

UFRRJ

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**ESTUDOS NO REPOSICIONAMENTO DO FÁRMACO NIMESULIDA PARA O
TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS: PREPARAÇÃO DE DERIVADOS,
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E INVESTIGAÇÕES SOBRE
PROVÁVEIS MECANISMOS DE AÇÃO**

Joana D'Arc da Silva Trindade

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDOS NO REPOSICIONAMENTO DO FÁRMACO NIMESULIDA
PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS:
PREPARAÇÃO DE DERIVADOS, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
TRIPANOCIDA E INVESTIGAÇÕES SOBRE PROVÁVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO**

JOANA D'ARC DA SILVA TRINDADE

Sob a Orientação do Professor
Marco Edilson Freire de Lima

Co-orientação da Professora
Débora Decote Ricardo de Lima

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

Seropédica-RJ
Outubro, 2019

T833e Trindade, Joana D'Arc da Silva, 1964-
Estudos no reposicionamento do fármaco nimesulida para o tratamento da doença de Chagas: preparação de derivados, avaliação da atividade tripanocida e investigações sobre prováveis mecanismos de ação / Joana D'Arc da Silva Trindade. - Rio de Janeiro, 2019. 200 f.: il.

Orientador: Marco Edilson Freire de Lima.
Coorientadora: Debora Decote-Ricardo.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Anti-inflamatórios não esteroidais. 3. Nitroaromáticos. 4. Fármacos antiparasitários . 5. Hibridação molecular. I. Freire de Lima, Marco Edilson, 1965-, orient. II. Decote Ricardo, Debora , 1965-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JOANA D'ARC DA SILVA TRINDADE

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, área de Concentração em Química.

TESE APROVADA EM 17/10/2019

Prof. Marco Edilson Freire de Lima
(IQ - UFRRJ)
(Orientador e Presidente)

Dr. Jadel Müller Kratz
(Drug Discovery Manager@DNDi – Latin America)

Prof^a Wanda Pereira Almeida
(FCF - UNICAMP)

Prof. Deivid Costa Soares
(Inst. Microbiologia Paulo de Góes - UFRJ)

Prof^a Lúcia Pinto da Silva
(IV - UFRRJ)

INDICE	a
DEDICATÓRIA	b
AGRADECIMENTOS	c-e
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS	iii-iv
LISTA DE FIGURAS	v-vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ESQUEMAS	viii
SUMÁRIO	ix-xi

DEDICATÓRIA

À meu amado esposo, José Alvarez.

À toda minha família.

Aos meus queridos e inesquecíveis pais (in memoriam), João Trindade e Keloísa Helena Trindade.

AGRADECIMENTOS

Tantas pessoas “escreveram” esta tese junto comigo que eu precisaria de outras centenas de páginas para expressar toda minha gratidão! Há nove anos, eu iniciava minha carreira de Servidora na UFRJ, somente com a graduação em Química concluída em 1992, na mesma casa. Por voltar ao meio acadêmico, vi que deveria atualizar-me e progredir em meus conhecimentos químicos. Logo tive a oportunidade de fazer a pós-graduação *lato sensu* em metodologia do ensino da química, prosseguindo com o mestrado na UFRJ e os anos de doutoramento na UFRRJ. Um caminho que foi trilhado ao lado de pessoas que muito contribuíram e contribuem para a construção perene do meu conhecimento. Espero que o doutorado tenha servido para eu ser melhor como pessoa para todos, em todos os aspectos. Senão terá valido pouco a pena... Meu Deus, eu agradeço por tudo na vida que de Vós recebi e rogo que abençoe a cada uma das pessoas que fizeram parte da minha trajetória nestes anos de doutorado:

Aos orientadores da tese. Professor Dr Marco Edilson Freire de Lima, por acreditar em meu trabalho. Com momentos fáceis e momentos difíceis, percorremos juntos esses quatro anos com um objetivo em comum: responder às nossas perguntas na tese. Acredito que encontramos respostas e consolidamos a mútua confiança. Professora Dr^a Débora Decote Ricardo, por apostar em minha capacidade de desenvolver o trabalho. Igualmente com momentos fáceis e momentos difíceis, aprendemos a entender as diferenças e a fazer a leitura correta do que realmente tem importância para a construção dos ideais em comum. Acredito também que respondemos às perguntas iniciais da tese e que consolidamos a mútua confiança. Ainda, as contribuições dos orientadores na revisão da escrita da versão final da tese foram feitas com muito respeito ao texto original, com aportes importantes e decisivos para a boa construção do documento. Por último, deve constar minha eterna gratidão a ambos pelo companheirismo durante os meses difíceis de doença de meu marido, em 2018. Muito obrigada sinceramente pela orientação na tese, pelos conhecimentos partilhados, pela confiança e, sobretudo, pela paciência com a aluna.

Ao professor Dr Célio Geraldo Freire-de-Lima, Chefe do Laboratório de Imunomodulação da UFRJ, onde sou lotada como Servidora, e a ele reportada. Agradeço pela sugestão e indicação de meu nome para a seleção de doutorado, na UFRRJ, e pelas condições favoráveis que eu recebi para o desenvolvimento da tese, juntamente com o meu trabalho técnico em seu laboratório, nestes 4 anos. Algo que deve ser dito, sem seu apoio e desprendimento teriam sido inviáveis o desenvolvimento e a conclusão da tese. Apoio humano com inteira empatia durante os meses sofridos com a falta de saúde de meu marido. Apoio material em todos os experimentos da tese, providenciando tudo o que estava ao seu alcance, ainda que com a escassez de recursos que vivenciamos. Apoio profissional nas minhas atribuições técnicas para o bom andamento das atividades em seu laboratório, com os erros e os acertos naturais. Um conjunto de situações que, penso, me fizeram crescer como pessoa e como profissional ao longo dos anos da tese em seu laboratório.

À Dra Marise Nunes, Pesquisadora da Fiocruz, por ter aprendido a escrever com ela a história de uma tese. Ensinou-me os passos ínfimos de quem precisava aprender todo o universo de um micro-organismo patogênico, a quem eu estava sendo apresentada pela primeira vez na vida.

À professora Dr^a Rosane Nora de Castro, uma especial lembrança aqui por tudo o que significou em meu reinício de estudos em Química. Sua generosidade incansável, dedicação, zelo e vontade de transmitir o conhecimento são marcas de sua presença. Sempre disponível. Muito obrigada por tudo, tudo.

A todos os professores do IQ/UFRRJ, pelos ensinamentos químicos e orientações. Seria uma extensa lista enumerar todos os que fizeram parte destes anos de doutorado, com a entrega de seu tempo e conhecimento. A todos que se doaram nas aulas, nos laboratórios e nos encontros pelos corredores, sempre com a boa vontade de contribuir, muito obrigada.

Ao Gil, da nossa Xerox....Lembro que um dia, lá no início de tudo, deixando umas infundáveis páginas de espectros rabiscados para ele xerocar, eu disse a ele desanimada que era tudo muito trabalhoso...e ele respondeu sorrindo, dizendo para eu não me preocupar, que daqui a pouco ele estaria imprimindo a minha tese! Obrigada, pois chegou essa hora, Gil. Você livrou-se deste trabalhinho rs. Que Deus o tenha.

Aos meus amigos do IQ/UFRRJ. Nossa, a lista é enorme também. Destaco de maneira especial a Tatiany Franklim, por todo tempo que passamos na bancada, fazendo reações juntas, estudando, e dividindo alegrias, como o nascimento da sua Larinha. Obrigada pelos ensinamentos e pela sua generosidade. Uma amiga.

Ao Douglas Alcântara pela amizade, companheirismo e infundável paciência com todos. Sempre solícito, um apoio no laboratório. Pessoa generosa. Sem sua ajuda material nesta reta final da tese, teria sido tudo bem mais complicado entre espectros, análises, e tudo o mais...Muito obrigada por tudo.

Às amigas de doutorado concluído nestes últimos meses, Juliana Sousa e Luiza Sant'Ana, sempre solícitas e dispostas a dividir o tempo necessário para o estudo e as boas conversas.

Ao Paulo Pitasse, por suas ideias sempre inovadoras nos experimentos, agregando conhecimento.

A todos os colegas do LaQuiMed pelo companheirismo e apoio de sempre, Larissa, Lucas, Afonso...

A todos os Técnicos da central de análises da UFRRJ, Carlos, Maurício, Frances, Vítor, Cristiane... Pessoas importantes que trabalham no IQ para que as teses aconteçam.

Às amigas da UFRJ, Jorgete Logullo, Isabel La Rocque, Angélica Arcanjo, nosso “Quarteto Fantástico” do doutorado rs. Tantas histórias. Jorgete, muito obrigada por tudo. Mãe coruja rs. Bel, sorriso acolhedor. Angélica, “comandante” da ordem no laboratório rs.

Às queridas Carolina Vellozo e Mayara Cristina, que tanto se doaram durante dois anos como alunas de Iniciação Científica na tese. Duas amigas. Agradeço tudo, cada minuto que dispensaram aos experimentos. Adoro vocês...

Ao aluno de Iniciação Científica Bruce Andriolo que tanto contribuiu nos experimentos e na manutenção das culturas que, deve ser dito, nunca contaminaram em suas mãos. Pelas tabelas, gráficos, cálculos, enfim, quanto apoio.

Ao técnico Lindomar, por todo apoio com material estéril para o trabalho.

Ao técnico Bill, por toda generosidade com seu tempo sempre que necessário.

A todas as pessoas do Laboratório de Imunomodulação da UFRJ, por inúmeros momentos agradáveis: Elias, Joyce, Ket, Lu, Rafael, Tadeu, Gil. Por todos os que passaram pelo laboratório e pela tese, Natália, Érika, Bruna, Jéssyca, Monique, Kamila, Léo, professora Danielle Nascimento...

À Dr^a Suzana Côrte-Real, Pesquisadora da Fiocruz, cuja participação nesta tese foi essencial para a realização das análises de MET. Além de ser uma pessoa formidável. Obrigada por tudo.

À Dr^a Mirian Cláudia de Souza Pereira, Pesquisadora da Fiocruz, por toda a contribuição, por ceder os parasitos utilizados na tese, pela colaboração na interpretação das imagens de MET, pela atenção solícita em tudo o que precisei.

Ao Dr. Wendell Girard Dias, Tecnologista da Fiocruz, pelas excelentes contribuições na aquisição e interpretação das micrografias de MET.

Ao Dr. Francisco Odencio Rodrigues, Pós-doutorando na Fiocruz, pelas também excelentes contribuições para meu aprendizado na manutenção correta dos parasitos utilizados durante a tese.

Àquelas pessoas que me ajudaram, sem a minha percepção, em tantos gestos pequenos, mas tão importantes, que porventura aqui não foram citadas...

Ao meu amado esposo José Alvarez, por seu carinho de sempre, sua paciência amorosa e seu sorriso amável. Sem você, esta tese não teria saído de minhas mãos. Amo você.

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

“Caminante, no hay camino, se hace camino al andar”.

Antonio Machado, poeta español.

RESUMO

TRINDADE, Joana D'Arc da Silva. **Estudos no reposicionamento do fármaco nimesulida para o tratamento da doença de Chagas: preparação de derivados, avaliação da atividade tripanocida e investigações sobre prováveis mecanismos de ação.** 2019. 179 p. Tese. (Tese em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

O tratamento da doença de Chagas é feito apenas por dois medicamentos, o nifurtimox (**1**) e o benznidazol (**2**). Contudo, além destes fármacos não serem eficazes em todas as fases da infecção, apresentam severos efeitos colaterais, o que justifica a busca de novas alternativas para o tratamento desta grave enfermidade. Dados da literatura descrevem a interferência de fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais no processo de infecção por tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, sobre células de mamíferos. O mecanismo de ação destes fármacos ocorre sobre as isoformas da enzima ciclo-oxigenase, importantes para o estabelecimento da infecção do parasito. Adicionalmente, são bem conhecidos os efeitos tóxicos de compostos nitro-aromáticos, sendo o *T. cruzi* bastante afetado pela ação dessas moléculas em seu equilíbrio *redox*. De posse destas informações, propusemos neste trabalho a investigação da atividade tripanocida do fármaco nimesulida (**3**), anti-inflamatório não-esteroidal, que possui em sua estrutura o grupamento toxicofórico nitro-aromático. A abordagem de reposicionamento de fármacos, como a que apresentamos aqui visando à possível atividade tripanocida da nimesulida (**3**), é um recurso importante na descoberta de fármacos aplicáveis ao tratamento de doenças negligenciadas. Outra estratégia, desenvolvida em paralelo, envolveu o emprego da hibridação molecular na preparação de dois derivados da nimesulida (**3**) com a amida natural piperina (**5**). Os resultados obtidos nas avaliações biológicas realizadas evidenciaram a atividade antiparasitária da nimesulida (**3**) sobre as diferentes formas evolutivas do parasito. Além disso, dos dois híbridos moleculares construídos, o híbrido H**1**, no qual foi preservada a porção nitro aromática, apresentou ação tripanocida, enquanto que o híbrido H**2** perdeu significativamente a atividade com a retirada do grupo nitro de sua estrutura, o que permitiu apontar para o grupo nitro presente na nimesulida (**3**) e no híbrido H**1** como porção farmacofórica para a atividade tripanocida estudada, validando as hipóteses deste estudo. Os resultados obtidos na avaliação das alterações ultra-estruturais em epimastigotas de *T. cruzi* tratados com nimesulida mostram a desorganização da estrutura das mitocôndrias, corroborando a possível interferência do fármaco no equilíbrio *redox* do parasito.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, anti-inflamatórios não-esteroidais, nitro-aromáticos, fármacos antiparasitários, piperina, hibridação molecular.

ABSTRACT

TRINDADE, Joana D'Arc da Silva. **Studies in the repositioning of the drug nimesulide for the treatment of Chagas disease: synthesis of derivatives, evaluation of the tripanocidal activity and investigation on the probable mechanisms of action.** 2019. 179 p. Thesis. (Thesis in Chemistry). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Chagas disease is treated only by two drugs, nifurtimox (**1**) and benznidazole (**2**). However, in addition to these drugs not being effective in all stages of infection, they have severe side effects, which justifies the search for new alternatives for the treatment of this serious disease. Literature data describe the interference of non-steroidal anti-inflammatory drugs on *Trypanosoma cruzi* trypomastigote infection process on mammalian cells. The mechanism of action of these drugs occurs on the isoforms of the enzyme cyclooxygenase, important for the establishment of parasite infection. Additionally, the toxic effects of nitro-aromatic compounds are well known, and *T. cruzi* is greatly affected by the action of these molecules in its redox equilibrium. With this information, we proposed in this work the investigation of the trypanocidal activity of the nimesulide (**3**), non-steroidal anti-inflammatory drug, which has in its structure the nitro-aromatic toxicophoric group. The drug repositioning approach, as presented here aiming at the possible trypanocidal activity of nimesulide (**3**), is an important resource in the discovery of drugs applicable to the treatment of neglected diseases. Another strategy, developed in parallel, involved the use of molecular hybridization in the preparation of two nimesulide derivatives (**3**) withing the structure of natural amide piperine. The results obtained from the biological evaluations carried out indicated antiparasitic activity of nimesulide (**3**) on the different evolutionary forms of the parasite. In addition, of the two molecular hybrids constructed, the hybrid H**1**, in which the aromatic nitro portion was preserved, presented trypanocidal action, while the hybrid H**2** significantly lost activity with the removal of the nitro group from its structure. This set of results allowed us to point to the nitro portion present both in the structures of nimesulide (**3**) and its hybrid H**1** as pharmacophoric group for the trypanocidal activity validating the hypothesis of this study. The results obtained in the evaluation of ultrastructural changes in *T. cruzi* epimastigotes treated with nimesulide show the disorganization of the mitochondrial structure, corroborating the possible interference of the drug on the redox equilibrium of the parasite.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, non-steroidal antiinflanmatory drugs, nitroaromatics, antiparasitic drugs, piperine, molecular hybridization.

LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AINE	Anti-Inflamatório Não Esteroidal
Anvisa	Agência nacional de vigilância sanitária
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
BALB/c	Bagg & ALbino
BENDITA	<i>Benznidazole New Doses Improved Treatment and Associations</i>
BENEFIT	<i>Benznidazole Evaluation for Interrupting Tripanosomiasis</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Dados
CCF	Cromatografia de Camada Fina
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
cm	centímetro
COX	Ciclo-OXigenase
d	Sinal duplo
Da	Dalton
DALY	<i>Disability-Adjusted Life Year</i>
DC	Doença de Chagas
dd	duplo-sinal duplo
DNA	<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>
DEPTQ	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer with retention of Quaternary Nuclei</i>
DMSO	DiMetilSulfÓxido
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i>
DTN	Doença Tropical Negligenciada
DTU	<i>Discrete Typing Unit</i>
EM	Espectrometria de Massas
EMAR/ES+	Espectrometria de Massas de Alta Resolução com ionização por <i>EletroSpray</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Fluoresceína na forma de IsoTioCianato
g	grama
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrum</i>
HIV/AIDS	<i>Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
IBCCF	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
IP	Iodeto de Propídeo
IV	InfraVermelho
LAFEPE	LABoratório Farmacêutico do Estado de PErnambuco Governador Miguel Arraes
LaQuiMed	Laboratório de Química Medicinal do Instituto de Química da UFRRJ
m	Sinal múltiplo
M ⁺	Íon Molecular
MAOS	<i>Microwave Assisted Organic Synthesis</i>
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MHz	Mega Hertz
mL	mililitro
m/z	Razão massa-carga
NBE	<i>New Biological Entity</i>
NCATS	<i>National Center for Advancing Translational Sciences</i>
NCE	<i>New Chemical Entity</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nm	nanômetro
NME	<i>New Molecular Entity</i>

NTR	NiTroR edutase
OMS	O rganização M undial da S aúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PF	P onto de F usão
PGE2	P rosta G landina E 2
PPGQ	P rograma de P ós- G raduação em Q uímica
ppm	p arte p or m ilhão
REA	R elação E strutura- A tividade
RMN ¹³ C	R essonância M agnética N uclear de C arbono 13
RMN ¹ H	R essonância M agnética N uclear de H idrogênio
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI 1640	<i>Roswel Park Memorial Institute</i> (meio de cultura de células)
s	Sinal simples
SAR	<i>Structure Activitie Relationship</i>
SFB	S oro F etal B ovino
sl	sinal largo
SOD	<i>SuperOxide Dismutase</i>
SUS	S istema Ú nico de S aúde
t	Sinal triplo
ta	t emperatura a mbiente
TC	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TMS	T etra M etil S ilano
UFRJ	U niversidade F ederal do R io de J aneiro
UFRRJ	U niversidade F ederal R ural do R io de J aneiro
u.m.a.	u nidade de m assa a tômica
UV	U ltra V ioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>
v	Deformação axial
σ	Deformação angular
δ	Deslocamento químico
μg	m icro g rama
μL	m icro L itro
μm	m icrô m etro
μM	m icro M olar
⁰ C	G raus C elsius

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomia do <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
Figura 2. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
Figura 3. Formas tripomastigota (A) e amastigota (B), em microscopia eletrônica de varredura	12
Figura 4. Imagem da forma evolutiva epimastigota, em microscopia eletrônica de varredura.	13
Figura 5. Estruturas do Nifurtimox (1) e do Benznidazol (2).	14
Figura 6. Estruturas químicas. (A): nimesulida (3), N-(4-nitro-2-fenoxifenil) metanossulfonamida. (B): nimesulida reduzida (4), N-(4-amino-2-fenoxifenil) metanossulfonamida.	21
Figura 7. Estrutura química da piperina (5), 1-[2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]piperidina.	21
Figura 8. Curva cinética de epimastigotas	27
Figura 9. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	28
Figura 10. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com nimesulida (3).	29
Figura 11. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com nimesulida reduzida (4)	30
Figura 12. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com benznidazol (2)	31
Figura 13. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com nimesulida (3)	32
Figura 14. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com benznidazol (2)	32
Figura 15. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com nimesulida (3)	34
Figura 16. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com benznidazol (2)	35
Figura 17. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com nimesulida (3) e benznidazol (2).	36
Figura 18. Avaliação da viabilidade celular em macrófagos peritoneais murinos tratados com nimesulida (3)	37
Figura 19. Avaliação da viabilidade celular em macrófagos peritoneais murinos tratados com benznidazol (2)	38
Figura 20. Avaliação da viabilidade celular em população de células enriquecida de linfócitos esplênicos murinos tratados com nimesulida (3)	39
Figura 21. Avaliação da viabilidade celular em população de células enriquecida de linfócitos esplênicos murinos tratados com benznidazol (2)	40
Figura 22. Avaliação da viabilidade celular de macrófagos tratados com nimesulida (3) e benznidazol (2)	41
Figura 23. Avaliação da viabilidade de células de linhagem LLCMK2 tratadas com nimesulida (3)	42
Figura 24. Inibição da proliferação de formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> in vitro de macrófagos peritoneais murinos infectados	43
Figura 25. Inibição da liberação de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> in vitro de macrófagos peritoneais de murinos infectados	44
Figura 26. Elucidação do tipo de morte celular de epimastigotas	45
Figura 27. Representação gráfica da porcentagem da marcação por PI/Anexina de parasitos tratados e não-tratados com nimesulida (3) e benznidazol (2)	47
Figura 28. (A-D). Imagens em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de cultura axênica de <i>T. cruzi</i> . (A)	48
Figura 29. Representação esquemática das principais organelas da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> observadas por MET	49
Figura 30. (A). Vista geral dos parasitos tratados com nimesulida (3) na concentração de 35 μ M, analisados por Microscopia Eletrônica de Transmissão	50

Figura 31. (A-F). Micrografias de epimastigotas tratadas com três concentrações de DMSO _____	52
Figura 32. (A-D). Imagens em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de cultura axênica de <i>T. cruzi</i> de indefinidas passagens _____	54
Figura 33. Variedade de estruturas químicas de alguns fármacos reposicionados. _____	57
Figura 34. O risco versus benefício entre diferentes estratégias no desenvolvimento de fármacos _____	59
Figura 35. Nifurtímox (1) como gerador de espécies reativas de oxigênio _____	63
Figura 36. Esquema do equilíbrio entre a forma oxidada (TS ₂) e reduzida {T(SH) ₂ } da tripanotona _____	64
Figura 37. Mecanismo de bioativação do benznidazol (2) mediada por nitrorredutase no <i>T. cruzi</i> _____	66
Figura 38. Características morfológicas de morte celular _____	69
Figura 39. Cultivo do <i>P. nigrum</i> _____	74
Figura 40. Representação esquemática da abordagem da hibridação molecular aplicada ao planejamento de novo fármaco _____	76
Figura 41. Estrutura química do anti-inflamatório benorilato _____	77
Figura 42. Aparelhagem para extração da piperina (5) _____	80
Figura 43. (A). Estrutura química do ácido piperínico (6) _____	81
Figura 44. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com piperina (5) _____	85
Figura 45. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com piperina (5) _____	86
Figura 46. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com benznidazol (2) _____	86
Figura 47. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com H1 _____	88
Figura 48. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com H2 _____	88
Figura 49. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com benznidazol (2) _____	89
Figura 50. Avaliação da viabilidade celular em macrófagos peritoneais murinos tratados com H1 _____	91
Figura 51. Avaliação da viabilidade celular em cultura de células enriquecida de linfócitos esplênicos murinos tratados com H1 _____	92
Figura 52. Avaliação da viabilidade de células de linhagem LLCMK2 tratadas com H1 _____	93
Figura 53. Inibição da proliferação de formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> in vitro em macrófagos peritoneais murinos infectados _____	94
Figura 54. Inibição da liberação de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> em macrófagos peritoneais murinos infectados _____	95
Figura 55. Estratégia integrada para a identificação de novos candidatos a fármacos no tratamento de DC _____	100
Figura 56. Análises de cromatografia líquida de alta eficiência para as substâncias isoladas ou obtidas por transformações químicas, testadas frente às diferentes formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> _____	143

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Principais situações e respectivas vigilâncias epidemiológicas na doença de Chagas.</i>	4
<i>Tabela 2. Número de DALYs (x1000) por região, 2004.</i>	7
<i>Tabela 3. Designação corrente de isolados (cepas) de Trypanosoma cruzi utilizados em estudos de infecção experimental.</i>	14
<i>Tabela 4. Valores de CI₅₀ das substâncias testadas contra formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi (cepa Y), através do método de exclusão com azul de Tripán.</i>	33
<i>Tabela 5. Valores de CI₅₀ das substâncias testadas contra formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi (cepa Y), através do método colorimétrico do MTT.</i>	35
<i>Tabela 6. Alguns fármacos reposicionados de sua indicação terapêutica original.</i>	56
<i>Tabela 7. Atividades biológicas da piperina (5).</i>	75
<i>Tabela 8. Valores de CI₅₀ da piperina (5) contra formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi</i>	87
<i>Tabela 9. Valores de CI₅₀ dos híbridos moleculares testados contra formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi (cepa Y), através do método colorimétrico do MTT.</i>	90
<i>Tabela 11. Deslocamento químico de RMN ¹H e RMN ¹³C para a nimesulida (3).</i>	147
<i>Tabela 12. Deslocamento químico de RMN ¹H e RMN ¹³C para a nimesulida reduzida (7).</i>	151
<i>Tabela 13. Deslocamento químico (δ) de ¹H e ¹³C para a piperina (4).</i>	155
<i>Tabela 14. Deslocamento químico (δ) de ¹H e ¹³C para o ácido piperínico (5).</i>	159
<i>Tabela 15. Deslocamento químico (δ) de ¹H e ¹³C para o híbrido H1.</i>	164
<i>Tabela 16. Deslocamento químico (δ) de ¹H e ¹³C para o híbrido H2.</i>	170

LISTA DE ESQUEMAS

<i>Esquema 1. Preparação da nimesulida reduzida (4).</i>	26
<i>Esquema 2. Proposta de planejamento do primeiro híbrido molecular neste estudo</i>	79
<i>Esquema 3. Reação de preparação do ácido piperínico (6).</i>	82
<i>Esquema 4. Proposta de planejamento do segundo híbrido molecular neste estudo</i>	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 A transmissão da doença de Chagas	3
1.2 Fases clínicas da doença.....	5
1.3 Impactos globais da doença de Chagas	6
1.4 <i>Trypanosoma cruzi</i> , ciclo evolutivo e aspectos da infecção.....	7
1.5 Quimioterapia da doença e suas limitações	14
2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	18
3 CAPÍTULO I.....	22
Estudos no reposicionamento do fármaco nimesulida para o tratamento da doença de Chagas.	22
Resultados I	25
Extração de nimesulida (3) a partir do medicamento adquirido comercialmente.	25
Obtenção da anilina (4) derivada da nimesulida (3).	25
Cinética de crescimento dos parasitos e cultivo das formas epimastigotas.	26
Determinação da concentração do diluente DMSO inócua aos parasitos.	27
Avaliação da atividade da nimesulida (3) sobre formas epimastigotas.	28
Avaliação da atividade da nimesulida reduzida (4) sobre formas epimastigotas.	29
Determinação dos valores da concentração inibitória (CI ₅₀) da nimesulida (3), nimesulida reduzida (4) e fármaco utilizado como referência no estudo, benznidazol (2).	31
Avaliação da atividade da nimesulida (3) sobre formas epimastigotas, após tratamento <i>overnight</i>	35
Avaliação do potencial citotóxico da nimesulida (3) em macrófagos murinos.....	36
Avaliação do potencial citotóxico da nimesulida (3) em culturas de linfócitos esplênicos.	38
Efeito da nimesulida (3) na infecção <i>in vitro</i> de células LLCMK2 com <i>T. cruzi</i>	41
Efeito da nimesulida (3) <i>in vitro</i> na proliferação de amastigotas, em macrófagos peritoneais murinos infectados pelo <i>T. cruzi</i>	42
Efeito da nimesulida (3) <i>in vitro</i> na liberação de tripomastigotas, em macrófagos peritoneais murinos infectados pelo <i>T. cruzi</i>	43
Avaliação da morte celular de epimastigotas tratados com nimesulida (3) <i>in vitro</i>	44
Avaliação de alterações ultraestruturais em epimastigotas tratadas com nimesulida (3) <i>in vitro</i> , por microscopia eletrônica de transmissão.	47

Avaliação das alterações ultraestruturais em epimastigotas causadas por diferentes concentrações do diluente DMSO.	51
Avaliação das alterações ultraestruturais em epimastigotas causadas por número de passagens indefinidas.	53
Discussão I	56
Fármacos nitroaromáticos.....	61
CAPÍTULO II:.....	72
Planejamento e síntese de derivados híbridos entre a nimesulida e a piperina: avaliação da atividade tripanocida.....	72
 Introdução	73
 Hibridação molecular	76
 Resultados II.....	79
 Planejamento do primeiro híbrido H1.....	79
 Isolamento da piperina (5) dos frutos secos de <i>Piper nigrum</i>.....	80
 Preparação do ácido piperínico (6) a partir da hidrólise da piperina (5).....	81
 Preparação do cloreto do ácido piperínico (7).....	82
 Preparação do primeiro híbrido (H1).....	82
 Preparação do segundo híbrido (H2).....	83
 Avaliação da atividade da piperina (5) extraída sobre formas epimastigotas.	84
 Avaliação da atividade dos híbridos H1 e H2 sobre formas epimastigotas.	87
 Avaliação do potencial citotóxico do híbrido H1 em culturas de macrófagos e linfócitos esplênicos.	90
 Avaliação do efeito citotóxico do híbrido H1 na linhagem LLCMK2.	92
 Efeito <i>in vitro</i> do híbrido H1 na proliferação de amastigotas, em macrófagos peritoneais murinos infectados pelo <i>T. cruzi</i>.....	93
 Efeito <i>in vitro</i> do híbrido H1 na liberação de tripomastigotas, em macrófagos peritoneais murinos infectados pelo <i>T. cruzi</i>.....	94
 Discussão II.....	96
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	98
PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS - QUÍMICOS.....	102
 Princípios gerais.	103
 Extração de nimesulida (3) a partir do medicamento adquirido comercialmente	103
 Isolamento da piperina (5) dos frutos secos de <i>Piper nigrum</i>.....	104
 Preparação do ácido piperínico (6) a partir da hidrólise da piperina (5).....	104

Preparação do cloreto do ácido piperínico (7).....	105
Preparação do primeiro híbrido H1 (adaptado de PERICHERLA <i>et al.</i>, 2007).	105
Preparação da anilina (4) derivada da nimesulida (3).....	106
Preparação do segundo híbrido H2.....	106
PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS - BIOLÓGICOS	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
ANEXOS.....	142
CROMATOGRAMAS DAS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	143
CADERNO DE ESPECTROS.....	144
CARTA DE SOLICITAÇÃO DOS PARASITOS	172
LISTA DAS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS	173
ESTRATÉGIAS NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS.....	175
PRODUÇÃO CIENTÍFICA E PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS DURANTE A TESE.....	176

1 INTRODUÇÃO GERAL

O acometimento de humanos pela doença de Chagas (DC) provavelmente é uma ocorrência bem antiga, pois o DNA de *T. cruzi* foi detectado em tecidos de múmias humanas em países andinos pré-colombianos, datadas de cerca de 9000 anos atrás (AUFDERHEIDEA *et al.*, 2004). A doença foi descoberta somente em 1909, pelo cientista brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas (CHAGAS, 1909). Em sua homenagem, a doença recebeu seu nome e 14 de abril foi escolhido como o Dia Mundial de Combate à doença de Chagas, por ter sido neste dia que o pesquisador comunicou a sua descoberta à comunidade científica da época¹. Carlos Chagas descobriu o protozoário hemoflagelado causador da doença no Estado de Minas Gerais (Brasil) e o denominou inicialmente de *SchizoTrypanum cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz, cientista brasileiro, com quem trabalhou junto em Manguinhos, futuro Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, Brasil. Posteriormente, o micro-organismo foi renomeado como *Trypanosoma cruzi* (LEWINSON, 1981). Não obstante, após mais de século de sua descoberta, a enfermidade ainda é considerada um problema de saúde pública, principalmente na América Latina. O Estado de Minas Gerais continua sendo endêmico tendo sido, paradoxalmente, o local onde foi descoberta a DC.

A doença é uma antropozoonose e integra a lista das doenças negligenciadas² da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Ministério da Saúde, 2010³; HOTEZ, 2007). A DC é considerada uma das enfermidades humanas mais relacionadas com o subdesenvolvimento e a pobreza, o que torna crítica a situação de milhões de pacientes chagásicos (MOTA *et al.*, 2006), sendo que menos de 1% dos portadores da doença tem acesso ao tratamento⁴. No início dos anos 2000, cerca de 8 milhões de pessoas estavam infectadas, a maioria distribuída em mais de 21 países da América Latina, sendo 1,9 milhão delas no Brasil, as quais 20 a 30% destas com possibilidade de desenvolver a doença de forma potencialmente letal (BERN *et al.* 2011; OPAS, 2004). De acordo com últimos registros e estimativas, aproximadamente 10 milhões de pessoas estão infectadas com o protozoário em todo o mundo (WHO, 2011). Apesar do controle da transmissão vetorial em algumas regiões, existe ainda um contingente de pessoas infectadas, cientes ou não, que precisam de atendimento nos serviços de saúde (ARAÚJO *et al.*, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2002). Calculam-se aproximadamente 12 mil mortes anuais em decorrência da doença de Chagas⁵

O conhecimento atual da bioquímica do *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) tem contribuído para o entendimento do modo de ação dos possíveis fármacos, pela identificação de seus alvos moleculares (SUETH-SANTIAGO, 2017; MAYA *et al.*, 2007). Assim, aspectos como identificação de componentes estruturais e funcionais envolvidos na interação parasito-hospedeiro, compreensão das características biológicas das diferentes famílias do parasito e sequenciamento do genoma completo do protozoário, contribuíram para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (EL-SAYED *et al.*, 2005) e para o

¹ Fonte: <http://www.lafepe.pe.gov.br/>. Acesso em 09-07-2019.

² Vide a lista das doenças negligenciadas nos **Anexos**. Fonte: https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/summary/en/. Acesso em 13-07-2019.

³ BRASIL, Ministério da Saúde. Notícias. Disponível em <http://www.saude.gov.br>. Acessado em 02-06-2019.

⁴ Fonte: <https://www.dndi.org>. Acesso em 09-07-2019. (DNDi, do inglês “*Drugs for Neglected Diseases initiative*”).

⁵ Informação disponível em *Annual reports 2017*: <https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/>. Acesso em 16-07-2019.

estudo e desenvolvimento de marcadores genéticos de resistência do *T. cruzi* às substâncias (WHO-Expert Committee on the Control of Chagas Disease, 2002). Várias pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de se obter um fármaco eficaz para o tratamento da doença de Chagas. A triagem de diversas substâncias de origem natural, sintética ou semissintética, revelou que as mesmas apresentaram atividade, mas ainda existe um longo caminho até que seus efeitos farmacológicos sejam comprovados por meio de testes clínicos (Maya *et al.*, 2007). Por isso, a Organização Mundial de Saúde afirma que a pesquisa e o desenvolvimento de novas moléculas ativas destinadas ao tratamento da doença de Chagas são extremamente necessários (WHO, 2012; WHO, 2002).

1.1 A transmissão da doença de Chagas

Os hábitos alimentares diversificados dos insetos vetores e o conjunto de hospedeiros vertebrados presentes numa determinada área geográfica definem dois tipos de transmissão vetorial do *T. cruzi*: o ciclo silvestre e o ciclo doméstico. A transmissão no ciclo silvestre envolve a interação entre triatomíneos e reservatórios de mamíferos, incluindo marsupiais, roedores, tatus e primatas. Já no ciclo doméstico, resulta do contato entre humanos e vetores, devido à colonização de ambientes domésticos e peridomésticos por insetos que utilizam pequenos mamíferos como fonte de alimento. Na transmissão vetorial, parece existir uma associação entre as diferentes linhagens de *T. cruzi* e as manifestações clínicas da DC, uma vez que as manifestações clínicas detectadas em pacientes chagásicos, em geral, refletem a principal linhagem circulante nos ciclos de transmissão doméstica, em uma dada região. Já em surtos de transmissão oral, é comum a prevalência de linhagens silvestres. (ZINGALES, 2018).

A infecção pelo *T. cruzi*, é um problema endêmico nas Américas do Sul e Central (UCHIYAMA, 2009) e devido a sua larga ocorrência já foi considerada de forte semelhança à pandemia de HIV/AIDS (*Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome*) (HOTEZ *et al.*, 2012). Trabalhos recentes mostram também o avanço desta infecção fora das regiões endêmicas como, por exemplo, no sudoeste dos Estados Unidos. Neste país, foram encontradas diferentes espécies de insetos infectados pelo *T. cruzi*, configurando a doença de Chagas como uma doença potencialmente emergente no continente Norte-Americano (KLOTZ, 2014). Devido às correntes de ar em dias mais quentes, os insetos hematófagos podem chegar a estes locais atraídos pela luz, abrigando-se nas casas. Quando se alimentam de sangue humano, ou de sangue de animais de estimação, são capazes de causar anafilaxia local ou de transmitir a doença de Chagas. Os insetos infectados foram encontrados em casas das regiões de San Diego, Califórnia, Phoenix e Tucson, no Arizona. (KLOTZ, 2014). Com efeito, nos últimos 20 anos vêm aumentando os casos de infecção crônica pelo *T. cruzi*, nos EUA. Estima-se um contingente de 23 milhões de imigrantes oriundos de países endêmicos, o que pode ter contribuído também para o aumento de casos, com mais de 300 mil pessoas infectadas vivendo nos EUA, na última década (BERN e MONTGOMERY, 2009). Os fatos apontam para uma dispersão da doença para além dos locais onde ocorre mais comumente, ou seja, na América do Sul e na América Central, reforçando a necessidade da busca contínua e desenvolvimento de novos fármacos que sejam mais eficazes contra a doença.

O Brasil recebeu, em 2006, a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, conferida pela Organização

Pan-Americana da Saúde (BRASIL, 2006). No entanto, essa certificação não significa controle efetivo da doença em território brasileiro, mas a interrupção momentânea da sua transmissão, especificamente pelo triatomíneo da espécie *T. infestans*. Para que seja mantida, são necessárias ações de controle e vigilância permanentes (CARTA, 2006). Porém, existem outras espécies de triatomíneos vetores da doença, principalmente na região Nordeste, o que implica risco de domiciliação de espécies secundárias como *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida*, cujo *habitat* preferido é o peridomicílio (DIAS, 2002). Na **Tabela 1** são elencadas algumas estratégias de vigilância epidemiológica na doença de Chagas.

Tabela 1. Principais situações e respectivas vigilâncias epidemiológicas na doença de Chagas.

Problema	Situação geográfica prevalente	Estratégia de segurança
Transmissão vetorial	Área rural	Detecção e eliminação de foco/melhoramento da vivenda e peridomicílio/campanhas
Transmissão transfusional	Área urbana	Sorologia de doadores/control de procedimentos
Transmissão congênita	Áreas urbana e rural	Diagnóstico precoce de gestantes e neonatos
Caso agudo eventual	Áreas urbana e rural	Diagnóstico precoce/tratamento específico
Caso crônico	Áreas urbana e rural	Atenção médica periódica/atenção previdenciária

Fonte: Adaptado de DIAS, 2002.

Observa-se na **Tabela 1** que, além da transmissão vetorial, a doença de Chagas pode ser transmitida também por via transfusional de doador infectado; por transmissão vertical de mãe para filho e ainda por transplante de órgão de doador infectado pelo *T. cruzi*, particularmente coração e rim (BRENER e ANDRADE, 2000). De acordo com DIAS (2000), a transmissão ocorre 80 a 90% pelo vetor, 5 a 20% por transfusão de sangue e 0,5 a 8% por via congênita. Pode ocorrer ainda de forma acidental por manipulação em laboratórios. No entanto, nesta última década, essa fatia de distribuição porcentual das formas de transmissão da doença vem sendo alterada, por um lado, pelo maior controle vetorial nos peridomicílios e por outro, pela maior incidência de casos ocorridos por ingestão de alimentos contaminados⁶ Com relação a esta última forma de contaminação, há relatos de infecção por *T. cruzi* no Brasil por meio da ingestão de frutos *in natura* ocorrido

⁶ Informação disponível em:

<http://g1.globo.com/rn/rio-grande-do-norte/noticia/2016/04/ingestao-de-caldo-de-cana-e-relatada-em-surto-de-doenca-de-chagas-no-rn.html>. Acesso em 07-06-2019. Acesso em 09-07-2019.

em Santa Catarina, devido à ingestão de caldo-de-cana que havia sido triturado com fezes do inseto, provocando a morte de 5 pessoas em 2005. Outros casos parecidos já foram relatados em 2007 e 2010. Na cidade de Belém, foram confirmados 39 casos com 2 mortes, em 2011, causados por ingestão de açaí⁷. Constatou-se que os frutos eram manipulados sem higiene, o que favoreceu a contaminação do produto com fezes do barbeiro infectado. Em 2015, a Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Norte registrou alguns casos em 4 cidades por ingestão de caldo-de-cana, causando um surto da doença nas cidades de Tenente Ananias, Marcelino Vieira, Alexandria e Pilões⁸. Mais recentemente, em maio de 2019, um grande surto de DC aguda ocorreu no município de Ibimirim, sertão de Pernambuco, onde de um total de 77 pessoas, participantes de um evento religioso, 27 foram diagnosticadas com DC, devido à ingestão de alimentos contaminados⁹. Os fatos noticiados alertam para o risco desta importante via de infecção também.

1.2 Fases clínicas da doença

A doença de Chagas possui um curso clínico bifásico. Entre as duas fases clínicas, pode haver longos períodos (10 a 30 anos) numa “fase silenciosa” da doença (COURA e BORGES-PEREIRA, 2011). A primeira é a fase aguda que ocorre em um período de incubação de 1 a 2 semanas após a infecção. Devido à baixa carga parasitária nesta fase da doença, a infecção costuma ser assintomática podendo apresentar alguns sintomas inespecíficos, como febre e mal-estar. No entanto, há presença de *T. cruzi* na corrente sanguínea, possível de ser detectada microscopicamente. A entrada do parasito através da pele produz um chagoma (área de eritema e inchaço), enquanto a entrada através das membranas das mucosas oculares produz o sinal de Romana, clássico da doença na fase aguda, que consiste num edema lateral da pálpebra e tecidos perioculares (RASSI *et al.*, 2012). Em geral, o sistema imunológico dos indivíduos infectados controla a replicação do parasito, e os sintomas se resolvem espontaneamente, levando ao desaparecimento da parasitemia em 4 a 8 semanas (RASSI *et al.*, 2010). Não obstante, a falta de tratamento pode levar ao óbito, sendo em sua maioria provocado por insuficiência cardíaca (BERN, 2015). Complicações neurológicas nesta fase não são comuns, mas há casos de meningoencefalite em crianças menores de 2 anos, com o surgimento de graves processos inflamatórios no cérebro (RASSI *et al.*, 2012).

A segunda é a fase crônica, iniciada de 2 a 3 meses após a infecção, descrita por CHAGAS (1916) como “forma crônica indeterminada”. Este conceito foi validado por um grupo de *experts* durante o *Applied Research Meeting on Chagas disease*, realizado no Estado de Minas Gerais, Brasil (Anônimo, 1985). Nesta fase, as manifestações clínicas (se presentes) da doença aguda terão desaparecido em praticamente todos os indivíduos

⁷ Informação disponível em:

<http://g1.globo.com/brasil/noticia/2011/10/belem-fecha-pontos-de-venda-de-acai-por-risco-da-doenca-de-chagas.html>. Acesso em 09-07-2019.

⁸ Informação disponível em: <http://g1.globo.com/rn/rio-grande-do-norte/noticia/2016/04/ingestao-de-caldo-de-cana-e-relatada-em-surto-de-doenca-de-chagas-no-rn.html>. Acesso em 09-07-2019.

⁹ Informação disponível em: <https://g1.globo.com/pe/pernambuco/noticia/2019/06/04/sobe-para-27-numero-de-pacientes-em-tratamento-devido-a-surto-agudo-de-doenca-de-chagas.ghtml>. Acesso em 09-07-2019.

infectados, ainda que a infecção não tenha sido tratada com os fármacos tripanocidas (RASSI *et al.*, 2010). Os pacientes cronicamente infectados apresentam sorologia positiva para *T. cruzi* e costumam desenvolver cardiomiopatia progressiva e/ou distúrbios de motilidade do esôfago e cólon (BERN, 2015). As alterações motoras podem causar a hipertrofia das camadas musculares, resultando na dilatação dos órgãos comprometidos, caracterizando megaesôfago e megacólon, típicos da forma crônica (COURA, 2007). Há ainda a possibilidade de ocorrer reativação da DC em pacientes crônicos, quando tornam-se imunocomprometidos (por exemplo, pela coinfeção com HIV ou pelo uso de fármacos imunossupressores). A reativação da doença de Chagas, caracterizada pela recorrência de sintomas agudos e elevada parasitemia em pacientes crônicos, pode ocorrer como resultado da incapacidade do hospedeiro em controlar a infecção causada pelo *T. cruzi* (PEREZ *et al.*, 2015). As manifestações mais comuns de reativação em pacientes com AIDS são a meningoencefalite e lesões no sistema nervoso central e, em pacientes transplantados, são a febre, miocardite e lesões cutâneas (RASSI *et al.*, 2012).

1.3 Impactos globais da doença de Chagas

A Organização Mundial da Saúde vem empregando uma abordagem que correlaciona a capacidade produtiva de uma dada população com as suas condições sócio-econômicas (OMS, 2015). Uma vez que a doença de Chagas pode causar danos sérios a órgãos vitais para o homem, a consequência direta é o comprometimento da capacidade laboral do indivíduo. Através de um parâmetro denominado **DALY** (sigla correspondente à expressão *Disability-Adjusted Life Year*), a Organização associa o número de anos produtivos perdidos, por morte ou incapacitação, para determinada população em virtude de uma doença. De acordo com esse fator, um **DALY** corresponde a um ano perdido de vida saudável. Os **DALYs** para uma condição de saúde são calculados como a soma dos anos de vida perdidos, devido à mortalidade prematura em uma população, e os anos perdidos devido à incapacidade para pessoas que vivem com a deficiente condição de saúde. A métrica permite avaliar a carga global da doença e seu impacto nas condições sociais e econômicas do conjunto da população.

O efeito das DTNs (**Doenças Tropicais Negligenciadas**) sobre a economia num país endêmico gera um ônus calculado pela somatória dos custos diretos com a doença, como prevenção e tratamento, mais os custos indiretos de tempo de trabalho produtivo perdido, em decorrência de morbidade ou mortalidade (CONTEH *et al.*, 2010). Conforme dito anteriormente, a doença de Chagas apresenta incidência majoritária nas Américas e, conhecidamente, a América Latina é onde há prevalência da enfermidade (REITHINGER *et al.*, 2011). Estimam-se nesta região, 752.000 dias de trabalho perdidos por mortes prematuras causadas pelo mal de Chagas. Além disso, são presumidos de US\$1-2 bilhões por ano em produtividade perdida em sete países do extremo sul da América. O absentismo de trabalhadores brasileiros acometidos pela doença de Chagas representa uma perda estimada de US\$5-6 milhões por ano (CONTEH *et al.*, 2010). Paradoxalmente a DC, ao mesmo tempo em que é consequência, passa também a ser causa de pobreza, por diminuição de capacidade produtiva de sua população (HOTEZ *et al.*, 2006), tornando mais complexa ainda a discussão sobre os aspectos sociais e econômicos envolvidos. A **Tabela 2** resume os valores calculados para o parâmetro, aplicados a algumas doenças

negligenciadas. Observa-se que o Continente Americano possui prevalência dos *DALYs* para a doença de Chagas.

Tabela 2. Número de *DALYs* (x1000) por região, 2004.

Doença tropical	Mundo	África	Américas	Ásia
Doença de Chagas	430	0	426	0
Esquistossomose	1707	1502	46	0
Leishmaniose	1974	328	45	1264
Hanseníase	194	25	16	118
Ascaridíase	1851	915	60	404
Filariose	5941	2263	10	3525

Fonte: *The global burden of disease: 2004 update*. Geneva, World Health Organization (OMS, 2008).

1.4 *Trypanosoma cruzi*, ciclo evolutivo e aspectos da infecção

O ciclo biológico do parasito inclui três formas distintas, as quais costumam apresentar posicionamento característico do flagelo, cinetoplasto e núcleo. A tripomastigota é a forma infecciosa, com 20 µm de comprimento, cinetoplasto fusiforme e subterminal, encontrada no sangue de mamíferos e no intestino posterior de insetos triatomíneos. A epimastigota também possui 20 µm de comprimento, cinetoplasto anterior ao núcleo, é a forma multiplicativa no intestino do triatomíneo e predominante em culturas. Por isso, é a comumente utilizada em estudos bioquímicos. A amastigota possui forma arredondada, com cerca de 2 µm de diâmetro, sem flagelo emergente; é a forma replicativa no interior de células hospedeiras mamíferas as quais, ao sofrerem rompimento, liberam tripomastigotas na corrente sanguínea, capazes de invadir outras células. (PRATA, 2001; BRENER *et al.*, 2000). O *T. cruzi* pode ser cultivado em diversas culturas de células, como por exemplo, musculares, fibroblastos, macrófagos (FAÚNDEZ *et al.*, 2005).

O *T. cruzi* é um protozoário do *Sarcomastigophora* filo, *Mastigophora* subfilo, ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae* (**Figura 1**). Possui um flagelo e sua única mitocôndria contém o cinetoplasto, uma rede de DNA extranuclear que corresponde ao genoma mitocondrial do parasito, localizado próximo ao corpo basal do flagelado (RASSI *et al.*, 2012).

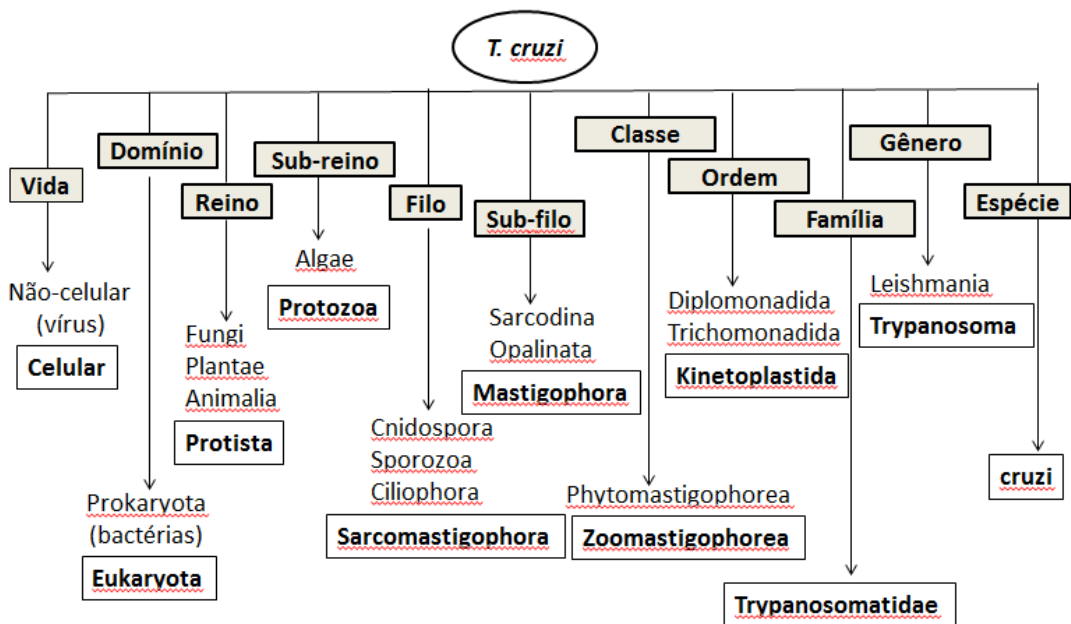


Figura 1. Taxonomia do *Trypanosoma cruzi*. Organismos celulares eucarióticos contendo núcleo e organelas específicas; Protista, sem características de plantas e animais; Protozoários, a forma mais inferior de vida animal, unicelular; Sarcomastigophora, protozoário que se movimenta por flagelos; Mastigophora, utiliza flagelos para a motilidade; Zoomastigophora, flagelados semelhantes a animais; Kinetoplastida, ordem de protozoários caracterizada por possuir cinetoplasto (região rica em DNA dentro da mitocôndria da célula); Trypanosoma, nome derivado do grego *Trypano* (broca) e *soma* (corpo), devido ao seu movimento em forma de saca-rolhas; cruzi, espécie de Trypanosoma descoberta por Carlos Chagas, e assim denominada em homenagem a seu mentor científico, Oswaldo Cruz. Adaptado de RASSI *et al.*, 2012.

Dentre os tripanosomatídeos, o *T. cruzi* é um dos que apresenta o ciclo de vida mais complexo. Nas células hospedeiras, comporta-se como um patógeno intracelular que exhibe vários mecanismos para manipular uma diversidade de processos de invasão da célula, normalmente com sucesso. O processo da infecção pelo *T. cruzi* (**Figura 2**) é transmitido por mais de 100 espécies de insetos triatomíneos (Hemíptera: Reduviidae: Triatominae) a mais de 70 gêneros de células mamíferas hospedeiras (ZINGALES, 2018).

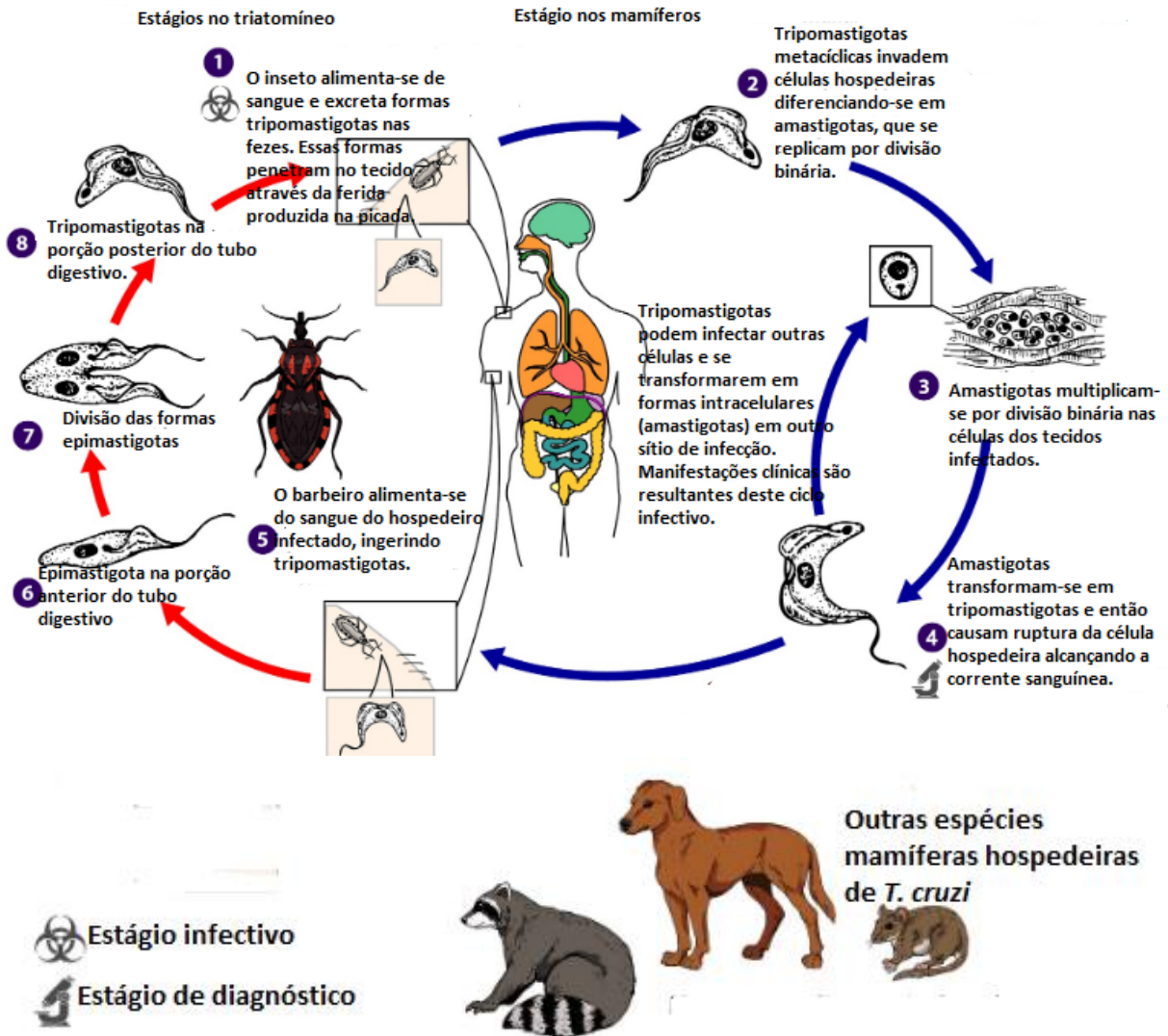


Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas, mostrando as formas celulares presentes em hospedeiros vertebrado e invertebrado. Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention* (<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>).

Dentro da célula, a forma tripomastigota infecciosa está contida temporariamente em uma vesícula até escapar para o citossol, onde se diferencia na forma amastigota, replicando-se por divisão binária (DE SOUZA *et al.*, 2010). O processo de replicação culmina, após vários ciclos seguidos, para uma nova fase de diferenciação, onde os parasitos voltam ao estágio de tripomastigota. A forma tripomastigota presente no sangue do hospedeiro infectado pode ser ingerida pelo inseto e levada até o seu aparelho digestivo. Ao chegar ao estômago, o tripomastigota diferencia-se nas formas epimastigotas e algumas são digeridas. As formas epimastigotas sobreviventes, quando alcançam o intestino, multiplicam-se por divisão binária, aderindo às membranas perimicrovilares excretadas pelas células do intestino. A etapa de adesão parece ser evento importante para o gatilho do processo de diferenciação da forma não-infecciosa epimastigota para a forma infecciosa

tripomastigota metacíclica (ALVES *et al.*, 2007). Nas regiões posteriores do intestino e no reto do triatomíneo, as formas tripomastigotas desaderecem do epitélio intestinal sendo liberadas com as fezes e urina do inseto vetor (DE SOUZA *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2007; BRENER *et al.*, 2000).

Os mecanismos celulares e moleculares da infecção causada pelo *T. cruzi* às células hospedeiras são complexos e têm sido objeto de estudos há várias décadas, pois inúmeros fatores estão envolvidos, incluindo diversas moléculas, tanto do parasito quanto das células hospedeiras (ROMANO *et al.*, 2012; DE SOUZA *et al.*, 2010). Duas vias possíveis são assumidas como prováveis para o entendimento do processo da infecção. A via fagocítica sugere que macrófagos, responsáveis pela fagocitose, internalizam qualquer uma das formas evolutivas do parasito, onde formas epimastigotas passam a residir em vacúolos parasitóforos e podem ser destruídas, num processo não infectivo. Por sua vez, formas amastigotas e tripomastigotas fagocitadas conseguem escapar desses vacúolos e realizar a replicação, uma vez diferenciadas todas em amastigotas (COURA e CASTRO, 2011; LEY *et al.*, 1988; MILDER e KLOETZEL, 1980). Já na via não fagocítica, a invasão dos parasitos pode ocorrer em qualquer tipo celular como músculos lisos e estriados, fibroblastos, epiteliais e neurônios (COURA e CASTRO, 2011), com mecanística menos simples. A infecção de mamíferos ocorre via inoculação direta das formas tripomastigotas metacíclicas na pele lesionada pelo inseto, durante o repasto sanguíneo, com reconhecimento de uma grande variedade de moléculas. Neste processo, estão envolvidas moléculas de glicoproteínas, como fibronectina, mucinas e trans-sialidases, que orquestram a adesão das membranas a receptores proteicos, chamados de integrinas, para posterior internalização do parasito na célula hospedeira (DE SOUZA *et al.*, 2010).

As mucinas são as glicoproteínas mais abundantes presentes no *T. cruzi*, (VILLALTA *et al.*, 2009) e possuem sítios com alta prevalência de resíduos de serina e treonina, aminoácidos hidroxilados que podem formar O-glicosídeos com oligossacarídeos, tornando a mucina extremamente hidrofílica (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2000). A expressão de diversas mucinas com diferentes sítios ricos em serina e treonina tem como principais vantagens para o parasito, a otimização da interação entre as membranas do parasito e da célula hospedeira, e uma menor probabilidade de ativação de resposta imune pelo hospedeiro. Além disso, as mucinas de *T. cruzi* trabalham em conjunto com outra classe de macromoléculas, igualmente importantes para o processo de invasão celular, denominadas trans-sialidases (BUSCHIAZZO *et al.*, 2012). Nas formas tripomastigotas, a trans-sialidase está ancorada como uma proteína não integral de membrana ao glicosil-fosfatidil-inositol (AGUSTI *et al.*, 1997). Estas enzimas têm a capacidade de realizar a sialização da mucina (GIORGI e LEDERKREMER, 2011), através da transferência de ácido siálico da membrana do hospedeiro para uma β -galactopiranosose presente no sítio hidrofílico glicosilado da mucina do parasito. Uma vez que as formas tripomastigotas de *T. cruzi* são incapazes de sintetizar ácido siálico, usando um carboidrato da membrana do hospedeiro (que está envolvido em processos de reconhecimento celular entre suas próprias células), o parasito consegue realizar o processo invasivo não fagocítico, sem que haja ativação de resposta imunológica (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2000).

Após adesão e reconhecimento, ocorrem os processos de sinalização celular consolidando a invasão do parasito na célula (DE SOUZA *et al.*, 2010; SCHENKMAN *et al.*, 1991). Nessa etapa, há a formação de um vacúolo parasitóforo, que pode fundir com o lisossomo ou endossoma precoce (BURLEIGH & WOOLSEY, 2002). O pH ácido e as

enzimas secretadas pelo parasito promovem a formação de poros e, conseqüentemente, ocorre a lise da membrana do vacúolo, resultando na liberação do parasito no citoplasma da célula hospedeira. Durante esse processo, dá-se a diferenciação da forma tripomastigota em amastigota, que, após a lise do vacúolo parasitóforo, entra em contato com o citosol da célula hospedeira (DE SOUZA *et al.*, 2010).

As formas amastigotas passam então por ciclos de divisão binária no citoplasma da célula, ocorrendo na seqüência a diferenciação das formas amastigotas em tripomastigotas sanguíneas, capazes de secretar enzimas que atuam no rompimento da membrana plasmática, permitindo a sua liberação para o ambiente extracelular. Entretanto, a lise da célula pode ocorrer antes da total diferenciação das formas amastigotas em tripomastigotas, gerando o aparecimento das duas formas evolutivas no meio extracelular. As formas tripomastigotas podem invadir novas células localmente ou alcançar a corrente sanguínea e infectar outros sítios (BRENER *et al.*, 2000). Após a saída da célula hospedeira sob a forma de tripomastigota, o parasito não tem capacidade de sobreviver indefinidamente nos vasos sanguíneos (REY, 2011), pois eles não infectam hemácias e não são formas replicativas. Assim, se as formas tripomastigotas não forem ingeridas por um vetor, elas tendem a se disseminar, atravessando a barreira endotelial do sistema circulatório do hospedeiro vertebrado para infectar células de órgãos como coração, esôfago e cólon. O resultado é a geração de danos irreversíveis nestes órgãos, a longo prazo, com comprometimento da saúde e da produtividade dos indivíduos portadores da doença de Chagas (ZINGALES e COLLI, 1995). O ciclo biológico do *T. cruzi* se completa quando as formas sanguíneas são ingeridas por um inseto vetor durante o repasto sanguíneo (BERN, 2015; RASSI *et al.*, 2012). Nas **Figuras 3A, 3B e 4** estão representadas as estruturas das formas evolutivas do *T. cruzi*, em microscopia eletrônica de varredura.

