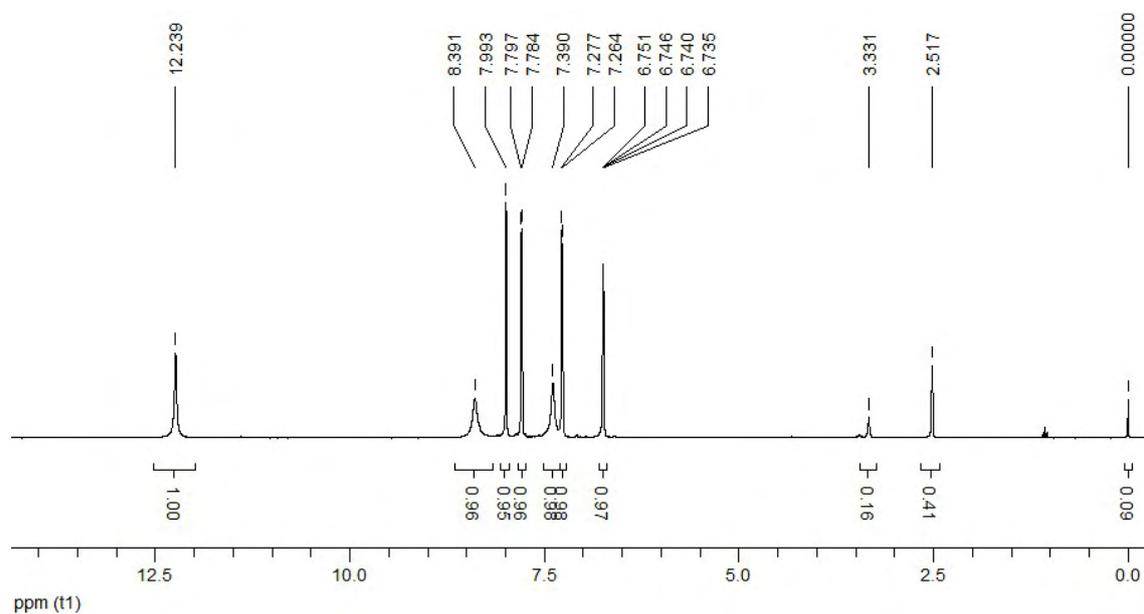
Composto 4
etil-*N'*-((5-nitrofur-2-il)metileno)
hidrazida carboxilato



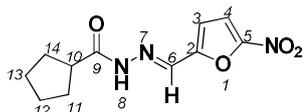
Sólido amarelo claro (η 87%); F.F. 183,0 – 185,0 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 11,53 (s, 1H, H8), 7,98 (s, 1H, H6), 7,75 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, H4), 7,15 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz, H3), 4,19 (d, 2H, $J = 6,9$ Hz, H11), 1,26 (s, 3H, H12); RMN ¹³C {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 153,1 (C9), 151,8 (C2), 151,6 (C5), 131,8 (C6), 114,6 (C4), 114,3 (C3), 61,0 (C11), 14,4 (C12); Anal. Calc. para (C₈H₉N₃O₅, 227,17 g): C, 42,30%; H, 3,99%; N, 18,50%. Exp.: C, 42,32%; H, 3,79%; N, 18,27%.



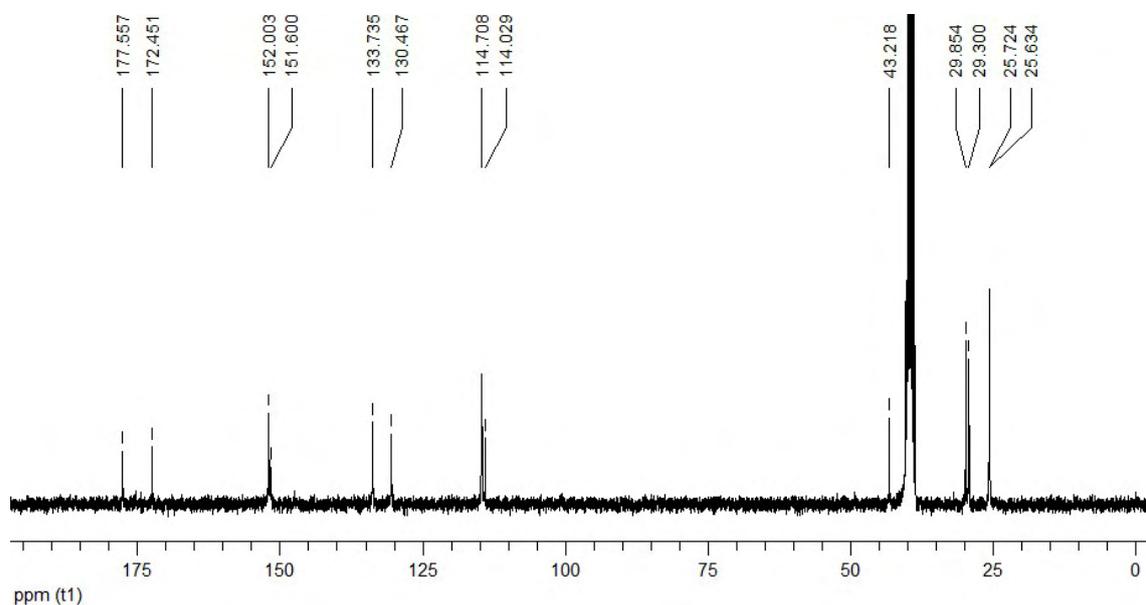
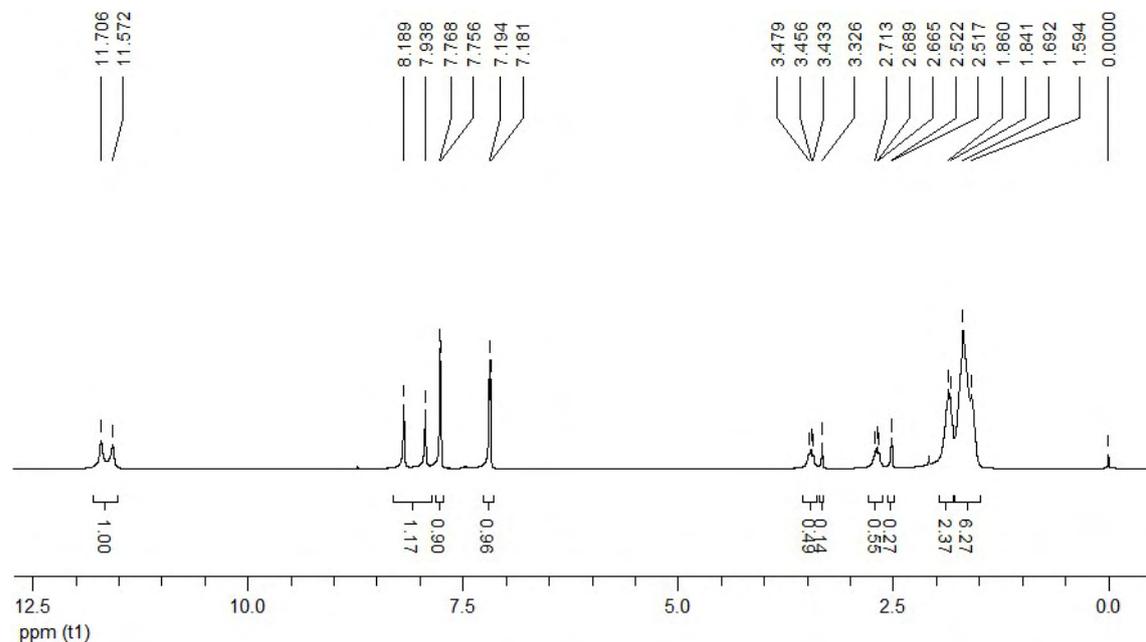
Composto 5
furan-2-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)carbohidrazida



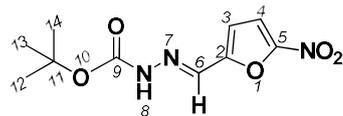
Sólido amarelo (η 92%); F.F. 249,0 – 250,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,23 (s, 1H, H8), 8,39 (s, 1H, H12), 7,99 (s, 1H, H6), 7,79 (d, 1H, $J = 3,9\text{Hz}$, H4), 7,29 (s, 1H, H14), 7,27 (d, 1H, $J = 3,9\text{Hz}$, H3), 6,74 (q, 1H, $J = 1,8\text{Hz}$, H13); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 154,2 (C9), 151,6 (C2), 151,7 (C5), 146,3 (C10), 146,0 (C12), 135,5 (C6), 116,0 (C14), 115,1 (C4), 114,6 (C3), 112,2 (C13); Anal. Calc. para (C₁₀H₇N₃O₅, 249,18 g): C, 48,20%; H, 2,83%; N, 16,86%. Exp.: C, 48,25 %; H, 2,83%; N, 16,62%.



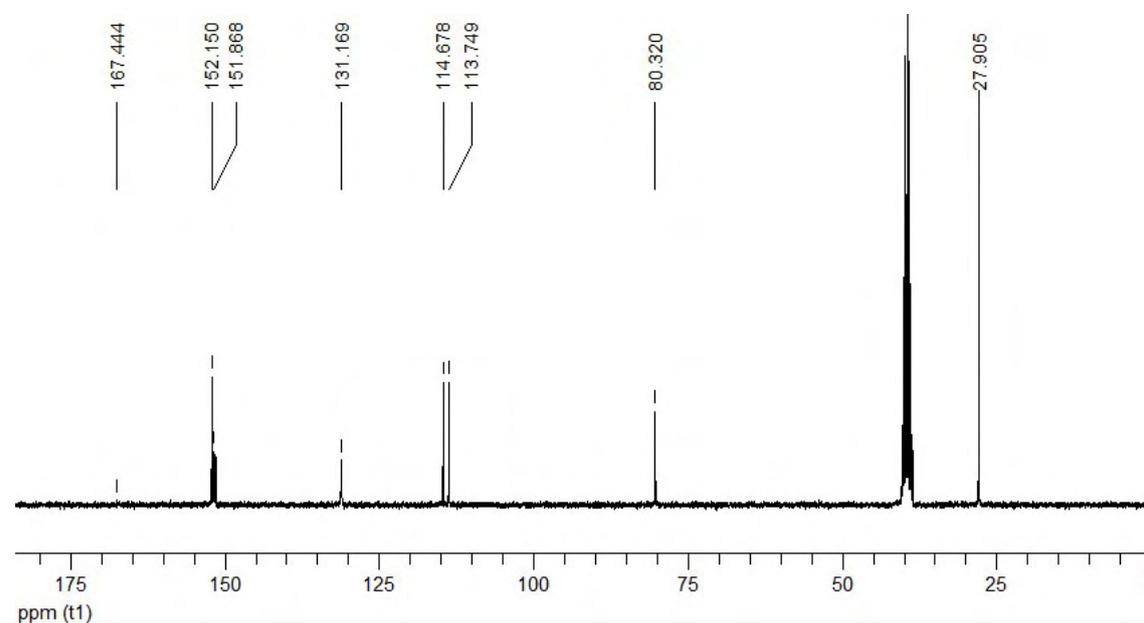
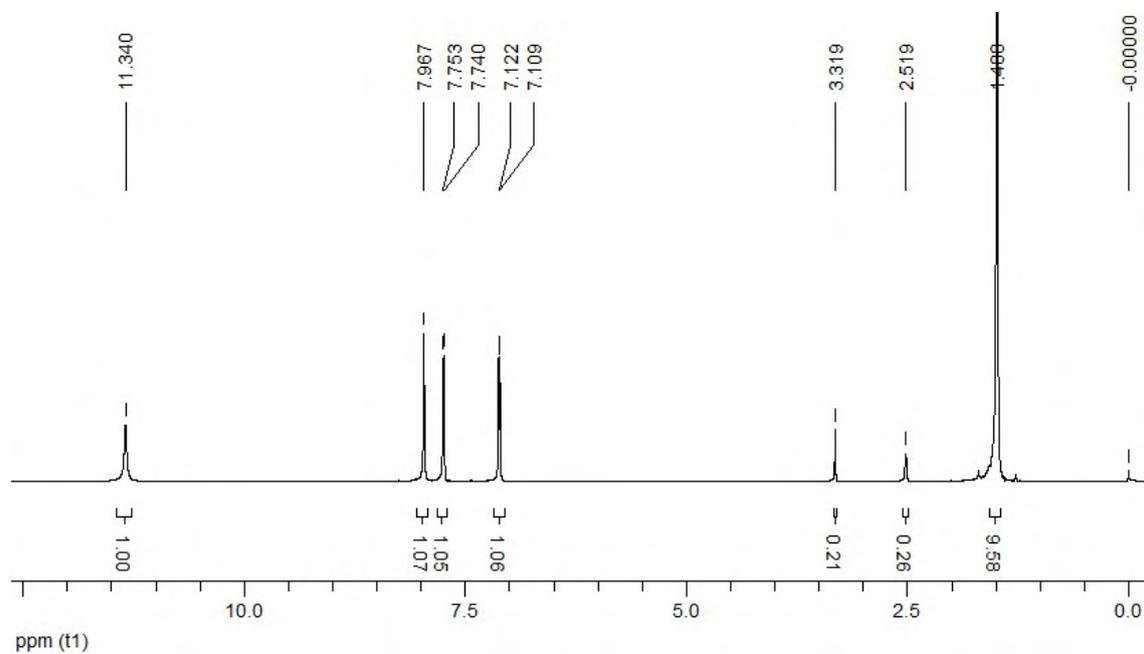
Composto 6
ciclopentano-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)
carbohidrazide



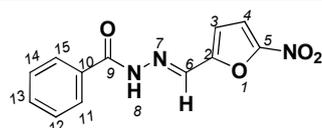
Sólido amarelo claro (η 49%); F.F. 206,0 – 207,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11,71/11,57 (s, 1H, H8), 8,19/7,93 (s, 1H, H6), 7,76 (d, 1H, $J = 3,8\text{Hz}$, H4), 7,19 (d, 1H, $J = 3,8\text{Hz}$, H3), 3,4/2,685 (t, 1H, $J = 6,9/7,5\text{Hz}$, H10), 1,86-1,59 (m, 8H, H11-H14 – Hax./eq.); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 177,6/172,4 (C9), 152,0 (C2), 151,6 (C5), 133,7/130,5 (C6), 114,7 (C4), 114,0 (C3), 43,2 (C10), 29,8 (C11), 29,3 (C14), 25,6 (C13), 25,1 (C12); Anal. Calc. para (C₁₁H₁₃N₃O₄, 251,24 g): C, 52,29%; H, 5,22%; N, 16,73%. Exp.: C, 52,34%; H, 5,04%; N, 16,78%.



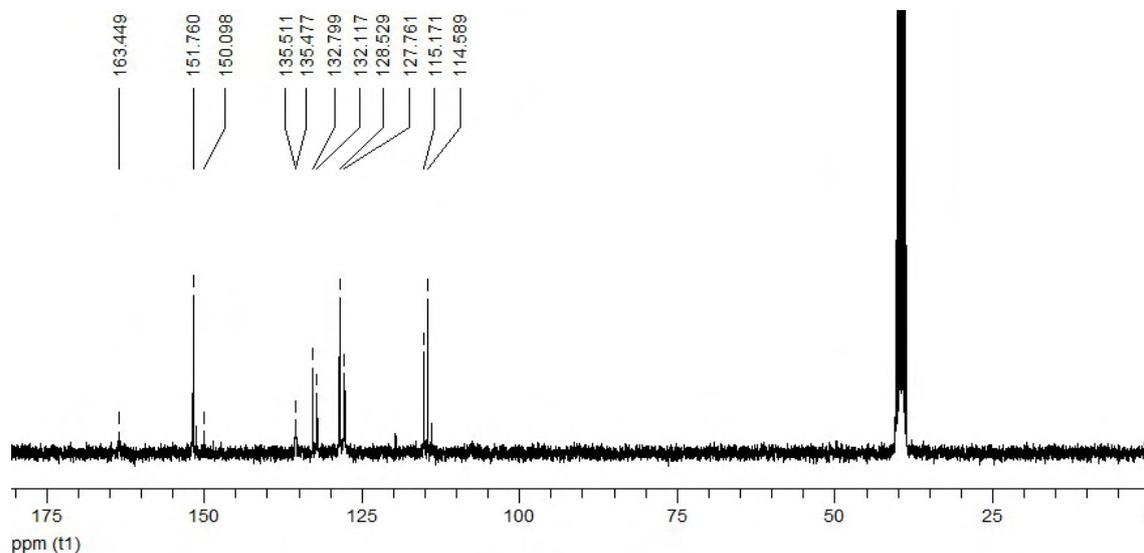
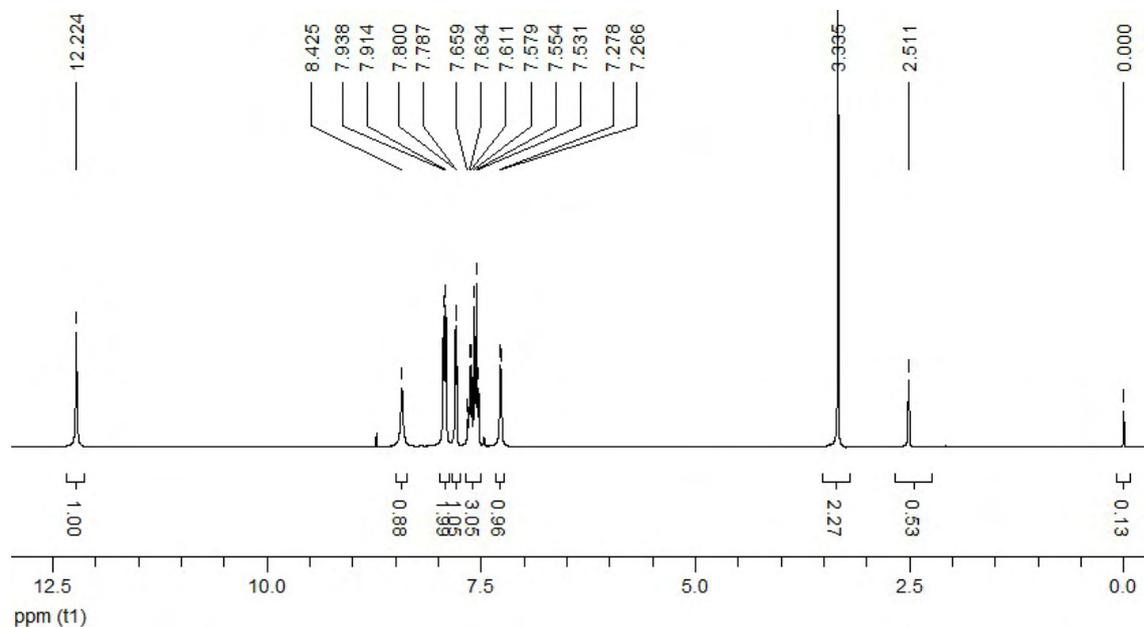
Composto 7
tert-butil-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)
 hidrazida carboxilato



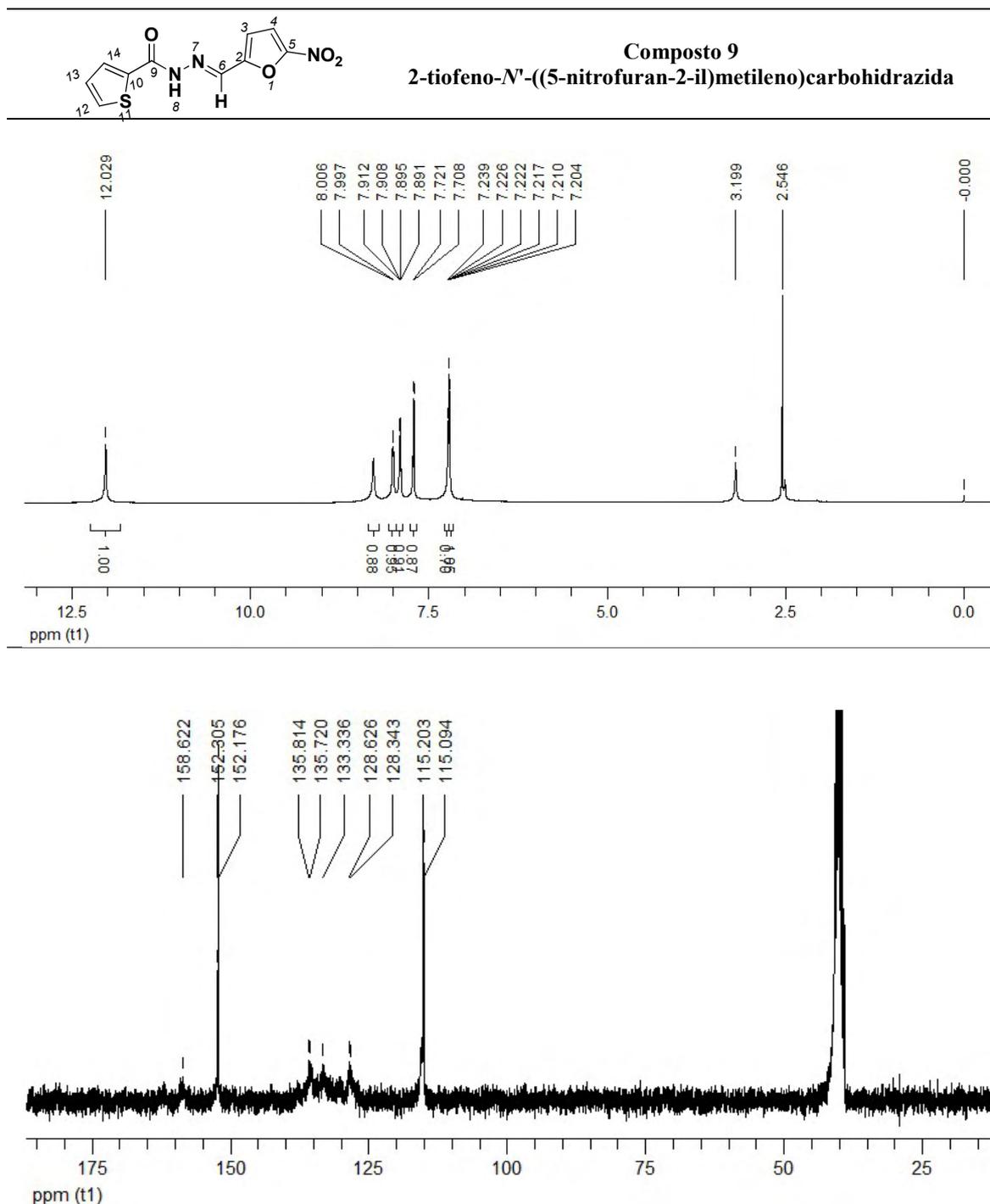
Sólido amarelo claro (η 65 %); F.F. 177,0 – 178,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11,34 (s, 1H, H8), 7,97 (s, 1H, H6), 7,74 (d, 1H, $J = 3,9\text{Hz}$, H4), 7,12 (d, 1H, $J = 3,9\text{Hz}$, H3), 1,49 (s, 9H, H11-H13); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 167,4 (C9), 152,1 (C2), 151,9 (C5), 131,2 (C6), 114,7 (C4), 113,7 (C3), 80,3 (C10), 27,9 (C11, C12, C13); Anal. Calc. para (C₁₀H₁₃N₃O₄, 239,23 g): C, 50,21%; H, 5,48%; N, 17,94%. Exp.: C, 50,76%; H, 5,52%; N, 17,94%.



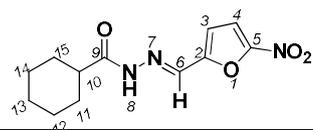
Composto 8
***N'*-((5-nitrofuran-2-yl)metano)benzidrazida**



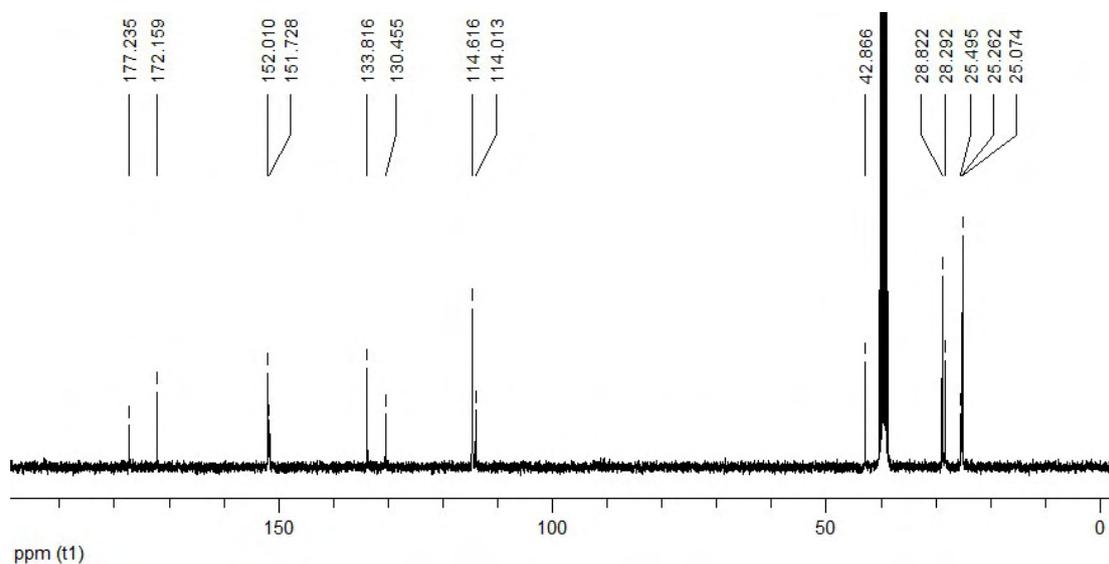
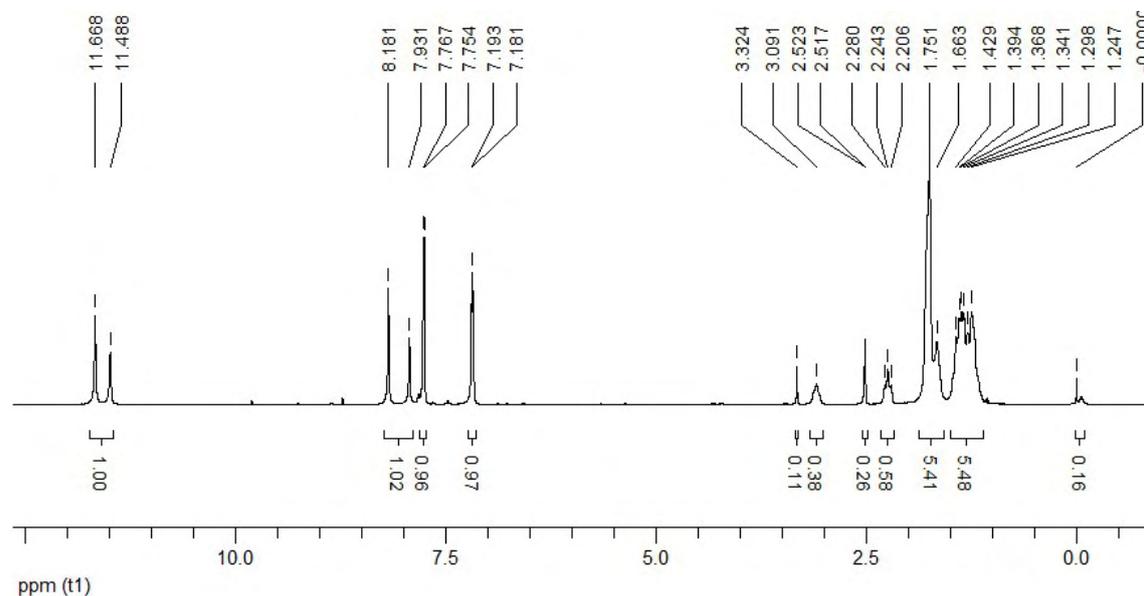
Sólido amarelo (η 86%); F.F. 211,0 – 212,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,22 (s, 1H, H8), 8,42 (s, 1H, H6), 7,92 (d, 2H, J = 7,3Hz, H11, H15), 7,79 (d, 1H, J = 3,9Hz, H4), 7,66-7,53 (m, 3H, H12-H14), 7,27 (d, 1H, J = 3,4Hz, H3); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 163,4 (C9), 151,8 (C2), 150,1 (C5), 135,5 (C6), 132,8 (C10), 132,1 (C13), 128,5 (C12, C14), 127,7 (C11, C15), 115,1 (C4), 114,5 (C3); Anal. Calc. para (C₁₂H₉N₃O₄, 259,06 g): C, 55,60%; H, 3,50%; N, 16,21%. Exp.: C, 55,33%; H, 3,60%; N, 16,08%.



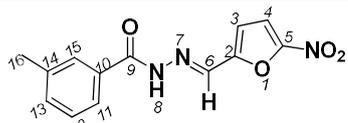
Sólido amarelo (η 92%); F.F. 114,0 – 115,0 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12,03 (s, 1H, H8), 8,01 (s, 1H, H6), 8,00 (d, 1H, *J* = 2,8 Hz, H14), 7,90 (dd, 1H, *J* = 4,8 Hz, H12), 7,71 (d, 1H, *J* = 3,9 Hz, H4), 7,24-7,20 (m, 2H, H13 e H3); RMN ¹³C {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 159,1 (C9), 152,3 (C2), 152,2 (C5), 135,8 (C6), 135,5 (C10), 133,3 (C14), 128,6 (C12), 128,3 (C13), 115,9 (C4), 115,2 (C3); Anal. Calc. para (C₁₀H₇N₃O₄S, 265,25 g): C, 45,28%; H, 2,66%; N, 15,84%. Exp.: C, 45,16%; H, 2,74%; N, 15,72%.



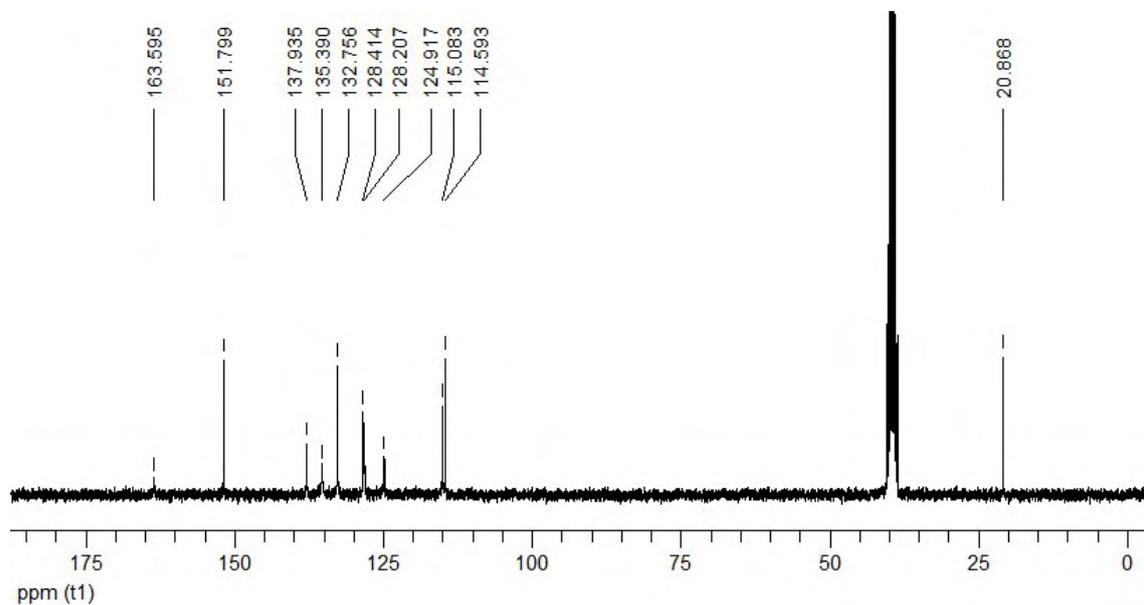
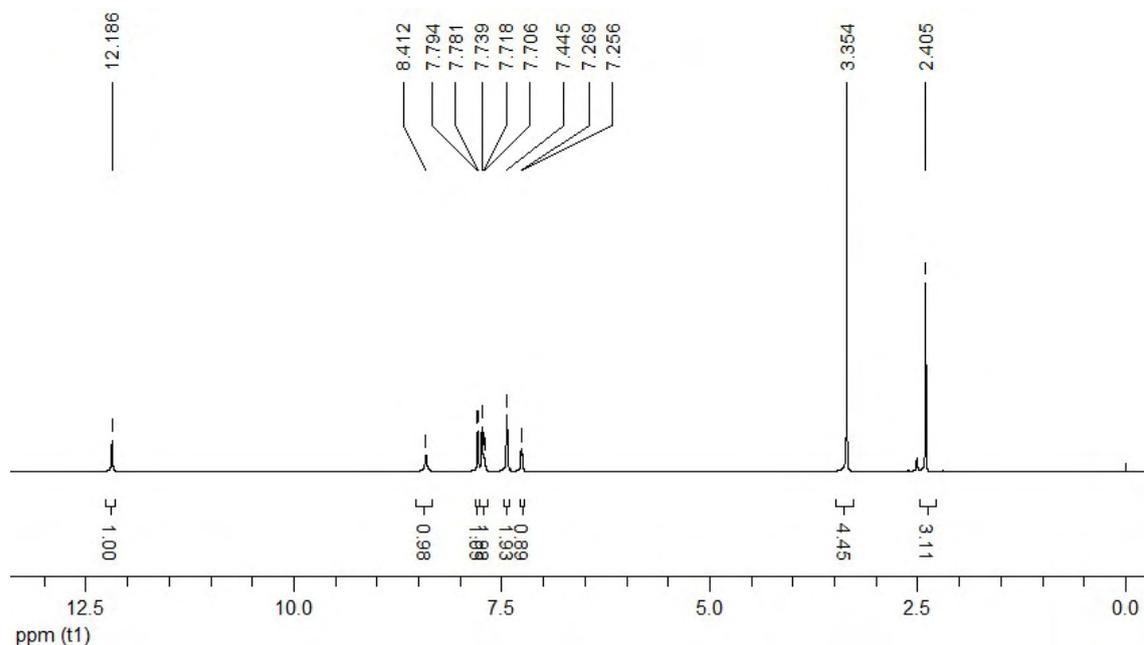
Composto 10
ciclohexano-*N'*-((5-nitrofuran-2-yl)methylene)
carbohidrazide



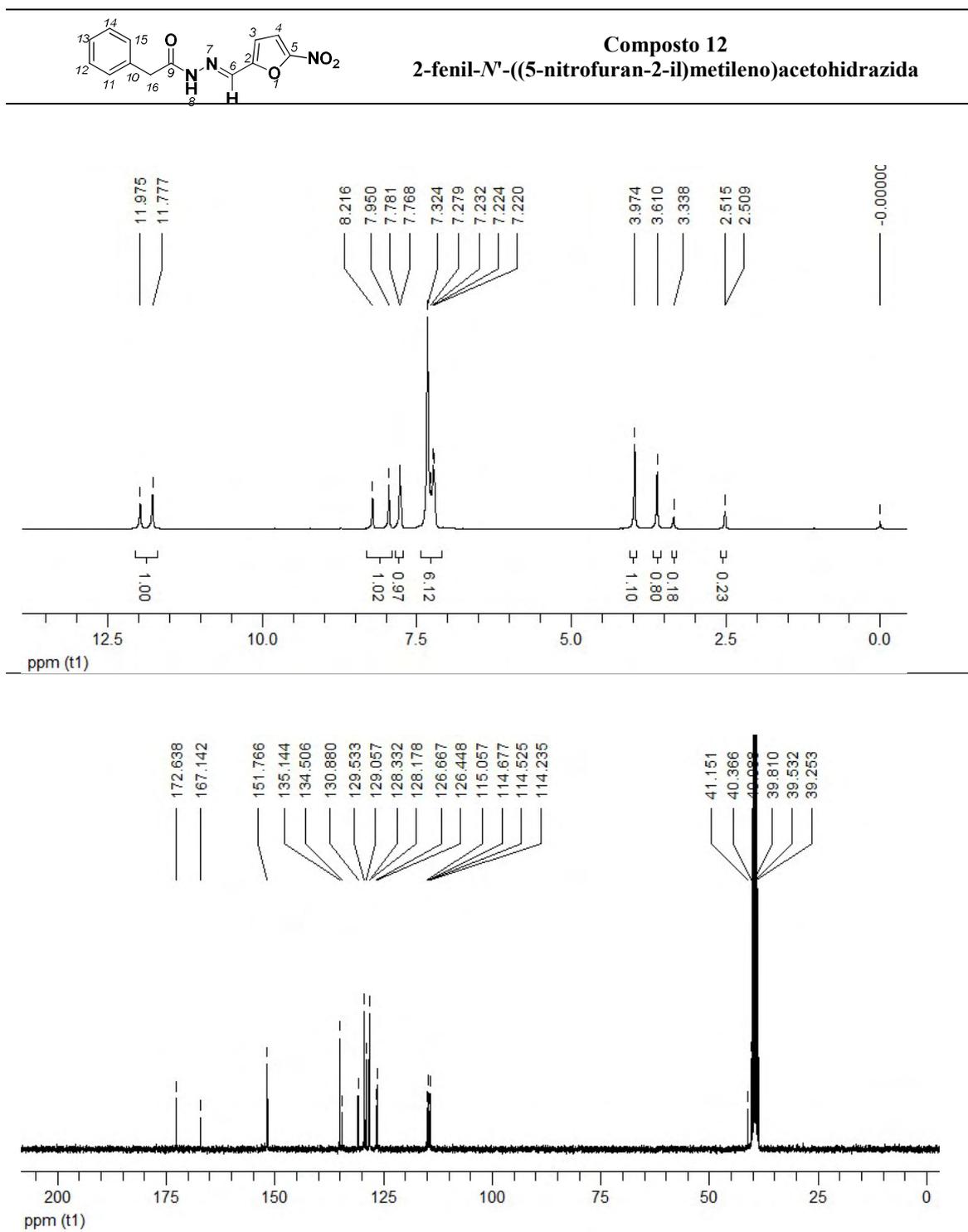
Sólido amarelo claro (η 63%); F.F. 202,0 – 203,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11,66/11,49 (s, 1H, H8), 8,18/7,93 (s, 1H, H6), 7,76 (d, 1H, $J = 3,9\text{Hz}$, H4), 7,19 (d, 1H, $J = 3,7\text{Hz}$, H3), 3,09/2,24 (s/t, 2H, $J = 11,1\text{Hz}$, H10), 1,43-1,25 (m, 10H, H11-H15 – Hax./eq.); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 177,2/172,2 (C9), 152,0 (C2), 151,7 (C5), 133,8/130,4 (C6), 114,6 (C4), 114,0 (C3), 42,9 (C10), 28,8 (C11), 28,3 (C15) 25,3 (C12), 25,1 (C13, C14); Anal. Calc. para (C₁₂H₁₅N₃O₄, 265,27 g): C, 54,33%; H, 5,70%; N, 15,84%. Exp.: C, 54,51%; H, 5,68%; N, 15,96%.



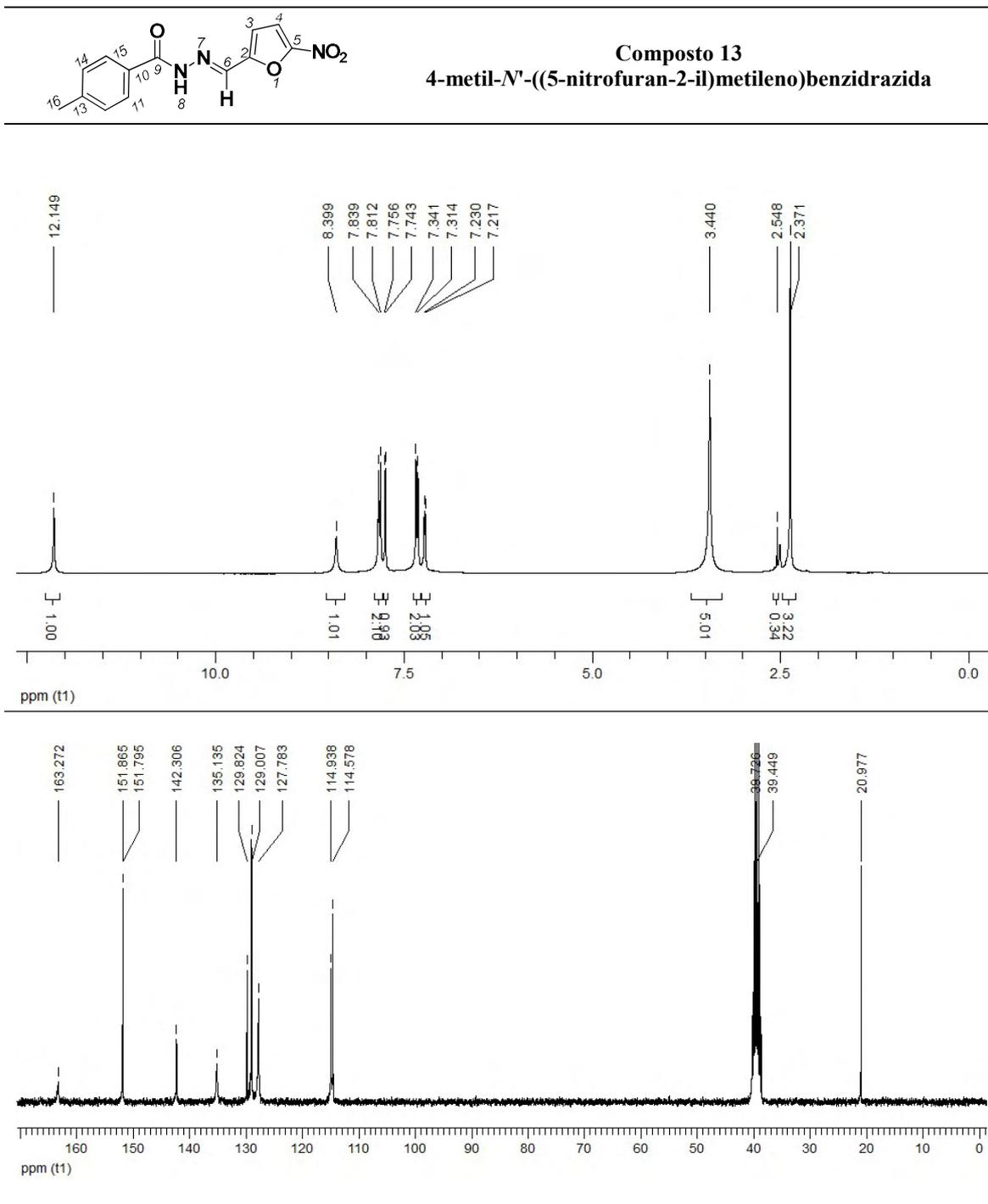
Composto 11
3-metil-N'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida



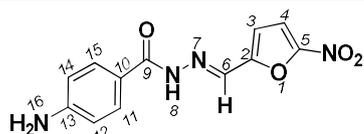
Sólido amarelo (η 69%); F.F. 200,0 – 201,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,18 (s, 1H, H8), 8,41 (s, 1H, H6), 7,79 (d, 1H, $J = 3,9\text{Hz}$, H4), 7,72 (t, 2H, $J = 5\text{Hz}$, H11, H15), 7,44 (d, 2H, $J = 4,9\text{Hz}$, H12, H13), 7,26 (d, 1H, $J = 3,7\text{Hz}$, H3), 2,40 (s, 3H, H16); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 163,6 (C9), 151,8 (C2, C5), 137,9 (C14), 135,3 (C6, C10), 132,8 (C13, C15), 128,4 (C12), 128,2 (C11), 115,1 (C4), 114,6 (C3), 20,9 (C16); Anal. Calc. para (C₁₃H₁₁N₃O₄, 273,24 g): C, 57,14%; H, 4,06%; N, 15,38%. Exp.: C, 57,32%; H, 3,97%; N, 15,53%.



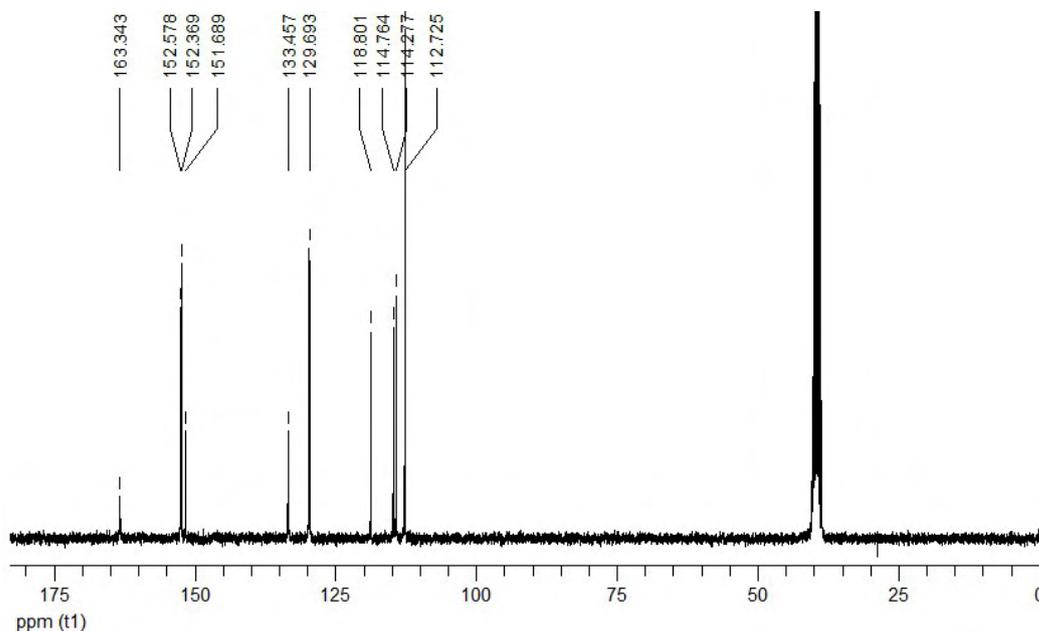
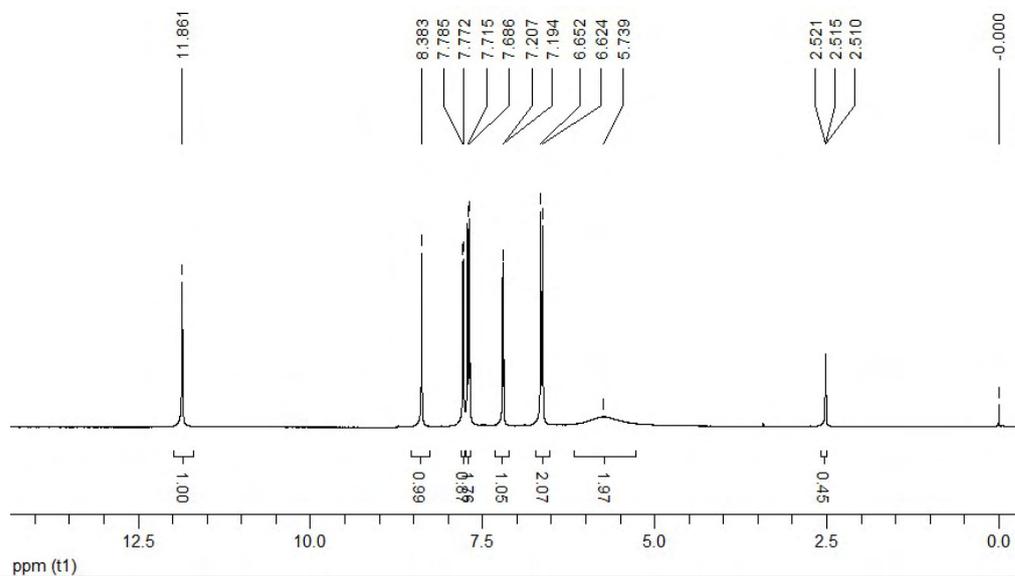
Sólido amarelo (η 66%); F.F. 195,0 – 196,0 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 11,97/11,78 (s, 1H, H8), 8,22/7,95 (s, 1H, H6), 7,78 (d, 1H, *J* = 3,9 Hz, H4), 7,32–7,22 (m, 6H, H3, H11–H15), 7,32–7,22 (m, 2H, H12, H14), 3,97–3,61 (s, 2H, H16); RMN ¹³C {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 172,6/167,1 (C9), 151,8 (C2, C5), 135,1 (C10), 134,5/130,9 (C6), 129,5 (C11), 129,1 (C15), 128,3 (C12), 128,2 (C14), 126,5 (C13), 115,0 (C4), 114,5 (C3), 41,2 (C17); Anal. Calc. para (C₁₃H₁₁N₃O₄, 273,24 g): C, 57,14%; H, 4,06%; N, 15,38%. Exp.: C, 57,46%; H, 4,07%; N, 15,52%.



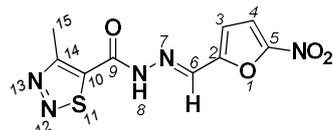
Sólido amarelo (η 78%); F.F. 230,0 – 231,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,15 (s, 1H, H8), 8,40 (s, 1H, H6), 7,83 (d, 2H, J = 8,1 Hz, H11, H15), 7,75 (d, 1H, J = 3,9 Hz, H4), 7,33 (d, 2H, J = 8,0 Hz, H12, H14), 7,22 (d, 1H, J = 3,9 Hz, H3), 2,37 (s, 3H, H16); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 163,3 (C9), 151,9 (C2), 151,8 (C5), 142,3 (C13), 135,1 (C6), 129,8 (C10), 129,0 (C12, C14), 127,8 (C11, C15), 114,9 (C3), 114,6 (C4), 21,0 (C16); Anal. Calc. para (C₁₃H₁₁N₃O₄, 273,24 g): C, 57,14%; H, 4,06%; N, 15,38%. Exp.: C, 57,52%; H, 4,41%; N, 15,35%.



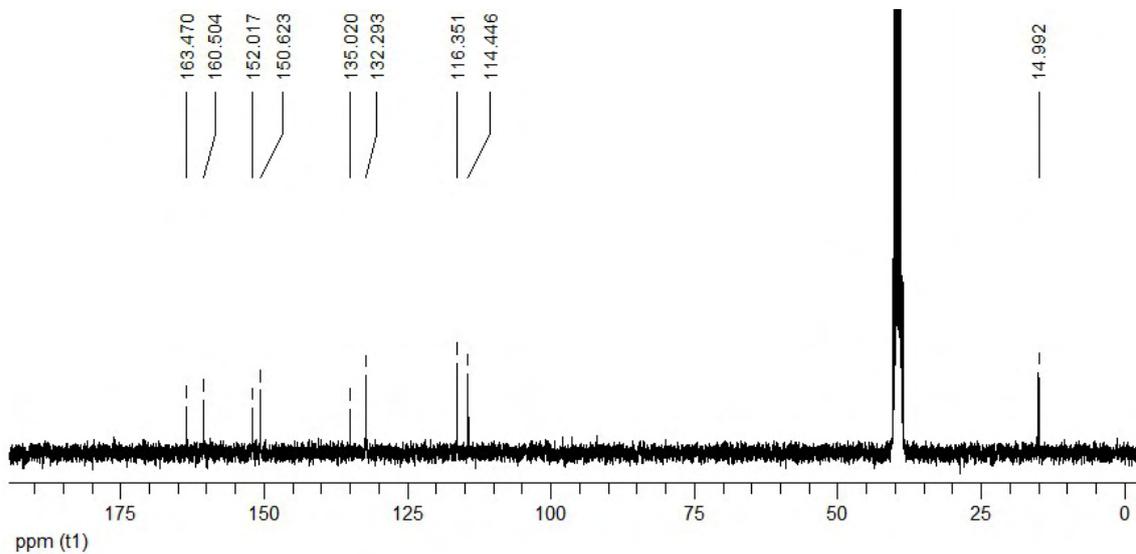
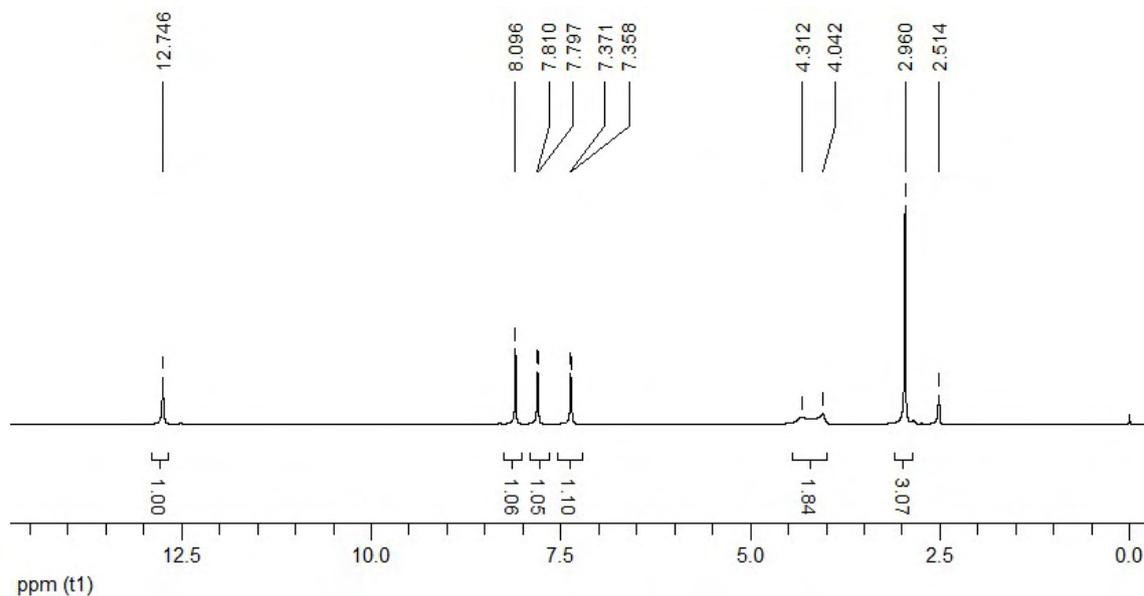
Composto 14
4-amino-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)benzidrazida



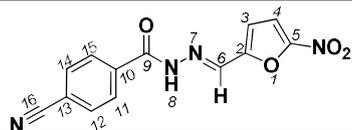
Sólido vermelho escuro (η 70%); F.F. 280,0 – 282,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11,86 (s, 1H, H8), 8,38 (s, 1H, H6), 7,78 (d, 1H, J = 3,9Hz, H4), 7,69 (d, 2H, J = 8,7Hz, H11, H15), 7,2 (d, 1H, J = 3,9Hz, H3), 6,64 (d, 2H, J = 8,4Hz, H12, H14), 5,74 (s, 2H - N H₂, H16); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 163,3 (C9), 152,6 (C2), 152,4 (C5), 151,7 (C13), 133,5 (C6), 129,7 (C11, C15), 118,8 (C10), 114,8 (C4), 114,3 (C3), 112,7 (C12, C14); Anal. Calc. para (C₁₂H₁₀N₄O₄, 274,23 g): C, 52,56%; H, 3,68%; N, 20,43%. Exp.: C, 52,19%; H, 3,53%; N, 20,10 %.



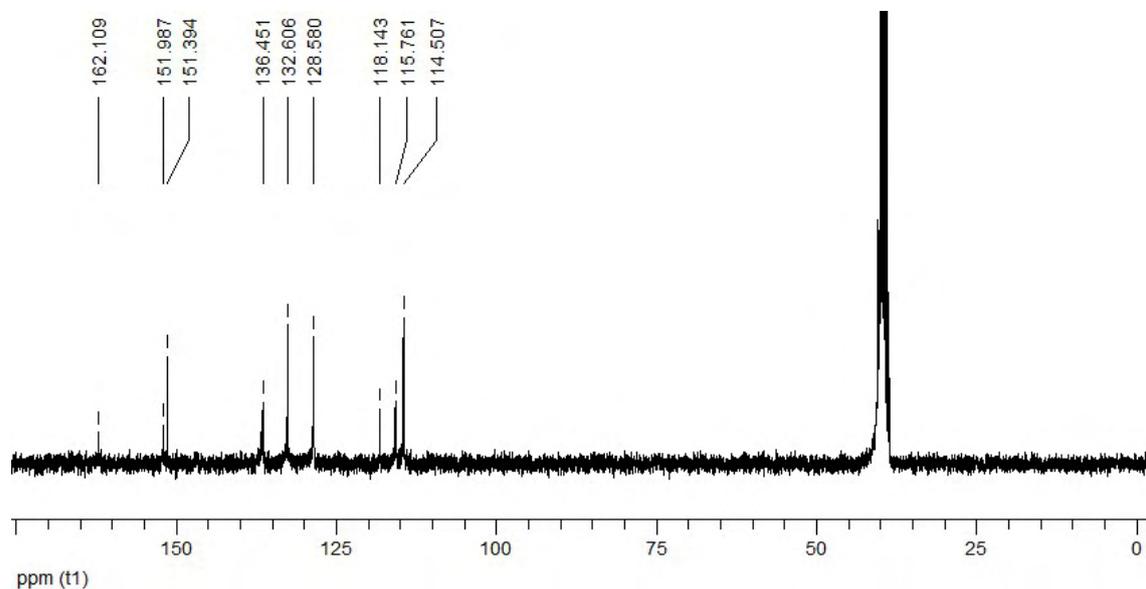
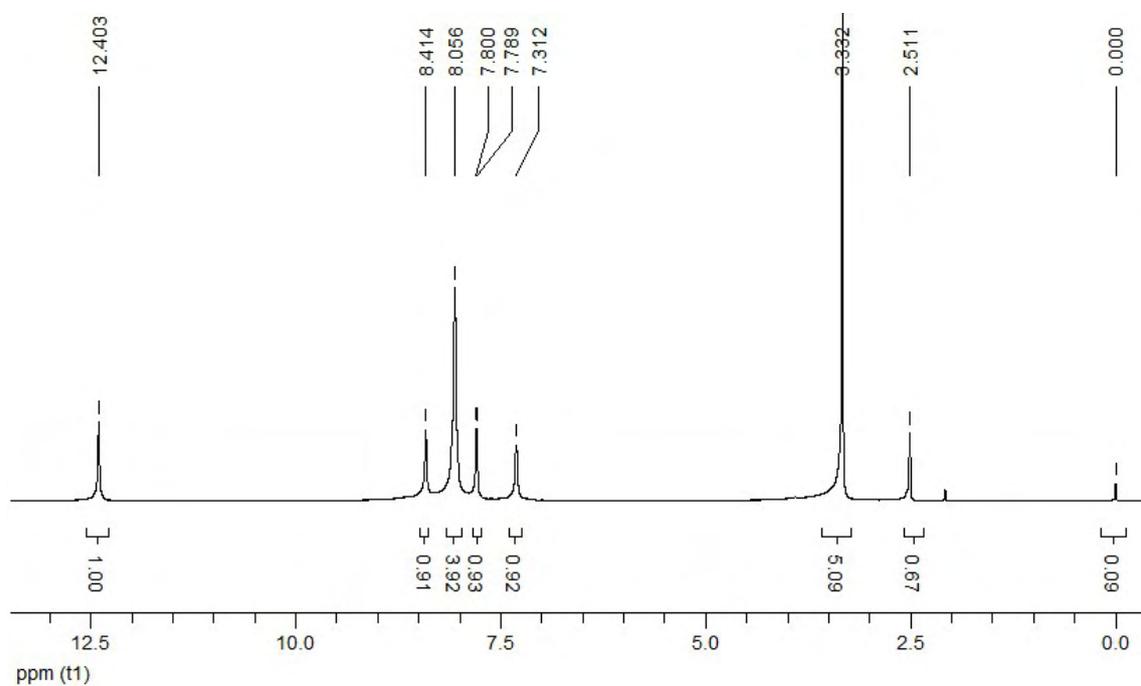
Composto 15
4-metil-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)-1,2,3-tiodiazol-5-carbohidrazida



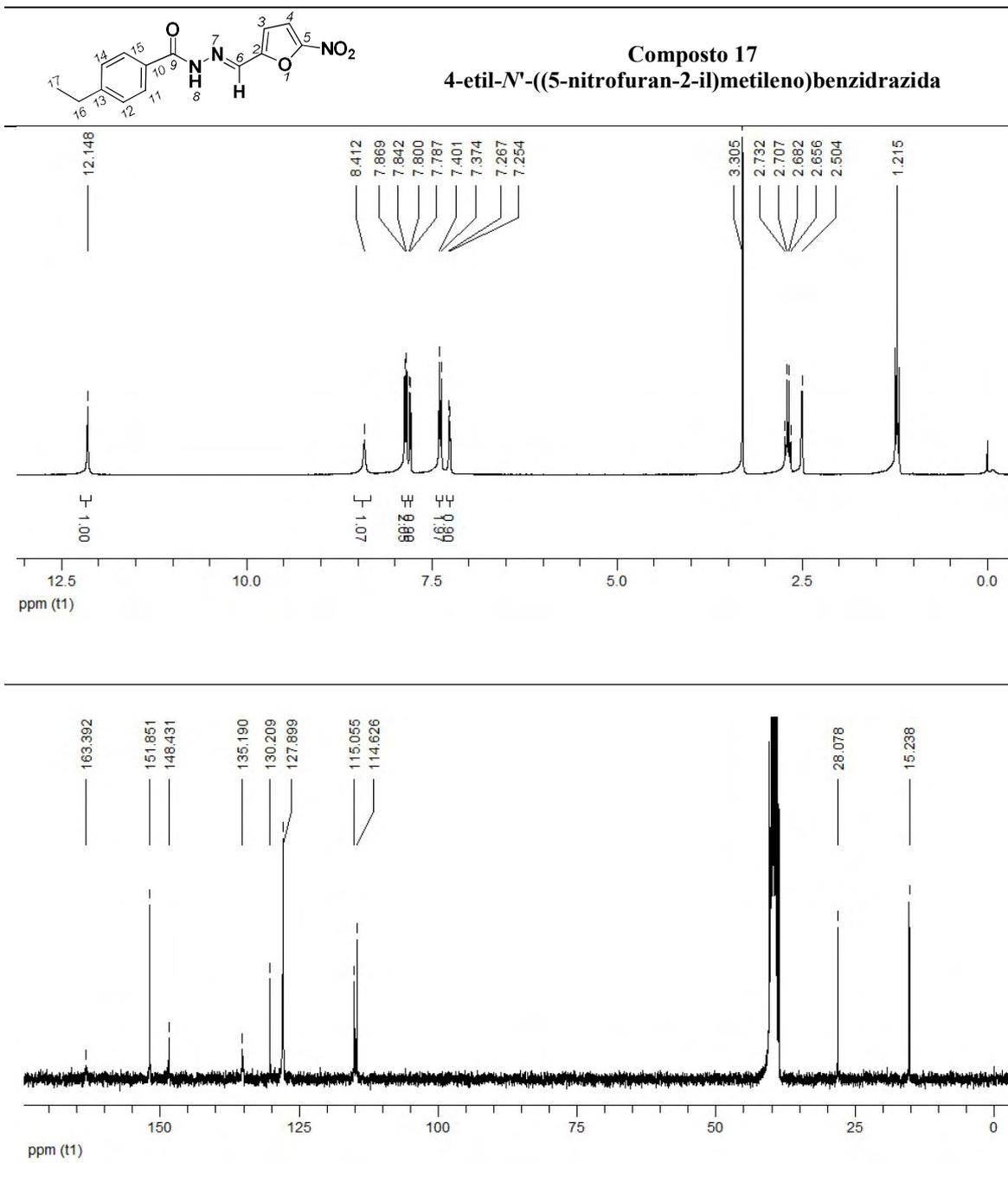
Sólido laranja escuro (η 98%); F.F. 245,0 – 248,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,75 (s, 1H, H8), 8,09 (s, 1H, H6), 7,80 (d, 1H, $J = 3,8\text{Hz}$, H4), 7,36 (d, 1H, $J = 3,8\text{Hz}$, H3), 2,96 (s, 3H, H16); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 163,5/160,5 (C9), 152,0 (C2, C5), 150,6 (C10), 135,0 (C14), 132,3 (C6), 116,4 (C3), 114,4 (C4), 15,0 (C15); Anal. Calc. para (C₉H₇N₅O₄S, 281,25 g): C, 38,43%; H, 2,51%; N, 24,90%. Exp.: C, 38,63%; H, 2,80%; N, 24,55 %.

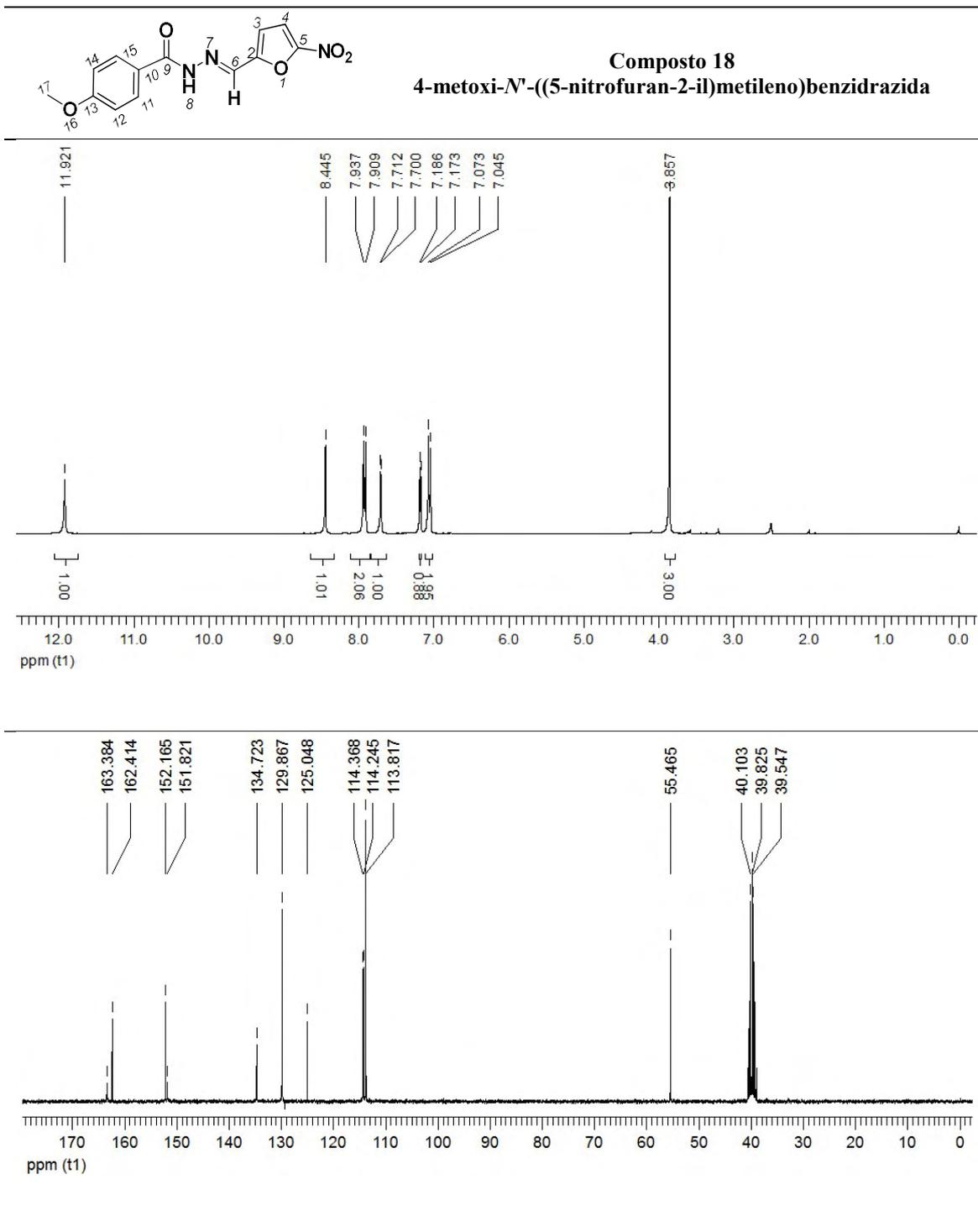


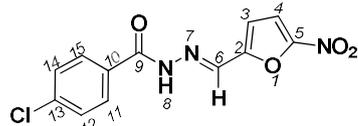
Composto 16
4-ciano-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida



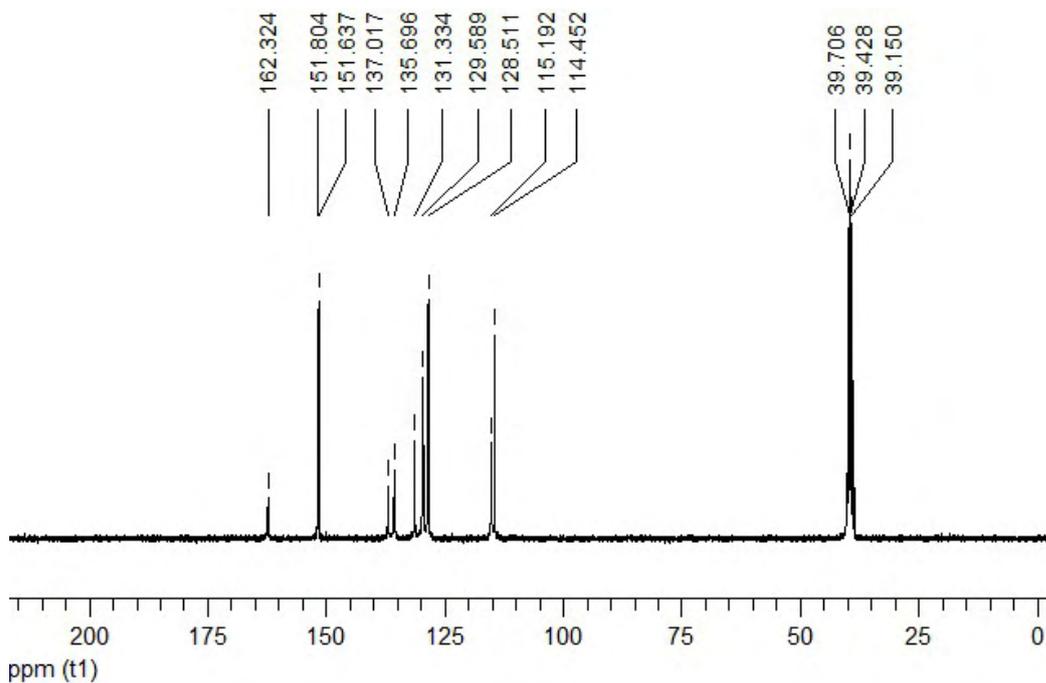
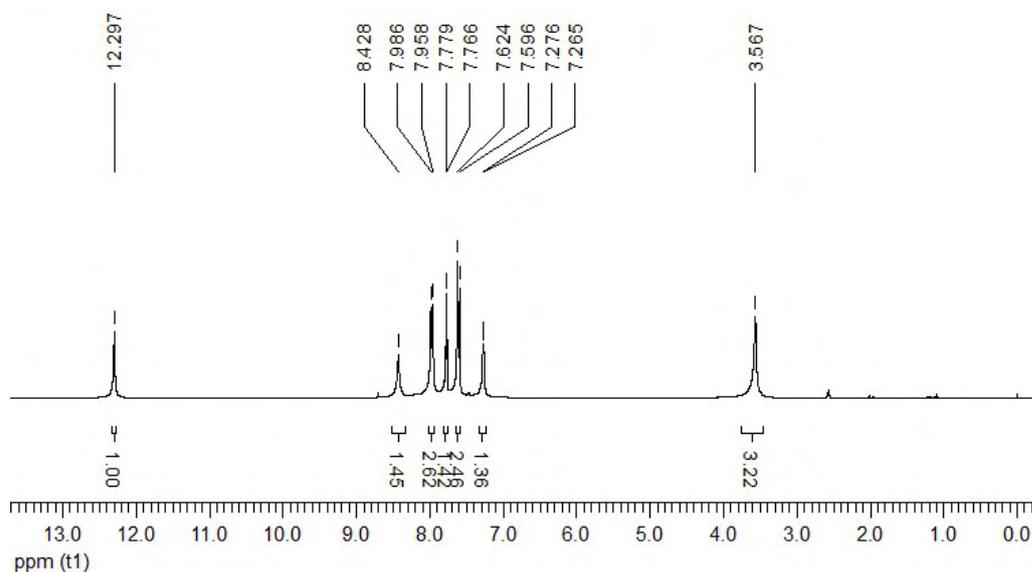
Sólido vermelho escuro (η 72%); F.F. 217,0 – 220,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,40 (s, 1H, H8), 8,41 (s, 1H, H6), 8,06 (d, 2H, H11, H15), 8,06 (d, 2H, H12, H14), 7,79 (d, 1H, $J = 3,3\text{Hz}$, H4), 7,31 (s, 1H, H3); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 162,1 (C9), 152,0 (C2), 151,4 (C5), 136,5 (C6, C10), 132,6 (C12, C14), 128,6 (C11, C15), 115,8 (C13), 114,5 (C3, C4), 118,1 (C16); Anal. Calc. para (C₁₃H₈N₄O₄, 284,05 g): C, 54,93%; H, 2,84%; N, 19,71%. Exp.: C, 54,52%; H, 3,08%; N, 19,39%.



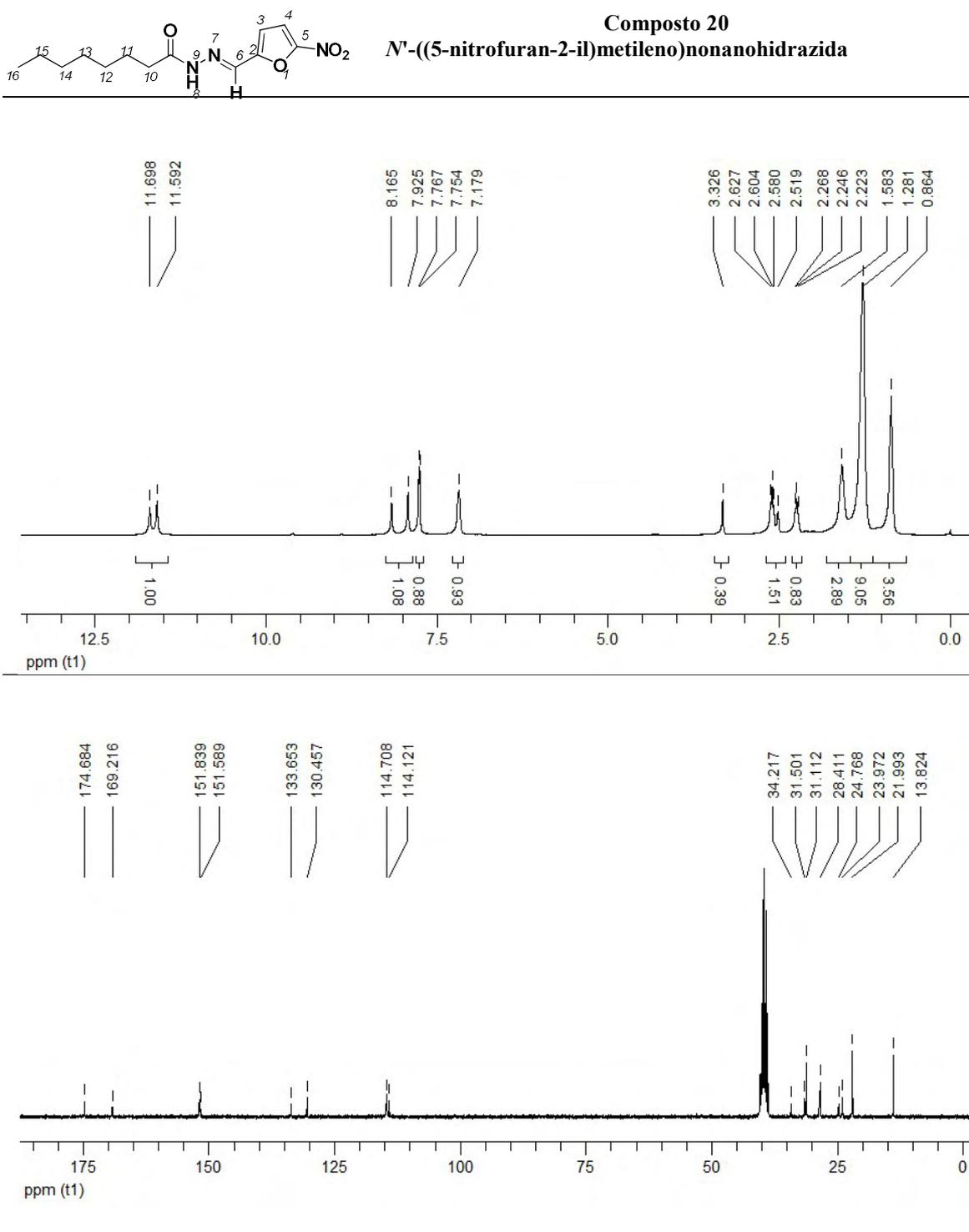




Composto 19
4-cloro-*N'*-((5-nitrofurán-2-il)metileno)benzidrazida

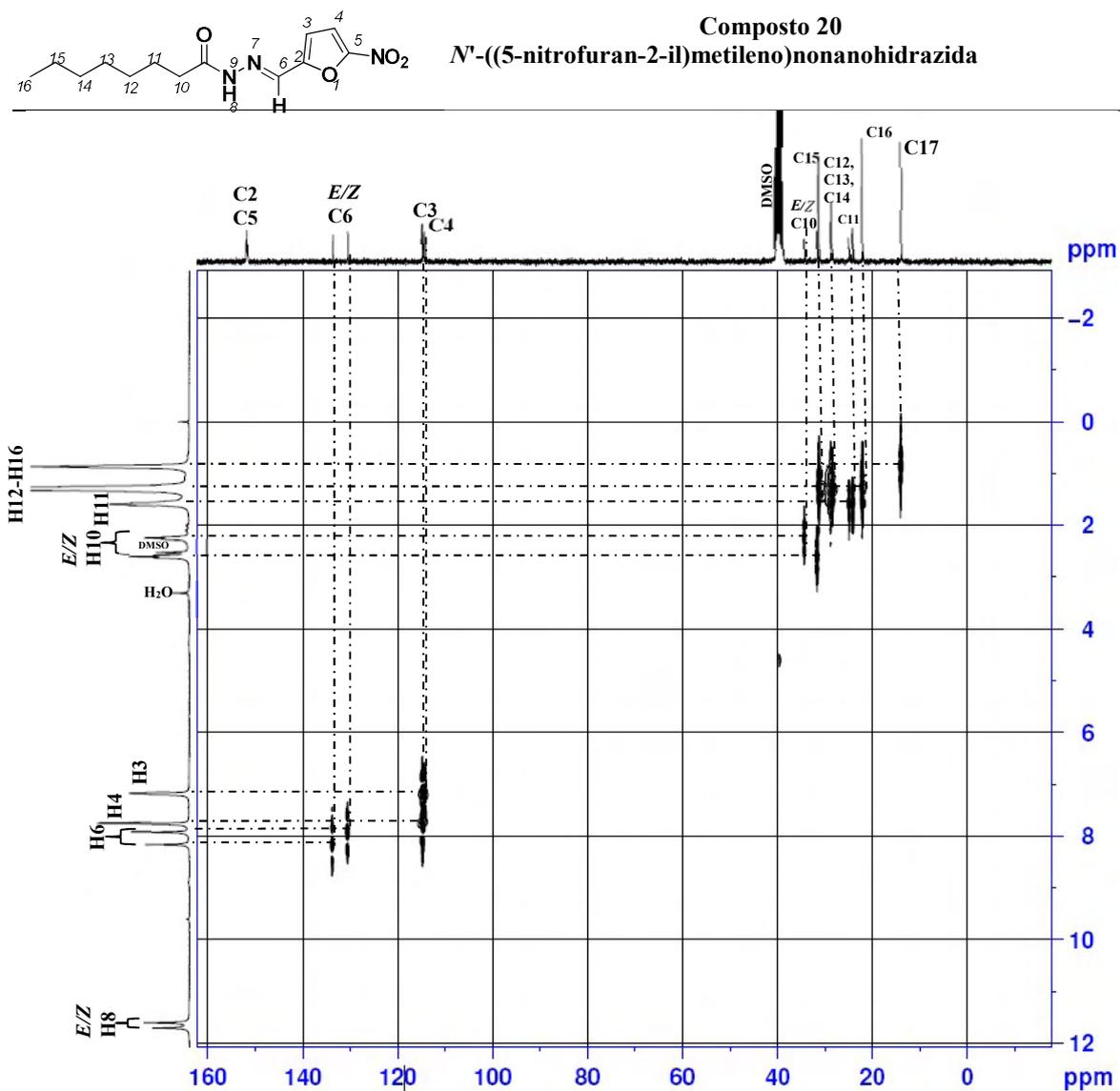


Sólido amarelo (η 67%); F.F. 228,0 – 229,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,30 (s, 1H, H8), 8,43 (s, 1H, H6), 7,97 (d, 2H, $J = 8,3\text{Hz}$, H11, H15), 7,77 (d, 1H, $J = 3,9\text{Hz}$, H4), 7,61 (d, 2H, $J = 8,5\text{Hz}$, H12, H14), 7,27 (d, 1H, $J = 3,4\text{Hz}$, H3); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 162,3 (C9), 151,8 (C2), 151,6 (C5), 137,0 (C13), 135,7 (C6), 131,3 (C10), 129,6 (C11, C15), 128,5 (C12, C14), 115,2 (C4), 114,5 (C3); Anal. Calc. para (C₁₂H₈ClN₃O₄, 293,02 g): C, 49,08%; H, 2,75 %; N, 14,31%. Exp.: C, 48,95 %; H, 2,81%; N, 14,18%.

