

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

HIBRIDAÇÃO MOLECULAR E DIMERIZAÇÃO DE
FARMACÓFOROS COMO ESTRATÉGIAS NO PLANEJAMENTO DE
NOVOS FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES
CAUSADAS POR TRIPANOSSOMATÍDEOS

AFONSO SANTINE MAGALHÃES MESQUITA VELEZ



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

HIBRIDAÇÃO MOLECULAR E DIMERIZAÇÃO DE
FARMACÓFOROS COMO ESTRATÉGIAS NO PLANEJAMENTO
DE NOVOS FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES
CAUSADAS POR TRIPANOSSOMATÍDEOS

AFONSO SANTINE MAGALHÃES MESQUITA VELEZ

Sob orientação do Professor

Dr. Marco Edilson Freire de Lima

e coordenação do Professora

Dra. Débora Decotè Ricardo de Lima

com período sanduíche no exterior (Cleveland State University, OH, USA)

orientado pelo Professor

Dr. Bin Su

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

Seropédica, RJ

Novembro, 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V436h

VELEZ, AFONSO SANTINE MAGALHÃES MESQUITA , 1996-
Hibridação molecular e dimerização de farmacóforos
como estratégias no planejamento de novos fármacos
para o tratamento de infecções causadas por
tripanossomatídeos / AFONSO SANTINE MAGALHÃES MESQUITA
VELEZ. - Seropédica, 2025.
376 f.

Orientador: Marco Edilson Freire Lima.
Coorientadora: Debora Decote Ricardo Lima.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA,
2025.

1. Química Medicinal. 2. Síntese Orgânica. 3.
Fármacos antiparasitários. I. Lima, Marco Edilson
Freire, 1965-, orient. II. Lima, Debora Decote
Ricardo, 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**

AFONSO SANTINE MAGALHÃES MESQUITA VELEZ

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química, no
Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

TESE APROVADA EM 28/11/2025

Marco Edilson Freire de Lima Dr. UFRRJ
(Orientador)

Aurea Echevarria Aznar Neves Lima Dra. UFRRJ

Arthur Eugen Kummerle Dr. UFRRJ

Luciana Polaco Covre Dra. UFES

Luís Octávio Regasini Dr. UNESP



TERMO Nº 1133/2025 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 01/12/2025 17:08)

ARTHUR EUGEN KUMMERLE
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: ###004#0

(Assinado digitalmente em 01/12/2025 17:24)

AUREA ECHEVARRIA AZNAR NEVES LIMA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: ###71#9

(Assinado digitalmente em 01/12/2025 16:49)

MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: ###587#8

(Assinado digitalmente em 01/12/2025 14:31)

LUIS OCTAVIO REGASINI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.328-##

(Assinado digitalmente em 01/12/2025 14:39)

LUCIANA POLACO COVRE
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.897-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **1133**, ano: **2025**,
tipo: **TERMO**, data de emissão: **01/12/2025** e o código de verificação: **1d69e29e4c**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida.

Agradeço a toda a minha família, em especial aos meus pais, Roberto e Isaura Velez, por todo o amor incondicional, carinho, pelo empenho máximo em me garantir a melhor educação possível e por sempre acreditarem nos meus sonhos e no meu potencial, estando sempre ao meu lado. Agradeço à minha irmã, Roberta, por toda a cumplicidade, amizade, carinho e apoio em todos os momentos. Também agradeço a toda a minha família, que de alguma forma me ajudou a trilhar este caminho até aqui.

Agradeço à Bárbara por todo o amor, carinho e amizade, sempre me motivando, incentivando e acreditando no meu potencial, especialmente nos momentos mais difíceis da caminhada. Agradeço também à sua família por todo o carinho e incentivo.

Agradeço ao professor Marco Edilson por toda a orientação, amizade e suporte em todos os momentos, bem como pela confiança em meu potencial. Tenho muito orgulho em tê-lo como orientador. Obrigado pelos ensinamentos e pelo conhecimento compartilhado ao longo de toda a trajetória desde a Iniciação Científica (2017).

Agradeço à professora Débora Decotè Ricardo pelo carinho, orientação e ajuda na imersão na parte biológica de todo o trabalho desenvolvido. Todo o treinamento realizado e as discussões foram essenciais para a minha formação como profissional.

Agradeço ao professor Bin Su, da Cleveland State University, que me recebeu e me incorporou ao seu grupo de pesquisa por seis meses. Foi um período enriquecedor, de muito aprendizado, participando ativamente dos projetos e discussões do grupo. Agradeço também aos colegas e amigos que conheci e com quem tive o prazer de compartilhar momentos e experiências, especialmente ao amigo Xiaotong Zhao, que me recebeu em sua casa e me auxiliou em tudo que foi necessário, e aos demais colegas: Akshay Patil, Fatma Salem, Soha, Ruchitha, Tyler, Jamie, Grace, Billy, Blake e Helen.

Agradeço à professora Rosane Nora Castro por todas as análises cromatográficas e de massas de alta resolução realizadas neste trabalho, bem como pelo treinamento para a utilização dos métodos cromatográficos disponíveis no IQ. Agradeço ainda mais por todo o apoio e ensinamentos.

Agradeço ao professor Guilherme Pereira Guedes (IQ/UFF) pela análise de difração de raios X.

Agradeço ao Otávio Augusto Chaves, membro ativo de nosso grupo de pesquisa, pela realização dos ensaios de interação albumina-fármaco e de parte da modelagem molecular realizada neste trabalho.

Agradeço ao aluno Bruno Sena e ao professor Carlos Maurício R. Sant’Anna pela parceria e pelo brilhante trabalho de modelagem molecular da série híbrida na enzima succinato desidrogenase.

Agradeço aos companheiros atuais e aos que já passaram pelo laboratório do LaQuiMed/UFRRJ e Lab 48B — Thiago Dias, Rafael, Douglas, Paulo, Gabriela, Fábio, Jorge Lucas, Luiz, Gabriel Fulgencio, Teles, João, Tiago, Maria, Ana, Jayane e Dandara — pela ajuda, sugestões, conhecimento compartilhado e momentos de descontração.

Agradeço aos companheiros de laboratório do LIVV/UFRRJ — Profa. Lúcia Pinto, Profa. Danielle Nascimento, Profa. Débora Regina, Profa. Juliana Macedo, Prof. Sieberth, Renata, Mayra, Fernanda, Isabella, Renata Q., Letícia, William, Thiago e Raíssa — pela ajuda, sugestões, conhecimento compartilhado e momentos de descontração.

Agradeço a todos os técnicos e funcionários do IQ-UFRRJ, em especial aos membros da Central Analítica, Vinícius Olivieri e Cristiane Cardoso, por realizarem todos os experimentos de caracterização dos compostos deste trabalho.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química, que contribuíram positivamente para a minha formação.

Agradeço aos membros da banca pela atenção e solicitude em agregar seus conhecimentos a este trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos que me ajudaram ao longo da caminhada — nos momentos de descontração e, principalmente, nos momentos difíceis — Caio, Escobar, Fábio, Felipe, Francisco, Gabriel Zé, Gustavo, José Gabriel, Jorge Lucas, Marcos Paulo, Kevin, Lucas, Leonardo, Louback, Renato, Tiago, Max, Victor, Wallace e Walgleyson.

Agradeço à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por garantir ensino gratuito e de qualidade.

Agradeço à CAPES pela bolsa de estudos durante todo o período da pós-graduação e pelo financiamento do período de doutorado sanduíche em Cleveland, OH, EUA.

Agradeço à CAPES, ao CNPq e à FAPERJ pelo auxílio financeiro para a execução dos projetos do nosso grupo de pesquisa.

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

RESUMO GERAL

VELEZ, Afonso Santine Magalhães Mesquita. **Hibridação molecular e dimerização de farmacóforos como estratégias no planejamento de novos fármacos para o tratamento de infecções causadas por tripanossomatídeos.** 2025. 198p Tese (Doutorado em Química, Química Orgânica). Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

As doenças causadas por protozoários tripanossomatídeos têm grande impacto na saúde pública em diferentes regiões do planeta e, até o momento, não dispõem de tratamentos adequados que garantam o bem-estar e a segurança dos pacientes durante os longos períodos de tratamento. Estando majoritariamente presente no continente americano, a doença de Chagas (tripanossomíase americana), causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, afeta mais de 7 milhões de pessoas em todo o mundo. No continente africano, a doença do sono (tripanossomíase humana africana), causada pelo *Trypanosoma brucei*, é um problema atual, visto que a mortalidade desta doença ocorre se não tratada no início de seus sintomas. No continente africano, mais de 55 milhões de pessoas vivem expostas em áreas endêmicas, em risco real de infecção. Considerando a demanda por desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento dessas doenças, esse trabalho tem como foco principal o planejamento racional de novas moléculas por meio de duas abordagens distintas. No capítulo 1, trata-se do planejamento de moléculas híbridas, explorando o potencial de derivados sintéticos da amida natural piperina, extraídos dos frutos secos de *Piper nigrum*, juntamente com grupos farmacofóricos presentes em fármacos comerciais com atividade antiparasitária conhecida, como nitroimidazóis (presentes e responsáveis pela atividade antiparasitária dos fármacos benznidazol, mefloquine e metronidazol). Todas as moléculas sintetizadas foram avaliadas frente às principais formas morfológicas do *T. cruzi*, especialmente as formas amastigotas (cepa Tulahuen C2C4-LacZ), bem como frente ao *T. brucei*, e quanto à sua citotoxicidade em diferentes células de mamíferos. Além dos cálculos de docagem molecular, foram conduzidos cálculos em modelos enzimáticos de TcSDH e de 14DM de *T. cruzi* para investigar a capacidade inibitória da nova série de ligantes híbridos. Além da hibridação molecular, no Capítulo 2 realizou-se o planejamento racional de compostos diméricos inspirados unicamente no núcleo farmacofórico do benznidazol (2-nitroimidazol), gerados por meio de simples *N*-alquilações com agentes alquilantes bidentados, o que se mostrou uma estratégia promissora. A avaliação biológica

demonstrou que todos os compostos dímeros foram ativos contra formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen C2C4-LacZ). Notavelmente, os dímeros de cadeia mais longa exibiram potência notável ($CI_{50} < 1,0 \mu M$); isso confirmou que sua atividade anti-*T. cruzi* é dependente do tamanho da cadeia metilênica espaçadora, uma vez que os híbridos de cadeia mais longa interagem melhor com a nitroredutase do *T. cruzi* (TcNTR), que atua na ativação metabólica desses nitroimidazóis (pró-farmacos) no interior da célula do parasito. Esses compostos também mostraram atividade significativa contra *T. b. brucei* (*T. b. brucei* 427) e citotoxicidade muito baixa em células de mamíferos, destacando sua seletividade, especialmente em relação aos dímeros de cadeia mais longa. Esses grupos farmacofóricos nitroimidazólicos são de fundamental importância na terapia dessas doenças antiparasitárias, que, apesar de sua baixa eficácia, é uma das poucas que ainda conseguem ter êxito em alguma etapa do tratamento. Todos os compostos de ambas as séries foram caracterizados por IV, RMN 1H e ^{13}C , bem como HRMS. Esse estudo em sua totalidade visa trazer à luz um melhor entendimento do seu funcionamento frente aos diferentes parasitos e hospedeiros, em diferentes abordagens, a fim de promover um melhoramento em sua aplicação nas estruturas de novos candidatos a fármacos, ajudando a desmistificar sua aplicação no desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de moléculas com atividade frente a doenças infecciosas parasitárias.

Palavras-chave: Piperina, Nitroimidazóis, Doença de Chagas, Doença do sono.

ABSTRACT

VELEZ, Afonso Santine Magalhães Mesquita. **Molecular hybridization and dimerization of pharmacophore groups as strategies for designing new drugs to treat infections caused by trypanosomatids.** 2025. 198p Thesis (Doctorate in Chemistry, Organic Chemistry). Institute of Chemistry, Department of Organic Chemistry, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Diseases caused by trypanosomatid protozoa significantly impact public health worldwide, and effective long-term treatments are still lacking. Predominantly found in the Americas, Chagas disease (American trypanosomiasis), caused by the hemoflagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects over 7 million people globally. In Africa, sleeping sickness (Human African trypanosomiasis), caused by *Trypanosoma brucei*, remains a serious health threat because of its high fatality rate if not treated early. Over 55 million people live in endemic zones across Africa, facing real risks of infection. Due to the urgent need for new therapeutic options, this work emphasizes the rational design of novel molecules using two approaches. Chapter 1 details the design of hybrids based on synthetic derivatives of the natural amide piperine, extracted from dried *Piper nigrum* fruits, combined with pharmacophoric groups found in existing antiparasitic drugs like nitroimidazoles (which contribute to the activity of benznidazole, meglumine, and metronidazole). All molecules were tested against the primary forms of *T. cruzi*, especially the amastigote stage (strain Tulahuen C2C4-*LacZ*), and evaluated for activity against *T. brucei* and cytotoxicity toward different mammalian cells. Molecular docking and enzymatic models of TcSDH and 14 DM of *T. cruzi* were used to assess the inhibitory potential of these hybrid ligands. In Chapter 2, the rational design of dimeric compounds was explored, inspired solely by the pharmacophoric core of benznidazole (2-nitroimidazole), created through simple *N*-alkylation using bidentate alkylating agents — a promising strategy. Biological tests showed all dimeric compounds were active against *T. cruzi* amastigotes (Tulahuen C 2 C 4- *LacZ*). Notably, longer-chain dimers displayed remarkable potency ($IC_{50} < 1.0 \mu M$), indicating that their activity depends on the length of the methylene spacer; longer chains interact more effectively with *T. cruzi* nitroreductase (TcNTR), which activates these prodrugs inside the parasite. These compounds also demonstrated significant activity against *T. b. brucei* (strain 427) and exhibited minimal cytotoxicity in mammalian cells, underscoring their selectivity — especially among the longer-chain dimers. The nitroimidazole pharmacophoric groups

are crucial in antiparasitic therapy, which, despite limited efficacy, continues to show some success at certain stages of treatment. All the compounds in both series were characterized by IR, ^1H and ^{13}C NMR, as well as HRMS. Overall, this study aims to enhance understanding of their mechanisms of action across different parasites and hosts. It uses multiple approaches to improve the design of new drug candidates and facilitate the development of prototype molecules active against parasitic infections.

Keywords: Piperine, Nitroimidazoles, Chagas disease, Sleeping sickness

ÍNDICE DE FIGURAS E ESQUEMAS

INTRODUÇÃO	1
Figura 1. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934)	1
Figura 2. Distribuição global da Doença de Chagas (WHO, 2018)	2
Figura 3. Imagem do barbeiro (inseto triatomíneo), vetor da doença de Chagas.....	3
Figura 4. Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> (Traduzida de CDC, 2021).....	4
Figura 5. Estrutura dos fármacos comerciais nifurtimox 1 e benznidazol 2	6
Figura 6. Ciclo de vida do <i>T. brucei</i> (Traduzida de CDC, 2019).....	8
Figura 7. Fármacos utilizados no tratamento da THA.....	9
Figura 8. Distribuição de todos os fármacos inseridos no mercado desde 1981 até 2020 (traduzido de NEWMAN & CRAGG, 2020)	11
Figura 9. (A) Sistema de extração com aparelho de Soxhlet; (B) Frutos secos da <i>P. nigrum</i> ; (C) Cristais de Piperina 7 obtidos a partir da recristalização do extrato etanólico utilizando etanol/água (Adaptado de VELEZ <i>et al.</i> , 2024)	12
Figura 10. Estruturas químicas e valores de EC ₅₀ obtidos para a piperina e alguns análogos estruturais (8 , 9 e 10), além do medicamento de referência benznidazol 2 contra as formas amastigota e epimastigota do <i>T. cruzi</i> (cepa Y)	14
Figura 11. Estruturas químicas e valores de EC ₅₀ dos derivados de piperina (11 - 15) contra as formas amastigota e epimastigota de <i>T. cruzi</i> (cepa Y)	15
Figura 12. Fármacos que contêm o núcleo nitroimidazol.....	19
Figura 13. Mecanismo de bioativação de compostos nitroimidazólicos mediada pelas enzimas nitroredutases (NTRs). (A) O nifurtimox sofre duas reduções sequenciais catalisadas pela NTRs, seguidas de abertura do anel para produzir um nitrilo tóxico insaturado de cadeia aberta. Tb, <i>Trypanosoma brucei</i> ; Tc, <i>Trypanosoma cruzi</i> ; (B) O grupo nitro do benznidazol é reduzido à hidroxilamina por ação das NTRs.	

Posteriormente, uma série de transformações não enzimáticas leva a um produto dihidro-dihidroxi, que pode liberar glioxal (Traduzido de PATTERSON; WYLLIE, 2014).....20

Figura 14. Estruturas químicas de compostos diméricos e seus valores de atividade biológica (19-24)25

CAPÍTULO 1.....30

Figura 1. Planejamento dos híbridos piperina-nitroimidazol partindo da amida natural piperina e o grupo farmacofórico do fármaco utilizado como tratamento padrão para doença de chagas, o benznidazol, além do grupo.....32

Figura 2. Esquema de síntese do derivado piperínico 1,2,4-triazol-3-tiona **2** usando a metodologia desenvolvida por Franklim (2013)(FRANKLIM, FREIRE-DE-LIMA, *et al.*, 2013)35

Figura 3. Metodologia de síntese dos híbridos **H1-H10**.....36

Figura 4. Metodologia de preparação dos agentes alquilantes nitroimidazólicos **5-14**....37

Esquema 1. Protonação do nitrogênio *N*-3 e comportamento ácido-base do núcleo imidazólico do metronidazol **3**.....38

Esquema 2. Proposta de fragmentação para o metronidazol **3**.....39

Esquema 3. Preparação do metanossulfonato **4**, derivado do metronidazol **3**.....40

Esquema 4. Mecanismo proposto para a obtenção do éster metanossulfonato **4**, derivado do metronidazol **3**.....40

Esquema 5. Proposta de fragmentação para o derivado metanossulfonato **4**.....41

Esquema 6. Reação da obtenção do iodeto derivado do metronidazol **5**.....43

Esquema 7. Formas tautoméricas do derivado 1,2,4-triazol-3-tiona (**4**) e 1,2,4-triazol-3-tiol (**4a**)43

Esquema 8. Proposta de fragmentação para o iodeto do metronidazol **5**.....44

Esquema 9. (A) Mecanismo proposto para a obtenção dos alquilantes 6-15 , derivados do 2-nitroimidazol, 2-metil-4-nitroimidazol e 4-nitroimidazol; (B) formação dos produtos dimerizados; (C) reação de eliminação dos produtos alquilados.....	45
Esquema 10. Reação da obtenção do 1-(2-bromoetil)-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol 6	46
Esquema 11. Proposta de fragmentação para o 1-(2-bromoetil)-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol 6	47
Figura 5. Produto de eliminação 6.1	48
Esquema 12. Reação da obtenção do 1-(3-bromopropil)-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol 7	48
Esquema 13. Proposta de fragmentação do 1-(3-bromopropil)-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol 7	49
Esquema 14. Reação da obtenção do 1-(4-bromobutil)-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol 8	50
Esquema 15. Proposta de fragmentação do 1-(4-bromobutil)-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol 8	50
Esquema 16. Formas Tautoméricas do 2-metil-(4)5-nitroimidazol (A) e do (4)5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol (B)	51
Esquema 17. Reação da obtenção do 1-(3-bromopropil)-2-metil-4-nitro-1 <i>H</i> -imidazol 9	53
Esquema 18. Proposta de fragmentação do 1-(2-bromoetil)-2-metil-4-nitro-1 <i>H</i> -imidazol 9	53
Esquema 19. Reação da obtenção do 1-(3-bromopropil)-2-metil-4-nitro-1 <i>H</i> -imidazol 10	54
Esquema 20. Reação da obtenção do 1-(4-bromobutil)-2-metil-4-nitro-1 <i>H</i> -imidazol 11	55
Esquema 21. Reação da obtenção do 1-(2-bromoetil)-4-nitro-1 <i>H</i> -imidazol 12	56
Esquema 22. Reação da obtenção do 1-(3-bromopropil)-4-nitro-1 <i>H</i> -imidazol 13	57
Esquema 23. Reação da obtenção do 1-(4-bromobutil)-4-nitro-1 <i>H</i> -imidazol 14	59
Figura 6. Metodologia de síntese dos híbridos H1-H10	60

Esquema 24. Obtenção do híbrido H1 , partindo dos precursores 2 e 5	61
Esquema 25. Obtenção do híbrido H2 , partindo dos precursores 2 e 6	62
Figura 7. Estrutura cristalina do composto H2 com numeração de átomos selecionada. Os átomos de hidrogênio e parte do grupo ciclohexil desordenado foram omitidos para maior clareza. Códigos de cores: C (cinza), N (azul), S (amarelo) e O (vermelho).....	63
Figura 8. Detalhes do empacotamento cristalino do composto H2 . Apenas os átomos de hidrogênio envolvidos nos contatos intermoleculares são exibidos como esferas brancas. Códigos de simetria para gerar átomos equivalentes: $i = x-1, -y+3/2, z-1/2$, $ii = -x+1, y-1/2$, $iii = -x+1, -y+2, -z+1$	64
Esquema 26. Obtenção do híbrido H3 , partindo dos precursores de 2 e 9	66
Esquema 27. Obtenção do híbrido H4 , partindo dos precursores 2 e 12	67
Esquema 28. Obtenção do híbrido H5 , partindo dos precursores 2 e 7	68
Esquema 29. Obtenção do híbrido H6 , partindo dos precursores 2 e 10	69
Esquema 30. Obtenção do híbrido H7 , partindo dos precursores 2 e 13	70
Esquema 31. Obtenção do híbrido H8 , partindo dos precursores 2 e 8	71
Esquema 32. Obtenção do híbrido H9 , partindo dos precursores 2 e 11	72
Esquema 33. Obtenção do híbrido H10 , partindo dos precursores 2 e 14	73
Figura 9. Gráficos de inibição de H2 e benznidazol (BZD) contra epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em diferentes períodos de tratamento.....	75
Figura 10. (A) Gráficos de viabilidade de H2 frente a macrófagos peritoneais nos períodos de 24 e 48 horas de tratamento (2×10^5 macrófagos/poço). (B) Gráficos de inibição de H2 frente a esplenócitos totais nos períodos de 24 e 48 horas de tratamento (2×10^5 esplenócitos/poço). As diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes concentrações de tratamentos em relação ao vivo (controle não tratado) são representadas por linhas de conexão e ns (não significativo), $^*(p < 0,05)$, $^{**}(p < 0,01)$, $^{***}(p < 0,001)$, $^{****}(p < 0,0001)$	77

Figura 11. (A) Espectros de absorção de UV para ASH (4,0 μM) sem e na presença de **H2** na concentração máxima de ligante usada na análise de fluorescência em estado estacionário (8,0 μM). (B) Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) para ASH sem e após adições sucessivas de **H2** (0,2, 0,4, 4,0, 6,0 e 8,0 μM) a 310K. 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 μM) a 310K. (C) Decaídas de fluorescência resolvidas no tempo para ASH (4,0 μM) sem e com **H2** sob a concentração mais alta de **H2** usada na análise de fluorescência em estado estável a 300K. (D) Gráficos de Stern-Volmer para a interação ASH:**H2** em PBS. (E) Gráfico de Van't Hoff com base nos valores de K_{SV} para ASH:**H2**. (F) Os espectros de CD para ASH sem e com **H2** (proporções 1:0 e 1:8). (G) Conteúdo da estrutura secundária (%) de ASH livre e ASH:**H2**. (H) Gráficos de Stern-Volmer para ASH:**H2** sem e com os marcadores de local warfarina, ibuprofeno ou digitoxina a 310K. (I) Os valores de K_{SV} para ASH:**H2** sem e na presença de cada marcador de local a 310K.....82

Figura 12. Secção longitudinal da superfície de interação do sítio dicarboxilato de TcSDH (contorno e fundo em cinza) evidenciando a pose de interação para os ligantes (A) piperina (átomos de carbono em ciano), **2** (átomos de carbono em laranja), benzonidazol (átomos de carbono em verde) e (B) **H1-H10**. Átomos de hidrogênio ocultados para melhor visualização. A posição dos resíduos Arg301, Ala416 e Arg413, que constituem a tríade catalítica, está demarcada na figura. Figura gerada com o programa PyMOL 3.1 (Schrödinger, LLC)85

Figura 13. Interações com visualização bidimensional dos ligantes piperina, **2**, **H1-H10** e benzonidazol no sítio dicarboxilato de TcSDH. Interações obtidas após a reotimização dos complexos com o método semiempírico PM7. Figura gerada com o programa Discovery Studio 25.1.0.24284 (Dassault Systèmes)86-88

Figura 14. Interações com visualização bidimensional dos ligantes piperina, **2**, **H1-H10** e benzonidazol no sítio ubiquinona (Qp) de TcSDH. Interações obtidas após a reotimização dos complexos com o método semiempírico PM7. Figura gerada com o programa Discovery Studio 25.1.0.24284 (Dassault Systèmes)90-93

Figura 15. Superfície de interação do sítio ubiquinona (Qp) de TcSDH (superfície em cor rosa claro) evidenciando a pose de interação para os ligantes (A) piperina (átomos de carbono em ciano), **2** (átomos de carbono em magenta), benzonidazol (átomos de carbono em amarelo) e (B) **H1-H10**. Átomos de hidrogênio ocultados para melhor visualização.

A posição dos resíduos Met37, Trp36, Trp440 e Tyr233, relevantes para a interação com os ligantes, está demarcada na figura por círculos em cor vermelha. Figura gerada com o programa PyMOL 3.1 (Schrödinger, LLC)93-94

Figura 16. Gráficos para a regressão linear simples nos sítios ativos dicarboxilato e ubiquinona (Qp) de TcSHD, considerando as entalpias de interação calculadas para os ligantes piperina, **2**, **H1-H10** e benzonidazol, e a variável dependente (CI₅₀ (μM) amastigotas de *T. cruzi*) para os mesmos compostos. Método: regressão linear simples (N = 13 ligantes). Figura gerada com o programa Excel (MICROSOFT CORPORATION, 2025)96

Figura 17. (A) Superposição da melhor pose de acoplamento para 14DM:**2/H1-H10** com a representação de zoom correspondente (B, C) no domínio de ligação HEME. O mapa de potencial eletrostático para 14DM acoplado com (D) **2**, (E) **H1-H4**, (F) **H5-H7** e (G) **H8-H10** no domínio de ligação HEME. (H) Melhor pose de acoplamento entre ASH:**H2** nos subdomínios IIA, IIIA e IB (locais I, I e III, respectivamente) com a representação de zoom correspondente (I) e (J) mapa de potencial eletrostático para albumina. Para melhor compreensão, os átomos de hidrogênio foram omitidos e as cores correspondentes dos compostos foram apresentadas na figura.....100

Figura 18. (A) Diagrama de biodisponibilidade oral, características físico-químicas e de semelhanças à fármacos para os ligantes piperina, **2**, **H1-H10** e benzonidazol. Os parâmetros são LIPO: lipofilicidade; SIZE: massa molecular; POLAR: polaridade; INSOLU: insolubilidade aquosa; INSATU: grau de insaturação; FLEX: flexibilidade molecular. (B) Gráfico BOILED-Egg contendo estimativas do perfil de absorção gastrointestinal e permeação da barreira hematoencefálica (BHE) para os ligantes piperina (ponto 1), **2** (ponto 2), **H1-H10** (grupo de pontos 3) e benzonidazol (ponto 4). Os pontos localizados na elipse branca representam compostos com alta probabilidade de serem absorvidos passivamente pelo trato gastrointestinal, e os pontos na elipse amarela são para compostos com alta probabilidade de permear através da BHE para acessar o sistema nervoso central (SNC). Moléculas que não se prevê serem bem absorvidas nem permeáveis passivamente à BHE e TGI estão na zona cinza. Os pontos coloridos em azul indicam moléculas que se prevê serem substrato da glicoproteína P (PGP+) e, portanto, ativamente bombeadas do SNC ou para o lúmen gastrointestinal. Figuras obtidas do servidor SwissADME (DAINA, MICHIELIN, *et al.*, 2017)102

CAPÍTULO 2.....	106
Figura 1. Planejamento molecular dos dímeros 2-nitroimidazóis.....	108
Figura 2. (A) O modelo dimérico previsto obtido de TcNTR e (B) sua superposição com o modelo AlphaFold - pontuação prevista do Teste de Diferença de Distância Local (pLDDT) para resíduos em toda a proteína de comprimento total de 61,3% e 19,5%, significando confiança muito alta e alta, respectivamente. (C) Superposição dos cálculos de redocking para MNF no sítio catalítico do NTR cristalográfico de <i>E. coli</i> B. (D) Superposição entre o modelo dimérico previsto obtido de TcNTR e o NTR cristalográfico de <i>E. coli</i> B. (E) O mapa de potencial eletrostático de TcNTR acoplado com 2-nitroimidazóis diméricos D1-D8 . A melhor posição de acoplamento para (F) D1-D3 , (G) D4-D6 e (H) D7 e D8 no bolso catalítico de TcNTR na presença do cofator MNF. Os principais resíduos de aminoácidos que interagem com (I) D1 , (J) D3 , (K) D7 e (L) D8 . Linhas azuis, pontos cinza, laranja e verde representam ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações de cátions- π e interações de π -“stacking”, respectivamente. Para melhor interpretação, os átomos de hidrogênio foram omitidos.....	111
Esquema 1. Reação de 2-nitroimidazol e dibromoalcenos adequados.....	113
MATERIAIS E MÉTODOS.....	126
Figura 1. Metodologia de preparação dos híbridos H1-H10	136
Figura 2. Metodologia de preparação dos dímeros D1-D8	147
Figura 3. Esquema reacional da redução do sal de MTT por redutases mitocondriais à formazana de MTT.....	153
Figura 4. Reação enzimática de clivagem do galactosídeo CPRG pela ação da enzima β -galactosidase, quantificada por absorbância no UV (570 nm) (adaptado de BUCKNER <i>et al.</i> , 1996)	154
Figura 5. Esquema reacional da redução do sal de MTS por redutases mitocondriais à formazana de MTS.....	155
Figura 6. Equação utilizada para a normalização das pontuações de docagem dos ligantes, na qual N = número de átomos pesados (exceto átomos de hidrogênio)	164

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1	30
Tabela 1. Comprimentos de ligação selecionados (Å) para o composto H2	65
Tabela 2. Avaliação biológica dos híbridos H1-H10 frente às formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade frente a células LLC-MK2 (fibroblastos de rim de macaco)	74
Tabela 3. Estudo cinético da atividade do híbrido H2 em diferentes períodos de incubação após tratamento, em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Tulahuen C2C4 LacZ) .	75
Tabela 4. Avaliação biológica dos híbridos H1-H10 frente às formas tripomastigotas de <i>T. b. brucei</i>	79
Tabela 5. Parâmetros de fluorescência de estado estável para a ligação ASH: H2 em cinco temperaturas diferentes e parâmetros de fluorescência resolvidos no tempo para a ligação ASH: H2 em diferentes concentrações híbridas a 300K.....	83
Tabela 6. Descritores de interação calculados para a pose dos ligantes piperina, 2 , H1-H10 e benzonidazol no sítio dicarboxilato de TcSDH.....	89
Tabela 7. Descritores de interação calculados para a pose dos ligantes piperina, 2 , H1-H10 e benzonidazol no sítio ubiquinona (Qp) de TcSDH.....	95
Tabela 8. Resultados para o estudo estatístico de correlação dos dados teóricos e experimentais nos sítios ativos ubiquinona (Qp) e dicarboxilato de TcSHD. Variável dependente (Y) = CI ₅₀ amastigotas de <i>T. cruzi</i> (µM). Método: regressão linear simples (N = 13 ligantes: piperina, 2 , H1-H10 e benzonidazol)	96
Tabela 9. Valores de pontuação de acoplamento (adimensionais) para a interação 14DM: 2/H1-H10	99
Tabela 10. Parâmetros de química medicinal e farmacocinéticos para os ligantes piperina, 2 , H1-H10 e benzonidazol, obtidos com os servidores SwissADME (DAINA, MICHIELIN, <i>et al.</i> , 2017) e ADMETlab 3.0 (FU, SHI, <i>et al.</i> , 2024). Contido na tabela, estão as previsões acerca da concordância com a regra dos cinco de Lipinski, inibição das enzimas do citocromo CYP450, filtros PAINS e Brenk contendo alertas estruturais de frações químicas com toxicidade conhecida, e vias de toxicidade biológica (avaliação de	

múltiplos alvos relacionados às principais vias de toxicidade celular e tecidual que podem ter interação com os ligantes em estudo). Para este último parâmetro: NR-AhR (receptor de hidrocarboneto arila), NR-Aromatase (aromatase), NR-ER (receptor de estrogênio), SR-ARE (elemento de resposta antioxidante), SR-ATAD5 (Proteína 5 contendo domínio AAA da família ATPase), SR-HSE (elemento de resposta ao fator de choque térmico), SR-MMP (potencial da membrana mitocondrial) e SR-p53 (proteína supressora de tumor).....103-104

CAPÍTULO 2.....106

Tabela 1. Propriedades farmacocinéticas previstas (*in silico*) para de dímeros usando o servidor web online SwissADME e o software Spartan 14 (DAINA, MICHIELIN, *et al.*, 2014, 2017).....112

Tabela 2. Atividade anti-*T. cruzi* da azomicina e dos compostos diméricos **D1-D8**.....122

Tabela 3. Atividade anti-*T. b. brucei* dos compostos diméricos **D1-D8**.....123

MATERIAIS E MÉTODOS.....126

Tabela 1. Códigos para as sequências primárias das subunidades catalíticas de TcSDH obtidas no servidor UniProt.....163

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt = Acetato de Etila

ACN = Acetonitrila

Ala = Alanina

ASH = Albumina sérica humana

Arg = Arginina

CH₃SO₂Cl = Cloreto de Mesila

CLAE = Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos

CCDA = Cromatografia em camada delgada analítica

CI₅₀ = Concentração Inibitória de 50%

CPRG = *Chlorophenol red β -D-galactopyranoside* (vermelho de clorofenol β-galactopiranosídeo)

d = duplete

dd = duplo duplete

DC = Doença de Chagas

DCM = Diclorometano

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMF = *N,N*-dimetilformamida

DMSO = Dimetilsulfóxido

DTN's = Doenças Tropicais Negligenciadas

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

EM = Espectroscopia de massas de Baixa resolução com ionização por impacto de elétrons

ESI = Espectrometria de Massa com ionização por Eletronspray

Gln = glutamina

Glu = Ácido Glutâmico

His = Histidina

HRMS = *High Resolution Mass Spectra* (Espectro de Massas de Alta Resolução)

Ile = Isoleucina

IS = Índice de seletividade

IV = InfraVermelho

J = constante de acoplamento

K_2CO_3 = Carbonato de Potássio

LIT = *Liver Infusion Triptose*

Lys = Lisina

M +• = Íon Molecular

m = múltiplo

Met = Metionina

MTT = (4,5-dimetil-2-{(E)-[(Z)-fenil(2-fenilhidrazinilideno)metil]diazenil} -1,3-tiazol

MTS = (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)

m/z = razão massa-carga

MHz = MegaHertz

NTR = Enzima nitroreductases

PBS = Solução Tampão de Fosfato

PMS = metossulfato de fenazina

P.F. = Ponto de fusão

ppm = parte por milhão

RMN 1H = Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ^{13}C = Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

s = simpleto

SAR = Relação de Estrutura-Atividade

Ser = Serina

SFB = Soro Fetal Bovino

SN^2 = Substituição Nucleofílica bimolecular

t = tripleto

t.a. = temperatura ambiente

TEA = Trietilamina

Tyr = Tirosina

Thr = Treonina

TR = Enzima Tripanotona Redutase

Trp = Triptofano

TMS = Tetrametilsilano

UV = Ultra Violeta

δ = deslocamento químico

ν = estiramento

λ = comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A Doença de Chagas	1
1.2. A Tripanosomíase Humana Africana.....	7
1.3. Produtos Naturais como alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários.....	10
1.3.1. Piperina como produto natural promissor para o desenvolvimento de novos fármacos.....	11
1.4. Esterol 14 α -demetilase (14DM)	16
1.5. Nitroimidazóis.....	17
1.6. Succinato Desidrogenase (TcSDH)	21
1.7. Estratégias de Modificações Estruturais.....	22
1.7.1. Hibridação molecular.....	23
1.7.2. Dimerização de grupo farmacofórico.....	24
1.8. Interação com a HSA.....	25
2. JUSTIFICATIVAS.....	26
3. OBJETIVOS.....	28
CAPÍTULO 1.....	30
Resumo.....	30
1. Planejamento molecular de híbridos piperina-nitroimidazol.....	31
2. Preparação dos alquilantes nitroimidazólicos 5-14	36
2.1. Preparação do alquilante 5-nitroimidazólico, a partir do metronidazol	37
2.1.1. Obtenção do Metronidazol (3)	37
2.1.2. Preparação do metanossulfonato de 2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-il) etila (4)	39
2.1.3. Preparação do 1- (2-iodo etil) -2-metil-5-nitro-1H-imidazol (5)	42
2.2. Preparação dos alquilantes a partir dos nitroimidazóis comerciais.....	45
2.2.1. Preparação dos alquilantes derivados 2-nitroimidazólicos.....	46
2.2.1.1. Preparação do 1-(2-bromoetil)-2-nitro-1H-imidazol (6)	46
2.2.1.2. Preparação do 1-(3-bromopropil)-2-nitro-1H-imidazol (7)	48
2.2.1.3. Preparação do 1-(4-bromobutil)-2-nitro-1H-imidazol (8)	49
2.2.2. Preparação dos alquilantes derivados (4)5-nitro-1H-imidazólicos.....	51

2.2.2.1. Preparação do 1-(2-bromoetil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (9)	52
2.2.2.2. Preparação do 1-(3-bromopropil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (10)	54
2.2.2.3. Preparação do 1-(4-bromobutil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (11)	55
2.2.2.4. Preparação do 1-(2-bromoetil)-4-nitro-1H-imidazol (12)	56
2.2.2.5. Preparação do 1-(3-bromopropil)-4-nitro-1H-imidazol (13)	57
2.2.2.6. Preparação do 1-(4-bromobutil)-4-nitro-1H-imidazol (14)	58
3. Preparação dos Híbridos Moleculares Planejados.....	59
3.1. Preparação do H1	60
3.2. Preparação do H2	61
3.2.1. Difração de raios X do híbrido H2	62
3.3. Preparação do H3	65
3.4. Preparação do H4	66
3.5. Preparação do H5	67
3.6. Preparação do H6	68
3.7. Preparação do H7	69
3.8. Preparação do H8	70
3.9. Preparação do H9	71
3.10. Preparação do H10	72
4. Ensaios biológicos.....	73
4.1. Resultados da avaliação biológica da série de híbridos H1-H10	73
5. Afinidade de ligação entre albumina e H2	80
6. Estudo <i>in silico</i>	83
6.1. Succinato desidrogenase (TcSDH)	83
6.1.1. Modelagem de TcSDH e refinamento estrutural.....	83
6.1.2. Estudo de docagem para os novos híbridos.....	84
6.1.3. Correlação dos descritores de interação com os dados experimentais.....	95
6.2. Esterol 14 α -demetilase (14DM)	97
7. Avaliação ADME-Tox.....	100
8. Conclusões.....	104
CAPÍTULO 2	106
Resumo.....	106
1. Planejamento da série.....	107

2.	Preparação do modelo TcNTR.....	109
3.	Preparação dos Dímeros.....	114
3.1.	Preparação do D1	114
3.2.	Preparação do D2	115
3.3.	Preparação do D3	116
3.4.	Preparação do D4	117
3.5.	Preparação do D5	118
3.6.	Preparação do D6	119
3.7.	Preparação do D7	120
3.8.	Preparação do D8	121
4.	Ensaio <i>in vitro</i>	122
5.	Conclusão.....	125
MATERIAIS E MÉTODOS.....		126
1.	Química.....	126
1.1.	Obtenção do derivado 1,2,4-triazol-3-tiona 2 derivado da amida natural piperina.....	127
1.2.	Preparação do alquilante 5-nitroimidazólico derivado do metronidazol.....	128
1.2.1.	Obtenção do metronidazol (3)	128
1.2.2.	Obtenção do 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil metanossulfonato (4)	128
1.2.3.	Obtenção do 1-(2-iodoetil)-2-metil-5-nitro-1H-imidazol (5)	129
1.3.	Preparação dos alquilantes 2-nitroimidazólicos.....	130
1.3.1.	Obtenção do 1-(2-bromoetil)-2-nitro-1H-imidazol (6)	130
1.3.2.	Obtenção do 1-(2-bromopropil)-2-nitro-1H-imidazol (7)	130
1.3.3.	Obtenção do 1-(4-bromobutil)-2-nitro-1H-imidazol (8)	131
1.4.	Preparação dos alquilantes 4-nitroimidazólicos.....	132
1.4.1.	Obtenção do 1-(2-bromoetil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (9)	132
1.4.2.	Obtenção do 1-(3-bromopropil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (10)	132
1.4.3.	Obtenção do 1-(4-bromobutil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (11)	133
1.4.4.	Obtenção do 1-(2-bromoetil)-4-nitro-1H-imidazol (12)	134
1.4.5.	Obtenção do 1-(3-bromopropil)-4-nitro-1H-imidazol (13)	135
1.4.6.	Obtenção do 1-(4-bromobutil)-4-nitro-1H-imidazol (14)	135
1.5.	Preparação dos Híbridos H1-H10	136

1.5.1. Metodologia de síntese do híbrido H1 , utilizando o iodeto 5 como agente alquilante.....	137
1.5.1.1. Obtenção do H1	137
1.5.2. Metodologia geral utilizada na síntese dos híbridos H2-H10 , utilizando os brometos 6-14 como agentes alquilantes.....	138
1.5.2.1. Obtenção do H2	138
1.5.2.2. Obtenção do H3	139
1.5.2.3. Obtenção do H4	140
1.5.2.4. Obtenção do H5	141
1.5.2.5. Obtenção do H6	142
1.5.2.6. Obtenção do H7	143
1.5.2.7. Obtenção do H8	144
1.5.2.8. Obtenção do H9	145
1.5.2.9. Obtenção do H10	146
1.6. Metodologia geral para a obtenção dos dímeros D1-D8	147
1.6.1. Obtenção de D1	147
1.6.2. Obtenção de D2	148
1.6.3. Obtenção de D3	148
1.6.4. Obtenção de D4	149
1.6.5. Obtenção de D5	149
1.6.6. Obtenção de D6	150
1.6.7. Obtenção de D7	150
1.6.8. Obtenção de D8	151
1.7. Difração de Raios X.....	151
2. Avaliação Biológica.....	152
2.1. Avaliação da citotoxicidade frente as células LLC-MK2.....	155
2.2. Avaliação da citotoxicidade frente as células HEK-293.....	155
2.3. Avaliação da citotoxicidade frente as células RAW-264.7.....	156
2.4. Avaliação da citotoxicidade de H2 frente a macrófagos peritoneais.....	156
2.5. Avaliação da citotoxicidade de H2 frente a esplenócitos totais.....	157
2.6. Avaliação da atividade tripanocida frente as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> ...157	
2.7. Avaliação da atividade tripanocida frente as formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>158	
2.8. Avaliação da atividade tripanocida frente ao <i>T. brucei brucei</i>159	

2.9.	Tratamento estatístico de dados.....	159
2.10.	Cálculo do Índice de Seletividade (IS)	160
3.	Análise espectroscópica da interação HSA:H2.....	160
4.	Avaliação <i>in silico</i>	162
4.1.	Procedimento de docking molecular TcNTR.....	162
4.2.	Procedimento de docking molecular TcSDH.....	163
4.2.1.	Construção, otimização e refinamento estrutural do modelo de TcSDH.....	163
4.2.2.	Construção e otimização dos ligantes.....	164
4.2.3.	Normalização das pontuações de docagem.....	164
4.2.4.	Estudo de docagem para os ligantes de referência.....	164
4.2.5.	Estudo de docagem em TcSDH para os híbridos.....	165
4.2.6.	Cálculos semiempíricos e reotimização da geometria dos complexos ligante-proteína.....	165
4.2.7.	Cálculo do ΔG_{bind} para os complexos ligante-proteína.....	166
4.2.8.	Correlação dos descritores de interação com os dados experimentais.....	166
4.3.	Procedimento de docking molecular 14DM e HSA.....	166
5.	Avaliação ADME-Tox.....	167
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	167
	ANEXOS.....	194

1. INTRODUÇÃO

1.1.A Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), também conhecida como Tripanossomíase Americana, é uma doença endêmica em 21 países do continente americano (MSF, 2018). Esta parasitose é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* e é considerada uma das mais negligenciadas entre o grupo de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) (HOTEZ *et al.*, 2007). As DTNs correspondem a um grupo de 20 doenças infecciosas que afetam mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo e estão presentes, principalmente, em países em desenvolvimento, especialmente em zonas tropicais. Estas doenças são recorrentes e socialmente determinadas, sendo predominantes em bolsões de extrema pobreza, onde a falta de itens básicos para a subsistência, como saneamento básico e acesso a unidades de saúde, permite a exposição e, conseqüentemente, o contágio de populações vulneráveis a diferentes patógenos (OPAS; OMS, 2024). Adicionalmente, destaca-se um dos principais motivos para a perpetuação das DTNs, que é a falta de investimentos e iniciativa de indústrias farmacêuticas privadas no desenvolvimento de novos tratamentos efetivos para essas enfermidades; e até mesmo, podemos destacar, a negligência por parte das autoridades competentes, em se colocar em prática políticas de saúde pública que conscientize a população vulnerável sobre o perigo crescente a que estão expostas e incentive a pesquisa e o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, a fim de mitigar o impacto nocivo dessas enfermidades (IHMT, 2020).

A DC foi descoberta e teve seu ciclo completamente descrito, ressaltando a sua complexidade, em 1909 pelo médico e cientista brasileiro Carlos Chagas (**Figura 1**), que identificou as primeiras formas flageladas de *T. cruzi* em sangue humano de uma paciente de dois anos que apresentava sintomas de febre alta, e aumento do tamanho de órgãos vitais, como fígado e baço (CHAGAS, 1909).



Figura 1. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934).

Atualmente, estima-se que, em todo o mundo, o número de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* seja de cerca de 6 milhões, sendo que mais de 70% dos indivíduos com DC não sabem que estão infectados, devido à falta de conhecimento sobre a doença e ao acesso limitado a unidades de saúde que efetivamente diagnostiquem ou alertem a população sobre a gravidade do problema, o que causa cerca de 12 mil mortes por complicações da DC (PAHO/WHO, 2023). Uma vez que a fase inicial desta doença é, praticamente, assintomática ou até mesmo apresentando sintomas leves que podem ser confundidos com outras enfermidades, milhares de pessoas convivem com essa infecção, sem o diagnóstico, alheias a qualquer tipo de tratamento ou cuidado necessário, visto que, atualmente no continente americano mais de 70 milhões de pessoas vivem em áreas de risco expostas ao contágio com o parasito (MSF, 2018; PAHO/WHO, 2023). Estima-se ainda que, anualmente, cerca de 30 mil novos casos de infecção ocorrem por transmissão vetorial e outros 9 mil casos são registrados de recém-nascidos infectados pelo *T. cruzi* por transmissão congênita (PAHO/WHO, 2023). Nas últimas décadas, a doença teve uma mudança em seu padrão epidemiológico, passando de rural para urbano, devido a fatores como urbanização, mobilidade da população e, principalmente, emigração. Com isso, observa-se o aparecimento massivo da DC em países não-endêmicos, sejam eles países desenvolvidos ou países em desenvolvimento, como Canadá, Estados Unidos, alguns dos principais países da Europa, alguns países da África, do Mediterrâneo Oriental e do Pacífico Ocidental (GONZALEZ-SANZ *et al.*, 2023; LEE *et al.*, 2013; WHO, 2020).

Figura 2. Distribuição global da Doença de Chagas (WHO, 2018).

A transmissão vetorial do *T. cruzi* para o hospedeiro humano ocorre, geralmente, em áreas rurais, onde se concentra a população em maior vulnerabilidade econômica, que pela falta de recursos moram em ambientes precários e sem serviços básicos de higiene e saneamento estando mais vulneráveis ao contato com os dejetos, contaminados com o *T. cruzi*, do “barbeiro” (**Figura 3**), nome popular que se dá ao grupo de insetos hematófagos triatomíneos, que tem como principal transmissor o *Triatoma infestans* da família *triatominae*. A transmissão por via oral tem despertado interesse nos últimos anos, epidemiologicamente, e vem sendo chamada por “transmissão à distância” (XAVIER, SAMANTA CRISTINA DAS CHAGAS *et al.*, 2014); recebe esse termo, pois consiste no consumo de insumos provenientes de regiões rurais (em sua maioria, endêmicas), geralmente, polpa de frutas contaminadas com *T. cruzi*, tendo havido algum tipo de contato com os dejetos do “barbeiro” em seu cultivo ou processamento, dando destaque para a polpa de açaí e o caldo-de-cana, muito populares no Brasil (BARROSO FERREIRA; BRANQUINHO; CARDARELLI-LEITE, 2014; ROCHA, YANCKA LENERHORA *et al.*, 2023). Não são muito comuns em trabalhos na literatura discussões que abordem a fisiopatologia da transmissão oral do *T. cruzi*; as evidências apontam para uma invasão parasitária através da mucosa gástrica (LIMA *et al.*, 2022). Segundo Coura e Castro (2002), a transmissão através de transfusões sanguíneas, de doadores infectados, já teve números expressivos (5 a 20% das infecções por *T. cruzi*), tendo atualmente diminuído esse número devido à maior fiscalização e cuidado nos bancos de sangue. A transmissão congênita, ou vertical, consiste na infecção de mãe para filho durante a gravidez, ou no momento do parto, em alguns casos pode ocorrer também através do aleitamento materno (LAMOUNIER *et al.*, 2004).



Figura 3. Imagem do barbeiro (inseto triatomíneo), vetor da doença de Chagas (imagem: <<http://triatookekey.cpqrr.fiocruz.br/#&ui-state=dialog>>).

O *T. cruzi* apresenta três variações morfológicas distintas ao longo de seu ciclo evolutivo de alta complexidade, passando por dois hospedeiros distintos (**Figura 4**). A epimastigota é a forma replicativa, exclusiva do hospedeiro invertebrado, presente no trato digestivo do inseto triatomíneo (vetor). A amastigota é a forma replicativa, exclusiva do hospedeiro mamífero, observada no interior das células hospedeiras, responsável pela perpetuação e expansão da DC no organismo do hospedeiro mamífero, e pode ser considerada a forma evolutiva mais importante a ser estudada em um tratamento quimioterápico, devido ao seu papel fundamental na manutenção da infecção nos hospedeiros vertebrados com formação dos chamados ninhos amastigotas dormentes em tecidos cronicamente infectados podendo, a qualquer momento, reiniciar a infecção (MARTÍN-ESCOLANO *et al.*, 2022). A tripomastigota é a forma infectante e não replicativa, presente nos dejetos do vetor e na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero infectado (FIOCRUZ, 2017).

Tripanossomíase americana (doença de Chagas) *Trypanosoma cruzi*

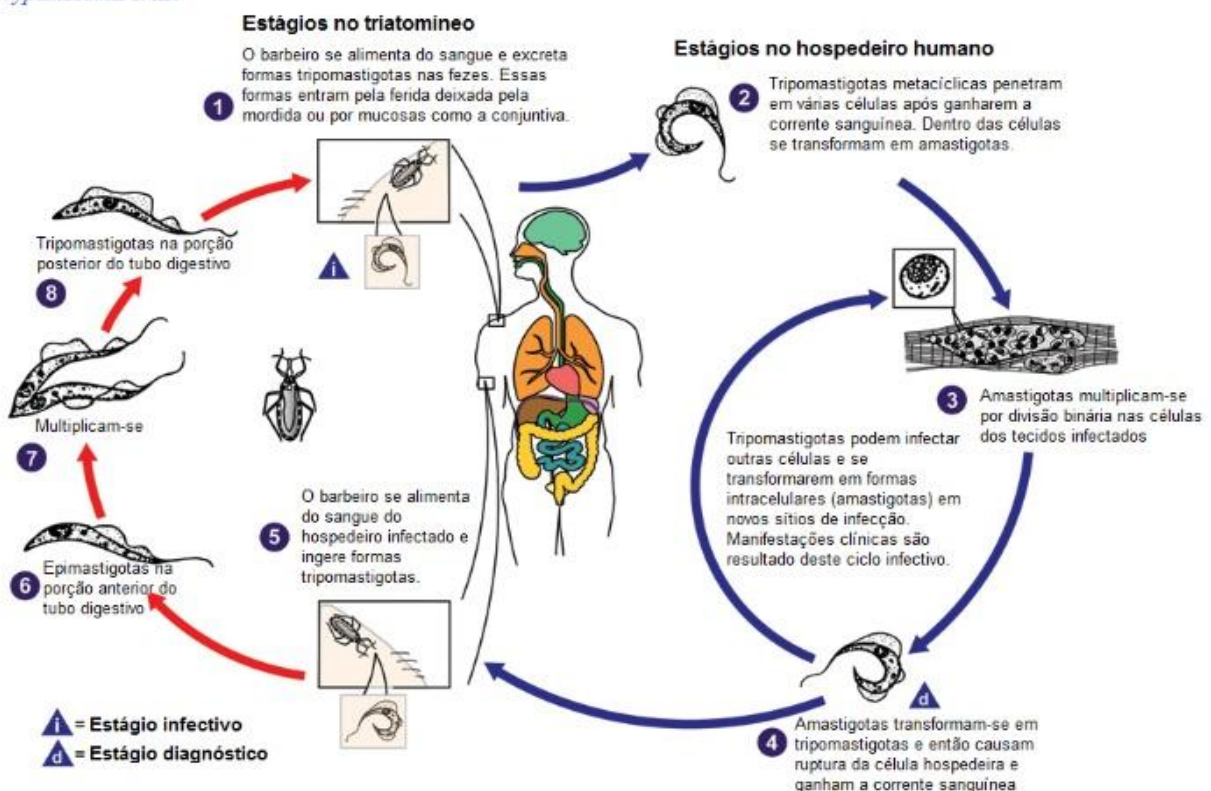


Figura 4. Representação esquemática do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (Traduzida de CDC, 2021).

Após instalada a infecção, a DC se manifesta, inicialmente, na fase aguda, que está associada à infestação e multiplicação parasitária nos tecidos, principalmente no miocárdio, no aparelho digestivo, alguns trabalhos destacam a possibilidade do parasito ultrapassar a barreira hematoencefálica infectando diversos tipos células do cérebro (SIMÕES *et al.*, 2018; USECHE *et al.*, 2022). Essa fase se inicia de 1 a 4 semanas após a exposição ao *T. cruzi*, ela é conhecida por ser assintomática, porém os pacientes podem apresentar quadros sintomáticos, com febre, adenomegalia e hepatoesplenomegalia. Uma pequena parte dos pacientes mais graves pode apresentar sintomas que se assemelham à miocardite e meningoencefalite, sendo fatal em até 10% dos casos mais graves, acometendo principalmente crianças menores de dois anos (RODRIGUES COURA, 2003; SIMÕES *et al.*, 2018). A fase crônica apresenta uma patogenia mais complexa, na qual a inflamação de diversos tecidos infectados é o determinante da progressão da doença. Muitos pacientes podem levar de 10 a 30 anos, após a fase aguda, para manifestar os sintomas da fase crônica, destacando-se como o principal, e mais o severo, a cardiomiopatia decorrente das lesões no tecido cardíaco, causadas pelo parasito e pelo sistema imune do hospedeiro, podendo levar à morte súbita do paciente (COURA; DE CASTRO, 2002; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RODRIGUES COURA, 2003; XAVIER, SÉRGIO SALLES *et al.*, 2005).

O tratamento quimioterápico da DC se restringe a dois fármacos nitro-heterocíclicos, inseridos no mercado a mais de 50 anos, o nifurtimox e o benznidazol (**Figura 5**), com índices de cura na faixa de 50 a 70% na fase aguda, em contraste com valores percentuais inferiores a 20% na fase crônica da doença (DIAS *et al.*, 2009; MÜLLER KRATZ *et al.*, 2018; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Esses fármacos demandam um longo tempo de tratamento (30 a 60 dias), e muitas vezes os pacientes acabam por abandonar o tratamento por diversos fatores, sendo o principal deles os efeitos colaterais severos causados por essas substâncias, como problemas gastrointestinais, dermatológicos, toxicidade hepatológica, entre outros, que apresentam um perfil de toxicidade bastante elevado (GARCIA *et al.*, 2005; RIBEIRO, VANESSA *et al.*, 2020; RODRIGUES COURA, 2003). No Brasil o benznidazol é o fármaco de primeira escolha, já a utilização do nifurtimox foi descontinuada devido aos seus efeitos genotóxicos, por volta de 2005 pelas agências reguladoras. Porém, nos últimos anos o nifurtimox é recomendado, conforme Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Doença de Chagas nº 397, de 2018, para o tratamento etiológico, em crianças e adolescentes na forma

crônica indeterminada e, nos casos agudos, para qualquer faixa etária, em situações em que o benznidazol não é adequadamente tolerado (FIOCRUZ, 2023).

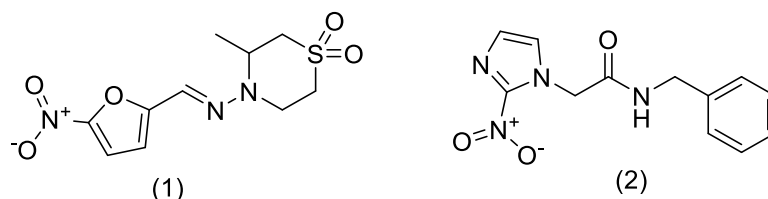


Figura 5. Estrutura dos fármacos comerciais nifurtimox **1** e benznidazol **2**.

A falta de interesse de indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de novos tratamentos para a DC é notável; pois é uma doença que não tem potencial lucrativo para essas empresas, uma vez que a maioria da população infectada não tem condições de arcar com o valor do tratamento, estando principalmente nas áreas mais carentes dos países endêmicos. O Brasil vem somando esforços no combate a DC, no ano de 2021 o Ministério da Saúde investiu outros R\$ 21 milhões no Cuida Chagas, projeto da Unitaid na Bolívia, Brasil, Colômbia e Paraguai, com o objetivo de melhorar o acesso ao diagnóstico, tratamento e atenção integral, por meio de abordagens inovadoras e sustentáveis, com foco na transmissão congênita. No Brasil, o Cuida Chagas atua nos territórios de Igarapé Miri (PA), Janaúba (MG), Paraúna (GO), Riachão das Neves (BA) e Rosário do Sul (RS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE BR, 2022). É um panorama de esperança, mas ainda muito aquém da urgência de um problema real de saúde pública que acomete povos carentes. Segundo matéria publicada em 2013 pela Agência FIOCRUZ de Notícias, essa negligência custa US\$ 129 milhões por ano à saúde pública brasileira. Para sanar esse problema da falta de tratamento, muitos trabalhos têm discutido a eficiência das estratégias de reposicionamento de fármacos, e da associação de fármacos, por serem abordagens mais rápidas e econômicas (RIBEIRO, VANESSA *et al.*, 2020). Porém, uma alternativa atraente é o estudo e uso de produtos naturais abundantes, obtidos de fontes renováveis, como precursores na síntese de novos antiparasitários, pois apresentam uma variedade infinita de estruturas capazes de interagir com diferentes modelos biológicos (DIAS *et al.*, 2009).

1.2.A Tripanosomíase Humana Africana

A Tripanosomíase Humana Africana (THA), popularmente conhecida como “doença do sono”, é uma doença transmitida, principalmente, por vetores através da picada de uma mosca tsé-tsé infectada (*Glossina* spp.) (BARRETT, 2006; BRUN *et al.*, 2010; WHO, 2023b). É uma doença potencialmente fatal em muitos casos, cujo agente etiológico é o *Trypanosoma brucei*, dividido em duas subespécies: *T. brucei gambiense* (responsável por 92% dos casos registrados) e *T. brucei rhodesiense* (responsável por 8% dos casos registrados), dependendo do local da infecção (WHO, 2023b). A *T.b. gambiense* está presente na África Ocidental e Central, causando um tipo de infecção crônica, na qual o indivíduo infectado passa longos períodos sem apresentar sintomas; embora os sintomas se manifestem após meses ou anos, na maioria dos casos, a doença já está no contexto de uma infecção avançada, com o sistema nervoso central comprometido (BÜSCHER *et al.*, 2017; WHO, 2023b). A *T.b. rhodesiense* está presente no leste e sul da África, causada por um tipo de infecção aguda, em que os primeiros sintomas aparecem em poucas semanas, evoluindo rapidamente, afetando órgãos vitais e o sistema nervoso central. Essa enfermidade causa sintomas como febre, dor de cabeça, dores articulares, inchaço dos gânglios (linfonodos) e um caroço na picada da mosca tsé-tsé; depois, afeta o sistema nervoso, causando sonolência excessiva diurna, insônia, confusão mental, alterações de comportamento, falta de coordenação, e pode levar ao coma se não tratada, sendo a forma mais potencialmente fatal (BÜSCHER *et al.*, 2017; WHO, 2023b).

Segundo dados recentes da Organização Mundial da Saúde, o continente africano tem mais de 55 milhões de pessoas expostas em áreas endêmicas, principalmente nas regiões rurais da África Subsaariana, sujeitas a riscos reais e latentes de infecção pelo *T. brucei*. Apesar da perspectiva negativa, a OMS uniu esforços para erradicar essa doença fatal. Uma queda significativa nos casos de doença do sono causada pelo *T. b. gambiense*, passando de 27.862 casos registrados em 1999 para 799 em 2022. Também houve uma redução significativa nos casos de doença do sono causada pelo *T. b. rhodesiense*, passando de 619 casos registrados em 1999 para 38 em 2022. No entanto, como se trata de uma doença parasitária fatal, se não for diagnosticada e tratada adequadamente, esses números ainda são preocupantes, uma vez que os povos nativos dessas áreas endêmicas não têm segurança adequada contra a transmissão da doença do sono. Todos os anos, pelo menos um caso de infecção por *T. brucei* é diagnosticado nos Estados Unidos, em

viajantes que retornam de áreas endêmicas (BÜSCHER *et al.*, 2017; CANTEY *et al.*, 2019; CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019).

O ciclo de vida do parasita (**Figura 6**) começa quando o vetor se alimenta do sangue do indivíduo, injetando tripomastigotas metacíclicos no sangue e na camada lipídica da pele. Quando entram na corrente sanguínea, eles diferenciam-se em tripomastigotas, que se dividem por fissão binária, ocorrendo fora das células e atingindo os fluidos corporais. Em segundo lugar, a mosca tsé-tsé se infecta com o tripomastigota presente no sangue do indivíduo infectado, ao fazer o repasto sanguíneo. No trato digestivo da mosca, os parasitas se diferenciam em tripomastigotas pró-cíclicos, que se dividem por divisão binária e, ao saírem do intestino, se diferenciam em epimastigotas ao chegarem às glândulas salivares da mosca, onde continuam a se multiplicar, até formar uma nova infecção, e então os parasitas se diferenciam novamente em tripomastigotas metacíclicos, fechando o ciclo de infecção (CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019).

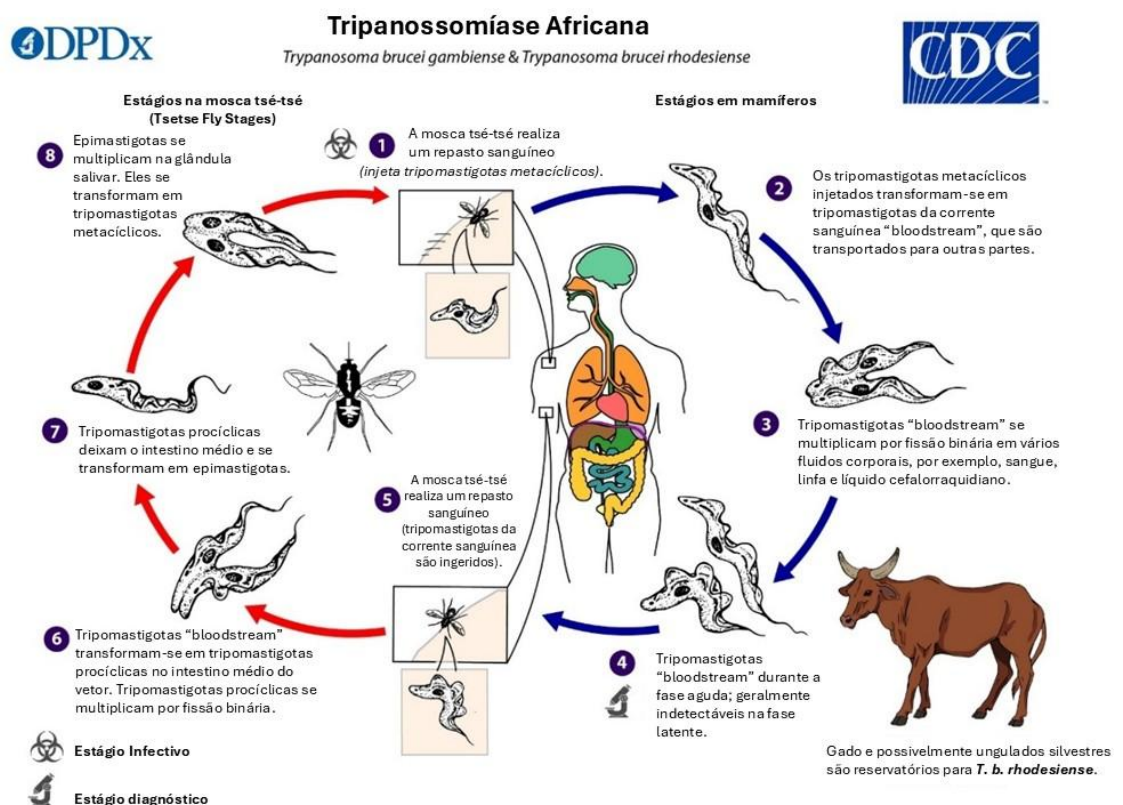


Figura 6. Ciclo de vida do *T. brucei* (Traduzida de CDC, 2019).