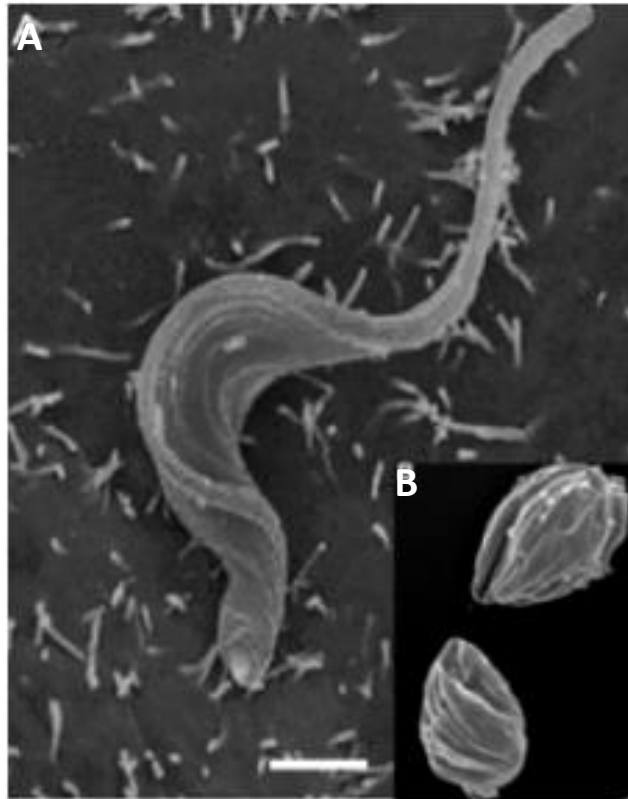


Figura 3. Formas tripomastigota (A) e amastigota (B), em microscopia eletrônica de varredura. Observa-se o flagelo livre na forma tripomastigota. Na forma amastigota, o flagelo encontra-se internalizado na bolsa flagelar. Disponível em: chagas.fiocruz.br/organização-estrutural. Acesso em 01-06-2019.

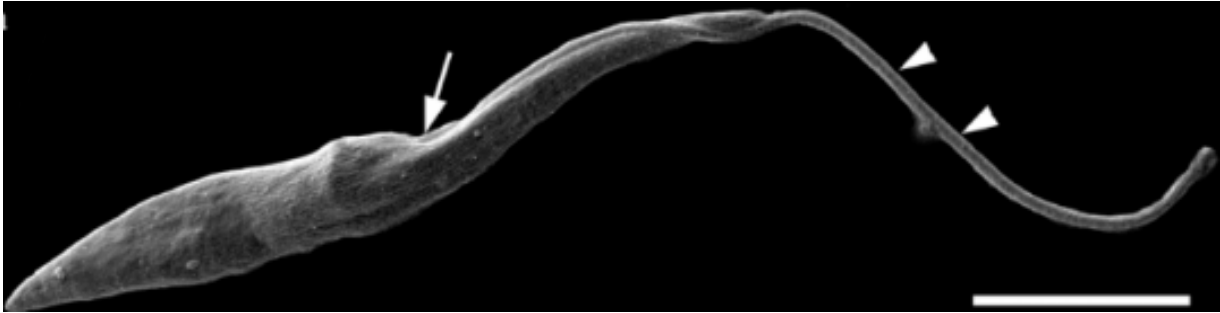


Figura 4. Imagem da forma evolutiva epimastigota, em microscopia eletrônica de varredura. Nota-se o corpo celular alongado. A seta aponta a bolsa flagelar, região de saída do flagelo e as cabeças de seta apontam o flagelo livre. Disponível em: chagas.fiocruz.br/organização-estrutural. Acesso em 01-06-2019.

O *T. cruzi* apresenta ampla diversidade genética demonstrada por diferentes técnicas bioquímicas, formando um complexo heterogêneo de subpopulações (FERNANDES e CAMPBELL, 2000). A partir de 2009, foi aceita a proposta de uma nomenclatura intraespecífica para a heterogeneidade populacional de *T. cruzi* para seis linhagens genéticas denominadas unidades de tipagens discretas (DTUs, do inglês *Discrete Typing Units*): TcI-TcVI. Posteriormente, foi acrescentado um sétimo DTU restrito a morcegos, o Tcbat (ZINGALES, 2018 e MARCILI *et al.*, 2009). O termo DTU foi proposto para descrever as diferentes tipagens geneticamente similares e identificadas por marcadores moleculares comuns. Baseado em estudos prévios, dividiu-se o *T. cruzi* em diferentes grupos de acordo com padrão de marcadores genéticos, bioquímicos, biológicos e moleculares (ZINGALES *et al.*, 2009). Na **Tabela 3**, observam-se alguns exemplos de isolados de *T. cruzi*, chamados de cepas, utilizados em estudos de infecção experimental, com sua designação corrente. Nos últimos anos, o conhecimento da diversidade genética do *T. cruzi* progrediu bastante, mas ainda há incertezas quanto aos fatores que determinam a patogenicidade do parasito e o papel do hospedeiro nas manifestações da DC.

Tabela 3. Designação corrente de isolados (cepas) de *Trypanosoma cruzi* utilizados em estudos de infecção experimental.

Y
Tulahuen
Colombiana
Sylvio-X10
Dm28c
Peru
21-SF
Esmeraldo
Berenice

Adaptado de (FERNANDES e CAMPBELL, 2000).

1.5 Quimioterapia da doença e suas limitações

Centenas de cepas de *T. cruzi* foram isoladas de diferentes países e zonas geográficas, caracterizando diferenças importantes na resistência e suscetibilidade a fármacos, ou substâncias utilizadas, em experimentação em laboratórios ou em estudos pré-clínicos (MORELLO *et al.*, 1994). Nas últimas décadas, nota-se uma escassa alternativa terapêutica para o tratamento da doença de Chagas, com notória ausência de propostas inovadoras de quimioterápicos por parte da indústria farmacêutica. Tal fato é derivado certamente da baixa expectativa de lucro financeiro que o justifique, devido ao cenário de pobreza nas regiões endêmicas. Dessa forma, os únicos medicamentos disponíveis para o tratamento são dois heterociclos: o 5-nitrofurano nifurtimox (**1**) e o 2-nitroimidazol benznidazol (**2**, BZN) (TROCHINE *et al.*, 2014), cujas estruturas químicas estão representadas na **Figura 5**.

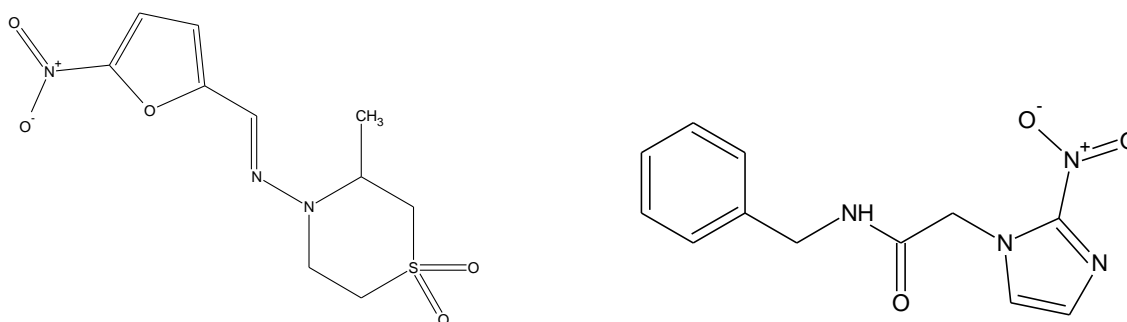


Figura 5. Estruturas do Nifurtimox (**1**) e do Benznidazol (**2**).

Esses fármacos têm passivos associados, incluindo falta de eficácia, gravidade dos efeitos colaterais, falta de praticidade para o uso em campo, entre outras limitações, as quais constituem obstáculos em termos de acesso a um tratamento eficaz para os pacientes. Sem dúvida, uma nova geração de medicamentos precisa ser mais eficaz e segura (Kaiser *et al.*, 2015). A eficácia terapêutica do nifurtimox (**1**) e do benznidazol (**2**) é controversa na fase crônica. Ambos produzem bons resultados apenas no tratamento da fase aguda da infecção. Os fármacos são muito tóxicos, apresentam diversos efeitos colaterais, além de

algumas cepas do parasito já terem desenvolvido resistência aos mesmos (BASCARDIN *et al.*, 2010). Cepas isoladas de diferentes regiões geográficas, vetores, hospedeiros e fases da doença apresentaram variedade na suscetibilidade ao benznidazol (2) (FILARD e BRENER, 1987). A resistência foi detectada em cepas isoladas de reservatórios e vetores silvestres sem contato anterior com o fármaco, sugerindo resistência natural ao mesmo. Tal diferença de perfis de sensibilidade ao quimioterápico pode explicar a variabilidade de resultados clínicos em pacientes em tratamento (ANDRADE, 1985). Além da resistência natural, há ainda estudos que apontam para o desenvolvimento da resistência adquirida em tratamento prolongado com o benznidazol (2) (MURTA *et al.*, 2001).

O nifurtimox (1) e o benznidazol (2) estão contidos em medicamentos com os nomes de Lampit® e Rochagan®, respectivamente. O Lampit® foi desenvolvido pela Bayer nos anos 60, recebendo a denominação *Bay 2502*, e demonstrou eficácia no tratamento de doenças parasitológicas (BOCK *et al.*, 1969). O medicamento é utilizado na dose de 8-10 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹, divididos em 2-3 doses por dia, por 60 dias (COURA, 2009). No entanto, teve a sua utilização descontinuada nos anos 80 em alguns países como Brasil, Argentina, Chile e Uruguai, devido a seus efeitos altamente nocivos (COURA e CASTRO, 2002). Dentre esses efeitos, destacam-se polineuropatia, anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade/sonolência, náuseas, vômitos, dentre outros distúrbios causados em 50 a 70% dos pacientes, o que compromete a tolerância do tratamento (LEPESHEVA, 2013; COURA e CASTRO, 2011; PRATA *et al.*, 1975). Ademais, estudos mostraram aumento de treze vezes nas aberrações cromossômicas em crianças que receberam nifurtimox (1) para o tratamento da DC, além de aumento na incidência de linfomas malignos em camundongos tratados com a substância, na dose de 80 mg por Kg de peso corporal por dia, durante 60 dias (GORLA *et al.*, 1989). Outras contraindicações ao tratamento com o nitrofurano (1) são gravidez, insuficiência renal ou hepática e uso em pacientes com antecedentes psiquiátricos ou problemas neurológicos. (WHO, 2010).

Já o BZN (2) foi desenvolvido e fabricado pela Roche, tendo sido comercializado até 2003, ano em que a empresa cedeu os direitos de comercialização e a tecnologia ao governo brasileiro¹⁰. Desde então, uma parceria estabelecida entre DNDi e LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco), permitiu a produção da formulação pediátrica do fármaco. O LAFEPE é um dos três maiores laboratórios públicos no Brasil, com Certificação de Boas Práticas de Fabricação, fornecido pela agência reguladora Anvisa. A distribuição do medicamento é feita no Brasil através do Sistema Único de Saúde (SUS) e, em outros países endêmicos, através de órgãos humanitários¹¹, como a Organização Pan-Americana de Saúde e os Médicos Sem Fronteiras. O benznidazol (2) apresenta efeitos nocivos similares ao nifurtimox (1) além de outros, incluindo o risco de genotoxicidade (BUSCHINI *et al.*, 2009). O medicamento é utilizado na dose de tratamento de 5-10 mg Kg⁻¹.dia⁻¹, por 30-60 dias (PATTERSON e WYLLIE, 2014; COURA, 2009). Em geral, as limitações de uso são associadas ao surgimento de efeitos secundários severos, tanto na fase aguda quanto na fase crônica, etapa clínica longa e mais comum da doença, o que leva à descontinuidade terapêutica pelos pacientes (WILKINSON, 2011 e URBINA, 2010 *apud* TROCHINE *et al.*, 2014).

¹⁰ Informação disponível em <http://www.lafepe.pe.gov.br/institucional> Acesso em 05-07-2019.

¹¹ Informação disponível em <http://www.lafepe.pe.gov.br/institucional>. Acesso em 05-07-2019

A ineficácia de ambos os fármacos na fase crônica da doença leva a questionamentos que permanecem sem explicações conclusivas, tais como, porque o tratamento na fase crônica tem desfechos variáveis; porque as manifestações clínicas são distintas para diferentes regiões geográficas; ou quais são as razões para as falhas no tratamento (CHATELAIN, 2015). Sem dúvida, a diversidade genética do parasito assim como a do hospedeiro, devem ser considerados fatores importantes para a precariedade de respostas a essas perguntas (ZINGALES, 2018). Adicionalmente, de uma maneira formal, acredita-se que o *T.cruzi* multiplica-se por fissão binária, e devido à ampla diversidade genética do protozoário é possível que, a partir de sua replicação, novos clones evoluam, acumulando modificações discretas, com evidências que sugerem haver recombinação natural no parasito durante a sua evolução, o que torna ainda mais complexa a resposta ao conjunto de interrogativas (TIBAYRENC e AYALA, 2002).

Estudos visando melhor eficácia de ambos os fármacos foram conduzidos na associação destes com diferentes moléculas (PEREZ-MAZLIAH *et al.*, 2013; LÓPEZ-MUÑOZ *et al.*, 2010). Por exemplo, em parceria com DNDi, foram realizados vários estudos clínicos randomizados¹² (estudos **BENDITA**, do inglês *Benznidazole New Doses Improved Treatment and Associations*). Em 2014-2016, pesquisadores avaliaram a eficácia de baixas doses e diferentes regimes (tempos curtos) da monoterapia com benznidazol (**2**) e sua associação medicamentosa com o fosravuconazol, antifúngico que mostrou atividade tripanocida (URBINA, 2003), em pacientes da Argentina e Bolívia (DNDi, 2017). Este estudo foi finalizado no primeiro semestre de 2019. Outro estudo estabeleceu a terapia combinada de benznidazol com alopurinol, fármaco utilizado no tratamento da hiperuricemia (PACHER *et al.*, 2006), que resultou numa interação sinérgica, com redução da carga parasitária (MAZZETI *et al.*, 2019). Outra estratégia empregada é o estudo chamado **BENEFIT** (do inglês *Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*), realizado para avaliar o efeito do benznidazol (**2**) em três mil pacientes, entre 18 a 75 anos, portadores de cardiomiopatia chagásica crônica, com benefícios de redução da carga parasitária em 66%. Porém não houve melhora do quadro clínico, após cinco anos de tratamento (MORILLO, 2015). Apesar dos esforços, observa-se enorme necessidade de busca por novos quimioterápicos e diferentes alvos moleculares a serem investigados, visando obter opções eficazes para o tratamento da doença de Chagas (DIAS *et al.*, 2009). De acordo com UCHIYAMA (2009), a despeito de inúmeras pesquisas já realizadas, não existem substâncias inéditas em ensaios clínicos para o tratamento da doença. No entanto, a ampla gama de alvos terapêuticos estudados pode contribuir para a descoberta de compostos tripanocidas vindouros, assim como para a compreensão do mecanismo de ação de cada substância testada. Neste sentido, a proposta do presente estudo foi contribuir para a solução deste problema, avaliando o potencial do AINE¹³ (acrônimo de

¹² Estudo clínico randomizado é uma ferramenta de estudos experimentais em seres humanos de alta evidência científica. Consiste na aplicação de intervenções clínicas nos grupos de pacientes de forma aleatória, ao invés de seleção por características da amostra ou preferência dos participantes. (SOUZA, 2009).

¹³ Os anti-inflamatórios dividem-se em duas grandes classes, qual seja os anti-inflamatórios não esteroidais, que atuam na redução da síntese de prostaglandinas, através da inibição das enzimas ciclo-oxigenases. (São exemplos: ácido acetil salicílico, ibuprofeno, nimesulida). A outra classe é a dos anti-inflamatórios esteroidais, que são corticosteroides com efeitos mineralocorticoides, utilizados em doenças reumáticas graves, doenças inflamatórias intestinais, neoplasias, dentre outras. Tratamentos prolongados costumam provocar retenção de água e sal, hipertensão e perda de potássio. (São exemplos: betametasona, dexametasona, hidrocortisona). Informação disponível em Formulário Terapêutico Nacional. Ministério da Saúde, 2ª edição. 2010. Disponível em: http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/formulario_terapeutico_nacional_2010.pdf. Acesso 17-07-2019.

Anti-Inflamatório Não Esteroidal) nimesulida (3) como uma possível alternativa para a terapêutica da doença de Chagas.

2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

A escolha do fármaco nimesulida para a realização deste estudo se baseou na consideração de alguns fatores, que apresentaremos rapidamente a seguir, e que serão abordados em maior profundidade na discussão dos resultados obtidos neste trabalho. Observa-se que a nimesulida (representado na **Figura 6**) possui em sua estrutura uma porção nitroaromática (Ar-NO₂). Diversos compostos contendo grupamento nitro possuem um amplo rol de atividades biológicas, incluindo ação antiparasitária (RAETHER e HANEL, 2003). Cabe ressaltar que os dois fármacos utilizados no tratamento da DC possuem um grupamento nitro que está ligado a anéis aromáticos heterocíclicos, e que este atributo estrutural está intimamente ligado aos seus respectivos mecanismos de ação. Um seguinte aspecto considerado por nós na escolha da nimesulida para a realização deste estudo foi a informação, disponível na literatura, de que outros AINE's são capazes de modular a infecção por *T. cruzi* (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). Esta modulação ocorre através da inibição do complexo enzimático ciclo-oxigenase, vital para o parasito. A utilização de um anti-inflamatório capaz de matar o parasito, além de inibir o processo de infecção de células hospedeiras pela inibição da produção de PGE₂, é vantajosa no tratamento dos danos inflamatórios causados durante o curso da doença (BONNEY e ENGMAN, 2008). Por último, a possibilidade da nimesulida possuir ação antiparasitária alinha-se com uma das estratégias contemporâneas de maior potencialidade para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças parasitárias negligenciadas, que é o reposicionamento de fármacos (SBARAGLINI *et al.*, 2016).

Desta forma, o objetivo principal deste trabalho consistiu na identificação da provável atividade tóxica sobre o protozoário *Trypanosoma cruzi* do fármaco anti-inflamatória nimesulida (**3**, **Figura 6**). Foram planejadas avaliações *in vitro* da nimesulida (**3**) frente às diferentes formas evolutivas do protozoário (epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas). Com o intuito de obtermos dados sobre a seletividade da atividade antiparasitária, planejamos ainda a avaliação do AINE frente a diferentes tipos celulares (macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, linfócitos oriundos do baço do animal, além de célula de linhagem, a LLCMK2). A fim de avaliar a potencial contribuição da porção nitroaromática na nimesulida (**3**) em sua possível atividade anti-*T. cruzi*, propusemos a redução quimiosseletiva do grupamento nitro presente na estrutura do fármaco, podendo gerar a anilina correspondente (**4**, **Figura 7**). Este derivado foi testado frente a formas epimastigotas do *T. cruzi*, nas mesmas condições que seu precursor (**3**). Assim obtivemos informações preliminares sobre a importância do grupo nitro-aromático, que como já dito anteriormente, tem potencial toxifórico frente ao *T. cruzi* e cuja presença na estrutura do fármaco foi estratégica na escolha da nimesulida para realização deste estudo.

Adicionalmente à pesquisa com o fármaco nimesulida, outro objetivo deste trabalho foi planejar dois compostos inéditos, através da estratégia de modificação estrutural denominada hibridação molecular (SAADEH *et al.*, 2009), unindo subunidades estruturais da piperina (**5**, **Figura 7**) e do fármaco nimesulida. A piperina, amida natural isolada de *Piper nigrum*, teve sua atividade tripanocida evidenciada em trabalhos anteriores de nosso grupo (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2004). Os novos derivados híbridos planejados foram sintetizados e submetidos aos mesmos testes *in vitro* que a nimesulida, com o intuito de se identificar possíveis incrementos na ação antiparasitária dos híbridos gerados, em relação aos seus precursores.

Visando facilitar a leitura e o entendimento das etapas deste trabalho, optou-se em dividir este estudo em dois capítulos, conforme descrito abaixo.

O Capítulo I contém a extração da molécula de nimesulida (**3**) a partir de comprimidos do fármaco adquirido no comércio para emprego nas análises, assim como sua caracterização. Contém ainda a síntese de seu derivado quimiosseletivamente reduzido (**4**), com os respectivos testes de atividade frente ao *Trypanosoma cruzi*. Análises de citometria de fluxo e de microscopia eletrônica de transmissão foram incluídas, objetivando inferir a via provável de morte celular induzida e as alterações ultraestruturais decorrentes do tratamento com o fármaco (**3**).

O Capítulo II contém a obtenção de dois híbridos moleculares de nimesulida (**3**) e o produto natural piperina. O primeiro híbrido **H1** foi sintetizado a partir da *N*-acilação da sulfonamida. Já para a construção do segundo híbrido **H2**, a *N*-acilação ocorreu no átomo de nitrogênio do grupamento amino, oriundo da redução química da nimesulida (**3**). Pretendeu-se observar o efeito tóxico das moléculas obtidas contra diferentes formas evolutivas do parasito em função da modificação molecular realizada.

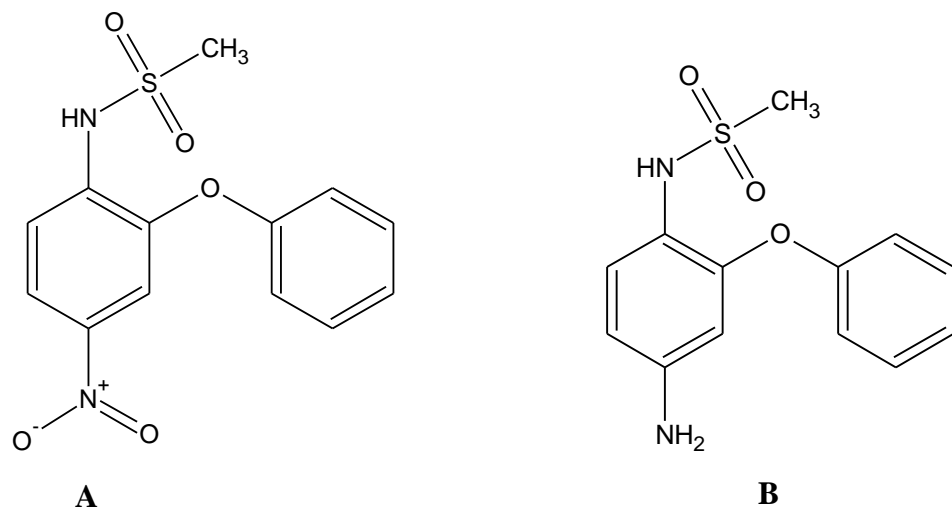


Figura 6. Estruturas químicas. (A): nimesulida (**3**), *N*-(4-nitro-2-fenoxifenil) metanossulfonamida. (B): nimesulida reduzida (**4**), *N*-(4-amino-2-fenoxifenil) metanossulfonamida.

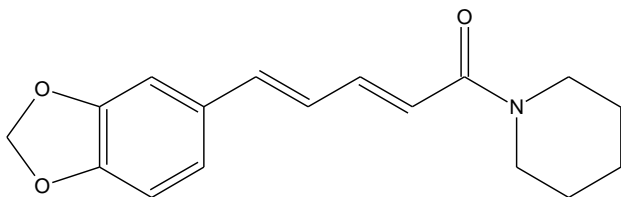


Figura 7. Estrutura química da piperina (**5**), 1-[(2*E*,4*E*)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]piperidina.

3 CAPÍTULO I

Estudos no reposicionamento do fármaco nimesulida para o tratamento da doença de Chagas.

Os fármacos são substâncias químicas projetadas para se ligarem a alvos moleculares, fazendo-os agir de forma benéfica. Quanto maior é o entendimento da ação de um fármaco, melhor é a matriz de seu ciclo de desenvolvimento, com relação à pesquisa de novas entidades moleculares envolvidas (*NMEs*, do inglês *New Molecular Entity*; *NCEs* e *NBEs*, do inglês *New Chemical Entity* e *New Biological Entity*, respectivamente). Além disso, o estudo contínuo dos órgãos-alvo e dos mecanismos de ação de um fármaco para determinada doença, torna possível que este seja empregado para o tratamento de diferentes grupos de população (ARROWSMITH e HARRISON, 2012).

Nos últimos anos, houve crescente interesse por se encontrar novas utilizações para antigos fármacos, diferentes do escopo para o qual foram desenvolvidos inicialmente. Fármacos e pró-fármacos aprovados em testes clínicos possuem grande potencial de serem utilizados com segurança para tratamento de outras doenças. Denominada de “reposicionamento de fármacos” (expressões similares encontradas na literatura como *drug re-positioning*; *drug re-purposing*; *drug re-profilin* e *drug-tasking*), a estratégia responde atualmente por cerca de 30% dos medicamentos e vacinas aprovados pelo FDA (do inglês *Food and Drugs Administration*) (JIN e WONG, 2014). Trata-se de uma abordagem de pesquisa e desenvolvimento viável e muito atraente, em vários aspectos (ARROWSMITH e HARRISON, 2012). Com efeito, reciclar antigos fármacos, que possuem suas propriedades farmacológicas bem descritas, resgatar protótipos de moléculas bioativas ou ainda prolongar a vida útil de patentes têm-se mostrado caminhos mais céleres, econômicos e atraentes para a descoberta de novos medicamentos. Entre 1998 e 2008, o custo médio envolvido no desenvolvimento de fármacos inéditos nos EUA foi de US\$ 1,24 bilhão, incluídas as tentativas fracassadas (KAITIN, 2010). Além do aspecto econômico implicado, fator primordial para a indústria, o reposicionamento torna-se particularmente interessante no que se refere ao tratamento de doenças raras e negligenciadas (OPREA *et al.*, 2011). As indústrias farmacêuticas, ao assumirem como estratégia de produção o reposicionamento de fármacos ou de candidatos já existentes para novas indicações, minimizam os 6 a 9 anos iniciais necessários para o desenvolvimento de fármacos inéditos, pois os testes pré-clínicos e ensaios clínicos passam a ser a etapa inicial do processo, o que reduz significativamente riscos e custos. O processo tradicional de descoberta de protótipos de novos fármacos, desde a descoberta do alvo molecular até o seu registro e fabricação, costuma durar de 10 a 17 anos. Enquanto o seu reposicionamento pode abreviar este tempo para algo entre 3 a 12 anos, até a sua reintrodução no mercado com outra função (ASHBURN e THOR, 2004). Com isso, a estratégia mostra-se economicamente atrativa, tanto para a indústria farmacêutica quanto para as empresas de biotecnologia, quando comparada ao custo de desenvolvimento de novas substâncias precursoras de fármacos. Ademais, fatores como obstáculos regulatórios cada vez maiores, juntamente com a pressão global sobre os preços, a alternativa de uso de medicamentos “genéricos” e a necessidade de estender a vida de um fármaco aprovado aumentam o rol de motivos mercadológicos para ampliar a criatividade nos departamentos de pesquisa e desenvolvimento de diversos nichos farmacêuticos, em detrimento de sua sobrevivência competitiva (HORROBIN, 2001). Parece haver muitos efeitos positivos nesta abordagem terapêutica, porém alguns pontos precisam ser considerados. Por exemplo, se o candidato não atender aos requisitos atuais de regulamentação clínica, serão necessários novos ensaios na fase I para completar o conjunto dos estudos, o que pode aumentar tempo, custo e risco. (BAEK *et al.*, 2015).

Outro desafio é o desvio no modo de ação do fármaco reposicionado, com comprometimento de segurança, afetando multi-alvos (MEDINA-FRANCO, *et al.*, 2013).

A sulfonamida nimesulida (**3**, NIM) é amplamente utilizada na terapêutica desde os anos 70, por suas propriedades anti-inflamatória, analgésica e antipirética. Desta forma, apostando em sua prática segura ao longo dos anos, este trabalho foi conduzido na expectativa de êxito terapêutico. O medicamento parece exercer seus efeitos através de vários mecanismos, incluindo eliminação de radicais livres, inibição da liberação de histamina, inibição da ciclo-oxigenase, inibição da fosfodiesterase, dentre outros (OATES, 1991; TOGNELLA, 1993). Sua descoberta ocorreu antes da identificação do papel das prostaglandinas (PGs) na inflamação e na dor (CAIAZZO *et al.*, 2019).

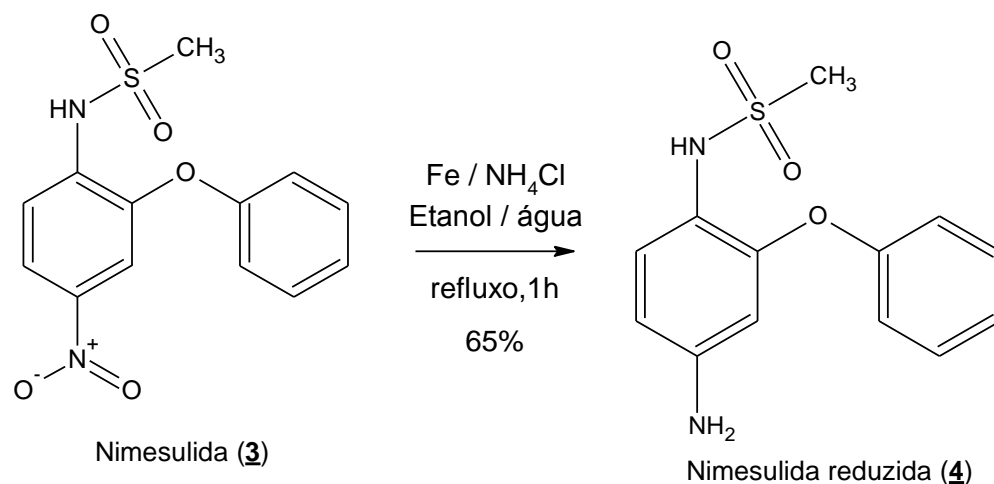
Resultados I

Extração de nimesulida (**3**) a partir do medicamento adquirido comercialmente.

A extração ácido-base de NIM (**3**), a partir de comprimidos do fármaco, resultou num rendimento de 90%. A sua purificação foi realizada através de duas recristalizações consecutivas, conforme sugerido por GONSALVES *et al.* (2013). O ponto de fusão do sólido obtido após a primeira recristalização foi 150-151 °C. Após a segunda recristalização, o sólido apresentou ponto de fusão 147-148 °C, o que está de acordo com o valor 147 °C apontado na literatura (SHOUKRI, *et al.*, 2009). A nimesulida (**3**) foi caracterizado por técnica de infravermelho (**Espectro 1, página 145**), em que foi possível observar sinais característicos do composto: um sinal em 3280 cm⁻¹ referente ao estiramento N-H de amida secundária e um sinal em 1587 cm⁻¹ referente à deformação angular da ligação N-H de amida secundária. Aparece ainda outro sinal em 1332 cm⁻¹ referente à deformação axial simétrica e assimétrica de NO₂. No espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) (**Espectro 2, página 146**), um conjunto de sinais entre δ 7,09 e 7,49 ppm representam os hidrogênios dos anéis aromáticos. Os hidrogênios metílicos são representados pelo sinal simples em δ 3,19 ppm. No espectro de Carbono-13 (DPTQ) (**Espectro 3, página 146**), um sinal em δ 40,56 ppm representa o carbono metílico. Também foram observados os sinais em δ 143,72 ppm referente ao carbono ligado ao nitrogênio da sulfonamida e em δ 154,17 ppm referente ao carbono ligado ao nitrogênio do grupamento NH₂. O espectro de massas (**Espectro 4, página 148**) apresentou o íon molecular m/z 308. Todos os espectros das moléculas, assim como os assinalamentos dos átomos de hidrogênio e carbono, estão apresentados nos **Anexos (página 142)**, ao final desta tese.

Obtenção da anilina (**4**) derivada da nimesulida (**3**).

A proposta de modificação estrutural na molécula da nimesulida (**3**) consistiu na redução quimiosseletiva do seu grupo nitro (NO₂) para gerar a anilina correspondente com o grupo amino (NH₂) ligado ao anel aromático. A alteração provocou ao mesmo tempo, perda de sua similaridade estrutural com o benznidazol e de suas propriedades como AINE. A nimesulida (**3**) sofreu redução química na presença de ferro metálico e cloreto de amônio, sob refluxo, por 2 horas (PERICHERLA *et al.*, 2007). A reação foi monitorada por cromatografia de camada fina em placas de sílica e visualizada com luz ultravioleta. Foi obtido um produto sólido (65%), de cor amarelada, com ponto de fusão 170-172 °C (JIAN *et al.*, 2017). O produto foi analisado e os dados espectroscópicos foram condizentes com a estrutura do composto. No **Esquema 1** encontra-se indicada a reação de formação da nimesulida reduzida (**4**).



Esquema 1. Preparação da nimesulida reduzida (4).

Observam-se sinais característicos para a estrutura de (4) no espectro de IV (**Espectro 5, página 149**), como sinais na região de 3396 cm^{-1} , referentes a estiramento N-H de amina primária aromática, além dos sinais de vibração 3328 cm^{-1} relativo a estiramento de N-H de amida secundária e 1585 cm^{-1} do deformação angular de N-H de amida secundária. No espectro de RMN ^1H (**Espectro 6, página 150**) foram observados os dois sinais referentes aos hidrogênios ligados ao átomos de nitrogênio, um sinal simples em $\delta\ 5,28\text{ ppm}$, referentes aos hidrogênios do grupo NH_2 , e outro sinal simples em $\delta\ 8,79\text{ ppm}$ referente ao hidrogênio do grupo NH da sulfonamida. Também está presente o sinal simples dos hidrogênios do grupamento metílico em $\delta\ 2,88\text{ ppm}$. No espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 7, página 150**) foi observado o sinal $\delta\ 40,46\text{ ppm}$ referente ao carbono metílico, além de outros sinais compatíveis com a estrutura. O espectro de massas apresentou o íon molecular $m/z\ 278$ (**Espectro 8, página 152**).

Cinética de crescimento dos parasitos e cultivo das formas epimastigotas.

Inicialmente, realizamos a padronização do crescimento das culturas do parasito. Para tanto, as formas epimastigotas de *T. cruzi* (2×10^5 parasitos $\times\ \text{mL}^{-1}$) foram cultivadas em meio próprio de nutrientes (BHI com 10% de soro fetal bovino). O crescimento da cultura foi então avaliado através da quantificação direta das formas epimastigotas em câmara de Neubauer, durante 15 dias consecutivos, em microscópico óptico com aumento de 40 x. O resultado indicou que o sétimo dia foi o que apresentou maior concentração de parasitos viáveis. A análise da curva cinética obtida indicou três fases de crescimento do parasito em cultura, quais sejam, a fase exponencial, iniciando no dia três até dias seis-sete; a fase estacionária até dias oito-nove e, por fim, o início da perda de viabilidade das células em cultura. Resultados apresentados na **Figura 8**.

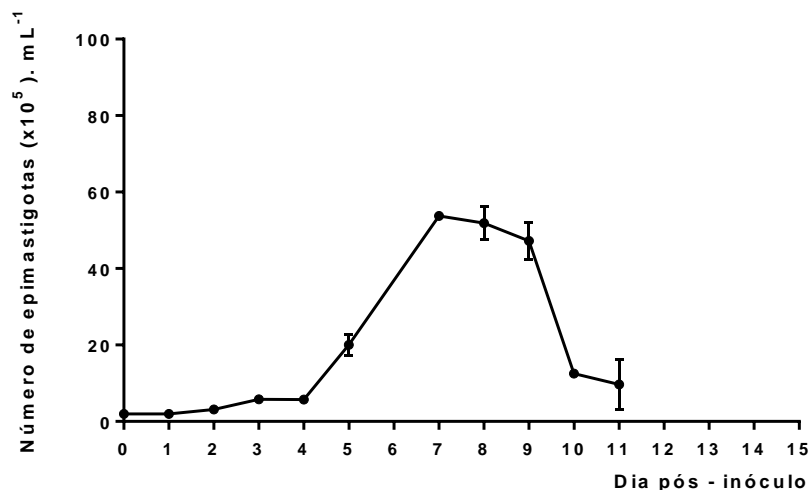


Figura 8. Curva cinética de epimastigotas em meio de cultura próprio (BHI com 10% de soro fetal bovino). O inóculo utilizado foi 2×10^5 parasitos $\times \text{mL}^{-1}$. A quantificação realizada durante 15 dias após o inóculo, por microscopia óptica com aumento de 40 x, em câmara de Neubauer. Resultado obtido em dois experimentos independentes.

Determinação da concentração do diluente DMSO inócua aos parasitos.

Um segundo aspecto experimental precisou ser considerado. Como todas as soluções estoque das substâncias seriam preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO), admitiu-se ser necessária a determinação da faixa de concentração de DMSO inócua à sobrevivência dos parasitos nos experimentos deste estudo. Para tal, os parasitos em fase exponencial de crescimento foram ressuspendidos em meio de cultura fresco, e adicionados em microplacas de 96 poços, utilizando-se um inóculo de 2×10^5 parasitos $\times \text{mL}^{-1}$, na presença ou não de DMSO, nas duas maiores concentrações que seriam utilizadas para preparação das soluções estoque. Foram empregadas concentrações de 0,38 e 0,19%, em diluição seriada, com fator de diluição igual a dois. Após incubação, a toxicidade dos parasitos frente ao DMSO foi avaliada através do ensaio do MTT¹⁴ (MUELAS-SERRANO *et al.*, adaptado, 2000). O efeito tripanocida foi mensurado pelo percentual de inibição de crescimento dos parasitos, em relação ao controle vivo (**Figura 9**).

¹⁴ O sal tetrazólio MTT (Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) é clivado pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial, resultando no produto azul de nome formazan, que absorve na faixa de 570 nm. O reagente é muito útil para avaliar a sobrevivência e proliferação celulares (DENIZOT e LANG, 1986).

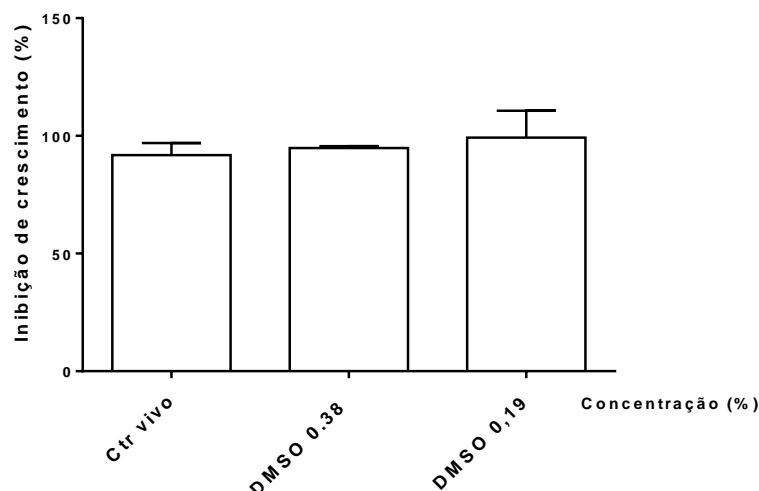


Figura 9. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com DMSO nas concentrações 0,38 % e 0,19 %. Os parasitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 células \times mL⁻¹. As células foram tratadas por 48 horas em placas de 96 poços com DMSO. A viabilidade celular foi obtida pelo método do MTT. Não se observa efeito tóxico significativo do solvente em ambas as concentrações. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

O resultado foi satisfatório indicando não haver efeito tóxico para o *T. cruzi* quando o parasito é exposto a uma concentração de 0,38 % de DMSO. Assim, a concentração final de DMSO utilizada nos ensaios permaneceu entre 0,1 e 0,3 %, no máximo, em todos os experimentos.

Avaliação da atividade da nimesulida (3) sobre formas epimastigotas.

A próxima fase foi a realização de um ensaio para verificar a atividade tripanocida da nimesulida (3). Perante as informações extraídas da curva cinética (**Figura 8**), procedeu-se então o tratamento das formas epimastigotas com nimesulida (3). Os parasitos em fase exponencial de crescimento foram ressuspendidos em meio de cultura fresco e adicionados em placas de 48 poços, utilizando inóculo de 2×10^5 parasitos \times mL⁻¹, na presença ou não de diferentes concentrações da NIM (3), 100, 50, 10 e 1 μ g \times mL⁻¹. O crescimento e as alterações morfológicas da cultura foram acompanhados por microscopia óptica e a quantificação realizada em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão, utilizando o corante azoico azul de Tripán (MULLEN *et al.*, 1975). Este resultado encontra-se na **Figura 10**.

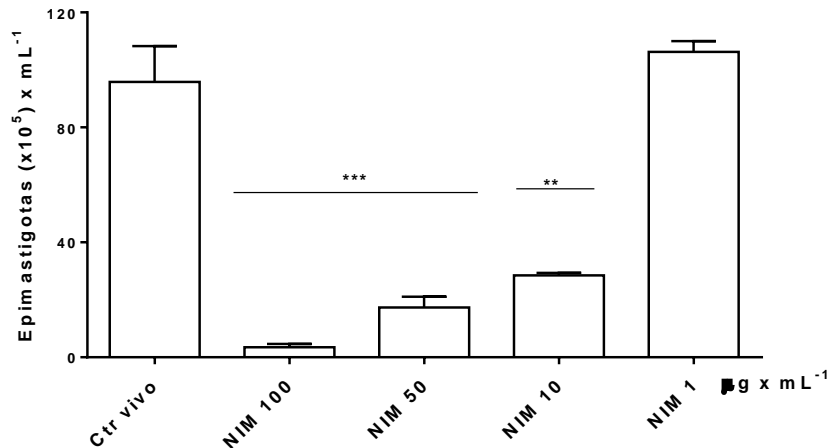


Figura 10. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com nimesulida (**3**) nas concentrações indicadas. Os parasitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 células $\times \text{mL}^{-1}$ e tratados em placas de 48 poços com quatro concentrações do fármaco (**3**), variando de 1 a 100 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. A viabilidade celular foi obtida pelo método de exclusão utilizando azul de Tripán. Observa-se atividade da molécula (**3**) nas três maiores concentrações (96%, 83% e 71%, respectivamente). Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

Avaliação da atividade da nimesulida reduzida (4**) sobre formas epimastigotas.**

Procedeu-se então o tratamento das formas epimastigotas com nimesulida reduzida (**4**). Os parasitos em fase exponencial de crescimento foram ressuspensos em meio de cultura fresco e adicionados em placas de 48 poços, utilizando inóculo de 2×10^5 parasitos $\times \text{mL}^{-1}$, na presença ou não de diferentes concentrações do derivado (**4**), 100, 50, 10 e 1 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. O crescimento e as alterações morfológicas da cultura foram acompanhados por microscopia óptica e a quantificação realizada em câmara de Neubauer (MULLEN *et al.*, 1975). Este resultado encontra-se na **Figura 11**.

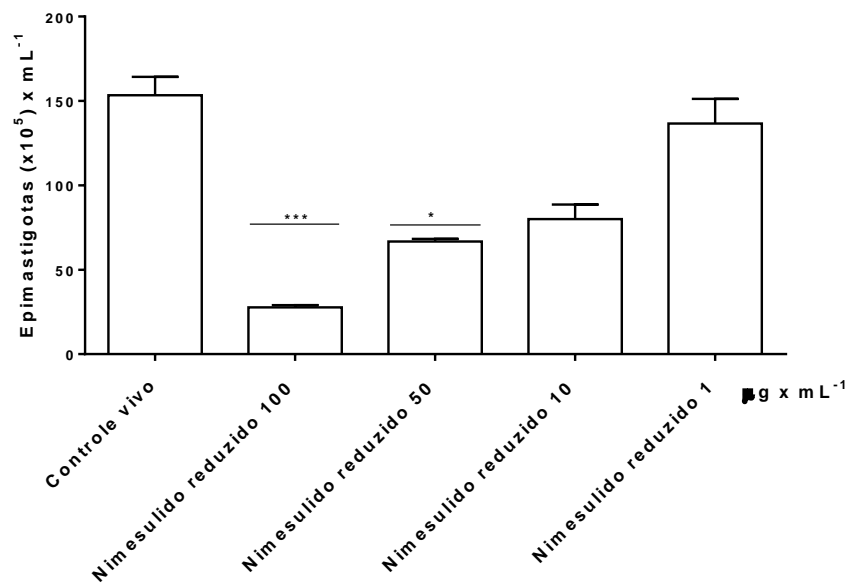


Figura 11. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com nimesulida reduzida (**4**) nas concentrações indicadas. Os parasitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 parasitos \times mL⁻¹ e tratados em placas de 48 poços com quatro concentrações do derivado (**4**), variando de 1 a 100 μ g \times mL⁻¹. A viabilidade celular foi obtida pelo método de exclusão utilizando azul de Tripán. Observa-se atividade da molécula (**4**) nas duas maiores concentrações (82% e 56%, respectivamente), porém inferior à atividade do precursor (**3**). Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

Paralelamente, foi executado o ensaio com benznidazol (**2**), de acordo com os mesmos procedimentos utilizados para a nimesulida (**3**) (**Figura 12**).

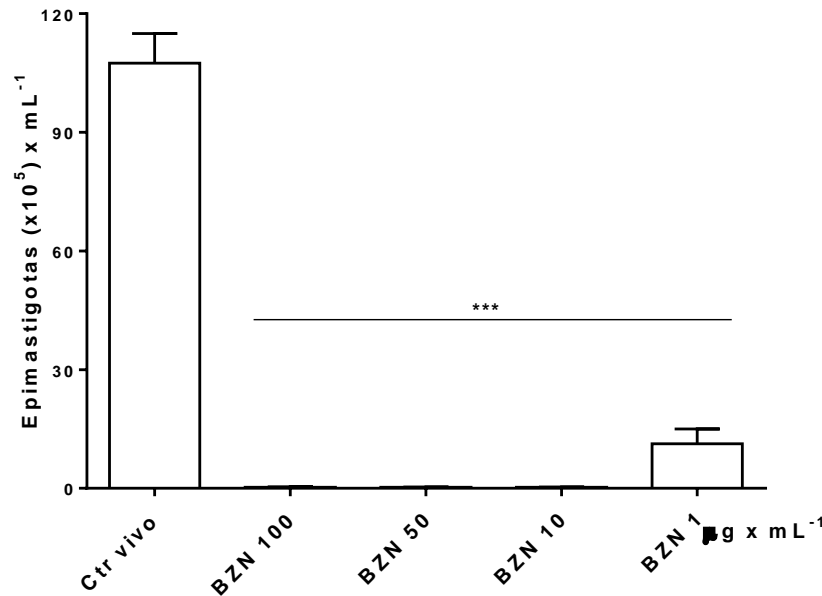


Figura 12. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com benznidazol (2) nas concentrações indicadas. Os parasitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 parasitos $\times \text{mL}^{-1}$ e tratados em placas de 48 poços com quatro concentrações do fármaco (2), variando de 1 a 100 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. A viabilidade celular foi obtida pelo método de exclusão utilizando azul de Tripán. Nas concentrações do ensaio, não observa-se crescimento celular. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (***) $p < 0,05$.

Determinação dos valores da concentração inibitória (CI_{50}) da nimesulida (3), nimesulida reduzida (4) e fármaco utilizado como referência no estudo, benznidazol (2).

Analisando o efeito da nimesulida (3), apresentado na **Figura 10**, é possível concluir que há uma evidente inibição do crescimento de epimastigotas nas concentrações de 100, 50 e 10 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ utilizadas. Já na concentração de 1 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$, ocorre uma diminuição expressiva da atividade tripanocida. O fenômeno de intensa atividade ocorreu nas quatro dosagens de benznidazol (2). Foi necessário então eger uma faixa menor de concentração, pois assim esperava-se determinar a concentração inibitória média (CI_{50}) de ambos os compostos. Já a observação do resultado para a nimesulida reduzida (4) (**Figura 11**) evidenciou um dado interessante, qual seja a baixa atividade do composto frente às formas epimastigotas, em comparação a nimesulida (3). A interpolação dos dados foi possível de ser feita no programa de análise, gerando um valor de concentração inibitória CI_{50} para a nimesulida reduzida (4) igual a $(47,74 \pm 3,81) \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ou $(171,74 \pm 13,72) \mu\text{M}$, valor expressivamente alto.

Quanto à nimesulida (3), do gráfico da **Figura 10** deduz-se que, provavelmente, a faixa da concentração inibitória frente às formas epimastigotas, deveria estar entre 1 e 10 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. Apostando-se nesta hipótese, um próximo ensaio foi conduzido nas mesmas

condições experimentais, mas em concentrações inseridas nesta faixa menor (1; 2,5; 5 e 10 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$). O estudo levou aos resultados apresentados nas **Figuras 13** e **14** para a nimesulida (**3**) e benznidazol (**2**), respectivamente.

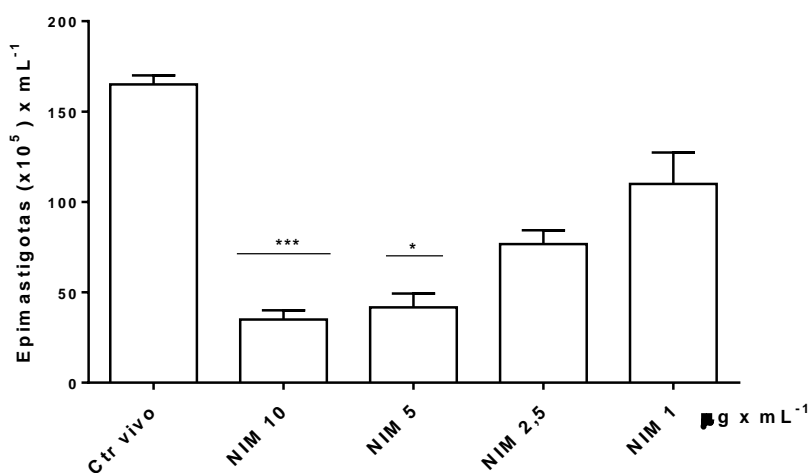


Figura 13. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com nimesulida (**3**) nas concentrações indicadas. Os parasitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 parasitos $\times \text{mL}^{-1}$ e tratados em placas de 48 poços com quatro concentrações do fármaco (**3**), variando de 1 a 10 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. A viabilidade celular foi obtida pelo método de exclusão utilizando azul de Tripán. Observa-se inibição de crescimento celular nas duas maiores concentrações. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (***) $p < 0,05$.

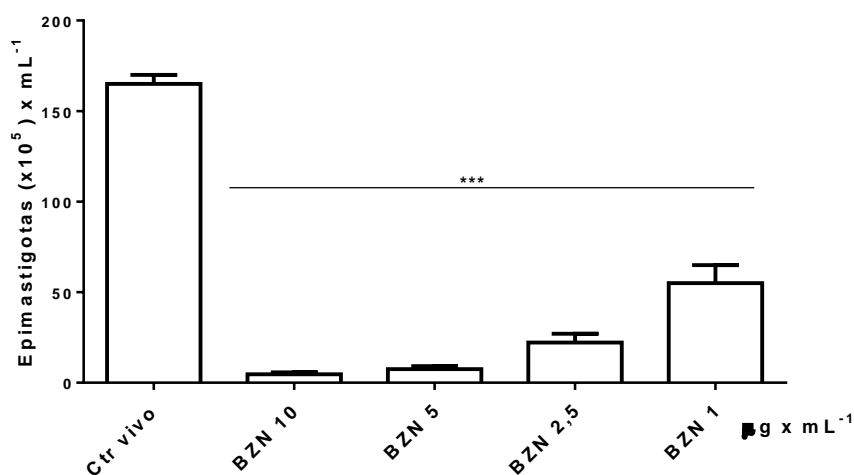


Figura 14. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com benznidazol (**2**) nas concentrações indicadas. Os parasitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 parasitos $\times \text{mL}^{-1}$ e tratados em placas de 48 poços com quatro concentrações do fármaco (**2**), variando de 1 a 10 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. A viabilidade celular foi obtida pelo método de exclusão utilizando azul de Tripán. Nas quatro concentrações do ensaio, não observa-se crescimento celular. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (***) $p < 0,05$.

Agora sim, a análise dos resultados obtidos no teste pelo método de exclusão com azul de Tripán (MULLEN *et al.*, 1975) permitiu o programa realizar a interpolação dos dados para nimesulida (3) e benznidazol (2), gerando a concentração inibitória para ambos os fármacos no tratamento dos epimastigotas. Os resultados para as três substâncias estão resumidos na **Tabela 4**. Diante da perda de atividade observada para (4), não foi dado prosseguimento no estudo com a molécula.

Tabela 4. Valores de CI_{50} das substâncias testadas contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), através do método de exclusão com azul de Tripán.

Substância	CI_{50} <i>T. cruzi</i> (μM)	CI_{50} <i>T. cruzi</i> (μg x mL⁻¹)
Nimesulida (3)	(12,90±0,48)	(3,97±0,15)
Benznidazol (2)	(3,82±0,65)	(0,99±0,17)
Nimesulida reduzida (4)	(171,74±13,72)	(47,74±3,81)

Decidiu-se numa etapa posterior, avaliar a atividade tripanocida empregando o método colorimétrico pelo MTT, por ser menor o tempo de análise. Para este intuito, os parasitos, em fase exponencial de crescimento, foram ressuspensos em meio de cultura fresco, e adicionados em microplacas de 96 poços, utilizando-se um inóculo de 2×10^5 parasitos x mL⁻¹, na presença ou não de diferentes concentrações da NIM (3). Foram utilizadas concentrações na faixa de 1,56 μ M a 100 μ M, em diluição seriada, com fator de diluição igual a dois. Após incubação, a viabilidade frente aa nimesulida (3) foi avaliada através do ensaio do MTT (MUELAS-SERRANO *et al.*, adaptado, 2000). O efeito tripanocida foi mensurado pelo percentual de inibição de crescimento dos parasitos, em relação ao controle em 50% (CI_{50}) (**Figura 15**). Como referência no teste utilizou-se o fármaco benznidazol (2) (**Figura 16**).

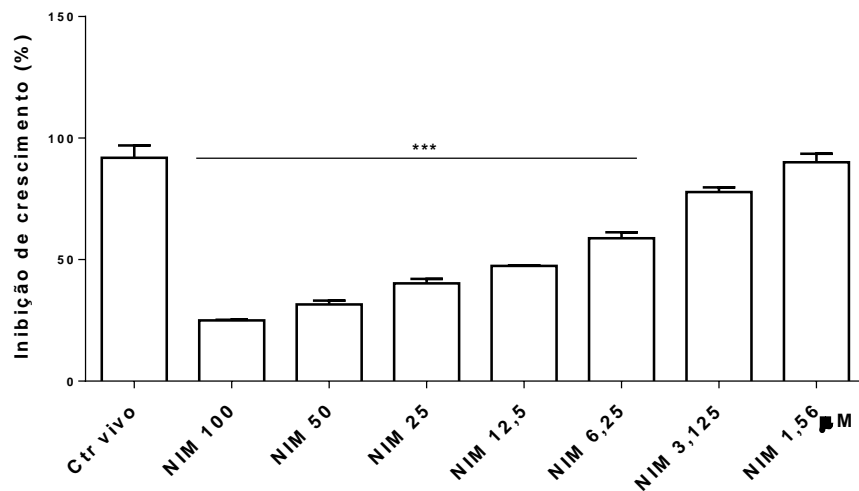


Figura 15. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com nimesulida (**3**) nas concentrações indicadas. Os parasitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 células \times mL⁻¹. As células foram tratadas por 48 horas em placas de 96 poços com sete concentrações do fármaco (**3**), variando de 1,56 a 100 μ M. A viabilidade celular foi obtida pelo método do MTT. Observa-se capacidade inibitória da nimesulida (**3**) na maioria das concentrações da faixa escolhida. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

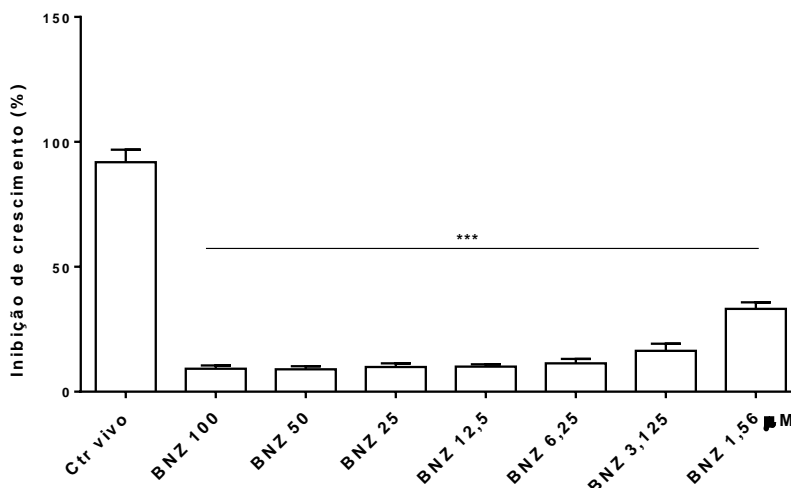


Figura 16. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com benznidazol (**2**) nas concentrações indicadas. Os parasitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 células \times mL⁻¹. As células foram tratadas por 48 horas em placas de 96 poços com sete concentrações do fármaco (**2**), variando de 1,56 a 100 μ M. A viabilidade celular foi obtida pelo método do MTT. Observa-se capacidade inibitória do benznidazol (**2**) em todas as concentrações da faixa escolhida. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

Novamente, a análise dos resultados obtidos com o teste colorimétrico do MTT (**Figuras 15 e 16**) permitiu determinar a concentração inibitória para ambos os fármacos no tratamento dos epimastigotas (**Tabela 5**).

Tabela 5. Valores de CI₅₀ das substâncias testadas contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), através do método colorimétrico do MTT.

Substância	CI ₅₀ <i>T. cruzi</i> (μ M)	CI ₅₀ <i>T. cruzi</i> (μ g \times mL ⁻¹)
Nimesulida (3)	(12,93 \pm 0,04)	(3,98 \pm 0,01)
Benznidazol (2)	(1,40 \pm 0,13)	(0,36 \pm 0,03)

Os dados obtidos foram sugestivos quanto à validação de ambos os métodos utilizados, uma vez que os resultados encontrados tanto por quantificação em câmara de Neubauer quanto por colorimetria ficaram dentro da mesma ordem de grandeza. Assim, a nimesulida (**3**) apresentou-se como capaz de inibir de forma satisfatória o crescimento dos parasitos em cultura, quando comparado ao fármaco de referência benznidazol (**2**).

Avaliação da atividade da nimesulida (3**) sobre formas epimastigotas, após tratamento overnight.**

A atividade da nimesulida (**3**) frente às formas epimastigotas, quando comparada ao efeito do benznidazol (**2**), gerou uma dúvida quanto ao início de sua atividade. Para a obtenção desta resposta, a cultura de parasitos na fase exponencial de crescimento foi

adicionada em placa de 48 poços, utilizando inóculo de 2×10^5 parasitos $\times \text{mL}^{-1}$, na presença ou não de NIM (**3**) e BNZ (**2**), ambos na concentração de $10 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. O crescimento e as alterações morfológicas da cultura foram acompanhados por microscopia óptica e a quantificação realizada em câmara de Neubauer, após 24 horas de incubação (MULLEN *et al.*, 1975). O resultado na **Figura 17** revela que a nimesulida (**3**), tal como o benznidazol (**2**), inicia seu efeito tóxico sobre o *T. cruzi* nas primeiras 24 horas de tratamento.

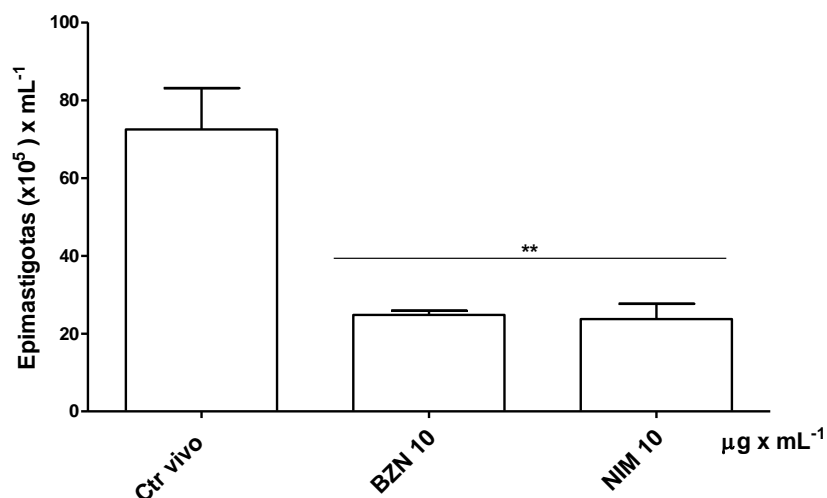


Figura 17. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com nimesulida (**3**) e benznidazol (**2**) nas concentrações indicadas. Os parasitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 parasitos $\times \text{mL}^{-1}$ e tratados por 24 horas em placas de 48 poços com as substâncias na concentração de $10 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. A viabilidade celular foi obtida pelo método de exclusão utilizando azul de Tripán. Observa-se atividade de ambas as moléculas (**3**) e (**2**) na concentração do ensaio. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

Avaliação do potencial citotóxico da nimesulida (3**) em macrófagos murinos.**

Para a avaliação da atividade citotóxica em células primárias foram utilizados macrófagos peritoneais que foram cultivados na presença ou não de nimesulida (**3**), nas concentrações de 10, 5, 2,5 e $1 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. Para efeitos de controle e parâmetro comparativo, os mesmos testes foram realizados com benznidazol (**2**). Os macrófagos foram coletados do exsudado peritoneal de camundongo BALB/c e tratados por 48 horas com as diferentes concentrações de NIM (**3**) e BNZ (**2**).

A quantificação de células viáveis foi realizada por reação com XTT (RISS *et al.*, 2013). Os resultados para ambos os fármacos (**3**) e (**2**) estão apresentados nas **Figuras 18 e 19**, respectivamente.