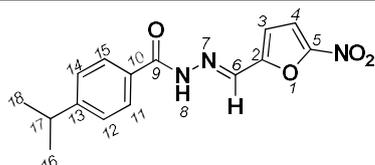


Sólido amarelo claro (η 75 %); F.F. 140,0 – 141,0 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 11,69/11,59 (s, 1H, H8), 8,16/7,92 (s, 1H, H6), 7,76 (d, 1H, *J* = 3,9 Hz, H4), 7,17 (d, 1H, *J* = 4,0 Hz, H3), 2,62-2,58, 2,27-2,22 (2H, H10), 1,28 (9H, H12-H16), 0,86 (3H, H17); RMN ¹³C {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 174,7/169,2 (C9), 151,8 (C2), 151,6 (C5), 133,7/130,5 (C6), 114,7 (C4), 114,2 (C3), 34,2/31,5 (C10), 31,1 (C15), 24,8/23,9 (C11), 28,6 (C12), 28,5 (C13), 28,4 (C14), 22,0 (C16), 13,8 (C17); Anal. Calc. para (C₁₄H₂₁N₃O₄, 295,15 g): C, 56,94%; H, 7,17%; N, 14,23%. Exp.: C, 56,90%; H, 6,77%; N, 14,57%.

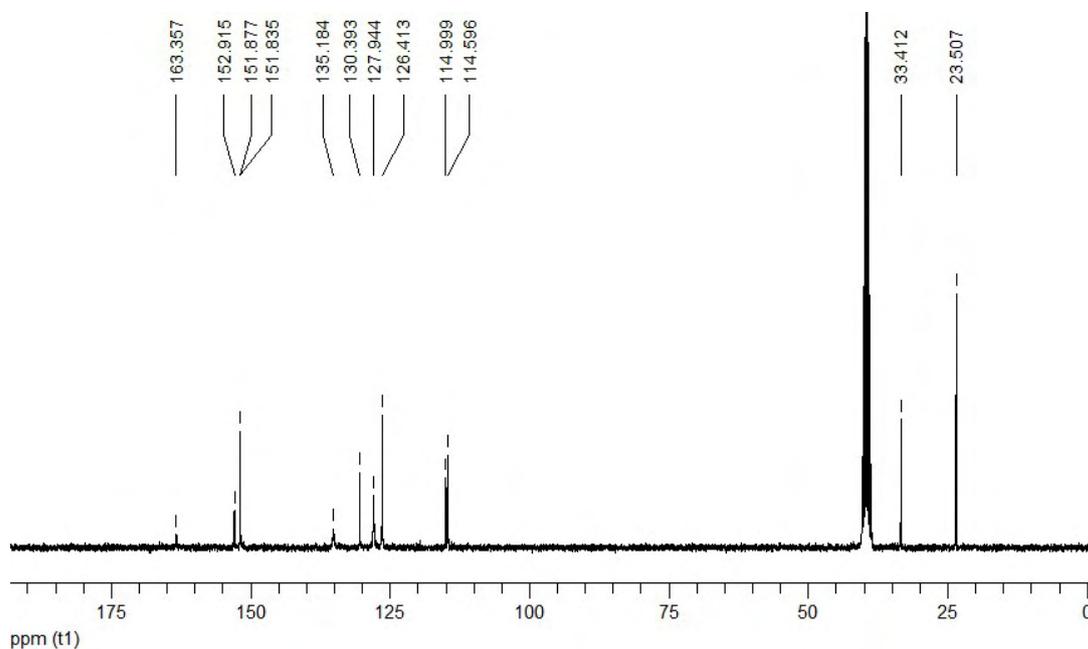
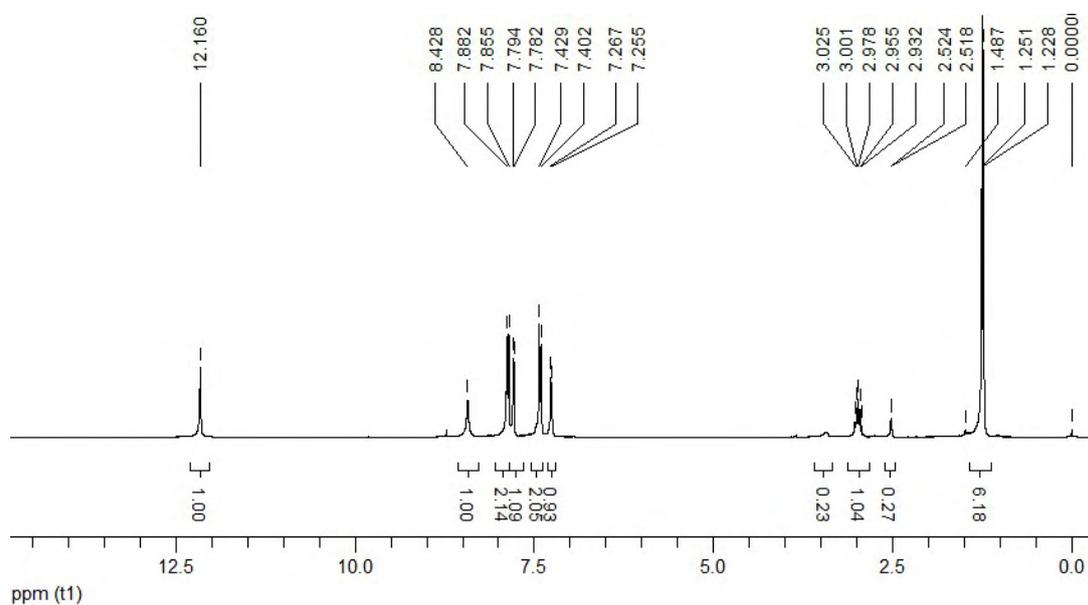
Espectro de correlação heteronuclear de deslocamentos químicos (HETCOR- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do composto 15 (300 MHz / 75 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / 18 h de aquisição)



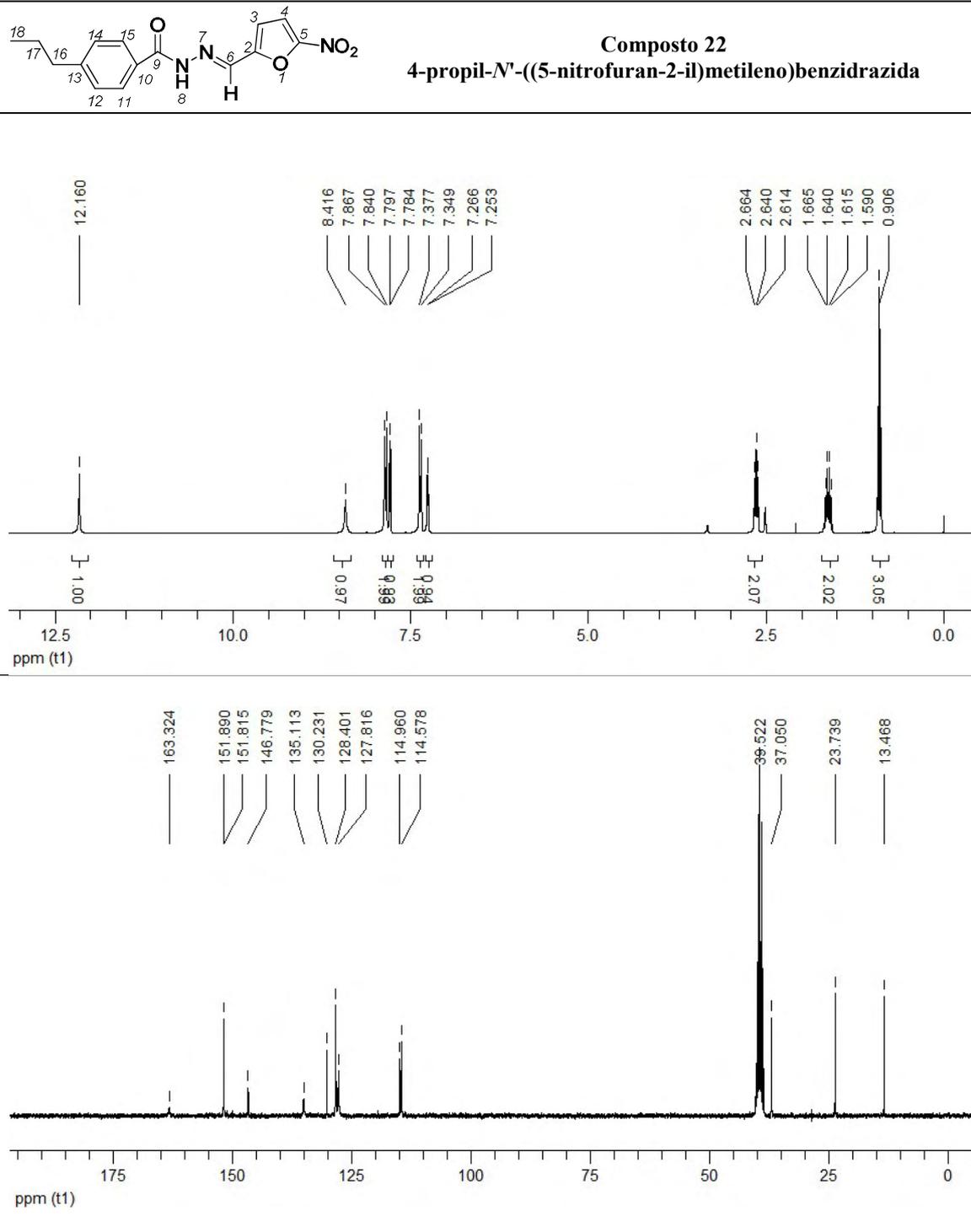
Linhas pontilhadas representam interações dos deslocamentos químicos.



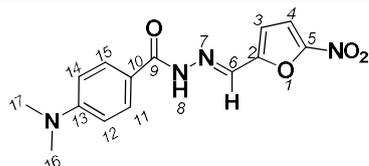
Composto 21
4-*iso*-propil-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)benzidrazida



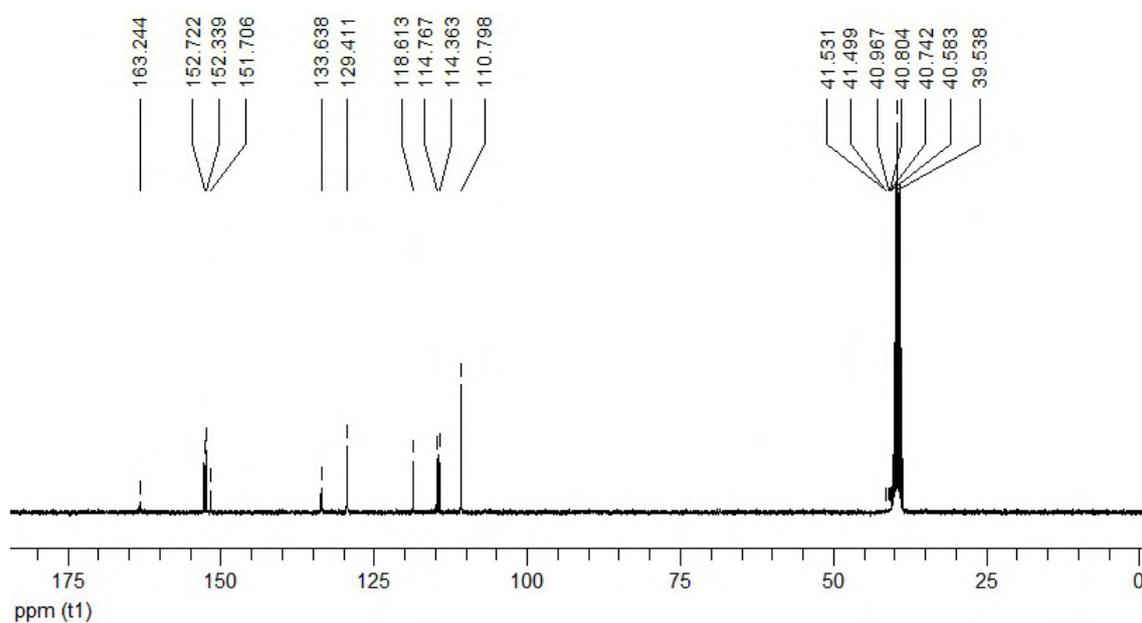
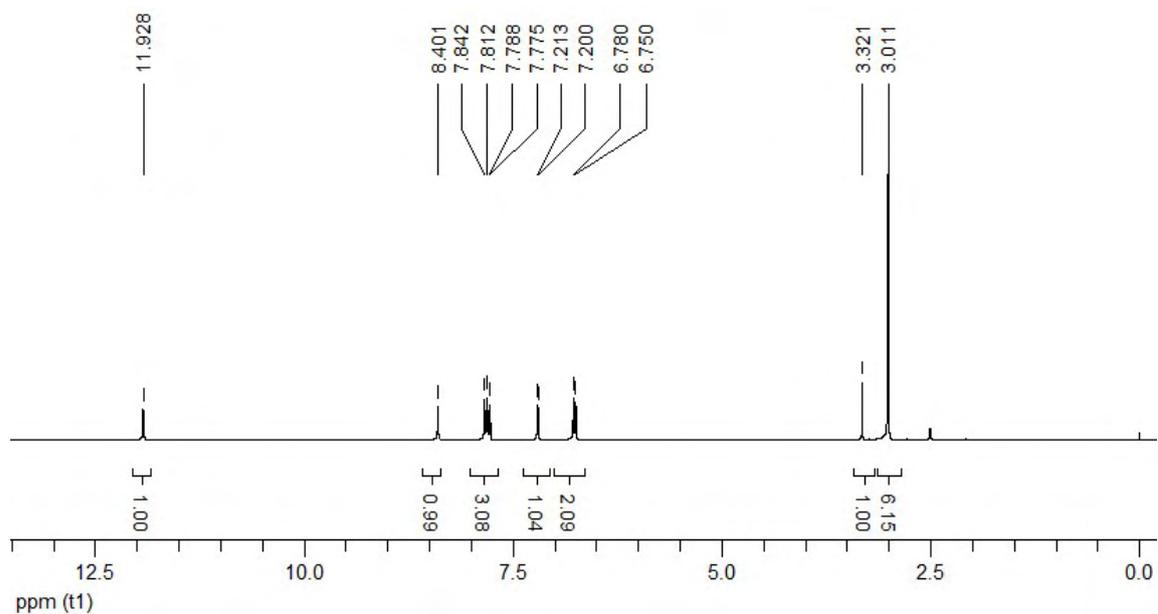
Sólido amarelo (η 74%); F.F. 228,0 – 230,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,16 (s, 1H, H8), 8,43 (s, 1H, H6), 7,87 (d, 2H, J = 8,1Hz, H11, H15), 7,78 (d, 1H, J = 3,9Hz, H4), 7,26 (d, 1H, J = 3,8Hz, H3), 7,41 (d, 2H, J = 8,1Hz, H12, H14), 3,02-2,91 (m, 1H, H17), 1,25 (s, 3H, H16), 1,23 (s, 3H, H18); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 163,4 (C9), 152,9 (C13), 151,9 (C2), 151,8 (C5), 135,2 (C6), 130,4 (C10), 127,9 (C11, C15), 126,4 (C12, c14), 115,0 (C4), 114,6 (C3), 33,4 (C16), 23,5 (C17, C18); Anal. Calc. para (C₁₅H₁₅N₃O₄, 301,30 g): C, 59,79%; H, 5,02%; N, 13,95 %. Exp.: C, 59,58%; H, 4,86%; N, 13,93%.



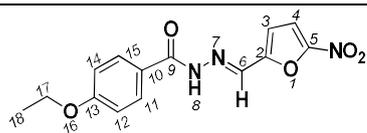
Sólido amarelo (η 77%); F.F. 244,0 – 245,0 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12,16 (s, 1H, H8), 8,42 (s, 1H, H6), 7,85 (d, 2H, *J* = 8,1Hz, H11, H15), 7,79 (d, 1H, *J* = 3,9Hz, H4), 7,36 (d, 2H, *J* = 8,2Hz, H12, H14), 7,26 (d, 1H, *J* = 3,9Hz, H3), 2,63 (t, 2H, *J* = 7,2Hz, H16), 1,66-1,59 (m, 2H, H17), 0,91 (s, 3H, H18); RMN ¹³C {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 163,3 (C9), 151,9 (C2), 151,8 (C5), 146,8 (C13), 135,1 (C6), 130,2 (C10), 128,4 (C12, C14), 127,8 (C11, C15), 115,0 (C4), 114,6 (C3), 37,0 (C16), 23,7 (C17), 13,5 (C18); Anal. Calc. para (C₁₅H₁₅N₃O₄, 301,30 g): C, 59,79%; H, 5,02%; N, 13,95 %. Exp.: C, 59,39%; H, 5,00%; N, 13,98%.



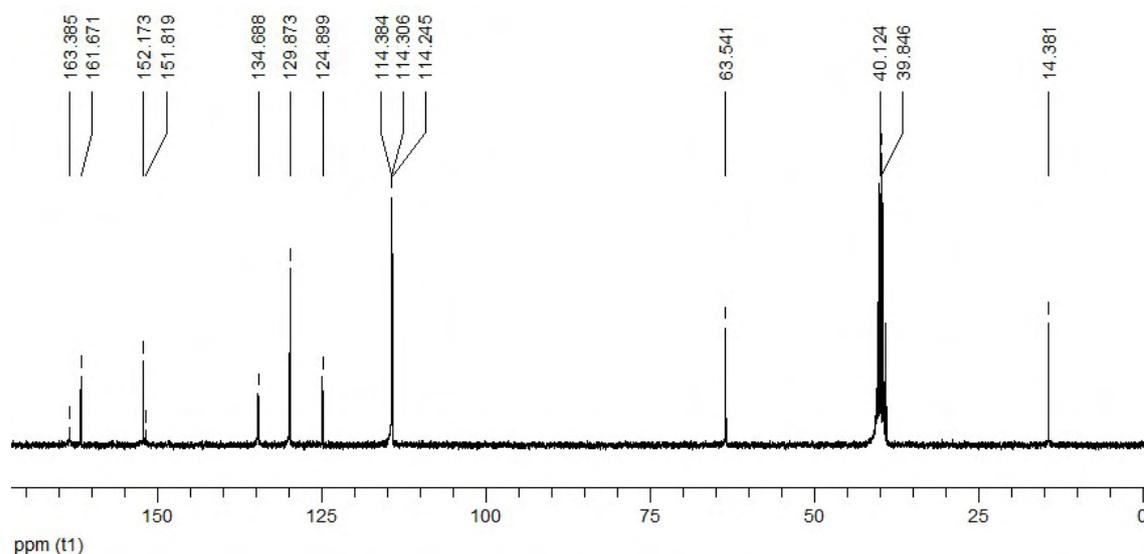
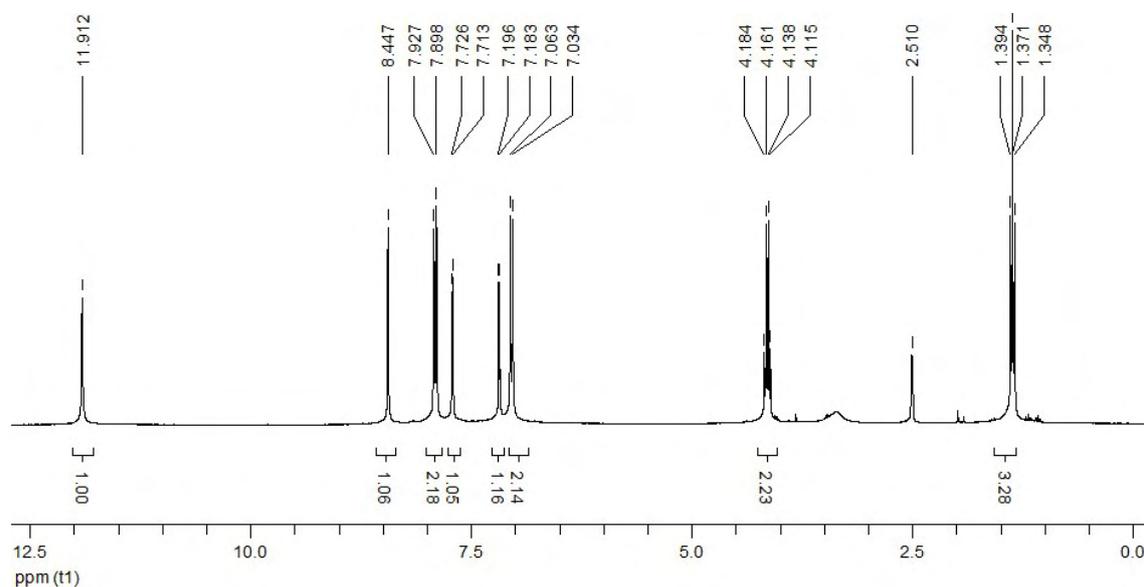
Composto 23
4-dimetilamino-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)
benzidrazida



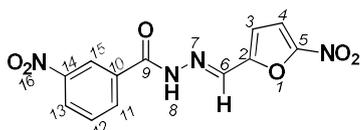
Sólido vermelho escuro (η 57%); F.F. 255,0 – 257,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11,93 (s, 1H, H8), 8,40 (s, 1H, H6), 7,83 (d, 2H, J = 8,9Hz, H11, H15), 7,78 (d, 1H, J = 3,9Hz, H4), 7,21 (d, 1H, J = 3,9Hz, H3), 6,76 (d, 2H, J = 9,0Hz, H12, H14), 3,01 (s, 6H, H16, H17); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 163,2 (C9), 152,7 (C13), 152,4 (C2), 151,7 (C5), 133,6 (C6), 129,4 (C11, C15), 118,6 (C10), 114,7 (C4), 114,4 (C3), 110,8 (C12, C14), 41,5 (C16, C17); Anal. Calc. para (C₁₄H₁₄N₄O₄, 302,29 g): C, 55,63%; H, 4,67%; N, 18,53%. Exp.: C, 55,85%; H, 4,58%; N, 18,58%.



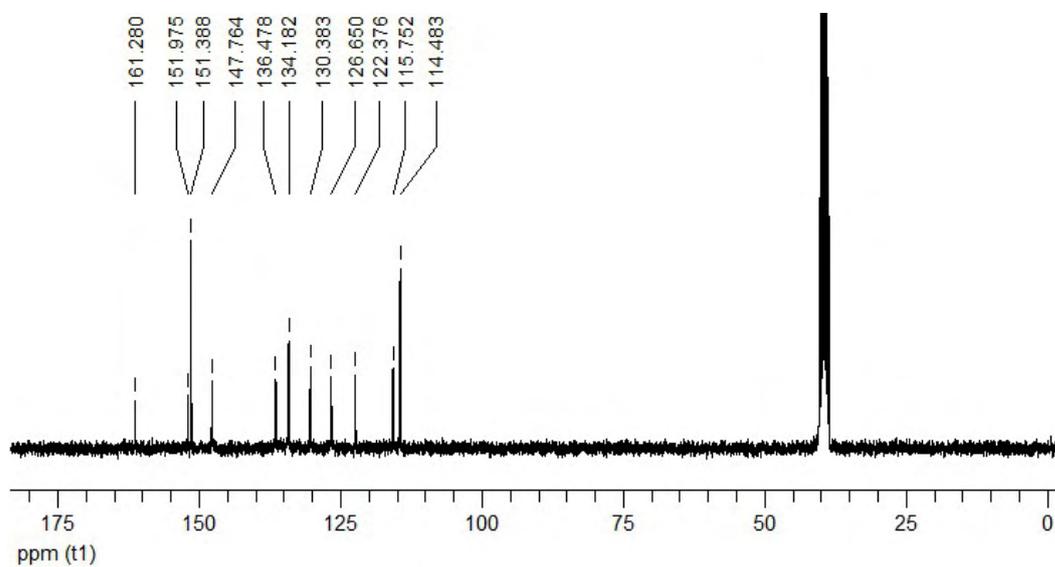
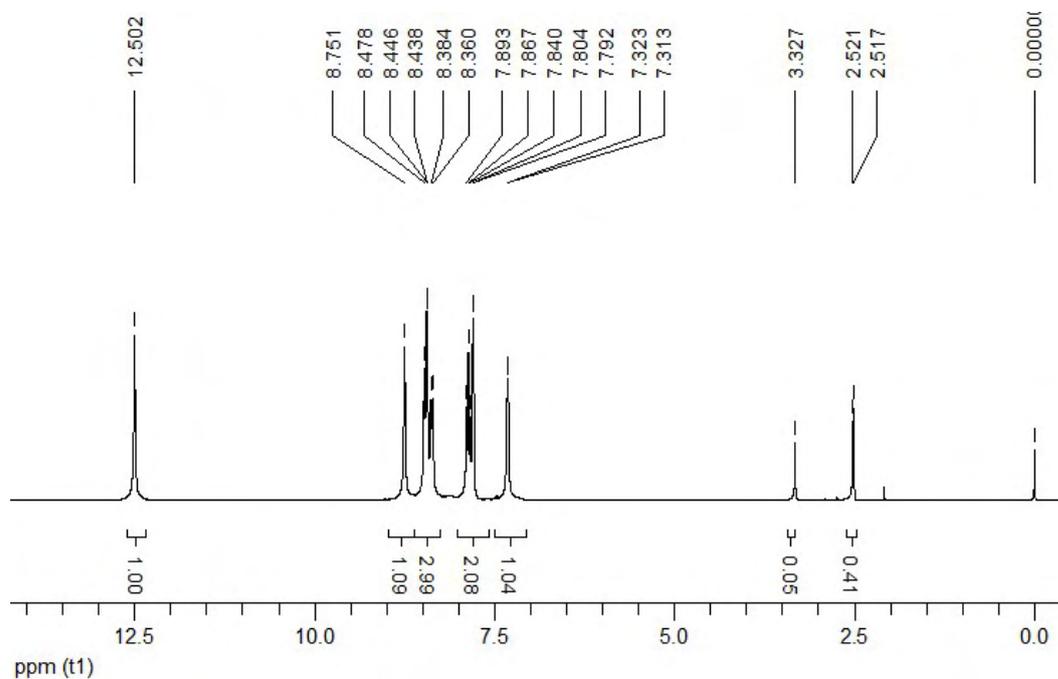
Composto 24
4-etoxi-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)benzidrazida



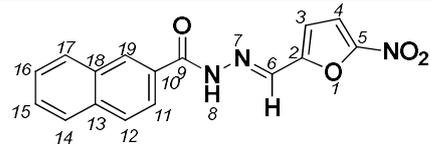
Sólido amarelo (η 87%); F.F. 228,0 – 230,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11,91 (s, 1H, H8), 8,45 (s, 1H, H6), 7,91 (d, 2H, J = 8,6Hz, H11, H15), 7,72 (d, 1H, J = 3,9Hz, H4), 7,19 (d, 1H, J = 3,9Hz, H3), 7,05 (d, 2H, J = 8,7Hz, H12, H14), 4,16 (q, 2H, J = 6,9Hz, H16), 1,35 (t, 3H, J = 6,8Hz, H17); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 163,4 (C9), 161,7 (C13), 152,2 (C2), 151,8 (C5), 134,7 (C6), 129,9 (C11, C15), 124,9 (C10), 114,4 (C12, C14), 114,3 (C3), 114,2 (C4), 63,5 (C16), 14,4 (C17); Anal. Calc. para (C $_{14}$ H $_{13}$ N $_3$ O $_5$, 303,27 g): C, 55,45 %; H, 4,32%; N, 13,86%. Exp.: C, 55,14%; H, 4,18%; N, 13,64%.



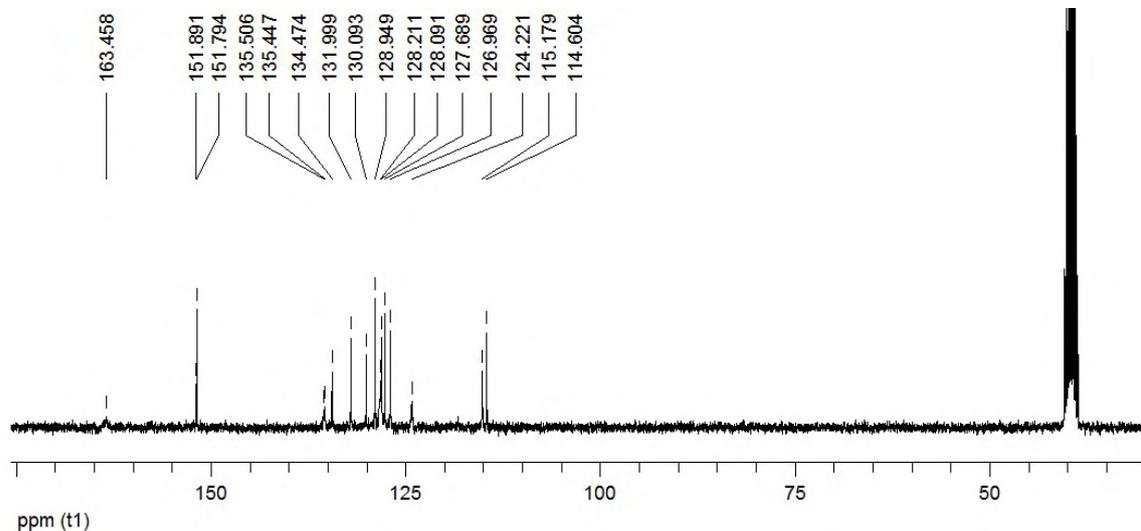
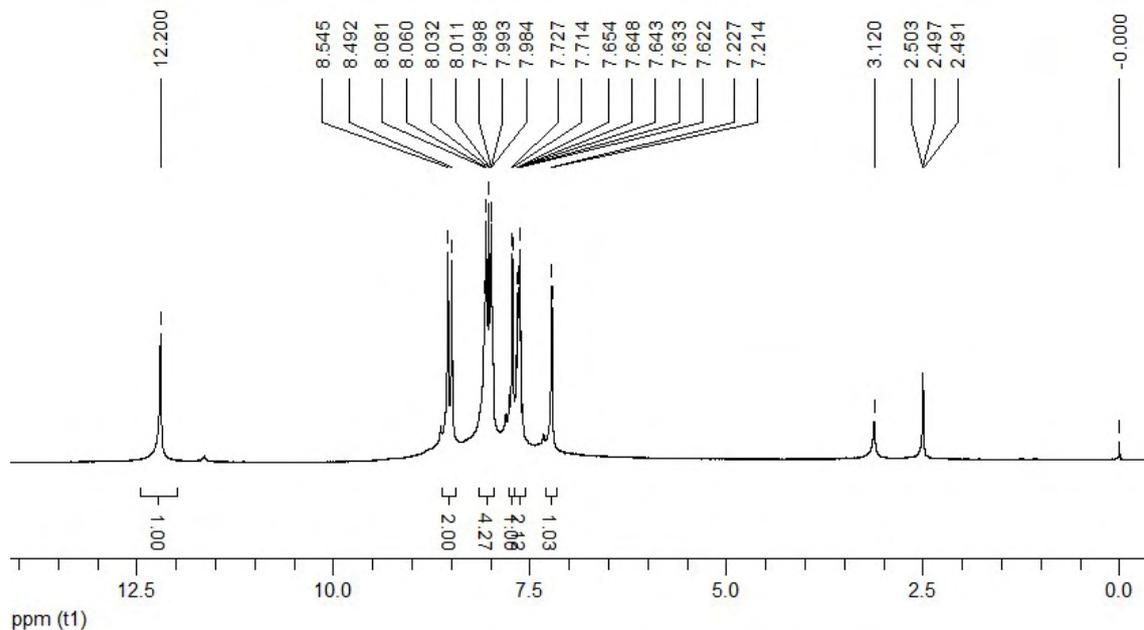
Composto 25
3-nitro-*N'*-((5-nitrofuran-2-yl)methylene)benzidrazida



Sólido amarelo escuro (η 66%); F.F. 249,0 – 250,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,50 (s, 1H, H8), 8,75 (s, 1H, H6), 8,48-8,36 (m, 3H, H11, H13, H15), 7,87 (t, 1H, J = 7,9Hz, H12), 7,80 (d, 1H, J = 3,8Hz, H4), 7,31 (d, 1H, J = 2,9Hz, H3); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 161,3 (C9), 152,0 (C2), 151,4 (C5), 147,8 (C14), 136,5 (C10), 134,2 (C6), 130,4 (C11), 126,6 (C12), 122,4 (C13), 115,8 (C15), 114,5 (C3, C4); Anal. Calc. para (C₁₂H₈N₄O₆, 304,22 g): C, 47,38%; H, 2,65 %; N, 18,42%. Exp.: C, 47,38%; H, 2,80%; N, 18,22%.



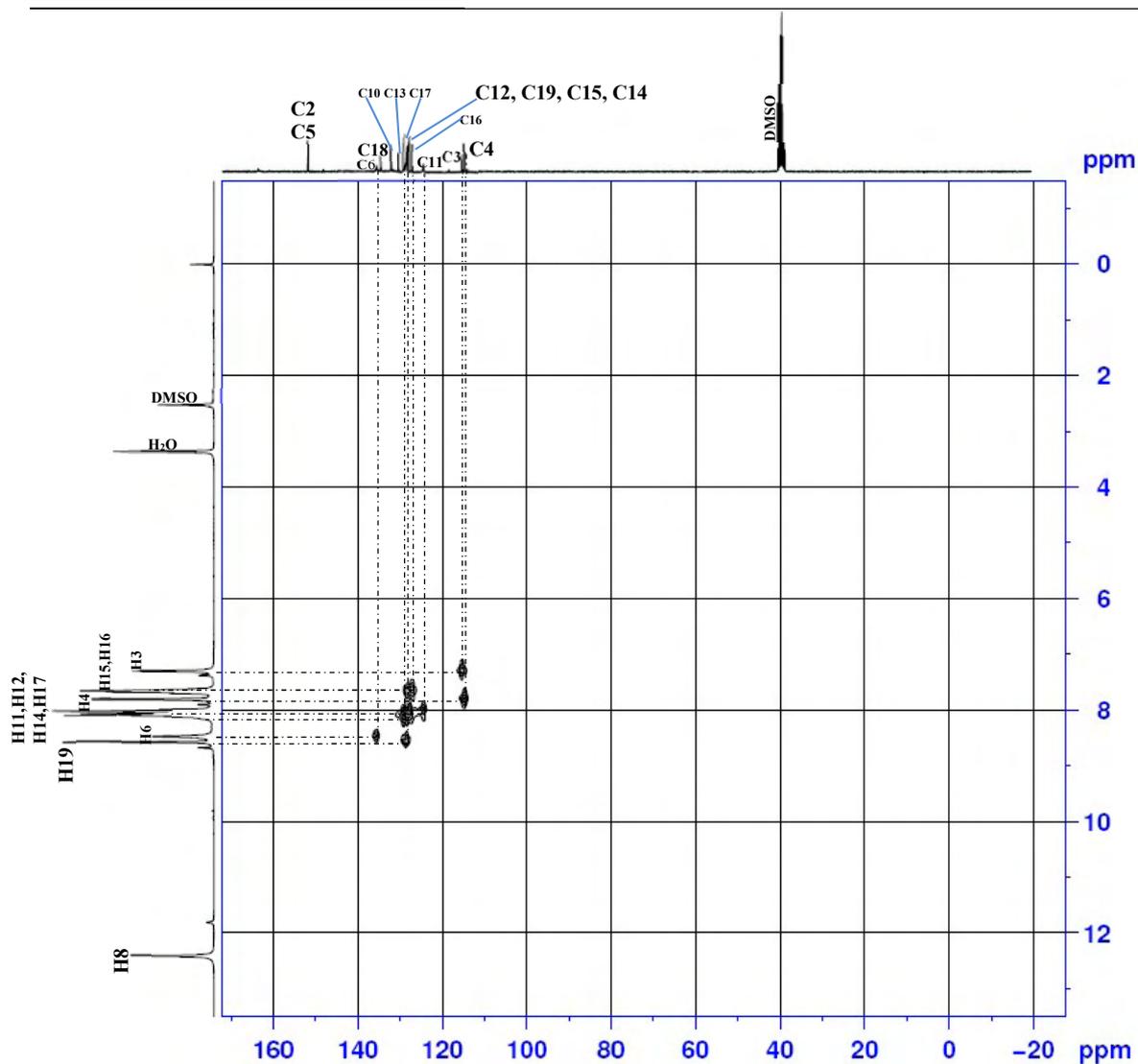
Composto 26
N'-((5-nitrofuran-2-il)metileno)naphtohidrazida



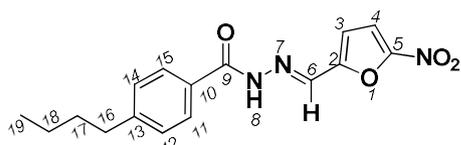
Sólido amarelo (η 94%); F.F. 249,0 – 250,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,20 (s, 1H, H8), 8,55 (s, 1H, H19), 8,49 (s, 1H, H6), 8,08-7,99 (m, 4H, H11, H12, H14, H17), 7,72 (d, 1H, J 3,9= Hz, H4), 7,65-7,62 (m, 2H, H15, H16), 7,22 (d, 1H, J = 3,9Hz, H3); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 163,5 (C9), 151,9 (C2), 151,8 (C5), 135,5 (C18), 135,4 (C6), 134,5 (C10), 132,0 (C13), 130,1 (C17), 128,9 (C19), 128,2 (C15), 128,1 (C12), 127,7 (C14), 126,9 (C16), 124,2 (C11), 115,2 (C3), 114,6 (C4); Anal. Calc. para (C₁₆H₁₁N₃O₄, 309,07 g): C, 62,14%; H, 3,58%; N, 13,59%. Exp.: C, 62,47%; H, 3,70%; N, 13,49%.

Espectro de correlação heteronuclear de deslocamentos químicos (HETCOR- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do composto 20 (300 MHz / 75 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / 19 h de aquisição).

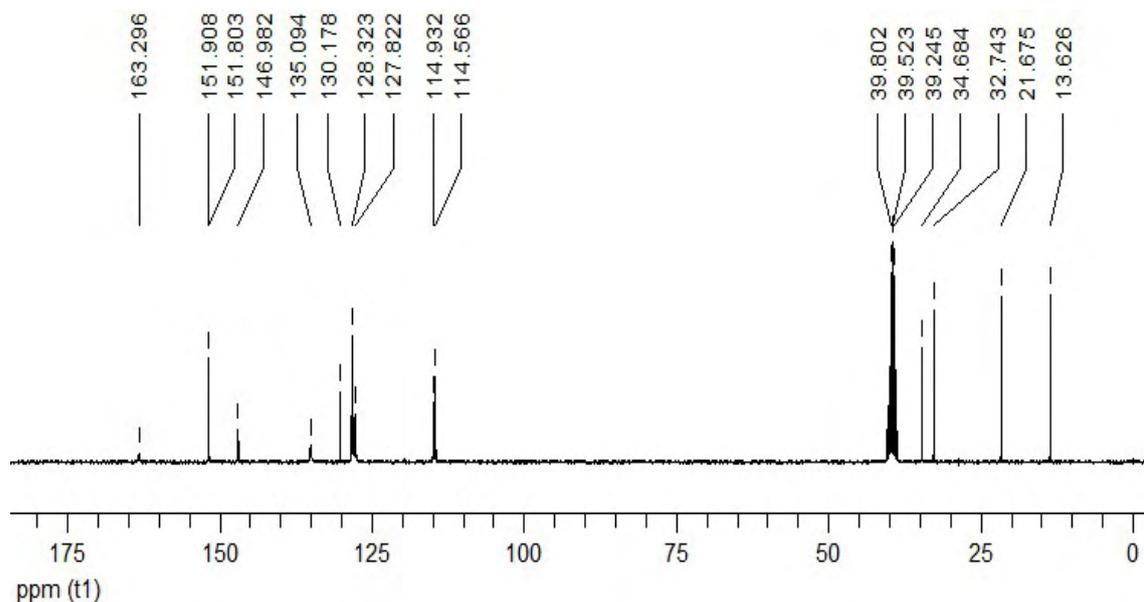
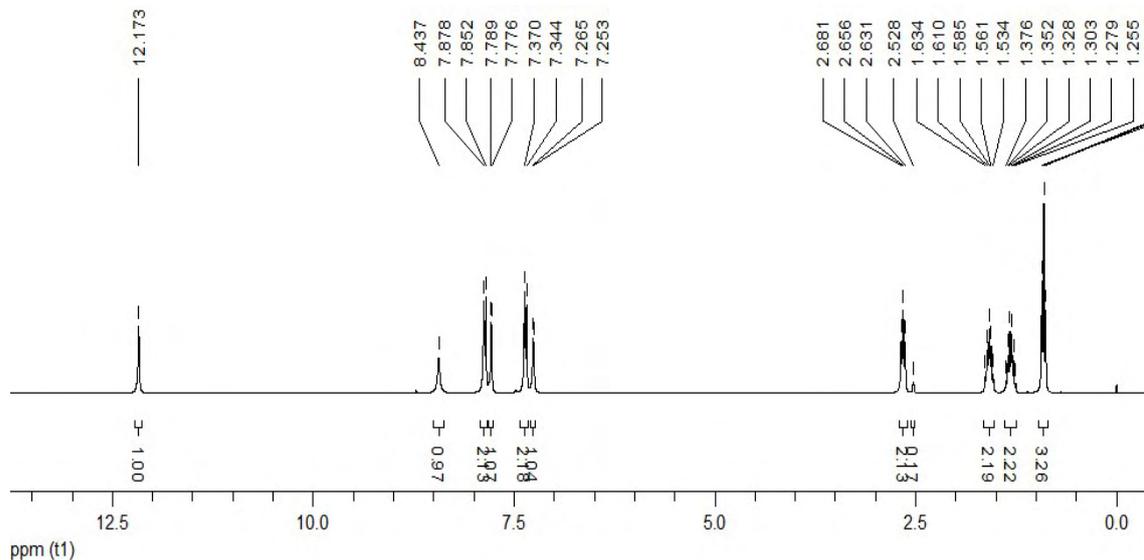
Composto 26
***N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)naphtohidrazida**



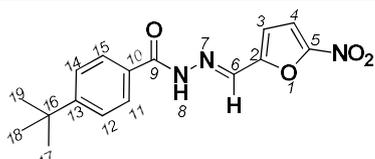
Linhas pontilhadas representam interações dos deslocamentos químicos.



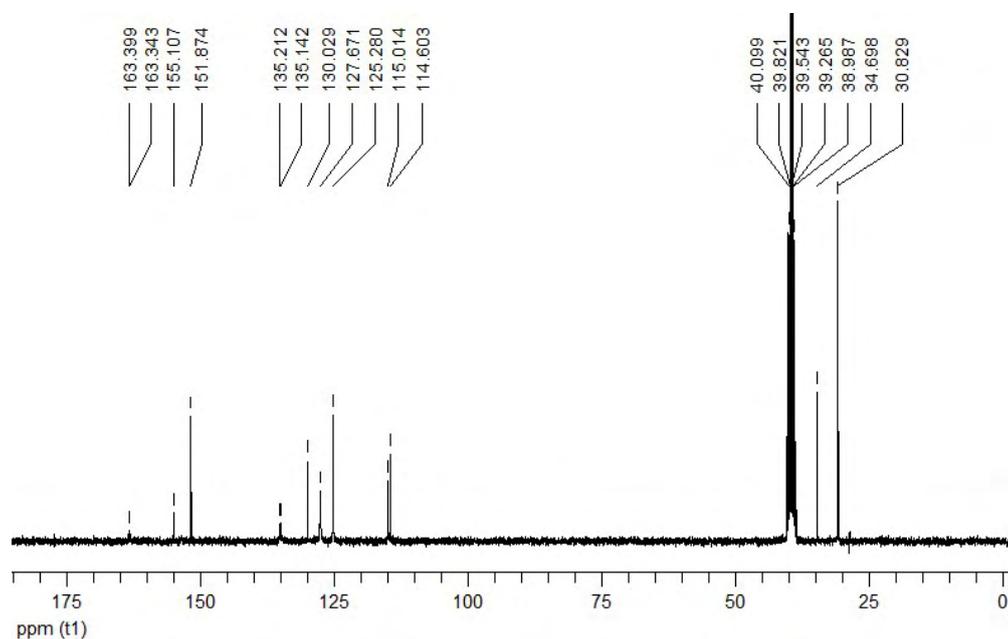
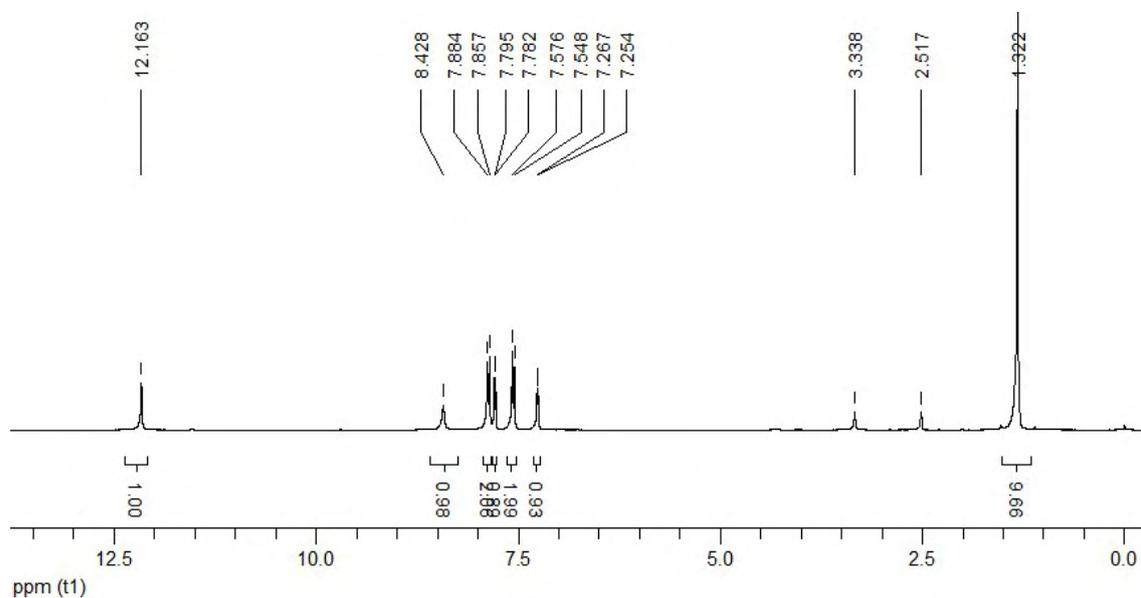
Composto 27
4-butil-N'-((5-nitrofuran-2-il)metileno)benzidrazida



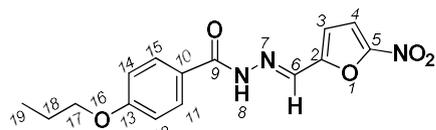
Sólido amarelo (η 94%); F.F. 198,0 – 199,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,17 (s, 1H, H8), 8,44 (s, 1H, H6), 7,86 (d, 2H, J = 8,1Hz, H11, H15), 7,78 (d, 1H, J = 3,9Hz, H4), 7,36 (d, 2H, J = 7,8Hz, H12, H14), 7,26 (d, 1H, J = 3,6Hz, H3), 2,66 (t, 2H, J = 7,5Hz, H16), 1,63-1,53 (m, 2H, H17), 1,38-1,25 (m, 2H, H18), 0,91 (t, 3H, J = 7,2Hz, H19); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 163,3 (C9), 151,9 (C2), 151,8 (C5), 147,0 (C13), 135,1 (C6), 130,2 (C10), 128,3 (C12, C14), 127,8 (C11, C15), 114,9 (C4), 114,6 (C3), 34,7 (C16), 32,7 (C17), 21,7 (C18), 13,6 (C19); Anal. Calc. para (C₁₆H₁₇N₃O₄, 315,32 g): C, 60,94%; H, 5,43%; N, 13,33%. Exp.: C, 60,61%; H, 5,41%; N, 13,32%.



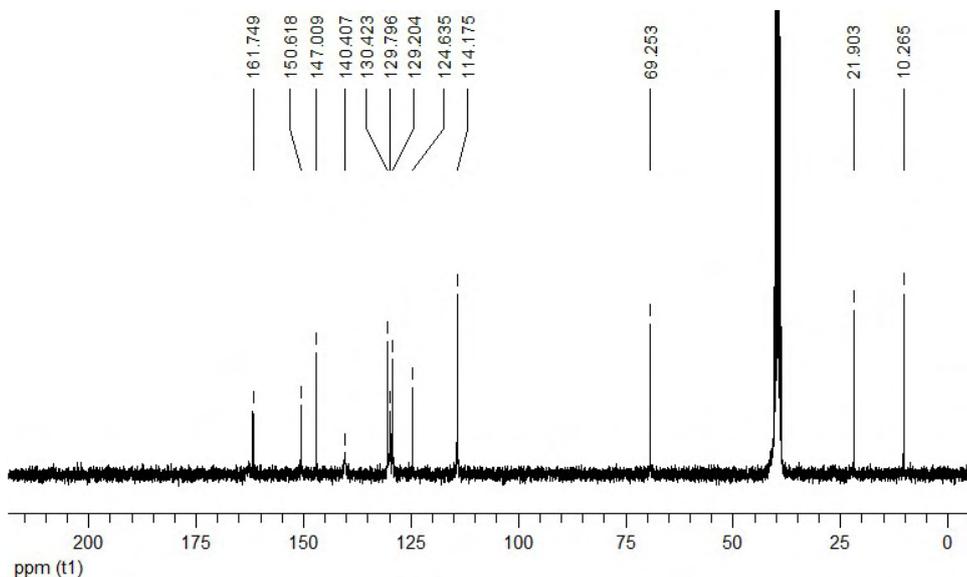
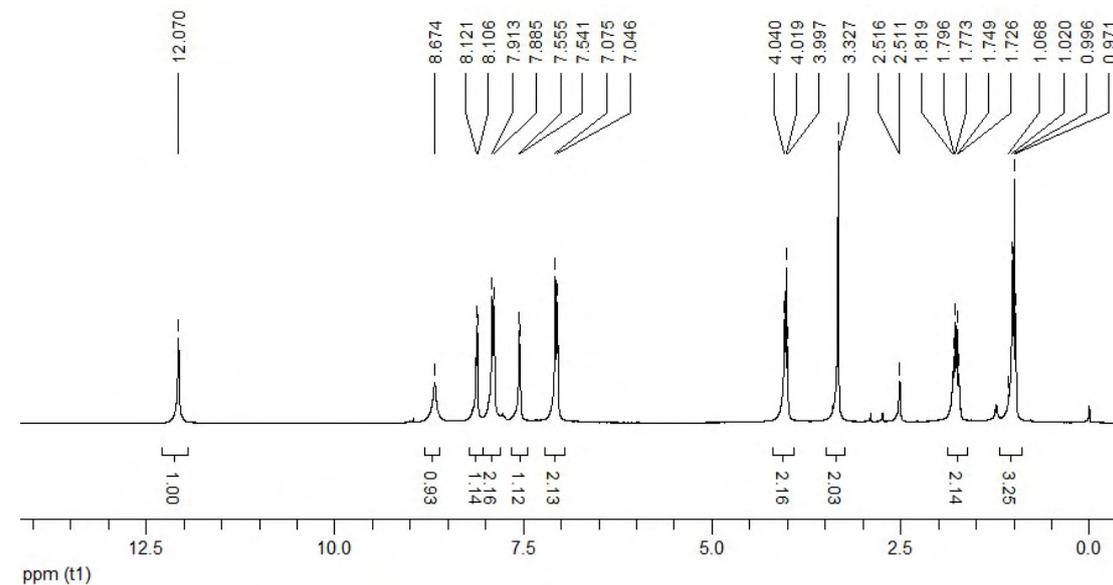
Composto 28
4-*tert*-butil-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)benzidrazida



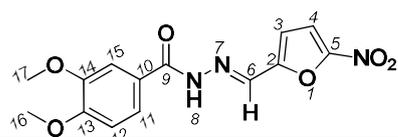
Sólido amarelo (η 76%); F.F. 304,0 – 305,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,16 (s, 1H, H8), 8,43 (s, 1H, H6), 7,87 (d, 2H, J = 8,2Hz, H11, H15), 7,79 (d, 1H, J = 3,9Hz, H4), 7,56 (d, 2H, J = 8,2Hz, H12, H14), 7,26 (d, 1H, J = 3,8Hz, H3), 1,32 (s, 9H, H17-19); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 163,4 (C9), 155,1 (C13), 151,9 (C2, C5), 135,2 (C6), 130,0 (C10), 127,7 (C11, C15), 125,3 (C12, C14), 115,0 (C4), 114,6 (C3), 34,7 (C16), 30,8 (C17, C18, C19); Anal. Calc. para (C₁₆H₁₇N₃O₄, 315,32 g): C, 60,94%; H, 5,43%; N, 13,33%. Exp.: C, 60,56%; H, 5,72%; N, 13,34%.



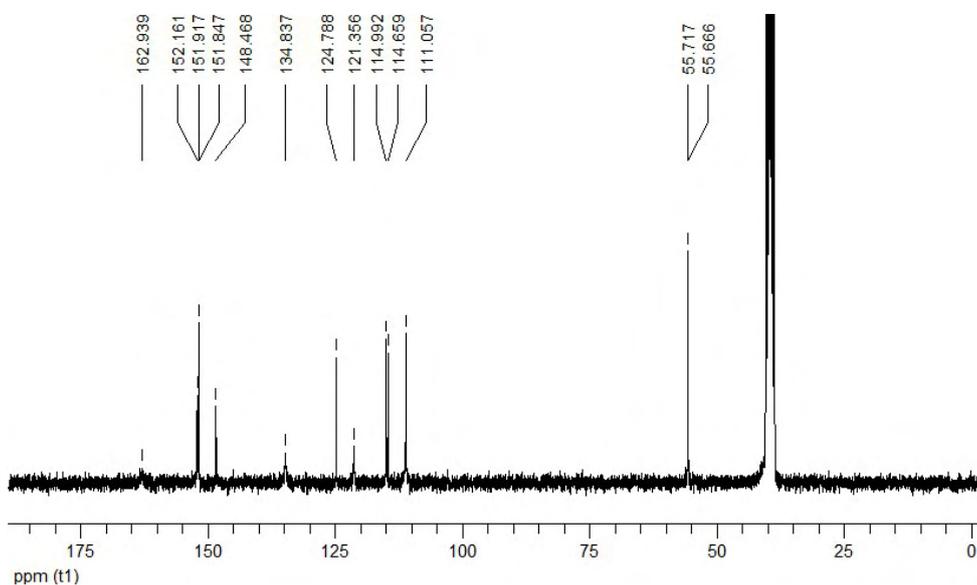
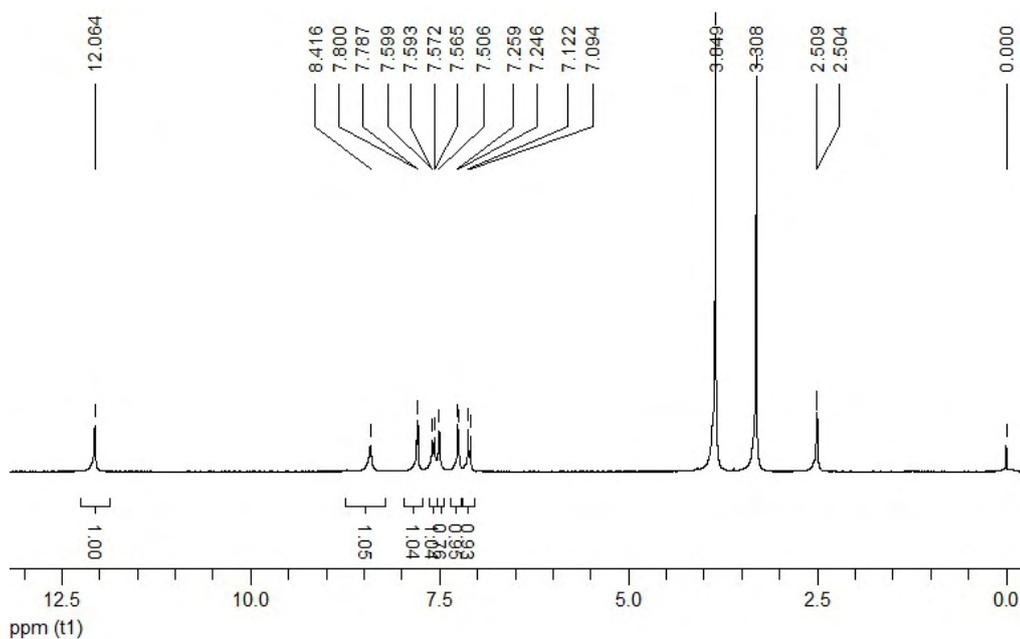
Composto 29
4-propoxi-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)benzidrazida



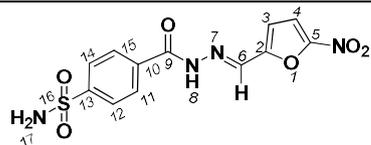
Sólido amarelo (η 92%); F.F. 204,0 – 205,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,07 (s, 1H, H8), 8,67 (s, 1H, H6), 8,11 (d, 1H, $J=4,2\text{Hz}$, H4), 7,88 (d, 2H, $J=8,6\text{Hz}$, H11, H15), 7,55 (d, 1H, $J=4,2\text{Hz}$, H3), 7,06 (d, 2H, $J=8,7\text{Hz}$, H12, H14), 4,01 (t, 2H, $J=6,6\text{Hz}$, H17), 1,82-1,73 (m, 2H, H18), 1,06-0,97 (m, 3H, H19); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 161,7 (C9), 150,6 (C13), 147,0 (C2, C5), 140,4 (C6), 130,4 (C11), 129,8 (C10), 129,8 (C15), 124,6 (C12, C14), 114,2 (C3, C4), 69,3 (C17), 21,9 (C18), 10,3 (C19); Anal. Calc. para (C₁₅H₁₅N₃O₅, 317,30 g): C, 56,78%; H, 4,76%; N, 13,24%. Exp.: C, 56,48%; H, 4,78%; N, 13,60%.



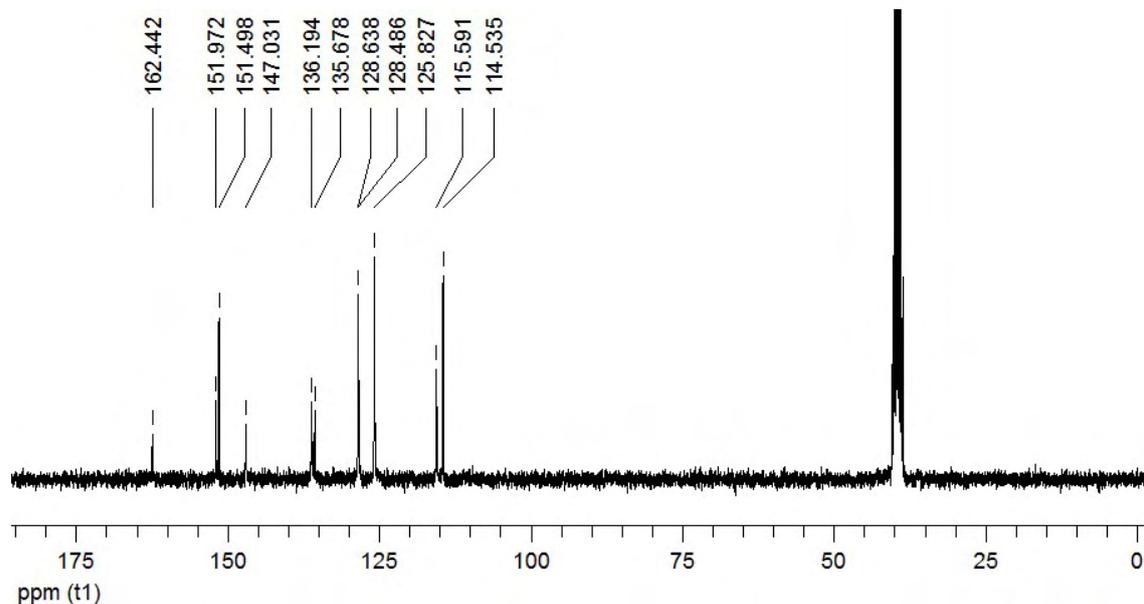
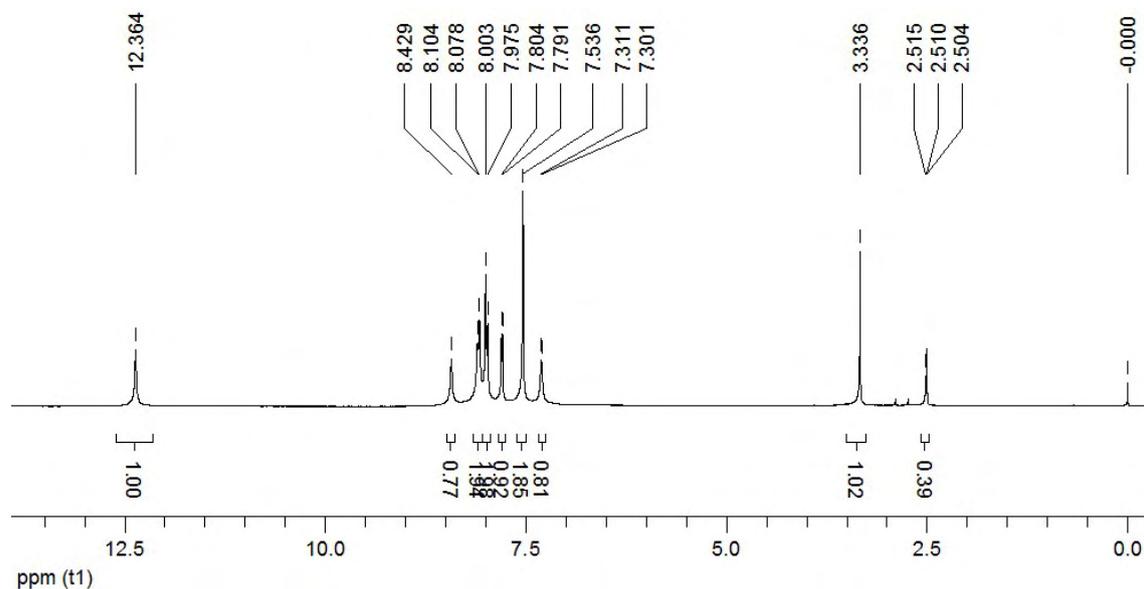
Composto 30
3,4-metoxi-*N'*-((5-nitrofur-2-il)metileno)benzidrazida



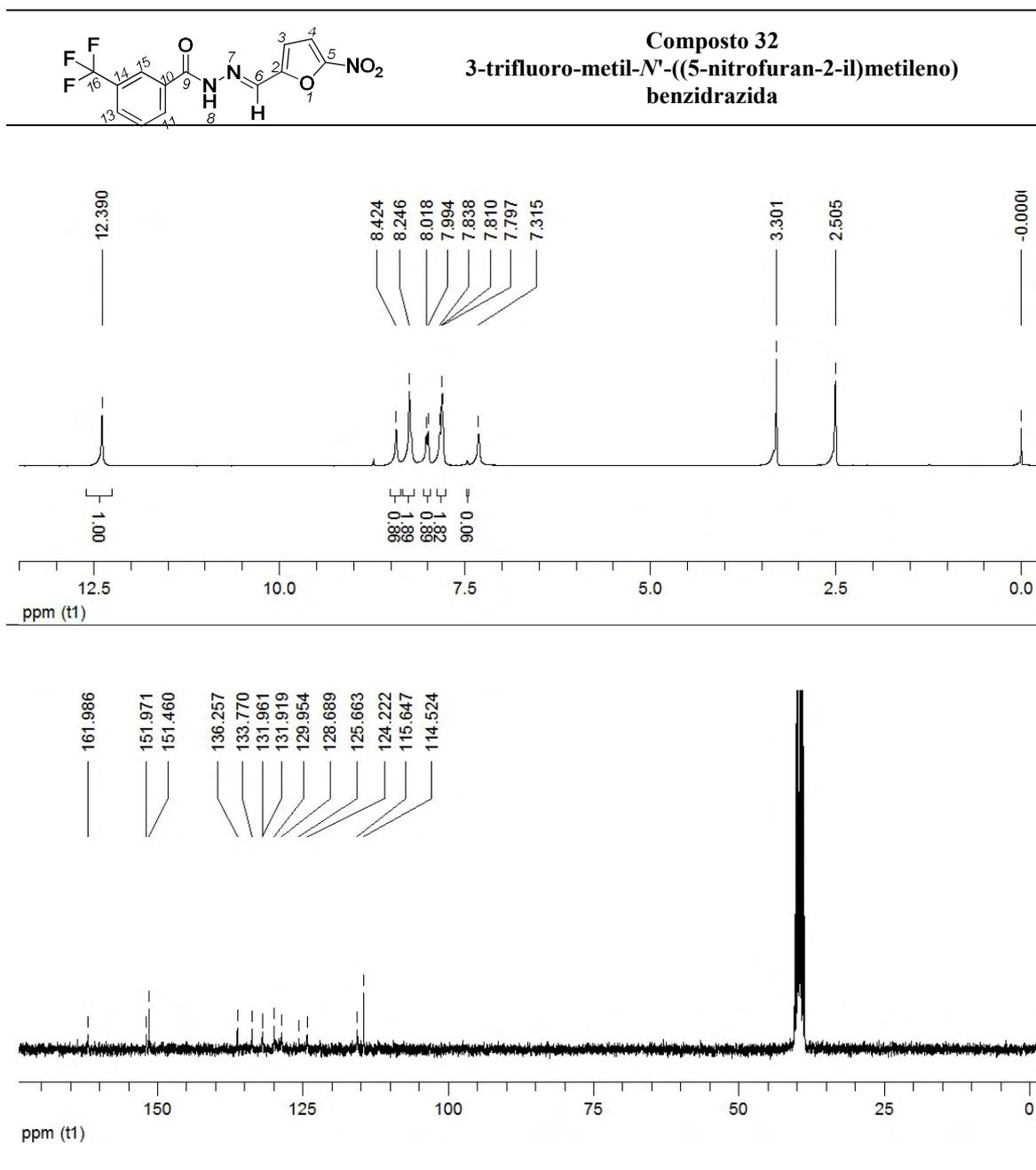
Sólido amarelo (η 74%); F.F. 216,0 – 218,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,06 (s, 1H, H8), 8,42 (s, 1H, H6), 8,4 (1H, H15), 8,4 (1H, H12), 7,71 (d, 1H, $J = 3,9\text{Hz}$, H4), 7,58 (dd, 1H, H15), 7,53 (1H, H11), 7,18 (d, 1H, $J = 3,9\text{Hz}$, H3), 7,08 (1H, H12), 3,85 (s, 3H, H16), 3,31 (s, 3H, H17) 1,9 (1H, H11); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 162,9 (C9), 152,1 (C13), 151,9 (C2), 151,8 (C5), 148,5 (C14), 134,8 (C6), 124,8 (C10), 121,3 (C11), 114,9 (C15), 114,5 (C3, C4), 111,1 (C12), 55,7 (C16, C17); Anal. Calc. para (C₁₄H₁₃N₃O₆, 319,27 g): C, 52,67%; H, 4,10 %; N, 13,16%. Exp.: C, 52,26%; H, 4,18%; N, 13,54%.



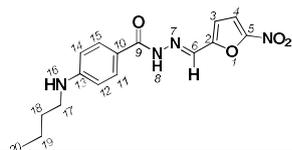
Composto 31
4-sulfamoyl-*N'*-((5-nitrofuran-2-yl)methylene)benzidrazida



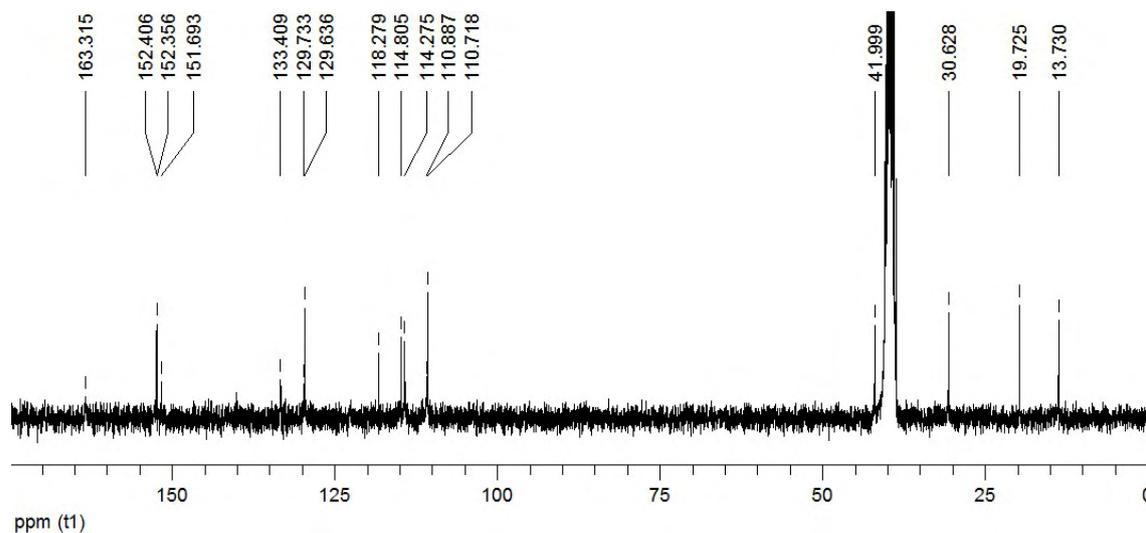
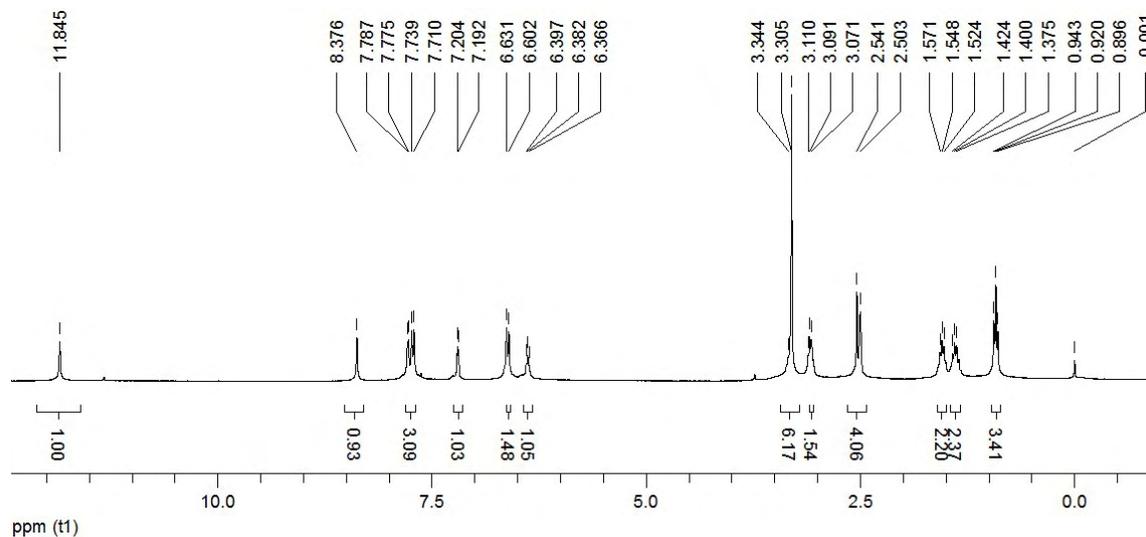
Sólido vermelho escuro (η 53%); F.F. 269,0 – 270,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,36 (s, 1H, H8), 8,43 (s, 1H, H6), 8,10 (d, 2H, J = 7,8Hz, H11, H15), 7,99 (d, 2H, J = 8,2Hz, H12, H14), 7,80 (d, 1H, J = 3,8Hz, H4), 7,54 (s, 2H, H17), 7,30 (d, 1H, J = 2,8Hz, H3); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 162,4 (C9), 152,0 (C2), 151,5 (C5), 147,0 (C13), 136,3 (C10), 135,7 (C6), 128,6 (C11), 128,5 (C15), 125,8 (C12, C14), 115,6 (C4), 114,5 (C3); Anal. Calc. para (C₁₂H₁₀N₄O₆S, 338,30 g): C, 42,60%; H, 2,98%; N, 16,56%. Exp.: C, 42,37%; H, 2,97%; N, 16,48%.



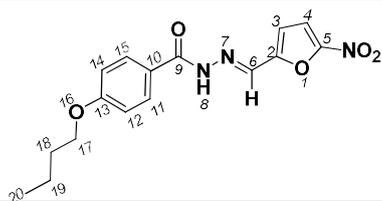
Sólido amarelo (η 76%); F.F. 217,0 – 218,0 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12,39 (s, 1H, H8), 8,42 (s, 1H, H6), 8,24 (s, 2H, H11, H15), 8,00 (d, 1H, *J* = 7,4 Hz, H13), 7,84-7,80 (t, 2H, H4), 7,84-7,80 (t, 2H, H12), 7,32 (s, 1H, H3); RMN ¹³C {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 162,0 (C9), 152,0 (C2), 151,5 (C5), 136,2 (C6), 133,7 (C10), 132,0 (C14), 131,9 (C11), 129,9 (C12), 128,7 (C13), 125,7 (C16), 124,2 (C15), 115,6 (C4), 114,5 (C3); Anal. Calc. para (C₁₃H₈ F₃N₃O₄, 327,05 g): C, 47,72%; H, 2,46%; N, 12,84%. Exp.: C, 47,53%; H, 2,49%; N, 12,96%.



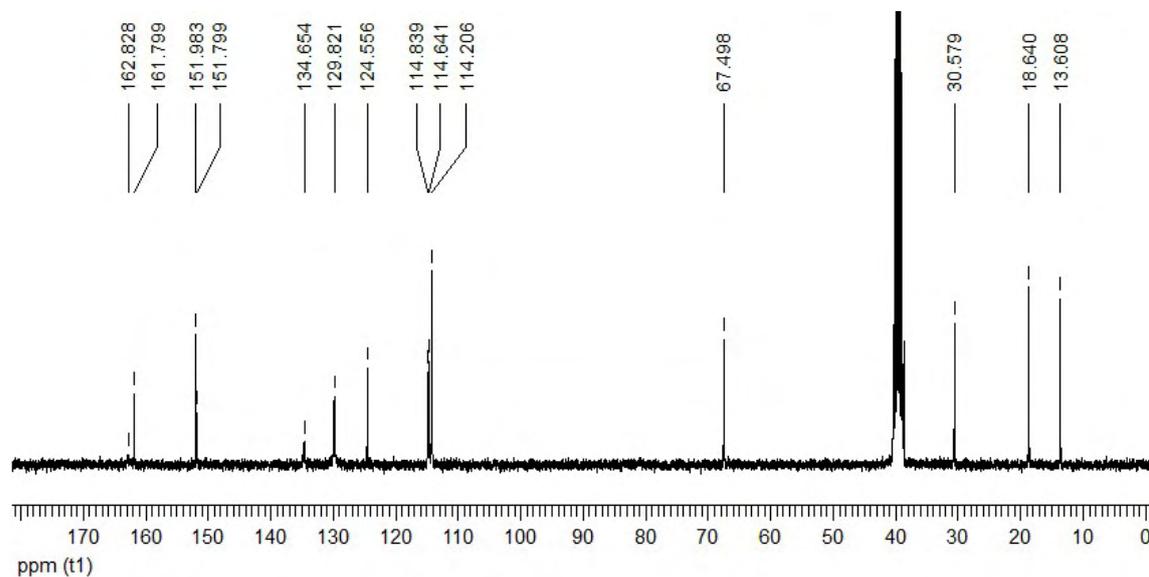
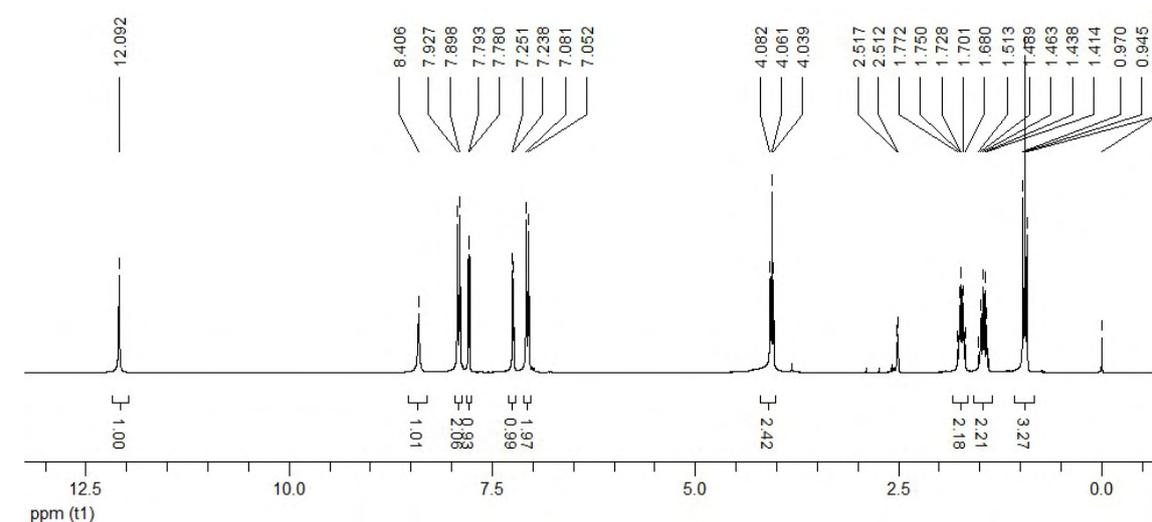
Composto 33
4-butilamino-*N'*-((5-nitrofurán-2-il)metileno)
benzidrazida



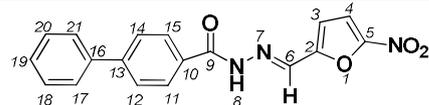
Sólido vermelho escuro (η 80%); F.F. 210,0 – 215,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11,84 (s, 1H, H8), 8,37 (s, 1H, H6), 7,78 (d, 1H, J = 3,63Hz, H4), 7,72 (d, 2H, J = 8,44Hz, H11, H15), 7,2 (d, 1H, J = 3,74Hz, H3), 6,62 (d, 2H, J = 8,46Hz, H12, H14), 6,38 (t, 1H, H16), 3,11-3,07 (t, 2H, H17), 1,57-1,52 (t, 2H, H19), 1,42-1,37 (t, 2H, H18), 0,94-0,90 (t, 3H, H20); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 163,3 (C9), 152,4 (C2), 152,3 (C5), 151,7 (C13), 133,4 (C6), 129,7 (C11), 129,6 (C15), 118,3 (C10), 114,8 (C4), 114,3 (C3), 110,9 (C12), 110,7 (C14), 42,0 (C17), 30,6 (C18), 19,7 (C19), 13,7 (C20); Anal. Calc. para (C₁₆H₁₈N₄O₄, 330,13 g): C, 58,17%; H, 5,49%; N, 16,94%. Exp.: C, 58,06%; H, 5,46%; N, 16,94%.



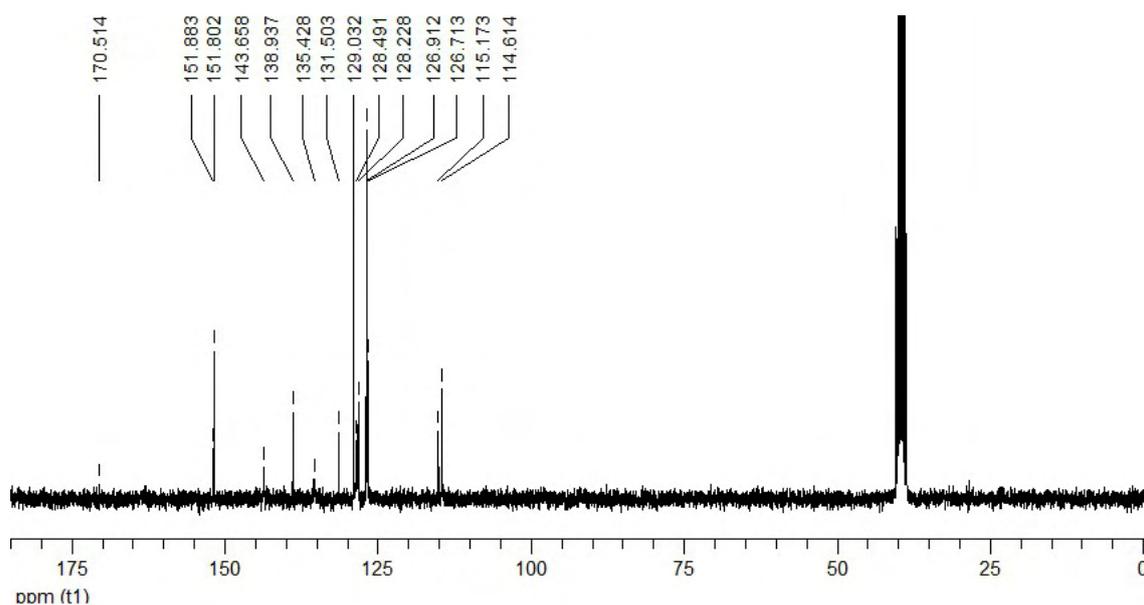
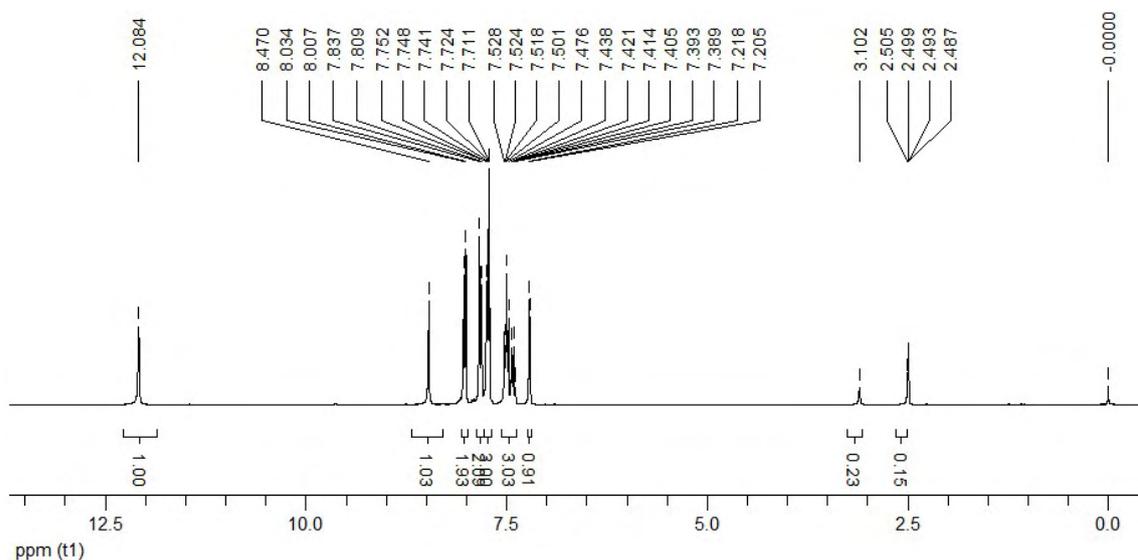
Composto 34
4-butoxi-N'-(5-nitrofurano-2-il)metileno
benzidrazida



Sólido amarelo (η 87%); F.F. 204,0 – 205,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,09 (s, 1H, H8), 8,41 (s, 1H, H6), 7,91 (d, 2H, $J=8,8$ Hz, H11), 7,79 (d, 1H, $J=3,9$ Hz, H4), 7,24 (d, 1H, $J=3,9$ Hz, H3), H15), 7,01 (d, 2H, $J=8,8$ Hz, H12, H14), 4,06 (t, 2H, $J=6,6$ Hz, H17), 1,82-1,73 (m, 2H, $J=6,5$ Hz, H18), 1,46 (m, 2H, H19), 0,94 (t, 3H, $J=7,2$ Hz, H20); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 162,8 (C9), 161,8 (C13), 151,9 (C2), 151,8 (C5), 134,6 (C6), 129,8 (C11, C15), 124,5 (C10), 114,8 (C4), 114,6 (C12, C14), 114,2 (C3), 67,5 (C17), 30,6 (C18), 18,6 (C19), 13,6 (C20); Anal. Calc. para (C₁₆H₁₇N₃O₅, 331,12 g): C, 42,37%; H, 3,30%; N, 15,27%. Exp.: C, 52,66%; H, 3,37%; N, 14,87%.