O diagnóstico da THA pode ser feito pela detecção do parasita em pacientes infectados, por meio de esfregaços de sangue ou de outras secreções corporais. Recentemente, foram lançados testes rápidos para *T. b. gambiense*, com desempenho questionável dependendo da endemicidade; esse tipo de teste é limitado para identificar *T. b. rhodesiense*, pois a soroconversão só ocorre após o início dos sintomas clínicos (BÜSCHER *et al.*, 2017; CDC, 2019; WHO, 2023).

O arsenal terapêutico utilizado no tratamento da THA inclui fármacos altamente citotóxicos, que podem causar sérios efeitos adversos aos pacientes, o que desestimula seu uso. Suas formas de administração são, em sua maioria, intramusculares e intravenosas (extremamente dolorosas), além de serem fármacos caros e de disponibilidade limitada em áreas endêmicas (devido à necessidade de acondicionamento em baixas temperaturas, CDC, 2019). Vale ressaltar que essas abordagens terapêuticas não apresentam uma taxa de cura adequada, seja pela rápida progressão do quadro clínico da THA, ou mesmo pelos graves efeitos adversos. Os medicamentos são fexinidazol **3**, pentamidina **4**, suramina **5**, merlasoprol **6**, eflornitina **7** (**Figura 7**) isoladamente ou em associação com nifurtimox, ressaltando que o tratamento é direcionado de acordo com o estágio da doença e, principalmente, pela espécie do *T. brucei*, o que destaca a grande importância do diagnóstico prévio, fatores que dificultam e oneram o tratamento dessa doença potencialmente fatal. Portanto, é evidente a necessidade de medicamentos mais eficazes e com maiores índices de seletividade, garantindo maior segurança aos pacientes infectados (CDC, 2019; PATTERSON; WYLLIE, 2014; WHO, 2023).

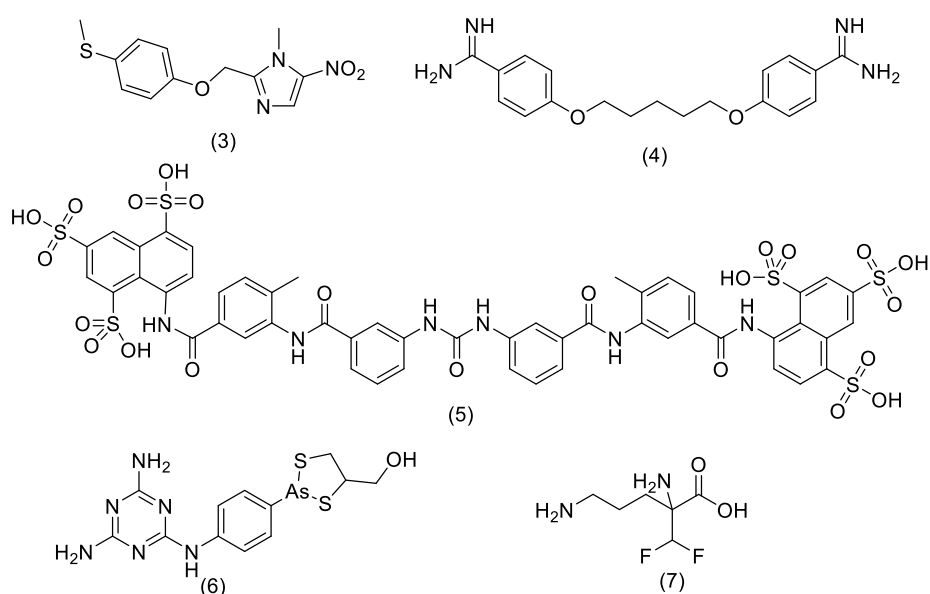


Figura 7. Fármacos utilizados no tratamento da THA.

1.3. Produtos Naturais como alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários

Na busca por novos tratamentos, os produtos naturais constituem uma alternativa atraente de estruturas biologicamente ativas, que podem ser utilizadas como fármacos ou mesmo como precursores na síntese de novos fármacos antiparasitários, pois apresentam uma infinita variedade de estruturas potencialmente bioativas (DA ROSA; SCHENKEL; CAMPOS BERNARDES, 2020; DIAS *et al.*, 2009; IZUMI *et al.*, 2011; KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2003). No campo da química medicinal, tendo em vista o contexto atual, com a crescente resistência aos fármacos de uso padrão e o pouco interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novas terapias antiparasitárias, os produtos naturais se reafirmam como uma importante estratégia de inovação na área de planejamento e desenvolvimento de novas substâncias com atividades em diversos alvos biológicos, em especial as substâncias isoladas de especiarias e temperos, conhecidas pelo potencial antimicrobiano e antiparasitário (DIAS *et al.*, 2009; NDJONKA *et al.*, 2013; OROSCO; MENDOZA; MELÉNDEZ, 2024; VELEZ, AFONSO *et al.*, 2024).

A importância dos produtos naturais é muito bem representada no trabalho de Newman e Cragg (2020), no qual foi feito um levantamento de todos os fármacos aprovados pelo FDA de 1981 a 2019, e conclui-se que cerca de 65% destes tiveram participação direta ou indiretamente de produtos naturais no seu desenvolvimento (**Figura 8**). De forma similar, o trabalho de Butler e colaboradores (2025) mostra um levantamento de todos os fármacos aprovados no mundo na última década (2014 a 2024) foram registrados 56 novos fármacos derivados direta ou indiretos de produtos naturais, com média de 5 fármacos derivados de produtos naturais lançados por ano por ano. No ano de 2025 até o final de junho houve a aprovação de mais três fármacos derivados de produtos naturais, o Telisotuzumab-vedotin (utilizado no tratamento de câncer de pulmão), Nafithromycin (Miqnaf®, utilizado no tratamento de infecções causadas por bactérias super resistentes) e Acoltremon (Tryptyr®, utilizado no tratamento oftalmológico), bem como outros fármacos derivados de produtos naturais estão em estágios clínicos finais para o provável lançamento (BUTLER *et al.*, 2025). A revisão descrita por Uchiyama (2009) ilustra alguns trabalhos desenvolvidos na investigação de produtos naturais aplicáveis a quimioterapia da DC.

Revisões recentes de Orosco e colaboradores (2024) e Sakyi e colaboradores (2025) reafirmam a importância de explorar os produtos naturais como fonte de inspiração para

novos fármacos para tratar parasitoses humanas, devido a sua riqueza e versatilidade estrutural (OROSCO; MENDOZA; MELÉNDEZ, 2024; SAKYI *et al.*, 2025). Dentre as principais classes estudadas, destacam-se os alcaloides, com ênfase na amida natural piperina, que apresentou atividade antiparasitária, principalmente contra o *T. cruzi*, bem descrita na literatura por trabalhos de nosso grupo de pesquisa (FERREIRA, WELISSON S. *et al.*, 2012; RIBEIRO, TATIANA SANTANA *et al.*, 2004). É interessante ressaltar que o trabalho de Domingo-Fernández e colaboradores (2024) mostra uma evolução favorável dos fármacos derivados de produtos naturais em relações aos fármacos sintéticos nas fases pré-clínicas de desenvolvimento de novos medicamentos (da fase I a III), mesmo com menos derivados de produtos naturais chegando nestas etapas, devido a menor toxicidade apresentada *in vitro* e *in silico*, o que apresenta um panorama muito otimista para o desenvolvimento eficaz de novos fármacos derivados planejados a partir de produtos naturais.

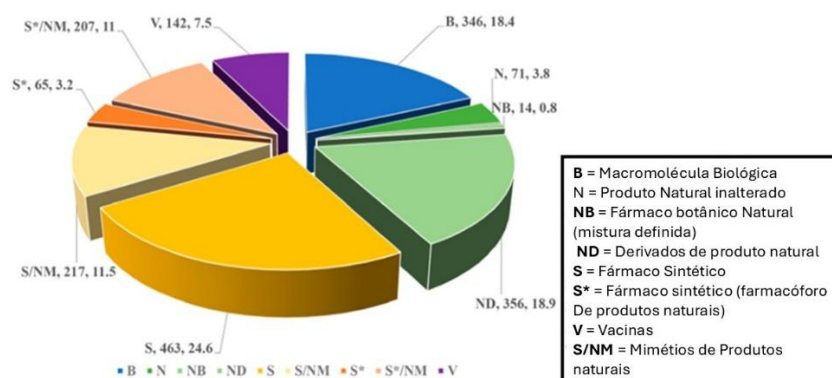


Figura 8. Distribuição de todos os fármacos inseridos no mercado desde 1981 até 2020 (traduzido de NEWMAN & CRAGG, 2020).

1.3.1. Piperina como produto natural promissor para o desenvolvimento de novos fármacos

Diferente de outros produtos naturais, a amida natural piperina pode ser encontrada em diversas espécies do gênero *Piper*, porém, se manifesta em abundância nos frutos da *Piper nigrum* (conhecida popularmente no Brasil como “pimenta do reino” ou “pimenta preta”), podendo ser extraída dos frutos secos com altos rendimentos, de até 7% (IKAN,

1991; SEMLER; GROSS, 1988). Apesar de, no Brasil, ser usada como condimento, a utilização da *P. nigrum* na medicina popular da Índia é amplamente difundida. Mesmo não sendo uma planta nativa da flora brasileira, o Brasil tem uma grande parcela na produção mundial de pimenta-do-reino, com um total de 51.739 toneladas colhidas em cerca de 22.000 hectares de área cultivada em 2015 (IBGE, 2017). A grande popularidade deste condimento, bem como seu amplo uso em todas as regiões do planeta, faz com que a pimenta-do-reino seja atualmente uma commodity. Segundo dados da FAO, a produção mundial de pimenta-do-reino, que em 2021 foi de cerca de 794 mil toneladas, está concentrada em apenas nove países, entre os quais Vietnã e Brasil se destacam como os principais produtores mundiais com 288 e 118 mil toneladas do condimento, respectivamente (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2022).

O uso de matérias primas naturais e, principalmente, renováveis no desenvolvimento de novos fármacos é uma alternativa muito promissora, pois, geralmente, é possível encontrar estruturas moleculares muito ricas e versáteis, que podem atuar como precursores fundamentais em síntese orgânica; como no caso da piperina, que pode ser dividida em três subunidades, todas elas passíveis de modificações estruturais (**Figura 9**): o anel benzodioxola (subunidade 1), o espaçador de cinco carbonos, com duas insaturações (subunidade 2), além do anel piperidínico (subunidade 3) (FERREIRA, WELISSON S. *et al.*, 2012; VELEZ, AFONSO *et al.*, 2024).

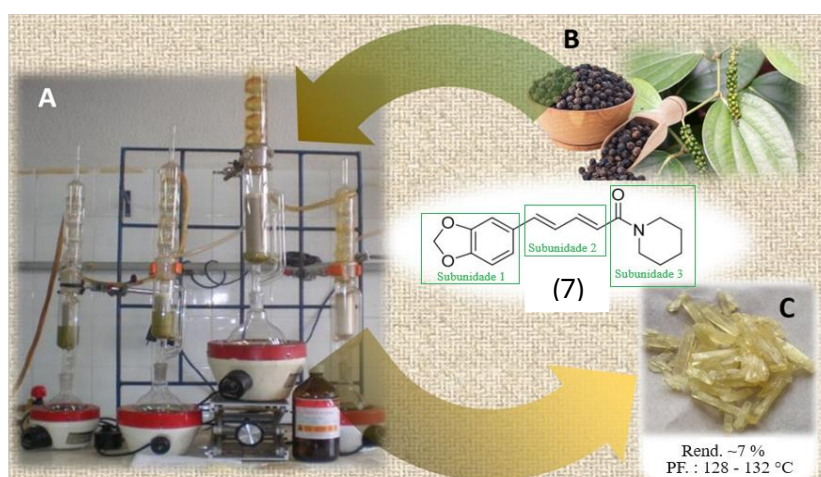


Figura 9. (A) Sistema de extração com aparelho de Soxhlet; (B) Frutos secos da *P. nigrum*; (C) Cristais de Piperina **7** obtidos a partir da recrystalização do extrato etanólico utilizando etanol/água (Adaptado de VELEZ *et al.*, 2024).

O trabalho de revisão de Carnevallia e Araújo (2013) descreve a atividade biológica de extratos e óleos essenciais de *P. nigrum* como anti-inflamatória, antioxidante, analgésica, fungicida e bactericida, ressaltando a importância do principal componente, a amida natural piperina, que é a principal responsável por essas atividades. Além disso, a Piperina está associada ao aumento da biodisponibilidade de medicamentos quando utilizada em tratamentos em associação, sendo uma das propriedades biológicas mais interessantes dessa amida natural. Há estudos teóricos que sugerem a interação da piperina 7 com a CYP3A4, uma enzima associada ao metabolismo oxidativo de mais da metade dos medicamentos e xenobióticos em humanos (JAYAKANTHAN *et al.*, 2010). É relevante destacar que os resultados mostram a formação de um complexo estável de piperina e CYP3A4, sugerindo um mecanismo de interação seletiva com o CYP3A4, o que melhor explicaria o aumento da biodisponibilidade dos medicamentos quando coadministrados com piperina (OLIVEIRA; ALENCAR - FILHO; VASCONCELLOS, 2014).

Outra propriedade da Piperina que merece destaque é a atividade antiparasitária, especialmente contra *T. cruzi*, *L. donovani* e *L. amazonensis* (FERREIRA, *et al.*, 2012). Esse conjunto de características pode ser explorado para apoiar a utilização dessa amida natural, sozinha ou em combinação com outras moléculas e medicamentos bioativos, e, até mesmo, na preparação de derivados moleculares preservando suas características moleculares que a tornam especial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de parasitoses, principalmente relacionados às doenças tropicais negligenciadas (FERREIRA, C. *et al.*, 2011; KAPIL, 1993; RIBEIRO, TATIANA SANTANA *et al.*, 2004).

Em um trabalho pioneiro de nosso grupo de pesquisa, a atividade tripanocida da Piperina e de seus análogos semissintéticos (por exemplo, 28-30, **Figura 10**) foi avaliada contra as formas amastigota e epimastigota do *T. cruzi* *in vitro*. Os resultados indicaram um perfil de atividade promissor contra o *T. cruzi*. As estruturas químicas dos compostos 2, 28-30, bem como do fármaco de referência, benznidazol, são mostradas na **Figura 6**, juntamente com os respectivos valores de EC₅₀ calculados no estudo, indicados para cada forma evolutiva do *T. cruzi* (RIBEIRO, TATIANA SANTANA *et al.*, 2004). Outras investigações forneceram pistas valiosas sobre o mecanismo de ação da piperina contra o *T. cruzi*. Observou-se que o tratamento com o produto natural resultou na interrupção reversível da citocinese do parasito, caracterizando a atividade tripanostática da piperina.

Nesse contexto, uma hipótese viável é o rompimento do mecanismo de polimerização dos microtúbulos (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2008). No entanto, a presença de várias estruturas membranosas vacuoladas em parasitos tratados com concentrações subletais de piperina, observadas por imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET), sugere que os efeitos de seu tratamento não estão restritos a apenas um mecanismo de ação contra o parasito.

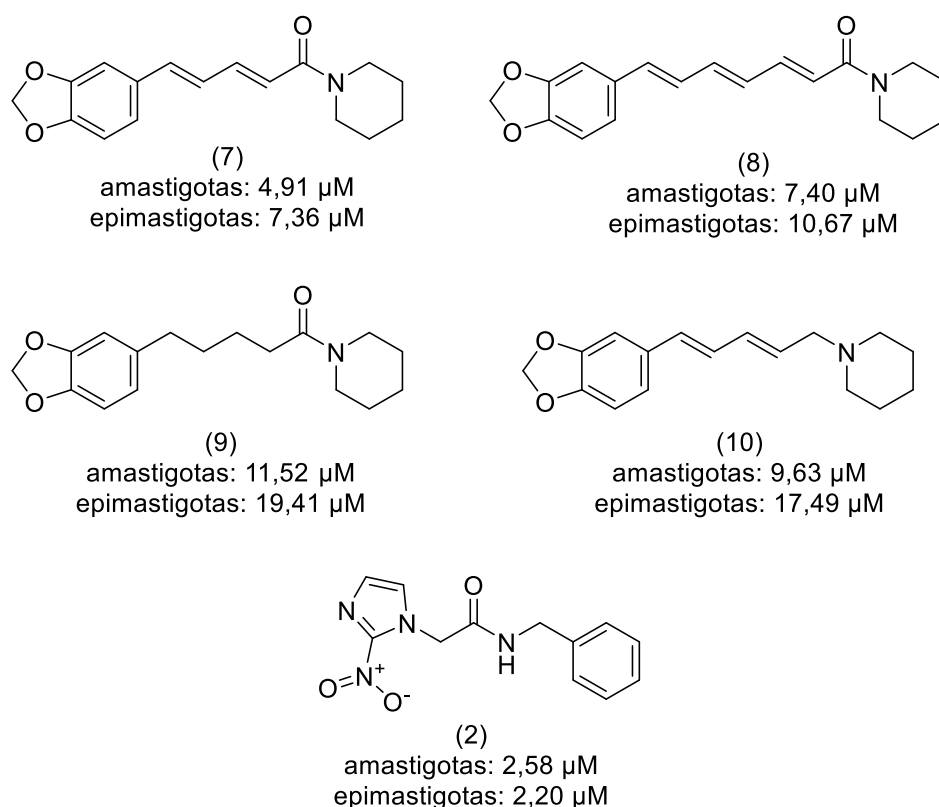


Figura 10. Estruturas químicas e valores de EC_{50} obtidos para a piperina e alguns análogos estruturais (8, 9 e 10), além do medicamento de referência benznidazol 2 contra as formas amastigota e epimastigota do *T. cruzi* (cepa Y).

A estrutura química da piperina foi explorada no projeto de compostos potencialmente bioativos, por meio de estratégias clássicas de química medicinal, como o bioisosterismo da função amida e a hibridação molecular. Foi sintetizada uma série de cloretos de 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (11–15, **Figura 11**) derivados de híbridos de piperina (TAKOOREE *et al.*, 2019). O projeto molecular dos novos compostos foi baseado na atividade leishmanicida de uma série cinâmica de cloretos de 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina descrita por Echevarria e colaboradores e nossos resultados com piperina

contra o *T. cruzi* (DASILVA *et al.*, 2002). Como foi demonstrado anteriormente que a porção 1,3-benzodioxole presente na piperina é importante para a atividade, ela foi preservada na estrutura dos novos derivados planejados. Observou-se aumento da atividade contra o *T. cruzi* (cepa Y) em comparação com o protótipo natural. Os compostos **11** e **13** foram capazes de inibir o crescimento do parasito, de forma ainda mais eficaz do que o medicamento de referência, benznidazol, *in vitro* (DA SILVA FERREIRA *et al.*, 2008). A estrutura da piperina também foi explorada no projeto de uma série de 1,2,4-triazóis-3-tiônicos (por exemplo, **14**, **15**, **Figura 11**). Essas estruturas foram planejadas para empregar as duas estratégias de bioisosterismo e de hibridação molecular. O grupo 1,2,4-triazolina-tiona atua como um bioisótero do grupo amida. A estrutura química dos compostos **11-15** e os respectivos valores de EC₅₀ calculados para diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* (cepa Y) são apresentados na **Figura 11** (DA SILVA FERREIRA *et al.*, 2008).

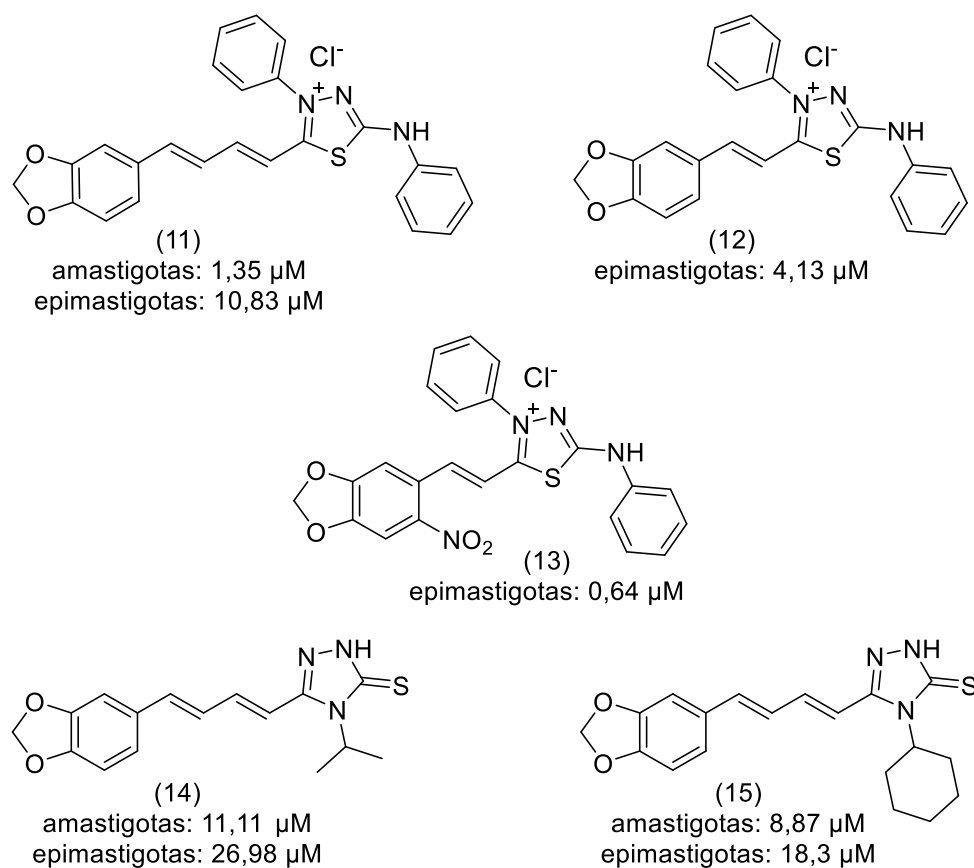


Figura 11. Estruturas químicas e valores de EC₅₀ dos derivados de piperina (11-15) contra as formas amastigota e epimastigota de *T. cruzi* (cepa Y).

1.4.Esterol 14 α -demetilase (14DM)

No trabalho de Franklim e colaboradores (2013), mencionado anteriormente, foi descrito o projeto de uma classe de novos derivados piperínicos baseados na amida natural piperina, em que foi explorado o bioisosterismo da função amida da piperina com anéis azólicos, gerando o núcleo 1,2,4-triazol-3-iona. Esse grupo farmacofórico está presente na estrutura do antifúngico protioconazol, um fármaco comercial disponível para o tratamento de infecções fúngicas, que atua inibindo a enzima CYP51 (esterol 14 α -demetilase), presente em organismos eucarióticos, como fungos e em alguns tripanossomatídeos, como o *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* spp.(CHOI; PODUST; ROUSH, 2014; LEPESHEVA *et al.*, 2008). Os azóis dessa classe são conhecidos como inibidores da enzima que atua diretamente na biossíntese do ergosterol, um lipídio diretamente relacionado à manutenção estrutural das membranas do parasito. O bloqueio da ação dessa enzima impede a síntese de precursores essenciais, levando ao acúmulo de lipídios tóxicos na membrana celular do parasito, comprometendo sua integridade e impedindo a formação do ergosterol, esteroide fundamental para as características físicas da membrana celular do parasito. Por esse motivo, a etapa de biossíntese do ergosterol é considerada um alvo bioquímico de grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos contendo porções azólicas para a DC. (FRANKLIM *et al.*, 2013; KUMARI *et al.*, 2020; SOEIRO *et al.*, 2013; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015; URBINA, 2009).

Diversos inibidores azólicos que exibem elevada potência *in vitro* demonstram ineficácia em modelos *in vivo* devido à capacidade adaptativa dos tripanossomatídeos, como *Leishmania* spp., de captar colesterol do hospedeiro e incorporá-lo à própria membrana, compensando a inibição da via endógena de biossíntese de ergosterol. Estudos mostram que o bloqueio da biossíntese de esteróis por azóis, como cetoconazol e miconazol, estimula significativamente a endocitose de LDL, permitindo que o colesterol exógeno substitua parcialmente o ergosterol e mantenha a integridade de membrana e a viabilidade celular, que pode ser observado em espécies de *Leishmania* spp., *T. cruzi* e *T. brucei* (ANDRADE-NETO *et al.*, 2022; COPPENS; COURTOY, 1995; DUMOULIN *et al.*, 2022). Em contraste, quando o colesterol exógeno é removido, observa-se um aumento expressivo da sensibilidade parasitária aos azóis (redução da EC₅₀ de cetoconazol de 4,7 para 1,5 μ M). Assim, a disponibilidade de colesterol do hospedeiro atua como fator protetor que explica a discrepância entre a alta atividade *in vitro* e a baixa eficácia *in vivo*, o que é corroborado por estudos onde a inibição da captação de colesterol

(como com ezetimibe) potencializa a ação dos azóis e restaura a eficácia terapêutica (ANDRADE-NETO *et al.*, 2011, 2022; DE CICCIO *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2013; SCALESE *et al.*, 2024)

Embora os derivados piperínicos contendo núcleos azólicos, como as 1,2,4-triazol-3-onas descritas por Franklim e colaboradores (2013), representem uma estratégia promissora ao explorarem o alvo enzimático CYP51 e interferirem na biossíntese do ergosterol, a eficácia terapêutica desses compostos *in vivo* pode ser severamente limitada pela capacidade dos tripanossomatídeos de compensar o bloqueio da via endógena por meio da captação e incorporação de colesterol exógeno proveniente do hospedeiro. Esse mecanismo adaptativo permite que o parasito mantenha a integridade de sua membrana celular, reduzindo o impacto letal dos inibidores azólicos observados *in vitro*. Assim, o sucesso futuro no desenvolvimento de agentes tripanocidas baseados em anéis azólicos dependerá não apenas da otimização estrutural para interação com a CYP51, mas também da consideração de abordagens combinatórias que impeçam o acesso do parasito ao colesterol do hospedeiro, potencializando a ação dessas moléculas em condições fisiológicas mais complexas.

1.5. Nitroimidazóis

Embora os fármacos nitroheterocíclicos utilizados no tratamento de doenças parasitárias apresentem limitações notáveis — especialmente relacionadas à citotoxicidade e à tolerabilidade —, eles continuam sendo parte essencial do atual conjunto de ferramentas antiparasitárias. Apesar de sua eficácia limitada na fase crônica da DC, o benznidazol continua sendo o tratamento preferencial, apresentando eficácia razoável na fase aguda e em crianças. No entanto, sua toxicidade sistêmica significativa enfatiza a necessidade de otimizar os regimes de dosagem, explorar terapias combinadas ou desenvolver novas aplicações e modificações moleculares com base nos fragmentos biologicamente ativos presentes nessas moléculas (IVASIV, ALBERTINI, *et al.*, 2019; PAQUIN, REYES-MORENO, *et al.*, 2021). Por outro lado, o fexinidazol marcou uma nova era ao oferecer um regime oral de 10 dias para tripanossomíase africana humana — tanto gambiense quanto rhodesiense — eliminando a necessidade de punções lombares em muitos casos e reduzindo o risco de efeitos adversos graves normalmente associados

ao melarsoprol ou tratamentos injetáveis (BARBARAS *et al.*, 2008b; SIJM *et al.*, 2019; WHO, 2023b).

Ensaio clínico publicado no The Lancet Global Health demonstraram alta eficácia em pacientes com doença leve a moderada, com apenas efeitos colaterais leves a moderados, como náusea, dor de cabeça, insônia ou tremores, e sem problemas de segurança inesperados (KANDE BETU KUMESU *et al.*, 2022; WHO, 2023b). Portanto, apesar de suas limitações, especialmente os efeitos colaterais do benznidazol, os nitroheterociclos ainda são os únicos medicamentos tripanocidas com eficácia comprovada e opções acessíveis. Por fim, é essencial destacar que a introdução do fexinidazol é um passo vital: menos tóxico, mais prático e com potencial para gerar um impacto significativo, especialmente em áreas remotas e entre crianças vulneráveis.

Os nitroimidazóis são uma classe de moléculas que apresentam em sua estrutura um anel heterociclo de cinco membros, obrigatoriamente, com dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 3, as demais posições são compostas por carbonos sp^2 , apresentando um grupo nitro ligado a posição 2, 4 ou 5. A história dessa classe começa quando o primeiro nitroimidazol foi isolado e caracterizado a partir de uma fonte natural, a azomicina **16** (2-nitroimidazol), um antibiótico natural de *Streptomyces eurocidicus*, na década de 1950, enquanto um grupo de cientistas analisava a atividade desse extrato contra *Trichomonas vaginalis* (COSAR; JULOU, 1959; MULLER, 1999).

A utilização de nitroimidazóis como agentes antiparasitários merece grande atenção, uma vez que o fármaco mais utilizado no tratamento da DC no mundo, o benznidazol, possui, em sua estrutura, o grupo nitroimidazólico, grupo farmacofórico responsável pela atividade antichagásica (MÜLLER KRATZ, GARCIA BOURNISSEN, *et al.*, 2018). Com destaque importante, também para o megazol **17** e para o fexinidazol **3** (ambos 1-metil-5-nitroimidazol), que têm grande potencial antichagásico, e para o metronidazol **18** (2-metil-5-nitroimidazol) para o tratamento de infecções causadas por protozoários como *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia* e infecções bacterianas (BELTRAN-HORTELANO *et al.*, 2020; COSAR; JULOU, 1959; LEITSCH *et al.*, 2012). A porção nitroimidazólica é a principal unidade ativa dos fármacos apresentados na **Figura 12**, caracterizando esse fragmento como uma subunidade fundamental na estrutura desse conjunto.

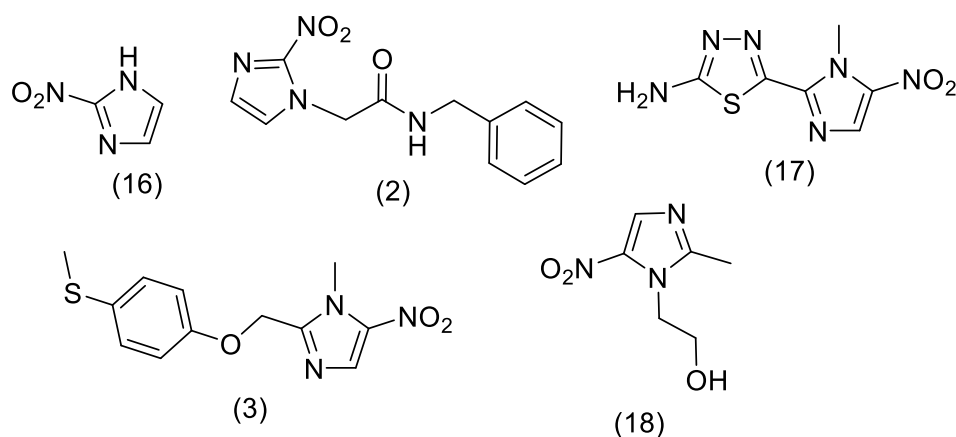


Figura 12. Fármacos que contêm o núcleo nitroimidazol.

Acredita-se que os grupos nitroheterociclos, no geral, atuem principalmente desestabilizando o equilíbrio redox da célula do parasito, devido as sucessivas reduções intracelulares sofridas por esses grupos, por meio da ação das enzimas nitrorredutases (NTRs) (**Figura 13**) (PATTERSON; WYLLIE, 2014a). Enzima presente em tripanossomatídeos que pode desempenhar o papel de "ativador de fármacos", o processo de "ativação" desses nitroheterociclos quando interagem com as NTRs, e pode atuar como pró-fármacos, pois essa enzima catalisa essas nitroreduções intracelulares, que geram várias espécies reativas e tóxicas, e intermediários que geram espécies radiculares que podem causar danos irreversíveis ao DNA do parasito, levando-o a um processo de apoptose (EDWARDS, 1980; HALL; WILKINSON, 2012; PATTERSON; WYLLIE, 2014a; SMITH; EDWARDS, 1995; THOMAS; GWENIN, 2021). O mecanismo de ação do medicamento benznidazol na célula do parasito envolve essas reduções intracelulares transportadas pela NTR do tipo I, gerando intermediários instáveis de alta toxicidade. O principal metabólito da redução do benznidazol é o benznidazol-NH₂ (que tem a mesma estrutura do benznidazol, só que com o grupo nitro reduzido ao grupo amino), identificado no organismo de pacientes chagásicos tratados com benznidazol, que pode causar diretamente danos irreversíveis ao parasito ou ligar-se covalentemente a macromoléculas importantes dentro da célula do parasito (PÉREZ MONTILLA *et al.*, 2023; TROCHINE *et al.*, 2014).

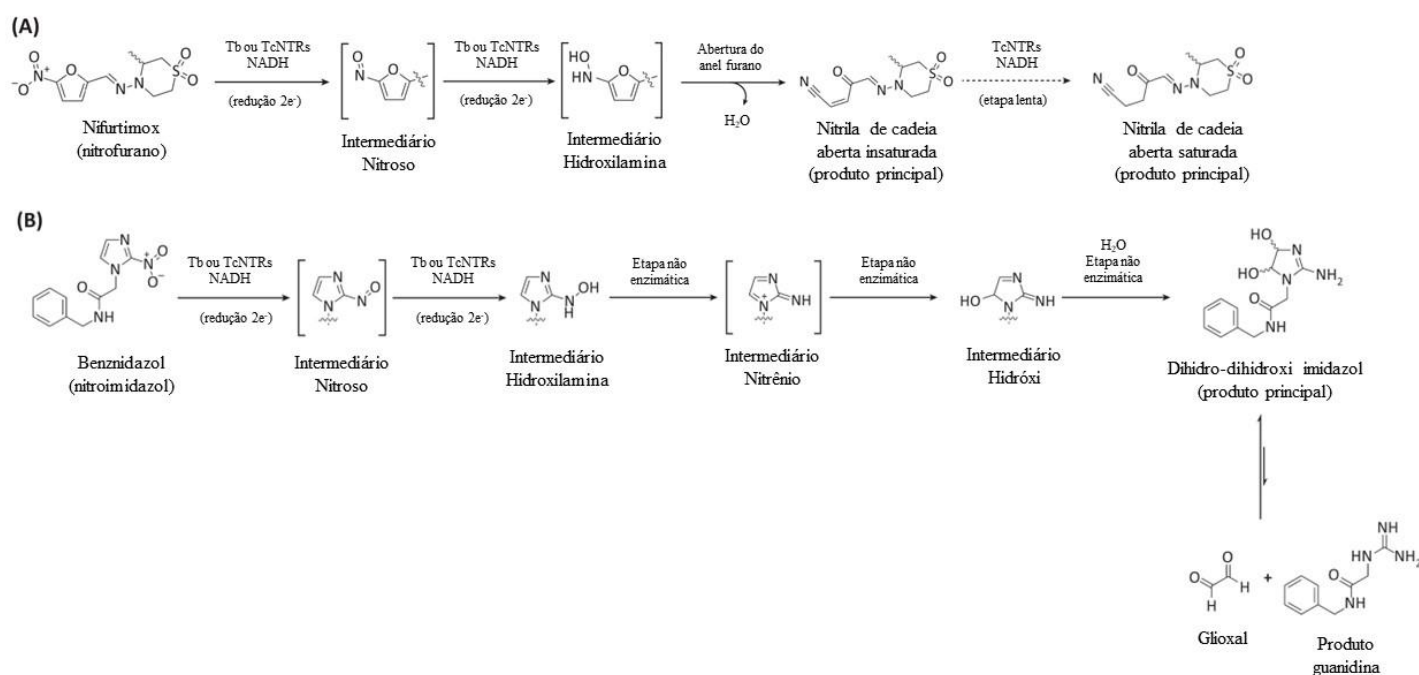


Figura 13. Mecanismo de bioativação de compostos nitroimidazólicos mediada pelas enzimas nitroredutases (NTRs). **(A)** O nifurtimox sofre duas reduções sequenciais catalisadas pela NTRs, seguidas de abertura do anel para produzir um nitrilo tóxico insaturado de cadeia aberta. Tb, *Trypanosoma brucei*; Tc, *Trypanosoma cruzi*; **(B)** O grupo nitro do benznidazol é reduzido à hidroxilamina por ação das NTRs. Posteriormente, uma série de transformações não enzimáticas leva a um produto dihidro-dihidroxi, que pode liberar glicoxal (Traduzido de PATTERSON; WYLLIE, 2014).

Apesar de o benznidazol ser um fármaco consagrado há décadas, seu mecanismo de ação ainda suscita discussão quanto ao efeito tripanocida, pois não está ligado à geração de radicais livres (como o nifurtimox), mas atua reduzindo seus produtos intracelulares e, por meio de ligações covalentes, ligando-se a macromoléculas, causando danos irreversíveis, principalmente ao DNA (TROCHINE *et al.*, 2014). Edwards (1980) discute o efeito tóxico desses intermediários reativos de nitroimidazol sobre o DNA e destaca suas curtas meias-vidas, algumas das quais são indetectáveis, com menos de um segundo em alguns casos. Vale destacar também a formação de adutos entre o nitroimidazol presente nos fármacos e fragmentos de proteínas de baixo peso molecular

disponíveis, gerando metabólitos de difícil eliminação e de alta toxicidade contra o *T. cruzi*, como evidenciado no trabalho de Trochine e colaboradores (2014). Esse processo ilustra claramente um possível mecanismo de ação da toxicidade seletiva do medicamento benznidazol, bem como de outros medicamentos nitroimidazólicos.

A utilização de centros imidazólicos com diferentes posições do grupo nitro é interessante para investigar a relação entre os diferentes potenciais de redução de cada espécie: 2-nitroimidazol (-418 mV), 4-nitroimidazol (-527 mV) e 5-nitroimidazol (-486 mV). Relacionando a atividade contra o parasito e o potencial de redução (aproximado) de cada grupo nitroimidazólico, inicialmente, e avaliar a relevância da posição do grupo nitro no anel imidazol, considerando o ambiente biológico de ação em questão (CHURCH; RABIN; LAISHLEY, 1990; KNOX; KNIGHT; EDWARDS, 1983; MAYA *et al.*, 2003; MORETH *et al.*, 2010; SMITH; EDWARDS, 1995).

1.6.Succinato Desidrogenase (TcSDH)

A succinato desidrogenase (também conhecida como complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, ou succinato:ubiquinona redutase) desempenha um papel fundamental no metabolismo energético, atuando entre o ciclo do ácido cítrico e a cadeia transportadora de elétrons (MORALES *et al.*, 2009). O mecanismo da SDH se baseia na oxidação do succinato a fumarato, etapa que envolve a transferência de um par de elétrons para o cofator flavina adenina dinucleotídeo, seguida da passagem de elétrons até o sítio da ubiquinona (NIHASHI *et al.*, 2016). Em mamíferos, esse processo é mediado por um complexo tetramérico conservado (SDH1–SDH4), enquanto nos tripanossomatídeos, como *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, a enzima apresenta diferenças estruturais relevantes e adaptações metabólicas específicas às condições e à vida parasitária (HARADA *et al.*, 2013). Em *T. cruzi*, a SDH é um complexo mitocondrial expandido, composto por 12 subunidades, incluindo uma subunidade Ip heterodimérica (SDH2N/SDH2C), responsável por uma conformação inédita e um sítio da ubiquinona modificado, que resulta em baixa sensibilidade a inibidores clássicos e alta seletividade para compostos específicos (MORALES *et al.*, 2009; NIIHASHI *et al.*, 2016). Essa enzima é fundamental para a sobrevivência das formas intracelulares de *T. cruzi* (amastigotas), que são altamente dependentes da oxidação de substratos como prolina,

glutamato e succinato; a inibição da SDH reduz consideravelmente a síntese de ATP, debilitando o parasito, podendo levar à morte celular, evidenciando sua essencialidade metabólica (ALENCAR *et al.*, 2025). Em *T. brucei*, observa-se uma modulação na dependência da SDH de acordo com a forma evolutiva e as condições, devido a grande plasticidade de seu metabolismo. Nas formas procíclicas (formas encontradas no inseto vetor) a SDH se mostra plenamente funcional e essencial para o crescimento e sobrevivência, sendo indispensável na etapa da fosforilação oxidativa, já nas formas metacíclicas “bloodstream” a SDH é praticamente inativa, contribuindo em muito pouco para o metabolismo energético, modulando sua função sendo quase que exclusivamente redox, e não mais energética (BESTEIRO *et al.*, 2005).

A validação da TcSDH como um alvo terapêutico para o *T. cruzi* se dá, principalmente, pelas diferenças estruturais marcantes em relação à enzima homóloga de mamíferos, e sua função essencial energética mitocondrial. O trabalho de Nihashi e colaboradores (2016) demonstra que o complexo II de *T. cruzi* e de outros tripanossomatídeos apresentaram baixa sensibilidade aos inibidores clássicos do complexo II de mamíferos (como malonato, Atpenina A5), porém se mostraram suscetíveis a compostos quinônicos, como a siccanina, inicialmente utilizado como fungicida e inibidor seletivo da SDH em tripanossomatídeos com altíssima seletividade em modelo de *L. tarentolae*. O mecanismo de ação desse composto envolve a inibição competitiva e mistra no sítio da ubiquinona, bloqueando o fluxo de elétrons entre o FADH₂ e a ubiquinona, e consequentemente interrompendo a cadeia respiratória. Adicionalmente, é relevante ressaltar que a siccanina inibiu o crescimento *in vivo* de *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania donovani* em concentrações razoáveis, evidenciando atividade antiparasitária de amplo espectro. Com tudo discutido até aqui, esses resultados evidenciam que a TcSDH é um alvo promissor para ser explorado na terapia de *T. cruzi*, bem como de outros tripanossomatídeos, pois se mostra um ponto de vulnerabilidade metabólica em comum a esses parasitos.

1.7. Estratégias de Modificações Estruturais

Sabendo a complexidade de realizar modificações estruturais efetivas na síntese de novos fármacos, estratégias de planejamento molecular, como a hibridização molecular,

dimerização de grupo farmacofórico e o bioisosterismo, se apresentam como ferramentas fundamentais para o químico medicinal. O bioisosterismo é uma estratégia de otimização molecular, baseada na troca de determinados fragmentos moleculares, sem perda de atividade do fármaco, fazendo apenas a modulação de propriedades farmacocinéticas, como o aumento da absorção do fármaco, otimização de sua distribuição no organismo, além de seu metabolismo e eliminação (BARREIRO & FRAGA 2008). O emprego desta abordagem exige um claro entendimento dos parâmetros físico-químicos, eletrônicos e químicos envolvidos na troca bioisostérica planejada; Lima e Barreiro (2005) descrevem os principais fatores a se levar em consideração para se lograr êxito em uma proposta de otimização de fármacos utilizando o bioisosterismo: tamanho e volume molecular; grau de solubilidade dos compostos bioisostéricos; reatividade química dos grupos funcionais ou subunidades bioisostéricas, além de fatores conformacionais.

1.7.1. Hibridação molecular

Sabendo a complexidade de realizar modificações estruturais eficazes na síntese de novos fármacos, estratégias de planejamento molecular, como a hibridação molecular e o bioisosterismo, são ferramentas fundamentais para o químico medicinal na etapa de concepção de uma nova entidade química bioativa.

A hibridação molecular é uma estratégia que se baseia de planejamento racional de fármacos, tendo como objetivo a homologação de fragmentos farmacofóricos (bioativos) de duas ou mais substâncias em uma mesma entidade química. A hibridação pode ser sinérgica (fármaco-fármaco), quando se unem de forma covalentes os fragmentos farmacofóricos de um determinado fármaco, ou até substâncias inteiras, que apresentem a mesma atividade farmacológica por vias distintas; já a hibridação de dupla ação ou simbiótica, consiste na junção de fármacos ou grupos farmacofóricos com atividades biológicas distintas, mas com o intuito de tratar uma mesma enfermidade através de diferentes alvos bioquímicos (ARAÚJO *et al.*, 2015; BARREIRO, E. J.; FRAGA, 2008; CLAUDIO VIEGAS-JUNIOR; ELIEZER J. BARREIRO; CARLOS ALBERTO MANSSOUR FRAGA, 2007). Os resultados quanto à atividade farmacológica, potência e outros fatores relacionados aos novos híbridos gerados, podem ser diversos e até mesmo de difícil previsão, sendo que o aumento da atividade farmacológica, geralmente, é o

resultado desejado de uma hibridação molecular exitosa. A estratégia de hibridação molecular, somada ao conhecimento dos alvos bioquímicos, com os quais se deseja interagir, além do conhecimento do perfil celular do hospedeiro e do parasito, são ferramentas fundamentais no desenvolvimento de fármacos antiparasitários (TYAGI *et al.*, 2013).

1.7.2. Dimerização de grupo farmacofórico

A dimerização de um composto ativo, ou de apenas uma fração de uma unidade estrutural responsável por sua atividade, é uma estratégia de planejamento molecular que geralmente resulta em uma interação aumentada, com propriedades farmacológicas aprimoradas. Essa melhoria na potência é atribuída a uma maior concentração de farmacóforos próximos aos locais de interação molecular no ambiente biológico (PAQUIN; REYES-MORENO; BÉRUBÉ, 2021). Essa estratégia é usada na química medicinal para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas sintéticas, além de ser possível encontrar estruturas diméricas biologicamente ativas na natureza (BERUBE, 2005; VOLOSHCHUK, FARINA). Alguns trabalhos, inclusive, realizam dimerização de produtos naturais, como o exemplo do trabalho de Mott e colaboradores (2013), onde foi realizada a dimerização da artemisinina, que demonstrou eficácia em experimentos *in vivo* contra o *Plasmodium berghei*, utilizando o fármaco de referência Arteméter (fármaco que é utilizado em associação com o fármaco Lumefantrina no tratamento de malária), possivelmente por ter apresentado propriedades físico-químicas aprimoradas. Essa abordagem apresenta resultados interessantes na criação de dímeros com potencial antiparasitário, como no trabalho de Barbaras e colaboradores (2008), no qual foi descrita a atividade promissora de dímeros sintéticos de nostocarbolina contra *Trypanosoma brucei*, *Leishmania donovani*, *T. cruzi* e *Plasmodium falciparum* (**Figura 14**). Assim como desenvolvido no trabalho de Sijm e colaboradores (2019), em que se descretem os dímeros de fenilpirazolona como uma nova classe promissora de compostos com atividade anti-*T. cruzi* (**Figura 14**). No trabalho de Vlahakis e colaboradores (2011), foi avaliada a síntese de dímeros de sais imidazóis, que frente ao *P. falciparum*, foi observado que os compostos que contém dois anéis de imidazóis carregados (mas não anéis de imidazol) apresentaram atividade muito promissora e altíssimas seletividades em modelo de malária murina (**Figura 14**). Neste trabalho, ressalta-se o espaçamento mínimo entre

os anéis imidazóis, o que demanda longas cadeias espaçadoras, de mais de oito átomos de carbono, necessárias tanto para a seletividade quanto para a potência dos compostos. É possível encontrar muitos trabalhos que utilizam essa abordagem também na quimioterapia de alguns tipos de câncer, doenças infecciosas, parasitárias e bacterianas, e do HIV, apresentando resultados muito interessantes e promissores (BERUBE, 2005; CHOW, CHAN, 2009; JEYADEVAN, BRAY, et al., 2004; KERNS, RYBAK, et al., 2003).

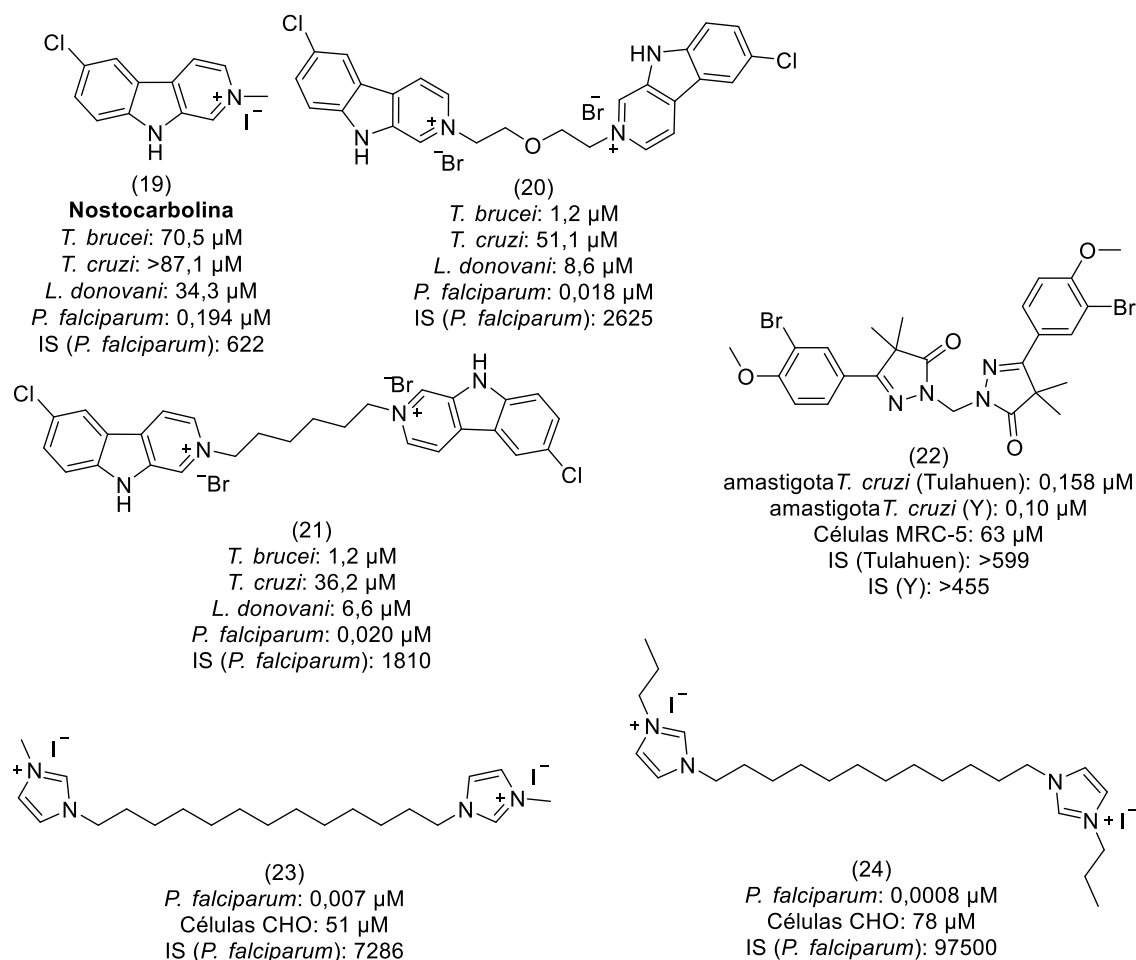


Figura 14. Estruturas químicas de compostos diméricos e seus valores de atividade biológica (19-24).

1.8. Interação com a HSA

A albumina sérica humana (HSA) é a principal e a mais abundante proteína plasmática, desempenhando papel crucial na farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos no organismo. Sendo responsável por armazenar e transportar fármacos (e

outros tipos de substâncias endógenas e exógenas) na corrente sanguínea, atuando diretamente no transporte, absorção, metabolismo, distribuição e excreção de fármacos, influenciando significativamente sua eficácia terapêutica. Além disso, sua relevância decorre do conceito de “fármaco livre”, segundo o qual apenas a fração não ligada à HSA é capaz de atravessar membranas biológicas, alcançar o sítio-alvo e exercer efeito terapêutico; porém, para isso, essa estrutura deve ser carregada pela corrente sanguínea até o sítio onde o fármaco vai atuar. Dessa forma, o estudo da interação entre compostos bioativos e a HSA mostra-se essencial para compreender e prever o comportamento de candidatos a fármacos em um organismo vivo. Uma interação muito forte do fármaco com a albumina é indesejável, pois pode reduzir a concentração da fração do composto livre na corrente sanguínea, limitando a eficácia imediata, enquanto uma ligação moderada é mais favorável e pode, além de prolongar a meia-vida, estabilizar os níveis plasmáticos, influenciando diretamente no regime de concentração e dosagem a ser administrado contribuindo para a segurança terapêutica. Além disso, alterações fisiológicas ou interações medicamentosas desfavoráveis que modifiquem a ligação com a HSA podem causar variações significativas na disponibilidade e na toxicidade dos fármacos. Por isso, a caracterização dessas interações é um passo indispensável no desenvolvimento racional de novos candidatos a fármacos, contribuindo para a otimização de seus perfis farmacocinético e farmacodinâmico, fornecendo a possibilidade de abordagens mais seguras e eficientes, em etapas prévias aos ensaios *in vivo* (THOMAS-BROWN; RUDDOCK; GOSSELL-WILLIAMS, 2023; YAMASAKI *et al.*, 2013; ZHAO, 2025; ZHENG *et al.*, 2024).

2. JUSTIFICATIVAS

A área de desenvolvimento de fármacos na indústria farmacêutica é um campo em pleno crescimento, no qual, ano após ano, os investimentos aumentam, assim como os gastos em propaganda. Porém, essa seara não contempla o desenvolvimento de novas terapias para doenças infecciosas ainda muito prevalentes em locais marginalizados de países em desenvolvimento. Nesse contexto, as doenças parasitárias ocupam lugar de destaque, uma vez que a busca por fármacos antiparasitários não figura entre as vinte principais classes terapêuticas que recebem grandes investimentos das grandes companhias farmacêuticas multinacionais do principal mercado mundial (IQVIA, 2020).

Dessa forma, a pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários é fundamental, uma vez que essas doenças matam e debilitam severamente milhares de pessoas em situação de vulnerabilidade econômica, todos os anos, em países onde essas parasitoses são endêmicas (WHO, 2023a).

As doenças causadas por protozoários tripanossomatídeos afetam vítimas e, até o momento, não contam com tratamentos adequados que garantam o bem-estar e a segurança do paciente durante os longos períodos de tratamento. São consideradas Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), que são doenças que não possuem a atenção devida das indústrias farmacêuticas, além de se apresentarem endêmicas em áreas rurais e em bolsões de pobreza em países em desenvolvimento. Presente majoritariamente no continente Americano, a doença de Chagas (tripanossomíase americana), causada pelo *Trypanosoma cruzi*, afeta mais de 7 milhões de pessoas em todo o mundo, e no ano de 2020 foi responsável pela morte de mais de 4 mil pessoas no Brasil (WHO, 2023a). No continente africano, a doença do sono (Tripanossomíase Humana Africana), causada pelo *Trypanosoma brucei*, é um problema atual, visto a fatalidade desta doença se não tratada no início de seus sintomas, no continente Africano mais de 55 milhões de pessoas vivem expostos em áreas endêmicas em situação de risco real de infecção (WHO, 2023b). Fica evidente o perigo iminente dessas doenças no cenário mundial, o que destaca a necessidade de focar nossos esforços no desenvolvimento de novas formas de tratamentos mais eficientes e menos invasivos e de maior segurança para a população infectada e para os indivíduos que se encontram em áreas endêmicas.

A utilização de produtos naturais, como o exemplo da amida natural piperina como estrutura base para a concepção de novas entidades ativas, com a homologação de grupos farmacofóricos heterocíclicos em sua estrutura como 1,3,4-oxadiazól-2-tiol (DA SILVA FERREIRA, 2014), e mais especificamente o 1,2,4-triazol-3-tiona (FRANKLIM *et al.*, 2013), entre outros que servem de base para o ancoramento de novas unidades ativas numa mesma molécula, gerando um número interessante de possibilidades de modificações estruturais. Além de explorar, com diferentes abordagens de planejamento molecular, a utilização de nitro-heterocícos, mais especificamente os nitroimidazóis, que por muitos anos foi uma classe estigmatizada pelos recorrentes efeitos adversos quando ministrado aos pacientes. Esses grupos farmacofóricos nitroimidazólicos são de fundamental importância nas terapias atualmente utilizadas para o tratamento de diferentes doenças parasitárias, que, apesar da baixa eficácia, são uma das poucas que

ainda conseguem ter êxito em alguma etapa do tratamento. Esse estudo visa trazer a luz um melhor entendimento do seu funcionamento frente aos diferentes parasitos e hospedeiros, em diferentes abordagens, a fim de promover um melhoramento em sua aplicação nas estruturas de novos candidatos a fármacos, ajudando a desmistificar sua aplicação no desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de moléculas com atividade contra doenças infecciosas.

3. OBJETIVOS

Os objetivos principais do trabalho são a síntese de uma série de híbridos piperina-nitroimidazóis, além da síntese de uma série dimérica de derivados diméricos *N*-alquilados de 2-nitroimidazol, ambos com potencial antiparasitário, cuja atividade biológica será avaliada frente a diferentes parasitos e modelos celulares, com o objetivo de validar as abordagens de planejamento molecular escolhidas nesse trabalho.

Dentre os objetivos específicos do **Capítulo 1**, destacam-se:

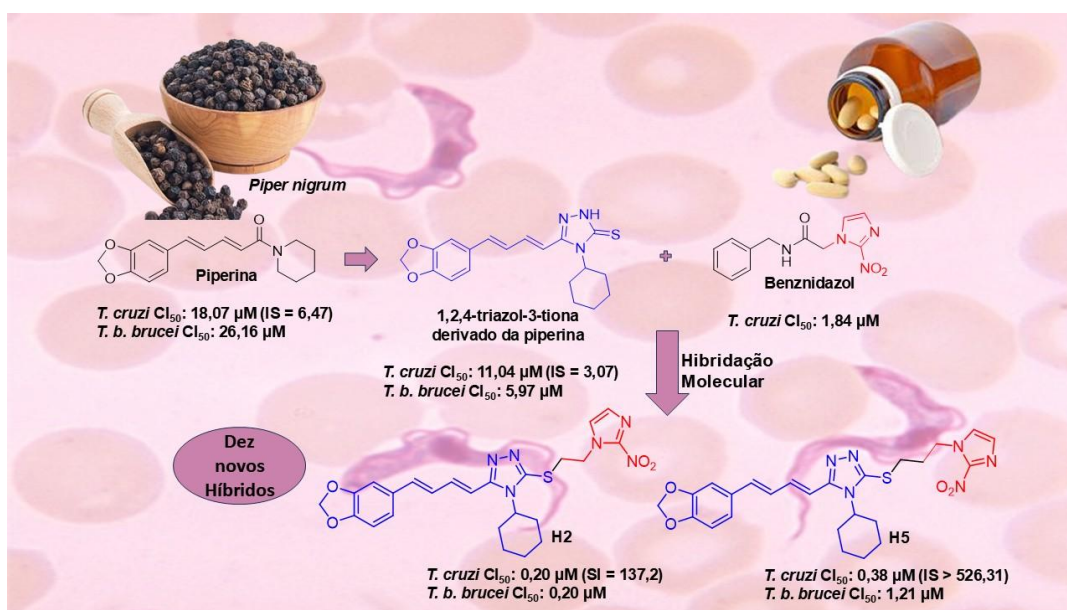
- Sintetizar as moléculas propostas;
- Analisar de pureza (CCD, CG e LC) e a completa caracterização de todos os produtos das respectivas séries planejadas, bem como seus intermediários através das principais técnicas de análise orgânica (FTIR, Cristalografia de Raio X, RMN ¹H, RMN ¹³C e espectrometria de massas) para confirmação de suas respectivas estruturas;
- Realizar a avaliação de seu perfil de atividade antiparasitária contra as formas amastigota e epimastigota do *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4 LacZ);
- Realizar a avaliação de seu perfil de atividade antiparasitária contra o *T. brucei*;
- Realizar a avaliação da citotoxicidade frente a diferentes modelos celulares de células de mamíferos, incluindo células primárias de camundongos;
- Realizar o estudo *in silico* da série híbrida frente à prováveis alvos moleculares presentes em tripanossomatídeos, como a Succinato Desidrogenase (TcSDH) e a esterol 14 α -demetilase (14DM);
- Realizar o estudo de interação do derivado mais ativo da série híbrida com a albumina sérica humana ASH;

Dentre os objetivos específicos do **Capítulo 2**, destacam-se:

- Realizar o planejamento *in silico* da série dimérica frente à enzima Nitroredutase do Tipo 1 (TcNTR), para compreender melhor a bioativação dos grupos farmacofóricos 2-nitroimidazólicos presentes em suas estruturas.
-
- Sintetizar as moléculas propostas;
- Analisar de pureza (CCD e LC) e a completa caracterização de todos os produtos das respectivas séries planejadas, bem como seus intermediários através das principais técnicas de análise orgânica (RMN ^1H , RMN ^{13}C e espectrometria de massas) para confirmação de suas respectivas estruturas;
- Realizar a avaliação de seu perfil de atividade antiparasitária contra as formas amastigota e epimastigota do *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4 LacZ);
- Realizar a avaliação de seu perfil de atividade antiparasitária contra o *T. brucei*;
- Realizar a avaliação da citotoxicidade frente a diferentes modelos celulares de células de mamíferos;

CAPÍTULO 1

Hibridização molecular no projeto e síntese de 1,2,4-triazol-3-tioalquil-nitroimidazóis derivados da piperina natural com um perfil tripanocida melhorado e de amplo espectro



Resumo

Dez novos híbridos derivados de 1,2,4-triazol-3-tiona da amida natural piperina, incorporando núcleos de nitroimidazol encontrados em fármacos clinicamente utilizados no tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos, foram projetados, sintetizados e estruturalmente caracterizados. Até o momento, não há tratamento eficaz para a doença de Chagas, uma doença tropical negligenciada significativa, endêmica principalmente em países em desenvolvimento da América do Sul, e para a tripanossomíase humana africana (HAT), comumente conhecida como doença do sono, prevalente na África, afetando mais de 55 milhões de pessoas em áreas endêmicas. Considerando a necessidade de novos compostos com potencial terapêutico para doenças negligenciadas, este trabalho visa ao desenvolvimento de fármacos com atividade tripanocida de amplo espectro. A aplicação da estratégia de modificação molecular e das metodologias desenvolvidas neste estudo facilitou as etapas sintéticas para a obtenção de dez novas moléculas: híbridos de 1,2,4-triazol-3-tioalquil-nitroimidazol. Esses híbridos exploram diferentes posições do grupo nitro no anel imidazol e apresentam comprimentos

de cadeia alquílica variáveis. Eles demonstraram atividade promissora contra amastigotas e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuen, C2C4 *LacZ*) e tripomastigotas “bloodstream” de *Trypanosoma brucei* (*T. b. brucei* 427), além de apresentarem baixa toxicidade em modelos celulares de mamíferos. O híbrido **H2** apresenta atividade superior à dos fármacos de referência, benznidazol e fexinidazol, para a doença de Chagas e a HAT, respectivamente, com notável seletividade e alta potência (valores de IC₅₀ inferiores de 1,0 µM). Cálculos de docagem molecular foram conduzidos em modelos enzimáticos de TcSDH e de 14DM confirmando teoricamente a capacidade inibitória da nova série de ligantes híbridos.

Palavras-chave: Híbridos semissintéticos; ensaio *in vitro*; *S*-alquilação; doença de Chagas; doença do sono.

1. Planejamento molecular de híbridos piperina-nitroimidazol

Neste capítulo foi aplicada a estratégia de hibridação molecular para a concepção de novas entidades químicas biologicamente ativas. A utilização de derivados piperínicos 1,2,4-triazol-3-*tionas* dá seguimento aos trabalhos de Franklim e colaboradores (2013) e Da Silva Ferreira (2014), onde ficou evidente que a conjugação de grupos farmacofóricos heterocíclicos nitrogenados na estrutura base da amida natural piperina é benéfica para a atividade antiparasitária. O planejamento da série híbrida se baseia estruturalmente e faz o uso do composto 1,2,4-triazol-3-*tiona* derivado da piperina **1** (disponível na quimioteca do LaQuiMed-UFRRJ), que foi escolhido por apresentar o melhor perfil de atividade antiparasitária (dentro de sua série original), homologando a sua estrutura base grupos nitroimidazólicos presentes em fármacos antiparasitários comerciais, a fim de somar seus diferentes perfis de interação no interior da célula do parasito, a fim de potencializar seu perfil de atividade (**Figura 1**).