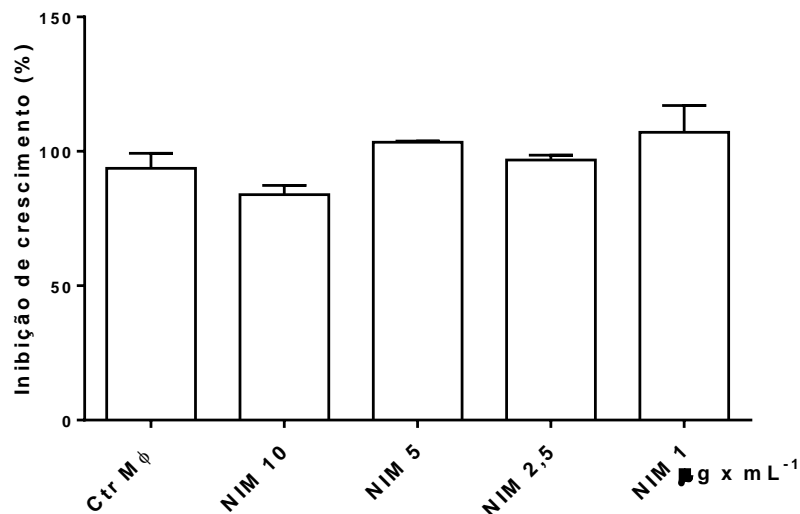


Figura 18. Avaliação da viabilidade celular em macrófagos peritoneais murinos tratados com nimesulida (**3**) nas concentrações indicadas. Os macrófagos foram cultivados em triplicata em placa de 24 poços na concentração de 2×10^5 células x mL⁻¹. As células foram tratadas por 48 horas com quatro concentrações do fármaco (**3**), variando de 1 a 10 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. A viabilidade celular foi obtida pelo método do XTT. Não se observa diferença significativa em relação ao controle vivo. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

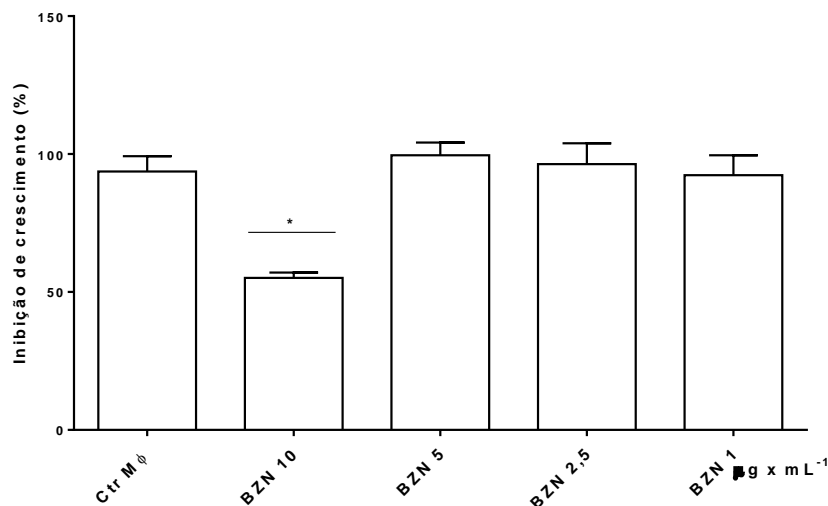


Figura 19. Avaliação da viabilidade celular em macrófagos peritoneais murinos tratados com benznidazol (**2**) nas concentrações indicadas. Os macrófagos foram cultivados em triplicata em placa de 24 poços na concentração de 2×10^5 células $\times \text{mL}^{-1}$. As células foram tratadas por 48 horas com quatro concentrações do fármaco (**2**), variando de 1 a $10 \mu\text{g x mL}^{-1}$. A viabilidade celular foi obtida pelo método do XTT. Observa citotoxicidade significativa em relação ao controle vivo na concentração de $10 \mu\text{g x mL}^{-1}$. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (***) $p < 0,05$.

O resultado obtido para citotoxicidade da nimesulida (**3**) frente a células de macrófagos foi melhor que do benznidazol (**2**), uma vez que o fármaco utilizado no tratamento do mal de Chagas (**2**) evidenciou que, numa concentração de $10 \mu\text{g x mL}^{-1}$, foi mais citotóxico que nimesulida (**3**), conforme visualizado na **Figura 19**.

Avaliação do potencial citotóxico da nimesulida (3**) em culturas de linfócitos esplênicos.**

Foi realizado outro ensaio de viabilidade em uma população de células primárias. Dessa vez, utilizamos culturas enriquecidas de linfócitos esplênicos. Os linfócitos são células mais sensíveis a agentes tóxicos. Dessa forma, a integridade destas células frente a nimesulida (**3**) pode indicar boa tolerância de células de mamíferos, quando expostas à substância (SPIELBERG, 1984). Para este ensaio, uma população enriquecida de células de linfócitos foi obtida do baço de camundongos BALB/c e cultivadas na concentração de 2×10^5 células $\times \text{mL}^{-1}$. As células foram submetidas ao teste com nimesulida (**3**) e benznidazol (**2**), nas mesmas concentrações anteriores descritas. A quantificação de células viáveis foi realizada por reação com XTT (RISS *et al.*, 2013). O resultado está apresentado nas **Figuras 20 e 21**, respectivamente.

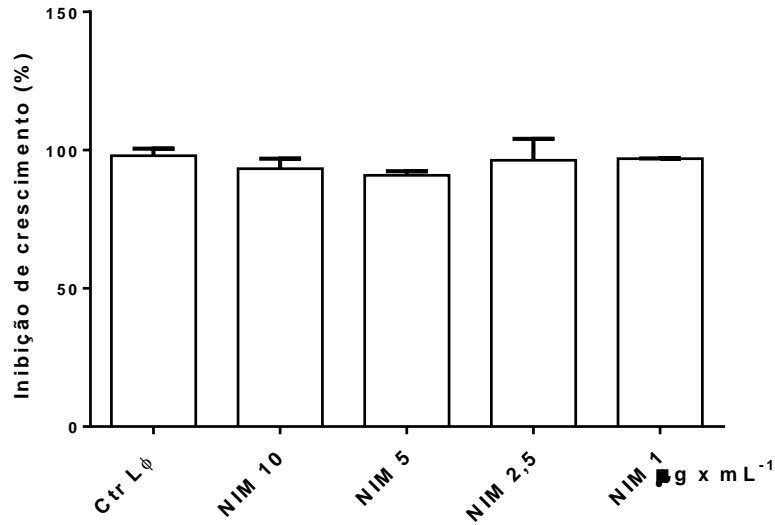


Figura 20. Avaliação da viabilidade celular em população de células enriquecida de linfócitos esplênicos murinos tratados com nimesulida (**3**) nas concentrações indicadas. Os esplenócitos foram cultivados em triplicatas na concentração de 2×10^5 células x mL⁻¹. As células foram tratadas por 48 horas com diferentes concentrações de NIM (**3**) variando de 1 a 10 μg x mL⁻¹. A viabilidade celular foi obtida pelo método do XTT. Não se observa diferença significativa em relação ao controle vivo. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) p<0,0001; (*) e (**) p<0,05.

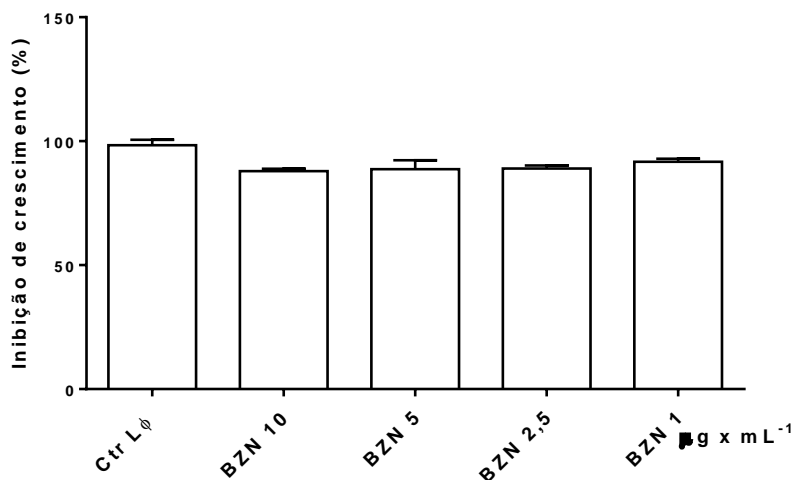


Figura 21. Avaliação da viabilidade celular em população de células enriquecida de linfócitos esplênicos murinos tratados com benznidazol (**2**) nas concentrações indicadas. Os esplenócitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 células \times mL⁻¹. As células foram tratadas por 48 horas em placas de 24 poços com quatro concentrações do fármaco (**2**), variando de 1 a 10 μ g \times mL⁻¹. A viabilidade celular foi obtida pelo método do XTT. Não se observa citotoxicidade significativa em relação ao controle vivo na concentração de 10 μ g \times mL⁻¹. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

O resultado obtido na avaliação da citotoxicidade da nimesulida (**3**) frente a linfócitos murinos mostrou que o composto não causa prejuízo a este tipo celular. Resultado semelhante foi obtido para o benznidazol (**2**), mesmo na maior concentração de 10 μ g \times mL⁻¹, conforme visualizado na **Figura 21**.

Procedeu-se então um novo teste em duas concentrações diferentes para nimesulida (**3**) e benznidazol (**2**), desta vez nas concentrações de 17 e 35 μ M, quantificando pela reação com MTT (MUELAS-SERRANO *et al.*, 2000). Esses valores de concentração foram escolhidos, considerando que o maior valor de concentração testada para a citotoxicidade da nimesulida (**3**), sobre macrófagos e linfócitos, que não apresentou efeito tóxico foi 10 μ g \times mL⁻¹, conforme mostrado nas **Figuras 18 e 20**¹⁵. O resultado obtido corroborou os dados mostrados na **Figura 21**, indicando ausência de toxicidade da nimesulida (**3**) para os macrófagos murinos (**Figura 22**). Quanto ao fármaco de referência (**2**), percebeu-se discreta toxicidade na maior concentração testada.

¹⁵ Transformando as unidades de concentração: 10 μ g \times mL⁻¹ correspondem a 32 μ M para nimesulida (MM 308 g \times mol⁻¹) e 38 μ M para benznidazol (MM 260 g \times mol⁻¹).

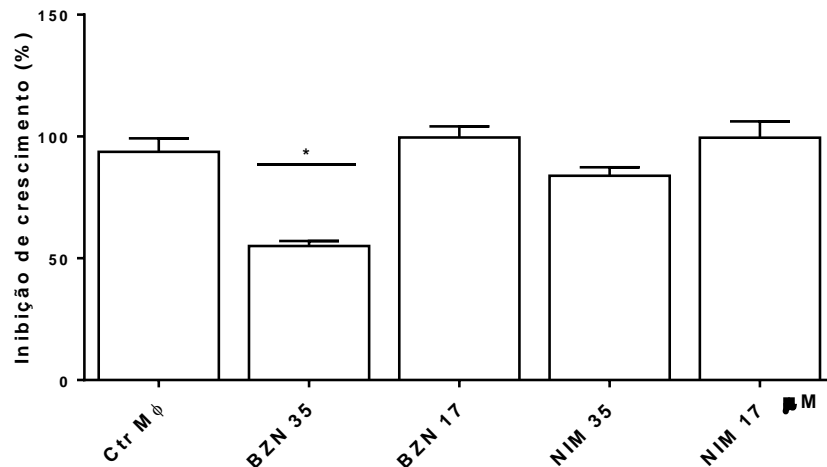


Figura 22. Avaliação da viabilidade celular de macrófagos tratados com nimesulida (**3**) e benznidazol (**2**) nas concentrações indicadas. As células foram cultivadas em triplicata na concentração de 2×10^5 células \times mL⁻¹. As células foram tratadas por 48 horas em placas de 24 poços com duas concentrações das moléculas, 17 e 35 μ M. A viabilidade celular foi obtida pelo método do MTT. Observa-se que nimesulida (**3**) não causou dano tóxico aos macrófagos enquanto que o benznidazol (**2**) é tóxico na maior concentração. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (***) $p < 0,05$.

Efeito da nimesulida (3**) na infecção *in vitro* de células LLCMK2 com *T. cruzi*.**

A constatação da ação tripanocida da nimesulida (**3**) frente às formas epimastigotas com a concomitante manutenção da viabilidade celular das células murinas, foi um estímulo à continuidade do estudo proposto. Assim, foram conduzidos, na sequência, experimentos visando verificar a ação da nimesulida (**3**) em ensaios *in vitro* sobre as demais formas evolutivas do parasito. As formas tripomastigotas foram obtidas da infecção de células de linhagem LLCMK2. Os parasitos foram recolhidos nos dias de pico de liberação (7^o e 9^o dias) e utilizados imediatamente para a infecção dos macrófagos murinos. Para descartar qualquer interferência da possível toxicidade da nimesulida (**3**) na linhagem LLCMK2 que pudesse interferir no resultado da infecção, buscou-se identificar a ação do NIM (**3**) na manutenção da viabilidade destas células. Resultou que, também neste caso, o NIM (**3**) não interferiu na preservação destas formas celulares, com nenhuma significância estatística, conforme evidenciado na **Figura 23**.

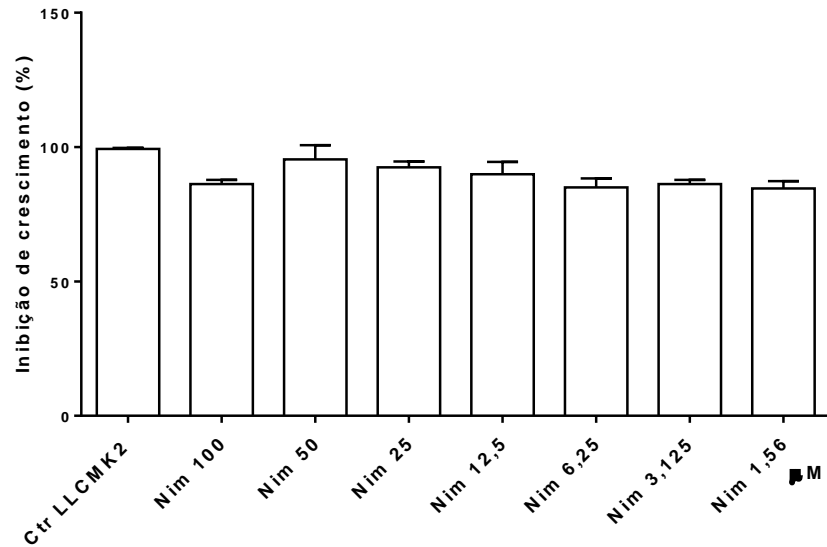


Figura 23. Avaliação da viabilidade de células de linhagem LLCMK2 tratadas com nimesulida (**3**) nas concentrações indicadas. As células foram cultivadas em triplicata na concentração de 2×10^5 células \times mL⁻¹ e tratadas por 48 horas em placas de 24 poços com sete concentrações do fármaco (**3**), variando de 1,56 a 100 µM. A viabilidade celular foi obtida pelo método do MTT. Não se observou ação citotóxica do NIM (**3**) em nenhuma das concentrações. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

Dessa forma, o índice de seletividade calculado (CI_{50} na célula/ CI_{50} no *T. cruzi*) resultou em valor maior que 7,8 para a nimesulida (**3**) e maior que 9,2 para o benznidazol (**2**), valores considerados como bons índices.

Efeito da nimesulida (**3**) *in vitro* na proliferação de amastigotas, em macrófagos peritoneais murinos infectados pelo *T. cruzi*.

A etapa seguinte consistiu na realização do ensaio para a avaliação da proliferação de amastigotas intracelulares na presença de nimesulida (**3**). O experimento foi conduzido semeando-se 2×10^5 macrófagos em lamínulas dentro de placa de 24 poços, por 72 horas, na presença ou não de nimesulida (**3**) e do fármaco de referência (**2**), na concentração de 35 µM, valor no qual a nimesulida não é tóxico aos macrófagos. Após este tempo de incubação, as lamínulas foram fixadas, coradas e procedeu-se a quantificação das formas amastigotas intracelulares em microscópio óptico em aumento de 100x (**Figura 24**).

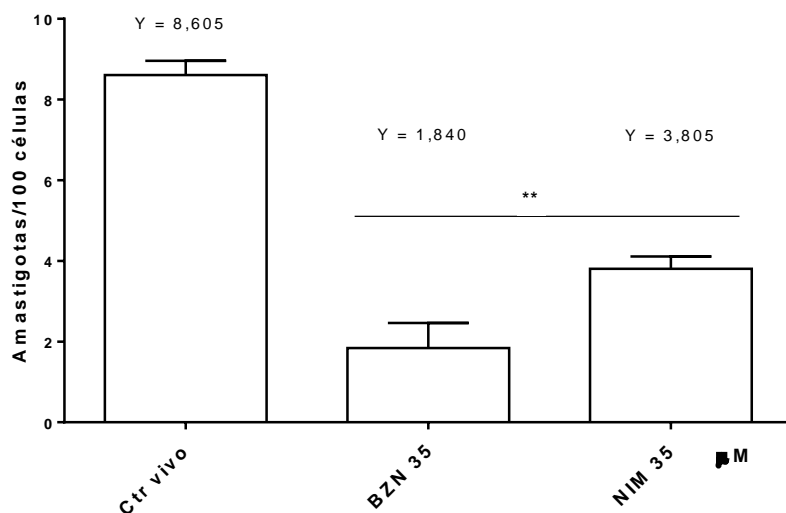


Figura 24. Inibição da proliferação de formas amastigotas de *T. cruzi* *in vitro* de macrófagos peritoneais murinos infectados. Foram semeados em lamínulas, em placas de 24 poços, 2×10^5 macrófagos, e infectados com tripomastigotas, com multiplicidade de infecção 3:1. As culturas foram tratadas com nimesulida (3) na concentração de 35 μ M e incubadas em atmosfera com 5% de CO_2 a 37 °C. O mesmo procedimento foi realizado com o fármaco de referência benznidazol (2). Após 72 horas de tratamento, as lamínulas foram processadas e quantificadas em microscópio óptico em aumento de 100x. Observa-se a inibição de 55,78% da proliferação das formas amastigotas em culturas tratadas com NIM (3) e 78,62% quando tratadas pelo BZN (2). Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

Neste experimento, a nimesulida (3) apresentou atividade anti-amastigota inibindo a proliferação desta forma parasitária em cerca de 56%, valor com significância estatística quando comparado ao efeito do benznidazol (2), nas mesmas condições, que inibiu em 78% a multiplicação das amastigotas.

Efeito da nimesulida (3) *in vitro* na liberação de tripomastigotas, em macrófagos peritoneais murinos infectados pelo *T. cruzi*.

De posse do resultado da avaliação da toxicidade do NIM (3) contra macrófagos murinos, prosseguiu-se então a infecção dos macrófagos com as formas tripomastigotas metacíclicas, oriundas da liberação das células LLMCK2 infectadas. A multiplicidade de infecção foi ajustada para 3 formas tripomastigotas para cada macrófago (PAIVA, *et al.*, 2012). Os macrófagos infectados foram tratados e não tratados com nimesulida (3) e benznidazol (2), ambos na concentração de 35 μ M, a mesma empregada no teste contra as amastigotas. As formas tripomastigotas liberadas nos dias sete e nove pós-infecção, foram quantificadas em câmara de Neubauer (MULLEN *et al.*, 1975) (Figura 24).

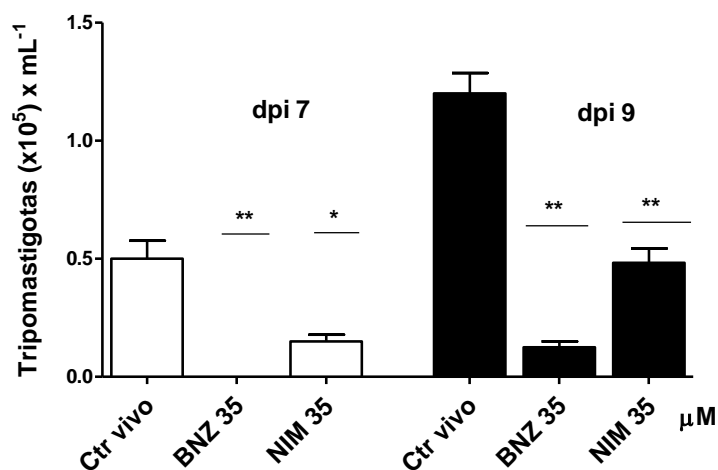


Figura 25. Inibição da liberação de formas tripomastigotas de *T. cruzi* *in vitro* de macrófagos peritoneais de murinos infectados. Foram plaqueados 1×10^5 macrófagos e infectados com tripomastigotas, com multiplicidade de infecção 3:1. As culturas foram tratadas com nimesulida (**3**) na concentração de $35 \mu\text{M}$ e incubadas em atmosfera com 5% de CO_2 a 37°C . O mesmo procedimento foi realizado com o fármaco de referência benznidazol (**2**). As formas tripomastigotas extracelulares no sobrenadante foram quantificadas nos dias sete e nove pós-infecção pelo método de exclusão utilizando azul de Tripán. Observou-se a inibição da liberação em ambos os dias, por ambos os fármacos (**3**) e (**2**). Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

Os resultados apresentados mostraram que a nimesulida (**3**) inibiu de forma significativa a liberação de formas tripomastigotas, em ambos os dias de pico de liberação dos parasitos. Isto sinalizou sua atividade antiparasitária sobre a forma evolutiva testada.

Avaliação da morte celular de epimastigotas tratados com nimesulida (3**) *in vitro*.**

O conjunto de resultados gerou a pergunta sobre qual tipo de morte celular do *T. cruzi* estava sendo provocada pela nimesulida (**3**). Tendo em vista a observação do efeito *in vitro* de apoptose e/ou necrose decorrente do tratamento com o fármaco (**3**), foi realizado um ensaio de citometria de fluxo, onde 1×10^6 epimastigotas, em fase exponencial de crescimento, foram dispostos, tratados e não-tratados, com nimesulida $35 \mu\text{M}$, e incubados por 24 horas. O BNZ (**2**) foi utilizado como referência. Após o tratamento, os parasitos foram centrifugados e ressuspendidos em $1000 \mu\text{L}$ de tampão. Novamente centrifugados e corados com Anexina V-FITC (AV) e Iodeto de Propídeo (IP), e analisados em citômetro de fluxo (FACSCALIBUR Becton & Dicknson) (**Figura 26**).

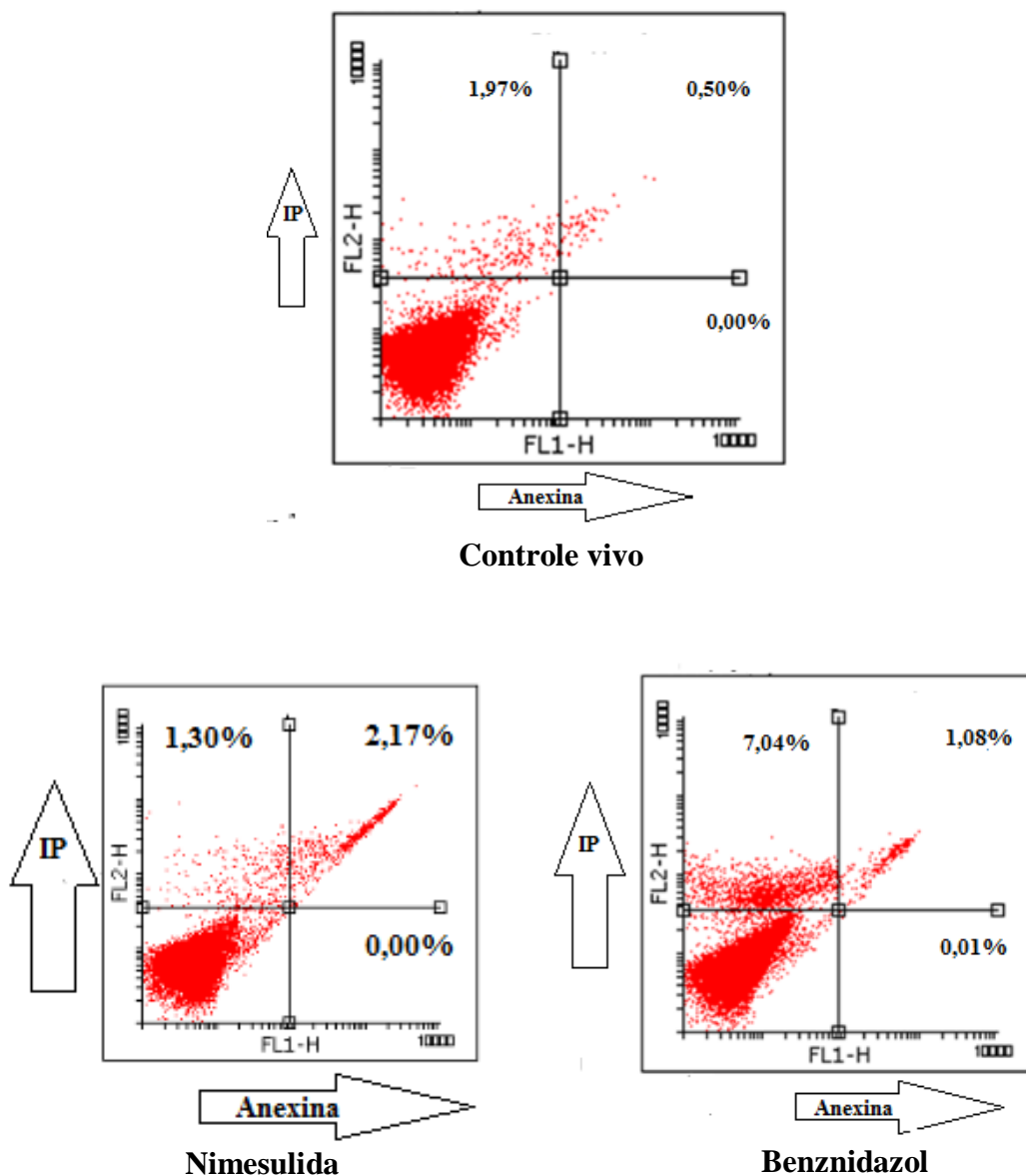


Figura 26. Elucidação do tipo de morte celular de epimastigotas, na fase exponencial de crescimento, tratados com nimesulida (**3**) na concentração de 35 μ M, por 24 horas. Histogramas representativos dos parasitos tratados e marcados para necrose com iodeto de propídio, no canal FL2-H, e marcados para apoptose com anexina, no canal FL1-H. O mesmo procedimento foi realizado para o fármaco de referência (**2**). Observa-se na região superior direita que a nimesulida (**3**) causou o dobro de morte por apoptose e necrose, simultaneamente, em relação ao benznidazol (**2**). Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

No conjunto dos resultados, observou-se que, após 24 horas de tratamento, enquanto o fármaco de referência (**2**) provocou a morte por necrose em 7,04% da população de células, o fenômeno ocorreu apenas discretamente no tratamento com NIM (**3**) (1,30%)

(região superior esquerda dos histogramas). Equiparativamente, ambos os fármacos não causaram efeito apoptótico durante o período de 24 horas de incubação (região inferior direita dos histogramas). Porém, na região de dupla marcação (superior direita), onde há morte celular por ambas as vias, necrótica e apoptótica, dois aspectos podem ser destacados. Primeiramente, o efeito causado pela nimesulida (**3**) apresentou mesma significância estatística que o benznidazol (**2**), no tocante à morte celular (**Figura 27**). Além disso, observou-se que a nimesulida (**3**) apresentou efeito apoptótico/necrótico sobre 2,17% da população de células, enquanto o BNZ (**2**) provocou este tipo de morte celular em 1,08% da população total, valor que representa a metade do verificado para a nimesulida (**3**). Ou, analisando em função de viabilidade celular, há mais parasitos viáveis após o tratamento com o benznidazol (88,5%) do que com a nimesulida (**3**) (82,05%) (**Figura 27**).

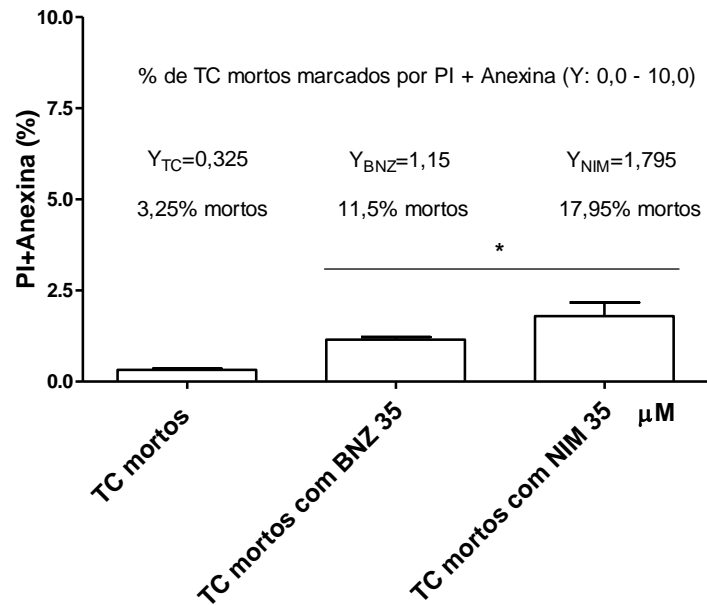


Figura 27. Representação gráfica da porcentagem da marcação por PI/Anexina de parasitos tratados e não-tratados com nimesulida (3) e benznidazol (2), após 24 horas. No controle morto, cerca de 97% dos parasitos estão viáveis. O tratamento por 24 horas com benznidazol (2) resultou em 88% de parasitos viáveis remanescentes, enquanto que no tratamento com a nimesulida (3) observa-se que menos parasitos estão viáveis (82%). Dessa forma, a ação do NIM (3) foi mais eficaz para causar morte celular por apoptose/necrose, simultaneamente. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

Avaliação de alterações ultraestruturais em epimastigotas tratadas com nimesulida (3) *in vitro*, por microscopia eletrônica de transmissão.

Em virtude destas comprovações, o próximo estudo consistiu na avaliação dos efeitos ultraestruturais dos epimastigotas tratados com nimesulida (3). Para isto, formas epimastigotas (2×10^5 parasitos \times mL^{-1}) em fase exponencial de crescimento foram tratadas e não-tratadas por 24 horas com NIM (3) e BZN (2), ambos na concentração de $35 \mu\text{M}$, mesmo valor utilizado nos ensaios anteriores de atividade, por não ser citotóxico aos macrófagos. Após o tratamento, foram processadas para análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET). As análises foram feitas sob a supervisão da Dr^a Suzana Côrte-Real, na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, localizada no *campus* da Fiocruz, RJ. As micrografias obtidas aparecem na **Figura 28 A-D**.

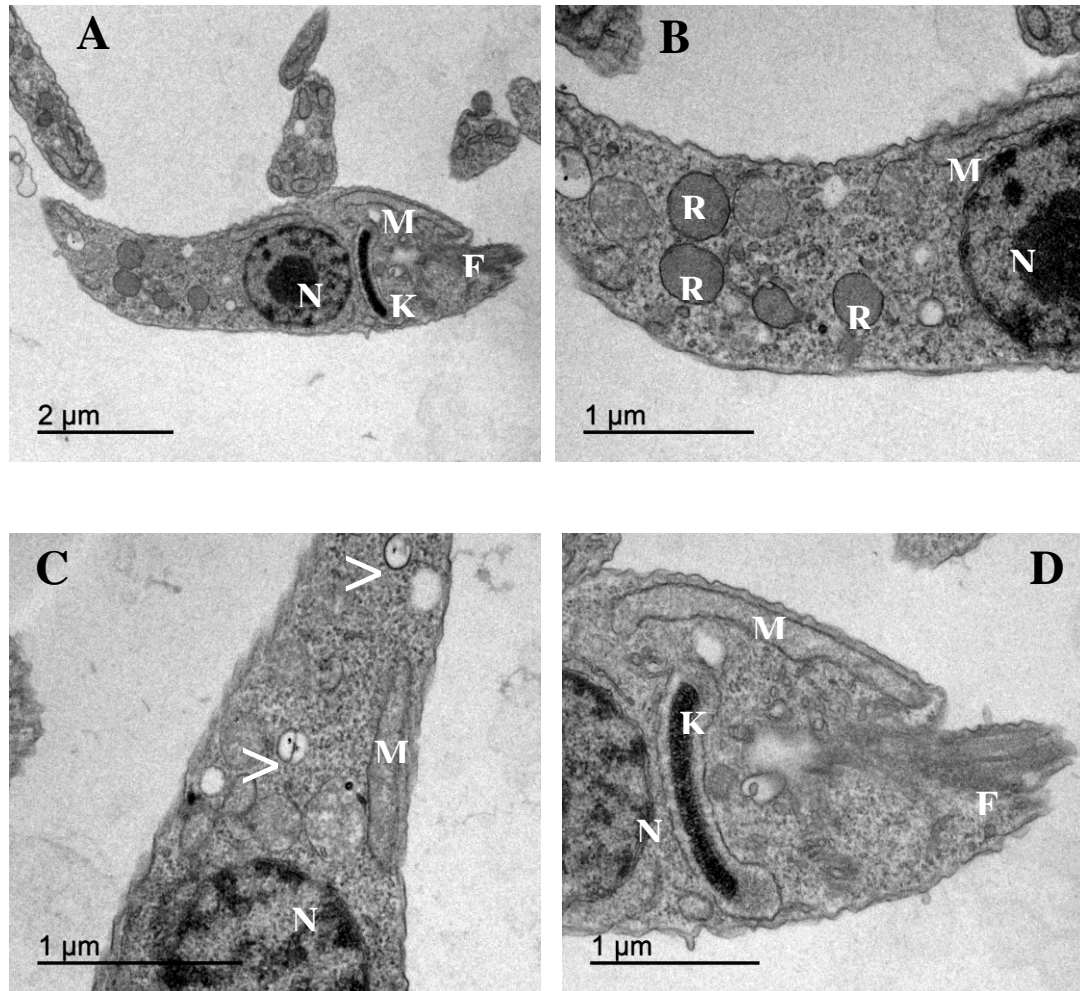


Figura 28. (A-D). Imagens em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de cultura axênica de *T. cruzi*. (A) Micrografia eletrônica mostrando visão geral da forma epimastigota de *T. cruzi*, cultivada na ausência de nimesulida (3) com as organelas características deste parasito. N: núcleo. M: mitocôndria. K: k DNA intramitocondrial. F: flagelo. R: reservossomos. (B). Nesta imagem, observam-se os reservossomos, núcleo e mitocôndria preservados. (C). Micrografia evidenciando os ácidos calcíssomos distribuídos no citoplasma, indicados pelas pontas das setas. (D). Perfil mitocondrial bem preservado, próximo à membrana plasmática. Destaca-se ainda o cinetoplasto mostrando o kDNA preservado na porção mitocondrial entre o núcleo e o flagelo.

A organização estrutural do *T. cruzi* tem sido bastante estudada pela técnica de MET. Na **Figura 29**, podemos observar uma representação esquemática das principais organelas encontradas na forma íntegra de epimastigota do parasito.

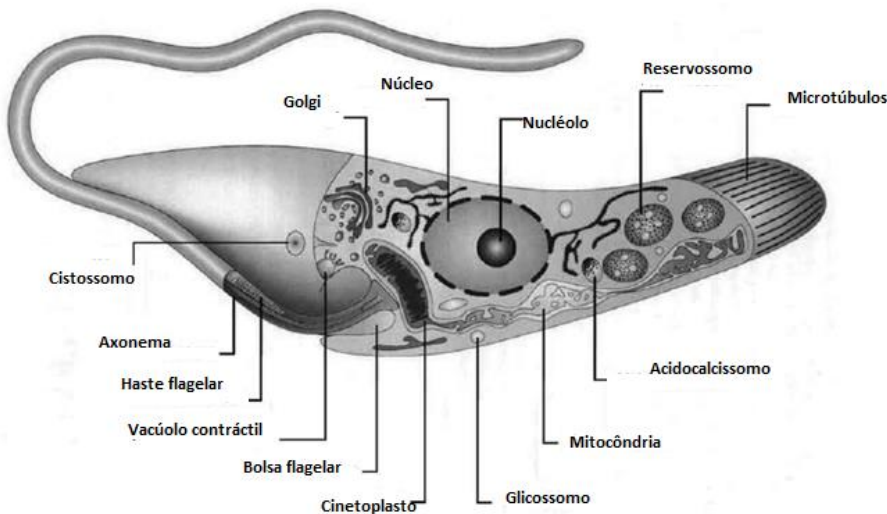


Figura 29. Representação esquemática das principais organelas da forma epimastigota de *T. cruzi* observadas por MET. (Adaptado de DE SOUZA, 2008).

Como é possível observar, os epimastigotas têm núcleo esférico com uma membrana típica com poros, e um nucléolo na porção central. O flagelo se projeta a partir da metade do corpo do protozoário. Já o cinetoplasto possui um formato de disco (FERREIRA *et al.*, 2008), sendo a região específica da mitocôndria na qual está concentrado o DNA mitocondrial. O formato do cinetoplasto e a sua posição em relação ao núcleo são característicos nas diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*, sendo que na forma epimastigota encontra-se entre a bolsa flagelar e o núcleo, na região anterior do parasito. Todas essas características puderam ser observadas nas micrografias obtidas dos parasitos cultivados na ausência da nimesulida (3), conforme mostradas na **Figura 28 A-D**.

Após 24 horas de tratamento com nimesulida (3), algumas alterações importantes foram observadas nas fotomicrografias resultantes, de acordo com a visão geral dos parasitos tratados, conforme mostrado na **Figura 30**.

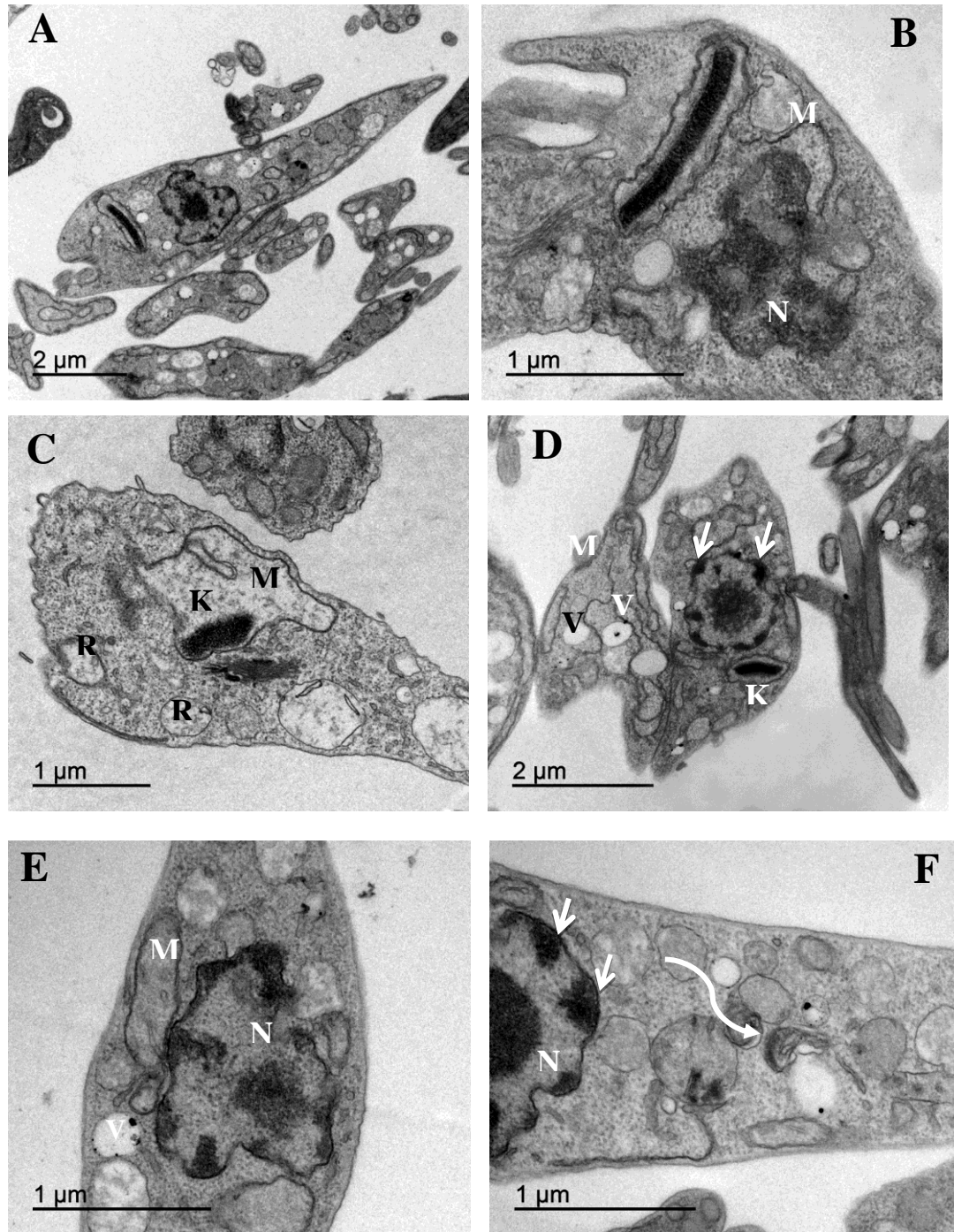


Figura 30. (A). Vista geral dos parasitos tratados com nimesulida (3) na concentração de 35 µM, analisados por Microscopia Eletrônica de Transmissão. (B). O tratamento induziu edema mitocondrial, com perda de morfologia da organela, além de profunda alteração da morfologia nuclear. (C). Mitocôndria bem dilatada e com perda de cristas, cinetoplasto elétron-denso e desorganização dos reservossomos. (D). Núcleo com a heterocromatina condensada localizada em trechos do envoltório nuclear, indicada pelas setas retas, cinetoplasto elétron-denso e intensa vacuolização citossólica, sinalizada com a letra V, além de mitocôndria com morfologia alterada. (E). Núcleo apresentando desestruturação do envoltório nuclear, mitocôndria dilatada e presença de vacúolos. (F). Núcleo desorganizado com heterocromatina aderida à superfície, indicada pelas setas retas e figura de mielina presente no citossol, representada pela seta curva.

Conforme mostrado na **Figura 30A**, há evidência nítida de alteração na ultraestrutura do parasito. Ainda: a perda de morfologia nuclear fica destacada na **Figura 30B**. A mitocôndria aparece com mudanças na sua estrutura, bastante dilatada e sem cristas aparentes, contendo o kDNA elétron-denso, bem compactado, com condensação exacerbada, indicativo de possível alteração da arquitetura do material genético (**Figura 30C-D**). O composto produziu ainda certa desorganização dos reservossomos, vacuolização citossólica, heterocromatina condensada em alguns trechos do envoltório nuclear e presença de mielina no citossol, conforme observado na **Figura 30 D-F**. Dessa forma, a análise das micrografias indicou que a nimesulida (**3**) provocou alterações ultraestruturais importantes sobre as formas epimastigotas do parasito, o que indicou clara atividade nas primeiras 24 horas de tratamento.

Avaliação das alterações ultraestruturais em epimastigotas causadas por diferentes concentrações do diluente DMSO.

Com o propósito de padronizar as doses seguras de DMSO que não causariam possíveis alterações ultraestruturais em nossas culturas de *T. cruzi*, um experimento foi conduzido tratando formas epimastigotas com três diferentes concentrações do diluente DMSO. Já havia sido identificado anteriormente neste estudo que a faixa segura de trabalho era em concentrações até 0,38% de DMSO. As formas epimastigotas (2×10^5 parasitos \times mL^{-1}) foram tratadas e não-tratadas por 24 horas com DMSO, nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1%. Após o tratamento, foram processadas para análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET). As micrografias obtidas para os parasitos tratados aparecem na **Figura 31A-F**, e as do controle não-tratado com DMSO são as mesmas apresentadas na **Figura 28**.

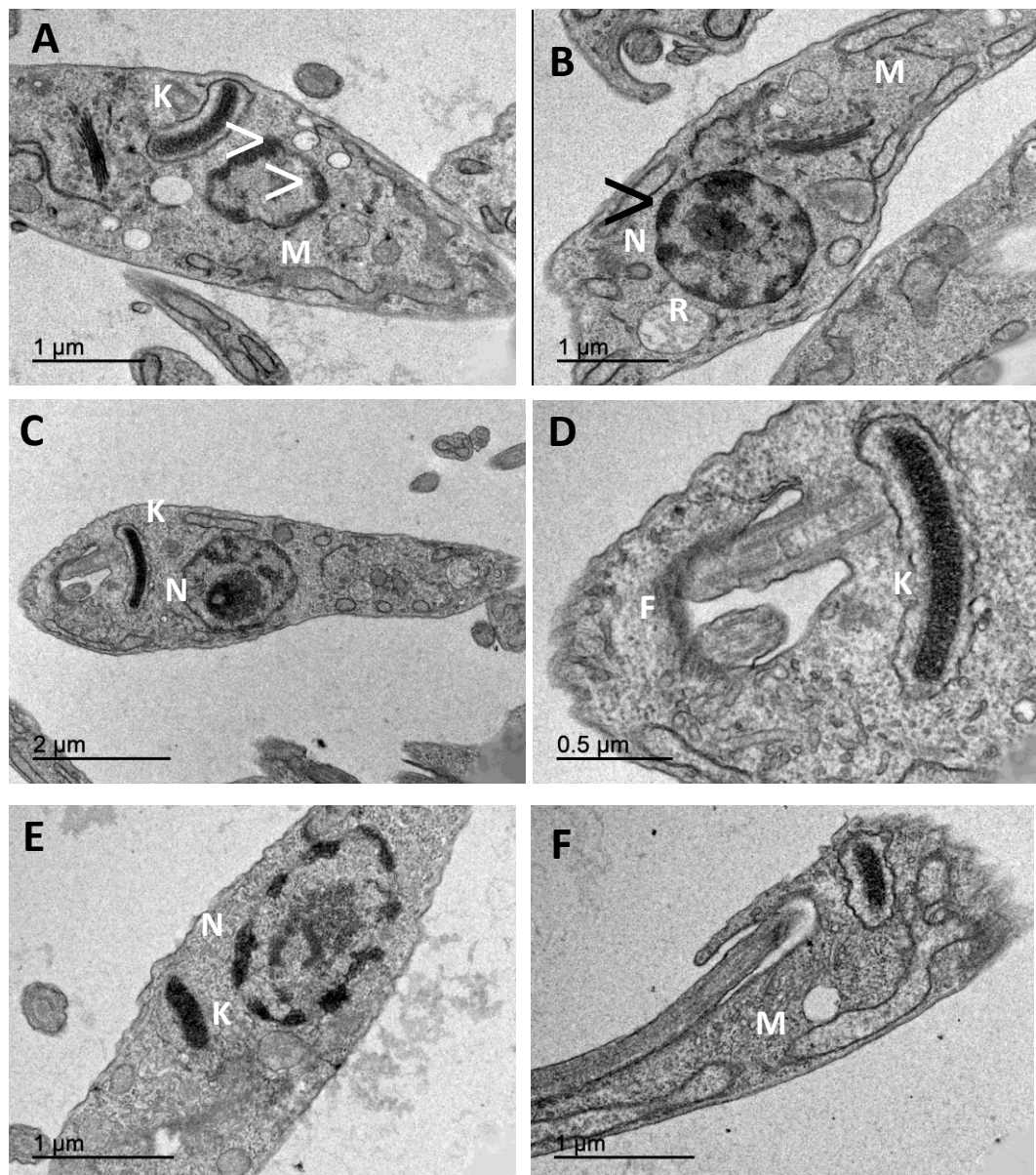


Figura 31. (A-F). Micrografias de epimastigotas tratadas com três concentrações de DMSO. (A-B). Tratamento com DMSO 0,1%. (A). Observam-se as organelas características desta forma evolutiva. Perfil mitocondrial preservado próximo à membrana plasmática. Ácidos calcíssomos distribuídos no citoplasma (setas brancas). Cinetoplasto com kDNA preservado na porção mitocondrial entre núcleo e flagelo. (B). Perfil nuclear característico, com núcleo e cromatina preservados (seta preta). Mitocôndria e reservossomos íntegros. (C-D). Tratamento com DMSO 0,5%. (C). Cinetoplasto apresentando kDNA com ultraestrutura característica, posicionado entre núcleo e flagelo. Núcleo com nucléolo e cromatina íntegros. (D). Flagelo na bolsa flagelar. Cinetoplasto preservado. (E-F). Tratamento com DMSO 1%. Notam-se discretas alterações ultraestruturais na morfologia do parasito. Núcleo com heterocromatina condensada, com certa desestruturação do envoltório nuclear. Cinetoplasto elétron-denso. Mitocôndria exibindo dilatação.

A observação das micrografias evidenciou que, em concentrações inferiores a 0,5% de DMSO, é possível manter a estrutura celular do parasito de forma íntegra. Tal constatação está de acordo com estudos de atividade antiparasitária que empregam 0,5% de concentração de dimetilsulfóxido, sem comprometimento da viabilidade celular (KAISER *et al.*, 2015). Porém, na concentração de 1% do diluente, surgem algumas alterações nucleares e discreto edema mitocondrial. Este resultado corrobora os dados obtidos pelo tratamento de epimastigotas com DMSO, utilizando o método do MTT, conforme mostrado na **Figura 9**, anteriormente. Como consequência, utilizou-se a concentração final de DMSO em contato com os parasitos na faixa de 0,1 a 0,3%, em todos os ensaios realizados nesta tese. Demonstramos, assim, que concentrações superiores a 1% do diluente empregado podem promover modificações ultraestruturais nos parasitos, prejudicando sua viabilidade. Por isso, os experimentos foram realizados numa faixa segura do diluente não tóxica às células, em concentrações cerca de dez vezes menor, garantindo-se dessa forma o excludente da interferência do DMSO utilizado nos ensaios. As observações realizadas neste estudo, onde claras alterações ultraestruturais ocorreram em epimastigotas de *T. cruzi* em contato com meios contendo concentrações finais de DMSO iguais a 1%, são de grande importância para pesquisas no desenvolvimento de novas moléculas com potencial anti-chagásico, visto que encontramos na literatura diversos trabalhos onde concentrações finais de DMSO iguais ou maiores que 1% são utilizadas nos ensaios frente ao *T. cruzi* (CAPUTTO *et al.*, 2011; NAVARRO *et al.*, 2001), o que talvez esteja interferindo nos resultados de atividade observados para as moléculas avaliadas, colocando em dúvida a confiabilidade dos dados obtidos nesses estudos. Apesar de estudos de viabilidade celular de epimastigotas de *T. cruzi* frente a DMSO e etanol, em diferentes concentrações, estarem presentes na literatura (CEVALLOS *et al.*, 2017), não encontramos precedentes de um estudo como o que realizamos neste trabalho, ou seja, com acompanhamento dos tratamentos do parasito, frente às diferentes concentrações de DMSO, por microscopia eletrônica de transmissão. No entanto não podemos deixar de mencionar que variações de sensibilidade ao DMSO podem estar relacionadas a determinados isolados ou condições de cultivo.

Avaliação das alterações ultraestruturais em epimastigotas causadas por número de passagens indefinidas.

Neste ponto da tese, está incluída uma consideração importante que esteve presente desde o início do trabalho, mas que vem apresentada após a abordagem da MET, para melhor compreensão.

A observação das primeiras culturas de epimastigotas mantidas para o estudo foi feita em microscópio óptico, com aumento de 40x. No entanto, após várias passagens, foi possível verificar que as formas epimastigotas não mantinham algumas características: ora perdiam motilidade, ora apresentavam algumas deformações morfológicas que tornavam, no conjunto, a cultura duvidosa para a condução dos experimentos, sendo então descartadas. Quando isto ocorria, era necessário fazer o descongelamento de nova amostra, dentre as mantidas em nitrogênio líquido no laboratório. Por isso, a pergunta a ser respondida foi se as sucessivas passagens de culturas de epimastigotas causariam algum dano celular ao *T. cruzi*. Procedeu-se então um ensaio de MET para a observação do comportamento de parasitos com indefinidas passagens.

Para o ensaio, 2×10^5 epimastigotas $\times \text{mL}^{-1}$ em fase exponencial de crescimento foram incubados e, após sete dias, os parasitos foram processados para o ensaio de MET, de acordo com os mesmos procedimentos já descritos anteriormente. Na **Figura 32** estão representadas algumas imagens obtidas.

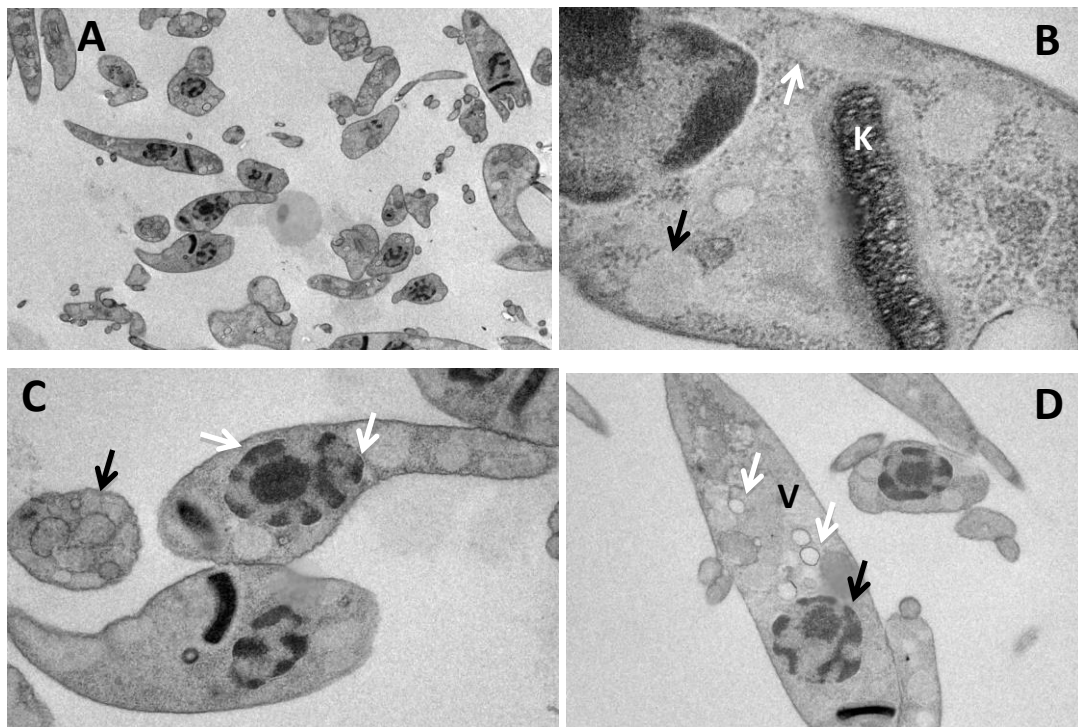


Figura 32. (A-D). Imagens em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de cultura axênica de *T. cruzi* de indefinidas passagens mantida por sete dias, após inóculo. (A) Micrografia eletrônica mostrando visão geral da forma epimastigota de *T. cruzi*, com as organelas características deste parasito. (B). Nesta imagem, observa-se o cinetoplasto elétron-denso e presença de vacúolo citossólico, indicada pela seta preta. A mitocôndria dilatada e com perda de morfologia está sinalizada com a seta branca. (C). Micrografia evidenciando núcleo com a heterocromatina condensada, localizada em trechos do envoltório nuclear, indicada pelas setas brancas. Vacuolização citossólica indicada pela seta preta. (D). Perfil nuclear desorganizado, com desestruturação do envoltório nuclear (seta preta) e forte vacuolização citossólica, sinalizada com a letra V (setas brancas).

Nas micrografias apresentadas na **Figura 32**, observa-se o aspecto pouco preservado dos parasitos, de uma forma geral. Embora a observação dos parasitos em microscopia óptica, em aumento de 40x, tenha sido capaz de evidenciar alguns aspectos, tais como perda de motilidade ou morfologia um tanto comprometida, a MET potencializou a visualização ultraestrutural do conjunto de alterações possíveis de ocorrer ao longo do tempo, com as passagens indefinidas, tais como perda de morfologia nuclear, processo de vacuolização ou comprometimento do cinetoplasto, como visto nas imagens. Talvez estes fenômenos eram os responsáveis pela observação, em microscopia óptica, de um aspecto pouco saudável dos parasitos, o que resultava na avaliação insatisfatória da cultura para sua utilização nos experimentos. Ou seja, os resultados mostraram que os parasitos

provenientes de sucessivas passagens perdiam a integridade de algumas organelas e, talvez por isso, era observado por vezes um aspecto não homogêneo das culturas de epimastigotas, embora com viabilidade parasitária. O ensaio de MET foi determinante para a orientação deste estudo no tocante à padronização do número de passagens (repiques) dos parasitos empregados nos ensaios. Dessa forma, visando contornar este efeito e dispor de parasitos com o fenótipo celular o mais homogêneo possível para os experimentos, normalizou-se utilizar epimastigotas sempre com baixas passagens, de 2 a 10, no máximo, após o descongelamento. Este fato tem relevância no estudo, pois os parasitos, embora viáveis, poderiam estar mais vulneráveis aos compostos utilizados nos ensaios, o que mascararia a interpretação dos resultados. O modo como os epimastigotas foram isolados com baixas passagens está descrito nos Procedimentos Experimentais Biológicos, ao final da tese.

Discussão I

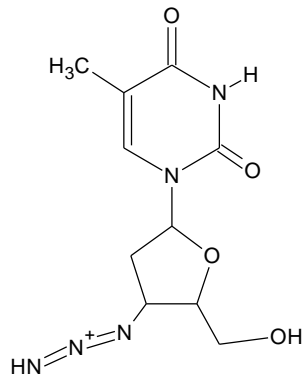
Desenvolvimento de novos fármacos: reposicionamento

O processo da identificação da atividade antiparasitária da nimesulida (3) sobre as três formas evolutivas de *T. cruzi* está alinhada com a tendência de estudos contemporâneos no tocante ao reposicionamento de fármacos. Tecendo considerações adicionais às inseridas na introdução desta tese, por entendermos a relevância do método, apresentaremos na sequência alguns pontos importantes sobre a inserção dos resultados obtidos no contexto do tema em tela. Com efeito, a prática da investigação do potencial de medicamentos presentes no mercado para tratamento de outras doenças gerou uma nova perspectiva na área da Farmacologia (BISGIN, 2012). O conceito de reposicionamento evoluiu a partir dos anos 80, e vem sendo considerado a nova face da inovação farmacêutica (KAITIN, 2010). Desde então, diversos medicamentos foram empregados com sucesso em indicação terapêutica adicional, conforme ilustrado na **Tabela 6**. A **Figura 33** apresenta a variedade estrutural destes fármacos reposicionados.

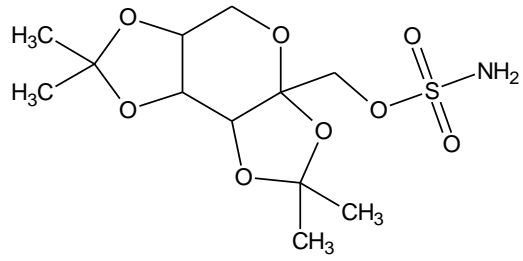
Tabela 6. Alguns fármacos reposicionados de sua indicação terapêutica original.

Fármaco	Indicação terapêutica	Nova indicação
Zidovudina (AZT)	Câncer	HIV/AIDS
Topiramato	Epilepsia	Enxaqueca
Milnaciprano	Depressão	Síndrome de fibromialgia
Minoxidil	Hipertensão	Queda de cabelos
Lidocaína	Anestésico	Arritmia

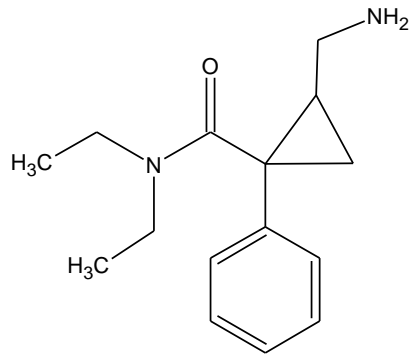
Adaptado de NOVAC, 2013.



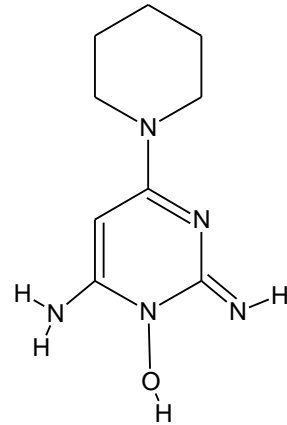
Zidovudina



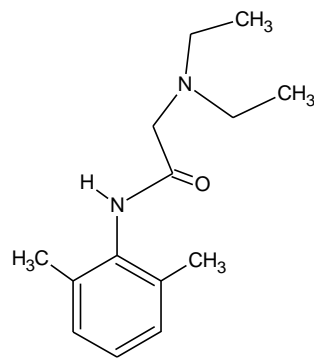
Topiramato



Milnaciprano



Minoxidil



Lidocaína

Figura 33. Variedade de estruturas químicas de alguns fármacos reposicionados.

Ademais, dentre as diferentes abordagens empregadas para o desenvolvimento de fármacos, a estratégia de reposicionamento é a que proporciona menor tempo de desenvolvimento com riscos mais baixos. Em geral, a redução de tempo nas etapas de desenvolvimento de um fármaco pode vir associada ao aumento do risco (ASHBURN e THOR, 2004). O reposicionamento contorna este problema, pois o candidato a ser reposicionado já foi testado em vários estágios e, portanto, apresenta perfil farmacocinético¹⁶ e de segurança bem conhecidos. Uma vez realizados previamente diversos estudos para o medicamento tais como, otimização de estrutura química, triagem de testes *in vitro* e *in vivo*, toxicologia, desenvolvimento de formulação, dosagens, processos de fabricação, etc., a rota clínica a ser construída para a sua nova utilização encontra um caminho melhor pavimentado. Outro aspecto interessante do reposicionamento é a aposta na introdução clínica de fármacos já utilizados, mas agora para finalidades terapêuticas graves, oferecendo medicina segura, por exemplo, para a moléstia do câncer (NOVAC, 2013; CHONG, 2007). Um dos mais sérios problemas dos medicamentos contra o câncer consiste nos efeitos colaterais que produzem, diminuindo a qualidade de vida dos pacientes. A maioria dos medicamentos reposicionados possui efeitos colaterais menores, quando comparados com outros fármacos anticancerígenos. Dessa forma, diversos trabalhos têm celebrado o sucesso de propostas de inovação para o tratamento do câncer, no âmbito da reorientação medicinal de fármacos aprovados. O conhecido triazol antifúngico itraconazol possui ação biológica bem estabelecida (WARNOCK, 1989 *apud* SHIM, 2014), no entanto, foi descrita também sua ação anticancerígena, devido à atividade antiangiogênica apresentada (CHONG, 2007). Igualmente acontece com a digoxina, desenvolvida para disfunções cardíacas (BELARDINELLI, 1979); posteriormente estudos indicaram a sua bioatividade anticâncer (STENKVIST, 1982). Assim, o reposicionamento para utilização no tratamento de câncer pode ser uma boa estratégia terapêutica do ponto de vista do bem estar do paciente (SHIM, 2014). Em outras linhas distintas, podemos citar mais alguns exemplos bem conhecidos. O citrato de sildenafil, desenvolvido pela Pfizer inicialmente para tratamento de hipertensão, não alcançou o efeito desejado. Mais tarde, pesquisadores desta empresa identificaram fortuitamente um efeito colateral interessante do sildenafil, e reposicionaram sua indicação médica para o tratamento de disfunção erétil masculina, nos anos 2000, sendo imediatamente aprovado pelo FDA (JIN e WONG, 2013; ASHBURN e THOR, 2004). Bastante citado também é o caso da talidomida, que surgiu no mercado em 1957 com indicação para tratamento antiemético durante a gravidez. Efeitos colaterais graves surgiram em mais de 12 mil crianças que nasceram com anormalidades nos membros, decorrentes do uso da substância pelas mães, o que resultou na retirada do medicamento do mercado. Estudos posteriores mostraram que o composto era um enantiômero e que apenas um dos isômeros era responsável pelos efeitos teratogênicos; porém, como os dois isômeros se interconvertem, este foi o risco de empregar a substância em mulheres férteis (FABRO *et al.*, 1967). Mais tarde, foi proposto com sucesso o reposicionamento da talidomida para o tratamento de uma complicação dolorosa de lepra e tuberculose (MATTHEWS e McCOY, 2003). Outros estudos foram feitos com a

¹⁶ A farmacocinética estuda como as taxas de circulação da substância comportam-se nos sistemas biológicos e como são afetadas pela ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Eliminação e Toxicidade). *In*: ASHBURN e THOR, 2004.

talidomida para o tratamento da síndrome de Kaposi e do mieloma múltiplo (DI PERSIO *et al.*, 2009). A empresa biofarmacêutica Celgene obteve receita de cerca de US\$ 550 milhões, em 2008, com vendas de talidomida e, ao que parece, há mais estudos em andamento para reposicionar a substância (ARROWSMITH e HARRISON, 2012). Assim, a talidomida e o sildenafil são exemplos bem sucedidos para a indústria farmacêutica, devido às extraordinárias receitas geradas com seu reposicionamento (NOVAC, 2013). Adicionalmente, no tocante ao viés custo-benefício, a metodologia posiciona-se como a melhor escolha para o desenvolvimento de fármacos, conforme indicado na **Figura 34** (ASHBURN e THOR, 2004).