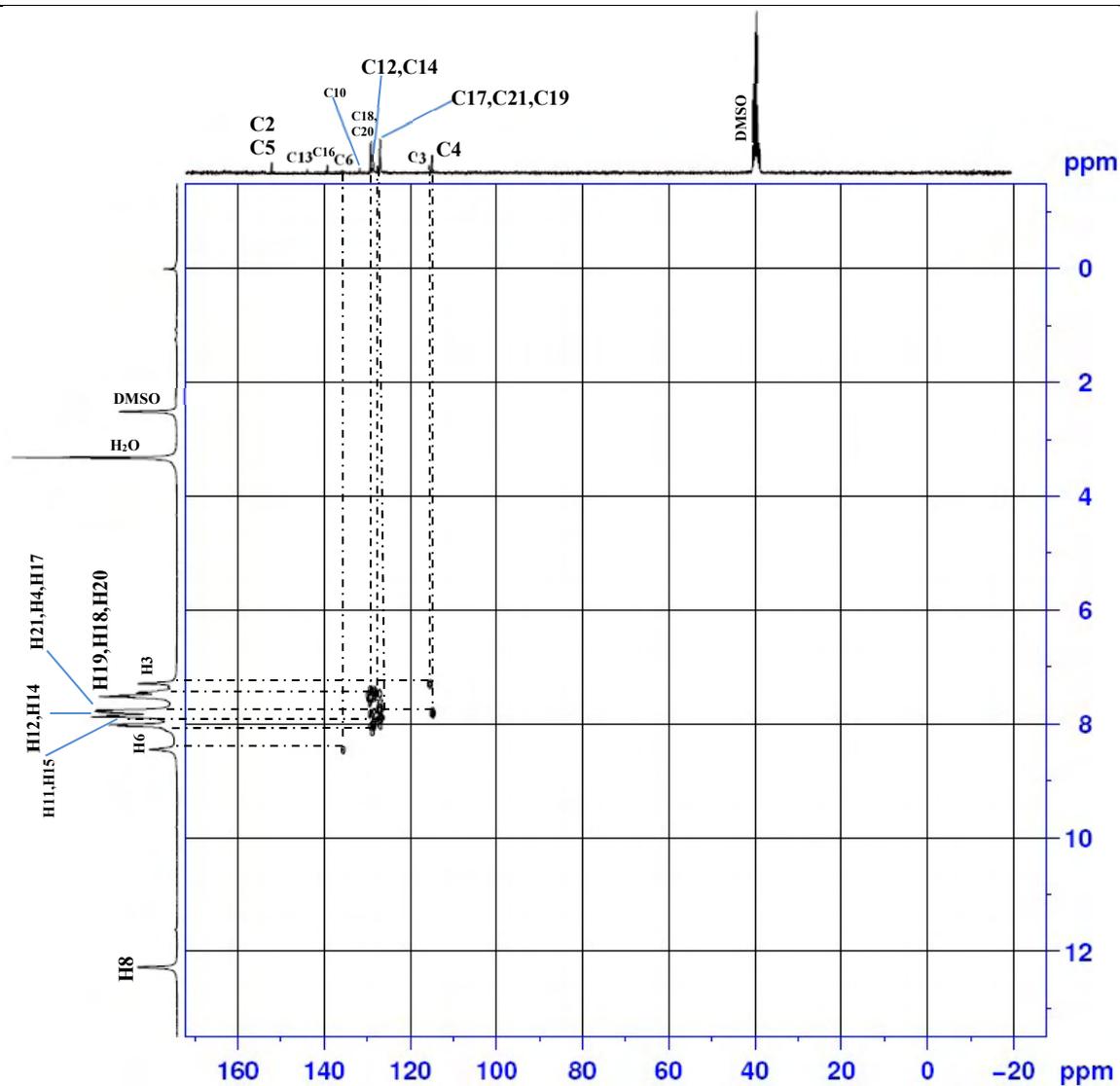
Composto 35
4-bifenil-N'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)
carbohidrazida



Sólido amarelo (η 90%); F.F. 239,0 – 240,0 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,08 (s, 1H, H8), 8,47 (s, 1H, H6), 8,02 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, H11, H15), 7,82 (d, 2H, $J=8,3$ Hz, H12, H14), 7,75-7,71 (m, 3H, H4, H17, H21), 7,53-7,39 (m, 3H, H18, H19, H20), 7,21 (d, 1H, $J=3,9$ Hz, H3); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 170,5 (C9), 151,9 (C2), 151,8 (C5), 143,2 (C13), 138,9 (C16), 135,5 (C6), 131,5 (C10), 129,0 (C11, C15), 128,5 (C18, C20), 128,2 (C12, C14), 126,9 (C17, C21), 126,7 (C19), 115,2 (C4), 114,6 (C3); Anal. Calc. para (C₁₈H₁₃N₃O₄, 335,41 g): C, 64,47%; H, 3,91%; N, 12,53%. Exp.: C, 64,24%; H, 3,88%; N, 12,60%.

Espectro de correlação heteronuclear de deslocamentos químicos (HETCOR- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do composto 29 (300 MHz / 75 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / 20 h de aquisição).

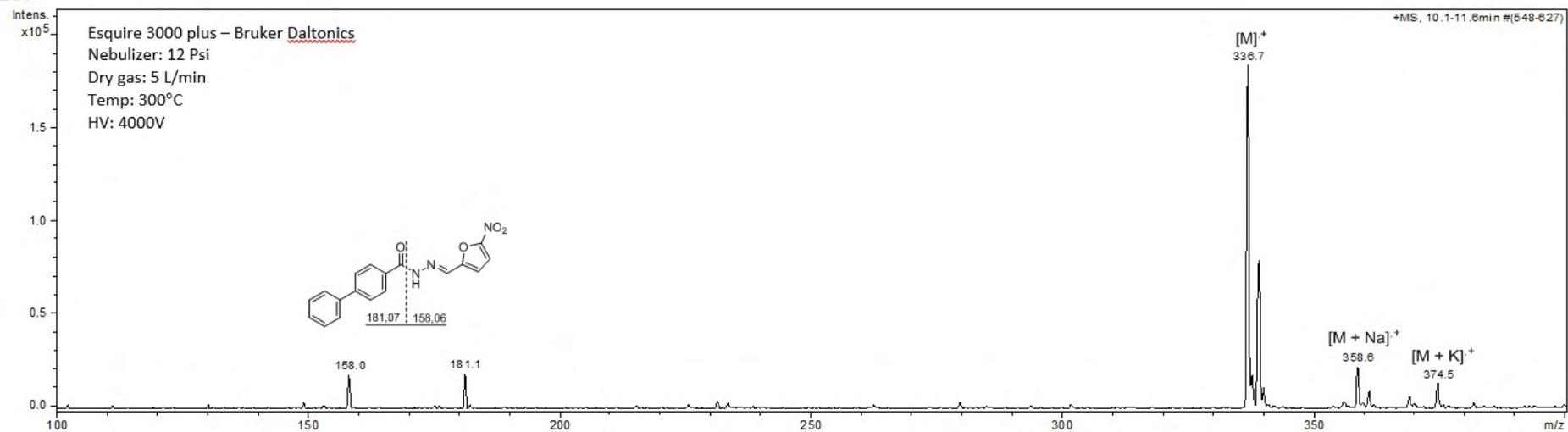
Composto 35
4-bifenil- N' -((5-nitrofurano-2-il)metileno)
carbohidrazida



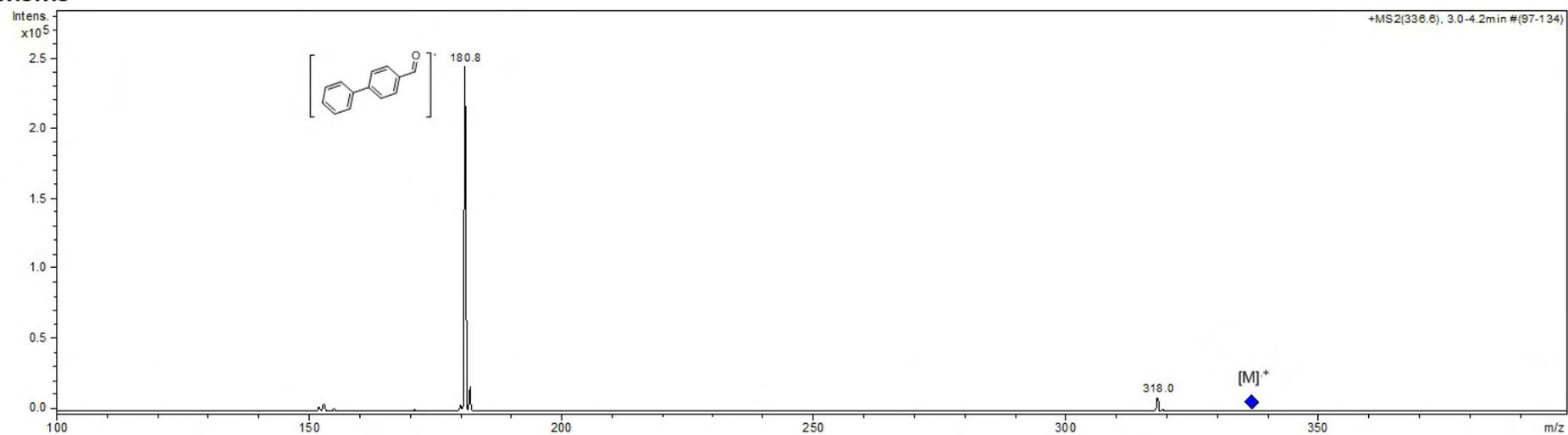
Linhas pontilhadas representam interações dos deslocamentos químicos.

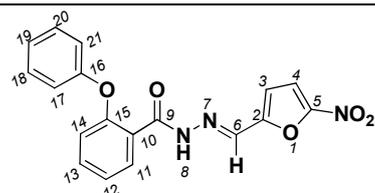
Espectrometria de massa do composto 35: 4-bifenil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno) carbohidrazida

ESI+

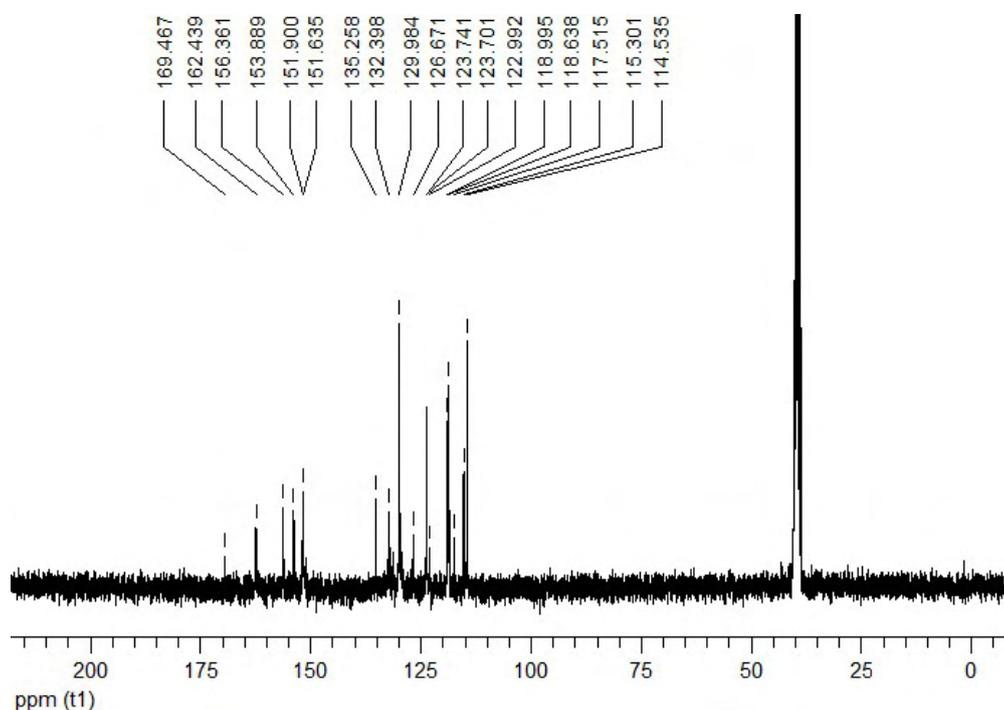
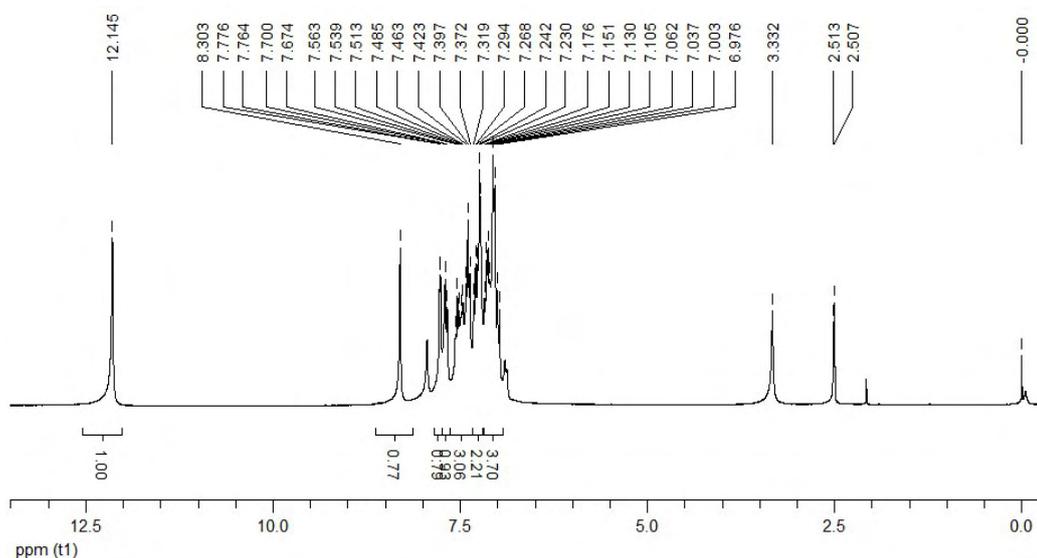


MSMS



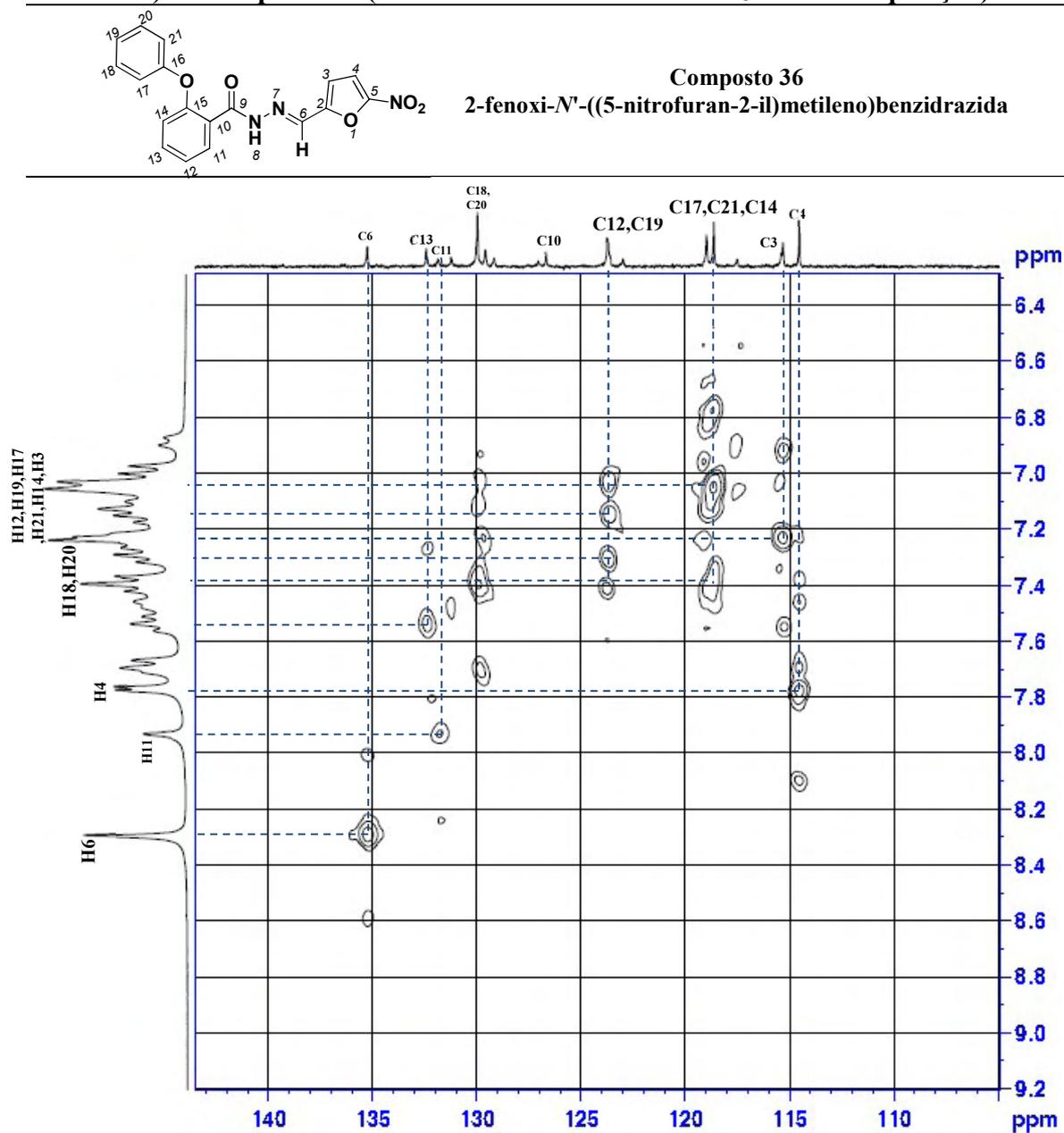


Composto 36
2-fenoxi-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)benzidrazida

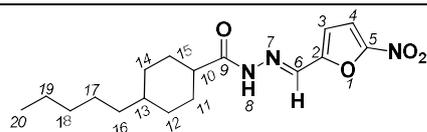


Sólido amarelo (η 74%); F.F. 197,0 – 198,0 °C, RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): d (ppm): 12,44 (s, 1H, H8), 8,30 (s, 1H, H6), 7,70 (d, 1H, $J=3,6$ Hz, H4), 7,69 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, H11), 7,56-7,37 (m, 3H, H12, H13, H14), 7,32-7,23 (m, 2H, H18, H20), 7,17-6,97 (m, 4H, H3, H17, H19, H21); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 169,5/162,4 (C9), 156,4 (C16), 153,9 (C15), 151,9 (C2), 151,6 (C5), 135,3 (C13), 132,3/130,0 (C6), 126,7 (C11), 123,7 (C18, C20), 122,9 (C12, C19), 119,0 (C10), 118,6 (C17, C21), 117,5 (C14), 114,5 (C3), 115,3 (C4); Anal. Calc. para (C₁₈H₁₃N₃O₅, 351,31 g): C, 61,54; H, 3,73; N, 11,96, Exp.: C, 61,54; H, 3,72; N, 12,18.

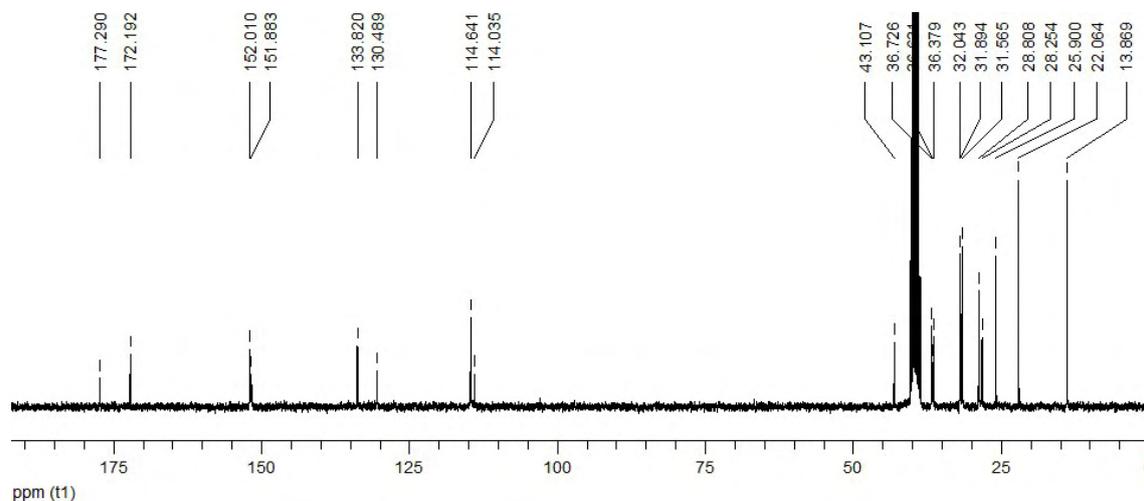
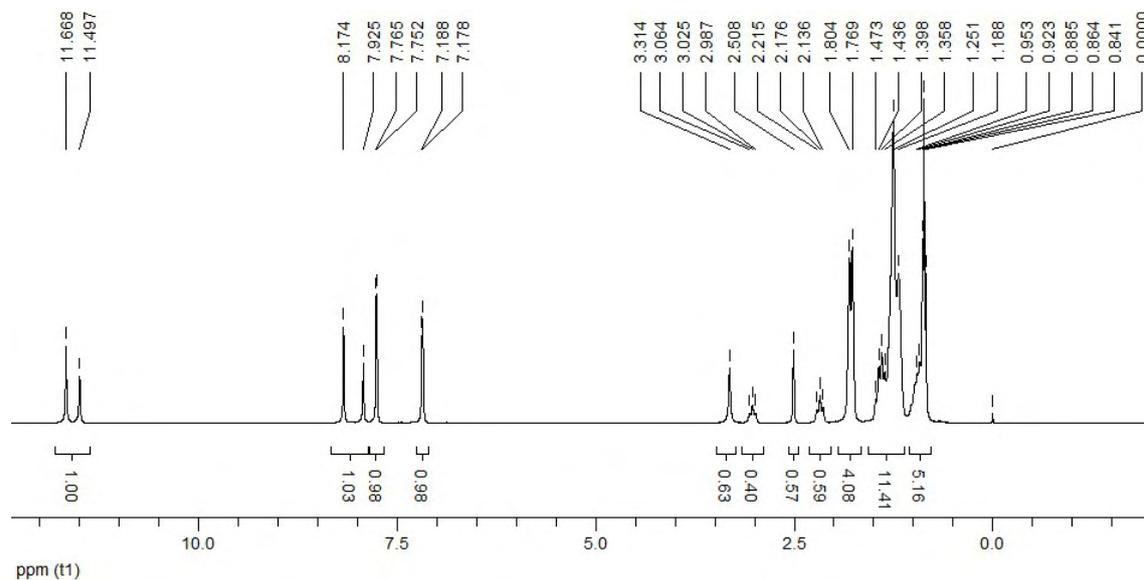
Espectro de correlação heteronuclear de deslocamentos químicos (HETCOR- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) do composto 36 (300 MHz / 75 MHz / $\text{DMSO-}d_6$ / 19 h de aquisição).



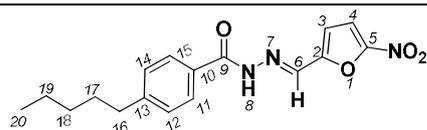
Linhas pontilhadas representam interações dos deslocamentos químicos.



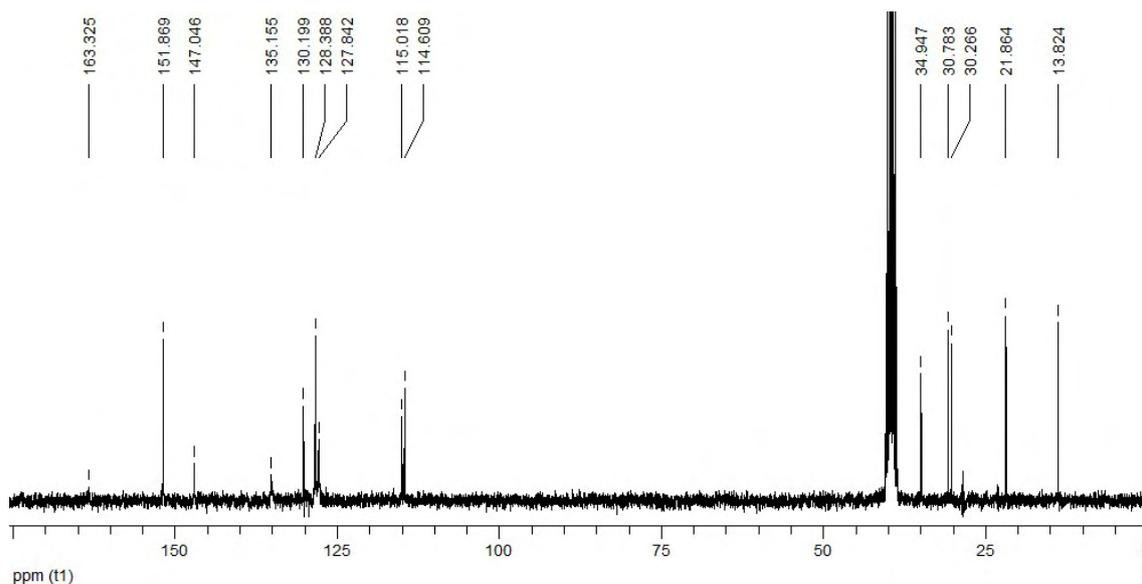
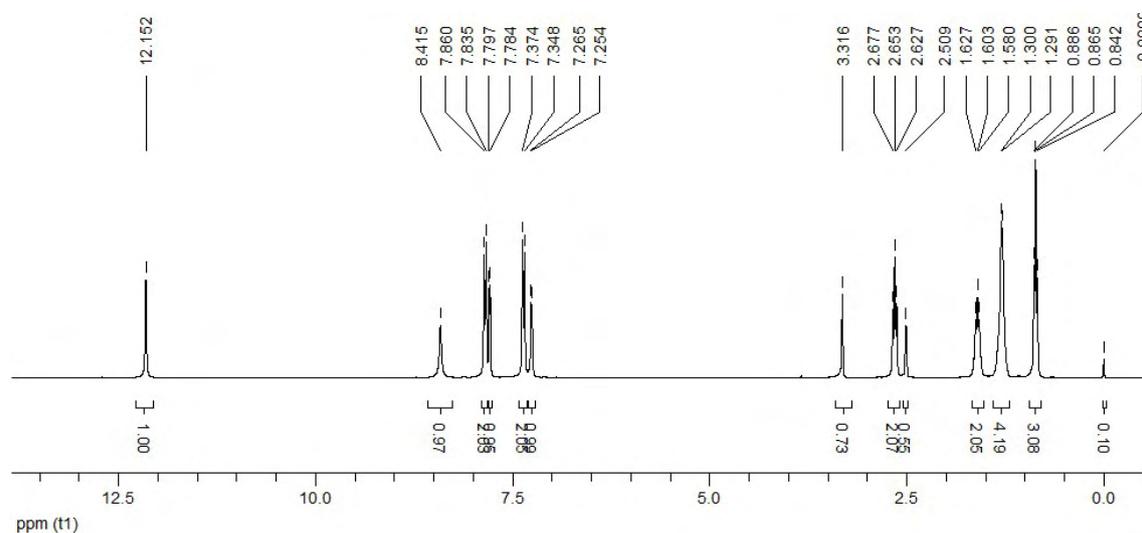
Composto 37
4-pentil-cicloexano-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida



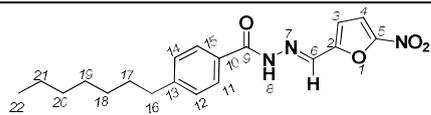
Sólido amarelo claro (η 91%); F.F. 169-170 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11,67/11,50 (s, 1H, H8), 8,17/7,93 (s, 1H, H6), 7,76 (d, 1H, $J=3,8$ Hz, H4), 7,18 (d, 1H, $J=3,2$ Hz, H3), 3,07/2,18 (t, 1H, $J=12,0$ Hz / t, $J=12,0$ Hz, H10), 1,79 (d, 4H, $J=10,5$ Hz, H11, H15), 1,47-1,19 (m, 11H, H3, H18, H19 – Hax. e H16, H17 Hax./eq.), 0,95-0,84 (m, 5H, H18, H19 (Heq.), H20 (CH₃)); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 177,3/172,2 (C9), 152,0 (C2), 151,9 (C5), 133,8/130,5 (C6), 114,6 (C4), 114,0 (C3), 43,1/36,4 (C10), 36,7 (C16), 36,6 (C13), 32,0 (C12), 31,9 (C14), 31,6 (C18), 28,8 (C11), 28,3 (C15), 25,9 (C17), 22,1 (C19), 13,9 (C20); Anal. Calc. para (C₁₇H₂₅N₃O₄, 335,40 g): C, 60,88; H, 7,51; N, 12,53. Exp.: C, 60,58; H, 7,20; N, 12,16.



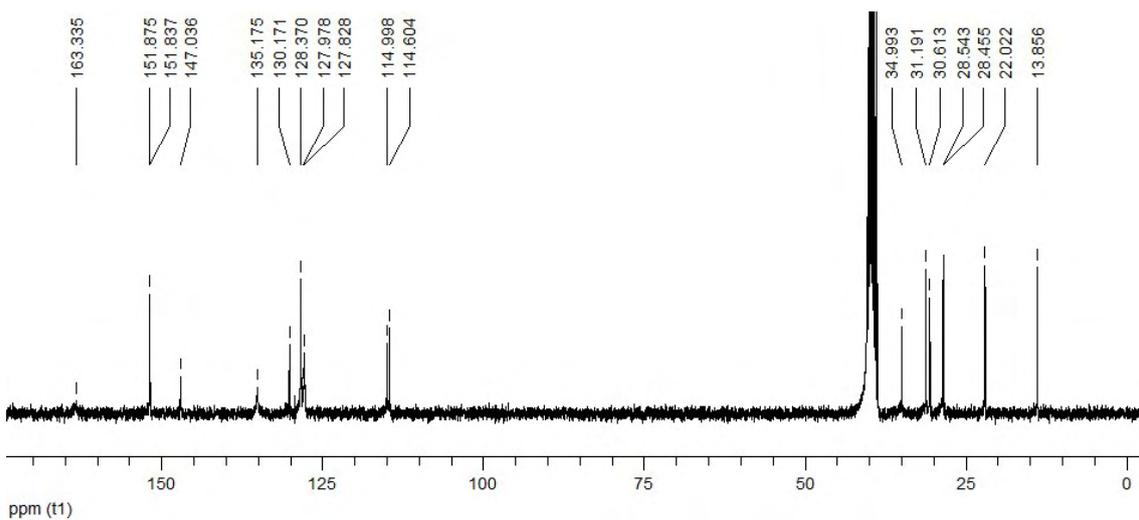
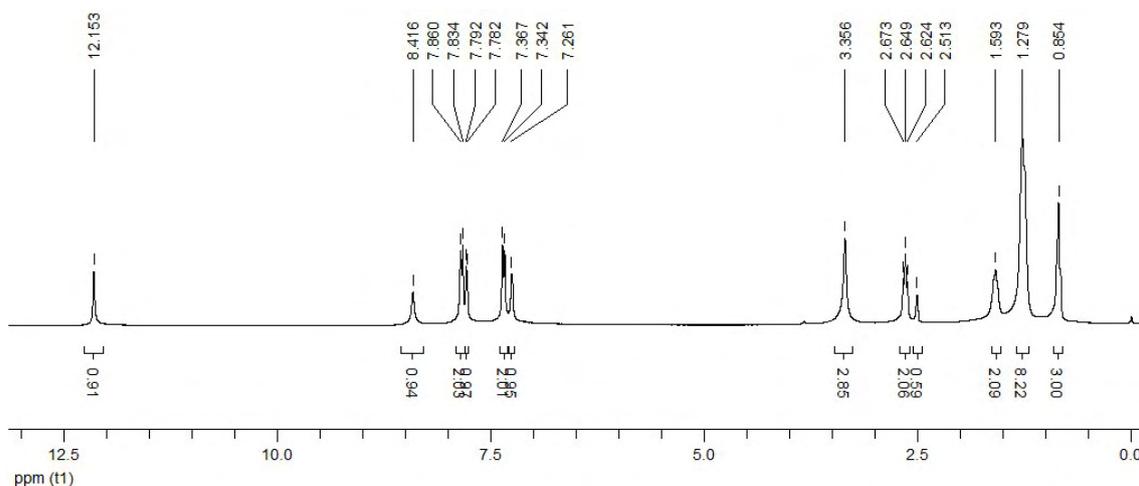
Composto 38
4-pentil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida



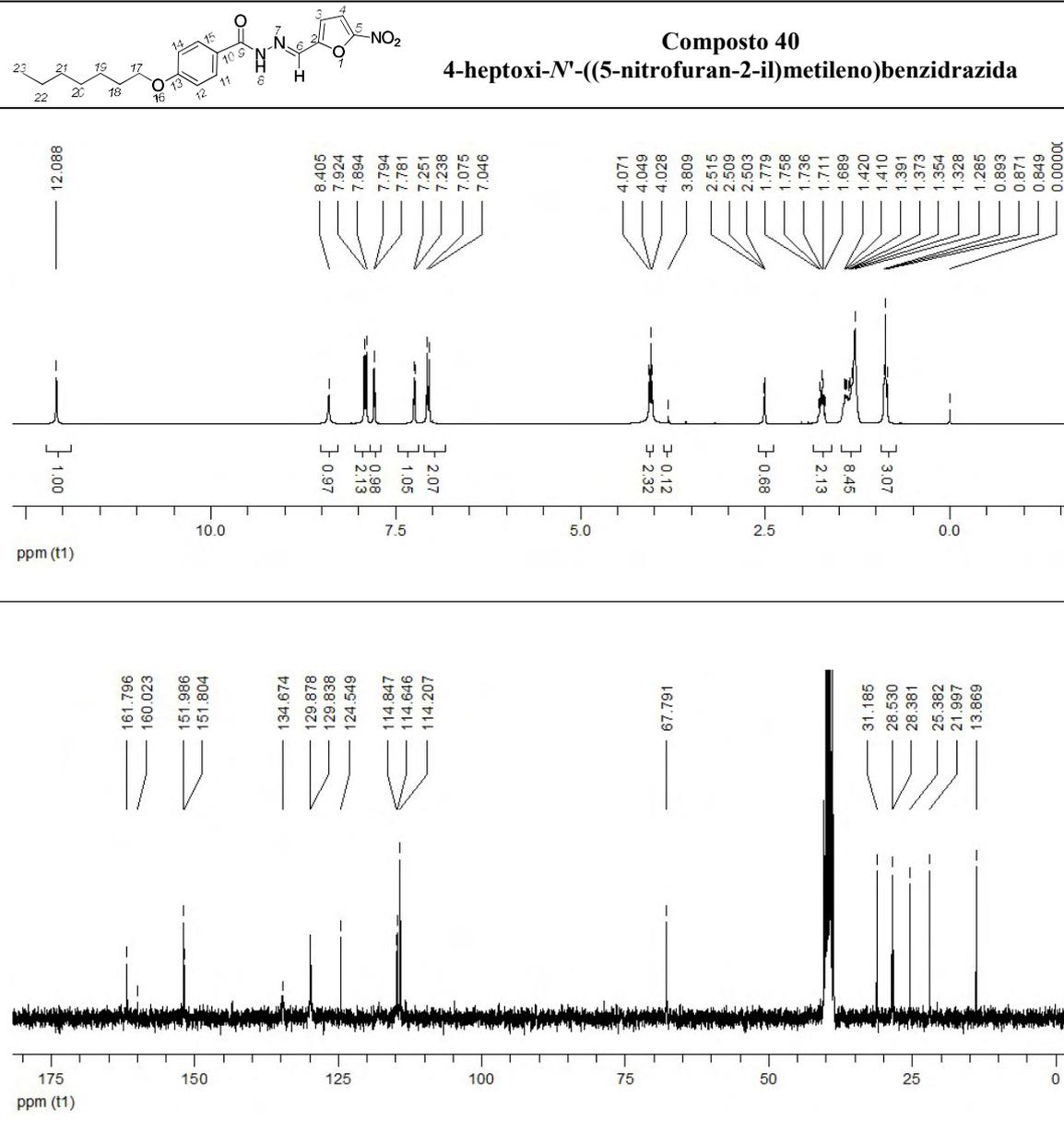
Sólido amarelo (η 88%); F.F. 200-201 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,15 (s, 1H, H8), 8,41 (s, 1H, H6), 7,84 (d, 2H, $J=7,7$ Hz, H11, H15), 7,79 (d, 1H, $J=3,0$ Hz, H4), 7,36 (d, 2H, $J=7,9$ Hz, H12, H14), 7,26 (d, 1H, $J=3,3$ Hz, H3), 2,65 (t, 2H, $J=7,5$ Hz, H16), 1,60 (t, 2H, $J=6,9$ Hz, H17), 1,30 (d, 4H, H18, H19), 0,86 (t, 3H, $J=6,6$ Hz, H20); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 163,3 (C9), 151,9 (C2, C5), 147,0 (C13), 135,1 (C6), 130,2 (C10), 128,4 (C11, C15), 127,8 (C12, C14), 115,0 (C4), 114,6 (C3), 34,9 (C16), 30,8 (C17), 30,3 (C18), 21,9 (C19), 13,8 (C20); Anal. Calc. para (C₁₇H₁₉N₃O₄, 329,35 g): C, 62,0; H, 5,81; N, 12,76. Exp.: C, 61,94; H, 5,73; N, 12,45.



Composto 39
4-heptil-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)benzidrazida



Sólido amarelo (η 92%); F.F. 178-179 °C. RMN ^1H (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12,15 (s,1H, H8), 8,42 (s,1H, H6), 7,85 (d, 2H, $J=7,6$ Hz, H11, H15), 7,79 (d, 1H, $J=3,0$ Hz, H4), 7,35 (d, 2H, $J=7,7$ Hz, H12, H14), 7,26 (s, 1H, H3), 2,65 (t, 2H, $J=7,2$ Hz, H16), 1,59 (s, 2H, H17), 1,28 (s, 8H, H18-H21), 0,86 (s, 3H, H22); RMN ^{13}C {H} (DMSO- *d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 163,3 (C9), 151,9 (C2), 151,8 (C5), 147,0 (C13), 135,2 (C6), 130,2 (C10), 128,4 (C11, C15), 127,9 (C12), 127,8 (C14), 115,0 (C4), 114,6 (C3), 35,0 (C16), 31,2 (C20), 30,6 (C17), 28,5 (C18), 28,4 (C19), 22,0 (C21), 13,8 (C20); Anal. Calc. para (C₁₉H₂₃N₃O₄, 357,470 g): C, 63,85; H, 6,49; N, 11,76. Exp.: C, 63,58; H, 6,39; N, 11,38.

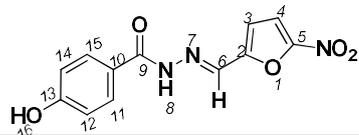


Sólido amarelo (η 88%); F.F. 172-173 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12,09 (s, 1H, H8), 8,41 (s, 1H, H6), 7,91 (d, 2H, *J*=8,8 Hz, H11, H15), 7,79 (d, 1H, *J*=3,9 Hz, H4), 7,24 (d, 1H, *J*=3,9 Hz, H3), 7,06 (d, 2H, *J*=8,8 Hz, H12, H14), 4,05 (t, 2H, *J*=6,3 Hz, H17), 1,78-1,71 (m, 2H, H18), 1,42-1,28 (m, 8H, H19-H22), 0,87 (s, 3H, *J*=6,9 Hz, H23); RMN ¹³C {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 161,8 (C9), 160,0 (C13), 152,0 (C2), 151,8 (C5), 134,7 (C6), 129,9 (C11), 129,8 (C15), 124,5 (C10), 114,8 (C4), 114,6 (C3), 114,2 (C12, C14), 67,8 (C17), 31,2 (C21), 28,5 (C18), 28,4 (C20), 25,4 (C19), 22,0 (C22), 13,9 (C23); Anal. Calc. para (C₁₉H₂₃N₃O₅, 373,40 g): C, 61,11; H, 6,21; N, 11,25. Exp.: C, 60,99; H, 5,96; N, 10,87.

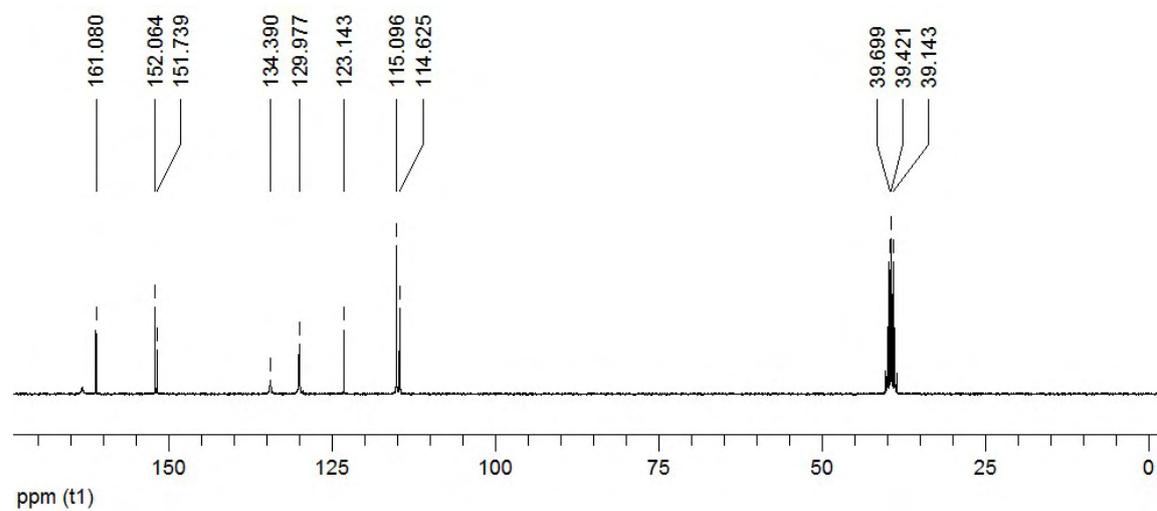
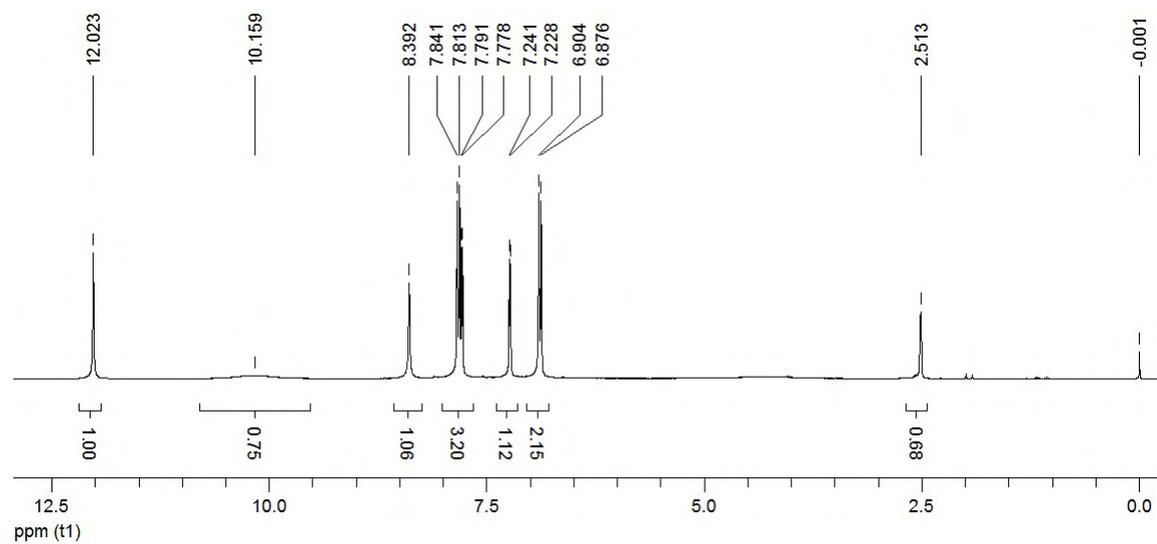
Anexo 2

Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C do composto-protótipo nifuroxazida

Parâmetros: RMN ^1H **300 MHz** / RMN ^{13}C **75 MHz** /
solvente **DMSO d_6** / padrão interno: **TMS**



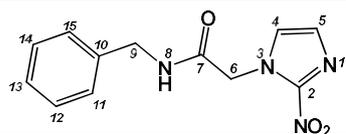
nifuroxazida



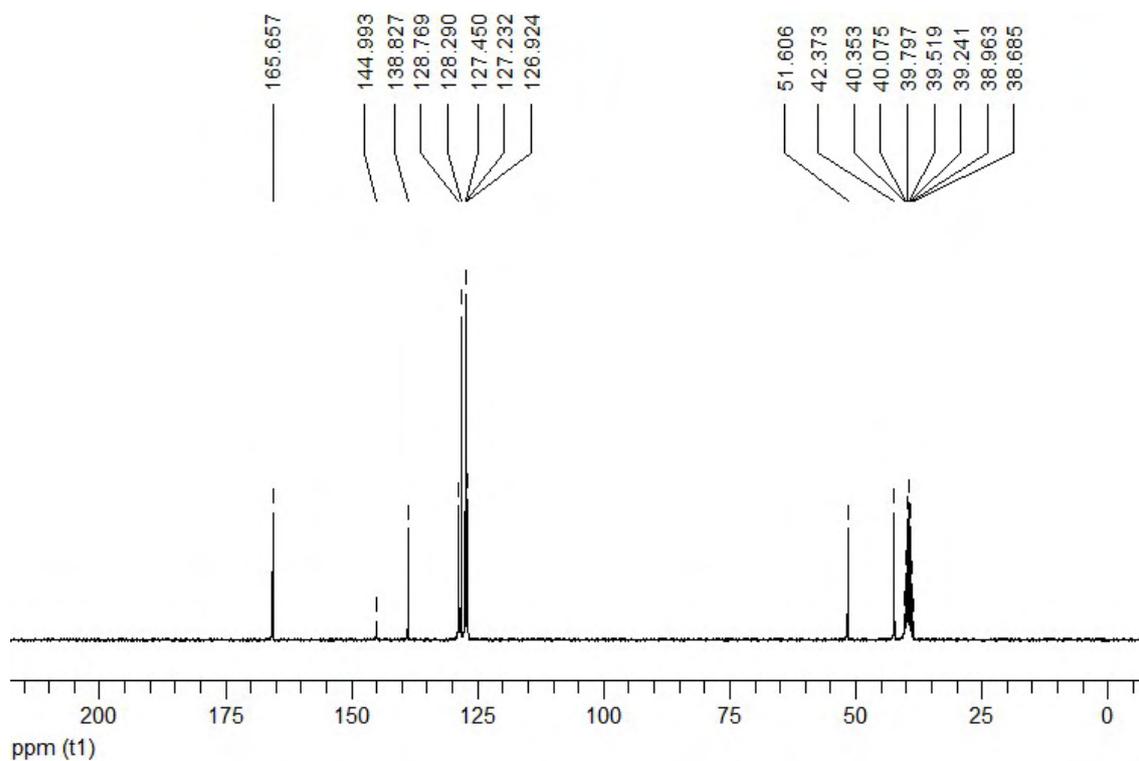
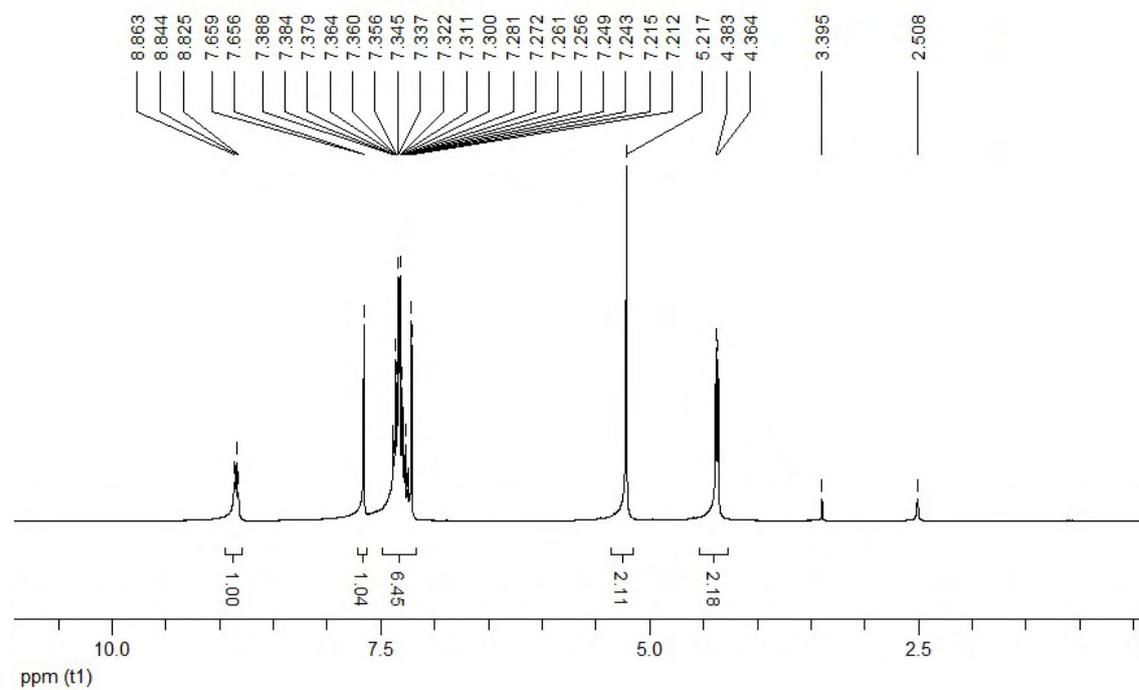
Anexo 3

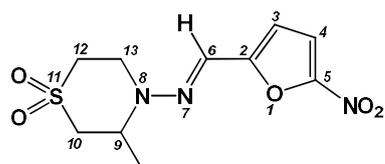
Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos fármacos benznidazol e nifurtimox

Parâmetros: RMN ^1H **300 MHz** / RMN ^{13}C **75 MHz** /
solvente **DMSO d_6** / padrão interno: **TMS**

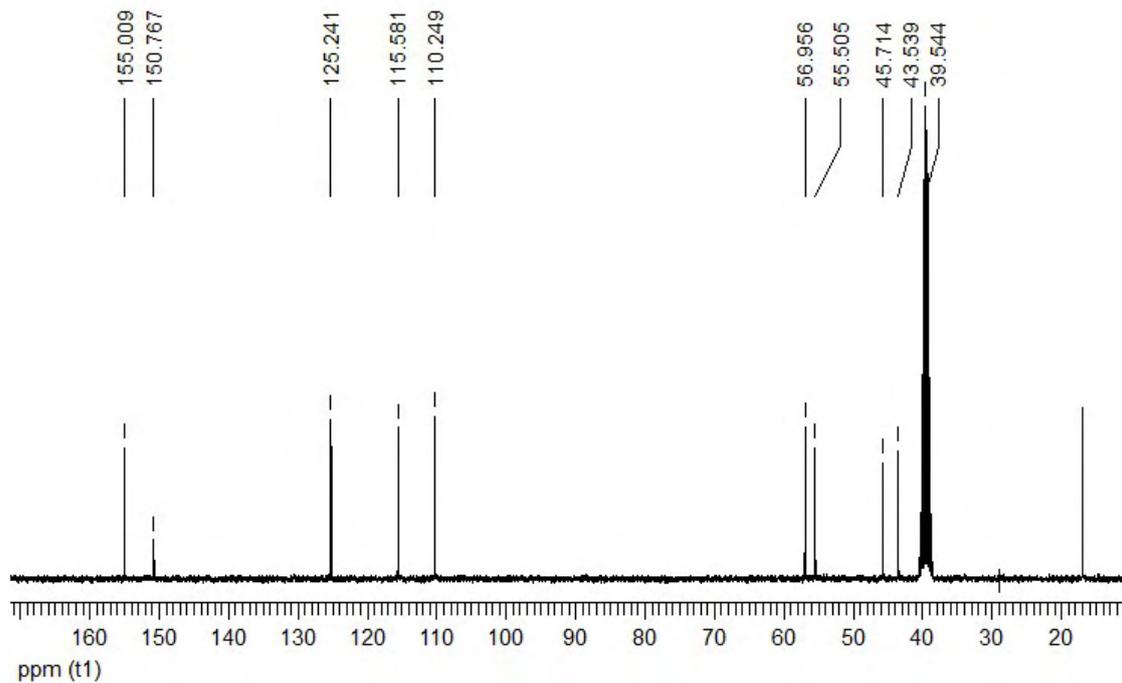
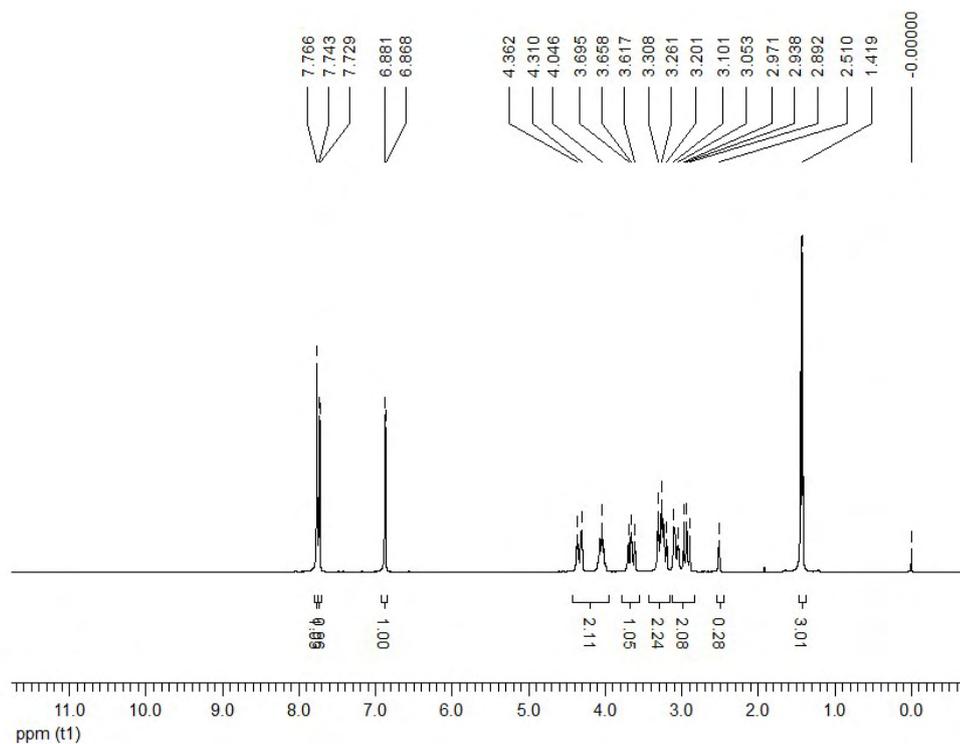


benznidazol





nifurtimox

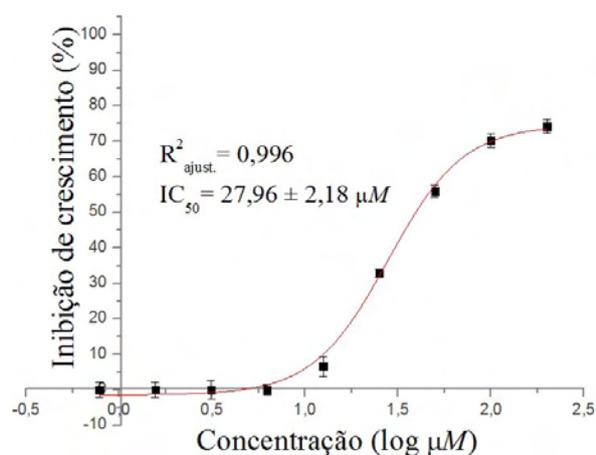


Anexo 4

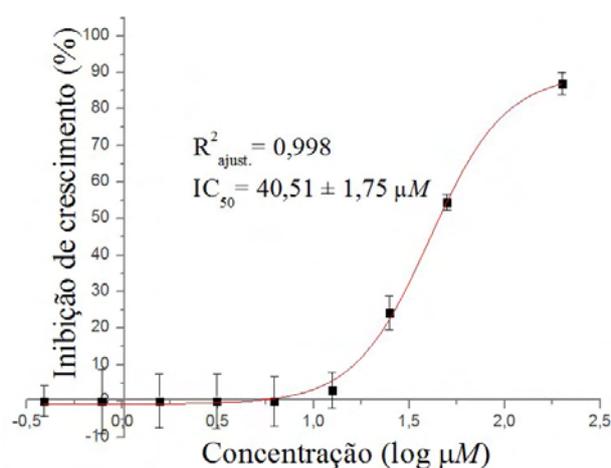
**Curvas dose-resposta da inibição de crescimento parasitário
para as cepas Silvio X10 cl1, Y, Bug 2149 cl10 e Colombiana**

Curvas dose-resposta realizadas para cepa Silvio X10 c11	p. 270
Curvas dose-resposta realizadas para cepa Y	p. 285
Curvas dose-resposta realizadas para cepa Bug 2149 c110	p. 300
Curvas dose-resposta realizadas para cepa Colombiana	p. 315

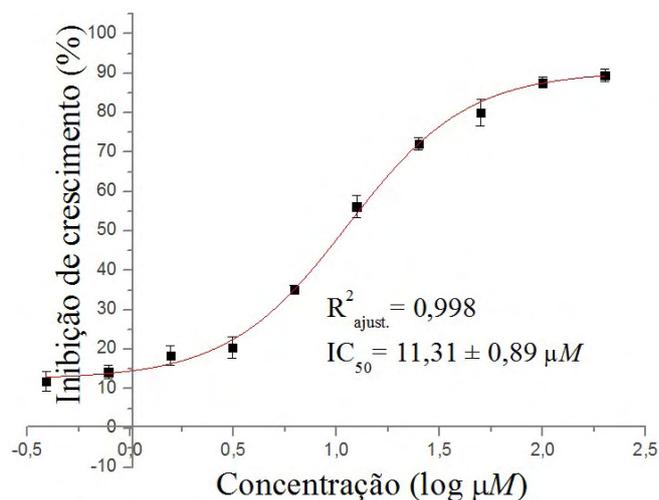
composto 1 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	74,26 \pm 1,87
100,00	2,000	70,26 \pm 1,99
50,00	1,699	55,95 \pm 1,68
25,00	1,398	32,90 \pm 1,10
12,50	1,097	6,66 \pm 2,80
6,25	0,796	0,00 \pm 1,53
3,12	0,495	0,00 \pm 2,63
1,56	0,194	0,00 \pm 2,15
0,78	-0,107	0,00 \pm 2,15



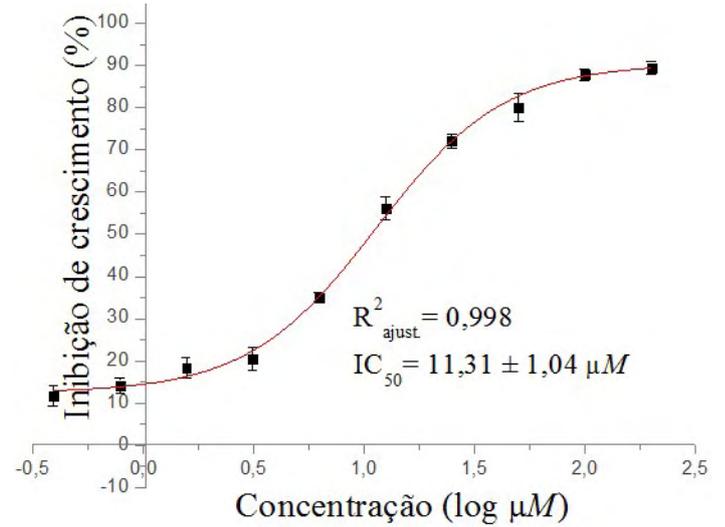
composto 2 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	86,93 \pm 3,14
50,00	1,699	54,47 \pm 2,09
25,00	1,398	24,18 \pm 4,61
12,50	1,097	2,99 \pm 4,80
6,25	0,796	0,00 \pm 6,75
3,12	0,495	0,00 \pm 7,52
1,56	0,194	0,00 \pm 7,31
0,78	-0,107	0,00 \pm 8,75
0,39	-0,408	0,00 \pm 4,17



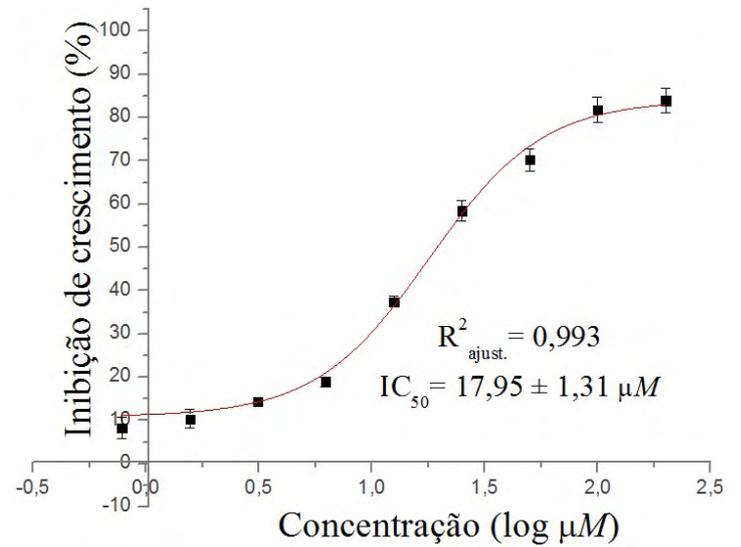
composto 3 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	79,20 \pm 4,64
100,00	2,000	78,05 \pm 6,01
50,00	1,699	72,96 \pm 3,68
25,00	1,398	63,39 \pm 4,18
12,50	1,097	51,00 \pm 3,55
6,25	0,796	20,39 \pm 1,12
3,12	0,495	6,55 \pm 1,80
1,56	0,194	3,72 \pm 2,06
0,78	-0,107	2,83 \pm 2,29



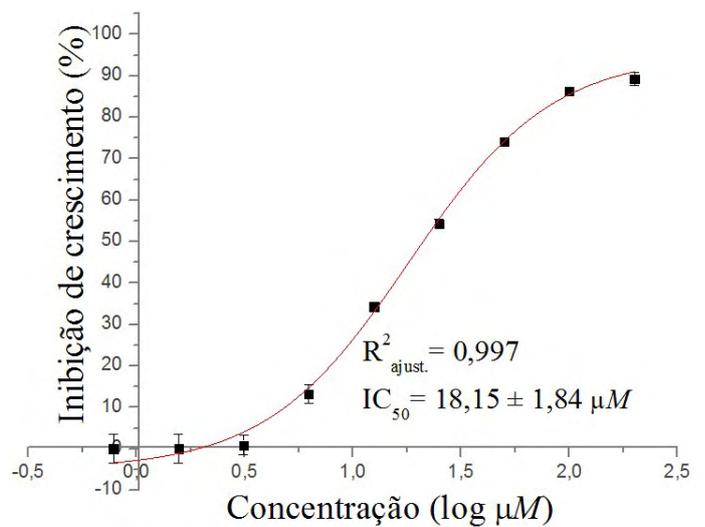
composto 4 - Silvio X10 cl1			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
200,00	2,301	89,50	$\pm 1,55$
100,00	2,000	87,77	$\pm 1,36$
50,00	1,699	79,94	$\pm 3,36$
25,00	1,398	72,06	$\pm 1,59$
12,50	1,097	56,21	$\pm 2,77$
6,25	0,796	35,10	$\pm 1,15$
3,12	0,495	20,42	$\pm 2,67$
1,56	0,194	18,36	$\pm 2,45$
0,78	-0,107	14,24	$\pm 1,77$



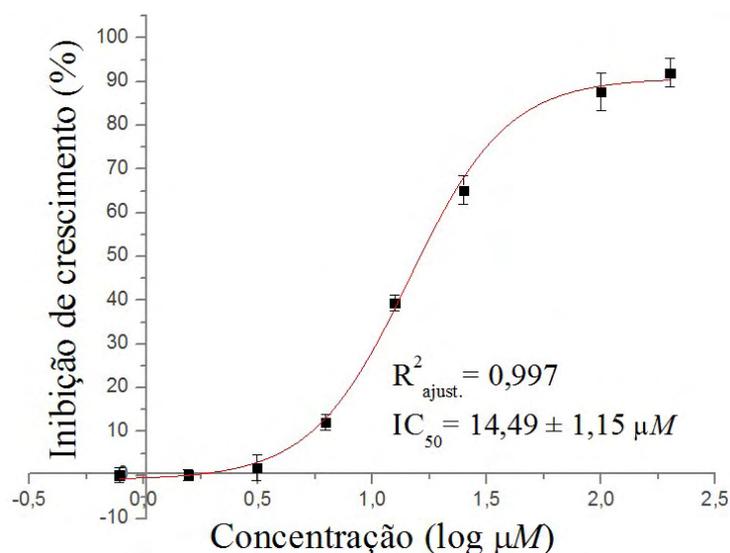
composto 5 - Silvio X10 cl1			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
200,00	2,301	83,97	$\pm 2,91$
100,00	2,000	81,84	$\pm 2,92$
50,00	1,699	70,26	$\pm 0,55$
25,00	1,398	58,47	$\pm 0,27$
12,50	1,097	37,42	$\pm 1,22$
6,25	0,796	18,88	$\pm 1,09$
3,12	0,495	14,44	$\pm 0,27$
1,56	0,194	10,38	$\pm 2,19$
0,78	-0,107	8,26	$\pm 2,46$



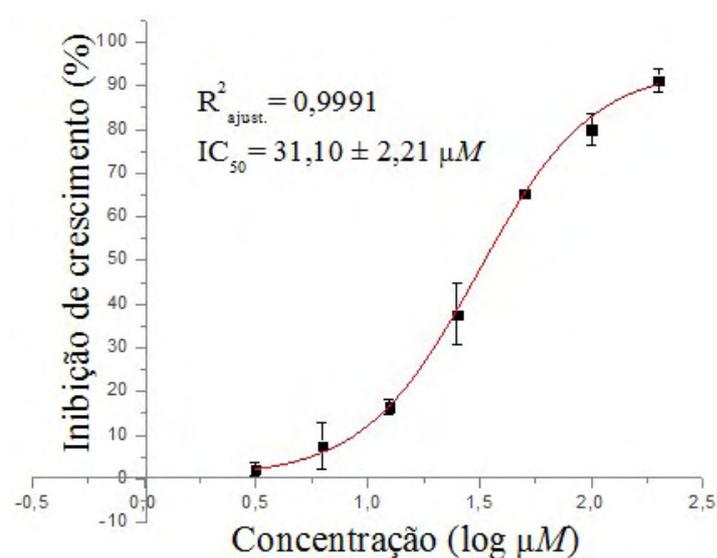
composto 6 - Silvio X10 cl1			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
200,00	2,301	89,23	$\pm 1,50$
100,00	2,000	86,33	$\pm 0,75$
50,00	1,699	74,14	$\pm 0,57$
25,00	1,398	54,38	$\pm 1,03$
12,50	1,097	34,28	$\pm 0,99$
6,25	0,796	13,26	$\pm 2,27$
3,13	0,495	0,87	$\pm 2,34$
1,56	0,194	0,00	$\pm 3,46$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 3,51$



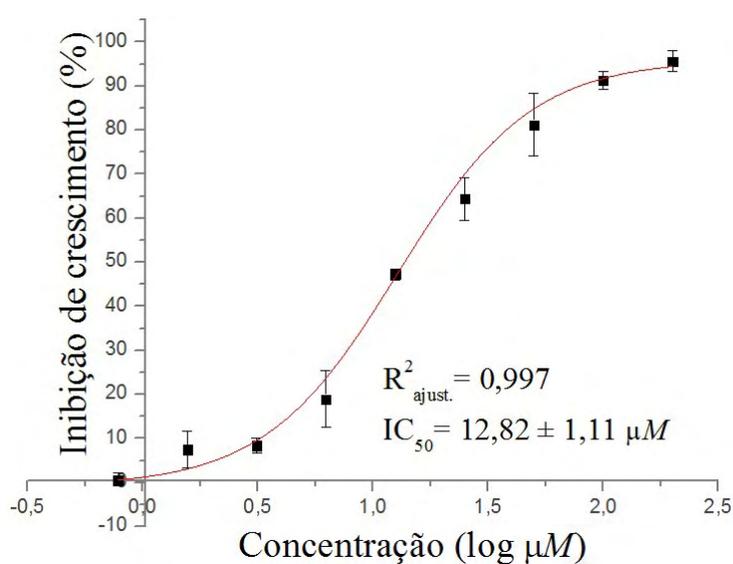
composto 7 - Silvio X10 c11		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	92,01 \pm 3,26
100,00	2,000	87,76 \pm 4,33
25,00	1,398	65,18 \pm 3,26
12,50	1,097	39,42 \pm 1,83
6,25	0,796	12,07 \pm 1,81
3,12	0,495	1,73 \pm 2,86
1,56	0,194	0,00 \pm 1,26
0,78	-0,107	0,00 \pm 1,68



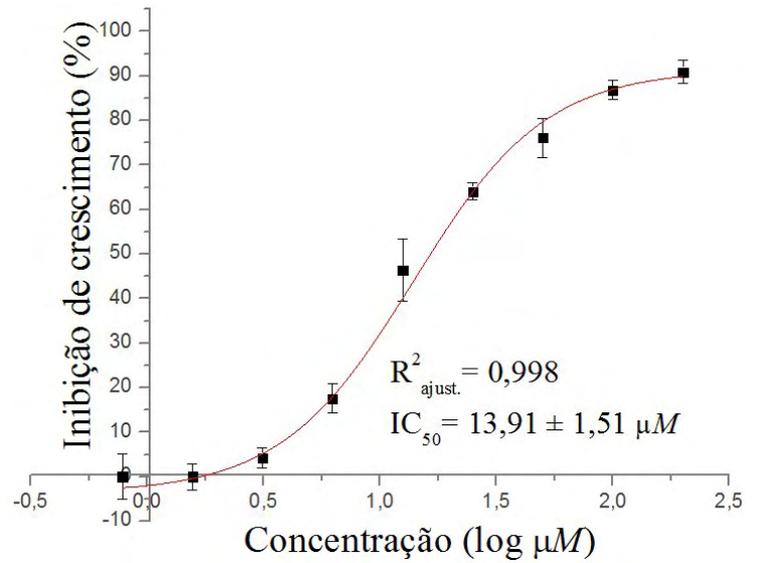
composto 8 - Silvio X10 c11		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	91,30 \pm 2,70
100,00	2,000	80,00 \pm 3,67
50,00	1,699	65,43 \pm 0,84
25,00	1,398	37,66 \pm 7,02
12,50	1,097	16,51 \pm 1,77
6,25	0,796	7,59 \pm 5,24
3,12	0,495	2,16 \pm 1,56



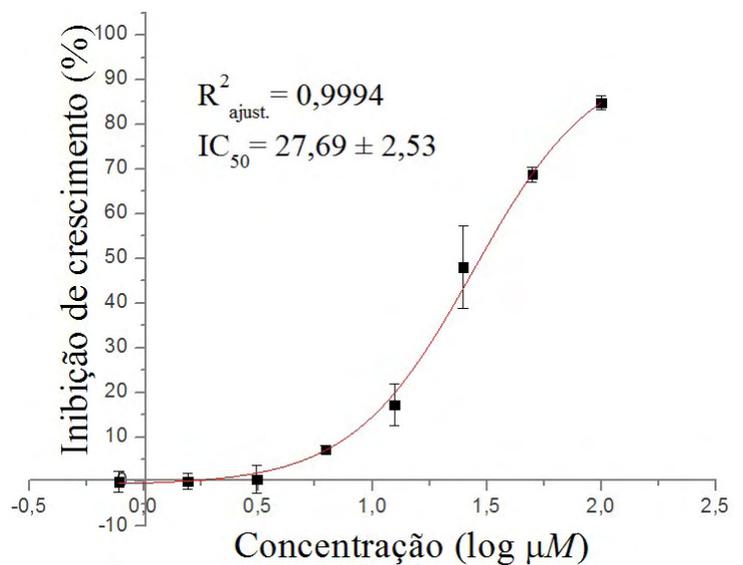
composto 9 - Silvio X10 c11		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	95,63 \pm 2,35
100,00	2,000	91,23 \pm 2,03
50,00	1,699	81,21 \pm 7,12
25,00	1,398	64,38 \pm 4,89
12,50	1,097	47,20 \pm 1,17
6,25	0,796	18,93 \pm 6,48
3,12	0,495	8,37 \pm 1,76
1,56	0,194	7,47 \pm 4,24
0,78	-0,107	0,67 \pm 1,42



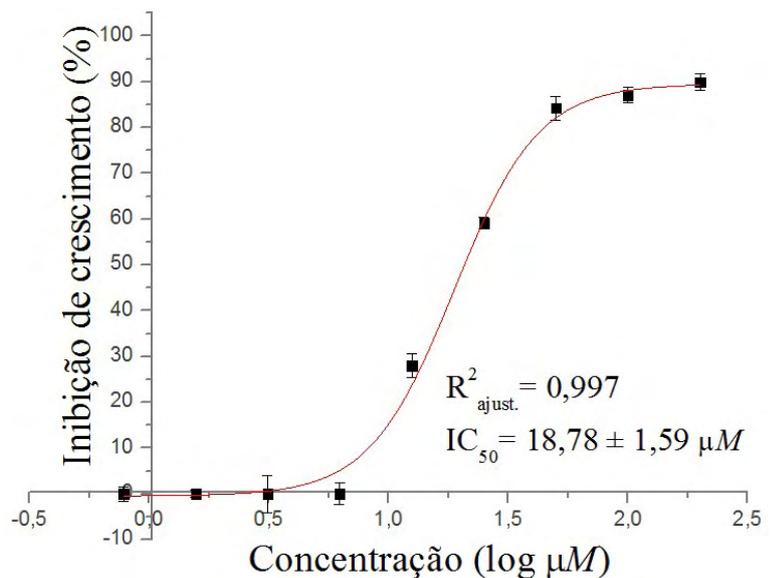
composto 10 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	90,91 \pm 2,57
100,00	2,000	86,83 \pm 2,13
50,00	1,699	76,10 \pm 4,46
25,00	1,398	64,07 \pm 1,85
12,50	1,097	46,34 \pm 6,98
6,25	0,796	17,56 \pm 3,29
3,12	0,495	4,23 \pm 2,20
1,56	0,194	0,00 \pm 2,97
0,78	-0,107	0,00 \pm 5,01



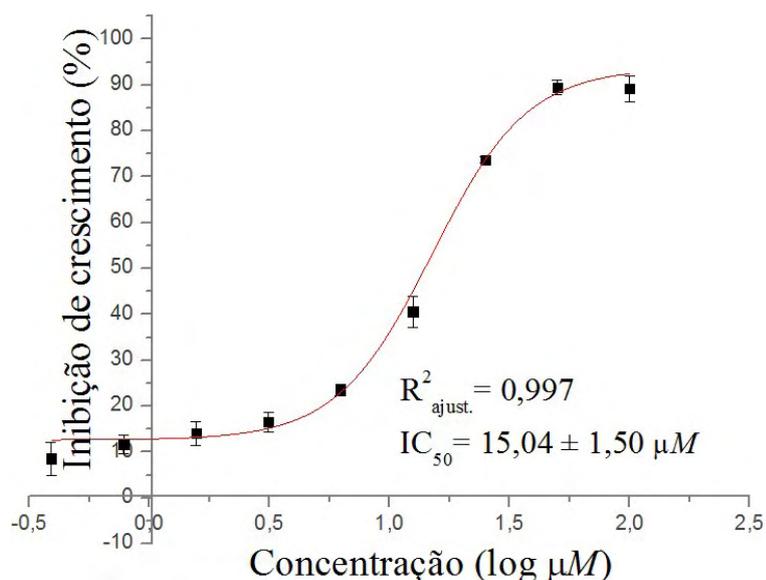
composto 11 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	89,32 \pm 2,03
100,00	2,000	84,87 \pm 1,50
50,00	1,699	68,81 \pm 1,64
25,00	1,398	48,07 \pm 9,29
12,50	1,097	17,19 \pm 4,69
6,25	0,796	7,21 \pm 0,97
3,12	0,495	0,51 \pm 3,12
1,56	0,194	0,04 \pm 1,77
0,78	-0,107	0,00 \pm 2,40



composto 12 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	89,99 \pm 1,86
100,00	2,000	87,13 \pm 1,68
50,00	1,699	84,26 \pm 2,60
25,00	1,398	59,12 \pm 1,30
12,50	1,097	27,98 \pm 2,61
6,25	0,796	0,00 \pm 2,31
3,12	0,495	0,00 \pm 4,05
1,56	0,194	0,00 \pm 0,80
0,78	-0,107	0,00 \pm 1,59



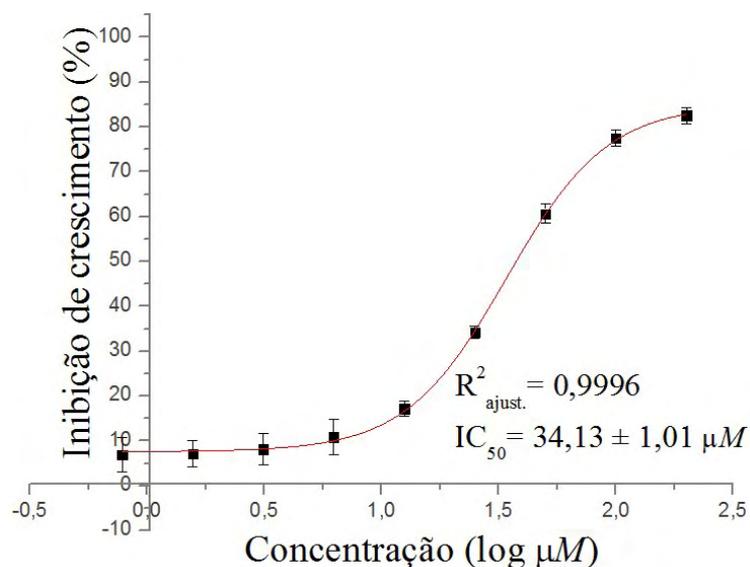
composto 13 - Silvio X10 cl1			
concentração		IC (%)	
μM	log μM	(média \pm dp)	
100,00	2,000	89,18	$\pm 2,83$
50,00	1,699	89,44	$\pm 1,60$
25,00	1,398	73,74	$\pm 0,60$
12,50	1,097	40,62	$\pm 3,41$
6,25	0,796	23,47	$\pm 1,21$
3,12	0,495	16,61	$\pm 2,14$
1,56	0,194	14,10	$\pm 2,58$
0,78	-0,107	11,73	$\pm 2,05$
0,39	-0,408	8,56	$\pm 3,58$



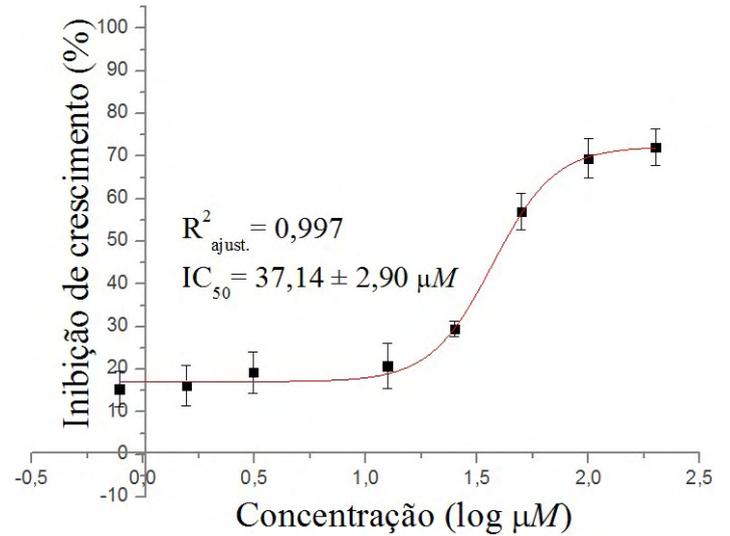
composto 14 - Silvio X10 cl1			
concentração		IC (%)	
μM	log μM	(média \pm dp)	
100,00	2,000	32,95	$\pm 0,34$
50,00	1,699	31,03	$\pm 0,35$
25,00	1,398	22,19	$\pm 0,39$
12,50	1,097	19,69	$\pm 0,40$
6,25	0,796	9,13	$\pm 0,46$
3,13	0,495	4,51	$\pm 0,48$
1,56	0,194	2,21	$\pm 0,49$
0,78	-0,107	7,59	$\pm 0,46$