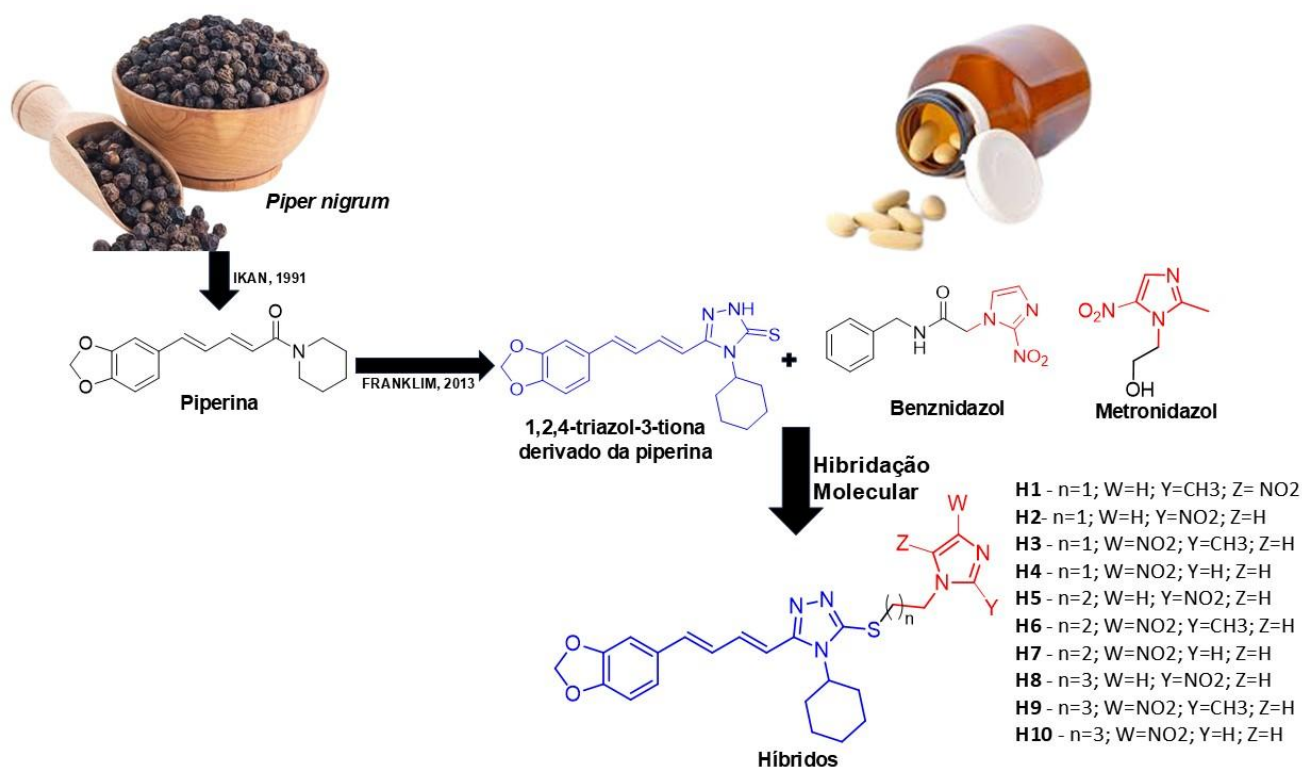


Figura 1. Planejamento dos híbridos piperina-nitroimidazol partindo da amida natural piperina e o grupo farmacofórico do fármaco utilizado como tratamento padrão para doença de chagas, o benznidazol, além do grupo triazol importante conector dessas porções.

A utilização da estratégia de hibridização molecular envolvendo o grupamento azólico, desse derivado da piperina, que é um potencial inibidor da enzima CYP51, que atua bloqueando a biossíntese de lipídeos fundamentais para o funcionamento do parasito pode não ser de grande importância num primeiro momento. Pois tendo conhecimento das limitações da utilização dos inibidores azólicos como principal alvo bioquímico, uma vez que apresentavam resultados excelentes *in vitro* mas sem o mesmo sucesso *in vivo*, e que pode ser explicado devido ao mecanismo adaptativo de compensação dos tripanossomatídeos, que apresentam uma plasticidade metabólica ímpar, que em modelos *in vivo*, ao terem sua via metabólica de síntese de esteróis bloqueada, absorve lipídios exógenos do hospedeiro (comportamento observado em *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* spp.)(ALCANTARA *et al.*, 2025; ANDRADE-NETO *et al.*, 2011; COPPENS; COURTOY, 1995; DE CICCO *et al.*, 2012; DIXON; GINGER; WILLIAMSON, 1972). Exercendo a via de captação de esterol exógeno, o parasito sobrevive, porém fica

extremamente debilitado, com alterações principalmente nas membranas celulares e mitocondriais, gerando um processo de estresse celular, levando o parasito a uma hipersensibilidade. Adicionalmente, autores descreverem a diminuição da virulência em modelos de infecção de camundongos por variações mutantes de *L. major*, que não expressavam a STM (esterol 24-C-metiltransferase, enzima que desempenha um papel muito importante na síntese de esteróis, especialmente o ergosterol) (ANDRADE-NETO *et al.*, 2022; DUMOULIN *et al.*, 2022; MUKHERJEE *et al.*, 2019, 2020; PRADHAN *et al.*, 2025). Trabalhos da literatura mostram que estratégias de terapias combinatórias frente a esses parasitos utilizando azóis em combinações com outros fármacos se mostraram promissores, inclusive *in vivo* em modelos de infecção murinos em fase aguda. Os trabalhos de Cunha e colaboradores (2019, 2022) mostram, em um modelo de infecção *in vivo* em cães, que o tratamento em combinação de benznidazol e itraconazol mostrou reduções de parastemia, inflamação, fibrose e mortalidade na fase aguda e, na fase crônica, redução da carga parasitária e das lesões cardíacas em animais tratados, melhorando assim sua condição clínica e prognóstico. Apesar de não ter ocorrido a cura parasitológica total, esta estratégia mostra-se viável e promissora ao combinar terapia com inibidores azólicos e nitroimidazóis. Com base nos dados até aqui discutidos, a estratégia de hibridação molecular desses azóis com nitroimidazóis de conhecida atividade antiparasitária é interessante e promissora. Esta abordagem resultaria em ataques combinados em mais de uma via metabólica do parasito, reduzindo a possibilidade de reversão de danos em duas vias metabólicas distintas e somando o efeito tóxico dos nitroimidazóis ao estresse metabólico que os azóis gerariam. A possibilidade de incluir mais de um farmacóforo numa única estrutura híbrida, permitiria entregar duas ações frente ao parasito, evitando assim problemas de farmacocinética e de interações medicamentosas, que podem ser fatores limitantes no caso de tratamentos com associação de fármacos, havendo ainda a possibilidade de diminuição de tempo de tratamento, além da diminuição de doses.

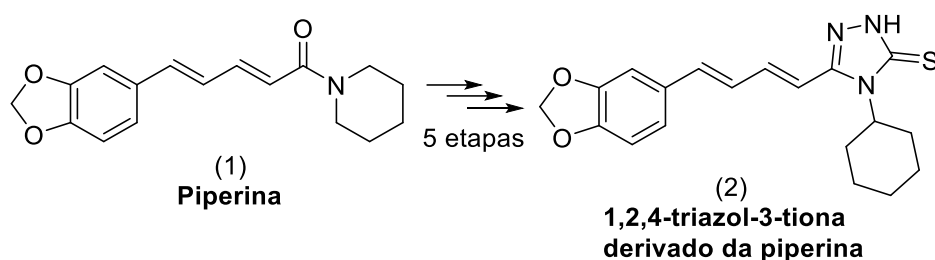
A hibridação envolverá a *S*-alquilação do núcleo 1,2,4-triazol-3-ona com diferentes núcleos nitroimidazólicos adequadamente funcionalizados. Nessa etapa, serão exploradas a interferência da posição do grupo nitro no anel imidazólico e a influência do número de metilenos espaçadores entre essas unidades ativas. A seleção de centros nitroimidazólicos com posições variadas para o grupo nitro busca investigar a relação de seus diferentes potenciais de redução e potencial atividade antiparasitária (CHURCH,

RABIN, et al., 1990; KNOX, KNIGHT, et al., 1983; MAYA, BOLLO, et al., 2003; MORETH, ORNELAS, et al., 2010);. Assim, o objetivo é aumentar o potencial terapêutico desta série de híbridos, permitindo-lhes atingir múltiplas vias bioquímicas contra *T. cruzi* e *T. brucei*, minimizando também a probabilidade de esses parasitas desenvolverem resistência ao tratamento. Entre os principais objetivos deste capítulo estão a síntese e a caracterização estrutural de uma nova série de híbridos e a avaliação dos seus perfis de toxicidade e atividade antiparasitária contra as formas amastigota e epimastigota de *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4 *LacZ*) e tripomastigotas “bloodstream” de *T. brucei* (*T. b. brucei* 427), bem como a realização de ensaios de citotoxicidade em modelos celulares de mamíferos. Adicionalmente, cálculos de *docking* molecular foram realizados em alvos parasitários viáveis para fornecer insights sobre a capacidade inibitória da nova série de híbridos. Por fim, como caracterização farmacocinética preliminar do híbrido antiparasitário mais ativo identificado, sua interação com a albumina sérica humana (HSA, a principal proteína globular responsável pela biodistribuição de compostos endógenos e exógenos na corrente sanguínea humana) foi caracterizada biofisicamente por meio de espectroscopia UV-Vis, dicroísmo circular, estado estacionário e medidas de fluorescência resolvidas no tempo, combinadas com cálculos de encaixe molecular.

A estratégia sintética desenvolvida neste trabalho envolve o acoplamento de grupos farmacofóricos nitroimidazóis, reconhecidos por sua atividade contra diversas infecções parasitárias (PATTERSON; WYLLIE, 2014a), no composto **2**, que contém um derivado 1,2,4-triazol-3-ona (**Figura 1**). Este derivado foi preparado utilizando a metodologia sintética descrita na pesquisa de Franklim, que levou à criação de uma série promissora de derivados biologicamente ativos contra *T. cruzi* a partir da amida natural piperina (**Figura 2**) (ANG *et al.*, 2017a; FRANKLIM *et al.*, 2013).

O acoplamento foi realizado por meio de uma estratégia de hibridização molecular envolvendo reações de *S*-alquilação entre o núcleo 1,2,4-triazol-3-ona e agentes alquilantes contendo porções nitroimidazólicas, empregando uma abordagem S_N2 . Variando as posições do grupo nitro nos anéis imidazólicos e o número de carbonos metilênicos que separam essas porções biologicamente ativas, um perfil de relação estrutura-atividade pode ser estabelecido para esta série de novos híbridos. Portanto, essas novas entidades híbridas podem atuar contra o parasita por meio de múltiplos mecanismos de ação contra *T. cruzi*, simultaneamente, o que impede o desenvolvimento de resistência

do parasita a esta estratégia de tratamento (BAHIA *et al.*, 2016; CLAUDIO VIEGAS-JUNIOR; ELIEZER J. BARREIRO; CARLOS ALBERTO MANSSOUR FRAGA, 2007).



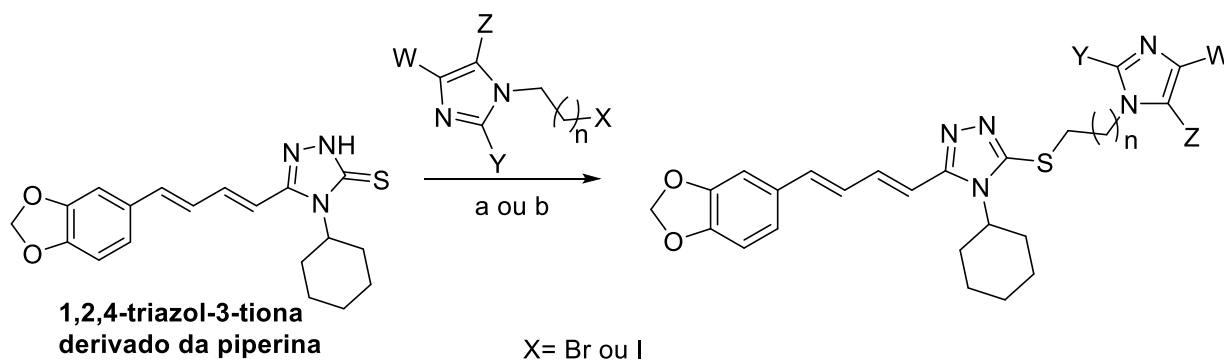
Condições reacionais: (a) KOH etanólico, refluxo; HCl até pH 3,0 (80%); (b) (COCl)₂, 30 min; (c) NH₂NH₂.H₂O, CH₂Cl₂, 0°C até t.a. (71%); (d) Isotiocianato de ciclohexila, etanol, MO, 30 min (91%); (e) NaOH aquoso, MO, 30 min.; então acidificação com HCl aquoso até pH 3,0 (91%).

Figura 2. Esquema de síntese do derivado piperínico 1,2,4-triazol-3-tiona **2** usando a metodologia desenvolvida por Franklim (2013)(FRANKLIM *et al.*, 2013).

Como representado na **Figura 2**, a hidrólise básica da amida natural foi realizada com uma solução etanólica de KOH à temperatura ambiente, seguida da preparação subsequente da fração de hidrazina a partir do ácido pipérico, utilizando o respectivo cloreto de ácido como intermediário. A preparação do cloreto de acila ocorre por meio da reação do ácido piperico com o cloreto de oxalila, a temperatura ambiente e sem solvente. É necessário ativar a carboxila do ácido, pois ele não possui eletrofilicidade suficiente para sofrer ataque nucleofílico por um átomo de nitrogênio da hidrazina. Nesta etapa, Franklim (2013) descreve a adição inversa de uma solução de cloreto de acila em DCM anidro sobre um excesso (10-20x) de hidrazina monohidratada. Este procedimento é vital devido ao risco de formação de um dímero, resultante da reação de cada átomo de nitrogênio da mesma molécula de hidrazina com duas moléculas de cloreto de acila. A hidrazida reage então com o isotiocianato de ciclohexila em meio básico, gerando o intermediário acíclico, que, sob refluxo de micro-ondas, sofre ciclização em meio básico. Todas estas etapas estão detalhadas no trabalho publicado por Franklim e colaboradores (2013) (FRANKLIM *et al.*, 2013).

A etapa planejada de *S*-alquilação baseou-se em adaptações das metodologias descritas por El-Emam e colaboradores (2014) (EL-EMAM, AL-ABDULLAH, et al., 2014) e por El-Ashry e colaboradores (2006) (EL ASHRY, KASSEM, et al., 2006), ambas empregando um solvente polar e um meio básico. Observou-se que, nas condições de

reação empregadas, a S-alkilação é o processo predominante em ambas as metodologias, tanto com brometos de alquila quanto com iodetos de alquila (**Figura 3**).



- H1** - $n=1$; $W=H$; $Y=CH_3$; $Z=NO_2$
H2 - $n=1$; $W=H$; $Y=NO_2$; $Z=H$
H3 - $n=1$; $W=NO_2$; $Y=CH_3$; $Z=H$
H4 - $n=1$; $W=NO_2$; $Y=H$; $Z=H$
H5 - $n=2$; $W=H$; $Y=NO_2$; $Z=H$
H6 - $n=2$; $W=NO_2$; $Y=CH_3$; $Z=H$
H7 - $n=2$; $W=NO_2$; $Y=H$; $Z=H$
H8 - $n=3$; $W=H$; $Y=NO_2$; $Z=H$
H9 - $n=3$; $W=NO_2$; $Y=CH_3$; $Z=H$
H10 - $n=3$; $W=NO_2$; $Y=H$; $Z=H$

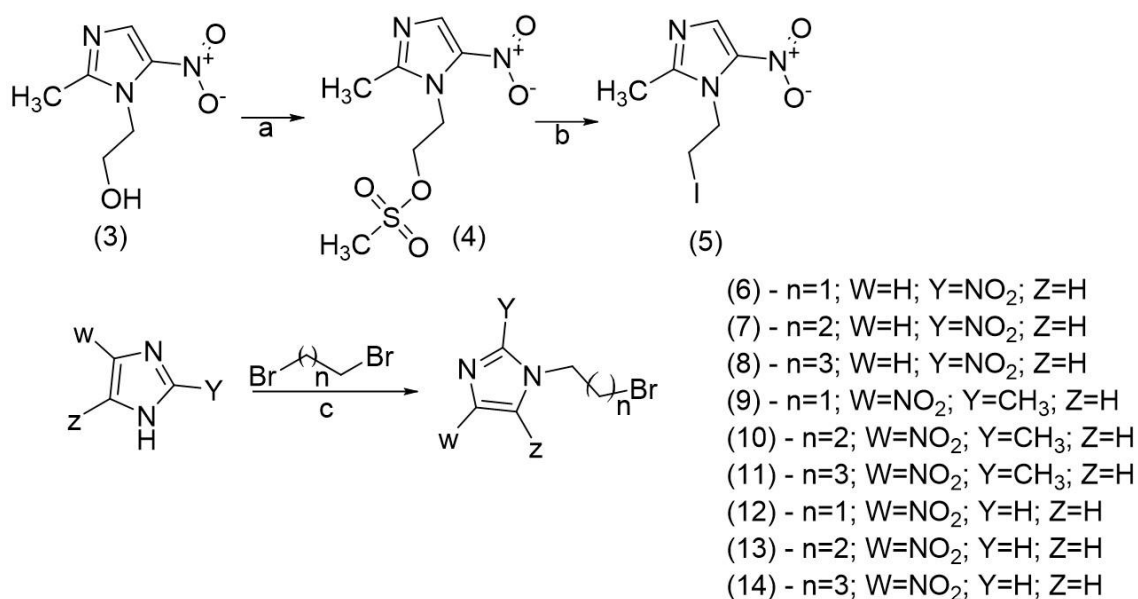
Condições reacionais: (a) DMF, K_2CO_3 , agente alquilante ($X=I$), 24 h, t.a., (63%); (b) etanol, TEA, agente alquilante ($X=Br$), 6 h, refluxo, (30-55%).

Figura 3. Metodologia de síntese dos híbridos **H1-H10**.

2. Preparação dos alquilantes nitroimidazólicos 5-14

Os intermediários **5-14** foram projetados de modo que houvesse uma ancoragem prática do grupo nitroimidazol ao enxofre do anel 1,2,4-triazol-3-tiona, na etapa subsequente, por meio de uma S-alkilação (S_N2), variando entre 2 e 4 carbonos do tamanho da cadeia de metileno que separa esses grupos farmacofóricos. Os grupos nitroimidazólicos usados para preparar os agentes alquilantes **5-14** foram obtidos a partir de 2-nitro-1H-imidazol, 4-nitro-1H-imidazol e 2-metil-4(5)-nitro-1H-imidazol, sendo N-alkilados por meio de uma metodologia S_N2 simples, utilizando agentes alquilantes bidentados (dibromoalcanos) de diferentes tamanhos de cadeia metilênica (**Figura 4**). Para preparar o agente alquilante **5**, o único alquilante 5-nitroimidazólico, o metronidazol foi usado como material de partida, preservando a posição do grupo nitro na posição 5 e a metila na posição 2 do anel imidazólico (**Figura 4**). Todos os agentes alquilantes

nitroimidazólicos foram purificados por cromatografia em coluna e tiveram suas estruturas confirmadas por meio de IV, RMN ^1H e ^{13}C além de EM.



Condições reacionais: (a) AcOEt, TEA, CH₃SO₂Cl, 2h (66%); (b) DMF, KI, 65°C, 4h (53%); (c) (a) DMF, TEA, dibromoalcanos adequados, 6h (45-60%).

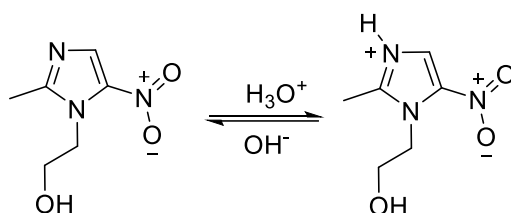
Figura 4. Metodologia de preparação dos agentes alquilantes nitroimidazólicos 5-14.

2.1. Preparação do alquilante 5-nitroimidazólico, a partir do metronidazol

2.1.1. Obtenção do metronidazol (3)

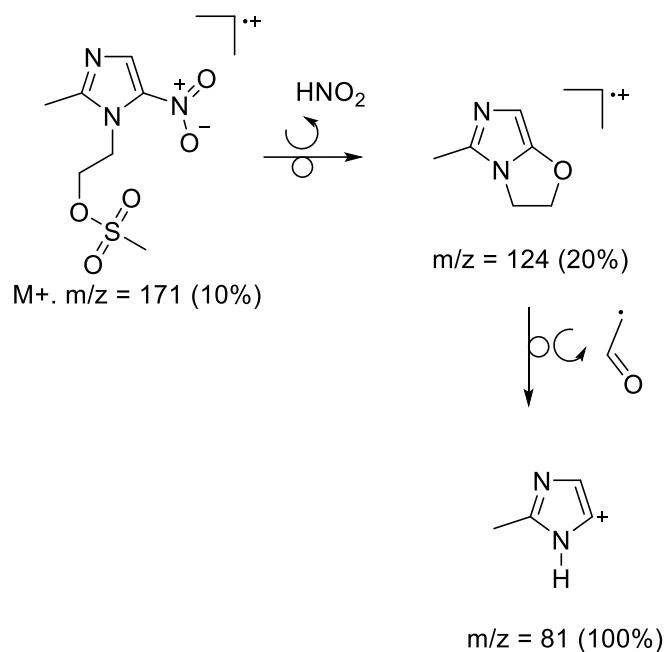
O núcleo 2-metil-5-nitroimidazol de interesse para a realização de algumas etapas de alquilação planejadas neste trabalho, está presente no metronidazol **3** (fármaco comercial utilizado no tratamento antiparasitário e antibacteriano). Este princípio ativo pode ser obtido em quantidades adequadas por meio de sua extração do medicamento Flagyl®, comercializado em comprimidos. Para o isolamento do metronidazol, foi explorada a basicidade do nitrogênio terciário N-3, presente no núcleo imidazólico, que apresenta um par de elétrons disponível para atacar um íon hidrônio. Apesar de, em meio aquoso, ser uma base fraca (pK 2,7) (ALSTON; ABELES, 1987), os autores descrevem a ocorrência da forma protonada do derivado heterocíclico em soluções aquosas de ácidos minerais, além de que ele pode agir como doador de elétrons na formação de compostos de coordenação (CHEN, 2016). Desta forma, foi conduzido um processo de extração

ácido-base para o isolamento do metronidazol, o que permitiu sua obtenção em grau de pureza adequado (**Esquema 1**). Os comprimidos pulverizados do medicamento foram suspensos em solução ácida, o que resultou na dissolução do princípio ativo. Após filtração e neutralização do meio com solução aquosa de NaHCO₃, o metronidazol foi obtido em grau de pureza adequado, sendo então caracterizado através dos métodos convencionais de análise.



Esquema 1. Protonação do nitrogênio *N*-3 e comportamento ácido-base do núcleo imidazólico do metronidazol **3**.

Para o metronidazol isolado, foi determinado seu ponto de fusão, que se mostrou bastante semelhante ao descrito na literatura PF: 162–163 °C (Lit.: 160 °C, (PUBCHEM, [S.d.])). Por meio do espectro de infravermelho (**Figura S6** no material em anexo), pode-se confirmar a presença de uma hidroxila, que apresenta uma banda de baixa intensidade e de alta frequência, 3213 cm⁻¹. Esta absorção refere-se à deformação axial da ligação O-H, em ligação hidrogênio intramolecular com o grupo nitro do anel imidazólico (SILVERSTEIN *et al.*, 1994). A absorção na região de 3099 cm⁻¹, observada no espectro de IV, é referente à deformação axial da ligação C-H do anel imidazólico; e aquela em 1458 cm⁻¹, foi atribuída à deformação angular da ligação C-H de CH₂. No espectro de massas (**Figura S10** no material em anexo) encontram-se fragmentos, como o íon molecular *m/z* = 171 (M⁺, 10%), além do fragmento *m/z* = 124 (20%) e do pico base *m/z* = 81 (100%), que ajudaram a confirmar a estrutura do metronidazol **3**. O **Esquema 2** apresenta uma proposta de formação de alguns dos principais fragmentos observados no espectro de massas do metronidazol.



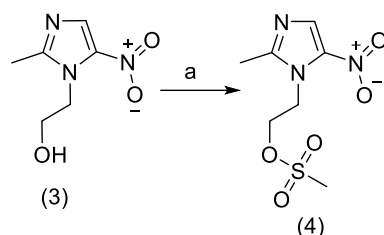
Esquema 2. Proposta de fragmentação do metronidazol **3**.

No espectro de RMN ^1H (**Figura S7** no material em anexo), notou-se um simpleto largo em δ 8,03 ppm, indicativo do hidrogênio do anel imidazólico, além de um tripleto em δ 5,0 ppm ($J = 5,4$ Hz), com integração de 1 hidrogênio, característico da função hidroxila, vizinha a um grupo CH_2 . No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S8** do material em anexo), observou-se um sinal em δ 152,4 ppm, indicando a absorção do carbono do anel imidazólico, ligado ao grupo nitro. Adicionalmente, observa-se outro sinal em δ 60,2 ppm, indicativo da absorção do metileno carbinólico.

2.1.2. Preparação do metanossulfonato de 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il) etila (**4**)

Uma vez obtidas quantidades adequadas de metronidazol (2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etanol) e determinado o seu grau de pureza, a próxima etapa deste trabalho consistiu na transformação da hidroxila primária, presente na cadeia ligada ao N-1 do núcleo imidazólico, num bom grupo abandonador, de modo a tornar o metronidazol numa espécie eletrofílica, adequada à reação de *S*-alquilação. Crossland e Servis (1970) descreveram a preparação do metanossulfonato derivado do metronidazol por meio do tratamento do álcool com cloreto de metanossulfonila em DCM, em presença de trietilamina. Foi decidida a preparação deste metanossulfonato, visto que é um

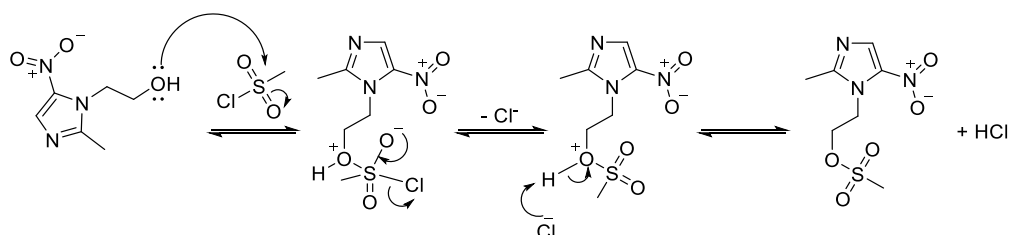
intermediário interessante, que poderia ser diretamente avaliado na etapa de *S*-alquilação, além de possuir a versatilidade necessária para ser explorado na preparação de outros intermediários e agentes alquilantes (**Esquema 3**).



Condições reacionais: (a) AcOEt, TEA, CH₃SO₂Cl, t.a. por 4h (66%).

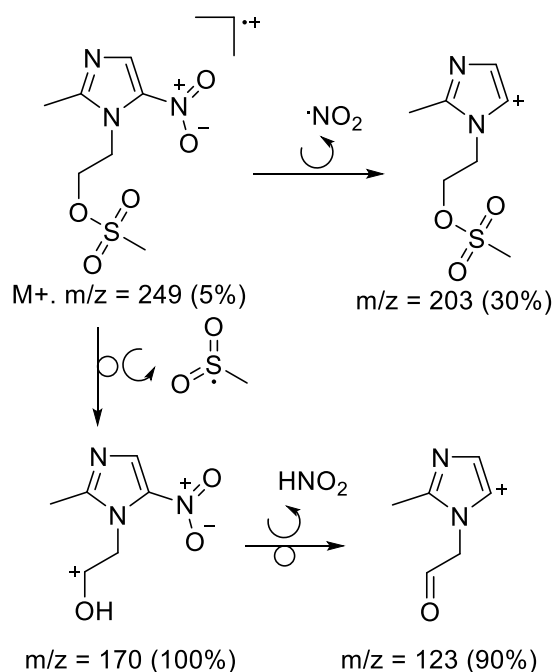
Esquema 3. Preparação do metanossulfonato **4**, derivado do metronidazol **3**.

A reação se procedeu conforme descrito por Crossland e Servis, porém, demandou um tempo de reação maior, passando dos 15 minutos descritos pelos autores para 2 horas. O solvente de escolha para essa reação foi o acetato de etila, no qual o metronidazol mostrou maior solubilidade, apresentando rendimentos superiores na reação em sua forma anidra; uma vez que a água residual presente no meio irá interferir no andamento reacional, hidrolisando o éster metanossulfonato formado, gerando novamente o metronidazol e o ácido metanossulfônico. A trietilamina, no meio reacional, atua como base de Lewis, neutralizando o HCl formado no processo (**Esquema 4**). Após o ataque dos elétrons livres do oxigênio da hidroxila alcoólica ao átomo de enxofre do cloreto de mesila, ocorrerá a liberação de HCl em solução, que rapidamente reagirá com a trietilamina presente, gerando o cloreto de trietilamínio, que se apresenta como sólido branco e insolúvel no meio reacional. Após o término da reação, o isolamento do metanossulfonato **4** foi realizado conforme a metodologia proposta por Crossland e Servis, resultando em produto desejado com grau de pureza adequado e rendimento isolado de 66%, em média.



Esquema 4. Mecanismo proposto para a obtenção do éster metanossulfonato **4**, derivado do metronidazol **3**.

O mesilato **4** teve seu ponto de fusão determinado e também foi caracterizado pelos métodos convencionais de análise (RMN ^1H e ^{13}C , EM e IV). O éster metanossulfonato **4**, derivado do metronidazol, se apresentou como um sólido amorfo branco levemente azulado, com ponto de fusão entre 163-165 °C. Através do espectro de infravermelho (**Figura S11** no material em anexo) pode ser confirmada a presença da ligação S=O devido a absorção em 1326 cm^{-1} , referente a deformação axial assimétrica do grupo S(=O)_2 . Além de ser possível também confirmar, pela ausência da absorção em $3200\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$, que houve a interconversão de grupos funcionais, com o desaparecimento da ligação O-H presente no metronidazol. No espectro de massas (**Figura S14** no material em anexo) encontram-se fragmentos como o íon molecular $m/z = 249$ (M^+ , 5%), além dos $m/z = 203$ (30%), pico base em 170 (100%) e 123 (90%), que ajudaram a confirmar a estrutura do éster metanossulfonato, derivado do metronidazol. O **Esquema 5** apresenta uma proposta de fragmentação de alguns dos principais picos detectados no EM do produto sintetizado.



Esquema 5. Proposta de fragmentação do derivado metanossulfonato **4**.

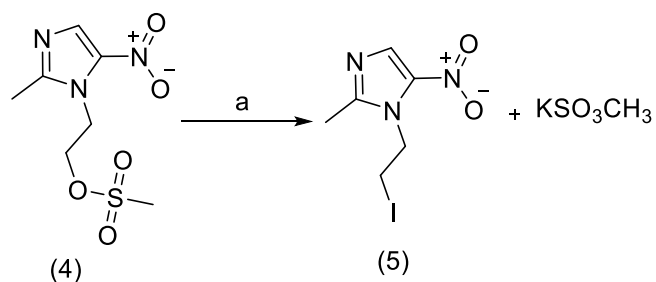
No espectro de RMN ^1H (**Figura S12** do material em anexo), observou-se a ocorrência de um simpleto, com integração de 3 hidrogênios em $\delta 2,47\text{ ppm}$, característico da metila ligada ao anel imidazólico. Adicionalmente, observou-se o aparecimento de um simpleto, com integração também para 3 hidrogênios, em campo mais baixo ($\delta 3,16\text{ ppm}$),

característico da metila ligada ao átomo de enxofre do grupo mesilato. Foi possível observar, ainda, o desaparecimento do tripleto referente ao Hidrogênio da hidroxila da função álcool, presente no metronidazol. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S13** no material em anexo), observou-se um sinal em δ 37,18 ppm, característico do carbono de metila ligado ao átomo de enxofre, além do sinal da metila ligada ao anel imidazólico, em δ 14,49 ppm.

O metanossulfonato **4**, uma vez obtido, foi diretamente utilizado como agente alquilante na reação de preparação do híbrido **1**, por meio da reação do ânion gerado a partir do 1,2,4-triazolo-3-tiona **2**, em meio básico. Contudo, a reação se apresentou lenta, gerando uma mistura de produtos e restando uma grande quantidade do produto de partida. A tentativa de preparar um iodeto in situ, por meio da adição de iodeto de potássio ao meio reacional (SAADEH et al., 2010), também não logrou êxito, gerando uma mistura de produtos, como constatado ao acompanhar a reação por CCD. Devido aos resultados negativos obtidos, optamos pela preparação prévia de um iodeto de alquila **5** a partir do mesilato **4**, para, em seguida, utilizá-lo na reação de *S*-alquilação.

2.1.3. Preparação do 1- (2-iodo etil) -2-metil-5-nitro-1H-imidazol (**5**)

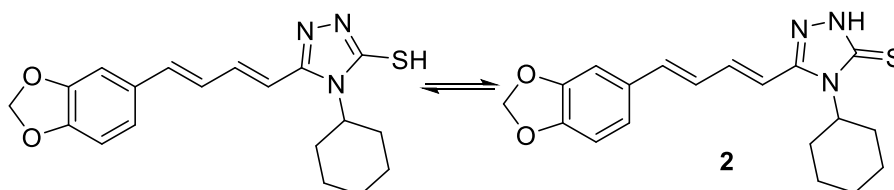
A fim de aperfeiçoar a etapa de alquilação, optou-se por preparar um iodeto a partir do metanossulfonato do metronidazol, seguindo a metodologia descrita por Busatti e colaboradores (2007). O iodeto se apresenta como um grupo abandonador melhor, quando comparado ao metanossulfonato, favorecendo a reação de $\text{S}_{\text{N}}2$; além de ser mais polarizável, comportando melhor os elétrons da ligação C-I, deixando o carbono com carga parcial positiva, e mais suscetível ao ataque nucleofílico do átomo de enxofre do que do átomo de nitrogênio-2. Uma vez que o núcleo 1,2,4-triazol-3-tiona pode se comportar como um nucleófilo bidentado, devido às suas formas tautoméricas (**Esquema 7**), porém, apresenta como mais estável a conformação com a tiona ($\text{C}=\text{S}$) em sua estrutura (SAYED, ASHRY, et al., 2017), possibilitando que o ataque nucleofílico ocorra por meio do enxofre e/ou do nitrogênio (SAADEH *et al.*, 2010). Assim, as características dos grupos de saída desses eletrófilos influenciarão diretamente a regioseletividade da alquilação.



Condições reacionais: (a) DMF, KI, 65°C em 4h (53%).

Esquema 6. Reação da obtenção do iodeto derivado do metronidazol **5**.

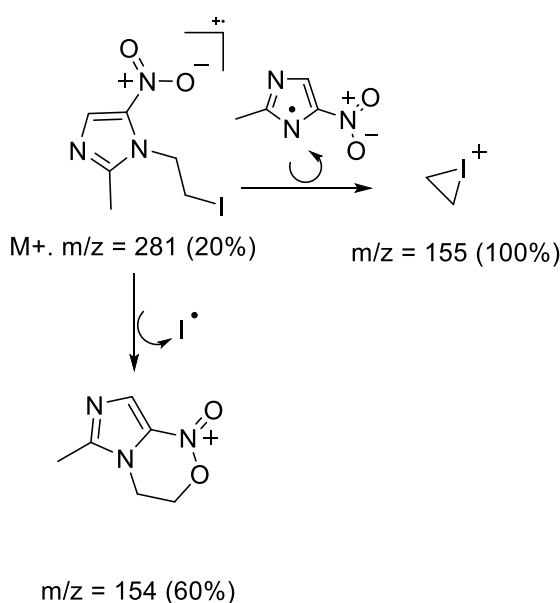
A reação transcorreu conforme a metodologia descrita por Busatti e colaboradores (2007), utilizando *N,N*-dimetilformamida como solvente, o que possibilitou o emprego de um meio reacional de menor volume, garantindo maior interação entre as moléculas, devido à grande solubilidade do metanossulfonato **4** neste solvente. O meio anidro é fundamental nessa reação, uma vez que a água, presente no meio, promoverá a hidrólise do metanossulfonato, gerando o ácido metanossulfônico e o metronidazol. O iodeto de potássio, adicionado ao meio reacional em excesso, promove a troca do grupo metanossulfonato pelo átomo de iodo por meio de uma reação de S_N2, gerando o iodeto **5** (Esquema 6). A reação foi conduzida ao abrigo da luz, uma vez que os iodetos de alquila geralmente são fotossensíveis, gerando intermediários radiculares (KROPP, 1984). O produto foi purificado por filtração em coluna cromatográfica. Após purificação, o produto foi obtido em grau de pureza adequado, com rendimentos compatíveis com os relatados na literatura (BUSATTI *et al.*, 2007).



Esquema 7. Formas tautoméricas do derivado 1,2,4-triazol-3-tiona (**4**) e 1,2,4-triazol-3-tiol (**4a**).

O iodeto **5** teve o seu ponto de fusão determinado, sendo caracterizado através dos métodos convencionais de análise (RMN ¹H e ¹³C, EM e IV). O iodeto, derivado do metronidazol, se apresentou como um sólido amorfo branco, levemente azulado, com

ponto de fusão entre 101 e 104 °C. Por meio do espectro de infravermelho (Figura S16 no material em anexo), pode-se confirmar a presença da ligação C-I, devida à absorção em 555 cm⁻¹, referente à deformação axial da ligação C-I. Observou-se, ainda, a absorção em 1176 cm⁻¹, referente à deformação axial simétrica da ligação C–H do metileno ligado ao iodo. No espectro de massas (**Figura S19** no material em anexo), encontram-se fragmentos, como o íon molecular $m/z = 281$ (M⁺, 20%), além dos picos base $m/z = 155$ (100%) e 154 (60%), que auxiliaram na confirmação da estrutura do iodeto **5**, derivado do metronidazol. O **Esquema 8** apresenta uma proposta de formação de alguns dos principais fragmentos observados no espectro de massas do produto sintetizado.

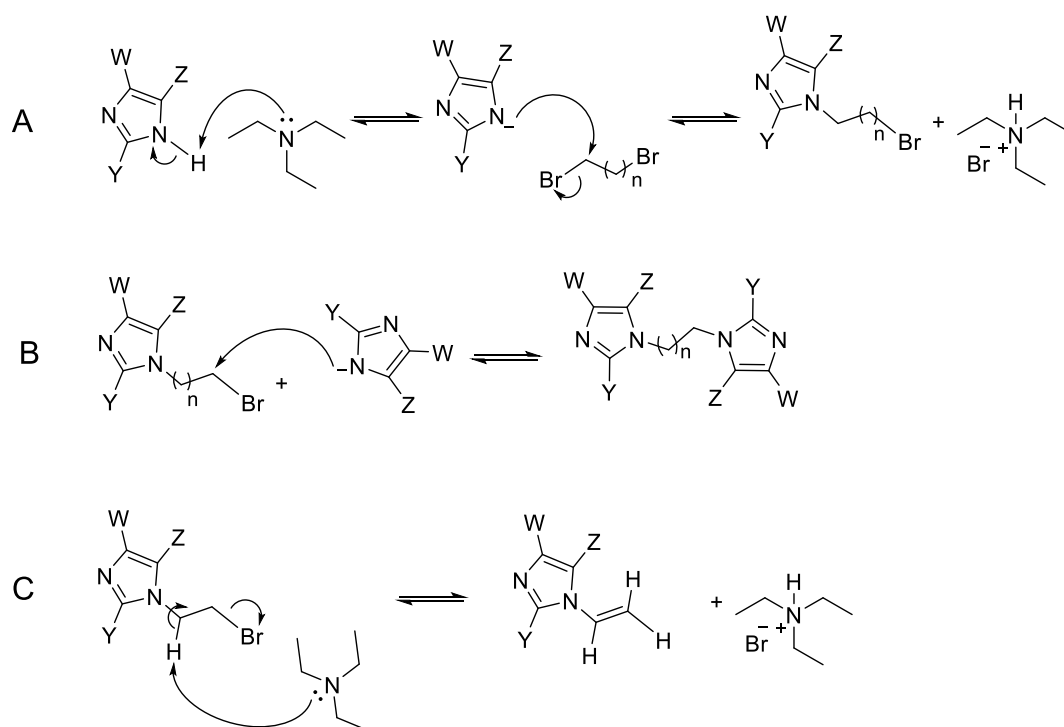


Esquema 8. Proposta de fragmentação para o iodeto do metronidazol **5**.

No espectro de RMN ¹H (**Figura S17** no material em anexo), notou-se a presença de um tripleto, com integração para 2 hidrogênios, centrado em δ 4,6 ppm ($J = 7,0$ Hz), que representa o metileno ligado ao iodo, além de também evidenciar o desaparecimento do simpleto, com integração para 3 hidrogênios, em δ 3,16 ppm, correspondente à metila ligada ao enxofre (presente na estrutura do precursor metanossulfonato). No espectro de RMN ¹³C (**Figura S18** no material em anexo), observou-se um sinal em δ 0,03 ppm, indicando a absorção do CH₂ ligado ao iodo; esse valor em campo alto se explica pelo “efeito do átomo pesado”, que, devido ao tamanho elevado do átomo de iodo, aumenta significativamente a blindagem (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994). Pôde-se também comprovar o desaparecimento do sinal em δ 37,18 ppm, indicando a absorção de CH₃ ligado ao enxofre (presente na estrutura do precursor metanossulfonato).

2.2. Preparação dos alquilantes a partir dos nitroimidazóis comerciais

Na preparação destes alquilantes (**Esquema 9**), utilizaram-se o 2-nitro-1H-imidazol, o 2-metil-4-nitro-1H-imidazol e o 4-nitro-1H-imidazol comerciais como materiais de partida. A reação se procede utilizando a *N,N*-dimetilformamida como solvente, em presença de trietilamina (TEA). A TEA exerce um papel fundamental nesta reação, uma vez que atua como base de Lewis, abstraindo o próton da posição 1 do anel imidazólico e gerando o nucleófilo necessário, que irá realizar uma reação S_N2 sobre os eletrófilos bidentados, 1,2-dibromoetano, 1,3-dibromopropano e 1,4-dibromobutano. Um detalhe reacional que faz grande diferença para o sucesso da reação é que a quantidade equivalente dos alquilantes bidentados deve estar presente no meio reacional em excesso razoável, evitando, assim, a formação, nesta etapa, de produtos indesejáveis, de dímeros, ocasionados pelo ataque nucleofílico em ambos os lados dos *bis*-eletrófilos (**Esquema 9**). Outro fator fundamental nestas reações é a necessidade de realizar controle de temperatura criterioso, a fim de desfavorecer a possibilidade de formação de produtos de eliminação, uma vez que, em altas temperaturas e em meio básico, os produtos alquilados tendem a formar produtos de eliminação E^2 indesejáveis (**Esquema 9c**).



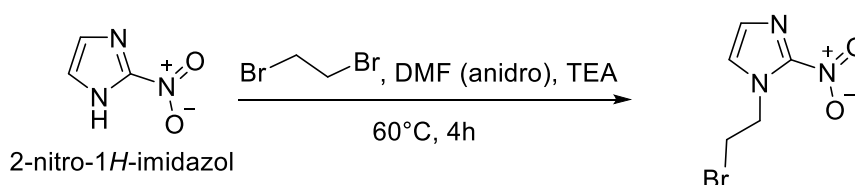
Esquema 9. (A) Mecanismo proposto para a obtenção dos alquilantes **6-15**, derivados do 2-nitroimidazol, 2-metil-4-nitroimidazol e 4-nitroimidazol; (B) formação dos produtos dimerizados; (C) reação de eliminação dos produtos alquilados.

2.2.1. Preparação dos alquilantes derivados 2-nitroimidazólicos

Tendo como objetivo a investigação da influência da posição do grupamento nitro no anel imidazólico sobre a atividade antiparasitária dos híbridos planejados, preparou-se inicialmente uma série de alquilantes que possuísem o grupamento nitro na posição 2 do anel imidazólico, análogos a uma porção da estrutura do fármaco benznidazol. Os alquilantes propostos foram planejados a partir do precursor 2-nitro-1*H*-imidazol (azomicina), variando apenas o número de carbonos espaçadores (sp^3), ligados na posição 1 do anel imidazólico. Os alquilantes **6**, **7** e **8** já são descritos na literatura nos trabalhos de Cheng e colaboradores (2014) e Long e colaboradores (1991) em condições reacionais similares (CHENG *et al.*, 2014; LONG; PARRICK; HODGKISS, 1991)

2.2.1.1. Preparação do 1-(2-bromoetil)-2-nitro-1*H*-imidazol (**6**)

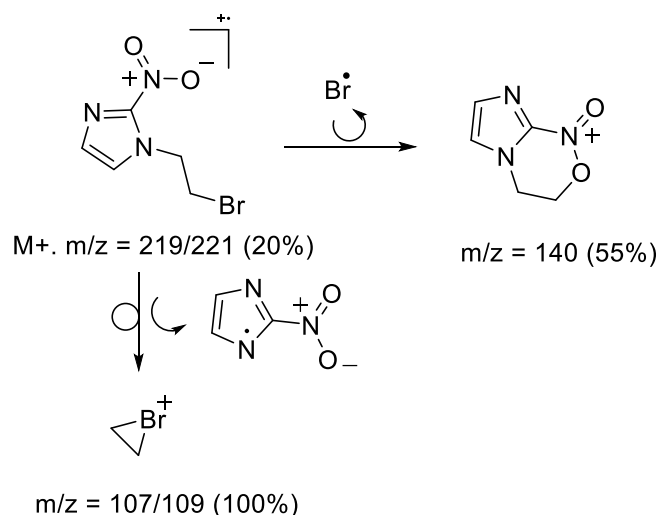
A reação de *N*-alquilação transcorreu por 4 horas, não sendo possível observar o consumo total do reagente de partida (reação acompanhada por CCD), mesmo após a adição de um equivalente adicional de TEA. Com isso, decidiu-se realizar a purificação do produto por filtração em coluna cromatográfica. Após filtração em coluna cromatográfica, o produto foi obtido, com pureza adequada (por CCD), na forma de um sólido amorfo, de coloração amarelo-claro, com rendimento de 50%.



Esquema 10. Reação da obtenção do 1-(2-bromoetil)-2-nitro-1*H*-imidazol **6**.

O alquilante **6** teve o seu ponto de fusão determinado, caracterizado por meio dos métodos convencionais de análise (RMN 1H e ^{13}C , EM). Este haleto se apresentou como um sólido amorfo amarelado, com ponto de fusão entre 68 e 70 °C. Por meio do espectro de infravermelho (Figura S21 no material em anexo), pode-se confirmar a presença da ligação C-Br, por meio da absorção em 646 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C-Br. Observou-se ainda a absorção em 1155 cm^{-1} , referente à deformação axial simétrica da ligação C-H do metileno ligado ao bromo; em 1253 cm^{-1} observa-se a banda de

deformação axial da ligação C-N formada. No espectro de massas (**Figura S24** no material em anexo), o íon molecular foi detectado em $m/z = 220$ (M^+ , 0%), com pico-base em $m/z = 107/109$ (100%), além de um pico em $m/z = 140$ (55%), que auxiliaram na confirmação da estrutura deste alquilante. O **Esquema 11** apresenta uma proposta de formação de alguns dos principais fragmentos observados no espectro de massas do produto sintetizado.



Esquema 11. Proposta de fragmentação para o 1-(2-bromoetil)-2-nitro-1*H*-imidazol **6**.

No espectro de RMN ^1H (**Figura S22** no material em anexo), notou-se a presença de um tripleto, com integração para 2 hidrogênios, centrado em δ 3,78 ppm ($J = 7,0$ Hz), que representa o metileno ligado ao átomo bromo, além da presença de um sinal triplo, com integração para 2 hidrogênios, centrado em δ 4,83 ppm ($J = 7,0$ Hz), que representa o metileno ligado ao nitrogênio do anel imidazólico. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S23** no material em anexo) observou-se um sinal em δ 51,41 ppm, indicando a absorção do CH_2 ligado ao nitrogênio, confirmando a presença da ligação formada. Foi possível isolar o produto de eliminação (**6.1**), indesejado (**Figura 5**). Por se tratar de um subproduto que se forma em quantidades razoáveis nessa reação, ele foi completamente caracterizado e avaliado frente a forma amastigota do *T. cruzi*, apresentando CI_{50} de 4,76 μM , além de haver a possibilidade de ser utilizado como material de partida em reações de Heck (JAGTAP, 2017), esse apêndice do trabalho foi publicado ao longo do andamento do trabalho de tese (VELEZ, AFONSO SANTINE M M *et al.*, 2022).

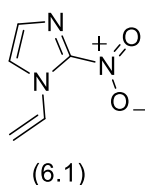
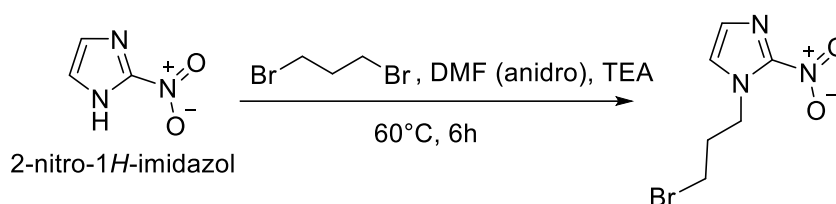


Figura 5. Produto de eliminação **6.1**.

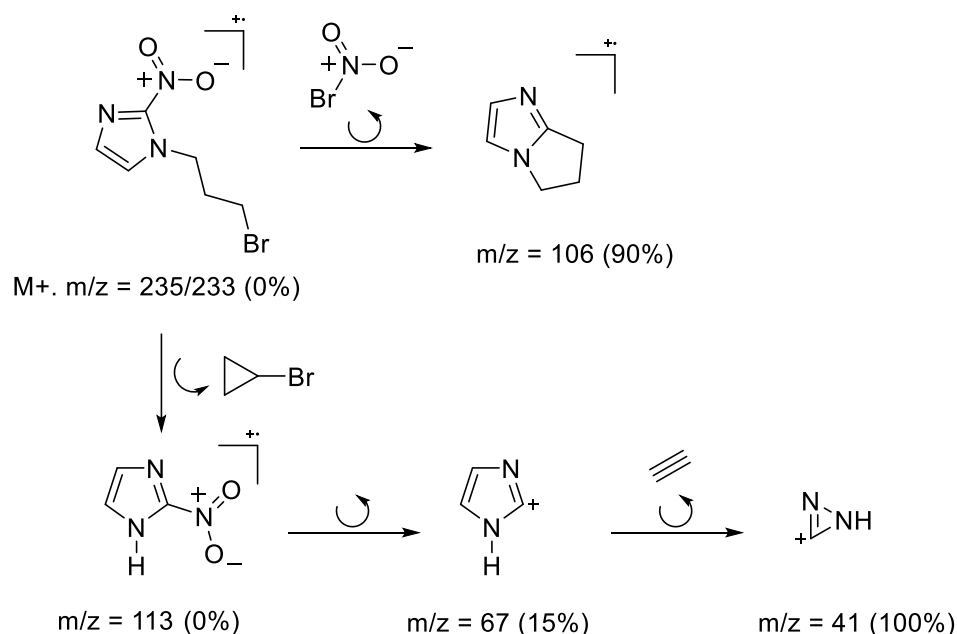
2.2.1.2. Preparação do 1-(3-bromopropil)-2-nitro-1*H*-imidazol (**7**)

A reação durou 24 horas, não sendo possível observar o consumo total do reagente de partida (reação acompanhada por CCD), mesmo após a adição de um equivalente adicional de TEA. Com isso, decidiu-se realizar a purificação do produto por filtração em coluna cromatográfica. Após filtração em coluna cromatográfica, o produto foi obtido, com pureza adequada (por CCD), na forma de um de coloração amarelo-claro em rendimento de 55%.



Esquema 12. Reação da obtenção do 1-(3-bromopropil)-2-nitro-1*H*-imidazol **7**.

O composto **7** teve o seu ponto de fusão determinado, caracterizado por meio dos métodos convencionais de análise (RMN ^1H e ^{13}C , EM). Este alquilante foi obtido como um sólido amorfo amarelado, com ponto de fusão entre 65 e 68 °C. Por meio do espectro de infravermelho (Figura S27 no material em anexo), pode-se confirmar a presença da ligação C-Br, devida à absorção em 648 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C-Br. Observou-se, ainda, em 1253 cm^{-1} , a banda de deformação axial da ligação C-N formada. No espectro de massas (**Figura S30** no material em anexo), o íon molecular não foi detectado, com $m/z = 235/233$ (M^+ , 0%), tendo como pico-base $m/z = 41$ (100%), além do pico em $m/z = 108$ (90%), que auxiliaram na confirmação da estrutura. O **Esquema 13** apresenta uma proposta de formação de alguns dos principais fragmentos observados no espectro de massas do produto sintetizado.

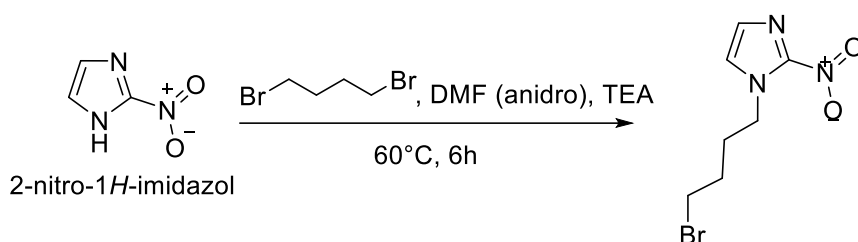


Esquema 13. Proposta de fragmentação do 1-(3-bromopropil)-2-nitro-1*H*-imidazol **7**.

No espectro de RMN ^1H (**Figura S28** no material em anexo), notou-se a presença de um tripleto, com integração para 2 hidrogênios, centrado em δ 3,40 ppm ($J = 7,0$ Hz), que representa o metileno ligado ao bromo, e a presença de um outro tripleto com integração para 2 hidrogênios, centrado em δ 4,64 ppm ($J = 7,0$ Hz), que representa o metileno ligado ao nitrogênio do anel imidazólico, e centrado em δ 2,43 ppm ($J = 7,0$ Hz), um sinal de quinteto com integração para 2 hidrogênios. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S29** do material em anexo), observou-se um sinal em δ 48,20 ppm, referente à absorção do CH_2 ligado ao nitrogênio.

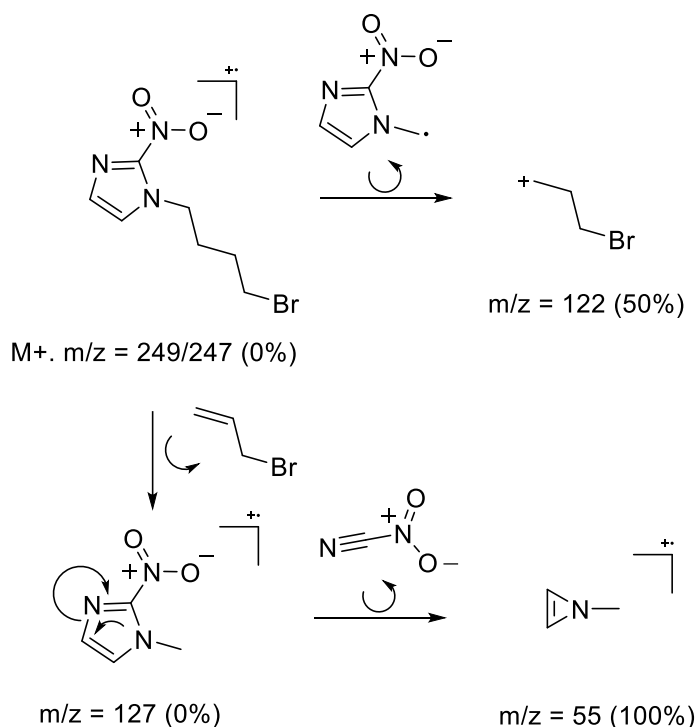
2.2.1.3. Preparação do 1-(4-bromobutil)-2-nitro-1*H*-imidazol (**8**)

A reação de formação de **8** foi conduzida por 6 horas, não sendo possível observar o consumo total do reagente de partida (reação acompanhada por CCD). Com isso, decidiu-se realizar a purificação do produto por filtração em coluna cromatográfica. Após filtração em coluna, o produto foi obtido com pureza adequada (avaliada por CCD), na forma de um óleo de coloração amarelada, com rendimento de 45%.



Esquema 14. Reação para a obtenção do 1-(4-bromobutil)-2-nitro-1*H*-imidazol **8**.

O alquilante **8** apresentou-se como um óleo amarelado e foi caracterizado por meio de métodos convencionais de análise (RMN ¹H e ¹³C, EM). Por meio do espectro de infravermelho (Figura S32 no material em anexo), pode-se confirmar a presença da ligação C-Br, devido à absorção em 649 cm⁻¹, referente à deformação axial da ligação C-Br. Observou-se, ainda, em 1276 cm⁻¹, a banda de deformação axial da ligação C-N formada. No espectro de massas (**Figura S35** no material em anexo), o íon molecular não foi detectado, com $m/z = 247/249$ (M⁺, 0%), tendo como pico-base o sinal a $m/z = 55$ (100%), além do fragmento a $m/z = 122$ (50%), que auxiliaram na confirmação da estrutura deste alquilante. O **Esquema 15** apresenta uma proposta de formação de alguns dos principais fragmentos observados no espectro de massas do produto sintetizado.



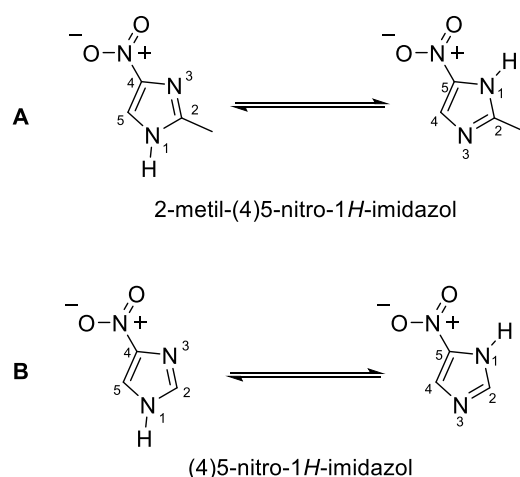
Esquema 15. Proposta de fragmentação do 1-(4-bromobutil)-2-nitro-1*H*-imidazol **8**.

No espectro de RMN ^1H de **8** (**Figura S33** no material em anexo), notou-se a presença de um tripleto, com integração para 2 hidrogênios, centrado em δ 3,45 ppm ($J=7,0$ Hz), que representa o metileno ligado ao bromo, e a presença de um outro tripleto com integração para 2 hidrogênios, centrado em δ 4,48 ppm ($J=7,0$ Hz), que representa o metileno ligado ao nitrogênio do anel imidazólico. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S34** no material em anexo) observou-se um sinal em δ 48,20 ppm, característica para o $-\text{CH}_2-$ ligado ao átomo de nitrogênio, indicando a presença da ligação formada.

2.2.2. Preparação dos alquilantes derivados (4)5-nitro-1*H*-imidazólicos

Com o objetivo de investigar com maior clareza a influência da posição do grupamento nitro no anel imidazólico na atividade antiparasitária dos híbridos planejados, foi decidido preparar novos alquilantes que possuísem o grupamento nitro em posições distintas do anel imidazólico. Os alquilantes propostos foram planejados a partir do precursor 2-metil-(4)5-nitro-1*H*-imidazol e do (4)5-nitro-1*H*-imidazol, diferenciando-se entre si no número de carbonos metilênicos espaçadores (Csp^3). A interpretação da atividade relacionada à variação na posição do grupo nitro no anel imidazólico fornecerá dados para discutir a interferência da posição desse substituinte nas respectivas atividades antiparasitárias dos híbridos preparados a partir desses alquilantes.

É importante ressaltar as possíveis formas tautoméricas desses centros nitroimidazólicos (**Esquema 16**), o que caracteriza esta molécula como nucleófilo bidentado.



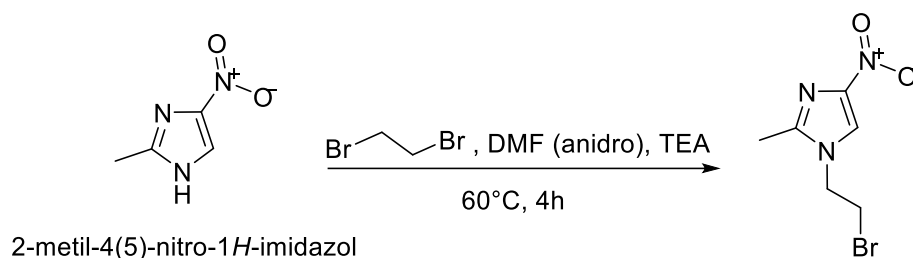
Esquema 16. Formas Tautoméricas do 2-metil-(4)5-nitroimidazol (**A**) e do (4)5-nitro-1*H*-imidazol (**B**).

O controle do pH é fundamental nesta etapa em que ocorre a reação de *N*-alquilação. Dependendo do pH do meio reacional, é possível realizar uma alquilação regioseletiva no anel imidazólico. Em condições reacionais de pH ácido, é favorecida a formação do composto com o grupo nitro na posição 5 do anel imidazólico, enquanto, em condições básicas, é favorecida a formação do regioisômero com o grupo nitro na posição 4 do anel imidazólico. Exemplos de variação na regioseletividade da alquilação de imidazóis, dependendo das condições reacionais e do pH do meio, encontram-se amplamente documentados na literatura (CAPLAR, SUNJIC et al., 1974; MANDALAPU, KUSHWAHA et al., 2016).

Na preparação destes alquilantes, utilizaram-se o 2-metil-(4)5-nitroimidazol e o (4)5-nitroimidazol comerciais como materiais de partida, em meio básico, para obter os produtos 4-nitroimidazólicos. O solvente escolhido para essa metodologia foi a *N,N*-dimetilformamida, em meio básico, com trietilamina (TEA) como base. A TEA exerce um papel fundamental nesta reação, uma vez que atua como base de Brønsted, abstraindo o próton presente na posição 1 do anel imidazólico, gerando um sítio nucleofílico preferencial para atacar o eletrófilo, visto que, neste ponto, haverá também menor impedimento estérico. Miller (1970) descreve que a *N*-alquilação do 2-metil-(4,5-nitroimidazol em meio alcalino tende a formar apenas o produto com o grupo nitro na posição 4 do anel imidazólico, devido à maior estabilidade do ânion correspondente (base conjugada). Dessa forma, o sítio nucleofílico, mais estável em meio básico, promoverá uma reação SN^2 com os dibromoetanos.

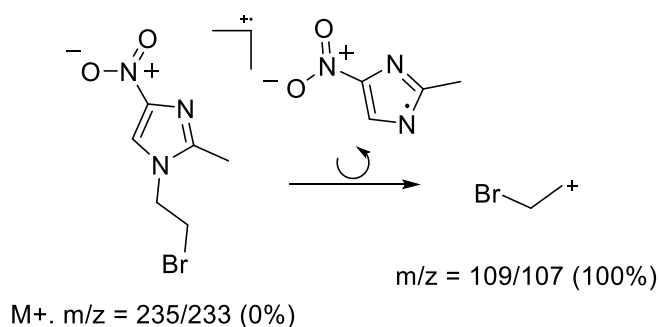
2.2.2.1. Preparação do 1-(2-bromoetil)-2-metil-4-nitro-1*H*-imidazol (9)

A reação transcorreu durante 6 horas, não sendo possível observar o consumo total do reagente de partida (reação acompanhada por CCD), mesmo após a adição de um equivalente adicional de TEA. Com isso, decidiu-se realizar a purificação do produto por filtração em coluna cromatográfica. Após filtração em coluna, o produto foi obtido com pureza adequada (determinada por CCD), na forma de um sólido de coloração branca, com rendimento de 50%.



Esquema 17. Reação da obtenção do 1-(3-bromopropil)-2-metil-4-nitro-1*H*-imidazol **9**.

O agente alquilante **9** teve o seu ponto de fusão determinado, caracterizado por meio dos métodos convencionais de análise (RMN ^1H e ^{13}C , EM). Este alquilante se apresentou como um sólido, levemente amarelado e amorfo, com ponto de fusão entre 200 e 203 °C. Por meio do espectro de infravermelho (Figura S37 no material em anexo), pode-se confirmar a presença da ligação C-Br, devida à absorção em 675 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C-Br. Observou-se, ainda, em 1357 cm^{-1} , a banda de deformação axial da ligação N-O do grupo nitro. No espectro de massas (Figura S40 no material em anexo), o íon molecular foi detectado como pico base, $m/z = 235/233$ (M^+ , 0%), e o pico base $m/z = 109/107$ (100%) auxiliou na confirmação da estrutura deste alquilante.