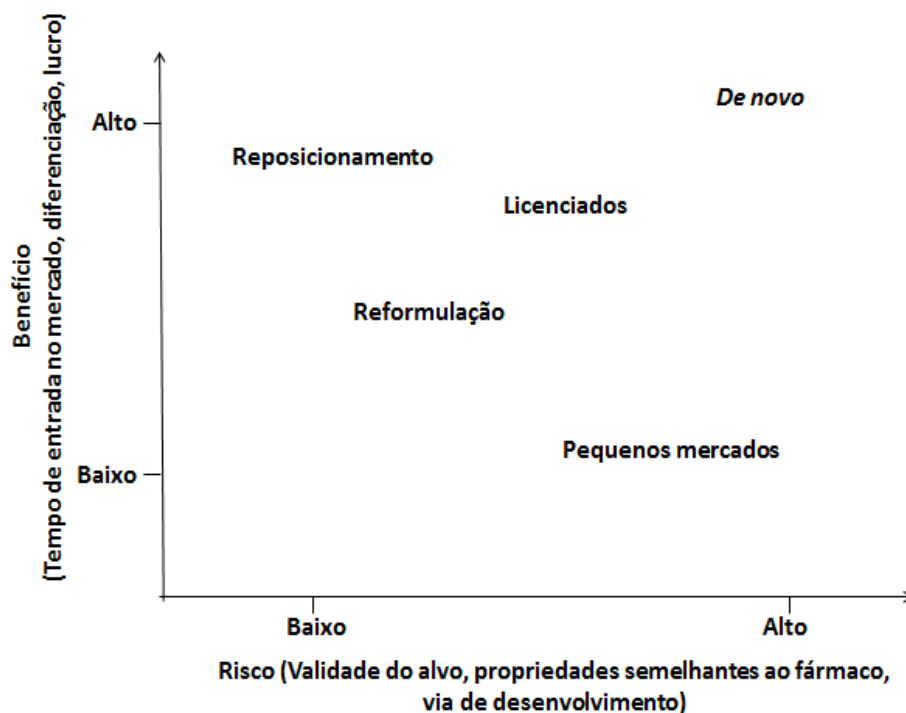


Figura 34. O risco versus benefício entre diferentes estratégias no desenvolvimento de fármacos. O reposicionamento apresenta melhor desempenho, pois o candidato já passou por vários estágios de desenvolvimento, sendo entidade já comercializada. Apresenta-se mais vantajoso ainda, pois oferece retorno de investimento mais rápido que os fármacos reformulados, sob licença, “de novo” ou aqueles de pequenos mercados. A descrição das estratégias está nos anexos. Adaptado de ASHBURN e THOR, 2004.

Em 2012, diversas companhias farmacêuticas, como Pfizer, AstraZeneca, Abbot, Eli Lilly, dentre outras, começaram a integrar um programa global de reposicionamento de fármacos no *NCATS* (do inglês *National Center for Advancing Translational Sciences*), órgão pertencente ao *NIH* (do inglês *National Institutes of Health*), com o objetivo de encontrar novos usos terapêuticos para moléculas conhecidas. À medida que mais empresas farmacêuticas exploram a farmacopeia existente para reposicionar candidatos, cresce o número de casos de sucesso no emprego da estratégia (PADHY e GUPTA, 2011). Com relação às DTNs, existem diversas iniciativas acadêmicas, sem fins lucrativos, visando o tratamento destas doenças através de propostas de reposicionamento. São modelos *open-*

source que permitem o compartilhamento de dados, recursos, moléculas, bibliotecas, bem como plataforma de triagem, na busca de novas indicações para medicamentos antigos, com a cooperação de todas as partes interessadas (ALLARAKHIA, 2013).

No tocante ao reposicionamento de AINEs, a realidade não é diferente. Pesquisadores concentram esforços para identificar novas ações para esta classe de fármacos, e também para elucidar as vias metabólicas associadas ao novo emprego proposto. Estudos evidenciaram que o uso do anti-inflamatório não-esteroidal ibuprofeno está associado a uma redução de 30-60% no risco de desenvolvimento de câncer (PAULO e PETER, 2015). Apesar de os AINEs terem sua ação ligada à inibição da ciclo-oxigenase, enzima envolvida na resposta inflamatória, não parece ser por esta via que o ibuprofeno atua na prevenção do estabelecimento futuro da doença. As linhas de pesquisa têm sustentado a hipótese de que a propriedade quimiopreventiva associada ao ibuprofeno vem de fatores complexos e independentes da via da inibição de COX, por caminhos alternativos de vias reguladoras do ciclo celular e de apoptose (PAULO e PETER, 2015). Torna-se consensual e promissora, portanto, a concepção de utilizar um medicamento anti-inflamatório para prevenir o mal do câncer, do que tratá-lo de maneira mais agressiva ao paciente, quando a enfermidade já está estabelecida.

Um vasto número de compostos desenvolvidos, incluindo AINEs, encontra-se sem utilização, por diferentes motivos. Por isso, é necessário debruçar esforços para explorar o rico substrato disponível empregando a estratégia de reaproveitamento desses compostos. Estimativas apontam para cerca de 2000 substâncias que falharam e que continuam nas prateleiras das indústrias, sendo que este número cresce a uma taxa de 150-200 novos fármacos a cada ano (ARROWSMITH e HARRISON, 2012). Se o conhecimento das doenças avança indefinidamente, cabe conduzir estudos constantemente sobre tais moléculas já construídas.

Neste contexto, entendemos que o presente estudo pode abrir caminhos para uma nova ação terapêutica do AINE nimesulida (**3**). Este foi o motor da tese, no sentido de identificar a sua provável atividade tripanocida, visando o aproveitamento de suas conhecidas propriedades para o tratamento de uma doença negligenciada. Os resultados obtidos para atividade antiparasitária do NIM (**3**) foram bem satisfatórios, quando comparados ao efeito causado pelo benznidazol (**2**). A triagem da ampla faixa de concentração inicialmente testada revelou que o fármaco (**3**) atua na inibição do crescimento das formas epimastigotas de maneira expressiva, em concentrações bem menores que $100 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$, evidenciado na concentração inibitória expressa em torno de $4 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ (Tabela 4). Este dado é bem promissor quando comparado ao fármaco de referência (**2**) que apresentou no mesmo teste controle $\text{CI}_{50} 1 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. Outro aspecto a ser destacado foi o tempo de início da atuação tóxica da nimesulida (**3**) em relação ao BZN (**2**). Ambos os fármacos demonstraram atividade tóxica durante o tratamento *overnight*. Isto ressalta outra vantagem da nimesulida (**3**) sobre o benznidazol (**2**), qual seja, o fato de agir sobre o *T. cruzi* com igual tempo de ação que o BZN (**2**) e não ser genotóxico como este. Além da ação sobre o epimastigota, o AINE (**3**) foi potencialmente maléfico às formas tripomastigotas, fato observado por nove dias, ao longo do tratamento desta forma evolutiva com o fármaco (**3**). Conhecidamente, os dias de pico de liberação das tripomastigotas dos macrófagos infectados são o sétimo e nono dias, após a infecção (PAIVA *et al.*, 2012). Na nossa leitura dos resultados encontrados, o fármaco (**3**) foi significativamente tão eficaz quanto o BZN (**2**), em ambos os dias de liberação. Mais: a

proliferação das amastigotas foi prejudicada na presença de NIM (**3**), que apresentou na análise o mesmo resultado estatístico que o BZN (**2**). Por último, um aspecto a ser considerado é que, dentre os malefícios causados pelos parasitos no curso da DC, estão os processos inflamatórios. O parasitismo tissular cardíaco persistente causa sérias complicações inflamatórias, acarretando danos miocárdicos irreversíveis (BONNEY e ENGMAN, 2008). Neste sentido, a utilização de um fármaco anti-inflamatório pode ser vantajosa para a amenização dos danos inflamatórios causados aos pacientes, na fase crônica da doença. Desta forma, acreditamos na proposta de potencial condição da nimesulida (**3**) ser empregada para finalidade terapêutica antichagásica, em acordo com a temática global de reposicionamento de fármacos.

Fármacos nitroaromáticos

Uma ferramenta que a literatura segue como tendência de pesquisa para o tratamento de doenças negligenciadas é a exploração de estruturas químicas semelhantes às dos fármacos clássicos utilizados. O estudo de relação estrutura-atividade (**SAR**, do inglês *Structure-Activity Relationship*) constitui instrumental importante para o desenvolvimento de precursores de novas substâncias, potencialmente ativas e candidatas. Com efeito, o desenvolvimento da quimioterapia antiparasitária provém, em muitos casos, da criteriosa triagem de bibliotecas sintéticas ou naturais de compostos com semelhanças estruturais entre si (COURA e CASTRO, 2002).

Dentro da abordagem SAR, destacam-se os estudos das estruturas que possuem grupamento nitro (NO₂) ligado diretamente a um sistema de anel aromático. Esses compostos podem sofrer redução em sistemas biológicos por ação das enzimas nitrorredutases, gerando produtos instáveis capazes de reagir com as biomoléculas (PATTERSON e WYLLIE, 2014). Substâncias aromáticas contendo porção NO₂ são utilizadas no tratamento de diversas doenças, como mal de Parkinson, angina, insônia, dentre outras (MATTILA e LARNI, 1980), além de serem amplamente empregadas como agentes terapêuticos contra uma variedade de infecções causadas por protozoários e bactérias (RAETHER e HANEL, 2003). Os dois medicamentos utilizados contra a DC, nifurtimox (**1**) benznidazol (**2**), possuem o grupamento nitroaromático em suas estruturas químicas.

Diversos trabalhos evidenciaram a atividade tripanocida de compostos nitro aromáticos, o que pode sugerir a importância da porção NO₂ para o tratamento do mal de Chagas (ZHOU *et al.*, 2013; VOAK *et al.*, 2013; PATTERSON *et al.*, 2013). Apesar da possibilidade da presença deste grupamento resultar em alguns processos nocivos aos sistemas biológicos (WALSH e MIWA, 2011), a toxicidade pode ser contornada pelo monitoramento dos efeitos colaterais e por medidas terapêuticas. Dessa maneira, é possível proporcionar uma relação custo/benefício satisfatória, o que justifica a sua utilização na quimioterapia antiparasitária (TRUONG, 2009). Porém, destacamos que os dados de citotoxicidade encontrados em nosso estudo indicaram que a nimesulida (**3**) não demonstrou efeitos nocivos sobre as células empregadas nos experimentos (macrófagos, linfócitos e LLCMK2). Os compostos nitroaromáticos são alvo de diversos estudos justamente pelo seu potencial nocivo, restando a habilidade de orientar sua ação tóxica para o agente infeccioso, sem prejuízo do hospedeiro.

Os resultados encontrados para a nimesulida (**3**) indicaram ser fundamental a presença do grupamento NO₂ na estrutura para a sua ação tóxica frente ao parasito. O fato

ficou demonstrado com a perda significativa de atividade contra o *T.cruzi* quando esta porção funcional foi substituída por um grupo amina (NH_2). O substituinte nitro presente na estrutura da nimesulida (**3**) relaciona este AINE ao fármaco de referência, benznidazol (**2**), sendo sugestivo em relação ao provável mecanismo de ação tóxica do NIM (**3**) frente ao *T. cruzi*, visto a morte parasitária só ocorrer quando este grupo está presente na estrutura.

O modo de ação dos fármacos nitroaromáticos passa pela formação de espécies radicalares instáveis prejudiciais à sobrevivência do parasito. O nifurtimox (**1**) e o BZN (**2**) são pró-fármacos, por isso precisam ser ativados por enzimas do parasito, as quais atuam através da geração de radicais livres ou de moléculas ligadas ao protozoário (HALL e WILKINSON, 2011; MAYA *et al.*, 2007). O *T. cruzi* é muito susceptível aos danos celulares causados pelos metabólitos radicalares gerados, uma vez que, as enzimas de eliminação dos sub-produtos formados estão ausentes, ou possuem baixa atividade, no protozoário (MAYA *et al.*, 2007). Outro alvo terapêutico importante é a cadeia respiratória do parasito devido às várias diferenças com o complexo enzimático do hospedeiro (MAYA *et al.*, 2007). A proposta de mecanismo de ação para ambos os medicamentos se dá por vias distintas (WILKINSON *et al.*, 2008). Na atividade do nifurtimox (**1**) estão envolvidas as enzimas nitrorredutases tipo I e tipo II (NTR I e NTR II), presentes no parasito (**Figura 35**).

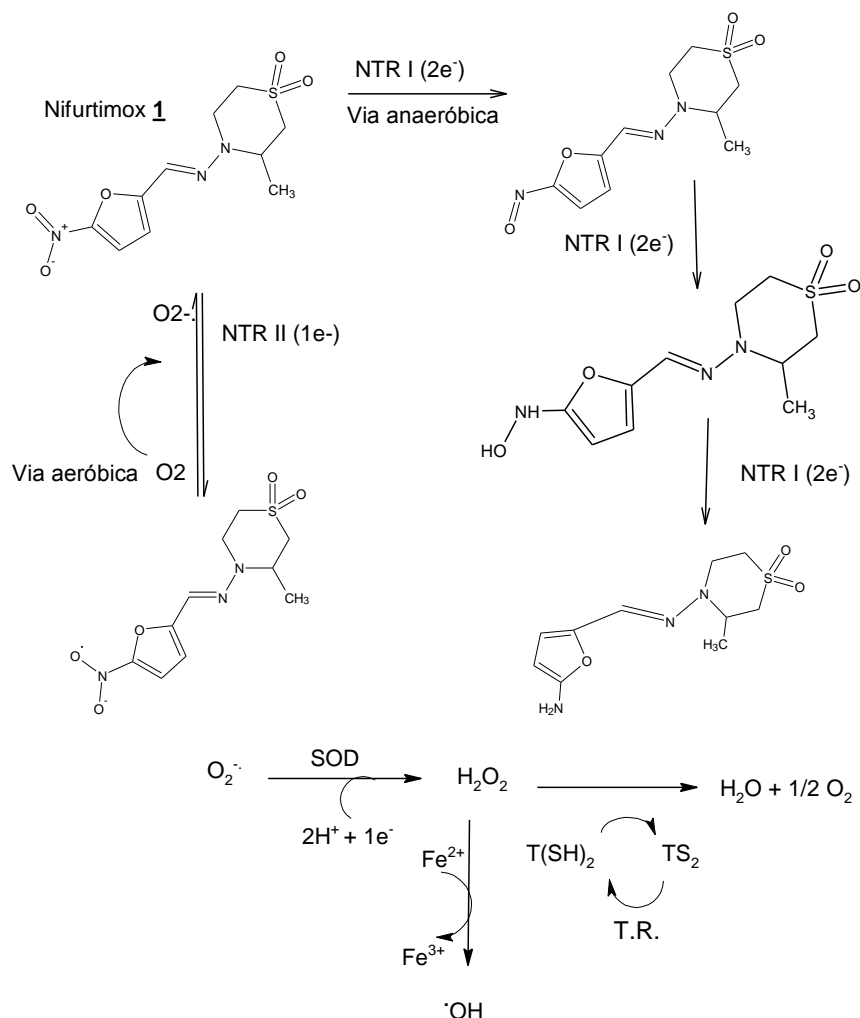


Figura 35. Nifurtimox (**1**) como gerador de espécies reativas de oxigênio. Adaptado de PATTERSON e WYLLIE, 2014.

As nitrorredutases tipo II fazem a redução do nitrofurano (**1**) pela doação de um elétron formando o nitro-ânion radical correspondente, com a conversão do oxigênio molecular, presente no meio biológico, no ânion-radical superóxido (O₂⁻). Esta espécie reativa de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) torna-se substrato da enzima superóxido-desmutase (SOD, do inglês *Superoxide Desmutase*) que catalisa sua dismutação em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), outra ROS, ao mesmo tempo em que é regenerado o fármaco (MASON e HOLTZMAN, 1975). Esta por sua vez, pode sofrer duas transformações. Pela via aeróbica, a redução intracelular do nifurtimox (**1**) para gerar (O₂⁻) e H₂O₂ parece ser o principal mecanismo contra o *T. cruzi* (DO CAMPO e STOPPANI, 1980). Na via anaeróbica, a presença da enzima tripanotona redutase, converte o peróxido em água, pela oxidação da tripanotona, da sua forma reduzida T(SH)₂ a TS₂ (**Figura 36**) (ARIYANAYAGAM e FAIRLAMB, 1999). Outra possibilidade, é o peróxido oxidar íons ferrosos dos sistemas microssomais, com a consequente geração de

radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), os quais podem ligar-se a lipídeos, proteínas, DNA e, portanto, causar efeitos nocivos ao *T. cruzi* (BOIANI *et al.*, 2010).

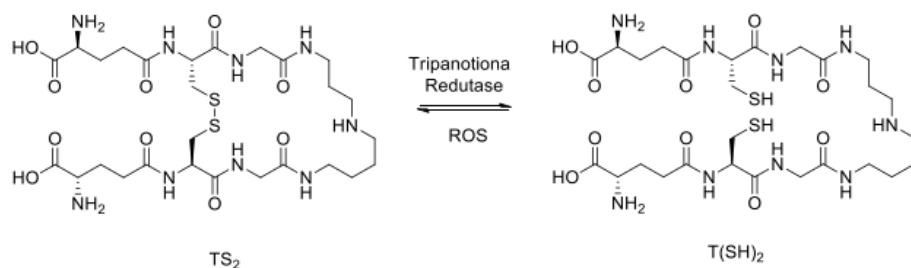


Figura 36. Esquema do equilíbrio entre a forma oxidada (TS_2) e reduzida $\{\text{T(SH)}_2\}$ da tripanotione, presente unicamente nos tripanossomatídeos. O processo de redução ocorre com a catálise da enzima tripanotione redutase. O processo de oxidação ocorre espontaneamente pela ação oxidante de espécies reativas de oxigênio (ROS). Adaptado de VIODÉ *et al.*, 1999.

Por sua vez, a descoberta da ação tripanocida do benznidazol (**2**) deu-se sem entender muito bem o seu mecanismo de atividade, o que vem sendo elucidado ao longo dos anos (CERECETTO e GONZALEZ, 2002; TROCHINE, 2014). A sua via de ação parece ser diferente da do nifurtimox (**1**). O motivo seria causado pelo menor potencial eletroquímico para redução da subunidade 2-nitroimidazol do BZN (**2**) em relação ao 5-nitrofurano (**1**). Com isso, a produção de uma concentração de ânion-radical superóxido seria baixa ou suficiente para que o parasito efetuasse a detoxificação por si próprio (DO CAMPO, 1990). A atividade biológica de (**2**) tem sido proposta como mediada por intermediários reduzidos, que se ligam covalentemente a moléculas como lipídeos, proteínas e DNA, *in vivo*, ao invés da preferência pela via de radicais livres e formação de espécies reativas de oxigênio, como no caso do nifurtimox (**1**) (DE TORANZO *et al.*, 1988 e MAYA *et al.*, 2007). Mais tarde, MAYA e colaboradores (2003) sugeriram outro alvo, a via da tripanotione. A tripanotione é um tiol exclusivamente encontrado em tripanossomatídeos e essencial para a viabilidade do *T. cruzi* (MITSCHER *et al.*, 2012). A função deste tiol é a eliminação dos radicais livres e a desintoxicação de diversas substâncias nocivas. Uma vez ativada, esta enzima desencadeia uma cascata de eventos responsáveis pela neutralização de espécies reativas de oxigênio, mantendo um ambiente redutor no interior do parasito, protegendo-o contra o estresse oxidativo (SCHMIDT *et al.*, 2002 *apud* OLIVEIRA *et al.*, 2008). A transferência de um elétron para o nitro-aryl causa sua desproporcionamento para gerar um nitroimidazol e um nitrosoimidazol, que se liga de forma irreversível à tripanotione. Dessa forma, a enzima tripanotione redutase é considerada um alvo molecular importante para o planejamento de inibidores a serem utilizados no tratamento da doença de Chagas (SCHMIDT *et al.*, 2002 e CHIBALE e MUSONDA, 2003 *apud* OLIVEIRA *et al.*, 2008). Uma característica da bioquímica do *T. cruzi* é a utilização da tripanotione em substituição à glutatona do sistema redox de defesa das células hospedeiras (FAIRLAMB e CERAMI, 1992). Por isso, a inibição desta via torna o parasito mais vulnerável à ação de agentes tripanocidas. Outro possível mecanismo do benznidazol (**2**) é pela via de sua conversão a uma *N*-aryl-hidroxilamina, similar ao do nifurtimox (**1**). Assim, após uma sucessão de reações não-enzimáticas, é formado um metabólito que contém uma

subunidade guanidina e uma molécula de glioxal, que possui propriedades citotóxicas contra o *T. cruzi*, pela formação de adutos com diversas biomoléculas (PATTERSON e WYLLIE, 2014; HALL e WILKINSON, 2011). Tais mecanismos estão resumidos na **Figura 37**.

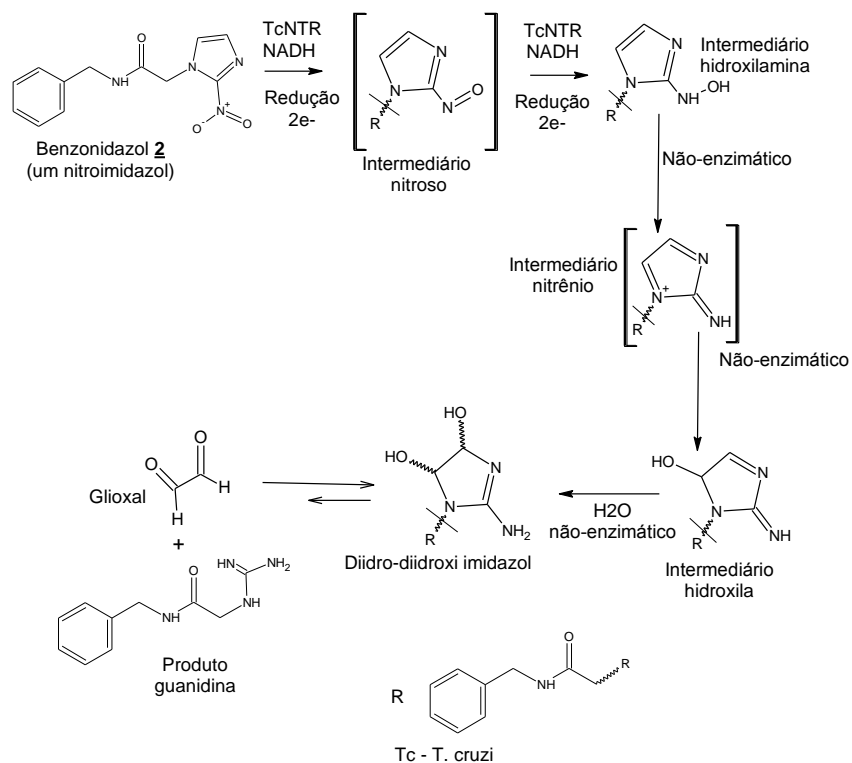


Figura 37. Mecanismo de bioativação do benznidazol (**2**) mediada por nitrorredutase no *T. cruzi*. O grupamento nitro do composto nitroimidazol (**2**) é reduzido por nitrorredutase aos metabólitos nitroso e *N*-aril-hidroxilamina, que pode ser convertido enzimaticamente ao íon nitrênio, espontaneamente di-hidroxilado, formando intermediário que estabelece equilíbrio gerando uma molécula de glioxal e um derivado guanidínico. Adaptado de PATTERSON e WYLLIE, 2014.

Neste panorama de especulações mecanísticas, é preciso considerar também a importância do papel da porção nitro da molécula da nimesulida (**3**) no seu efeito sobre o *T. cruzi*. Pelo que vimos, tal grupo químico em sistemas biológicos pode ser reduzido pelas enzimas nitrorredutases. O processo inicia com uma reação catalisada pelo NADPH/NADH-nitrorredutase, que atua no grupo NO₂ produzindo o ânion radical intermediário (MORENO *et al.*, 1982).

As espécies radiculares intermediárias formadas parecem ter sido fundamentais para a atividade da nimesulida (**3**), uma vez que a nimesulida reduzida (**4**), no qual o grupo nitro dera lugar ao grupo amino, perdeu substancialmente a atividade. A formação do ânion radical nitro reativo, sob ação das NTR, pode ter desencadeado a produção de diversas espécies reativas de oxigênio ou de outras biomoléculas instáveis, causando danos ao *T. cruzi*, fato que não ocorreu com a nimesulida reduzida (**4**). A capacidade da nimesulida para gerar espécies radiculares tóxicas foi demonstrado por SQUELLA e colaboradores (1999) no estudo da redução eletroquímica do fármaco, demonstrando ainda a capacidade do nitro-ânion-radical formado interagir com GSH (glutationa na forma reduzida) e bases do DNA (*e.g.* adenina). Mais recentemente, trabalhos descrevem a capacidade da nimesulida em promover estresse oxidativo celular (SINGH *et al.*, 2010; ONG *et al.*, 2006), o que sugere o envolvimento deste fármaco na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), tornando-o atraente para estudos de sua atividade antiparasitária.

Ressaltamos que as NTR nos tripanossomatídeos não possuem, intrinsecamente, a função de reduzir nitroaromáticos exógenos. Na verdade, este conjunto de enzimas é essencial para a virulência dos parasitos, com implicações na resistência aos medicamentos. Dessa forma, as NTR tornam-se também alvos de potenciais fármacos (ALSFORD *et al.*, 2012) e, talvez, a nimesulida (**3**) possa ter agido nesta via. Porém, a elucidação do mecanismo precisa ser melhor estudada, pois por ser uma molécula pequena é possível que a nimesulida (**3**) possua outros alvos moleculares capazes de interação. Deste modo, considerar a possibilidade do grupo nitro ter sido reduzido enzimaticamente parece gerar boas perspectivas para o emprego da nimesulida (**3**), uma vez que parece exercer seus efeitos tóxicos em vias importantes para a viabilidade parasitária. Além disso, como os mamíferos não possuem atividade de NTR's não-sensíveis à presença de oxigênio (NTR do tipo I), como ocorre em células de tripanossomatídeos e de bactérias (WILKINSON *et al.*, 2011; HALL *et al.*, 2010) são menos suscetíveis aos efeitos citotóxicos de um fármaco que atua através desta via de ativação. O conjunto de especulações nos levou a crer que a presença do grupamento nitroaromático da nimesulida (**3**) foi determinante para a atividade da molécula. Se há inúmeros esforços de pesquisa sendo feitos no sentido de aprofundar na potencialidade biológica de compostos com grupo nitro sobre tripanossomatídeos, e se o reposicionamento é uma ferramenta adotada globalmente para agilizar este conhecimento, entendemos que o presente estudo contribui neste cenário colocando a nimesulida (**3**) como fármaco promissor no tratamento de DC. Ainda: compostos híbridos poderão ser propostos a partir de nimesulida (**3**) e outras substâncias de reconhecida ação antiparasitária, a fim de gerar novas famílias de moléculas potencialmente ativas.

Além disso, há um segundo aspecto estrutural que pensamos ter contribuído no tratamento anticruzi, qual seja a presença do grupo sulfonamida no composto, o que acentuaria a seletividade do fármaco (**3**). Estudos suportam que, dentre os grupos estruturais que apresentam maior seletividade à ciclo-oxigenase, estão compostos contendo grupos metilsulfonil e sulfonamida (FAMAHEY *et al.*, 1997). De fato, a ação da nimesulida (**3**) dá sinais de ocorrer também pela interação da sua porção sulfonamida com um resíduo de arginina, em uma cavidade hidrofílica da enzima (RUELA *et al.*, 2009). Pode ser, então, que além do grupo nitro presente na estrutura da nimesulida (**3**), também a porção sulfonamida potencializaria a sua ação antiparasitária, por interação de resíduos deste aminoácido, o que foi sentido já no tratamento *overnight*, conforme demonstrado neste estudo. O fundamento desta suposição encontra-se no trabalho de NANAVATY *et al.* (2016). Desta vez, a via de ação sugerida para a ação tripanocida da família sintetizada foi a da tubulina, importante para a motilidade do parasito (HEALD e NOGALES, 2002; WERBOVETZ, 2002). Os autores planejaram e testaram uma série de sulfonamidas em suas atividades *in vitro* e *in vivo* contra TC, analisando os efeitos produzidos de acordo com as modificações estruturais estabelecidas. Dentre as análises que realizaram, puderam inferir, dentre outros pontos, que a presença de um grupo retirador de elétrons nas posições 2 e 4 da sulfonamida é um aspecto importante para incrementar a ação tripanocida. Este dado vem de encontro com a estrutura da nimesulida (**3**), uma vez que a molécula apresenta como característica estrutural grupos retiradores de elétrons nas posições 2 e 4 da sulfonamida. Quiçá este fator tenha contribuído também para o resultado encontrado.

Por último, outro componente da equação modo de ação dos AINEs é a consideração que a nimesulida (**3**), assim como os outros fármacos da classe, possui diferentes vias de atuação, com destaque para a da ciclo-oxigenase (FORREST e

BROOKS, 1988). O principal mecanismo sobre a enzima parece ser a inibição da sua atividade e, conseqüentemente, da cascata do ácido araquidônico, responsável pela síntese de substâncias envolvidas no processo de inflamação, como as prostaglandinas (PG) (PRESTON *et al.*, 1989; VANE, 1971). Dessa forma, a inibição da COX reduz a síntese de PGs e desvia o ácido araquidônico para a via da lipo-oxigenase, com formação de leucotrienos. Isto causa uma vasoconstrição na mucosa gástrica aumentando a formação de radicais livres resultantes da peroxidação lipídica, causando lesão na mucosa gástrica (BJARNASON e THJODLEIFSSON, 1999). Na análise custo/benefício, embora tenham sido reportados danos gástricos e hepáticos (MINGATTO *et al.*, 2000; BOELSTERLI *et al.*, 1995) durante administração de alguns AINEs, a severidade associada ao uso destes medicamentos é variável, sendo mais incidente com a idade avançada (TRAVERSA, 2003; RAINSFORD, 1999). Vantajosamente, os danos ulcerogênicos gástricos provocados por três AINEs clássicos (indometacina, diclofenaco e naproxeno) foram maiores quando comparados aos causados pelo NIM (3) (GODESSART e SALCEDO, 1996). Até os anos 90, acreditava-se que só havia um tipo de ciclo-oxigenase, a COX-1, constitutivamente expressa em muitas células e tecidos. Mais tarde, descobriu-se que a COX existe em duas isoformas: a COX-1, constitutiva, e a COX-2, indutível. Fármacos que inibem seletivamente a isoforma COX-2 são menos propensos a causar os efeitos adversos oriundos daqueles que atuam na inibição da COX-1, com melhor panorama de eficácia e mais baixa toxicidade, equilíbrio que deve ser considerado entre os benefícios e os efeitos colaterais dos AINEs (JONES, 2001). Foi descrito que a COX-2, codificada por um gene diferente da COX-1, é seletivamente induzida por citocinas pró-inflamatórias no local da inflamação. A COX-2 é quase indetectável em condições fisiológicas, no entanto sua expressão é consideravelmente aumentada durante a inflamação. Isso pode indicar que sua produção é induzida mediante estímulos. A expressão da enzima COX-2 é seletivamente bloqueada pelos AINEs. A descoberta da COX-2 fez supor que a toxicidade associada aos AINEs era causada pela inibição da COX-1, enquanto as propriedades anti-inflamatórias eram provocadas pela inibição da COX-2 (SEIBERT e MASFERRER, 1994). De tal forma que se postulou a COX-1 constitutivamente expressa na maioria dos tecidos, como uma enzima de manutenção, com o propósito de produzir PGs em resposta aos estímulos hormonais reguladores de processos fisiológicos. Hoje, sabe-se que a COX-2 também é constitutivamente expressa em alguns tecidos, que as prostaglandinas derivadas da COX-1 também participam da inflamação e que a reserva de COX-1 não é suficiente para evitar a toxicidade gastrointestinal (ROUZER e MARNETT, 2009).

Somada à ação do NIM (3) sobre o complexo enzimático COX no paciente, agindo benéficamente no seu processo anti-inflamatório, ressaltamos neste ponto um estudo de nosso grupo no qual ficou demonstrado que dois AINEs, aspirina e indometacina, apresentaram potencial capacidade de controlar a replicação do *T.cruzi*, inibindo a parasitemia em camundongos infectados, pela via de inibição da COX (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). Portanto, temos outra possibilidade de via de ação da nimesulida (3) a ser especulada, qual seja interferindo na via da ciclo-oxigenase, uma enzima importante para a replicação e sobrevivência do parasito (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). Neste contexto, torna-se promissora a consideração de que, como a DC produz complicações inflamatórias cardíacas no paciente, a utilização de nimesulida (3) na terapêutica favorece a medicina anti-inflamatória com menos danos gástricos que outros AINEs, ao mesmo tempo em que atua sobre a parasitemia.

Neste estudo comprovou-se ainda que a nimesulida (3) provoca a morte do parasito por ambas as vias, apoptótica e necrótica, de maneira mais intensa que o benznidazol (2), conforme observado na dupla marcação no ensaio de citometria de fluxo. Essa via de morte foi confirmada pelas alterações ultraestruturais evidenciadas na análise por microscopia eletrônica de transmissão. Os diversos fenômenos observados em diferentes organelas no parasito tratado ocorrem, uns em apoptose e outros, em necrose. Por isso, o efeito causado leva a crer que ambas as vias são possíveis, o que é previsto na literatura (MENNA-BARRETO, *et al.*, 2009). Tanto um aumento de volume celular, com edema de algumas organelas, quanto presença de fragmentos observados no citossol podem indicar características presentes na necrose e/ou na apoptose, conforme esquematizado na **Figura 38**.

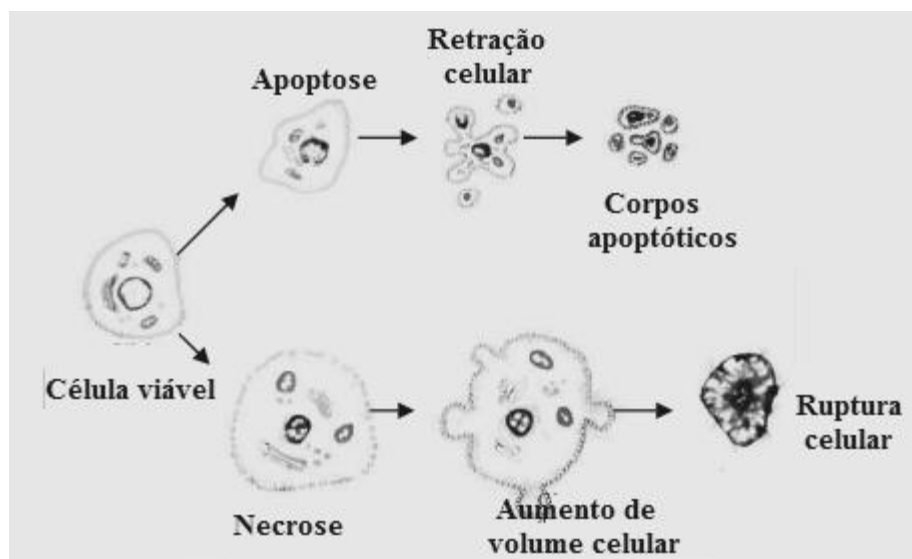


Figura 38. Características morfológicas de morte celular. Adaptado de GRIVICICH *et al.*, 2007.

De fato, estudos sobre os efeitos ultraestruturais nas organelas dos parasitos, como mitocôndria, cinetoplasto, núcleo, reservossomos, ácidos calcissomos, etc., têm sido úteis na investigação dos alvos e mecanismos acerca dos novos compostos quimioterápicos propostos (RODRIGUES e DE SOUZA, 2008). No entanto, MENNA-BARRETO *et al.* (2009) afirmam que, com relação ao *T. cruzi*, ainda não há muitos dados reportados sobre o caminho de morte celular provocado pelos diferentes agentes quimioterápicos. Múltiplas alterações de morte por necrose e/ou apoptose são passíveis de serem observadas na quimioterapia de Chagas. Há indícios de morte por alterações na organização de cromatina ou pela presença de figuras de mielina e formação de corpos autofagossômicos, sugerindo um processo de morte autofágica, característica de necrose. Pode ocorrer também formação de bolhas na membrana e alterações na cromatina, indicativos de “apoptosis-like”. Outras vezes, há ruptura da membrana plasmática, o que sugere morte por necrose. Mas um complexo de alterações observadas faz crer na ocorrência de mais de um caminho de morte na célula, quando tratada com diferentes compostos químicos (MENNA-BARRETO *et al.*, 2009). Em nosso estudo, a análise de microscopia eletrônica de transmissão das formas epimastigotas axênicas revelou a integridade do parasito, conforme mostrado na **Figura 28**,

quando comparado à literatura, na **Figura 29** (DE SOUZA, 2008). Por sua vez, os ensaios de MET em epimastigotas de *T. cruzi* tratados com nimesulida (**3**) demonstraram alterações ultraestruturais importantes nos parasitos, principalmente na membrana mitocondrial, com perda de morfologia, prejudicando a sua viabilidade. Como os eventos apoptóticos iniciam na mitocôndria, com perda de potencial de membrana e ativação de caspases (DONNELLY *et al.*, 2000), as alterações observadas nesta organela podem sugerir a ocorrência deste tipo de morte celular. Além disso, observamos forte compactação do cinetoplasto, conforme mostrado na **Figura 30**. Com efeito, a técnica de microscopia eletrônica de transmissão tem se mostrado uma poderosa ferramenta na elucidação de efeitos nocivos à ultraestrutura de *T. cruzi*, auxiliando na investigação de novos potenciais fármacos para o tratamento de DC (VANNIER-SANTOS e CASTRO, 2009). Quanto ao processo de morte celular, como falamos acima, o tratamento de *T. cruzi* com compostos químicos ativos causa sua morte celular por diferentes vias. As alterações mitocondriais são comuns tanto na necrose quanto na apoptose, sendo que no caso de necrose, há um aumento de vacuolização citoplasmática (MENNA-BARRETO *et al.*, 2009), fenômeno observado em nosso trabalho. Além disso, dados na literatura demonstram que os reservossomos desempenham papel importante para a integridade do *T. cruzi* e, uma vez afetados, o metabolismo lipídico do parasito fica prejudicado ou ainda pode ter início um processo proteolítico, resultando em morte celular (MENNA-BARRETO *et al.*, 2009). Neste estudo, observamos que o tratamento das formas epimastigotas com nimesulida (**3**) provocou uma nítida desorganização dos reservossomos, apontando para um desequilíbrio do metabolismo do parasito, prejudicando a sua sobrevivência. Outro aspecto ultraestrutural revelado foi o padrão anormal de distribuição de heterocromatina na forma epimastigota tratada, indicando danos causados pelo composto nesta organela, num processo sugestivo de apoptose (DO CAMPO *et al.*, 1977). Desta forma, acreditamos que os efeitos ultraestruturais observados, após o tratamento com nimesulida (**3**), apontam para morte celular por apoptose e necrose. Isto alinha-se com os resultados obtidos na técnica de citometria de fluxo, que indicaram haver morte celular por ambas as vias, conforme observamos na **Figura 26**.

Deveras, muitos estudos têm mostrado a complexidade na forma como os fármacos nitro aromáticos clássicos agem sobre o *T. cruzi*, sem contudo identificarem especificamente os alvos biológicos exatos, seja do nifurtimox (**1**) ou do benznidazol (**2**). O próprio argumento de ação das nitrorredutases precisa ser melhor compreendido. A identificação de quatro isoformas de SOD dependentes de ferro nestes parasitos, presentes na mitocôndria, citossol e glicossomos, pode indicar uma correlação também entre atividade de SOD em tripanossomatídeos e sua resistência a fármacos (WILKINSON *et al.*, 2006). Ou seja, não parece simples a compreensão da versatilidade com que o *T. cruzi* sofre a ação de fármacos nitroaromáticos e, ao mesmo tempo, desenvolve resistência a estes. Talvez isto responda à pergunta deste estudo. A constatação de ocorrência de ambas as formas de morte celular, observadas na análise por citometria de fluxo, além das várias alterações estruturais na análise por MET, apontam para um atributo importante da nimesulida (**3**), a sua reposição como novo fármaco para agir sobre o *T. cruzi*, uma vez que pode ser capaz de interferir em vias múltiplas ou distintas das já reconhecidas pelos parasitos, em seus mecanismos de toxicidade e resistência. De maneira adicional, como a inibição da síntese de prostaglandinas parece ser o principal caminho de ação dos AINEs (VANE, 1971), supomos que esta via pode ter um papel significativo na ação da nimesulida (**3**) sobre o *T. cruzi*, já que essa via é de reconhecida importância para a viabilidade e

multiplicação dos parasitos (FREIRE-DE-LIMA, *et al.*, 2000). O conjunto de resultados sugere, portanto, a possibilidade do reposicionamento da nimesulida (**3**) para o tratamento da DC ou, ainda, para seu emprego como protótipo no desenvolvimento de moléculas mais ativas e menos tóxicas aos pacientes chagásicos.

Assim, sob o aspecto da abordagem do reaproveitamento de fármacos, guiada pelos Perfis de Produtos Alvo - TPP¹⁷ - (do inglês *Target Product Profiles*), a nimesulida (**3**) pode ser utilizado como uma alternativa satisfatória para uma doença negligenciada¹⁸. Trata-se de um medicamento existente, com farmacocinética conhecida, bom perfil de segurança e aprovação pelas autoridades reguladoras (FERREIRA *et al.*, 2018; CHONG e SULLIVAN, 2007). Além desse aspecto, o candidato apresentou atividade *in vitro* equivalente ao BNZ (**2**), condição que o torna apto para a continuidade do presente estudo, em outros modelos experimentais (KAISER *et al.*, 2015). Entendemos que o papel dos centros acadêmicos de pesquisa, como aquele onde foi desenvolvida a presente tese, ainda que, com escassos recursos, é essencial para a busca de novas alternativas terapêuticas para pacientes chagásicos, pois aí são desenvolvidas tanto pesquisa básica quanto medicina translacional, que faz possível a transição da pesquisa básica para a pesquisa clínica aplicada (KAITIN, 2010).

Por último, com relação à metodologia química empregada para a extração da nimesulida (**3**) a partir de comprimidos do fármaco obtidos comercialmente mostrou-se relativamente simples, de baixo custo e rápida, com bons rendimentos de extração e alta pureza do sólido obtido, o que foi confirmado pelo ponto de fusão encontrado, e as análises físicas comprovaram a obtenção do produto. Com isso, utilizamos a substância obtida para os testes de avaliação de atividade contra *T. cruzi*, comparada ao fármaco de referência benznidazol (**2**). Além disso, o derivada nimesulida reduzida (**4**), sintetizado de maneira quimiosseletiva usando metodologia simples e rápida, foi caracterizado pelos métodos convencionais de análise, exibindo dados compatíveis com o descrito na literatura.

¹⁷ Um perfil de produto-alvo descreve o "perfil" desejado ou as características de um produto-alvo que é direcionado a uma doença em particular. Os TPPs indicam o uso pretendido, populações alvo e outros atributos desejados dos produtos, incluindo características relacionadas à segurança e eficácia. Tais perfis podem orientar a pesquisa e desenvolvimento de produtos. Informação disponível em: <https://www.who.int/research-observatory/analyses/tpp/en/>. Acesso em 13-07-2019.

¹⁸ Informação disponível em *Medicine for Malaria Venture*: <https://www.mmv.org/research-development>. Acesso em 13-07-2019.

CAPÍTULO II:

**Planejamento e síntese de derivados híbridos entre a nimesulida e a piperina:
avaliação da atividade tripanocida.**

Introdução

Vários grupos de pesquisa estão empenhados no planejamento de novas entidades químicas e na descoberta de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas (CHATELAIN, 2015). O pressuposto da semelhança estrutural da nimesulida (**3**) e benznidazol (**2**), aliado ao fato deste AINE (**3**) ser inibidor da ciclo-oxigenase, parece ter contribuído para a identificação da ação tripanocida do fármaco (**3**). Como visto, a substância apresentou atividade sobre as três formas evolutivas de *T. cruzi*, sinalizando a necessidade de mais estudos para o melhor entendimento dos prováveis mecanismos de ação do fármaco na atividade tripanocida observada. Dando continuidade aos esforços pela identificação de outras moléculas ativas contra o protozoário, o presente estudo alinhou-se, em um segundo momento, a uma das frentes de pesquisa do grupo no qual esta tese está inserida (LaQuiMed-UFRRJ), qual seja o estudo das propriedades medicinais de produtos naturais, dentre os quais, destaca-se a amida natural piperina (**5**). O desenvolvimento de novos fármacos está intimamente relacionado à área de pesquisa dos produtos de origem natural. Vários trabalhos na literatura destacam a importância deles, principalmente em determinadas áreas terapêuticas, como por exemplo, a quimioterapia antitumoral. Segundo levantamento realizado numa revisão recente (NEWMAN e CRAIG, 2016), os produtos naturais estão envolvidos, direta ou indiretamente, na gênese de cerca de 65% dos novos fármacos introduzidos no mercado americano, entre 1981-2014. Encontramos na literatura um grande número de trabalhos onde produtos de origem natural são avaliados contra as diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*. JONES e colaboradores (2013) fizeram um levantamento dos produtos naturais isolados de organismos marinhos, com atividade tripanocida.

A molécula da piperina (**5**) é formada por um grupo 1,3-benzodioxola, ao lado de uma cadeia de ácido pentadienoico ligada à uma amida piperidinil, conforme estrutura representada na **Figura 7**.

O primeiro trabalho descrevendo o isolamento da piperina dos frutos de *P. nigrum* foi descrito em 1819, pelo químico e físico dinamarquês Hans Christian Oersted (PARTHASARATHY, *et al.*, 2008). A piperina (**5**) é o principal alvo de avaliações biológicas da planta *Piper nigrum* (**Figura 39**) provavelmente por ser a piperamida majoritária (SRINIVASAN, 2007; PARMAR *et al.*, 1997). Além da piperina, estão presentes em *Piper nigrum* outras piperamidas minoritárias, além de monoterpenos, sesquiterpenos e terpenos oxigenados (SRINIVASAN, 2007; PARMAR *et al.*, 1997).



Figura 39. Cultivo do *P. nigrum*. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 30-07-2019.

Um aspecto econômico relevante deste produto natural é a sua abundância, pois é extraído com rendimentos considerados elevados, de cerca de 3-7%, a partir dos frutos secos da planta (IKAN, 1991), o que torna vantajosa a exploração das propriedades biológicas da substância (5). A pimenteira-do-reino é bastante exaltada pela EMBRAPA¹⁹ (2011) como especiaria de amplo valor agregado e importância ímpar como produto agrícola, tendo sido comparada ao protagonismo que o petróleo assumiu nos tempos modernos. Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores desta planta exótica, com um total de mais de 35 mil toneladas. ano⁻¹, respondendo por 28% da produção mundial, pelo que o Estado do Pará contribui com 90% do montante nacional (EMBRAPA, 2011). Trata-se da principal especiaria comercializada para atender à indústria alimentícia, medicinal, cosmética, de perfumaria, dentre outras (EMBRAPA, 2011).

Historicamente, o cultivo da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum*) no Brasil está estreitamente relacionado à colonização portuguesa. Originária das florestas de Kerala, no sul da Índia, é a especiaria que mais atraiu os comerciantes daquela época. Os portugueses, primeiros a descobrir uma rota mais curta para a Índia partindo da Europa, passaram a denominar o produto de pimenta-do-reino, termo como é conhecida até hoje nos países de língua portuguesa. O grão era chamado no Brasil de “pimenta de Portugal” durante o período colonial. Depois da colonização passou a se chamar “pimenta do reino”, pois vinha de Portugal e logo, do reino²⁰.

¹⁹ EMBRAPA - Amazônia Oriental. Sistema de Produção da Pimenta-do-reino. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/colheita.htm>. 2011. Acessado em 29-07-2019.

²⁰ Cidade de São Paulo, Secretaria de Saúde. Disponível em: <https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/saude/noticias/?p=159551>. Acessado em 14-09-2019.

Nos últimos vinte anos, os efeitos farmacológicos desta amida natural (**5**) vêm sendo amplamente demonstrados. Propriedades tais como, capacidade neuroprotetora (DA CRUZ, 2012), estimulante da biossíntese de serotonina no Sistema Nervoso Central (CHONPATHOMPIKUNLERT *et al.*, 2010), estimulante natural intervindo na absorção de selênio, vitamina B e β -caroteno, sendo por isso utilizada no tratamento de atletas e também de idosos, cuja capacidade de absorver nutrientes é deficiente (SEMLER e GROSS, 1988), e outras sumarizadas na **Tabela 7**.

Tabela 7. Atividades biológicas da piperina (**5**).

Atividades Biológicas	Referências
Amebicida	Ghosal, 1996; Marques <i>et al.</i> , 2010
Anticonvulsivante	Egebjerg <i>et al.</i> , 2009
Antidepressiva	Lee <i>et al.</i> , 2005; Mao <i>et al.</i> , 2011
Antifúngica	Marques <i>et al.</i> , 2010
Antioxidante	Kumar <i>et al.</i> ;2010; Mehta <i>et al.</i> ;2012
Antitumoral	Sunila, 2004; Rao <i>et al.</i> , 2010
Antimalárica*	Martinelli <i>et al.</i> , 2008
Hepatoprotetor	Matsuda <i>et al.</i> , 2009; Chandrasekhar <i>et al.</i> , 2008
Inibição da resistência bacteriana	Sangwan <i>et al.</i> , 2008
Leishmanicida	Kapil, 1993; Raay <i>et al.</i> , 1999; Veerareddy <i>et al.</i> , 2004; Singh <i>et al.</i> , 2010
Regulador do metabolismo lipídico	Kim <i>et al.</i> , 2011

*Em associação com outros fármacos. Adaptado de FRANKLIM *et al.*, 2013.

Dentre as diferentes atividades biológicas descritas na literatura para a piperina (FERREIRA *et al.*, 2012), destacamos a sua atividade tóxica e de seus derivados contra parasitos da família Trypanosomatidae (*e.g.* *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*). Estas atividades antiparasitárias têm sido estudadas por nosso grupo de pesquisa em diferentes trabalhos (FRANKLIM *et al.*, 2019; FRANKLIM *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2008; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2004), explorando o bioisosterismo existente entre a função amida e diferentes núcleos heterocíclicos nitrogenados (LIMA e BARREIRO, 2005) como o oxadiazol, o tiadiazol e triazol. O conjunto de resultados obtidos nestes trabalhos, resultantes das avaliações destes derivados mostraram a importância da função piperamida e da presença dos quatro carbonos olefínicos do produto natural no efeito tóxico contra os parasitos. Assim, a piperina (**5**) apresentou concentração inibitória de 14,2 μ M e 28 μ M contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonenses*, respectivamente (FERREIRA *et al.*, 2011). Além disso, a piperina (**5**) apresentou atividade tóxica seletiva contra as formas epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, exibindo valores de CI_{50} 7,36 μ M e 4,91 μ M, respectivamente (RIBEIRO *et al.*, 2004). O provável mecanismo de ação da amida natural contra epimastigotas de *T. cruzi* foi estudado por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, evidenciando sua interferência no processo de citocinese do parasito (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2008). Estas considerações estimularam o interesse pelo segundo viés deste trabalho de pesquisa, que consistiu na utilização da piperina (**5**) para o

planejamento de híbridos moleculares com a nimesulida (**3**), principal alvo deste estudo. A premissa fundamentou-se no fato de aliar estruturalmente duas substâncias com ação antiprotozoária para avaliar o efeito na atividade contra as diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*.

Hibridação molecular

Uma das abordagens clássicas para o desenho de novos protótipos²¹ é a junção de fragmentos bioativos em uma estrutura molecular química única. Chamada de hibridação molecular, esta ferramenta da Química Medicinal é amplamente utilizada para projetar novas moléculas, com vistas à ação tóxica contra algum alvo biológico, sendo recurso muito útil para o desenho de arquiteturas moleculares inéditas, candidatas a fármacos (BARREIRO e FRAGA, 2015; VIEGAS-JR *et al.*, 2007). Encontramos na literatura algumas revisões sobre o uso da hibridação molecular como estratégia de planejamento de fármacos, sendo a mais recente a descrita por BÉRUBÉ (2016). Através desta estratégia de planejamento racional, novas substâncias podem ser descobertas, com importantes atividades farmacoterapêuticas, agregando minimização de esforços de trabalho sintético e maximização de chances de sucesso na descoberta de medicamentos mais eficientes e seguros (VIEGAS-JR *et al.*, 2007; LIMA e BARREIRO, 2005). Ademais, a hibridação molecular pode resultar no sinergismo da ação farmacológica e/ou na modulação de efeitos secundários indesejados (BÉRUBÉ, 2016). Na **Figura 40**, encontra-se uma representação esquemática da estratégia de hibridação molecular.

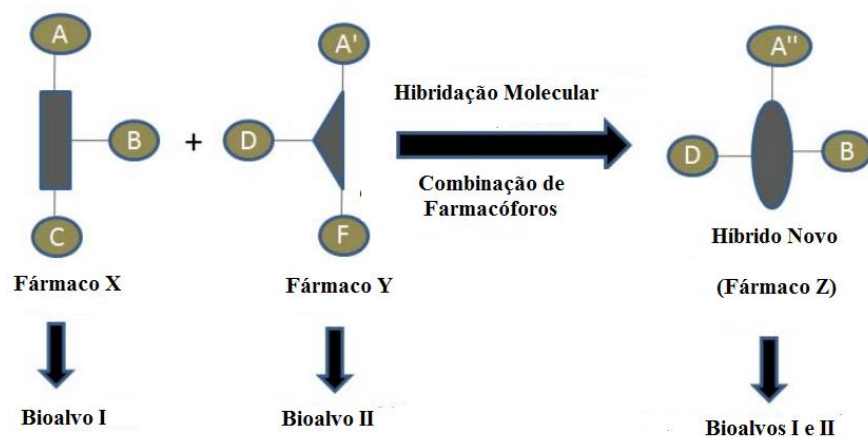


Figura 40. Representação esquemática da abordagem da hibridação molecular aplicada ao planejamento de novo fármaco híbrido **Z**, a partir da combinação de fármacos hipotéticos **X** e **Y**. **A**, **A'** e **A''**, grupos ligantes auxiliares. **B** e **D**, porções farmacofóricas. **C** e **F**, subunidades não farmacofóricas. Adaptado de MAIA e FRAGA, 2010.

Um aspecto interessante observado na construção da nova molécula híbrida é a sua capacidade de ação em, pelo menos, dois alvos moleculares diferentes. Com isto, a

²¹ O protótipo, em Química Medicinal, é definido como a primeira substância estudada com estrutura química definida, de origem natural ou sintética, que exiba alguma atividade farmacológica *in vivo* (BARREIRO e FRAGA, 2015).

estratégia promove efeito benéfico no tratamento de doenças multifatoriais causadas por agentes patógenos como protozoários, bactérias, vírus ou fungos (MAIA e FRAGA, 2010). O químico medicinal tem como objetivos principais a descoberta de novas entidades químicas bioativas, juntamente com a interpretação dos mecanismos de sua ação em nível molecular, e o entendimento das relações existentes entre as estruturas químicas e suas atividades farmacológicas (ARAÚJO *et al.*, 2015). Embora o paradigma dominante entre os químicos medicinais no planejamento de fármacos seja o projeto de ligantes seletivos a determinado alvo biológico, o avanço da biologia de sistemas tem revelado que compostos seletivamente excelentes, quando comparados a fármacos com ação multi-alvos, exibem uma eficácia clínica menor que a desejada. Acredita-se que a entidade química que modula mais de um alvo possa ter eficácia superior quando comparada à outra, moduladora de alvo único (HOPKINS, 2008). Com efeito, para o tratamento de algumas doenças, como câncer ou AIDS, a terapia combinada (utilização de *cocktail* de fármacos) apresenta resposta mais satisfatória que o monoterapêutico (NEPALI *et al.*, 2013).

O fármaco anti-inflamatório não esteroidal benorilato é um exemplo bem-sucedido da hibridação molecular fármaco-fármaco, obtido a partir do paracetamol (analgésico e antipirético, introduzido no mercado nos anos 50) e ácido acetilsalicílico (anti-inflamatório, analgésico e antipirético, fabricado desde o século XIX) (**Figura 41**). Provavelmente o benorilato é absorvido como molécula intacta o que justifica sua boa tolerância gástrica. Após a absorção, o benorilato é hidrolisado em seus componentes, salicilato e paracetamol, que seguem as rotas usuais de metabolismo. O fármaco revelou melhor desempenho que outros anti-inflamatórios no tratamento de doenças musculoesqueléticas, como artrite reumatoide e osteoartrose (WRIGHT, 1975).

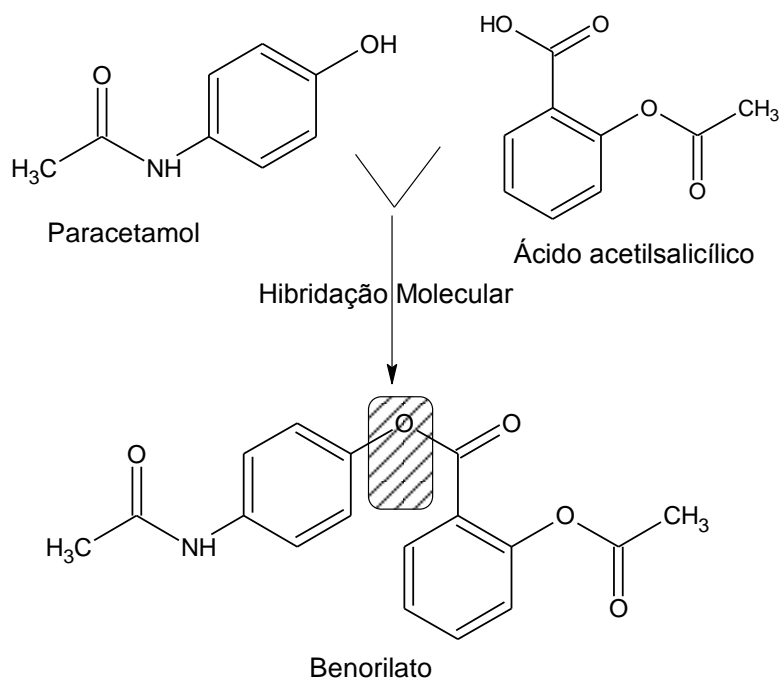


Figura 41. Estrutura química do anti-inflamatório benorilato, híbrido do tipo fármaco-fármaco do paracetamol e ácido acetilsalicílico. Adaptado de ARAÚJO *et al.*, 2015.

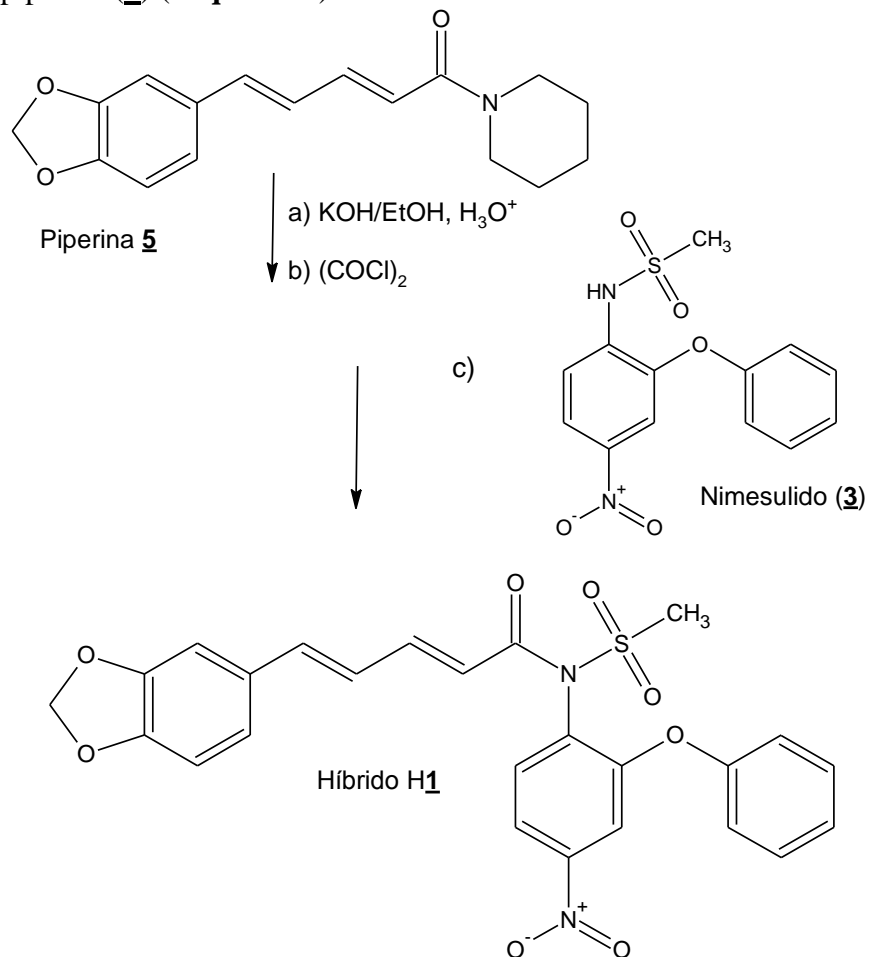
Diversos estudos relatam a utilização exitosa da hibridação molecular para a construção de famílias de compostos com ação biológica desejada, a partir de uma molécula protótipo. Por exemplo, o emprego da estratégia vem crescendo no planejamento de híbridos para tratamento de infecções causadas por bactérias. Nas últimas décadas, as bactérias patogênicas desenvolveram resistência às classes de antibióticos clinicamente importantes, por isso, várias tentativas híbridas são feitas no intuito de combinar alvos e classes químicas. Por exemplo, a ciprofloxacina exerce sua ação inibindo a replicação do DNA da bactéria, mas este medicamento enfrenta hoje o problema da resistência. Um híbrido da ciprofloxacina e de outro antibiótico, neomicina, produziu o protótipo de uma família com melhor atividade antibacteriana (POKROVSKAYA *et al.*, 2009). Moléculas híbridas com ação antitumoral também vêm sendo testadas nos últimos anos, obtendo-se estruturas químicas promissoras com mecanismo de ação sobre os microtúbulos²² (NEPALI *et al.*, 2014). Moléculas agentes cardioativas promissoras também foram desenvolvidas a partir da estratégia de hibridação de propranolol (bloqueador β -adrenérgico) e zatebradine (fármaco que promove a diminuição da contratilidade cardíaca) (WYNSEN *et al.*, 1994). Com relação às doenças infecciosas, é necessário atentar para a rapidez com que os micro-organismos adquirem resistência aos fármacos de tratamento, fato agravante no quadro de pacientes imunossuprimidos. Por isso, a hibridação molecular torna-se importante ainda na concepção de novos padrões moleculares, capazes de gerar fármacos potenciais para o combate aos micro-organismos patogênicos resistentes (NEPALI *et al.*, 2014).

²² Os microtúbulos são extremamente importantes no processo de mitose, durante os quais os cromossomos duplicados de uma célula se separam em dois conjuntos idênticos, antes da clivagem da célula em duas células-filhas. Sua importância na mitose e divisão celular torna-os um alvo importante para fármacos anticâncer (NEPALI *et al.*, 2014).

Resultados II

Planejamento do primeiro híbrido H₁.