Valor de IC_{50} não determinado

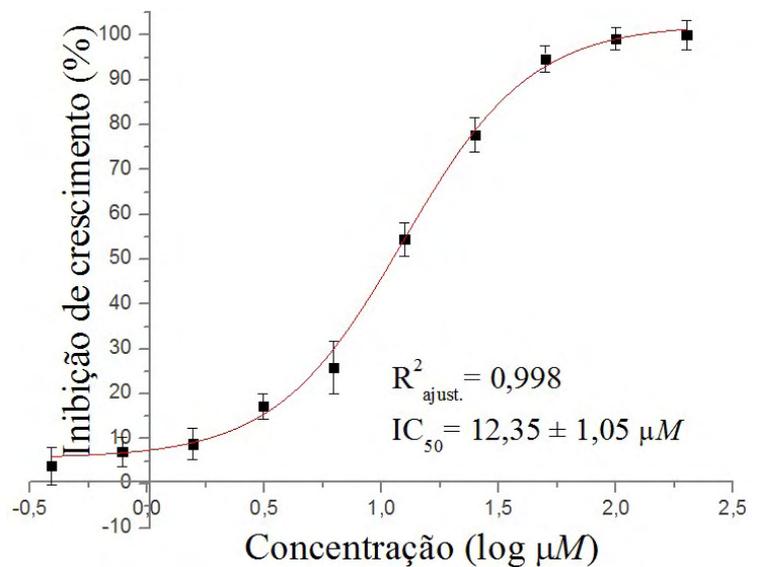
composto 15 - Silvio X10 cl1			
concentração		IC (%)	
μM	log μM	(média \pm dp)	
200,00	2,301	82,56	$\pm 1,78$
100,00	2,000	77,54	$\pm 1,89$
50,00	1,699	60,65	$\pm 2,16$
25,00	1,398	34,23	$\pm 1,43$
12,50	1,097	17,16	$\pm 1,73$
6,25	0,796	10,87	$\pm 4,05$
3,12	0,495	8,18	$\pm 3,59$
1,56	0,194	7,10	$\pm 2,97$
0,78	-0,107	6,92	$\pm 3,79$



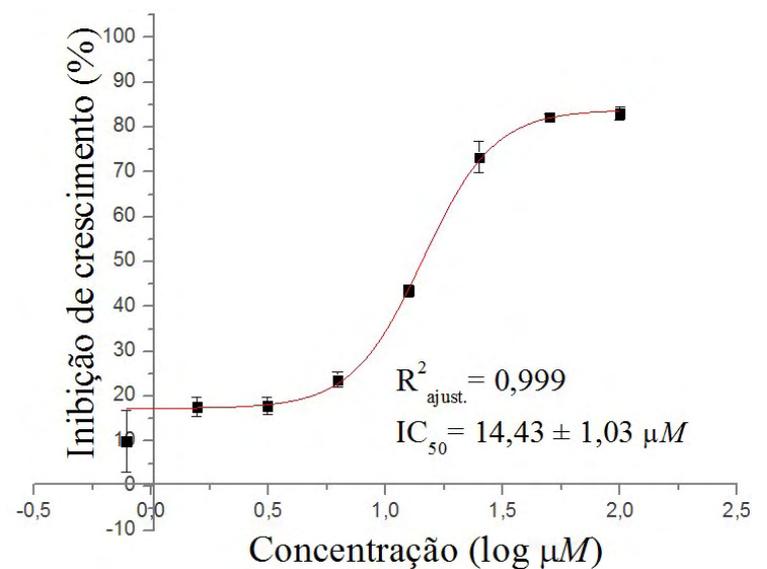
composto 16 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	72,15 \pm 4,24
100,00	2,000	69,46 \pm 4,62
50,00	1,699	56,96 \pm 4,30
25,00	1,398	29,49 \pm 1,71
12,50	1,097	20,80 \pm 5,21
3,12	0,495	19,24 \pm 4,84
1,56	0,194	16,20 \pm 4,73
0,78	-0,107	15,40 \pm 4,23



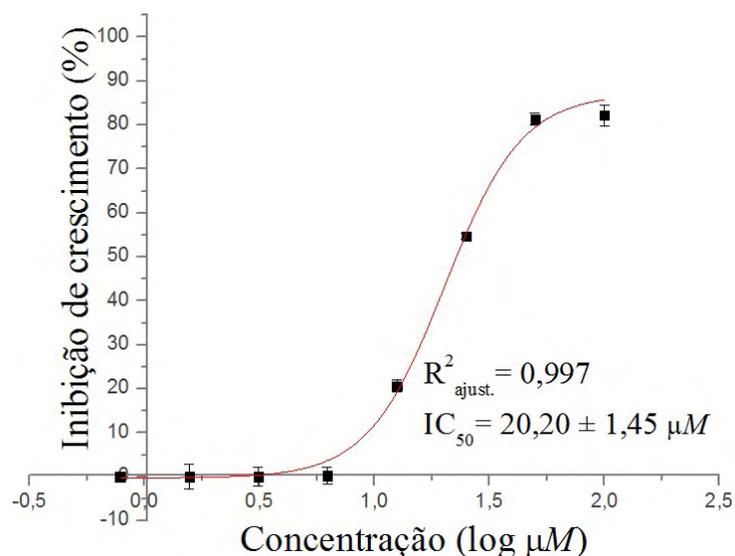
composto 17 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	100,00 \pm 3,22
100,00	2,000	99,21 \pm 2,48
50,00	1,699	94,72 \pm 2,92
25,00	1,398	77,70 \pm 3,80
12,50	1,097	54,48 \pm 3,78
6,25	0,796	25,85 \pm 5,95
3,12	0,495	17,27 \pm 2,81
1,56	0,194	8,82 \pm 3,41
0,78	-0,107	7,11 \pm 3,27
0,39	-0,408	3,94 \pm 4,16



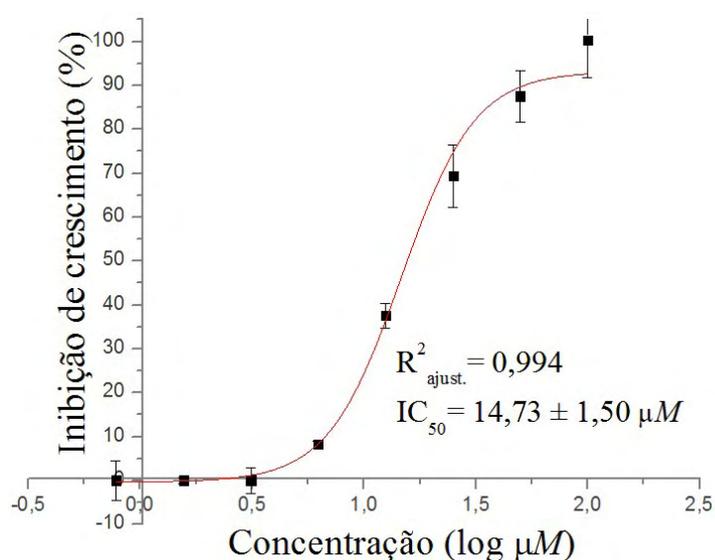
composto 18 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	83,07 \pm 1,47
50,00	1,699	82,22 \pm 0,73
25,00	1,398	73,32 \pm 3,46
12,50	1,097	43,56 \pm 1,36
6,25	0,796	23,67 \pm 1,71
3,12	0,495	17,88 \pm 1,85
1,56	0,194	17,60 \pm 2,17
0,78	-0,107	9,98 \pm 6,92



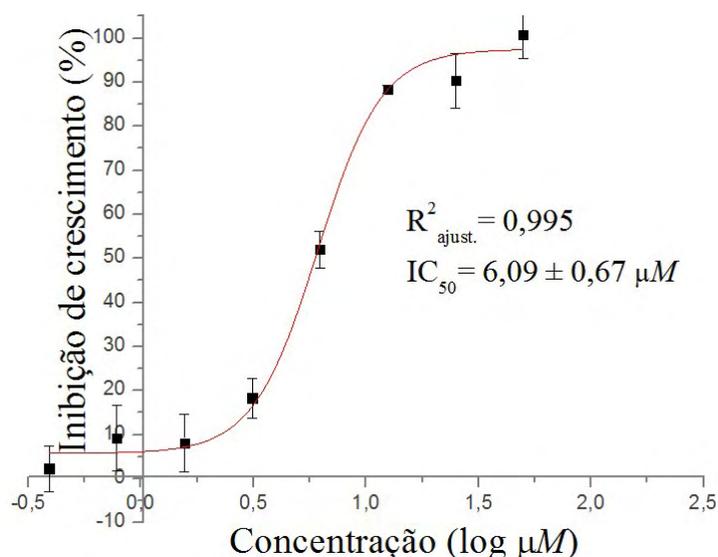
composto 19 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	82,21 \pm 2,32
50,00	1,699	81,38 \pm 1,30
25,00	1,398	54,77 \pm 0,75
12,50	1,097	20,64 \pm 1,30
6,25	0,796	0,22 \pm 1,98
3,12	0,495	0,00 \pm 2,14
1,56	0,194	0,00 \pm 2,83
0,78	-0,107	0,00 \pm 0,75



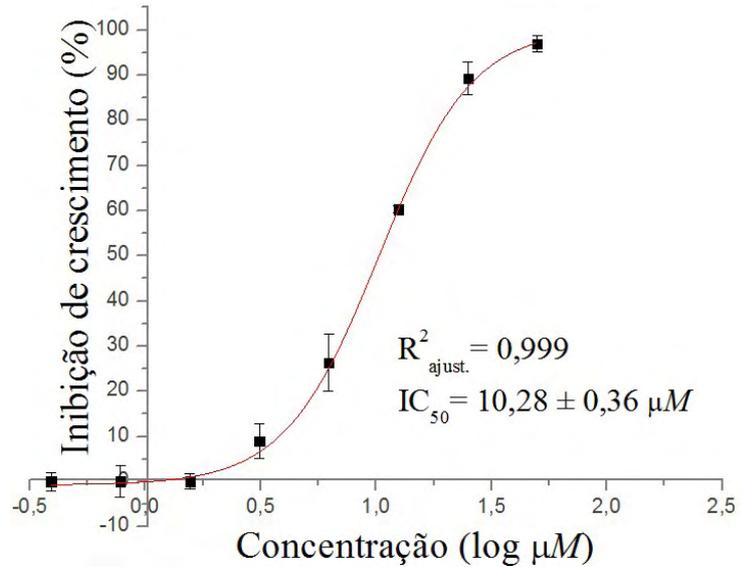
composto 20 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	100,33 \pm 8,59
50,00	1,699	87,56 \pm 5,86
25,00	1,398	69,43 \pm 7,11
12,50	1,097	37,56 \pm 2,76
6,25	0,796	8,29 \pm 0,69
3,12	0,495	0,00 \pm 2,93
1,56	0,194	0,00 \pm 0,69
0,78	-0,107	0,00 \pm 4,48



composto 21 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
50,00	1,699	100,83 \pm 8,40
25,00	1,398	90,34 \pm 6,17
12,50	1,097	88,41 \pm 0,83
6,25	0,796	51,97 \pm 4,14
3,12	0,495	18,29 \pm 4,56
1,56	0,194	8,07 \pm 6,63
0,78	-0,107	9,18 \pm 7,51
0,39	-0,408	2,28 \pm 5,17



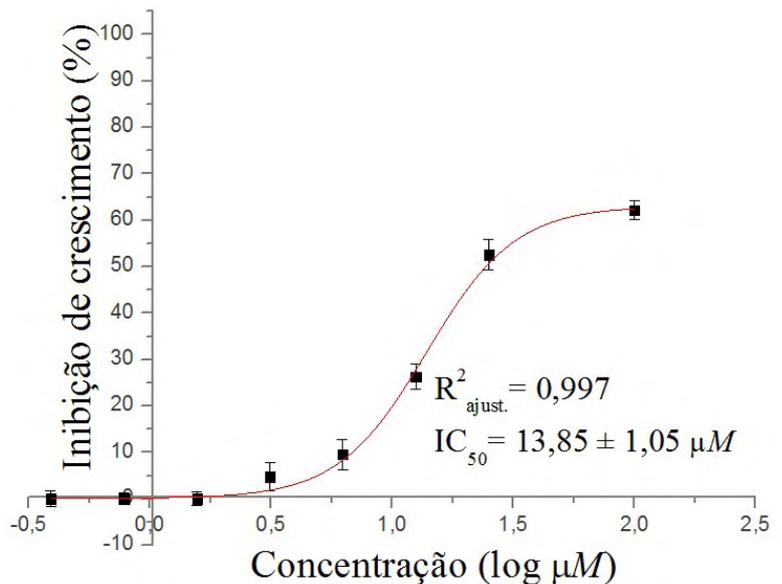
composto 22 - Silvio X10 c11			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
50,00	1,699	96,96	$\pm 1,72$
25,00	1,398	89,23	$\pm 3,61$
12,50	1,097	60,25	$\pm 0,83$
6,25	0,796	26,29	$\pm 6,25$
3,12	0,495	8,90	$\pm 3,80$
1,56	0,194	0,00	$\pm 1,72$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 3,45$
0,39	-0,408	0,00	$\pm 2,08$



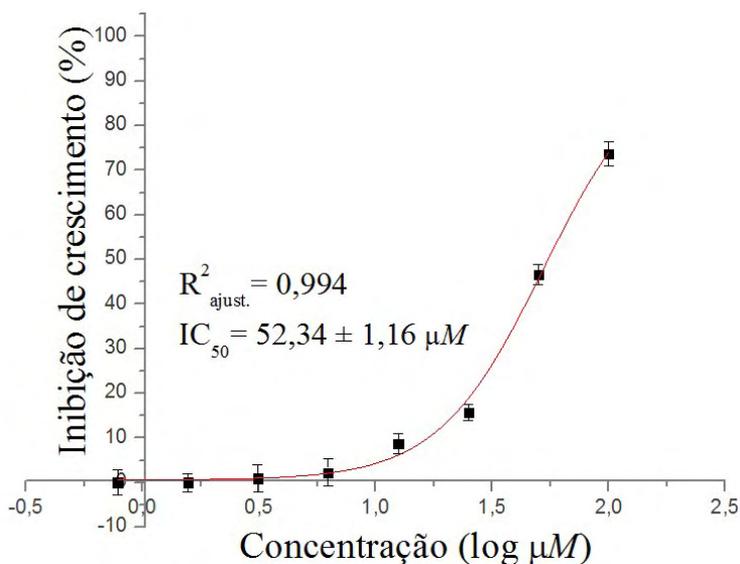
composto 23 - Silvio X10 c11			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
100,00	2,000	53,36	$\pm 5,27$
50,00	1,699	48,02	$\pm 3,43$
25,00	1,398	35,91	$\pm 6,44$
12,50	1,097	36,45	$\pm 3,20$
6,25	0,796	19,54	$\pm 2,47$
3,13	0,495	20,96	$\pm 3,26$
1,56	0,194	17,76	$\pm 6,50$
0,78	-0,107	12,77	$\pm 4,04$

IC_{50} obtido experimentalmente (próximo à $100 \mu\text{M}$)

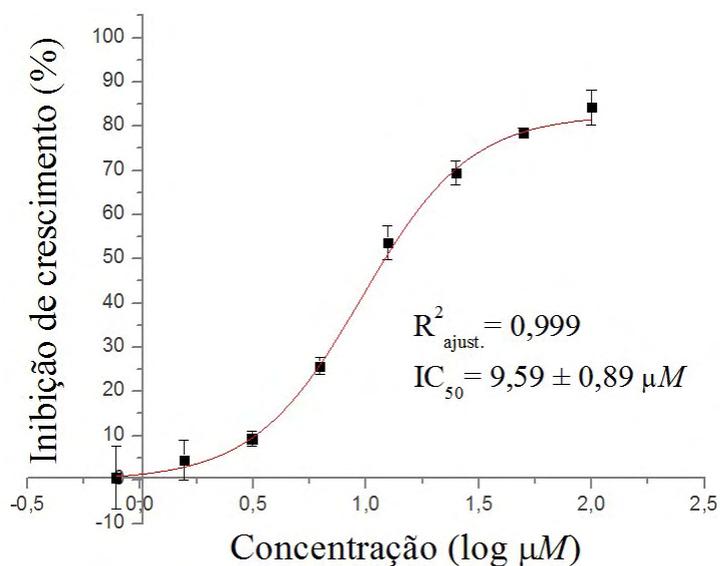
composto 24 - Silvio X10 c11			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
100,00	2,000	62,19	$\pm 1,98$
25,00	1,398	52,59	$\pm 3,20$
12,50	1,097	26,35	$\pm 2,64$
6,25	0,796	9,56	$\pm 3,21$
3,12	0,495	4,76	$\pm 2,99$
1,56	0,194	0,00	$\pm 1,42$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 1,22$
0,39	-0,408	0,00	$\pm 1,71$



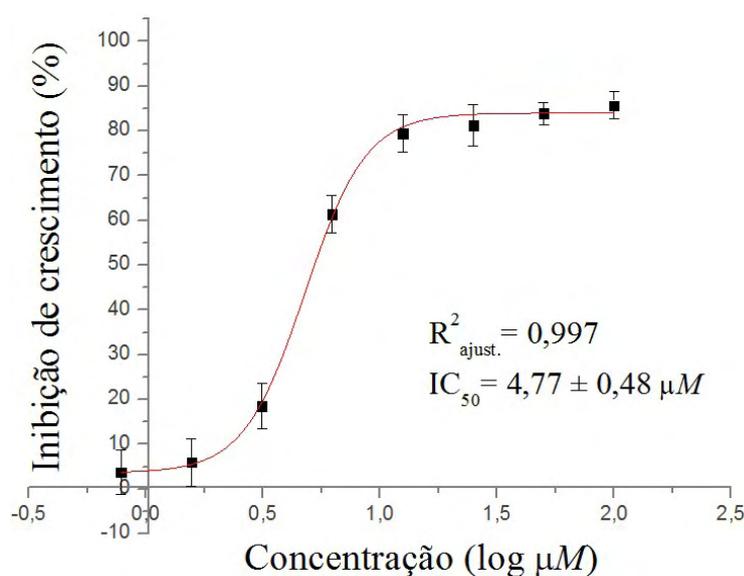
composto 25 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	73,76 \pm 2,65
50,00	1,699	46,61 \pm 2,24
25,00	1,398	15,73 \pm 1,80
12,50	1,097	8,71 \pm 2,24
6,25	0,796	2,24 \pm 3,05
3,12	0,495	0,90 \pm 3,09
1,56	0,194	0,00 \pm 2,02
0,78	-0,107	0,00 \pm 2,88



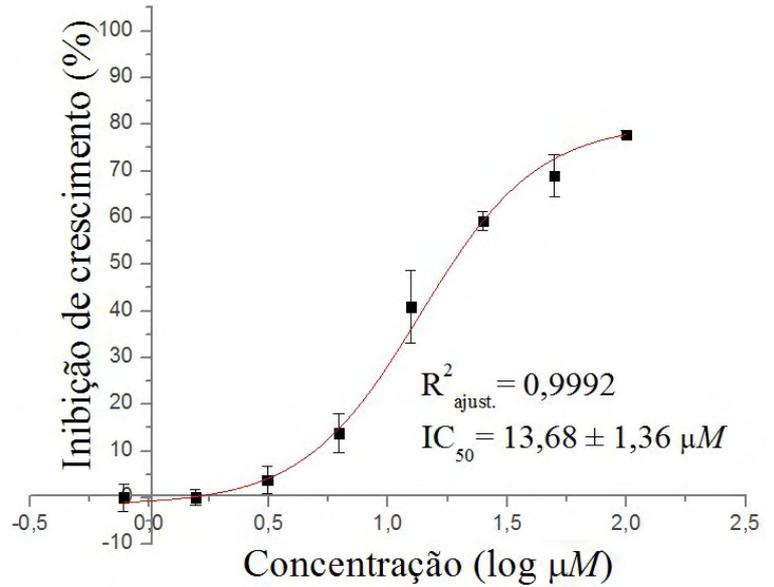
composto 26 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	84,24 \pm 4,00
50,00	1,699	78,54 \pm 1,04
25,00	1,398	69,39 \pm 2,64
12,50	1,097	53,63 \pm 3,91
6,25	0,796	25,72 \pm 1,91
3,12	0,495	9,29 \pm 1,59
1,56	0,194	4,46 \pm 4,46
0,78	-0,107	0,51 \pm 7,00



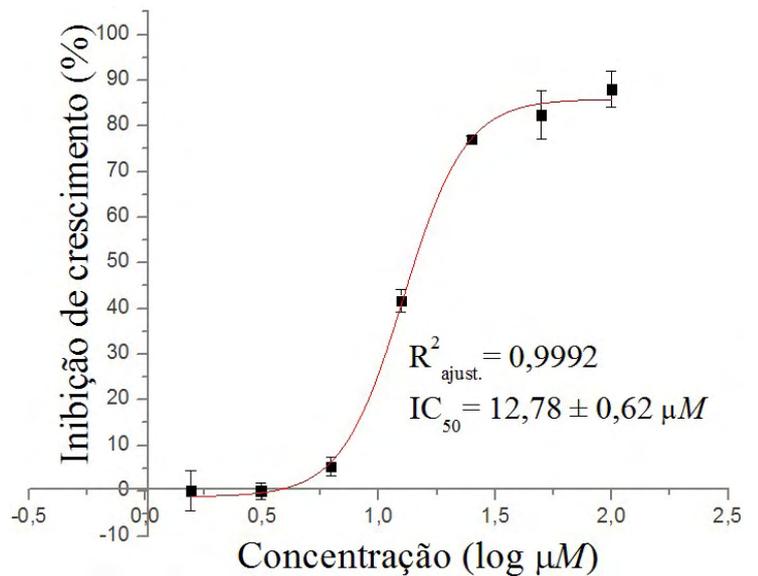
composto 27- Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	85,71 \pm 3,05
50,00	1,699	83,92 \pm 2,46
25,00	1,398	81,25 \pm 4,68
12,50	1,097	79,46 \pm 4,21
6,25	0,796	61,42 \pm 4,21
3,12	0,495	18,55 \pm 5,16
1,56	0,194	5,96 \pm 5,26
0,78	-0,107	3,82 \pm 4,92



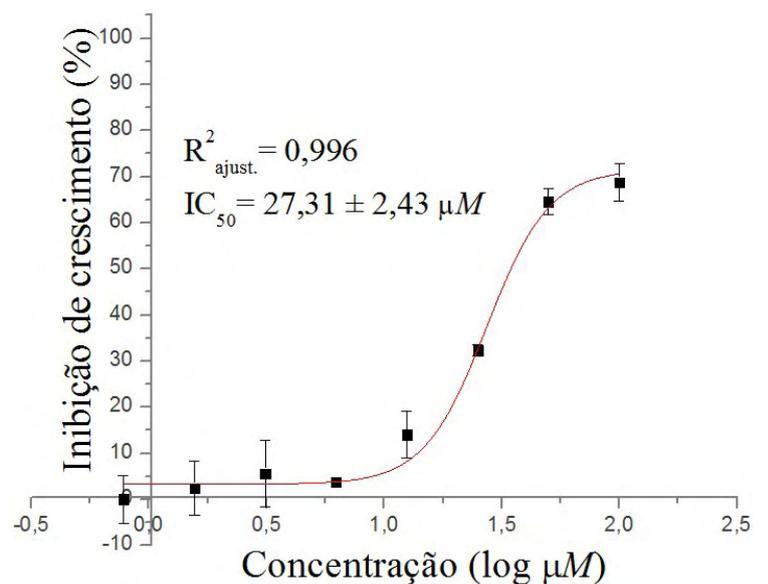
composto 28 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	77,85 \pm 0,75
50,00	1,699	68,97 \pm 4,57
25,00	1,398	59,28 \pm 1,98
12,50	1,097	40,87 \pm 7,79
6,25	0,796	13,83 \pm 4,21
3,12	0,495	3,73 \pm 2,93
1,56	0,194	0,00 \pm 1,72
0,78	-0,107	0,00 \pm 2,99



composto 29 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	88,03 \pm 3,92
50,00	1,699	82,41 \pm 5,36
25,00	1,398	77,03 \pm 0,85
12,50	1,097	41,68 \pm 2,51
6,25	0,796	5,36 \pm 1,98
3,12	0,495	0,00 \pm 1,85
1,56	0,194	0,00 \pm 4,34



composto 30 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	68,80 \pm 4,14
50,00	1,699	64,59 \pm 2,90
25,00	1,398	32,30 \pm 1,31
12,50	1,097	14,02 \pm 5,14
6,25	0,796	3,81 \pm 0,29
3,12	0,495	5,62 \pm 7,28
1,56	0,194	2,41 \pm 5,94
0,78	-0,107	0,00 \pm 5,16

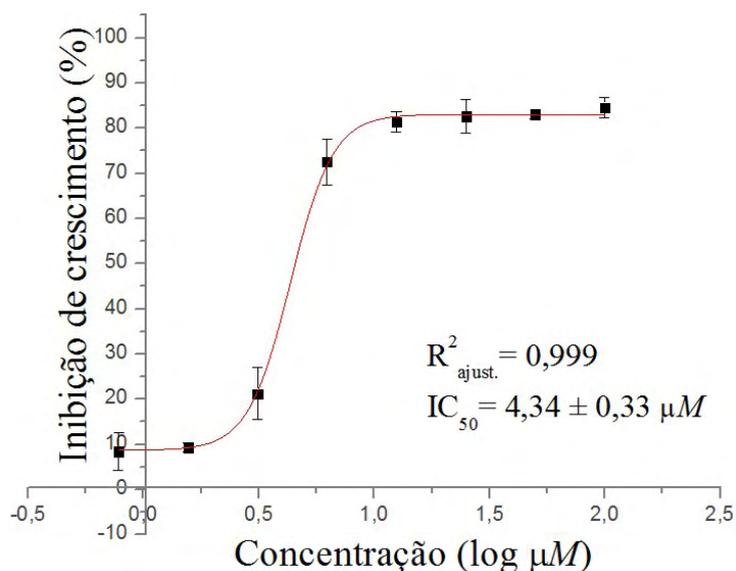
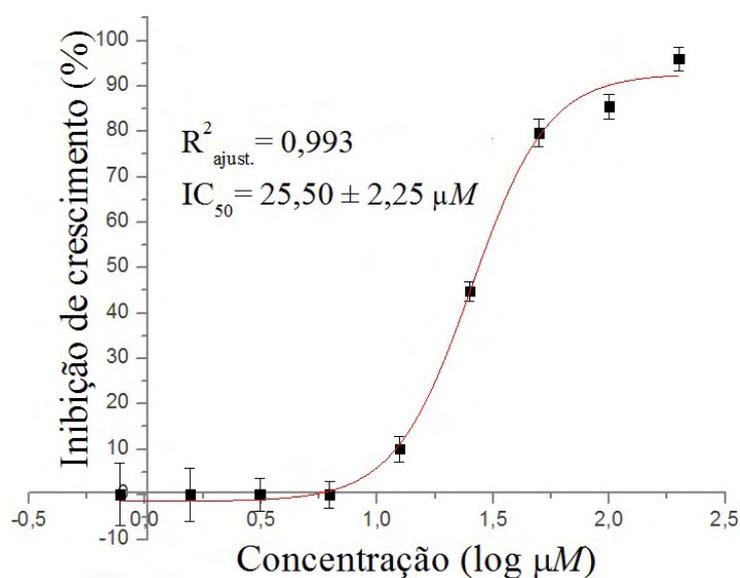


composto 31 - Silvio X10 cl1			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
50,00	1,699	20,09	$\pm 1,18$
25,00	1,398	17,08	$\pm 1,31$
12,50	1,097	17,27	$\pm 3,21$
6,25	0,796	18,40	$\pm 1,99$
3,12	0,495	18,21	$\pm 1,82$
1,56	0,194	19,72	$\pm 4,83$
0,78	-0,107	19,91	$\pm 3,21$

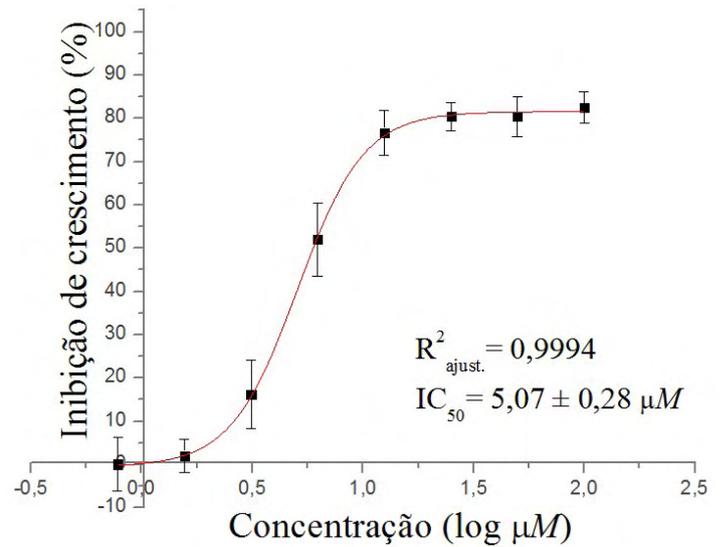
composto 32 - Silvio X10 cl1			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
200,00	2,301	96,00	$\pm 2,60$
100,00	2,000	85,54	$\pm 2,69$
50,00	1,699	79,72	$\pm 3,06$
25,00	1,398	44,77	$\pm 2,08$
12,50	1,097	10,03	$\pm 2,82$
6,25	0,796	0,00	$\pm 2,99$
3,12	0,495	0,00	$\pm 3,60$
1,56	0,194	0,00	$\pm 5,87$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 6,92$

composto 33 - Silvio X10 cl1			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
100,00	2,000	84,54	$\pm 2,22$
50,00	1,699	83,04	$\pm 0,94$
25,00	1,398	82,59	$\pm 3,75$
12,50	1,097	81,32	$\pm 2,23$
6,25	0,796	72,54	$\pm 5,09$
3,12	0,495	21,22	$\pm 5,73$
1,56	0,194	9,29	$\pm 0,96$
0,78	-0,107	8,38	$\pm 4,14$

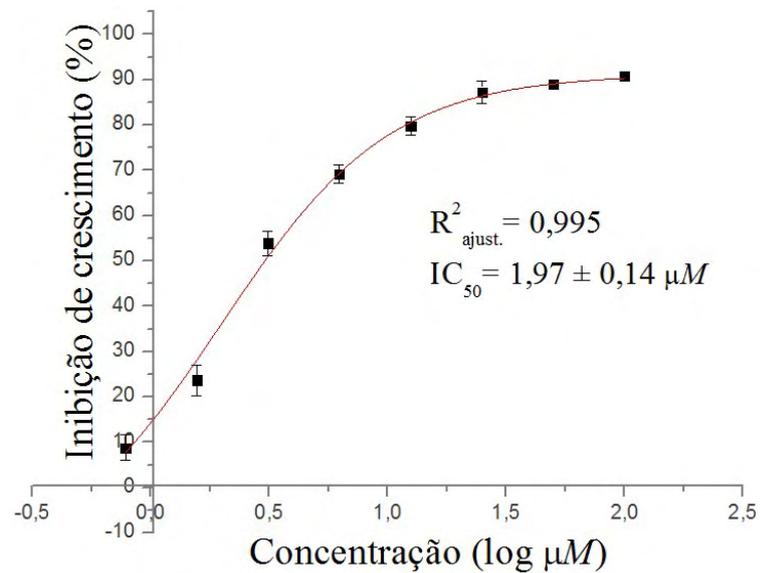
IC₅₀ não determinado



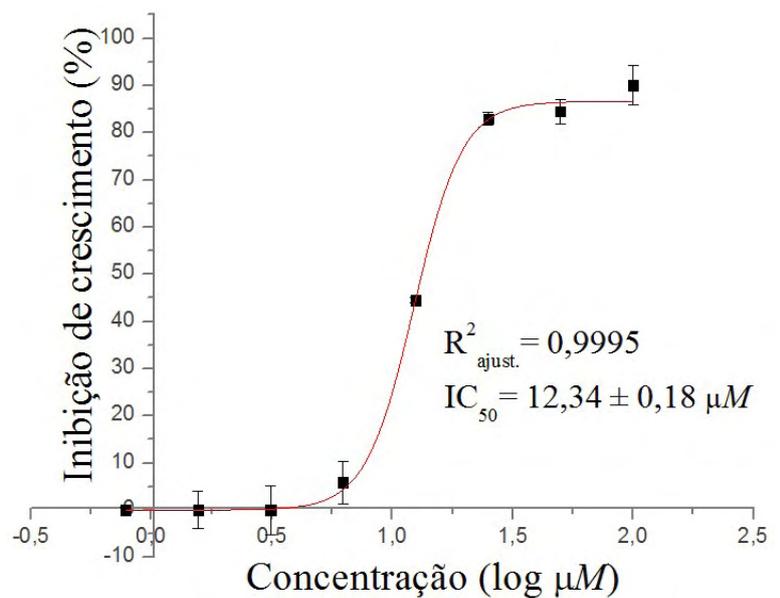
composto 34 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	82,45 \pm 3,65
50,00	1,699	80,39 \pm 4,66
25,00	1,398	80,39 \pm 3,19
12,50	1,097	76,66 \pm 5,21
6,25	0,796	52,01 \pm 8,48
3,12	0,495	16,15 \pm 7,93
1,56	0,194	1,96 \pm 3,92
0,78	-0,107	0,00 \pm 6,15



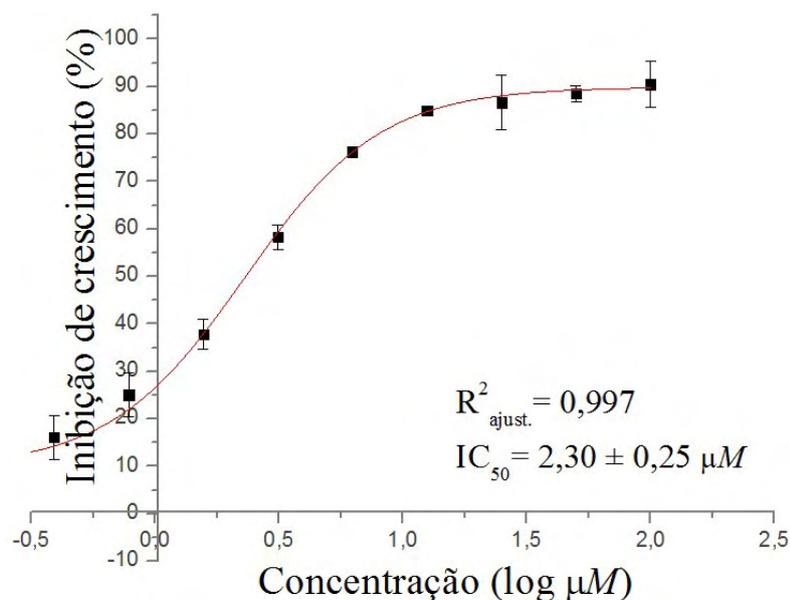
composto 35 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	90,84 \pm 0,99
50,00	1,699	89,04 \pm 0,34
25,00	1,398	87,25 \pm 2,37
12,50	1,097	79,83 \pm 2,00
6,25	0,796	69,19 \pm 2,01
3,12	0,495	53,92 \pm 2,71
1,56	0,194	23,69 \pm 3,42
0,78	-0,107	8,77 \pm 2,86



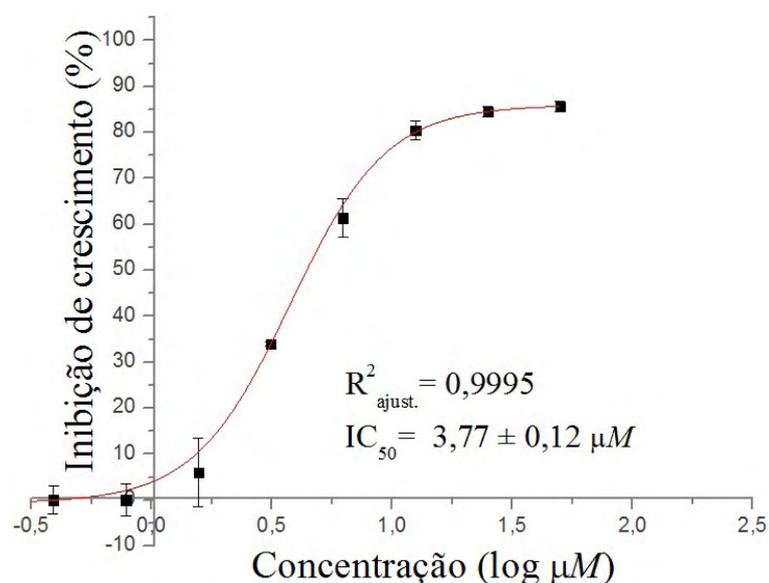
composto 36 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	90,08 \pm 4,27
50,00	1,699	84,52 \pm 2,57
25,00	1,398	82,95 \pm 1,31
12,50	1,097	44,51 \pm 0,60
6,25	0,796	5,89 \pm 4,50
3,12	0,495	0,00 \pm 5,22
1,56	0,194	0,00 \pm 3,99
0,78	-0,107	0,00 \pm 0,60



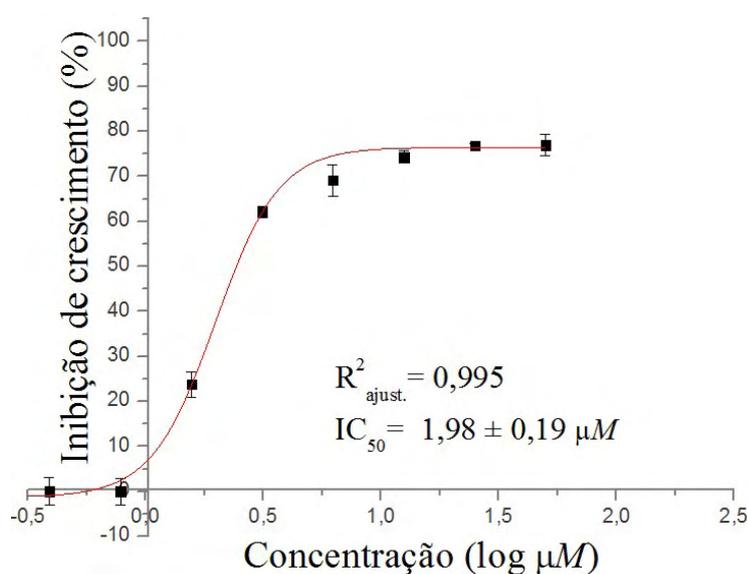
composto 37 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	90,51 \pm 4,78
50,00	1,699	88,52 \pm 1,61
25,00	1,398	86,66 \pm 5,78
12,50	1,097	85,00 \pm 0,79
6,25	0,796	76,21 \pm 1,05
3,12	0,495	58,29 \pm 2,52
1,56	0,194	37,76 \pm 3,14
0,78	-0,107	25,04 \pm 4,60
0,39	-0,408	16,15 \pm 4,63
0,20	-0,709	7,88 \pm 4,60



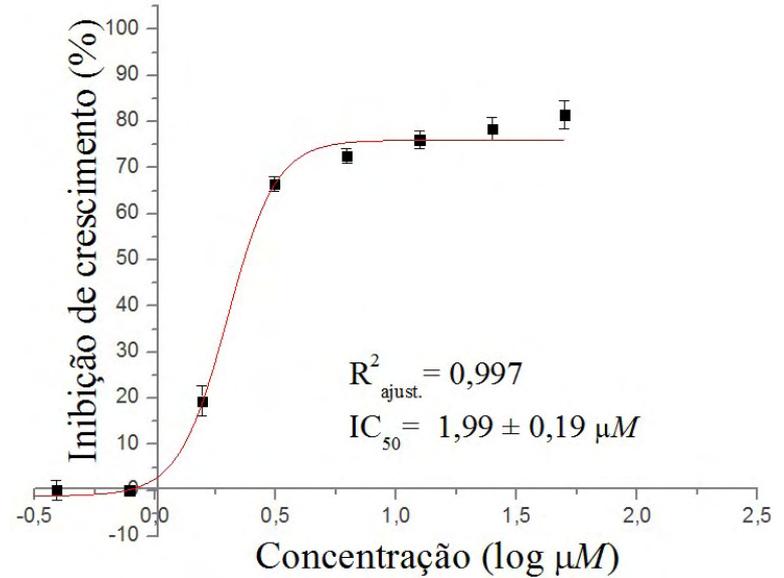
composto 38 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
50,00	1,699	85,68 \pm 1,13
25,00	1,398	84,56 \pm 1,19
12,50	1,097	80,49 \pm 2,04
6,25	0,796	61,41 \pm 4,23
3,12	0,495	33,98 \pm 0,46
1,56	0,194	6,00 \pm 7,48
0,78	-0,107	0,00 \pm 3,44
0,39	-0,408	0,00 \pm 2,98
0,20	-0,709	0,00 \pm 1,64



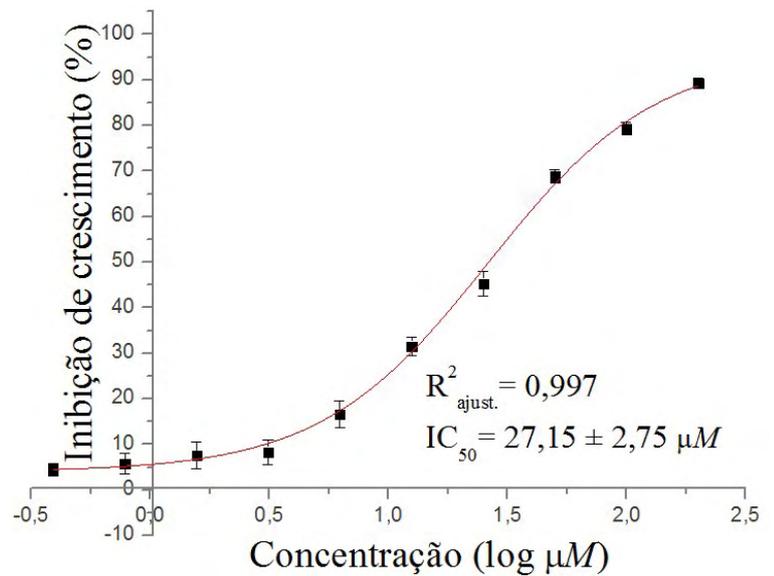
composto 39 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
50,00	1,699	76,99 \pm 2,33
25,00	1,398	76,85 \pm 0,54
12,50	1,097	74,28 \pm 1,35
6,25	0,796	69,14 \pm 3,44
3,12	0,495	62,19 \pm 1,24
1,56	0,194	23,84 \pm 2,83
0,78	-0,107	0,00 \pm 2,95
0,39	-0,408	0,00 \pm 3,08
0,20	-0,709	0,00 \pm 2,95



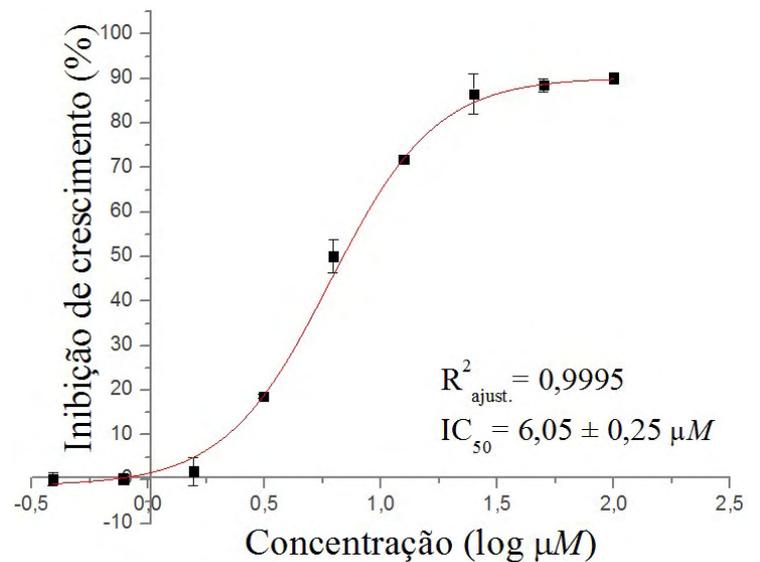
composto 40 - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
50,00	1,699	81,45 \pm 3,03
25,00	1,398	78,45 \pm 2,45
12,50	1,097	76,06 \pm 1,93
6,25	0,796	72,53 \pm 1,63
3,12	0,495	66,47 \pm 1,54
1,56	0,194	19,38 \pm 3,27
0,78	-0,107	0,00 \pm 0,54
0,39	-0,408	0,00 \pm 2,16
0,20	-0,709	0,00 \pm 2,17



benznidazol - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	89,29 \pm 1,23
100,00	2,000	79,32 \pm 1,41
50,00	1,699	68,83 \pm 1,53
25,00	1,398	45,31 \pm 2,78
12,50	1,097	31,56 \pm 2,00
6,25	0,796	16,60 \pm 2,97
3,12	0,495	8,27 \pm 2,65
1,56	0,194	7,56 \pm 2,94
0,78	-0,107	5,78 \pm 2,16
0,39	-0,408	4,53 \pm 1,37



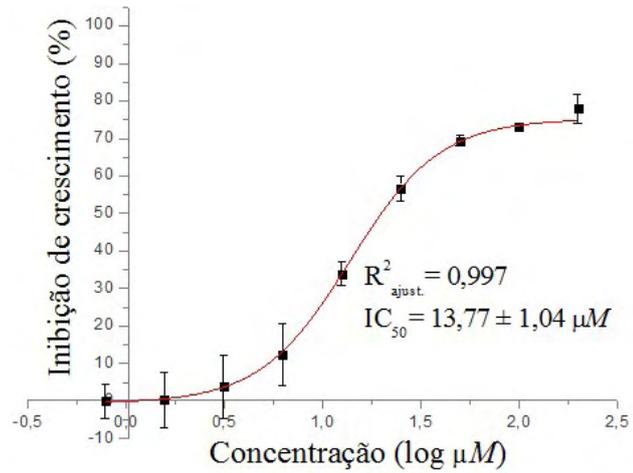
nifurtimox - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	90,12 \pm 1,23
50,00	1,699	88,52 \pm 1,43
25,00	1,398	86,61 \pm 4,56
12,50	1,097	71,95 \pm 0,55
6,25	0,796	50,11 \pm 3,68
3,12	0,495	18,71 \pm 0,48
1,56	0,194	1,81 \pm 3,18
0,78	-0,107	0,00 \pm 1,27
0,39	-0,408	0,00 \pm 1,46



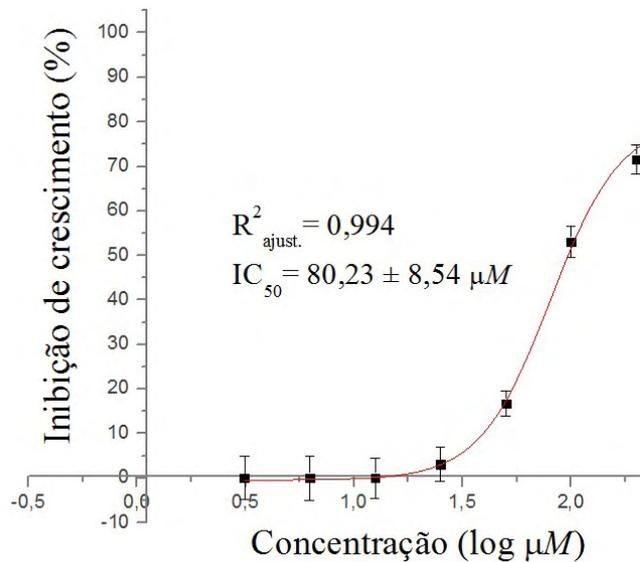
nifuroxazida - Silvio X10 cl1		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
300,00	2,477	47,58 \pm 9,32
150,00	2,176	28,02 \pm 5,14
75,00	1,875	27,29 \pm 1,51
37,50	1,574	11,59 \pm 6,44
18,75	1,273	0,00 \pm 5,24
9,37	0,972	0,00 \pm 7,63
4,69	0,671	0,00 \pm 5,07
2,34	0,370	0,00 \pm 8,46

IC₅₀ obtido experimentalmente (próximo à 300 μM)

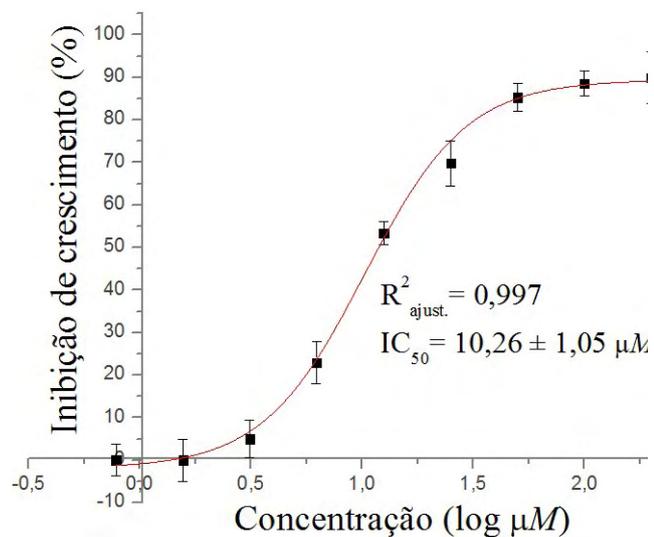
composto 1 - Y		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	77,98 \pm 3,80
100,00	2,000	73,20 \pm 1,01
50,00	1,699	69,36 \pm 1,40
25,00	1,398	56,73 \pm 3,38
12,50	1,097	33,88 \pm 3,11
6,25	0,796	12,36 \pm 8,26
3,12	0,495	3,79 \pm 8,57
1,56	0,194	0,27 \pm 7,41
0,78	-0,107	0,00 \pm 4,63



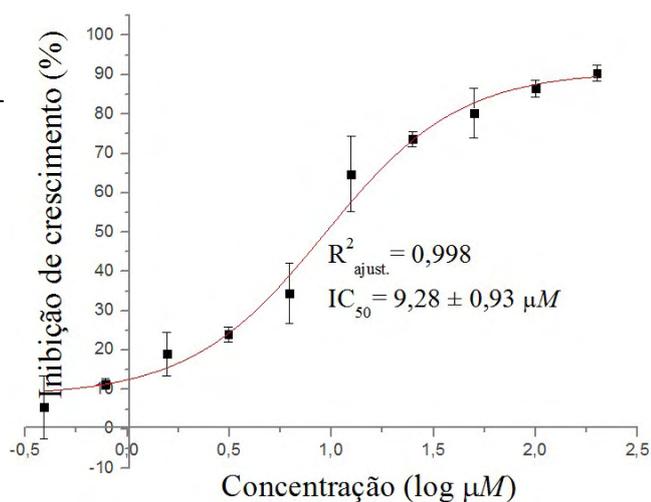
composto 2 - Y		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
400,00	2,602	84,25 \pm 5,71
200,00	2,301	71,52 \pm 3,23
100,00	2,000	53,06 \pm 3,53
50,00	1,699	16,71 \pm 2,78
25,00	1,398	3,06 \pm 3,80
12,50	1,097	0,00 \pm 4,56
6,25	0,796	0,00 \pm 5,02
3,12	0,495	0,00 \pm 4,90



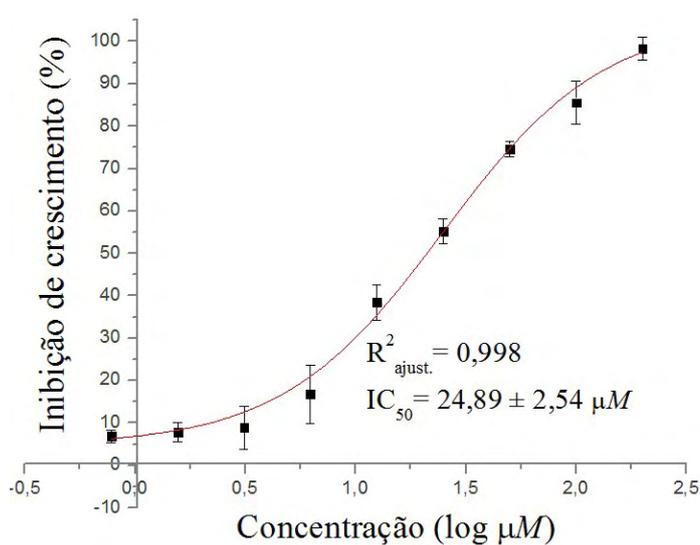
composto 3 - Y		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	90,00 \pm 6,07
100,00	2,000	88,56 \pm 2,88
50,00	1,699	85,33 \pm 3,34
25,00	1,398	69,78 \pm 5,33
12,50	1,097	53,36 \pm 2,76
6,25	0,796	23,00 \pm 4,98
3,12	0,495	5,00 \pm 4,43
1,56	0,194	0,00 \pm 4,99
0,78	-0,107	0,00 \pm 3,72



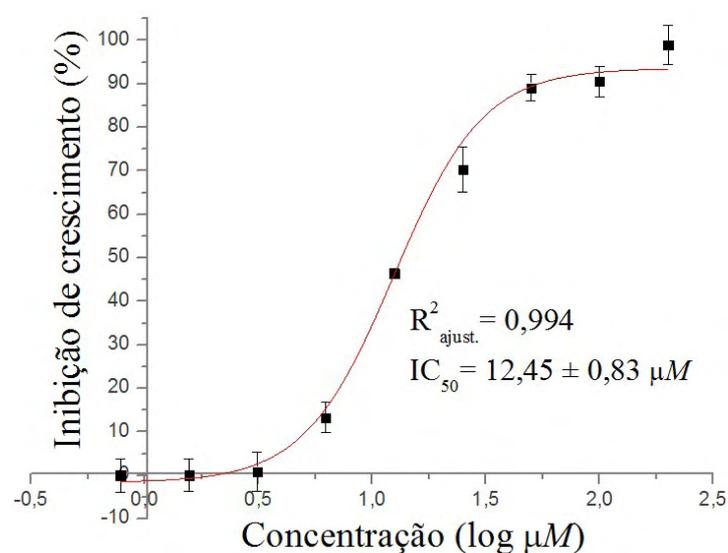
composto 4 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	log μM	(média \pm dp)	
200,00	2,301	90,45	$\pm 2,06$
100,00	2,000	86,50	$\pm 2,06$
50,00	1,699	80,25	$\pm 6,31$
25,00	1,398	73,66	$\pm 1,97$
12,50	1,097	64,77	$\pm 9,58$
6,25	0,796	34,49	$\pm 7,67$
3,12	0,495	23,95	$\pm 1,98$
1,56	0,194	19,01	$\pm 5,53$
0,78	-0,107	11,44	$\pm 1,45$
0,39	-0,408	5,51	$\pm 7,94$



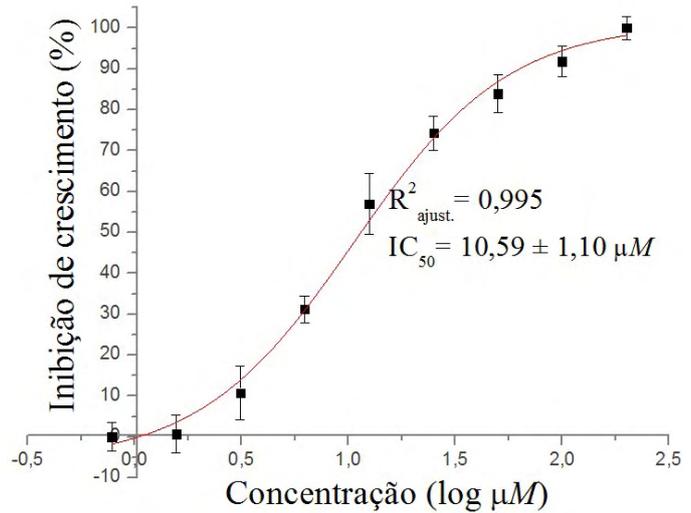
composto 5 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	log μM	(média \pm dp)	
200,00	2,301	98,26	$\pm 2,67$
100,00	2,000	85,51	$\pm 5,07$
50,00	1,699	74,65	$\pm 1,87$
25,00	1,398	55,23	$\pm 2,91$
12,50	1,097	38,43	$\pm 4,18$
6,25	0,796	16,80	$\pm 6,94$
3,12	0,495	8,81	$\pm 5,01$
1,56	0,194	7,82	$\pm 2,17$
0,78	-0,107	6,83	$\pm 1,51$



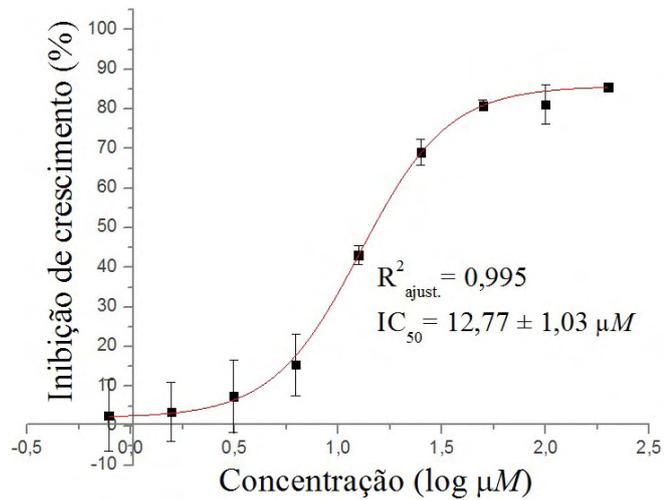
composto 6 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	log μM	(média \pm dp)	
200,00	2,301	98,98	$\pm 4,56$
100,00	2,000	90,58	$\pm 3,50$
50,00	1,699	89,10	$\pm 3,01$
25,00	1,398	70,29	$\pm 5,19$
12,50	1,097	46,47	$\pm 1,11$
6,25	0,796	13,26	$\pm 3,50$
3,12	0,495	0,87	$\pm 4,50$
1,56	0,194	0,00	$\pm 3,70$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 3,85$



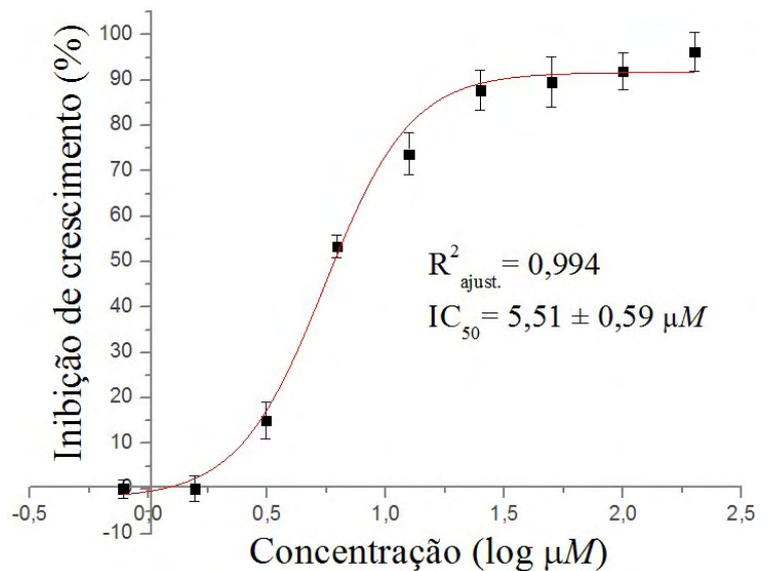
composto 7 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
200,00	2,301	100,00	$\pm 2,84$
100,00	2,000	91,87	$\pm 3,76$
50,00	1,699	83,96	$\pm 4,52$
25,00	1,398	74,30	$\pm 4,14$
12,50	1,097	57,05	$\pm 7,37$
6,25	0,796	31,25	$\pm 3,25$
3,12	0,495	10,81	$\pm 6,52$
1,56	0,194	0,70	$\pm 4,64$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 3,49$



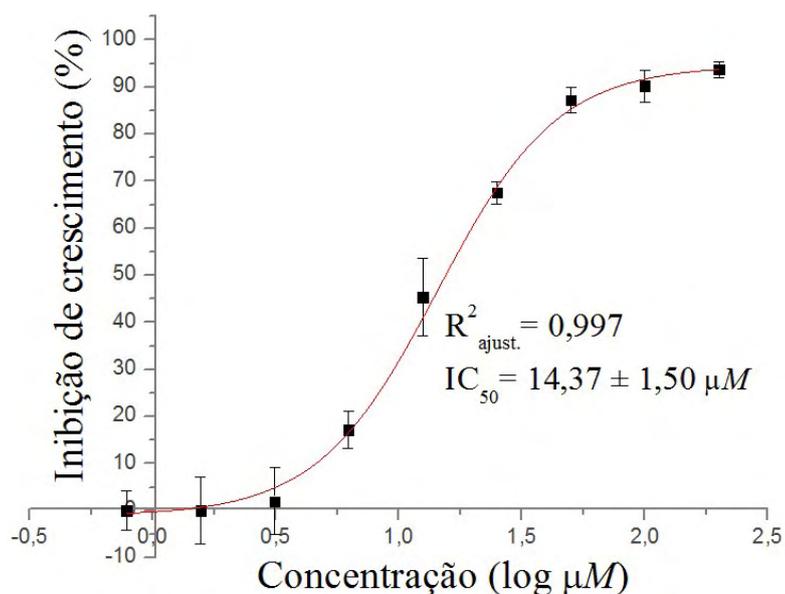
composto 8 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
2,301	85,54	$\pm 0,76$	2,301
2,000	81,18	$\pm 4,90$	2,000
1,699	80,86	$\pm 1,38$	1,699
1,398	69,07	$\pm 3,33$	1,398
1,097	43,12	$\pm 2,28$	1,097
0,796	15,44	$\pm 7,79$	0,796
0,495	7,43	$\pm 9,09$	0,495
0,194	3,54	$\pm 7,46$	0,194
-0,107	2,68	$\pm 9,08$	-0,107



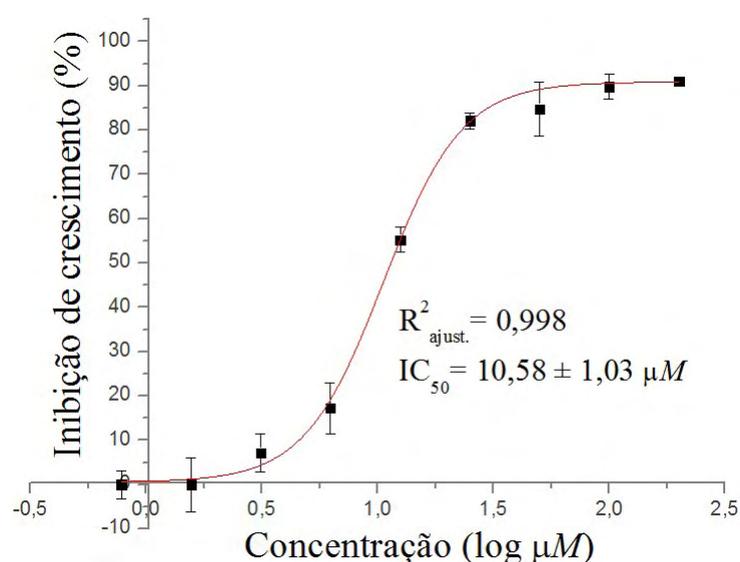
composto 9 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
200,00	2,301	96,24	$\pm 4,21$
100,00	2,000	92,03	$\pm 4,03$
50,00	1,699	89,63	$\pm 5,48$
25,00	1,398	87,77	$\pm 4,32$
12,50	1,097	73,77	$\pm 4,62$
6,25	0,796	53,41	$\pm 2,49$
3,12	0,495	15,00	$\pm 4,01$
1,56	0,194	0,00	$\pm 2,86$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 2,06$



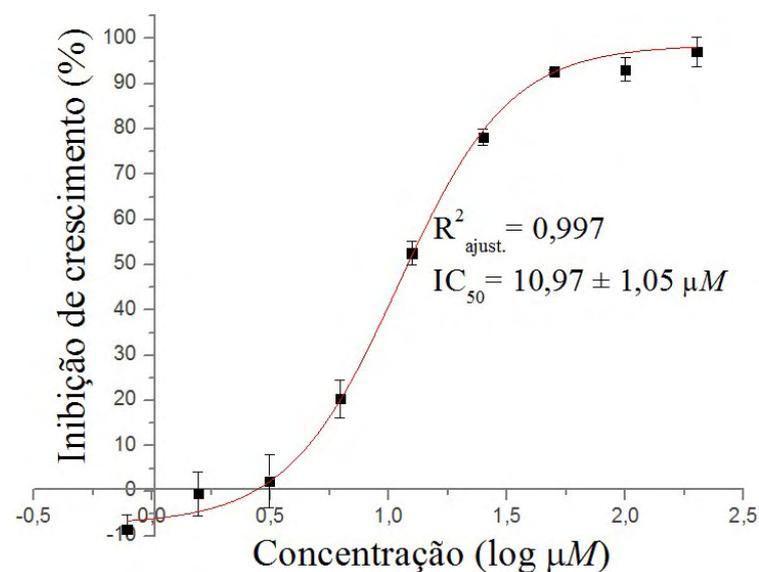
composto 10 - Y		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	93,71 \pm 1,64
100,00	2,000	90,27 \pm 3,37
50,00	1,699	87,24 \pm 2,62
25,00	1,398	67,56 \pm 2,34
12,50	1,097	45,39 \pm 8,28
6,25	0,796	17,17 \pm 3,91
3,12	0,495	2,00 \pm 7,12
1,56	0,194	0,00 \pm 7,15
0,78	-0,107	0,00 \pm 4,22



composto 11 - Y		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	91,02 \pm 1,06
100,00	2,000	89,83 \pm 2,80
50,00	1,699	84,75 \pm 6,10
25,00	1,398	82,14 \pm 1,81
12,50	1,097	55,27 \pm 2,80
6,25	0,796	17,21 \pm 5,71
3,12	0,495	7,19 \pm 4,31
1,56	0,194	0,00 \pm 6,10
0,78	-0,107	0,00 \pm 3,14



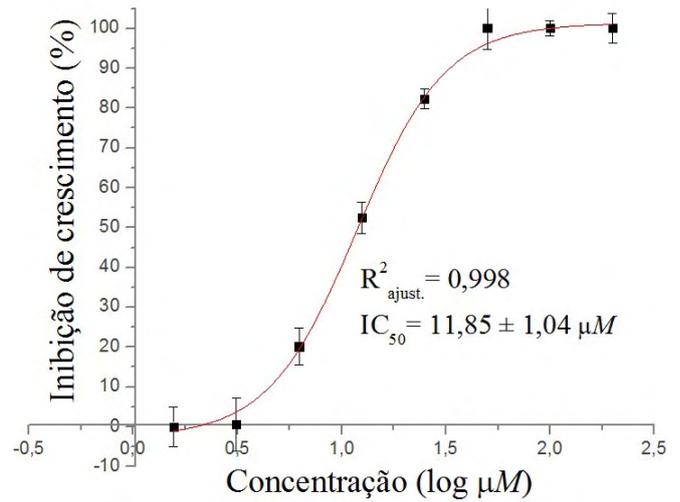
composto 12 - Y		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	97,14 \pm 3,28
100,00	2,000	93,17 \pm 2,59
50,00	1,699	92,74 \pm 0,37
25,00	1,398	78,22 \pm 1,69
12,50	1,097	52,60 \pm 2,56
6,25	0,796	20,36 \pm 4,17
3,12	0,495	2,22 \pm 5,92
1,56	0,194	-0,56 \pm 4,84
0,78	-0,107	-8,46 \pm 3,29



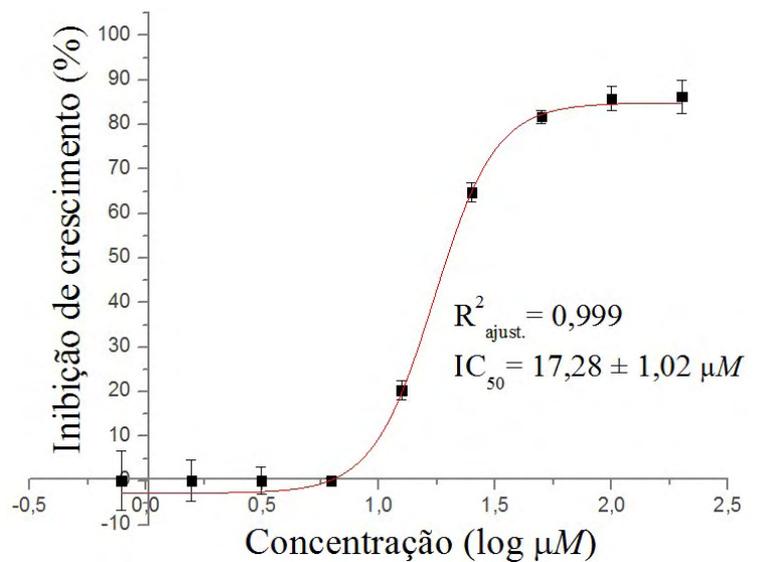
composto 13 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
200,00	2,301	100,00	$\pm 3,77$
100,00	2,000	100,00	$\pm 1,94$
50,00	1,699	100,00	$\pm 5,19$
25,00	1,398	82,28	$\pm 2,47$
12,50	1,097	52,45	$\pm 3,96$
6,25	0,796	20,12	$\pm 4,60$
3,12	0,495	0,54	$\pm 6,62$
1,56	0,194	0,00	$\pm 4,93$

composto 14 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
100,00	2,000	26,16	$\pm 0,63$
50,00	1,699	12,11	$\pm 5,60$
25,00	1,398	12,11	$\pm 11,86$
12,50	1,097	6,73	$\pm 4,75$
6,25	0,796	2,54	$\pm 7,84$
3,12	0,495	1,05	$\pm 6,73$
1,56	0,194	0,00	$\pm 4,94$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 5,38$

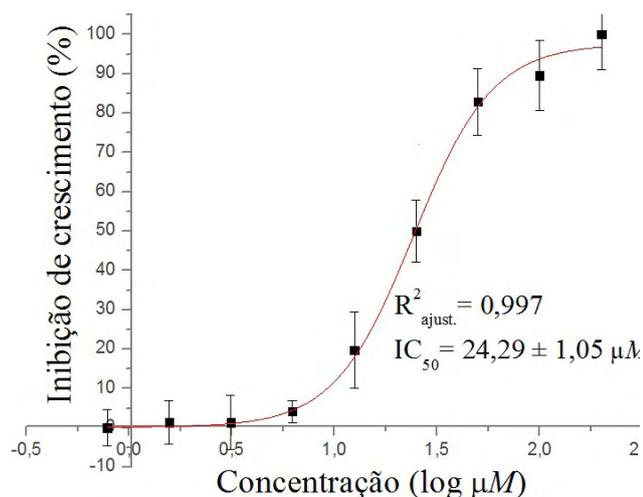
composto 15 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
200,00	2,301	86,25	$\pm 3,77$
100,00	2,000	85,79	$\pm 2,69$
50,00	1,699	81,73	$\pm 1,44$
25,00	1,398	64,81	$\pm 2,11$
12,50	1,097	20,30	$\pm 2,15$
6,25	0,796	0,00	$\pm 0,59$
3,12	0,495	0,00	$\pm 3,10$
1,56	0,194	0,00	$\pm 4,65$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 6,61$



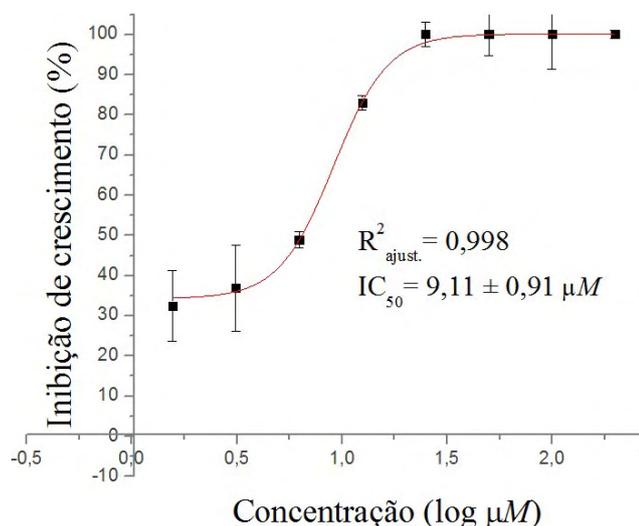
Valor de IC_{50} não determinado



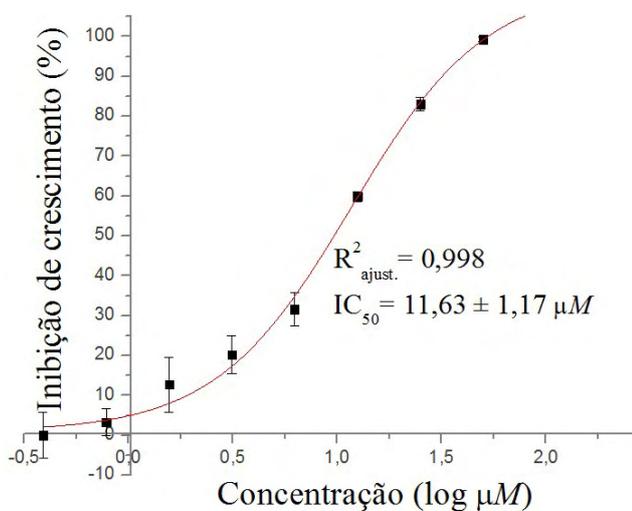
composto 16 - Y		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	100,00 \pm 8,92
100,00	2,000	89,61 \pm 8,80
50,00	1,699	82,87 \pm 8,48
25,00	1,398	50,06 \pm 7,93
12,50	1,097	19,80 \pm 9,66
6,25	0,796	4,12 \pm 2,75
3,12	0,495	1,39 \pm 6,84
1,56	0,194	1,39 \pm 5,59
0,78	-0,107	0,00 \pm 4,67



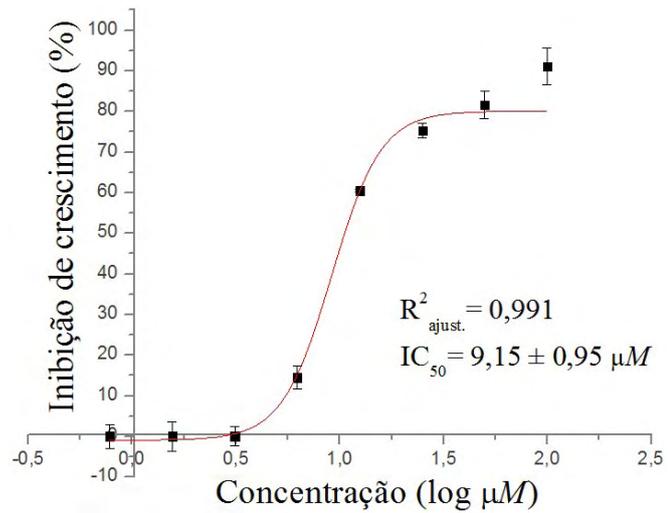
composto 17 - Y		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	100,00 \pm 1,00
100,00	2,000	100,00 \pm 8,72
50,00	1,699	100,00 \pm 5,16
25,00	1,398	100,00 \pm 3,12
12,50	1,097	82,97 \pm 1,83
6,25	0,796	48,90 \pm 2,03
3,12	0,495	36,86 \pm 10,62
1,56	0,194	32,45 \pm 8,83



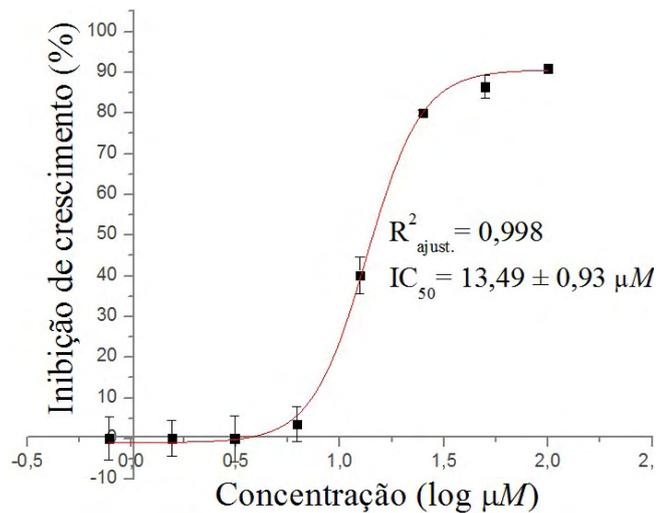
composto 18 - Y		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
50,00	1,699	99,31 \pm 0,60
25,00	1,398	83,07 \pm 1,61
12,50	1,097	59,93 \pm 1,25
6,25	0,796	31,61 \pm 4,11
3,12	0,495	20,21 \pm 4,79
1,56	0,194	12,72 \pm 6,90
0,78	-0,107	3,28 \pm 3,33
0,39	-0,408	0,00 \pm 5,77



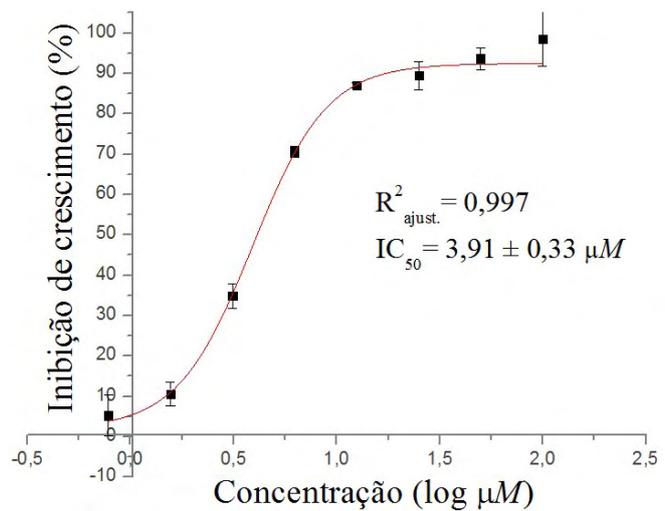
composto 19 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	log μM	(média \pm dp)	
100,00	2,000	91,04	$\pm 4,52$
50,00	1,699	81,59	$\pm 3,36$
25,00	1,398	75,30	$\pm 1,83$
12,50	1,097	60,52	$\pm 0,42$
6,25	0,796	14,50	$\pm 2,75$
3,12	0,495	0,00	$\pm 2,34$
1,56	0,194	0,00	$\pm 3,66$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 2,94$



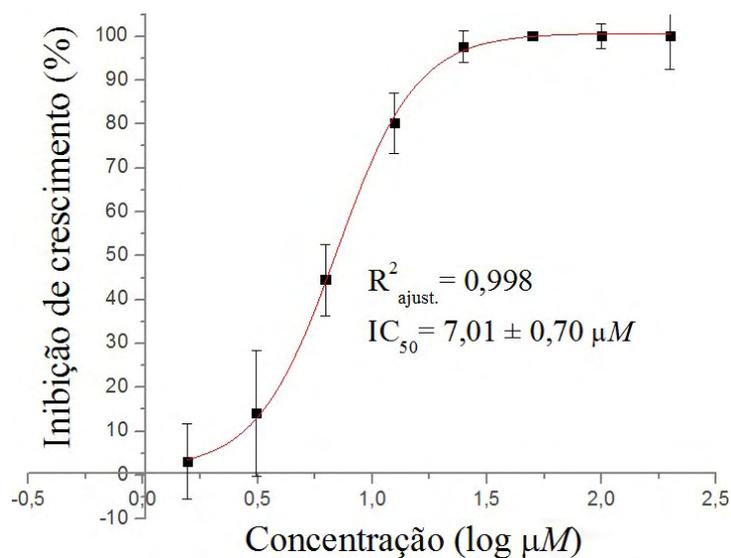
composto 20 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	log μM	(média \pm dp)	
100,00	2,000	90,86	$\pm 1,02$
50,00	1,699	86,46	$\pm 2,93$
25,00	1,398	80,03	$\pm 0,59$
12,50	1,097	40,10	$\pm 4,43$
6,25	0,796	3,55	$\pm 4,31$
3,12	0,495	0,00	$\pm 5,59$
1,56	0,194	0,00	$\pm 4,43$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 5,28$



composto 21 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	log μM	(média \pm dp)	
100,00	2,000	98,46	$\pm 6,74$
50,00	1,699	93,64	$\pm 2,74$
25,00	1,398	89,47	$\pm 3,48$
12,50	1,097	87,06	$\pm 0,76$
6,25	0,796	70,61	$\pm 1,37$
3,12	0,495	34,87	$\pm 3,01$
1,56	0,194	10,53	$\pm 3,01$
0,78	-0,107	5,26	$\pm 5,14$



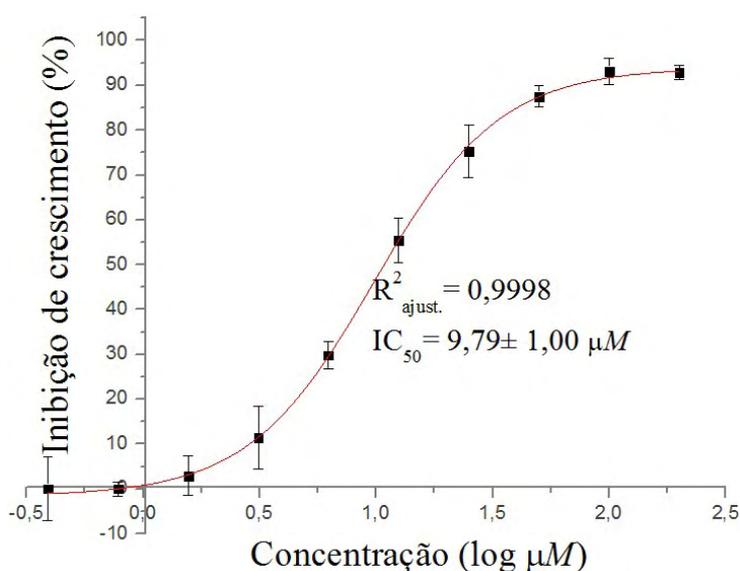
composto 22 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
200,00	2,301	100,00	$\pm 7,48$
100,00	2,000	100,00	$\pm 2,83$
50,00	1,699	100,00	$\pm 1,00$
25,00	1,398	97,65	$\pm 3,67$
12,50	1,097	80,18	$\pm 6,85$
6,25	0,796	44,49	$\pm 8,14$
3,12	0,495	14,10	$\pm 10,33$
1,56	0,194	3,08	$\pm 8,50$