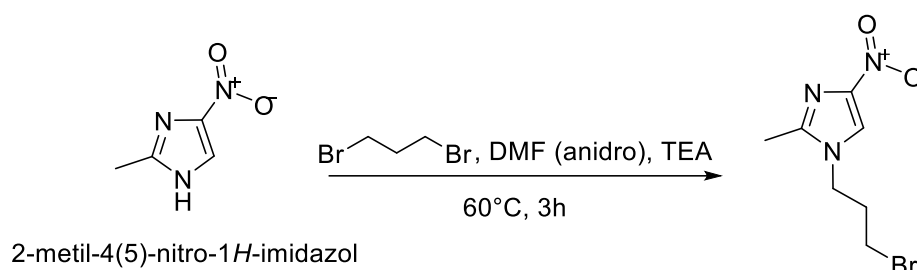
Esquema 18. Proposta de fragmentação do 1-(2-bromoetil)-2-metil-4-nitro-1*H*-imidazol **9**.

No espectro de RMN ^1H (Figura S38 no material em anexo), notou-se a presença de um tripleto, com integração para 2 hidrogênios, centrado em δ 3,66 ppm ($J = 7,0\text{ Hz}$), que representa o metileno ligado ao bromo, e a presença de um outro tripleto com integração para 2 hidrogênios, centrado em δ 4,38 ppm ($J = 7,0\text{ Hz}$), que representa o metileno ligado ao nitrogênio do anel imidazólico. No espectro de RMN ^{13}C (Figura S39

no material em anexo), observou-se um sinal em δ 49,20 ppm, indicando a absorção do CH₂ ligado ao nitrogênio e a ligação formada.

2.2.2.2. Preparação do 1-(3-bromopropil)-2-metil-4-nitro-1*H*-imidazol (10)

A reação durou 24 horas, não sendo possível observar o consumo total do reagente de partida (reação acompanhada por CCD), mesmo após a adição de um equivalente adicional de TEA. Com isso, decidiu-se realizar a purificação do produto por filtração em coluna cromatográfica. Após filtração em coluna, o produto foi obtido, com pureza adequada (por CCD), na forma de um sólido de coloração branca, com rendimento isolado de 47%.



Esquema 19. Reação da obtenção do 1-(3-bromopropil)-2-metil-4-nitro-1*H*-imidazol 10.

O alquilante teve o seu ponto de fusão determinado, caracterizado por meio dos métodos convencionais de análise (RMN ¹H e ¹³C, EM). Este alquilante se apresentou como um sólido, levemente amarelado e amorfo, com ponto de fusão entre 78 e 80°C. Por meio do espectro de infravermelho (Figura S42 no material em anexo), pode-se confirmar a presença da ligação C-Br, devida à absorção em 3099 cm⁻¹, referente à deformação axial da ligação C-H do anel imidazólico. Observou-se, ainda, em 1326 cm⁻¹, a banda de deformação axial da ligação N-O do grupo nitro do anel imidazólico. No espectro de massas (**Figura S45** no material em anexo), o íon molecular foi detectado como pico base, $m/z = 250/248$ [(M+H)⁺] (100%), o que auxiliou na confirmação da estrutura deste alquilante.

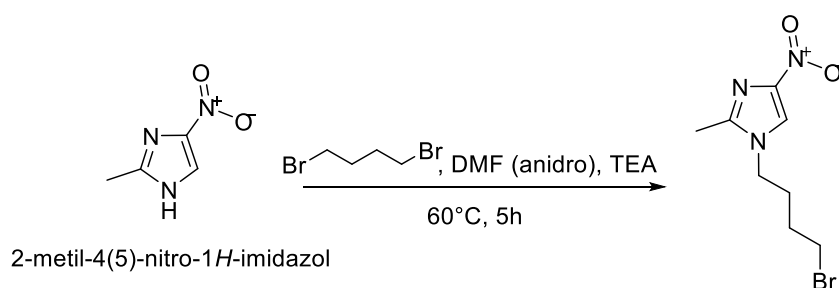
No espectro de RMN ¹H (**Figura S43** no material em anexo), notou-se a presença de um tripleto, com integração para 2 hidrogênios, centrado em δ 3,41 ppm ($J = 7,0$ Hz), que representa o metileno ligado ao bromo, e a presença de um outro tripleto com

integração para 2 hidrogênios, centrado em δ 4,17 ppm ($J= 7,0$ Hz), que representa o metileno ligado ao nitrogênio do anel imidazólico, e centrado em δ 2,34 ppm ($J= 7,0$ Hz), um sinal de quinteto com integração para 2 hidrogênios. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S44** no material em anexo), observou-se um sinal em δ 44,89 ppm, indicando a absorção do CH₂ ligado ao nitrogênio e a ligação formada.

A validação da metodologia descrita acima, para a alquilação em meio básico, formando o derivado 4-nitroimidazólico, pôde ser confirmada pelos espectros bidimensionais de RMN ^1H e ^{13}C , ^1H , ^{13}C -HSQC (*J* 1) (**Figura S44.1** no material em anexo) e ^1H , ^{13}C -HMBC (*J* 2, *J* 3) (**Figura S44.2** no material em anexo), que nos deram suporte para confirmar a estrutura do alquilante formado. No espectro de HSQC, é possível observar o acoplamento C–H (*J* 1), o que nos fornece a correlação de cada hidrogênio e o seu carbono correspondente. Já no espectro de HMBC, fornece informações sobre os acoplamentos a longa distância C-H (*J* 2, *J* 3), o que nos permite correlacionar a posição de cada carbono em relação aos hidrogênios vizinhos (de até três ligações de distância).

2.2.2.3. Preparação do 1-(4-bromobutil)-2-metil-4-nitro-1*H*-imidazol (11)

A reação durou 5 horas, não sendo possível observar o consumo total do reagente de partida (reação acompanhada por CCD), mesmo após a adição de um equivalente adicional de TEA. Com isso, decidiu-se realizar a purificação do produto por filtração em coluna cromatográfica. Após filtração em coluna cromatográfica, o produto foi obtido, com pureza adequada (por CCD), na forma de um sólido de coloração branca, com rendimento isolado de 45%.



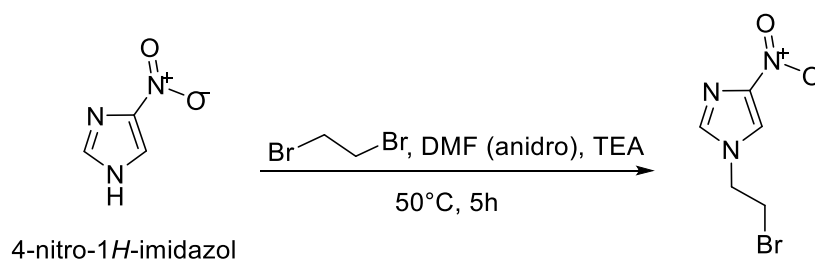
Esquema 20. Reação da obtenção do 1-(4-bromobutil)-2-metil-4-nitro-1*H*-imidazol **11**.

O alquilante **11** teve o seu ponto de fusão determinado, caracterizado por meio dos métodos convencionais de análise (RMN ^1H e ^{13}C , EM). Este alquilante se apresentou como um sólido, levemente amarelado e amorfo, com ponto de fusão entre 70 e 72 °C. Por meio do espectro de infravermelho (Figura S47 no material em anexo), pode-se confirmar a presença da ligação C-Br, devida à absorção em 680 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C-Br. Observou-se, ainda, em 1363 cm^{-1} , a banda de deformação axial da ligação N-O do nitro do anel imidazólico. No espectro de massas (Figura S50 no material em anexo) o íon molecular foi detectado, como pico base, $m/z = 261/263$ [(M+H)+.] (100%), que auxiliou na confirmação da estrutura deste alquilante.

No espectro de RMN ^1H (Figura S48 no material em anexo), notou-se a presença de um tripleto, com integração para 2 hidrogênios, centrado em δ 3,46 ppm ($J = 7,0$ Hz), que representa o metileno ligado ao bromo, e a presença de um outro tripleto com integração para 2 hidrogênios, centrado em δ 3,98 ppm ($J = 7,0$ Hz), que representa o metileno ligado ao nitrogênio do anel imidazólico. No espectro de RMN ^{13}C (Figura S49 no material em anexo), observou-se um sinal em δ 46,40 ppm, indicando a absorção do CH2 ligado ao nitrogênio e a ligação formada.

2.2.2.4. Preparação do 1-(2-bromoetil)-4-nitro-1*H*-imidazol (**12**)

A reação durou 5 horas, não sendo possível observar o consumo total do reagente de partida (reação acompanhada por CCD), mesmo após a adição de um equivalente adicional de TEA. Com isso, decidiu-se realizar a purificação do produto por filtração em coluna cromatográfica. Após filtração em coluna cromatográfica, o produto foi obtido, com pureza adequada (por CCD), na forma de um sólido de coloração branca, em rendimento isolado de 60%.



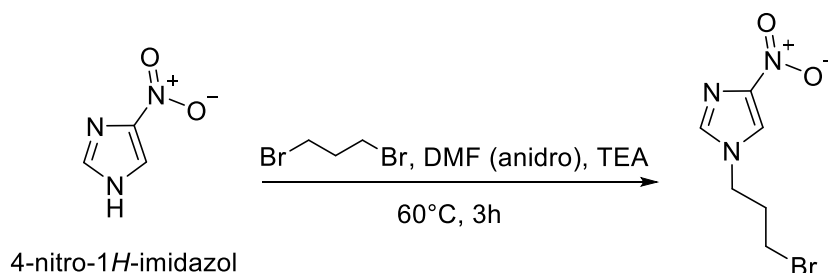
Esquema 21. Reação da obtenção do 1-(2-bromoetil)-4-nitro-1*H*-imidazol **12**.

O alquilante **12** teve o seu ponto de fusão determinado, caracterizado por meio dos métodos convencionais de análise (RMN ^1H e ^{13}C , EM). Este alquilante se apresentou como um sólido, levemente amarelado e amorfo, com ponto de fusão entre 87 e 90 °C. Por meio do espectro de infravermelho (Figura S52 no material em anexo), pode-se confirmar a presença da ligação C-Br, devida à absorção em 655 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C-Br. Observou-se, ainda, em 1336 cm^{-1} , a banda de deformação axial da ligação N-O do nitro do anel imidazólico. No espectro de massas (Figura S55 no material em anexo), o íon molecular foi detectado, como pico, $m/z = 262/264 [\text{M}+\text{ACN}+2\text{H}]^+$, que auxiliou na confirmação da estrutura deste alquilante.

No espectro de RMN ^1H (Figura S53 no material em anexo), notou-se a presença de um tripleto, com integração para 2 hidrogênios, centrado em $\delta\ 3,7\text{ ppm}$ ($J= 7,0\text{ Hz}$), que representa o metileno ligado ao bromo, e a presença de um outro tripleto com integração para 2 hidrogênios, centrado em $\delta\ 4,49\text{ ppm}$ ($J= 7,0\text{ Hz}$), que representa o metileno ligado ao nitrogênio do anel imidazólico. No espectro de RMN ^{13}C (Figura S54 no material em anexo), observou-se um sinal em $\delta\ 49,60\text{ ppm}$, indicando a absorção do CH_2 ligado ao nitrogênio e a ligação formada.

2.2.2.5. Preparação do 1-(3-bromopropil)-4-nitro-1H-imidazol (**13**)

A reação durou 3 horas, não sendo possível observar o consumo total do reagente de partida (reação acompanhada por CCD), mesmo após a adição de um equivalente adicional de TEA. Com isso, decidiu-se realizar a purificação do produto por filtração em coluna cromatográfica. Após filtração em coluna cromatográfica, o produto foi obtido, com pureza adequada (por CCD), na forma de um sólido de coloração branca, com rendimento isolado de 45%.



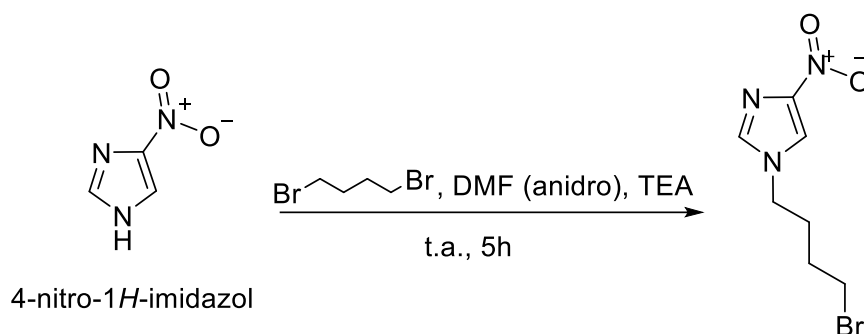
Esquema 22. Reação da obtenção do 1-(3-bromopropil)-4-nitro-1H-imidazol **13**.

O alquilante **13** teve o seu ponto de fusão determinado, caracterizado por meio dos métodos convencionais de análise (RMN ^1H e ^{13}C , EM). Este alquilante se apresentou como um sólido levemente amarelado, amorfo, com ponto de fusão entre 78 e 80 °C. Por meio do espectro de infravermelho (Figura S57 no material em anexo), pode-se confirmar a presença da ligação C-H do anel imidazólico, devida à absorção em 3105 cm^{-1} , referente à deformação axial desta ligação. Observou-se, ainda, em 1324 cm^{-1} , a banda de deformação axial da ligação N–O do nitro do anel imidazólico. No espectro de massas (Figura S60 no material em anexo) o íon molecular foi detectado, como pico do íon molecular, $m/z = 235/233$ (M^+ , 20%), que auxiliou na confirmação da estrutura deste alquilante.

No espectro de RMN ^1H (Figura S58 no material em anexo), notou-se a presença de um tripleto, com integração para 2 hidrogênios, centrado em $\delta\ 3,39\text{ ppm}$ ($J = 7,0\text{ Hz}$), que representa o metileno ligado ao bromo, e a presença de um outro tripleto com integração para 2 hidrogênios, centrado em $\delta\ 4,30\text{ ppm}$ ($J = 7,0\text{ Hz}$), que representa o metileno ligado ao nitrogênio do anel imidazólico, e centrado em $\delta\ 2,39\text{ ppm}$ ($J = 7,0\text{ Hz}$), um sinal de quinteto com integração para 2 hidrogênios. No espectro de RMN ^{13}C (Figura S59 no material em anexo), observou-se um sinal em $\delta\ 46,0\text{ ppm}$, indicando a absorção do CH_2 ligado ao nitrogênio e a ligação formada.

2.2.2.6. Preparação do 1-(4-bromobutil)-4-nitro-1*H*-imidazol (**14**)

A reação aconteceu por 5 horas, não sendo possível observar o consumo total do reagente de partida (reação acompanhada por CCD), mesmo após a adição de um equivalente adicional de TEA. Com isso, foi decidido realizar a purificação do produto por filtração em coluna cromatográfica. Após filtração em coluna cromatográfica, o produto foi obtido, com pureza adequada (por CCD), na forma de um sólido de coloração branca, em rendimento isolado de 48%.



Esquema 23. Reação para a obtenção do 1-(4-bromobutil)-4-nitro-1*H*-imidazol **14**.

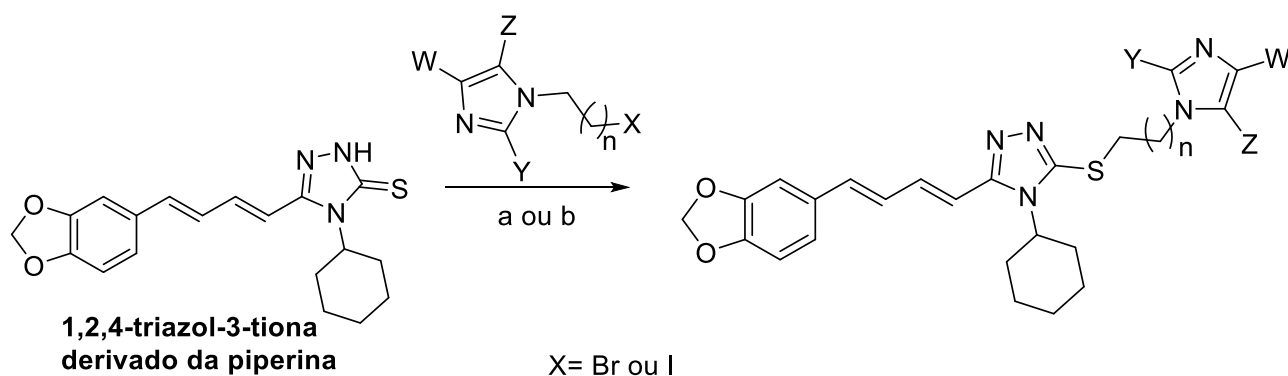
O alquilante **14** teve o seu ponto de fusão determinado, caracterizado por meio dos métodos convencionais de análise (RMN ^1H e ^{13}C , EM). Este alquilante se apresentou como um sólido, levemente amarelado e amorfo, com ponto de fusão entre 70 e 72°C. Por meio do espectro de infravermelho (Figura S14 no material em anexo), pode-se confirmar a presença da ligação N-O a 1355 cm^{-1} na banda de deformação axial da ligação N-O do nitro do anel imidazólico. No espectro de massas (**Figura S65** no material em anexo), o íon molecular foi detectado, como pico base, $m/z = 249$ $[(M+H)^+]$, que auxiliou na confirmação da estrutura deste alquilante.

No espectro de RMN ^1H (**Figura S63** no material em anexo), notou-se a presença de um tripleto, com integração para 2 hidrogênios, centrado em δ 3,46 ppm ($J = 7,0\text{ Hz}$), que representa o metileno ligado ao bromo, e a presença de um outro tripleto com integração para 2 hidrogênios, centrado em δ 4,10 ppm ($J = 7,0\text{ Hz}$), que representa o metileno ligado ao nitrogênio do anel imidazólico. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S64** no material em anexo), observou-se um sinal em δ 47,59 ppm, indicando a absorção do CH₂ ligado ao nitrogênio e a ligação formada.

3. Preparação dos Híbridos Moleculares Planejados

A etapa de *S*-alquilação planejada neste trabalho baseou-se em uma adaptação das metodologias descritas por El-Emam e colaboradores (2014) e El-Ashry e colaboradores (2006), que utilizam solvente polar e meio básico. Observou-se, nessa reação, que, nas condições reacionais empregadas, o produto de *S*-alquilação é o majoritário em ambas as metodologias, no caso da alquilação com os dois tipos de agentes alquilantes (**Figura 6**). Todos os híbridos foram purificados por cromatografia em coluna e tiveram sua estrutura

confirmada pelos principais métodos de análise orgânica e suas purezas foram avaliadas por CLAE.



H1 - n=1; W=H; Y=CH₃; Z=NO₂; (63 %)
H2 - n=1; W=H; Y=NO₂; Z=H; (50 %)
H3 - n=1; W=NO₂; Y=CH₃; Z=H; (53 %)
H4 - n=1; W=NO₂; Y=H; Z=H; (50 %)
H5 - n=2; W=H; Y=NO₂; Z=H; (55 %)
H6 - n=2; W=NO₂; Y=CH₃; Z=H; (30 %)
H7 - n=2; W=NO₂; Y=H; Z=H; (50 %)
H8 - n=3; W=H; Y=NO₂; Z=H; (50 %)
H9 - n=3; W=NO₂; Y=CH₃; Z=H; (45 %)
H10 - n=3; W=NO₂; Y=H; Z=H; (50 %)

Condições reacionais: (a) DMF, K₂CO₃, agente alquilante (X= I), 24 h, t.a., (63%); (b) etanol, TEA, agente alquilante (X= Br), 6 h, refluxo.

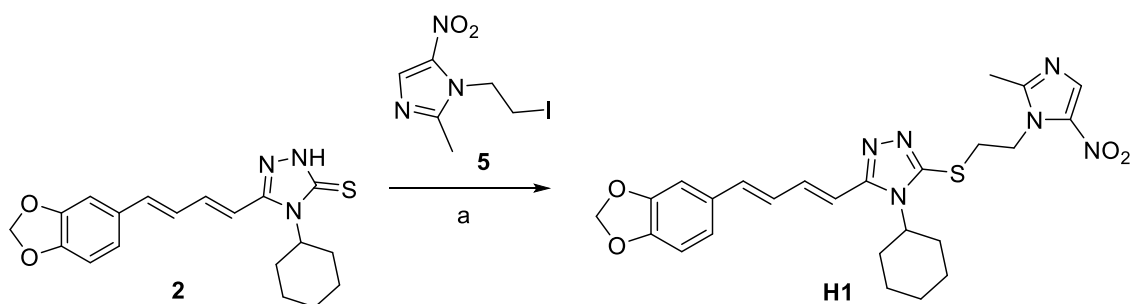
Figura 6. Metodologia de síntese dos híbridos **H1-H10**.

3.1. Preparação do H1

A reação de *S*-alquilação, utilizando o 1-(2-iodoetil)-2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol **5** foi bem-sucedida, realizada de acordo com a metodologia de El-Eman e colaboradores (2014). Após o término da reação, a etapa de purificação do produto obtido foi conseguida pela precipitação dele através da adição de água gelada ao meio reacional. O híbrido **H1** foi obtido, na forma de um sólido amorfo de coloração amarela, com rendimento de 63%, além de apresentar grau de pureza adequado (superior a 95%) (determinado por CLAE, **Figura S71** no material em anexo).

O híbrido preparado teve sua estrutura caracterizada através dos métodos convencionais de análise (RMN ¹H e ¹³C, EM e IV), além de ter seu ponto de fusão determinado (207–209 °C). Através do espectro de infravermelho (**Figura S67** no material em anexo) pode ser confirmada a presença da ligação C-S, responsável pela absorção em 1180 cm⁻¹, referente à deformação axial simétrica da ligação C-S, indicativa

da formação do produto de *S*-alquilação. No espectro de massas (**Figura S70** no material em anexo), o HRMS (EI, m/z) calculado para $C_{25}H_{29}N_6O_4S^+$ foi 509,1971; encontrado: 509,2018, confirmando a estrutura de **H1**. Adicionalmente, no espectro de RMN 1H (**Figura S68** no material em anexo) é possível observar um tripleto, com integração para 2 hidrogênios, em δ 3,62 ppm ($J= 6,3$ Hz), referente ao CH_2 ligado ao enxofre. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S69** no material em anexo), observou-se um sinal em δ 45,22 ppm, indicando a presença de carbono metilênico ligado ao átomo de enxofre. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada e pontuados anteriormente, corroboram a tese de que a *S*-alquilação foi realizada com êxito (**Esquema 24**), formando o **H1**.



Condições reacionais: (a) DMF, K_2CO_3 , 55 °C por 24 h (63%).

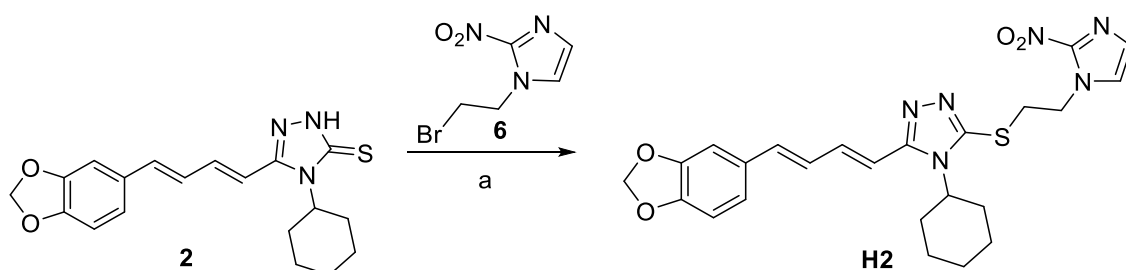
Esquema 24. Obtenção do híbrido **H1** a partir dos precursores **2** e **5**.

3.2.Preparação do H2

A reação de *S*-alquilação de **2** com o 1-(2-bromoetil)-2-nitro-1*H*-imidazol **6**, derivado do 2-nitroimidazol, foi bem-sucedida, realizada conforme a metodologia de El-Ashry e colaboradores (2006). Após o término da reação, a etapa de purificação do produto obtido foi realizada por meio de filtração em coluna cromatográfica. O híbrido **H2** foi obtido na forma de um sólido amorfo, de coloração amarela, com rendimento de 50%, além de apresentar grau de pureza adequado (superior a 95%) (determinado por CLAE; **Figura S75** no material em anexo).

O híbrido **H2** foi caracterizado por meio de métodos convencionais de análise (RMN 1H e ^{13}C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado (170–174 °C). No espectro de infravermelho (**Figura S72** do material em anexo), observa-se uma absorção em 1197 cm^{-1} , referente à deformação axial simétrica da ligação C-S, indicativa da

formação do produto de *S*-alquilação. No espectro de massas (**Figura S76** no material em anexo), HRMS (EI, m/z) calculado para $C_{24}H_{27}N_6O_4S^+$: 495,1814; encontrado: 495,1837, confirmando a estrutura de **H2**. Adicionalmente, no espectro de RMN 1H (**Figura S73** no material em anexo), é possível observar um tripleto, com integração de 2 hidrogênios, em δ 3,63 ppm ($J = 6,3$ Hz), referente ao CH_2 ligado ao enxofre. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S74** no material em anexo), observou-se um sinal em δ 48,59 ppm, indicando a presença de carbono metilênico ligado ao átomo de enxofre. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada e pontuados anteriormente, corroboram a tese de que a *S*-alquilação foi realizada com êxito (**Esquema 25**), formando o híbrido **H2** planejado. Além dos métodos convencionais de análise, realizou-se a espectrometria de raios X do monocristal de **H2**, o que ajudou a confirmar a formação deste híbrido (**Figuras 7**).



Condições reacionais: (a) Etanol, TEA, refluxo, 6h (50%).

Esquema 25. Obtenção do híbrido **H2** a partir dos precursores **2** e **6**.

3.2.1. Difração de raios X do híbrido **H2**

Os monocristais amarelos do híbrido **H2**, adequados para difração de raios X, foram obtidos por evaporação lenta de uma solução etanólica à temperatura ambiente, para experiências de difração de raios X. Os detalhes dos dados do cristal, da coleta e do refinamento estão resumidos na **Tabela 1** (ESI). Os comprimentos de ligação selecionados também constam da **Tabela 1**. O composto **H2** cristaliza no grupo espacial monoclinico P21/c, e sua estrutura cristalina é ilustrada na **Figura 7**.

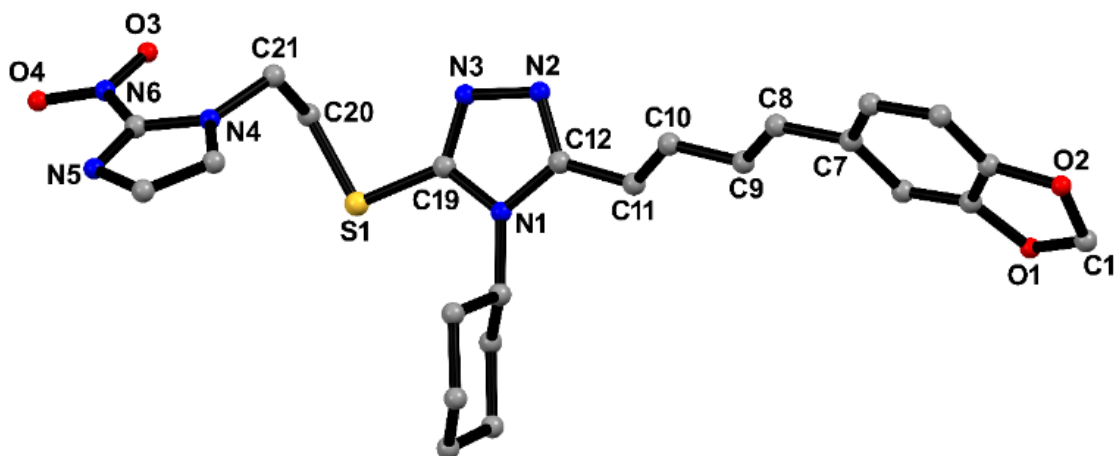


Figura 7. Estrutura cristalina do composto **H2** com numeração de átomos selecionada. Os átomos de hidrogênio e parte do grupo ciclohexil desordenado foram omitidos para maior clareza. Códigos de cores: C (cinza), N (azul), S (amarelo) e O (vermelho).

A estrutura cristalina corrobora os resultados obtidos com outras técnicas de caracterização, revelando a presença das frações esperadas de 4-ciclohexil-1,2,4-triazol, imidazol com o grupo nitro e 3,4-metilenodioxifenil. Essas unidades são conectadas por um grupo etil-tioéter saturado, que liga as unidades de imidazol e de 4-ciclohexil-1,2,4-triazol. Um esqueleto conjugado de quatro carbonos liga as unidades 3,4-metilenodioxifenil e 4-ciclohexil-1,2,4-triazol. As distâncias de ligação nos anéis 1,2,4-triazol, imidazol e 3,4-metilenodioxifenil são normalmente comparadas a estruturas cristalinas semelhantes (AZZAM, ELGEMEIE, *et al.*, 2023; JI, TIAN, *et al.*, 2008; JUN, BINGHENG, *et al.*, 2023).

No que diz respeito à parte conjugada composta por átomos C8-C11 e ao alargamento desta discussão aos átomos de ligação nos anéis triazol e 3,4-metilenodioxifenil, os comprimentos das ligações são os seguintes: C7-C8 = 1,452(5); C8-C9 = 1,326(5); C9-C10 = 1,431(5); C10-C11 = 1,321(5) e C11-C12 = 1,462(4) Å. Os comprimentos de ligação revelaram o papel fundamental da conjugação nesta parte da molécula, uma vez que se enquadram nas distâncias interatômicas típicas esperadas para um esqueleto de quatro carbonos -C=C-C=C- (ORPEN *et al.*, 1994). Além disso, o plano formado pela unidade -C=C-C=C- está deslocado apenas 11,6° em relação ao que contém a porção 3,4-metilenodioxifenil. Por outro lado, foi observado um ângulo maior entre os

planos das unidades 1,2,4-triazol e $-C=C-C=C-$ ($48,5^\circ$), o que sugere uma pequena deslocalização de elétrons devido à falta de planaridade em ambas as partes da molécula.

O empacotamento do cristal é estabilizado por uma série de contatos curtos, conforme mostrado na **Figura 8**. Os parâmetros geométricos associados a esses contatos estão listados na **Tabela 1** (ESI). Ao longo do eixo cristalográfico, o contato curto C23-H23...O2ⁱⁱⁱ ($iii = -x+1, -y+2, -z+1$) entre os anéis 3,4-metilenodioxifenil e imidazol leva à formação de dímeros de moléculas, conforme mostrado na **Figura 8** (parte superior). Cada unidade de dímero interage, por meio dos átomos de hidrogênio do metileno, com dois átomos de oxigênio nitro vizinhos (C1-H1a...O3ⁱ e C1-H1a...O3ⁱⁱ, com $i = x-1, -y + 3/2, z-1/2$ e $ii = -x + 1, y-1/2$), como visto na **Figura 8** (parte inferior). Finalmente, os contatos fracos entre o grupo etil tiol e o anel 3,4-metilenodioxifenil também contribuem para a manutenção da rede cristalina (C20-H20a...C6ⁱⁱ).

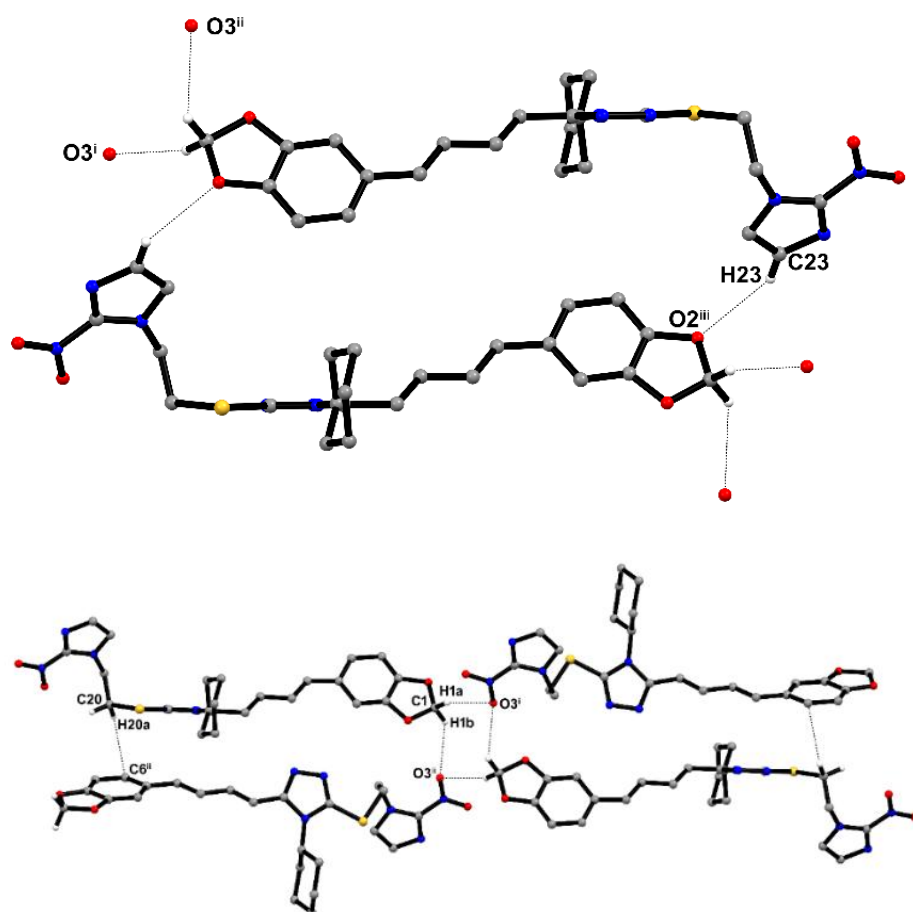


Figura 8. Detalhes do empacotamento cristalino do composto **H2**. Apenas os átomos de hidrogênio envolvidos nos contatos intermoleculares são exibidos como esferas brancas.

Códigos de simetria para gerar átomos equivalentes: $i = x-1, -y + 3/2, z-1/2$; $ii = -x + 1, y-1/2$; $iii = -x + 1, -y + 2, -z + 1$.

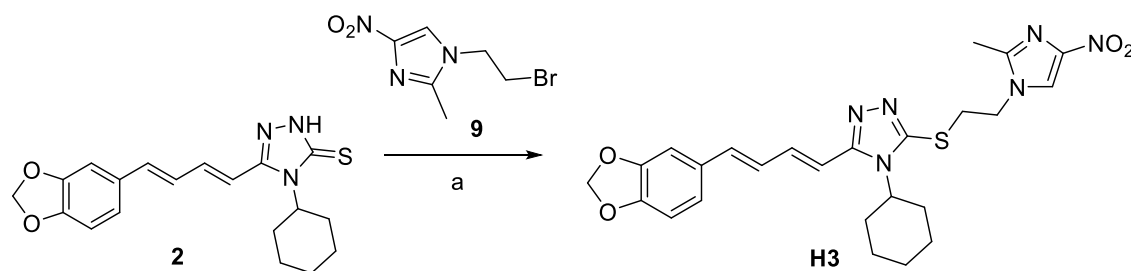
Tabela 1. Comprimentos de ligação selecionados (Å) do composto **H2**.

O1—C1	1,412(5)
O2—C1	1,405(6)
C7—C8	1,452(5)
C8—C9	1,326(5)
C9—C10	1,431(5)
C10—C11	1,321(5)
C11—C12	1,462(4)
N1—C12	1,368(4)
N1—C19	1,358(4)
N2—C12	1,304(4)
N2—N3	1,389(4)
N3—C19	1,304(4)
S1—C19	1,747(3)
N4—C24	1,353(4)
N4—C22	1,347(5)
N5—C23	1,340(5)
N5—C24	1,300(5)
N6—C24	1,419(5)
C22—C23	1,348(7)
N6—O3	1,216(5)
N6—O4	1,211(4)

3.3.Preparação do H3

A reação de *S*-alquilação de **2** com o 1-(2-bromoetil)-2-metil-4-nitro-1*H*-imidazol **9**, derivado do 2-metil-(4)5-nitroimidazol, foi bem-sucedida, realizada conforme a metodologia de El-Ashry e colaboradores (2006). Após o término da reação, a etapa de purificação do produto obtido foi realizada por meio de filtração em coluna cromatográfica. O híbrido **H3** foi obtido na forma de um sólido amorfo de coloração amarela, com rendimento de 53%, além de apresentar grau de pureza adequado (superior a 95%) (determinado por CLAE; **Figura S81** no material em anexo).

O híbrido preparado foi caracterizado por meio de métodos convencionais de análise (RMN ^1H e ^{13}C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado (217–219 °C). Por meio do espectro de infravermelho (**Figura S77** no material em anexo), pode-se confirmar a presença da ligação C-N, responsável pela absorção em 1236 cm^{-1} , referente à deformação axial simétrica da ligação C-N, indicativa da presença do grupo C-NO₂ na estrutura da molécula. No espectro de massas (**Figura S80** no material em anexo), o HRMS (EI, m/z) calculado para C₂₅H₂₉N₆O₄S⁺ é 509,1971; encontrado: 509,2015, o que confirma a estrutura do híbrido **H3** planejado. Adicionalmente, no espectro de RMN ^1H (**Figura S78** no material em anexo), observa-se um tripleto, com integração de 2 hidrogênios, em δ 3,57 ppm ($J = 6,3\text{ Hz}$), referente ao CH₂ ligado ao átomo de enxofre. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S79** no material em anexo), observou-se um sinal em δ 32,64 ppm, indicando a presença de carbono metilênico ligado ao átomo de enxofre. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada e pontuados anteriormente, indicam que a S-alkilação foi realizada com êxito (**Esquema 27**), formando o híbrido **H3**.



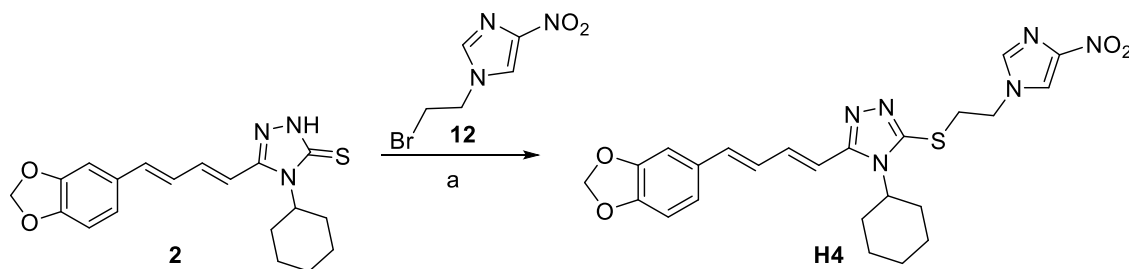
Condições reacionais: (a) Etanol, TEA, refluxo por 6h (53%).

Esquema 26. Obtenção do híbrido **H3**, partindo dos precursores de **2** e **9**.

3.4. Preparação do H4

A reação de S-alkilação de **2** com o 1-(2-bromoetil)-4-nitro-1H-imidazol **12**, derivado do (4)5-nitroimidazol, foi bem-sucedida, realizada pela metodologia de El-Ashry e colaboradores (2006). Terminada a reação, a etapa de purificação do produto obtido foi realizada por meio de filtração em coluna cromatográfica. O híbrido **H4** foi gerado na forma de um sólido amorfo de coloração amarela, com rendimento de 50%, além de apresentar grau de pureza adequado (superior a 95%) (determinado por CLAE; Figura S86 do material em anexo).

O híbrido **H4** foi devidamente caracterizado por meio de métodos físicos de análise (RMN ^1H e ^{13}C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado (217–218 °C). Por meio do espectro de infravermelho (Figura S82 no material em anexo), pode-se confirmar a presença da ligação C-N, responsável pela absorção em 1249 cm^{-1} , referente à deformação axial simétrica da ligação C-N, indicativa da presença do grupo C-NO₂ na estrutura da molécula. No espectro de massas (Figura S85 no material em anexo), o HRMS (EI, m/z) calculado para C₂₄H₂₇N₆O₄S⁺ é 495,1814; encontrado: 495,1843, confirmando a estrutura de **H4**. Adicionalmente, no espectro de RMN ^1H (Figura S83 no material em anexo), observa-se um tripleto, com integração de 2 hidrogênios, em δ 3,60 ppm ($J = 6,3\text{ Hz}$), referente ao CH₂ ligado ao átomo de enxofre. No espectro de RMN ^{13}C (Figura S84 no material em anexo), observou-se um sinal em δ 33,48 ppm, indicando a presença de carbono metilênico ligado ao átomo de enxofre. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada, indicam que a reação de S-alkilação foi realizada com êxito (Esquema 27), formando o **H4**.



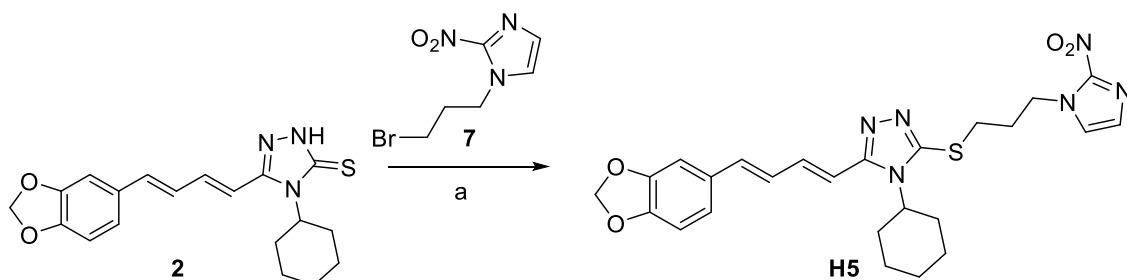
Condições reacionais: (a) Etanol, TEA, refluxo por 6 h (50%).

Esquema 27. Obtenção do híbrido **H4**, partindo dos precursores **2** e **12**.

3.5. Preparação do H5

A reação de S-alkilação de **2** com o 1-(3-bromopropil)-2-nitro-1H-imidazol **7**, derivado do 2-nitroimidazol, foi bem-sucedida, realizada pela metodologia de El-Ashry e colaboradores (2006). Após o término da reação, a etapa de purificação do produto S-alkilado foi realizada por meio de filtração em coluna cromatográfica. O híbrido **H5** foi obtido na forma de um sólido amorfo de coloração amarela, com rendimento de 55%, além de apresentar pureza adequada (superior a 95%) (determinada por CLAE, Figura S90 no material em anexo).

O híbrido preparado foi caracterizado por meio de métodos físicos de análise (RMN ^1H e ^{13}C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado (150–153 °C). Por meio do espectro de infravermelho (**Figura S87** no material em anexo), pode-se confirmar a presença da ligação C-N, responsável pela absorção em 1251 cm^{-1} , referente à deformação axial simétrica da ligação C-N, indicativa da presença do grupo C-NO₂ na estrutura da molécula. No espectro de massas (**Figura S91** no material em anexo), o HRMS (EI, m/z) calculado para C₂₅H₂₉N₆O₄S⁺ é 509,1971; encontrado: 509,2011, o que confirma a estrutura do **H5**. Adicionalmente, no espectro de RMN ^1H (**Figura S88** no material em anexo), observa-se um tripleto, com integração de 2 hidrogênios, em δ 3,27 ppm ($J = 6,3$ Hz), referente ao CH₂ ligado ao átomo de enxofre. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S89** do material em anexo), observou-se um sinal em δ 31,71 ppm, indicando a presença de carbono metilênico ligado ao átomo de enxofre. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada, indicam que a S-alquilação foi realizada com êxito (**Esquema 27**), fornecendo o híbrido **H5**.



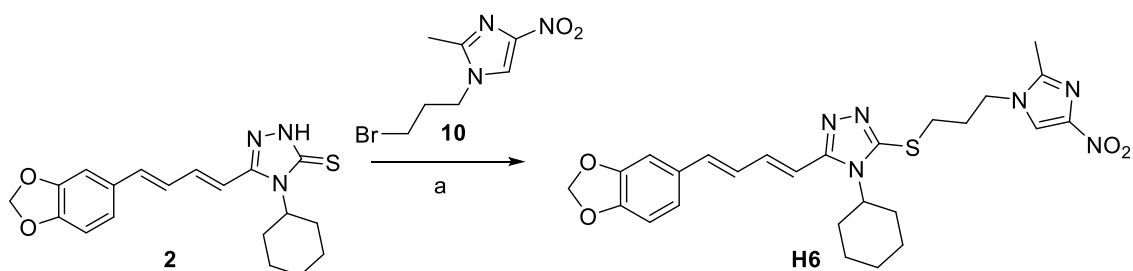
Condições reacionais: (a) Etanol, TEA, refluxo por 6 h (55%).

Esquema 28. Obtenção do híbrido **H5**, partindo dos precursores **2** e **7**.

3.6.Preparação do H6

A reação de S-alquilação de **2** com o 1-(3-bromopropil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol **10**, derivado do 2-metil-(4)5-nitroimidazol, foi bem-sucedida, realizada pela metodologia de El-Ashry e colaboradores (2006). Após o término da reação, a etapa de purificação do produto obtido foi realizada por meio de filtração em coluna cromatográfica. O híbrido **H6** planejado foi obtido na forma de um sólido amorfo de coloração branca, com rendimento de 30%, além de apresentar grau de pureza adequado (superior a 95%) (determinado por CLAE; **Figura S96** do material em anexo).

O híbrido preparado foi caracterizado por meio de métodos convencionais de análise (RMN ^1H e ^{13}C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado (175–177 °C). No espectro de infravermelho (**Figura S92** do material em anexo), observa-se uma absorção em 1193 cm^{-1} , referente à deformação axial simétrica da ligação C-S, indicativa da formação do produto de *S*-alquilação. No espectro de massas (**Figura S95** no material em anexo), HRMS (EI, m/z) calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}^+$: 523,2127; encontrado: 523,2187, que confirma a estrutura de **H6**. Adicionalmente, no espectro de RMN ^1H (**Figura S93** no material em anexo), é possível observar um tripleto, com integração de 2 hidrogênios, em δ 3,25 ppm ($J = 6,3$ Hz), referente ao CH_2 ligado ao enxofre. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S94** do material em anexo) observou-se um sinal em δ 31,70 ppm, indicando a presença de carbono metilênico ligado ao átomo de enxofre. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada e pontuados anteriormente, indicam que a *S*-alquilação foi realizada com êxito (**Esquema 27**), formando o híbrido **H6**.



Condições reacionais: (a) Etanol, TEA, refluxo por 6h (30%).

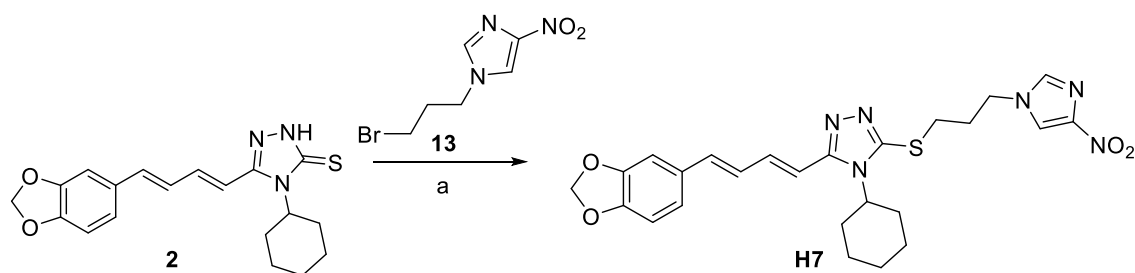
Esquema 29. Obtenção do híbrido **H6**, partindo dos precursores **2** e **10**.

3.7.Preparação do H7

A reação de *S*-alquilação de **2** com o 1-(3-bromopropil)-4-nitro-1*H*-imidazol **13**, derivado do (4)5-nitroimidazol, foi bem-sucedida, realizada pela metodologia de El-Ashry e colaboradores (2006). Após o término da reação, a etapa de purificação do produto obtido foi realizada por meio de filtração em coluna cromatográfica. O híbrido **H7** foi obtido na forma de um sólido amorfo de coloração branca, com rendimento de 50%, além de apresentar grau de pureza adequado (superior a 95%) (determinado por CLAE, **Figura S101** no material em anexo).

O híbrido preparado foi caracterizado por meio de métodos físicos de análise (RMN ^1H e ^{13}C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado (186–189 °C). No espectro

de infravermelho (**Figura S97** do material em anexo), pode-se confirmar a presença da ligação C-N, responsável pela absorção em 1236 cm^{-1} , referente à deformação axial simétrica da ligação C-N, indicativa da presença do grupo C-NO₂ na estrutura da molécula. No espectro de massas (**Figura S100** no material em anexo), HRMS (EI, m/z) calculado para C₂₅H₂₉N₆O₄S⁺: 509,1971; encontrado: 509,2007, que confirma a estrutura do híbrido **H7**. Adicionalmente, no espectro de RMN ¹H (**Figura S98** no material em anexo), é possível observar um tripleto, com integração de 2 hidrogênios, em $\delta\text{ }3,23\text{ ppm}$ ($J = 6,3\text{ Hz}$), referente ao CH₂ ligado ao átomo de enxofre. No espectro de RMN ¹³C (**Figura S99** no material em anexo), observou-se um sinal em $\delta\text{ }31,69\text{ ppm}$, indicando a presença de carbono metilênico ligado ao átomo de enxofre. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada, indicam que a S-alquilação foi realizada com êxito (**Esquema 27**), formando o **H7**.



Condições reacionais: (a) Etanol, TEA, refluxo por 6h (50%).

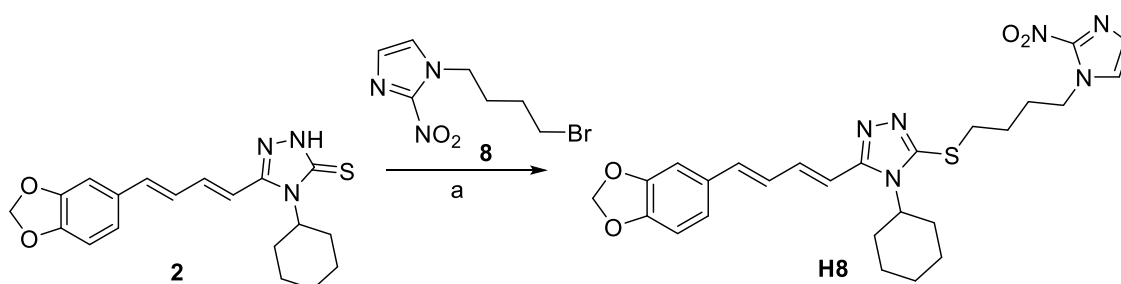
Esquema 30. Obtenção do híbrido **H7**, partindo dos precursores **2** e **13**.

3.8.Preparação do H8

A reação de S-alquilação de **2** com o 1-(4-bromobutil)-2-nitro-1H-imidazol **8**, derivado do 2-nitroimidazol, foi bem-sucedida, realizada sob a metodologia de El-Ashry e colaboradores (2006). Após o término da reação, a etapa de purificação do produto obtido foi realizada por filtração em coluna cromatográfica. O híbrido **H8** planejado foi obtido, na forma de um sólido amorfo de coloração amarela, em rendimento isolado de 50%, além de apresentar pureza adequada (superior a 95%) (determinada por CLAE, **Figura S106** no material em anexo).

O híbrido preparado foi caracterizado pelos métodos convencionais de análise (RMN ¹H e ¹³C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado (129–131 °C). Através do espectro de infravermelho (**Figura S102** no material em anexo) pode ser confirmada

a presença da ligação C-N, responsável pela absorção em 1249 cm^{-1} , referente à deformação axial simétrica da ligação C-N, indicativa da presença do grupo C-NO₂ na estrutura da molécula. No espectro de massas (**Figura S105** no material em anexo), o HRMS (EI, m/z) calculado para C₂₆H₃₁N₆O₄S⁺ é 523,2127; encontrado: 523,2189, o que confirma a estrutura de **H8**. Adicionalmente, no espectro de RMN ¹H (**Figura S103** no material em anexo) é possível observar um tripleto, com integração para 2 hidrogênios, em δ 3,30 ppm ($J = 6,3\text{ Hz}$), referente ao CH₂ ligado ao enxofre. No espectro de RMN ¹³C (**Figura S104** no material em anexo) observou-se um sinal em δ 32,33 ppm, indicando a presença de carbono metilênico ligado ao átomo de enxofre. Esse conjunto de sinais, relacionado à estrutura da molécula sintetizada, sugere que a S-alquilação foi realizada com êxito (**Esquema 27**), formando o híbrido **H8**.



Condições reacionais: (a) Etanol, TEA, refluxo por 6 h (50%).

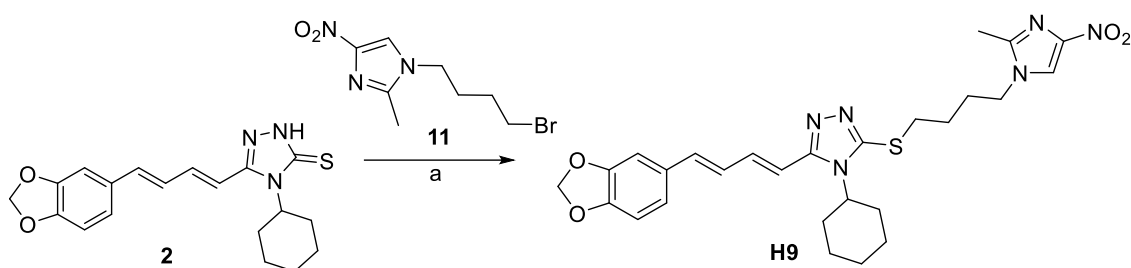
Esquema 31. Obtenção do híbrido **H8**, partindo dos precursores **2** e **8**.

3.9.Preparação do H9

A reação de S-alquilação de **2** com o 1-(4-bromobutyl)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol **11**, derivado do 2-metil-(4)5-nitroimidazol, foi bem-sucedida, realizada sob a metodologia de El-Ashry e colaboradores (2006). Após o término da reação, a etapa de purificação do produto obtido foi realizada por filtração em coluna cromatográfica. O **H9** planejado foi obtido, na forma de um sólido amorfo de coloração amarela, em rendimento isolado de 45%, além de apresentar grau de pureza adequado (superior a 95%) (determinado por CLAE, **Figura S111** no material em anexo).

O híbrido preparado foi caracterizado através dos métodos convencionais de análise (RMN ¹H e ¹³C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado (97–99 °C). Através do espectro de infravermelho (**Figura S107** no material em anexo) pode ser confirmada a presença da ligação C-N, responsável pela absorção em 1249 cm^{-1} , referente à

deformação axial simétrica da ligação C-N, indicativa da presença do grupo C-NO₂ na estrutura da molécula. No espectro de massas (**Figura S110** no material em anexo) HRMS (EI, *m/z*) calculado para C₂₈H₃₃N₆O₄S⁺: 537,2284; encontrado: 537,2324, confirmando a estrutura de **H9**. Adicionalmente, no espectro de RMN ¹H (**Figura S108** no material em anexo) é possível observar um tripleto, com integração para 2 hidrogênios, em δ 3,32 ppm (*J* = 6,3 Hz), referente ao CH₂ ligado ao enxofre. No espectro de RMN ¹³C (**Figura S109** no material em anexo) observou-se um sinal em δ 31,70 ppm, indicando a presença de carbono metilênico ligado ao átomo de enxofre. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada, suportam que a *S*-alquilação foi realizada com êxito (**Esquema 27**), formando o híbrido **H9**.



Condições reacionais: (a) Etanol, TEA, refluxo por 6h (45%).

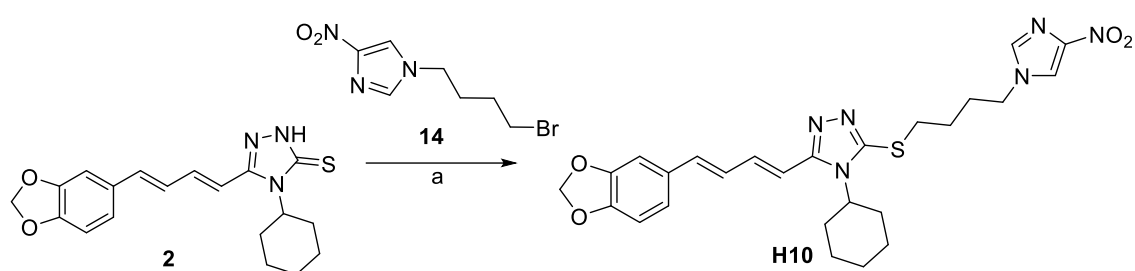
Esquema 32. Obtenção do híbrido **H9**, partindo dos precursores **2** e **11**.

3.10. Preparação do H10

A reação de *S*-alquilação de **2** com o 1-(4-bromobutil)-4-nitro-1*H*-imidazol **14**, derivado do (4)5-nitroimidazol, foi bem-sucedida, realizada sob a metodologia de El-Ashry e colaboradores (2006). Após o término da reação, a etapa de purificação do produto obtido foi realizada por filtração em coluna cromatográfica. O **H10** planejado foi obtido, na forma de um sólido amorfo de coloração branca, em rendimento isolado de 50%, além de apresentar grau de pureza adequado (superior a 95%) (determinado por CLAE, **Figura S116** no material em anexo).

O híbrido preparado foi caracterizado através dos métodos convencionais de análise (RMN ¹H e ¹³C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado (97–100 °C). No espectro de infravermelho (**Figura S112** no material em anexo) pode ser confirmada a presença da ligação C-N, responsável pela absorção em 1249 cm⁻¹, referente à deformação axial simétrica da ligação C-N, indicativa da presença do grupo C-NO₂ na

estrutura da molécula. No espectro de massas (**Figura S115** no material em anexo) HRMS (EI, m/z) calculado para $C_{26}H_{31}N_6O_4S^+$: 523,2127; encontrado: 523,2178, confirmando a estrutura do **H10**. Adicionalmente, no espectro de RMN 1H (**Figura S113** no material em anexo) é possível observar um tripleto, com integração para 2 hidrogênios, em δ 3,32 ppm ($J=6,3$ Hz), referente ao CH_2 ligado ao enxofre. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S114** no material em anexo) observou-se um sinal em δ 31,87 ppm, indicando a presença de carbono metilênico, ligado ao átomo de enxofre. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada, pontuados anteriormente, suportam que a *S*-alquilação foi realizada com êxito (**Esquema 27**), formando o **H10**.



Condições reacionais: (a) Etanol, TEA, refluxo por 6 h (50%).

Esquema 33. Obtenção do híbrido **H10**, partindo dos precursores **2** e **14**.

4. Ensaios biológicos

4.1. Resultados da avaliação biológica da série de híbridos H1-H10

Todos os híbridos planejados (**H1-H10**) foram avaliados contra amastigotas e epimastigotas do *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4 LacZ) (**Tabela 2**). Essa cepa foi submetida a modificação genética para expressar a enzima β -galactosidase (gene LacZ de *Escherichia coli*), permitindo a determinação indireta da viabilidade do parasita por meio de um método colorimétrico. Após a ruptura da membrana celular do amastigota, essa enzima é liberada no meio. Ela cliva o β -galactopiranosídeo clorofenol vermelho (CPRG) de cor amarela, resultando em uma molécula de galactose incolor e clorofenol vermelho, que aparece violeta em solução. Essa mudança de cor pode ser medida usando um leitor de placas com uma leitura de absorbância em $\lambda = 570$ nm (BUCKNER *et al.*, 1996; SEEGER; BOOTHROYD, 1996).

Tabela 2. Avaliação biológica dos híbridos **H1-H10** frente às formas amastigotas de *T. cruzi* e citotoxicidade frente a células LLC-MK2 (fibroblastos de rim de macaco).

Compostos	Amastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Tulahuen C2C4-LacZ)	Células LLC-MK2	IS*
	120h	120h	(LLC-MK2)
	CI ₅₀ (μM)		
Piperina 1	18,07 ± 1,24	117,00 ± 6,54	6,47
2	11,04 ± 0,14	33,93 ± 2,83	3,07
H1	2,72 ± 0,63	>200	>73,52
H2	0,20 ± 0,01	27,44 ± 3,03	137,2
H3	7,73 ± 2,30	>100	>12,93
H4	5,70 ± 1,66	>100	>17,54
H5	0,38 ± 0,01	>200	>526,31
H6	4,01 ± 0,30	>200	>48,78
H7	8,23 ± 0,11	>100	>12,15
H8	0,63 ± 0,04	12,84 ± 0,98	20,38
H9	5,56 ± 1,03	>100	>17,98
H10	4,63 ± 0,53	>100	>21,59
Benznidazol**	1,84 ± 0,40	>200	-

*IS = Índice de seletividade = (CI₅₀ LLC-MK2)/(CI₅₀ amastigotas de *T. cruzi*); **fármaco de referência para o *T. cruzi*.

A atividade *in vitro* dos híbridos contra as formas amastigotas do *T. cruzi* foi promissora para todas as moléculas da série, em que algumas delas mostraram valores de CI₅₀ abaixo de 1,0 μM (**H2**, **H5** e **H8**), apresentando resultados superiores ao fármaco de referência. Além disso, é importante destacar o bom índice de seletividade (SI) de até 12 para todos os híbridos, com **H2** e **H5** se destacando como os híbridos mais seletivos da série, com seletividade de 137,2 e 526,31, respectivamente. Esses dados mostram o sucesso da estratégia de hibridização molecular aplicada, uma vez que todos os híbridos apresentaram melhores resultados do que seus precursores, piperina e o derivado triazolo-tiona **2**. Vale ressaltar que **H2**, **H5** e **H8** possuem o mesmo grupo 2-nitroimidazol que o benznidazol e foram mais ativos do que o benznidazol.

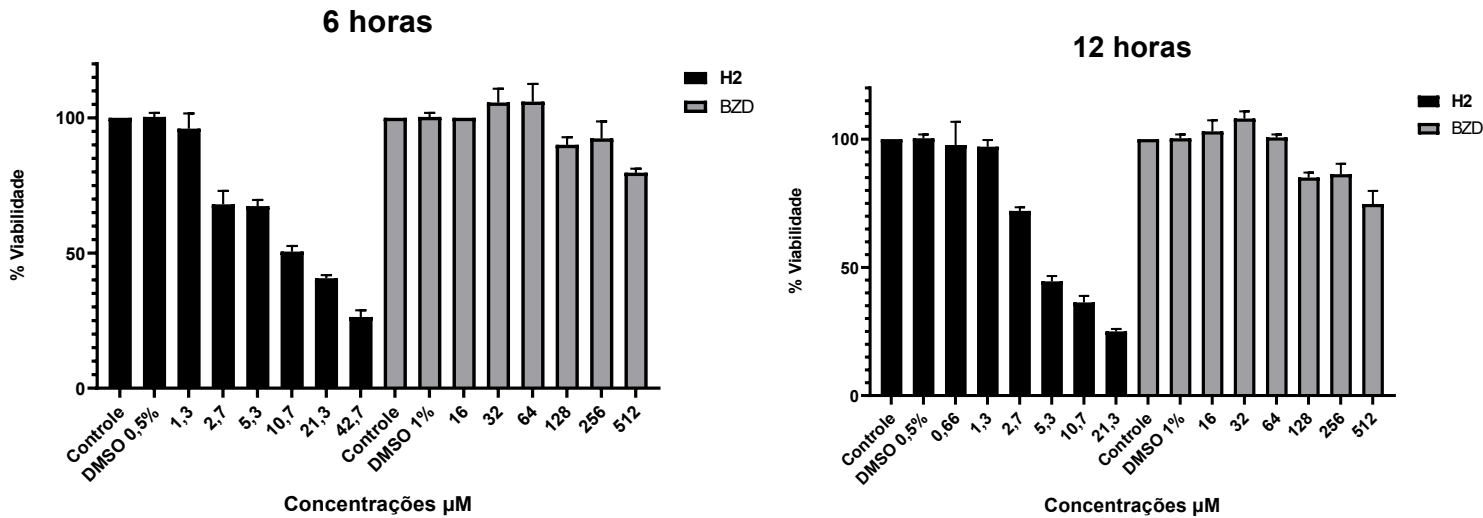
Motivada pelo bom perfil de atividade contra formas amastigotas em um período de 120 horas, a atividade em epimastigotas de *T. cruzi* foi realizada somente com o derivado mais ativo, **H2**, em diferentes tempos de tratamento, com o objetivo de se avaliar a influência do tempo em períodos curtos de exposição do parasita ao tratamento (**Tabela 3**). Os resultados desse estudo cinético mostram que o híbrido **H2** apresenta atividade antiparasitária potente e eficiente em períodos curtos de incubação, após o tratamento contra formas epimastigotas de *T. cruzi*, quando comparado ao benznidazol, como

mostram os gráficos na **Figura 9**. Em curtos períodos de 6 e 12 horas o **H2** apresenta valores de CI_{50} muito bons, enquanto o benznidazol não apresenta atividade, mesmo em concentrações muito mais altas. Este resultado pode ser compreendido, uma vez que o benznidazol precisa ser bioativado, através da redução pela TcNTR, que ocorre dentro da célula do parasita, para então se tornar ativo contra o *T. cruzi*, já que seu mecanismo de ação é bem estabelecido e amplamente discutido (PATTERSON; WYLLIE, 2014a).