Neste contexto, objetivando o estudo SAR da atividade tripanocida resultante, a síntese do primeiro híbrido neste estudo (H₁) entre piperina (5) e nimesulida (3) partiu da consideração da importância da cadeia insaturada na atividade piperínica (FERREIRA *et al.*, 2012). Dessa forma, a hibridação molecular proposta foi a substituição da amida piperidínica por grupamento oriundo da nimesulida (3), mantendo-se todo o esqueleto restante da piperina (5) (Esquema 2).



Esquema 2. Proposta de planejamento do primeiro híbrido molecular neste estudo piperina-nimesulida (H₁).

Com esta estratégia pretendeu-se somar ao possível efeito da nimesulida no equilíbrio redox do *T. cruzi*, evidenciado pelos resultados obtidos neste trabalho, à ação da amida natural piperina no bloqueio da citocinese do parasito (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2008).

Na sequência, constam os passos para a obtenção do primeiro híbrido (**H1**) a partir da piperina (**5**) e da nimesulida (**3**, **Esquema 2**), além das caracterizações dos intermediários obtidos.

Isolamento da piperina (5**) dos frutos secos de *Piper nigrum*.**

A etapa inicial envolveu a obtenção da piperina (**5**) em quantidades adequadas para a execução das transformações químicas planejadas. A amida (**5**) foi então extraída de frutos secos de *Piper nigrum*, utilizando etanol como solvente extrator, em aparelhagem de Soxlet (**Figura 42**) (RIBEIRO, 2004). O extrato foi reduzido em um evaporador rotatório, gerando um óleo castanho escuro, ao qual foi adicionado solução de KOH 10% para remover as substâncias indesejadas (fenóis e taninos) que precipitam na forma de sais de potássio em KOH etanólico. Além disso, os açúcares presentes nos taninos também precipitam em etanol, após hidrólise dos respectivos ésteres (KIUCHI *et al.*, 1988). Após filtração, a solução básica foi acrescida de água até turvação do meio. Os cristais formados foram filtrados em funil de Buchner e lavados consecutivamente, com água e éter etílico gelados. Formaram-se cristais em agulhas amarelo-claros. O rendimento das extrações variou de 3 a 7%, com adequado grau de pureza. O ponto de fusão determinado foi 126-127 °C, que está de acordo com a faixa descrita (126-127 °C, IKAN, 1991). A pureza do material obtido foi confirmada através dos métodos convencionais de análise (RMN, IV e EM). Os dados obtidos nas análises foram compatíveis com a estrutura da piperina (**5**) e com as informações descritas na literatura (IKAN, 1991; RIBEIRO, 2004).



Figura 42. Aparelhagem para extração da piperina (**5**). Extrator de Soxhlet, condensador, balão de fundo redondo e manta de aquecimento. Imagem retirada de (FERREIRA, 2006).

O espectro de infravermelho (**Espectro 9, página 153**) apresentou um sinal intenso em 1633 cm^{-1} referente à carbonila da amida e, outro em 2940 cm^{-1} , indicativo de estiramento de metilenos do anel piperidínico. No espectro de RMN ^1H (**Espectro 10, página 154**), o sinal em $\delta\ 5,98$ ppm confirma a presença dos dois hidrogênios do grupamento metilenodioxí. Os sinais hidrogênicos da cadeia olefínica estão inseridos entre $\delta\ 6,43$ e $7,44$ ppm. Na análise de RMN ^{13}C (**Espectro 11, página 154**), a carbonila aparece representada em $\delta\ 165,42$ ppm e o metilenodioxí, em $\delta\ 101,28$. O EM (**Espectro 12, página 156**) apresenta o pico do íon molecular $m/z\ 285$. Em cada espectro, aparecem os sinais característicos e outros compatíveis com o descrito na literatura para a amida extraída (**5**) (FERREIRA, 2006).

Preparação do ácido piperínico (**6**) a partir da hidrólise da piperina (**5**).

Após obtenção da piperina (**5**), procedeu-se à hidrólise da função amida presente em sua estrutura para obtenção do ácido piperínico (**6**). A hidrólise de amidas leva à quebra da ligação entre o carbono da carbonila e o átomo de nitrogênio, gerando os respectivos ácido e amina. Diferentemente das reações de hidrólise de ésteres, as amidas são muito mais refratárias às condições de hidrólise básica, ou mesmo ácida. A hidrólise de amidas ocorre somente após refluxo demorado em presença de ácidos ou bases fortes (OUELLETE e RAWN, 2015). A hidrólise básica da piperina (**5**), descrita por IKAN (1991), forneceu o ácido carboxílico correspondente em bons rendimentos (90%). No entanto, a condução da reação em reator de micro-ondas reduziu o tempo reacional para cerca de 2 horas, gerando o mesmo produto em rendimento de 85% (**Figura 43**).

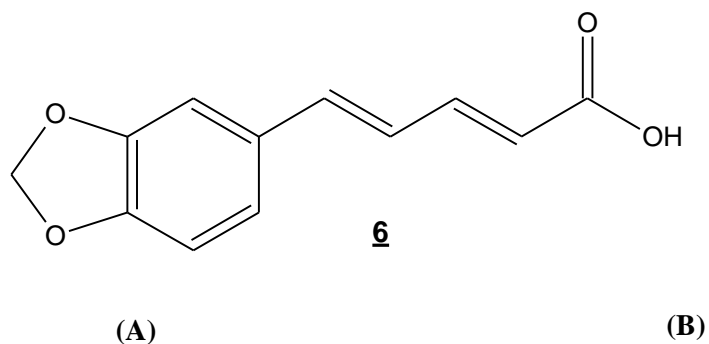
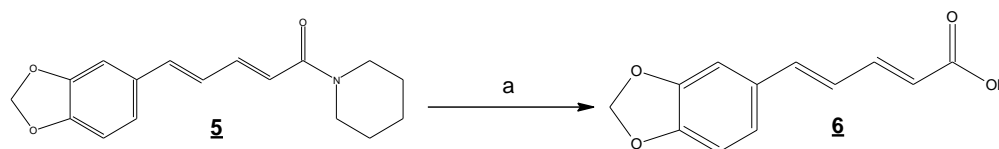


Figura 43. (A). Estrutura química do ácido piperínico (**6**), ácido (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il) penta-2,4-dienoico. (B) Reator de micro-ondas utilizado durante a reação.
Imagem retirada de FRANKLIM, 2013.

O aquecimento não-clássico da mistura reacional, utilizando o reator de micro-ondas como fonte de calor, é uma técnica em síntese orgânica que permite, normalmente, se alcançar melhores rendimentos, com tempos reacionais bem mais curtos (MAOS, do inglês *Microwave Assisted Organic Synthesis*) (KAPPE, 2009). A execução da hidrólise da piperina, com aquecimento clássico em refluxo, durou 12 horas para obtenção do produto desejado, enquanto na reação sob radiação de micro-ondas (Equipamento Discovery-CEM),

observou-se que em pouco mais de 1 hora de reação o produto já havia sido formado, o que torna esta alternativa mais atraente, devido à economia de tempo. A reação está representada no **Esquema 3**.



Condições reacionais: (a) KOH, etanol. Refluxo, 12 h (aquecimento convencional) ou 1 h (micro-ondas: 92 °C, 50 W); HCl (até pH 3-4). (90% e 85%), respectivamente).

Esquema 3. Reação de preparação do ácido piperínico (**6**).

O ponto de fusão do sólido obtido ficou na faixa 217-218 °C, o que está de acordo com os dados encontrados na literatura (216-217 °C, IKAN, 1991). A pureza da substância foi confirmada através dos métodos convencionais de análise (RMN, IV e EM). Os dados apresentados nos espectros foram compatíveis com a estrutura do ácido piperínico (**6**) e com as informações descritas na literatura (IKAN, 1991; RIBEIRO, 2004). Uma banda larga em 2918-2544 cm^{-1} no espectro de infravermelho (**Espectro 13, página 157**) representa o estiramento da ligação OH do ácido carboxílico obtido. Ainda: uma absorção a 1673 cm^{-1} , característica da carbonila de ácido conjugado, apareceu como sinal intenso. No espectro de RMN de ^1H (**Espectro 14, página 158**) observou-se um sinal largo em δ 6,05 ppm relativo ao hidrogênio metilênico. Outros sinais presentes foram compatíveis com a estrutura de (**6**). No espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 15, página 158**), o carbono da carbonila mostrou um sinal característico em δ 167,13 ppm. O espectro de massas (**Espectro 16, página 160**) mostrou o pico do íon molecular m/z 218 e outros fragmentos característicos para o ácido piperínico (**6**) (FERREIRA, 2006).

Preparação do cloreto do ácido piperínico (7**).**

O cloreto do ácido piperínico (**7**) é muito mais reativo que o ácido carboxílico correspondente (**6**). Por isso, a próxima etapa foi a preparação do cloreto do ácido piperínico (**7**) necessário para a reação subsequente com a nimesulida (**3**). Devido a sua instabilidade em atmosfera úmida, o cloreto de acila (**7**) foi preparado *in situ* empregando o reagente cloreto de oxalila (COCl_2) na reação com ácido piperínico (**6**), em temperatura ambiente, com formação de subprodutos gasosos (CO e CO_2), o que representa uma vantagem pela não-contaminação do produto (MARCH, 1985). O curso da reação foi acompanhado indiretamente por cromatografia em camada fina, através da reação com metanol para a formação do éster metílico. Após a remoção do excesso de cloreto de oxalila, em evaporador rotatório, o cloreto de acila (**7**) foi logo utilizado.

Preparação do primeiro híbrido (H1).

O cloreto de ácido piperínico (**7**), gerado *in situ*, foi imediatamente utilizado na reação de substituição nucleofílica com a nimesulida (**3**) para formação da sulfonamida H1,

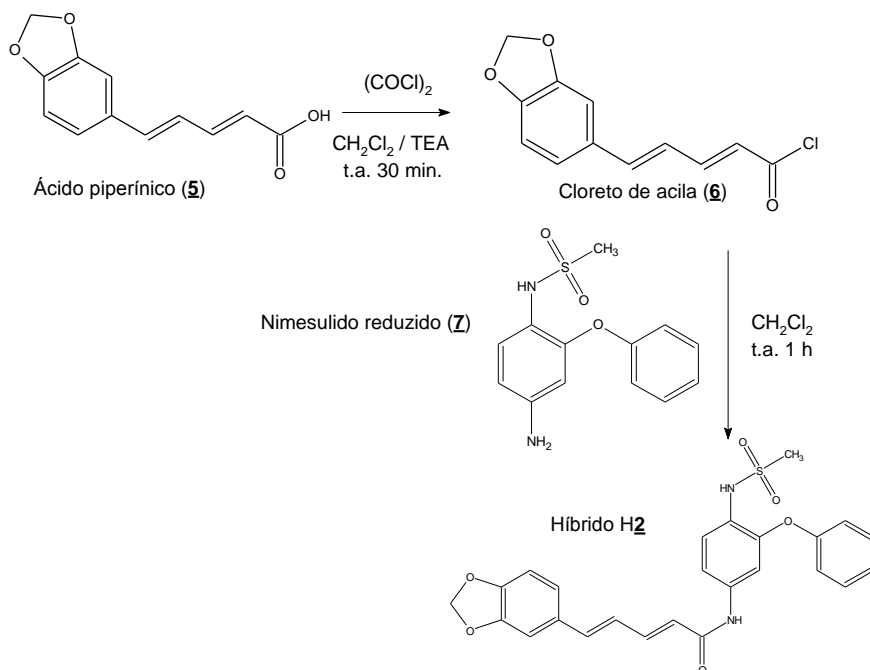
obtida em 60% de rendimento. A metodologia seguiu a adição da nimesulida (**3**) à solução do cloreto de acila (**7**), ambos em diclorometano, e em presença de trietilamina, como descrito pela literatura (PERICHERLA *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2004). O ponto de fusão encontrado para **H1** foi 145-146 °C. O produto foi caracterizado pelos métodos convencionais de análise, e apresentou dados espectroscópicos compatíveis com sua estrutura.

Observou-se no **Espectro 17 (página 161)** de infravermelho, o sinal em 1687 cm⁻¹ relativo ao estiramento C=O de carbonila de amida dissustituída. Outra banda em 1253 cm⁻¹ revela a vibração angular C-O-C do grupo metilenodioxi. Em 1591 e 1114 cm⁻¹ sinais referentes às vibrações de C sp² do anel aromático. No espectro de RMN ¹H foi observado o sinal simples em δ 6,01 ppm referente aos dois hidrogênios do carbono metilênico. Também foram observados sinais múltiplos na região entre δ 6,94 ppm e δ 5,77 ppm, característicos dos hidrogênios da cadeia olefínica. O sinal simples em δ 3,54 ppm refere-se aos hidrogênios metílicos. (**Espectro 18, página 162**). No espectro de RMN ¹³C (**Espectro 19, página 163**) foi observado o sinal δ 165,80 ppm, referente ao carbono da carbonila. Os sinais em δ 154,00 ppm e em δ 155,88 ppm são relativos aos carbonos ligados aos átomos de nitrogênio imídico e do grupo nitro, respectivamente. Um sinal em δ 42,61 ppm refere-se ao carbono metílico, além de outros sinais compatíveis com a estrutura construída.

No espectro de massas de alta resolução (**Espectros 20 e 21, páginas 165 e 166**), a massa observada foi de 531,08331 Da (M⁺ + Na⁺). Sendo a massa monoisotópica calculada = 531,08380 Da, o valor de massa obtido representa uma variação de 0,0001% de unidade de massa (a variação deve ser inferior a 0,005%, PAVIA *et al.*, 2013).

Preparação do segundo híbrido (H2).

Tendo obtido o derivada nimesulida reduzida (**4**), ele foi utilizado na preparação do segundo híbrido **H2**, através de reação de acilação com o cloreto de ácido (**7**). O **Esquema 4** mostra a preparação do produto **H2**. Cabe destacar nesse ponto a maior nucleofilicidade do Nitrogênio amínico, comparado ao seu congênere, presente na sulfonamida, desta forma, a reação de acilação foi quimiosseletiva, levando, nestas condições, à formação somente do derivado acilado no átomo de Nitrogênio da anilina. Este mesmo tipo de observação foi feita por PERICHERLA (2007) e colaboradores em seu trabalho de derivatização da molécula da nimesulida.



Esquema 4. Proposta de planejamento do segundo híbrido molecular neste estudo piperina-nimesulida (**H2**).

O cloreto de ácido piperínico (**7**) gerado *in situ* foi imediatamente utilizado na reação com a nimesulida reduzida (**4**) para formação do segundo híbrido **H2**, com 60% de rendimento. A metodologia seguiu a adição da nimesulida reduzida (**4**) à solução do cloreto de acila (**7**), ambos em diclorometano, como descrito pela literatura (RIBEIRO *et al.*, 2004). O ponto de fusão encontrado para **H2** foi 192-193 °C. O produto foi caracterizado pelos métodos convencionais de análise e apresentou dados espectroscópicos compatíveis com sua estrutura.

No espectro de infravermelho (**Espectro 22, página 167**), o estiramento N-H da amida secundária está sinalizada em 3265 cm^{-1} e a deformação angular N-H da sulfonamida aparece em 1616 cm^{-1} . O sinal 1249 cm^{-1} referente ao carbono do grupamento metilenodioxí também pode ser observado. No espectro de RMN ^1H (**Espectro 23, página 168**), foram observados um sinal simples em δ 9,43 ppm referente ao hidrogênio da amida secundária e um sinal simples em δ 8,21 ppm referente ao hidrogênio da sulfonamida, além de outros compatíveis com a estrutura de **H2**. No espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 24, página 169**) foi observado um sinal δ 163,91 ppm referente ao carbono da carbonila. O sinal do carbono do grupo metila aparece em δ 39,16 ppm.

No espectro de massas de alta resolução (**Espectros 25 e 26, páginas 171 e 190**), a massa observada foi de 479,12722 Da ($\text{M}^+ + 1$). Sendo a massa monoisotópica calculada= 479,119859 Da, o valor de massa obtido representa uma variação de 0,001% de unidade de massa (a variação deve ser inferior a 0,005%, PAVIA *et al.*, 2013).

Avaliação da atividade da piperina (5**) extraída sobre formas epimastigotas.**

Conforme citado, a piperina (**5**) tem sido estudada pelo nosso grupo de pesquisa, na UFRRJ. Porém, os dados obtidos até então para a atividade desta substância (**5**) foram obtidos a partir de um isolado da cepa Y, distinto daquele utilizado neste estudo. Ademais, não havia ainda sido feitas as análises de MET para o estudo do comportamento das alterações ultraestruturais dos parasitos, após indefinidas passagens de epimastigotas, conforme foi realizado nesta tese. Desta forma, buscando padronização dos resultados, se fez necessária a realização de novo teste de atividade de piperina (**5**) frente ao parasito. Para o ensaio, as formas epimastigotas de *T. cruzi*, em fase exponencial de crescimento, foram resuspendidas em meio de cultura fresco e adicionadas em placas de 48 poços, utilizando-se inóculo de 2×10^5 parasitos $\times \text{mL}^{-1}$, na presença ou não de diferentes concentrações da piperina (**5**), 100, 50, 10 e 1 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. O crescimento e as alterações morfológicas da cultura foram acompanhados por microscopia óptica e a quantificação realizada em câmara de Neubauer, em microscópio óptico em aumento de 40x. Este resultado encontra-se na **Figura 44**.

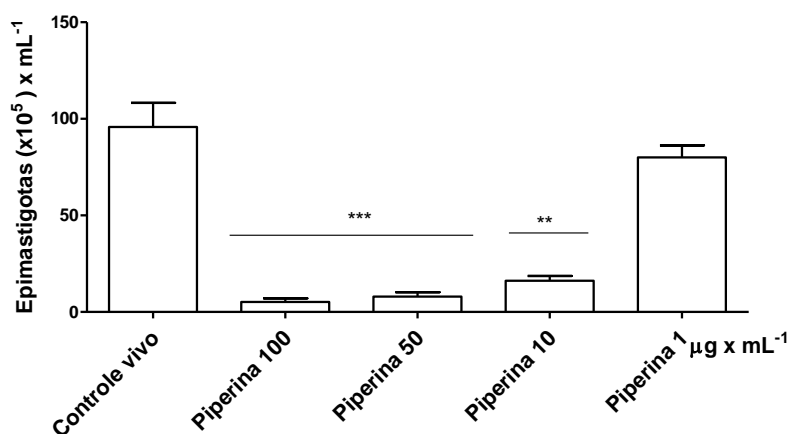


Figura 44. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com piperina (**5**) nas concentrações indicadas. Os parasitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 células $\times \text{mL}^{-1}$ e tratados em placas de 48 poços com quatro concentrações da amida (**5**), variando de 1 a 100 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. A viabilidade celular foi obtida pelo método de exclusão utilizando azul de Tripán. Observa-se atividade da molécula (**5**) nas três maiores concentrações. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

Analisando o efeito da piperina (**5**) (**Figura 44**), é possível concluir que há uma evidente inibição do crescimento de epimastigotas nas três maiores concentrações utilizadas. Em contrapartida, na concentração de 1 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$, a molécula perde atividade. Foi necessário então eleger uma faixa menor de concentração, para a determinação da concentração inibitória média (CI_{50}) para o composto (**5**), uma vez que não houve um comportamento dose-resposta em todos os intervalos de concentração mostrados acima. De acordo com o observado na **Figura 44**, deduz-se que, provavelmente, a faixa da concentração inibitória frente às formas epimastigotas, deveria estar entre 1 e 10 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. Apostando-se nesta hipótese, um próximo ensaio foi conduzido nas mesmas condições experimentais, mas em concentrações inseridas nesta faixa menor (1; 2,5; 5 e 10 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$)

O estudo levou aos resultados apresentados na **Figura 45**. O ensaio foi conduzido tendo como referência o benznidazol (**2**) **Figura 46**.

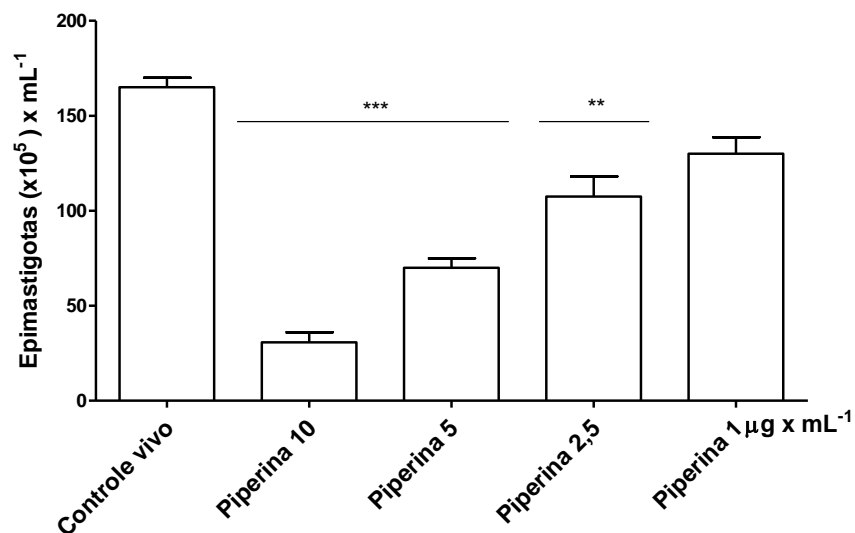


Figura 45. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com piperina (**5**) nas concentrações indicadas. Os parasitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 parasitos $\times \text{mL}^{-1}$ e tratados em placas de 48 poços com quatro concentrações da amida (**5**), variando de 1 a 10 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. A viabilidade celular foi obtida pelo método de exclusão utilizando azul de Tripán. Observa-se atividade da molécula (**5**) nas quatro concentrações do ensaio. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

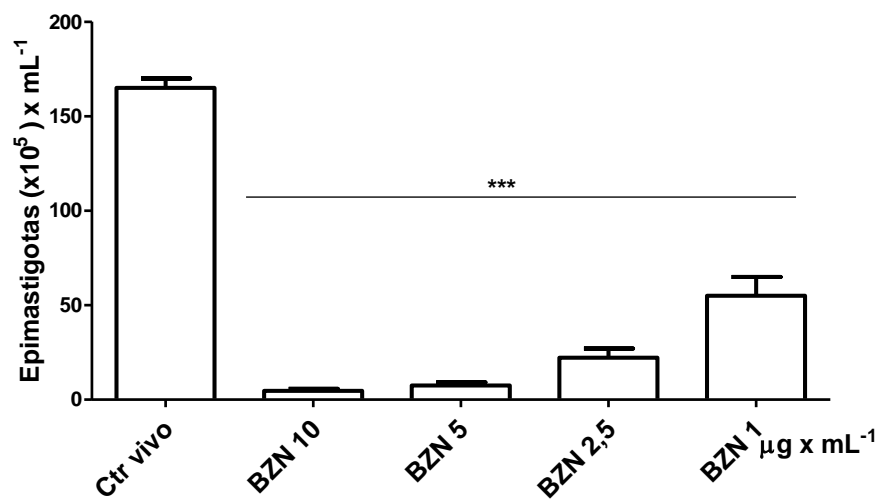


Figura 46. Avaliação da viabilidade de formas epimastigotas tratadas e não tratadas com benznidazol (**2**) nas concentrações indicadas. Os parasitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 células $\times \text{mL}^{-1}$ e tratados em placas de 48 poços com quatro concentrações do fármaco (**2**), variando de 1 a 10 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$. A viabilidade celular foi obtida pelo método de exclusão utilizando azul de Tripán. Observa-se atividade da molécula (**2**) nas quatro concentrações do ensaio. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

Desta maneira, a interpolação dos dados nos gráficos foi possível de ser feita no programa de análise, gerando os valores de concentração inibitória CI_{50} para a piperina. Na **Tabela 8** estão resumidos os dados gerados.

Tabela 8. Valores de CI_{50} da piperina (**5**) contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), através do método de exclusão com azul de Tripán.

Substância	CI_{50} <i>T. cruzi</i> (μ M)	CI_{50} <i>T. cruzi</i> (μ g x mL ⁻¹)
Piperina (5)	(18,1±1,74)	(5,17±0,49)
Benznidazol (2)	(3,82±0,65)	(0,99±0,17)

A observação do resultado encontrado para a toxicidade da piperina (**5**) contra os epimastigotas de *T. cruzi* (CI_{50} 18,1 μ M), nas condições em que os ensaios foram realizados neste trabalho, é extremamente importante, pois demonstra, pela variação dos dados obtidos (CI_{50} 7,36 μ M; RIBEIRO *et al.*, 2004), a importância da repetição dos ensaios de toxicidade dos padrões utilizados em função, principalmente, de variações fenotípicas existentes entre isolados distintos de uma mesma cepa. Esse cuidado na obtenção dos resultados experimentais é fundamental na validação de um estudo realizado e, particularmente, pode exercer grande influência nas conclusões que serão obtidas ao final do mesmo.

Avaliação da atividade dos híbridos H1 e H2 sobre formas epimastigotas.

Para a avaliação da atividade dos híbridos H1 e H2 construídos, os parasitos em fase exponencial de crescimento foram ressuspensos em meio de cultura fresco, e adicionados em microplacas de 96 poços, utilizando-se um inóculo de 2×10^5 parasitos x mL⁻¹, na presença ou não de diferentes concentrações de H1 e H2. Foram utilizadas concentrações na faixa de 1,56 μ M a 100 μ M, em diluição seriada, com fator de diluição igual a dois. Após incubação, a viabilidade dos parasitos frente a ambos os híbridos foi avaliada através do ensaio do MTT (MUELAS-SERRANO *et al.*, adaptado, 2000). O efeito tripanocida foi mensurado pelo percentual de inibição de crescimento dos parasitos, em relação ao controle, em 50% (CI_{50}) para H1 e H2 (**Figuras 47 e 48**, respectivamente). Como referência no teste, utilizou-se o fármaco benznidazol (**2**) (**Figura 49**).

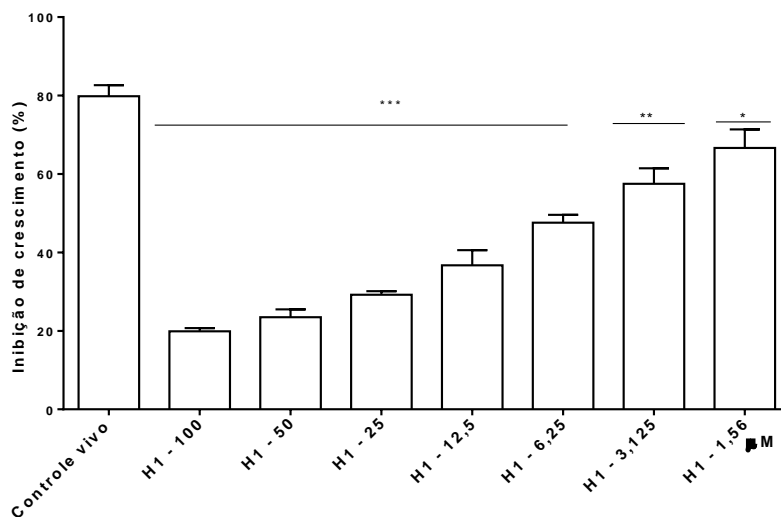


Figura 47. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com **H1** nas concentrações indicadas. Os parasitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 células \times mL⁻¹. As células foram tratadas por 48 horas com sete concentrações de **H1**, variando de 1,56 a 100 μ M. A viabilidade celular foi obtida pelo método do MTT. Observa-se capacidade inibitória em todas as concentrações da faixa escolhida. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

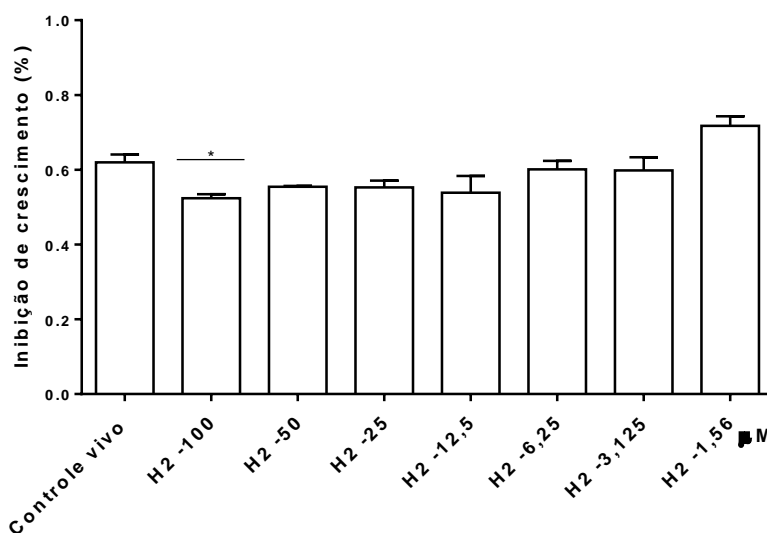


Figura 48. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com **H2** nas concentrações indicadas. Os parasitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 células \times mL⁻¹. As células foram tratadas por 48 horas com sete concentrações de **H2**, variando de 1,56 a 100 μ M. A viabilidade celular foi obtida pelo método do MTT. Observa-se capacidade inibitória restrita à maior concentração da faixa escolhida. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

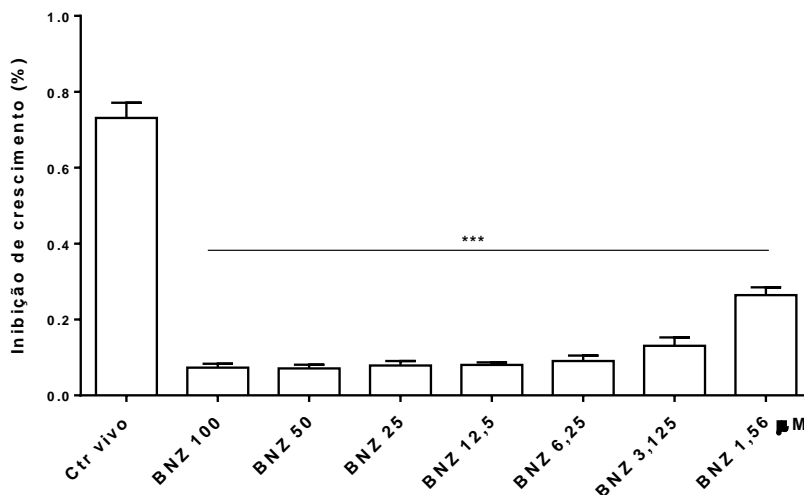


Figura 49. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com benznidazol (**2**) nas concentrações indicadas. Os parasitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 células \times mL⁻¹. As células foram tratadas por 48 horas com sete concentrações do fármaco (**2**), variando de 1,56 a 100 μ M. A viabilidade celular foi obtida pelo método do MTT. Observa-se capacidade inibitória do benznidazol (**2**) em todas as concentrações da faixa escolhida. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

Desta maneira, a interpolação dos dados foi possível de ser feita no programa de análise, gerando os valores de concentração inibitória CI₅₀ para ambos os híbridos **1** e **2** contra as formas epimastigotas, utilizando o fármaco benznidazol (**2**) como referência. Os valores estão resumidos na **Tabela 9**.

Tabela 9. Valores de CI_{50} dos híbridos moleculares testados contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), através do método colorimétrico do MTT.

Substância	CI_{50} <i>T. cruzi</i> (μ M)	CI_{50} <i>T. cruzi</i> (μ g x mL ⁻¹)
Híbrido H $\underline{1}$	(9,27 \pm 0,83)	(4,71 \pm 0,42)
Híbrido H $\underline{2}$	>100	~50
Benznidazol ($\underline{2}$)	(1,40 \pm 0,13)	(0,36 \pm 0,03)

O experimento revelou que o híbrido H $\underline{1}$ foi ativo sobre as formas epimastigotas, enquanto que o híbrido H $\underline{2}$ não mostrou efeito nocivo contra os parasitos, nas concentrações testadas (CI_{50} >100 μ M). Este dado permite inferir que a porção NO $_2$ presente no primeiro híbrido $\underline{1}$ foi fundamental para a atividade tripanocida da estrutura construída, sendo possivelmente a entidade farmacofórica já que, após ser quimicamente reduzida, o produto resultante não foi capaz de inibir o crescimento das formas epimastigotas do *T. cruzi* tanto quanto o composto anterior. Provavelmente o grupamento nitro realiza interações com biorreceptores que o faz ter caráter farmacofórico. Desta forma, não se deu prosseguimento a novos testes com H $\underline{2}$.

Avaliação do potencial citotóxico do híbrido H $\underline{1}$ em culturas de macrófagos e linfócitos esplênicos.

Na sequência do estudo, pretendia-se infectar macrófagos peritoneais com o *T. cruzi* e realizar o tratamento da infecção com o híbrido H $\underline{1}$. Por isso, o composto $\underline{1}$ foi submetido ao teste para avaliação de seu potencial tóxico frente às células primárias. Assim, em um primeiro momento, foi testado em culturas de macrófagos peritoneais murinos, células susceptíveis de sofrerem infecção pelo *T. cruzi*. As células foram obtidas do lavado peritoneal de camundongos Balb/c e tratados por 48 horas com a molécula. A determinação da viabilidade celular foi feita pelo método XTT, em leitura no comprimento de onda a 490 nm (**Figura 50**). Em seguida, foi realizado ensaio de viabilidade em uma população enriquecida de linfócitos esplênicos, igualmente tratados por 48 horas com a molécula e avaliado pelo método do XTT (**Figura 51**).

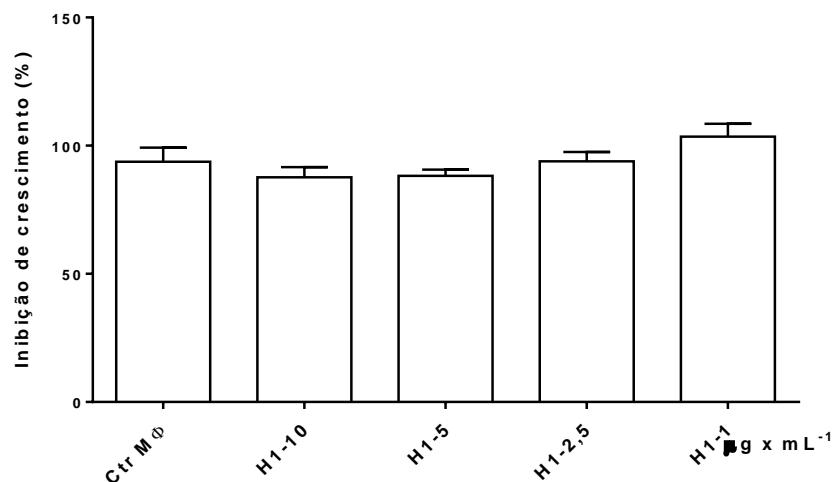


Figura 50. Avaliação da viabilidade celular em macrófagos peritoneais murinos tratados com H1 nas concentrações indicadas. Os macrófagos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 células x mL⁻¹. As células foram tratadas por 48 horas com quatro concentrações do híbrido H1, variando de 1 a 10 μg x mL⁻¹. A viabilidade celular foi obtida pelo método do XTT. Não se observa citotoxicidade significativa em relação ao controle vivo em nenhuma das concentrações testadas. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

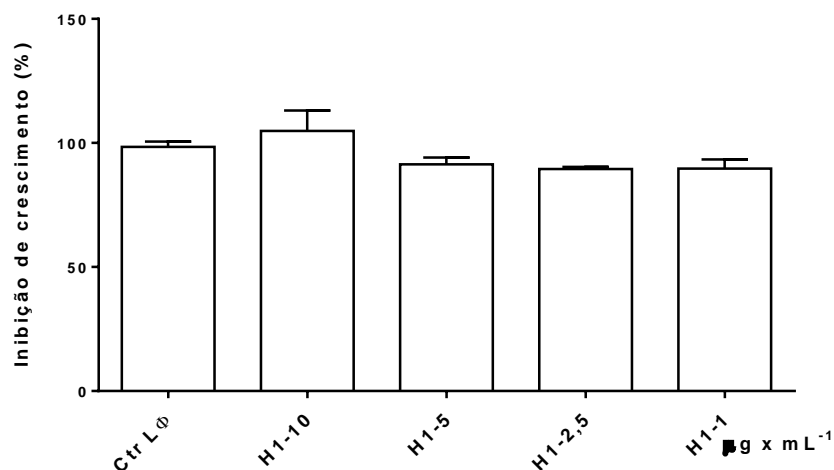


Figura 51. Avaliação da viabilidade celular em cultura de células enriquecida de linfócitos esplênicos murinos tratados com **H1** nas concentrações indicadas. Os esplenócitos foram cultivados em triplicata na concentração de 2×10^5 células x mL⁻¹. As células foram tratadas por 48 horas com quatro concentrações do híbrido **1**, variando de 1 a 10 μg x mL⁻¹. A viabilidade celular foi obtida pelo método do XTT. Não se observa citotoxicidade significativa em relação ao controle vivo nas concentrações testadas. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

Conforme apresentado nas duas figuras anteriores, não se observou citotoxicidade da molécula **H1** nem aos macrófagos nem aos linfócitos tratados pela mesma. A verificação da atividade de **H1** frente às formas epimastigotas com a concomitante manutenção da viabilidade das células murinas, quando na presença de **H1**, possibilitaram a realização de um experimento de infecção *in vitro*, para verificar o comportamento da molécula sobre outras formas evolutivas do parasito.

Avaliação do efeito citotóxico do híbrido **H1 na linhagem LLCMK2.**

Neste ponto, novamente, as formas tripomastigotas foram obtidas da infecção de células de linhagem LLCMK2, recolhidas nos dias de pico de liberação e utilizadas imediatamente para a infecção dos macrófagos. Uma vez que este tipo celular estava envolvido na pesquisa, buscou-se identificar a ação de **H1** na manutenção da viabilidade desta célula, utilizando a metodologia do MTT. Resultou que, também neste caso, o híbrido **1** não interferiu na preservação destas formas celulares, com nenhuma significância estatística, conforme evidenciado na **Figura 52**.

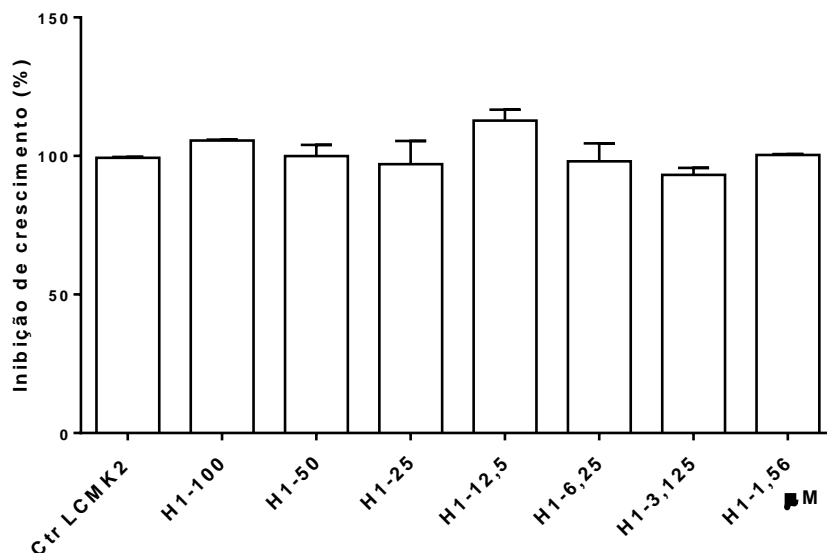


Figura 52. Avaliação da viabilidade de células de linhagem LLCMK2 tratadas com H1 nas concentrações indicadas. As células foram cultivadas em triplicata na concentração de 2×10^5 células \times mL⁻¹ e tratadas por 48 horas com sete concentrações do híbrido 1, variando de 1,56 a 100 μ M. A viabilidade celular foi obtida pelo método do MTT. Não se observou ação citotóxica do H1 em nenhuma das concentrações. Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

Com isso, índice de seletividade para o H1 (CI_{50} na célula/ CI_{50} no *T. cruzi*) resultou em valor maior que 10, considerado bom índice.

Efeito *in vitro* do híbrido H1 na proliferação de amastigotas, em macrófagos peritoneais murinos infectados pelo *T. cruzi*.

O ensaio para a avaliação da proliferação de amastigotas intracelulares na presença de H1 foi conduzido semeando-se 2×10^5 macrófagos em lamínulas, dentro de placa de 24 poços, por 72 horas, na presença ou não H1 e do fármaco de referência (2), na concentração de 35 μ M. Após este tempo de incubação, as lamínulas foram fixadas e coradas para a quantificação das formas amastigotas (Figura 53).

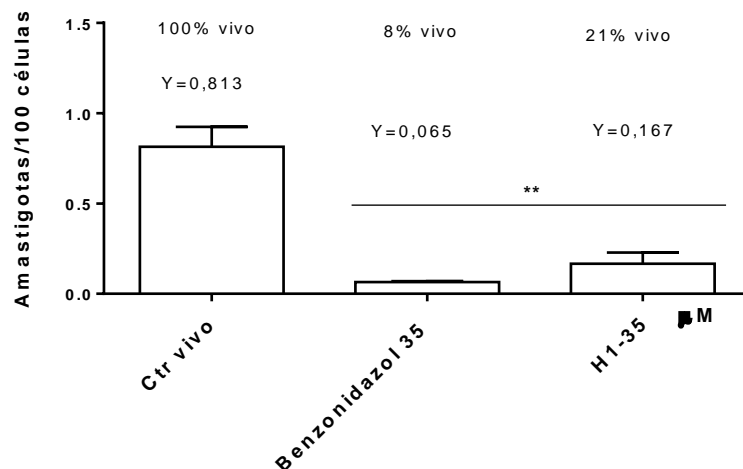


Figura 53. Inibição da proliferação de formas amastigotas de *T. cruzi* *in vitro* em macrófagos peritoneais murinos infectados. Foram semeados em lamínulas, em placas de 24 poços, 2×10^5 macrófagos e infectados com tripomastigotas, com multiplicidade de infecção 3:1. As culturas foram tratadas com H1, na concentração de 35 μM e incubadas em atmosfera com 5% de CO_2 a 37 $^\circ\text{C}$. O mesmo procedimento foi realizado com o fármaco de referência benznidazol (2). Após 72 horas de tratamento, as lamínulas foram fixadas e coradas para a quantificação do número de amastigotas em microscópio óptico, no aumento de 100x. Observa-se a inibição de 79% da proliferação das formas amastigotas tratadas por H1 e 92% quando tratadas pelo BZN (2). Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

Neste experimento, nota-se uma expressiva capacidade na inibição de proliferação de amastigotas, após os macrófagos infectados serem tratados com H1. Este resultado é de extrema importância, visto que esta forma replicativa presente no hospedeiro vertebrado é a responsável pela manutenção da infecção, com formação de ninhos de amastigotas em diferentes tecidos. A molécula reduziu em cerca de 79 % a multiplicação das formas parasitárias, valor significativo quando comparado ao efeito causado pelo benznidazol (2), nas mesmas condições (92%) (Figura 53). Pelos resultados apresentados, o híbrido H1 mostra-se como uma molécula que possui expressiva ação tripanocida sobre as duas formas evolutivas de *T. cruzi* testadas, sem comprometimento da viabilidade das populações celulares empregadas nos experimentos. Tal toxicidade seletiva é crucial para que a molécula candidata seja empregada em futuras avaliações nos modelos de infecção *in vivo*.

Efeito *in vitro* do híbrido H1 na liberação de tripomastigotas, em macrófagos peritoneais murinos infectados pelo *T. cruzi*.

Para mensurar a atividade de H1 sobre as formas tripomastigotas, foi realizado um experimento de infecção *in vitro* de macrófagos obtidos através de lavados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c. A multiplicidade de infecção foi ajustada para 3 formas tripomastigotas para cada macrófago (PAIVA, *et al.*, 2012). Os macrófagos infectados foram tratados e não tratados com H1 e benznidazol (2), utilizado como fármaco

de referência no ensaio. Ambas as substâncias foram utilizadas na concentração de 35 μ M. As formas tripomastigotas liberadas no sobrenadante, nos dias sete e nove pós-infecção, foram quantificadas em câmara de Neubauer, em microscópio óptico no aumento de 40x (MULLEN *et al.*, 1975) (**Figura 54**).

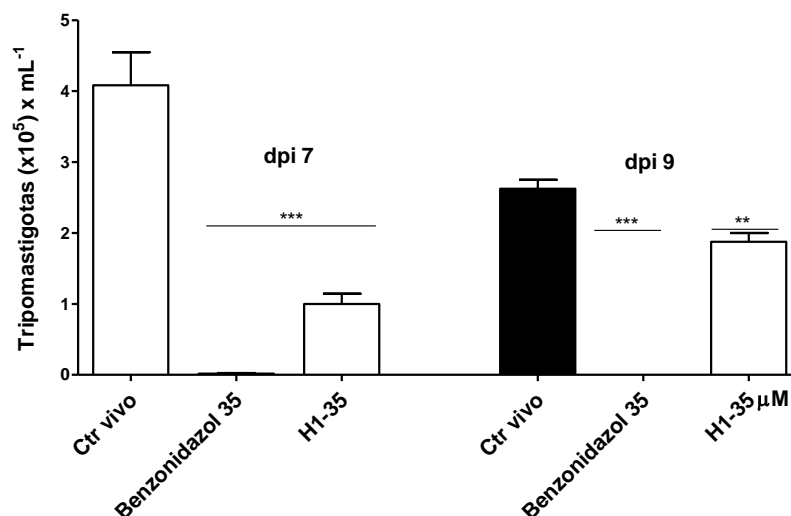


Figura 54. Inibição da liberação de formas tripomastigotas de *T. cruzi* em macrófagos peritoneais murinos infectados. Foram plaqueados 1×10^5 macrófagos e infectados com tripomastigotas, com multiplicidade de infecção 3:1. As culturas foram tratadas com H1 nas concentrações de 35 μ M e incubadas em atmosfera com 5% de CO $_2$ a 37 °C. O mesmo procedimento foi realizado com o fármaco de referência benznidazol (2). As formas tripomastigotas liberadas no sobrenadante foram quantificadas, nos dias sete e nove pós-infecção, pelo método de exclusão utilizando azul de Tripán. Observou-se a inibição da liberação em nos dois dias, por ambos os compostos H1 e (2). Resultados representativos de dois experimentos independentes, com as culturas comparadas utilizando o teste ANOVA, do programa *GraphPad Prism*, versão 5. (***) $p < 0,0001$; (*) e (**) $p < 0,05$.

Os resultados apresentados mostraram que o H1 inibiu a liberação de formas tripomastigotas significativamente, em ambos os dias de pico de liberação dos parasitos. A toxicidade seletiva do H1 frente a esta forma infectiva de *T. cruzi* é importante, uma vez que, as tripomastigotas celulares liberadas *in vivo* são as responsáveis pela manutenção da infecção e proliferação dos parasitos no hospedeiro.

Discussão II

Ao que parece, todas as premissas utilizadas para a realização deste estudo, argumentaram a favor dos resultados obtidos. A piperina (5) não é nociva à saúde, uma vez que é amplamente utilizada na indústria alimentícia desde há muitos anos, sendo em contrapartida, detentora de inúmeras atividades farmacológicas. Com isso, pode-se pressupor que a administração da substância seja feita de maneira relativamente segura. De sua parte, a nimesulida (3) é um medicamento com propriedades farmacológicas bem estabelecidas. No âmbito do planejamento de novos fármacos com possibilidades de aplicação em quimioterapia antiparasitária, um aspecto imprescindível a ser considerado é a seletividade existente entre as células hospedeiras e as células dos agentes infecciosos, causadores da doença. Como visto, ambas as substâncias (3) e (5) não demonstraram efeito tóxico às células primárias testadas *in vitro* neste estudo, fatos que suportam a hipótese de empregá-las na construção de híbridos moleculares visando à ação medicinal contra DC.

Uma das características descritas na coadministração de piperina com outros compostos é o aumento da biodisponibilidade destes, traduzindo-se numa maior concentração plasmática dos mesmos. Tal efeito foi constatado em estudos com vasicina, esparteína (ATAL *et al.*, 1981), propranolol, teofilina, fenitoína (BANO *et al.*, 1991) e curcumina (SHOBA *et al.*, 1998). A maioria dos trabalhos relata um aumento de 100% na concentração de tais substâncias na corrente sanguínea. Algumas das vias de ação conhecidas da piperina (5) podem justificar a potencialização de fármacos na coadministração. A amida (5) causa alteração na permeabilidade das células epiteliais do trato gastro-intestinal, influência na glicuronidação (etapa mais importante na biotransformação de compostos xenobióticos) (REEN *et al.*, 1993; ATAL *et al.*, 1981), atuação sobre enzimas hepáticas metabolizantes (ATAL *et al.*, 1985) e sobre monooxigenases hepáticas, dependentes de citocromo P450 (KOUL *et al.*, 2000; REEN, 1997; BHAT e CHANDRASEKHATA, 1987). Em outro estudo, GUPTA *et al.* (1999) verificaram que a associação terapêutica de piperina (5) e nimesulida (3) foi capaz de aumentar a biodisponibilidade de (3) na avaliação do perfil anti-inflamatório do fármaco. O conjunto de propriedades supracitadas da piperina poderia facilitar a absorção da nimesulida (3) biodisponibilizado, durante administração de H1. A sinergia da ação anti-inflamatória da piperina (5) e nimesulida (3) (BAE *et al.*, 2010; BANG *et al.*, 2009) permite especular que, se em alguma etapa da biotransformação de H1, houver biodisponibilização das moléculas nimesulida (3) e piperina (5), os processos inflamatórios decorrentes da doença de Chagas poderiam ser atenuados secundariamente durante administração de H1. Ademais, associando esta premissa ao fato de que a piperina (5) apresenta ainda atividade tripanocida (RIBEIRO *et al.*, 2004; FERREIRA, 2006; FERREIRA *et al.*, 2008; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2008; FRANKLIM *et al.*, 2013), faz sentido considerar a molécula como um provável protótipo para o desenvolvimento de novos compostos anti-cruzi, utilizando a estratégia da hibridação molecular.

Dentre os estudos sobre a diversidade de ação terapêutica da nimesulida (3), encontra-se o potencial antiproliferativo contra diferentes linhagens tumorais. Embora esteja descrito que os inibidores de COX-2 exibem ação antitumoral e quimiopreventiva contra o câncer, devido a muitos tumores apresentarem uma super-expressão de COX-2 (LIU *et al.*, 2001), a nimesulida exibe efeitos antitumorais induzindo seletivamente células tumorais à apoptose e/ou necrose, através de mecanismos de ação independentes da

via de inibição da COX-2, evidenciando assim o potencial deste fármaco em interagir com diferentes receptores, modulando distintas vias de sinalização celular (ZHONG *et al.*, 2012).

A piperina, conforme demonstrado em trabalhos anteriores de nosso grupo, é capaz de bloquear o processo de divisão celular do *T. cruzi*. FREIRE-DE-LIMA e colaboradores (2008) estudaram, utilizando técnicas de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, os efeitos de concentrações sub-letais da amida natural contra epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, visualizando imagens comparáveis àquelas obtidas por BAUM e colaboradores (1981) no tratamento de epimastigotas com inibidores tubulínicos conhecidos, como o fármaco antitumoral taxol.

A análise destes parâmetros reforçou o estabelecimento da hipótese de que híbridos moleculares entre as duas moléculas (3) e (5) poderiam gerar produtos tripanocidas semelhantes, ou mais potentes, que os precursores. Considerando a suposição de que moléculas semelhantes possuem propriedades semelhantes, e que a vizinhança química de uma dada molécula pode potencializar um determinado efeito (PATTERSON, *et al.*, 1996), foram planejados dois híbridos, preservando ou não uma porção química da molécula da nimesulida (3), que revelaram capacidades antiparasitárias distintas, reforçando a importância da presença do grupamento NO₂ ligado a um dos anéis aromáticos da nimesulida, na estrutura molecular planejada e construída. Adicionalmente, observou-se que o híbrido H1 é uma amida *N, N*-dissubstituída com atividade tripanocida. Quiçá este formato estrutural tenha ainda contribuído de alguma maneira para uma conformação mais adequada da ligação de H1 com um provável biorreceptor, o que não ocorreu com H2. Como a nimesulida e a piperina, especulativamente, parecem exercer, isoladamente, suas atividades contra o *Trypanosoma cruzi* através de mecanismos de ação distintos, a junção de porções estruturais destes dois precursores na molécula de H1 pode permitir a esse híbrido evadir de possíveis mecanismos de resistência desenvolvidos pelo parasito (WILKINSON *et al.*, 2009).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi descrita a atividade tóxica, seletiva, do anti-inflamatório não esteroideal nimesulida contra diferentes formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), com efeitos comparáveis ao exibido pelo benznidazol, utilizado como fármaco de referência nos ensaios realizados.

Investigações preliminares sobre a relação entre a estrutura química do fármaco e a atividade anti-*T. cruzi* exibida pelo mesmo evidenciaram a importância do substituinte nitro, ligado ao anel aromático da nimesulida, como farmacofórico para a atividade antiparasitária estudada. Os resultados obtidos sugerem que, nos ensaios realizados *in vitro*, a nimesulida possa interferir no equilíbrio redox do *T. cruzi*, através da formação de espécies radicalares tóxicas, contra as quais o parasito não consegue lidar.

Foram também preparados dois derivados a partir da nimesulida, **H1** e **H2**, decorrentes da hibridação molecular entre o anti-inflamatório e a amida natural piperina (**5**), já estudada por nosso grupo em diferentes trabalhos, tendo evidenciado importante perfil tripanocida. O híbrido **H1**, que possui o N da sulfonamida como ponto de hibridação, apresentou um incremento de atividade, comparado ao fármaco precursor, mantendo a seletividade desejada. Por sua vez, o híbrido **H2**, que possui como ponto de hibridação o N da anilina proveniente da redução quimiosseletiva do nitro-substituinte, se apresentou inativo. Esses dados, além de validarem a estratégia de hibridação molecular para o estudo em tela, corroboram os resultados que mostram a importância do grupo nitro-aromático para a atividade antiparasitária estudada.

O desenvolvimento de um novo fármaco é um processo tão complexo que não pode estar contido apenas no âmbito da pesquisa, desenvolvimento e inovação da indústria farmacêutica. Com efeito, o estudo de novos compostos medicinais é cada vez mais guiado pelos princípios e métodos químicos aplicados à farmacologia e à clínica médica, com envolvimento de diversas áreas de pesquisa interdisciplinares e acadêmicas (DREWS, 2000). Os bancos de dados atuais contêm informações valiosas sobre alvos biológicos e estruturas de sítio ativo, as quais podem elucidar novas atividades para moléculas conhecidas. Esses compêndios compreendem o PubChem²³, ChEMBL²⁴, ChemSpider²⁵, o IDMap²⁶, a lista de produtos descontinuados no *Orange Book*²⁷ eletrônico, dentre outros (HA *et al.*, 2008), os quais reúnem diversas informações de apoio sobre um composto e suas interações, tais como estrutura química, estrutura tridimensional do alvo, dados ômicos, farmacologia, etc. (MA'AYAN *et al.*, 2007). Não obstante os inúmeros métodos computacionais existentes preditivos de propriedades ADMET das moléculas, de sítios de receptores biológicos ou de similaridade estrutural, há ainda uma diversidade de compostos e de suas famílias com diferentes atividades que necessitam ser mais estudados, até a sua efetiva aplicabilidade. Neste sentido, a abordagem terapêutica do reposicionamento de fármacos beneficia-se da disponibilidade crescente de bibliotecas moleculares e do avanço

²³ Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em 11-07-2019.

²⁴ Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>. Acesso em 11-07-2019.

²⁵ Disponível em: <https://www.chemspider.com/>. Acesso em 11-07-2019.

²⁶ Disponível em <https://www.idmap.org/>. Acesso em 29-09-2019.

²⁷ *Orange book* é uma edição eletrônica do FDA que possui a lista “*disc*” (do inglês *discontinued drug products*), com milhares de moléculas que passaram pela Fase I de testes mas foram abandonadas, seja por razões de segurança, restrições comerciais, substituição por outros compostos mais ativos, etc. Informação disponível em: <http://www.biointworld.com/issues/2008/nov-dec/chantest.html>. Acesso em 11-07-2019.

da genômica e da bioinformática (NOVAC, 2013), além da notória importância pela celeridade dos resultados conclusivos.

Considerando o fluxograma apresentado na **Figura 55**, os testes para nimesulida (3) e H1 caminharão, no presente estudo, até o ponto da determinação da concentração inibitória sobre epimastigotas de *T. cruzi* e da comprovação de sua atividade contra as formas amastigotas e tripomastigotas.

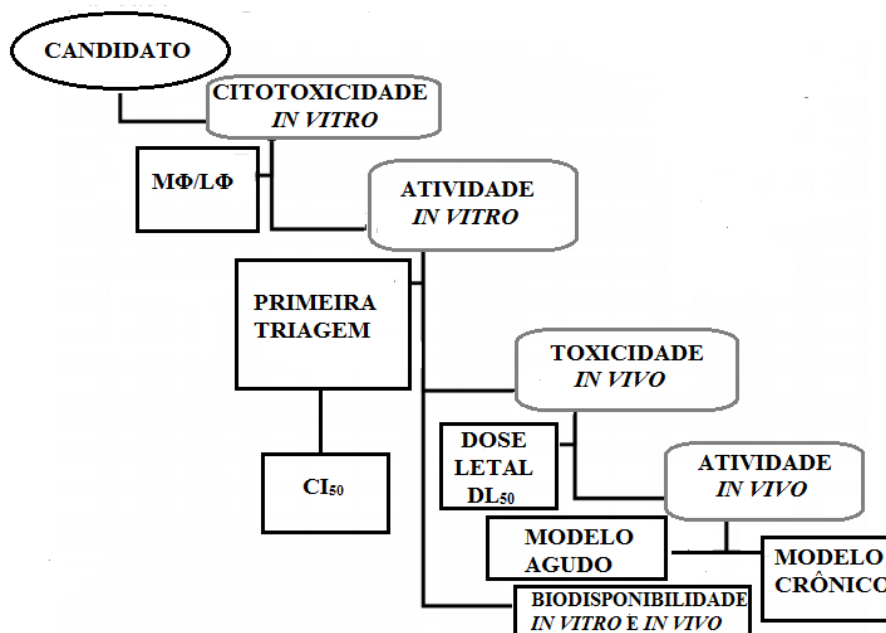


Figura 55. Estratégia integrada para a identificação de novos candidatos a fármacos no tratamento de DC. Adaptado de DIAS *et al.*, 2009.

Dessa forma, o prosseguimento da pesquisa até o próximo passo, no modelo *in vivo*, poderá concluir o conjunto das expectativas sobre os candidatos nimesulida (3) e H1 na terapêutica antichagásica. Na biologia de sistemas, são múltiplas as informações disponíveis sobre os alvos, porém é necessário transformar essas informações em conhecimento para a produção de uma nova medicina e, neste cenário, nenhum esforço de pesquisa pode ser ignorado. Por isso, acreditamos que os dados extraídos do conjunto desta tese poderão contribuir para a exploração de novas alternativas para o tratamento da DC, uma vez que nenhum fármaco disponível no mercado conseguiu eficácia na terapia crônica da doença. Dessa forma, a possibilidade de reposicionamento da nimesulida (3) torna-se promissora, já que a ação tripanocida, aliada ao seu potencial como agente anti-inflamatório, implica ganho de dupla medicina para conter os danos decorrentes da doença de Chagas. Neste sentido, uma das perspectivas desta tese consiste na exploração dos bancos de dados disponíveis relacionados à nimesulida (3) para a melhor compreensão dos alvos de sua ação tripanocida. Além disso, como a nimesulida (3) apresentou atividade *in vitro* equivalente ao benznidazol (2), pretendemos prosseguir com os estudos, identificando sua possível eficácia *in vivo*, um passo adiante na confirmação desta sua atividade biológica. Caso sua atividade *in vivo* seja comprovada, a nimesulida (3) destacar-se-á como

vantajoso frente ao benznidazol (2) ou ao nifurtimox (1), pelos menores efeitos tóxicos relativos e uma possível maior abrangência da atividade.

Por outro lado, a avaliação dos estudos disponíveis na literatura permite apostar na exploração da estrutura molecular da piperina (5) e de seus derivados para a construção de híbridos com a nimesulida (3), com vistas ao desenvolvimento de novos compostos tripanocidas. Em adição, a constatação de que a amida (5) potencializa a ação da nimesulida (3), torna-se relevante o prosseguimento dos estudos para caracterizar a biodisponibilização de ambas as substâncias, após a administração do híbrido H1, pois o NIM (3) e piperina (5) livres potencializariam o tratamento, concomitantemente à minimização dos efeitos inflamatórios crônicos produzidos durante o curso da doença. Em longo prazo, a doença de Chagas é uma das causas mais incapacitantes do homem nas regiões onde é endêmica. Vimos que a terapia atualmente disponível possui uma combinação de desvantagens, como baixa eficácia, efeitos colaterais graves e resistência parasitária. No estado da arte de novas medicinas antichagásicas, a proposta de reposicionar a nimesulida (3), ou ainda de hibridizá-lo quimicamente com um produto natural atóxico para a construção de novas moléculas ativas, através de metodologias sintéticas simples e diretas, pode ser considerada uma linha de investigação com resultados satisfatórios, visto integrar baixo custo, menores efeitos colaterais e maior eficácia. Por fim, complementamos que o conjunto de perspectivas torna-se animador para a continuidade desta linha de trabalho, pois consistiu na primeira contribuição do nosso grupo de pesquisa no campo de reposicionamento de fármacos.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS - QUÍMICOS

Princípios gerais.

O progresso das reações foi monitorado por cromatografia em camada fina, realizada em placas de alumínio revestidas com sílica-gel (0,25 mm de espessura), em solvente apropriado, e os *spots* visualizados sob luz ultravioleta (254 e 356 nm). As fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio anidro e os solventes removidos sob pressão reduzida e aquecimento em evaporador rotativo. As purificações por cromatografia em coluna foram realizadas em coluna aberta utilizando sílica gel Aldrich 230-440 mesh. Pontos de fusão foram determinados em um aparelho Büchi B-510, e não foram corrigidos. As análises de CLAE foram realizadas no equipamento da marca Shimadzu, modelo PROMINENCE, equipado com bomba LC-20AT, autosampler SIL-10AF, detector SPD-M20A, forno CTO-20A, CBM-20a. Foi utilizada uma coluna Betasil C18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm), fabricada pela Thermo. A fase móvel usada na análise foi composta por mistura MeOH (65%)/H₂O, com 1% AcOH (35%). Os espectros de RMN ¹H (500 MHz) e DEPTQ (125 MHz) foram adquiridos a partir de um Bruker Ultrashield Plus Spectrometer (BrukerBioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemanha). Foi utilizado como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Para a solubilização das amostras foram utilizados os solventes deuterados clorofórmio (CDCl₃), dimetilsulfóxido (DMSO-*d*₆) e acetona [(D₃C)₂CO]. Deslocamentos químicos (δ) foram reportados em partes por milhão (ppm) com relação ao DMSO-*d*₆ (2,50 ppm para ¹H e 39,7 ppm para ¹³C) ou ao solvente indicado. As multiplicidades dos sinais foram assinaladas como sinal simples (s), sinal duplo (d), duplo-sinal duplo (dd), sinal múltiplo (m) e sinal largo (sl). Todas as reações, envolvendo aquecimento por micro-ondas, foram realizadas em um sistema Discover SP (CEM Inc., Matthews, NC, USA) e sob pressão atmosférica. Os espectros na região do Infravermelho (IV) foram obtidos no espectrofotômetro da marca Bruker, modelo Vertex 70 (PPGQ – UFRRJ), utilizando a técnica de ATR. Os espectros de massa de baixa resolução (EMBR) foram obtidos no cromatógrafo em fase gasosa, acoplado ao espectrofotômetro de massas GCMSQP2010 da Shimadzu (PPGQ - UFRRJ). Condições de análise: Coluna: vf575MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm); Temperatura: 200 °C/1' – 10 °C – 290 °C/40 mim; Injetor: 270 °C. Os espectros de massas de alta resolução (HRMS) dos novos híbridos preparados neste trabalho, inéditos na literatura, foram obtidos no *Department of Chemistry & Biochemistry* da *The University of Arizona* (Tucson, AZ, USA). O equipamento utilizado na análise foi um espectrômetro Bruker ESI-ICR. A amostra foi introduzida por infusão (em solução de acetonitrila/metanol) e a análise realizada em modo positivo (*ESI*, do inglês: *Elétron Spray Ionization*).