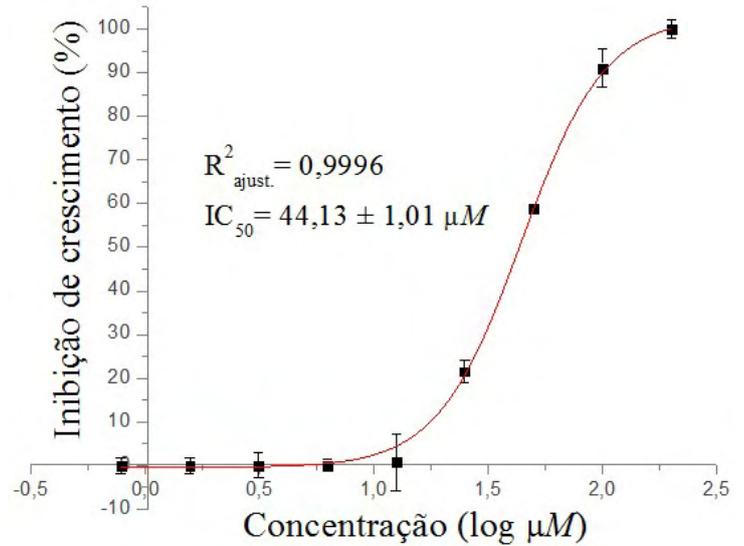
composto 23 - Y		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,300	55,39 $\pm 2,28$
100,00	2,000	50,00 $\pm 6,87$
50,00	1,699	37,28 $\pm 3,31$
25,00	1,398	23,68 $\pm 3,66$
12,50	1,097	12,72 $\pm 5,02$
6,25	0,796	3,95 $\pm 6,28$
3,12	0,495	-1,32 $\pm 4,11$
1,56	0,194	-6,14 $\pm 2,66$

Valor experimental:
 $\text{IC}_{50} = 100,00 \pm 6,87 \mu\text{M}$

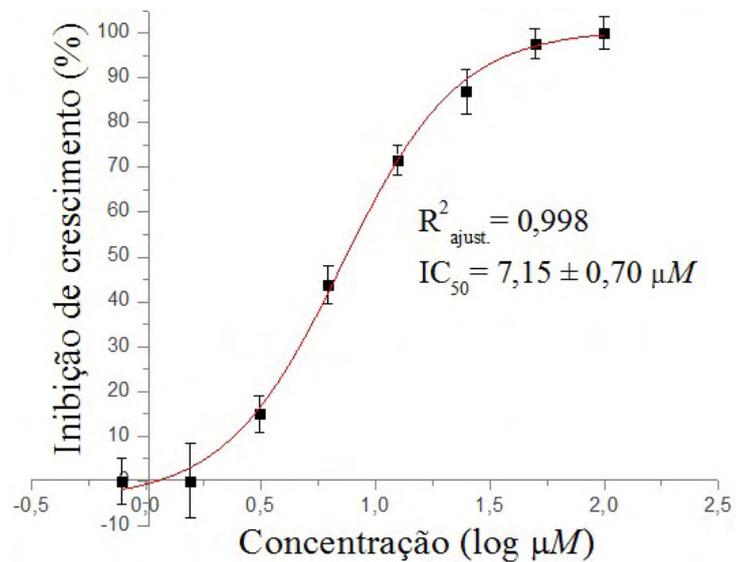
composto 24 - Y		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	93,85 $\pm 1,55$
100,00	2,000	93,15 $\pm 2,87$
50,00	1,699	87,49 $\pm 2,36$
25,00	1,398	75,27 $\pm 5,82$
12,50	1,097	55,45 $\pm 4,92$
6,25	0,796	29,83 $\pm 3,16$
3,12	0,495	11,51 $\pm 6,98$
1,56	0,194	2,87 $\pm 4,41$
0,78	-0,107	0,00 $\pm 1,58$
0,39	-0,408	0,00 $\pm 7,05$



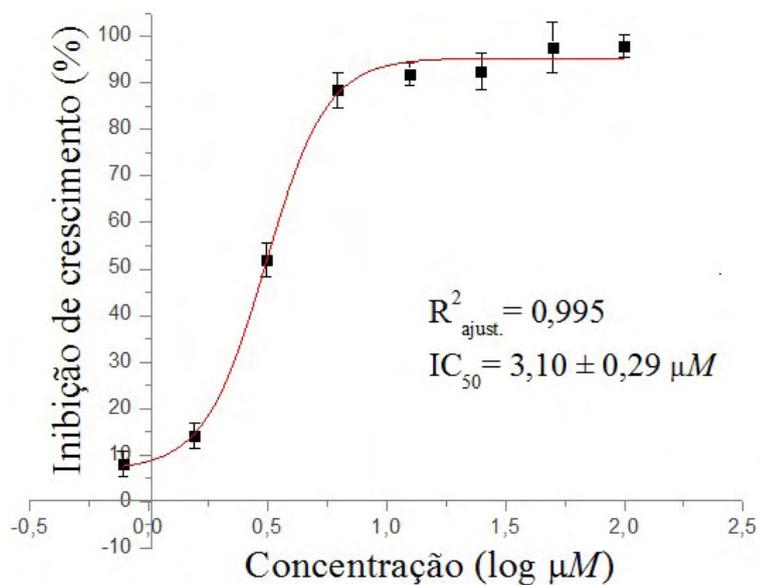
composto 25 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
200,00	2,301	100,00	$\pm 2,23$
100,00	2,000	91,03	$\pm 4,30$
50,00	1,699	58,74	$\pm 1,04$
25,00	1,398	21,52	$\pm 2,52$
12,50	1,097	0,75	$\pm 6,59$
6,25	0,796	0,00	$\pm 1,37$
3,12	0,495	0,00	$\pm 2,88$
1,56	0,194	0,00	$\pm 1,87$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 1,87$



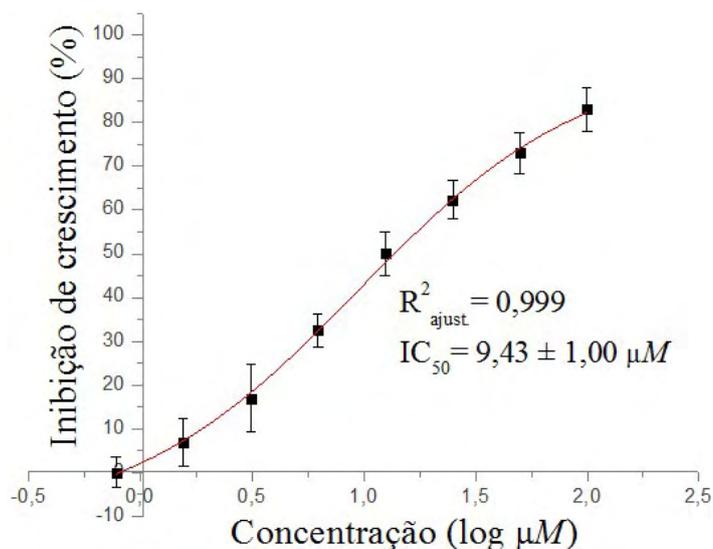
composto 26 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
100,00	2,000	100,00	$\pm 3,51$
50,00	1,699	97,53	$\pm 3,41$
25,00	1,398	86,95	$\pm 4,93$
12,50	1,097	71,60	$\pm 3,41$
6,25	0,796	43,83	$\pm 4,28$
3,12	0,495	15,00	$\pm 4,04$
1,56	0,194	0,00	$\pm 8,30$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 5,27$



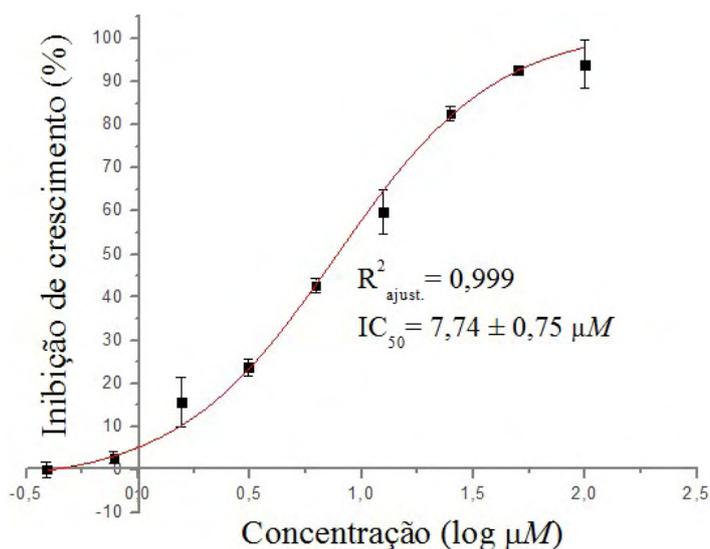
composto 27 - Y			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
100,00	2,000	97,85	$\pm 2,31$
50,00	1,699	97,59	$\pm 5,48$
25,00	1,398	92,49	$\pm 4,03$
12,50	1,097	91,95	$\pm 2,42$
6,25	0,796	88,37	$\pm 3,88$
3,12	0,495	51,89	$\pm 3,57$
1,56	0,194	14,15	$\pm 2,84$
0,78	-0,107	8,07	$\pm 2,75$



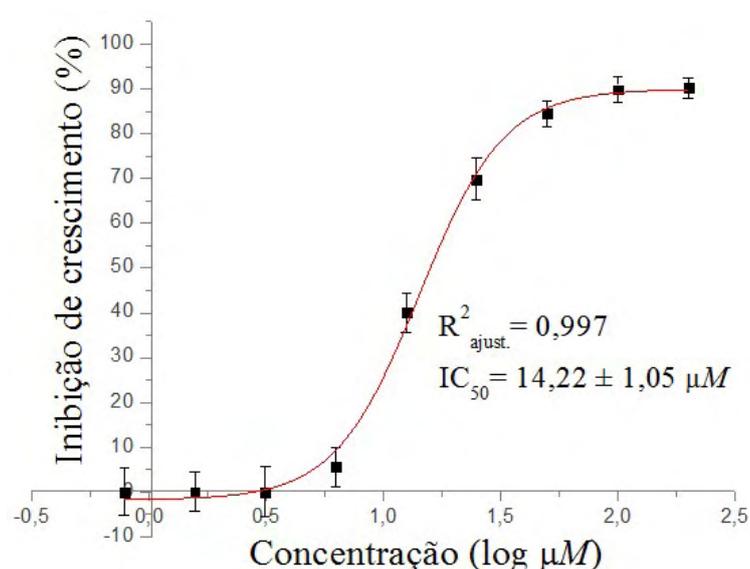
composto 28 - Y		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	83,00 \pm 4,94
50,00	1,699	73,00 \pm 4,68
25,00	1,398	62,30 \pm 4,41
12,50	1,097	50,00 \pm 4,96
6,25	0,796	32,43 \pm 3,83
3,12	0,495	17,00 \pm 7,81
1,56	0,194	7,00 \pm 5,40
0,78	-0,107	0,00 \pm 3,50



composto 29 - Y		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	93,97 \pm 5,61
50,00	1,699	92,65 \pm 1,10
25,00	1,398	82,58 \pm 1,55
12,50	1,097	59,80 \pm 5,21
6,25	0,796	42,71 \pm 1,59
3,12	0,495	23,71 \pm 1,85
1,56	0,194	15,66 \pm 5,73
0,78	-0,107	2,71 \pm 1,39
0,39	-0,408	0,00 \pm 1,79



composto 30 - Y		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	90,23 \pm 2,32
100,00	2,000	89,86 \pm 3,02
50,00	1,699	84,46 \pm 2,93
25,00	1,398	69,89 \pm 4,59
12,50	1,097	40,10 \pm 4,43
6,25	0,796	5,55 \pm 4,31
3,12	0,495	0,00 \pm 5,59
1,56	0,194	0,00 \pm 4,43
0,78	-0,107	0,00 \pm 5,28

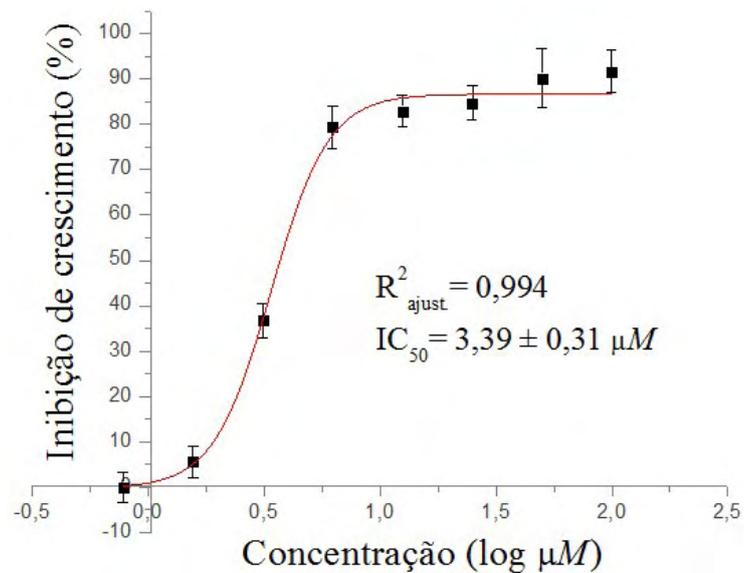
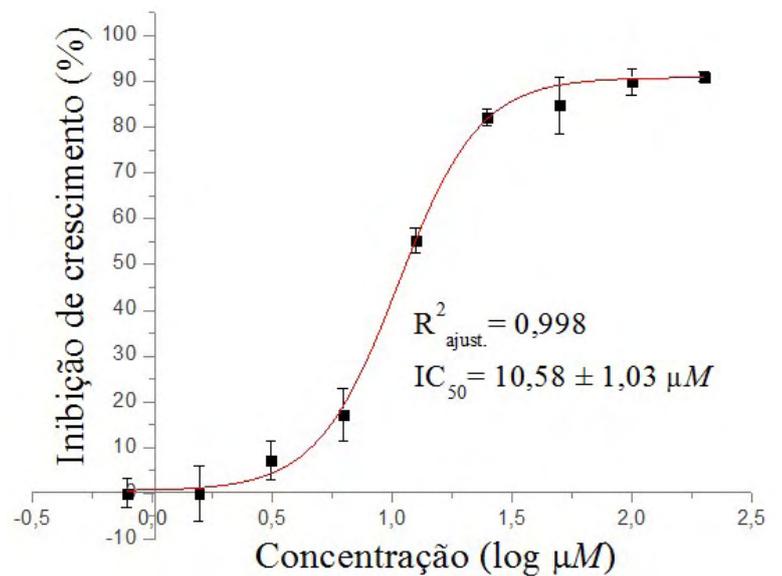


composto 31 - Y		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
50,00	1,699	18,21 \pm 2,08
25,00	1,398	17,88 \pm 1,01
12,50	1,097	17,20 \pm 2,21
6,25	0,796	16,84 \pm 0,99
3,12	0,495	16,21 \pm 1,20
1,56	0,194	15,72 \pm 3,33
0,78	-0,107	14,91 \pm 2,21

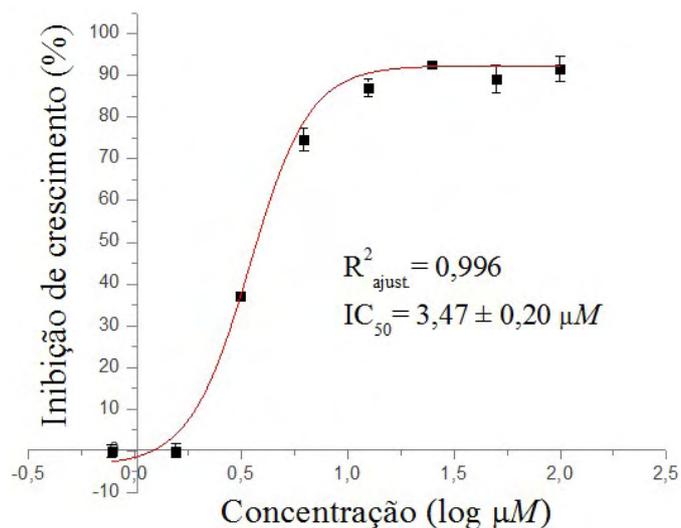
composto 32 - Y		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	91,02 \pm 1,06
100,00	2,000	89,83 \pm 2,80
50,00	1,699	84,75 \pm 6,10
25,00	1,398	82,14 \pm 1,81
12,50	1,097	55,27 \pm 2,80
6,25	0,796	17,21 \pm 5,71
3,12	0,495	7,19 \pm 4,31
1,56	0,194	0,00 \pm 6,10
0,78	-0,107	0,00 \pm 3,14

composto 33 - Y		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	91,67 \pm 4,66
50,00	1,699	90,12 \pm 6,57
25,00	1,398	84,72 \pm 3,74
12,50	1,097	82,87 \pm 3,51
6,25	0,796	79,32 \pm 4,75
3,12	0,495	36,73 \pm 3,74
1,56	0,194	5,56 \pm 3,34
0,78	-0,107	0,00 \pm 3,34

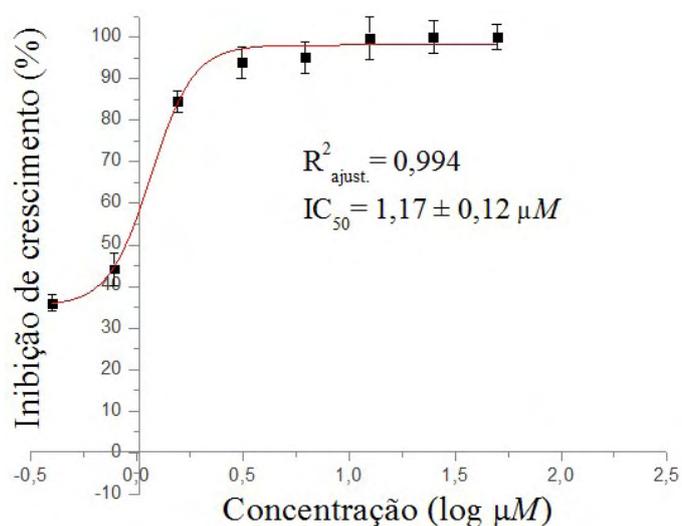
IC50 não determinado



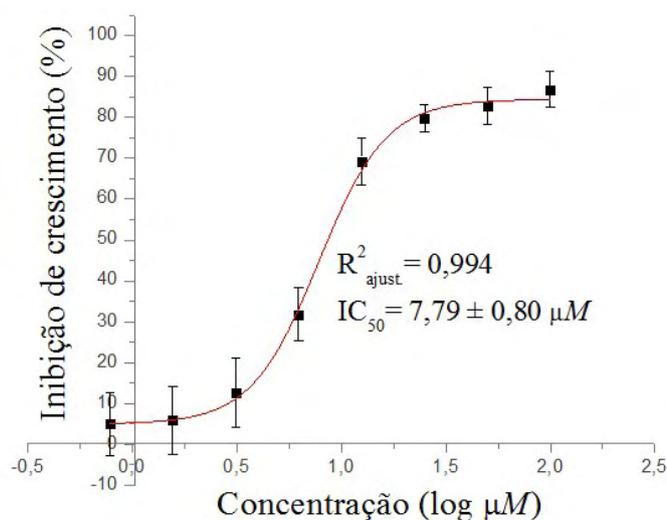
composto 34 - Y		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	91,56 \pm 3,11
50,00	1,699	90,59 \pm 3,40
25,00	1,398	90,09 \pm 0,62
12,50	1,097	87,04 \pm 2,23
6,25	0,796	74,69 \pm 2,69
3,12	0,495	37,04 \pm 0,62
1,56	0,194	0,00 \pm 1,63
0,78	-0,107	0,00 \pm 1,55



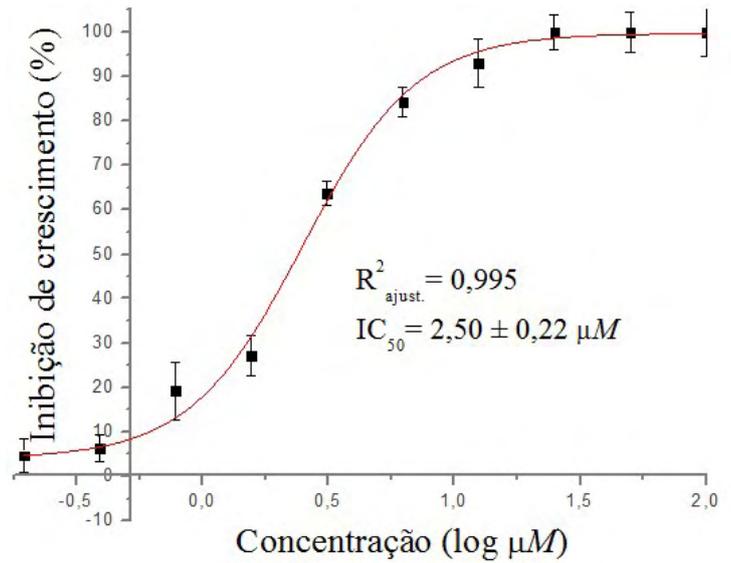
composto 35 - Y		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
50,00	1,699	100,00 \pm 3,00
25,00	1,398	100,00 \pm 4,00
12,50	1,097	99,71 \pm 5,22
6,25	0,796	95,03 \pm 3,82
3,12	0,495	93,87 \pm 3,84
1,56	0,194	84,52 \pm 2,53
0,78	-0,107	44,21 \pm 3,96
0,40	-0,398	36,00 \pm 2,00



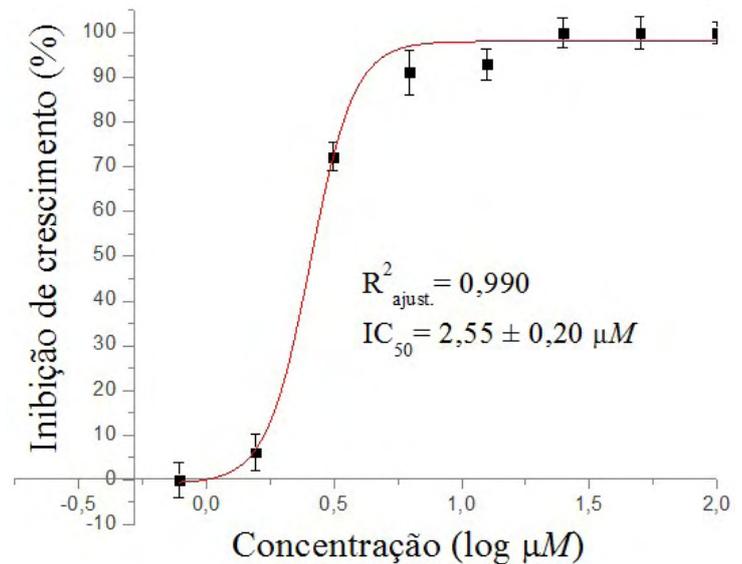
composto 36 - Y		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	86,82 \pm 4,43
50,00	1,699	82,66 \pm 4,56
25,00	1,398	79,73 \pm 3,38
12,50	1,097	69,26 \pm 5,77
6,25	0,796	31,76 \pm 6,52
3,12	0,495	12,61 \pm 8,45
1,56	0,194	5,86 \pm 8,45
0,78	-0,107	4,95 \pm 7,83



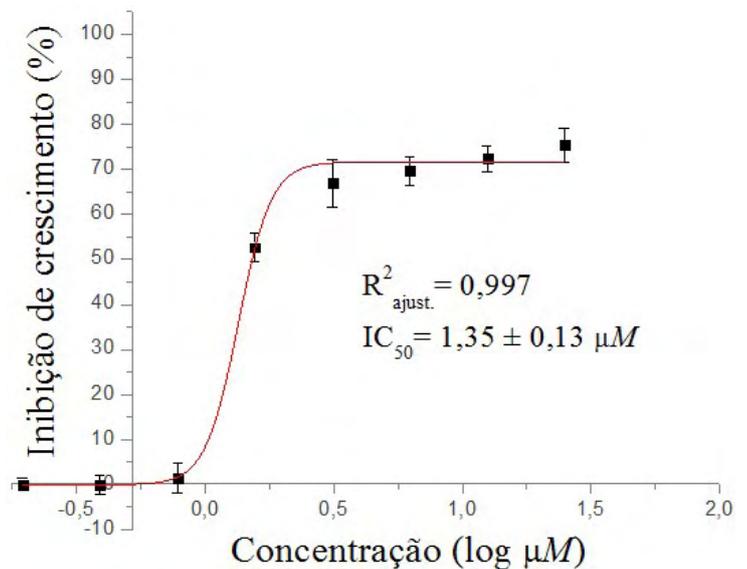
composto 37 - Y		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	100,00 \pm 5,36
50,00	1,699	100,00 \pm 4,47
25,00	1,398	100,00 \pm 3,94
12,50	1,097	92,94 \pm 5,48
6,25	0,796	84,28 \pm 3,41
3,12	0,495	63,74 \pm 2,75
1,56	0,194	27,16 \pm 4,55
0,78	-0,107	19,18 \pm 6,38
0,39	-0,408	6,22 \pm 3,05
0,20	-0,709	4,66 \pm 3,63



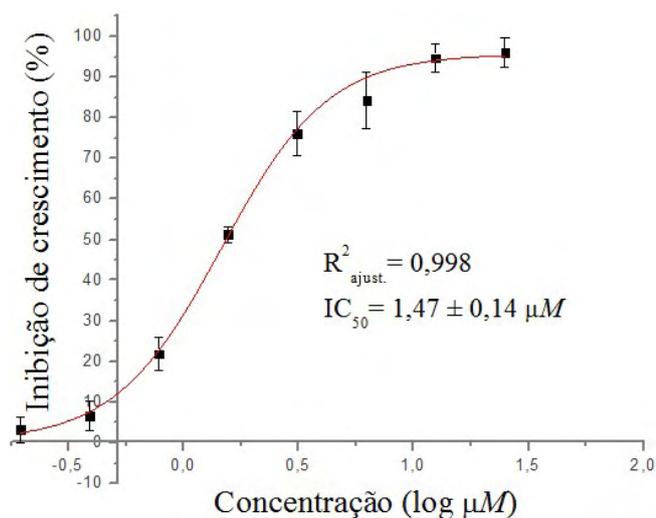
composto 38 - Y		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	100,00 \pm 2,31
50,00	1,699	100,00 \pm 3,64
25,00	1,398	100,00 \pm 3,33
12,50	1,097	92,93 \pm 3,39
6,25	0,796	91,10 \pm 4,92
3,12	0,495	72,22 \pm 3,15
1,56	0,194	6,12 \pm 4,13
0,78	-0,107	0,00 \pm 3,93



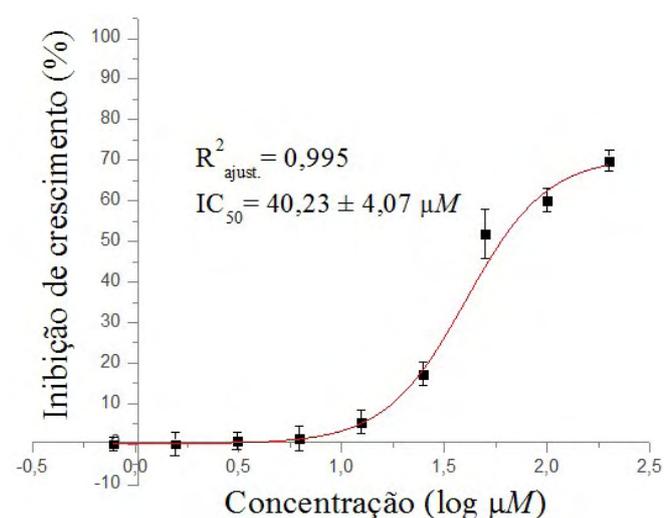
composto 39 - Y		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
25,00	1,398	75,36 \pm 3,76
12,50	1,097	72,38 \pm 2,83
6,25	0,796	69,65 \pm 3,27
3,12	0,495	66,90 \pm 5,26
1,56	0,194	52,66 \pm 3,23
0,78	-0,107	1,45 \pm 3,25
0,39	-0,408	0,00 \pm 2,05
0,20	-0,709	0,00 \pm 1,41



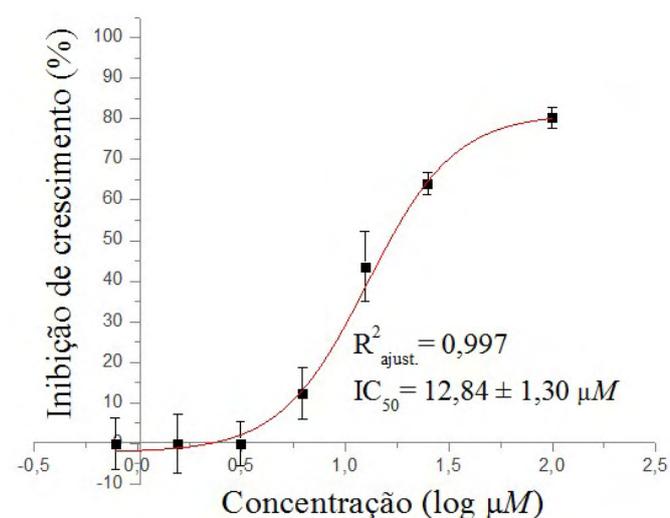
composto 40 - Y		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
25,00	1,398	96,03 \pm 3,55
12,50	1,097	94,70 \pm 3,47
6,25	0,796	84,28 \pm 6,97
3,12	0,495	76,16 \pm 5,50
1,56	0,194	51,32 \pm 1,98
0,78	-0,107	21,85 \pm 4,05
0,39	-0,408	6,62 \pm 3,55
0,20	-0,709	3,26 \pm 3,14



benznidazol - Y		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	69,90 \pm 2,48
100,00	2,000	60,10 \pm 2,89
50,00	1,699	51,75 \pm 6,07
25,00	1,398	17,25 \pm 2,86
12,50	1,097	5,38 \pm 2,90
6,25	0,796	1,32 \pm 3,04
3,12	0,495	0,71 \pm 2,07
1,56	0,194	0,00 \pm 2,86
0,78	-0,107	0,00 \pm 1,57



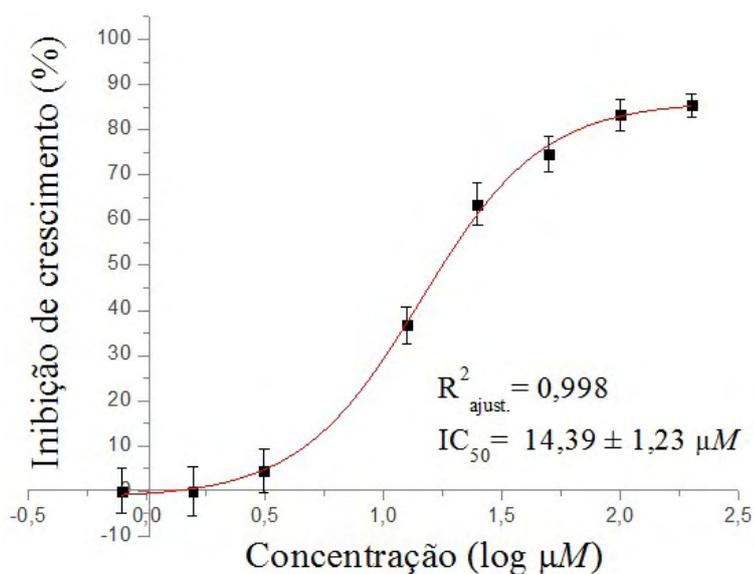
nifurtimox - Y		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	80,19 \pm 2,67
25,00	1,398	64,01 \pm 2,67
12,50	1,097	43,55 \pm 8,65
6,25	0,796	12,23 \pm 6,34
3,12	0,495	0,00 \pm 5,34
1,56	0,194	0,00 \pm 7,33
0,78	-0,107	0,00 \pm 6,28



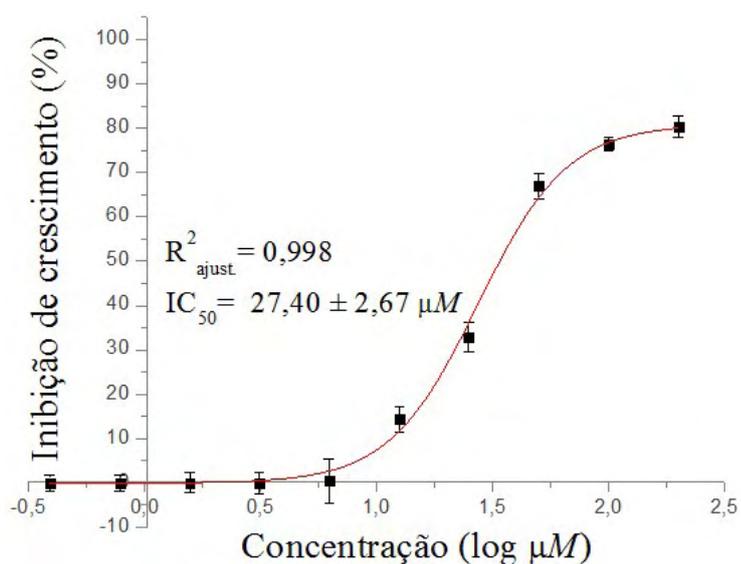
nifuroxazida- Y			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
300,00	2,477	46,17	$\pm 5,12$
150,00	2,176	34,01	$\pm 16,23$
75,00	1,875	16,22	$\pm 1,79$
37,50	1,574	4,73	$\pm 2,95$
18,75	1,273	0,00	$\pm 4,34$
9,38	0,972	0,00	$\pm 3,76$
4,69	0,671	0,00	$\pm 7,44$
2,34	0,370	0,00	$\pm 4,29$

IC₅₀ obtido experimentalmente (próximo à 300 μM)

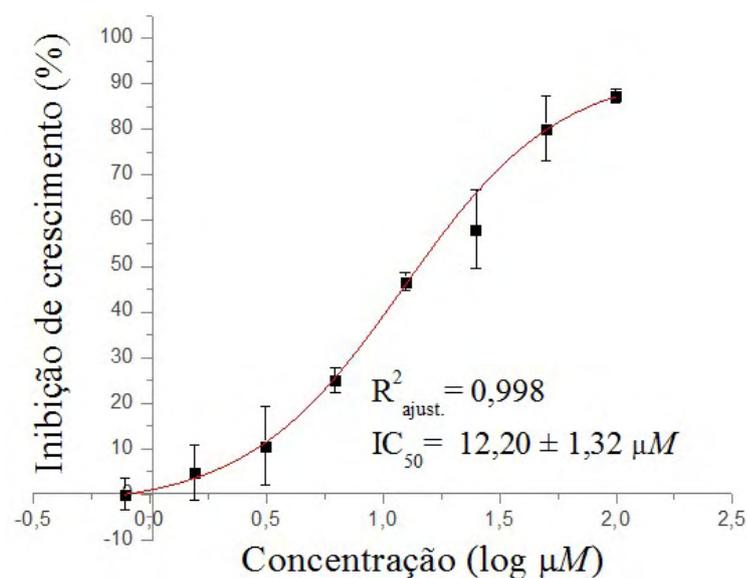
composto 1 - Bug 2149 cl10			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
200,00	2,301	85,47	$\pm 2,56$
100,00	2,000	83,26	$\pm 3,57$
50,00	1,699	74,66	$\pm 3,90$
25,00	1,398	63,50	$\pm 4,71$
12,50	1,097	36,76	$\pm 4,02$
3,12	0,495	4,45	$\pm 4,74$
1,56	0,194	0,00	$\pm 5,52$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 5,00$



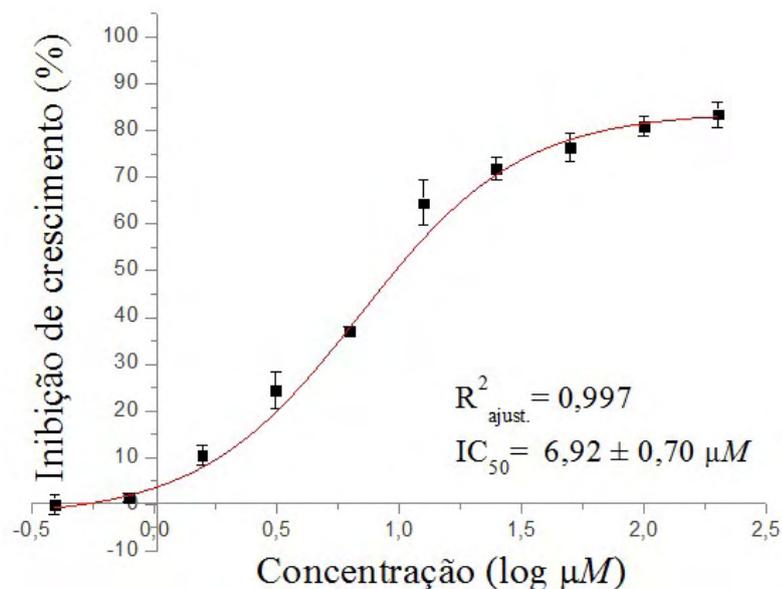
composto 2 - Bug 2149 cl10			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
200,00	2,301	80,33	$\pm 2,50$
100,00	2,000	76,30	$\pm 1,48$
50,00	1,699	67,05	$\pm 2,87$
25,00	1,398	32,87	$\pm 3,21$
12,50	1,097	14,43	$\pm 2,87$
6,25	0,796	0,44	$\pm 4,98$
3,12	0,495	0,00	$\pm 2,38$
1,56	0,194	0,00	$\pm 2,26$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 1,82$
0,39	-0,408	0,00	$\pm 1,79$



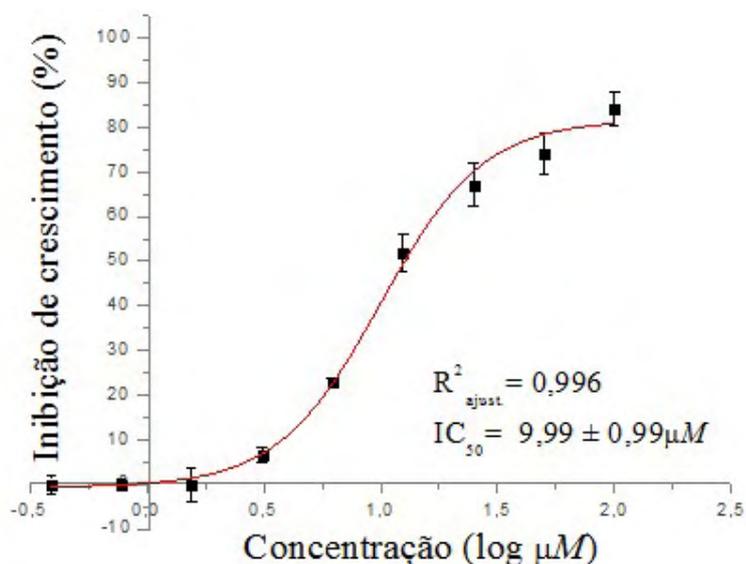
composto 3 - Bug 2149 cl10			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
100,00	2,000	87,26	$\pm 1,47$
50,00	1,699	80,13	$\pm 7,09$
25,00	1,398	58,01	$\pm 8,62$
12,50	1,097	46,63	$\pm 2,04$
6,25	0,796	25,00	$\pm 2,72$
3,12	0,495	10,58	$\pm 8,62$
1,56	0,194	4,81	$\pm 6,00$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 3,47$



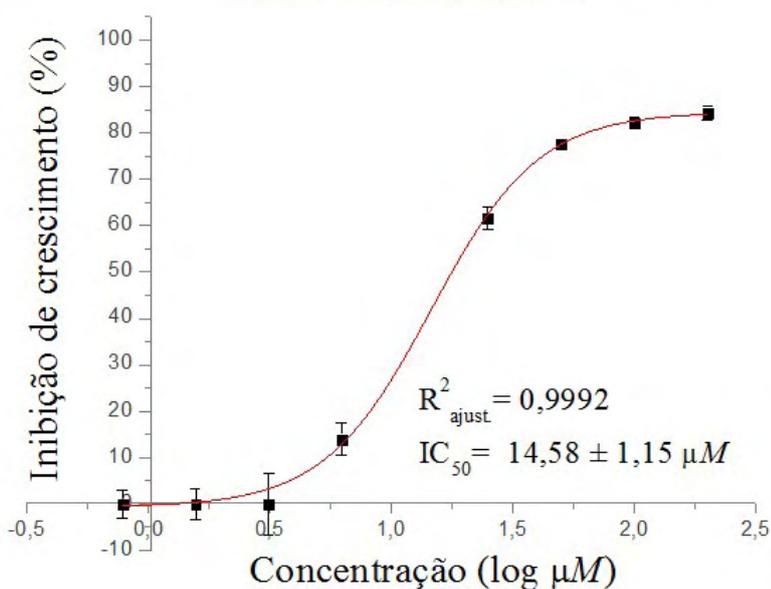
composto 4 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	83,49 \pm 2,71
100,00	2,000	80,99 \pm 2,12
50,00	1,699	76,49 \pm 3,03
25,00	1,398	71,98 \pm 2,41
12,50	1,097	64,48 \pm 4,84
6,25	0,796	37,21 \pm 0,87
3,12	0,495	24,46 \pm 4,03
1,56	0,194	10,44 \pm 2,17
0,78	-0,107	1,44 \pm 0,87
0,39	-0,408	0,00 \pm 2,17



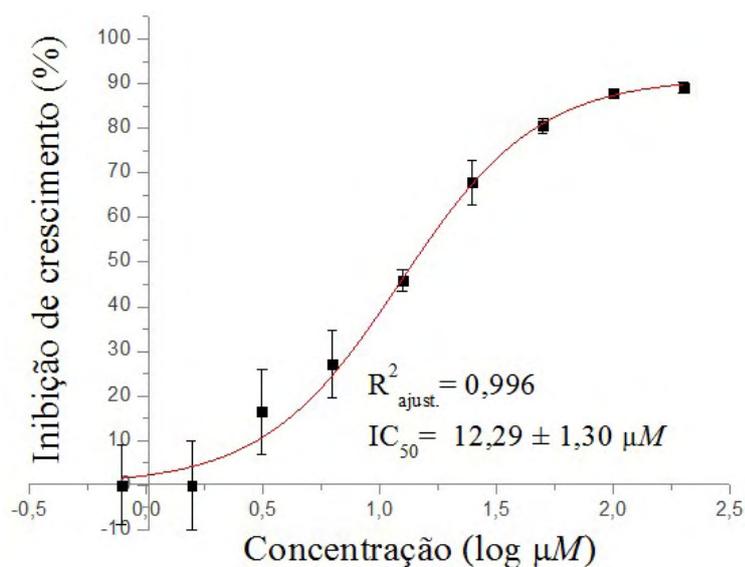
composto 5 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	84,12 \pm 3,65
50,00	1,699	74,11 \pm 4,53
25,00	1,398	66,98 \pm 4,82
12,50	1,097	51,97 \pm 4,25
6,25	0,796	22,70 \pm 1,06
3,12	0,495	6,57 \pm 1,59
1,56	0,194	0,00 \pm 3,71
0,78	-0,107	0,00 \pm 1,12
0,39	-0,408	0,00 \pm 2,12



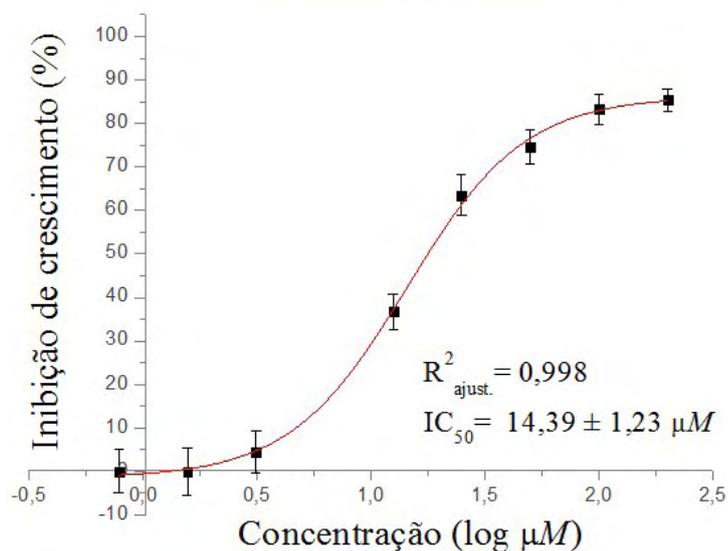
composto 6 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	88,36 \pm 1,57
100,00	2,000	82,21 \pm 1,03
50,00	1,699	77,70 \pm 0,68
25,00	1,398	61,71 \pm 2,41
6,25	0,796	13,96 \pm 3,47
3,12	0,495	0,00 \pm 6,73
1,56	0,194	0,00 \pm 3,33
0,78	-0,107	0,00 \pm 3,05



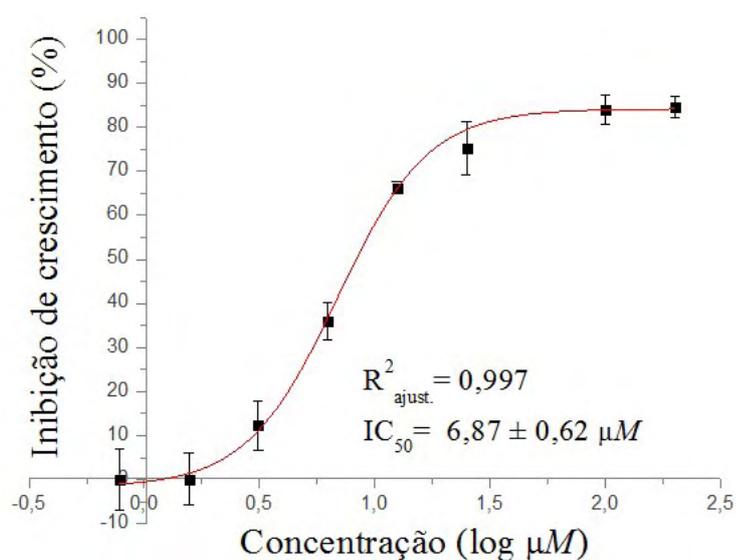
composto 7 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	89,21 \pm 1,23
100,00	2,000	87,91 \pm 0,94
50,00	1,699	80,53 \pm 1,78
25,00	1,398	67,82 \pm 4,97
12,50	1,097	45,89 \pm 2,40
6,25	0,796	27,03 \pm 7,55
3,12	0,495	16,52 \pm 9,55
1,56	0,194	0,00 \pm 9,93
0,78	-0,107	0,00 \pm 8,92



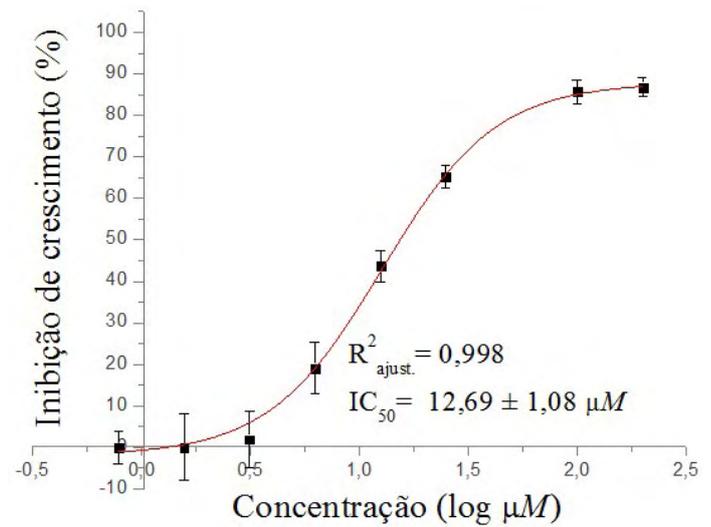
composto 8 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	85,47 \pm 2,56
100,00	2,000	83,26 \pm 3,57
50,00	1,699	74,66 \pm 3,90
25,00	1,398	63,50 \pm 4,71
12,50	1,097	36,76 \pm 4,02
3,12	0,495	4,45 \pm 4,74
1,56	0,194	0,00 \pm 5,52
0,78	-0,107	0,00 \pm 5,00



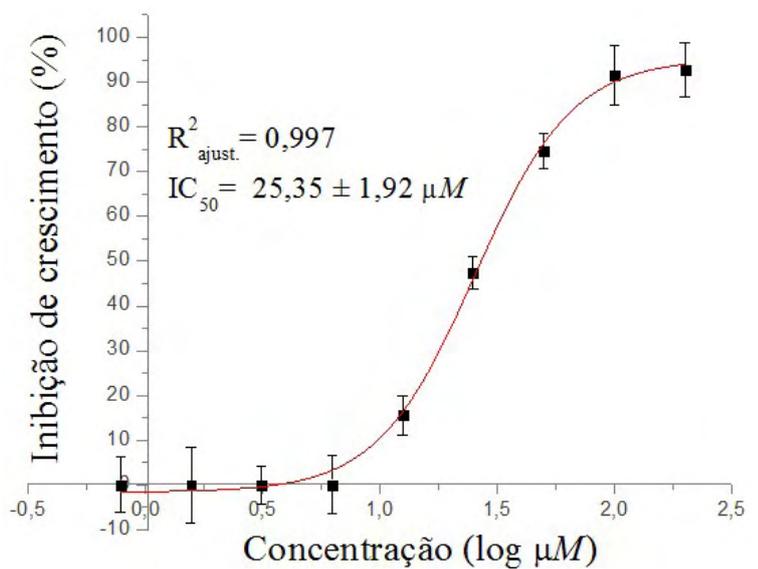
composto 9 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	84,59 \pm 2,53
100,00	2,000	83,90 \pm 3,35
25,00	1,398	75,20 \pm 5,99
12,50	1,097	66,29 \pm 1,36
6,25	0,796	35,83 \pm 4,25
3,12	0,495	12,34 \pm 5,55
1,56	0,194	0,00 \pm 5,88
0,78	-0,107	0,00 \pm 7,06



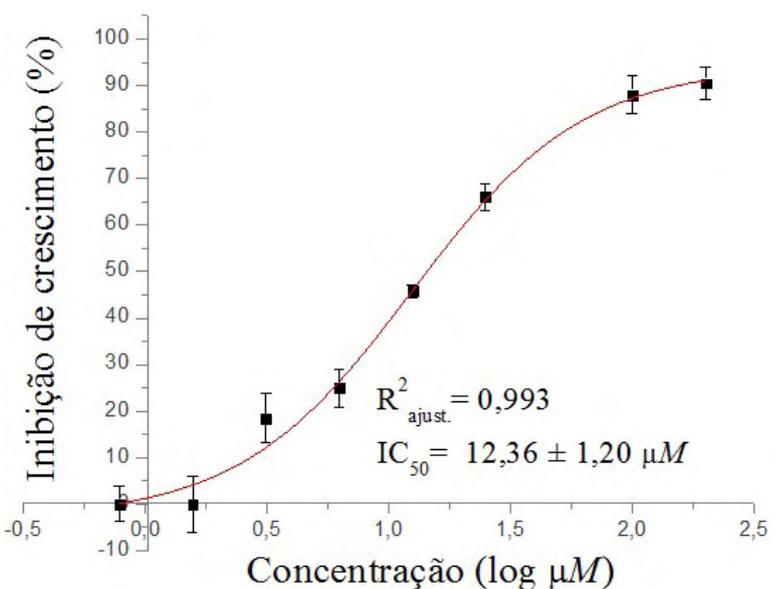
composto 10 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	86,78 \pm 2,34
100,00	2,000	85,64 \pm 2,84
25,00	1,398	65,20 \pm 2,72
12,50	1,097	43,67 \pm 3,71
6,25	0,796	19,09 \pm 6,26
3,12	0,495	1,90 \pm 6,70
1,56	0,194	0,00 \pm 8,05
0,78	-0,107	0,00 \pm 3,99



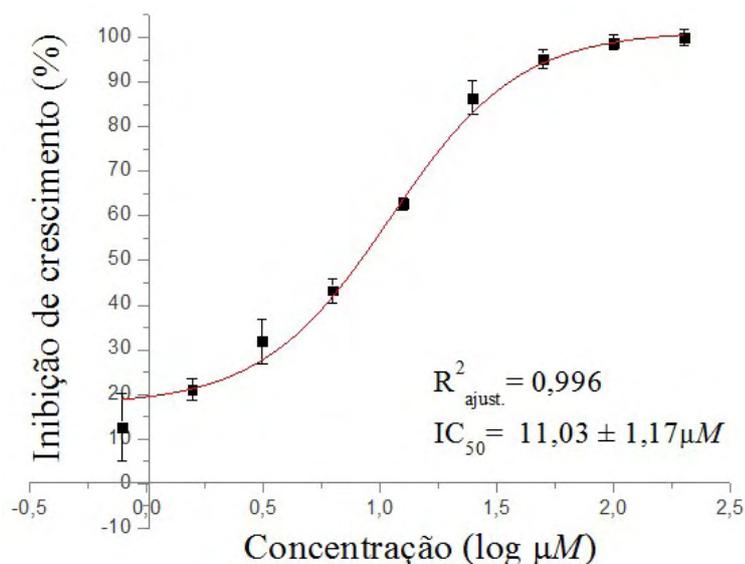
composto 11- Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	94,72 \pm 5,98
100,00	2,000	91,55 \pm 6,74
50,00	1,699	74,65 \pm 3,96
25,00	1,398	47,46 \pm 3,57
12,50	1,097	15,51 \pm 4,36
6,25	0,796	0,00 \pm 6,48
3,12	0,495	0,00 \pm 4,19
1,56	0,194	0,00 \pm 8,47
0,78	-0,107	0,00 \pm 6,15



composto 12 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	90,45 \pm 3,45
100,00	2,000	88,00 \pm 4,00
25,00	1,398	66,00 \pm 2,91
12,50	1,097	45,78 \pm 1,39
6,25	0,796	24,89 \pm 4,02
3,12	0,495	18,46 \pm 5,24
1,56	0,194	0,00 \pm 6,11
0,78	-0,107	0,00 \pm 3,79



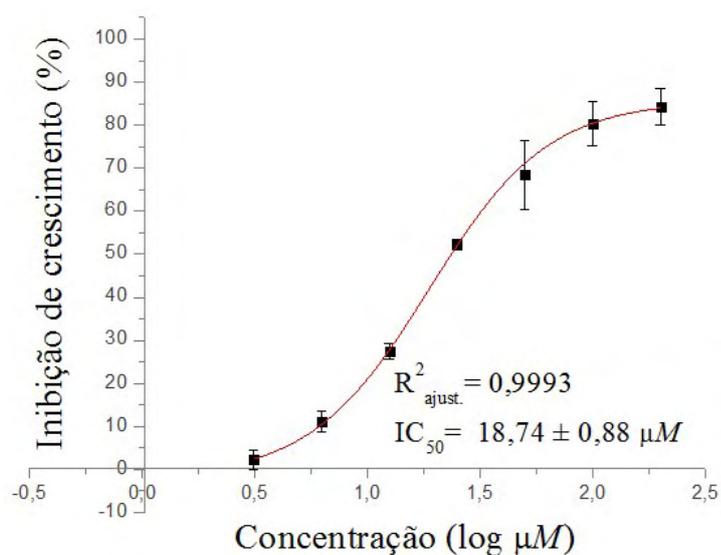
composto 13 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	100,00 \pm 1,67
100,00	2,000	98,81 \pm 1,64
50,00	1,699	95,26 \pm 2,11
25,00	1,398	86,48 \pm 3,83
12,50	1,097	62,75 \pm 1,41
6,25	0,796	43,30 \pm 2,74
3,12	0,495	31,91 \pm 4,92
1,56	0,194	21,00 \pm 2,42
0,78	-0,107	12,69 \pm 7,48



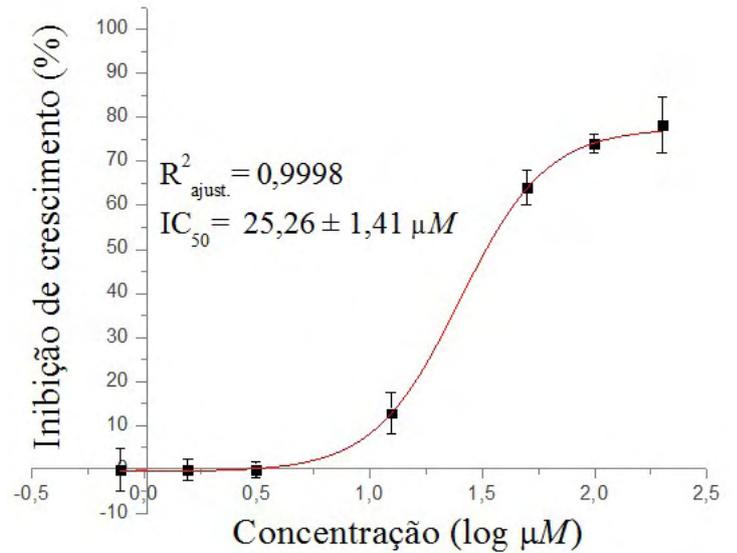
composto 14 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	18,11 \pm 8,38
50,00	1,699	18,00 \pm 3,24
25,00	1,398	15,37 \pm 4,03
12,50	1,097	18,86 \pm 7,52
6,25	0,796	14,68 \pm 2,13
3,12	0,495	6,07 \pm 7,65
1,56	0,194	8,34 \pm 6,48
0,78	-0,107	0,00 \pm 4,64

Valor de IC_{50} não determinado

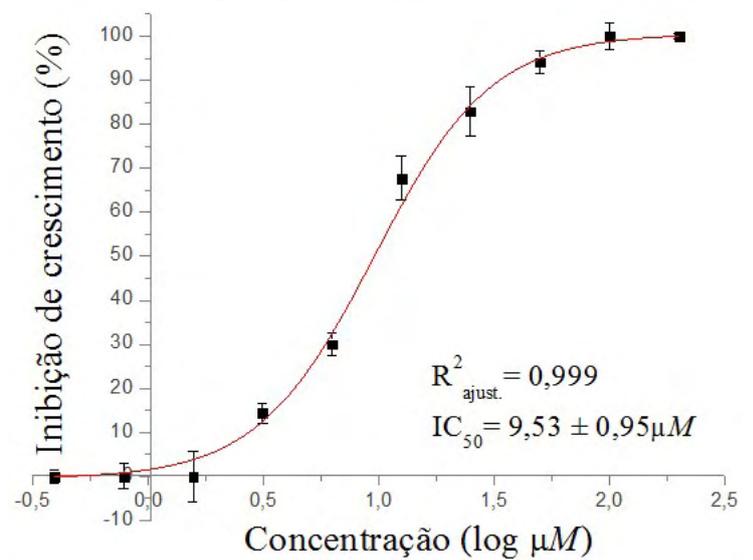
composto 15 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	84,23 \pm 4,25
100,00	2,000	80,30 \pm 5,11
50,00	1,699	68,41 \pm 8,01
25,00	1,398	52,19 \pm 1,10
12,50	1,097	27,45 \pm 1,81
6,25	0,796	11,11 \pm 2,53
3,12	0,495	2,22 \pm 2,32



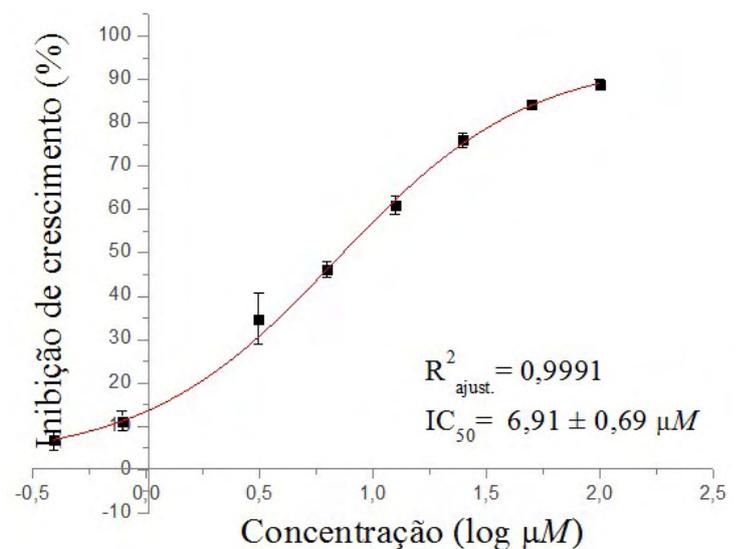
composto 16 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	78,20 \pm 6,30
100,00	2,000	74,00 \pm 2,11
50,00	1,699	64,00 \pm 3,83
12,50	1,097	12,80 \pm 4,74
3,12	0,495	0,00 \pm 1,92
1,56	0,194	0,00 \pm 2,53
0,78	-0,107	0,00 \pm 4,71



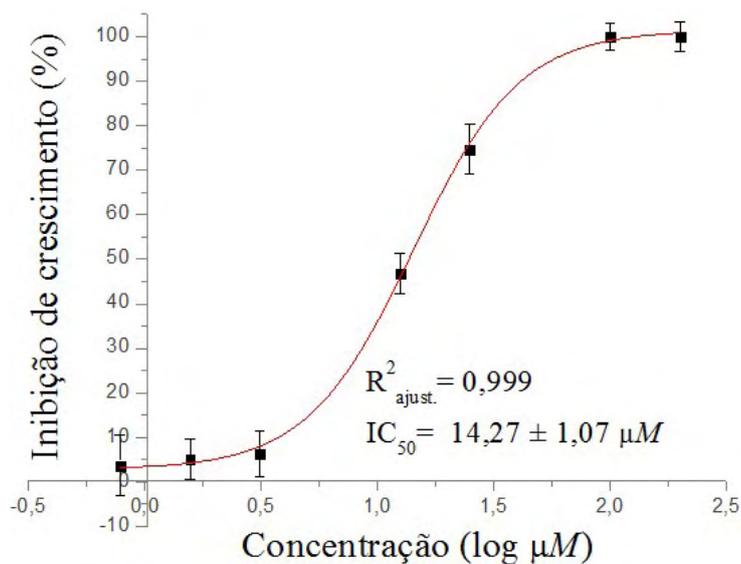
composto 17 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	100,00 \pm 0,71
100,00	2,000	100,00 \pm 3,10
50,00	1,699	94,07 \pm 2,50
25,00	1,398	82,92 \pm 5,65
12,50	1,097	67,73 \pm 5,00
6,25	0,796	30,01 \pm 2,50
3,12	0,495	14,35 \pm 2,17
1,56	0,194	0,00 \pm 5,75
0,78	-0,107	0,00 \pm 2,85
0,39	-0,408	0,00 \pm 1,42



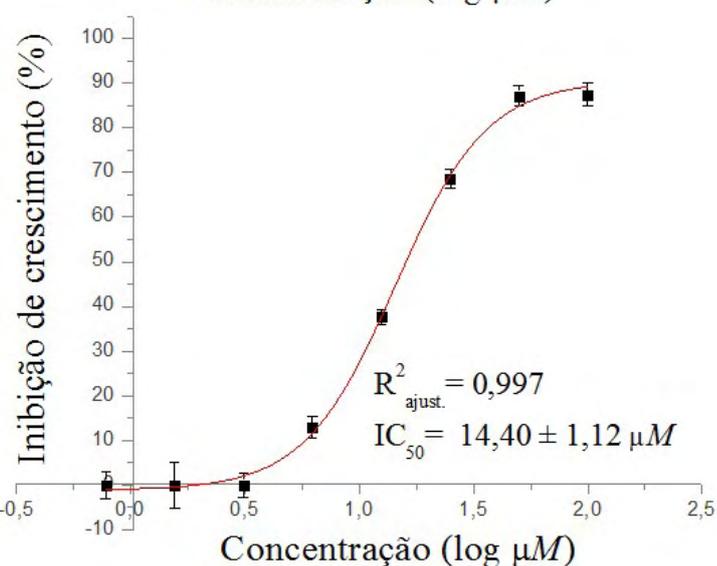
composto 18 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	88,92 \pm 1,09
50,00	1,699	84,17 \pm 0,79
25,00	1,398	76,00 \pm 1,65
12,50	1,097	60,96 \pm 2,00
6,25	0,796	46,19 \pm 1,74
3,12	0,495	34,81 \pm 5,82
0,78	-0,107	11,23 \pm 2,37
0,39	-0,408	6,81 \pm 2,22



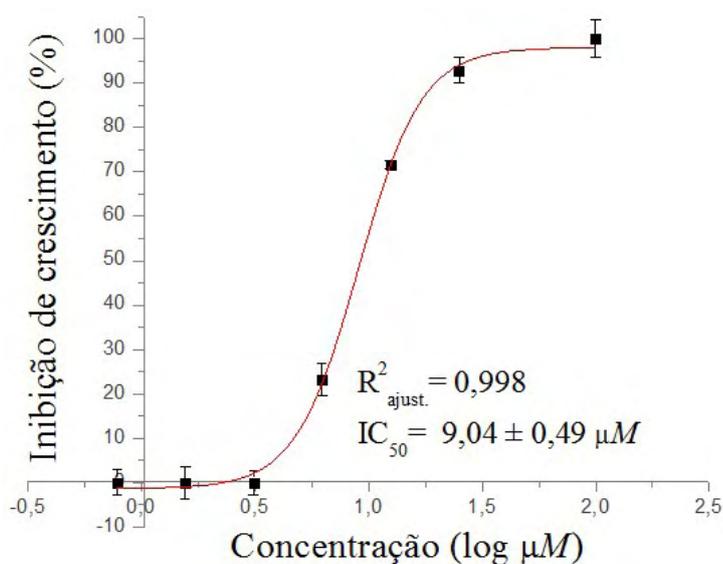
composto 19 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	100,00 \pm 3,45
100,00	2,000	100,00 \pm 3,06
25,00	1,398	74,69 \pm 5,58
12,50	1,097	46,81 \pm 4,46
3,12	0,495	6,27 \pm 5,18
1,56	0,194	5,10 \pm 4,61
0,78	-0,107	3,69 \pm 6,92



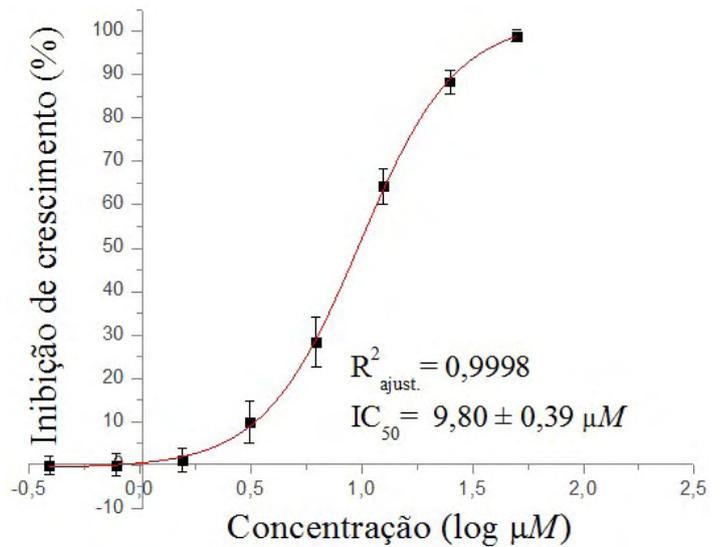
composto 20 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	87,33 \pm 2,57
50,00	1,699	87,11 \pm 2,35
25,00	1,398	68,56 \pm 2,18
12,50	1,097	37,57 \pm 1,80
6,25	0,796	12,92 \pm 2,38
3,12	0,495	0,00 \pm 2,74
1,56	0,194	0,00 \pm 5,09
0,78	-0,107	0,00 \pm 3,11



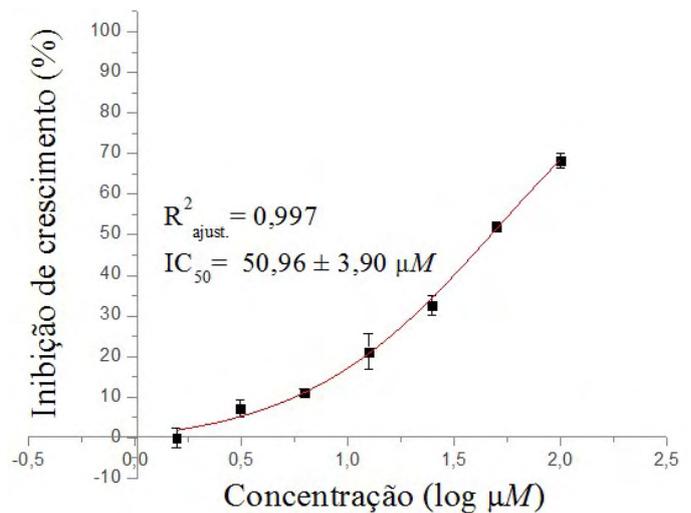
composto 21 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	100,00 \pm 4,11
25,00	1,398	92,84 \pm 2,87
12,50	1,097	71,61 \pm 0,92
6,25	0,796	23,32 \pm 3,59
3,12	0,495	0,00 \pm 2,80
1,56	0,194	0,00 \pm 3,68
0,78	-0,107	0,00 \pm 2,87



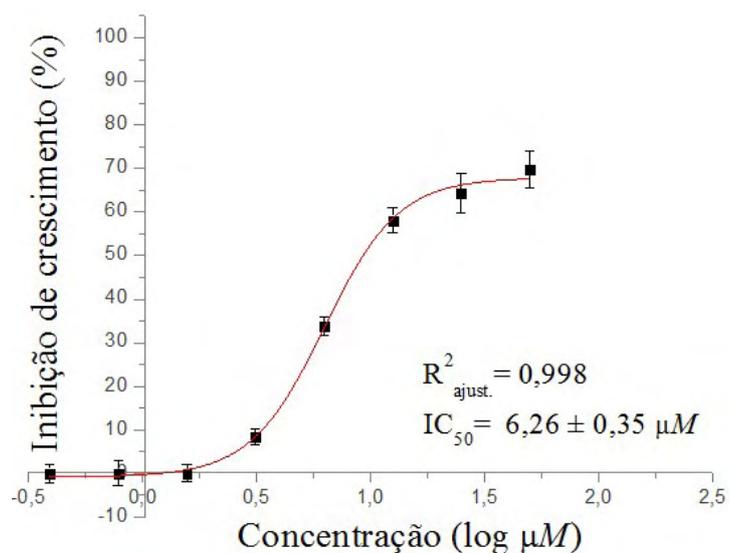
composto 22 - Bug 2149 cl10			
concentração		IC (%)	
μM	log μM	(média \pm dp)	
50,00	1,699	98,86	$\pm 1,30$
25,00	1,398	88,34	$\pm 2,70$
12,50	1,097	64,24	$\pm 4,16$
6,25	0,796	28,29	$\pm 5,78$
3,12	0,495	9,86	$\pm 4,76$
1,56	0,194	1,23	$\pm 2,72$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 2,55$
0,39	-0,408	0,00	$\pm 2,08$



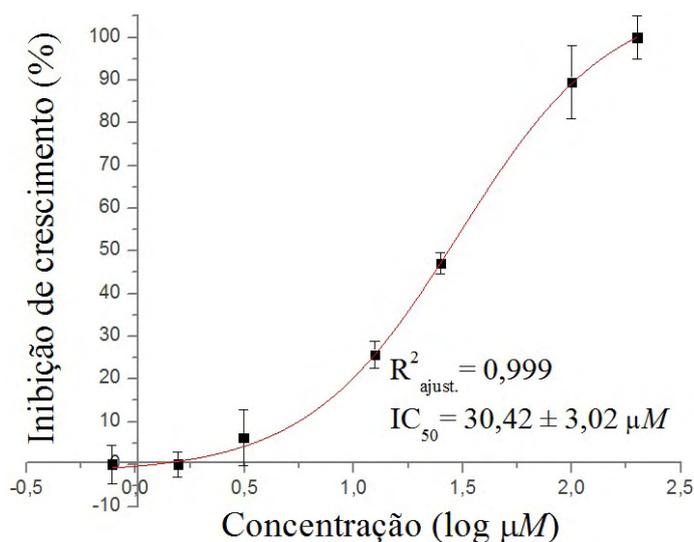
composto 23 - Bug 2149 cl10			
concentração		IC (%)	
μM	log μM	(média \pm dp)	
100,00	2,000	68,16	$\pm 1,84$
50,00	1,699	51,97	$\pm 1,22$
25,00	1,398	32,60	$\pm 2,40$
12,50	1,097	21,19	$\pm 4,43$
6,25	0,796	11,11	$\pm 0,92$
3,12	0,495	7,23	$\pm 2,10$
1,56	0,194	0,00	$\pm 2,39$



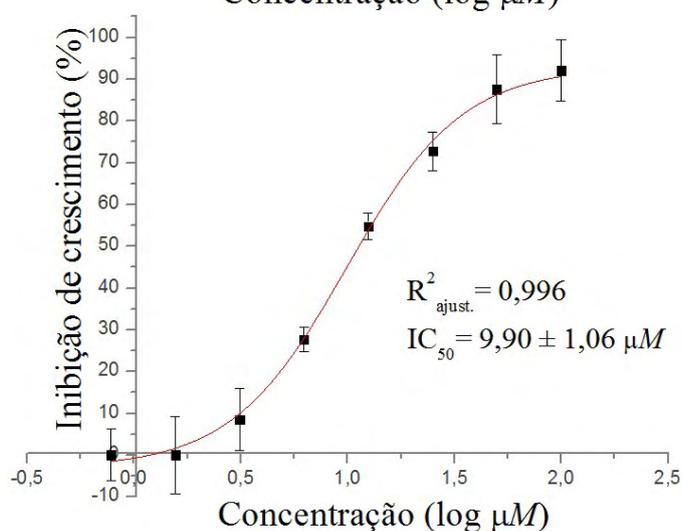
composto 24 - Bug 2149 cl10			
concentração		IC (%)	
μM	log μM	(média \pm dp)	
50,00	1,699	69,80	$\pm 4,18$
25,00	1,398	64,27	$\pm 4,47$
12,50	1,097	58,06	$\pm 2,85$
6,25	0,796	33,70	$\pm 2,10$
3,12	0,495	8,47	$\pm 1,83$
1,56	0,194	0,00	$\pm 1,91$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 2,81$
0,39	-0,408	0,00	$\pm 2,21$



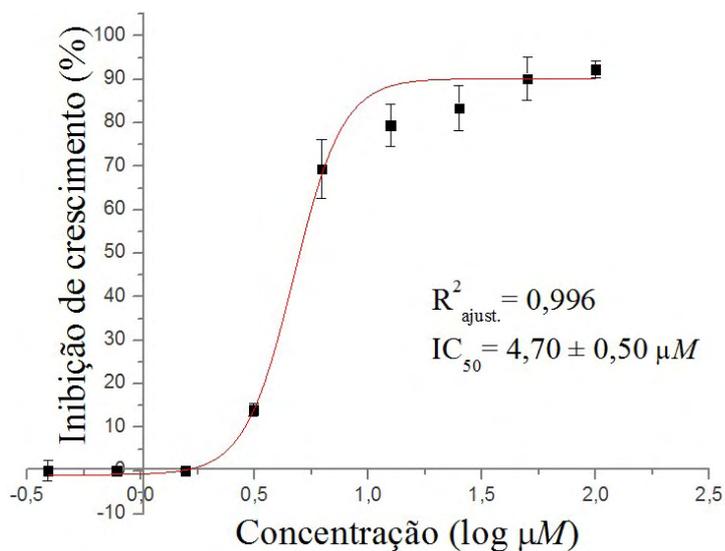
composto 25 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	100,00 \pm 5,00
100,00	2,000	89,50 \pm 8,48
25,00	1,398	47,07 \pm 2,42
12,50	1,097	25,63 \pm 3,07
3,12	0,495	6,20 \pm 6,60
1,56	0,194	0,00 \pm 2,92
0,78	-0,107	0,00 \pm 4,46



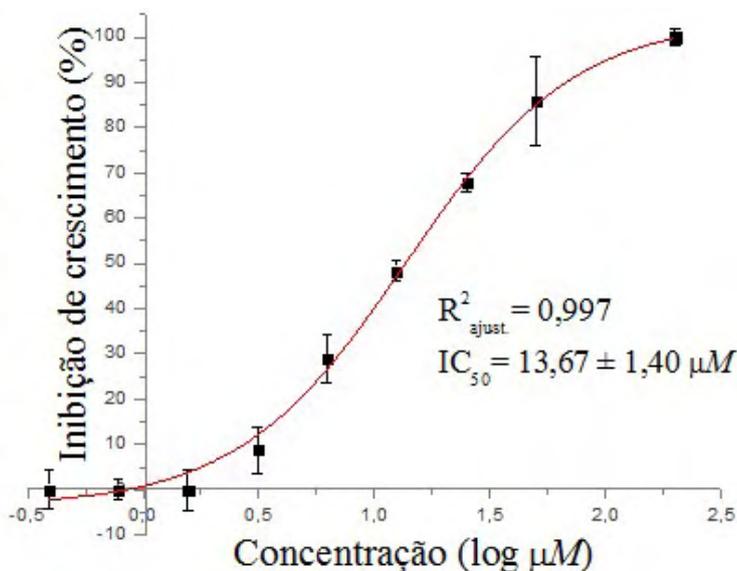
Composto 26 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	92,09 \pm 7,28
50,00	1,699	87,57 \pm 8,17
25,00	1,398	72,75 \pm 4,65
12,50	1,097	54,80 \pm 3,13
6,25	0,796	27,68 \pm 2,99
3,12	0,495	8,47 \pm 7,41
1,56	0,194	0,00 \pm 9,20
0,78	-0,107	0,00 \pm 6,22



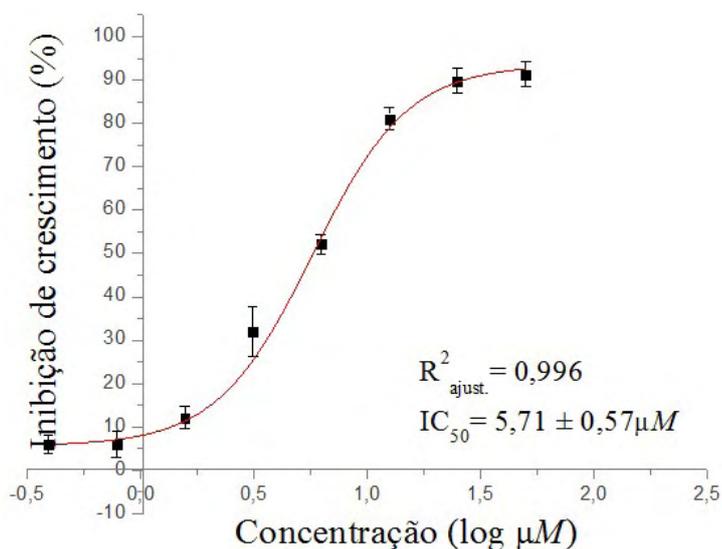
composto 27 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	92,31 \pm 1,84
50,00	1,699	90,17 \pm 4,87
25,00	1,398	83,47 \pm 5,15
12,50	1,097	79,45 \pm 4,75
6,25	0,796	69,40 \pm 6,74
3,12	0,495	14,01 \pm 1,39
1,56	0,194	0,00 \pm 0,39
0,78	-0,107	0,00 \pm 1,02
0,39	-0,408	0,00 \pm 2,32



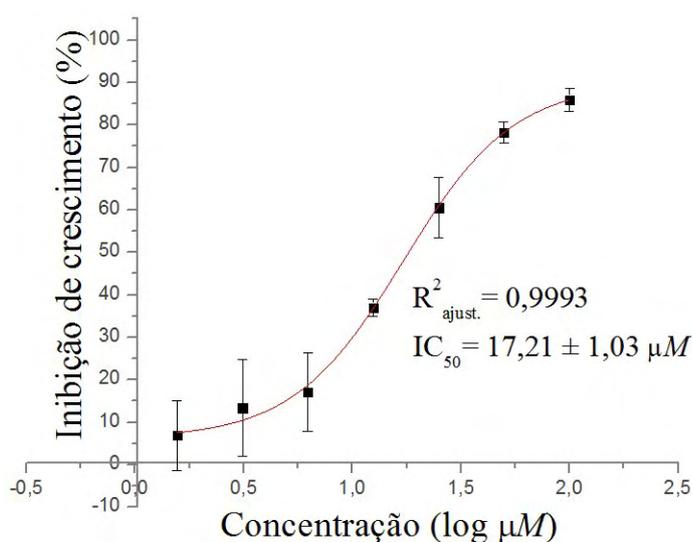
composto 28 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	100,00 \pm 2,00
50,00	1,699	85,87 \pm 9,84
25,00	1,398	67,80 \pm 2,12
12,50	1,097	48,33 \pm 2,23
6,25	0,796	28,87 \pm 5,31
3,12	0,495	8,72 \pm 5,03
1,56	0,194	0,00 \pm 4,47
0,78	-0,107	0,00 \pm 2,12
0,39	-0,408	0,00 \pm 4,23



composto 29 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
50,00	1,699	91,23 \pm 2,87
25,00	1,398	89,81 \pm 2,87
12,50	1,097	81,04 \pm 2,63
6,25	0,796	52,12 \pm 2,21
3,12	0,495	31,97 \pm 5,84
1,56	0,194	12,06 \pm 2,57
0,78	-0,107	5,90 \pm 2,96
0,39	-0,408	5,90 \pm 2,12



composto 30 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	85,90 \pm 2,62
50,00	1,699	78,28 \pm 2,43
25,00	1,398	60,49 \pm 7,04
12,50	1,097	36,92 \pm 2,08
6,25	0,796	17,04 \pm 9,21
3,12	0,495	13,33 \pm 10,30
1,56	0,194	6,87 \pm 8,21