Tabela 3. Estudo cinético da atividade do híbrido **H2** em diferentes períodos de incubação após tratamento, em epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4 LacZ).

Compostos	6h	12h	24h	48h	7 d
	IC₅₀ (μM)				
H2	11.08 ± 2.47	6.99 ± 2.09	1.85 ± 0.41	1.12 ± 0.26	0.54 ± 0.16
Benznidazol*	>500	>500	50.88 ± 7.75	30.53 ± 6.58	2.71 ± 0.32

*fármaco de referência para o *T. cruzi*.



fração nitroimidazólica dos híbridos estarem atuando como “pró-farmaco”. Uma vez que esses farmacóforos ao serem “ativados”, geram intermediários tóxicos para o *T. cruzi*, que podendo causar danos intracelulares irreversíveis, com formação de ligações covalentes a macromoléculas, como proteínas e fragmentos de DNA (HALL; WILKINSON, 2012; KEDDERIS; MIWA, 1988; PATTERSON; WYLLIE, 2014b; PÉREZ MONTILLA *et al.*, 2023; TROCHINE *et al.*, 2014). Embora todos os híbridos apresentaram perfil de atividade relevante, destaca-se a melhora do perfil de atividade dos híbridos que ostentam o grupo nitro na posição 2 do anel imidazólico, com alto perfil de seletividade e potência antichagásica superior ao benznidazol. Essa melhora no perfil de atividade comparação com a atividade de seus precursores indica que a estratégia de hibridização molecular se mostrou eficaz para alguns híbridos, aumentando principalmente a seletividade dessa série.

Como o **H2** se mostrou eficaz, mesmo em períodos curtos de tratamento frente ao parasito, esse híbrido foi selecionado para ser avaliado *in vitro* frente a células primárias de camundongo. Essa etapa foi interessante para avaliar sua segurança em modelos celulares mais fidedignos, nas quais o **H2** mostrou baixa toxicidade, mesmo nas maiores concentrações testadas, tanto em macrófagos peritoneais quanto em esplenócitos totais nos períodos de tratamento avaliados, como pode ser visualizado na **Figura 10**, abaixo. Esses resultados evidenciam que o híbrido apresenta baixa toxicidade em modelos de células primárias, o que estimula um posterior estudo de um ensaio de infecção *in vivo*.

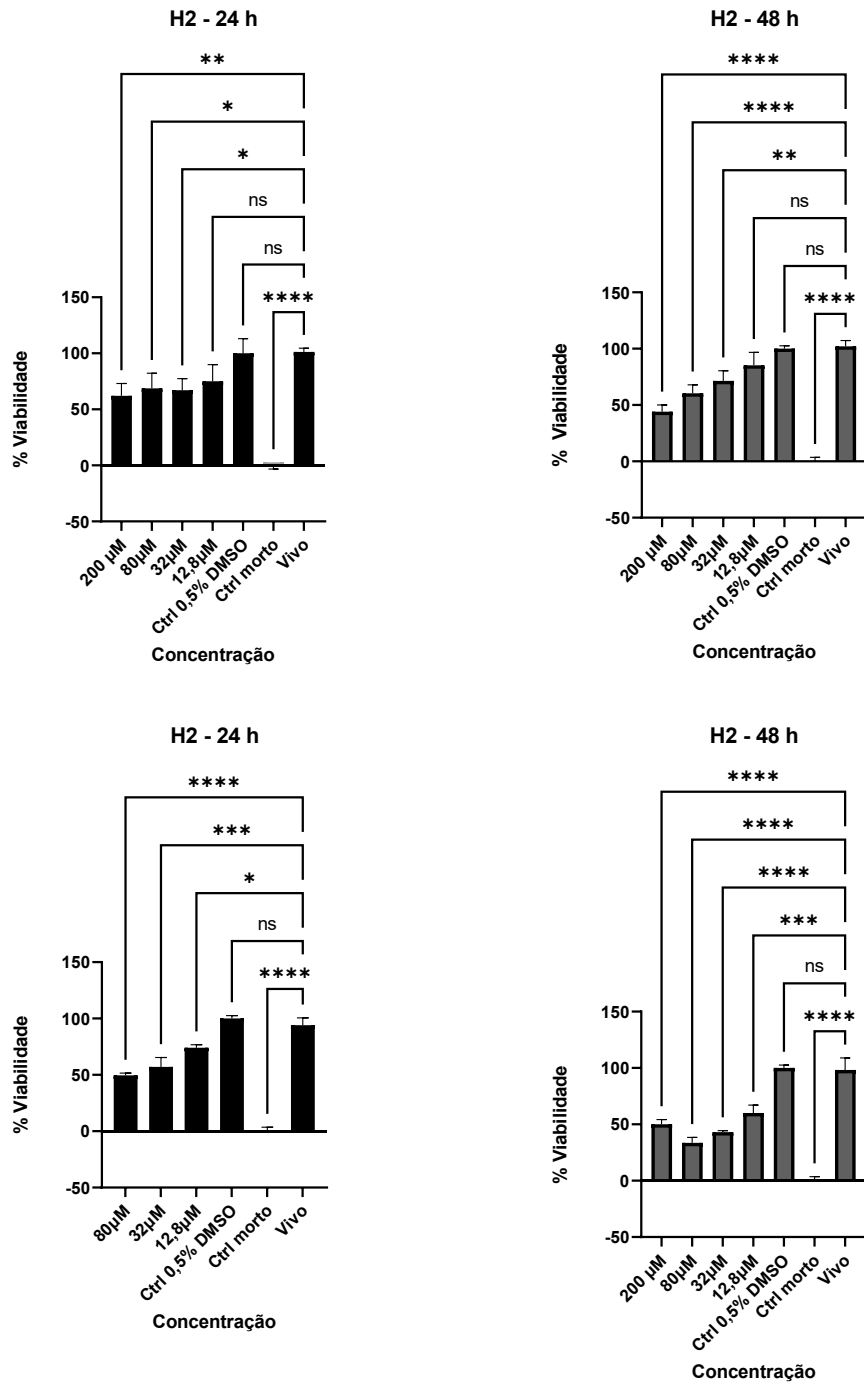


Figura 10. (A) Gráficos de viabilidade de H2 frente a macrófagos peritoneais nos períodos de 24 e 48 horas de tratamento (2×10^5 macrófagos/poço). (B) Gráficos de inibição de H2 frente a esplenócitos totais nos períodos de 24 e 48 horas de tratamento (2×10^5 esplenócitos/poço). As diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes concentrações de tratamentos em relação ao vivo (controle não tratado) são representadas por linhas de conexão e ns (não significativo), * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$).

Um aspecto relevante dos resultados obtidos neste trabalho é a possibilidade de correlacionar, de forma preliminar, as atividades desses híbridos com o potencial de redução de cada porção de nitroimidazólica presente na estrutura dos híbridos, de forma comparativa. Espera-se que haja influência da posição do grupo nitro no perfil de atividade, uma vez que, dependendo de suas posições no anel imidazólico, a molécula apresenta diferentes potenciais de redução e, conseqüentemente, variada reatividade intracelular. A posição do substituinte nitro pode interferir diretamente no mecanismo das nitro-reduções conduzidas pelas TcNTRs intracelulares, que são as principais vias de ação desse grupo farmacofórico nitro-heterocíclico, somadas aos danos causados às macromoléculas biológicas, como proteínas e DNA, pelos metabólitos reduzidos gerados (EDWARDS, 1980; MAYA *et al.*, 2003; MORETH *et al.*, 2010; PATTERSON; WYLLIE, 2014a; SMITH; EDWARDS, 1995). Assim, observa-se uma tendência na série de híbridos sintetizados, na qual as estruturas com maiores potências contra o *T. cruzi* apresentam o farmacóforo nitroimidazol com o grupo nitro na posição 2 do anel, em comparação com os híbridos correspondentes, com o grupo nitro nas posições 4 e 5 do anel imidazólico. Smith e Edwards (1995) discutem essa tendência em seu trabalho, no qual relacionam os potenciais de redução mais altos de derivados 2-nitroimidazólicos (-418 mV) à sua maior atividade contra *Helicobacter pylori*, e atividades menores em potenciais de redução mais baixos, como os nitroimidazóis com o grupamento nitro nas posições 4 e 5 (que apresentam potenciais de redução de -527 mV e -486 mV, respectivamente). Este mesmo tipo de comportamento, provavelmente, poderia estar ocorrendo nesse caso com o *T. cruzi* (SMITH; EDWARDS, 1995). Ao comparar as atividades de **H1** e **H2** com **H3** e **H4**, observa-se que há uma grande disparidade, em que **H2** apresenta uma atividade consideravelmente maior do que as demais de mesmo tamanho de cadeia metilênica; ambos diferem entre si apenas na porção nitroimidazol da estrutura (posição do grupo nitro no anel heterocíclico). Essa maior atividade pode estar diretamente relacionada ao maior potencial de redução, conforme explicado anteriormente. Essa mesma tendência é observada quando se comparam as atividades de híbridos com o mesmo tamanho de cadeia metilênica, que diferem entre si apenas na posição do grupo nitro no núcleo imidazólico, e observa-se que, para todos os tamanhos de cadeia, o mais ativo continua sendo o composto contendo o grupo farmacofórico 2-nitroimidazol, que também está presente na estrutura do benznidazol, fármaco de referência para a doença de Chagas.

Visto as semelhanças biológicas e bioquímicas entre *T. cruzi* e *T. brucei*, é importante se destacar o investimento de terapias antiparasitárias de amplo espectro. Esses parasitos compartilham de muitos alvos moleculares em comum e vias bioquímicas similares, além de terem como principais armas de suas terapias antiparasitárias fármacos nitro-heterocíclis, muitos deles com atividade em ambos, como o fexinidazol e o nifurtimox (MAZZETI *et al.*, 2021). Com isso, destaca-se a importância de avaliar esses híbridos que se mostraram promissores *in vitro* frente ao *T. cruzi* frente a outro tripanossomatídeo de grande interesse clínico que, até hoje, assim como o *T. cruzi*, não conta com um tratamento adequado e seguro, o *T. brucei*. Na **Tabela 4**, abaixo, estão dispostos os resultados de **H1-H10** frente às formas tripomastigotas “*bloodstream*” de *T. b. brucei* (cepa 427), bem como em macrófagos RAW-264.7 e células embrionárias de rim humano HEK-293.

Tabela 4. Avaliação biológica dos híbridos **H1-H10** frente às formas tripomastigotas de *T. b. brucei*.

Compostos	<i>T. brucei</i> <i>brucei</i> 24h	<i>T. brucei</i> <i>brucei</i> 48h	HEK-293 48h	RAW-264.7 48h	IS* (HEK)	IS** (RAW)
CI ₅₀ (μM)						
Piperina	-	26.16 ± 6.39	30.58 ± 4.19	>125	1.16	4.77
2	-	5.97 ± 1.86	14.41 ± 1.73	82.21 ± 4.25	2.41	13.77
H1	-	2.67 ± 1.43	94.12 ± 6.39	>125	35.25	46.81
H2	0.322 ± 0.006	0.20 ± 0.06	32.82 ± 1.03	98.53 ± 7.47	164.10	492.65
H3	-	5.88 ± 1.50	>125	>125	21.25	21.25
H4	-	6.28 ± 1.80	57.60 ± 5.37	>125	9.17	19.90
H5	1.172 ± 0.167	1.21 ± 0.60	>125	>125	103.30	103.30
H6	-	7.64 ± 2.23	68.10 ± 7.16	97.02 ± 2.50	8.90	12.69
H7	-	4.54 ± 4.41	>125	>125	27.53	27.53
H8	-	1.56 ± 0.38	9.51 ± 1.78	26.89 ± 1.83	6.09	17.23
H9	-	3.71 ± 2.63	49.76 ± 7.70	>125	13.41	33.69
H10	-	5.17 ± 2.59	21.8 ± 0.14	86.45 ± 7.19	4.21	16.72
Fexinidazol[#]	-	1.2 ± 0.51	-	-	-	-

IS* = Índice de seletividade = (CI₅₀ HEK-293)/(CI₅₀ *T. brucei brucei* 48h); IS** = Índice de seletividade = (CI₅₀

RAW-264.7)/(CI₅₀ *T. brucei brucei* 48h); [#] fármaco de referência para o *T. brucei*.

Todos os híbridos foram avaliados contra o *T. b. brucei* e mostraram um perfil de atividade muito semelhante à atividade anteriormente exibida contra o *T. cruzi*, com toda a série apresentando bons resultados, comparáveis ao fármaco de referência, em

comparação com o fármaco de referência fexinidazol (estrutura número **3** da introdução), que possui em sua estrutura um anel imidazólico nitrado na posição 5. Na avaliação *in vitro* frente a tripomastigotas de *T. brucei*, destaca-se o híbrido **H2**, que apresentou valor de CI_{50} abaixo de 1,0 μM , apresentando-se mais potente do que o fármaco de referência, o fexinidazol (**Tabela B**), nesse modelo *in vitro*. O índice de seletividade em dois modelos diferentes de células de mamíferos foi muito promissor, com destaque para **H2** e **H5**, que apresentaram SI entre 103 e 492, dependendo do tipo celular avaliado.

5. Afinidade de ligação entre albumina e H2

Dentre os novos derivados híbridos de piperina, do tipo 1,2,4-triazol-3-tioalquil-nitroimidazol (**H1-H10**) sintetizados e avaliados nesta tese, que apresentaram perfis antiparasitários relevantes, o híbrido **H2** foi selecionado como modelo para estudar as interações com a albumina sérica humana (ASH), a principal proteína globular da corrente sanguínea humana, responsável pela distribuição de vários compostos endógenos e exógenos (PITASSE-SANTOS *et al.*, 2022). Além disso, em trabalho recente, Zhao (2025) descreve a importância do estudo das interações de novos hits com ASH, em etapas preliminares do desenvolvimento de fármacos, pois essa análise permite demonstrar, de forma estratégica, a possibilidade de interações favoráveis às proteínas plasmáticas, especialmente a albumina, o que pode ajudar a prever a possibilidade de êxito nas etapas seguintes, como na análise *in vivo*. Trazendo dados significativos quanto a segurança e eficácia dessa nova entidade, reforçando assim seu papel como fator crítico na etapa de planejamento de candidatos à fármacos.

A análise qualitativa preliminar sobre a ligação ASH:**H2** foi realizada por espectroscopia de absorção de UV. A **Figura 11A** mostra a absorção de UV da albumina sem e na presença de **H2** na concentração mais alta usada na análise de fluorescência de estado estável (**Figura 11B**). Nesse caso, há um aumento na absorção na faixa de 265-300 nm (transição $n-\pi^*$), que é atribuído à ligação do **H2** à albumina. No entanto, para avaliar se o efeito hipercrômico observado é de fato uma consequência da interação ASH:**H2**, e não simplesmente uma contribuição da absorção híbrida, o espectro de absorção de ASH:**H2** foi subtraído pelo sinal de **H2**, resultando na mesma tendência detectada anteriormente, indicando uma associação de estado fundamental. Esse tipo de associação foi reforçado pela análise de fluorescência em estado estacionário, na qual os

valores da constante de taxa de extinção bimolecular (k_q) (**Tabela 5**) são cerca de 10.000 vezes mais altos do que a constante de taxa de difusão máxima na água ($k_{diff} \approx 7,40 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 298K, de acordo com a teoria de Smoluchowski-Stokes-Einstein), concordando com os valores médios de tempo de vida da fluorescência ($\tau_{\text{médio}}$) bastante semelhantes entre ASH livre e ASH:H2 (**Tabela 5** e **Figura 11C**) (MONTALTI *et al.*, 2006). A associação adicional ao estado fundamental (mecanismo de extinção de fluorescência estática) foi reforçada pelas diferenças nos gráficos de Stern-Volmer com base em dados de fluorescência de estado estável (F_0/F , gráficos lineares com valores superiores à unidade) e dados de fluorescência resolvidos no tempo (τ_0/τ , todos os valores próximos à unidade) (**Figura 11D**). Como um mecanismo estático está envolvido na extinção da fluorescência da albumina por H2, os valores da constante de extinção de Stern-Volmer (K_{SV}) podem estimar a afinidade de ligação (**Tabela 5** e **Figura 11D**) (CHAVES, OTÁVIO A. *et al.*, 2024; MORENO *et al.*, 2022). Os valores de K_{SV} obtidos estão na faixa de 10^4 a 10^5 M^{-1} (**Tabela 5**), o que significa um perfil interativo moderado que pode resultar em uma concentração viável de H2 na corrente sanguínea humana (CHAVES, OTÁVIO A. *et al.*, 2016; NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013).

De acordo com a análise de Ross e Subramanian, o sinal e a magnitude dos parâmetros termodinâmicos, ou seja, as alterações de entalpia (ΔH°) e entropia (ΔS°) são importantes para determinar as forças de interação envolvidas nas interações proteína-ligante (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981). Nesse sentido, foi realizada a análise de van't Hoff (**Figura 11E**), e o $\Delta S^\circ = 0,173 \pm 0,013 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ e o $\Delta H^\circ = 35,1 \pm 4,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ (**Tabela 5** e **Figura 11E**) obtidos podem ser relacionados às forças hidrofóbicas e ao processo de dessolvatação. Dessa forma, a espontaneidade ($\Delta G^\circ < 0$, **Tabela 5**) da associação ASH:H2 é apenas orientada entalpicamente (CHAVES, OTÁVIO AUGUSTO *et al.*, 2016). Por fim, a análise estrutural do dicroísmo circular (CD) mostra que o H2 se liga à albumina sem perturbar significativamente o conteúdo da estrutura secundária da biomacromolécula (**Figura 11F e 11G**) (CHAVES, OTÁVIO AUGUSTO *et al.*, 2017). É importante destacar que a albumina tem três principais locais de ligação viáveis: subdomínio IIA (local I), subdomínio IIIA (local II) e subdomínio IB (local III) nos quais a varfarina, o ibuprofeno e a digitoxina se ligam seletivamente, respectivamente. Para identificar o principal local de ligação do H2 à albumina, foram realizados ensaios de deslocamento de drogas sem e na presença de varfarina, ibuprofeno ou digitoxina (**Figura 11H**). Conforme mostrado na **Figura 11I**, o valor de KSV para

ASH:**H2** diminuiu em cerca de 20,3% na presença de digitoxina, indicando que o subdomínio IB é a principal bolsa de ligação ao **H2**. Provavelmente, o local III foi detectado como a principal bolsa de ligação ao híbrido devido ao alto volume estrutural desse composto, o que está de acordo com o tipo de conteúdo estrutural dos compostos que se ligam ao subdomínio IB, por exemplo, porfirinas, ftalocianinas, corolas e doxorubicina (CHAVES, OTÁVIO AUGUSTO *et al.*, 2020; ZSILA, 2013).

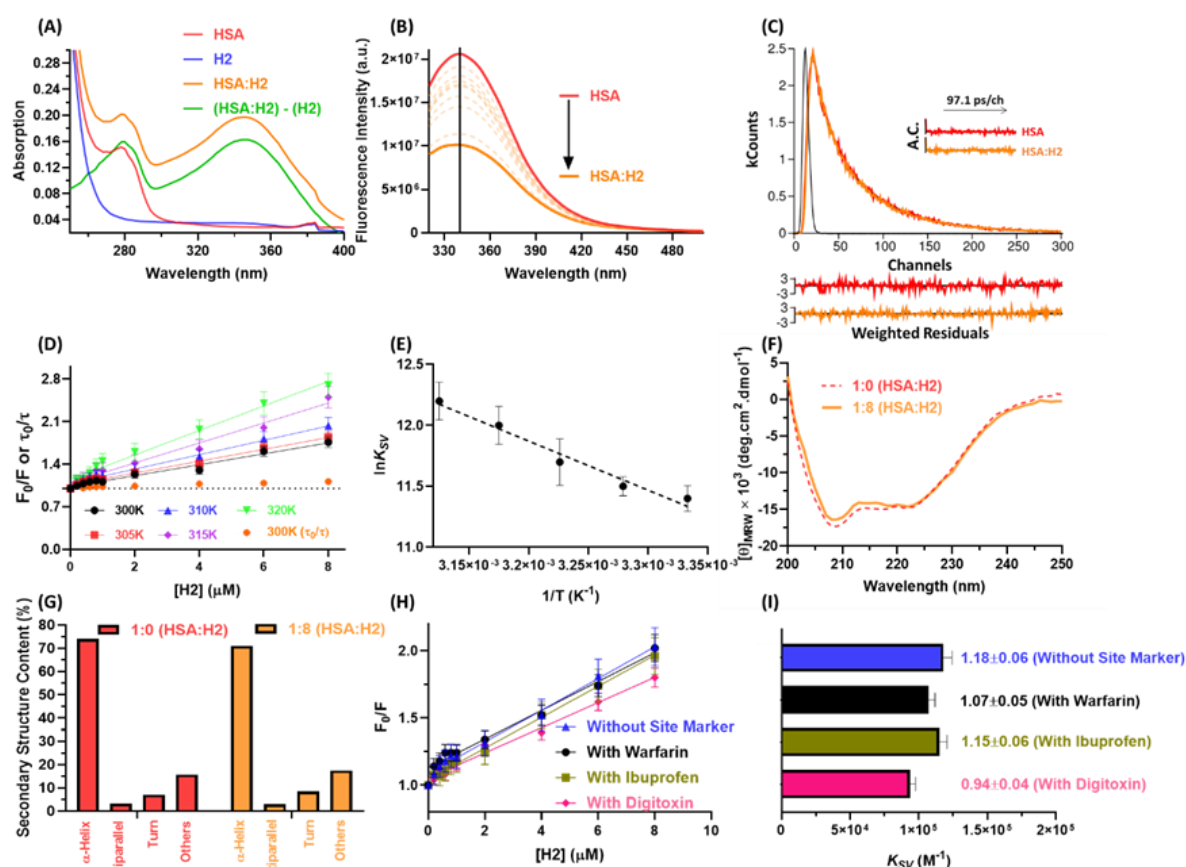


Figura 11. (A) Espectros de absorção de UV para ASH (4,0 μM) sem e na presença de **H2** na concentração máxima de ligante usada na análise de fluorescência em estado estacionário (8,0 μM). (B) Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) para ASH sem e após adições sucessivas de **H2** (0,2, 0,4, 4,0, 6,0 e 8,0 μM) a 310K. 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 μM) a 310K. (C) Decaídas de fluorescência resolvidas no tempo para ASH (4,0 μM) sem e com **H2** sob a concentração mais alta de **H2** usada na análise de fluorescência em estado estável a 300K. (D) Gráficos de Stern-Volmer para a interação ASH:**H2** em PBS. (E) Gráfico de Van't Hoff com base nos valores de K_{SV} para ASH:**H2**. (F) Os espectros de CD para ASH sem e com **H2** (proporções 1:0 e 1:8). (G) Conteúdo da estrutura secundária (%) de ASH livre e

ASH:**H2**. (H) Gráficos de Stern-Volmer para ASH:**H2** sem e com os marcadores de local warfarina, ibuprofeno ou digitoxina a 310K. (I) Os valores de K_{SV} para ASH:**H2** sem e na presença de cada marcador de local a 310K.

Tabela 5. Parâmetros de fluorescência de estado estável para a ligação ASH:**H2** em cinco temperaturas diferentes e parâmetros de fluorescência resolvidos no tempo para a ligação ASH:**H2** em diferentes concentrações híbridas a 300K.

T (K)	Fluorescência em estado estacionário					Fluorescência resolvida no tempo					
	K_{SV} ($\times 10^4$) (M^{-1})	k_q ($\times 10^{13}$) ($M^{-1}s^{-1}$)	ΔH° ($kJ\ mol^{-1}$)	ΔS° ($kJ\ mol^{-1}\ K^{-1}$)	ΔG° ($kJ\ mol^{-1}$)	[H2] (μM)	τ_1 (ns)	Rel. %	τ_2 (ns)	Rel. %	$\tau_{média}$ (ns)
300	8,70 $\pm$ 0,47	1,66 $\pm$ 0,09	35,1 $\pm$ 4,1	0,173 $\pm$ 0,013	-16,7	0,0	1,50	17,0	5,99	83,0	5,23
305	9,75 $\pm$ 0,44	1,86 $\pm$ 0,08			-17,6	0,2	1,40	20,6	5,80	79,4	4,89
310	11,8 $\pm$ 0,64	2,26 $\pm$ 0,12			-18,4	0,4	1,41	15,3	5,87	84,7	5,19
315	16,4 $\pm$ 0,94	3,14 $\pm$ 0,18			-19,3	0,6	1,38	15,5	5,77	84,5	5,09
320	20,2 $\pm$ 0,96	3,85 $\pm$ 0,18			-20,2	0,8	1,61	18,4	5,87	81,6	5,09
						1,0	1,37	16,1	5,78	83,9	5,07
						2,0	1,52	18,5	5,82	81,5	5,02
						4,0	1,45	18,5	5,63	81,5	4,86
						6,0	1,48	20,0	5,64	80,0	4,81
						8,0	1,58	22,9	5,62	77,1	4,69

6. Estudo *in silico*

6.1. Succinato desidrogenase (TcSDH)

6.1.1. Modelagem de TcSDH e refinamento estrutural

A modelagem individual de todas as subunidades de TcSDH teve êxito e os dados de avaliação dos modelos obtidos por modelagem comparativa no servidor Swiss-Model se encontram no material em anexo (**Tabela S1**). As métricas de qualidade assumiram valores adequados e os critérios de pontuação Z-QMEAN estimam modelos individuais com alta confiança.

Como a subunidade TcSDHB apresenta uma conformação heterodimérica totalmente distinta das subunidades SDHB de outras espécies (MORALES *et al.*, 2009), foi necessária a utilização do servidor PHYRE2 para explorar um método que combina a modelagem comparativa com a modelagem *ab initio*. A subunidade TcSDHB foi

modelada com alto grau de confiança (>90% na estimativa global) e apresentou 92% de cobertura com o molde principal (**Tabela S2** no material em anexo). Devido à sua conformação singular, o servidor PHYRE² empregou moldes adicionais para regiões que não se alinharam adequadamente ao molde principal e secundário, cuja modelagem alcançou 100% de confiança e identidade de sequência de aproximadamente 49%, valor considerado satisfatório para modelos de alta precisão, conforme os critérios estabelecidos na literatura (>30%) (PEARSON, 2013; XIANG, 2006). Além disso, treze outros moldes foram utilizados para refinar segmentos inicialmente não cobertos, garantindo quase 100% de cobertura estrutural nas regiões modeladas. Importante destacar que as regiões funcionais, como o sítio de ligação da ubiquinona (Qp) e dos três aglomerados de ferro-enxofre, foram modelados com alta confiança. Além disso, as predições de estrutura secundária estiveram em concordância com os moldes utilizados, e a análise de conservação de resíduos revelou alto grau de conservação nas regiões catalíticas.

A resolução dos conflitos estéricos após a montagem e união das subunidades individuais de TcSDH foi precedida da minimização de energia com simulações curtas de dinâmica molecular discreta (**Tabela S3** no material em anexo).

A avaliação das métricas de qualidade indica que o modelo construído se apresenta viável para a docagem dos ligantes com segurança, pois evidencia ótima conservação e confiança, principalmente, dos resíduos necessários para a catálise proteica e críticos para a interação com os ligantes, especialmente os que constituem os sítios ativos dicarboxilato e ubiquinona (Qp).

6.1.2. Estudo de docagem para os novos híbridos

Os perfis de interação para os ligantes híbridos (**H1-H10**) no sítio dicarboxilato indicam poses quase sobrepostas (RMSD = 0,987 Å), com uma complementaridade volumétrica e estrutural notável, ocupando toda a extensão do sítio ativo (**Figura 12B**). Todos os grupos nitroimidazóis se encontram orientados para o sentido da tríade catalítica (Arg413, Ala416 e Arg301), exercendo as interações mais relevantes por meio de ligações de hidrogênio com esses resíduos, principalmente (**Figura 12B** e **Figura 13**). Apenas o anel ciclohexil de **H3**, **H6** e **H7** estão orientados, em uma pose, de forma invertida aos demais ligantes híbridos, em uma interação hidrofóbica com Ile422 ao invés de

exercer a mesma interação com His61, Ala64, His368 e Ala65, como no caso dos outros ligantes da série.

Comparativamente, também foram avaliados os perfis de interação para a piperina, **2** e o benznidazol. Além de não apresentarem interações com a tríade catalítica, a pose para esses ligantes descreve interações com resíduos de aminoácidos da parte central do sítio dicarboxilato, com enfoque para as ligações de hidrogênio com Ser418, Ala31, Ser34, Glu402 e Thr62 (**Figura 13**). Como precursores estruturais, a piperina e **2** conservaram uma pose de interação parcial em relação aos híbridos **H1-H10** (**Figura 12A**).

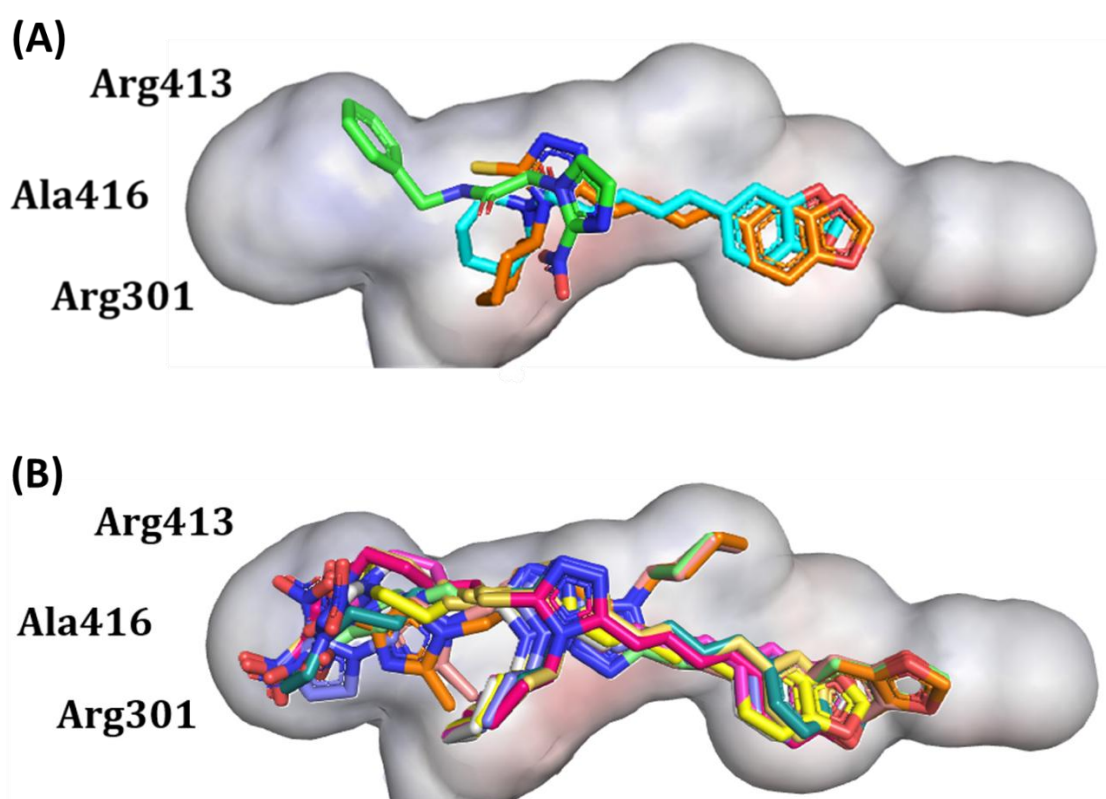
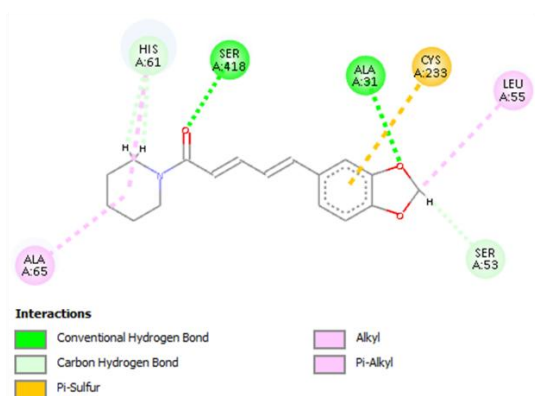
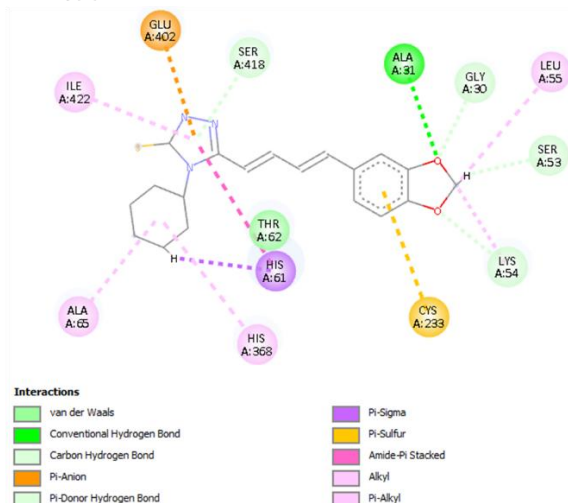


Figura 12. Secção longitudinal da superfície de interação do sítio dicarboxilato de TcSDH (contorno e fundo em cinza) evidenciando a pose de interação para os ligantes (A) piperina (átomos de carbono em ciano), **2** (átomos de carbono em laranja), benznidazol (átomos de carbono em verde) e (B) **H1-H10**. Átomos de hidrogênio ocultados para melhor visualização. A posição dos resíduos Arg301, Ala416 e Arg413, que constituem a tríade catalítica, está demarcada na figura. Figura gerada com o programa PyMOL 3.1 (Schrödinger, LLC).

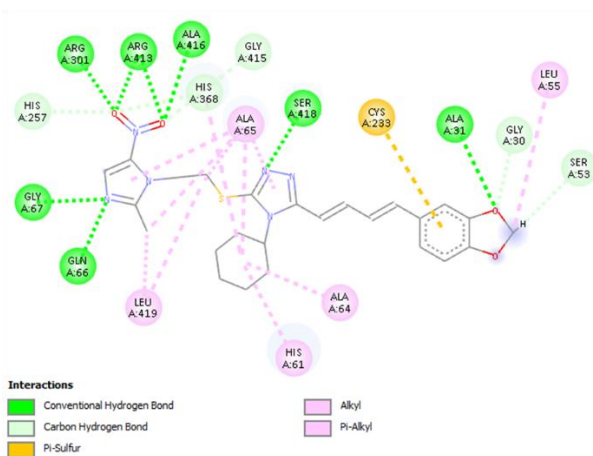
Piperina



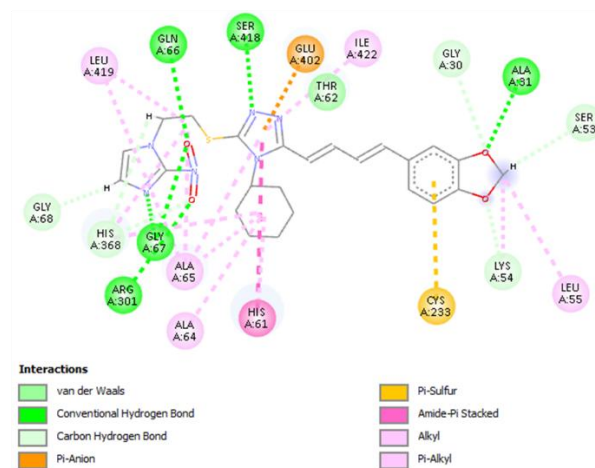
TRI-Cy(2)



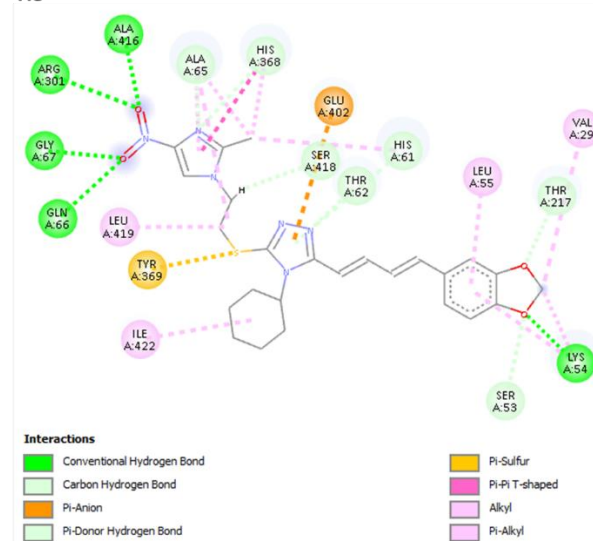
H1



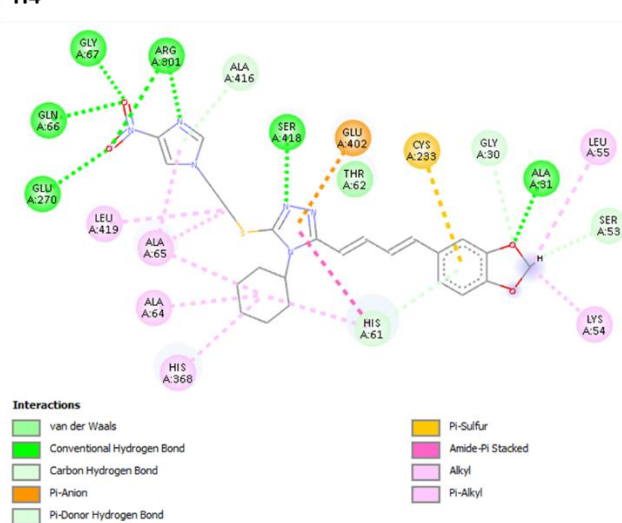
H2



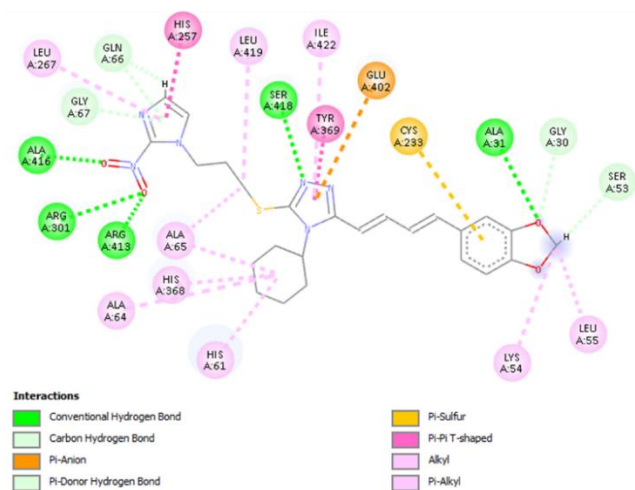
H3



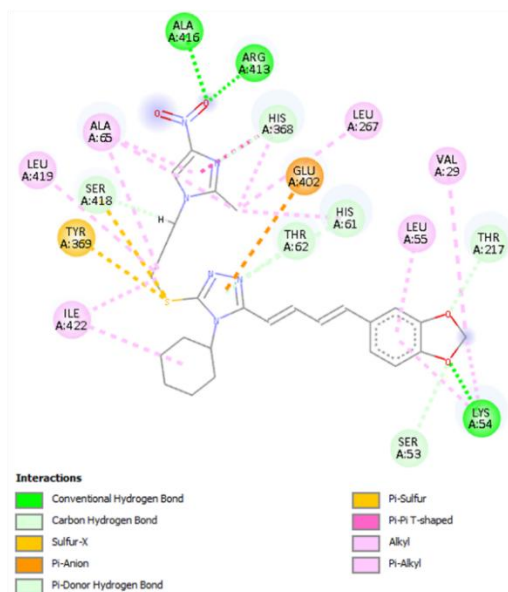
H4



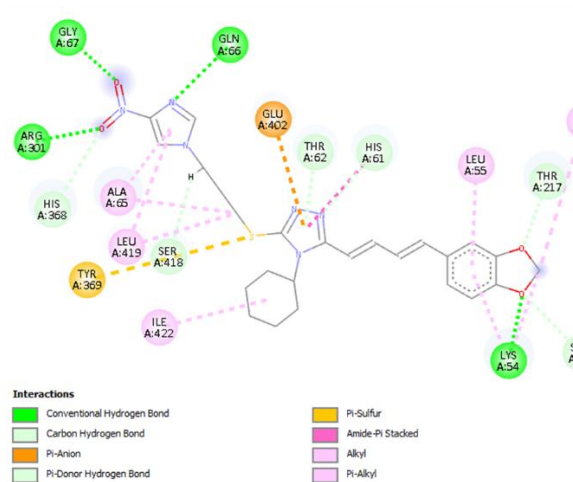
H5



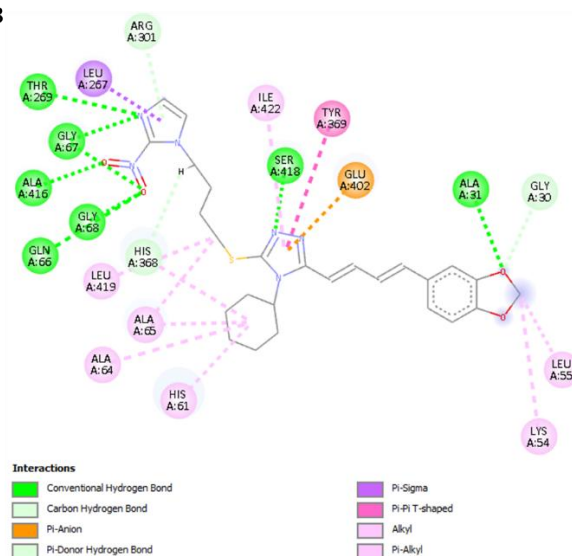
H6



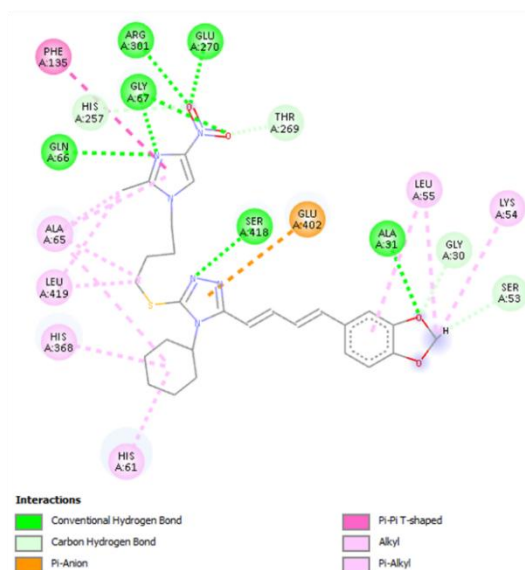
H7



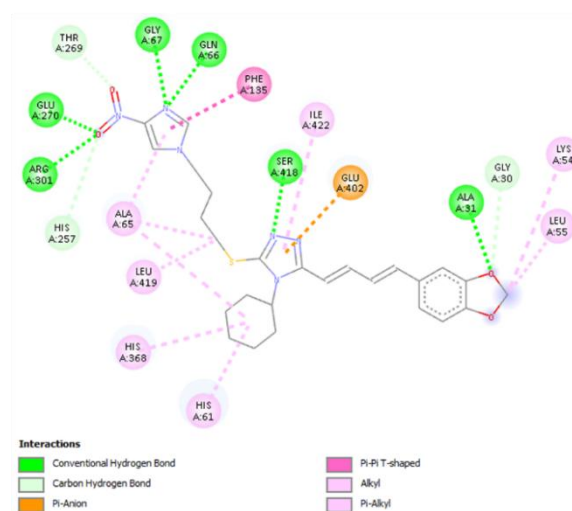
H8



H9



H10



Benzonidazol

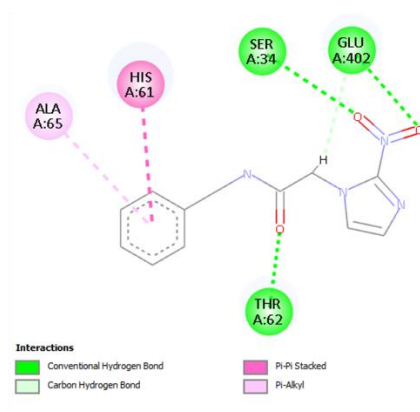


Figura 13. Interações com visualização bidimensional dos ligantes piperina, **2**, **H1-H10** e benznidazol no sítio dicarboxilato de TcSDH. Interações obtidas após a reotimização dos complexos com o método semiempírico PM7. Figura gerada com o programa Discovery Studio 25.1.0.24284 (Dassault Systèmes).

A capacidade dos compostos de estabelecer muitas interações com TcSDH deve-se, em parte, à estratégia de hibridização molecular que conferiu aos compostos meios de usufruir de toda a extensão do sítio dicarboxilato. Posicionado no centro do sítio ativo, é previsto que o grupo triazol de **H1-H10** realiza ligações de hidrogênio com Ser418, empilhamento amida- π com His61 e empilhamento π com Tyr369 (**Figura 13**). A interação do tipo ânion- π com Glu402 destacada pelo programa Discovery Studio deve ser tratada com cautela, visto que esse tipo de interação só é esperado ocorrer com anéis aromáticos deficientes em elétrons, o que não deve ser o caso aqui. Uma limitação do programa é que as interações são identificadas por ele a partir de critérios puramente geométricos, sem levar em consideração os aspectos eletrônicos das interações.

Enquanto o grupo nitroimidazol dos híbridos interage com Arg413, Ala416 e Arg301, beneficiando-se da região com o maior perfil de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, o grupo benzodioxola está posicionado na zona de caráter mais aromático do sítio ativo, mas participando de ligações de hidrogênio com Ala31 e Lys54 (**Figura 13**).

Revelado pelas poses de docagem, a modificação do número de carbonos nos espaçadores metileno parece não ter efeito relevante no modo de interação de **H1-H10**, visto que os maiores espaçadores sofrem uma torção significativa para permitir a

aproximação do grupo nitroimidazol com a tríade catalítica (**Figura 12B**). O efeito da posição do grupo farmacofórico 2-nitroimidazol dos ligantes **H2**, **H5** e **H8**, foi perceptível ao verificar que a geometria das ligações de hidrogênio era favorecida por uma orientação mais refinada e distâncias de ligação menores, principalmente, em relação a Arg413, Ala416 e Arg301.

Nas melhores poses obtidas para **H1-H10**, todos os descritores energéticos para a interação com o sítio dicarboxilato (**Tabela 6**) são superiores aos do ligante de referência fumarato (**Tabela S5** no material em anexo). Ademais, é notável que as entalpias de interação calculadas (ΔH_{int}) para os ligantes com atividade *in vitro* mais promissora (**H2**, **H5** e **H8**) são as que detêm de valores mais favoráveis. Nesse conjunto de dados, os outros descritores de interação não conseguiram refletir precisamente a qualidade das interações, mas todos evidenciaram uma maior afinidade de **H1-H10** em TcSDH quando comparado a piperina e **2**.

Tabela 6. Descritores de interação calculados para a pose dos ligantes piperina, **2**, **H1-H10** e benznidazol no sítio dicarboxilato de TcSDH.

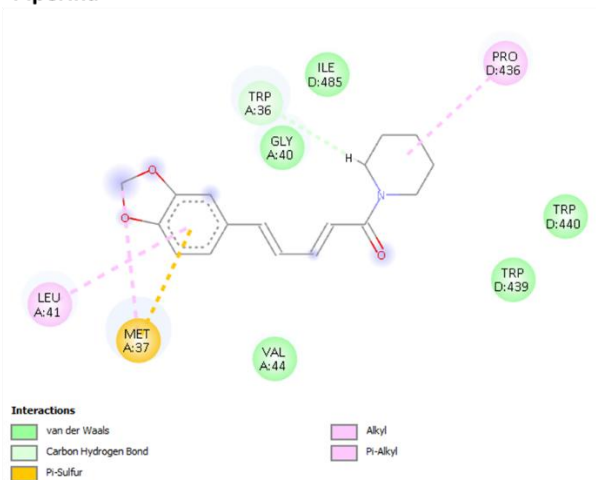
Ligantes	Pontuação de docagem (ChemPLP)	Pontuação normalizada	ΔH_{int} (kcal/mol)	ΔG_{bind} (kcal/mol)
Piperina	69,93	25,34	-25,73	-9,26
2	68,74	23,50	-37,42	-11,77
H1	102,98	31,18	-53,68	-18,35
H2	103,02	31,49	-57,73	-18,19
H3	106,80	32,34	-43,80	-18,45
H4	109,42	33,45	-50,44	-17,70
H5	91,52	27,71	-56,92	-19,28
H6	95,12	28,54	-47,96	-18,83
H7	87,11	26,38	-41,64	-19,15
H8	89,72	26,92	-56,12	-20,01
H9	93,94	27,94	-49,82	-18,16
H10	97,82	29,35	-48,57	-18,43
Benznidazol	62,60	23,45	-51,38	-8,55

A análise das melhores poses obtidas para **H1-H10** no sítio ubiquinona (Qp) de TcSDH revela uma sobreposição muito efetiva (RMSD = 0.993 Å). Assim como no sítio dicarboxilato, os ligantes adotaram uma conformação muito complementar à superfície do sítio catalítico (**Figura 15B**). Os grupos nitroimidazol, triazol e ciclohexil se encaixaram dentro da cavidade de ligação principal e foram responsáveis por exercer as

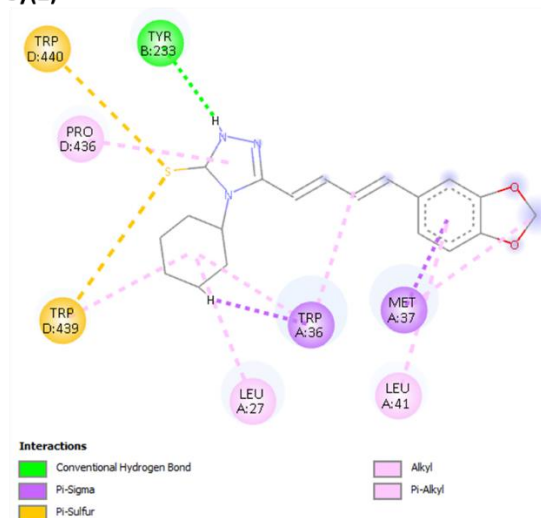
principais interações que o ligante de referência realiza com esse sítio ativo, com enfoque para a interação com Trp440, Tyr233, Trp36 e Arg43.

Paralelamente, os perfis de interação para a piperina, **2** e benznidazol evidenciam interações parciais ou integrais com esses mesmos resíduos (**Figura 14**). Enquanto o benznidazol se encaixa completamente na cavidade principal de ligação, a piperina e **2** conservaram uma pose de interação parcial em relação aos híbridos **H1-H10** (**Figura 15A**). As interações mais relevantes realizadas pela piperina e **2** são relativamente mais fracas, quando comparadas às do benznidazol e da série de ligantes híbridos, podendo citar interações com Met37, Trp440, Trp439 e Trp36. Somente uma ligação de hidrogênio foi averiguada entre o anel triazol de **2** e Tyr233. Em contrapartida, o benznidazol interage fortemente com o sítio ubiquinona por meio de ligações de hidrogênio com Ser39, Gln437, Tyr233 e Trp440, e ainda por meio de empilhamento π com Trp36 e cátion- π com Arg43 (**Figura 14**).

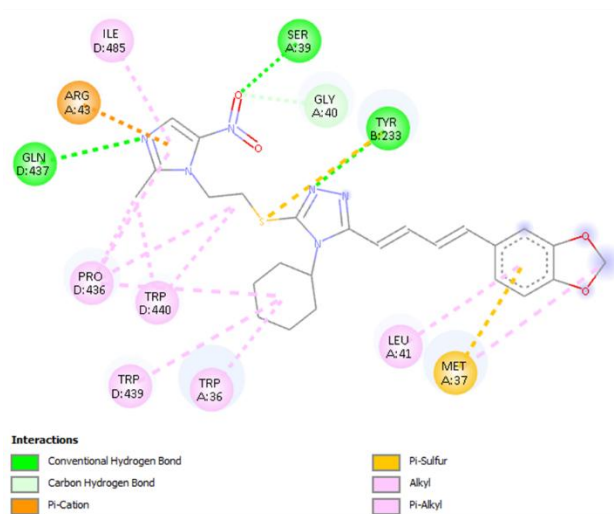
Piperina



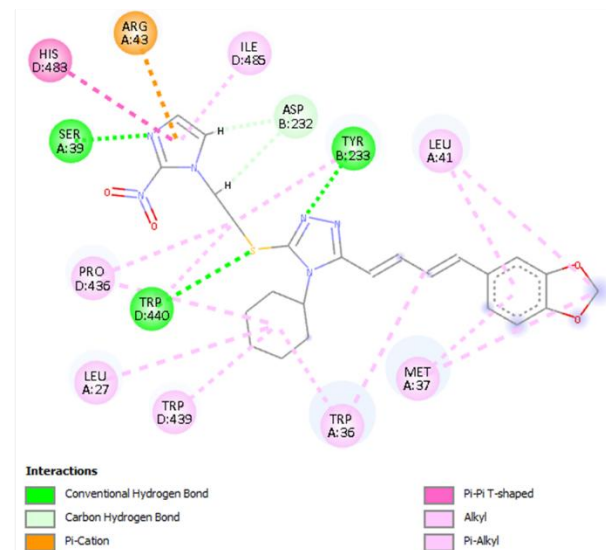
TRI-Cy(2)



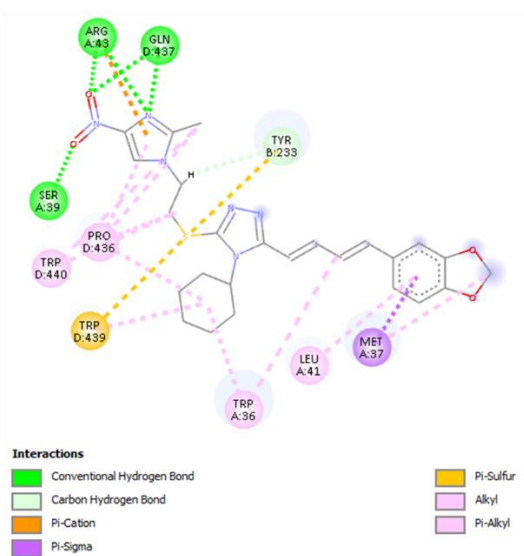
H1



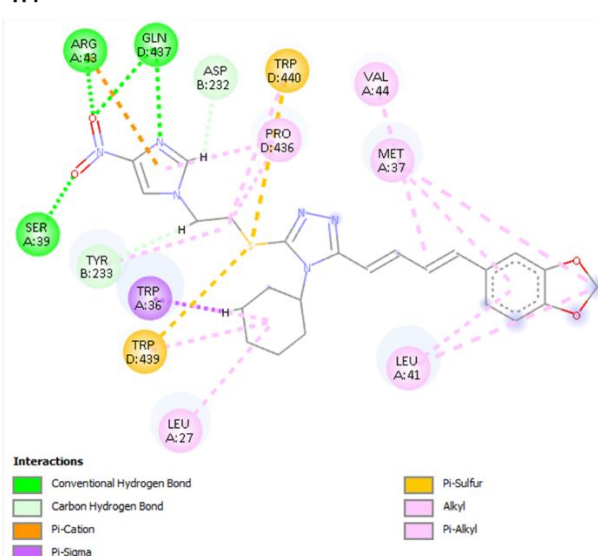
H2



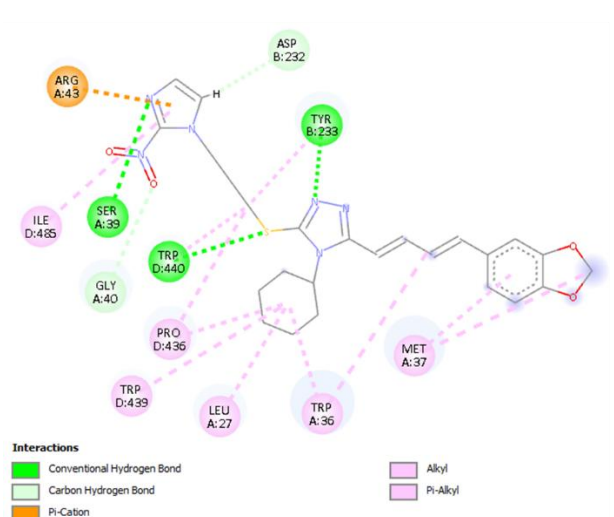
H3



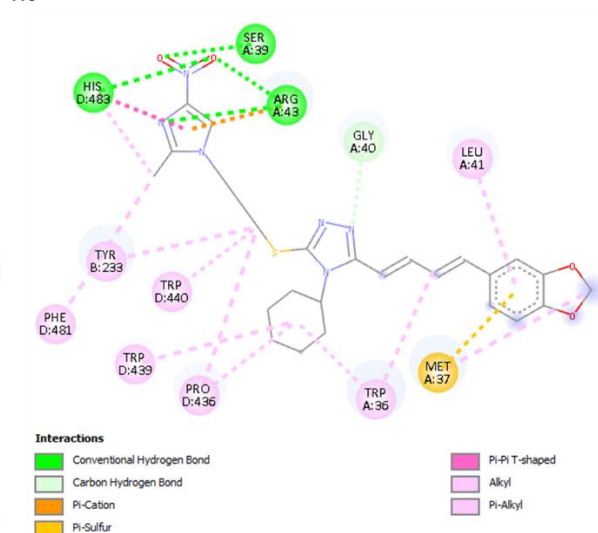
H4



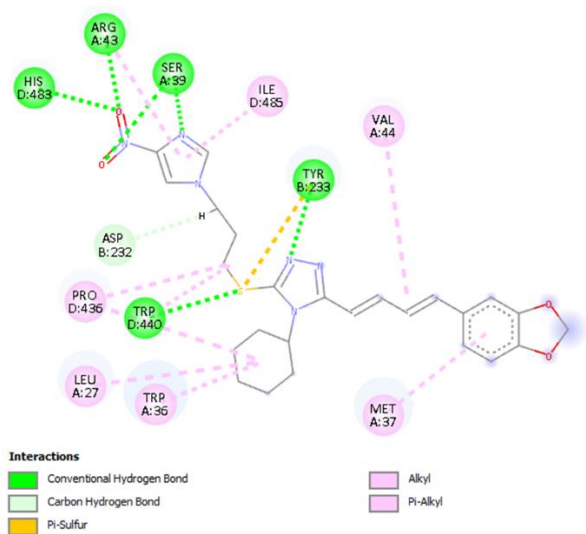
H5



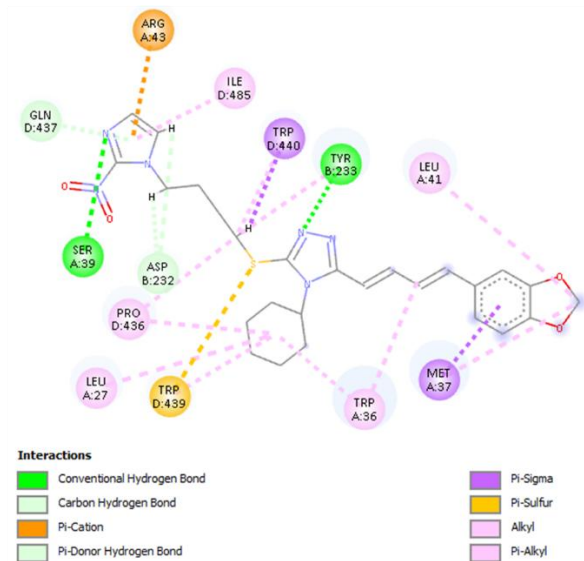
H6



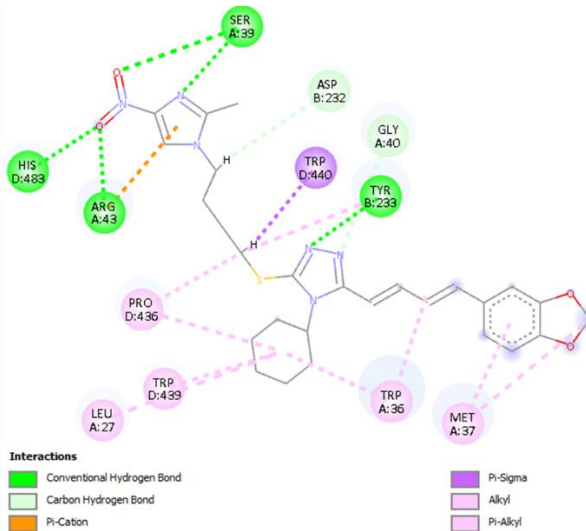
H7



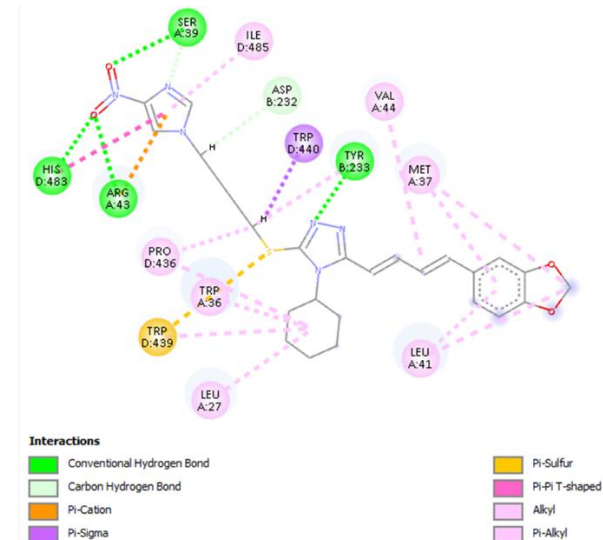
H8



H9



H10



Benzonidazol

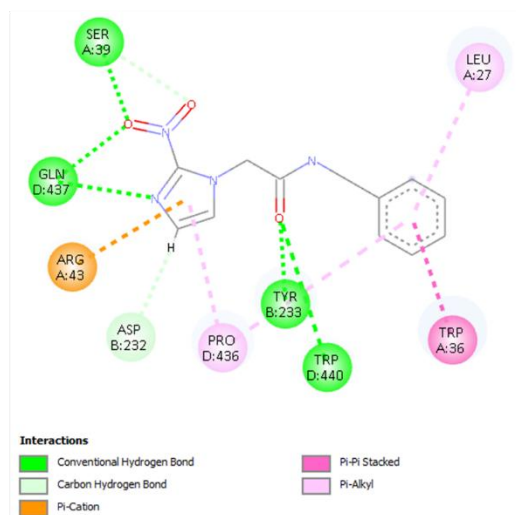
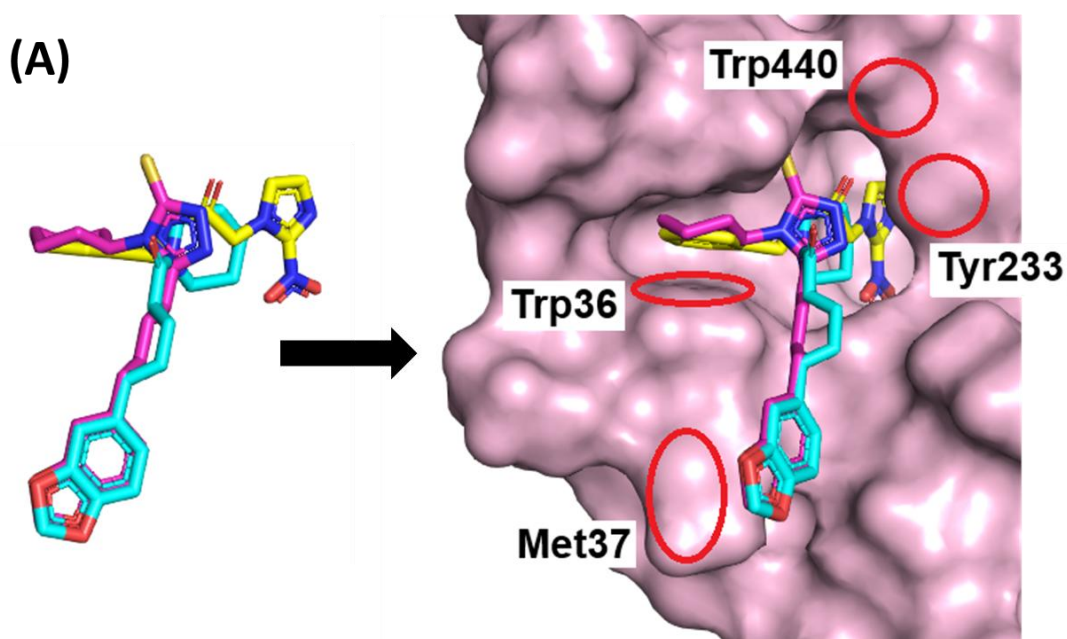


Figura 14. Interações com visualização bidimensional dos ligantes piperina, **2**, **H1-H10** e benznidazol no sítio ubiquinona (Qp) de TcSDH. Interações obtidas após a reotimização dos complexos com o método semiempírico PM7. Figura gerada com o programa Discovery Studio 25.1.0.24284 (Dassault Systèmes).