Extração de nimesulida (3) a partir do medicamento adquirido comercialmente.

A fim de obter quantidades suficientes de NIM (3) a um baixo custo, optou-se por extrair a substância a partir de comprimidos do medicamento genérico, de diferentes laboratórios²⁸.

²⁸ Nossa opção pela extração se justifica, pois o produto é disponível comercialmente na Sigma-Aldrich a um custo de R\$ 2.084,00 o frasco de 25 g, enquanto uma caixa do medicamento genérico, contendo 12 comprimidos de 100 mg, tem um custo de cerca de R\$ 10,00.

A extração ácido-base foi conduzida de acordo com a metodologia descrita por GONSALVES *et al.* (2013). Foram macerados 10 comprimidos de Nimesulida® de 100 mg cada (massa total do fármaco 1,00 g, 0,3 mmol), sendo adicionados em seguida 100 mL de hidróxido de sódio 0,10 mol x L⁻¹. A mistura foi agitada por 15 minutos e deixada em repouso por 15 minutos também, após o qual foi filtrada em algodão umedecido como meio filtrante. O resíduo sólido foi desprezado (excipientes insolúveis) sendo adicionado ao filtrado 100 mL de ácido clorídrico 0,20 mol x L⁻¹, com agitação e deixado em repouso por 15 minutos, em banho de gelo. Após filtração, o sólido foi espalhado cuidadosamente sobre vidro de relógio e seco em estufa a 50 °C, por 1 hora. Procedeu-se por duas vezes a recristalização em etanol do sólido obtido e após seco verificou-se o ponto de fusão.

Isolamento da piperina (5) dos frutos secos de *Piper nigrum*.

Para a obtenção da piperina necessária para a realização do estudo, foram colocados 250 g de pimenta-do-reino em um cartucho de uma aparelhagem de *Soxhlet* e, num balão de fundo redondo de 500 mL, foram adicionados 350 mL de etanol a 95%. O sistema foi mantido sob refluxo, por aproximadamente 10 horas. Após término da extração, foi feita a concentração do extrato em evaporador rotatório. Ao resíduo formado, de aspecto viscoso e aroma adocicado, foram adicionados cerca de 100 mL de uma solução alcoólica de KOH 10%, recentemente preparada, para que ocorresse a precipitação dos taninos e demais materiais fenólicos, contaminantes do meio, na forma dos seus respectivos sais de potássio. Após filtração a vácuo e remoção do material precipitado, foi adicionada uma pequena quantidade de água ao sobrenadante suficiente para que o meio se tornasse turvo. Depois de um período de três dias em repouso, formou-se um precipitado amarelo que foi filtrado, sob pressão reduzida. O material sólido obtido foi lavado com uma pequena quantidade de água gelada, seguido de éter etílico gelado. Após a recristalização em etanol foram obtidos 7,0 g (24,6 mmol) (aproximadamente 3%) de piperina na forma de cristais amarelo-claro (IKAN, 1991).

Preparação do ácido piperínico (6) a partir da hidrólise da piperina (5).

Em um equipamento para refluxo, foram adicionados 2,10 g (7,37 mmol) de piperina (5) ao balão de 100 mL de capacidade equipado com barra de agitação magnética, contendo 25 mL de solução alcoólica de KOH 20%. A mistura reacional foi mantida sob refluxo e agitação por 1 hora no reator de micro-ondas (temperatura de 92°C e 50 W de potência). A reação passou da cor amarela para marrom, com formação de um precipitado, tendo sido acompanhada por cromatografia em camada fina. Após o término da reação, o etanol da mistura reacional foi evaporado em rotavapor. Foi adicionada água ao resíduo sólido formado, deixando-se atingir a temperatura de ebulição para solubilização de todo o material precipitado, seguida de filtração a quente. Os contaminantes diferentes do carboxilato foram extraídos por duas vezes com éter etílico. A precipitação do ácido como um sólido amarelo ocorreu após adição, gota a gota, de uma solução de HCl a 10%, até o meio atingir pH próximo de 3. O material foi filtrado sob pressão reduzida e lavado com água gelada. O sólido obtido foi seco em dessecador e recristalizado em etanol, gerando 1,35 g (6,19 mmol) (84%) do ácido piperínico (6). O produto foi devidamente caracterizado

pelos métodos convencionais de análise e os dados obtidos estão de acordo com o descrito na literatura (FERREIRA, 2006).

Preparação do cloreto do ácido piperínico (7).

O ácido piperínico (6) formado na etapa anterior foi adicionado a um balão de 25 mL de capacidade equipado com barra de agitação magnética e mantido em atmosfera inerte com septo de borracha e bolhometro. Em seguida, foram adicionados 500 mg (2,29 mmol) do ácido (6) e, após cerca de 30 segundos de borbulhamento de nitrogênio, adicionou-se cerca de 1,5 mL (17,62 mmol) do reagente cloreto de oxalila (COCl_2). Esta solução foi submetida à agitação em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos, em capela de exaustão química (ocorre liberação de CO , CO_2 e HCl do meio reacional). A reação foi acompanhada por cromatografia em camada fina indiretamente, através da reação de uma pequena alíquota com metanol, com a formação do éster metílico (eluente hexano: acetato de etila 25%). Concluída a reação, o excesso de COCl_2 foi removido em evaporador rotatório restando apenas o cloreto de acila (7), na forma de um resíduo sólido de cor laranja, sendo imediatamente utilizado na etapa posterior das sínteses sem tratamento prévio, devido a sua instabilidade em atmosfera úmida. Uma observação importante para preparação exitosa do cloreto de ácido envolve a retirada dele do evaporador rotativo. O evaporador deve ter sua pressão equalizada pela entrada de Nitrogênio, que pode ser introduzido através de um balão de borracha.

Preparação do primeiro híbrido H1 (adaptado de PERICHERLA *et al.*, 2007).

Foram adicionados ao balão contendo o cloreto de ácido (7), 5 mL de solvente diclorometano (CH_2Cl_2), seco por 12 h sobre peneira molecular ativada. O sistema permaneceu sob agitação, em banho de gelo. Em outro balão, previamente seco em estufa a 120 °C por 12 h, equipado com barra de agitação magnética, foram adicionados 350 mg de nimesulida (3) e, sob atmosfera de N_2 , foi adicionado 0,86 mL de trietilamina (6 equivalentes; 0,626g), dissolvida em cerca de 10 mL de CH_2Cl_2 . Esta solução foi gotejada sobre o meio reacional contendo o cloreto de ácido (7). Após finalizada a adição do NIM (3) ao cloreto de ácido (7), a mistura reacional foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por 12 horas. Na sequência, uma alíquota foi retirada para acompanhamento da reação em cromatografia de camada fina (eluente hexano: acetato de etila 25%), utilizando o ácido piperínico (6) como referência, o que demonstrou formação de produto. O solvente foi evaporado em rotavapor, e foram adicionados cerca de 50 mL de acetato de etila ao resíduo obtido. Procedeu-se uma extração por partição do produto duas vezes com 10 mL de NaOH 5%, sob forte agitação, a fim de retirar a nimesulida (3) residual. As fases foram separadas em funil de separação e a fase orgânica contendo o produto foi lavada três vezes com 10 mL de água destilada e solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi seca em sulfato de sódio (Na_2SO_4) e a solução límpida amarelo-clara resultante foi concentrada sob pressão reduzida, em evaporador rotatório. O produto bruto foi solubilizado em CH_2Cl_2 para purificação em coluna empacotada com sílica-gel, utilizando como eluente (hexano: acetato de etila 25%). O eluído foi acompanhado por cromatografia de camada fina para identificação das frações contendo o produto H1, que foram juntadas e

deixadas por 48 horas para evaporação do solvente. O produto purificado foi obtido como um sólido amorfo de cor amarelada (325 mg, 0,6 mmol, 60%).

H1: Rendimento 60% PF. 145-146 °C

(2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-(metilsulfonil)-N-(4-nitro-2-fenoxifenil) penta-2,4-dienamida.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,06 (d, 1H); 7,67 (d, 3H); 7,46 (dd, 2H); 7,32 (d, 1H); 7,09 (d, 2H); 6,98 (d, 2H); 6,94 (d, 1H); 6,81 (d, 1H); 6,63 (dd, 1H); 6,01 (s, 2H); 5,79 (d, 1H); 3,54 (s, 3H).

DEPTQ (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165,80; 155,88; 154,00; 149,39; 149,21; 148,41; 148,09; 143,22; 133,64; 131,21; 130,78; 130,07; 126,28; 123,85; 123,78; 120,28; 117,94; 117,72; 112,16; 108,64; 105,92; 101,56; 42,61.

HRMS: *m/z* 531,0833 [M + Na]⁺

Preparação da anilina (4) derivada da nimesulida (3).

Num balão de 25 mL, equipado com condensador de refluxo e barra de agitação magnética, foram adicionados à solução de nitro-sulfonamida (**3**) (339 mg; 1,1 mmol) em 20 mL de mistura etanol/água (2:1), ferro metálico (365 mg; 6,5 mmol) e cloreto de amônio (65 mg; 1,2 mmol). A mistura reacional foi mantida sob refluxo, durante 1 hora, e acompanhada por cromatografia de camada fina em placas de sílica, visualizadas sob luz ultravioleta. Constatado o término da reação por CCF, o material foi filtrado em coluna de sílica e a solução obtida foi concentrada sob pressão reduzida. Ao resíduo, foi adicionado gelo e o precipitado resultante foi filtrado para obtenção do derivado nimesulida reduzida de interesse (**4**) (MAIA *et al*, 2009). O produto foi caracterizado pelos métodos convencionais de análise e os dados obtidos estão de acordo com aqueles anteriormente descritos na literatura para o mesmo produto (JIAN *et al*, 2017).

Preparação do segundo híbrido H2.

Em um balão de fundo redondo com 25 mL de capacidade, completamente seco contendo agitador magnético, foram adicionados 250 mg (1,1 mmol) de ácido piperínico (**6**) e em seguida foi acoplado o bolhometro e entrada de nitrogênio, para garantir atmosfera inerte. Após cerca de 30 segundos de borbulhamento, foi adicionado 1 mL de (COCl)₂ através de uma seringa com agulha própria. O sistema foi mantido sob agitação em capela de exaustão química, atmosfera inerte e temperatura ambiente, por cerca de 45 minutos. A cor alaranjada da solução inicial torna-se vermelho alaranjado forte, indicando a formação do cloreto de acila (**7**). A presença de **7** foi confirmada mediante retirada de pequena alíquota gotejada sobre metanol. Imediatamente, ocorre a formação de éster metílico, visualizada na cromatografia de camada fina com eluente hexano: acetato de etila 25%. Após este tempo, o sistema de entrada de N₂ foi retirado e o balão contendo a mistura reacional foi levado ao rotavapor para evaporação do excesso de (COCl)₂ remanescente.

Finalizada a evaporação, o balão foi novamente acoplado à entrada de nitrogênio para garantir atmosfera inerte para a próxima etapa reacional. Foram adicionados ao balão contendo o cloreto de ácido, 5 mL de solvente diclorometano. O sistema foi mantido com agitação e banho de gelo.

Em outro balão completamente seco contendo agitador magnético, foram adicionados 300 mg (1,1 mmol) de nimesulida reduzida (**4**), imediatamente fechado e, sob atmosfera de N₂, adicionados cerca de 10 mL de CH₂Cl₂ seco e 10 mL de trietilamina (PERICHERLA *et al.*, 2007). Esta solução foi gotejada sobre o meio reacional contendo o cloreto de ácido (**7**). Após finalizada a adição da nimesulida reduzida (**4**) ao cloreto de ácido (**7**), a mistura reacional foi mantida sob agitação e em temperatura ambiente, por cerca de 1 hora. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada fina utilizando como eluente hexano: acetato de etila 25%, em relação ao ácido piperínico (**6**) como referência, o que demonstrou formação de produto. A mistura foi vertida em água e extraída 3 vezes com diclorometano. As fases orgânicas foram juntadas e lavadas 2 vezes com HCl 10% e água, secas em Na₂SO₄ e concentrada. O resíduo sólido obtido foi purificado por recristalização em mistura de clorofórmio e acetato de etila, gerando 0,350 g da amida desejada (0,73 mmol, 60% de rendimento), na forma de um sólido amorfo, de coloração bege. Ponto de fusão 192-193 °C.

H2: Rendimento 60% PF. 192-193 °C

(2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-{4-[(metilsulfonil)amino]-3-fenoxifenil}penta-2,4-dienamida.

RMN ¹H (500 MHz, acetona) δ (ppm): 9,43 (s, 1H); 8,21 (s, 1H); 7,54 (s, 1H); 7,52 (s, 1H); 7,45 (s, 1H); 7,44 (s, 1H); 7,42 (s, 1H); 7,39 (m, 1H); 7,21 (s, 1H); 7,15 (s, 1H); 7,13 (s, 1H); 7,11 (s, 1H); 7,03 (dd, 1H); 6,86 (d, 1H); 6,93 (s, 1H); 6,91 (s, 1H); 6,27 (d, 1H); 6,04 (s, 2H); 3,00 (s, 3H).

DEPTQ (500 MHz, acetona) δ (ppm): 163,91; 156,37; 149,79; 148,41; 141,69; 139,16; 138,24; 131,06; 129,96; 125,70; 124,90; 123,93; 123,88; 122,83; 119,10; 114,30; 109,15; 108,32; 105,57; 101,51; 39,16.

HRMS: *m/z* 479,1272 [M + H]⁺

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS - BIOLÓGICOS

Animais - Camundongos da linhagem BALB/c de ambos os sexos, com 6-8 semanas de idade foram obtidos do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e mantidos em microisoladores, com ração e água *ad libitum*.

Declaração de Ética – O presente estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, do *National Institutes of Health* (Estados Unidos). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA-IV, Número de Autorização: 8819010217), e todos os esforços foram envidados para minimizar o sofrimento.

Parasitas – Nos ensaios deste estudo, foi utilizado o protozoário *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Os parasitos foram gentilmente cedidos pela Doutora Mirian Cláudia de Souza Pereira, chefe do Laboratório de Ultraestrutura Celular, pertencente ao Instituto Oswaldo Cruz, da Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz – RJ. Todos os experimentos foram conduzidos com biossegurança nível 2. As formas epimastigotas utilizadas nos experimentos são de até décima passagem, no máximo, após seu descongelamento. Cerca de 1-2 mL de sangue de camundongo BALB/c infectado com 10^6 tripomastigotas x mL⁻¹ de *T. cruzi*, cepa Y, foram transferidos para uma garrafa de cultura de células contendo 40 mL de infusão de tecido cardíaco e cerebral (BHI, do inglês *Brain Heart Infusion* (BD Bioscience) suplementada com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 20 µg x mL⁻¹ de ácido fólico (Sigma-Aldrich), 12 µg x mL⁻¹ de hemina (Sigma-Aldrich), 10 µg x mL⁻¹ de gentamicina (Sigma-Aldrich), sendo esse meio chamado de BHI completo) e mantido em repouso na BOD, a 27 °C por oito dias, para o isolamento das formas epimastigotas diferenciadas. O material foi retirado desta garrafa, e à garrafa vazia foram adicionados 20 mL de BHI completo e mantida na BOD, por 15 dias. O sobrenadante retirado da garrafa inicial apresentou cerca de 6×10^4 epimastigotas x mL⁻¹ e foi utilizado para montar duas garrafas de primeira passagem de epimastigotas, com inóculo de 10^6 epimastigotas x mL⁻¹, cada. O material decantado (*pellet* de isolamento de epimastigotas) foi ressuspensionado em 2 mL de BHI completo e centrifugado a 2200 rpm, 10 minutos, 4 °C. O *pellet* foi ressuspensionado em SFB e quantificado apresentando cerca de 1×10^8 epimastigotas x mL⁻¹. Em seguida, foram adicionados 10% de DMSO para formar a solução congelante e foram congeladas as amostras de isolamento com 20×10^6 epimastigotas x mL⁻¹ de primeira passagem, em cada criotubo. O material foi mantido *overnight* a -80 °C e então armazenado em nitrogênio líquido (-196 °C). Para o trabalho desta tese, foi utilizado inóculo de 10^6 epimastigotas x mL⁻¹ em todas as passagens dos parasitos. A partir das garrafas de primeira passagem foi possível fazer a manutenção e o congelamento de *pool* de primeira a décima passagens destas formas epimastigotas. A cultura de epimastigota anteriormente preparada (garrafa que foi mantida por 15 dias na BOD) foi utilizada para a diferenciação de formas epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas. Nos 14° e 15° dias da cultura, há algumas formas tripomastigotas presentes. Então foram retirados 2 mL de caldo desta cultura contendo tripomastigotas e adicionados a 4 garrafas de LLCMK2 semi-confluente para infecção. A partir do 7° dia pós-infecção foi possível recolher as formas tripomastigotas liberadas para fazer um estoque de formas infectivas necessárias para a realização dos experimentos da tese.

Manutenção de células LLCMK2 – A linhagem de células epiteliais aderentes de LLCMK2, proveniente de macacos Rhesus da espécie *Macaca mulata*, obtidas a partir do tecido do Rim, foi fornecida gentilmente pelo Professor Doutor Célio Geraldo Freire-de-Lima, chefe do Laboratório de Imunomodulação, pertencente ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As células foram mantidas *in vitro*, em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) completo (2 mM de glutamina, 50 mM de β -mercaptoetanol, 100 mM piruvato, 50 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ de gentamicina, aminoácidos não essenciais, suplementado com 2,5% de SFB), em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂.

Obtenção de macrófagos peritoneais - Camundongos BALB/c foram eutanasiados com inalação de Isoflurano, como descrito no protocolo aprovado pela CEUA/IV/UFRRJ. Em seguida, macrófagos peritoneais residentes foram obtidos através do lavado da cavidade peritoneal com 5 mL de DMEM (Gibco-Invitrogen) suplementado e sem soro. As células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se solução de 0,01% de Azul de Tripán (Riedel-de Haen) em PBS (*PBS*, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) para análise da viabilidade celular, e ajustadas para concentração de 2×10^5 células $\times \text{mL}^{-1}$ em meio DMEM suplementado e com 10 % de SFB. Então, 1 mL dessa suspensão foi distribuída, em triplicatas, em microplacas de 24 e 48 poços para cultura de células (TPP®). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO₂, por 3 horas.

Crescimento das formas epimastigotas dos parasitos - As formas epimastigotas de *T. cruzi* Y foram cultivadas em meio BHI completo. As culturas de parasitos foram mantidas em incubadora BOD a 27°C, com passagem a cada 7 dias, utilizando inóculo de 10^6 parasitos $\times \text{mL}^{-1}$ em 25 mL de meio BHI completo. Para os experimentos com as formas epimastigotas, os parasitos foram centrifugados a 2200 rpm, 10 minutos, a 4 °C (condições de centrifugação utilizadas para os epimastigotas em todos os ensaios). Em seguida, os parasitos foram ressuspensos em 10 mL de BHI completo e contados em câmara de Neubauer, com 0,01% de azul de Tripán (Riedel-de Haen).

Crescimento das formas tripomastigotas dos parasitos – As formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* Y foram obtidas de culturas de células LLCMK2. Após o crescimento das células LLCMK2, o meio de cultivo foi descartado e as células foram lavadas com tampão fosfato-salino para a retirada do SFB. Em seguida, as células foram tripsinizadas por incubação de 5 a 10 minutos a 37 °C com solução contendo 1 mM de ácido etileno diamino tetra-acético (Sigma-Aldrich) e 0,25% de tripsina (Life Technologies) em PBS. A incubação foi interrompida pela adição de PBS suplementado com 10% de SFB, seguida por centrifugação a 1500 rpm, por 6 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em diluição de 1:10 em meio RPMI completo (Sigma-Aldrich) Quando a cultura alcançou 50% de confluência, as células de LLCMK2 foram infectadas com as formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* na razão de 5 parasitos por célula. Após 24 horas de interação parasito-célula hospedeira, os parasitos não internalizados foram removidos pelo descarte do meio da cultura. As células foram lavadas três vezes com PBS, havendo reposição de meio RPMI 1640 completo. A obtenção das formas tripomastigotas para a infecção de macrófagos foi feita a partir da

coleta do sobrenadante das células LLCMK2, nos 7º e 9º dias após infecção (picos parasitêmicos).

Ensaio de citotoxicidade - A toxicidade celular foi avaliada através do método colorimétrico do XTT {do inglês *2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide*} para a quantificação do metabolismo mitocondrial e atividade da cadeia respiratória, na presença do acceptor de elétrons metassulfato de fenazina (PMS, do inglês *Phenazine Methosulfate*). Esse reagente é usado como carreador intermediário de elétrons, aumentando a produção de formazan e diminuindo o tempo de incubação (DA COSTA, 2017).

Os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, obtidos como descrito anteriormente, foram cultivados em microplacas de 96 poços, com meio de cultura DMEM completo, numa concentração final de 1×10^5 células por poço, mantidos nas mesmas condições que as experimentais, como controle para a técnica. Os macrófagos foram então incubados com nimesulida (**3**), nas concentrações de 1 a $10 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$, por 48 horas. Após os períodos de incubação, 50 μL de solução de XTT (1,8 mg de XTT, 75 μL de PMS e 1425 μL de PBS 1x) foram adicionados em cada poço, deixando incubar pelo período de 4 horas, seguida de leitura em um leitor de microplacas (Spectramax M3), com filtro de 490 nm. (O mesmo procedimento foi empregado no ensaio com piperina (**5**), benznidazol (**2**) e H**1**).

A população enriquecida com linfócitos esplênicos foi obtida do baço de camundongos BALB/c. O baço foi macerado e o lavado resultante, centrifugado a 1500 rpm, por 6 minutos, a 4 °C. O *pellet*, contendo os linfócitos e hemáceas, foi tratado com 3 mL de solução de tampão de lise de hemácias ACK 1x (formulação para 1 L: 8 g NH_4Cl , 1 g KHCO_3 , 1,84 g EDTA) a 37 °C por 5 minutos, em estufa de CO_2 . Após a lise, foram adicionados 3 mL de SFB, e centrifugado nas mesmas condições acima. O *pellet* de linfócitos foi ressuspenso em meio RPMI completo para quantificação das células em câmara de Neubauer, com 0,01% de azul de Tripán (Riedel-de Haen). Os linfócitos foram cultivados em microplacas de 96 poços, com meio de cultura DMEM completo, numa concentração final de 1×10^5 células por poço, mantidos nas mesmas condições que as experimentais, como controle para a técnica. Os linfócitos foram incubados com nimesulida (**3**), e quantificados por XTT, seguindo os mesmos procedimentos empregados para os macrófagos. (O mesmo procedimento foi empregado no ensaio com piperina (**5**), benznidazol (**2**) e H**1**).

As células LLCMK2 foram cultivadas em microplacas de 96 poços, com meio de cultura RPMI completo, numa concentração final de 1×10^5 células por poço, mantidas nas mesmas condições que as experimentais, como controle para a técnica. As células foram então incubadas com nimesulida (**3**), nas concentrações de 1,56 a $100 \mu\text{M}$, a 27 °C, por 48 horas em estufa BOD. Para analisar a viabilidade das células na presença da nimesulida (**3**), foi realizado o ensaio de redução do MTT (do inglês *3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide*). De acordo com o método desta técnica, as células viáveis com metabolismo ativo são capazes de reduzir o sal MTT produzindo o composto colorido formazan, em forma de cristais, que devem ser dissolvidos em dimetilsulfóxido antes da leitura da absorbância, em filtro de 570 nm (RISS *et al.*, 2013). Para verificar a viabilidade em *T.cruzi*, a metodologia do ensaio de redução de MTT foi adaptada de MUELAS-SERRANO *et al.* (2000), utilizando o reagente PMS. O efeito citotóxico foi avaliado pelo

percentual de inibição de crescimento celular em relação ao controle em 50% (IC₅₀). (O mesmo procedimento foi empregado no ensaio H1).

Viabilidade celular das formas epimastigotas de *T.cruzi* Y, em diferentes concentrações de nimesulida (3) e demais substâncias – Todas as formas epimastigotas de *T.cruzi* Y foram utilizadas em fase exponencial de crescimento (96 h) e ressuspensas em meio BHI completo na concentração final de 2×10^5 parasitos x mL⁻¹. Em microplacas de cultura de 96 poços, foram adicionados 100 µL da cultura de parasitos, na presença ou não de diferentes concentrações da NIM (3). Foram utilizadas concentrações numa faixa de 1,56 µM a 100 µM, em diluição seriada usando fator de diluição igual a dois. As placas foram incubadas a 27 °C, por 72 horas em estufa BOD. Para analisar a viabilidade dos parasitos na presença da nimesulida (3), foi realizado o ensaio de redução do MTT. O efeito tripanocida foi avaliado pelo percentual de inibição de crescimento dos parasitos em relação ao controle em 50% (IC₅₀). A substância utilizada como controle foi o fármaco Benznidazol®. (O mesmo procedimento foi empregado no ensaio com nimesulida reduzida (4), piperina (5), H1 e H2).

Preparação das soluções das moléculas utilizadas no tratamento de formas evolutivas de *T. cruzi* – Para o preparo das soluções dos compostos, foi preparada solução estoque de 30 mM para cada uma das moléculas, utilizando DMSO como diluente. concentração final de DMSO nos ensaios foi 0,12 %. A concentração das moléculas em cada poço foi ajustada para a concentração desejada. A maior concentração citotóxica inócua testada para nimesulida (3) e benznidazol (2) foi 10 µg x mL⁻¹. Transformando as unidades de concentração, este valor corresponde a 32 µM para nimesulida (3) – PM 308 g x mol⁻¹ e 38 µM para benznidazol (2) – PM 260 g x mol⁻¹. Dessa forma, após a realização dos ensaios citotóxicos, estas substâncias foram utilizadas nos experimentos seguintes nas concentrações comuns de 17 µM e/ou 35 µM. O benznidazol utilizado nos ensaios foi obtido do LAFEPE, lote 140201/14. Todos os compostos testados frente às diferentes formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* tiveram seus graus de pureza avaliados por CLAE-DAD (fase reversa), apresentando pureza ≥ 95%. Na **Figura 56, (Anexos, página 173)**, encontram-se os cromatogramas de todas as moléculas utilizadas nos ensaios deste trabalho.

Infecção de macrófagos *in vitro* com tripomastigotas e tratamento com nimesulida (3) – Nos dias de picos de liberação de tripomastigotas, o sobrenadante da cultura de células LLCMK2 infectadas foi centrifugado para a obtenção das formas parasitárias de *T. cruzi*. No entanto, em geral, amastigotas costumam estar presentes no sobrenadante (isto foi verificado através da observação em microscópio óptico, com aumento de 40x). Como as amastigotas podem ser fagocitadas por macrófagos e replicarem-se, tal fato poderia interferir na interpretação dos resultados para a infecção. Por isso, visando obter somente tripomastigotas para a infecção, optou-se por fazer a purificação das culturas empregadas. Para o procedimento, as formas tripomastigotas e amastigotas presentes no sobrenadante da cultura de LLCMK2 foram removidas da garrafa de cultura de células, centrifugadas a 1550 rpm, durante 6 minutos a 5 °C, para retirada das células LLCMK2. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a 4000 rpm, durante 10 minutos a 4 °C para baixar as formas tripomastigotas e amastigotas, eventualmente

presentes. Após a centrifugação, o tubo foi deixado na posição vertical em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO₂, durante 2 horas para obtenção apenas da forma tripomastigota no sobrenadante (isto foi verificado através da observação em microscópio óptico, com aumento de 40x). Após 2 horas, o sobrenadante foi centrifugado a 10.000 RPM durante 15 minutos à temperatura de 10 °C na centrífuga Sorvall, rotor SS-34. O precipitado foi ressuscitado em meio RPMI (Sigma) completo chegando-se a uma concentração de 1 x 10⁷ parasitos x mL⁻¹ (nesta suspensão estão presentes unicamente as formas tripomastigotas, fato verificado através da observação em microscópio óptico, com aumento de 40x). Os macrófagos foram infectados com as formas tripomastigotas obtidas e ajustados à proporção de 3 parasitos para 1 macrófago²⁹. A cultura foi mantida em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 24 horas de infecção, os poços foram lavados com solução salina PBS para remoção dos parasitos não internalizados e mantidos em meio DMEM completo, na presença ou não, de nimesulida (3) e benznidazol (2) 35µM. Foram mantidos em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, durante nove dias. A multiplicação dos parasitos foi avaliada após sete e nove dias em cultura, pela contagem em câmara de Neubauer das formas tripomastigotas livres nos sobrenadantes. (O mesmo procedimento foi empregado no ensaio com H1).

Viabilidade Celular por citometria de fluxo – Para a elucidação do tipo de morte celular, os parasitos foram tratados com nimesulida (3) por 24 horas, em número de 1 x 10⁶ parasitos por poço. Após o tratamento, foram centrifugados e ressuscitados em 1000 µL de tampão; novamente centrifugados e tratados com Anexina V-FITC (AV) e Iodeto de Propídeo (IP), e analisados em citômetro de fluxo (FACSCALIBUR Becton & Dicknson).

Análise Ultraestrutural – Formas epimastigotas (2 x 10⁵ parasitos x mL⁻¹) de terceira passagem, na fase exponencial de crescimento, foram tratados por 24 horas com a sulfonamida (3) 35 µM, e fixados com glutaraldeído a 2,5%, diluído em cacodilato de sódio 0,1 M, contendo 3,5% de sacarose, pH 7,2, por 1 hora a 4 °C. Após esse tempo, os parasitos foram lavados no mesmo tampão e pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% (OsO₄), diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 1 h a 4 °C. Então, as células foram lavadas no mesmo tampão, e desidratadas em um gradiente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e incorporado em resina PolyBed 812. Após a polimerização, foram obtidas secções ultrafinas no Leica ULTRACUT S UCT e coradas com 5% de acetato de urânio/1% de citrato de chumbo. A análise foi realizada sob o microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM-1011) Rudolf Barth, na Plataforma de Microscopia Eletrônica da Fiocruz (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), sob a supervisão da Dr^a Suzana Côrte-Real.

Análise estatística – As análises estatísticas foram conduzidas no programa *GraphPad Prism*, versão 5, em testes de análise *one-way* ANOVA para amostras

²⁹ A multiplicidade de infecção está de acordo com a literatura para ensaios com a cepa Y. No entanto, foi realizado um experimento visual de acompanhamento da infecção nas proporções de 1:1; 3:1 e 5:1. Onde observou-se que, no primeiro caso, a infecção foi baixa o suficiente para não haver liberação após 7 ou 9 dias. No segundo caso, a infecção seguiu conforme os dias de picos parasitêmicos e, na proporção de 5:1, observou-se perda de integridade morfológica dos macrófagos, com muitos debrís celulares no sobrenadante, após 5 dias de infecção. O que fez supor que, talvez pelo fato da cepa Y ser muito infectiva, a multiplicidade de infecção era demasiado forte. Desta forma, utilizou-se em todos os experimentos de infecção, a multiplicidade de 3 tripomastigotas para cada macrófago.

independentes. Os valores de significância foram representados nos gráficos por (*) para valores com $p < 0,05$; (**) para valores com $p < 0,01$ e (***) para valores com $p < 0,001$. Valores de $< 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, S.B. e WEISSMAN, G. The mechanisms of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Rheum* vol. 32:1-9. **1989**.

AGUSTI, R.; COUTO, A. S.; CAMPETELLA, O. E.; FRASCH, A. C. C.; LEDERKREMER, R.M. The trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* is anchored by two diferente lipids. *Glycobiology*, 7, 731-735, **1997**.

ALLARAKHIA, M. Open-source approaches for the repurposing of existing or failed candidate drugs: learning from and applying the lessons across diseases. *Drug design, development and therapy*, 7, 753-766, **2013**.

ALSFORD, S.; ECKERT, S.; BAKER, N.; GLOVER, L.; SANCHEZ-FLORES, A.; LEUNG, K.F.; TURNER, D.J.; FIELD, M.C.; BERRIMAN, M.; HORN, D. High-throughput decoding of antitripanosomal drug efficacy and resistance. *Nature*, 482, 232-236, **2012**.

ALVES, C. R.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M.; MELLO, C. B.; GARCIA, E. S.; NOGUEIRA, N.F.; BOURGUINGNON, S.C.; DE SOUZA, W.; AZAMBUJA, P.; GONZALEZ, M.S. *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, 116 (1), 44-52, **2007**.

ANDRADE, Z. A. The pathology of Chagas disease in man. *Annales des Societes Belges de Medecine Tropicale*, 65 (1), 15-30, **1985**.

ANÔNIMO. Reunião de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas. Validade do conceito de forma indeterminada. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 18, 46, **1985**.

ARAÚJO, C.R.M.; FILHO, C.A.L.; SANTOS, V.L.A.; MAIA, G.L.A.; GONSALVES, A.A. Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual scifinder®. *Química. Nova*, XY (00), 1-6, **2015**.

ARAÚJO, S. M.; ANDÓ, M. H.; CASSAROTTI, D. J.; D'ARCE MOTA, D.C.G.; BORGES, S.M.R.; GOMES, M.L. Programa ACHEI: Atenção ao Chagásico com Educação Integral no Município de Maringá e Região Noroeste do Paraná, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33, 565-572, **2000**.

ARAÚJO, S. M.; MOTA, D. C. G. D.; BORGES, S. M. R. Educação e Apoio Psicossocial ao Paciente Chagásico. *Sociedade Iberoamericana de Información Científica*, **2002**. Acesso em 24-08-2019. Disponível em: <http://www.siicsalud.com>.

ARIYANAYAGAM, M.R. & FAIRLAMB, A.H. Entamoeba histolytica lacks Trypanothione metabolism. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 103, 61-69, **1999**.

ARROWSMITH, J. & HARRISON, R. Drug repositioning: the business case and current strategies to repurpose shelved candidates and marketed drugs. *In*: BARRAT, M.J.; FRAIL,

D.E. Drug repositioning: bringing new life to shelved assets and existing drugs. Hoboken, US: Wiley, 2012. *ProQuest ebrary.web*. Capítulo 1, 9-88, **2016**.

ARSLAN, A.; OZCICEK, A.; SULEYMAN, B.; COBAN, T.A.; CIMEN, F.K.; NALKIRAN, H.S.; KUZUCU, M.; ALTURNER, D.; CETIN, N.; SULEYMAN, H. Effects of nimesulide on the small intestine mucositis induced by methotrexate in rats. *Experimental Animals*, 65, 329- 336, **2016**.

ASHBURN.T.T. & THOR, K.B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 673-683, **2004**.

ATAL, C. K.; ZUTSHI, U.; RAO, P. G. Scientific evidence on the role of ayurvedic herbals on bioavailability of drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, 4 (2), 229-232, **1981**.

ATAL, C. K.; DUBEY, R. K.; SINGH, J. Biochemical basic of enhanced drug bioavailability by piperine-evidence that piperine is a potent inhibitor of drug-metabolism. *The Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, 232 (1), 258-262, **1985**.

AUFDERHEIDEA, A.C.; SALOA, W.; MADDENA, M. S.; STREITZ, J.; BUILKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 17-101 (7), 2034-2039, **2004**.

BAE, G.S.; KIM, M.S.; JUNG, W.S.; SEO, S.W.; YUN, S.W.;KIM, S.G.;PARK, R.K.; KIM, E.C.; SONG, H.J.; PARK, S.J. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by piperine *European Journal of Pharmacology*, 642, 154-162, **2010**.

BAEK, M.C.; JUNG, B.; KANG, H.; LEE, H.S.; BAE, J.S. Novel insight into drug repositioning: Methylthiouracil as a case in point. *Pharmacological Research*, 99, 185–193, **2015**.

BAHIA, M. T.; DE ANDRADE, I.M.; MARTINS, T.A.F.; DO NASCIMENTO, A.F.S.; DINIZ, L.F.; CALDAS, I.S.; TALVANI, A.; TRUNZ, B.B.; TORREELE, E.; RIBEIRO, I. Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **2012**.

BANG, J.S.; OH, D.H.; CHOI, H.M.; SUR, B.J.; LIM, S.J.; KIM, J.Y.; YANG, H.I.; YOO, M.C.; HAHM, D.H.; KIM, K.S. Antiinflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. *Arthritis Research & Therapy*, 11 (2), 1-9, **2009**.

BANO, G.; RAINA, R. K.; ZUTSHI, U.; BEDI, K.L.; JOHRI, R.K.; SHARMA, S.C. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy- volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 41 (6), 615-617, **1991**.

BARREIRO, E. & FRAGA, C.A.M. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. ISBN 9788582711187. 3. ed. Porto Alegre: Artmed,. **2015**.

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

BAUM, S.G.; WITTNER, M.; NADLER, J.P.; HORWITZ, S.B.; DENNIS, J.E.; SCHIFF, P.B.; TANOWITZ, H.B. Taxol, a microtubule stabilizing agent, blocks the replication of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78 (7), 4571-4575, **1981**.

BELARDINELLI, L; HARDER, D.; SPERELAKIS, N.; RUBIO, R; BERNE, R.M. Cardiac glycoside stimulation of inward Ca⁺⁺ current in vascular smooth muscle of canine coronary artery. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, 209, 62-6, **1979**.

BERN, C. & MONTGOMERY, S.P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 52-4, **2009**.

BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M.J.; MONTGOMERY, S.P. *Trypanosoma cruzi* and Chagas's disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, 24 (4), 655, **2011**.

BERN, C. Chagas' Disease. *The New England Journal of Medicine*, 373 (5), 456-466, **2015**.

BÉRUBÉ, G. An overview of molecular hybrids in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2016. Acesso em 10-09-2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1517/17460441.2016.1135125>. **2016**.

BHAT, B. G. & CHANDRASEKHARA, N. Interaction of piperine with rat-liver microsomes. *Toxicology*, 44(1), 91-98, **1987**.

BISGIN, H. A graphical approach to drug safety and drug repositioning. 2012. 128f. Tese (Doctor of Philosophy) – Department of Computer Science, Donaghey College of Engineering and Information Technology, University of Arkansas at Little Rock, EUA, **2012**.

BJARNASON, I. & THJODLEIFSSON, B. Gastrointestinal toxicity of non-steroidal antiinflammatory drugs: the effect of nimesulide compared with naproxen on the human gastrointestinal tract. *Rheumatology*, 38, 24-32, **1999**.

BOCK, M.; GONERT, R.; HABERKORN, A. Studies with Bay 2502 on animals. *Boletín Chileno de Parasitología*, 24, 13-19, **1969**.

BOELSTERLI, U.A.; ZIMMERMAN, I.H.J.; KRETZ-ROMMEL, A. Idiosyncratic Liver Toxicity of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *Molecular Mechanisms and Pathology Critical. Reviews in Toxicology*, 25(3), 207-235, **1995**.

BOIANI, M.; PIACENZA, L.; HERNÁNDEZ, P; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; GONZÁLES, M.; DENICOLA, A. Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved? *Biochemical Pharmacology*, 79, 1736-1745, **2010**.

BONNEY, K.M. & ENGMAN, D.M. Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many? *Current Molecular Medicine*, 8(6), 510–518, **2008**.

BRENER, Z. & ANDRADE, Z.A. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. ISBN 9788527705639. 2. ed. 440p. Rio de Janeiro: Nova Guanabara, **2000**.

BROOKS, P.M. & DAY, R.O. Nonsteroidal antiinflammatory drugs – differences and similarities. *The New England Journal of Medicine*, 324, 1716-1725, **1991**.

BRUNE, K. & GRAFT, P. Non-steroid antiinflammatory drugs: influence of extracellular pH on biodistribution and pharmacological effects. *Biochemical Pharmacology*, 27, 525-30, **1978**.

BUCKNER, F. S.; URBINA, J. A. Recent developments in sterol 14- α -demethylase inhibitors for Chagas disease. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 236–242, **2012**.

BUSCHIAZZO, A.; MUIÁ, R.; LARRIEUX, N.; PITCOVSKY, T.; MUCCI, J.; CAMPETELLA, O. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors. *PLoS Pathogens*, 8, 1-12, **2012**.

BUSCHINI, A.; FERRARINI, L.; FRANZONI, S.; GALATI, S.; LAZARETTI, M.; MUSSI, F.; DE ALBUQUERQUE, C.N.; ZUCCHI, T.M.A.D.; POLI, P. Genotoxicidade reevaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole, and metronidazole. *Journal of Parasitology Research*, 2009, 463-575. **2009**.

BURLEIGH, B. A. & A. M. WOOLSEY. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cellular Microbiology*, 4 (11), 701-711, **2002**.

CAIAZZO, E.; IALENTI, A.; CICALA, C. The relatively selective cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide: What's going on? *European Journal of Pharmacology*, 848, 105-111, **2019**.

CANÇADO, J.R.; MARRA, U.D.; LOPES, M.; MOURÃO, O.; FARIA, C.A.F.; ÁLVARES, J.M.; SALGADO, A.A. Toxicidade y valor terapêutico del Bay 2502 en la

enfermedad de Chagas in tres esquemas posológicos. *Boletín Chileno de Parasitología*, 24, 28-32, **1969**.

CANDELARIO-JALIL, E. Nimesulide as a promising neuroprotectant in brain ischemia: New experimental evidences. *Pharmacological Research*, 57, 266-273, **2008**.

CAPUTTO, M.E.; FABIAN, L.E.; BENÍTEZ, D.; MERLINO, A.; RÍOS, N.; CERECETTO, H.; MOLTRASIO, G.Y.; MOGLIONI, A.G.; GONZÁLEZ, M.; FINKIELSZTEIN, L.M. Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-*Trypanosoma cruzi* agentes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19, 22, 6818-6826, **2011**.

CARTA AO EDITOR. Acadêmicos de Medicina da UFCE. *Triatoma infestans* in Brazil: an historical fact. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39 (5), 507-509, **2006**.

CEVALLOS, A.M.; HERRERA, J.; LÓPEZ-VILLASEÑOR, I.; HERNANDÉZ, R. Differential effects of two widely used solvents, DMSO and etanol, on growth and recovery of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in culture. *The Korean Journal Parasitology*, 55(1), 81-84, **2017**.

CERECETTO, H & GONZALEZ, M. Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2, 1187-1213, **2002**.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1 (2): 159-21, **1909**.

CHANDRASEKHAR, R. B.; JITHAN, A.; NARSIMHA, R. Y.; MALLA, R. V. Fabrication and investigation on hepatoprotective activity of sustained release biodegradable piperine microspheres. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 1 (1), 87-96, **2008**.

CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *Journal of Biomolecular Screening*, 20, 22-35, **2015**.

CHIBALE, K. & MUSONDA, C. C. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 1863, **2003**.

CHONG, C.R.; XU, J.; LU, J.; BHAT, S.; SULLIVAN-JUNIOR, D.J.; LIU, J.O... Inhibition of angiogenesis by the antifungal drug itraconazole. *ACS Chemical Biology*, 2, 263-70, **2007**.

CHONG, C.R. & SULLIVAN, D.J. Jr. New uses for old drugs. *Nature*, 9, 448(7154), 645-6, **2007**.

CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and

cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 798-802, **2010**.

CLAYTON, J. Chagas disease 101. *Nature*, 465, S4–S5, **2010**.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 16 de fevereiro de 2018.

COURA, J.R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy – a proposal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(4), 549-554, **2009**.

COURA, J. R. & CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97 (1), 3-24, **2002**.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, supl. I, 113-122, **2007**.

COURA, J.R. & BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106 (6), 641-645, **2011**.

COURA, J.R. & DE CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 642-645, **2011**.

CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D. H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. *The Lancet*, 375, 239-247, **2010**.

CUÉLLAR, M.A.; SALAS, C.; CORTÉS, M.J.; MORELLO, A.; MAYA, J.D.; PREITE, M.D. Synthesis and *in vitro* Trypanocide activity of several polycyclic drimane-quinone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 293-302, **2003**.

DA COSTA, K.M. Atividade de transportadores ABC em *Trypanosoma cruzi* e sua relação com a resistência ao benznidazol. 2017. 173f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Biofísica). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, **2017**.

DA CRUZ, G.M.P. Estudo dos mecanismos neuroprotetores da piperina nas convulsões induzidas pela pilocarpina em camundongos. 2012. 200f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, **2012**.

DAVIS, R. & BROGDEN, R.N. Nimesulide. An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs*, 48(3), 431-54, **1994**.

DE ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; DA CUNHA, E. V. L.; CHAVES, M. C. O.; GRAY, A. I. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, 44(3), 559-561, **1997**.

DEL CASALE, A.; SORICE, S.; PADOVANO, A.; SIMMACO, M. Psychopharmacological treatment of Obsessive-Compulsive Disorder (OCD). *Current Neuropharmacology*, 13, **2018**.

DENIZOT, F. & LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability *Journal of Immunological Methods*, 89, 271-277, **1986**.

DE SOUZA. Electron microscopy of Tripanosomes – A histórica review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103 (4), 313-325, **2008**.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T.M.U.; BARRIAS, E.S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*, 1, 1-18, **2010**.

DE TORANZO, E.G.D.; CASTRO, J.A.; DE CAZZULO, B.M.F; CAZZULO, J.J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplatic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, 44, 880–881, **1988**.

DHIR, A.; NAIDU, P. S.; KULKARNI, S. K. Neuroprotective effect of nimesulide, a preferential COX-2 inhibitor, against pentylenetetrazol (PTZ)-induced chemical kindling and associated biochemical parameters in mice. *Seizure*, 16, 691-697, **2007**.

DIAS, L.C.; DESSOY, M.A.; SILVA, J.J.N ; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova*, 32, (9), 2444-2457, **2009**.

DIAS, J.C.P. O controle da doença de Chagas no Brasil. In: SILVEIRA, A.C. (org.). O Controle da Doença de Chagas nos Países do Cone Sul da América: História de uma iniciativa internacional 1991-2001. Organização Pan-Americana da Saúde, Brasília, 145-250, **2002**.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. (eds.). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 48-74, **2000**.

DI PERSIO, J.F.; UY, G.L.; YASOTHAN, U.; KIRKPATRICK, P. Plerixaflor. *Nature Review Drug Discovery*, 8, 105-107, **2009**.

DNDi. Drugs for Neglected Diseases *initiative*, **2019**. Acesso em 17-03-2019. Disponível em:
<http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas/tratamentos-atuais.html>.

DUAN, W.; PENG, Q., MASUDA, N.; FORD, E.; TRYGGESTAD, E.; LADENHEIM, B.; ZHAO, M.; CADET, J.L.; WONG., J.; ROSS, C.A. Sertraline slows disease progression and increases neurogenesis in N171-82Q mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 30(3), 312–22, **2008**.

DO CAMPO, R.; LOPES, J.N.; CRUZ, F.S.; SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by beta-lapachone. *Experimental Parasitology*, 42 (1), 142–149, **1977**.

DO CAMPO, R. & STOPPANI, A.O. Mechanism of the trypanocidal action of nifurtimox and other nitro-derivatives on *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (B Aires)*, 40 (Suppl. 1), 10–16, **1980**.

DO CAMPO, R. Sensitivity of Parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemical and Biological Interactions*, 73, 1-27, **1990**.

DONNELLY, E.T.; O'CONNELL M.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Human Reproduction*, 7, 1552-1561, **2000**.

DREWS, J. Drug discovery: a historical perspective. *Science*, 287, **2000**.

EGEBJERG, M.M.; JAGER, A.K.; BJORN, M.; VAN STADEN, J.; STAFFORD, G. I.; HASMUSSEN, H.B. Amides from *Piper capense* with CNS Activity—A Preliminary SAR Analysis. *Molecules*, 14 (9), 3833-3843, **2009**.

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BARTHOLOMEU, D.C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRANS, A.N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E.A.; DELCHER, A.L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S.J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G.C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, E.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D.A.; CARRINGTON, M.; CABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J.F.; DE JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P.T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A.C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M.J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C.R.; McCULLOCH, R.; McKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAN, J.C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J.L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S.L.; SANCHEZ, D.O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A.J.; SISK, E.; TAMMI, M.T.; TARLENTON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P.N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C.M.; STUART, K.D.; ANDERSSON, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309 (5733), 409-15, **2005**.

FABRO, S.; SMITH, R.L.; WILLIAMS, R.T. Toxicity and teratogenicity of optical isomers of thalidomide. *Nature*, 215, 296, **1967**.

FAIRLAMB, A.H. & CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annual Review of Microbiology*, 46, 695–729, **1992**.

FAMAHEY, J. P. *In vitro* and *in vivo* pharmacological evidence of selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulida: An overview. *Inflammation Research*, 46, 437- 446, **1997**.

FAÚNDEZ, M.; PINO, L.; LETELIER, P.; ORTIZ, C.; LÓPEZ, R.; SEGUEL, C.; FERREIRA, J.; PAVANI, M.; MORELLO, A.; MAYA, J.D. Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49, 126–130, **2005**.

FERNANDES, O. & CAMPBELL, D.A. *Trypanosoma cruzi*: cepas de eleição. In: ARAÚJO-JORGE, T. & CASTRO, S.L.(orgs.). *Doença de Chagas - manual para experimentação animal*. 20. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. Capítulo 10.2, 178-183, **2000**.

FERREIRA, W. S. Utilização da piperina como protótipo na síntese de novos anti-chagásicos da classe das 1,3,4- tiadiazólio-2- fenilaminidas. 2006. 197 p. Dissertação (Mestre em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, **2006**.

FERREIRA, W. S.; FREIRE-DE-LIMA, L.; SARAIVA, V.B.; ALISSON-SILVA, F.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J.O.; ECHEVARRIA, A.; DE LIMA, M.E.; Novel 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides derived from natural piperine as trypanocidal agents: chemical and biological studies. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 16, 2984-2991, **2008**.

FERREIRA, C.; SOARES, D. C.; BARRETO-JUNIOR, C. B.; NASCIMENTO, M.T.; FREIRE-DE-LIMA, L.; DELORENZI, J.C.; LIMA, M.E.F.; ATELLA, G.C.; FOLLY, E.; CARVALHO, T.M.U.; SARAIVA, E.M.; PINDO-DA-SILVA, L.H.; Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. *Phytochemistry*, 72, 2155, **2011**.

FERREIRA, W. S.; FRANKLIM, T. N.; LOPES, N. D.; DE LIMA, M. E. F. Piperina, seus análogos e derivados: potencial como antiparasitários. *Revista Virtual de Química*, 4(3), 208-224, **2012**.

FERREIRA, D.D.; MESQUITA, J.T.; SILVA, T.A.C.; ROMANELLI, M.M.; BATISTA, D.G.J.; DA SILVA, C.F.; DA GAMA, A.N.S.; NEVES, B.J.; MELO-FILHO, C.C.; SOEIRO, M.N.C.; ANDRADE, C.H.; TEMPONE, A.G. Efficacy of sertraline against *Trypanosoma cruzi*: an *in vitro* and *in silico* study. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 24, 30, **2018**.

FILARDI, L. S. & BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(5), 755-759, **1987**.

FORREST, M. & BROOKS, P.M. Mechanism of action of non-steroidal anti-rheumatic drugs. *Clinical Rheumatology*, 2, 275-94, **1988**.

FRANKLIM, T, N. Planejamento, síntese e avaliação da atividade de novos 1,2,4-triazóis, derivados da amida natural piperina, contra formas proliferativas do *Trypanosoma cruzi*. 2013. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, **2013**.

FRANKLIM, T, N.; FREIRE-DE-LIMA, L.; DINIZ, J, N, S.; PREVIATO, J. O.; CASTRO, R. N.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; LIMA, M. E. F. Design, synthesis and *Trypanocidal* evaluation of novel 1,2,4-triazoles-3-thiones derived from natural piperine. *Molecules*, 18, 6366-6382, **2013**.

FREIRE-DE-LIMA, L.; RIBEIRO, T. S.; ROCHA, G. M.; BRANDÃO, B. A.; ROMEIRO, A.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O.; FREIRE-DE-LIMA, M. E.; CARVALHO, T. M. U.; HEISE, N. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. *Parasitology Research*, 102, 1059-1067, **2008**.

FREIRE-DE-LIMA, C.G.; NASCIMENTO, D.O.; SOARES, M.B.; BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; DE MELLO, F.G.; DOS REIS, G.A.; LOPES, M.F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic tripanosome in macrophages. *Nature*, 403(6766), 199-203, **2000**.

GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A.; WHITTEN, M. M.; GONZALEZ, M. S.; AZAMBUJA, P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *Journal of Insect Physiology*, 53 (1), 11-21, **2007**.

GHOSHAL, S.; PRASAD, B. N. K.; LAKSIMI, V. Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoebahistolytica* *in vitro* and *in vivo*. *Journal of. Ethnopharmacology*, 50, 167- 170, **1996**.

GIORGI, M. E. & LEDERKREMER, R. M. Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an importante interplay for the parasite. *Carbohydrate Research*, 346, 1389-1393, **2011**.

GODESSART, N. & SALCEDO, C. Antiinflammatory and gastrointestinal lesive effects of novel and classical NSAIDs in rats after acute and subacute treatments. *In: Abstract book of the 10th International Conference on Prostaglandins and related Compounds*, Sept 22–27, Vienna (Austria), **1996**.

GONSALVES, A.A.; ARAÚJO, C.R.M.; FILHO, C.A.L.; MEDEIROS, F.S. Contextualizing acid-base reactions according to Bronsted-Lowry protonic theory using propranolol and nimesulide tablets. *Química Nova*, 35 (8), 1235-1241, **2013**.

GORLA, N.B.; LEDESMA, O.S.; BARBIERI, G.P.; LARRIPA, I.B. Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 224, 263-7, **1989**.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Apoptosis: Programmed Cell Death. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53(3), 335-343, **2007**.

GUPTAU, S.K.; BANSAL, P.; BHARDWAJ, R.K.; VELPANDIAN. T. Comparative anti-nociceptive, anti-inflammatory and toxicity profile of nimesulide vs nimesulide and piperine combination. *Pharmacological Research*, 41, 6, **2000**.

HA, S.; SEO, Y-J; KWON, M-S; CHANG, B-H; HAN, C-K e YOON, J-H. IDMap: facilitating the detection of potential leads with therapeutic targets. *Bioinformatics*, 24 (11), 1413–1415, **2008**.

HALL, B.S & WILKINSON, S.R. Activation of benzimidazole by Trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56 (1), 115, **2011**.

HEALD ,R. & NOGALES, E. Microtubule dynamics. *Journal of Cell Science*, 115, 3-4, **2002**.

HIGGS, A.G.; MONCADA, S.; VANE, J.R. The mode of action of anti-inflammatory drugs with prevent peroxidation of arachidonic acid. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 6, 675-93, **1980**.

HOPKINS, A.L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nature Chemical Biology*, 4 (11), 682-90, **2008**.

HORROBIN, D.F. Realism in drug discovery-could Cassandra be right? *Nature Publishing Group-Nature biotechnology*, 19, 1099-1100, **2001**.

HOTEZ P.J.; MOLYNEUX, D.H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S.E.; SACHS, J.D.; SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. *The New England Journal of Medicine*, 357, 1018–27, **2007**.

HOTEZ, P.; OTTESEN, E.; FENWICK, A.; MOLYNEUX, D. The neglected tropical diseases: the ancient afflictions of stigma and poverty and the prospects for their control and elimination. *In: Hot Topics in Infection and Immunity in Children*. Nova Iorque: Springer, **2006**.

HOTEZ, P.J.; DUMONTEIL, E.; WOC-COLBURN, L.; SERPA J.A.;BEZEC S.; EDWARDS, M.S.; HALLMARK, C.J.; MUSSELWHITE, L.W.; FLINK, B.J.; BOTTAZZI, M.E. Chagas disease: “The new HIV/AIDS of the Americas”. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 6(5), e1498, **2012**.

HUANG, S.A. & LIE, J.D. Phosphodiesterase-5 (PDE₅) Inhibitors in the management of erectile dysfunction. *Pharmacy and Therapeutics*, 38, 7, **2013**.

IKAN, R. *Natural Products: A Laboratory Guide*.2. ed. 340p: Academic Press, 233-238, **1991**.

JIAN, Y.S.; CHEN, C.W.; LIN, C.A.; YU, H.P.; LIAO, M.Y.; WU, S.H.; LIN, Y.F.; LAI, P.S. Hyaluronic acid-nimesulide conjugates as anticancer drugs against CD44-overexpressing HT-29 colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Nanomedicine*, 27 (12), 2315-2333, **2017**.

JIN, G & WONG, S.T.C. Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. *Drug Discovery Today*, 00, 00 January, **2014**.

JOHRI, R. K., THUSU, N., KHAJURIA, A., ZUTSHI, U. Piperine-mediated changes in the permeability of rat intestinal epithelial-cells the status of gamma-glutamyl tranpeptidase activity, uptake of amino-acid and lipid-peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 43 (7), 1401-1407, **1992**.

JONES, A.J.; GRKOVIC, T.; SYKES, M.L.; AVERY, V.M. Trypanocidal activity of marine natural products. *Marine Drugs*, 11, 4058-4082, **2013**.

JONES, R. Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: past, present, and future. *The American Journal of Medicine*, 110, (1A), 7S, **2001**.

KAISER, M.; MÄSER, P.; TADOORI, L.P.; IOSET, J.R.; BRUN, R. Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning. *PLOS ONE*, 13, **2015**.

KAITIN, K.I. Deconstructing the drug development process: the new face of innovation. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 87, 356-61, **2010**.

KAPIL, A. Piperine: a potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro*. *Planta Medica*, 59 (5), 474, **1993**.

KAPPE, C.O.; DALLINGER, D. Controlled microwave heating in modern organic synthesis: highlights from the 2004-2008 literature. *Molecular Diversity*, 13(2), 71-193, **2009**.

KIM, K. J.; LEE, M. S.; JO, K.; HWANG, J. K. Piperidine alkaloids from *Piper retrofractum* Vahl. protect against high-fat diet-induced obesity by regulating lipid metabolism and activating AMPactivated protein kinase. *Biochemica and Biophysical Research Communications*, 411 (1), 219-225, **2011**.

KIUCHI, F.; NAKAMURA, N.; TSUDA, Y.; KONDO, K. e YOSHIMURA H. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. IV. Isolation and identification of larvicidal principles in pepper. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 36, 2452-2465, **1988**.

KLOTZ, S.A.; SCHIMIDT, J.O.; DORN, P. L.; IVANYI, C.; SULLIVAN, K.R.; STEVENS, L. Free-roaming kissing bugs, vectors of Chagas disease, feed often on humans in the Southwest. *The American Journal of Medicine*, 127(5), **2014**.

KONTOGIORGIS, C. A. & HADJIPAVLOU-LITINA, D. J. Non steroidal anti-inflammatory and anti-allergy agents. *Current Medicinal Chemistry*, 9, 89-98, **2002**.

KORNHUBER, J.; MUEHLBACHER, M.; TRAPP, S.; PECHMANN, S.; FRIEDL, A.; REICHEL, M.; MUHLE, C.; TERFLOTH, L.; GROEMER, T.W.; SPITZER, G.M.; LIEDL, K.R.; GULBINS, E.; TRIPAL, P. Identification of Novel Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase. *PLOS ONE*, 6, **2011**.

KOUL, S.; KOUL, J. L.; TANEJA, S. C.; DHAR, K. L.; JAMWAL, D. S.; SINGH, K.; REEN, R. R.; SINGH, J. Structure-activity relationship of piperine and its synthetic analogues for their inhibitory potentials of rat hepatic microsomal constitutive and inducible cytochrome P450 activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 8(1), 251-268, **2000**.

KUMAR, S.; SARAVANAKUMAR, M.; RAJA, B. Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent of pepper on nitric oxide, antioxidants and lipid peroxidation markers in L-NAME induced hypertensive rats. *International Journal of Pharmacology Sciences and Research*, 1, 300-307, **2010**.

KUMMER, C.L. & COELHO, T.C.R.B. Cyclooxygenase-2 inhibitors nonsteroid anti-inflammatory drugs: Current Issues. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 52 (4), 498-512, **2002**.

LEE, S. A.; HONG, S. S.; HAN, X. H.; HWANG, J.S.; OH, G.H.; LEE, K.S.; LEE, M.K.; HWANG, B.Y.; RO, J.S. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on monoamine oxidase and antidepressant-like activity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 53 (7), 832-835, **2005**.

LEPESHEVA, G.I. Design or screening of drugs for the treatment of Chagas disease: what shows the most promise? *Expert Opinion on Drug Discovery*, 8(12), **2013**.

LEY, V.; ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*, 168, 649-659, **1988**.

LEWINSON, R. Carlos Chagas and the discovery of Chaga's disease (*American Trypanosomiasis*). *Journal of the Royal Society of Medicine*, 74 (6), 451-455, **1981**.

LIMA, L.M. & BARREIRO, E. Bioisosterism: an useful strategy for molecular modification and drug design. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 23-49, **2005**.

LIU, C.; CHANG, S.H.; NARKO, K.; TRIFAN, O.C.; WU, M.T.; SMITH, E.; HAUDENSCHILD, C.; LANE, T.F.; HLA, T. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumor genesis in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (21), 18563-18569, **2001**.

MA'AYAN, A.; JENKIS, S.L.; GOLDFARB, J.; IYENGAR, R. Network analysis of FDA approved drugs and their targets. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 74,27-32, **2007**.

MACHADO, F.S.; MUKHERJEE, S.; WEISS, L.M.; TANOWITZ, H.B.; ASHTON, A.W. Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection. *Advances in Parasitology*, 76, 1-31, **2011**.

MAIA, R. C.; SILVA, L.L.; MAZZEU, E.F.; FUMIAN, M.M.; DE REZENDE, C.M.; DORIGUETTO, A.C.; CORRÊA, R.S.; MIRANDA, A.L.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A. Synthesis and analgesic profile of conformationally constrained N-acylhydrazone analogues: Discovery of novel N-arylideneamino quinazolin-4(3H)-one compounds derived from natural safrole. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 6517-6525, **2009**.

MAIA, R.C. & FRAGA, C.A.M. Discovery of dual chemotherapy drug candidates designed by molecular hybridization current. *Enzyme Inhibition*, 6, 171-182, **2010**.

MARCH, J. Advanced organic chemistry-reactions, mechanism and structure. 3. ed.: *John Willey & Sons*: 388, 437, 438, 1095, 1099, 1100 e 1101, **1985**.

MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M.; JUNQUEIRA, A.C.V. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2 B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*, 136, 641-655, **2009**.

MAO, Q. Q.; XIAN, Y. F.; IP, S. P.; CHE, C.T. Involvement of serotonergic system in the antidepressant-like effect of piperine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35, 1144-1147, **2011**.

MARQUES, J. V.; OLIVEIRA, A.; RAGGI, L.; YOUNG, M.C.M.; KATO, M.J.. Antifungal activity of natural and synthetic amides from *Piper* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21, (10), 1807-1813, **2010**.

MARTINELLI, A.; RODRIGUES, L. A.; CRAVO, P. *Plasmodium chabaudi*: efficacy of artemisinin + curcumin combination treatment on a clone selected for artemisinin resistance in mice. *Experimental Parasitology*, 119, 304-307, **2008**.

MATTHEWS, S.J. & McCoy, C. Thalidomide: a review of approved and investigational uses. *Clinical therapeutics*, 25, (2), **2003**.