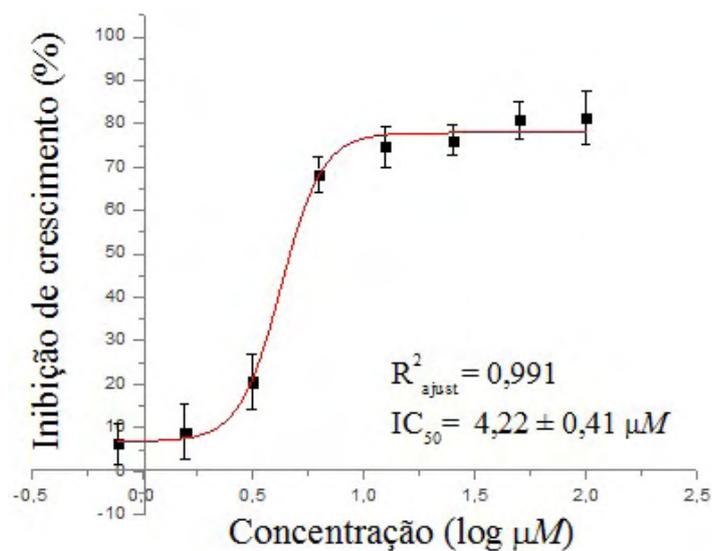
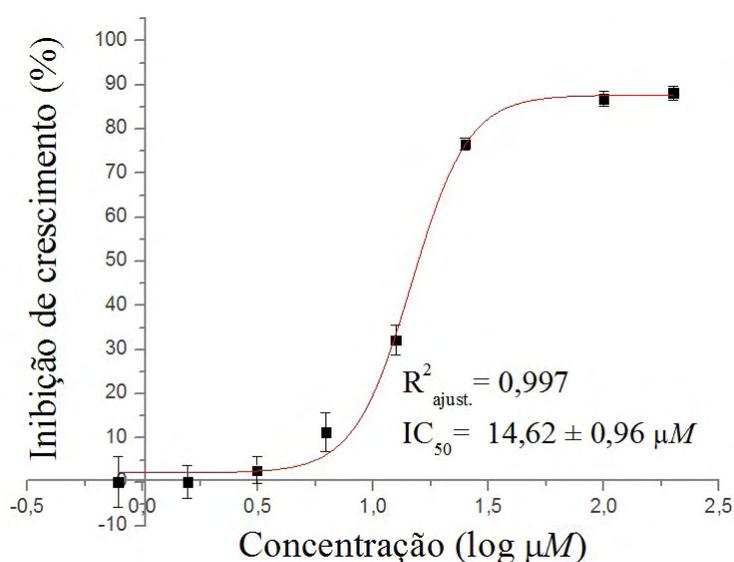


composto 31 - Bug 2149 cl10			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
50,00	1,699	15,91	$\pm 3,02$
25,00	1,398	14,40	$\pm 1,22$
12,50	1,097	12,23	$\pm 1,71$
6,25	0,796	12,12	$\pm 4,50$
3,12	0,495	12,03	$\pm 1,12$
1,56	0,194	11,40	$\pm 3,54$
0,78	-0,107	10,55	$\pm 6,94$

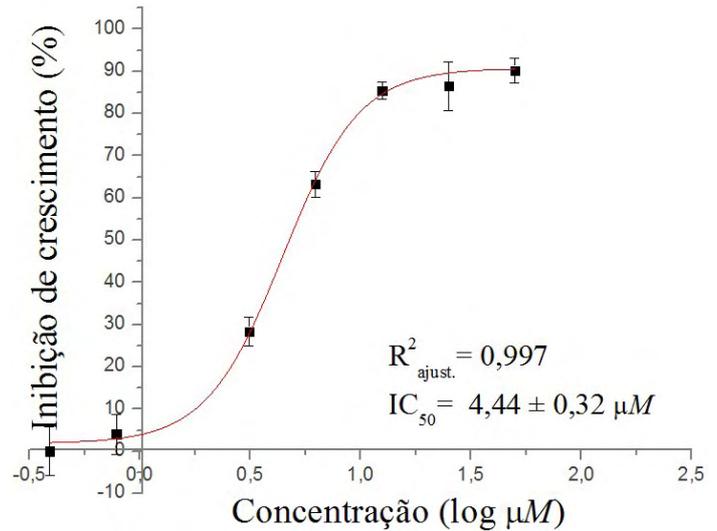
composto 32 - Bug 2149 cl10			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
200,00	2,301	88,21	$\pm 1,59$
100,00	2,000	86,89	$\pm 1,68$
25,00	1,398	76,67	$\pm 1,33$
12,50	1,097	32,22	$\pm 3,36$
6,25	0,796	11,33	$\pm 4,40$
3,12	0,495	2,67	$\pm 3,06$
1,56	0,194	0,00	$\pm 3,79$
0,78	-0,107	0,00	$\pm 5,67$

composto 33 - Bug 2149 cl10			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
100,00	2,000	81,49	$\pm 6,22$
50,00	1,699	80,79	$\pm 4,20$
25,00	1,398	76,14	$\pm 3,45$
12,50	1,097	74,75	$\pm 4,70$
6,25	0,796	68,36	$\pm 4,07$
3,12	0,495	20,53	$\pm 6,22$
1,56	0,194	8,99	$\pm 6,39$
0,78	-0,107	6,21	$\pm 4,79$

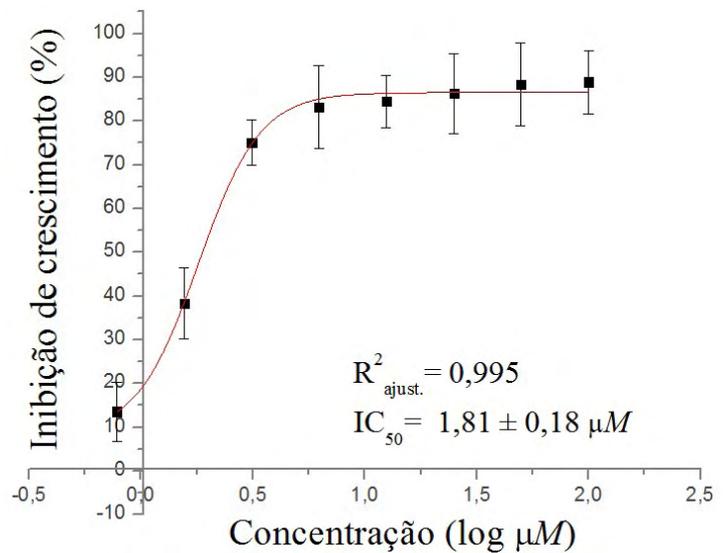
Valor de IC_{50} não determinado



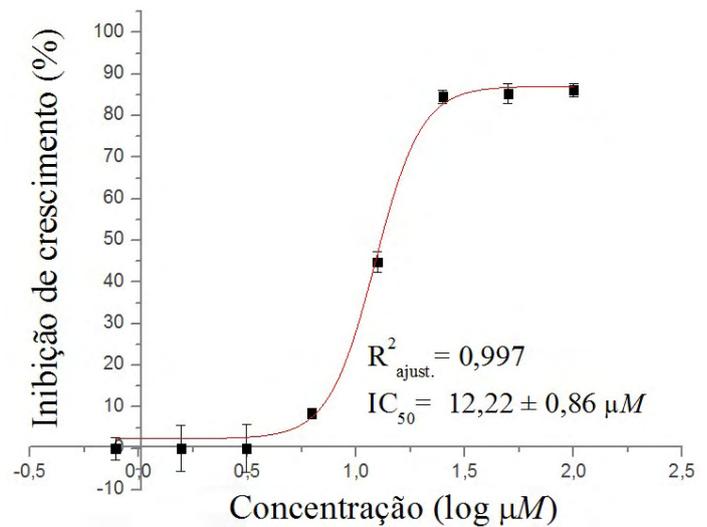
composto 34 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média ± dp)
50,00	1,699	90,20 ±2,95
25,00	1,398	86,49 ±5,68
12,50	1,097	85,47 ±2,03
6,25	0,796	63,28 ±3,02
3,12	0,495	28,38 ±3,38
0,78	-0,107	4,05 ±4,73
0,39	-0,408	0,00 ±5,77



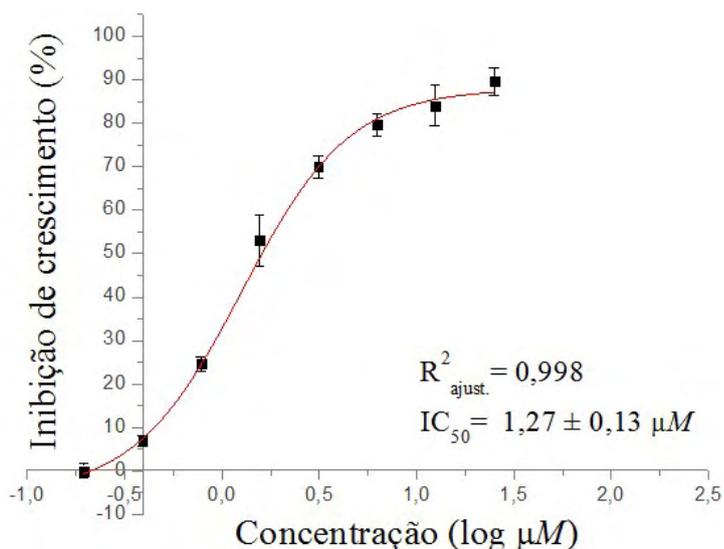
composto 35 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média ± dp)
100,00	2,000	88,93 ±7,24
50,00	1,699	88,41 ±9,46
25,00	1,398	86,30 ±9,13
12,50	1,097	84,49 ±5,99
6,25	0,796	83,14 ±9,51
3,12	0,495	75,05 ±5,22
1,56	0,194	38,34 ±8,17
0,78	-0,107	13,57 ±6,74



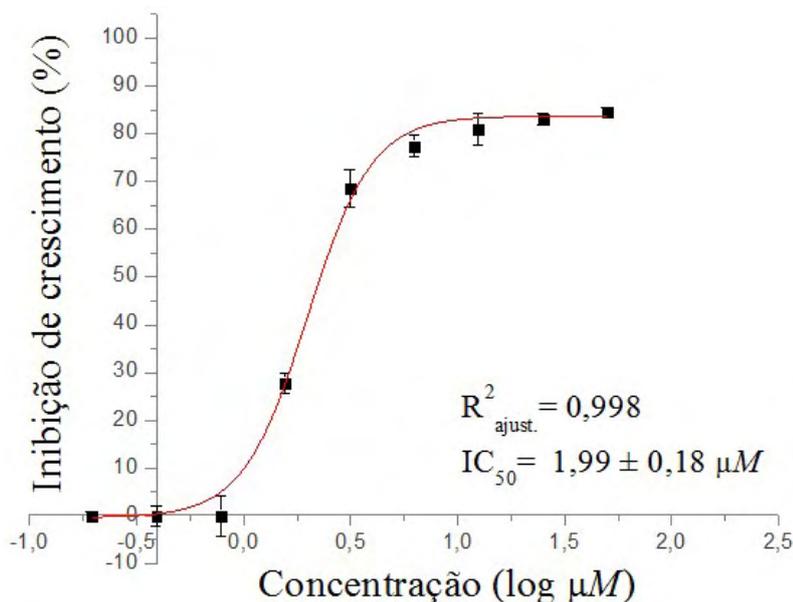
composto 36 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média ± dp)
100,00	2,000	86,20 ±1,57
50,00	1,699	82,13 ±2,74
25,00	1,398	84,62 ±1,57
12,50	1,097	44,81 ±2,57
6,25	0,796	8,40 ±1,18
3,12	0,495	0,00 ±5,69
1,56	0,194	0,00 ±5,48
0,78	-0,107	0,00 ±2,71



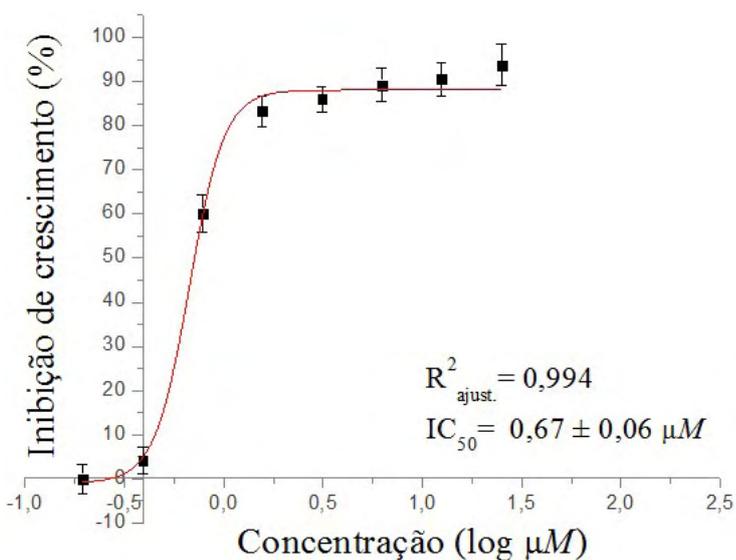
composto 37 - Bug 2149 cl10		
concentração	IC (%)	
μM	log μM	(média \pm dp)
25,00	1,398	89,57 \pm 3,29
12,50	1,097	84,08 \pm 4,62
6,25	0,796	79,60 \pm 2,43
3,12	0,495	69,90 \pm 2,68
1,56	0,194	53,02 \pm 5,87
0,78	-0,107	24,63 \pm 1,69
0,39	-0,408	6,97 \pm 1,26
0,20	-0,709	0,00 \pm 1,69



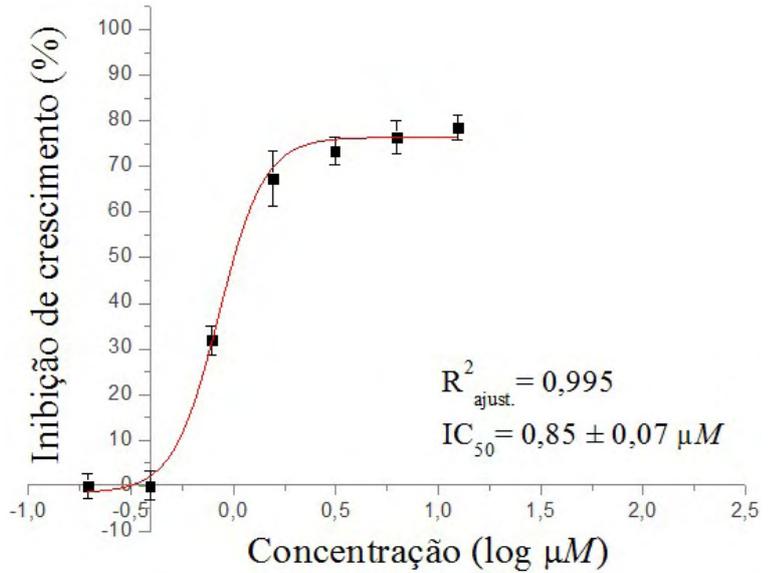
composto 38 - Bug 2149 cl10		
concentração	IC (%)	
μM	log μM	(média \pm dp)
50,00	1,699	84,58 \pm 0,86
25,00	1,398	83,08 \pm 1,14
12,50	1,097	80,85 \pm 3,37
6,25	0,796	77,36 \pm 2,28
3,12	0,495	68,66 \pm 3,95
1,56	0,194	27,86 \pm 2,15
0,78	-0,107	0,00 \pm 4,16
0,39	-0,408	0,00 \pm 2,15
0,20	-0,709	0,00 \pm 0,86



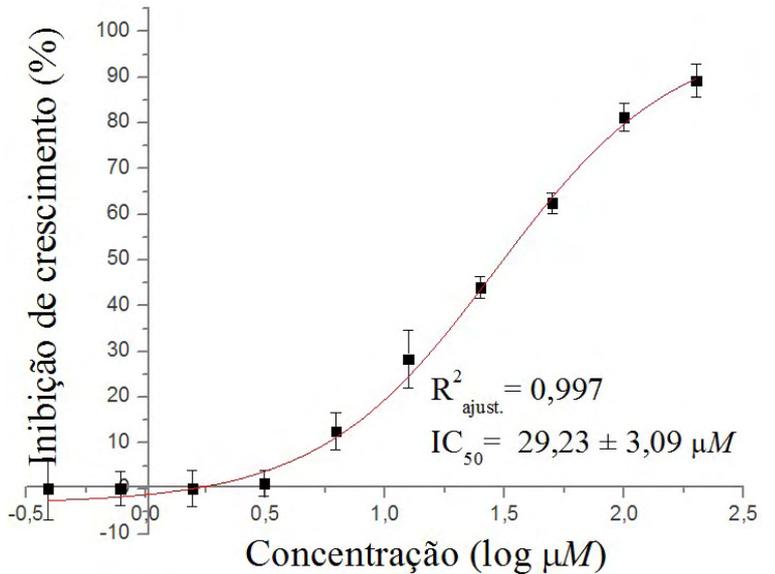
composto 39 - Bug 2149 cl10		
concentração	IC (%)	
μM	log μM	(média \pm dp)
25,00	1,398	93,74 \pm 4,71
12,50	1,097	90,49 \pm 3,85
6,25	0,796	89,23 \pm 3,78
3,12	0,495	85,98 \pm 2,84
1,56	0,194	83,22 \pm 3,55
0,78	-0,107	60,19 \pm 4,24
0,39	-0,408	4,10 \pm 3,00
0,20	-0,709	0,00 \pm 3,24



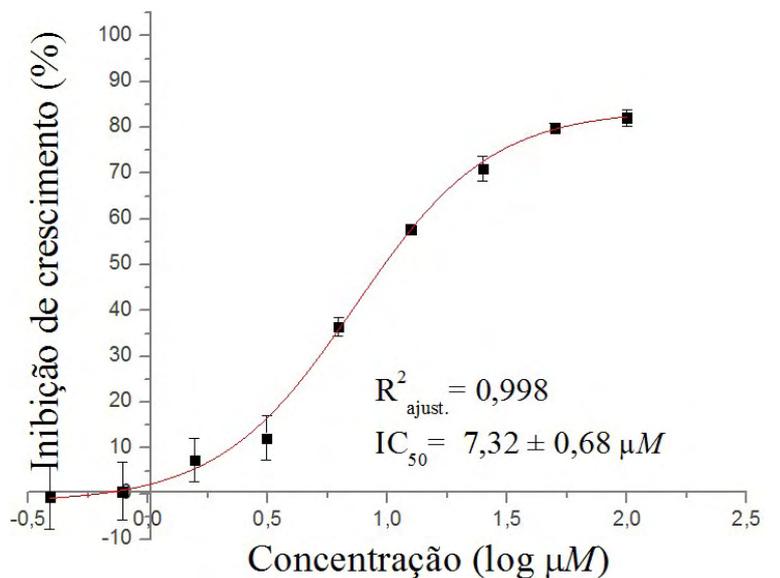
composto 40 - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
12,50	1,097	78,47 \pm 2,64
6,25	0,796	76,46 \pm 3,55
3,12	0,495	73,46 \pm 3,04
1,56	0,194	67,45 \pm 6,07
0,78	-0,107	31,89 \pm 3,13
0,39	-0,408	0,00 \pm 3,13
0,20	-0,709	0,00 \pm 2,71



benznidazol - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	89,27 \pm 3,55
100,00	2,000	81,25 \pm 3,00
50,00	1,699	62,50 \pm 2,23
25,00	1,398	43,99 \pm 2,35
12,50	1,097	28,40 \pm 6,35
6,25	0,796	12,57 \pm 4,02
3,12	0,495	1,13 \pm 2,77
1,56	0,194	0,00 \pm 4,02
0,78	-0,107	0,00 \pm 3,75
0,39	-0,408	0,00 \pm 6,75



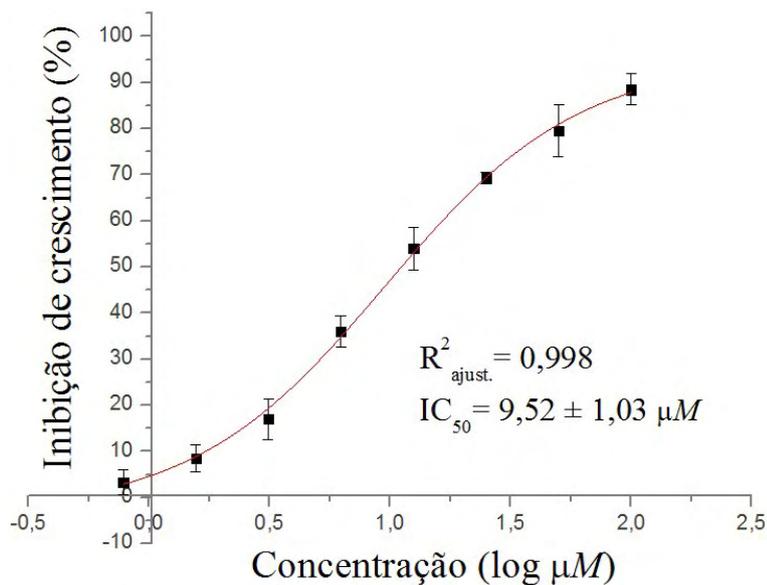
nifurtimox - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	82,13 \pm 1,84
50,00	1,699	79,87 \pm 1,05
25,00	1,398	70,95 \pm 2,77
12,50	1,097	57,69 \pm 1,05
6,25	0,796	36,42 \pm 1,98
3,12	0,495	12,18 \pm 4,82
1,56	0,194	7,38 \pm 4,75
0,78	-0,107	0,51 \pm 6,29
0,39	-0,408	-0,63 \pm 7,14



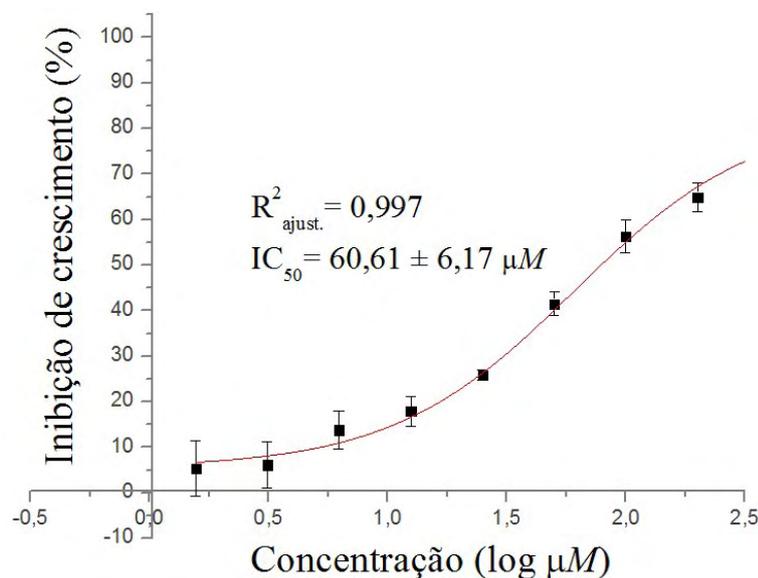
nifuroxazida - Bug 2149 cl10		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
300,00	2,477	49,58 \pm 9,32
150,00	2,176	28,02 \pm 5,14
75,00	1,875	27,29 \pm 1,51
37,50	1,574	11,59 \pm 6,44
18,75	1,273	0,00 \pm 5,24
9,37	0,972	0,00 \pm 7,63
4,69	0,671	0,00 \pm 5,07
2,34	0,370	0,00 \pm 8,46

IC₅₀ obtido experimentalmente (próximo à 300 μM)

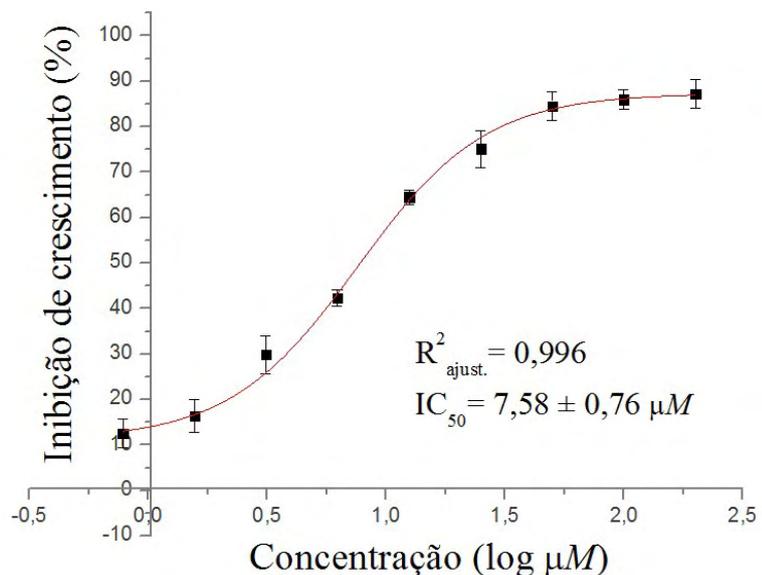
composto 1 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	88,50 \pm 3,38
50,00	1,699	79,55 \pm 5,57
25,00	1,398	69,33 \pm 1,28
12,50	1,097	53,99 \pm 4,61
6,25	0,796	36,05 \pm 3,32
3,12	0,495	17,01 \pm 4,47
1,56	0,194	8,50 \pm 2,91
0,78	-0,107	3,36 \pm 2,66



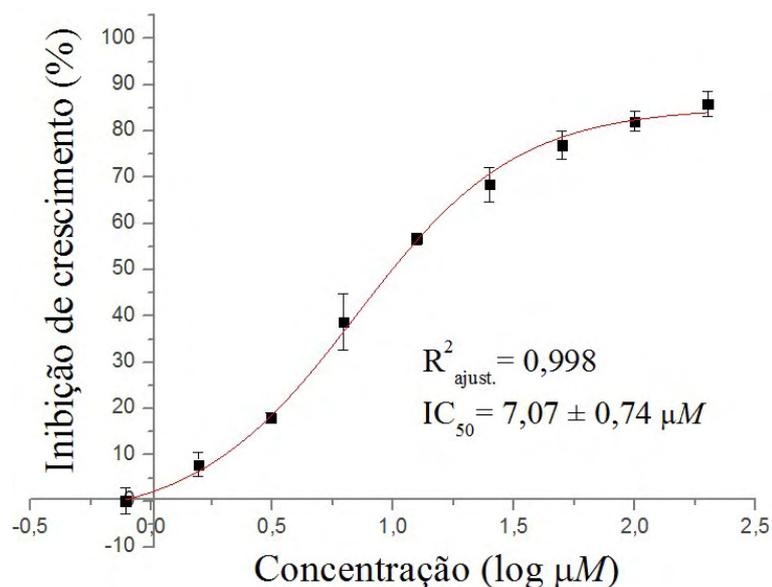
composto 2 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
400,00	2,602	75,17 \pm 2,36
200,00	2,301	64,97 \pm 2,18
100,00	2,000	56,30 \pm 3,56
50,00	1,699	41,50 \pm 2,57
25,00	1,398	25,85 \pm 1,12
12,50	1,097	17,93 \pm 3,28
6,25	0,796	13,78 \pm 2,16
3,12	0,495	6,12 \pm 4,08
1,56	0,194	3,34 \pm 5,12



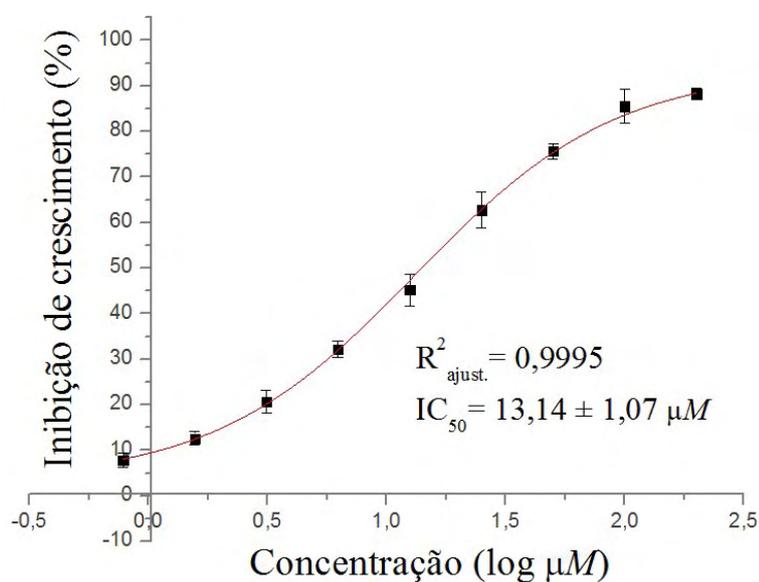
composto 3 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	87,24 \pm 3,16
100,00	2,000	85,95 \pm 2,19
50,00	1,699	84,54 \pm 3,22
25,00	1,398	75,14 \pm 4,04
12,50	1,097	64,51 \pm 1,61
6,25	0,796	42,35 \pm 1,83
3,12	0,495	29,84 \pm 4,22
1,56	0,194	16,38 \pm 3,65
0,78	-0,107	12,52 \pm 3,22



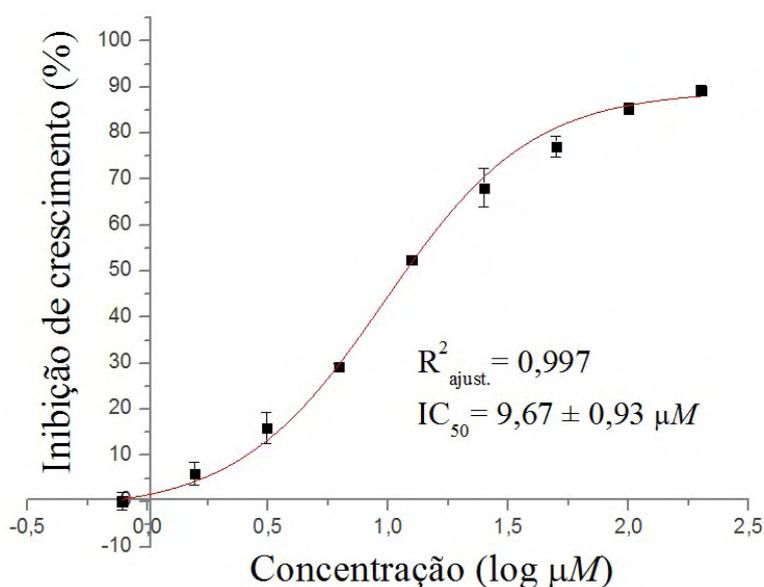
composto 4 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	85,89 \pm 2,79
100,00	2,000	82,08 \pm 2,11
50,00	1,699	76,95 \pm 3,04
25,00	1,398	68,43 \pm 3,79
12,50	1,097	56,70 \pm 1,22
6,25	0,796	38,76 \pm 6,11
3,12	0,495	17,98 \pm 1,19
1,56	0,194	7,89 \pm 2,65
0,78	-0,107	0,00 \pm 2,79



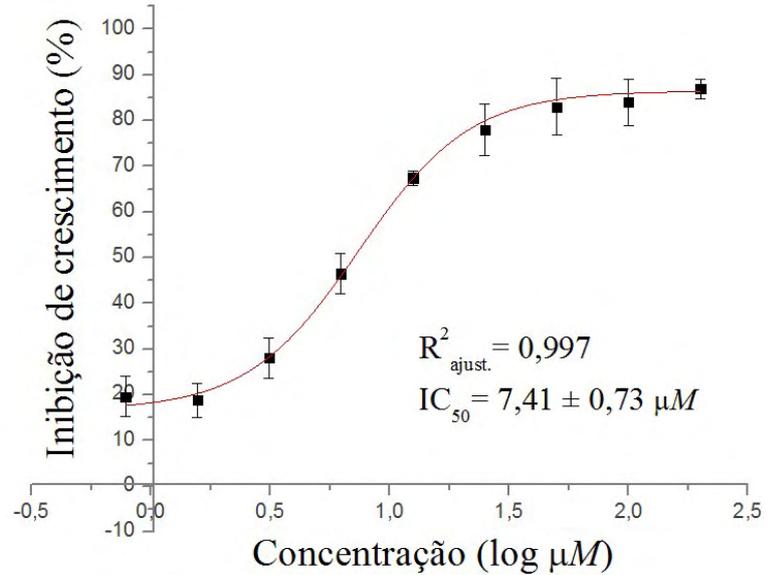
composto 5 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	88,20 \pm 1,23
100,00	2,000	85,52 \pm 3,79
50,00	1,699	75,65 \pm 1,76
25,00	1,398	62,76 \pm 4,03
12,50	1,097	45,18 \pm 3,52
6,25	0,796	32,19 \pm 1,76
3,12	0,495	20,64 \pm 2,52
1,56	0,194	12,63 \pm 1,52
0,78	-0,107	7,77 \pm 1,63



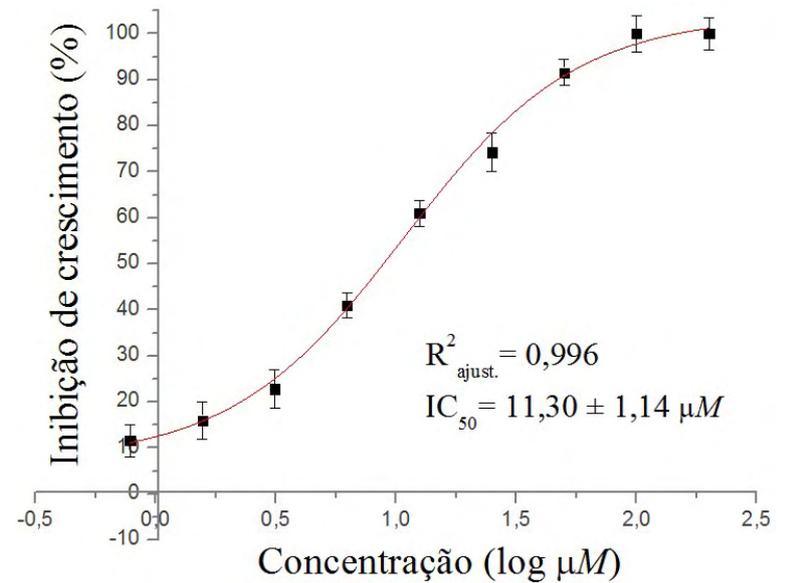
composto 6 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	89,28 \pm 1,14
100,00	2,000	85,34 \pm 1,19
50,00	1,699	77,12 \pm 2,23
25,00	1,398	68,12 \pm 4,22
12,50	1,097	52,46 \pm 0,70
6,25	0,796	29,19 \pm 0,76
3,12	0,495	15,93 \pm 3,45
1,56	0,194	5,99 \pm 2,45
0,78	-0,107	0,00 \pm 1,87



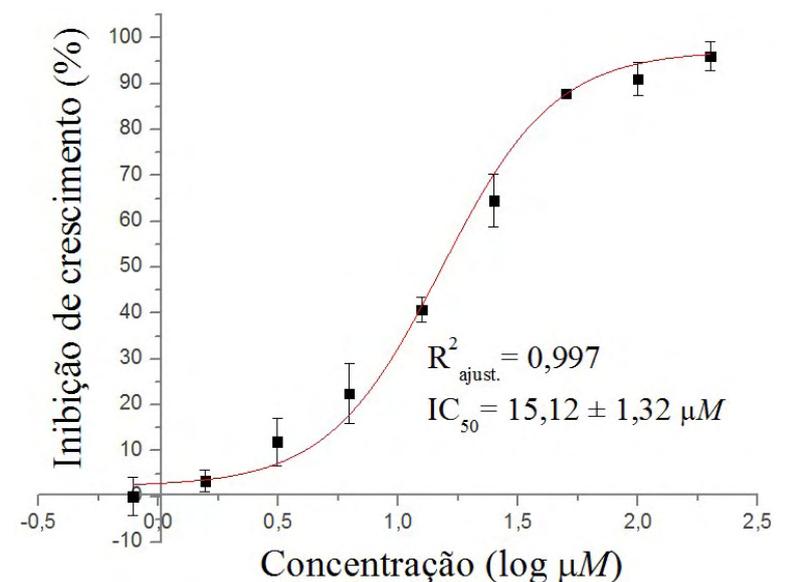
composto 7 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média ± dp)
200,00	2,301	100,00 ±3,41
100,00	2,000	100,00 ±3,98
50,00	1,699	91,56 ±2,84
25,00	1,398	74,27 ±4,27
12,50	1,097	61,01 ±2,84
6,25	0,796	40,90 ±2,71
3,13	0,495	22,81 ±4,27
1,56	0,194	15,98 ±3,98
0,78	-0,107	11,56 ±3,41



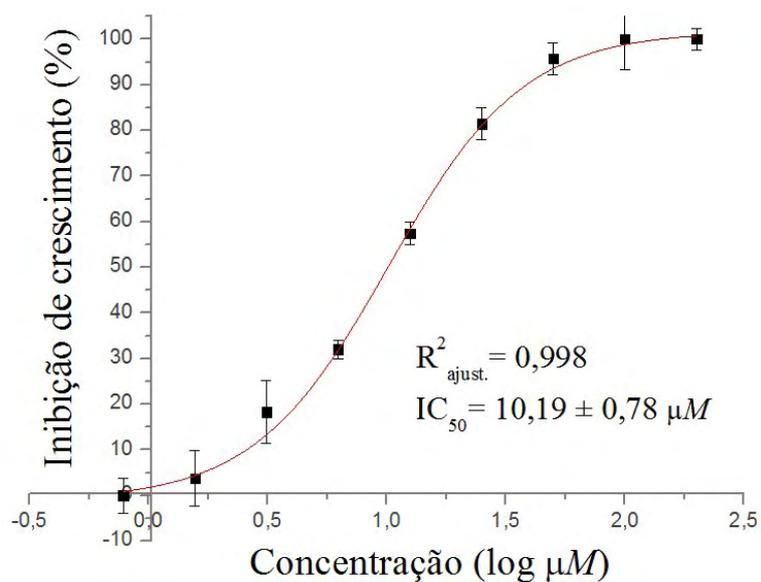
composto 8 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média ± dp)
200,00	2,301	87,00 ±2,14
100,00	2,000	84,00 ±5,10
50,00	1,699	83,00 ±6,25
25,00	1,398	78,00 ±5,69
12,50	1,097	67,44 ±1,57
6,25	0,796	46,53 ±4,39
3,13	0,495	28,04 ±4,39
1,56	0,194	18,79 ±3,69
0,78	-0,107	19,60 ±4,39



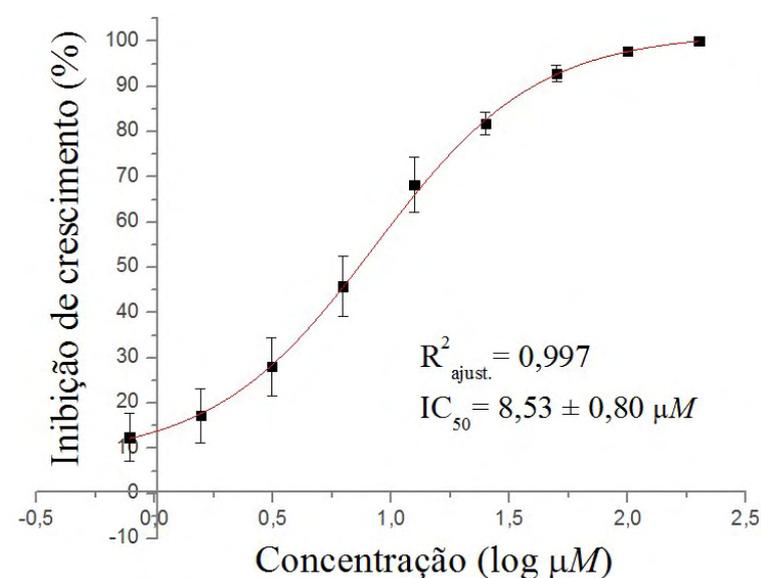
composto 9 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média ± dp)
200,00	2,301	95,98 ±3,22
100,00	2,000	91,04 ±3,55
50,00	1,699	87,93 ±0,55
25,00	1,398	64,56 ±5,75
12,50	1,097	40,76 ±2,77
6,25	0,796	22,50 ±6,47
3,13	0,495	11,98 ±5,22
1,56	0,194	3,41 ±2,30
0,78	-0,107	0,00 ±4,22



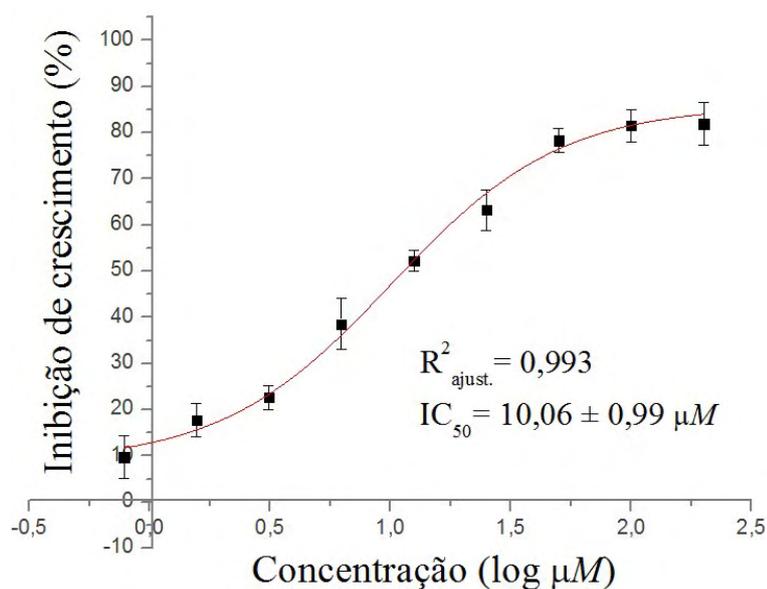
composto 10 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	100,00 \pm 2,28
100,00	2,000	100,00 \pm 6,61
50,00	1,699	95,72 \pm 3,55
25,00	1,398	81,46 \pm 3,55
12,50	1,097	57,45 \pm 2,55
6,25	0,796	32,03 \pm 2,02
3,13	0,495	18,32 \pm 6,91
1,56	0,194	3,77 \pm 6,06
0,78	-0,107	0,00 \pm 3,86



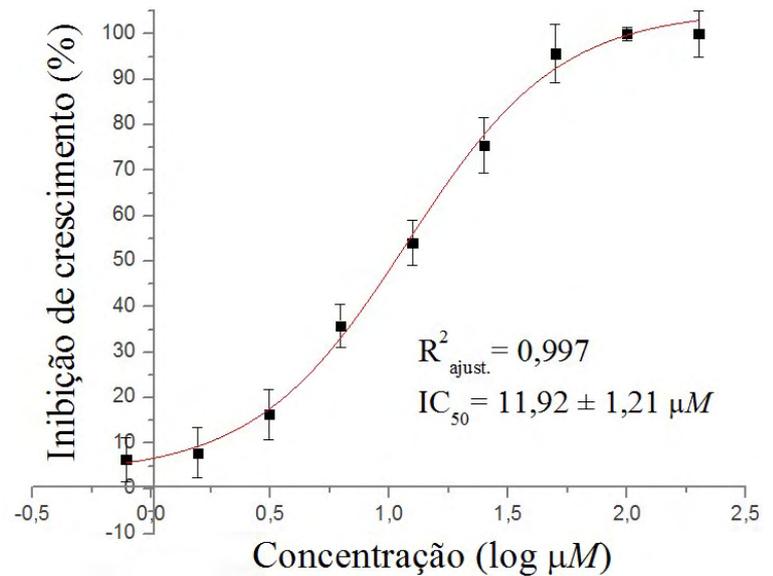
composto 11 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	100,00 \pm 0,61
100,00	2,000	97,83 \pm 0,61
50,00	1,699	92,83 \pm 1,84
25,00	1,398	81,80 \pm 2,45
12,50	1,097	68,23 \pm 6,06
6,25	0,796	45,83 \pm 6,74
3,13	0,495	28,06 \pm 6,35
1,56	0,194	17,23 \pm 6,03
0,78	-0,107	12,46 \pm 5,35



composto 12 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	81,93 \pm 4,62
100,00	2,000	81,51 \pm 3,52
50,00	1,699	78,28 \pm 2,62
25,00	1,398	63,27 \pm 4,45
12,50	1,097	52,32 \pm 2,24
6,25	0,796	38,54 \pm 5,51
3,12	0,495	22,65 \pm 2,62
1,56	0,194	17,70 \pm 3,61
0,78	-0,107	9,70 \pm 4,62



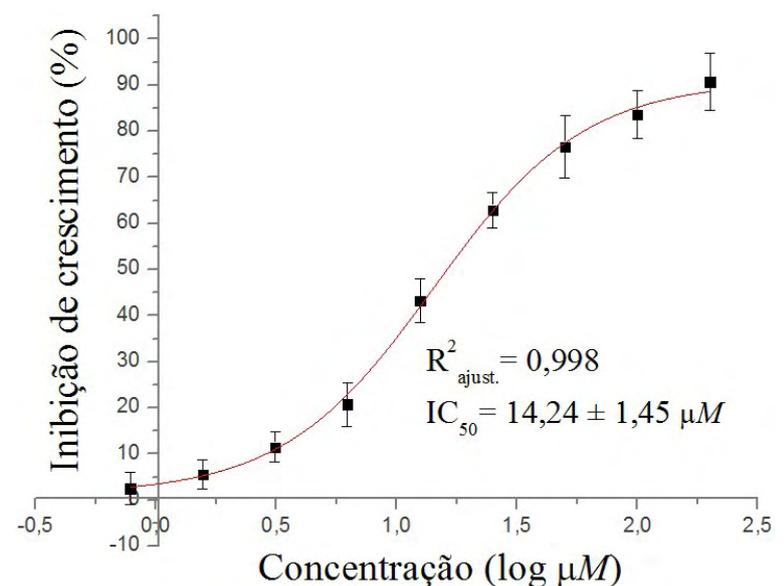
composto 13 - Colombiana			
concentração		IC (%)	
μM	log μM	(média ± dp)	
200,00	2,301	100,00	±5,06
100,00	2,000	100,00	±1,45
50,00	1,699	95,67	±6,45
25,00	1,398	75,53	±6,13
12,50	1,097	54,06	±4,90
6,25	0,796	35,86	±4,68
3,13	0,495	16,36	±5,52
1,56	0,194	7,87	±5,52
0,78	-0,107	6,39	±4,90



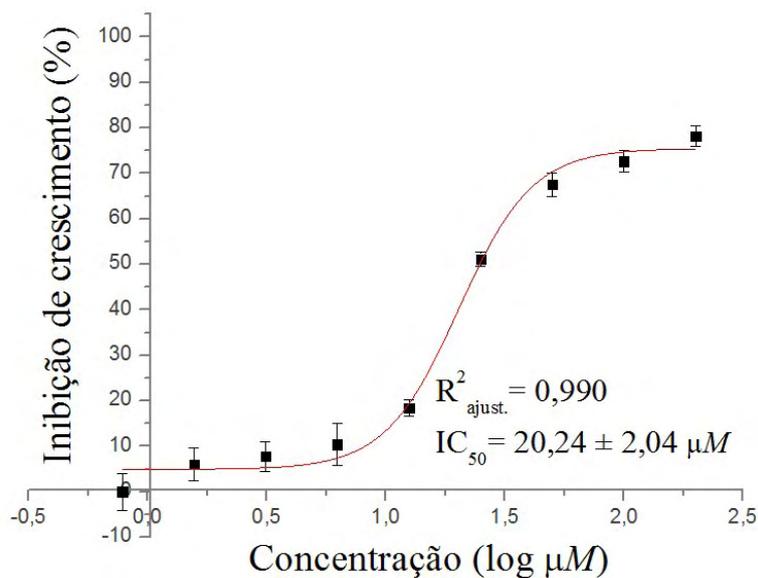
composto 14 - Colombiana			
concentração		IC (%)	
μM	log μM	(média ± dp)	
200,00	2,301	40,99	±9,92
100,00	2,000	49,00	±8,52
50,00	1,699	48,16	±2,98
25,00	1,398	38,46	±3,58
12,50	1,097	38,04	±1,79
6,25	0,796	23,71	±2,98
3,13	0,495	19,92	±2,38
1,56	0,194	10,22	±2,98
0,78	-0,107	9,38	±2,38

Valor de IC_{50} não determinado

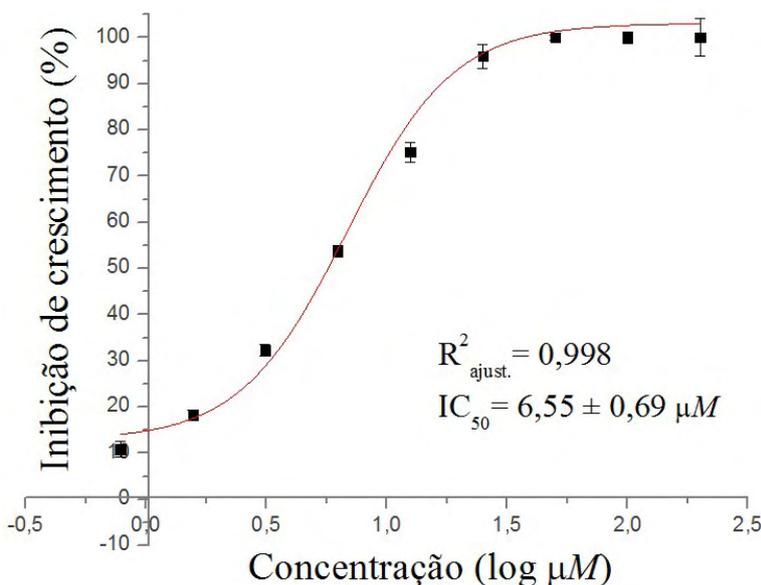
composto 15 - Colombiana			
concentração		IC (%)	
μM	log μM	(média ± dp)	
200,00	2,301	90,73	±6,23
100,00	2,000	83,61	±5,23
50,00	1,699	76,65	±6,84
25,00	1,398	62,91	±3,84
12,50	1,097	43,24	±4,75
6,25	0,796	20,76	±4,77
3,13	0,495	11,49	±3,23
1,56	0,194	5,58	±3,23
0,78	-0,107	2,49	±3,51



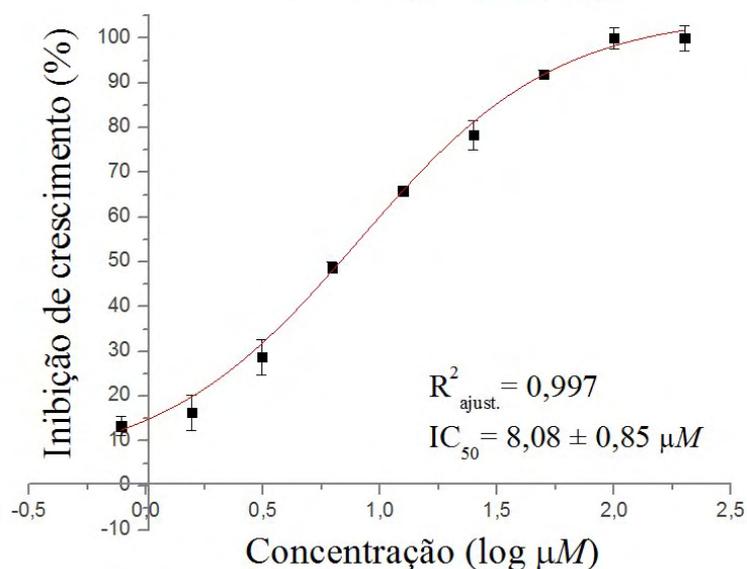
composto 16 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	78,21 \pm 2,21
100,00	2,000	72,68 \pm 2,45
50,00	1,699	67,56 \pm 2,61
25,00	1,398	51,21 \pm 1,61
12,50	1,097	18,49 \pm 1,78
6,25	0,796	10,42 \pm 4,75
3,12	0,495	7,76 \pm 3,22
1,56	0,194	5,99 \pm 3,62
0,78	-0,107	0,00 \pm 4,06



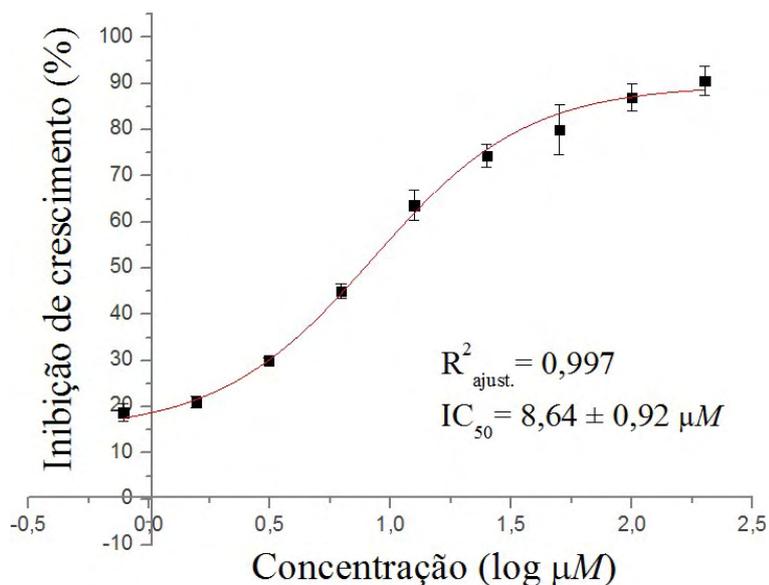
composto 17 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	100,00 \pm 4,09
100,00	2,000	100,00 \pm 1,17
50,00	1,699	100,00 \pm 0,58
25,00	1,398	96,00 \pm 2,58
12,50	1,097	75,23 \pm 2,11
6,25	0,796	53,77 \pm 1,17
3,13	0,495	32,30 \pm 1,23
1,56	0,194	18,27 \pm 1,17
0,78	-0,107	10,84 \pm 1,65



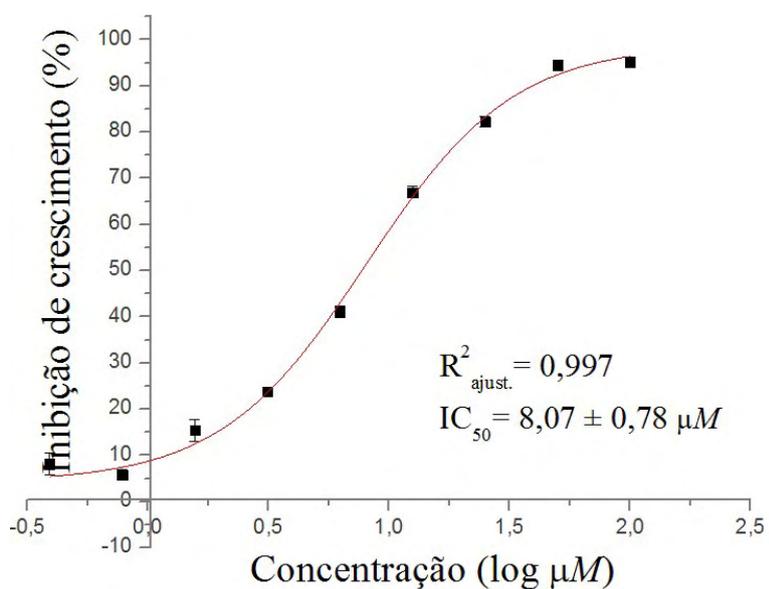
composto 18 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	100,00 \pm 2,83
100,00	2,000	100,00 \pm 2,26
50,00	1,699	92,00 \pm 0,83
25,00	1,398	78,43 \pm 3,26
12,50	1,097	65,88 \pm 0,48
6,25	0,796	48,81 \pm 1,21
3,13	0,495	28,72 \pm 3,95
1,56	0,194	16,34 \pm 3,90
0,78	-0,107	13,31 \pm 2,18



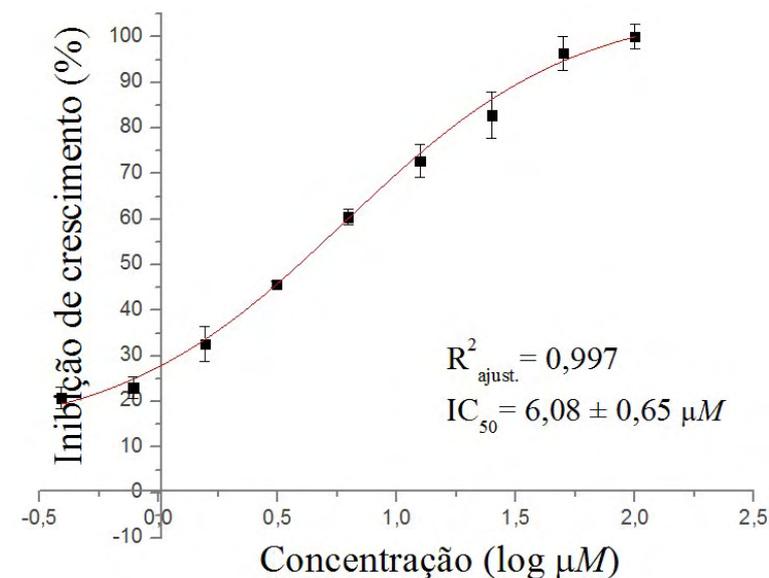
composto 19 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	90,57 \pm 3,17
100,00	2,000	86,98 \pm 2,95
50,00	1,699	79,95 \pm 5,37
25,00	1,398	74,41 \pm 2,43
12,50	1,097	63,68 \pm 3,27
6,25	0,796	45,07 \pm 1,63
3,12	0,495	30,01 \pm 0,63
1,56	0,194	20,99 \pm 1,27
0,78	-0,107	18,74 \pm 1,90



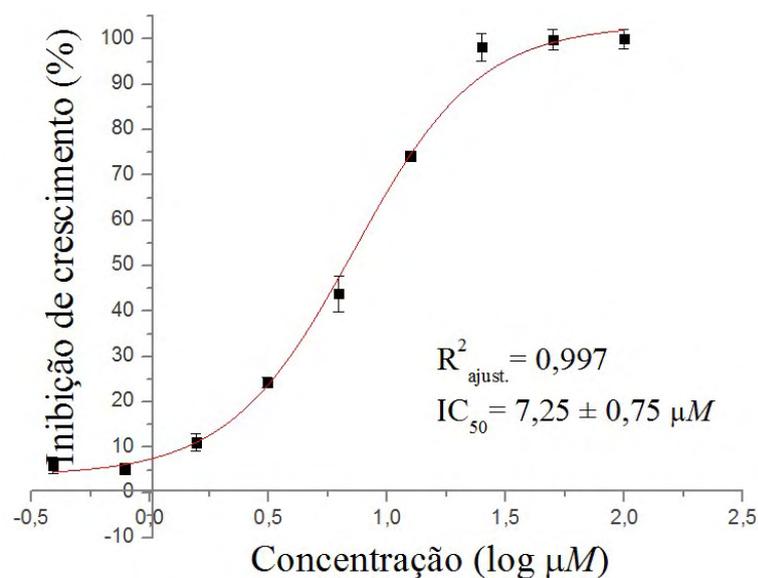
composto 20 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	95,17 \pm 1,14
50,00	1,699	94,36 \pm 1,12
25,00	1,398	82,28 \pm 1,16
12,50	1,097	66,97 \pm 1,25
6,25	0,796	41,19 \pm 1,26
3,13	0,495	23,87 \pm 0,57
1,56	0,194	15,41 \pm 2,28
0,78	-0,107	5,74 \pm 1,14
0,39	-0,408	8,16 \pm 2,28



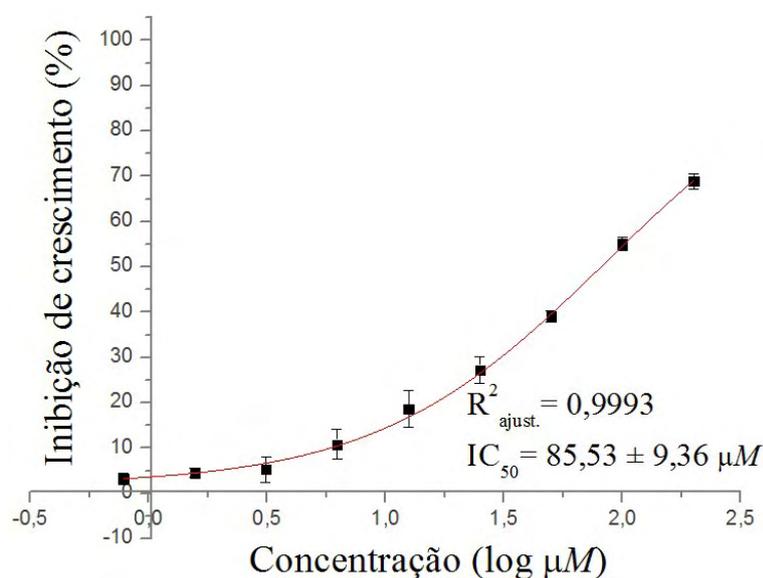
composto 21 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	100,00 \pm 2,72
50,00	1,699	96,46 \pm 3,71
25,00	1,398	82,82 \pm 5,11
12,50	1,097	72,82 \pm 3,54
6,25	0,796	60,51 \pm 1,63
3,13	0,495	45,77 \pm 0,63
1,56	0,194	32,69 \pm 3,81
0,78	-0,107	23,08 \pm 2,35
0,39	-0,408	20,77 \pm 2,35



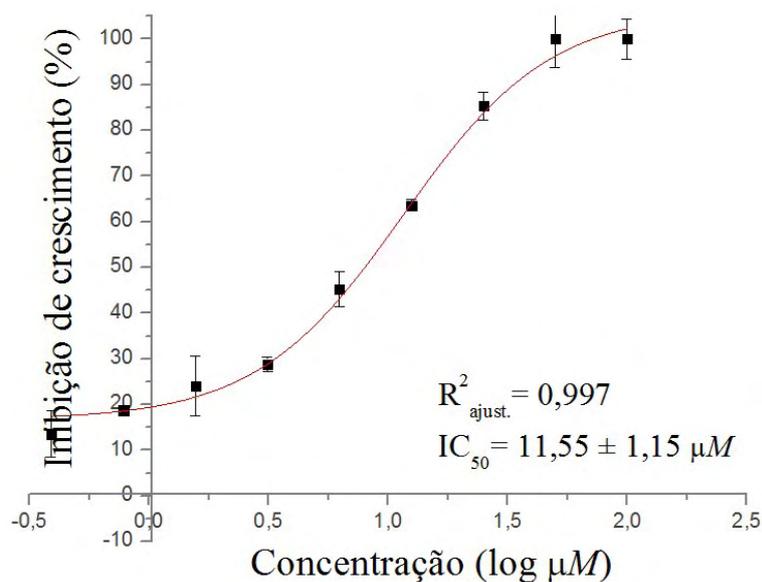
composto 22 - Colombiana			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
100,00	2,000	100,00	$\pm 2,13$
50,00	1,699	99,85	$\pm 2,33$
25,00	1,398	98,26	$\pm 3,03$
12,50	1,097	74,22	$\pm 0,81$
6,25	0,796	43,87	$\pm 3,97$
3,13	0,495	24,27	$\pm 1,12$
1,56	0,194	11,11	$\pm 2,03$
0,78	-0,107	5,20	$\pm 1,23$
0,39	-0,408	6,01	$\pm 1,86$



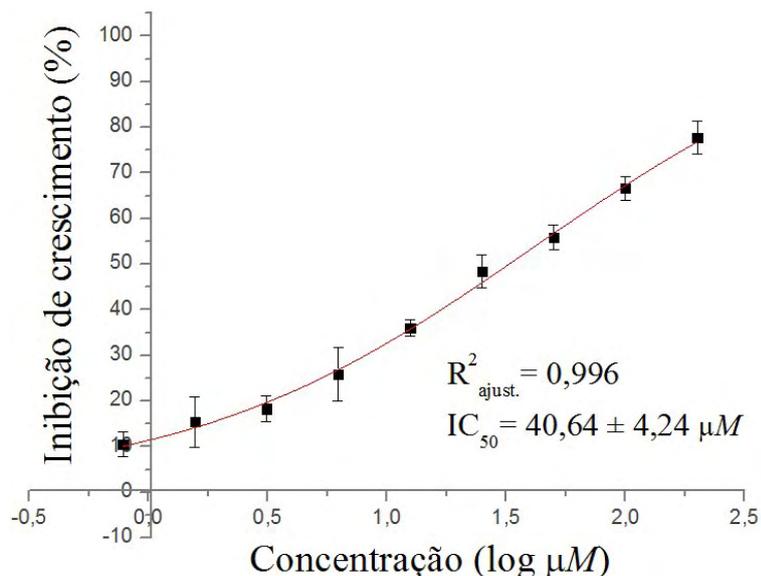
composto 23 - Colombiana			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
200,00	2,301	68,87	$\pm 1,63$
100,00	2,000	55,11	$\pm 1,38$
50,00	1,699	39,05	$\pm 1,27$
25,00	1,398	27,27	$\pm 2,90$
12,50	1,097	18,59	$\pm 4,05$
6,25	0,796	10,81	$\pm 3,31$
3,12	0,495	5,26	$\pm 2,90$
1,56	0,194	4,56	$\pm 1,05$
0,78	-0,107	3,25	$\pm 1,31$



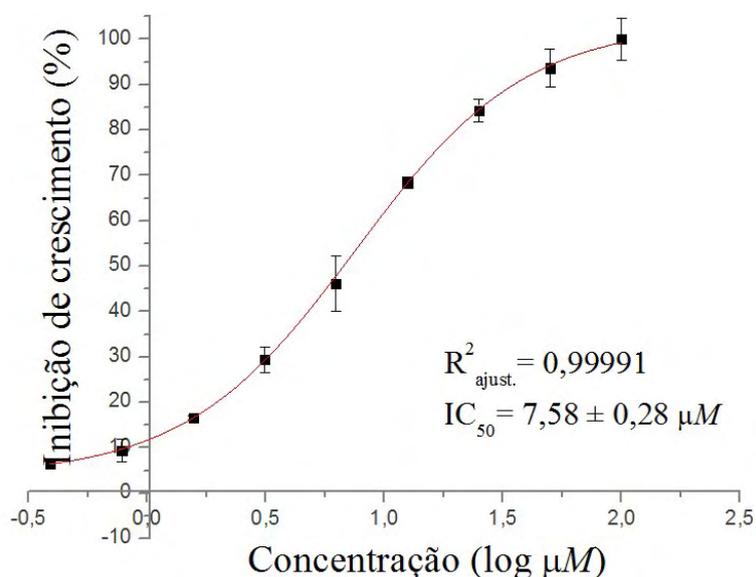
composto 24 - Colombiana			
concentração		IC (%)	
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)	
100,00	2,000	100,00	$\pm 4,39$
50,00	1,699	100,00	$\pm 6,22$
25,00	1,398	85,39	$\pm 3,02$
12,50	1,097	63,61	$\pm 1,22$
6,25	0,796	45,29	$\pm 3,93$
3,13	0,495	28,82	$\pm 1,66$
1,56	0,194	24,04	$\pm 6,49$
0,78	-0,107	18,73	$\pm 1,13$
0,39	-0,408	13,55	$\pm 5,07$



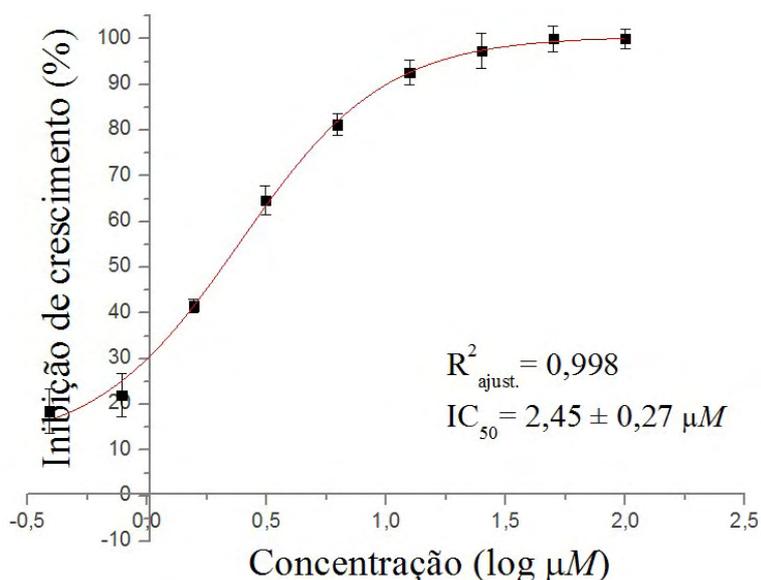
composto 25 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	77,76 \pm 3,60
100,00	2,000	66,61 \pm 2,65
50,00	1,699	55,84 \pm 2,73
25,00	1,398	48,34 \pm 3,60
12,50	1,097	35,97 \pm 1,80
6,25	0,796	25,92 \pm 5,89
3,13	0,495	18,33 \pm 2,78
1,56	0,194	15,44 \pm 5,57
0,78	-0,107	10,53 \pm 2,78



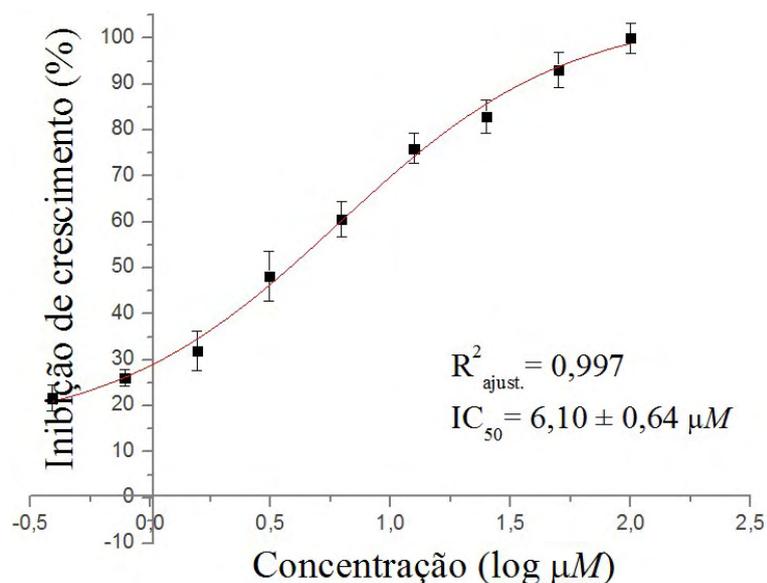
composto 26 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	100,00 \pm 4,53
50,00	1,699	93,63 \pm 4,22
25,00	1,398	84,33 \pm 2,43
12,50	1,097	68,39 \pm 1,22
6,25	0,796	46,08 \pm 6,09
3,13	0,495	29,48 \pm 2,82
1,56	0,194	16,60 \pm 0,46
0,78	-0,107	9,43 \pm 2,43
0,39	-0,408	6,51 \pm 1,22



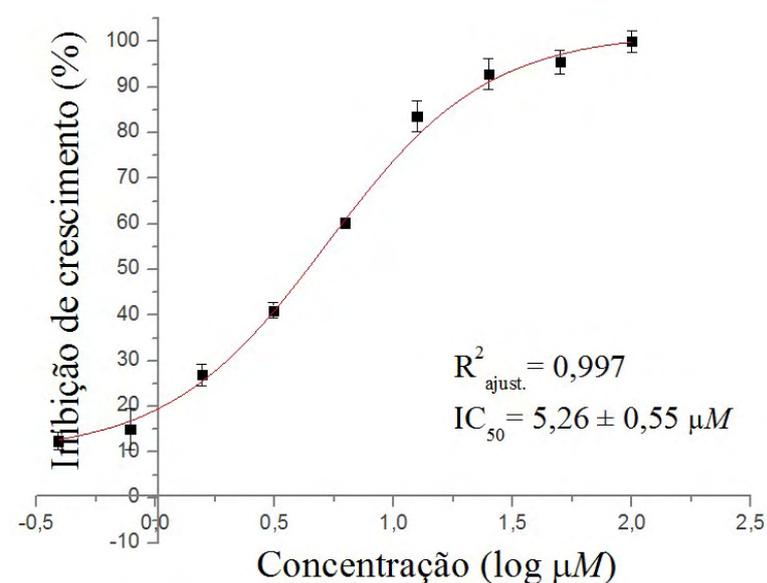
composto 27- Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	100,00 \pm 2,18
50,00	1,699	100,00 \pm 2,77
25,00	1,398	97,36 \pm 3,79
12,50	1,097	92,62 \pm 2,77
6,25	0,796	81,28 \pm 2,44
3,13	0,495	64,62 \pm 3,18
1,56	0,194	41,54 \pm 1,54
0,78	-0,107	22,05 \pm 4,70
0,39	-0,408	18,51 \pm 4,77



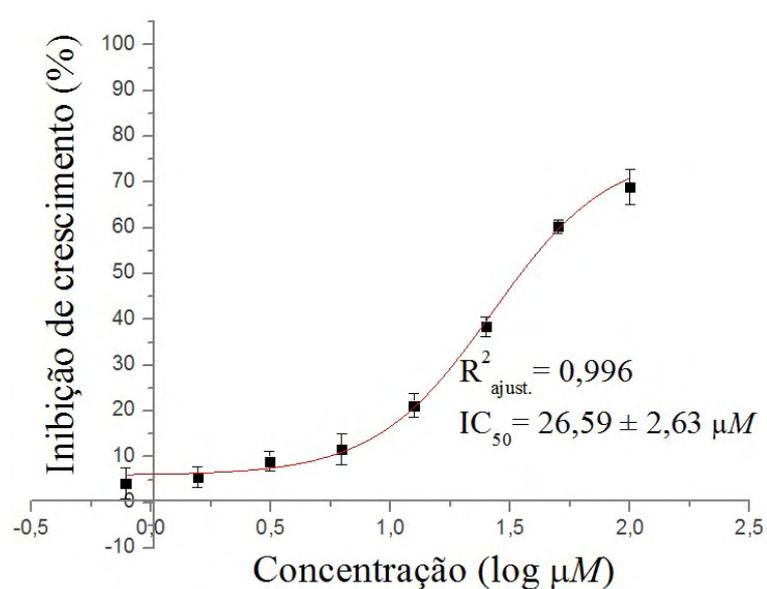
composto 28 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	100,00 \pm 3,23
50,00	1,699	93,12 \pm 3,74
25,00	1,398	82,99 \pm 3,57
12,50	1,097	75,97 \pm 3,28
6,25	0,796	60,64 \pm 3,76
3,13	0,495	48,25 \pm 5,39
1,56	0,194	31,95 \pm 4,36
0,78	-0,107	26,06 \pm 1,80
0,39	-0,408	21,66 \pm 2,80



composto 29 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	100,00 \pm 2,42
50,00	1,699	95,52 \pm 2,65
25,00	1,398	92,88 \pm 3,45
12,50	1,097	83,65 \pm 3,42
6,25	0,796	60,17 \pm 1,21
3,13	0,495	41,05 \pm 1,68
1,56	0,194	26,94 \pm 2,42
0,78	-0,107	15,07 \pm 4,50
0,39	-0,408	12,43 \pm 1,98



composto 30 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	69,00 \pm 3,86
50,00	1,699	60,33 \pm 1,50
25,00	1,398	38,43 \pm 2,18
12,50	1,097	21,21 \pm 2,60
6,25	0,796	11,69 \pm 3,45
3,13	0,495	9,01 \pm 2,18
1,56	0,194	5,55 \pm 2,29
0,78	-0,107	4,26 \pm 3,32

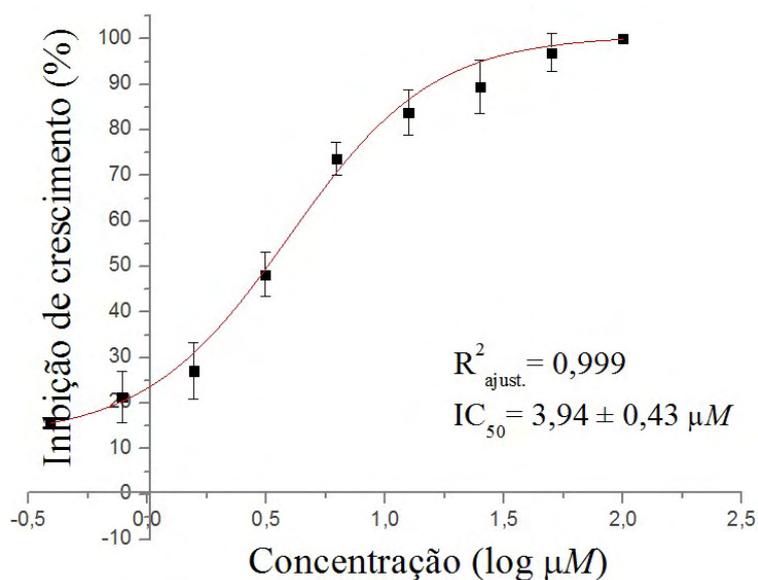
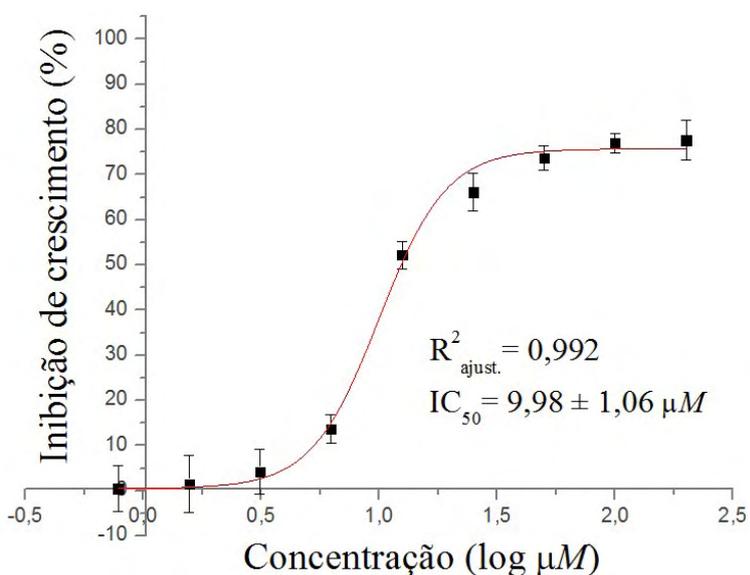


composto 31 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	-18,52 \pm 32,25
50,00	1,699	-3,38 \pm 23,43
25,00	1,398	-2,42 \pm 21,78
12,50	1,097	1,45 \pm 20,97
6,25	0,796	7,89 \pm 17,29
3,13	0,495	-0,16 \pm 16,21
1,56	0,194	-2,09 \pm 21,20
0,78	-0,107	-4,35 \pm 25,10
0,39	-0,408	-1,13 \pm 21,20

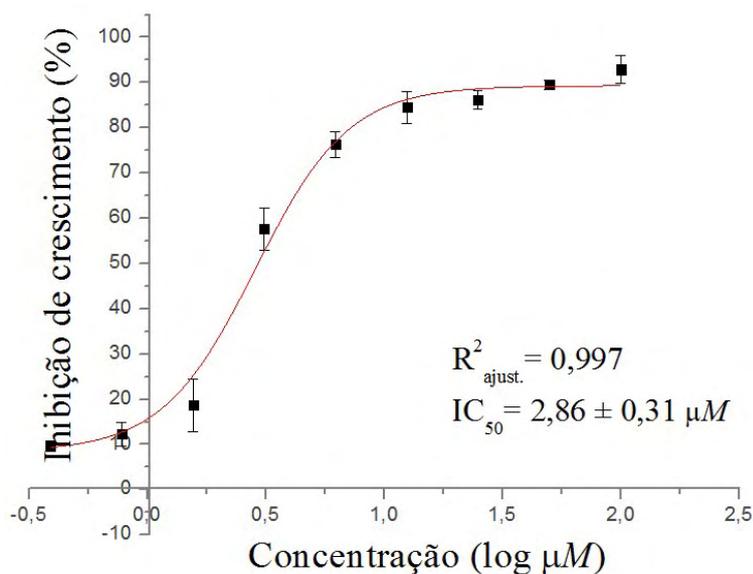
composto 32 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
200,00	2,301	77,66 \pm 4,43
100,00	2,000	76,99 \pm 2,11
50,00	1,699	73,70 \pm 2,76
25,00	1,398	66,16 \pm 4,10
12,50	1,097	52,21 \pm 3,10
6,25	0,796	13,71 \pm 3,11
3,12	0,495	4,23 \pm 5,01
1,56	0,194	1,55 \pm 6,34
0,78	-0,107	0,51 \pm 5,01

composto 33 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média \pm dp)
100,00	2,000	100,00 \pm 0,62
50,00	1,699	96,97 \pm 4,17
25,00	1,398	89,49 \pm 5,84
12,50	1,097	83,90 \pm 4,99
6,25	0,796	73,68 \pm 3,63
3,13	0,495	48,21 \pm 4,84
1,56	0,194	27,11 \pm 6,21
0,78	-0,107	21,41 \pm 5,59
0,39	-0,408	15,70 \pm 1,24