A estratégia de hibridização molecular permitiu a ampliação das interações para além da cavidade principal, possibilitando que o grupo benzodioxola realize interações adicionais hidrofóbicas com Met37 (**Figura 14**). O grupo triazol, por sua vez, foi responsável por interagir com Tyr233 via ligação de hidrogênio. O átomo de enxofre do espaçador tioalquil teve relevância para a manutenção da interação com Trp440. Há também interações com Trp439 ou Tyr233 nos complexos de **H1**, **H3**, **H4**, **H7**, **H8** e **H10**.

A modificação da extensão dos espaçadores metileno em **H8**, **H9** e **H10** permitiu uma interação adicional com Trp440 devido à maior torção da cadeia alquílica para acomodar o ligante dentro da cavidade de ligação principal do sítio ubiquinona. O anel ciclohexil dos ligantes híbridos interagiu eficientemente com Trp439, Leu27, Pro436 e Trp36. Este último, sendo o resíduo mais importante desse conjunto de interações (**Figura 14**). O grupo nitroimidazol apresenta interações com Ser39, Gln437, Arg43, His483 na região central do sítio ativo por meio de ligação de hidrogênio. Interações adicionais também foram efetuadas, seja por interação do tipo cátion- π ou empilhamento π , respectivamente, com Arg43 e His483.



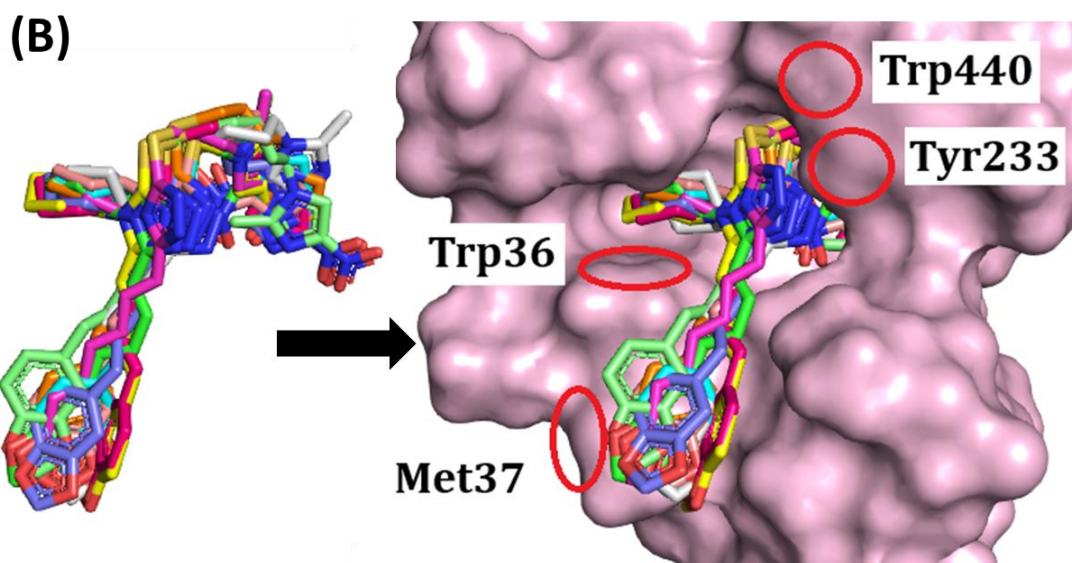


Figura 15. Superfície de interação do sítio ubiquinona (Qp) de TcSDH (superfície em cor rosa claro) evidenciando a pose de interação para os ligantes **(A)** piperina (átomos de carbono em ciano), **2** (átomos de carbono em magenta), benznidazol (átomos de carbono em amarelo) e **(B) H1-H10**. Átomos de hidrogênio ocultados para melhor visualização. A posição dos resíduos Met37, Trp36, Trp440 e Tyr233, relevantes para a interação com os ligantes, está demarcada na figura por círculos em cor vermelha. Figura gerada com o programa PyMOL 3.1 (Schrödinger, LLC).

Nas melhores poses obtidas para **H1-H10**, todos os descritores energéticos para a interação com o sítio ubiquinona (**Tabela 7**) são superiores aos do ligante de referência flutolanil (**Tabela S5** no material em anexo). Novamente, as entalpias de interação calculadas (ΔH_{int}) para os ligantes com atividade *in vitro* mais promissora (**H2**, **H5** e **H8**) são as que detêm de valores mais favoráveis, e os outros descritores de interação não conseguiram discriminar precisamente a qualidade das interações entre os híbridos. Não obstante, continuam evidenciando uma maior afinidade de **H1-H10** em TcSDH quando comparado a piperina e **2**.

Tabela 7. Descritores de interação calculados para a pose dos ligantes piperina, **2**, **H1-H10** e benznidazol no sítio ubiquinona (Qp) de TcSDH.

Ligantes	Pontuação de docagem (ChemPLP)	Pontuação normalizada	ΔH_{int} (kcal/mol)	ΔG_{bind} (kcal/mol)
Piperina	67,59	24,49	-16,30	-5,94
2	68,29	23,35	-35,01	-9,00
H1	81,75	24,75	-60,42	-11,92
H2	87,05	26,61	-66,72	-12,78
H3	81,22	24,59	-47,31	-11,95
H4	84,68	25,88	-47,89	-12,89
H5	81,52	24,68	-60,68	-12,99
H6	79,91	23,98	-52,82	-12,04
H7	80,81	24,47	-40,00	-12,29
H8	80,65	24,20	-64,80	-13,69
H9	77,74	23,12	-48,55	-12,62
H10	80,07	24,02	-55,89	-11,67
Benznidazol	66,30	24,84	-48,43	-8,60

6.1.3. Correlação dos descritores de interação com os dados experimentais

Embora diversas variáveis possam influenciar a atividade tripanocida dos compostos deste estudo, a análise estatística revelou uma alta correlação lógica entre as entalpias de interação calculadas (ΔH_{int}) e os valores experimentais de CI_{50} (μM) em amastigotas de *T. cruzi* (**Tabela 8**). Assumindo o modelo de regressão linear simples para a interação da piperina, **2**, **H1-H10** e benznidazol nos sítios dicarboxilato e ubiquinona de TcSDH, verificou-se, especificamente, coeficientes de determinação excelentes ($R^2=0,9669$ e $R^2=0,9164$), indicando um ajuste significativo do modelo em função do conjunto de dados explorado (**Figura 16**). Para os outros termos de interação não houve correlações significativas (**Tabela S7**). Especificamente neste caso, a proporcionalidade direta entre o ΔH_{int} e os valores de CI_{50} sugerem que a atividade dos ligantes híbridos é essencialmente determinada pelas entalpias de interação.

Tabela 8. Resultados para o estudo estatístico de correlação dos dados teóricos e experimentais nos sítios ativos ubiquinona (Qp) e dicarboxilato de TcSHD. Variável dependente (Y) = CI₅₀ amastigotas de *T. cruzi* (μM). Método: regressão linear simples (N = 13 ligantes: piperina, **2**, **H1-H10** e benznidazol).

Sítio dicarboxilato			Sítio ubiquinona (Qp)		
Descritor de interação	R ²	Equação da reta	Descritor de interação	R ²	Equação da reta
ΔH _{int} (kcal/mol)	0.9669	y = 0,553x + 31,866	ΔH _{int} (kcal/mol)	0.9164	y = 0,3523x + 22,918

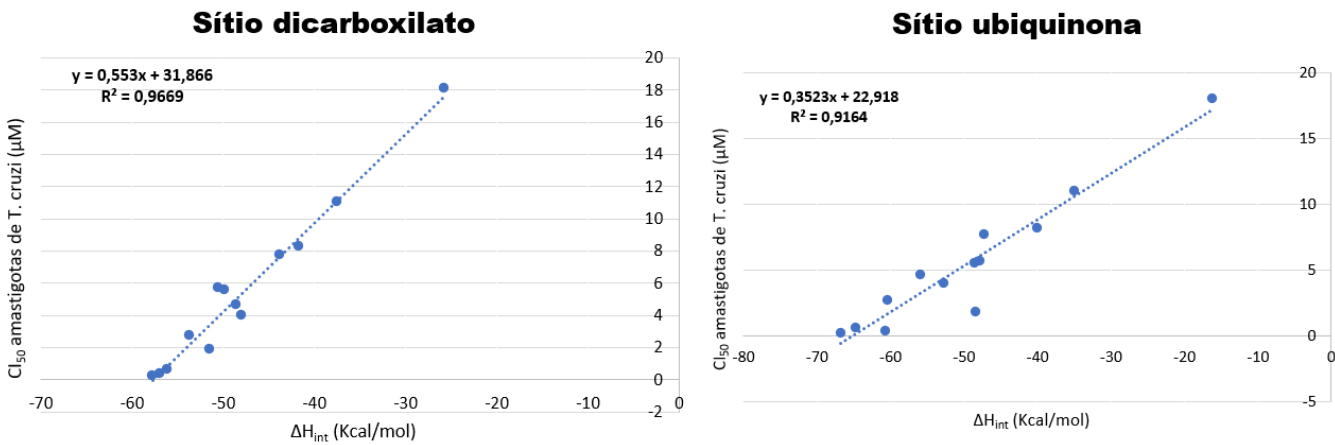


Figura 16. Gráficos para a regressão linear simples nos sítios ativos dicarboxilato e ubiquinona (Qp) de TcSHD, considerando as entalpias de interação calculadas para os ligantes piperina, **2**, **H1-H10** e benznidazol, e a variável dependente (CI₅₀ (μM) amastigotas de *T. cruzi*) para os mesmos compostos. Método: regressão linear simples (N = 13 ligantes). Figura gerada com o programa Excel (MICROSOFT CORPORATION, 2025).

Adicionalmente, os resultados sugerem a superioridade do modelo semi-empírico PM7 na avaliação das interações em comparação com a função de pontuação e o modelo de cálculo de energia livre, cujos resultados não mostraram correlação significativa com os dados de atividade (**Tabela S7** no material em anexo). A utilização do método PM7, parametrizado para reproduzir as entalpias de formação, foi crucial para gerar um descritor de interação que, quantitativamente, foi capaz de revelar de modo apropriado as interações entre os ligantes e a TcSDH, além de indicar, conjuntamente com as outras

evidências, que **H1-H10** podem interagir com ambos os sítios catalíticos da enzima de *T. cruzi*. Esses dados auxiliam na interpretação dos resultados da avaliação biológica e podem explicar um mecanismo de ação com alto potencial terapêutico e ainda pouco explorado.

6.2.Esterol 14 α -demetilase (14DM)

Como o *T. cruzi* tem defesas antioxidantes rudimentares, os desreguladores do equilíbrio redox são candidatos promissores para novos medicamentos antitripanossômicos (MENDONÇA *et al.*, 2018). Nesse sentido, para oferecer percepções do ponto de vista atômico sobre a capacidade inibitória do composto **2** e **H1-H10**, foram realizados cálculos de acoplamento molecular para a estero 14 α -demetilase (14DM). A 14DM, também conhecida como citocromo P51 (CYP51), é o único membro funcionalmente conservado da monooxigenase do citocromo da superfamília do citocromo P450 (CYP450), encontrada em todos os reinos biológicos. Essa enzima carece completamente de promiscuidade de substrato, catalisando a remoção oxidativa do grupo 14 α -metil do núcleo do estero. A 14DM é fortemente inibida por compostos heterocíclicos, por exemplo, derivados de imidazol e triazol, que se coordenam com o ferro ferroso (ferro protoporfirina IX, grupo HEME), afetando a ligação e a catálise do substrato (FRANCO, CAIO H. *et al.*, 2020).

A **Tabela 9** resume os valores mais altos de pontuação de acoplamento após 10 execuções/cada composto para a interação 14DM:**2/H1-H10**. O valor da pontuação de acoplamento (adimensionais) de cada pose foi considerado como o valor negativo da soma dos termos de energia do componente do tipo mecânico-molecular na associação biomacromolécula-composto; portanto, quanto mais positivo for o valor da pontuação, melhor será a interação. Nesse caso, o composto **2** apresentou o valor de pontuação de acoplamento mais baixo do que os híbridos para 14DM, indicando uma baixa capacidade inibitória, de acordo com a tendência experimental de CI_{50} . Além disso, o maior valor de pontuação de acoplamento foi obtido para 14DM:**H1-H10**, principalmente devido ao tipo de forças interativas envolvidas na associação, indicando uma capacidade inibitória superior a de seu precursor **2**.

Como exemplo, a **Figura 17A-17G** mostra a melhor pose de acoplamento de cada composto para 14DM, destacando que o nitrogênio do núcleo de 1,2,4-triazol-3-tiol dos

híbridos pode se coordenar com a espécie inorgânica do complexo protético de ferro ferroso na estrutura de 14DM (**Figura 17A-17C**), sendo uma interação mais significativa em termos de energia do que as interações apenas com resíduos de aminoácidos, como ocorre para RT:**H1-H10**. Os resultados *in silico* sobre a coordenação entre o núcleo de 1,2,4-triazol-3-tiol dos híbridos com Fe(II) do grupo HEME são viáveis devido aos dados cristalográficos relatados para os potenciais inibidores de *T. cruzi* 4-(4-clorofenil)-N-[2-(1H-imidazol-1-il)-1-feniletil]benzamida (VNF) e posaconazol, que também mostraram a mesma tendência com o grupo HEME do 14DM (LEPESHEVA *et al.*, 2010). Além disso, para o 14DM, os compostos **H2**, **H5** e **H8** que apresentaram o menor valor experimental de CI_{50} tinham praticamente a mesma pose de acoplamento (**Figura 17C**), enquanto o composto **2**, que apresentou o maior valor experimental de CI_{50} , foi acoplado de forma diferente e não se coordenou com o Fe(II). Isso provavelmente ocorre devido à presença do 2-nitroimidazol que está encaixado no sítio de potencial eletrostático negativo do 14DM (**Figura 17D-17G**), levando a pose dos híbridos a se coordenar com o Fe(II).

Além disso, os resultados *in silico* também sugeriram que o aumento da quantidade de metilenos conectores entre a porção 2-nitroimidazol e o núcleo 1,2,4-triazol-3-tiol aumenta a flexibilidade dos híbridos no domínio de ligação ao FAD, escapando do local de interação experimental relatado para a mostarda quinacrina e o GCG, concordando com a tendência do valor experimental de CI_{50} . De modo geral, os cálculos de acoplamento molecular sugeriram que a 14DM é um dos alvos viáveis para os híbridos em estudo, interagindo principalmente nos domínios de ligação HEME.

Por fim, como a análise de fluorescência mostrou um perfil interativo espontâneo e favorável entre a albumina e o **H2**, também foram realizados cálculos de acoplamento molecular nessa proteína para oferecer uma explicação em nível atômico sobre a capacidade de ligação. Os valores de pontuação de acoplamento nos locais I, II e III foram 71,9, 72,2 e 83,1, respectivamente, corroborando os ensaios de ligação competitiva que identificaram o local de ligação da digitoxina (subdomínio IB, local III) como a principal bolsa para o **H2**. Esse mesmo local de ligação foi relatado anteriormente para outros pequenos compostos orgânicos heterocíclicos, por exemplo, 1,3,4-oxadiazolil-1,2,4-oxadiazóis (fenil/naftil)etenil-substituídos, camptotecina, doxorubicina, daunorubicina, teniposídeo, suramina e dicumarol (MAYER *et al.*, 2021; ZSILA, 2013).

Tabela 9. Valores de pontuação de acoplamento (adimensionais) para a interação 14DM:2/H1-H10.

Compostos	14DM (HEME-domínio de ligação)
2	33,8
H1	37,3
H2	38,4
H3	39,4
H4	39,0
H5	39,8
H6	39,7
H7	38,8
H8	40,6
H9	40,1
H10	39,8

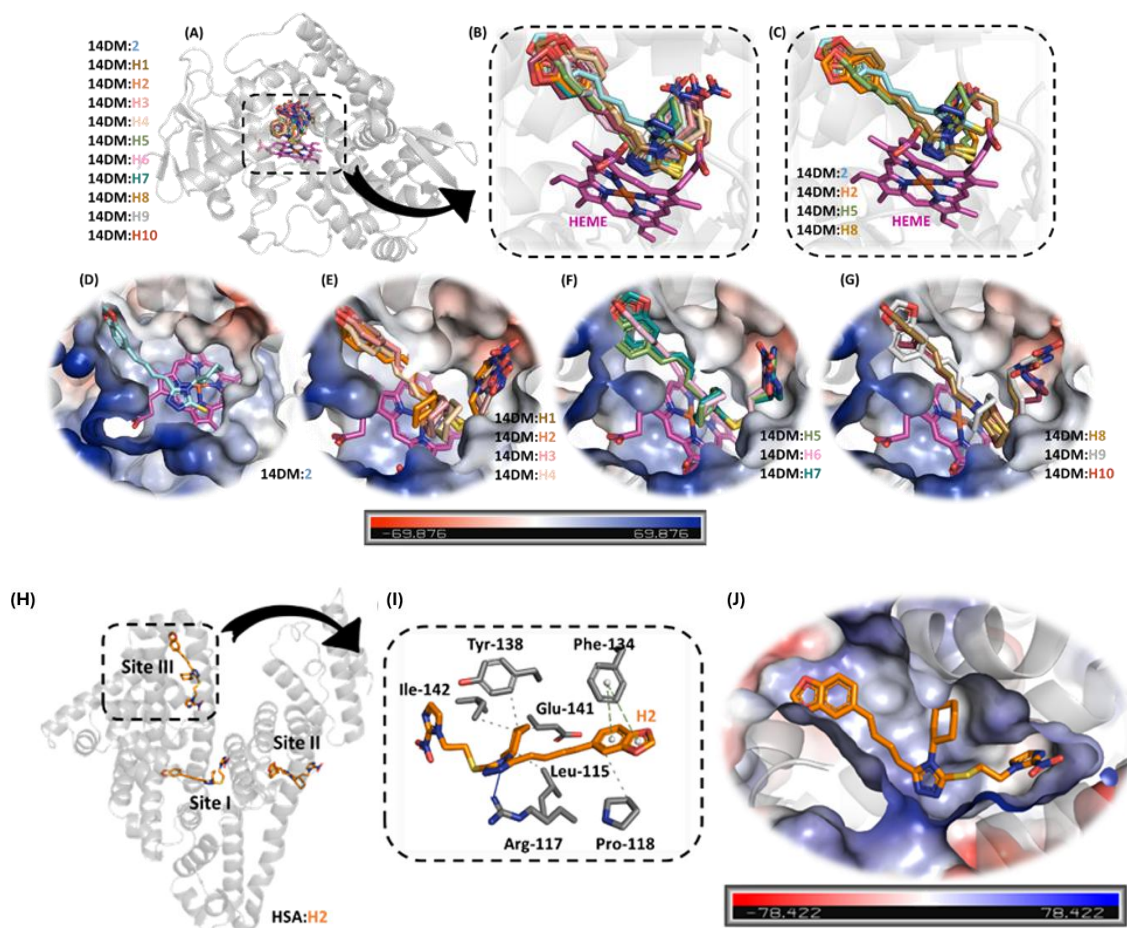


Figura 17. (A) Superposição da melhor pose de acoplamento para 14DM:2/H1-H10 com a representação de zoom correspondente (B, C) no domínio de ligação HEME. O mapa de potencial eletrostático para 14DM acoplado com (D) 2, (E) H1-H4, (F) H5-H7 e (G) H8-H10 no domínio de ligação HEME. (H) Melhor pose de acoplamento entre ASH:H2 nos subdomínios IIA, IIIA e IB (locais I, I e III, respectivamente) com a representação de zoom correspondente (I) e (J) mapa de potencial eletrostático para albumina. Para melhor compreensão, os átomos de hidrogênio foram omitidos e as cores correspondentes dos compostos foram apresentadas na figura.

7. Avaliação ADME-Tox

De acordo com a previsão teórica do estudo de farmacocinética, o diagrama resumido das características físico-químicas e de semelhança à fármacos para os ligantes híbridos H1-H10 evidencia conformidade com todos os parâmetros dispostos no hexágono delimitado (**Figura 18A**), demonstrando, assim, um potencial adequado referente ao comportamento farmacológico. Apenas os ligantes H5-H10 tiveram um

pequeno desvio do limite para o parâmetro FLEX (flexibilidade molecular) devido ao alongamento da cadeia tioalquil entre os grupos nitroimidazol e triazol. Os parâmetros para **H1-H4** foram muito bem dispostos no gráfico, ocupando idealmente todas as características analisadas. O mesmo se aplica aos ligantes piperina e **2**. Comparativamente, o benznidazol teve um desvio dos valores ideais para o parâmetro INSATU (insaturação molecular), mas detém conformidade com todas as outras características.

Foi previsto que somente a piperina permeia a barreira hematoencefálica (BHE) passivamente, ao contrário dos outros ligantes (**Figura 18B**). Ela, conjuntamente com o benznidazol e **2**, ainda apresentaram alta probabilidade de serem absorvidas passivamente pelo trato gastrointestinal (TGI). Os ligantes híbridos, por sua vez, estão contidos na zona cinza do gráfico, indicando que eles não apresentam boa absorção passiva pelo TGI e permeação pela BHE, provavelmente, devido às massas moleculares serem próximas ou maiores que 500 Dalton. Como um fator importante para garantir biodisponibilidade apropriada quando se planeja potenciais fármacos administrados por via oral, uma absorção reduzida pode ser compensada pela potência farmacológica (como visto para os compostos híbridos, especialmente o **H2**) e por outros mecanismos de transporte ativo presentes no TGI. Dessa forma, não excluindo a qualidade farmacocinética de **H1-H10**.

Ademais, todos os ligantes foram dispostos como pontos vermelhos no mesmo gráfico, o que indica que eles não são substratos da glicoproteína-P (PGP-), significando a ausência de efluxo celular após passarem pela fase de absorção.

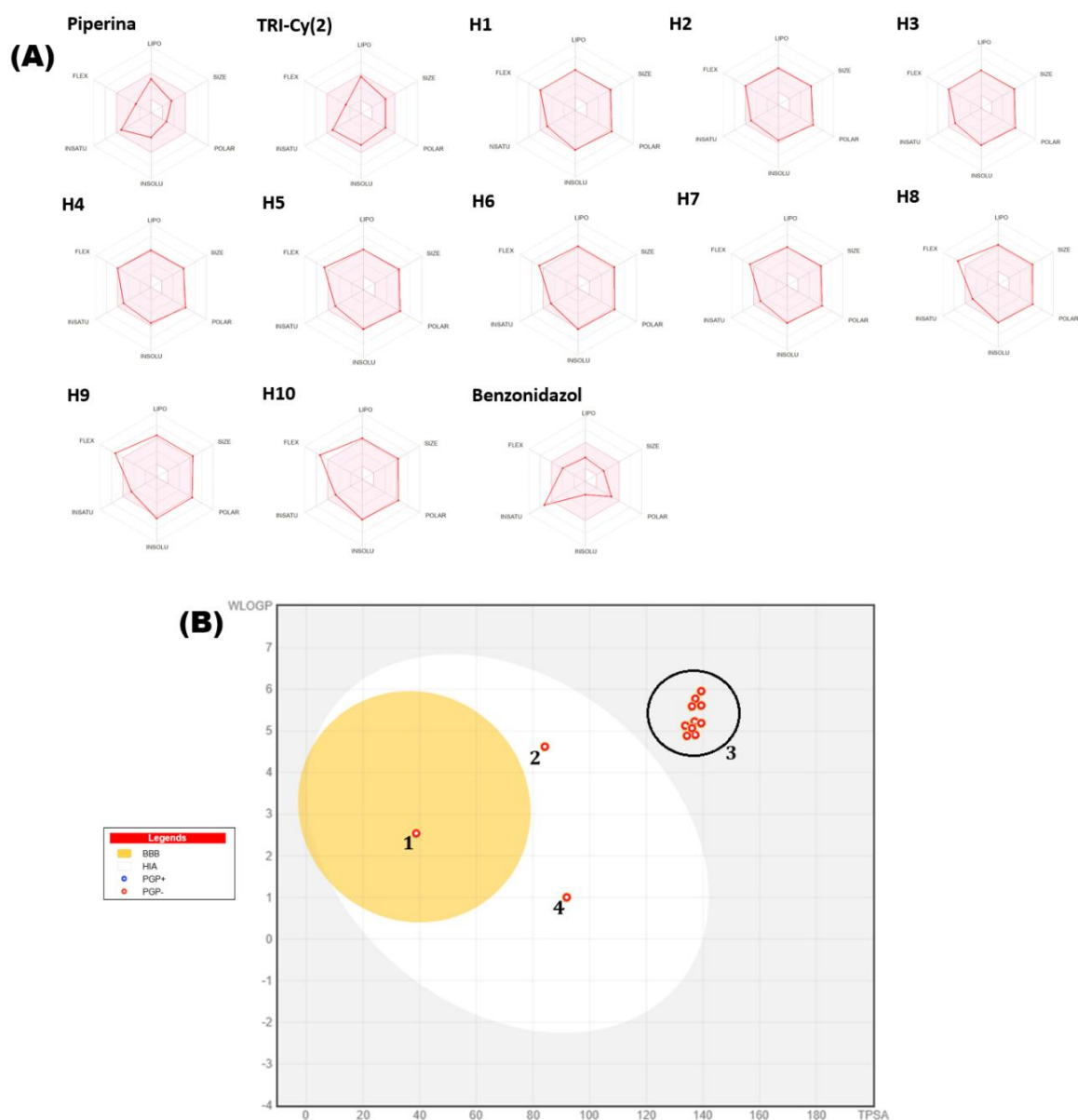


Figura 18. (A) Diagrama de biodisponibilidade oral, características físico-químicas e de semelhanças à fármacos para os ligantes piperina, **2**, **H1-H10** e benznidazol. Os parâmetros são LIPO: lipofilicidade; SIZE: massa molecular; POLAR: polaridade; INSOLU: insolubilidade aquosa; INSATU: grau de insaturação; FLEX: flexibilidade molecular. **(B)** Gráfico BOILED-Egg contendo estimativas do perfil de absorção gastrointestinal e permeação da barreira hematoencefálica (BHE) para os ligantes piperina (ponto 1), **2** (ponto 2), **H1-H10** (grupo de pontos 3) e benznidazol (ponto 4). Os pontos localizados na elipse branca representam compostos com alta probabilidade de serem absorvidos passivamente pelo trato gastrointestinal, e os pontos na elipse amarela são para compostos com alta probabilidade de permear através da BHE para acessar o sistema nervoso central (SNC). Moléculas que não se prevê serem bem absorvidas nem

permeáveis passivamente à BHE e TGI estão na zona cinza. Os pontos coloridos em azul indicam moléculas que se prevê serem substrato da glicoproteína P (PGP+) e, portanto, ativamente bombeadas do SNC ou para o lúmen gastrointestinal. Figuras obtidas do servidor SwissADME (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Houve concordância, principalmente, com a regra dos cinco de Lipinski, para todos os ligantes, apenas com 1 violação para **H1**, **H3** e **H5-H10** (massa molecular > 500 Dalton) (**Tabela 10**). Portanto, estão aptos a desempenharem características semelhantes às de fármacos, pois até 1 violação da regra é tolerada (LIPINSKI *et al.*, 2001). Por meio do parâmetro Brenk de química medicinal do servidor SwissADME, verificou-se que houve alertas de formação de metabólitos tóxicos para todos os compostos. Dentre eles, destacam-se aceptores de Michael, polienos, tiocarbonilas e grupos nitro. Especialmente para **H1-H10**, frações moleculares contendo grupos nitro e polienos podem ser gerados pela metabolização *in vivo*.

Foi previsto que todos os ligantes, exceto o benznidazol são potenciais inibidores de alguma enzima do sistema citocromo microsomal hepático (**Tabela 10**). Entretanto, os efeitos do ato inibitório estão em função da via metabólica acoplada ao citocromo P450, e não necessariamente serão negativos ou biologicamente danosos.

Os resultados do estudo para as vias toxicidade específicas com o servidor ADMETlab 3.0 (CBDD, 2020) indicam que **H1-H10** podem interferir com o potencial da membrana mitocondrial (SR-MMP) (**Tabela 10**). Como um dos parâmetros utilizados para avaliar a função mitocondrial, especificamente na cadeia transportadora de elétrons, trata-se de mais um achado que corrobora a potencial atividade dos ligantes em TcSDH.

Tabela 10. Parâmetros de química medicinal e farmacocinéticos para os ligantes piperina, **2**, **H1-H10** e benznidazol, obtidos com os servidores SwissADME (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017) e ADMETlab 3.0 (FU *et al.*, 2024). Contido na tabela, estão as previsões acerca da concordância com a regra dos cinco de Lipinski, inibição das enzimas do citocromo CYP450, filtros PAINS e Brenk contendo alertas estruturais de frações químicas com toxicidade conhecida, e vias de toxicidade biológica (avaliação de múltiplos alvos relacionados às principais vias de toxicidade celular e tecidual que podem ter interação com os ligantes em estudo). Para este último parâmetro: NR-AhR (receptor de hidrocarboneto arila), NR-Aromatase (aromatase), NR-ER (receptor de estrogênio),

SR-ARE (elemento de resposta antioxidante), SR-ATAD5 (Proteína 5 contendo domínio AAA da família ATPase), SR-HSE (elemento de resposta ao fator de choque térmico), SR-MMP (potencial da membrana mitocondrial) e SR-p53 (proteína supressora de tumor).

Ligantes	Lipinski	Alvos colaterais (CYP)	PAIN S	Brenk	Vias de toxicidade
Piperina	Sim	1A2, 2C9, 2C19	0	Aceptor de Michael e polienos	NR-AhR, NR-ER, SR-ARE, SR-ATAD5
2	Sim	1A2, 2C9, 2C19, 3A4	0	Polienos e tiocarbonila	NR-Aromatase, SR-ARE, SR-ATAD5, SR-HSE, SR-MMP
H1	Sim	2C9, 2C19, 3A4	0	Nitro e polienos	NR-Aromatase, SR-ARE, SR-MMP
H2	Sim	2C9, 2C19, 3A4	0	Nitro e polienos	NR-Aromatase, SR-ARE, SR-MMP, SR-p53
H3	Sim	2C9, 3A4	0	Nitro e polienos	NR-Aromatase, SR-ARE, SR-MMP
H4	Sim	2C9, 2C19, 3A4	0	Nitro e polienos	NR-Aromatase, SR-ARE, SR-MMP, SR-p53, SR-ATAD5
H5	Sim	2C9, 3A4	0	Nitro e polienos	NR-Aromatase, SR-ARE, SR-MMP, SR-p53
H6	Sim	2C9, 3A4	0	Nitro e polienos	NR-Aromatase, SR-ARE, SR-MMP
H7	Sim	2C9, 3A4	0	Nitro e polienos	NR-Aromatase, SR-ARE, SR-MMP, SR-p53
H8	Sim	2C9, 3A4, 2D6	0	Nitro e polienos	NR-Aromatase, SR-ARE, SR-MMP, SR-p53
H9	Sim	2C9, 3A4, 2D6	0	Nitro e polienos	NR-Aromatase, SR-ARE, SR-MMP
H10	Sim	2C9, 3A4, 2D6	0	Nitro e polienos	NR-Aromatase, SR-ARE, SR-MMP, SR-p53
Benznidazol	Sim	Não	0	Nitro	Não

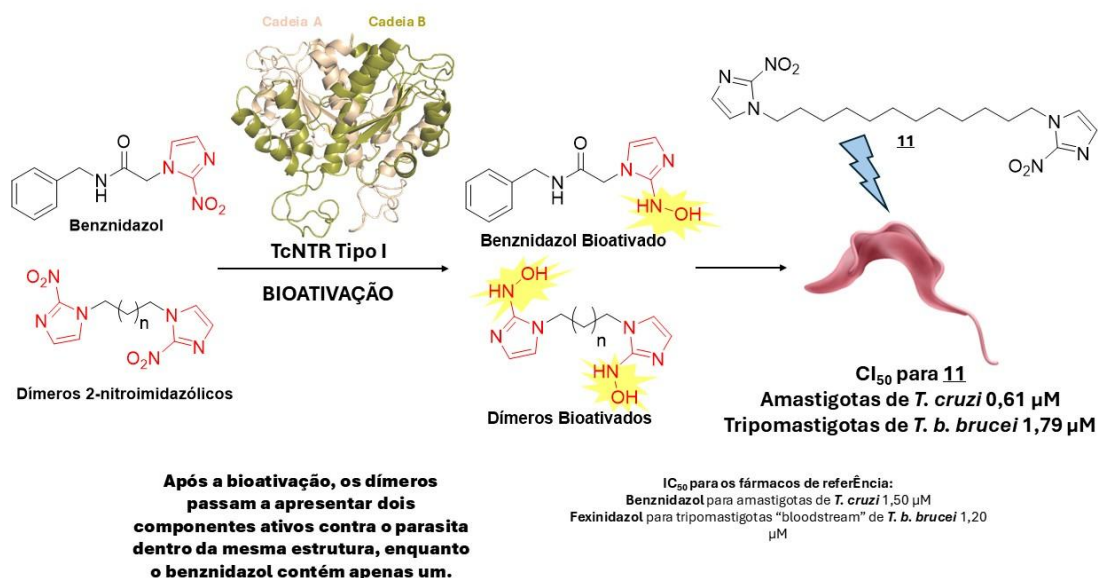
8. Conclusões

A hibridização molecular foi empregada como estratégia de modificação molecular para sintetizar os dez novos híbridos (**H1-H10**). Os híbridos sintetizados exibiram atividades tóxicas seletivas contra amastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4 LacZ) e *T. b. brucei*, com destaque para o híbrido **H2**, que demonstrou um melhor perfil de atividade do que os respectivos fármacos de referência usados nos tratamentos atuais. Dentre esses híbridos, aqueles com o grupo nitro na posição 2 do anel imidazólico (**H2**, **H5** e **H8**) apresentaram a melhor atividade antiparasitária da série

(maiores potências). A hibridização molecular usando o grupo farmacofórico do metronidazol também foi bem-sucedida, com **H1** apresentando ganhos significativos na potência antiparasitária e no índice de seletividade contra a forma replicativa mais importante de *T. cruzi*. Além disso, o estudo cinético realizado com **H2** frente a epimastigotas do *T. cruzi* evidenciou que este híbrido atua rapidamente contra os epimastigotas de *T. cruzi*, sugerindo que, diferentemente do benznidazol, o **H2** pode operar por meio da combinação de diferentes mecanismos de ação dentro da célula do parasita, exigindo uma duração de tratamento mais curta e menores concentrações para comprometer a integridade do *T. cruzi*. Além disso, os híbridos foram menos citotóxicos contra várias células de mamíferos. Finalmente, usando análise de fluorescência, o estudo do perfil de interação entre **H2** e albumina sérica humana revelou a ocorrência de interação espontânea e favorável. Os estudos de modelagem molecular e a análise estatística dos dados contribuíram para a proposição de um mecanismo de ação adequado para os compostos híbridos deste trabalho. O conjunto completo das poses de docagem para **H1-H10** e seus descritores de interação revelaram que eles têm potencial para interagir com ambos os sítios catalíticos de TcSDH com afinidades similares. A análise dos resultados indica que o processo é fortemente determinado pela entalpia de interação, visto que ótimas correlações entre a atividade e esta quantidade foram observadas, para ambos os sítios, com um desempenho ligeiramente superior para a interação no sítio dicarboxilato de TcSDH, o que poderia indicar que esse seria o sítio preferencial de ação. Os estudos de modelagem *in silico* na enzima CYP51 corroboraram a hipótese de que também pode ser um alvo viável para os híbridos sintéticos derivados piperínicos que ostentam a porção triazólica em sua estrutura, interagindo principalmente com o domínio de ligação HEME. Esses resultados ilustram que a série projetada a partir de derivados triazólicos da amida natural piperina, homologados aos nitroimidazóis, que são grupos farmacofóricos de significativa importância no tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos, representa uma excelente estratégia para o desenvolvimento de novos derivados com atividades antiparasitárias de amplo espectro. Os impactos das estratégias de modificação molecular dos ligantes híbridos foram captados pelos métodos computacionais utilizados neste trabalho, indicando, sobretudo, que a presença do farmacóforo 2-nitroimidazol nos ligantes otimiza a geometria e a intensidade das interações com os principais resíduos de aminoácidos do sítio dicarboxilato e ubiquinona de TcSDH. Esses achados podem explicar satisfatoriamente o perfil de atividade superior dos derivados **H2**, **H5** e **H8**.

CAPÍTULO 2

Contribuição para a quimioterapia da tripanossomíase humana: projeto, síntese e avaliação biológica de 2-nitroimidazóis diméricos contra amastigotas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*



Resumo

Tratamentos eficazes e seguros para doenças tropicais negligenciadas causadas por parasitas, como a doença de Chagas e a doença do sono, ainda são escassos, representando um desafio significativo para pesquisadores em todo o mundo. O planejamento racional de compostos diméricos, inspirados unicamente no núcleo farmacofórico do benznidazol (2-nitroimidazol) provou ser uma estratégia promissora. O aumento do ligante entre as unidades ativas melhorou a interação com TcNTR, facilitando a bioativação desses dímeros mais longos em comparação com os mais curtos. A avaliação biológica confirmou essa previsão, demonstrando que todos os compostos foram ativos contra formas amastigotas replicativas e intracelulares de *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen C2C4-LacZ). Notavelmente, os dímeros de cadeia mais longa exibiram potência notável ($CI_{50} < 1,0 \mu M$). Esses compostos também mostraram atividade significativa contra *T. b. brucei* (*T. b. brucei* 427) e demonstraram citotoxicidade muito baixa em células de mamíferos, destacando sua seletividade, especialmente entre os dímeros de cadeia mais longa. Esses dados corroboram o desenvolvimento de derivados diméricos de 2-nitroimidazol como agentes antiparasitários seletivos e de amplo espectro contra tripanossomatídeos.

Palavras-chave: dimerização molecular; azomicina; fármacos antitripanossomais; enzima nitrorredutase de *Trypanosoma cruzi* (TcNTR).

1. Planejamento da série

Tendo em vista a relevância da posição dos grupos nitro-heterocíclis no capítulo anterior, este capítulo visa traçar um panorama específico da importância desses nitroimidazóis em uma abordagem de planejamento molecular diferente. Visto que na terapia antiparasitária, sabe-se que o núcleo nitroimidazólico é o principal farmacóforo presente na estrutura do benznidazol, sendo um fragmento indispensável que garante sua atividade antiparasitária, especialmente após ativação pela enzima nitroredutase do *T. cruzi* (TcNTR), gerando danos irreversíveis às biomacromoléculas da célula do parasita (GARCIA *et al.*, 2005; HALL; WILKINSON, 2012; TROCHINE *et al.*, 2014).. Nesse sentido, a dimerização de fragmentos ativos tem sido amplamente explorada como uma estratégia de planejamento molecular para melhorar a interação biológica fármaco-alvo e além das propriedades farmacológicas (PAQUIN; REYES-MORENO; BÉRUBÉ, 2021). Essa abordagem produz resultados interessantes no planejamento de dímeros com potencial antiparasitário, conforme demonstrado no trabalho de Barbaras e colaboradores (2008), onde a atividade promissora de dímeros de nostocarbolina sintética contra *T. brucei* e *Plasmodium falciparum* foi relatada (BARBARAS *et al.*, 2008a). Bem como no trabalho de Sijm e colaboradores, onde foi explicado que os dímeros de fenil-pirazolona são uma nova classe de agentes anti-*T. cruzi* (SIJM *et al.*, 2019). Também é possível encontrar diversos trabalhos que utilizam essa abordagem na quimioterapia para certos tipos de câncer, apresentando resultados promissores (BERUBE, 2005; CHOW; CHAN, 2009; JEYADEVAN *et al.*, 2004).

A estratégia de dimerização do grupo farmacofórico pode impactar a potência da molécula dimérica de diferentes maneiras, dependendo do tipo de interação e da estrutura do receptor (PAQUIN; REYES-MORENO; BÉRUBÉ, 2021). O fato de cada molécula planejada possuir duas unidades de nitroimidazólicas em sua estrutura duplicaria a concentração de farmacóforos próximos ao alvo bioquímico, aumentando a probabilidade de ocorrência das interações necessárias para a ocorrência dos efeitos biológicos desejados. Sabendo da importância da atividade dos grupos nitroheterocíclis nos fármacos utilizados no tratamento de doenças infecciosas, foi planejada uma série de

dímeros 2-nitroimidazólicos, com o objetivo de aumentar a disponibilidade desta unidade biologicamente ativa em uma mesma estrutura, variando apenas o tamanho da cadeia metilênica espaçadora entre essas porções nitro-heterocíclicas (**Figura 1**). Essa maior concentração de unidade ativa, através do uso do dímero, no interior do parasito pode gerar um maior desequilíbrio redox em detrimento do uso de um monômero.

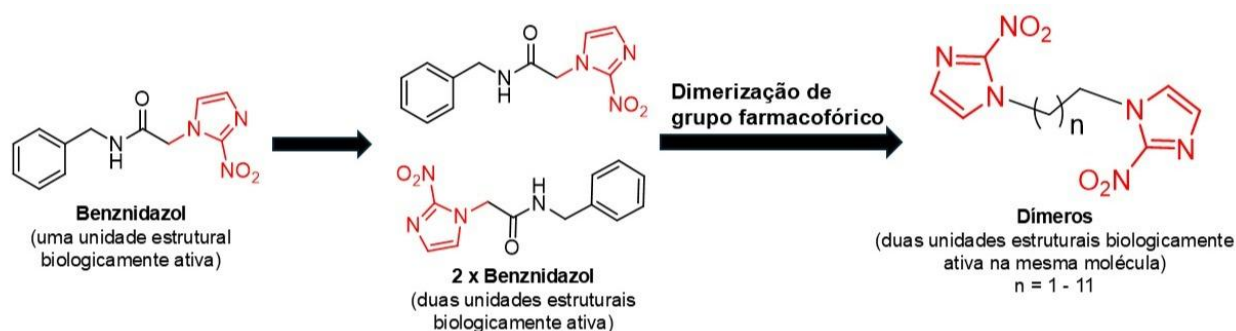


Figura 1. Planejamento molecular dos dímeros 2-nitroimidazóis.

A dimerização do grupo farmacofórico do principal fármaco utilizado no tratamento da DC, o benznidazol (2-nitroimidazol, **Figura 1**), foi planejada para explorar novas abordagens terapêuticas para a terapia da DC. Hall e Wilkinson (2012) explicam como o benznidazol atua dentro da célula do parasito, onde sofre reduções intracelulares. Seu grupo farmacofórico sofre bioativação pelas TcNTR, atuando como um pró-fármaco, produzindo intermediários tóxicos. Essa enzima é encontrada em tripanossomatídeos e pode servir como um ativador de fármacos. Esse processo permite que a estrutura em questão atue como um pró-fármaco, pois a enzima catalisa reações de nitro-reduções intracelulares que geram diversas espécies tóxicas, incluindo intermediários radiculares que causam danos irreversíveis ao DNA e outras macromoléculas do parasita e levando o mesmo a um processo de apoptose (ANG *et al.*, 2017b; PATTERSON; WYLLIE, 2014a; PÉREZ MONTILLA *et al.*, 2023). Variações no comprimento e na flexibilidade conformacional da cadeia espaçadora que conecta os farmacóforos podem ser cruciais devido à sua influência direta na posição desses farmacóforos em ambiente biológico. Tamiz e colaboradores (2000) discutem e exemplificam detalhadamente essa influência de tamanho da cadeia espaçadora em inibidores diméricos de serotonina (TAMIZ *et al.*, 2000). Usando essa abordagem, optou-se por variar o conector utilizando de duas a doze unidades de metilênicas (-CH₂-) para primeiramente avaliar *in silico* o impacto das

cadeias de carbono na capacidade de interação com TcNTR, com o objetivo de serem “ativadas” na presença do cofator MNF (mononucleotídeo de flavina).

2. Preparação do modelo TcNTR

Como não há estrutura tridimensional experimental para TcNTR, um modelo enzimático foi construído e validado, utilizando como base a estrutura da nitroredutase de raios X (NTR) de *E. coli* B, obtida no *Protein Data Bank*, com código de acesso 1DS7, seguindo o protocolo relatado anteriormente por Cirqueira e colaboradores (CIRQUEIRA *et al.*, 2022; PARKINSON; SKELLY; NEIDLE, 2000). A **Figura 2A** descreve a estrutura homodimérica prevista obtida de TcNTR com alta superposição do sítio ativo com a estrutura prevista de TcNTR de AlphaFold (**Figura 2B**) dentro de um valor de desvio quadrático médio (RMSD) de 1,667 Å. Conforme relatado anteriormente por Cirqueira e colaboradores, o suposto sítio de ligação para o cofator enzimático MNF no sítio catalítico de TcNTR é encontrado intacto em NTR de *E. coli* B, portanto, cálculos de “redocking” para MNF (código PDB: 1DS7) foram realizados para identificar as melhores funções de pontuação do software GOLD 2025 (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, CB2 1EZ, Reino Unido) para prever a ligação de MNF ao modelo enzimático obtido (CIRQUEIRA *et al.*, 2022; JONES *et al.*, 1997). Conforme representado na **Figura 2C**, ChemPLP foi identificado como a melhor função de pontuação com valor RMSD de 1,0529 Å. A estrutura MNF acoplada no modelo TcNTR apresentou alta superposição com a experimental, conservando as principais interações com os resíduos de aminoácidos R88, S90, Q145, E260 e R300 localizados na interface dimérica da enzima (**Figura 2D**).

Uma vez obtido o modelo TcNTR, foram realizados cálculos de “docking” molecular para os produtos diméricos de 2-nitroimidazóis (**D1-D8**) e para a azomicina, o monômero precursor, para avaliar sua capacidade desses núcleos nitroimidazólicos sofrerem ativação por essa enzima. No software GOLD 2025, o valor da pontuação de “docking” (adimensional) para cada pose leva em consideração as tensões intramoleculares dentro do ligante e as interações intermoleculares, e é considerado como o negativo da soma dos termos de energia envolvidos na associação macromolécula-ligante; portanto, quanto maior a pontuação, melhor o perfil de interação (MACHADO *et*

al., 2025). Os valores da pontuação de “*docking*” (adimensional) para azomicina e para os dímeros **D1-D8** foram 29,8, 50,0, 50,6, 51,4, 55,3, 58,6, 59,7, 67,4 e 62,7, respectivamente. Esses resultados sugerem que os produtos diméricos de 2-nitroimidazóis podem ter maior atividade antiparasitária do que o reagente precursor, a azomicina. Além disso, há evidências claras de uma melhoria na capacidade de interação dos compostos testados à medida que o número de unidades metilênicas aumenta.

Conforme ilustrado na **Figura 2E**, todos os compostos diméricos podem interagir dentro da região de potencial eletrostático positivo do TcNTR, onde o cofator MNF pode ser encontrado. É essencial destacar que a reação redox no sítio da TcNTR segue um mecanismo bi-bi “pingue-pongue” de cinética, ou seja, o dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADH) é oxidado pela redução concomitante de MNF para redução posterior de compostos nitro por MNFH₂, regenerando assim a flavina para novos ciclos catalíticos (HALL; WILKINSON, 2012). Com base nesse mecanismo, a interação de **D1-D8** com o cofator enzimático é crucial para converter essas estruturas, analogamente, de um pró-fármaco em um fármaco ativo e, provavelmente, devido ao aumento de unidades de metileno nos compostos diméricos, melhorou o volume cinético (área e volume de 120,7 para 449,2 Å² e de 95,7 para 400,8 Å³, respectivamente), a flexibilidade e a probabilidade do grupo nitro interagir com o cofator, conforme resumido nas **Figuras 2F (D1, D2 e D3), 2G (D4, D5 e D6) e 2H (D7 e D8)**, e apoiado pelos valores crescentes de “ovalização”, de 1,19 a 1,71 (**Tabela 1**), sendo os compostos diméricos mais alongados ou em forma de charuto para interagir com o cofator enzimático com o aumento das unidades de metilenos.

Curiosamente, além do aumento dos pontos de conexão e das forças interativas que estabilizam a interação de compostos diméricos com o aumento do número de unidades de metileno (**Figuras 2I-2L**), foi demonstrado que a fração 2-nitroimidazol nos compostos **D7 e D8** pode interagir mais intimamente do que os compostos **D1-D6** com a porção aromática da estrutura MNF. Isso indica a alta capacidade dos grupos nitro nesses dois pró-fármacos diméricos de sofrer redução enzimática a grupos amino. Por fim, como a cavidade catalítica do TcNTR é externa e localizada na interface do dímero, e como os 2-nitroimidazóis diméricos têm maior flexibilidade e capacidade de interagir com o cofator enzimático à medida que as unidades de metileno aumentam, é provável que não apenas uma, mas ambas as frações 2-nitroimidazol dos compostos **D1-D8** possam ser

reduzidas. Em particular, os compostos **D7** e **D8** podem ser mais reativos do que o benznidazol em relação às biomacromoléculas do *T. cruzi*.

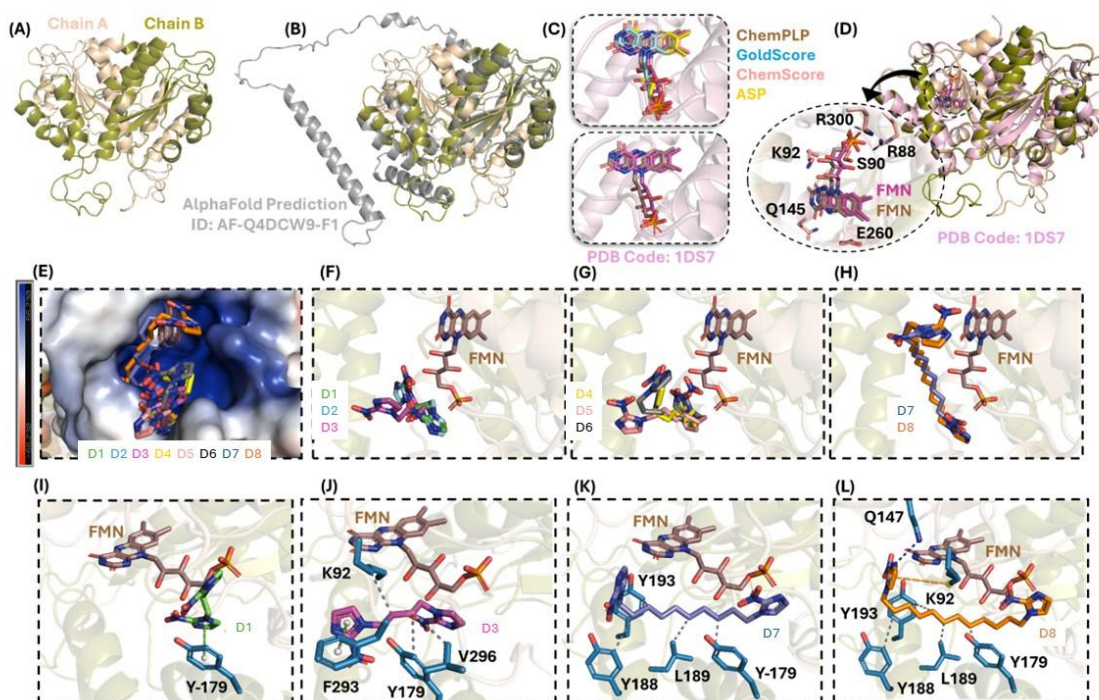


Figura 2. (A) O modelo dimérico previsto obtido de TcNTR e (B) sua superposição com o modelo AlphaFold - pontuação prevista do Teste de Diferença de Distância Local (pLDDT) para resíduos em toda a proteína de comprimento total de 61,3% e 19,5%, significando confiança muito alta e alta, respectivamente. (C) Superposição dos cálculos de redocking para MNF no sítio catalítico do NTR cristalográfico de *E. coli* B. (D) Superposição entre o modelo dimérico previsto obtido de TcNTR e o NTR cristalográfico de *E. coli* B. (E) O mapa de potencial eletrostático de TcNTR acoplado com 2-nitroimidazóis diméricos **D1-D8**. A melhor posição de acoplamento para (F) **D1-D3**, (G) **D4-D6** e (H) **D7** e **D8** no bolso catalítico de TcNTR na presença do cofator MNF. Os principais resíduos de aminoácidos que interagem com (I) **D1**, (J) **D3**, (K) **D7** e (L) **D8**. Linhas azuis, pontos cinza, laranja e verde representam ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações de cátions- π e interações de π -“stacking”, respectivamente. Para melhor interpretação, os átomos de hidrogênio foram omitidos.

As energias dos orbitais moleculares de fronteira (OMFs), mais especificamente, o orbital molecular ocupado mais alto (HOMO) e o orbital molecular desocupado mais baixo (LUMO), são consideradas indicadores de reatividade entre moléculas e sítios

biológicos, como cavidades de proteínas, ou seja, compostos com a menor diferença de energia HOMO-LUMO podem facilmente sofrer reações químicas (DEMIR *et al.*, 2023; MARTINS *et al.*, 2025). Assim, os valores de OMFs dos produtos diméricos de 2-nitroimidazóis (**D1-D8**) e da azomicina foram previstos usando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com o método Becke-3-Lee Yang Parr (B3LYP) e o conjunto de base padrão 6-31G* (veja detalhes computacionais e **Figura S155** no material em anexo) para compreender a capacidade desses compostos de sofrer redução adicional após interação com TcNTR para apoiar a tendência de encaixe molecular. Nesse sentido, os valores previstos de “gap” energético HOMO-LUMO para azomicina, **D1-D8** foram 4,71, 4,71, 4,70, 4,70, 4,65, 4,68, 4,68, 4,68 e 4,68 eV, respectivamente, com densidade de OMFs localizada no núcleo heterocíclico, onde o grupo nitro pode ser encontrado, sem densidade significativa de OMFs nas unidades metilênicas (**Figura S155**, material em anexo), reforçando a tendência de docking molecular de que o aumento nas unidades metileno pode melhorar a flexibilidade da cadeia e o perfil anti-*T. cruzi*, ou seja, os compostos diméricos **D4-D8** apresentarão melhor atividade biológica do que os compostos azomicina e **D1-D3**. Por fim, todos os compostos diméricos planejados não apresentam violações a regra de Lipinski (RO5, **Tabela 1**), sendo considerados promissores potenciais a fármacos, assim como o aumento da lipofilicidade relacionado ao aumento de unidades de metileno (LogP_{o/w}, **Tabela 1**) melhorará a captação dos diméricos até o alvo para atuar como anti-*T. cruzi*.

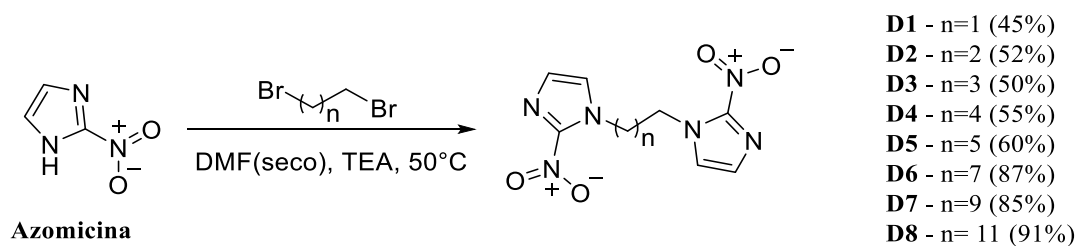
Tabela 1. Propriedades farmacocinéticas previstas (*in silico*) para de dímeros usando o servidor web online SwissADME e o software Spartan 14 (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2014, 2017).

Compostos	n(CH ₂)	LogP _{o/w} ^a	RO5	Polarizabilida de	Ovalid ade	Área (Å ²)	Volume (Å ³)
Azomicina	-	0.21 / 0.81	0	48.02	1.19	120.7	95.71
D1	2	0.78 / 2.12	0	57.8	1.41	245.2	216.3
D2	3	1.09 / 2.40	0	59.3	1.45	266.9	234.9
D3	4	1.40 / 2.68	0	60.8	1.48	286.1	253.2
D4	5	1.46 / 3.10	0	62.3	1.51	306.7	271.6
D5	6	1.88 / 3.52	0	63.8	1.54	327.1	290.1
D6	8	2.36 / 4.35	0	66.8	1.60	367.9	327.0
D7	10	2.74 / 5.19	0	69.8	1.66	408.6	363.9
D8	12	3.33 / 6.02	0	72.8	1.71	449.2	400.8

^a Previsto com o servidor web Swiss ADME / Previsto com o software Spartan 14. RO5: número de violações da regra de Lipinski.

É importante reconhecer que a estabilidade futura da posição de encaixe molecular obtida pode ser avaliada por meio de simulações de dinâmica molecular ao longo do tempo. A combinação de ensaios bioquímicos e biofísicos, como a determinação do mecanismo inibitório enzimático, a realização de ensaios de ligação para medir a força das interações e experimentos estruturais, deve ser realizada para melhor compreender como os dímeros (**D1-D8**) sofrem a atuação da TcNTR (CHAVES, OTÁVIO AUGUSTO *et al.*, 2025). No entanto, neste estudo, como etapa inicial para fundamentar o perfil anti-*T. cruzi in silico* desses compostos.

Para validar as predições *in silico*, os dímeros propostos foram sintetizados através da *N*-alquilação realizada através do mecanismo de S_N2 clássico. A síntese foi realizada usando 2-nitro-1*H*-imidazol comercial em excesso (0,5 mmol equivalente) em relação ao dibromoalcano a ser utilizado com diferentes tamanhos de cadeia metilênica (0,1 mmol equivalente) usado para preparar cada produto. O excesso de 2-nitro-1*H*-imidazol com o dibromoalcano como limitante tem como objetivo forçar a dimerização. Esse procedimento foi realizado sob aquecimento brando, com objetivo de evitar possíveis reações de eliminação. Além disso, foi utilizado *N,N*-dimetilformamida seca como solvente, sob uma atmosfera de N₂, usando trietilamina como base (0,3 mmol equivalente) (**Esquema 1**).



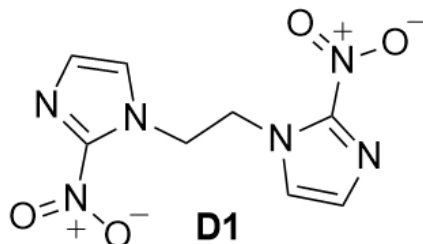
Esquema 1. Reação de 2-nitroimidazol e dibromoalcanos adequados.

Os tempos de reação foram de 24 horas, com rendimentos variando de 45% a 91%. Todos os dímeros foram confirmados por RMN de ¹H e ¹³C e análise HRMS, e sua pureza foi verificada por CLAE (superior a 95%). Assim, a metodologia sintética otimizada neste trabalho produziu os dímeros pretendidos em rendimentos médios a bons e em condições de reação mais suaves do que as descritas por Long e colaboradores (1991) para a síntese

dos dímeros **4** e **5**. O dímero **11** também foi descrito na patente CN106692059 (2017), juntamente com sua caracterização por RMN ^1H .

3. Preparação dos Dímeros

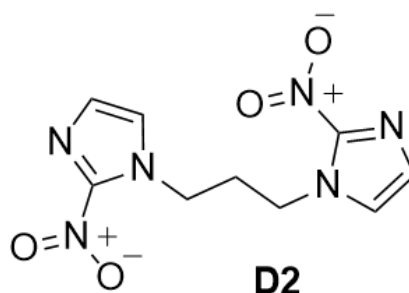
3.1.Preparação do D1



O **D1** foi obtido, utilizando o alquilante bidentado 1,2-dibromoetano, seguindo a metodologia descrita no **Esquema 1**, na forma de um sólido de coloração amarela, em rendimento isolado de 45%, além de apresentar pureza adequada para e prosseguir com os ensaios biológicos (determinada por CLAE, **Figura S120** no material em anexo).

O **D1** foi caracterizado através dos métodos convencionais de análise (RMN ^1H e ^{13}C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado (252-255°C). No espectro de massas (**Figura S119** no material em anexo) HRMS (EI, m/z) calculado para $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_6\text{O}_4^+$, 253,0685; encontrado 253,0639, que confirma a estrutura do **D1**. Adicionalmente, no espectro de RMN ^1H (**Figura S117** no material em anexo) é possível observar um tripleto, com integração para 4 hidrogênios, em δ 5,11 ppm, referente ao CH_2 ligado ao nitrogênio do anel imidazólico, que fornece a informação da ligação C-N formada. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S118** no material em anexo) observou-se um sinal em δ 49,55 ppm, referente a dois carbonos, indicando a presença de carbono metilênico, ligado ao átomo de nitrogênio. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada, pontuados anteriormente, suportam a tese de que a *N*-alquilação foi realizada com êxito, formando o **D1**.

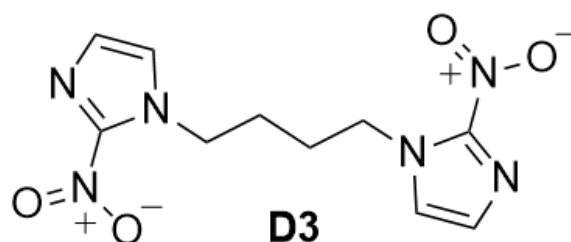
3.2.Preparação do D2



O **D2** foi obtido, utilizando o alquilante bidentado 1,3-dibromopropano, seguindo a metodologia descrita no **Esquema 1**, na forma de um sólido de coloração amarela, em rendimento isolado de 52%, além de apresentar pureza adequada para e prosseguir com os ensaios biológicos (determinada por CLAE, **Figura S124** no material em anexo).

O **D2** foi caracterizado através dos métodos convencionais de análise (RMN ^1H e ^{13}C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado (257-260°C). No espectro de massas (**Figura S123** no material em anexo) HRMS (EI, m/z) calculado para $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_6\text{O}_4^+$, 267,0841; encontrado 267,0849, que confirma a estrutura do **D2**. Adicionalmente, no espectro de RMN ^1H (**Figura S121** no material em anexo) é possível observar um tripleto, com integração para 4 hidrogênios, em δ 4,86 ppm, referente ao CH_2 ligado ao nitrogênio do anel imidazólico, que fornece a informação da ligação C-N formada. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S122** no material em anexo) observou-se um sinal em δ 47,02 ppm, referente a dois carbonos, indicando a presença de carbono metilênico, ligado ao átomo de nitrogênio. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada, pontuados anteriormente, suportam a tese de que a *N*-alquilação foi realizada com êxito, formando o **D2**.

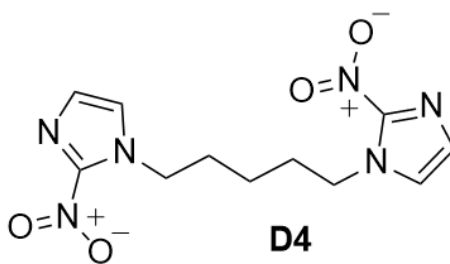
3.3.Preparação do D3



O **D3** foi obtido, utilizando o alquilante bidentado 1,4-dibromobutano, seguindo a metodologia descrita no **Esquema 1**, na forma de um sólido de coloração amarela, em rendimento isolado de 52%, além de apresentar pureza adequada para e prosseguir com os ensaios biológicos (determinada por CLAE, **Figura S128** no material em anexo).

O **D3** foi caracterizado através dos métodos convencionais de análise (RMN ^1H e ^{13}C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado ($217\text{-}220^\circ\text{C}$). No espectro de massas (**Figura S127** no material em anexo) HRMS (EI, m/z) calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_6\text{O}_4^+$, 281,0998; encontrado 281,1007, que confirma a estrutura do **D3**. Adicionalmente, no espectro de RMN ^1H (**Figura S125** no material em anexo) é possível observar um tripleto, com integração para 4 hidrogênios, em δ 4,41 ppm, referente ao CH_2 ligado ao nitrogênio do anel imidazólico, que fornece a informação da ligação C-N formada. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S126** no material em anexo) observou-se um sinal em δ 49,33 ppm, referente a dois carbonos, indicando a presença de carbono metilênico, ligado ao átomo de nitrogênio. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada, pontuados anteriormente, suportam a tese de que a *N*-alquilação foi realizada com êxito, formando o **D3**.

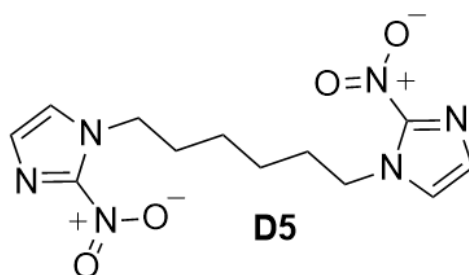
3.4.Preparação do D4



O **D4** foi obtido, utilizando o alquilante bidentado 1,5-dibromopentano, seguindo a metodologia descrita no **Esquema 1**, na forma de um sólido de coloração amarela, em rendimento isolado de 55%, além de apresentar pureza adequada para e prosseguir com os ensaios biológicos (determinada por CLAE, **Figura S132** no material em anexo).