MATTILA, M.A.K. & LARNI, H.M. Flunitrazepam: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs*, 20, 353-374, **1980**.

MATSUDA, H.; NINOMIYA, K.; MORIKAWA, T.; YASUDA, D.; YAMAGUCHI, I.; YOSHIKAWA, M. Hepatoprotective amide constituents from the fruit of *Piper chaba*: structural requirements, mode of action, and new amides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 7313-7323, **2009**.

MASON, R.P. & HOLTZMAN, J.L. The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 67, 1267–1274, **1975**.

MAYA, J. D.; BOLLO, S; NUÑES-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PÉRIÉ, J.; CHAUVIÈRE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives. *Biochemical Pharmacology*, 65, 999-1006, **2003**.

MAYA, J.D.; CASSELS, B.K.; ITURRIAGA-VASQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 146, 601–620, **2007**.

MAZZETI, A.L.; DINIZ, L.F.; GONÇALVES, K.R.; WONDOLLINGER, R.S.; ASSÍRIA, T.; RIBEIRO, I.; BAHIA, M.T. Synergic effect of allopurinol in combination with nitro-heterocyclic compounds 2 against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 8, **2019**.

MEANWELL, N.A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 2529–2591, **2011**.

MEDINA-FRANCO, J.L.; GIULIANOTTI, M.A.; WELMAKER, G.S.e HOUGHTEN, R.A. Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 00, 00, **2013**.

MEHTA, A; KAUR, G; CHINTAMANENI, M. Piperine and quercetin enhances antioxidant and hepatoprotective effect of curcumin in paracetamol induced oxidative stress. *International Journal of Pharmacology*, 8, 101–7, **2012**.

MENNA-BARRETO, R.F.S.; SALOMÃO, K.; DANTAS, A.P.; SANTA-RITA, R.M.; SOARES, M.J.; BARBOSA, H.S.; DE CASTRO, S.L. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron*, 40, 157-168, **2009**.

MEZENCEV, R.; GALLIZI, M.; KUTSCHY, P.; DO CAMPO, R. *Trypanosoma cruzi*: antiproliferative effect of indole phytoalexins on intracellular amastigotes *in vitro*. *Experimental Parasitology*, 122, 66-69, **2008**.

MILDER, R. & KLOETZEL, J. The development of *Trypanosoma cruzi* in macrophages *in vitro*. Interaction with lysosomes and host cell fate. *Parasitology*, 80, 139-145, **1980**.

MINISTÉRIO DA SAÚDE-Doenças Infecciosas e Parasitárias-Guia de Bolso Revista. 8. ed.: Brasília, DF, **2010**.

MINGATTO, F.E.; SANTOS, A.C.; RODRIGUES, T.; PIGOSO, A.A.; UYEMURA, S.A.; CURTI, C. Effects of nimesulide and its reduced metabolite on mitochondria. *British Journal of Pharmacology*, 131, 1154-1160, **2000**.

MUNOZ-BELLIDO, J.; MUNOZ-CRIADO, S.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, J.A. Antimicrobial activity of psychotropic drugs: selective serotonin reuptake inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14(3), 177–80, **2000**.

MITSCHER, L. A.; LEMKE, T. L.; GENTRY, E. J. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 6.ed. Lippincott: Williams & Wilkins, **2012**.

MURTA, S. M.; DOS SANTOS, W. G.; ANACLETO, C.; NIRDE, P.; MOREIRA, E. S. e ROMANHA, A. J. Drug resistance in *Trypanosoma cruzi* is not associated with amplification or overexpression of P-glycoprotein (PGP) genes. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 117 (2), 223-228, **2001**.

MORELLO, A.; LIPCHENCA, I.; CASSELS, B.K.; SPEISKY, H.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry & Physiology-Pharmacology Toxicology & Endocrinology*, 107, 367–371, **1994**.

MORENO, S.N., DO CAMPO, R., MASON, R.P.; LEON, W.; STOPPANI, A.O.M. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 218, 585–591, **1982**.

MORILLO, C. A., MARIN-NETO, J. A., AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S.; RASSI JR, A.; ROSAS, F.; VILLENA, E.; QUIROZ, R.; BONILLA, R.; BRITTO, C.; GUHL, F.; VELAZQUEZ, E. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, 373, 1295-1306, **2015**.

MOTA, D. C. G. D.; PEREIRA, A. M. T. B.; ARAÚJO, S. M.; GOMES, M. L. Estresse e resiliência em doença de Chagas. *Aletheia*, 24, 57-68, **2006**.

MUELAS-SERRANO, S.J.J.; NOGAL-RUIZ, A.; GOMEZ-BARRIO. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*, 86, 12, 999-1002, **2000**.

MULLEN, O. L.; DODD, M. C.; MINTON, J. P. Evaluation of dye exclusion and colony inhibition techniques for detection of polyoma-specific, cell-mediated immunity. *Journal of National Cancer Institute*, 54, 229-231, **1975**.

MUNOZ-BELLIDO, J.; MUNOZ-CRIADO, S.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, J.A. Antimicrobial activity of psychotropic drugs: selective serotonin reuptake inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14(3), 177–80, **2000**.

NANAVATY, V.; LAMA, R.; SANDHU, R.; ZHONG, B.; KULMAN, D.; BOBBA, V.; ZHAO, A.; LI, B.; SU, B. Orally active and selective tubulin inhibitors as anti-Trypanosome agents. *Plos One*, 15, **2016**.

NAVARRO, M.; CISNEROS-FAJARDO, E.J.; LEHMANN, T.; SANCHEZ-DELGADO, R.S.; ATENCIO, R.; SILVA, P.; LIRA, R.; URBINA, J.A. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 6. Synthesis and characterization of new copper(II) and gold(I) clotrimazole and ketoconazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*. *Inorganic Chemistry*, 40, 6879-6884, **2001**.

NEPALI, K; SHARMA, S.; SHARMA, M.; BEDI, P.M.S.; DHAR, K.L. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 77, 422-487, **2014**.

NETTER, P; LAPICQUE, F.; BANNWARTH, B.; TAMISIER, J.N.; THOMAS, P. ROYER, R.J. Diffusion of intramuscular ketoprofen into the cerebrospinal fluid. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 29 (3), 319-321, **1985**.

NEWMAN, D.J. & CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629-661, **2016**.

NOVAC, N. Challenges and opportunities of drug repositioning. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34 (5), **2013**.

OATES, J.A. Nonsteroidal antiinflammatory drugs-differences and similarities. *The New England Journal of Medicine*, 324, 1716-1725, **1991**.

OMS. Metrics: Disability-Adjusted Life Year (DALY). World Health Organization, **2015**. Acesso em 01-06-2019.

Disponível em: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/metrics_daly/en/.

ONG, M.M.; WANG, A.S.; LEOW, K.Y.; KHOO, Y.M.; BOELSTERLI, U.A. Nimesulide-induced hepatic mitochondrial injury in heterozygous *Sod2^{+/-}* mice. *Free Radical Biology & Medicine*, 40, 420-429, **2006**.

OPREA, T.I.; NIELSEN, S.K.; URSU, O.; YANG, J.J.; TABOUREAU, O.; MATHIAS, S.L.; KOUSKOUMVEKAKI, I.; SKLAR, L.A.; BOLOGA, C.G. Association drugs, targets and clinical outcomes into an integrated network affords a new platform for computer-aided drug repurposing. *Molecular Informatics*, 14, 30 (2-3), 100-11, **2011**.

OPAS (Organización Panamericana de la Salud) XIII Reunión de la comisión intergubernamental para la eliminación de *Triatoma infestans* y la interrupción de la tripanosomiasis americana por transfusión. Montevideo y Argentina, Mar, 29-31, **2004**.

OUELLETTE, R.J. & RAWN, J.D. Amines and amides. *In: Principles of organic chemistry*. OUELLETTE, R.J. & RAWN, J.D. 1. ed. 496p.: Elsevier, 315-342, **2015**.

PACHER, P.; NIVOROZHKIN, A.; SZABO, C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacological Reviews*, 58, 87–114, **2006**.

PADHY, B.M. & GUPTA, Y.K. Drug repositioning: re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. *Journal of Postgraduate Medicine*, 57, 153-160, **2011**.

PAIVA, C.N; FEIJÓ, D.F.; DUTRA, F.F.; CARNEIRO, V.C.; FREITAS, G.B.; ALVES, L. S.; MESQUITA, J.; FORTES, G.B.; FIGUEIREDO, R.T.; SOUZA, H.S.P.; FONTAPPIÉ, M.R.; LANNES-VIEIRA, J.; BOZZA, M.T. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122, 7, **2012**.

PALIT, P. & ALI, N. Oral therapy with sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, shows activity against *Leishmania donovani*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(5), 1120–4, **2008**.

PAPADOPOULOU, M.V., TRUNZ, B.B.; BLOOMER, W.D.; MCKENZIE, C.; WILKINSON, S.R.; PRASITICHAI, C.; BRUN, R.; KAISER, M.; TOREELE, E. Novel 3-nitro-1*H* 1,2,4-triazole-based aliphatic and aromatic amines as anti-Chagasic agents. *Journal of Medicine Chemistry*, 54, 8214-23, **2011**.

PATTERSON, D.E.; CRAMER, R.D.; FERGUSON, A.M.; CLARCK, R.D.; WEINBERGER, L.E. Neighborhood behavior: a useful concept for validation of ‘molecular diversity’ descriptors. *Journal of Medicine Chemistry*, 39, 3049–3059, **1996**.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S.; STOJANOVSKY, L.; PERRY, M.R.; SIMEONS, F.R.C.; NORVAL, S.; OSUNA-CABELLO, M.; DE RYCKER, M.; FAIRLAMB, A.H. The *R* enantiomer of the antitubercular drug PA-824 as a potential oral treatment for visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 57, 4699-4706, **2013**.

PATTERSON, S. & WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of Trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends in Parasitology*, 30 (6), **2014**.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, 46(4), 597-673, **1997**.

PARTHASARATHY, V.A.; CHEMPAKAM, B.; ZACHARIAH, T.J. Chemistry of spices. CAB International: Oxfordshire, cap. 2, **2008**.

PAULO, M. & PETER, J. Beyond Cox-inhibition: ‘side-effects’ of ibuprofen on neoplastic development and progression. *Current Pharmaceutical Design*, 21, 2978-2982, **2015**.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. Introduction to Spectroscopy. 5. ed. 784 p : Cengage Learning, **2014**.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; ACOSTA-SERRANO, A.; ALMEIDA, I.C.; FERGUSON, M.A.J.; SOUTO-PADRÓN, T.; RODRIGUES, M.M.; TRAVASSOS, L.R.; SCHENKMAN, S. Mucin-like molecules from a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti- α -galactosyl antibodies. *Journal of Cell Science*, 113, 1299-1307, **2000**.

PEREZ-MAZLIAH, D.E.; ALVAREZ, M.G.; COOLEY, G.; LOCOCO, B.E.; BERTOCCHI, G.; PETTI, M.; ALARMENTI, A.H.; TARLETON, R.L.; LAUCELLA, S.A.; ALBAREDA, M.C.; VIOTTI, R. Sequential combined treatment with allopurinol and benznidazole in the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a pilot study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68, 424-437, **2013**.

PEREZ, C. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C.A. Reactivation of chagas disease: implications for global health. *Trends in Parasitology*, 31 (11), 595-603, **2015**.

PERICHERLA, S.; MAREDDY, J.; GEETHA RANI, D. P.; GOLLAPUD, P.V.; PAL, S. Chemical modifications of nimesulide. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 18 (2), 384-390, **2007**.

PINAZO, M.J.; ESPINOSA G.; GÁLLEGO, M.; LÓPEZ-CHEJADE, P.L.; URBINA, J.A.; GASCÓN, J. Successful treatment with posaconazole of a patient with chronic Chagas disease and systemic lupus erythematosus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82, 583–587, **2010**.

POKROVSKAYA, V.; BELAKHOV, V.; HAINRICHSON, M.; YARON, S.; BAASOV, T. Design, synthesis, and evaluation of novel fluoroquinolone aminoglycoside hybrid antibiotics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 2243-2254, **2009**.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 1, 92–100, **2001**.

PRATA, A.; MACÊDO, V.; PORTO, G.; SANTOS, I.; CERISOLA, J.A.; SILVA, N. Tratamento da doença de Chagas pelo nifurtimox (Bayer 2502). *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 9, 6, **1975**.

PRESTON, S.J.; ARNOLD, M.H.; BELLER, E.M.; BROOKS, P.M.; BUCHANAN, W.W. Comparative analgesic and anti-inflammatory properties of sodium salicylate and acetylsalicylic acid (aspirin) in rheumatoid arthritis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 27, 607-11, **1989**.

RAAY, B.; MEDDA, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BASU, M. K. Targeting of piperine intercalated in mannose-coated liposomes in experimental leishmaniasis. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 36 (4), 248-251, **1999**.

RAETHER, W. & HANEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitology Research*, 50, 19-39, **2003**.

RAINSFORD, K. D. Relationship of nimesulida safety to its pharmacokinetics: assessment of adverse reactions. *Rheumatology*, 38, 4-10, **1999**.

RAO, V. R. S.; SURESH, G.; RAO, R. R.; BABU, K. S.; CHASHOO, G.; SAXENA, A. K.; RAO, J. M. Synthesis of piperine-amino acid ester conjugates and study of their cytotoxic activities against human cancer cell lines. *Medicinal Chemistry Research*, 21, 38, **2010**.

RASHEED, S.; SÁNCHEZ, S.S.; YOUSUF, S.; HONORÉ, S.M.; CHOUDHARY, M.I. Drug repurposing: *in-vitro* anti-glycation properties of 18 common drugs. *PLOS ONE*, 13, e0190509, **2018**.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. *The Lancet*, 375,1388–402, **2010**.

RASSI A. JR.; RASSI, A.; DE REZENDE, J.M. American Tripanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26 (2), 275-291, **2012**.

REEN, R. K., JAMWAL, D.S., TANEJA, S. C.; KOUL, J.L.; DUBEY, R.K.; WIEBEL, F.J.; SINGH, J. Impairment of UDP-glucose dehydrogenase and glucuronidation activities in liver and small-intestine of rat and guinea-pig *in vitro* by piperine. *Biochemical Pharmacology*, 46(2), 229-238, **1993**.

REEN, R. K., WIEBEL, F. J., SINGH, J. Piperine inhibits aflatoxin B-1-induced cytotoxicity and genotoxicity in V79 Chinese hamster cells genetically engineered to express rat cytochrome P4502B1. *Journal of Ethnopharmacology*, 58 (3), 165-173, **1997**.

REITHINGER, R.; TARLETON, R. L.; URBINA, J. A.; KITRON, U.; GÜRTLER, R. E. Eliminating Chagas' disease: challenges and a roadmap. *The BMJ*, 338, b1283, **2009**.

REY, L. *Parasitologia*. 3. ed. 856 p. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **2011**.

RIBEIRO, T. S., LIMA, L. F., PREVIATO, J. O., PREVIATO, L. M., HEISE, N., LIMA, M. E. F. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 3555–3558, **2004**.

RISS, T.L.; MORAVEC, R.A.; MINOR, L.; NILES, A.L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H.A.; WORZELLA, T.J. Cell Viability Assays Assay Guidance Manual, 1 (1), 305-336, **2013**.

RODRIGUES, J.C. & DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors. *Current Pharmaceutical Design*, 14 (9), 925–938, **2008**.

RODRIGUES, J.H.S.; STEIN, J.; STRAUSS, M.; RIVAROLA, H.W.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V.; DUSZENKO, M. Clomipramine kills *Trypanosoma brucei* by apoptosis. *International Journal of Medical Microbiology*, 306, 196-205, **2016**.

ROMANO, P.S.; CUETO, J.A.; CASASSA, A.F.; VANRELL, M.C.; GOTTLIEB, R.A.; COLOMBO, M.I. Molecular and cellular mechanisms involved in *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. *IUBMB Life*, 64, 387-396, **2012**.

ROMÃO, J.A.; BOCCARDO, L.; DE PAULA, V.F.; CHAGAS, R.J.; MOREIRA, B.O. Toxicidade de extratos de *Piper nigrum*, piperina e piperamidas para o diplópodo *Orthoporus fuscipes* em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Toxicologia*, 21(1), 33-38, **2008**.

ROUZER, C.A. & MARNETT, L.J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of Lipid Research*, 50 (Suppl), S29-S34, **2009**.

RUELA, A.L.M.; ARAÚJO, M.B.; PEREIRA, G.R. Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação *in vitro*. *Química Nova*, 32, 1, 165-168, **2009**.

SAADEH, H.A.; MOSLEH, I.M.; MUBARAK, M.S. Synthesis of novel hybrid molecules from precursors with known antiparasitic activity. *Molecules*, 14, 1483-1494, **2009**.

SANGWAN, P.L.; KOUL, J.L.; SURRINDER, K.; REDDY, M.V.; THOTA, N.; KHAN, I.; KUMAR, A.; KALIA, N.; QAZI, G.N. Piperine analogues as potente *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 9847-9857, **2008**.

SBARAGLINI, M.L.; VANRELL, M.C.; BENAÏM, G.; CARRILLO, C.; TALEVI, A.; ROMANO, P.S. Neglected tropical protozoan diseases: drug repositioning as a rational option. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16 (19), 2201-2222, **2016**.

SCHENKMAN, S.; JIANG, M.S.; HART, G. W.; NUSSENWEIG, V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell*, 65, 1117-1125, **1991**.

SCHMIDT, A. & KRAUTH-SIEGEL, R. L. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2, 1239-1259, **2002**.

SEEBEK, T.; STERK, G.J.; KE, H. Phosphodiesterase inhibitors as a new generation of antiprotozoan drugs: exploiting the benefit of enzymes that are highly conserved between host and parasite. *Future Medicinal Chemistry*, 3(10), 1289-1306, **2011**.

SEIBERT, K. & MASFERRER, J.L. Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor*, 4,17–23, **1994**.

SEMLER, U. & GROSS, G.G. Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*. *Phytochemistry*, 27 (5), 1566-1567, **1988**.

SHIM, J.S. & LIU, J.O. Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs. *International Journal of Biological Sciences*, 10 (7), 654-663, **2014**.

SHOBA, G.; JOY, D.; THANGAM, J.; MAJEED, M.; RAGENDRAM, R.; SRINIVAS, P. S. R. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Medica*, 64 (4), 353-356, **1998**.

SHOUKRI, R.A.; AHMED, I.S.; SHAMMA, R.N. *In vitro* and *in vivo* evaluation of nimesulide lyophilized orally disintegrating tablets. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*, 73, 162-171, **2009**.

SILVA, E.F.; CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; BRAZ, V.R.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L. L.; ECHEVARRIA, A. Synthesis and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 37 (12), 979-984, **2002**.

SINGH, B.K.; TRIPATHI, M.; PANDEY, P.K.; KAKKAR, P. Nimesulide aggravates redox imbalance and calcium dependent mitochondrial permeability transition leading to dysfunction *in vitro*. *Toxicology*, 275, 1–9, **2010**.

SINGH, I.P.; JAIN, S.K.; KAUR, A.; SINGH, S.; KUMAR, R.; GARG, P.; SHARMA, S.S.; ARORA, S.K. Synthesis and antileishmanial activity of piperoyl-amino acid conjugates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 3439-3445, **2010**.

SOUZA, R.F. O que é um estudo clínico randomizado? *Medicina (Ribeirão Preto)*, 42 (1), 3-8. Disponível em: <http://www.fmrp.usp.br/revista>. Acesso em: 16-07-2019. **2009**.

SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 735-748, **2007**.

SPIELBERG, S.P. *In vitro* assessment of pharmacogenetic susceptibility to toxic drug metabolites in humans. *Federation Proceedings*, 43 (8), 2308-13, **1984**.

SQUELLA, J.A.; GONZALEZ, P.; BOLLO, S.; NUNEZ-VERGARA, L.J. Electrochemical generation and interaction study of the nitro radical anion from nimesulide. *Pharmaceutical Research*, 16 (1), 161-164, **1999**.

STENKVIST, B.; BENGTSSON, E.; DAHLQVIST, B.; ERIKSSON, O.; JARKRANS, T.; NORDIN, B. Cardiac glycosides and breast cancer, revisited. *The New England Journal of Medicine*, 306, 484, **1982**.

SUETH-SANTIAGO, V. Avaliação da atividade tóxica e investigação sobre os prováveis mecanismos de ação de diarileptanoides naturais, seus derivados e análogos frente ao *Trypanosoma cruzi*. 2015. 274 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, **2015**.

SUETH-SANTIAGO, V.; DECOTE-RICARDO, D.; MORROT, A.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; LIMA, M.E.F. Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. *World Journal of Biological Chemistry*, 8, 57–80, **2017**.

SÜLEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGOZ, Y.; OZTASAN, N.; SULEYMAN, B. Antiinflammatory effects of selective COX-2 inhibitors. *Polish Journal of Pharmacology*, 56, 775-780, **2004**.

SÜLEYMAN, H.; CADIRCI, E.; ALBAYRAK, A.; HALICI, Z. Nimesulide is a selective COX-2 inhibitory, atypical non-steroidal anti-inflammatory drug. *Current Medicinal Chemistry*, 15 (3), 278-83, **2008**.

SUNILA, E. S. & KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 339-346, **2004**.

TIBAYRENC, M. & AYALA, F.J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends in Parasitology*, 18, 405–410, **2002**.

TOGNELLA, S. Nimesulide new clinical opportunities. *Drugs*, 46 (Suppl. I), 275-276, **1993**.

TRAVERSA, G.; BIANCHI, C.; DA CAS, R.; ABRAHA, I.; MENNITI-IPPOLITO, F.; VENEGONI, M. Cohort study of hepatotoxicity associated with nimesulide and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *British Medicinal Journal*, 327, 18-22, **2003**.

TROCHINE, A; CREEK, D.J.; FARAL-TELLO, P.; BARRETT, M.P.; ROBELLO, C Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8 (5), e2844, **2014**.

TRUONG, D.D. Tolcapone: review of its pharmacology and use as adjunctive therapy in patients with Parkinson's disease. *Clinical Interventions in Aging*, 4, 109-113, **2009**.

UCHIYAMA, N. J. Antichagasic activities of natural products against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Health Science*, 55, 1, 31-39, **2009**.

URBINA, J.A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; LIRA, R.; ROMANHA, A.J. *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21, 27-38, **2003**.

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

VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin-like drugs. *Nature New Biol*, 231, 232-235, **1971**.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, 38, 97-120, **1998**.

VANNIER-SANTOS, M.A.; CASTRO, S.L. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. *Current Drug Targets*, 10 (3), 246-60, **2009**.

VARGAS-MÉNDEZ, L.Y.; KOUZNETSOV, V.V. Cruzain inhibitors as prominent molecules with the potential to become drug candidates against Chagas disease. *Journal of Pharmacological Research*, 2 (3), 1–7, **2019**

VEERAREDDY, P. R.; VOBALABOINA, V.; NAHID, A. Formulation and evaluation of oil-in-water emulsions of piperine in visceral leishmaniasis. *Die Pharmazie*, 59 (3), 194-197, **2004**.

VIEGAS-JUNIOR, C.; DANUELLO, A.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 1829-1852, **2007**.

VILLALTA, F.; MADISON, M. N.; KLESHCHENKO, Y. Y.; NDE, P.N.; LIMA, M. F. Molecular analysis of early host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers In Bioscience*, 13, 3714-3734. **2009**.

VIODÉ, C.; BETTACHE, N.; CENAS, N.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.; CHAUVIÉRE, G.; BAKALARA, N.; PÉRIÉ, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochemical Pharmacology*, 57, 549-557, **1999**.

VOAK, A.A.; GOBALAKRISHNAPILLAI, V.; SEIFERT, K.; BALCZO, E.; HU, L.; HALL, B.S.; WILKINSON, S.R. An essential type nitroreductase from *Leishmania major* can be used to activate leishmanicidal prodrugs. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 28466-28476, **2013**.

WALSH, J.S. & MIWA, G. T. Bioactivation of drugs: risk and drug design. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 51, 145-167, **2011**.

WARNOCK, D.W. Itraconazole and fluconazole: new drugs for deep fungal infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 24, 275-7, **1989**.

WERBOVETZ, K.A. Tubulin as an antiprotozoal drug target. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2 (6), 519–529, **2002**.

WHO (Word Health Organization). Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: WHO, 115p., **1998**.

WHO. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. TDR - Technical Report Series, vol. 905, Geneva, **2002**

WHO. *TDR and product/drug discovery, introduction*. Acesso em 15-04-2019. Disponível em: <http://apps.who.int/tdr/svc/topics/product-drug-development>, **2009**

WHO: Chagas disease (American Tripanosomiasis) fact sheet (revised in June 2010). *Weekly Epidemiological Record*, 85, 334–6, **2010**

WHO. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. Technical report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization; (WHO Technical Report Series, 975), **2012**.

WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. *First WHO report on neglected tropical diseases*, **2011**.

WILKINSON, S.R.; PRATHALINGAM, S.R.; TAYLOR, M.C. *et al*. Functional characterisation of the iron superoxide dismutase gene repertoire in *Trypanosoma brucei*. *Free Radical Biology & Medicine*, 40,198–209, **2006**.

WILKINSON, S.R.; TAYLOR, M.C.; HORN, D.; KELLY, J.M.; CHEESEMAN, I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in *Trypanosomes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 13p, 5022-5027, **2008**.

WILKINSON, S.R. & KELLY, J.M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Experts Reviews in Molecular Medicine*, 11, e31. Acesso em 26-09-2019. Disponível em: http://journals.cambridge.org/abstract_S1462399409001252. **2009**.

WILKINSON, S.R.; BOT, C.; KELLY, J.M.; HALL, B.S. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. *Current Topics in Medicine Chemistry*, 11, 2072–2084, **2011**.

WRIGHT, V. A review of benorylate - a new antirheumatic drug. *Scandinavian Journal of Rheumatology Supplement*, 13, 5-8, **1975**.

WYNSEN, J.C.; O'BRIEN, P.D.; WARLTIER, D.C. Zatebradine, a specific bradycardic agent, enhances the positive inotropic actions of dobutamine in ischemic myocardium, *Journal of the American College of Cardiology*, 23 (1), 233-241, **1994**.

ZHAI, B.; WU, C.; WANG, L.; SACHS, M.S. e LIN, X. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic *cryptococcal* infections. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 56(7), 3758–66, **2012**.

ZHOU, L.; STEWART, G.; RIDEAU, E.; WESTWOOD, N.J.; SMITH, T.K. A class of 5-nitro-2-furancarboxylamides with potent Trypanocidal activity against *Trypanosoma brucei* *in vitro*. *Journal of Medicine Chemistry*, 56, 796-806, **2013**.

ZINGALES, B. & COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells. In: *The biology of Trypanosomes*. Berlin: Springer Verlag, **1995**.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.; 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.; SCHIGMAN, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 1051–1054, **2009**.

ZINGALLES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: something new for something know about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 184, 38-52, **2018**.

ZHONG, B.; CAI, X.; CHENNAMANESI, S.; YI, X.; LIU, L.; PINK, J.J.; DOWLATI, A.; XU, Y; ZHOU, A.; SU, B. From COX-2 inhibitor nimesulide to potent anti-cancer agent: synthesis, *in vitro*, *in vivo* and pharmacokinetic evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (1), 432-444, **2012**.

ANEXOS

CROMATOGRAMAS DAS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS.

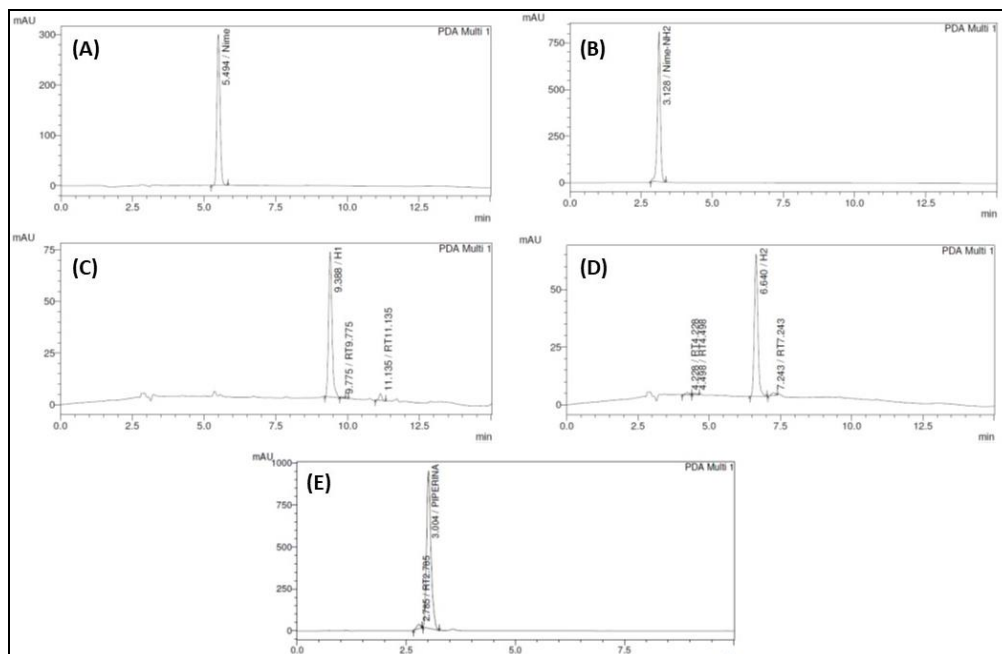


Figura 56. Análises de cromatografia líquida de alta eficiência para as substâncias isoladas ou obtidas por transformações químicas, testadas frente às diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*. Cromatograma **A**: Nimesulida (**3**); Cromatograma **B**: Nimesulida reduzida (**4**); Cromatograma **C**: Híbrida nimesulida-piperina, **H1**; Cromatograma **D**: Híbrida nimesulida-piperina, **H2**; Cromatograma **E**: Piperina (**5**), isolada de *Piper nigrum*. Todos os compostos enviados para avaliação biológica apresentaram grau de pureza > 95% por CLAE. O equipamento e coluna utilizados, bem como as condições de análise, encontram-se descritas na parte experimental desta tese.

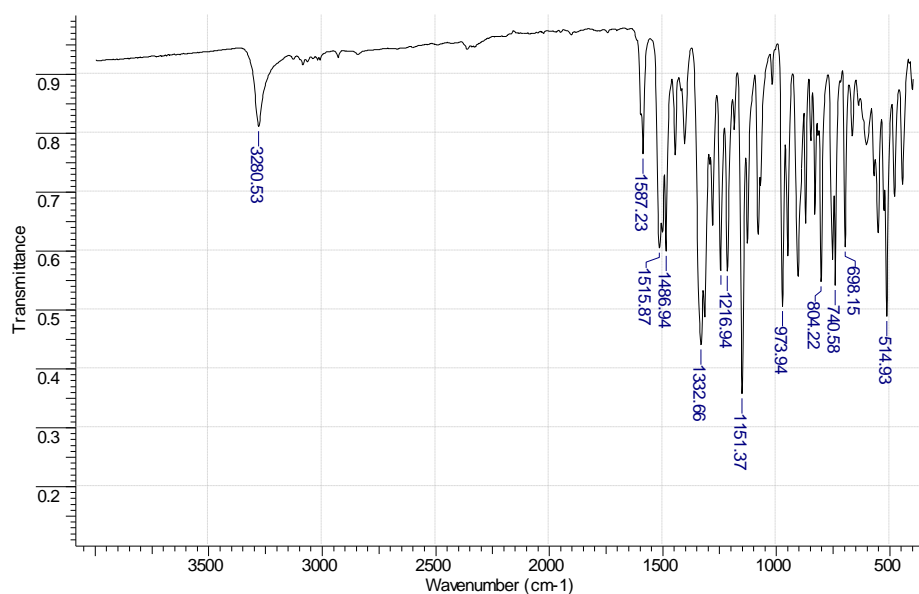
CADERNO DE ESPECTROS

Espectro 1. Espectro de infravermelho da nimesulida (3).	145
Espectro 2. Espectro de RMN ¹ H da nimesulida (3) em CDCl ₃ a 500 MHz.	146
Espectro 3. Espectro de RMN ¹³ C da nimesulida (3) em CDCl ₃ 500 MHz.	146
Espectro 4. Espectro de massas da nimesulida (3).	148
Espectro 5. Espectro de IV da nimesulida reduzida (7).	149
Espectro 6. Espectro RMN ¹ H da nimesulida reduzida (7) em DMSO-d ₆ 500 MHz.	150
Espectro 7. Espectro de RMN ¹³ C da nimesulida reduzida (7).	150
Espectro 8. Espectro de massas da nimesulida reduzida (7).	152
Espectro 9. Espectro de IV da piperina (4).	153
Espectro 10. Espectro RMN ¹ H da piperina (4) em CDCl ₃ a 500 MHz.	154
Espectro 11. Espectro de RMN ¹³ C da piperina (4).	154
Espectro 12. Espectro de massas da piperina (4).	156
Espectro 13. Espectro de IV do ácido piperínico (5).	157
Espectro 14. Espectro RMN ¹ H do ácido piperínico (5) em CDCl ₃ a 500 MHz.	158
Espectro 15. Espectro de RMN ¹³ C do ácido piperínico (5).	158
Espectro 16. Espectro de massas do ácido piperínico (5).	160
Espectro 17. Espectro de Infravermelho de H1.	161
Espectro 18. Espectro RMN ¹ H do primeiro híbrido H1 em CDCl ₃ a 500 MHz.	162
Espectro 19. Espectro de RMN ¹³ C do primeiro híbrido H1.	163
Espectro 20. Espectro de massas (a) em alta resolução do primeiro híbrido H1.	165
Espectro 21. Espectro de massas (b) em alta resolução do primeiro híbrido H1.	166
Espectro 22. Espectro de IV do segundo híbrido H2.	167
Espectro 23. Espectro RMN ¹ H do segundo híbrido H2 em acetona a 500 MHz.	168
Espectro 24. Espectro de RMN ¹³ C do segundo híbrido H2.	169
Espectro 25. Espectro de massas (a) em alta resolução do segundo híbrido H2.	171
Espectro 26. Espectro de massas (b) em alta resolução do segundo híbrido H2.	171

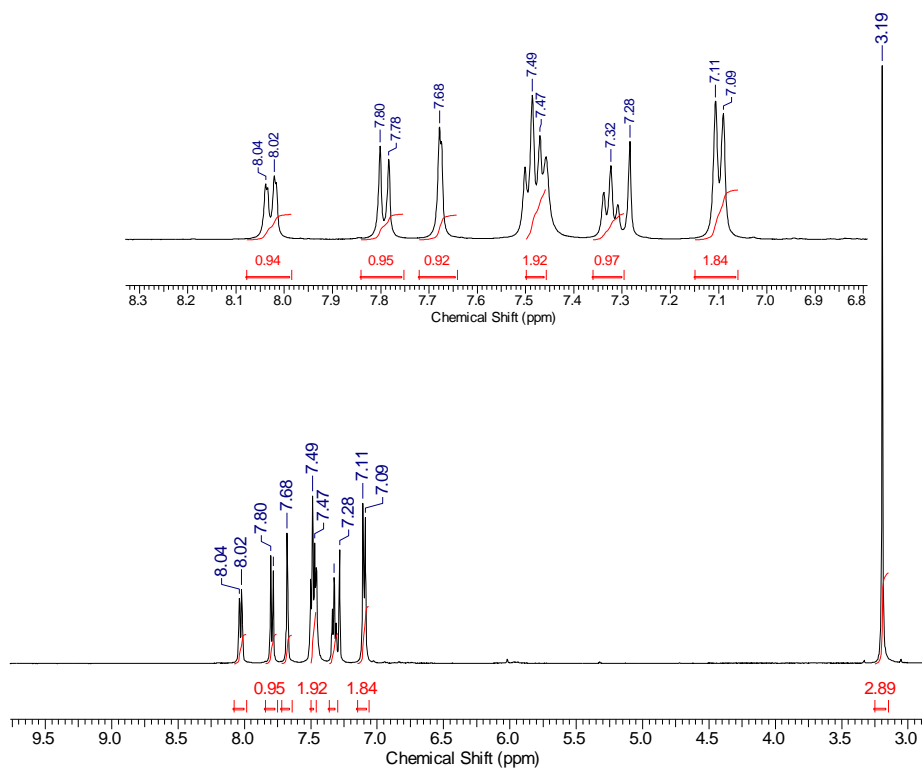
Nimesulida (**3**).

Dados de infravermelho (pastilha em KBr, cm^{-1}):

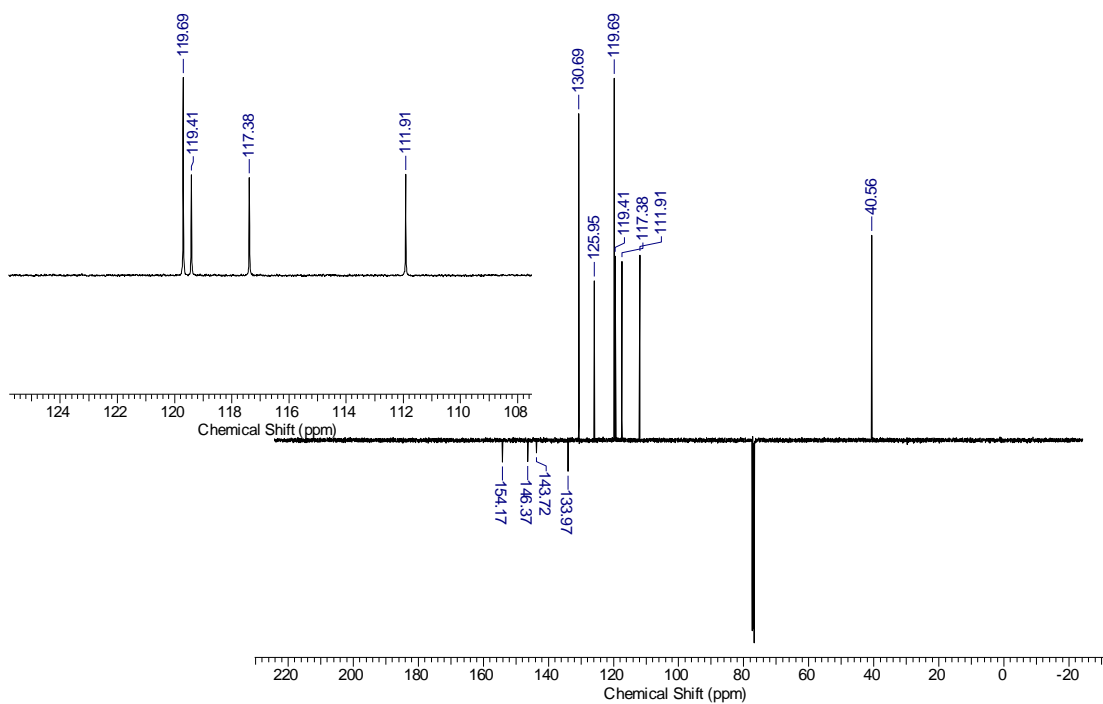
- $\nu_{\text{N-H}}$ = 3280 (estiramento N-H amida secundária);
 $\nu_{\text{C=C}}$ ($\text{C}_{\text{sp}2}$) = 1515 e 1486 (vibração da ligação C=C do anel aromático);
 $\delta_{\text{N-H}}$ = 1587 (deformação angular simétrica no plano N-H amida secundária);
 δ_{NO_2} = 1332 (deformação axial assimétrica e simétrica);
 δ_{SO_2} = 1245 e 1216 (deformação axial assimétrica e simétrica);
 $\nu_{\text{C-O-C}}$ = 1151 (estiramento C-O de éter);
 $\delta_{\text{C-H}}$ ($\text{C}_{\text{sp}2}$) = 973 (deformação angular núcleo aromático);
 $\delta_{\text{C-H}}$ ($\text{C}_{\text{sp}2}$) = 804 (deformação angular anel aromático 2H adjacentes);
 $\delta_{\text{C-H}}$ ($\text{C}_{\text{sp}2}$) = 740 e 698 (deformação angular anel aromático 5H adjacentes).
 $\delta_{\text{C-H}}$ ($\text{C}_{\text{sp}3}$) = 514 (deformação angular fora do plano CH_3).



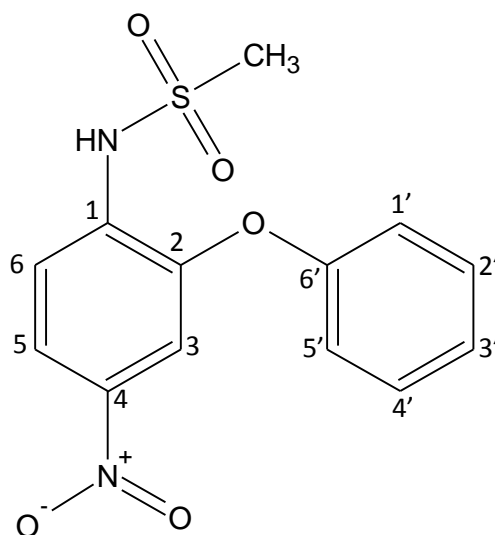
Espectro 1. Espectro de infravermelho da nimesulida (**3**).



Espectro 2. Espectro de RMN ^1H da nimesulida (**3**) em CDCl_3 a 500 MHz.



Espectro 3. Espectro de RMN ^{13}C da nimesulida (**3**) em CDCl_3 500 MHz.



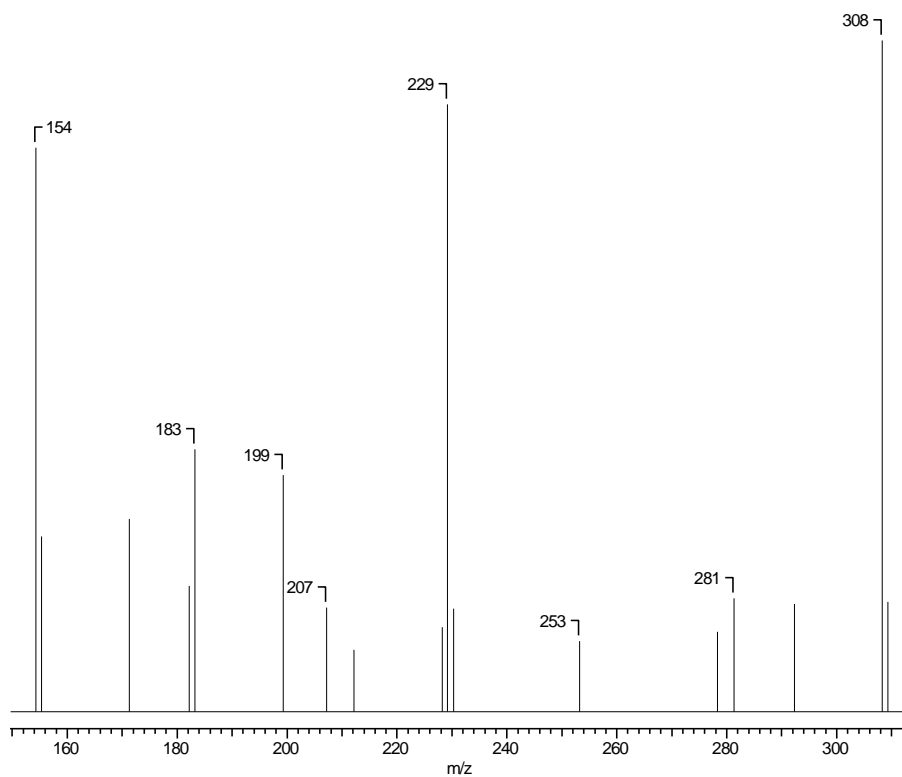
Nimesulida (**3**)

Tabela 10. Deslocamento químico de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a nimesulida (**3**).

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	---	146,37 (C)
2	---	143,72 (C)
3	7,80-7,78 (d, 1H)	125,95 (CH)
4	---	154,17 (C)
5	8,04-8,01 (d, 1H)	130,69 (CH)
6	7,68 (d, 1H)	130,69 (CH)
CH ₃	3,19 (s, 3H)	40,56
1'	7,11-7,09 (d, 1H)	119,41 (CH)
2'	7,49-7,47 (d, 1H)	119,69 (CH)
3'	7,32 (m, 1H)	111,91 (CH)
4'	7,49-7,47 (d, 1H)	119,69 (CH)
5'	7,11-7,09 (d, 1H)	117,38 (CH)
6'	---	133,97 (C)

Dados do Espectro de Massas:

EM / IE: $m/z = 308$ (M^+ , 100%); 281(17%); 229 (88%); 199 (34%); 154 (82%).

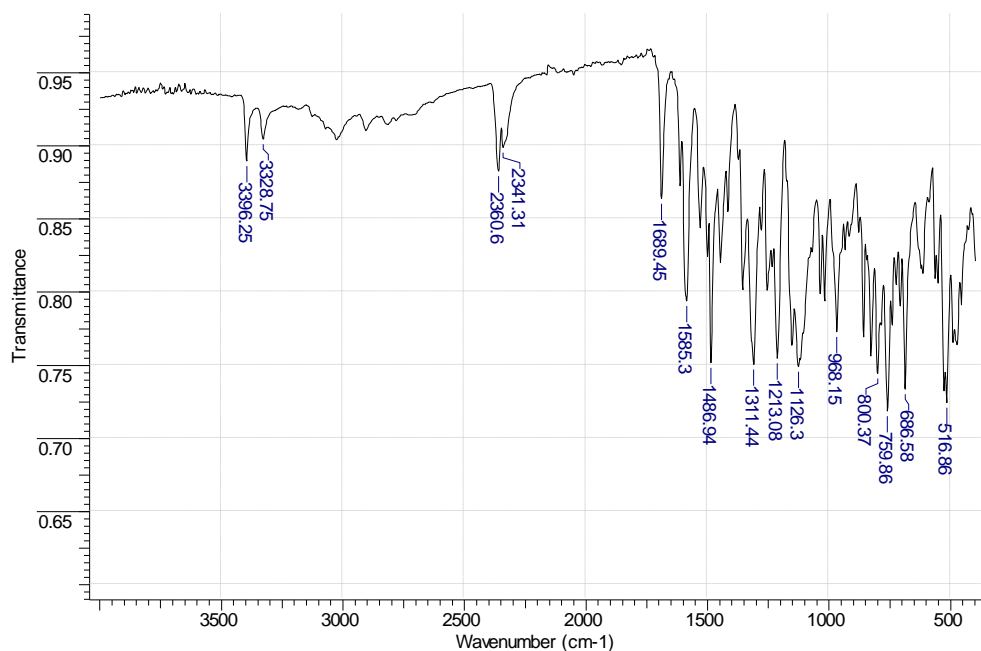


Espectro 4. Espectro de massas da nimesulida (**3**).

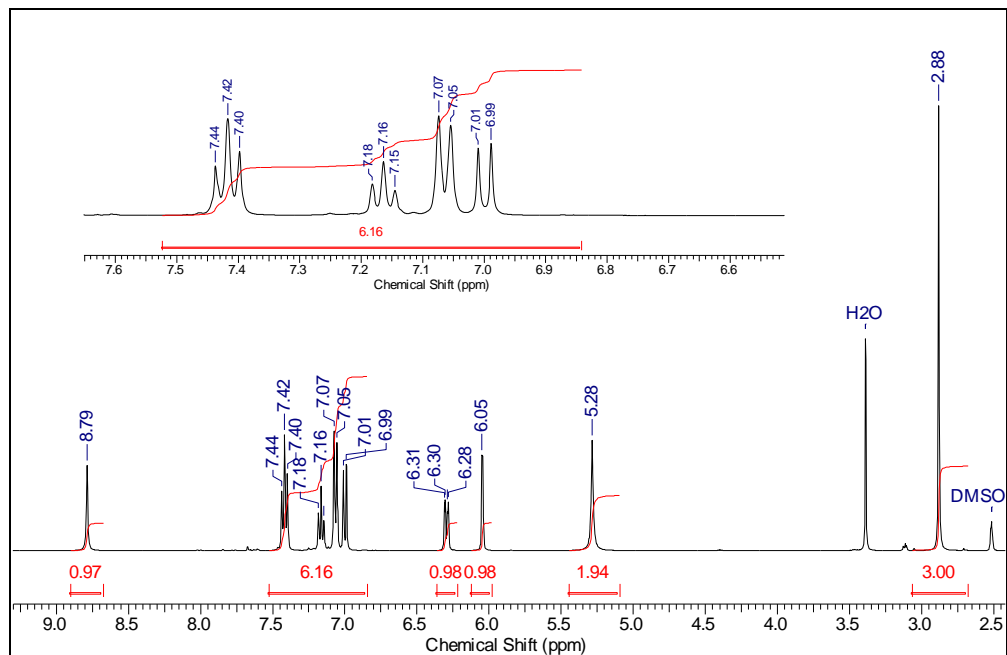
Nimesulida reduzida (7).

Dados de infravermelho (pastilha em KBr, cm^{-1}):

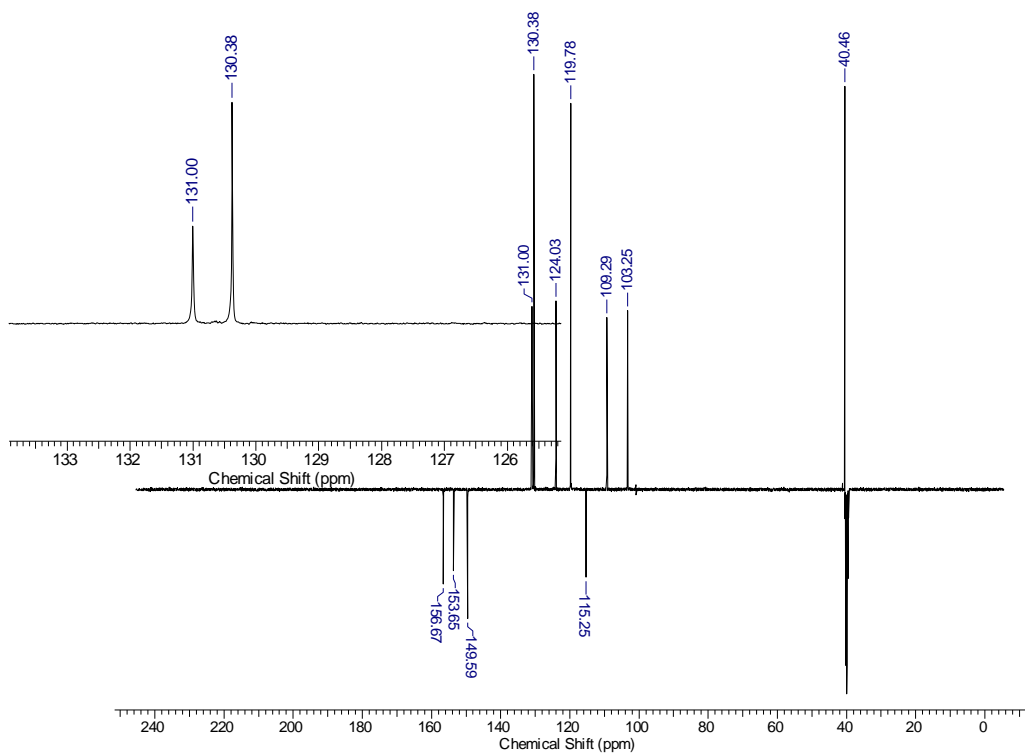
- $\nu_{\text{N-H}} = 3396$ (estiramento N-H amina primária aromática);
- $\nu_{\text{N-H}} = 3328$ (estiramento N-H amida secundária);
- $\nu_{\text{N-H}} = 2360$ e 2341 (estiramento N-H amina primária aromática);
- $\delta_{\text{N-H}} = 1585$ (deformação angular simétrica no plano N-H amida secundária);
- $\nu_{\text{C=C}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 1689$ e 1486 (vibração da ligação C=C do anel aromático);
- $\delta_{\text{SO}_2} = 1311$ e 1213 (deformação axial assimétrica e simétrica);
- $\nu_{\text{C-O-C}} = 1126$ (estiramento C-O de éter);
- $\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 968$ (deformação angular núcleo aromático);
- $\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 800$ (deformação angular anel aromático 2H adjacentes);
- $\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 759$ e 686 (deformação angular anel aromático 5H adjacentes).
- $\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}3}) = 516$ (deformação angular fora do plano CH_3).



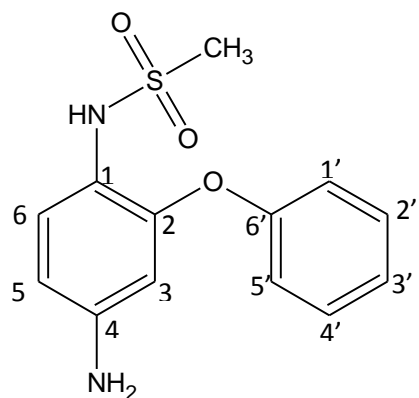
Espectro 5. Espectro de IV da nimesulida reduzida (7).



Espectro 6. Espectro RMN ^1H da nimesulida reduzida (**7**) em DMSO- d_6 500 MHz.



Espectro 7. Espectro de RMN ^{13}C da nimesulida reduzida (**7**).



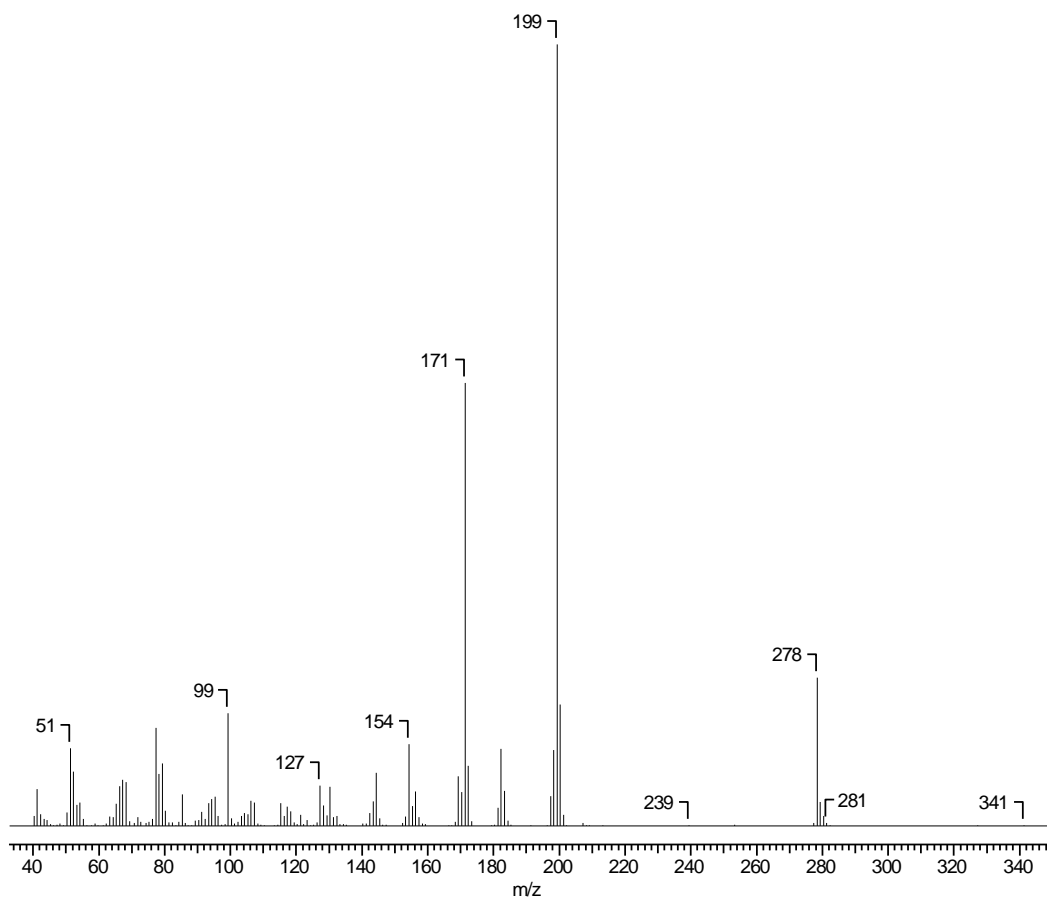
Nimesulida reduzida (7)

Tabela 11. Deslocamento químico de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a nimesulida reduzida (7).

Posição	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	---	115,25 (C)
2	---	149,59 (C)
3	6,31-6,28 (d, 1H)	103,25 (CH)
4	---	156,67 (C)
5	6,05 (d, 1H)	109,29 (CH)
6	7,01-6,99 (d, 1H)	124,03 (CH)
SO ₂ CH ₃	2,88 (s, 3H)	40,46 (CH ₃)
1'	7,18-7,15 (m, 1H)	119,78 (CH)
2'	7,44-7,40 (m, 1H)	131,00 (C)
3'	7,07-7,05 (d, 1H)	130,38 (CH)
4'	7,44-7,40 (m, 1H)	131,00 (C)
5'	7,18-7,15 (m, 1H)	119,78 (CH)
6'	---	153,65 (C)
NH	8,79 (s, 1H)	---
NH ₂	5,28 (s, 2H)	---

Dados do Espectro de Massas:

EM: $m/z = 278$ (M^+ , 19%); 199 (100%); 171 (57%); 154 (10%).



Espectro 8. Espectro de massas da nimesulida reduzida (7).

Piperina (4).

Dados de infravermelho (pastilha em KBr, cm^{-1}):

$\nu\text{C-H (Csp}^2\text{)} = 3008$ (estiramento de C-H de sistema aromático);

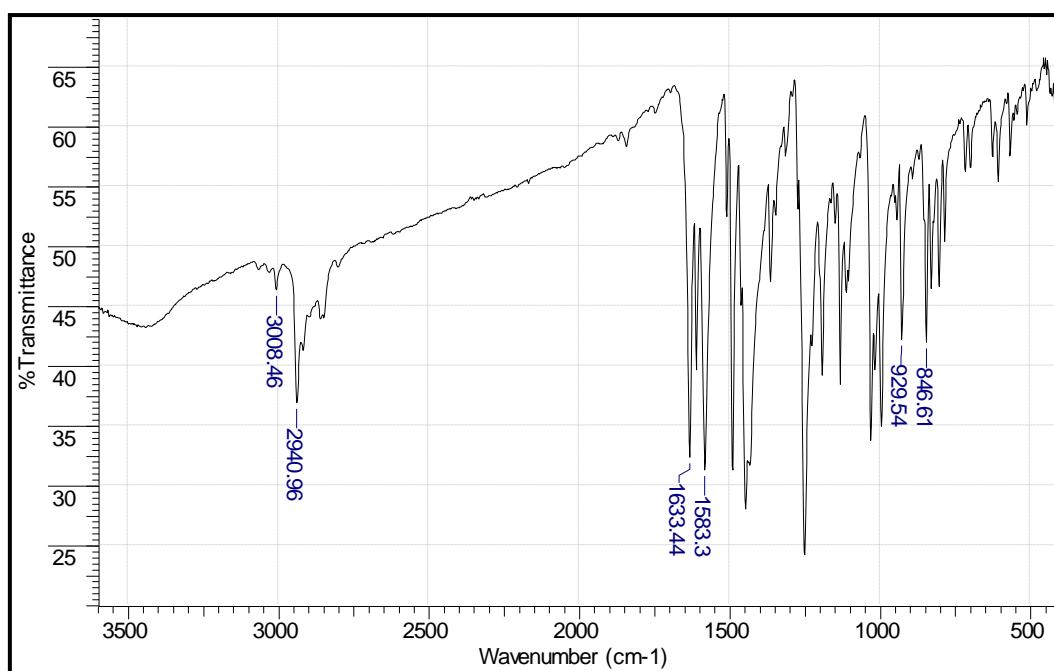
$\nu\text{C-H (Csp}^3\text{)} = 2940\text{-}2858$ (estiramento de metilenos do anel piperidínico);

$\nu(\text{C=O}) = 1633$ (estiramento da carbonila de amida conjugada);

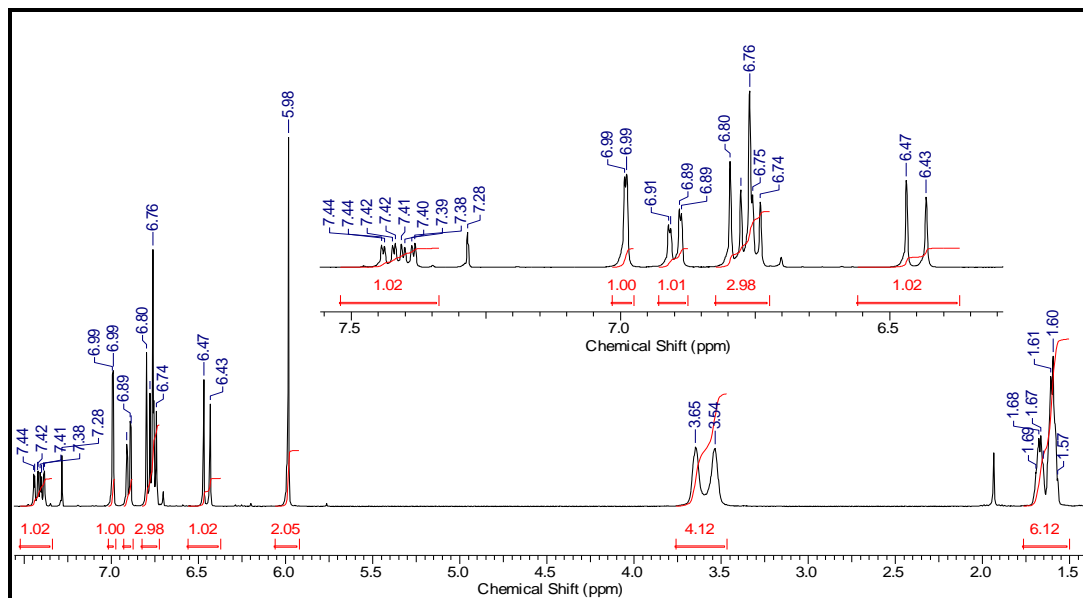
$\nu\text{C=C (Csp}^2\text{)} = 1583\text{-}1490$ (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

$\delta\text{C-H (Csp}^2\text{)} = 929$ (deformação angular de C-H para H isolado no sistema aromático);

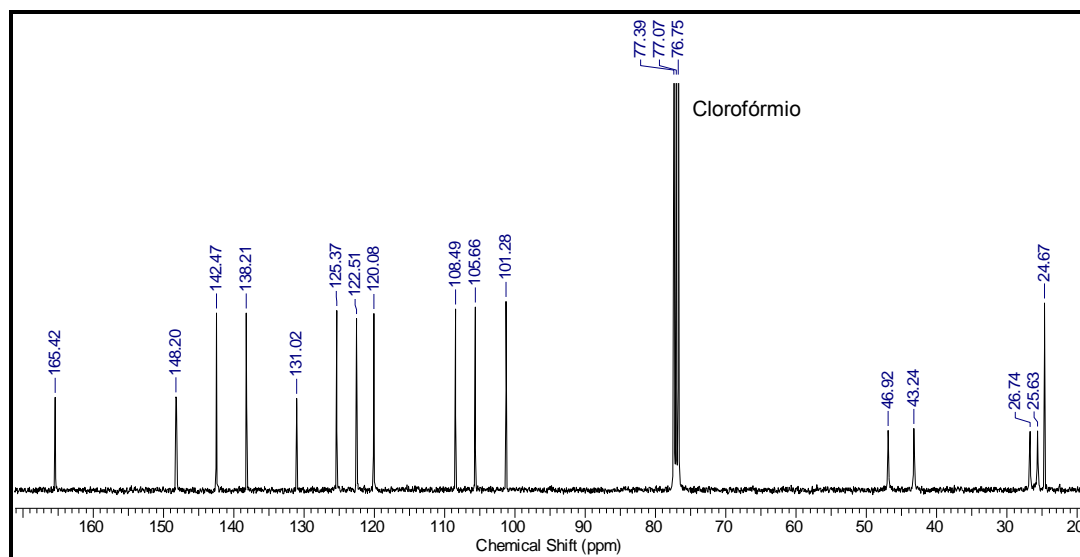
$\delta\text{C-H (Csp}^2\text{)} = 846$ (deformação angular de C-H para 2H no sistema aromático).