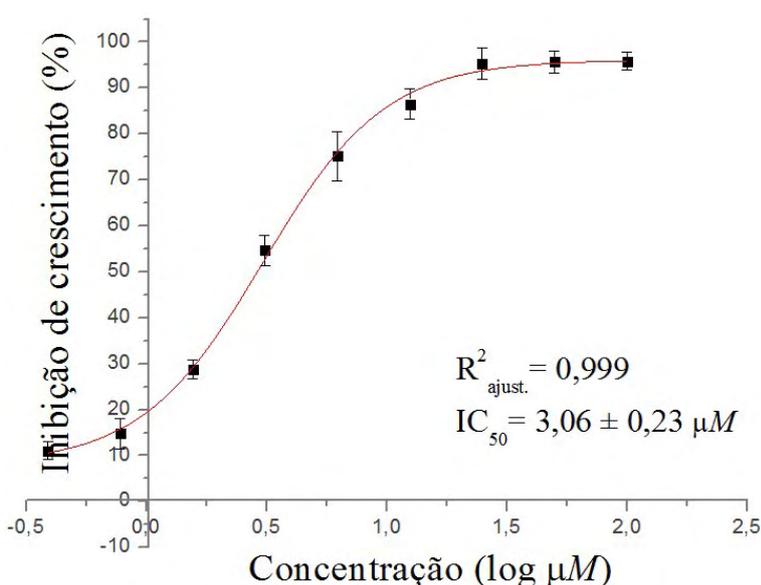
IC₅₀ não determinado



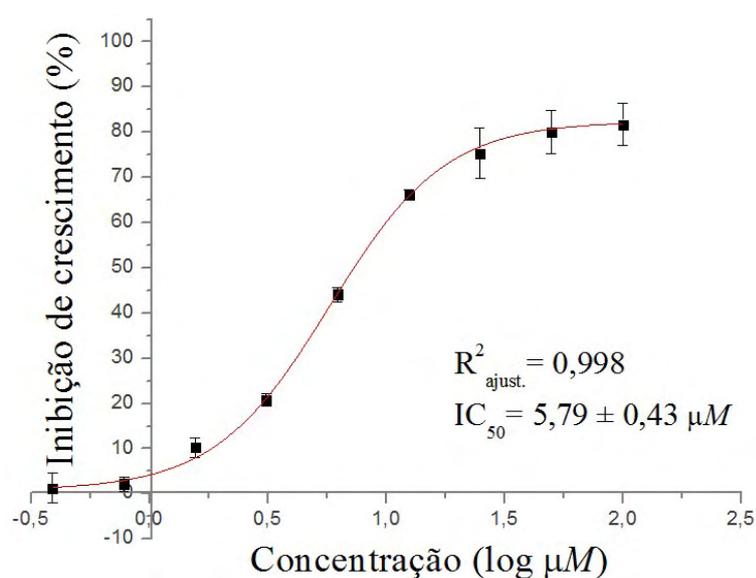
composto 34 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	92,90 \pm 3,08
50,00	1,699	89,51 \pm 1,01
25,00	1,398	86,24 \pm 2,03
12,50	1,097	84,49 \pm 3,55
6,25	0,796	76,29 \pm 2,76
3,13	0,495	57,63 \pm 4,73
1,56	0,194	18,67 \pm 5,85
0,78	-0,107	12,28 \pm 2,62
0,39	-0,408	9,55 \pm 1,13



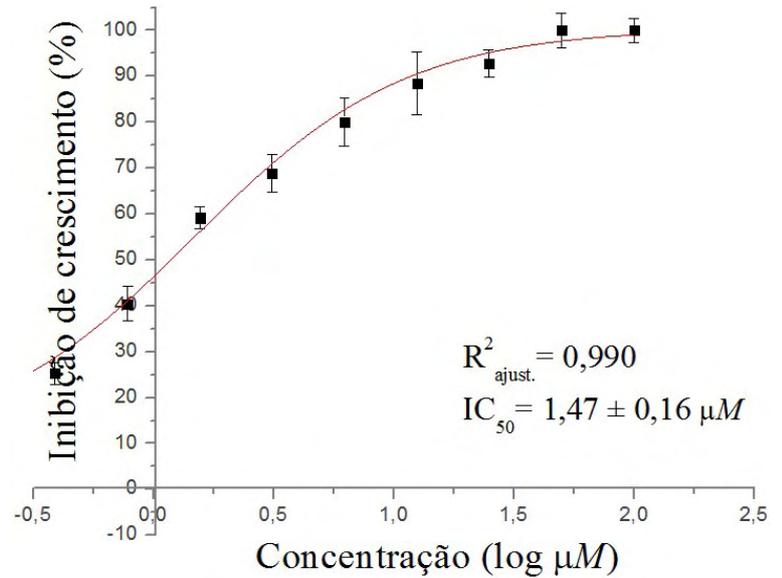
composto 35 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	95,81 \pm 1,98
50,00	1,699	95,65 \pm 2,34
25,00	1,398	95,34 \pm 3,36
12,50	1,097	86,50 \pm 3,29
6,25	0,796	75,16 \pm 5,30
3,13	0,495	54,68 \pm 3,27
1,56	0,194	28,75 \pm 1,98
0,78	-0,107	14,78 \pm 3,29
0,39	-0,408	11,06 \pm 1,98



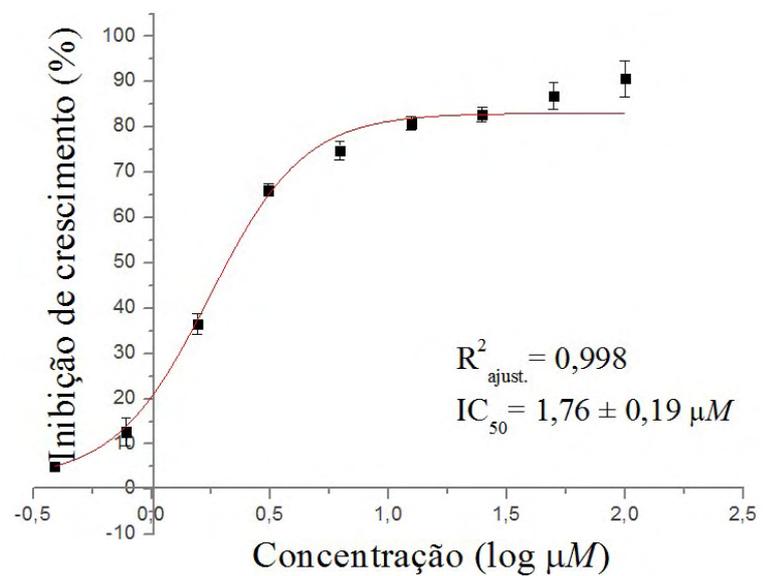
composto 36 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	81,68 \pm 4,69
50,00	1,699	79,98 \pm 4,78
25,00	1,398	75,32 \pm 5,61
12,50	1,097	66,16 \pm 1,08
6,25	0,796	44,12 \pm 1,61
3,13	0,495	20,84 \pm 1,32
1,56	0,194	10,28 \pm 2,15
0,78	-0,107	2,21 \pm 1,61
0,39	-0,408	1,28 \pm 3,36



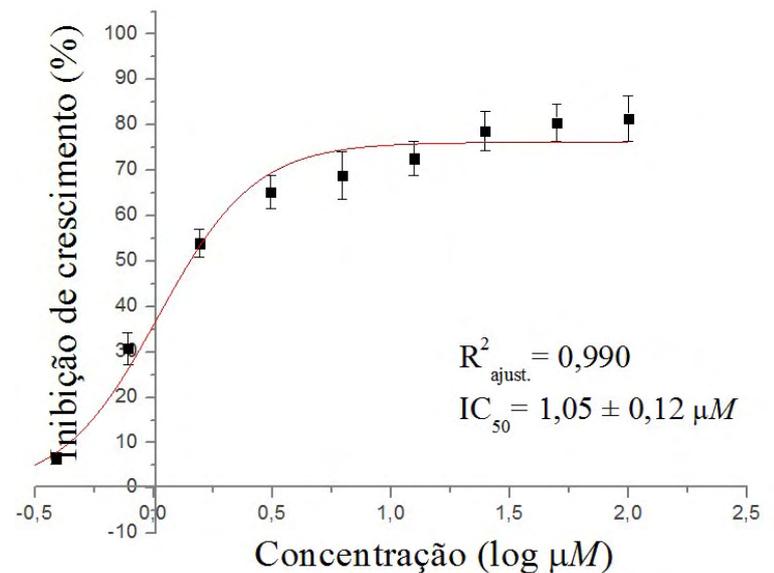
composto 37 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	100,00 \pm 2,66
50,00	1,699	100,00 \pm 3,67
25,00	1,398	92,78 \pm 2,98
12,50	1,097	88,41 \pm 6,82
6,25	0,796	80,01 \pm 5,19
3,13	0,495	68,90 \pm 4,11
1,56	0,194	59,17 \pm 2,41
0,78	-0,107	40,41 \pm 3,77
0,39	-0,408	25,25 \pm 2,41
0,20	-0,709	22,24 \pm 2,23



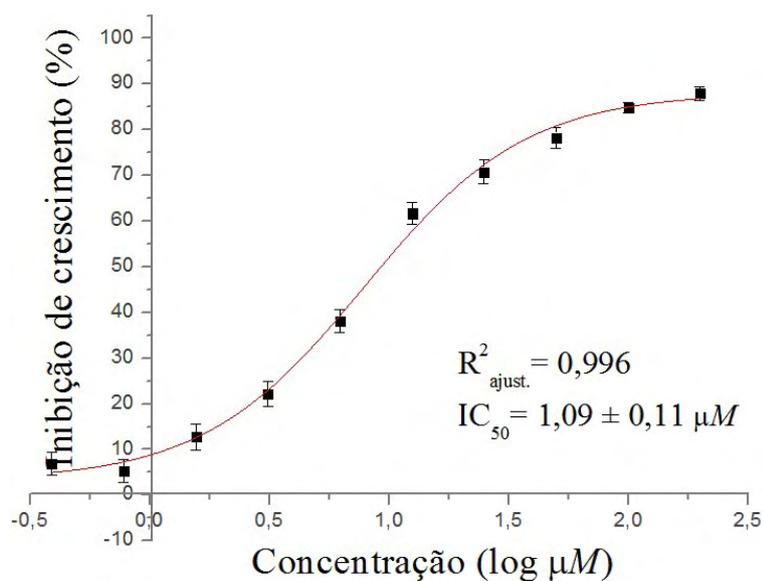
composto 38 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	90,72 \pm 3,96
50,00	1,699	86,81 \pm 2,94
25,00	1,398	82,72 \pm 1,54
12,50	1,097	80,84 \pm 1,44
6,25	0,796	74,87 \pm 2,09
3,13	0,495	66,08 \pm 1,33
1,56	0,194	36,55 \pm 2,37
0,78	-0,107	12,68 \pm 3,03
0,39	-0,408	5,14 \pm 0,54



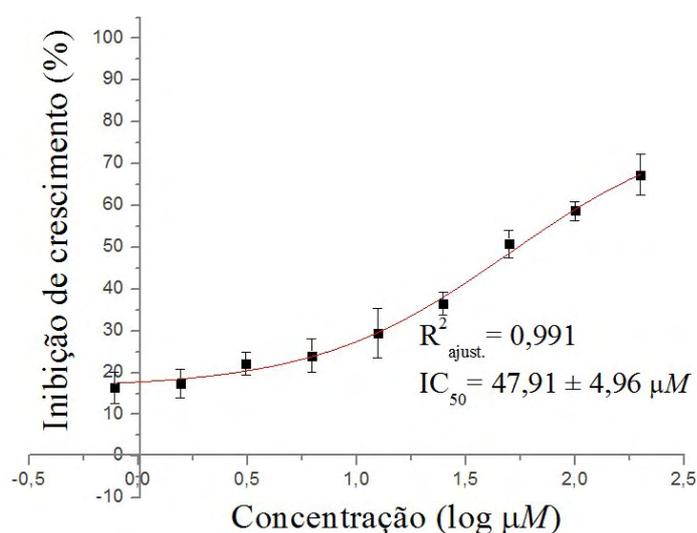
composto 39 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,000	81,47 \pm 4,97
100,00	1,699	80,47 \pm 4,02
50,00	1,398	78,58 \pm 4,31
25,00	1,097	72,63 \pm 3,81
12,50	0,796	68,83 \pm 5,31
6,25	0,495	65,19 \pm 3,59
3,13	0,194	53,94 \pm 3,15
1,56	-0,107	30,75 \pm 3,47
0,78	-0,408	6,55 \pm 1,24
0,39	-0,709	2,57 \pm 1,26



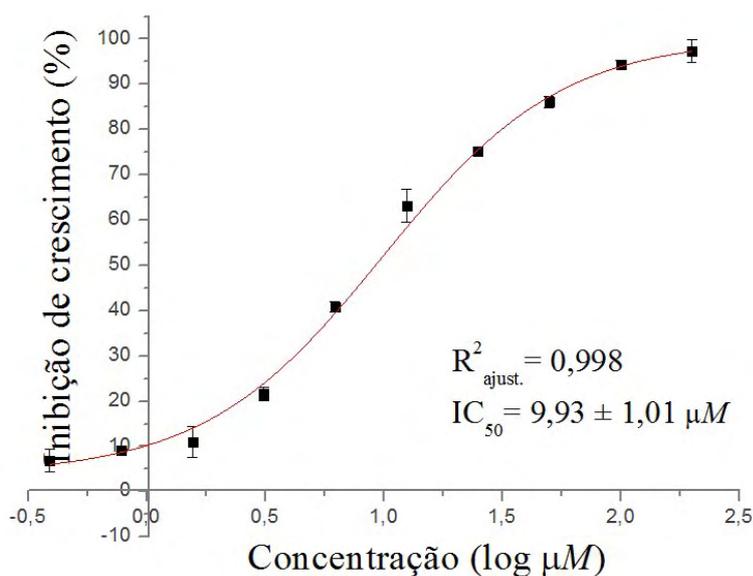
composto 40 - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,000	72,84 \pm 3,23
100,00	1,699	70,74 \pm 6,32
50,00	1,398	69,14 \pm 1,82
25,00	1,097	67,14 \pm 2,67
12,50	0,796	63,61 \pm 1,50
6,25	0,495	62,45 \pm 2,23
3,13	0,194	54,00 \pm 1,82
1,56	-0,107	16,45 \pm 1,82
0,78	-0,408	4,22 \pm 2,20
0,39	-0,709	2,65 \pm 1,26



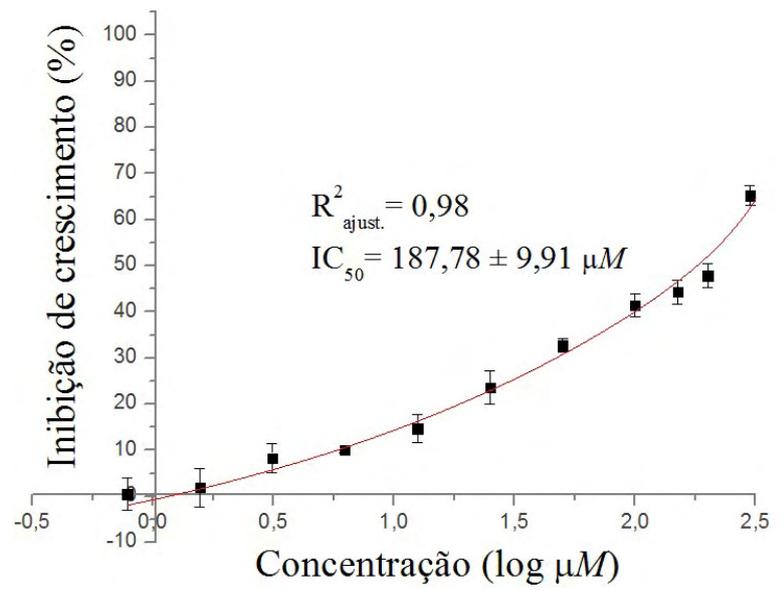
benznidazol - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	67,34 \pm 4,90
100,00	2,000	58,73 \pm 2,26
50,00	1,699	50,87 \pm 3,30
25,00	1,398	36,51 \pm 2,67
12,50	1,097	29,47 \pm 5,85
6,25	0,796	24,07 \pm 4,05
3,13	0,495	22,09 \pm 2,71
1,56	0,194	17,43 \pm 3,39
0,78	-0,107	16,44 \pm 3,73



nifurtimox - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
200,00	2,301	97,33 \pm 2,44
100,00	2,000	94,40 \pm 0,80
50,00	1,699	86,13 \pm 1,22
25,00	1,398	75,20 \pm 0,80
12,50	1,097	63,20 \pm 3,60
6,25	0,796	40,80 \pm 1,13
3,13	0,495	21,60 \pm 1,39
1,56	0,194	10,93 \pm 3,44
0,78	-0,107	9,07 \pm 0,92
0,39	-0,408	6,92 \pm 2,43

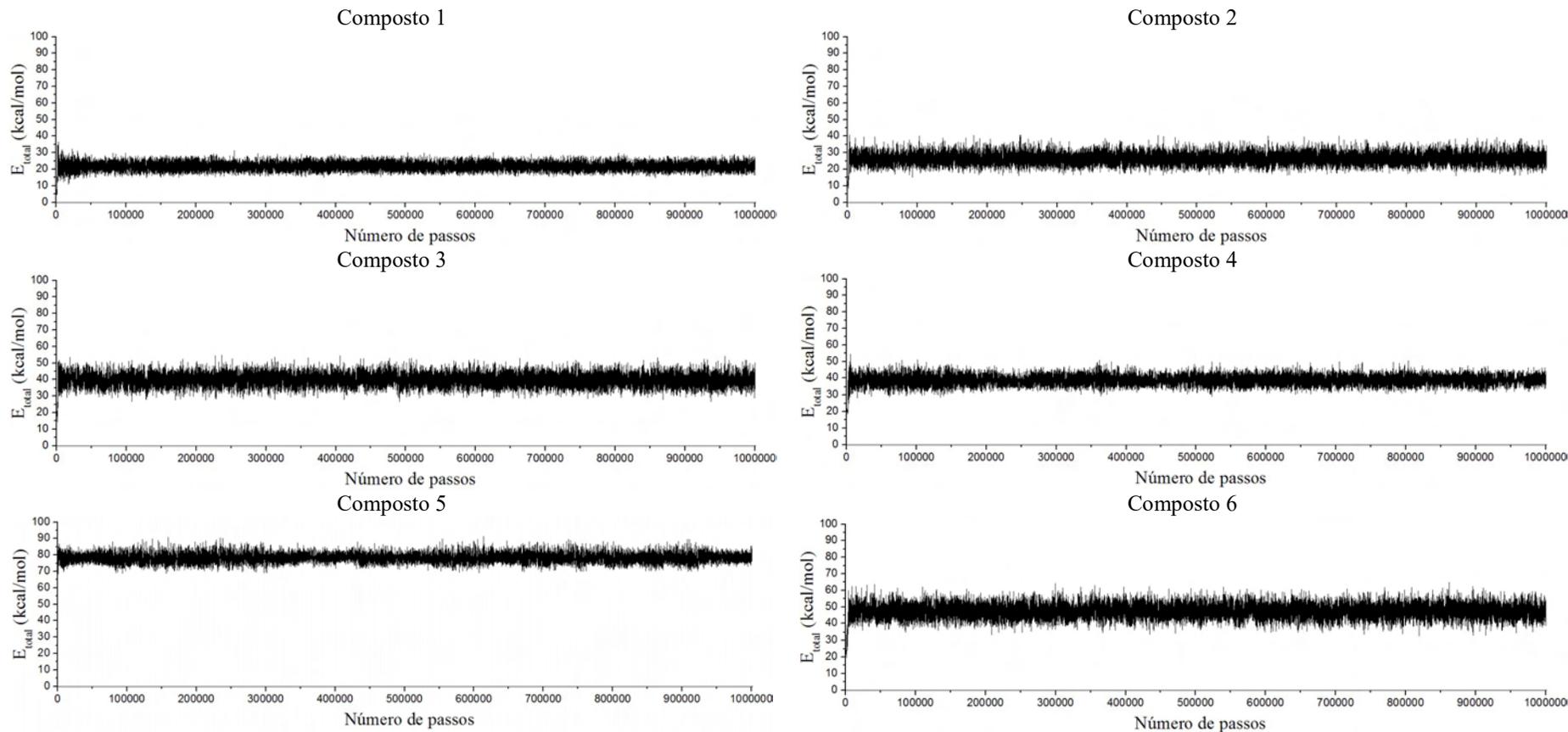


nifuroxazida - Colombiana		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
400,00	2,602	72,93 \pm 3,57
300,00	2,477	65,23 \pm 2,23
200,00	2,301	47,88 \pm 2,58
150,00	2,176	44,32 \pm 2,64
100,00	2,000	41,46 \pm 2,55
50,00	1,699	32,76 \pm 1,55
25,00	1,398	23,61 \pm 3,57
12,50	1,097	14,72 \pm 3,05
6,25	0,796	10,15 \pm 0,72
3,13	0,495	8,29 \pm 3,10
1,56	0,194	1,86 \pm 4,10
0,78	-0,107	0,51 \pm 3,52

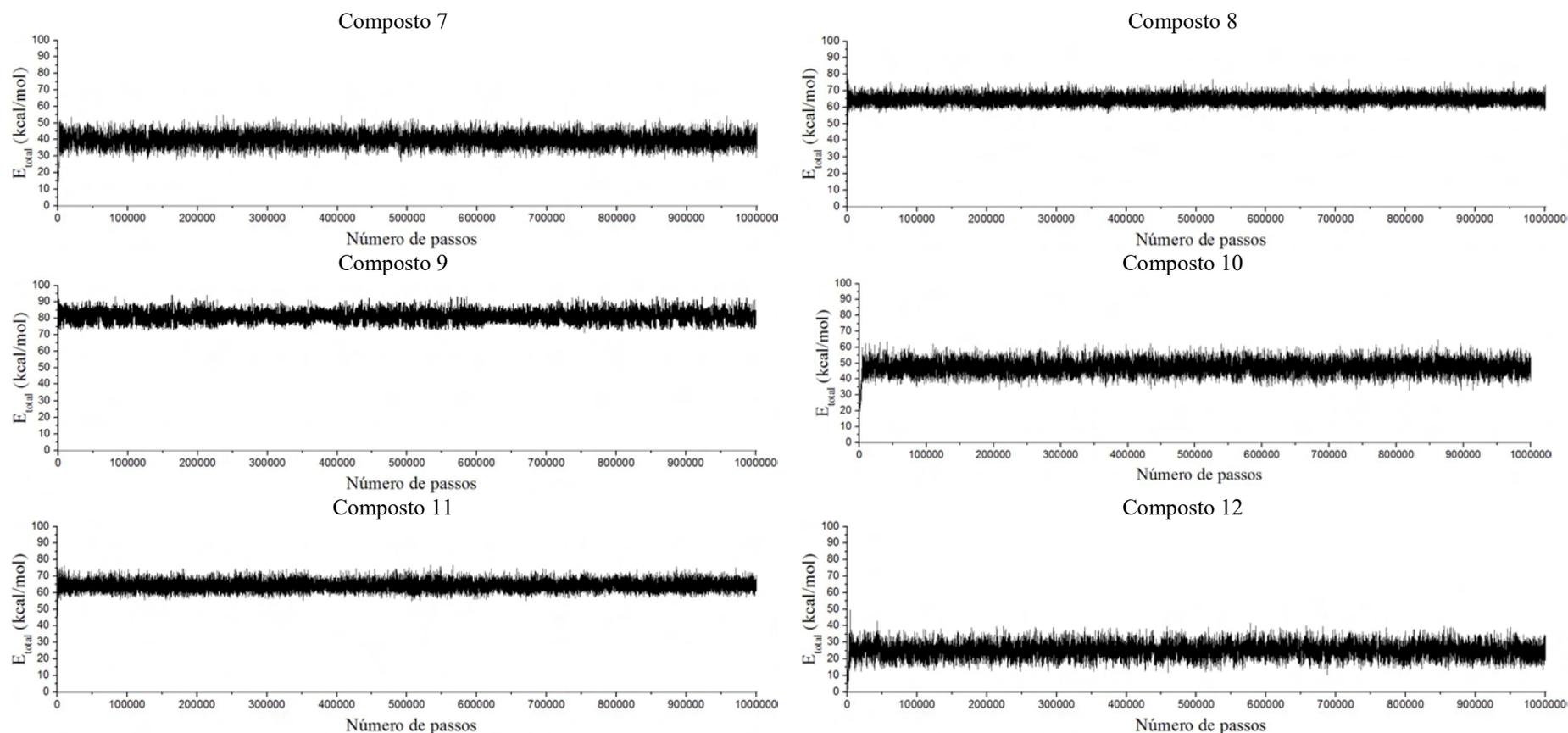


Anexo 5

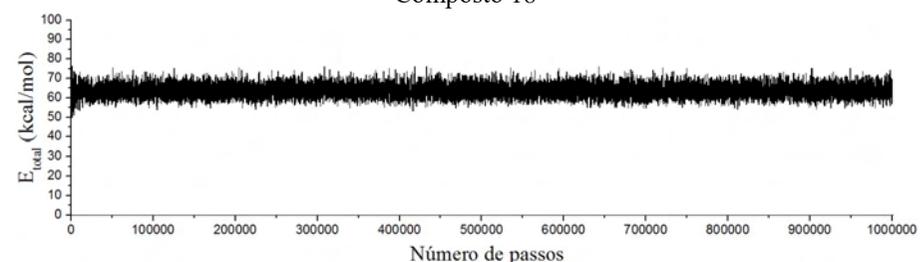
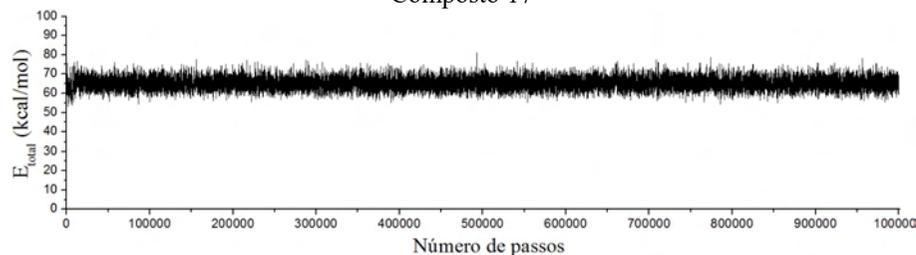
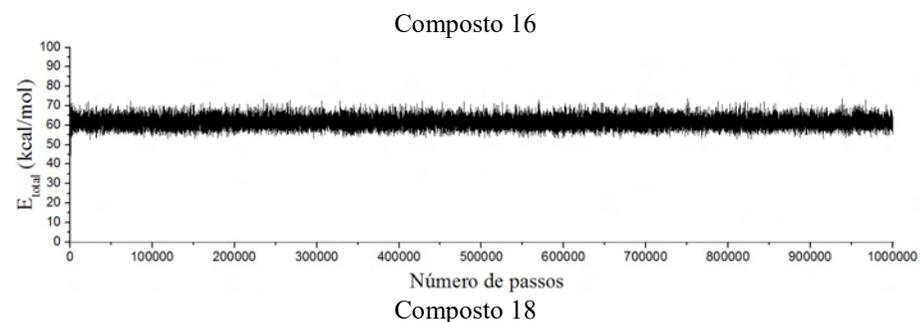
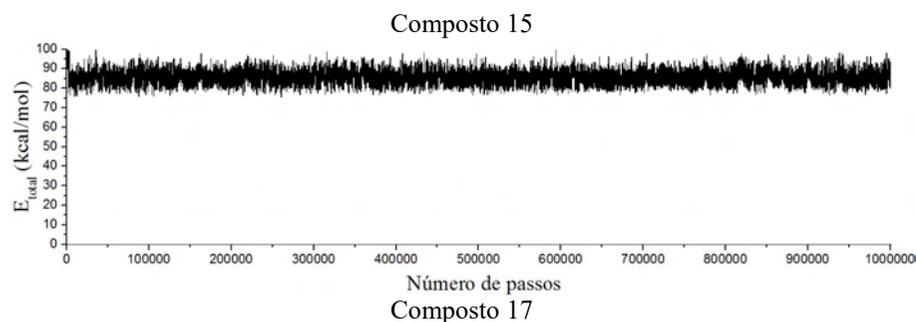
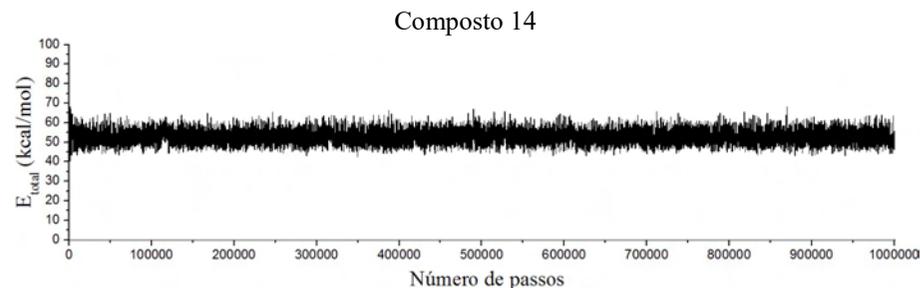
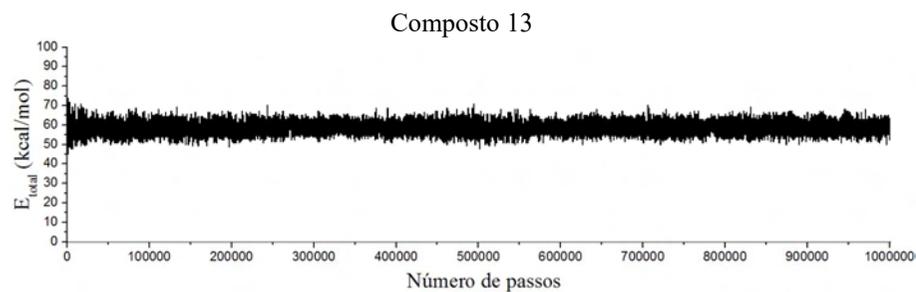
**Representação gráfica do perfil de amostragem
conformacional da simulação de dinâmica molecular**



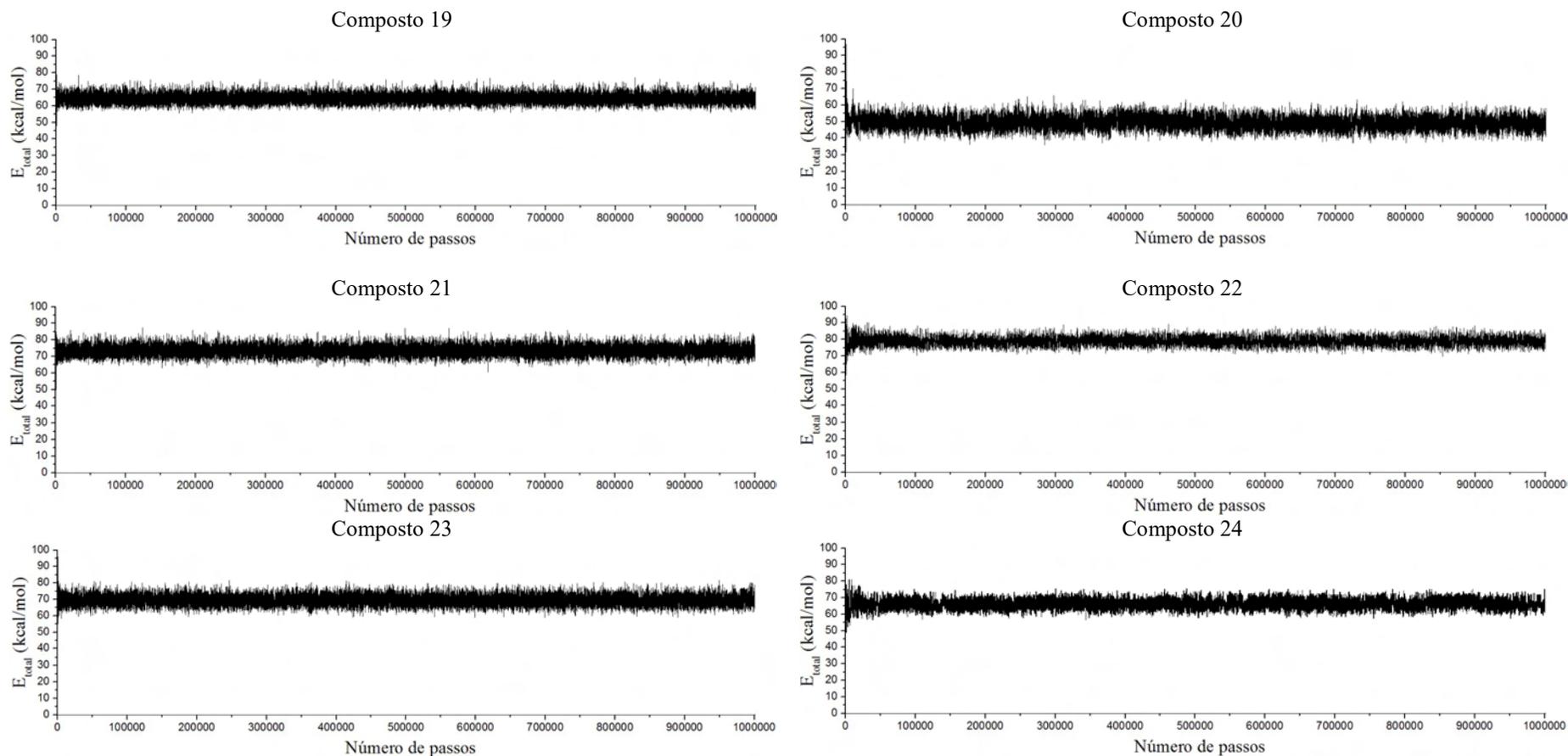
Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confôrmeros do composto-protótipo NF e dos 40 compostos sintetizados, resultante da simulação de DM (1ns, 301 K) *versus* a energia total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição das energias de interação de: E_{STRETCH} (contribuição de energia de deformação axial), E_{BEND} (contribuição de energia de deformação angular), E_{TORS} (contribuição de energia de deformação torsional), E_{1-4} (contribuição de energia de interações do tipo 1-4), E_{vdW} (contribuição de energia de van der Waals), E_{CHARGE} (contribuição de energia eletrostática).



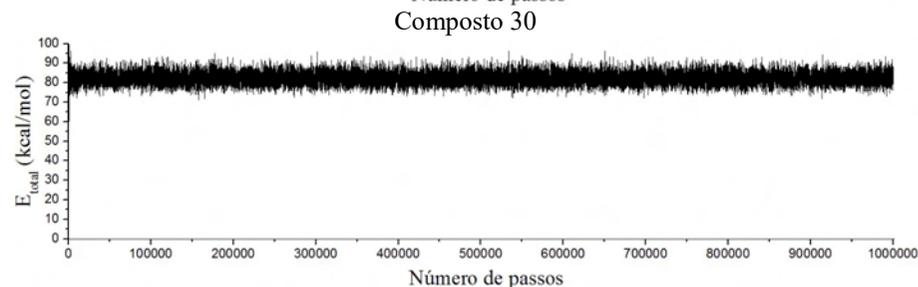
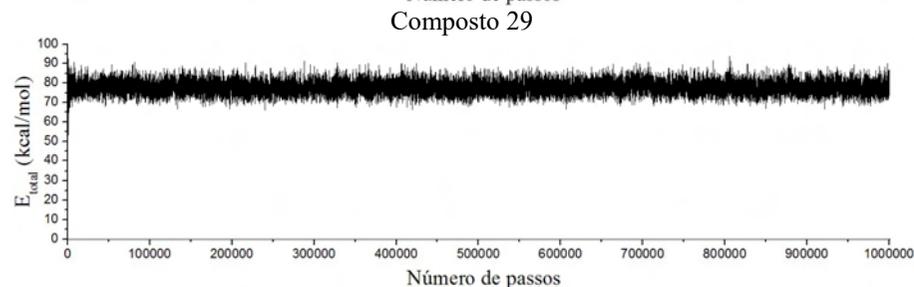
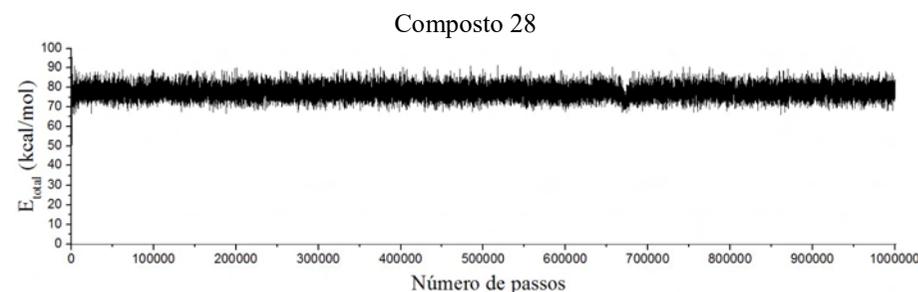
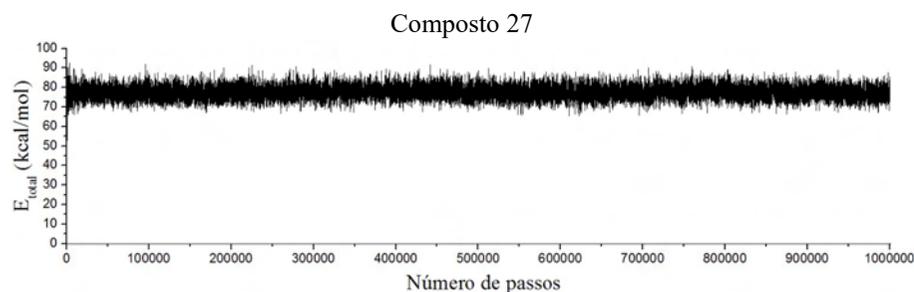
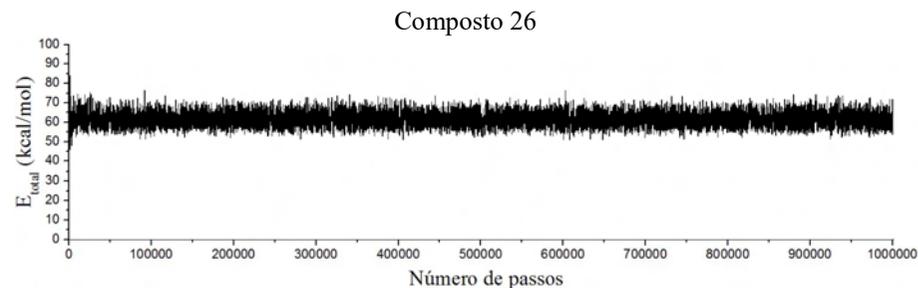
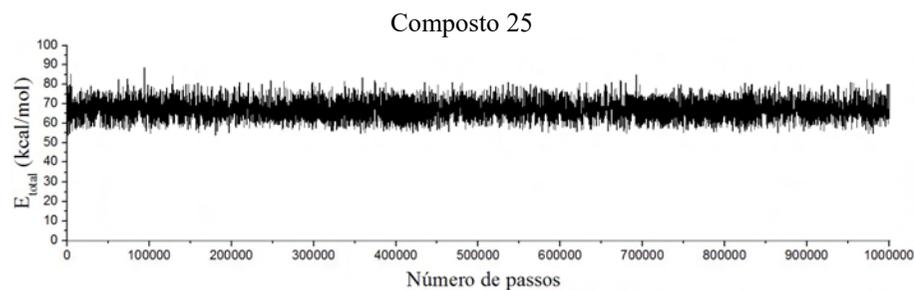
Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confôrmeros do composto-protótipo NF e dos 40 compostos sintetizados, resultante da simulação de DM (1ns, 301 K) *versus* a energia total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição das energias de interação de: E_{STRETCH} (contribuição de energia de deformação axial), E_{BEND} (contribuição de energia de deformação angular), E_{TORS} (contribuição de energia de deformação torsional), E_{1-4} (contribuição de energia de interações do tipo 1-4), E_{vdW} (contribuição de energia de van der Waals), E_{CHARGE} (contribuição de energia eletrostática).



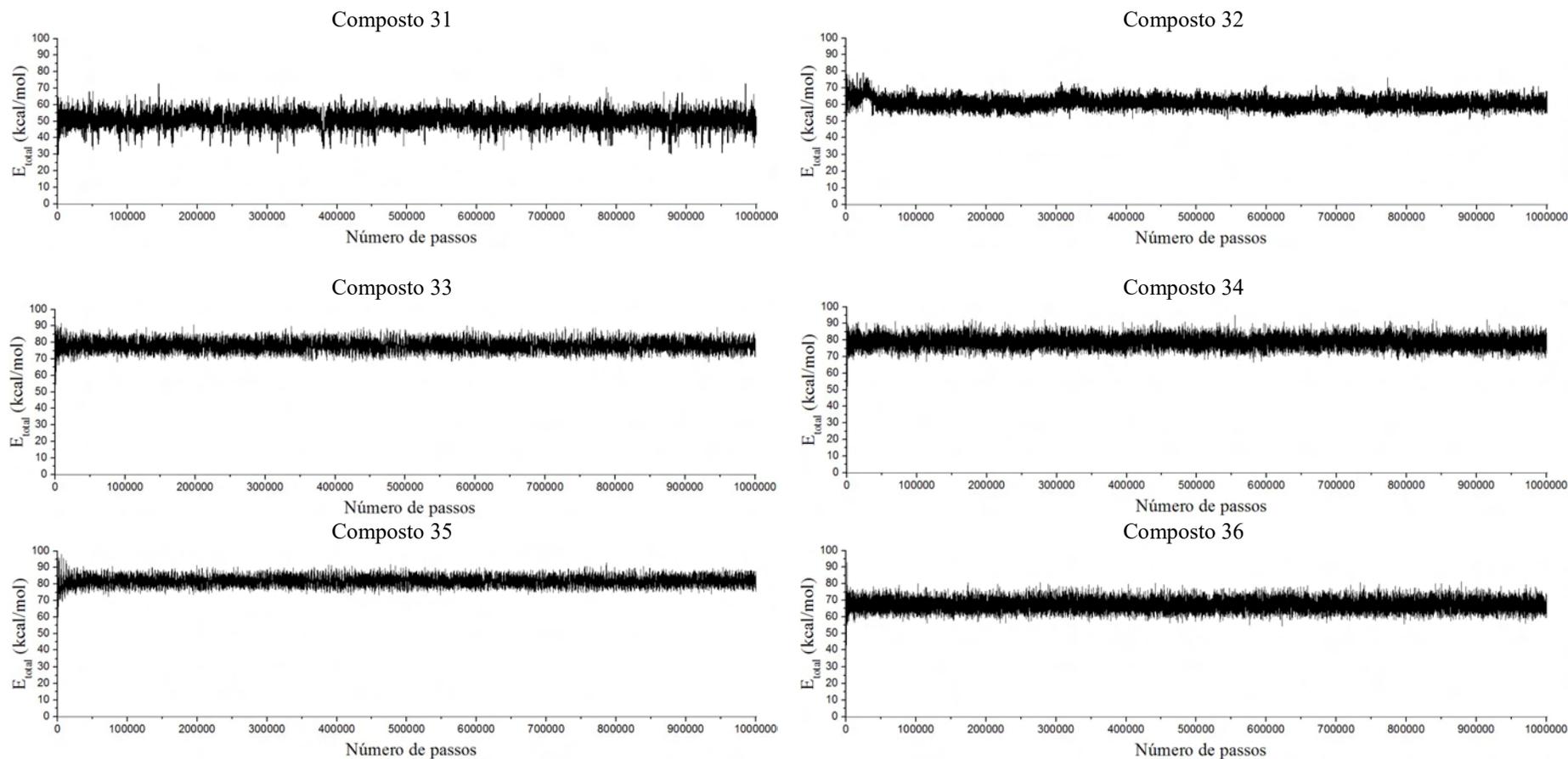
Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confôrmeros do composto-protótipo NF e dos 40 compostos sintetizados, resultante da simulação de DM (1ns, 301 K) *versus* a energia total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição das energias de interação de: $E_{STRETCH}$ (contribuição de energia de deformação axial), E_{BEND} (contribuição de energia de deformação angular), E_{TORS} (contribuição de energia de deformação torsional), E_{1-4} (contribuição de energia de interações do tipo 1-4), E_{vdW} (contribuição de energia de van der Waals), E_{CHARGE} (contribuição de energia eletrostática).



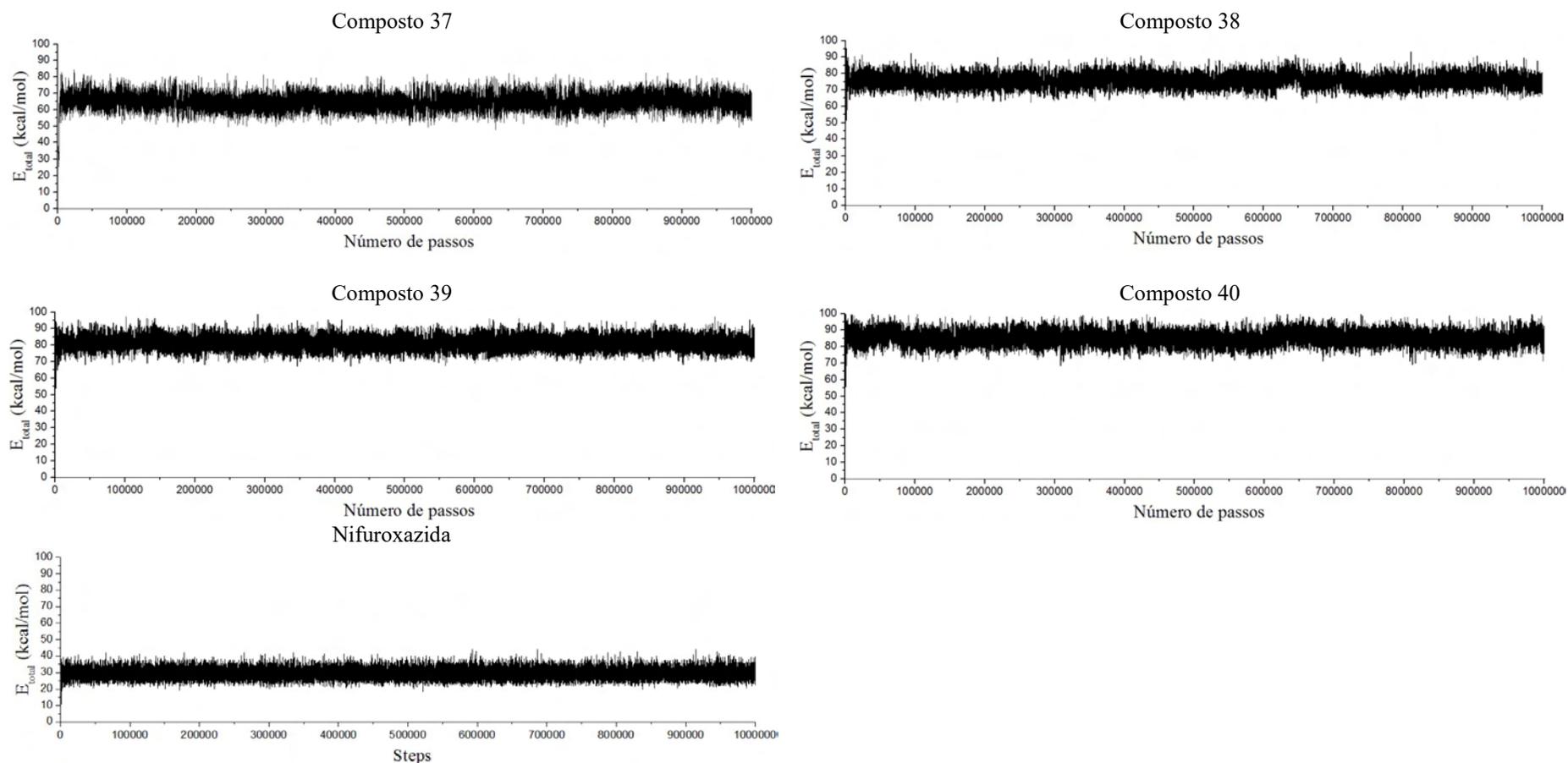
Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confôrmeros do composto-protótipo NF e dos 40 compostos sintetizados, resultante da simulação de DM (1ns, 301 K) *versus* a energia total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição das energias de interação de: $E_{STRETCH}$ (contribuição de energia de deformação axial), E_{BEND} (contribuição de energia de deformação angular), E_{TORS} (contribuição de energia de deformação torsional), E_{1-4} (contribuição de energia de interações do tipo 1-4), E_{vdW} (contribuição de energia de van der Waals), E_{CHARGE} (contribuição de energia eletrostática).



Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 conformêros do composto-protótipo NF e dos 40 compostos sintetizados, resultante da simulação de DM (1ns, 301 K) *versus* a energia total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição das energias de interação de: $E_{STRETCH}$ (contribuição de energia de deformação axial), E_{BEND} (contribuição de energia de deformação angular), E_{TORS} (contribuição de energia de deformação torsional), E_{1-4} (contribuição de energia de interações do tipo 1-4), E_{vdW} (contribuição de energia de van der Waals), E_{CHARGE} (contribuição de energia eletrostática).



Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confôrmeros do composto-protótipo NF e dos 40 compostos sintetizados, resultante da simulação de DM (1ns, 301 K) *versus* a energia total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição das energias de interação de: E_{STRETCH} (contribuição de energia de deformação axial), E_{BEND} (contribuição de energia de deformação angular), E_{TORS} (contribuição de energia de deformação torsional), E_{1-4} (contribuição de energia de interações do tipo 1-4), E_{vdW} (contribuição de energia de van der Waals), E_{CHARGE} (contribuição de energia eletrostática).



Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confôrmeros do composto-protótipo NF e dos 40 compostos sintetizados, resultante da simulação de DM (1ns, 301 K) *versus* a energia total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição das energias de interação de: $E_{STRETCH}$ (contribuição de energia de deformação axial), E_{BEND} (contribuição de energia de deformação angular), E_{TORS} (contribuição de energia de deformação torsional), E_{1-4} (contribuição de energia de interações do tipo 1-4), E_{vdW} (contribuição de energia de van der Waals), E_{CHARGE} (contribuição de energia eletrostática).

Anexo 6

Descritores calculados e obtidos experimentalmente dos compostos sintetizados

Compostos identificados conforme intervalos de atividade de $\log 1/IC_{50}$: atividade alta (H), valores de 6,00 a 5,40; mediana (M), valores entre 5,40 e 4,60 e baixa (L), valores entre 4,60 e 3,50.

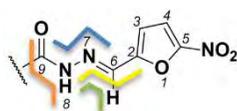
Atividade biológica:

$\log 1/IC_{50}$: atividade frente a forma epimastigota do *T. cruzi* das cepas Silvio X10 cl1, Y, Bug 2149 cl10 e Colombiana.

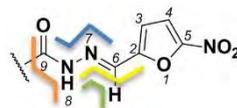
Descritores:

ESTRETCH : contribuição de energia intramolecular de deformação axial, **EBEND**: contribuição de energia intramolecular de deformação angular, **ETORS**: contribuição de energia intramolecular de deformação torsional, **E1-4**: contribuição de energia intramolecular do tipo 1-4, **Evdw**: contribuição de energia intramolecular de van der Waals, **ECHARGE**: contribuição de energia intramolecular de carga ou eletrostática, **Esolv**: contribuição de energia de solvatação, **E_{lig H}**: contribuição de energia de ligação H, **ETOT**: energia potencial total, **EHOMO**: energia do orbital de fronteira HOMO (eV), **ELUMO**: energia do orbital de fronteira LUMO (eV), **GAP**: diferença entre E_{HOMO} e E_{LUMO} , **μ** : momento de dipolo (debye), **CHELPG**: carga do potencial eletrostático do átomo na posição indicada e numera na figura acima da tabela, **ϕ** : ângulos de torção (diedros) dos átomos indicados conforme figura acima da tabela, **ClogP_{WM}**: coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa, considerado pesos iguais para os métodos de VISVANADHAN et al., 1989, KLOPMAN et al., 1993 e PHYSPROP© database, **I_{Platt}**: índice que descreve a soma dos graus de contorno da superfície molecular, **I_{Randic}**: índice que descreve a soma harmônica das médias geométricas dos graus dos vértices, **I_{Balaban}**: índice que descreve a média da somatória da distância de conectividade da molécula, **I_{Harary}**: índice que descreve a metade da somatória da diagonal externa, distância matricial recíproca, dos elementos da molécula, **I_{Hiper Wiener}**: descreve uma variação do índice de Wiener, **I_{Szeged}**: estende o índice de Wiener para gráficos cíclicos pela contagem do número de átomos em ambos os lados de cada ligação (considera aqueles átomos que estão mais perto de um lado da ligação do que do outro), **I_{Wiewer}**: índice que descreve a distância atômica topológica média (metade da soma de todas as distâncias atômicas) na molécula, **Dreinding**: energia relacionada com a estabilidade da conformação da molécula (kcal/mol), **PSA**: área de superfície polar, **V_{vdw}**: volume de Van der Waals (Å^3), **A_{vdw}**: área de superfície de Van der Waals (Å^2), **Pi energy**: calcula a energia π do anel aromático (s) (dimensão β) com o método de orbital molecular de Hückel, **HBD**: número de átomos doadores de ligação hidrogênio, **HBA**: número de átomos receptores de ligação hidrogênio, **RB**: número de ligação rotáveis presentes na molécula, **Nº átomos**: número de átomos que constituem a molécula, **MM**: massa molar (Da, u.m.a. ou g), **ASA**: superfície acessível a solvente, calculada usando o raio do solvente (1,4 Å para a molécula de água) (Å^2), **ASA+**: superfície acessível a solvente de todos os átomos com carga parcial positiva (Å^2), **ASA-**: superfície acessível a solvente de todos os átomos com carga parcial negativa (Å^2), **ASA_H**: superfície acessível a solvente de todos os átomos hidrofóbico (Å^2), **ASA_P**: superfície acessível a solvente de todos os átomos hidrofílicos (Å^2), **MR**: refatividade molar da molécula ($10^6 [\text{m}^3 \text{mol}^{-1}]$), **RMN ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆) e **¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆): deslocamentos químicos em ppm obtidos experimentalmente correspondente aos átomos numerados conforme figura acima da tabela.

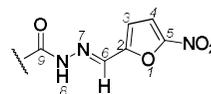
Compostos	Silvio X10	Y	Bug 2149	Colombiana	ESTRETCH	EBEND	ERORS	Ei-4	EVDW	ECHARGE	E _{solv}	E _{ig II}	EROT	ETOMO	ELUMO
	c11 log1/IC ₅₀ (M)	log1/IC ₅₀ (M)	c110 log1/IC ₅₀ (M)	log1/IC ₅₀ (M)	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7	x8	x9	x10	x11
BSF-1-M	4,55	4,86	4,84	5,02	8,82	12,36	2,15	-12,97	-0,37	5,32	-10,26	-0,83	4,22	-9,52	-0,80
BSF-2-L	4,39	4,09	4,56	4,22	3,32	15,52	0,73	-2,31	-2,25	1,90	-9,87	-1,97	5,07	-7,22	-3,55
BSF-3-M	5,00	4,99	4,91	5,12	11,00	17,92	1,65	0,88	-3,34	1,57	-6,63	-2,16	20,89	-6,79	-3,22
BSF-4-M	4,95	5,03	5,16	5,15	7,37	18,25	11,64	-3,62	-2,17	-0,53	-8,17	-1,89	20,88	-6,78	-3,13
BSF-5-L	4,75	4,60	5,00	4,88	17,84	28,02	22,27	-0,85	-0,63	3,67	-13,86	0,33	56,79	-6,53	-2,98
BSF-6-M	4,74	4,90	4,84	5,01	33,63	23,61	-1,70	16,03	3,44	-0,71	-10,83	0,76	64,23	-6,75	-3,20
BSF-7-M	4,84	4,98	4,91	5,13	5,38	20,16	-0,20	12,51	-2,66	-6,73	-5,91	-1,63	20,92	-6,84	-3,27
BSF-8-M	4,51	4,89	4,84	4,95	19,84	17,05	9,70	9,01	-0,15	2,69	-10,71	0,77	48,20	-7,14	-3,96
BSF-9-M	4,89	5,26	5,16	4,82	17,64	36,75	24,24	-10,86	-0,91	5,81	-11,27	0,76	62,16	-6,58	-2,98
BSF-10-M	4,86	4,84	4,90	4,99	5,99	24,03	3,13	5,78	-4,35	-1,37	-6,01	-1,94	25,26	-6,76	-3,18
BSF-11-M	4,56	4,98	4,60	5,07	17,27	19,80	10,44	8,62	-0,60	1,78	-9,87	0,77	48,21	-6,47	-2,91
BSF-12-M	4,73	4,96	4,91	5,00	5,11	15,11	-1,84	-12,33	-3,84	8,42	-7,16	-1,99	1,48	-6,71	-3,16
BSF-13-M	4,82	4,93	4,96	4,92	18,91	18,90	6,76	3,46	-0,93	3,69	-10,03	0,77	41,53	-6,64	-3,09
BSF-15-L	4,47	4,76	4,73	4,85	18,91	23,33	44,07	-16,05	-0,58	7,43	-9,50	0,25	67,86	-6,90	-3,36
BSF-16-L	4,43	4,61	4,60	4,69	16,40	19,02	7,03	11,71	-0,13	-0,50	-10,93	0,77	43,37	-6,79	-3,37
BSF-17-M	4,91	5,04	5,02	5,18	19,40	18,04	11,43	8,73	-2,07	-0,75	-9,41	0,77	46,14	-6,46	-2,90
BSF-18-M	4,84	4,93	5,16	5,09	19,67	21,53	9,95	3,65	-0,89	0,62	-11,65	0,31	43,19	-6,42	-2,87
BSF-19-M	4,69	5,04	4,85	5,06	16,68	18,60	9,69	9,54	0,46	1,87	-11,70	0,77	45,91	-6,60	-3,05
BSF-20-M	4,83	4,87	4,84	5,09	14,67	22,49	1,15	1,07	-2,99	1,59	-6,76	-1,27	29,95	-6,78	-3,21
BSF-21-H	5,22	5,41	5,04	5,22	17,57	22,75	9,72	11,05	-0,21	0,09	-8,79	0,77	52,95	-6,46	-2,91
BSF-22-M	4,99	5,15	5,01	5,14	29,74	20,01	8,48	10,51	-1,13	2,58	-9,20	0,75	61,74	-6,45	-2,89
BSF-23-L	4,00	4,00	4,29	4,07	17,23	24,26	12,93	5,55	-1,84	2,45	-9,46	-0,11	51,01	-5,83	-2,88
BSF-24-M	4,86	5,01	5,20	4,94	27,24	19,55	8,93	3,09	-0,32	-0,69	-10,59	0,30	47,51	-6,41	-2,85
BSF-25-L	4,28	4,36	4,52	4,39	19,11	19,75	10,96	10,73	-0,15	-4,76	-15,83	0,02	39,83	-6,78	-3,38
BSF-26-M	5,02	5,15	5,00	5,12	20,37	19,16	-0,45	14,71	-1,16	-1,07	-10,64	0,77	41,69	-6,47	-2,97
BSF-27-H	5,32	5,51	5,33	5,61	21,70	21,13	10,29	11,19	-1,87	3,26	-8,88	0,77	57,59	-6,44	-2,88
BSF-28-M	4,86	5,03	4,86	5,21	23,40	21,80	10,82	8,17	0,55	1,82	-8,40	0,77	58,93	-6,45	-2,90
BSF-29-M	4,89	5,11	5,24	5,28	22,48	24,27	12,01	8,57	0,13	1,14	-10,08	0,21	58,73	-6,40	-2,85
BSF-30-M	4,56	4,85	4,76	4,58	16,81	24,40	15,79	18,12	0,46	-3,01	-11,81	-0,51	60,25	-6,51	-2,94
BSF-32-M	4,59	4,98	4,84	5,00	19,82	21,38	6,82	7,03	-0,80	-2,99	-12,59	0,77	39,44	-6,70	-3,17
BSF-33-H	5,36	5,47	5,35	5,40	30,15	21,25	11,94	-1,42	-1,55	8,14	-8,94	-3,17	56,40	-6,18	-2,78
BSF-34-H	5,29	5,46	5,37	5,54	19,98	23,77	11,90	9,56	0,12	3,41	-9,54	0,22	59,42	-6,40	-2,85
BSF-35-H	5,71	5,93	5,74	5,51	33,63	23,61	-1,70	16,03	3,44	-0,71	-10,83	0,76	64,23	-6,44	-2,96
BSF-36-M	4,91	5,11	4,91	5,24	21,72	21,22	4,39	2,99	-3,43	8,08	-10,53	-3,39	41,05	-6,30	-2,81
BSF-37-H	5,64	5,60	5,90	5,83	13,27	27,46	5,36	8,46	-4,71	-0,18	-4,89	-2,03	42,74	-6,75	-3,17
BSF-38-H	5,42	5,59	5,70	5,75	25,48	20,55	10,37	8,14	-2,36	0,23	-8,75	0,76	54,42	-6,43	-2,87
BSF-39-H	5,70	5,86	6,17	5,98	23,86	26,32	10,21	8,82	-1,67	1,14	-8,26	0,77	61,19	-6,43	-2,87
BSF-40-H	5,70	5,83	6,07	5,96	25,88	22,19	12,15	6,52	-1,49	4,40	-9,20	0,29	60,74	-6,40	-2,85
NF	3,52	3,52	3,52	3,73	8,82	12,36	2,15	-12,97	-0,37	5,32	-10,26	-0,83	4,22	-7,04	-4,00



Compostos	GAP	μ				CHELPG_											ϕ_1 (C9-N8-N7=C6)	
		x12	x13	x14	x15	N (-NO ₂)	C2	C5	C6	N7	N8	C9	O9	x25	x26			
BSF-1-M	8,72	-2,26	4,96	0,46	5,47	0,826	0,425	0,171	0,032	-0,351	-0,097	0,656	-0,543	175,9	179,7			
BSF-2-L	3,67	7,81	-2,88	0,09	8,33	0,914	0,211	-0,251	0,060	-0,392	0,066	0,536	-0,497	180,0	179,7			
BSF-3-M	3,57	-3,76	-1,12	0,40	3,94	0,855	0,153	-0,215	0,082	-0,409	0,136	0,529	-0,545	-176,4	178,9			
BSF-4-M	3,65	2,14	-1,81	0,28	2,82	0,890	0,194	-0,234	0,077	-0,396	0,016	0,820	-0,604	179,1	179,2			
BSF-5-L	3,55	-0,18	-3,63	2,01	4,16	0,847	0,367	0,093	-0,032	-0,270	-0,119	0,428	-0,579	-179,2	-6,2			
BSF-6-M	3,55	-3,76	0,23	0,35	3,79	0,837	0,172	-0,215	0,034	-0,388	0,170	0,400	-0,521	177,7	179,8			
BSF-7-M	3,57	4,88	-0,42	0,07	4,90	0,865	0,105	-0,250	0,089	-0,436	0,129	0,719	-0,562	178,2	-179,5			
BSF-8-M	3,19	-7,16	9,14	1,35	11,69	0,485	0,351	0,283	0,131	-0,208	-0,257	0,673	-0,538	-179,3	-124,8			
BSF-9-M	3,59	-0,23	-3,89	2,87	4,84	0,840	0,339	0,115	0,023	-0,243	-0,273	0,669	-0,597	-168,3	-11,2			
BSF-10-M	3,57	-3,29	1,09	0,88	3,57	0,893	0,181	-0,244	0,063	-0,415	0,135	0,507	-0,537	-172,5	178,2			
BSF-11-M	3,55	6,06	-8,57	0,10	10,50	0,874	0,381	0,081	0,002	-0,242	-0,203	0,549	-0,536	179,8	178,5			
BSF-12-M	3,55	3,51	-0,33	1,12	3,68	0,809	0,263	-0,143	0,050	-0,379	0,018	0,624	-0,553	173,1	179,0			
BSF-13-M	3,54	-5,74	8,56	0,21	10,31	0,859	0,343	0,098	0,106	-0,322	-0,172	0,589	-0,543	-149,0	180,0			
BSF-15-L	3,54	1,61	7,97	-1,08	8,20	0,835	0,373	0,112	-0,029	-0,235	-0,186	0,616	-0,569	-176,5	-6,1			
BSF-16-L	3,42	0,87	-7,97	-0,28	8,02	0,865	0,358	0,103	0,004	-0,236	-0,184	0,516	-0,519	-179,0	178,0			
BSF-17-M	3,55	-6,96	-8,40	-0,18	10,91	0,861	0,375	0,095	0,017	-0,265	-0,173	0,559	-0,540	170,4	174,6			
BSF-18-M	3,55	-7,34	-9,61	-0,19	12,09	0,850	0,376	0,106	-0,009	-0,246	-0,141	0,510	-0,538	-174,2	-175,4			
BSF-19-M	3,55	-4,45	-8,25	0,02	9,37	0,854	0,373	0,093	-0,001	-0,252	-0,154	0,509	-0,526	-176,1	179,3			
BSF-20-M	3,58	2,35	-2,98	-0,77	3,87	0,834	0,203	-0,190	0,056	-0,384	0,039	0,599	-0,552	-177,8	179,0			
BSF-21-H	3,55	7,35	-8,29	0,05	11,08	0,874	0,398	0,070	-0,009	-0,259	-0,147	0,529	-0,537	-172,6	-178,7			
BSF-22-M	3,56	6,99	-8,32	-1,28	10,94	0,885	0,398	0,050	-0,012	-0,257	-0,146	0,514	-0,530	177,2	178,4			
BSF-23-L	2,95	7,24	-8,45	-0,02	11,12	0,850	0,380	0,093	-0,010	-0,247	-0,183	0,573	-0,547	-179,3	178,7			
BSF-24-M	3,55	-7,79	-9,40	-0,31	12,21	0,856	0,407	0,078	0,078	-0,252	-0,143	0,516	-0,537	-176,2	-175,8			
BSF-25-L	3,40	3,67	-3,40	-2,04	5,40	0,859	0,363	0,097	0,019	-0,244	-0,203	0,535	-0,520	176,0	173,0			
BSF-26-M	3,50	-6,32	-8,51	-0,86	10,63	0,868	0,373	0,092	0,005	-0,257	-0,164	0,546	-0,541	-168,3	-173,8			
BSF-27-H	3,56	-7,31	-8,32	-1,30	11,15	0,857	0,372	0,087	0,008	-0,248	-0,207	0,590	-0,547	-176,1	-179,9			
BSF-28-M	3,56	7,25	-8,43	0,03	11,12	0,837	0,370	0,110	-0,002	-0,252	-0,158	0,521	-0,534	-178,2	-179,6			
BSF-29-M	3,55	-7,68	7,07	0,38	10,90	0,847	0,386	0,101	-0,006	-0,251	-0,179	0,580	-0,556	-177,9	-179,1			
BSF-30-M	3,57	6,17	8,91	1,28	10,92	0,870	0,360	0,082	0,026	-0,262	-0,217	0,625	-0,550	-178,7	180,0			
BSF-32-M	3,53	4,79	-4,62	-1,93	6,93	0,841	0,381	0,115	0,001	-0,251	-0,157	0,488	-0,513	172,5	173,1			
BSF-33-H	3,40	-8,70	-0,76	-8,06	11,88	0,865	0,395	0,082	-0,012	-0,256	-0,150	0,531	-0,551	-179,2	176,4			
BSF-34-H	3,55	7,62	-9,36	-0,07	12,08	0,860	0,392	0,086	-0,023	-0,249	-0,165	0,550	-0,543	179,1	177,4			
BSF-35-H	3,48	7,57	8,39	0,06	11,30	0,839	0,374	0,128	0,002	-0,239	-0,197	0,546	-0,538	-179,7	-180,0			
BSF-36-M	3,49	7,70	5,39	-4,98	10,64	0,852	0,382	0,091	-0,003	-0,291	-0,084	0,536	-0,537	-179,7	-163,9			
BSF-37-H	3,58	2,50	-1,54	1,94	3,52	0,897	0,151	-0,254	0,077	-0,423	0,184	0,432	-0,518	178,9	-177,4			
BSF-38-H	3,56	-8,29	-7,55	-1,10	11,26	0,866	0,379	0,082	-0,004	-0,251	-0,140	0,502	-0,531	-178,5	-176,1			
BSF-39-H	3,56	8,67	-7,30	-0,34	11,34	0,862	0,360	0,081	0,008	-0,253	-0,163	0,537	-0,538	177,5	175,7			
BSF-40-H	3,55	-9,01	-8,25	-1,80	12,47	0,862	0,383	0,083	-0,003	-0,260	-0,125	0,502	-0,533	-177,5	-174,1			
NF	3,04	-7,19	-10,42	1,13	12,71	0,510	0,268	-0,445	0,148	-0,233	-0,238	0,663	-0,541	-179,3	128,0			



Compositos	φ3 (N8- N7=C6-H6)	φ4 (N8- N7=C6-C2)	ClogP	I _{Platt}	I _{Randic}	I _{Balaban}	I _{Harary}	I _{Hyper Wiener}	I _{Sæged}	I _{Wiener}	I _{Wiener Polarity}	Dreiding	VvdW	PSA	AwdW
	x27	x28													
BSF-1-M	179,4	-0,9	0,20	64	9,46	2,10	35,91	1116	397	356	14	332,00	155,22	97,75	279,39
BSF-2-L	179,9	-0,1	0,15	66	10,02	2,06	43,14	1904	588	537	17	264,66	177,91	121,53	275,92
BSF-3-M	-179,9	0,2	2,23	112	14,46	2,01	50,35	3149	843	782	19	1048,67	178,54	97,74	304,99
BSF-4-M	179,7	-0,2	1,17	78	11,19	2,06	43,14	1904	588	537	17	228,86	186,13	106,97	306,52
BSF-5-L	-1,0	179,2	1,11	78	11,56	1,50	52,87	2702	817	725	20	257,59	191,83	110,88	303,36
BSF-6-M	179,8	-0,3	1,87	112	13,71	1,50	52,87	2702	817	725	20	223,41	216,31	97,74	351,38
BSF-7-M	-180,0	-0,1	1,87	102	13,69	2,12	51,83	2799	800	739	19	227,54	219,48	106,97	366,90
BSF-8-M	-7,6	178,6	2,05	88	12,89	1,43	57,13	3271	1055	845	23	232,84	215,94	97,74	336,61
BSF-9-M	-0,5	179,3	1,97	78	11,56	1,50	52,87	2702	817	725	20	396,11	199,09	125,98	306,48
BSF-10-M	-179,7	0,6	2,13	124	14,96	1,43	57,13	3271	1055	845	23	238,91	233,44	97,74	376,03
BSF-11-M	-0,4	179,6	2,57	100	14,11	1,61	61,81	3847	1218	968	25	255,84	231,30	97,74	367,08
BSF-12-M	-180,0	-0,4	2,03	100	14,14	1,54	60,71	4171	1231	1007	23	232,93	231,50	97,74	362,75
BSF-13-M	0,8	-179,1	2,57	100	14,11	1,59	61,58	3968	1244	981	25	255,58	230,32	97,74	365,94
BSF-15-L	-0,5	179,4	0,91	82	11,95	1,45	57,63	3160	930	831	23	244,44	211,81	151,76	327,92
BSF-16-L	-0,3	179,6	1,91	90	13,43	1,51	65,80	4821	1453	1137	27	231,58	229,82	121,53	349,83
BSF-17-M	-1,1	179,6	3,01	112	15,36	1,51	65,80	4821	1453	1137	27	239,70	247,53	97,74	395,35
BSF-18-M	0,9	-179,5	1,89	102	14,58	1,51	65,80	4821	1453	1137	27	239,49	239,31	106,97	380,30
BSF-19-M	0,1	179,7	2,66	88	12,89	1,59	61,58	3968	1244	981	25	231,09	227,30	97,74	349,31
BSF-20-M	-179,7	0,2	3,57	148	18,21	1,83	61,36	6184	1363	1287	22	220,55	279,13	97,74	472,69
BSF-21-H	0,5	179,9	3,30	124	16,61	1,46	70,52	5677	1664	1295	29	239,20	264,67	97,74	425,15
BSF-22-M	-0,2	180,0	3,46	124	16,61	1,44	69,92	5851	1683	1314	28	239,34	264,61	97,74	425,79
BSF-23-L	-0,1	179,7	2,16	118	16,23	1,46	70,52	5677	1664	1295	29	249,87	259,77	100,98	419,57
BSF-24-M	0,7	-179,5	2,25	114	15,83	1,44	69,92	5851	1683	1314	28	245,92	256,39	106,97	412,35
BSF-25-L	-1,0	179,1	1,99	94	13,81	1,50	71,11	5288	1586	1256	29	242,38	236,00	143,56	373,07
BSF-26-M	1,2	-179,6	3,04	112	15,72	1,29	77,21	6129	2021	1411	32	254,99	256,81	97,74	395,40
BSF-27-H	0,1	179,7	3,90	136	17,86	1,56	73,99	7080	1935	1513	29	240,29	281,70	97,74	456,54
BSF-28-M	0,0	179,9	3,60	136	17,86	1,62	75,75	6536	1877	1455	31	252,34	281,96	97,74	459,69
BSF-29-M	0,2	-179,9	2,77	126	17,08	1,56	73,99	7089	1935	1513	29	249,51	273,45	106,97	441,83
BSF-30-M	0,0	179,9	1,74	116	16,26	1,66	75,91	6157	1819	1419	32	247,82	265,09	116,20	427,57
BSF-32-M	-1,2	179,3	2,93	100	14,11	1,68	76,50	6013	1773	1403	31	238,97	245,39	97,74	382,46
BSF-33-H	-0,4	179,5	2,85	142	18,77	1,48	78,04	8531	2210	1735	30	276,70	293,49	109,77	475,01
BSF-34-H	-0,4	179,6	3,22	138	18,33	1,48	78,04	8531	2210	1735	30	246,50	290,53	106,97	472,60
BSF-35-H	0,0	180,0	3,70	124	17,54	1,15	85,50	8985	2585	1859	34	270,27	284,90	97,74	437,85
BSF-36-M	1,5	-178,7	3,55	126	17,86	1,39	91,68	8819	2548	1942	35	269,18	294,03	106,97	455,57
BSF-37-H	179,9	0,0	4,38	184	21,21	1,48	78,04	8531	2210	1735	30	238,90	318,88	97,74	528,84
BSF-38-H	0,6	-179,5	4,34	148	19,11	1,48	78,04	8531	2210	1735	30	249,22	298,81	97,74	487,80
BSF-39-H	-0,6	179,5	5,23	172	21,61	1,51	86,12	12196	2833	2252	32	250,74	332,95	97,74	547,87
BSF-40-H	0,8	-179,2	4,55	174	22,08	1,44	90,17	14461	3183	2549	33	260,79	341,81	106,97	564,49
NF	0,8	178,6	1,75	90	13,43	1,59	61,58	3968	1244	981	25	228,10	225,15	117,97	349,36



Compostos	ASA	ASA+	ASA-	ASA_H	ASA_P	RM	Pi-energy	HBD	HBA	RB	n° atomos	MM	RMN ¹³ C C9	RMN ¹ H H8	RMN ¹ H H6
	x42	x43	x44	x45	x46	x47	x48	x49	x50	x51	x52	x53	x54	x55	x56
BSF-1-M	455,21	280,79	174,42	234,81	220,40	45,53	30,99	1	4	3	21	197,15	172,27	11,74	8,14
BSF-2-L	415,04	230,10	184,94	193,93	221,11	50,85	33,60	1	5	4	22	222,16	170,3	12,14	8,14
BSF-3-M	293,66	194,29	99,38	217,70	75,96	63,96	30,99	1	4	7	33	253,26	174,7	11,7	8,16
BSF-4-M	480,36	291,73	188,63	284,73	195,63	51,90	35,36	1	4	5	25	227,18	153,1	11,53	7,98
BSF-5-L	465,74	303,81	161,93	248,97	216,77	58,59	40,57	1	4	4	25	249,18	154,2	12,23	7,99
BSF-6-M	411,55	267,52	144,03	273,69	137,86	62,13	30,99	1	4	4	31	251,24	177,6	11,71	8,19
BSF-7-M	414,79	258,84	155,95	264,35	150,44	60,96	35,36	1	4	5	31	255,23	167,4	11,34	7,97
BSF-8-M	505,51	277,55	227,95	317,08	188,42	66,20	39,40	1	4	4	28	259,22	163,43	12,22	8,42
BSF-9-M	474,34	291,60	182,74	283,02	191,31	63,09	38,86	1	4	4	25	265,25	159,1	12,03	8,01
BSF-10-M	421,65	284,24	137,42	290,63	131,03	66,73	30,99	1	4	4	34	265,27	177,2	11,66	8,18
BSF-11-M	545,81	321,17	224,65	325,82	220,00	71,24	39,40	1	4	4	31	273,25	163,6	12,18	8,41
BSF-12-M	447,81	286,76	161,05	314,51	133,30	70,25	38,99	1	4	5	31	273,25	172,6	11,97	8,22
BSF-13-M	542,18	308,04	234,14	356,65	185,53	71,24	39,40	1	4	4	31	273,25	163,27	12,15	8,4
BSF-15-L	486,81	258,26	228,55	275,94	210,87	64,87	40,21	1	6	4	26	281,25	163,5	12,75	8,09
BSF-16-L	510,98	275,89	235,10	288,06	222,92	71,92	42,44	1	5	4	29	284,23	162,1	12,4	8,41
BSF-17-M	567,01	334,54	232,46	383,11	183,89	75,84	39,40	1	4	5	34	287,28	163,4	12,15	8,41
BSF-18-M	566,82	351,71	215,10	411,21	155,61	72,66	43,72	1	5	5	32	289,25	162,4	11,92	8,44
BSF-19-M	517,42	265,18	252,24	332,61	184,81	71,00	42,51	1	5	4	28	293,66	162,32	12,3	8,43
BSF-20-M	594,37	402,76	191,61	444,65	149,72	77,76	30,99	1	4	10	42	295,34	174,7	11,69	8,16
BSF-21-H	583,04	352,14	230,90	429,18	153,86	80,39	39,40	1	4	5	37	301,30	163,4	12,16	8,43
BSF-22-M	580,94	351,04	229,91	427,36	153,58	80,44	39,40	1	4	6	37	301,30	163,3	12,16	8,42
BSF-23-L	587,97	390,27	197,70	427,98	159,98	80,63	42,46	1	5	5	36	302,29	163,2	11,93	8,4
BSF-24-M	607,76	368,79	238,97	439,32	168,44	77,41	43,72	1	5	6	35	303,27	163,4	11,91	8,45
BSF-25-L	545,61	278,58	267,03	306,69	238,93	73,52	51,16	1	6	5	30	304,22	161,3	12,5	8,75
BSF-26-M	558,84	312,07	246,78	357,36	201,49	82,65	45,08	1	4	4	34	309,28	163,5	12,2	8,49
BSF-27-H	632,81	386,31	246,49	431,59	201,22	85,04	39,40	1	4	7	40	315,33	163,29	12,17	8,44
BSF-28-M	593,73	361,41	232,32	392,97	200,77	84,87	39,40	1	4	5	40	315,33	163,4	12,16	8,43
BSF-29-M	633,68	401,20	232,48	430,45	203,22	81,94	43,72	1	5	8	38	317,30	161,7	12,07	8,67
BSF-30-M	617,55	419,99	197,56	371,71	245,84	79,13	48,02	1	6	6	36	319,27	162,9	12,06	8,42
BSF-32-M	549,85	270,96	278,90	234,07	315,78	72,17	55,66	1	7	5	31	327,22	162	12,39	8,42
BSF-33-H	639,58	410,22	229,36	415,19	224,39	90,27	42,46	2	5	8	42	330,34	165,7	11,84	8,37
BSF-34-H	660,56	430,97	229,59	457,80	202,76	86,54	43,72	1	5	8	41	331,33	162,8	12,09	8,41
BSF-35-H	610,16	351,61	258,56	408,77	201,40	91,34	47,79	1	4	5	38	335,32	170,5	12,08	8,47
BSF-36-M	605,78	366,84	238,93	421,31	184,47	92,44	51,85	1	4	6	39	351,32	169,5	12,14	8,3
BSF-37-H	599,70	415,23	184,47	459,00	140,70	89,68	30,99	1	4	8	49	335,40	177,3	11,67	8,17
BSF-38-H	666,79	411,29	255,49	464,56	202,23	89,65	39,40	1	4	8	43	329,36	163,3	12,15	8,41
BSF-39-H	720,12	455,77	264,34	518,55	201,57	98,85	39,40	1	4	10	49	357,41	163,3	12,15	8,42
BSF-40-H	743,20	487,65	255,55	538,19	205,01	100,34	43,72	1	5	11	50	373,41	161,8	12,09	8,41
NF	515,41	305,86	209,55	273,93	241,48	68,18	43,72	2	5	4	29	275,22	161,1	12,02	8,39

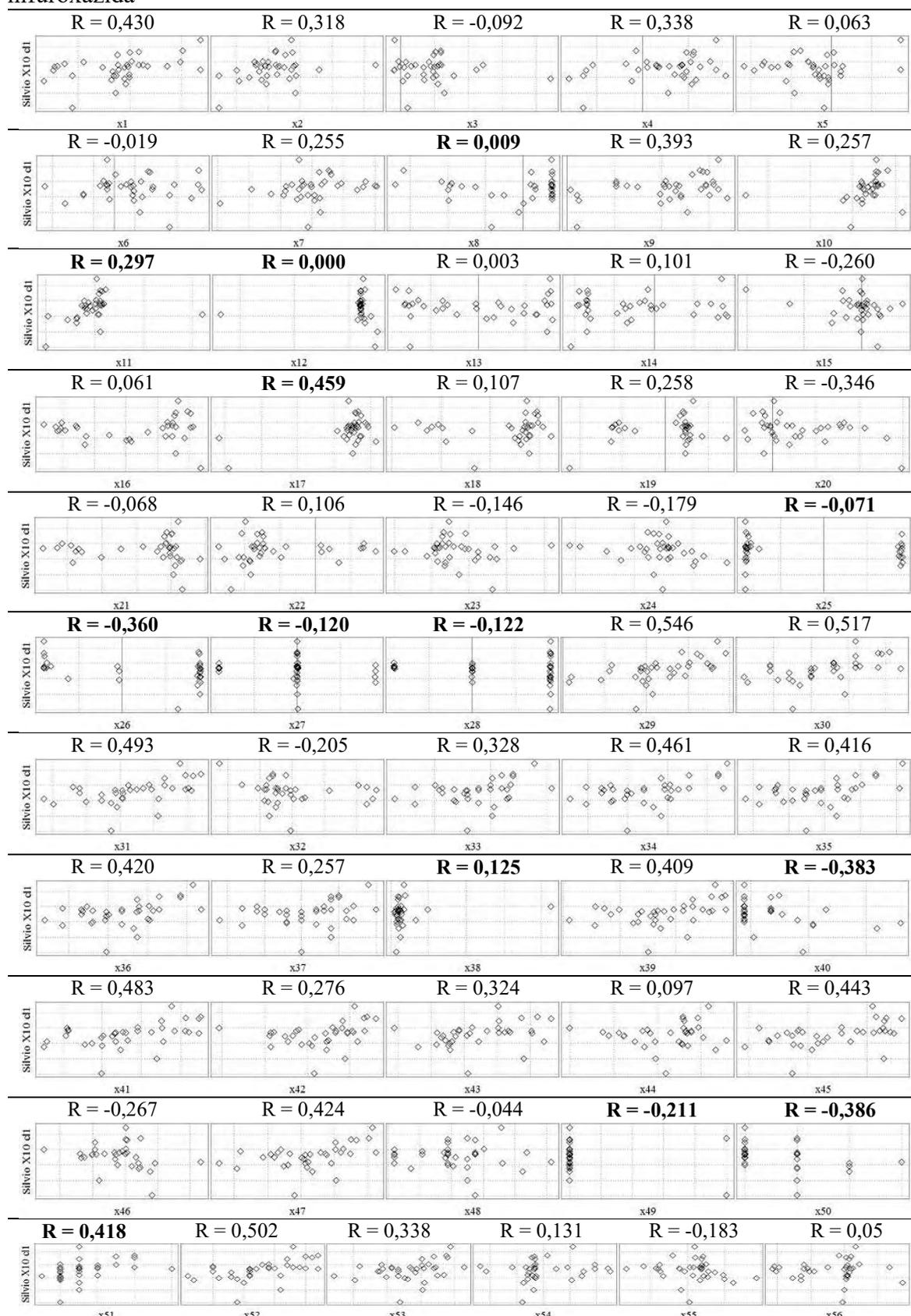
Anexo 7

Gráficos de dispersão para seleção de descritores mais correlacionados com a atividade biológica