O **D4** foi caracterizado através dos métodos convencionais de análise (RMN ^1H e ^{13}C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado (98-101°C). No espectro de massas (**Figura S131** no material em anexo) HRMS (EI, m/z) calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{O}_4^+$, 295,1154; encontrado 295,1168, que confirma a estrutura do **D4**. Adicionalmente, no espectro de RMN ^1H (**Figura S129** no material em anexo) é possível observar um tripleto, com integração para 4 hidrogênios, em δ 4,38 ppm, referente ao CH_2 ligado ao nitrogênio do anel imidazólico, que fornece a informação da ligação C-N formada. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S130** no material em anexo) observou-se um sinal em δ 46,60 ppm, referente a dois carbonos, indicando a presença de carbono metilênico, ligado ao átomo de nitrogênio. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada, pontuados anteriormente, suportam a tese de que a *N*-alquilação foi realizada com êxito, formando o **D4**.

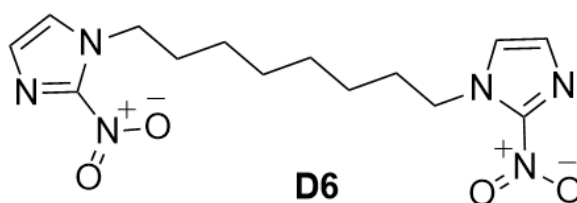
3.5.Preparação do D5



O **D5** foi obtido, utilizando o alquilante bidentado 1,6-dibromohexano, seguindo a metodologia descrita no **Esquema 1**, na forma de um sólido de coloração amarela, em rendimento isolado de 60%, além de apresentar pureza adequada para e prosseguir com os ensaios biológicos (determinada por CLAE, **Figura S136** no material em anexo).

O **D5** foi caracterizado através dos métodos convencionais de análise (RMN ^1H e ^{13}C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado (180-183°C). No espectro de massas (**Figura S135** no material em anexo) HRMS (EI, m/z) calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}_4^+$, 309,1311; encontrado 309,1318, que confirma a estrutura do **D5**. Adicionalmente, no espectro de RMN ^1H (**Figura S133** no material em anexo) é possível observar um tripleto, com integração para 4 hidrogênios, em δ 4,36 ppm, referente ao CH_2 ligado ao nitrogênio do anel imidazólico, que fornece a informação da ligação C-N formada. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S134** no material em anexo) observou-se um sinal em δ 49,75 ppm, referente a dois carbonos, indicando a presença de carbono metilênico, ligado ao átomo de nitrogênio. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada, pontuados anteriormente, suportam a tese de que a *N*-alquilação foi realizada com êxito, formando o **D5**.

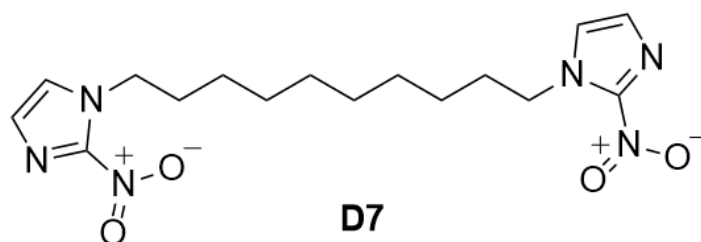
3.6.Preparação do D6



O **D6** foi obtido, utilizando o alquilante bidentado 1,8-dibromooctano, seguindo a metodologia descrita no **Esquema 1**, na forma de um sólido de coloração amarela, em rendimento isolado de 87%, além de apresentar pureza adequada para e prosseguir com os ensaios biológicos (determinada por CLAE, **Figura S140** no material em anexo).

O **D6** foi caracterizado através dos métodos convencionais de análise (RMN ¹H e ¹³C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado (149-150°C). No espectro de massas (**Figura S139** no material em anexo) HRMS (EI, *m/z*) calculado para C₁₄H₂₁N₆O₄⁺, 337,1624; encontrado 337,1633, que confirma a estrutura do **D6**. Adicionalmente, no espectro de RMN ¹H (**Figura S137** no material em anexo) é possível observar um tripleto, com integração para 4 hidrogênios, em δ 4,42 ppm, referente ao CH₂ ligado ao nitrogênio do anel imidazólico, que fornece a informação da ligação C-N formada. No espectro de RMN ¹³C (**Figura S138** no material em anexo) observou-se um sinal em δ 50,24 ppm, referente a dois carbonos, indicando a presença de carbono metilênico, ligado ao átomo de nitrogênio. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada, pontuados anteriormente, suportam a tese de que a *N*-alquilação foi realizada com êxito, formando o **D6**.

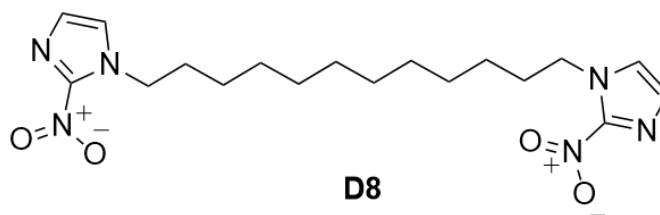
3.7.Preparação do D7



O **D7** foi obtido, utilizando o alquilante bidentado 1,10-dibromodecanoano, seguindo a metodologia descrita no **Esquema 1**, na forma de um sólido de coloração amarela, em rendimento isolado de 85%, além de apresentar pureza adequada para e prosseguir com os ensaios biológicos (determinada por CLAE, **Figura S144** no material em anexo).

O **D7** foi caracterizado através dos métodos convencionais de análise (RMN ^1H e ^{13}C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado (109-110°C). No espectro de massas (**Figura S143** no material em anexo) HRMS (EI, m/z) calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_4^+$, 365,1937; encontrado 365,1942, que confirma a estrutura do **D7**. Adicionalmente, no espectro de RMN ^1H (**Figura S141** no material em anexo) é possível observar um tripleto, com integração para 4 hidrogênios, em δ 4,42 ppm, referente ao CH_2 ligado ao nitrogênio do anel imidazólico, que fornece a informação da ligação C-N formada. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S142** no material em anexo) observou-se um sinal em δ 50,34 ppm, referente a dois carbonos, indicando a presença de carbono metilênico, ligado ao átomo de nitrogênio. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada, pontuados anteriormente, suportam a tese de que a *N*-alquilação foi realizada com êxito, formando o **D7**.

3.8.Preparação do D8



O **D8** foi obtido, utilizando o alquilante bidentado 1,12-dibromododecanoano, seguindo a metodologia descrita no **Esquema 1**, na forma de um sólido de coloração amarela, em rendimento isolado de 91%, além de apresentar pureza adequada para e prosseguir com os ensaios biológicos (determinada por CLAE, **Figura S148** no material em anexo).

O **D8** foi caracterizado através dos métodos convencionais de análise (RMN ^1H e ^{13}C e EM), além de ter seu ponto de fusão determinado (97-100°C). No espectro de massas (**Figura S147** no material em anexo) HRMS (EI, m/z) calcd. para $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_4^+$, 393,2250; encontrado 393,2266, que confirma a estrutura do **D8**. Adicionalmente, no espectro de RMN ^1H (**Figura S145** no material em anexo) é possível observar um tripleto, com integração para 4 hidrogênios, em δ 4,42 ppm, referente ao CH_2 ligado ao nitrogênio do anel imidazólico, que fornece a informação da ligação C-N formada. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura S146** no material em anexo) observou-se um sinal em δ 50,37 ppm, referente a dois carbonos, indicando a presença de carbono metilênico, ligado ao átomo de nitrogênio. Esses sinais, relacionados à estrutura da molécula sintetizada, pontuados anteriormente, suportam a tese de que a *N*-alquilação foi realizada com êxito, formando o **D8**.

4. Ensaios *in vitro*

Os compostos diméricos **D1-D8** obtidos foram avaliados quanto ao seu perfil de citotoxicidade contra células de mamíferos, bem como sua atividade antiparasitária contra amastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4-LacZ) e testados contra tripomastigotas “bloodstream” de *T. brucei* (cepa *T. b. brucei* 427) apresentando atividade antiparasitária relevante e de amplo espectro. Todas as moléculas exibiram um bom perfil de citotoxicidade contra os modelos de células de mamíferos testados, incluindo fibroblastos LLC-MK2, células renais humanas (HEK-293) e macrófagos de camundongo (RAW 264.7) (**Tabelas 2 e 3**).

Como detectado inicialmente por uma abordagem *in silico*, a atividade antiparasitária da série dimérica se mostrou promissora para atuar frente ao *T. cruzi* através da ativação dessas moléculas pela TcNTR como evidenciado no ensaio *in vitro* (**Tabela 2**) com bons resultados e altos índices de seletividade.

Tabela 2. Atividade anti-*T. cruzi* da azomicina e dos compostos diméricos **D1-D8**.

Compostos	Amastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Tulahuen C2C4-LacZ) 120h	Células LLC-MK2 120h	IS* (LLC-MK2)
CI ₅₀ (μM)			
Azomicina	5,74 ± 1,89	>500	>87,10
D1	9,13 ± 0,93	>200	>21,90
D2	3,20 ± 0,58	>200	>62,50
D3	2,66 ± 0,78	>200	>75,18
D4	1,38 ± 0,24	>200	>144,9
D5	0,59 ± 0,01	>200	>338,98
D6	1,19 ± 0,31	>100	>84,03
D7	0,48 ± 0,11	>100	>208,33
D8	0,61 ± 0,13	52,39 ± 4,13	85,88
Benznidazol [#]	1,84 ± 0,4	>200	>133,33

IS* = Índice de Seletividade = (CI₅₀ LLC-MK2)/(CI₅₀ *T. cruzi*); [#]Fármaco de referência para *T. cruzi*.

Os dímeros também foram avaliados frente ao *T. b. brucei*, apresentando atividade moderada, e também bons índices de seletividade (**Tabela 3**), demonstrando a capacidade dos compostos diméricos de serem considerados como potenciais agentes de amplo espectro contra diferentes espécies de Trypanosomas.

Tabela 3. Atividade anti-*T. b. brucei* dos compostos diméricos **D1-D8**.

Compostos	<i>T. b. brucei</i>	HEK-293	RAW-264.7	IS*	IS**
	48h	48h	48h	(HEK-293)	(RAW-264.7)
	CI ₅₀ (μM)				
D1	21,42 ± 1,14	>125	>125	>5,83	>5,83
D2	16,36 ± 2,65	>125	>125	>4,57	>4,57
D3	24,89 ± 7,89	>125	>125	>5,02	>5,02
D4	10,06 ± 2,47	>125	>125	>12,42	>12,42
D5	5,37 ± 3,15	87,41 ± 1,20	>125	16,27	>23,27
D6	7,98 ± 3,12	22,32 ± 1,08	71,71 ± 3,67	2,79	8,98
D7	21,04 ± 1,90	35,14 ± 5,31	98,38 ± 9,39	1,67	4,67
D8	1,79 ± 0,63	102,05 ± 8,54	>125	57,01	>69,83
Fexinidazol[#]	1,20 ± 0,51	-	-	-	-

IS* = Índice de Seletividade = (CI₅₀ HEK-293)/(CI₅₀ *T. brucei brucei*); IS** = Índice de Seletividade = (CI₅₀ RAW-264.7)/(CI₅₀ *T. brucei brucei*); [#]Fármaco de referência para *T. brucei*.

Conforme identificado anteriormente por meio de uma abordagem *in silico*, a atividade antiparasitária da série dimérica mostra-se promissora para o combate ao *T. cruzi*; no entanto, também a avaliamos *in vitro* contra o *T. b. brucei* e obtivemos um bom índice seletivo, demonstrando o potencial dos compostos diméricos para serem considerados agentes de amplo espectro contra o Trypanosoma. Observamos um aumento na atividade contra as formas amastigotas do *T. cruzi* à medida que o comprimento da cadeia espaçadora entre os fragmentos de 2-nitroimidazol aumentava, apoiando tanto a tendência de acoplamento molecular ao TcNTR quanto os valores teóricos da diferença de energia HOMO-LUMO, o que reforça que o TcNTR é um alvo viável para os compostos diméricos testados. Os compostos **D5**, **D7** e **D8** exibiram valores de concentração inibitória (CI₅₀) na faixa submicromolar, superando o benznidazol, o fármaco de referência para o tratamento de infecções por *T. cruzi*. É essencial observar que compostos com espaçadores maiores que cinco unidades CH₂ na cadeia de ligação apresentam potência semelhante à do benznidazol, com os compostos **D5** e **D7**

apresentando índice seletividade superior ao do benznidazol. Isso sugere que a atividade anti-*T. cruzi* altamente eficaz depende do comprimento da cadeia metilênica (**Tabela 2**), corroborando a previsão teórica de melhora da flexibilidade dos compostos diméricos com o aumento de unidades espaçadoras, o que pode impactar positivamente sua capacidade de interagir com o cofator enzimático, levando à redução não apenas de uma, mas de ambas as frações 2-nitroimidazol dos compostos diméricos.

Com base nos resultados da avaliação frente as formas tripomastigotas “bloodstream”, os dímeros apresentaram um perfil de atividade antiparasitária significativo frente ao *T. b. brucei*, demonstrando alta seletividade, mas CI_{50} moderado contra o parasita. Apenas o composto **D8** se destaca, por apresenta potência comparável à do fármaco de referência fexinidazol, com alto índice de seletividade (**Tabela 3**). Como os aumentos na cadeia metileno não se correlacionam com a atividade anti-*T. b. brucei*, como observado no perfil de atividade anti-*T. cruzi*, não foram realizados cálculos de “docking” molecular para a enzima NTR de *T. b. brucei*.

É importante notar que esses valores crescentes de atividade podem, de fato, estar relacionados à maior flexibilidade conformacional de suas estruturas, o que permite que os grupos farmacofóricos em suas extremidades interajam mais livremente com os receptores dentro do parasita. Esse aumento de atividade também pode ser atribuído ao valor de $LogP_{o/w}$ desses compostos, que aumenta sua atividade devido à lipofilicidade (**Tabela 1**). Portanto, a eficácia desses dímeros com uma cadeia espaçadora mais longa também pode ser devida à sua capacidade de penetrar na membrana do parasita, considerando o aumento do $LogP_{o/w}$ e a permeação mais fácil da membrana. Os valores de $LogP_{o/w}$ foram calculados usando o método relatado por Daina e colaboradores (2014) por meio do servidor web SwissADME, suportado pelo software Spartan 14 (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2014).

5. Conclusão

O projeto da série dimérica com base no grupo farmacóforo benzimidazol (2-nitroimidazol) foi promissor e corroborou os resultados obtidos no estudo *in silico*. O ensaio de “*docking*” molecular exigiu a preparação da TcNTR para gerar uma estrutura homodimérica com alta sobreposição do sítio ativo AlphaFold. A etapa de síntese do dímero demonstrou que a preparação do dímero foi simples em uma única etapa por meio de uma reação de *N*-alquilação usando agentes alquilantes bidentados. Todos os compostos foram ativos contra as formas replicativas do *T. cruzi* (Tulahuen C2C4-LacZ), particularmente os dímeros de cadeia mais longa, que exibiram valores de CI_{50} abaixo de 1,0 μ M. Conforme observado no estudo *in silico*, a ativação do grupo nitroimidazol pela TcNTR depende do comprimento da cadeia metileno dos compostos, pois há melhor interação com o sítio ativo da enzima em estruturas de cadeias metilênicas mais longas. Essa ativação estaria gerando produtos de redução tóxicos que podem causar danos irreversíveis às macromoléculas biológicas, comprometendo a integridade do parasita. Além de serem tóxicos ao *T. cruzi* e moderadamente tóxicos ao *T. b. brucei*, os novos derivados produzidos neste estudo apresentaram perfil de citotoxicidade muito baixo contra células de mamíferos, demonstrando sua alta seletividade — especialmente para os dímeros de cadeia mais longa. Os resultados discutidos acima sugerem o avanço do composto mais ativo em futuras avaliações de citotoxicidade em células primárias e em um modelo de infecção *in vivo* em investigações subsequentes conduzidas pelo nosso grupo.

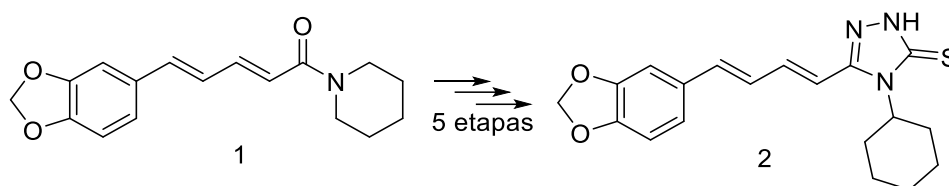
MATERIAIS E MÉTODOS

1. Química

Todos os reagentes químicos foram adquiridos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA), a menos que indicado de outra forma. Os solventes foram tratados com peneiras moleculares ativadas (3A) antes do uso. Foi utilizado o reator de micro-ondas - Modelo Discover - CEM Inc., para a realização de algumas etapas reacionais, além de placas de aquecimento e agitação das marcas Corning, Fisatom ou Ika. As reações foram monitoradas por cromatografia em camada fina (CCDA) em placas de sílica gel Merck (Darmstadt, Alemanha) de 0,25 mm (60F-254) e visualizadas sob lâmpadas UV (254 e 365 nm). As purificações dos compostos foram realizadas com sílica gel flash padrão (mesh 60) em coluna cromatográfica da Sorbent Technologies. Todos os pontos de fusão (P.F.) foram medidos utilizando um aparelho Fisatom 430D (São Paulo, Brasil) e não foram corrigidos. Os espectros de ^1H -RMN (400 e 500 MHz) e de ^{13}C -RMN (100 e 125 MHz) foram medidos em um espectrômetro BRUKER Ultrashield Plus (Billerica, Massachusetts, EUA) a 25 °C e referenciados a TMS. Os deslocamentos químicos são relatados em ppm (δ) em relação à linha de solvente residual como padrão interno. Os padrões de divisão são descritos como s, simpleto; d, duplete; t, tripleto; m, multiplete; sl, simpleto largo. As constantes de acoplamento (J) foram medidas em hertz (Hz). O espectro de IV foi registrado em um espectrofotômetro BRUKER-VERTEX 70 FT-IR utilizando o método ATR. As análises de cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-MS) foram realizadas em um LCMS-2020 (Shimadzu Inc., Kyoto, Japão). Condições analíticas: coluna: Kromasil C18, 150 mm $\times$ 4,6 mm $\times$ 5 μm (AkzoNobel, Amsterdã, Holanda); fase móvel: água com 0,1% de ácido fórmico (A), acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), 1,0 mL/min, gradiente linear (indicado no traço); volume de injeção: 10 μL ; detectores: PDA (200–400 nm), ESI+ (baixa resolução). As análises de cromatografia líquida-espectrometria de massas de alta resolução (LCMS-HR) foram realizadas em um Agilent LC-MS-QTOF 6530C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA). Condições analíticas: coluna: Poroshell C18, 100 mm $\times$ 4,6 mm $\times$ 2,1 μm (Phenomenex, Inc., Califórnia, EUA); fase móvel: água com 0,1% de ácido fórmico (A), acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), 1,0 mL/min, gradiente linear (indicado no traço); volume de injeção: 4 μL ; detectores: PDA (200–400 nm). Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrofotômetro de massas Shimadzu GCMS-QP2010 (Condições de análise: Coluna vf575MS (30 m x

0,25 mm x 0,25 mm); Temperatura: 200 °C/1 °C – 10 °C – 290 °C/40 min.; Injetor: 270 °C). Todos os equipamentos de análise estão na Central Analítica Multiusuário – PPGQ – UFRRJ.

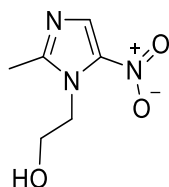
1.1. Obtenção do derivado 1,2,4-triazol-3-tiona 2 derivado da amida natural piperina



5-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4-ciclohexil-2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona **2**. A síntese de **2** foi realizada conforme a metodologia descrita por Franklim (2013). Este trabalho descreve tudo, desde a extração de piperina da pimenta-do-reino até a preparação do ciclohexil triazol **2**. Cor: Amarelo. Rendimento: 90%. P.F.: 192–194 °C. FT-IR (n, cm⁻¹): 3425 (N-H) (triazol), 1251 (O-C-O) (éter), 1037 (C=S) (triazol-tiona). ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm): 13,76 (s, 1H, NH), 7,19 (d, 1H, *J* = 1,89 Hz), 7,19–7,24 (m, 1H), 7,11–7,17 (m, 1H), 6,99 (dd, 1H, *J* = 10,00 e 5,00 Hz), 6,93 (d, 1H, *J* = 8,20 Hz), 6,85 (d, 1H, *J* = 15,13 Hz), 6,75 (d, 1H, *J* = 14,50 Hz), 6,05 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 4,55–4,75 (m, 1H, -NH-CH-(CH₂-CH₂)₂-CH₂), 1,33–2,08 (m, 10H, -NH-CH-(CH₂-CH₂)₂-CH₂). ¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm): 166,63 (1C, triazol-C=S), 149,63 (1C, triazol-C), 148,47 (1C, Ar-C), 148,21 (1C, Ar-C), 141,20 (1C, vinil-CH), 137,22 (1C, vinil-CH), 131,45 (1C, Ar-C), 126,80 (1C, vinil-CH), 122,97 (1C, Ar-C), 114,63 (1C, vinil-CH), 109,06 (1C, Ar-C), 105,82 (1C, Ar-C), 101,81 (1C, O-C-O), 55,45 (1C, CH), 32,35 (1C, CH₂), 26,13 (1C, CH₂), 24,87 (1C, CH₂). MS (EI, *m/z* (%)): 307 (M⁺, 100). HRMS (EI, *m/z*) calculado para C₁₉H₂₂N₃O₂S⁺: 356,1354; encontrado: 356,1433. CLAE (isocrático; ACN:H₂O 65:35, 15 min; 0,1% de ácido fórmico): t.r. = 1,93 min, pureza = 95,21%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S1-S5** do material em anexo.

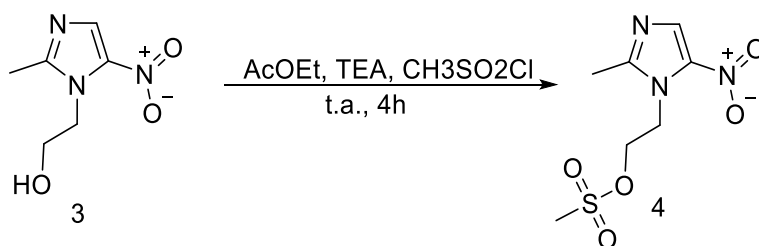
1.2.Preparação do alquilante 5-nitroimidazólico derivado do metronidazol

1.2.1. Obtenção do metronidazol (3)



2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etan-1-ol (metronidazol) **3**. Para extração, foram utilizados seis comprimidos de Flagyl® de 400 mg, macerados, e 50 mL de solução de HCl a 10%, sob agitação por 1 h. Posteriormente, a solução foi filtrada e neutralizada até pH 7 com solução saturada de NaHCO₃, o que levou à precipitação do metronidazol. Cor: Branco. Rendimento: 82%. P.F.: 162 – 165 °C. FT-IR (ν, cm⁻¹): 3213 (OH) (álcool), 1523 (N–O) (nitro). ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆, δ, ppm): 2,46 (s, 3H, CH₃), 3,7 (q, 2H J=5,4 Hz, OCH₂), 4,4 (t, 2H J = 5,4 Hz, NCH₂), 8,03 (s, 1H IM-H). ¹³C RMN (125 MHz, DMSO-d₆, δ, ppm): 14,68 (1C, CH₃), 48,7 (1C, CH₂-OH), 60,19 (1C, CH₂-N), 133,41 (1C, CH-IM), 138,84 (1C, C-IM), 152,42 (1C, C-IM). MS (IE 70 eV, m/z (%)): 171 (M⁺, 10); 124(60); 81 (100) e 54 (75). CG (25 min): t.r. = 14,33 min, pureza = 100%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S6-S10** do material em anexo.

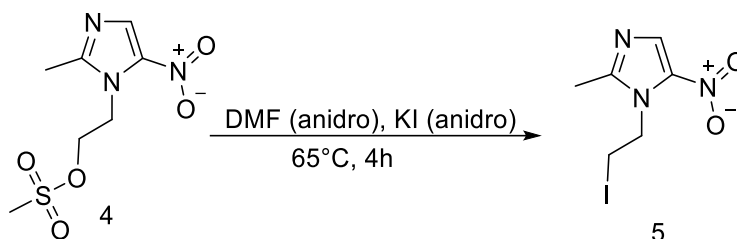
1.2.2. Obtenção do 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil metanossulfonato (4)



2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etilmetanossulfonato **4**. Inicialmente, foi adicionado metronidazol (3) (1,2 mmol) em 25 ml de acetato de etila anidro e trietilamina (3 mmol), em seguida, foi adicionado cloreto de mesila (4,3 mmol). Após 4 h, o fim da reação foi observado por CCD; o meio reacional foi filtrado e a fase orgânica foi lavada com solução de NaHCO₃ a 5% e com solução saturada de NaCl, e, finalmente, seca com Na₂SO₄ e evaporada em rotaevaporador, gerando cristais levemente azulados. Cor: Branco. Rendimento: 66%. P.F.: 163 – 165 °C. FT-IR (ν, cm⁻¹): 3024 (C–H) (imidazol), 2981 (C–H) (CH₂, CH₃), 1523 (N–O) (nitro), 1178 (S=O) (metanossulfonato). ¹H RMN

(500 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm): 2,47 (s, 3H, CH₃), 3,16 (s, 3H, SCH₃), 4,56 (t, 2H, J = 4,7 Hz, OCH₂), 4,66 (t, 2H J =4,7 Hz), 8,07 (s, 1H). ¹³C RMN (125 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm): 14,49 (1C, CH₃), 37,18 (1C, S-CH₃), 45,56 (1C, CH₂-O), 68,95 (1C, CH₂-N), 133,55 (1C, CH-IM), 138,91 (1C, C-IM). EM (IE, 70 eV): m/z 249 (M⁺, 5%); 203 (30%); 170 (100%); 123 (90%) e 79 (60%). CG (45 min): t.r. = 13,62 min, pureza = 97,7%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S11-S15** do material em anexo.

1.2.3. Obtenção do 1-(2-iodoetil)-2-metil-5-nitro-1H-imidazol (5)



1-(2-iodoetil)-2-metil-5-nitro-1H-imidazol **5**. 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil metanossulfonato (**4**) (8 mmol) e KI anidro (2,4 mmol) foram solubilizados em 4 ml de *N,N*-dimetilformamida seca. A reação foi realizada na escuridão por 4 horas a 60 °C, sendo monitorada por CCDA. Após seu término, o meio reacional foi evaporado em rotaevaporador e, posteriormente, o produto foi isolado por meio de coluna cromatográfica, na forma de um sólido cristalino de cor branca, com rendimento de 53%. P.F.: 101 – 104 °C. FT-IR (n, cm⁻¹): 3108 (C-H) (imidazol), 2966 (C-H) (CH₂, CH₃), 1346 (N-O) (nitro), 555 (CH₂-I). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 2,60 (s, 3H, CH₃), 3,48 (t, 2H, J = 7,0 Hz, CH₂I), 4,65 (t, 2H J = 7,0 Hz, NCH₂), 8,01 (s, 1H, IM-H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 0,03 (1C, CH₂-I), 14,78 (1C, CH₃), 40,92 (1C, CH₂-N), 133,4 (1C, CH-IM), 150,4 (1C, C-IM). EM (IE, 70 eV): m/z 281 (M⁺, 20%); 155 (100%); 154 (60%); 123 (90%) e 80 (50%). CG (30 min): t.r. = 11,08 min., pureza = 100%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S16-S20** do material em anexo.

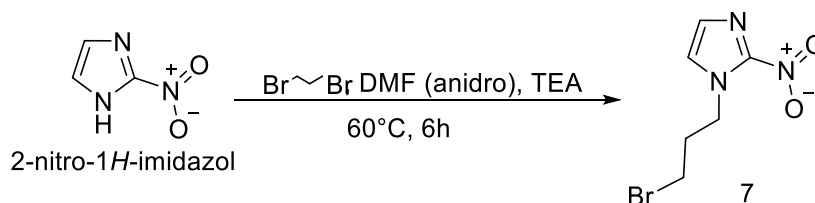
1.3.Preparação dos alquilantes 2-nitroimidazólicos

1.3.1. Obtenção do 1-(2-bromoetil)-2-nitro-1H-imidazol (6)



1-(2-bromoetil)-2-nitro-1H-imidazol 6. Inicialmente, 2-nitroimidazol (1,77 mmol) foi solubilizado em 3 ml de *N,N*-dimetilformamida seca e de trietilamina (7 mmol). Em seguida, sob agitação, o agente alquilante 1,2-dibromoetano (14 mmol) foi adicionado. A reação continuou por 4 horas a 55 °C, sendo monitorada por CCDA. O meio de reação foi evaporado em rotaevaporador e, posteriormente, o produto foi isolado em uma coluna cromatográfica, resultando em um sólido cristalino, de cor amarelo-clara, com rendimento de 52%. P.F.: 68 - 70 °C (Lit.: 73 - 75 °C) (LONG; PARRICK; HODGKISS, 1991). FT-IR (n, cm⁻¹): 3120(C-H) (imidazol), 2927(C-H) (CH₂, CH₃), 1351 (N-O) (nitro), 1155 (C-H) (CH₂-Br). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 3,78 (t, *J* = 5,8 Hz, 2 H, CH₂Br) 4,83 (t, *J* = 5,8 Hz, 2 H, NCH₂) 7,21 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, IM-H) 7,23 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, IM-H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 29,73 (1C, CH₂-Br), 51,41 (1C, CH₂-N), 127,15 (1C, CH-IM), 128,37 (1C, CH-IM). EM (IE, 70 eV): *m/z* 219/221 (M⁺, 20%); 140 (55%); 107/109 (100%) e 82 (60%). MS (ESI⁺, *m/z* (%)): 307 253,0 [M+Na]⁺. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (5-95% CAN), 15 min; 0,1% ácido fórmico): r.t. = 6,95 min, pureza = 92,8%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S21-S26** do material em anexo.

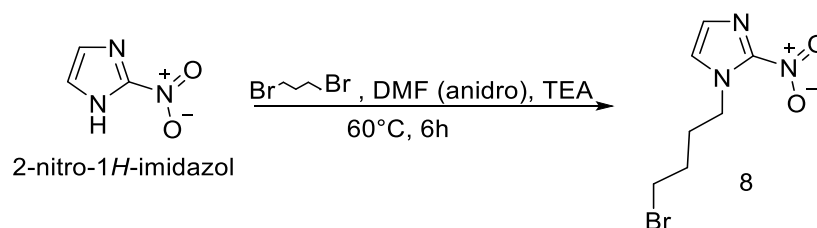
1.3.2. Obtenção do 1-(3-bromopropil)-2-nitro-1H-imidazol (7)



1-(3-bromopropil)-2-nitro-1H-imidazol 7. Inicialmente, 2-nitroimidazol (1,77 mmol) foi solubilizado em 3 ml de *N,N*-dimetilformamida seca e trietilamina (7 mmol). Em seguida, sob agitação, o agente alquilante 1,3-dibromopropano (7 mmol) foi

adicionado. A reação continuou por 6 horas a 60 °C, sendo monitorada por CCDA. O meio de reação foi evaporado em rotaevaporador e, posteriormente, o produto foi isolado em coluna cromatográfica, resultando em um sólido de cor amarelo-clara, com rendimento de 55%. P.F.: 65 - 68 °C (Lit.: 62 - 63 °C)(LONG; PARRICK; HODGKISS, 1991). FT-IR (n, cm⁻¹): 3112 (C-H) (imidazol), 2921 (C-H) (CH₂, CH₃), 1355 (N-O) (nitro), 648 (C-Br). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 2,43 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂), 3,40 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂Br), 4,64 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, NCH₂), 7,18 (s, 1H, IM-H), 7,28 (s, 1H, IM-H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 29,15 (1C, CH₂-CH₂-CH₂); 32,99 (1C, CH₂-Br), 48,20 (1C, CH₂-N), 126,92 (1C, CH-IM), 128,61 (1C, CH-IM). EM (IE, 70 eV): *m/z* 235/233 (M⁺., 0%); 41 (100%); 108 (90%); 81 (40%). CG (20 min): t.r. = 8,92 min, pureza = 82,8%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S27-S31** do material em anexo.

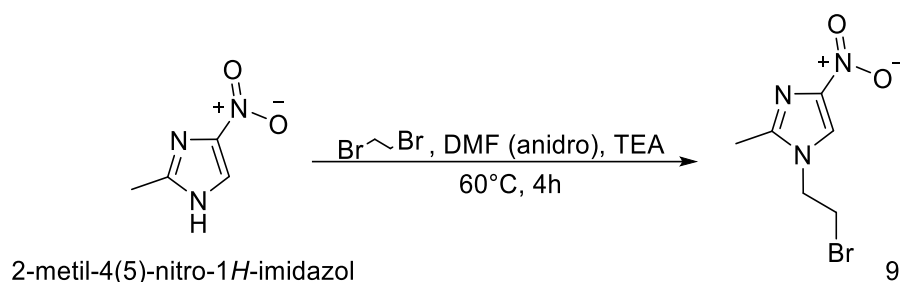
1.3.3. Obtenção do 1-(4-bromobutil)-2-nitro-1H-imidazol (8)



1-(4-bromobutil)-2-nitro-1H-imidazol **8**. Inicialmente, 2-nitroimidazol (1,77 mmol) foi solubilizado em 3 ml de *N,N*-dimetilformamida seca e trietilamina (7 mmol). Em seguida, sob agitação, foi adicionado o agente alquilante 1,4-dibromobutano (4,4 mmol). A reação ocorreu por 6 horas, sendo monitorada por meio de CCD. O meio reacional foi evaporado em rotaevaporador e, em seguida, o produto foi isolado em coluna cromatográfica, resultando em um óleo de cor amarela, com rendimento de 45%. FT-IR (n, cm⁻¹): 3116 (C-H) (imidazol), 2960 (C-H) (CH₂, CH₃), 1353 (N-O) (nitro), 649 (C-Br). RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 1,96 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂), 2,07 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂), 3,45 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂Br), 4,48 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, NCH₂), 7,18 (s, 1H, IM-H), 7,24 (s, 1H, IM-H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 29,24 (1C, CH₂-CH₂-CH₂), 29,30 (1C, CH₂-CH₂-CH₂), 32,18 (1C, CH₂-Br), 49,41 (1C, CH₂-N), 125,74 (1C, CH-IM), 128,57 (1C, CH-IM). EM (IE, 70 eV): *m/z* 247/249 (M⁺., 0%); 55 (100%); 122 (50%). CG (27 min): r.t. = 10,51 min, pureza = 99,3%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S32-S36** do material em anexo.

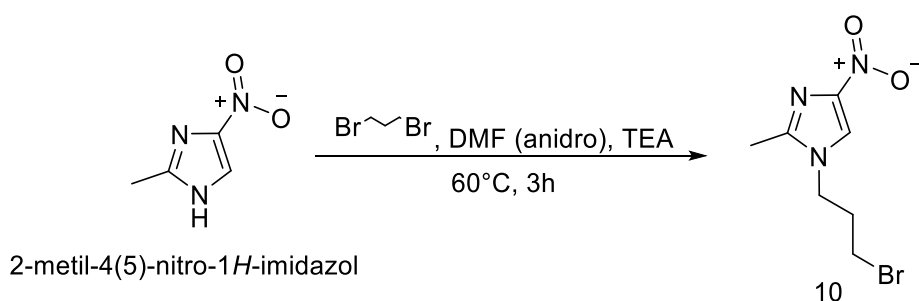
1.4.Preparação dos alquilantes 4-nitroimidazólicos

1.4.1. Obtenção do 1-(2-bromoetil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (9)



1-(2-bromoetil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol **9**. Inicialmente, 2-metil-(4)5-nitroimidazol (1,58 mmol) foi solubilizado em 3 ml de *N,N*-dimetilformamida seca e trietilamina (7 mmol). Em seguida, sob agitação, o agente alquilante 1,2-dibromoetano (8 mmol) foi adicionado. A reação continuou por 4 horas a 60 °C, sendo monitorada por CCDA. O meio de reação foi evaporado em rotaevaporador e, posteriormente, o produto foi isolado em coluna cromatográfica, resultando em um sólido de cor branca com rendimento de 50%. P.F.: 200-203 °C. FT-IR (n, cm⁻¹): 3099 (C-H) (imidazol), 2968 (C-H) (CH₂, CH₃), 1357 (N-O) (nitro), 675 (C-Br). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 2,50 (s, 3H, CH₃), 3,66 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂Br), 4,38 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, NCH₂), 7,80 (s, 1H IM-H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 13,22 (1C, CH₃), 29,14 (1C, CH₂-Br), 49,20 (1C, CH₂-N), 119,54 (1C, CH-IM), 144,89 (1C, C-IM). EM (IE, 70 eV): *m/z* 235/233 (M⁺, 50%); 135/134 (40%); 109/107 (100%). CG (20 min): r.t. = 14,25 min, pureza = 97,0%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S37-S41** do material em anexo.

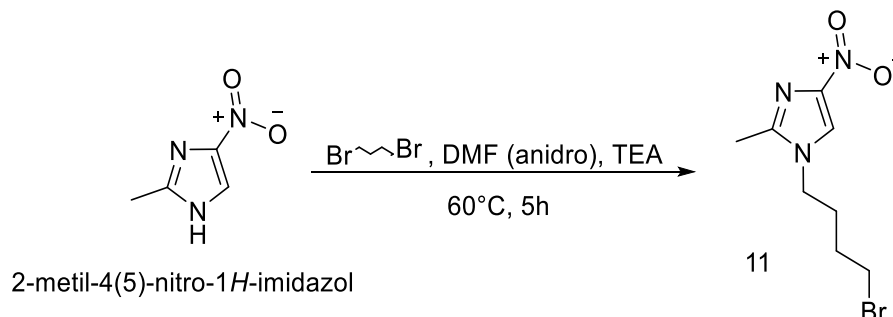
1.4.2. Obtenção do 1-(3-bromopropil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (10)



1-(3-bromopropil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol **10**. Inicialmente, 2-metil-(4)5-nitroimidazol (1,58 mmol) foi solubilizado em 3 mL de *N,N*-dimetilformamida seca e

triethylamina (7 mmol). Em seguida, sob agitação, o agente alquilante 1,3-dibromopropano (6,3 mmol) foi adicionado. A reação continuou por 3 horas a 60 °C, sendo monitorada por CCDA. O meio reacional foi evaporado em rotaevaporador e, posteriormente, o produto foi isolado em coluna cromatográfica, resultando na obtenção de **10**, em forma de sólido branco, com rendimento de 47%. P.F.: 78 - 80 °C. FT-IR (n, cm⁻¹): 3099 (C-H) (imidazol), 2968 (C-H) (CH₂, CH₃), 1326 (N-O) (nitro). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 2,34 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂), 2,49 (s, 3H, CH₃), 3,41 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂Br), 4,17 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, NCH₂), 7,75 (s, 1H IM-H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 13,17 (1C, CH₃), 28,89 (1C, CH₂-CH₂-CH₂), 32,41 (1C, CH₂-Br), 44,89 (1C, CH₂-N), 119,49 (1C, CH-IM), 144,90 (1C, C-IM). MS (ESI+, *m/z* (%)): 248/250 [M⁺]. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (5-95% CAN), 15 min; 0,1% ácido fórmico): r.t. = 3,14 min, pureza = 72,8%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S42-S46** do material em anexo.

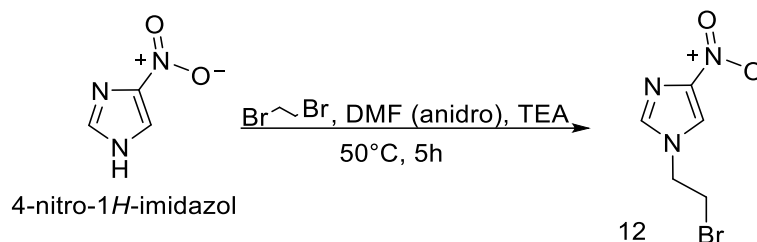
1.4.3. Obtenção do 1-(4-bromobutil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (**11**)



1-(4-bromobutil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol **11**. Inicialmente, 2-metil-(4)5-nitroimidazol (1,58 mmol) foi solubilizado em 3 ml de *N,N*-dimetilformamida seca e trietilamina (7 mmol). Em seguida, sob agitação, o agente alquilante 1,4-dibromobutano (3,16 mmol) foi adicionado. A reação continuou por 5 horas à temperatura ambiente, sendo monitorada por CCDA. O meio de reação foi evaporado em rotaevaporador e, posteriormente, o produto foi isolado em coluna cromatográfica, resultando em um sólido branco, com rendimento de 45%. P.F.: 70 - 72 °C. FT-IR (n, cm⁻¹): 3145 (C-H) (imidazol), 2954 (C-H) (CH₂, CH₃), 1363 (N-O) (nitro), 680 (C-Br). RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 1,94 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂), 2,01 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂), 2,46 (s, 3H, CH₃), 3,46 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂Br), 3,98 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, NCH₂), 7,72 (s, 1H, IM-H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 13,17 (1C, CH₃), 28,82 (1C, CH₂-CH₂-CH₂), 29,14

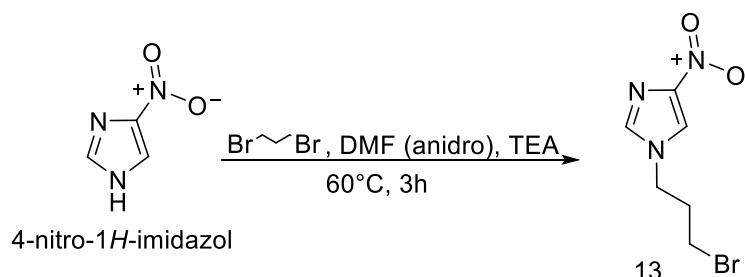
(1C, CH₂-CH₂-CH₂), 32,17 (1C, CH₂-Br), 46,40 (1C, CH₂-N), 119,40 (1C, CH-IM), 144,64 (1C, C-IM). MS (ESI+, *m/z* (%)): 261/263 [M⁺]. CLAE (gradiente; ACN:H₂O, 5-95% CAN, 15 min; 0,1% ácido fórmico): r.t. = 2,48 min, pureza = 92,1%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S47-S51** do material em anexo.

1.4.4. Obtenção do 1-(2-bromoetil)-4-nitro-1H-imidazol (**12**)



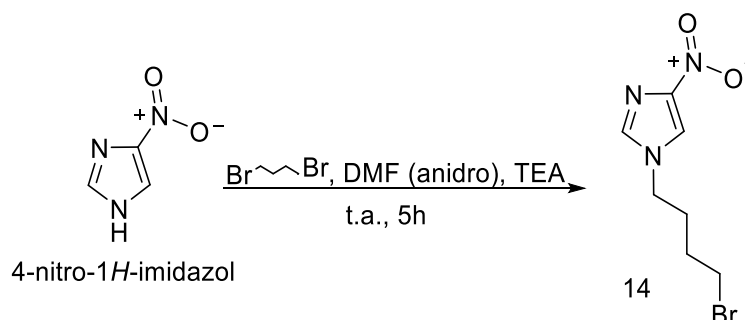
1-(2-bromoetil)-4-nitro-1H-imidazol **12**. Inicialmente, 4-nitroimidazol (1,77 mmol) foi solubilizado em 3 mL de *N,N*-dimetilformamida seca e trietilamina (7 mmol). Em seguida, sob agitação, o agente alquilante 1,2-dibromoetano (8 mmol) foi adicionado. A reação continuou por 5 horas a 50 °C, sendo monitorada por CCDA. O meio de reação foi evaporado em rotaevaporador e, posteriormente, o produto foi isolado em coluna cromatográfica, resultando em um sólido branco, com rendimento de 60%. P.F.: 87 - 90 °C. FT-IR (n, cm⁻¹): 3020 (C-H) (imidazol), 1336 (N-O) (nitro), 655 (C-Br). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 3,7 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂-Br), 4,49 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂-N), 7,55 (s, 1H, CH), 7,89 (s, 1H, CH). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 29,56 (1C, CH₂-Br), 49,60 (1C, CH₂-N), 119,00 (1C, CH-IM), 136,15 (1C, CH-IM). EM (ESI+, *m/z* (%)): 263,0 [M+ACN+2H]⁺. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (5-95% CAN), 15 min; 0,1% ácido fórmico): r.t. = 5,91 min, pureza = 93,7%. Os espectros de caracterização estão nas **figuras S52-S56** do material em anexo.

1.4.5. Obtenção do 1-(3-bromopropil)-4-nitro-1H-imidazol (13)



1-(3-bromopropil)-4-nitro-1H-imidazol **13**. Inicialmente, 4-nitroimidazol (1,77 mmol) foi solubilizado em 3 ml de *N,N*-dimetilformamida seca e trietilamina (7 mmol). Em seguida, sob agitação, o agente alquilante 1,3-dibromopropano (6,3 mmol) foi adicionado. A reação continuou por 3 horas a 60 °C, sendo monitorada por CCDA. O meio de reação foi evaporado em rotaevaporador e, posteriormente, isolado em coluna cromatográfica, resultando em um sólido branco, com rendimento de 45%. P.F.: 78 - 80 °C. FT-IR (n, cm⁻¹): 3105 (C-H) (imidazol), 1324 (N-O) (nitro). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 2,39 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂), 3,39 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂Br), 4,30 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, NCH₂), 7,0 (s, 1H, IM-H), 7,52 (s, 1H, IM-H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 28,52 (1C, CH₂-CH₂-CH₂), 32,78 (1C, CH₂-Br), 46,00 (1C, CH₂-N), 118,96 (1C, CH-IM), 136,15 (1C, CH-IM). EM (IE, 70 eV): *m/z* 235/233 (M⁺., 20%); 187/185 (40%); 127 (100%). CG (20 min): t.r. = 14,65 min, pureza = 94,8%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S57-S61** do material em anexo.

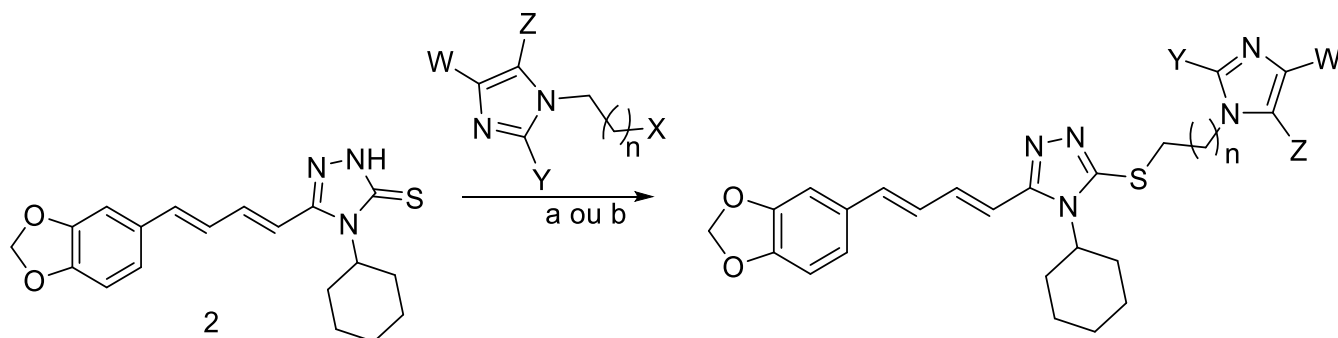
1.4.6. Obtenção do 1-(4-bromobutil)-4-nitro-1H-imidazol (14)



1-(4-bromobutil)-4-nitro-1H-imidazol **14**. Inicialmente, 4-nitroimidazol (1,77 mmol) foi solubilizado em 3 ml de *N,N*-dimetilformamida seca e trietilamina (7 mmol). Em seguida, sob agitação, o agente alquilante 1,4-dibromobutano (3,54 mmol) foi adicionado. A reação continuou por 5 horas à temperatura ambiente, sendo monitorada por CCDA. O meio reacional foi evaporado em rotaevaporador e, posteriormente, o

produto foi isolado em coluna cromatográfica, resultando em um sólido branco, com rendimento de 48%. P.F.: 70 - 72 °C. FT-IR (n, cm⁻¹): 2921 (C-H) (CH₂), 1355 (N-O) (nitro). RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 1,92 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂), 2,08 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂), 3,46 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, CH₂Br), 4,10 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, NCH₂), 7,47 (s, 1H IM-H), 7,81 (s, 1H IM-H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 29,12 (1C, CH₂-CH₂-CH₂), 29,26 (1C, CH₂-CH₂-CH₂), 31,95 (1C, CH₂-Br), 47,59 (1C, CH₂-N), 118,86 (1C, CH-IM), 135,81 (1C, CH-IM). MS (ESI⁺, *m/z* (%)): 249,0 [M+H]⁺. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (5-95% CAN), 15 min; 0,1% ácido fórmico): r.t. = 6,68 min, pureza = 98,6%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S62-S66** do material em anexo.

1.5.Preparação dos Híbridos H1-H10:



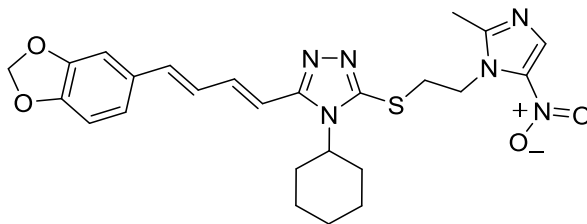
- H1** - n=1; W=H; Y=CH₃; Z=NO₂
H2 - n=1; W=H; Y=NO₂; Z=H
H3 - n=1; W=NO₂; Y=CH₃; Z=H
H4 - n=1; W=NO₂; Y=H; Z=H
H5 - n=2; W=H; Y=NO₂; Z=H
H6 - n=2; W=NO₂; Y=CH₃; Z=H
H7 - n=2; W=NO₂; Y=H; Z=H
H8 - n=3; W=H; Y=NO₂; Z=H
H9 - n=3; W=NO₂; Y=CH₃; Z=H
H10 - n=3; W=NO₂; Y=H; Z=H

Condições reacionais: (a) DMF, K₂CO₃, **5**, 24h, t.a., (63%); (b) Etanol, TEA, **6-14**, 6h, refluxo, (30-55%).

Figura 1. Metodologia de preparação dos híbridos **H1-H10**.

1.5.1. Metodologia de síntese do híbrido H1, utilizando o iodeto 5 como agente alquilante

1.5.1.1. Obtenção do H1

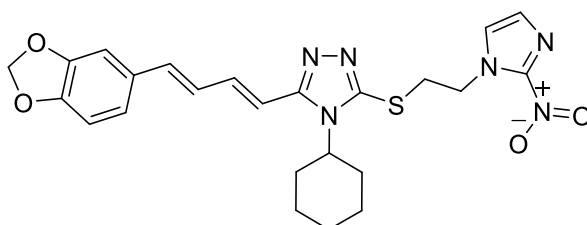


3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-il)-4-ciclohexil-5-((2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)tio)-4H-1,2,4-triazol (**H1**). Em um balão de reação equipado com uma barra magnética, foram adicionados **2** (0,127 mmol) e K₂CO₃ (0,20 mmol), que foram solubilizados em 2 mL de *N,N*-dimetilformamida seca, e, em seguida, o agente alquilante **5** (0,127 mmol) previamente preparado foi adicionado. A reação prosseguiu por 24 horas, sendo monitorada por CCDA (98% de diclorometano: 2% de metanol). Depois, água destilada gelada foi adicionada ao meio reacional, resultando na precipitação do produto em forma de sólido amarelo-claro, com rendimento de 63%. P.F.: 207 - 209 °C. FT-IR (n, cm⁻¹): 3025(C-H) (imidazol), 2935 (C-H) (CH₂, CH₃), 1359 (N-O) (nitro), 1180 (C-S). ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm): 1,3-1,9 (m, 10H, CH₂-cy), 2,44 (s, 3H, CH₃), 3,62 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, S-CH₂), 4,11 (m, 1H, CH-cy), 4,69 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, N-CH₂), 6,05 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 6,8 (m, 2H, 1 Ar-H, 1 C=C-H), 6,9 (m, 2H, Ar-H), 7,0 (d, 1H, C=C-H), 7,1 (m, 1H, Ar-H), 7,3 (m, 1H, C=C-H), 8,01 (s, 1H, IM-H). ¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm): 14,43 (1C, CH₃), 24,88 (1C, CH₂-cy), 25,77 (2C, CH₂-cy), 31,43 (2C, CH₂-cy), 32,13 (1C, CH₂-S), 45,22 (1C, CH₂-N), 55,83 (1C, CH-cy), 101,71 (1C, OCO), 105,73 (1C, Ar-CH), 109,02 (1C, Ar-CH), 115,17 (1C, C = CH), 122,68 (1C, Ar-CH), 127,06 (1C, C = CH), 133,48 (1C, C-H-IM), 136,08 (1C, C=C-H), 138 (1C, C=C-H), 147,99 (1C, Ar-C), 148,31 (1C, Ar-C), 148,41 (1C, Tri-C), 148,47 (1C, Tri-C-S), 153,67 (1C, C-IM). HRMS(EI, *m/z*) calculado para C₂₅H₂₉N₆O₄S⁺: 509,1971; encontrado: 509,2018. CLAE (isocrático; MeOH:H₂O 73:27, 20 min; 0,1% ácido fórmico): r.t. = 11,53 min, pureza = 98,8%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S67-S71** do material em anexo.

1.5.2. Metodologia geral utilizada na síntese dos híbridos H2-H10, utilizando os brometos 6-14 como agentes alquilantes

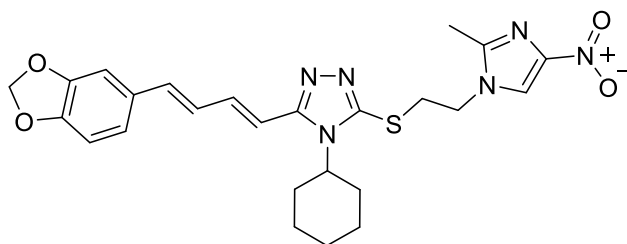
Em um balão de fundo redondo de 10 mL, equipado com uma barra magnética, foram adicionados 2 (0,35 mmol), trietilamina (1,4 mmol) e o alquilante nitroimidazol preparado anteriormente (0,35 mmol), que foram solubilizados em 5 mL de etanol. A reação prosseguiu sob refluxo, sendo monitorada por CCDA (98% de diclorometano: 2% de metanol). A reação foi evaporada em rotaevaporador e, em seguida, isolada em coluna cromatográfica.

1.5.2.1. Obtenção do H2



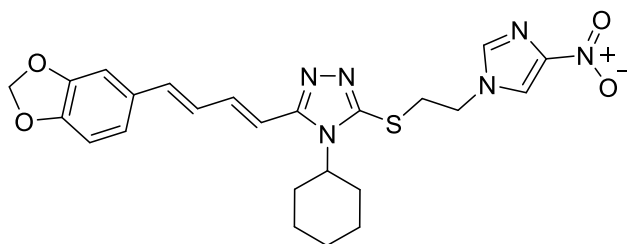
3-((1*E*,3*E*)-4-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4-ciclohexil-5-((2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)etil)tio)-4*H*-1,2,4-triazol (**H2**). Usando a metodologia descrita acima, com 1-(2-bromoetil)-2-nitro-1*H*-imidazol (**6**) como agente alquilante. Características do produto: sólido amarelo, com rendimento de 50%. P.F.: 170 - 174 °C. FT-IR (n, cm⁻¹): 3027 (C-H) (imidazol), 2929 (C-H) (CH₂, CH₃), 1361 (N-O) (nitro), 1197 (C-S). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 1,4-2,0 (m, 10H, CH₂-cy), 3,63 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, S-CH₂), 4,04 (m, 1H, CH-cy), 4,95 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, N-CH₂), 6,00 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 6,42 (d, 1H, Ar-H), 6,75 (t, 1H, Ar-H), 6,80 (m, 1H, Ar-H), 6,85 (m, 1H, C=C-H), 6,92 (m, 1H, C=C-H), 7,03 (d, 1H, C=C-H), 7,16 (m, 1H, C=C-H), 7,38 (s, 1H, IM-H), 7,51 (m, 1H, IM-H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 24,87 (1C, CH₂-cy), 25,92 (2C, CH₂-cy), 48,59, 31,65, (1C, CH₂-S), 56,61 (1C, CH-cy), 61,95 (1C, CH₂-N), 101,32 (1C, O-C -O), 105,57 (1C, Ar-CH), 108,55 (1C, Ar-CH-H), 113,13 (1C, C=CH), 122,46 (1C, Ar-CH), 125,72 (1C, CH-IM), 127,61 (1C, vinil-CH), 128,35 (1C, C-H-IM), 131,02 (1C, C=C-H), 137,09 (1C, C=C-H), 137,14 (1C, C=C-H), 148,13 (1C, Tri-C), 148,35 (1C, Tri-C-S), 153,98 (1C, C-IM). HRMS (EI, *m/z*) calculado para C₂₄H₂₇N₆O₄S⁺: 495,1814; encontrado: 495,1837. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (25-75% ACN), 18 min; 0,1% ácido fórmico): r.t. = 6,53 min, pureza = 98,7%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S72-S76** do material em anexo.

1.5.2.2.Obtenção do H3



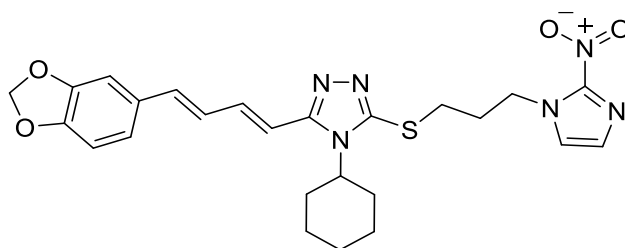
3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il)-4-ciclohexil-5-((2-(2-metil-4-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)tio)-4H-1,2,4-triazol (**H3**). Usando a metodologia descrita acima, com 1-(2-bromoetil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (**9**) como agente alquilante. Características do produto: sólido branco, com rendimento de 53%. P.F.: 217 - 219 °C. FT-IR (n, cm⁻¹): 3106 (C-H) (imidazol), 2939 (C-H) (CH₂, CH₃), 1236 (C-N) (nitro). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 1,26-2,6 (m, 10H, CH₂), 2,49 (s, 3H, CH₃), 3,57 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, CH₂), 4,00 (m, 1H, CH), 4,54 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, CH₂), 6,01 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 6,40 (d, 1H, Ar-H), 6,75 (t, 1H, Ar-H), 6,78 (m, 2H, Ar-H, C=C-H), 6,93 (m, 1H, C=C-H), 7,03 (d, 1H, C=C-H), 7,50 (dd, 1H, , C=C-H), 7,78 (s, 1H, IM-H). ¹³ C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 13,18 (1C, CH₃), 24,85 (1C, CH₂-cy), 25,92 (2C, CH₂-cy), 31,64 (1C, CH₂-cy), 32,64 (1C, S-CH₂), 45,78 (1C, N-CH₂), 56,60 (1C, CH-cy), 101,31 (1C, OCO), 105,58 (1C, Ar-CH), 108,55 (1C, Ar-CH), 113,03 (1C, C = CH), 119,76 (1C, IM-CH), 122, 46 (1C, Ar-CH), 125,69 (1C, C=C-H), 131,02 (1C, Ar-C), 137,12 (1C, C=C-H), 137,14 (1C, Ar-C), 145,21 (1C, C-IM), 146,67(1C, Ar-C), 147,88 (1C, Ar-C), 148,13 (1C, Tri-C), 148,26 (1C, Tri-C-S), 154,12 (1C, C-IM). HRMS (EI, *m/z*) calculado para C₂₅H₂₉N₆O₄S⁺: 509,1971; encontrado: 509,2015. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (50-95% CAN), 15 min; 0,1% ácido fórmico): r.t. = 5,83 min, pureza = 98,6%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S77-S81** do material em anexo.

1.5.2.3.Obtenção do H4



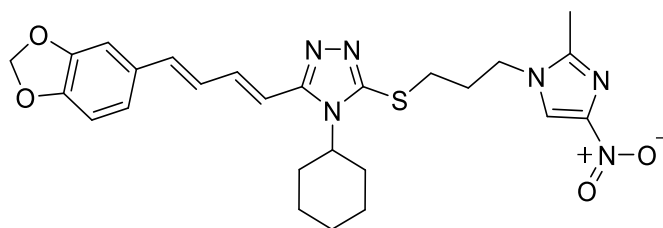
3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il)-4-ciclohexil-5-((2-(4-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)tio)-4H-1,2,4-triazol (**H4**). Usando a metodologia descrita acima, com 1-(2-bromoetil)-4-nitro-1H-imidazol (**12**) como agente alquilante. Características do produto: sólido branco, com rendimento de 50%. P.F.: 217 - 218 °C. FT-IR (n, cm⁻¹): 2927 (C-H) (CH₂, CH₃), 1336 (N-O) (nitro), 1249 (C-N) (nitro). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 1,26-2,03 (m, 10H, CH₂-cy), 3,60 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, S-CH₂), 4,01 (q, 1H, *J* = 6,3 Hz, CH₂-cy), 4,64 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, N-CH₂), 6,01 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 6,43 (m, 1H, Ar-H), 6,76 (m, 1H, Ar-H), 6,79 (m, 1H, Ar-H), 6,82 (m, 1H, C=C-H), 6,93 (d, 1H, C=C-H), 7,04 (m, 1H, C=C-H), 7,49 (m, 1H, C=C-H), 7,54 (s, 1H, IM-H), 7,89 (s, 1H, IM-H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 24,86 (1C, CH₂-cy), 25,92 (2C, CH₂-cy), 31,68 (1C, CH₂-cy), 33,48 (1C, S-CH₂), 46,89 (1C, N-CH₂), 56,61 (1C, CH-cy), 101,32 (1C, OCO), 105,59 (1C, Ar-CH), 108,56 (1C, Ar-CH), 113,06 (1C, C = CH), 119,32 (1C, C = CH), 122,47 (1C, Ar-CH), 125, 70 (1C, CH-IM), 131,03 (1C, Ar-C), 136,43 (1C, C=C-H), 137,15 (1C, C-H-IM), 137,15 (1C, Ar-C-H), 147,69 (1C, Ar-C), 148,14 (1C, Tri-C), 148,27(1C, Tri-C-S), 154,15 (1C, C-IM). HRMS (EI, *m/z*) calculado para C₂₄H₂₇N₆O₄S⁺: 495,1814; encontrado: 495,1843. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (50-95% ACN), 15 min; 0,1% ácido fórmico): r.t. = 5,63 min, pureza = 98,2%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S82-S86** do material em anexo.

1.5.2.4.Obtenção do H5



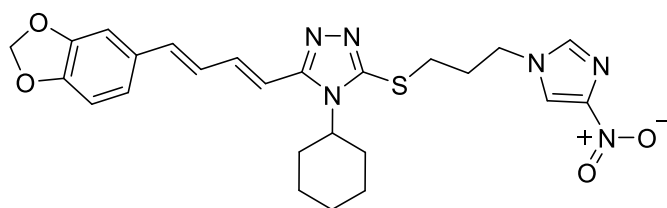
3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-il)-4-ciclohexil-5-((3-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)propil)tio)-4H-1,2,4-triazol (**H5**). Usando a metodologia descrita acima, com 1-(3-bromopropil)-2-nitro-1H-imidazol (**7**) como agente alquilante. Características do produto: sólido branco, com rendimento de 55%. P.F.: 150 - 153 °C. FT-IR (n, cm⁻¹): 3054 (C-H) (imidazol), 2933 (C-H) (CH₂, CH₃), 1251 (C-N) (nitro). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 1,42-1,89 (m, 10H, CH₂-cy), 2,4 (q, 2H, J=6,3 Hz, -CH₂-), 3,27 (t, 2H, J = 6,3 Hz, S-CH₂), 4,08 (t, 1H, J = 6,3 Hz, CH₂-cy), 4,64 (t, 2H, J = 6,3 Hz, N-CH₂), 6,00 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 6,44 (m, 1H, Ar-H), 6,73 (m, 1H, C=C-H), 6,76 (m, 1H, Ar-H), 6,85 (m, 1H, C=C-H), 6,91 (d, 1H, C=C-H), 7,02 (s, 1H, Ar-H), 7,17 (s, 1H, IM-H), 7,33 (s, 1H, IM-H), 7,48 (m, 1H, C=C-H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 24,94 (1C, CH₂-cy), 25,97 (2C, CH₂-cy), 29,82 (1C, CH₂-cy), 30,18 (1C, CH₂-cy), 31,71 (1C, S-CH₂), 48,70 (1C, N-CH₂), 56,53 (1 C, CH-cy), 101,30 (1C, O-C-O), 105,55 (1C, Ar-C-H), 108,53 (1C, Ar-CH), 113,57 (1C, C=CH), 119,32(1C, C=CH), 122,39 (1C, Ar-C-H), 125(1C, C-H-IM), 126,41 (1C, Ar-C), 131,09 (1C, C=C-H), 136,73 (1C, C-H-IM), 136,83 (1C, Ar-C-H), 147,69 (1C, Ar-C), 148,05 (1C, Tri-C), 148,23 (1C, Tri-C-S), 153,85 (1C, C-IM). HRMS (EI, m/z) calculado para C₂₅H₂₉N₆O₄S⁺: 509,1971; encontrado: 509,2011. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (25-75% ACN), 18 min; 0,1% ácido fórmico): r.t. = 6,65 min, pureza = 98,1%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S87-S91** do material em anexo.