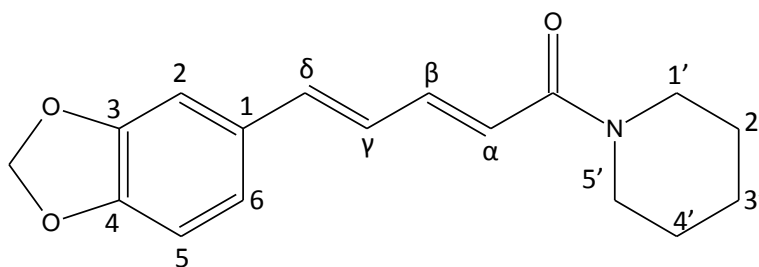
Espectro 9. Espectro de IV da piperina (4).



Espectro 10. Espectro RMN ^1H da piperina (**4**) em CDCl_3 a 500 MHz.



Espectro 11. Espectro de RMN ^{13}C da piperina (**4**).



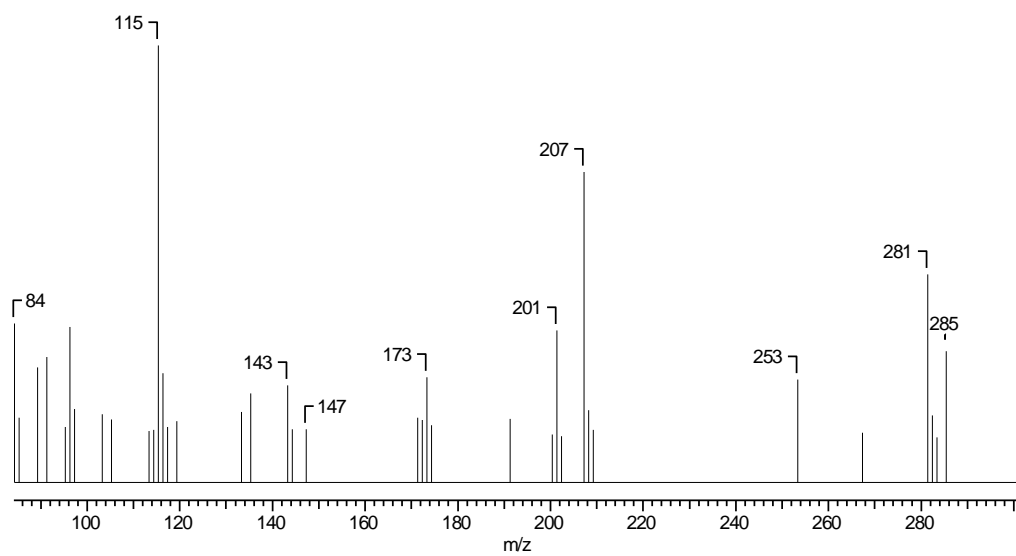
Piperina (**4**).

Tabela 12. Deslocamento químico (δ) de ^1H e ^{13}C para a piperina (**4**).

Posição	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	---	131,02 (C)
2	6,99 (d, 1H)	105,66 (CH)
3	---	148,20 (C)
4	---	148,20 (C)
5	6,80 – 6,74 (m, 1H)	108,49 (CH)
6	6,89 (d, 1H)	122,51 (CH)
C=O	---	165,42 (C)
1'	3,65-3,54 (m, 2H)	46,92 (CH ₂)
2'	1,69 – 1,57 (m, 2H)	24,67 (CH ₂)
3'	1,69 – 1,57 (m, 2H)	25,63 (CH ₂)
4'	1,69 – 1,57 (m, 2H)	26,74 (CH ₂)
5'	3,65-3,54 (m, 2H)	43,24 (CH ₂)
α	6,47-6,43 (d, 1H)	120,08 (CH)
β	7,44-7,28 (m, 1H)	142,47 (CH)
γ	6,80 – 6,74 (m, 1H)	125,37 (CH)
δ	6,80 – 6,74 (m, 1H)	138,21 (CH)
OCH ₂ O	5,98 (s, 2H)	101,28 (CH ₂)

Dados do Espectro de Massas:

EM: $m/z= 285$ (M^+ , 30%); 201 (75%); 173 (25%); 143 (25%); 115 (100%).



Espectro 12. Espectro de massas da piperina (**4**).

Ácido piperínico (5).

Dados de infravermelho (pastilha em KBr, cm^{-1}):

$\nu_{\text{O-H}} = 2918$ e 2544 (estiramento O-H banda larga);

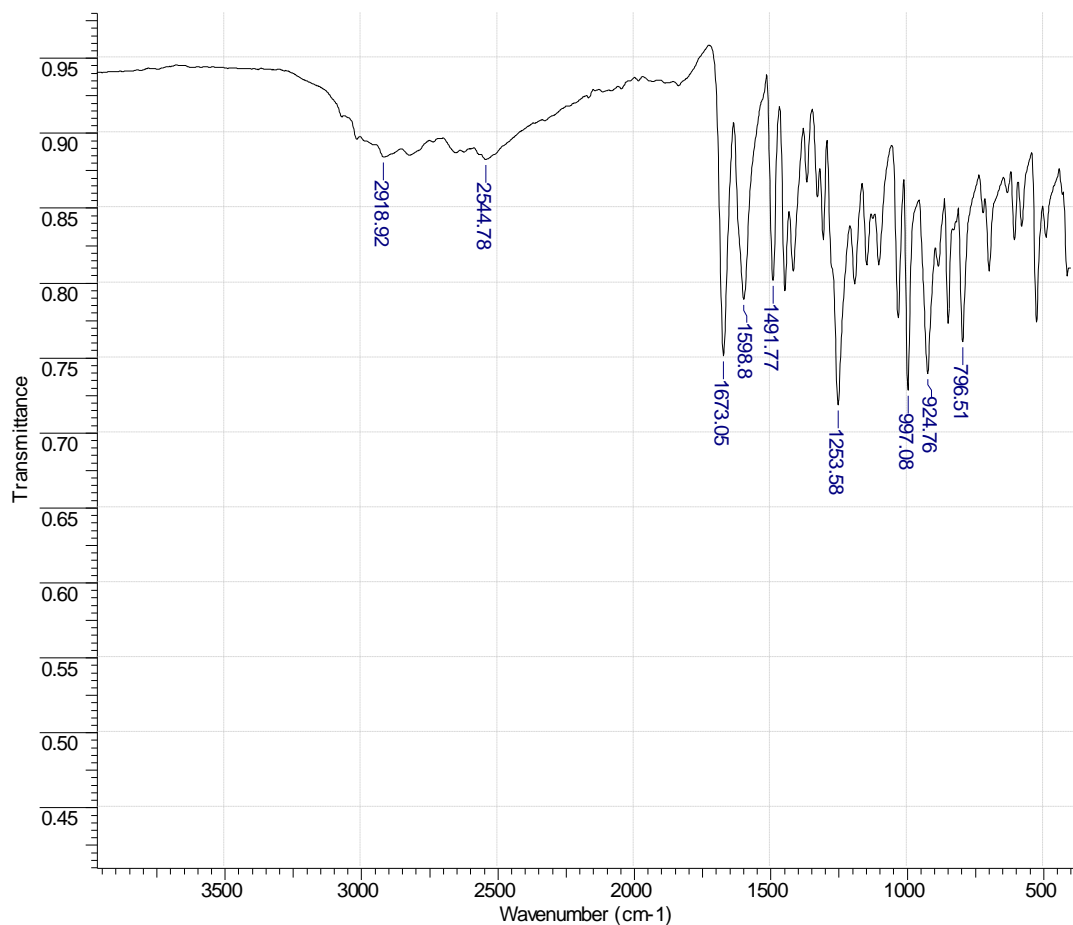
$\nu_{\text{C=O}} = 1673$ (estiramento C=O carbonila de ácido conjugada);

$\nu_{\text{C=C}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 1598, 1491$ (vibração da ligação C=C do anel aromático);

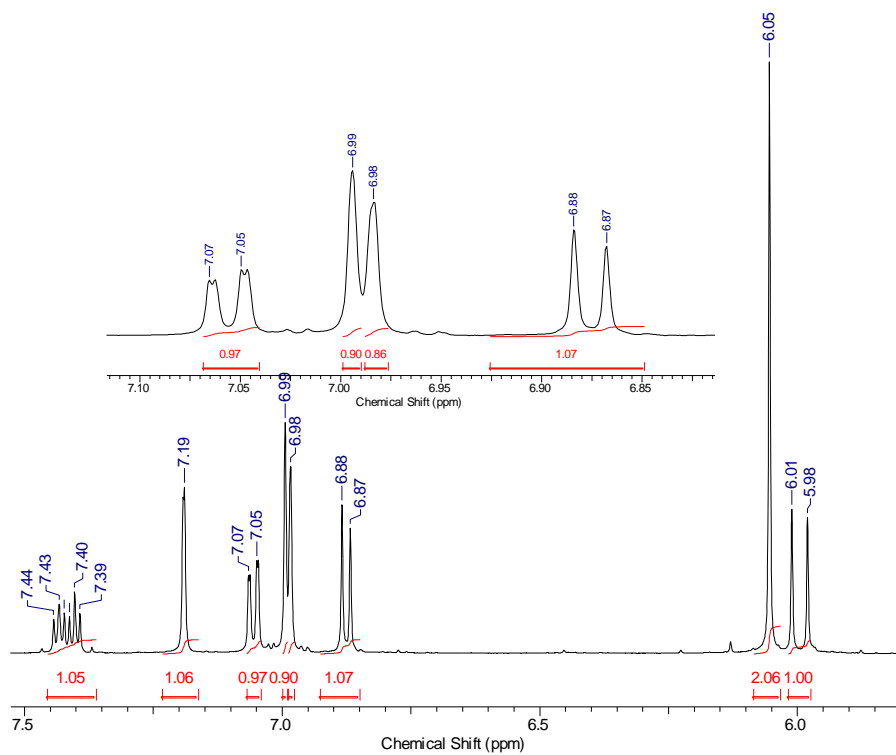
$\nu_{\text{C-O-C}} = 1253$ (estiramento metilenodioxi);

$\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 924$ (deformação angular núcleo aromático);

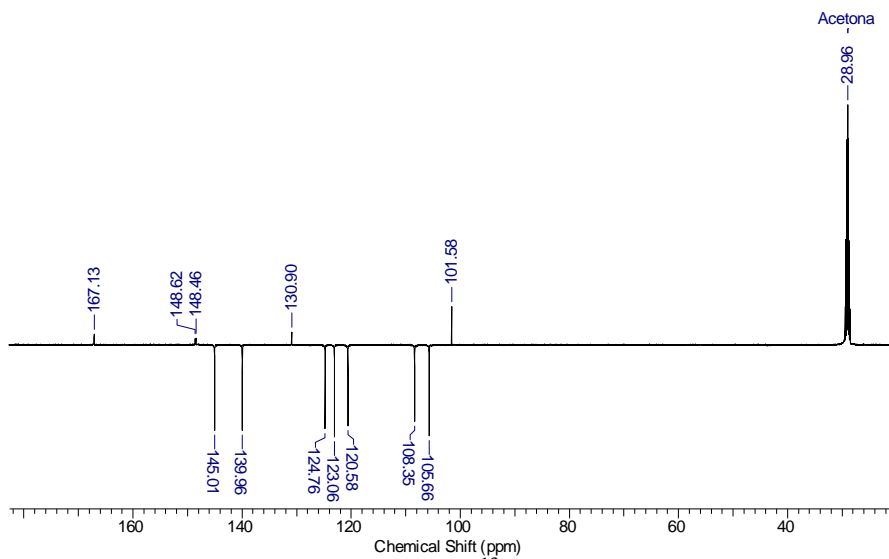
$\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 796$ (deformação angular anel aromático 2H adjacentes).



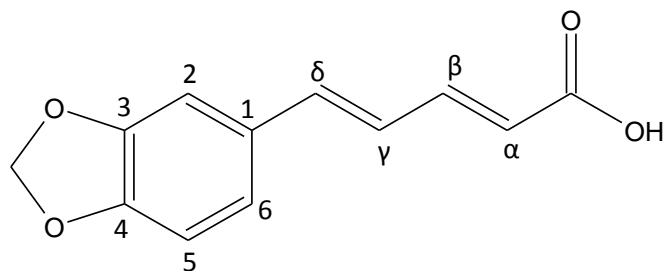
Espectro 13. Espectro de IV do ácido piperínico (5).



Espectro 14. Espectro RMN ^1H do ácido piperínico (**5**) em CDCl_3 a 500 MHz.



Espectro 15. Espectro de RMN ^{13}C do ácido piperínico (**5**).



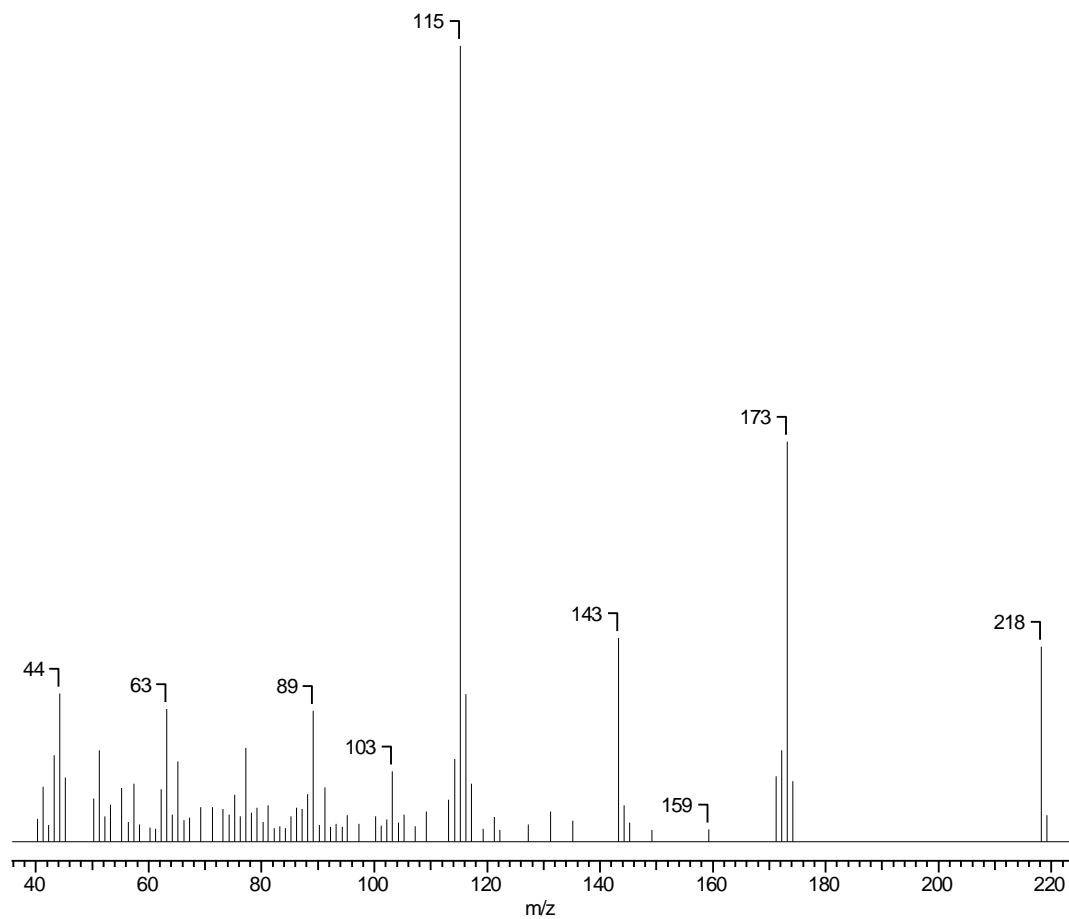
Ácido piperínico (5).

Tabela 13. Deslocamento químico (δ) de ^1H e ^{13}C para o ácido piperínico (5).

Posição	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	---	130,90 (C)
2	7,19 (sl, 1H)	105,66 (CH)
3	---	148,62 (C)
4	---	148,46 (C)
5	6,88-6,87 (d, 1H)	123,06 (CH)
6	7,07-7,05 (m, 1H)	120,58 (CH)
C=O	---	167,13 (C)
α	6,01-5,98 (d, 1H)	108,35 (CH)
β	7,44-7,39 (m, 1H)	145,01 (CH)
γ	6,99 (m, 1H)	139,96 (CH)
δ	6,98 (m, 1H)	124,76 (CH)
OCH ₂ O	6,05 (sl, 2H)	101,58 (CH ₂)

Dados do Espectro de Massas:

EM : $m/z = 218$ (M^+ , 25%); 173 (75%); 143 (25%); 115 (100%).

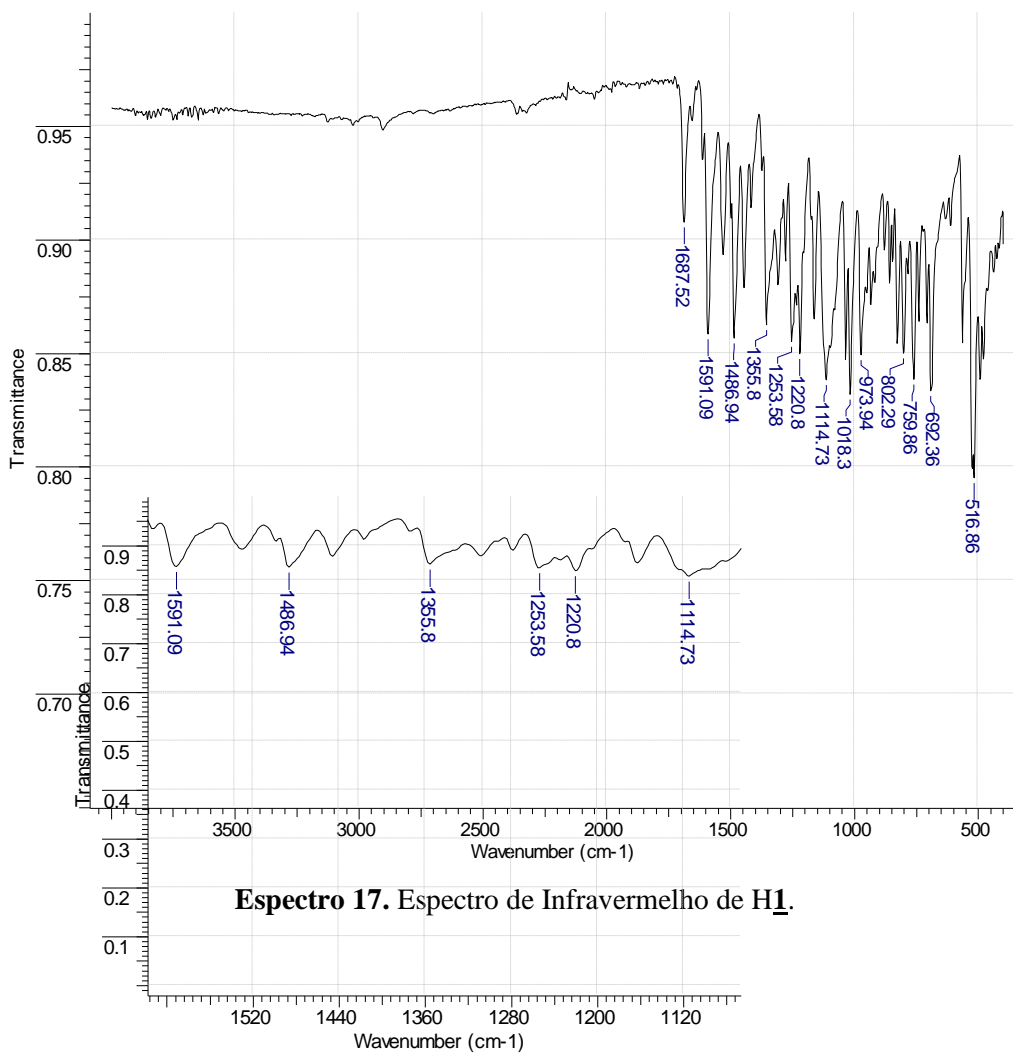


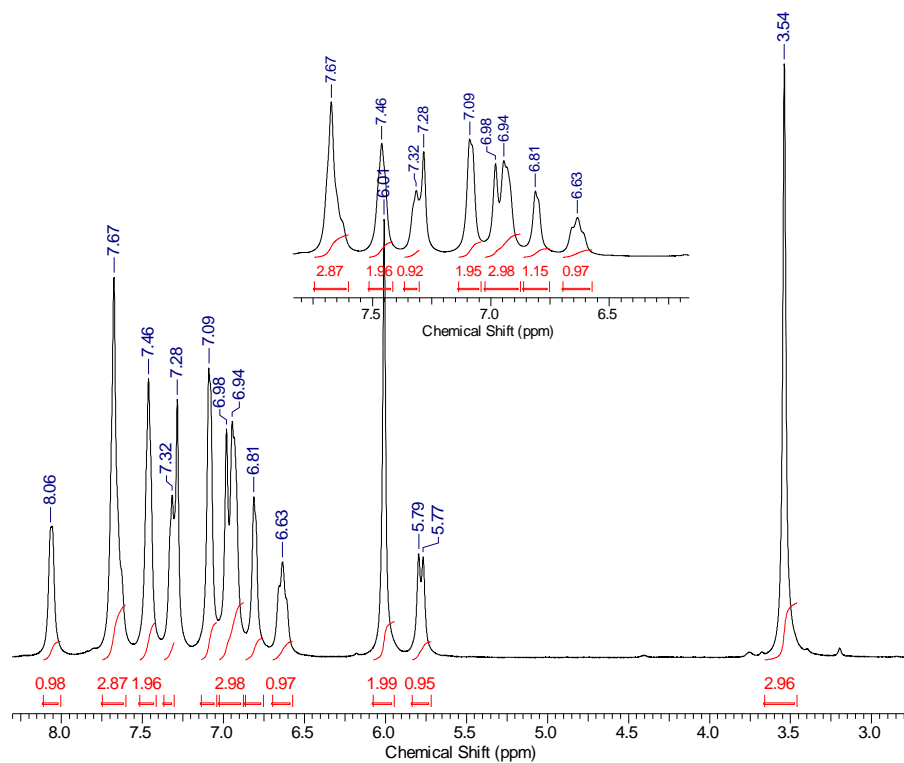
Espectro 16. Espectro de massas do ácido piperínico (**5**).

Híbrido H1.

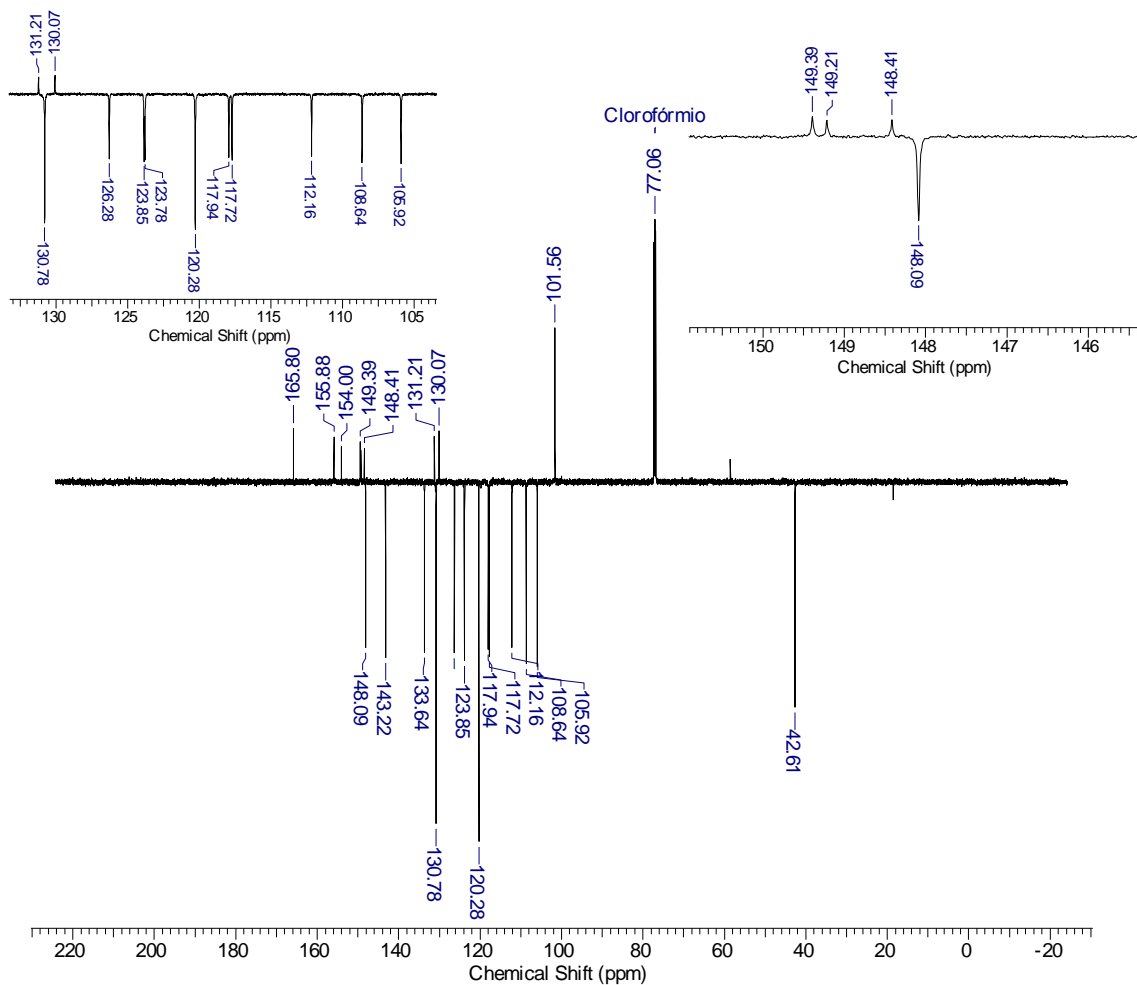
Dados de infravermelho (pastilha em KBr, cm^{-1}):

- $\nu_{\text{C=O}} = 1687$ (estiramento C=O de amida N, N-substituída);
- $\nu_{\text{C=C}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 1591$ e 1486 (vibração da ligação C=C do anel aromático);
- $\delta_{\text{NO}_2} = 1355$ (deformação axial assimétrica e simétrica);
- $\delta_{\text{SO}_2} = 1220$ (deformação axial assimétrica e simétrica);
- $\nu_{\text{C-O-C}} = 1253$ (estiramento metilenodioxi);
- $\nu_{\text{C-O-C}} = 1114$ (estiramento C-O de éter);
- $\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 1018$ (deformação angular fora do plano -CH=CH-);
- $\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 973$ (deformação angular núcleo aromático);
- $\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 802$ (deformação angular anel aromático 2H adjacentes);
- $\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 759$ e 692 (deformação angular anel aromático 5H adjacentes).
- $\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}3}) = 516$ (deformação angular fora do plano CH_3).





Espectro 18. Espectro RMN ^1H do primeiro híbrido **H1** em CDCl_3 a 500 MHz.



Espectro 19. Espectro de RMN ^{13}C do primeiro híbrido **H1**.

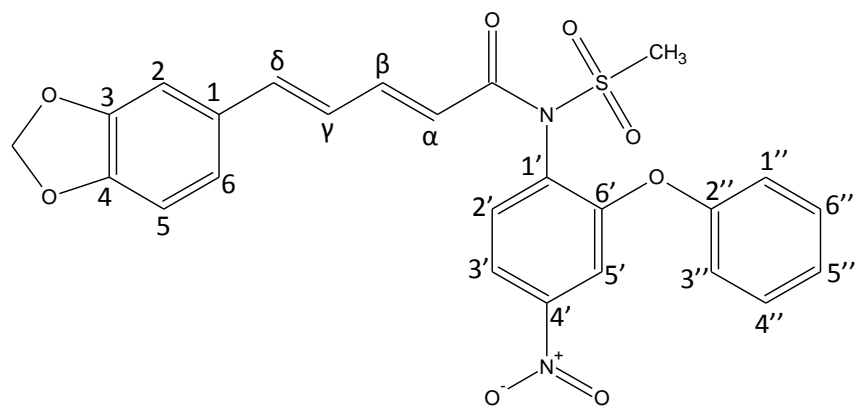


Tabela 14. Deslocamento químico (δ) de ^1H e ^{13}C para o híbrido **H1**.

Posição	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	---	131,21 (C)
2	6,98 (d, 1H)	130,78 (CH)
3	---	149,39 (C)
4	---	149,21 (C)
5	7,32-7,28 (d, 1H)	130,78 (CH)
6	6,98 (d, 1H)	123,78 (CH)
1'	---	154,00 (C)
2'	7,67 (d, 1H)	133,64 (CH)
3'	8,06 (d, 1H)	143,22 (CH)
4'	---	155,88 (C)
5'	7,67 (d, 1H)	148,09 (CH)
6'	---	148,41 (C)
1''	7,09 (d, 1H)	108,64 (CH)
2''	---	130,07 (C)
3''	7,09 (d, 1H)	105,92 (CH)
4''	7,46 (dl, 1H)	117,94 (CH)
5''	7,67 (d, 1H)	112,16 (CH)
6''	7,46 (dl, 1H)	117,72 (CH)
OCH ₂ O	6,01 (s, 2H)	101,56 (CH ₂)
CH ₃	3,54 (s, 3H)	42,61 (CH ₃)
α	6,81 (d, 1H)	126,28 (CH)
β	6,63 (d, 1H)	120,28 (CH)
γ	6,94 (d, 1H)	120,28 (CH)
δ	5,79-5,77 (d, 1H)	123,85 (CH)
C=O	---	165,80 (C)

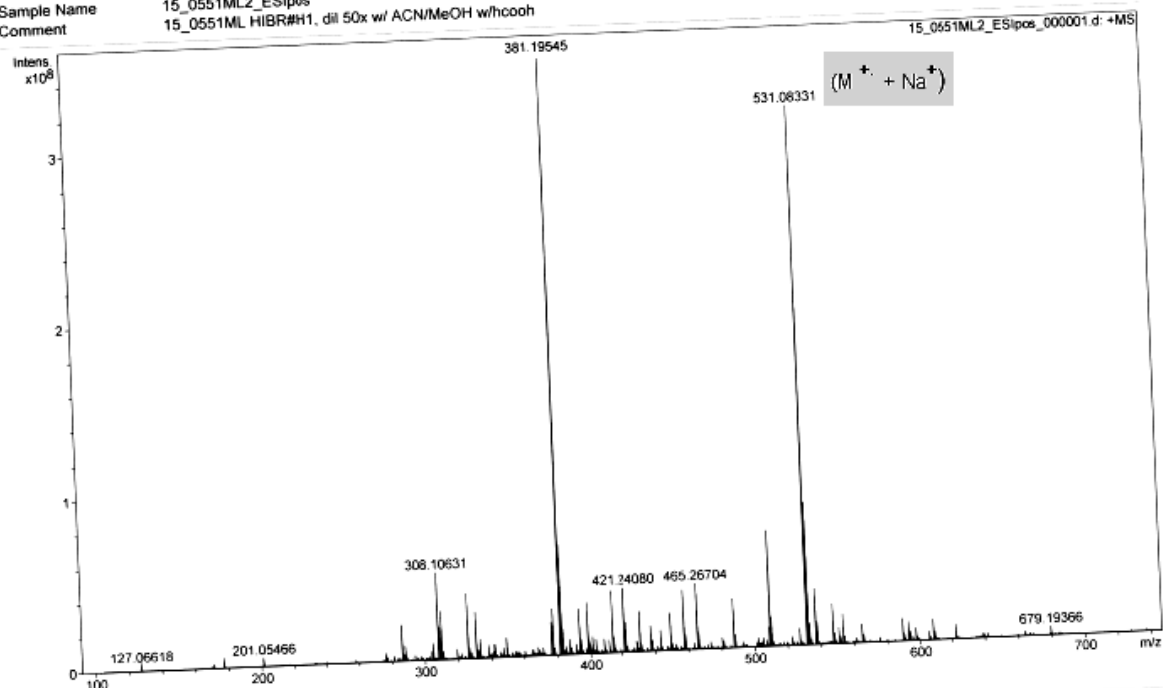
Generic Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Aug_15\15_0551ML2_ESIpos_000001.d
Method April_good_method
Sample Name 15_0551ML2_ESIpos
Comment 15_0551ML HIBR#H1, dil 50x w/ ACN/MeOH w/hcooh

Acquisition Date 8/12/2015 9:44:32 AM

Operator
Instrument apex-Qe



Bruker Compass DataAnalysis 4.0

printed: 8/12/2015 9:45:52 AM

Page 1 of 1

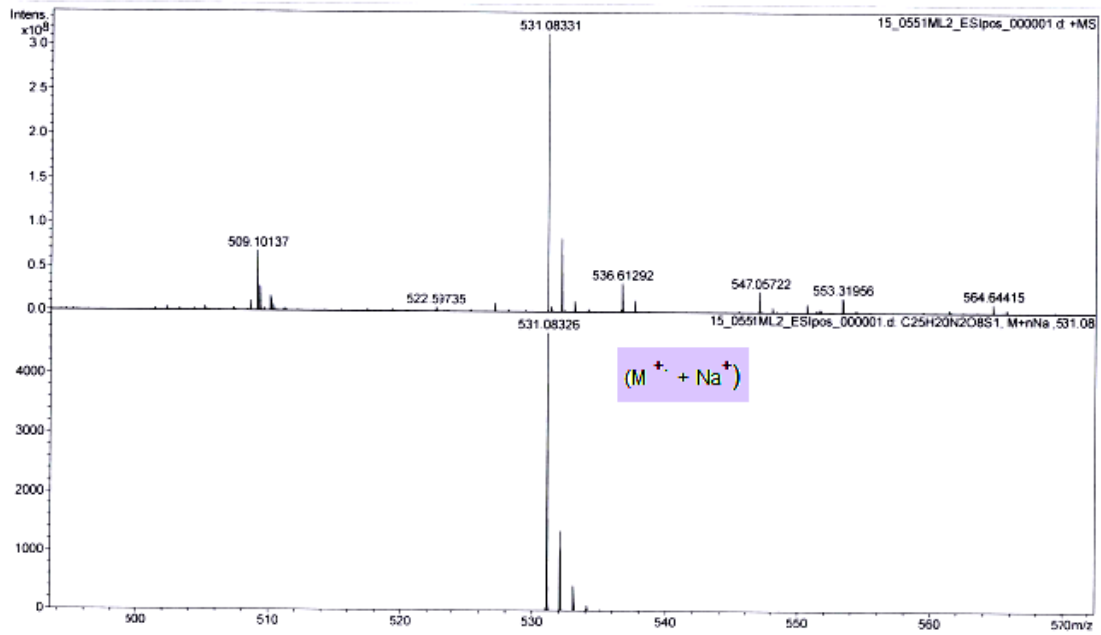
Espectro 20. Espectro de massas (a) em alta resolução do primeiro híbrido H₁.

Generic Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Aug_15\15_0551ML2_ESIpos_000001.d
Method April_good_method
Sample Name 15_0551ML2_ESIpos
Comment 15_0551ML HIBR#H1, dil 50x w/ ACN/MeOH w/hcooh

Acquisition Date 8/12/2015 9:44:32 AM
Operator
Instrument apex-Qe



Bruker Compass DataAnalysis 4.0

printed: 8/12/2015 9:46:48 AM

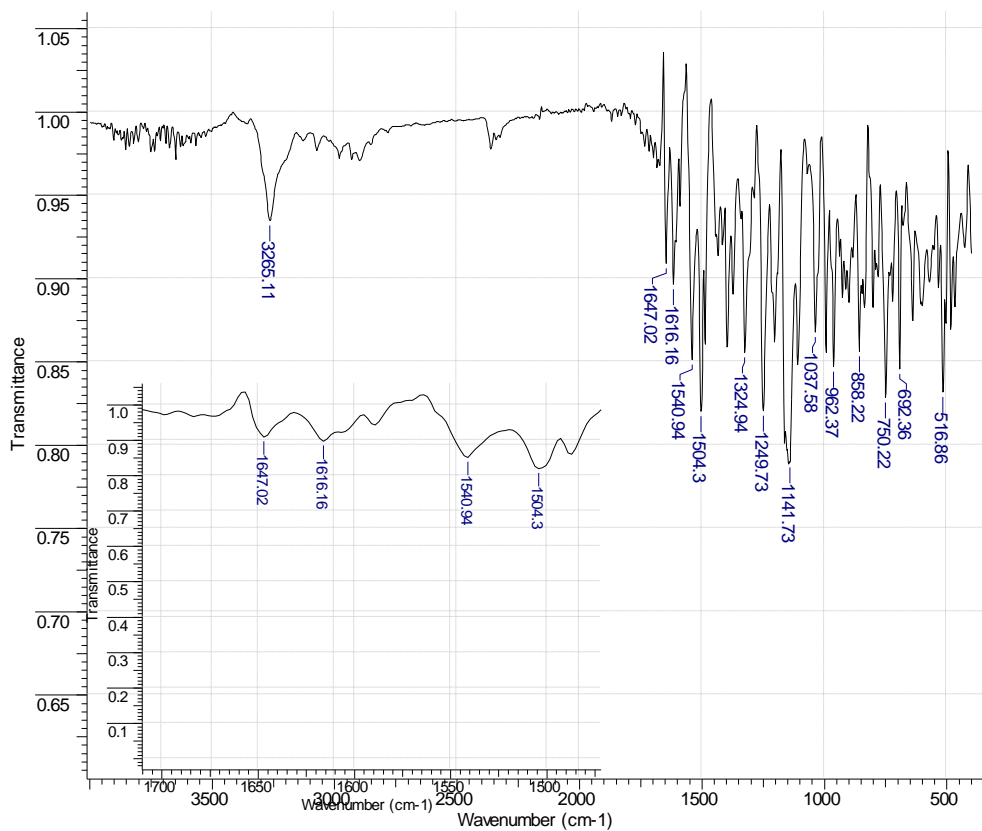
Page 1 of 1

Espectro 21. Espectro de massas (b) em alta resolução do primeiro híbrido H₁.

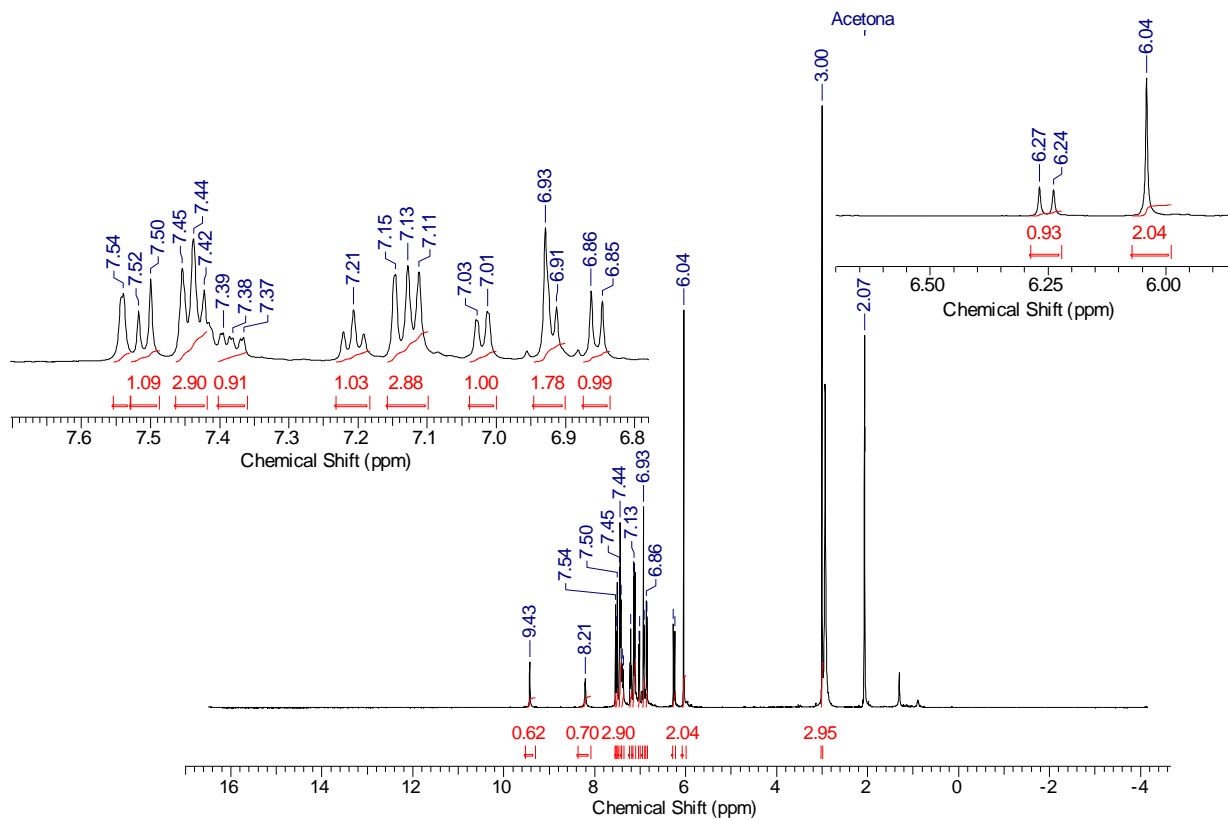
H₂

Dados de infravermelho (pastilha em KBr, cm⁻¹):

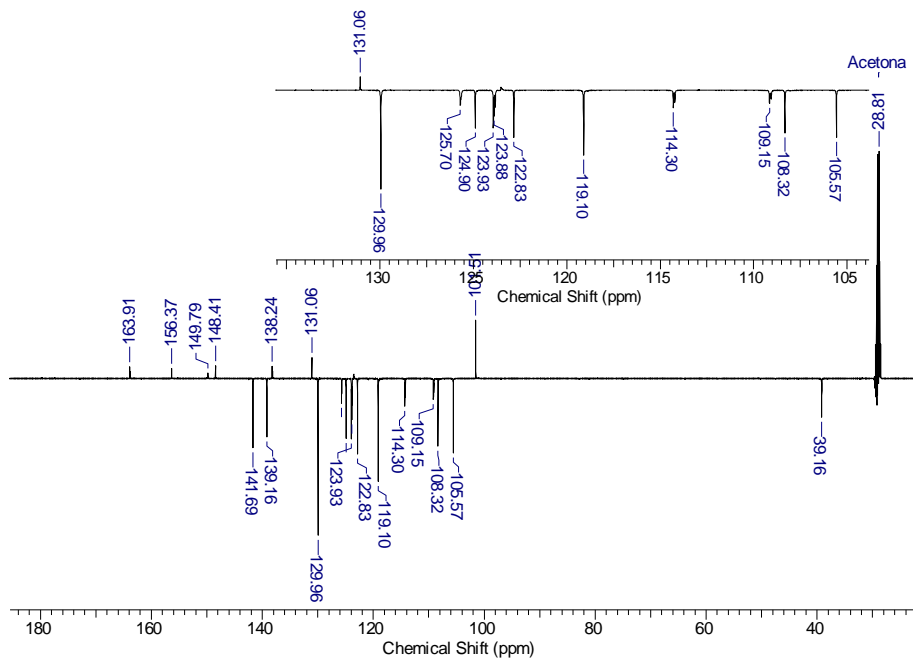
- $\nu_{\text{N-H}} = 3265$ (estiramento N-H amida secundária);
 $\nu_{\text{C=O}} = 1647$ (estiramento C=O de amida N, N-substituída);
 $\delta_{\text{N-H}} = 1616$ (deformação angular simétrica no plano N-H da sulfonamida);
 $\nu_{\text{C=C}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 1540, 1504$ (vibração da ligação C=C do anel aromático);
 $\delta_{\text{SO}_2} = 1324$ e 1249 (deformação axial assimétrica e simétrica);
 $\nu_{\text{C-O-C}} = 1249$ (estiramento metilenodioxi);
 $\nu_{\text{C-O-C}} = 1141$ (estiramento C-O de éter);
 $\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 1037$ (deformação angular fora do plano -CH=CH-);
 $\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 962$ (deformação angular núcleo aromático);
 $\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 858$ (deformação angular anel aromático 2H adjacentes);
 $\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}2}) = 750$ e 692 (deformação angular anel aromático 5H adjacentes).
 $\delta_{\text{C-H}} (\text{C}_{\text{sp}3}) = 516$ (deformação angular fora do plano CH₃).



Espectro 22. Espectro de IV do segundo híbrido H₂.



Espectro 23. Espectro RMN ^1H do segundo híbrido H_2 em acetona a 500 MHz.



Espectro 24. Espectro de RMN ^{13}C do segundo híbrido H $\underline{2}$.

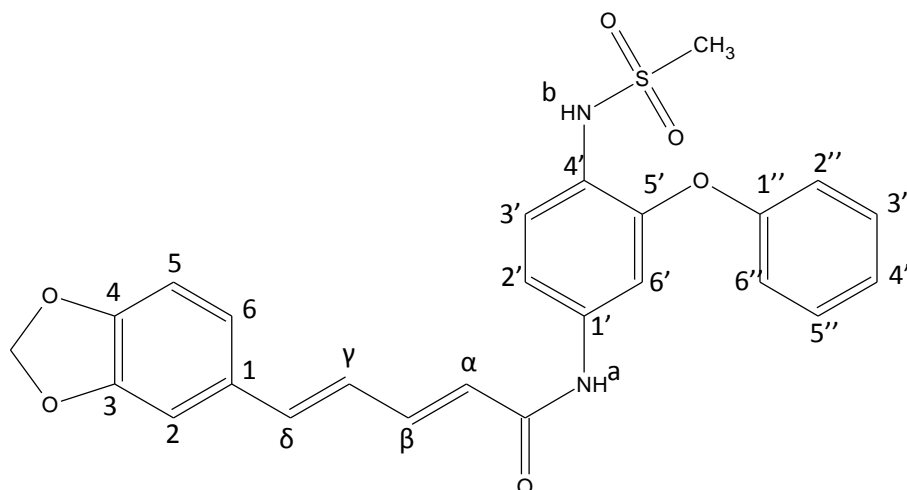


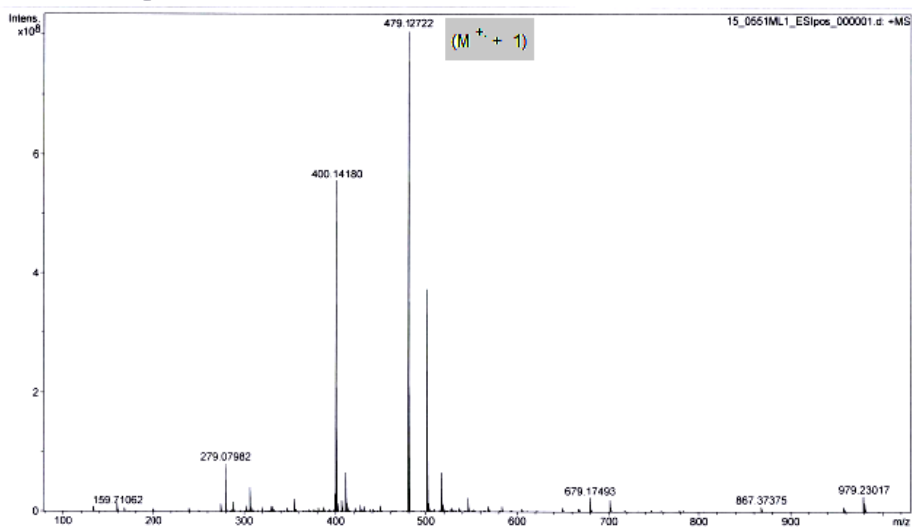
Tabela 15. Deslocamento químico (δ) de ^1H e ^{13}C para o híbrido **H2**.

Posição	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	---	148,41 (C)
2	6,93 (s, 1H)	124,90 (CH)
3	---	131,06 (C)
4	---	131,06 (C)
5	7,42 (s, 1H)	129,96 (CH)
6	6,91 (s, 1H)	125,70 (CH)
1'	---	156,37 (C)
2'	7,52-7,50 (s, 1H)	139,16 (CH)
3'	7,54 (s, 1H)	141,69 (CH)
4'	---	149,79 (C)
5'	---	138,24 (C)
6'	7,44 (s, 1H)	129,96 (CH)
1''	---	138,24 (C)
2''	7,11 (s, 1H)	123,93 (CH)
3''	7,21 (s, 1H)	124,90 (CH)
4''	7,03-7,01 (d, 1H)	123,88 (CH)
5''	7,15 (s, 1H)	119,10 (CH)
6''	7,13 (s, 1H)	122,83 (CH)
α	7,45 (s, 1H)	109,15 (CH)
β	6,27-6,24 (d, 1H)	108,32 (CH)
γ	6,86-6,85 (d, 1H)	105,57 (CH)
δ	7,39-7,37 (m, 1H)	114,30 (CH)
CH_2	6,04 (s, 2H)	101,51 (CH_2)
CH_3	3,00 (s, 3H)	39,16 (CH_3)
$\text{C}=\text{O}$	---	163,91 (C)
NH ^a	9,43 (s, 1H)	---
NH ^b	8,21 (s, 1H)	---

Generic Display Report

Analysis Info
Analysis Name D:\Data\Aug_15\15_0551ML1_ESIpos_000001.d
Method April_good_method
Sample Name 15_0551ML1_ESIpos
Comment 15_0551ML HIBR#H2, dil 50x w/ ACN/MeOH w/hcooh

Acquisition Date 8/12/2015 9:57:10 AM
Operator
Instrument apex-Qe



Bruker Compass DataAnalysis 4.0

printed: 8/12/2015 9:59:03 AM

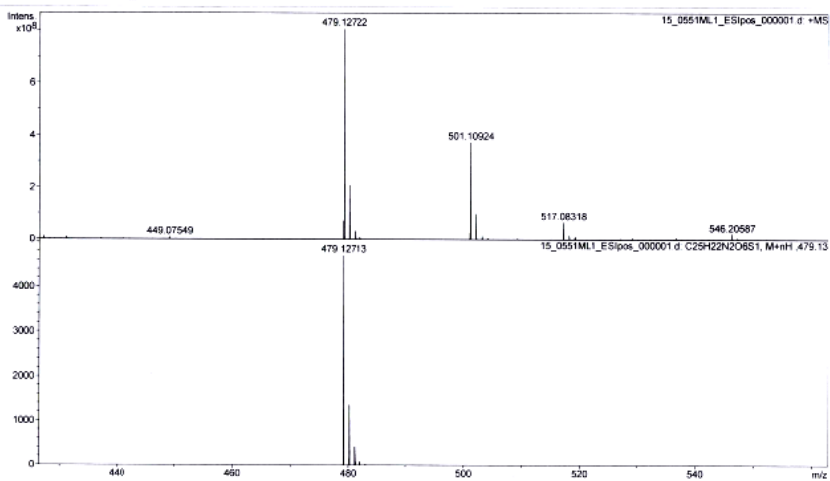
Page 1 of 1

Espectro 25. Espectro de massas (a) em alta resolução do segundo híbrido H₂.

Generic Display Report

Analysis Info
Analysis Name D:\Data\Aug_15\15_0551ML1_ESIpos_000001.d
Method April_good_method
Sample Name 15_0551ML1_ESIpos
Comment 15_0551ML HIBR#H2, dil 50x w/ ACN/MeOH w/hcooh

Acquisition Date 8/12/2015 9:57:10 AM
Operator
Instrument apex-Qe



Bruker Compass DataAnalysis 4.0

printed: 8/12/2015 9:59:53 AM

Page 1 of 1

Espectro 26. Espectro de massas (b) em alta resolução do segundo híbrido H₂.

CARTA DE SOLICITAÇÃO DOS PARASITOS

LISTA DAS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

BOLBA – infecção bacteriana crônica que afeta principalmente pele e osso.

DENGUE - doença viral transmitida por mosquitos que causa doença semelhante à gripe. Ocasionalmente se desenvolve em uma complicação letal, conhecida como dengue grave como as formas hemorrágicas .

DOENÇA DE CHAGAS - infecção transmitida pelo contato com insetos vetores, ingestão de alimentos contaminados, transfusão de sangue infectado, transmissão congênita, transplante de órgãos ou acidentes laboratoriais.

DRACUNCULÍASE (DOENÇA DO GUINÉ) – infecção por nematódeos, transmitida por água potável contaminada com pulgas de água infectadas por parasitas.

ESQUITOSSOMOSE – infecção de larvas de vermes. A transmissão ocorre quando as formas larvais liberadas pelos caramujos de água doce penetram na pele humana durante o contato com água infestada.

EQUINOCOCOSE – infecção causada por estágios larvais de tênia, formando cistos patogênicos. Transmitido aos seres humanos por meio da ingestão de ovos colocados em fezes de cães e animais selvagens.

FILARIOSE LINFÁTICA (ELEFANTÍASE) - infecção transmitida por mosquitos que causa aumento anormal de membros e genitais de vermes adultos habitando e se reproduzindo no sistema linfático.

HANSENÍASE (LEPRA) – causada pela infecção principalmente da pele, nervos periféricos, mucosa do trato respiratório superior e olhos.

HELMINTÍASE – grupo de infecções de helmintos intestinais transmitidas por meio de solo contaminado por fezes humanas.

LEISHMANIOSE – transmitida por meio de picadas de flebotomíneos infectados. Em sua forma mais severa (visceral), ataca os órgãos internos. A forma mais prevalente (cutânea) causa úlceras faciais, cicatrizes desfigurantes e incapacidade.

MICETOMA – debilitante e incapacitante infecção bacteriana/fúngica da pele, provavelmente causada pela inoculação de fungos ou bactérias no tecido subcutâneo.

ONCOCERCOSE – doença parasitária dos olhos e da pele, transmitida pela picada de mosquitos pretos infectados. Causa coceira intensa e lesões oculares, levando à deficiência visual e cegueira permanente.

RAIVA – doença viral transmitida aos seres humanos por meio da mordedura de cães infectados. Invariavelmente fatal quando os sintomas se desenvolvem.

TENÍASE e NEUROCISTICERCOSE – infecção por tênia adulta em intestinos humanos; a cisticercose ocorre quando os seres humanos ingerem ovos de tênia que se desenvolvem como larvas nos tecidos.

TRACOMA – infecção transmitida por contato direto com os olhos ou secreção nasal. Causa opacidades corneanas irreversíveis e cegueira.

TREMATODÍASE – infecção adquirida pelo consumo de peixe, vegetais e crustáceos contaminados com larvas parasitas.

TRIPANOSOMÍASE AFRICANA (DOENÇA DO SONO) – propagada por picadas de moscas tsé-tsé. Quase 100% fatal sem diagnóstico e tratamento imediatos.

ÚLCERA DE BURULI – infecção debilitante que causa destruição grave da pele, dos ossos e dos tecidos moles.

Fonte: Organização Mundial da Saúde – Organização Pan-Americana da Saúde. Disponível em: <https://www.paho.org>. Acesso em 08-08-2019.

ESTRATÉGIAS NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS.

Fármacos reformulados. Medicamentos reformulados são os que possuem características alteradas, apenas o suficiente, para obterem proteção adicional de patente e aprovação no FDA como NDA (do inglês *New Drug Application*), mantendo as propriedades dos testes clínicos anteriores. Trata-se de uma estratégia mercadológica para expandir o tempo de vida de uma patente, com garantia exclusiva de dados. Os pacientes são migrados para a nova formulação protegida por patente, substituindo a administração via cutânea por via oral, por exemplo. Informação disponível em:

<https://www.biosimilardevelopment.com/doc/the-impact-of-reformulation-strategies-on-pharmaceuticals-biologics-0001>. Acesso em 10-07-2019.

Sob licença. Medicamentos licenciados são os obtidos pela celebração de acordos bilaterais pela indústria, mediante aquisição de licença da parte desenvolvedora (parte licenciante) para a sua fabricação e comercialização pela parte licenciada, numa contrapartida mercadológica vantajosa para ambas as corporações. Informação disponível em

<https://investingnews.com/daily/life-science-investing/pharmaceutical-investing/what-is-in-licensing/> Acesso em 10-07-2019.

“De novo”. Aqueles fármacos que chegaram a estágios clínicos avançados (fase III), mas que obtiveram eficácia insatisfatória, retomam testes diferentes para identificação de biomarcadores a novos alvos terapêuticos, de forma que, o candidato a fármaco “de novo” passa por mais ensaios clínicos. Informação disponível em:

<https://www.pharmaguideline.com/2019/05/abbreviated-new-drug-application-anda.html>. Acesso em 11-07-2019.


Pequenos mercados. Constituem pequenos mercados os que atendem a doenças raras (as que afetam 1 em 2000 habitantes) ou aquelas incidentes em países sub-desenvolvidos, por exemplo. Muitas vezes, medidas regulatórias são elaboradas para melhorar o retorno financeiro aos desenvolvedores dos fármacos utilizados, conferindo-lhes o *status* de “medicamentos órfãos”, pois em condições normais, a indústria ficaria deficitária para a sua produção. Informação disponível em:

<https://www.eurordis.org/pt-pt/content/o-que-e-um-medicamento-orfao>
Acesso em 10-07-2019.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA E PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS DURANTE A TESE

2015


Participação no X Fórum da Pós- Graduação da UFRRJ. Apresentação (Pôster).



ASSOCIAÇÃO DE PIPERINA COM BENZONIDAZOL E NIMESULIDO, E SÍNTESE DE HÍBRIDOS MOLECULARES: INVESTIGAÇÕES SOBRE OS MECANISMOS DE AÇÃO TRIPANOCIDA E PERFIL DE ATIVIDADE EM MODELO MURINO DE CHAGAS.

Trindade, J.D.S.¹; Lima, M.E.F.; Decote-Ricardo, D.² *joanaufrrj@gmail.com

¹Departamento de Química – ICE, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ. ²Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ. *e-mail:* joanaufrrj@gmail.com; marcoedilson@gmail.com; decoter Ricardo@ufrj.br



2016

Participação no XI Fórum da Pós- Graduação da UFRRJ. Apresentação (Oral).
Menção honrosa

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

XI FÓRUM DA Pós-Graduação da UFRRJ

"Desafios da Ciência e Tecnologia em Tempos de Crise"

CERTIFICADO

Menção Honrosa
conferida a
Joana D'Arc da Silva Trindade

pelo destaque na apresentação da pesquisa **"SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO FÁRMACO NIMESULIDO E DE NOVOS HÍBRIDOS COM A AMIDA NATURAL PIPERINA"**, durante o XI Fórum da Pós-Graduação da UFRRJ, no período de 26 a 29 de setembro de 2016.

Seropédica, 23 de março de 2017



Prof. Roberto Carlos Costa Lelis
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

2016

Participação no XV Encontro da Regional Rio de Janeiro – Sociedade Brasileira de Química (ERSBQ). Apresentação (Pôster).

Sociedade Brasileira de Química (SBQ) *Regional Rio de Janeiro – 2016*

SYNTHESIS AND TRYPANOCIDAL EVALUATION OF NOVEL PIPERINE-NIMESULIDE HYBRIDS

¹Joana D'Arc da S. Trindade (PG); ^{2*}Celso G. Freire de Lima (PQ); ^{3*}Debora D. Ricardo (PQ)^{4*}Marco Edilson F. Lima (PQ); (^{1,3,4}Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ² Universidade Federal do Rio de Janeiro).

marcoedilson@gmail.com; decoter Ricardo@ufrj.br; joanadarc@biof.ufrj.br

Keywords: Piperine, Nimesulide, Molecular Hybridization, Chagas disease.

2018

Participação em Congresso: XLV Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Biologia Translacional. Apresentação (Pôster).

TRANSLATIONAL BIOLOGY

Drug Repurposing for the Treatment of Chagas Disease: Studies on the Toxic Effects of the NSAID Nimesulide Against the Evolutive Forms of *Trypanosoma cruzi*

TRINDADE, J.D.S.¹; VELLOSO, C.S.²; MARINHO GRAÇA, M.C.N.³; FREIRE-DE-LIMA, C.G.²; DECOTE-RICARDO, D.¹; FREIRE DE LIMA, M.E.¹.

1. UFRJ, RIO DE JANEIRO-RJ-BRASIL; 2. UFRJ, RIO DE JANEIRO-RJ-BRASIL.



Funding agencies: FAPERJ; CAPES; CNPq

Keywords: Chagas disease; NSAID; antiparasitic drugs

INTRODUCTION



2018
Participação na XIV Jornada Fluminense de Produtos Naturais.
Apresentação (Pôster).


 **SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO FÁRMACO NIMESULIDO E DE NOVOS HÍBRIDOS COM A AMIDA NATURAL PIPERINA.** 

Joana D'Arcs. Trindade¹ (PG), Débora Decoté-Ricardo² (PQ), Célio G. Freire de Lima³ (PQ), Marco Edilson F. de Lima³ (PQ). *joanaufjr@gmail.com

¹Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química-UFRRJ; ²Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, IV-UFRRJ; ³Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-UFRJ.

Palavras Chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, hibridação molecular, reposicionamento de fármacos

2019
Artigo Científico – publicação.

 <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190033>
J. Braz. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-17, 2019
Printed in Brazil • ©2019 Sociedade Brasileira de Química

Article

Design, Synthesis, Trypanocidal Activity, and Studies on Human Albumin Interaction of Novel S-Alkyl-1,2,4-triazoles

Tatiany N. Franklim,^{a,b} Leonardo Freire-de-Lima,^b Otávio A. Chaves,^a
Isabel F. LaRocque-de-Freitas,^b Joana D. da Silva-Trindade,^a José C. Netto-Ferreira,^{a,c}
Célio G. Freire-de-Lima,^b Debora Decoté-Ricardo,^d José O. Previato,^b
Lucia Mendonça-Previato^b and Marco E. F. de Lima^{b,e}

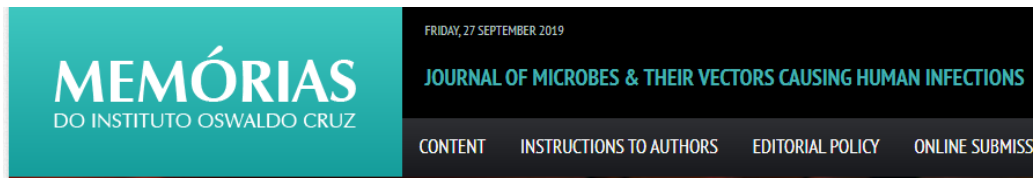
^aInstituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, km 07, 23890-000 Seropédica-RJ, Brazil

^bInstituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, 21941-902 Rio de Janeiro-RJ, Brazil

^cDivisão de Metrologia Química, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), 25250-020 Duque de Caxias-RJ, Brazil

^dDepartamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, km 07, 23890-000 Seropédica-RJ, Brazil

Artigo em andamento (2019-2020).



Reposicionamento de fármaco para o tratamento de Doença de Chagas: estudos sobre os efeitos tóxicos do anti-inflamatório não esteroidal nimesulido contra as formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*.

¹Joana D'Arc S Trindade, ²Débora D Ricardo, ³Célio GF Lima, ⁴Suzana Côrte-Real, ⁵Marco EF Lima.

^{1,2,5} Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴ Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil

RESUMO A doença de Chagas é uma doença parasitária causada pelo *Trypanosoma cruzi* com risco à vida de vários seres humanos, principalmente no continente americano. Apesar dos muitos esforços de pesquisa, ainda não existem novos compostos em ensaios clínicos para o tratamento da doença. Por isso, a abordagem de reposicionamento de fármacos para o tratamento da doença de Chagas é particularmente atraente, uma vez que não há investimentos significativos no desenvolvimento de novas substâncias nesse campo.