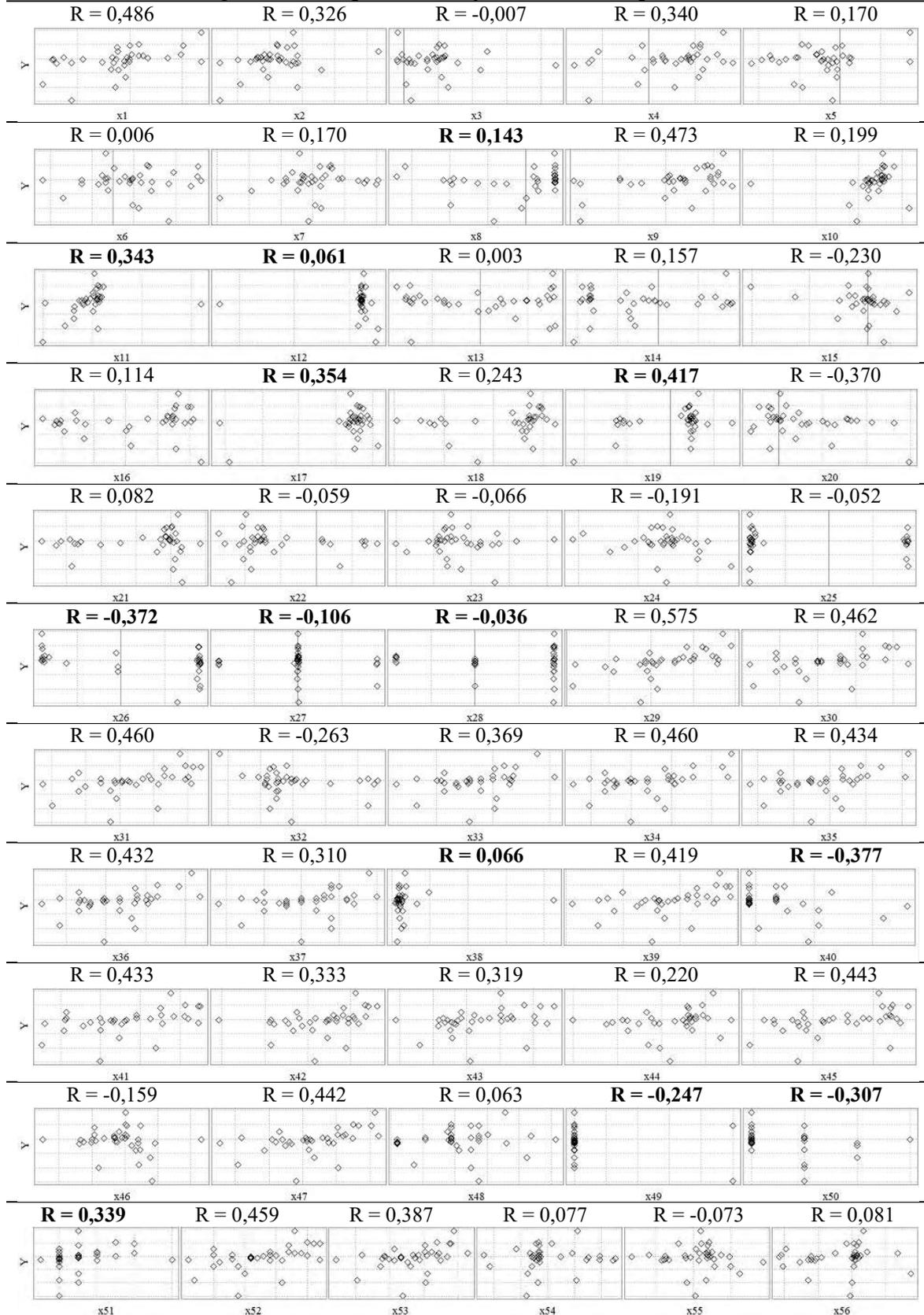
Valores de correlação de Pearson (**R**) que não apresentaram boa correlação com a atividade estão destacados em negrito

Gráficos de dispersão – conjunto N = 36	p. 347
Gráficos de dispersão – conjunto N = 13	p. 351
Gráficos de dispersão – conjunto N = 22	p. 355

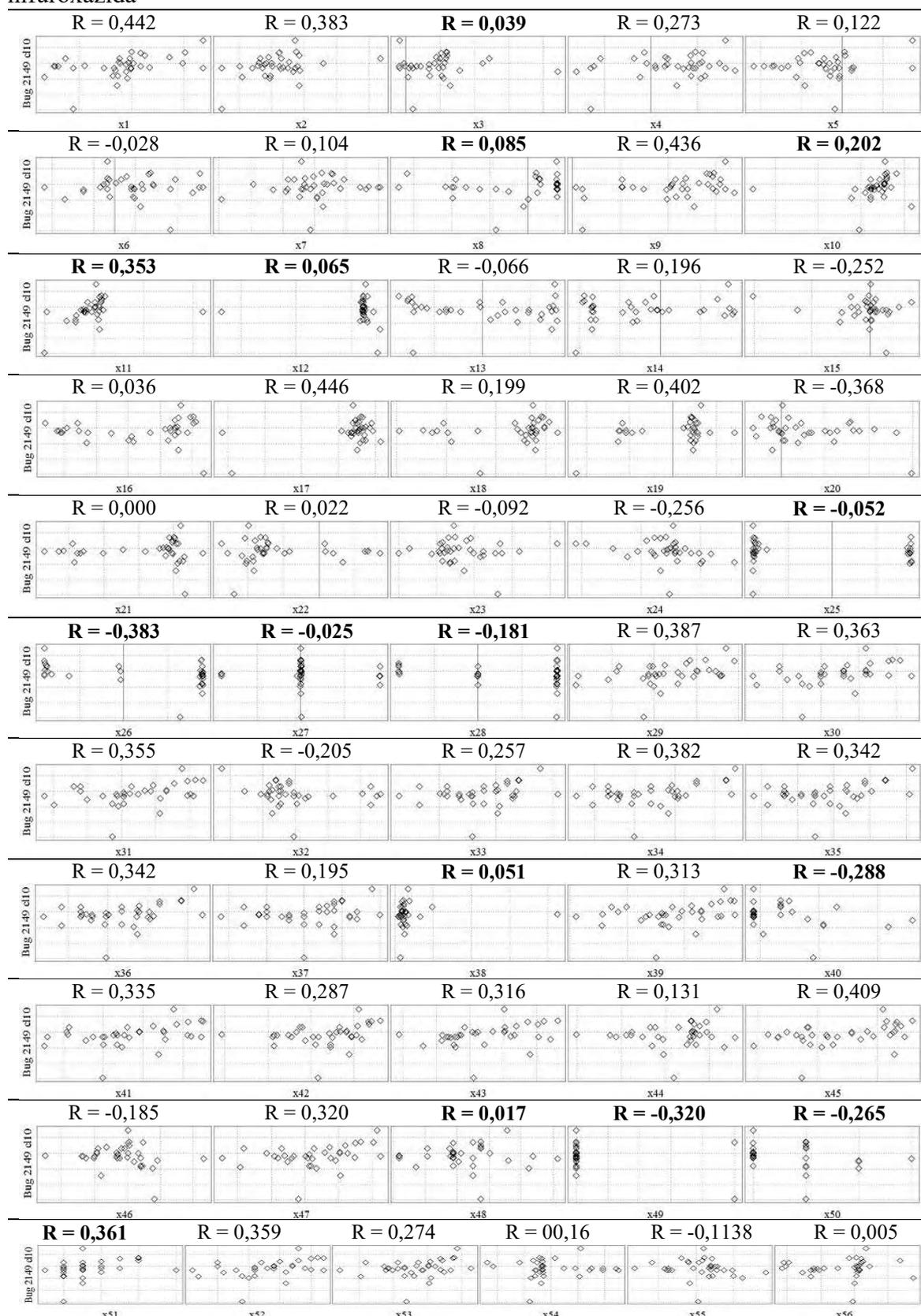
Descritores *versus* \log_1/IC_{50} da cepa Silvio X10 c11 do conjunto de 34 compostos e nifuroxazida



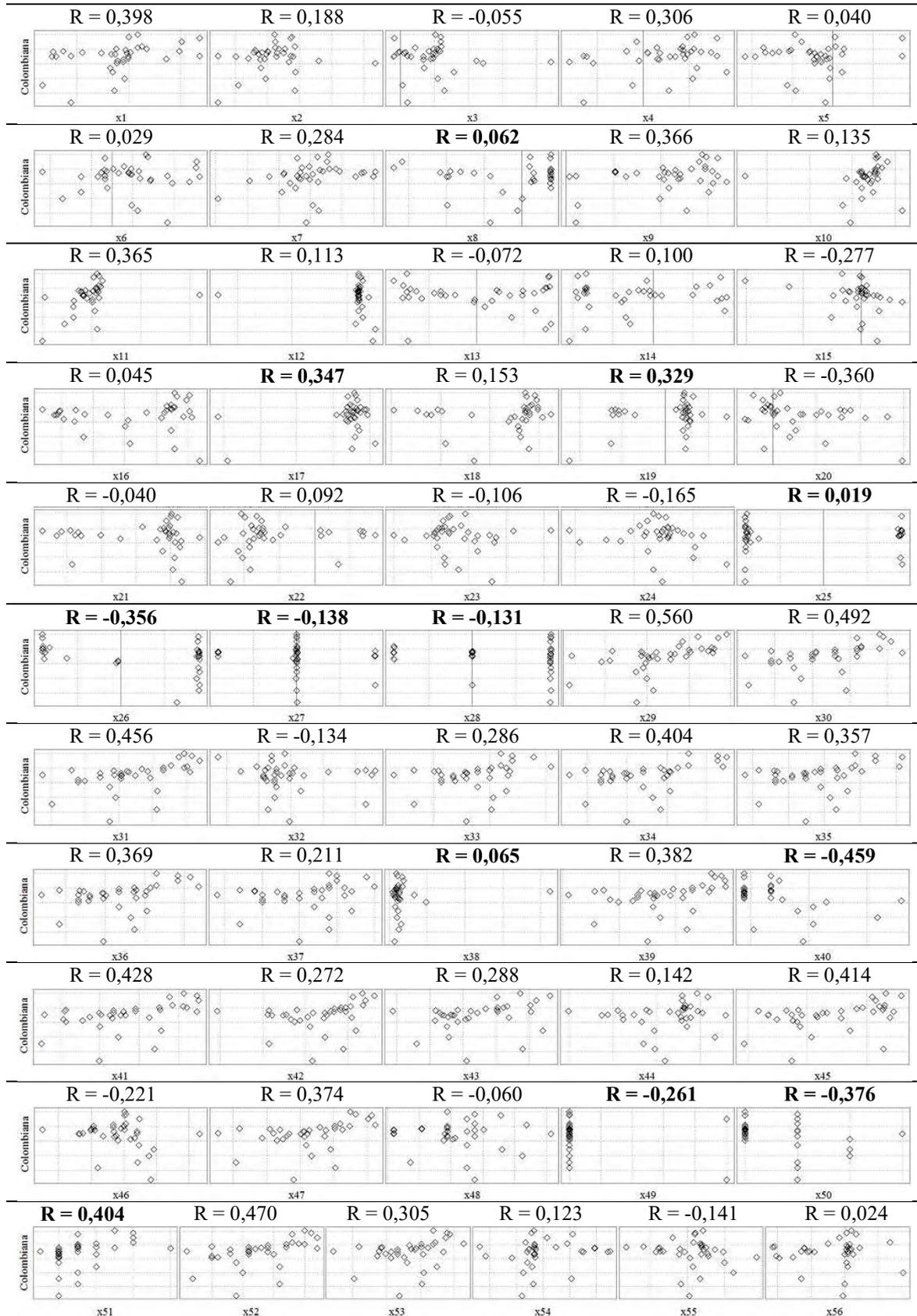
Descritores *versus* \log_1/IC_{50} da cepa Y do conjunto de 34 compostos e nifuroxazida



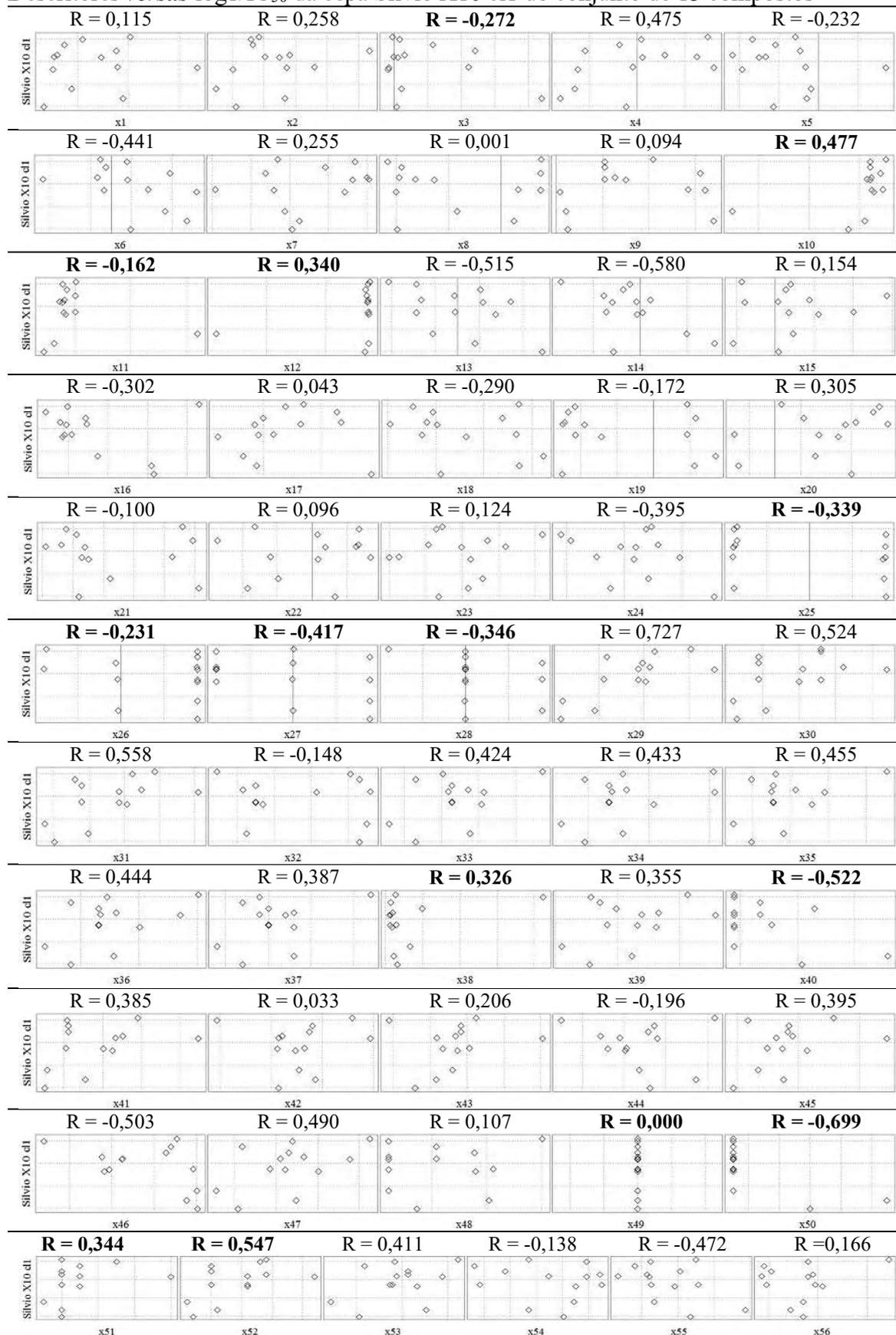
Descritores *versus* \log_1/IC_{50} da cepa Bug 2149 cl10 do conjunto de 34 compostos e nifuroxazida



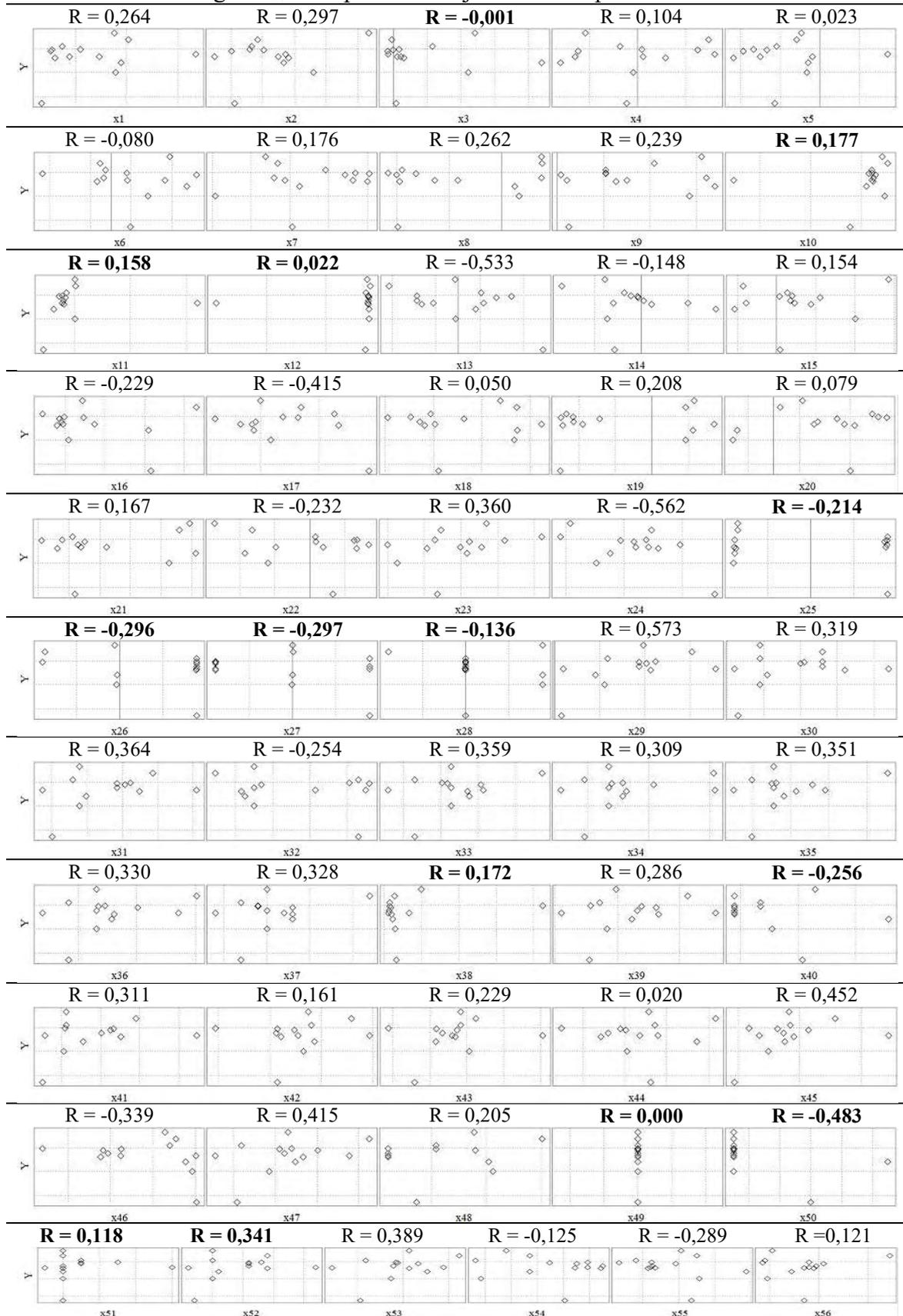
Descritores *versus* \log_1/IC_{50} da cepa Colombiana do conjunto de 34 compostos e nifuroxazida



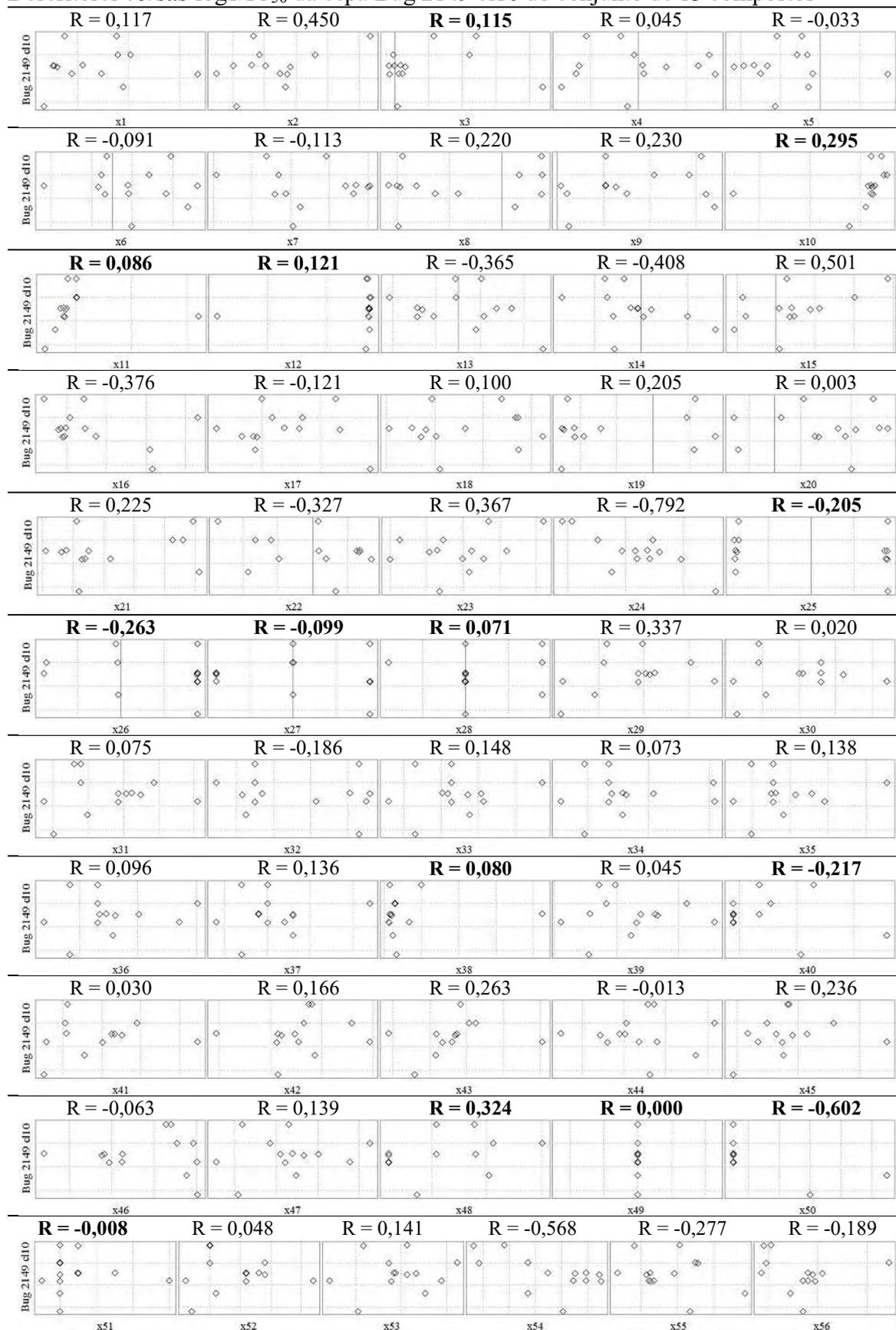
Descritores *versus* \log_1/IC_{50} da cepa Silvio X10 d1 do conjunto de 13 compostos



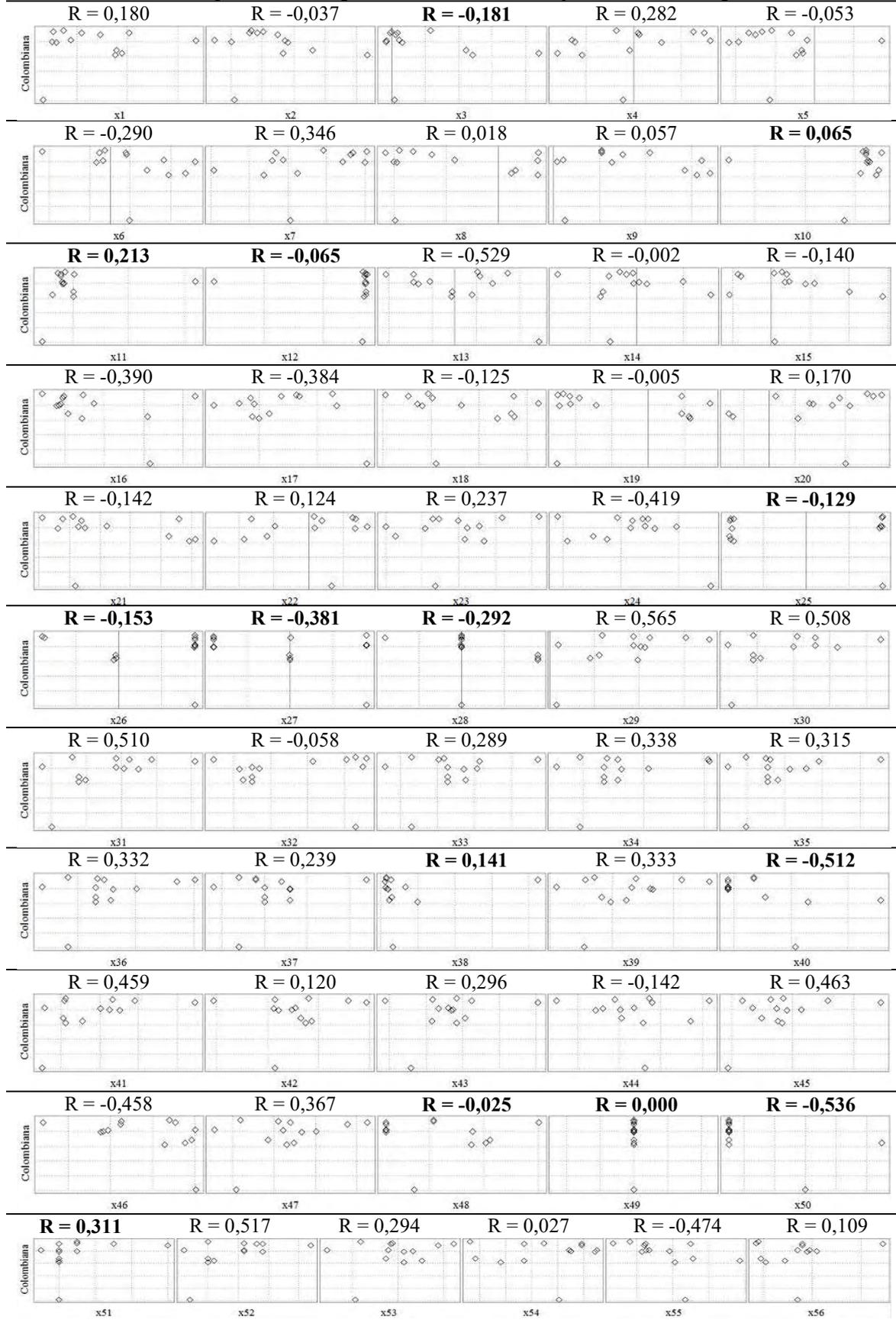
Descritores *versus* \log_1/IC_{50} da cepa Y do conjunto 13 compostos



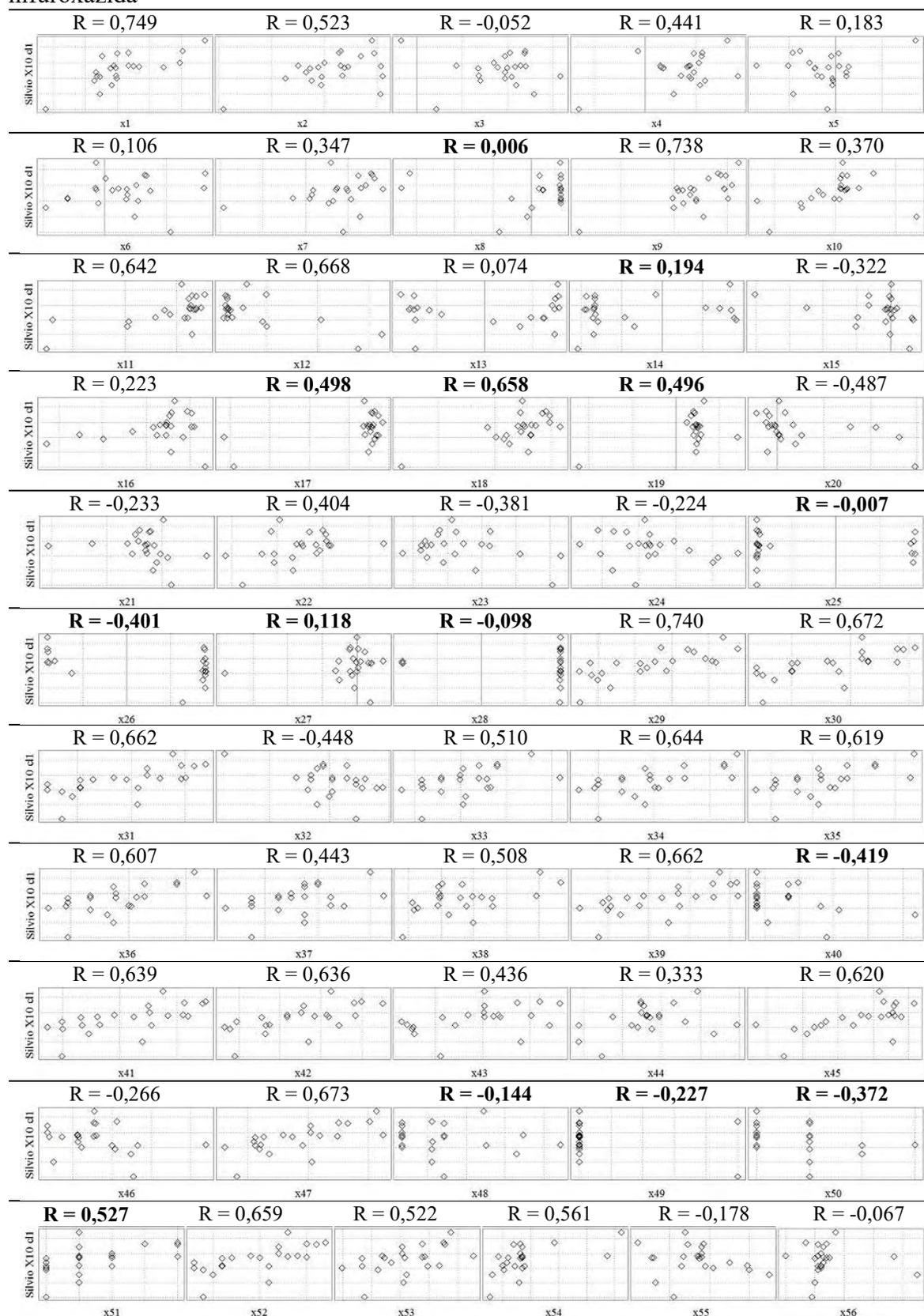
Descritores *versus* \log_1/IC_{50} da cepa Bug 2149 d10 do conjunto de 13 compostos



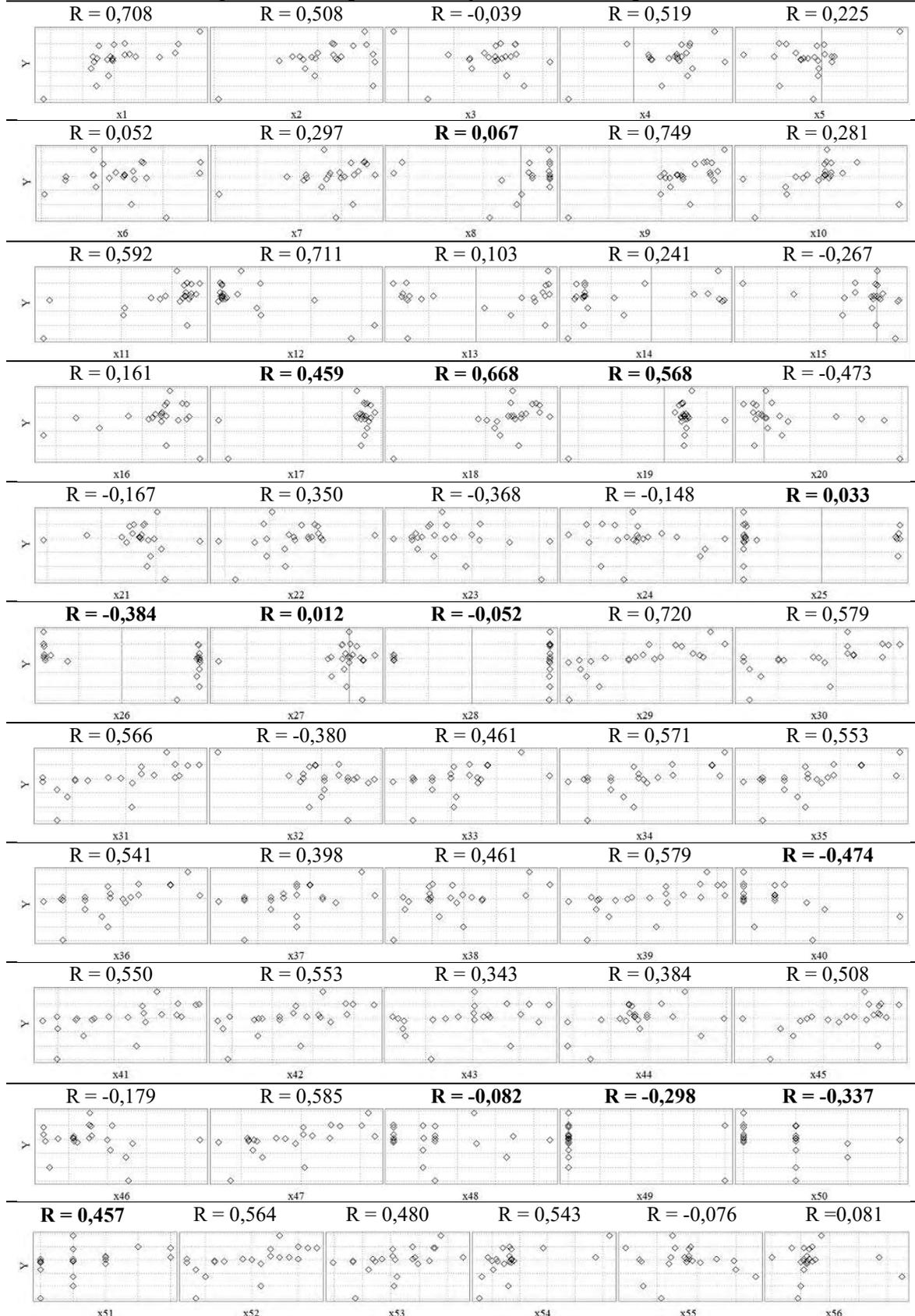
Descritores *versus* $\log 1/IC_{50}$ da cepa Colombiana do conjunto de 13 compostos



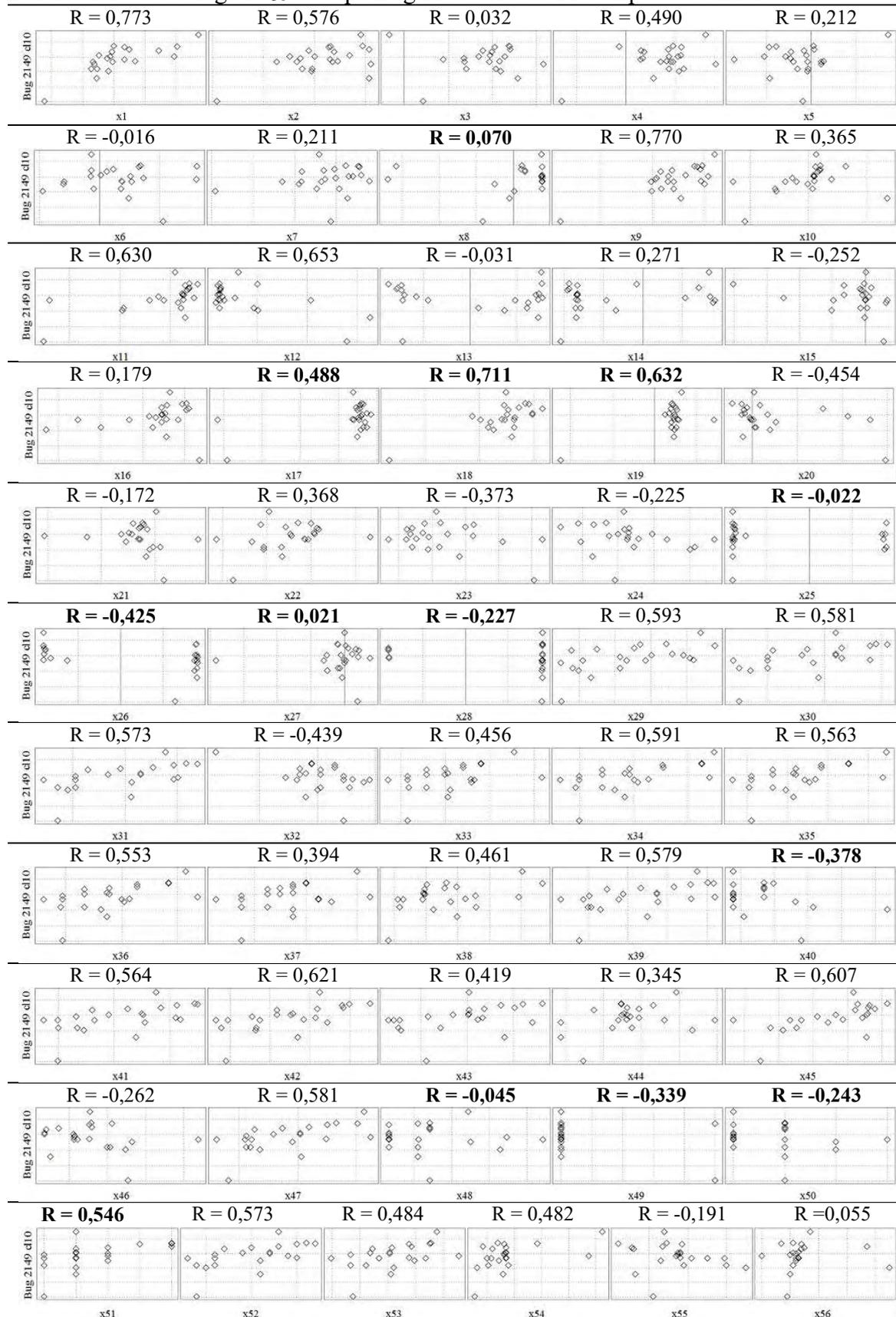
Descritores *versus* \log_1/IC_{50} da cepa Silvio X10 cl1 do conjunto de 21 compostos e nifuroxazida



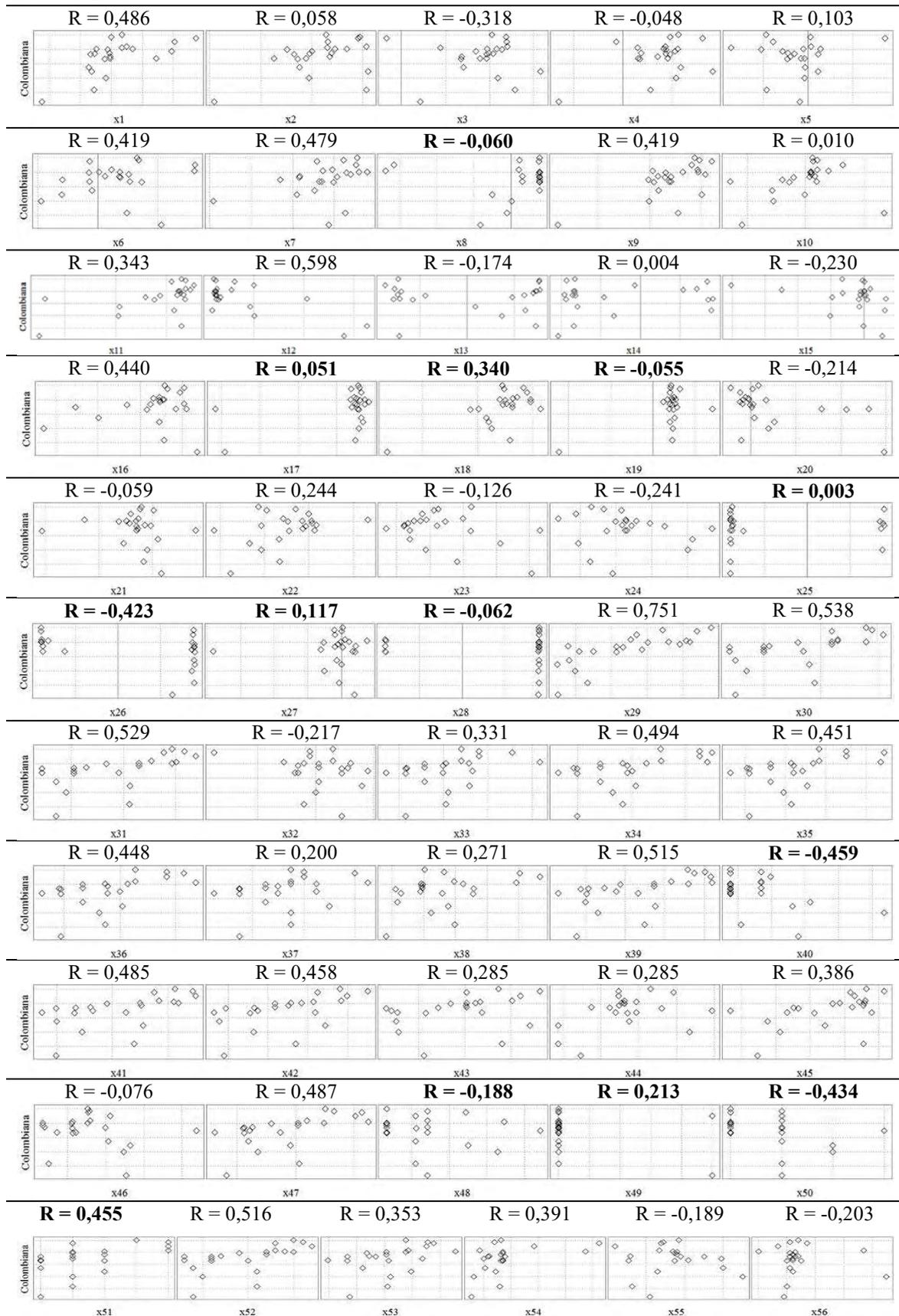
Descritores *versus* \log_1/IC_{50} da cepa Y do conjunto de 21 compostos e nifuroxazida



Descritores *versus* $\log 1/IC_{50}$ da cepa Bug 2149 cl10 de 21 compostos e nifuroxazida



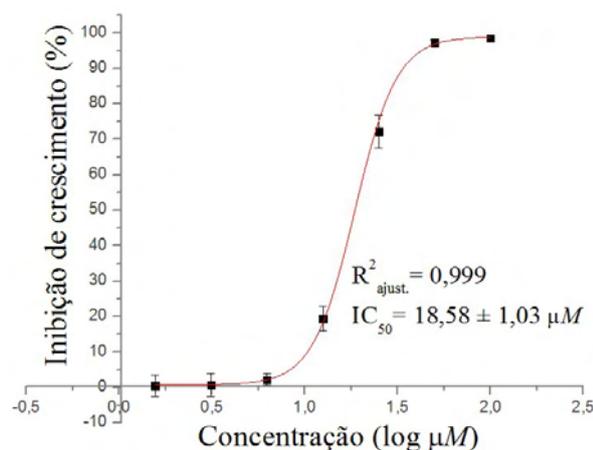
Descritores *versus* \log_1/IC_{50} da cepa Colombiana do conjunto de 21 compostos e nifuroxazida



Anexo 8

Dados de citotoxicidade frente a células LLC-MK₂ dos compostos e fármacos

composto 26		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	98,5 \pm 0,73
50,00	1,699	97,3 \pm 0,80
25,00	1,398	72,2 \pm 4,58
12,50	1,097	19,4 \pm 3,51
6,25	0,796	2,2 \pm 1,71
3,12	0,494	0,7 \pm 3,31
1,56	0,193	0,5 \pm 3,10



composto 27		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	49,75 \pm 4,56
50,00	1,699	35,15 \pm 2,21
25,00	1,398	22,98 \pm 1,56
12,50	1,097	12,96 \pm 5,87
6,25	0,796	12,96 \pm 3,78
3,12	0,494	12,43 \pm 1,56
1,56	0,193	11,29 \pm 2,07

composto 33		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	46,96 \pm 1,25
50,00	1,699	30,96 \pm 1,45
25,00	1,398	18,22 \pm 1,62
12,50	1,097	15,72 \pm 1,65
6,25	0,796	20,33 \pm 2,10
3,12	0,494	19,60 \pm 8,56
1,56	0,193	11,36 \pm 1,86

composto 34		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	49,62 \pm 5,47
50,00	1,699	32,70 \pm 3,46
25,00	1,398	14,87 \pm 1,52
12,50	1,097	9,56 \pm 9,49
6,25	0,796	2,53 \pm 3,61
3,12	0,494	0,37 \pm 2,88
1,56	0,193	0,07 \pm 1,08

composto 35		
concentração		IC (%)
μM	$\log \mu\text{M}$	(média \pm dp)
100,00	2,000	45,67 \pm 1,29
50,00	1,699	30,20 \pm 1,22
25,00	1,398	14,68 \pm 3,42
12,50	1,097	4,67 \pm 0,69
6,25	0,796	7,34 \pm 3,01
3,12	0,494	7,96 \pm 1,63
1,56	0,193	6,99 \pm 1,89

composto 37		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média ± dp)
100,00	2,000	25,692 ±1,53
50,00	1,699	14,039 ±1,85
25,00	1,398	1,733 ±1,26
12,50	1,097	1,824 ±3,46
6,25	0,796	1,077 ±3,40
3,12	0,494	1,777 ±8,90
1,56	0,193	0,349 ±9,13

composto 38		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média ± dp)
200,00	2,301	56,51 ±6,58
100,00	2,000	49,82 ±1,75
50,00	1,699	34,83 ±1,96
25,00	1,398	18,81 ±6,66
12,50	1,097	13,91 ±4,31
6,25	0,796	10,61 ±1,12
3,12	0,495	8,33 ±1,11
1,56	0,194	8,16 ±5,14

composto 39		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média ± dp)
100,00	2,000	44,70 ±2,17
50,00	1,699	23,71 ±5,89
25,00	1,398	25,35 ±1,58
12,50	1,097	17,75 ±4,61
6,25	0,796	18,17 ±0,37
3,12	0,494	13,18 ±4,42
1,56	0,193	11,61 ±2,98
0,78	-0,108	12,26 ±4,70

composto 40		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média ± dp)
100,00	2,000	29,81 ±3,17
50,00	1,699	24,65 ±2,98
25,00	1,398	16,32 ±4,47
12,50	1,097	13,56 ±2,97
6,25	0,796	11,05 ±2,90
3,12	0,494	11,51 ±1,78
1,56	0,193	9,59 ±1,37
0,78	-0,108	10,36 ±4,78

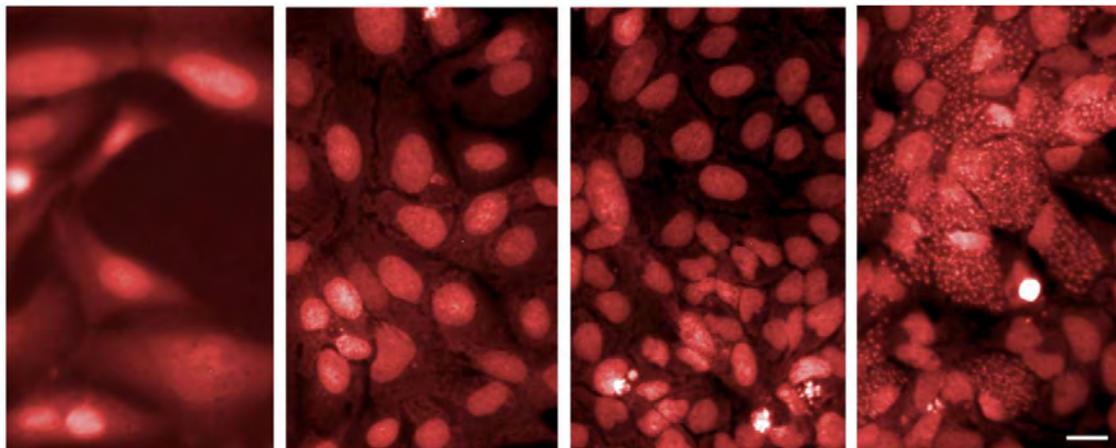
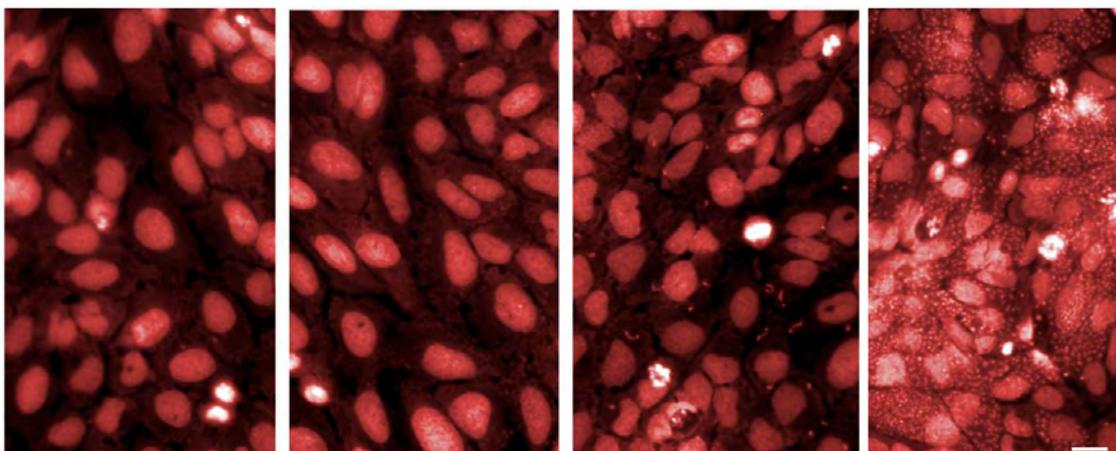
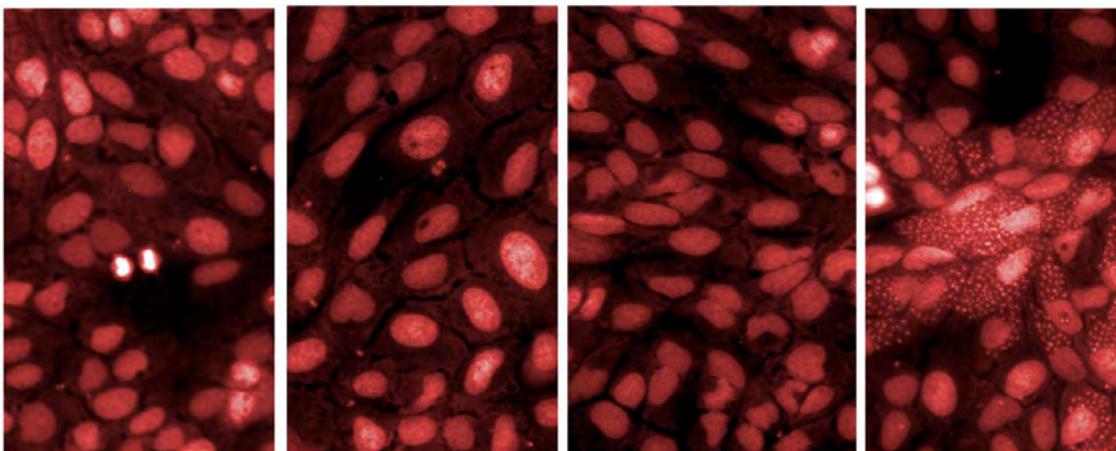
BZD		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média ± dp)
200,00	2,301	48,68 ±1,55
100,00	2,000	15,49 ±1,04
50,00	1,699	-1,01 ±0,34
25,00	1,398	-0,17 ±1,94
12,50	1,097	0,08 ±2,10
6,25	0,796	0,89 ±1,76
3,12	0,495	-0,03 ±2,36
1,56	0,194	0,55 ±1,58

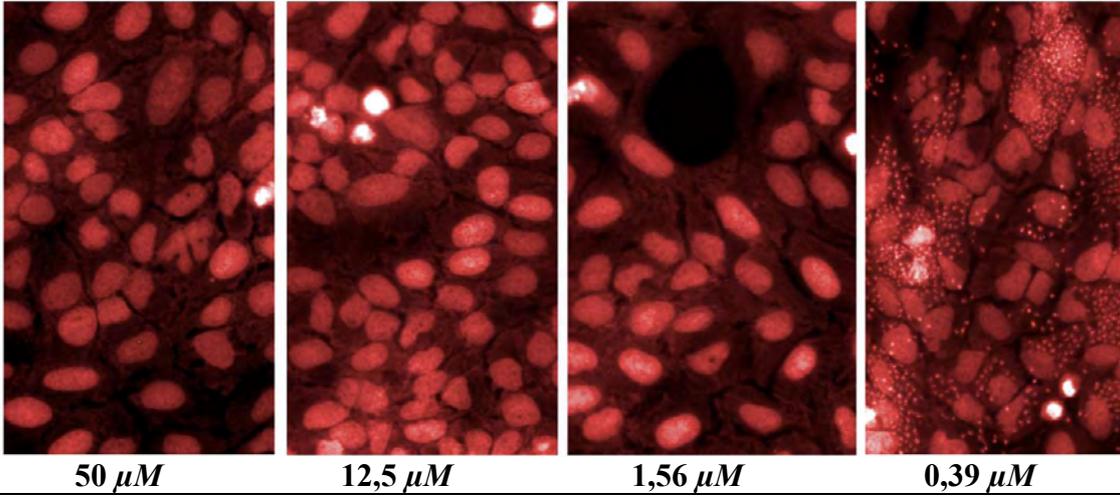
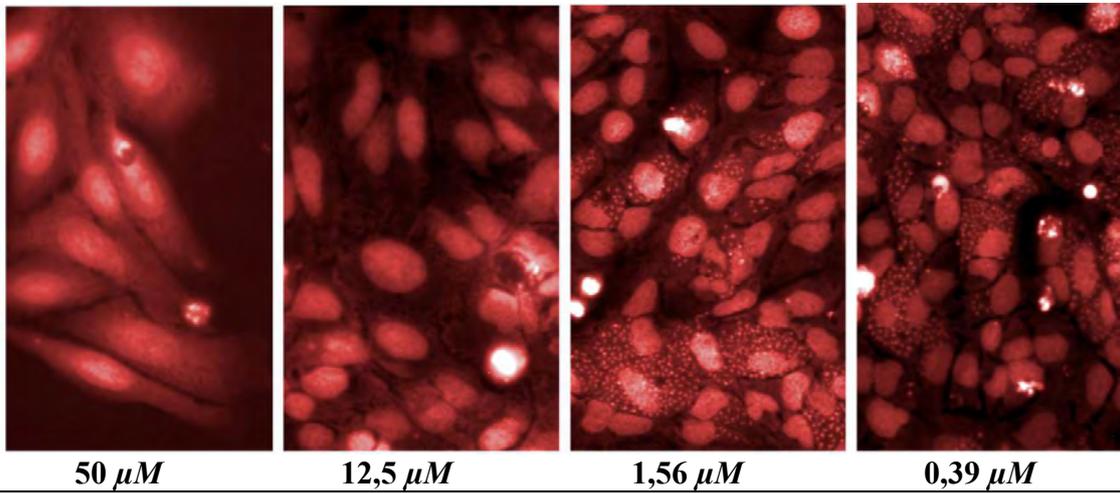
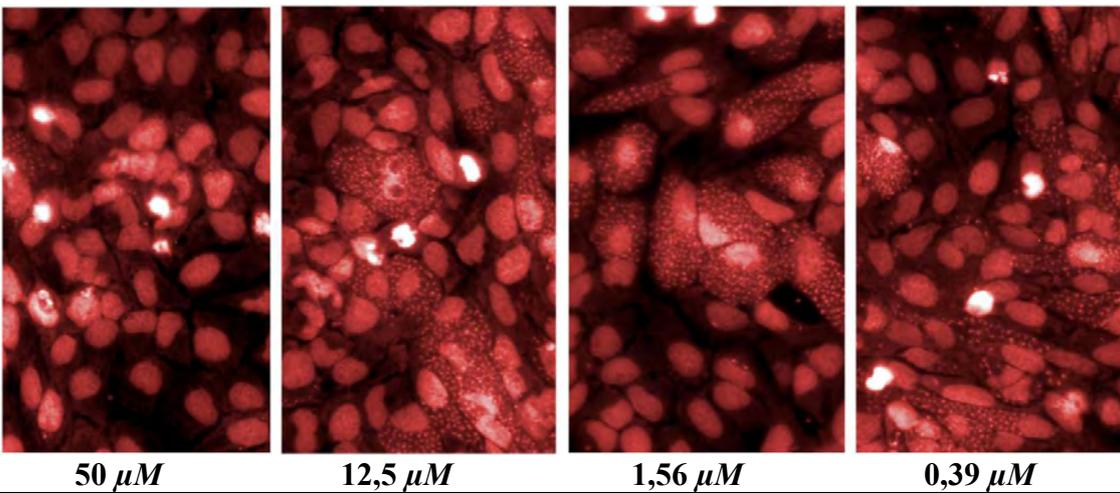
NFX		
concentração		IC (%)
μM	log μM	(média ± dp)
200,00	2,301	42,97 ±0,92
100,00	2,000	21,20 ±2,33
50,00	1,699	3,23 ±1,15
25,00	1,398	4,83 ±1,59
12,50	1,097	8,56 ±2,00
6,25	0,796	8,80 ±1,91
3,12	0,495	8,43 ±2,83
1,56	0,194	6,12 ±3,96

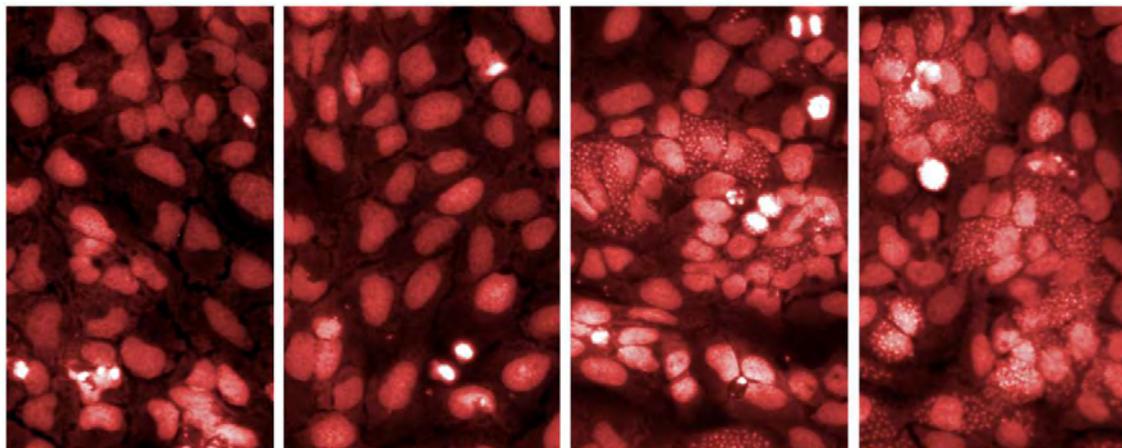
Anexo 9

**Imagens obtidas nos ensaios de atividade frente a forma
amastigota do parasito pelo método de análise de alto
conteúdo (HCA': *High Content Analysis*)**

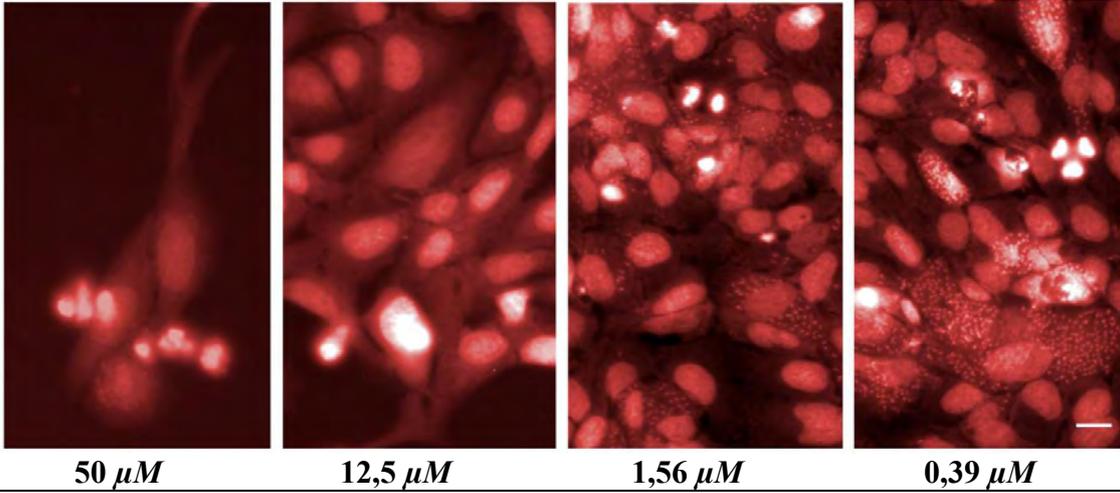
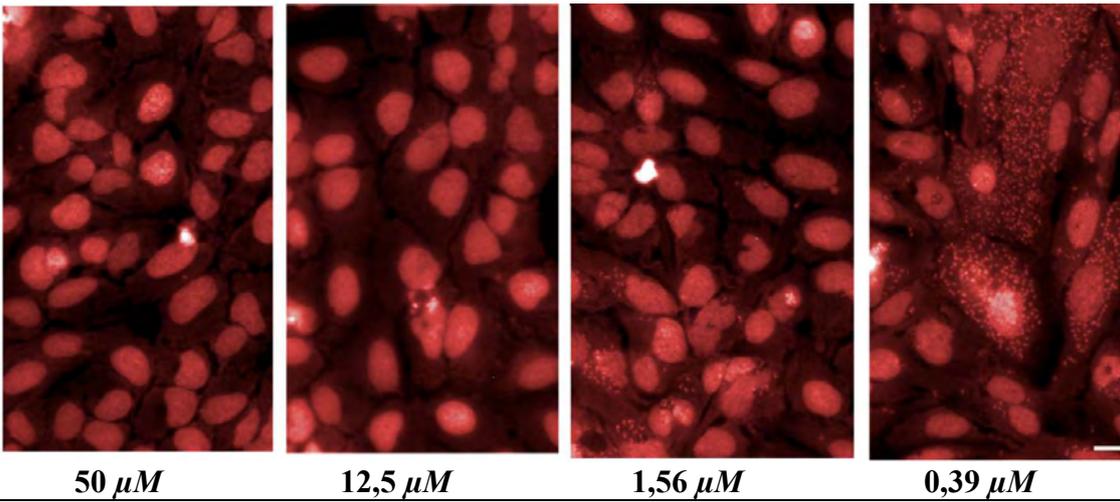
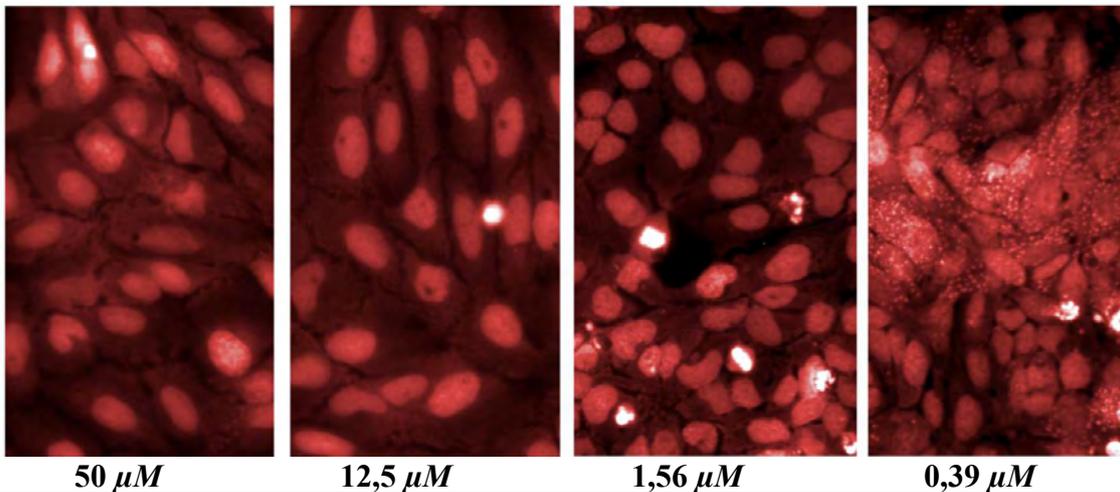
Imagens obtidas no ensaio frente a forma amastigota da cepa $Y_{(ama-R)}$, parcialmente resistente ao benznidazol. Compostos BSF-27, BSF-37, BSF-39, BSF-40, nifuroxazida, benznidazol e nifurtimox nas concentrações de 50, 12,5, 1,56 e 0,39 μM , utilizando escala de 20 μm .

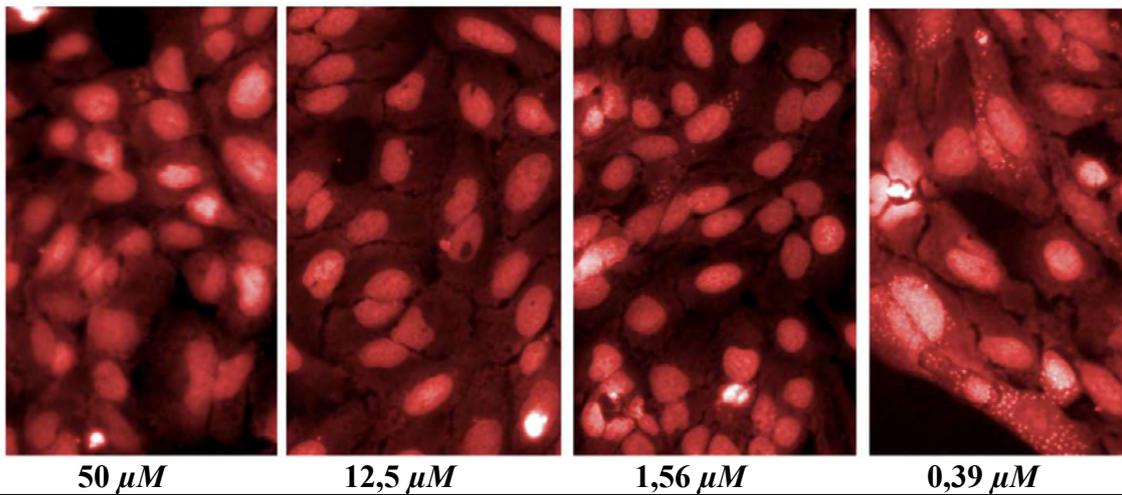
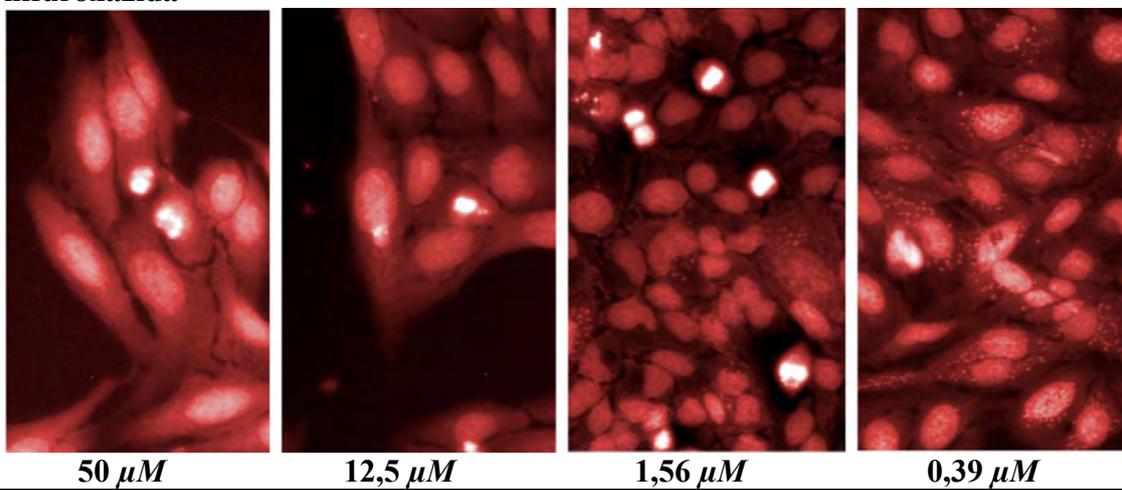
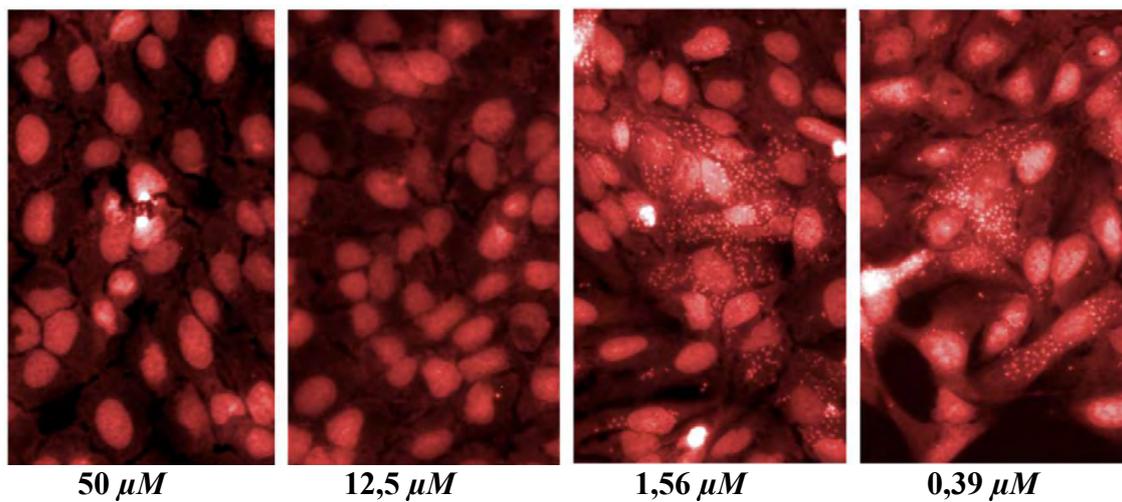
BSF-27*50 μM* *12,5 μM* *1,56 μM* *0,39 μM* **BSF-37***50 μM* *12,5 μM* *1,56 μM* *0,39 μM* **BSF-39***50 μM* *12,5 μM* *1,56 μM* *0,39 μM*

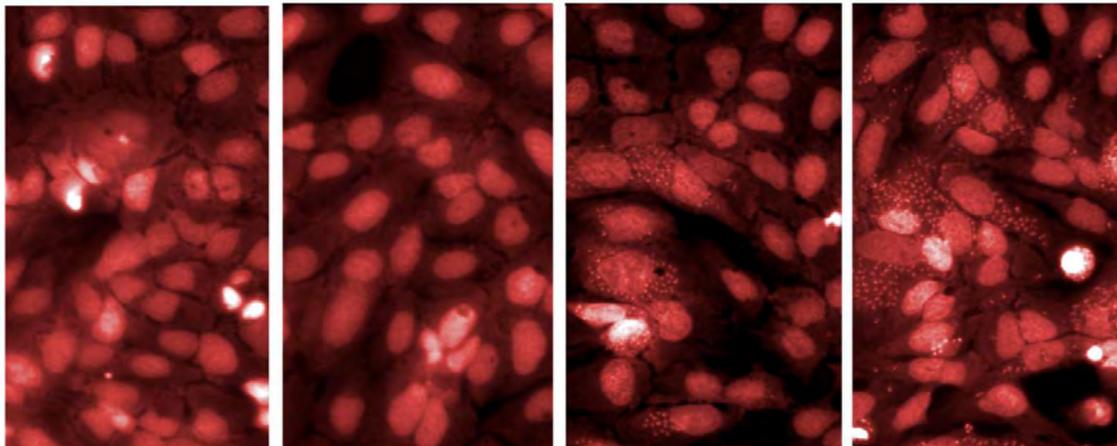
BSF-40**nifuroxazida****benznidazol**

nifurtimox**50 μM** **12,5 μM** **1,56 μM** **0,39 μM**

Imagens obtidas no ensaio frente a forma amastigota da cepa $Y_{(ama-S)}$, sensível ao benznidazol. Compostos BSF-27, BSF-37, BSF-39, BSF-40, nifuroxazida, benznidazol e nifurtimox nas concentrações de 50, 12,5, 1,56 e 0,39 μM , utilizando escala de 20 μm .

BSF-27**BSF-37****BSF-39**

BSF-40**nifuroxazida****benznidazol**

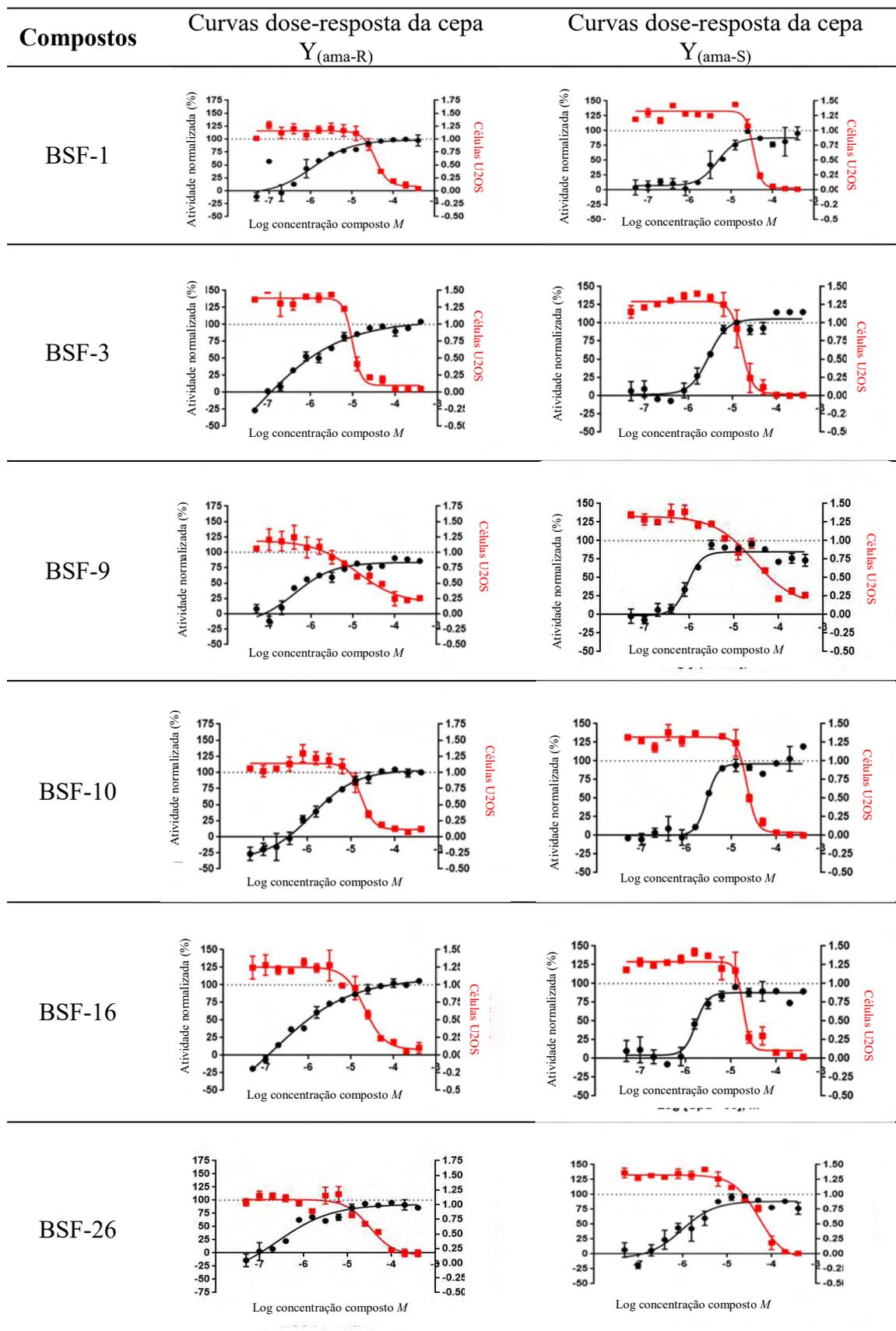
nifurtimox**50 μM** **12,5 μM** **1,56 μM** **0,39 μM**

Anexo 10

Curvas dose-resposta obtidas nos ensaios de atividade frente a forma amastigota do parasito pelo método de análise de alto conteúdo (HCA': *High Content Analysis*)

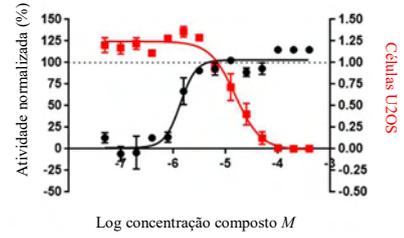
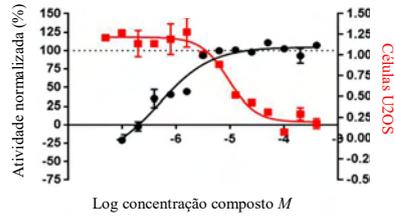
Y_(ama-R): cepa Y parcialmente resistente ao benznidazol;

Y_(ama-S): cepa Y sensível ao benznidazol.

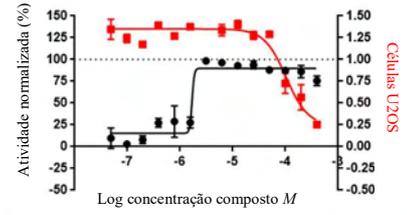
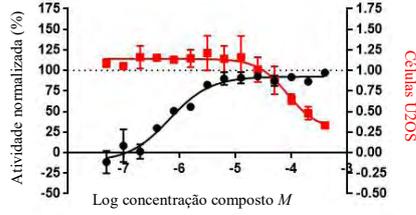


Compostos Curvas dose-resposta da cepa $Y_{(ama-R)}$ Curvas dose-resposta da cepa $Y_{(ama-S)}$

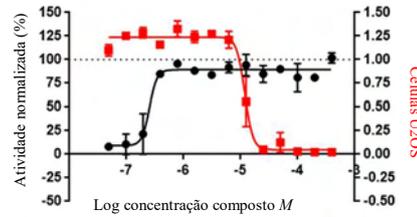
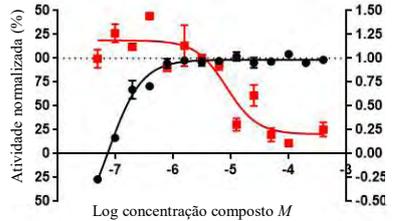
BSF-27



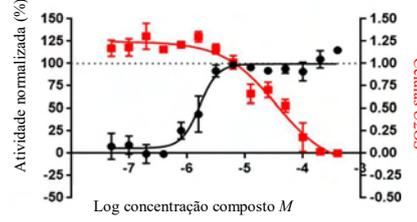
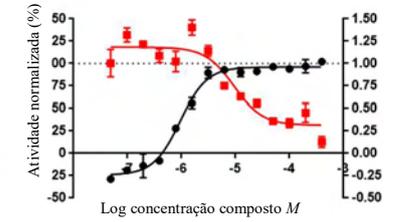
BSF-28



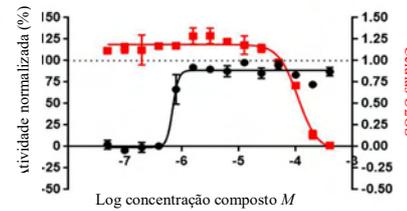
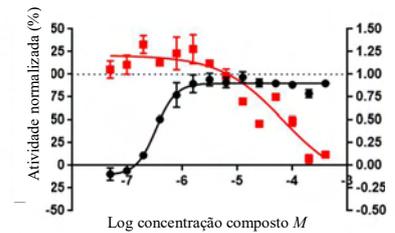
BSF-33



BSF-34



BSF-35



BSF-37