1.5.2.5.Obtenção do H6



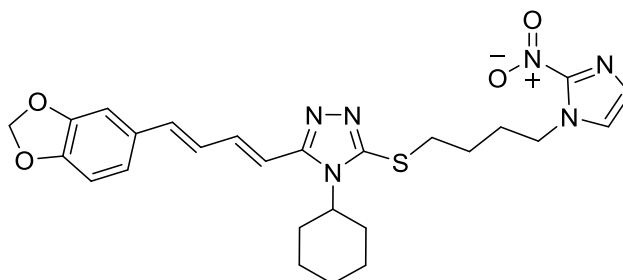
3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-il)-4-ciclohexil-5-((3-(2-metil-4-nitro-1H-imidazol-1-il)propil)tio)-4H-1,2,4-triazol (**H6**). Usando a metodologia descrita acima, com 1-(3-bromopropil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (**10**) como agente alquilante. Características do produto: sólido branco, com rendimento de 30%. P.F.: 175 - 177 °C. FT-IR (ν , cm^{-1}): 3056 (C-H) (imidazol), 2923 (C-H) (CH_2 , CH_3), 1249 (C-N) (nitro). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1,42-1,89 (m, 10H, $\text{CH}_2\text{-cy}$), 2,37 (t, 2H, $J = 6,3$ Hz, CH_2), 2,48 (s, 3H, CH_3), 3,25 (t, 2H, $J = 6,3$ Hz, S- CH_2), 4,04 (m, 1H, CH), 4,16 (t, 2H, $J = 6,3$ Hz, N- CH_2), 6,00 (s, 2H, -O- CH_2 -O-), 6,42 (d, 1H, Ar-H), 6,44 (d, 1H, C=C-H), 6,76 (t, 1H, Ar-H), 6,81 (m, 2H, Ar-H, C=C-H), 6,91 (m, 1H, C=C-H), 7,02 (d, 1H, C=C-H), 7,42 (dd, 1H, C=C-H), 7,78 (s, 1H, IM-H). ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 13,20 (1C, CH_3), 24,92 (1C, $\text{CH}_2\text{-cy}$), 25,96 (2C, $\text{CH}_2\text{-cy}$), 29,61 (1C, $\text{CH}_2\text{-cy}$), 31,70 (1C, S- CH_2), 45,65 (1C, N- CH_2), 56,53 (1C, CH-cy), 101,30 (1C, OCO), 105,56 (1C, Ar-CH), 108,53 (1C, Ar-CH), 113,44 (1C, C=CH), 119,50 (1C, IM-CH), 122,40 (1C, Ar-CH), 125,68 (1C, C=C-H), 131,08 (1C, Ar-C), 136,86 (1C, C=C-H), 136,92 (1C, C=C-H), 137,14 (1C, Ar-C), 145,21 (1C, C-IM), 146,67 (1C, Ar-C), 148,07 (1C, Ar-C), 148,24 (1C, Tri-C), 148,49 (1C, Tri-C-S), 153,92 (1C, C-IM). HRMS (EI, m/z) calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}^+$: 523,2127; encontrado: 523,2187. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (25-75% CAN), 18 min; 0,1% ácido fórmico): r.t. = 6,23 min, pureza = 95,1%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S92-S97** do material em anexo.

1.5.2.6.Obtenção do H7



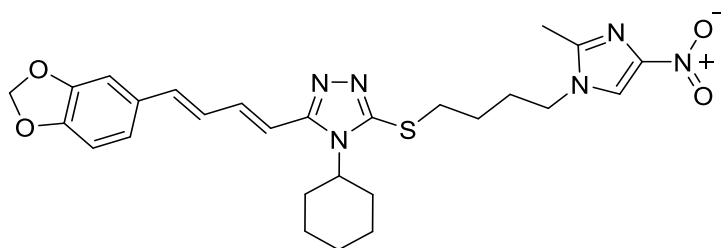
3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-il)-4-ciclohexil-5-((3-(4-nitro-1H-imidazol-1-il)propil)tio)-4H-1,2,4-triazol (**H7**). Usando a metodologia descrita acima, com 1-(3-bromopropil)-4-nitro-1H-imidazol (**13**) como agente alquilante. Características do produto: sólido branco, com rendimento de 50%. P.F.: 186 - 189 °C. FT-IR (n, cm⁻¹): 2923 (C-H) (CH₂, CH₃), 1236 (C-N) (nitro). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 1,27-2,06 (m, 10H, CH₂-cy), 2,42 (t, 2H, J=6,3 Hz, -CH₂-), 3,23 (t, 2H, J = 6,3 Hz, S-CH₂), 4,05 (q, 1H, J = 6,3 Hz, CH-cy), 4,28 (t, 2H, J = 6,3 Hz, N-CH₂), 6,00 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 6,43 (m, 1H, Ar-H), 6,75 (m, 1H, Ar-H), 6,78 (m, 1H, Ar-H), 6,81 (m, 1H, C=C-H), 6,92 (d, 1H, C=C-H), 7,03 (m, 1H, C=C-H), 7,49 (m, 1H, C=C-H), 7,52 (s, 1H, IM-H), 7,86 (s, 1H, IM-H). ¹³ C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 24,91 (1C, CH₂-cy), 25,95 (2C, CH₂-cy), 29,49 (2C, CH₂-cy), 30,50 (2C, -CH₂-), 31,69 (1C, S-CH₂), 46,72 (1C, N-CH₂), 56,59 (1 C, CH-cy), 101,30 (1C, O-C-O), 105,57 (1C, Ar-C-H), 108,54 (1C, Ar-CH), 113,30 (1C, C=CH), 119,10 (1C, C=CH), 122,44 (1C, Ar-C-H), 125,73 (1C, C-H-IM), 131,06 (1C, Ar-C), 136,08 (1C, C=C-H), 137,02 (1C, C-H-IM), 137,06 (1C, Ar-C-H), 148,09 (1C, Ar-C), 148,24 (1C, Tri-C), 148,54 (1C, Tri-C-S), 153,95 (1C, C-IM). HRMS (EI, m/z) calculado para C₂₅H₂₉N₆O₄S⁺: 509,1971; encontrado: 509,2007. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (50-95% ACN), 15 min; 0,1% ácido fórmico): r.t. = 5,80 min, pureza = 98,3%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S97-S101** do material em anexo.

1.5.2.7.Obtenção do H8



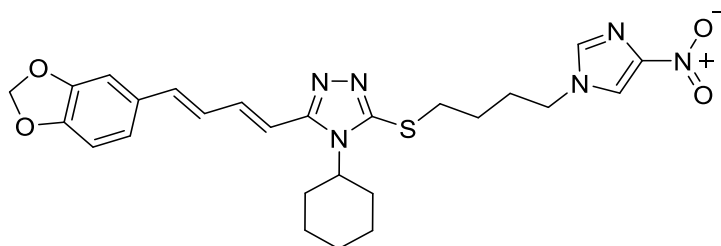
3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-il)-4-ciclohexil-5-((4-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)butil)tio)-4H-1,2,4-triazol (**H8**). Usando a metodologia descrita acima, com 1-(4-bromobutil)-2-nitro-1H-imidazol (**8**) como agente alquilante. Características do produto: sólido branco, com rendimento de 50%. P.F.: 129 - 131°C. FT-IR (n, cm⁻¹): 3070 (C-H) (imidazol), 2931 (C-H) (CH₂, CH₃), 1249 (C-N) (nitro). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 1,8-2,03 (m, 10H, CH₂-cy), 1,96 (q, 2H, J = 6,3 Hz, -CH₂-), 2,4 (q, 2H, J = 6,3 Hz, -CH₂-), 3,30 (t, 2H, J = 6,3 Hz, S-CH₂), 4,06 (t, 1H, J = 6,3 Hz, CH₂-cy), 4,5 (t, 2H, J 6,3 Hz, N-CH₂), 6,00 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 6,45 (m, 1H, Ar-H), 6,76 (m, 1H, C=C-H), 6,81 (m, 1H, Ar-H), 6,81 (m, 1H, C = C-H), 6,91 (d, 1H, C=C-H), 7,02 (s, 1H, Ar-H), 7,15 (s, 1H, IM-H), 7,22 (s, 1H, IM-H), 7,48 (m, 1H, C = C-H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 24,95 (1C, CH₂-cy), 25,98 (2C, CH₂-cy), 29,27 (1C, CH₂-cy), 31,65 (2C, CH₂-cy), 32,33 (1C, S-CH₂), 48,61 (1C, N-CH₂), 56,48 (1 C, CH-cy), 101,27 (1C, O-C-O), 105,60 (1C, Ar-C-H), 108,52 (1C, Ar-CH), 113,72 (1C, C=CH), 119,32(1C, C=CH), 122,31 (1C, Ar-C-H), 125,91 (1C, C-H-IM), 126,30 (1C, Ar-C), 131,16 (1C, C=C-H), 136,61 (1C, C-H-IM), 136,61 (1C, Ar-C-H), 148,03 (1C, Ar-C), 148,25 (1C, Tri-C), 149,54 (1C, Tri-C-S), 153,65 (1C, C-IM). HRMS (EI, m/z) calculado para C₂₆H₃₁N₆O₄S⁺: 523,2127; encontrado: 523,2189. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (25-75% ACN), 18 min; 0,1% ácido fórmico): r.t. = 5,86 min, pureza = 96,3%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S102-S106** do material em anexo.

1.5.2.8.Obtenção do H9



3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-il)-4-ciclohexil-5-((4-(2-metil-4-nitro-1H-imidazol-1-il)butil)tio)-4H-1,2,4-triazol (**H9**). Usando a metodologia descrita acima, com 1-(3-bromopropil)-2-metil-4-nitro-1H-imidazol (**11**) como agente alquilante. Características do produto: sólido branco, com rendimento de 45%. P.F.: 97 - 99 °C. FT-IR (n, cm⁻¹): 3062, (C-H) (imidazol), 2923 (C-H) (CH₂, CH₃), 1249 (C-N) (nitro). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 1,79-1,98 (m, 10H, CH₂-cy), 1,89 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, CH₂), 2,07 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, CH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃), 3,32 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, S-CH₂), 4,01 (m, 1H, CH), 4,05 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, N-CH₂), 6,00 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 6,44 (d, 1H, Ar-H), 6,73 (d, 1H, C=C-H), 6,77 (t, 1H, Ar-H), 6,81 (m, 2H, Ar-H, C=C-H), 6,92 (m, 1H, C=C-H), 7,02 (d, 1H, C=C-H), 7,48 (dd, 1H, , C=C-H), 7,75 (s, 1H, IM-H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 13,17 (1C, CH₃), 24,92 (1C, CH₂-cy), 25,96 (2C, CH₂-cy), 29,61 (1C, CH₂-cy), 31,70 (1C, S-CH₂), 45,65 (1C, N-CH₂), 56,53 (1C, CH-cy), 101,30 (1C, O-C-O), 105,56 (1C, Ar-CH), 108,53 (1C, Ar-CH), 113,44 (1C, C=CH), 119,50 (1C, IM-CH), 122,39 (1C, Ar-CH), 125,85 (1C, C=C-H), 131,16 (1C, Ar-C), 136,66 (1C, C=C-H), 136,77 (1C, C=C-H), 144,63 (1C, C-IM), 148,02(1C, Ar-C), 148,22 (1C, Tri-C), 149,36 (1C, Tri-C-S), 153,78 (1C, C-IM). HRMS (EI, *m/z*) calculado para C₂₈H₃₃N₆O₄S⁺: 537,2284; encontrado: 537,2324. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (50-95% CAN), 18 min; 0,1% ácido fórmico): r.t. = 5,63 min, pureza = 96,77%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S107-S112** do material em anexo.

1.5.2.9.Obtenção do H10



3-((1*E*,3*E*)-4-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-il)-4-ciclohexil-5-((4-(4-nitro-1*H*-imidazol-1-il)butil)tio)-4*H*-1,2,4-triazol (**H10**). Usando a metodologia descrita acima, usando 1-(4-bromobutil)-4-nitro-1*H*-imidazol (**14**) como agente alquilante. Características do produto: sólido branco, com rendimento de 50%. P.F.: 97 - 100 °C. FT-IR (n, cm⁻¹): 2919 (C-H) (CH₂, CH₃), 1249 (C-N) (nitro). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 1,27-2,06 (m, 10H, CH₂-cy), 1,89 (t, 2H, *J*=6,3 Hz, -CH₂-), 2,04 (t, 2H, *J*=6,3 Hz, -CH₂-), 3,32 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, S-CH₂), 4,03 (q, 1H, *J* = 6,3 Hz, CH-cy), 4,14 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, N-CH₂), 6,00 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 6,44 (m, 1H, Ar-H), 6,75 (m, 1H, Ar-H), 6,78 (m, 1H, Ar-H), 6,82 (m, 1H, C=C-H), 6,92 (d, 1H, C=C-H), 7,03 (m, 1H, C=C-H), 7,49 (m, 1H, C=C-H), 7,50 (s, 1H, IM-H), 7,83 (s, 1H, IM-H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 24,94 (1C, CH₂-cy), 25,98 (2C, CH₂-cy), 26,61 (2C, CH₂-cy), 29,69 (2C, -CH₂-), 31,64 (2C, -CH₂-), 31,87 (1C, S-CH₂), 47,70 (1C, N-CH₂), 56,45 (1C, CH-cy), 101,27 (1C, O-C-O), 105,57 (1C, Ar-CH), 108,53 (1C, Ar-CH), 113,59 (1C, C=CH), 119,05 (1C, C=CH), 122,36 (1C, Ar-C-H), 125,86 (1C, C-H-IM), 131,16 (1C, Ar-C), 136,03 (1C, C=C-H), 136,69 (1C, C-H-IM), 136,78 (1C, Ar-C-H), 148,03 (1C, Ar-C), 148,24 (1C, Tri-C), 149,38 (1C, Tri-C-S), 153,81 (1C, C-IM). HRMS (EI, *m/z*) calculado para C₂₆H₃₁N₆O₄S⁺: 523,2127; encontrado: 523,2178. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (50-95% ACN), 15 min; 0,1% ácido fórmico): r.t. = 5,80 min, pureza = 98,5%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S112-S116** do material em anexo.

1.6. Metodologia geral para a obtenção dos dímeros D1-D8

Os dibromoalcanos adequados (0,1 mmol), 2-nitro-1*H*-imidazol (**3**) (0,5 mmol equivalente) e TEA (0,33 mmol equivalente) foram dissolvidos em DMF (1 mL) em um balão de fundo redondo. A reação foi mantida sob agitação a 60 °C por 24 h. Após o consumo completo do 2-nitro-1*H*-imidazol, monitorado por CCDA analítico (hexano: DCM: acetato de etila 5:2:3), 20 mL de água destilada fria foram adicionados, aguardando a formação de um precipitado. Os cristais foram filtrados a vácuo e o produto foi seco à temperatura ambiente.

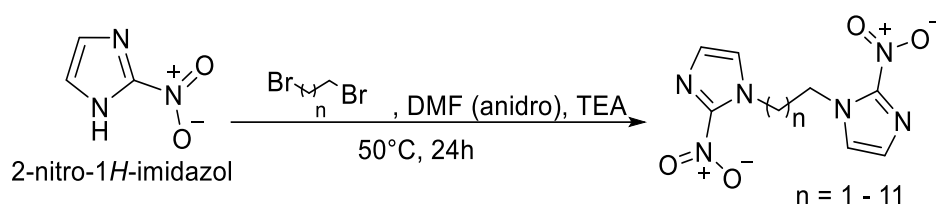
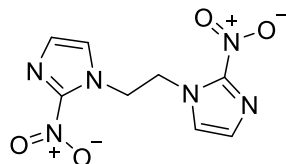


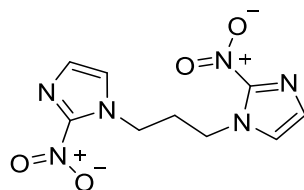
Figura 2. Metodologia de preparação dos dímeros **D1-D8**.

1.6.1. Obtenção de D1



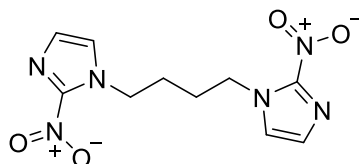
*1,2-bis(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)etano* (**D1**). 1,2-dibromoetano (0,1 mmol) foi utilizado como dibromoalcano nesta reação. Após 24 horas, o produto foi isolado na forma de um sólido cristalino de cor amarela, com rendimento de 45%. P.F. = 252–255 °C (Lit.: 240 - 241 °C)(LONG; PARRICK; HODGKISS, 1991). ¹H-RMN (500 MHz, Acetona-*d*₆): δ 7,29 (s, 2H); 7,08 (s, 2H); 5,11 (s, 4H). ¹³C-RMN (125 MHz, Acetona-*d*₆): δ 127,95; 127,19; 49,55. HRMS (EI, *m/z*) calculado para C₈H₉N₆O₄⁺: 253,0685; encontrado: 253,0639. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (5-95% ACN), 15 min; 0,1 % de ácido fórmico): t.r. = 5,37 min, pureza = 95,77 %. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S117-S120** do material em anexo.

1.6.2. Obtenção de D2



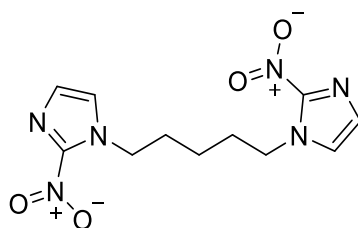
1,3-bis(2-nitro-1H-imidazol-1-il)propano (**D2**). 1,3-dibromopropano (0,1 mmol) foi utilizado como dibromoalcano nesta reação. Após 24 horas, o produto foi isolado na forma de um sólido cristalino de cor amarela, com rendimento de 52%. P.F. = 257–260 °C (Lit.: 194 - 196 °C)(LONG; PARRICK; HODGKISS, 1991). ¹H-RMN (500 MHz, acetona-*d*₆): δ 7,63 (s, 2H); 7,15 (s, 2H); 4,86 (t, J= 7,25, 4H); 2,59 (q, J= 7,25, 2H). ¹³C-RMN (125 MHz, Acetona-*d*₆): δ 127,92; 47,02; 30,80. HRMS (EI, *m/z*) calculado para C₉H₁₁N₆O₄⁺: 267,0841; encontrado: 267,0849. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (5-95% ACN), 15 min; 0,1 % de ácido fórmico): t.r. = 5,70 min, pureza = 98,96 %. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S121-S124** do material em anexo.

1.6.3. Obtenção de D3



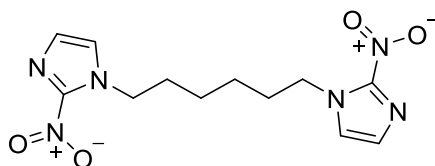
1,4-bis(2-nitro-1H-imidazol-1-il)butano (**D3**). 1,4-dibromobutano (0,1 mmol) foi utilizado como dibromoalcano nesta reação. Após 24 horas, o produto foi isolado na forma de um sólido cristalino de cor amarela, com rendimento de 50%. P.F. = 217–220 °C. A estrutura foi confirmada por ¹H-RMN, ¹³C-RMN, IR e MS: ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,69 (s, 2H); 7,18 (s, 2H); 4,41 (t, 4H); 1,80 (s, 4H). ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 128,35; 49,33; 27,13. HRMS (EI, *m/z*) calculado para C₁₀H₁₃N₆O₄⁺: 281,0998; encontrado: 281,1007. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (5-95% ACN), 15 min; 0,1% de ácido fórmico): t.r. = 6,25 min, pureza = 99,7%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S125-S128** do material em anexo.

1.6.4. Obtenção de D4



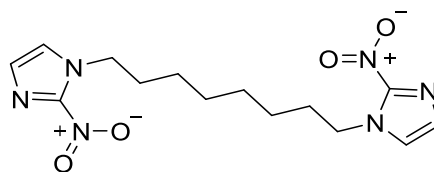
1,5-bis(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)pentano (D4). 1,4-dibromobutano (0,1 mmol) foi utilizado como dibromoalcano nesta reação. Após 24 horas, o produto foi isolado na forma de um sólido cristalino de cor amarela, com rendimento de 55%. P.F. = 98–101 °C. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,68 (s, 2H); 7,19 (s, 2H); 4,38 (t, *J* = 7,25 4H); 1,81 (q, *J* = 7,41 4H); 1,28 (q, *J* = 7,88, 7,67 2H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 128,32; 46,60; 29,62; 23,06. HRMS (EI, *m/z*) calculado para C₁₁H₁₅N₆O₄⁺: 295,1154; encontrado: 295,1168. CLAE (gradiente; ACN:H₂O, 5-95% de ACN; 15 min; 0,1% de ácido fórmico): t.r. = 6,72 min, pureza = 96,7%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S129-S132** do material em anexo.

1.6.5. Obtenção de D5



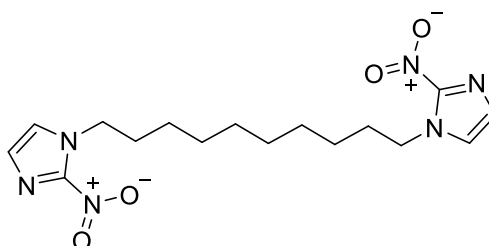
1,6-bis(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)hexano (D5). 1,6-dibrohexano (0,1 mmol) foi utilizado como dibromoalcano nesta reação. Após 24 horas, o produto foi isolado como cristais amarelos, com rendimento de 60%. P.F. = 180–183 °C. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,68 (s, 2H); 7,18 (s, 2H); 7,20 (s, 1H); 4,36 (t, *J* = 7,6 Hz, 4H); 1,76 – 1,78 (m, *J* = 13,6 Hz, 4H); 1,29 – 1,32 (m, *J* = 7,1 Hz, 4H). RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 128,31; 49,75; 30,02; 25,73. HRMS (EI, *m/z*) calculado para C₁₂H₁₇N₆O₄⁺: 309,1311; encontrado: 309,1318. CLAE (gradiente; ACN:H₂O, 5-95% de ACN, 15 min; 0,1% de ácido fórmico): t.r. = 7,24 min, pureza = 98,5%. Os espectros de caracterização se encontram nas **figuras S133-S136** do material em anexo.

1.6.6. Obtenção de D6



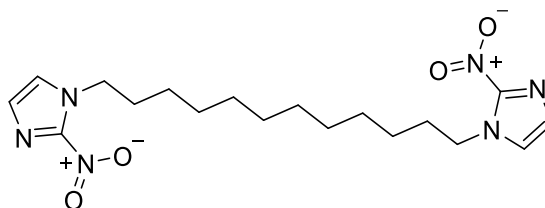
1,8-bis(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)octano (**D6**). 1,8-dibromooctano (0,1 mmol) foi usado como dibromoalcano nesta reação. Após 24 horas, o produto foi isolado na forma de cristais amarelos, com rendimento de 87%. P.F. = 149 – 150 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7,17 (s, 2H); 7,10 (s, 2H); 4,42 (t, *J* = 7,4 Hz, 4H); 1,85 – 1,87 (m, *J* = 7,4 Hz, 4H); 1,36 (s, *J* = 7,4 Hz, 8H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 128,4; 125,8; 50,24; 30,47; 28,71; 26,18. HRMS (EI, *m/z*) calculado para C₁₄H₂₁N₆O₄⁺: 337,1624; encontrado: 337,1633. CLAE (Gradiente; ACN:H₂O (5-100% ACN), 10 min; 0,1% de ácido fórmico): t.r. = 8,29 min, pureza = 96,76%. Os espectros de caracterização se encontram nas figuras **S137-S140** do material em anexo.

1.6.7. Obtenção de D7



1,10-bis(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)decano (**D7**). 1,10-dibrodecano (0,1 mmol) foi utilizado como dibromoalcano nesta reação. Após 24 horas, o produto foi isolado como cristais amarelos, com rendimento de 85%. P.F. = 109 – 110 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7,16 (s, 2H); 7,11 (s, 2H); 4,42 (t, *J* = 7,2 Hz, 4H); 1,83 – 1,88 (m, *J* = 7,2 Hz, 4H); 1,28 – 1,34 (m, *J* = 7,2 Hz, 12H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 128,36; 125,85; 50,34; 30,50; 29,12; 28,85; 26,27. HRMS (EI, *m/z*) calculado para C₁₆H₂₅N₆O₄⁺: 365,1937; encontrado: 365,1942. CLAE (gradiente; ACN:H₂O, 5-100% de ACN, 15 min; 0,1% de ácido fórmico): t.r. = 9,35 min, pureza = 96,8%. Os espectros de caracterização se encontram nas figuras **S141-S144** do material em anexo.

1.6.8. Obtenção de D8



1,12-bis(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)dodecano (**D8**). 1,12-dibromodecano (0,1 mmol) foi utilizado como dibromoalcano nesta reação. Após 24 horas, o produto foi isolado como cristais amarelos, com rendimento de 91%. P.F. = 97 – 100 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7,16 (s, 2H); 7,11 (s, 2H); 4,42 (t, *J* = 7,2 Hz, 4H); 1,83 – 1,88 (m, *J* = 7,2 Hz, 4H); 1,27 – 1,34 (m, *J* = 7,1 Hz, 14H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 128,32; 125,83; 50,37; 30,53; 29,31; 29,25; 28,92; 26,32. HRMS (EI, *m/z*) calculado para C₁₈H₂₉N₆O₄⁺: 393,2250; encontrado: 393,2266. CLAE (gradiente; ACN:H₂O (5-100% ACN), 10 min; 0,1% de ácido fórmico): t.r. = 10,43 min, pureza = 97,03%. Os espectros de caracterização se encontram nas figuras **S145-S148** do material em anexo.

1.7. Difração de Raios X

Dados de difração de raios X de cristal único do composto H2 foram coletados em um difratômetro Bruker D8 Venture, à temperatura ambiente, com radiação MoKα monocromática de grafite (*l* = 0,71069 Å). A coleta de dados e o refinamento da célula foram realizados com o Bruker Instrument Service v6.2.12 e o APEX3 v2019.1-0 (BRUKER, 2007; APEX3 V2019.1-0. BRUKER AXS INC., MADISON, WISCONSIN, [S.d.]), respectivamente. A redução de dados foi realizada com o SAINT V8.40A («Bruker (2013). SAINT v8.40A. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.», [S.d.]). A correção de absorção multiscan empírica usando reflexões equivalentes foi realizada com o programa SADABS-2016/2 («Sheldrick, G.M. SADABS, Program for Empirical Absorption Correction of Area Detector Data, University of Göttingen, Germany, 1996.», [S.d.]). As soluções estruturais e os refinamentos de mínimos quadrados de matriz completa baseados em F2 foram realizados com os pacotes de programas SHELXS e SHELXL («Sheldrick, G.M. SADABS, Program for Empirical Absorption Correction of Area Detector Data, University of Göttingen, Germany, 1996.», [S.d.]). Todos os átomos, exceto o hidrogênio, foram refinados anisotropicamente. Os átomos de hidrogênio foram tratados por um refinamento restrito. A estrutura foi desenhada pelo programa Mercury

(«Macrae, C. F., Edgington, P. R., McCabe, P., Pidcock, E., Shields, G. P., Taylor, R., Towler, M. & van de Streek, J., J. Appl. Cryst. 2006, 39, 453-457.», [S.d.]).

2. Avaliação Biológica

A avaliação biológica *in vitro* dos compostos sintetizados neste trabalho foi realizada conforme a sequência de procedimentos descrita abaixo. Inicialmente, foi avaliada a citotoxicidade frente a diferentes modelos celulares e, posteriormente, sua atividade tóxica frente a tripanossomatídeos: *T. cruzi* nas formas amastigota e epimastigota (cepa Tulahuen C2C4 *LacZ*) e *T. brucei* (*T. b. brucei* 427) na forma tripomastigota.

Os animais utilizados foram disponibilizados pelo Biotério de experimentação do Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária da UFRRJ. Foram utilizados apenas camundongos isogênicos de linhagem BALB/c machos com idades de 6 a 8 semanas e peso de 22 a 25 g. Todos os processos realizados seguem as normas determinadas sob o protocolo de CEUA número: 4348191124, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) no dia 9 de junho de 2025.

A etapa de avaliação de citotoxicidade foi realizada em diferentes modelos celulares de mamíferos, a fim de conferir maior robustez e consistência aos resultados. Foram utilizados os modelos LLC-MK2 (fibroblastos de rim de macaco rhesus), HEK-293 (células embrionárias de rim humano), macrófagos RAW-264.7 e células primárias de camundongos: macrófagos peritoneais e esplenócitos totais, em diferentes tempos de incubação, com a viabilidade celular medida por MTT, conforme descrito em seus respectivos procedimentos experimentais. A técnica de MTT mede, indiretamente, a viabilidade celular pela atividade mitocondrial, através da redução enzimática do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio (sal de MTT) à 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazana (formazana de MTT), catalisada por PMS (metossulfato de fenazina). Uma vez que a formazana de MTT apresenta coloração roxa/violeta intensa, pode ser quantificada por absorbância no UV entre 550 e 590 nm após ser solubilizada em DMSO, uma vez que a formazana do MTT é insolúvel em água (**Figura 3**)(KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018). Para as leituras das absorbâncias

foi utilizado o leitor de placas iMark microplate absorbance reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EUA).

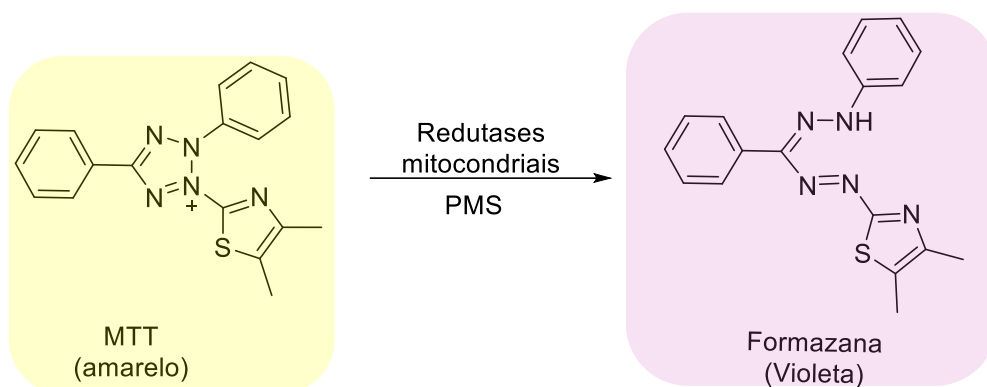


Figura 3. Esquema reacional da redução do sal de MTT por redutases mitocondriais à formazana de MTT.

A avaliação frente a amastigotas intracelulares de *T. cruzi* de vários compostos de maneira eficiente foi possível graças à cepa Tulahuen C2C4 *LacZ*, que é uma cepa que sofreu uma modificação genética de modo a ser capaz de expressar a enzima β -galactosidase (gene *LacZ* de *Escherichia coli*) (BUCKNER *et al.*, 1996). Uma vez que essa enzima não ocorre em células de mamíferos, o que torna essa metodologia uma estratégia eficaz para a quantificação indireta do parasito, ela se baseia na hidrólise enzimática de galactosídeos, como o CPRG. Essa enzima, liberada no meio após a ruptura da membrana celular das amastigotas pela ação do Triton X-100, é responsável pela clivagem do vermelho de clorofenol β -galactopiranosídeo (CPRG), de coloração amarela, dando origem a uma molécula de galactose (incolor) e a uma molécula de vermelho de clorofenol (**Figura 4**), de coloração violeta ($\lambda = 562$ nm) (SEEBER; BOOTHROYD, 1996). Já o ensaio de toxicidade frente às formas epimastigotas se procedeu utilizando o protocolo CPRG para maiores tempos de incubação (7 dias) e MTT para menores tempos de incubação (6, 12, 24 e 48 horas). A utilização do MTT se fez necessária, pois, em curtos períodos de incubação, não é possível observar proliferação do parasito que garanta uma “janela de quantificação” razoável para realizar o tratamento estatístico. Uma vez que, inclusive, os parasitos mortos ou com danos estruturais irreversíveis também apresentam β -galactosidase em seu interior celular, sendo quantificáveis como viáveis quando se utiliza o CPRG, o que pode ser contornado com o uso do MTT para tempos curtos de incubação.

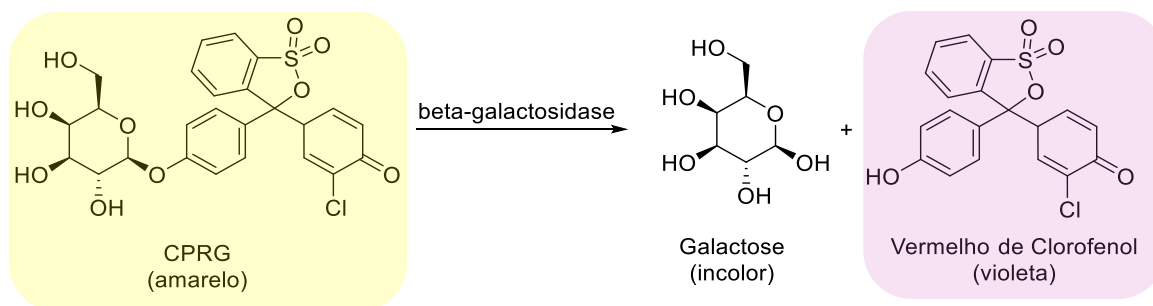


Figura 4. Reação enzimática de clivagem do galactosídeo CPRG pela ação da enzima β -galactosidase, quantificada por absorbância no UV (570 nm) (adaptado de BUCKNER *et al.*, 1996).

A etapa de avaliação frente as formas tripomastigotas de *T. brucei brucei* foi realizada durante o período do PDSE em Cleveland State University – Ohio, EUA, sob a orientação do Dr. Bin Su. A espécie utilizada foi a *Trypanosoma brucei brucei* que não apresenta riscos de infecção para humanos, apenas para mamíferos de pequeno porte, e, por isso, é utilizada amplamente em triagens *in vitro*, diferente das espécies *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *Trypanosoma brucei gambiense* altamente infectivas para humanos (NAESSENS, 2006). Todos os compostos foram testados frente as tripomastigotas de *T. b. brucei* em diferentes tempos de incubação (24 e 48 horas), sendo que o período de incubação de 24 horas se procedeu apenas para os dois híbridos mais ativos no período de 48 horas, **H2** e **H5**. A viabilidade celular foi medida por meio de MTS, conforme descrito no procedimento experimental. A técnica de MTS mede, indiretamente, a viabilidade celular pela atividade mitocondrial, através da redução enzimática do (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) (sal de MTS) à 4-(2-(-(3-(carboximeetoxi)fenil)-(4,5-dimetiltiazol-2-il)diazenil)metileno)hidrazineil) benzenossulfonato (formazana de MTS) catalisada por PMS (metossulfato de fenazina). Diferentemente da formazana do MTT, a formazana do MTS é solúvel em água. Uma vez que a formazana de MTS possui coloração vermelho-alaranjado intensa, esta pode ser quantificada por absorbância no UV de 450 a 540 nm (**Figura 5**) (BOBBA *et al.*, 2022; TOMINAGA *et al.*, 1999).

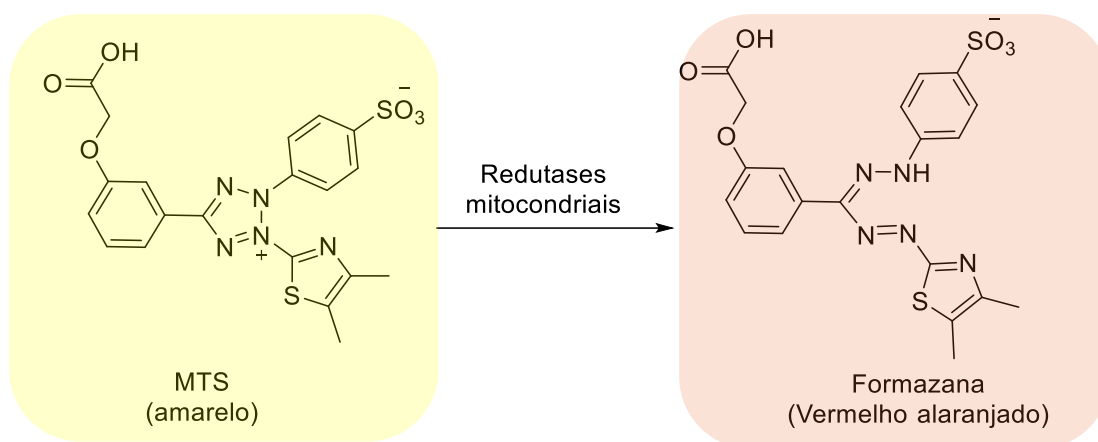


Figura 5. Esquema reacional da redução do sal de MTS por redutases mitocondriais à formazana de MTS.

2.1. Avaliação da citotoxicidade frente as células LLC-MK2

Em uma placa transparente de 96 poços, foi adicionada uma suspensão de 1×10^4 células LLC-MK2 (ATCC) em meio DMEM + 2 % de SFB. As células foram incubadas a 37 °C (5% de CO₂) por 20 horas e, depois, lavadas com PBS para remover as células não aderentes. As células foram tratadas com diluições em série dos compostos em triplicata, pré-diluídas em DMEM + 2% de SFB. Controles não tratados, veículo (DMSO 0,2% v/v) e branco (sem adição de células) foram incluídos no experimento. Após 120 h de incubação, o sobrenadante foi removido, a monocamada de células foi lavada com PBS e, em seguida, o meio de cultura foi renovado. Em seguida, foram adicionados 20 µL de MTT salino 3,0 mM, seguidos de incubação por mais 1,5 h. O sobrenadante foi então removido e os cristais de formazana foram dissolvidos com a adição de 120 µL de DMSO em cada poço. Após incubação por 1,5 h para dissolver os cristais de MTT, ao abrigo da luz e a 37 °C, a absorbância foi medida em $\lambda = 570$ nm com um leitor de placas.

2.2. Avaliação da citotoxicidade frente as células HEK-293

Em uma placa transparente de 96 poços, foi adicionada uma suspensão de 1×10^4 células HEK-293 (ATCC) em meio DMEM + 10 % de SFB. As células foram incubadas a 37 °C (5% de CO₂) por 20 horas e, depois, lavadas com PBS para remover as células não aderentes. As células foram tratadas com diluições em série dos compostos em triplicata, pré-diluídas em DMEM + 10% de SFB. Controles não tratados, veículo (DMSO 0,2% v/v) e branco (sem adição de células) foram incluídos no experimento.

Após 48 h de incubação com os compostos, o sobrenadante foi removido, a monocamada de células foi lavada com PBS e, em seguida, o meio de cultura foi renovado. Em seguida, foram adicionados 20 µL de MTT salino 3,0 mM, seguidos de incubação por mais 1,5 h. O sobrenadante foi então removido e os cristais de formazana foram dissolvidos com a adição de 120 µL de DMSO em cada poço. Após incubação por 1,5 h para dissolver os cristais de MTT, ao abrigo da luz e a 37 °C, a absorbância foi medida em $\lambda = 570$ nm com um leitor de placas.

2.3.Avaliação da citotoxicidade frente as células RAW-264.7

Em uma placa transparente de 96 poços, foi adicionada uma suspensão de 1×10^4 células RAW-264-7 (ATCC) em meio RPMI + 10 % de SFB. As células foram incubadas a 37 °C (5% de CO₂) por 20 horas e, depois, lavadas com PBS para remover as células não aderentes. As células foram tratadas com diluições em série dos compostos em triplicata, pré-diluídas em RPMI + 10% de SFB. Controles não tratados, veículo (DMSO 0,2% v/v) e branco (sem adição de células) foram incluídos no experimento. Após 48 h de incubação, o sobrenadante foi removido, a monocamada de células foi lavada com PBS e, em seguida, o meio de cultura foi renovado. Em seguida, foram adicionados 20 µL de MTT salino 3,0 mM, seguidos de incubação por mais 1,5 h. O sobrenadante foi então removido e os cristais de formazana foram dissolvidos com a adição de 120 µL de DMSO por poço. Após incubação por 1,5 h para dissolver os cristais de MTT, ao abrigo da luz e a 37 °C, a absorbância foi medida em $\lambda = 570$ nm com um leitor de placas.

2.4.Avaliação da citotoxicidade de H2 frente a macrófagos peritoneais

Os macrófagos peritoneais foram obtidos a partir de lavado peritoneal 2×5 mL com DMEM gelado, em seguida centrifugados (1600 rpm por 5 minutos) e lavados com PBS 10 mL e suspensos em DMEM + 10 % SFB. Em uma placa transparente de 96 poços, foi adicionada uma suspensão de 2×10^5 macrófagos em meio DMEM + 10 % de SFB. As células foram incubadas a 37 °C (5% de CO₂) por 24 horas e, depois, lavadas com PBS para remover as células não aderentes. As células foram tratadas com diluições em série de **H2** em triplicata, pré-diluídas em DMEM + 10% de SFB. Controles não tratados, veículo (DMSO 0,2% v/v) e branco (sem adição de células) foram incluídos no

experimento. Após os períodos de 24 e 48 h de incubação (respectivamente para cada ensaio), o sobrenadante foi removido, a monocamada de células foi lavada com PBS e, em seguida, o meio de cultura foi renovado. Em seguida, foram adicionados 20 µL de MTT salino 3,0 mM, seguidos de incubação por mais 1,5 h. O sobrenadante foi então removido e os cristais de formazana foram dissolvidos com a adição de 120 µL de DMSO em cada poço. Após incubação por 1,5 h para dissolver os cristais de MTT, ao abrigo da luz e a 37 °C, a absorbância foi medida em $\lambda = 570$ nm com um leitor de placas.

2.5.Avaliação da citotoxicidade de H2 frente a esplenócitos totais

Os esplenócitos totais foram obtidos a partir da maceração do baço dos camundongos, seguido do tratamento de 3 a 5 minutos com tampão de lise ACK para lisar glóbulos vermelhos, em seguida centrifugados (1600 rpm por 5 minutos) e lavados com PBS 10 mL e suspensos em DMEM + 10 % SFB. Em uma placa transparente de 96 poços, foi adicionada uma suspensão de 2×10^5 macrófagos em meio DMEM + 10 % de SFB. As células foram incubadas a 37 °C (5% de CO₂) por 24 horas e, depois, lavadas com PBS com auxílio de centrifugação (1600 rpm por 5 minutos). As células foram tratadas com diluições em série de **H2** em triplicata, pré-diluídas em DMEM + 10% de SFB. Controles não tratados, veículo (DMSO 0,2% v/v) e branco (sem adição de células) foram incluídos no experimento. Após os períodos de 24 e 48 h de incubação (respectivamente para cada ensaio), o sobrenadante foi removido, a monocamada de células foi lavada com PBS e, em seguida, o meio de cultura foi renovado. Em seguida, foram adicionados 20 µL de MTT salino 3,0 mM, seguidos de incubação por mais 1,5 h. O sobrenadante foi então removido e os cristais de formazana foram dissolvidos com a adição de 120 µL de DMSO em cada poço. Após incubação por 1,5 h para dissolver os cristais de MTT, ao abrigo da luz e a 37 °C, a absorbância foi medida em $\lambda = 570$ nm com um leitor de placas.

2.6.Avaliação da atividade tripanocida frente as formas epimastigotas de *T. cruzi*

Em uma placa transparente de 96 poços, os parasitos na forma epimastigota foram incubados por 7 dias a uma concentração de 1×10^6 parasitos/mL; para os demais períodos de tratamento, utilizou-se $8,5 \times 10^6$ parasitos/mL em meio LIT suplementado com hemina (25 mg/L) e 10% de SFB, com volume final de 150 µL/célula. O tratamento foi realizado

com diluições seriadas de **H2**, em triplicata, e o benznidazol foi usado como fármaco de referência, também em triplicata. Triplicatas de parasitas não tratadas (controle vivo), tratadas com DMSO 0,2% v/v (veículo) e sem parasitas (controle em branco) serviram como controles experimentais. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada (1800 rpm por 10 min a 4 °C) e o sobrenadante foi removido; em seguida, 100 µL de solução de PBS foram adicionados aos poços, seguidos de 30 µL de substrato de β-clorofenol vermelho galactopiranosídeo (CPRG) a 0,5 mM em PBS, com 0,9% v/v de Igepal CA-630. Após a incubação por 1,5 h, a absorbância foi medida a $\lambda = 570$ nm em um leitor de placas. Para o procedimento de incubação em 48, 24, 12 e 6 horas, utilizou-se a mesma metodologia de montagem, com as respectivas concentrações de parasitos: 1×10^6 parasitos/mL para os períodos de 24 e 48 horas e 10×10^6 parasitos/mL para os períodos de 6 e 12 horas. Após os períodos de incubação (48, 24, 12 e 6 horas), a placa foi centrifugada a 1800 rpm por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi removido. Em seguida, 100 µL de solução PBS + glicose 2 g/L + 10% SFB foram adicionados aos poços. Em seguida, foram adicionados 20 µL de solução salina de MTT 3,0 mM, seguidos de incubação por mais 1,5 h. O sobrenadante foi removido e os cristais de formazana foram dissolvidos com a adição de 120 µL de DMSO em cada poço. Após incubação por 1,5 h para dissolver os cristais de MTT ao abrigo da luz e a 28 °C, a absorbância foi medida a $\lambda = 570$ nm, com o auxílio de um leitor de placas.

2.7. Avaliação da atividade tripanocida frente as formas amastigotas de *T. cruzi*

Em uma placa transparente de 96 poços, foi adicionada uma suspensão de 1×10^4 células LLC-MK2 (ATCC) em meio DMEM + 2% de SFB. As células foram incubadas a 37 °C (5% de CO₂) para adesão por 3 h e, em seguida, lavadas com PBS para remover as células não aderentes. Uma suspensão contendo $1,5 \times 10^5$ tripomastigotas da cepa *T. cruzi* Tulahuen C2C4 *LacZ* foi adicionada às células, seguida de incubação a 37 °C (5% de CO₂) por 20 horas para estabelecer a infecção. Os parasitas não internalizados foram removidos por três lavagens sucessivas com PBS, seguidas de tratamento com diluições em série dos compostos em triplicata, pré-diluídos em DMEM + 2% de SFB. Os controles sem tratamento, o veículo (DMSO 0,2% v/v) e o branco (sem adição de parasitas) foram incluídos no experimento. O benznidazol foi usado em diluição em série como controle positivo. Após a incubação por 5 dias (120 h), foram adicionados 30 µL de solução de

0,5 mM de substrato vermelho de clorofenol β -galactopiranosídeo (CPRG) em PBS, contendo 0,9% v/v de Igepal CA-630. Após incubação por 1,5 h, a absorbância foi medida a $\lambda = 570$ nm em um leitor de placas.

2.8. Avaliação da atividade tripanocida frente as formas “bloodstream” de *T. brucei brucei*

Em uma placa transparente de 96 poços, os parasitos foram incubados por 48 horas a uma concentração de 5×10^4 parasitos cepa *T. b. brucei* 427 por poço, no período de 24 horas foi utilizado uma concentração de 10×10^5 parasitos por poço em meio HMI-9 com 10% de SFB e um volume final de 100 μ L/poço sob 37°C (5% de CO₂). O tratamento foi realizado com diluições seriadas dos compostos, em triplicata, usando o fexinidazol como fármaco de referência. Triplicatas de parasitos não tratados (controle vivo), tratados com DMSO 0,2% v/v (veículo) e sem parasitos (controle em branco) serviram como controles experimentais. Após a incubação, foram adicionados 20 μ L de solução MTS (5 % PMS), seguidos de incubação por mais 2 h. Após a mudança de coloração visível da placa, devido a solubilização dos cristais de formazana do MTS hidrossolúveis, a absorbância foi medida a $\lambda = 490$ nm, com o auxílio de um leitor de placas.

2.9. Tratamento estatístico de dados

Os dados de absorbância foram convertidos em valores de viabilidade relativa à média do controle veículo, descontados da média do controle branco, conforme a fórmula abaixo:

$$V(\%) = \frac{Abs - M_B}{M_V - M_B}$$

$V(\%)$ = Viabilidade em %

Abs = Leitura de absorbância em determinado poço

M_B = Média da absorbância da triplicata do **Controle Branco**

M_V = Média da absorbância da triplicata do **Controle Veículo**

Os valores percentuais foram inseridos no *software* GraphPad Prism 9, onde foram realizados os cálculos estatísticos e gerados os gráficos apresentados. Para os cálculos da concentração inibitória do crescimento em 50% (CI₅₀) foi utilizado o modelo padrão do *software* de regressão não linear para valor de concentração de inibidor *versus* resposta

normalizada com inclinação variável. Os valores de CI_{50} foram obtidos pela média de pelo menos 3 experimentos independentes. Para os testes de significância estatística, utilizou-se a análise de variância simples (ANOVA).

2.10. Cálculo do índice de seletividade (IS)

O cálculo do índice se deu pela divisão entre o CI_{50} sobre as células hospedeiras pelo CI_{50} do parasito em questão, da seguinte forma:

$$IS = \frac{(CI_{50} \text{ célula hospedeira})}{(CI_{50} \text{ parasito})}$$

3. Análise espectroscópica da interação HSA:H2

Os espectros de absorção UV e de fluorescência em estado estacionário foram obtidos com um SpectraMax iD5 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) em uma placa de 96 poços. Em todos os casos, experimentos triplicados foram realizados e os dados foram analisados no GraphPad Prism, versão 8.0.1, para Windows, da GraphPad *Software* (San Diego, Califórnia, EUA). Para a análise de absorção de UV, três amostras diferentes foram medidas na faixa de 230-400 nm a 310 K com PBS como linha de base: solução de HSA não ligada (4,0 μ M em PBS), H2 (8,0 μ M em PBS) e HSA:H2 (com uma concentração fixa de HSA de 4,0 μ M e concentração de H2 de 8,0 μ M em PBS). Em cada caso, a linha de base correspondente foi subtraída.

As medidas de fluorescência em estado estacionário foram obtidas na faixa de 320-500 nm, em cinco temperaturas (300, 305, 310, 315 e 320 K), com um comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) de 280 nm. A uma concentração fixa de 4,0 μ M de albumina, foi adicionada à solução de H2 até atingir concentrações finais de 0,0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 μ M. Em cada caso, a linha de base correspondente foi subtraída. Para obter parâmetros quantitativos da afinidade de ligação entre HSA e H2, foram utilizadas as aproximações matemáticas da energia livre de Stern-Volmer, de van 't Hoff e de Gibbs, após a correção do filtro interno, seguindo trabalhos anteriores (CHAVES, OTÁVIO *et al.*, 2015; CHAVES, OTÁVIO A. *et al.*, 2023; CHAVES, OTÁVIO AUGUSTO *et al.*, 2024).

Os ensaios de deslocamento de fármacos foram realizados com sondas de sítio para sítio I (varfarina), sítio II (ibuprofeno) e sítio III (digitoxina) (ACUNHA; CHAVES; IGLESIAS, 2021; CHAVES, OTÁVIO AUGUSTO *et al.*, 2019). As medições de fluorescência em estado estacionário foram obtidas sob as mesmas condições descritas acima a 310 K. No entanto, neste caso, cada sonda de sítio foi pré-incubada a 4,0 μM de solução de HSA (proporção 1:1) antes das adições de **H2** (0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 μM).

Os decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo (TRF) foram obtidos por meio de um aparelho construído pelo grupo da Universidade de Coimbra-PT, que faz a contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (TCSPC), conforme descrito anteriormente (PINA *et al.*, 2009). Os decaimentos foram coletados com excitação a 282 nm (HoribaJobin-Yvon-IBH nanoLED) e comprimento de onda de emissão a 338 nm. Os decaimentos de fluorescência para HSA (4,0 μM , em PBS) e HSA:H2 (concentrações de fármaco de 0,0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 μM), bem como a função de resposta instrumental (FRI, coletada com dispersão Ludox®), foram obtidos com 1024 canais e uma resolução de 97,1 ps/canal. A desconvolução das curvas de decaimento de fluorescência foi realizada pelo método da função de modulação, conforme implementado por G. Striker no *software* SAND, conforme relatado anteriormente na literatura (STRIKER *et al.*, 1999).

Experimentos de dicroísmo circular (CD) foram realizados em um espectrofotômetro Olis DSM-20CD (OLIS, Inc., Bogart, GA, EUA), com um sistema de controle de temperatura Quantum Northwest CD 150 (Quantum Northwest, Inc., Liberty Lake, WA, EUA). Usando uma cubeta de 0,1 cm de comprimento de caminho, os espectros de CD HSA far-UV (de 200 a 250 nm) foram registrados na ausência e presença de H2 na proporção de 1:1 e 1:8. Os espectros médios obtidos de três execuções sucessivas foram corrigidos pela subtração do sinal do buffer. Os resultados foram normalizados e expressos como o peso médio do resíduo $[\Theta]_{\text{MRW}}$ em $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ (COSTA-TUNA *et al.*, 2024). O conteúdo da estrutura secundária foi estimado pela análise dos espectros de UV distante, usando um servidor online Beta Structure Selection (BestSel, <http://bestsel.elte.hu/index.php>) (MICSONAI *et al.*, 2018).

4. Avaliação *in silico*

4.1.Procedimento de *docking* molecular TcNTR

A estrutura tridimensional homodimérica do TcNTR foi prevista com o servidor web Swiss-model (WATERHOUSE, ANDREW M *et al.*, 2024), utilizando como modelo a estrutura da nitrorredutase de raios X da *E. coli* B obtida no Banco de Dados de Proteínas com o código de acesso 1DS72 (PARKINSON; SKELLY; NEIDLE, 2000), seguindo o protocolo anteriormente relatado por Cirqueira e colaboradores (CIRQUEIRA *et al.*, 2022), que foi revalidado com o modelo previsto pelo AlphaFold para o sítio ativo. A estrutura química da azomicina e os produtos diméricos de 2-nitroimidazóis **D1-D8** foram construídos e minimizados em termos de energia pela Teoria Funcional da Densidade (DFT) sob a função de energia B3LYP/6-31G* com o software Spartan'14 (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, EUA) (SHAO *et al.*, 2006). O mesmo método foi utilizado para obter as propriedades físico-químicas dos compostos no software Spartan'14 (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, EUA).

Os cálculos de acoplamento molecular foram realizados com o software GOLD 2025 (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, CB2 1EZ, Reino Unido) (JONES *et al.*, 1997), considerando-se pH 7,4. Os cálculos de redocking foram realizados com o cofator FMN cristalizado com estrutura NTR de *E. coli* B, obtendo-se valores de desvio quadrático médio (RMSD) de 1,0529, 0,9275, 1,1619 e 1,4489 Å para ChemPLP, GoldScore, ChemScore e ASP, respectivamente. Como o ChemPLP resultou em um valor de RMSD próximo de 1, essa função padrão do software GOLD 2025 foi usada para os cálculos de acoplamento molecular, com raio de 6 Å ao redor do cofator FMN. O servidor web Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) foi utilizado para a identificação de interações proteína-ligante (ADASME *et al.*, 2021), e as figuras das poses de acoplamento com o maior valor de pontuação de acoplamento foram geradas no software PyMOL Molecular Graphics System 1.0 (software Delano Scientific LLC, Schrödinger, Nova Iorque, NY, EUA) (YUAN; CHAN; HU, 2017a).

4.2.Procedimento de docking molecular TcSDH

4.2.1. Construção, otimização e refinamento estrutural do modelo de TcSDH

Como a estrutura do alvo enzimático proposto ainda não foi determinada experimentalmente, foi necessário preparar um modelo a partir das sequências primárias de aminoácidos das 4 subunidades catalíticas A, B (heterodimérica), C e D da succinato desidrogenase de *T. cruzi* (TcSDH), obtidas do servidor UniProt (BATEMAN *et al.*, 2025) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Códigos para as sequências primárias das subunidades catalíticas de TcSDH obtidas no servidor UniProt.

Subunidades de TcSDH	Código UniProt
SDHA	Q9U8Q2.Q9U8Q2_TRYCR
SDHBn	A0A2V2VL92.A0A2V2VL92_TRYCR
SDHBc	Q4CVH2.Q4CVH2_TRYCC
SDHC	Q4D4V5.Q4D4V5_TRYCC
SDHD	Q4D1F3.Q4D1F3_TRYCC

As subunidades TcSDHA, TcSDHC e TcSDHD foram modeladas com o servidor Swiss-Model (GUEx; PEITSCH, 1997; WATERHOUSE, ANDREW *et al.*, 2018). A subunidade TcSDHA foi modelada no modo automatizado, tendo como molde a estrutura da succinato desidrogenase aviária (código PDB: 1YQ4; resolução = 2,33 Å). Para as duas outras subunidades (TcSDHC e TcSDHD) foi usado o modo de alinhamento, usando-se como molde a enzima homóloga de *Escherichia coli* (código PDB: 1NEK; resolução = 2,60 Å).

A subunidade heterodimérica TcSDHB foi modelada com o servidor PHYRE² (Imperial College, 2024)(KELLEY *et al.*, 2015) em uma abordagem híbrida das técnicas de modelagem comparativa e *ab initio*. As enzimas homólogas de *Ascaris suum* (código PDB: 4YSX; resolução = 2,25 Å) e aviária (código PDB: 2H89; resolução = 2,40 Å) foram utilizadas, respectivamente, como os moldes primários e secundários.

Os modelos individuais de cada subunidade de TcSDH foram montados pela sobreposição na SDH de *A. suum* (código PDB: 4YSX) e acoplados por encaixe manual

usando-se os programas GOLD 2024.3 (CCDC) (LIEBESCHUETZ; COLE; KORB, 2012; VERDONK *et al.*, 2003) e PyMOL 3.1 (Schrödinger, LLC) (YUAN; CHAN; HU, 2017b). Os grupos prostéticos e ligantes (FAD⁺, fumarato, flutolanil, protoheme IX e os aglomerados [2Fe-2S], [4Fe-4S] e [3Fe-4S]) foram transferidos para seus sítios específicos. Átomos de hidrogênio foram adicionados por meio do procedimento padrão do programa GOLD. Conflitos estéricos do modelo foram resolvidos com simulações curtas de dinâmica molecular discreta com o servidor Chiron (Dokholyan Group, 2024) (RAMACHANDRAN *et al.*, 2011) pelo método padrão.

4.2.2. Construção e otimização dos ligantes

As estruturas dos ligantes foram construídas e tiveram suas energias minimizadas com o método semiempírico PM6 (STEWART, JAMES J. P., 2007) do programa Spartan'24 (FRANCO, LUCAS SILVA *et al.*, 2025; WAVEFUNCTION, 2025). Os estados de protonação e formas tautoméricas mais estáveis em pH = 7.40 foram definidos com o plugin pKa/tautômero do programa MarvinSketch 23.1.0 (CHEMAXON, 2024).

4.2.3. Normalização das pontuações de docagem

Para reduzir o viés das funções da docagem em pontuar mais os ligantes com maior massa molecular, as pontuações foram normalizadas com o número de átomos diferentes de hidrogênio (N) presentes na estrutura dos ligantes, seguindo a equação descrita por Pan e colaboradores (2002) (**Figura 6**).

$$\text{Normalized score} = \frac{\text{Docking score}}{N^{\frac{1}{3}}}$$

Figura 6. Equação utilizada para a normalização das pontuações de docagem dos ligantes, na qual N = número de átomos pesados (exceto átomos de hidrogênio).

4.2.4. Estudo de docagem para os ligantes de referência

Com a finalidade de avaliar o desempenho das funções de pontuação para o sistema, estudos prévios de docagem foram feitos com os ligantes fumarato e flutolanil no modelo

enzimático de TcSDH, utilizando as 4 funções de pontuação disponíveis no programa GOLD 2024.3 (ChemPLP, GoldScore, ChemScore e ASP) (JONES *et al.*, 1997).

O fumarato foi docado no sítio dicarboxilato, definido na subunidade A, tendo como centro da cavidade de interação suas coordenadas de transferência para o modelo e um raio de 12 Å para essa cavidade. O ligante flutolanil foi docado no sítio ubiquinona, definido na interface das subunidades B, C e D, nas mesmas condições. Moléculas de água não foram consideradas devido à alta incerteza de suas posições na estrutura proteica. As poses geradas foram analisadas com os programas PyMOL 3.1 (Schrödinger, LLC) e Discovery Studio 25.1.0.24284 (Dassault Systèmes) (LU *et al.*, 2011).

4.2.5. Estudo de docagem em TcSDH para os híbridos

A docagem molecular dos novos híbridos (**H1-H10**), assim como da piperina, **2** e benznidazol, foi realizada no modelo construído de TcSDH, explorando os sítios ativos dicarboxilato e ubiquinona (Qp). Em ambos os sítios a docagem rígida foi realizada com a função de pontuação ChemPLP (anteriormente selecionada no estudo para os ligantes de referência) e 200% de eficiência de pesquisa do algoritmo genético do programa GOLD 2024.3 (CCDC). O raio de docagem abrangeu 12 Å a partir das coordenadas dos ligantes de referência flutolanil e fumarato, respectivamente, nos sítios ubiquinona e dicarboxilato. As poses geradas foram analisadas com os programas PyMOL 3.1 (Schrödinger, LLC) e Discovery Studio 25.1.0.24284 (Dassault Systèmes).

4.2.6. Cálculos semiempíricos e reotimização da geometria dos complexos ligante-proteína

O termo entálpico referente ao processo de interação entre ligante e proteína foi obtido pela reotimização dos complexos com o método do orbital molecular PM7 (STEWART, JAMES J. P., 2013) do programa Mopac2016 (Stewart Computational Chemistry, 2016), pelo qual as entalpias de interação (ΔH_{int}) foram calculadas. Para reduzir o custo computacional, foram selecionados somente os resíduos de aminoácidos contidos em um raio de 12 Å a partir da pose dos ligantes em cada sítio ativo da enzima. O restante da proteína foi substituído por um meio contínuo com constante dielétrica adequada para representar o interior de proteínas; os ligantes fora do sítio foram

modelados em um meio contínuo com constante dielétrica igual a da água, com o modelo COSMO (KLAMT; SCHÜRMANN, 1993). As entalpias de interação dos complexos, então, foram calculadas considerando a diferença entre a entalpia de formação (ΔH_f) do complexo ligante-proteína e a soma dos valores de ΔH_f individuais da proteína e do ligante isolados (ROCHA, SHEISI F. L. S.; SANT'ANNA, 2019).

4.2.7. Cálculo do ΔG_{bind} para os complexos ligante-proteína

A energia livre de ligação (ΔG_{bind}) para as poses de docagem dos ligantes em TcSDH foi calculada com o método Sievgene do programa MyPresto versão 1.1.107 (JBIC, 2025) (FUKUNISHI; MIKAMI; NAKAMURA, 2003), por meio do método padrão de aproximação de interação direta (DIA) (FUKUNISHI; NAKAMURA, 2013).

4.2.8. Correlação dos descritores de interação com os dados experimentais

Os descritores de interação obtidos para os ligantes deste trabalho, em cada um dos dois sítios ativos, foram correlacionados com os dados experimentais dos ensaios biológicos contra as formas amastigotas de *T. cruzi* (**Tabela 8 – Resultados e discussão**). Na perspectiva de se encontrar uma correlação adequada entre ambos, praticou-se uma combinação de análises estatísticas com regressão linear simples e múltipla por meio do programa Excel (MICROSOFT CORPORATION, 2025). A variável dependente [IC₅₀ (μ M) Amastigotes *T. cruzi*] foi individualmente correlacionada com cada descritor de interação (pontuação de docagem, pontuação normalizada, ΔG_{bind} e ΔH_{int}), adotando um nível de confiança de 95% (ROCHA, SHEISI F. L. S.; SANT'ANNA, 2019).

4.3. Procedimento de *docking* molecular 14DM e HSA

A estrutura 3D para esterol 14 α -desmetilase (1,4DM) e HSA foi obtida do *Protein Data Bank* (PDB) com códigos de acesso 3KSW e 3JRY, respectivamente. A estrutura dos híbridos foi construída e minimizada em energia com o *software* Spartan'14 (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, EUA) pelo método de *Density Functional Theory* (DFT) (SHAO *et al.*, 2006). Os cálculos de *docking* molecular foram realizados com o *software* GOLD 2022.3.0 (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, CB2 1EZ, Reino

Unido)(JONES *et al.*, 1997). No caso do 14DM, estudos de redocagem foram realizados com o inibidor 4-(4-clorofenil)-N-[2-(1H-imidazol-1-il)-1-feniletil]benzamida (VNF), que apresentou similaridades estruturais com os híbridos em estudo, obtendo-se valores de desvio quadrático médio (RMSD) adimensionais de 2,0011, 2,3146, 1,8052 e 2,1968 para ChemPLP, GoldScore, ChemScore e ASP, respectivamente. Como o menor valor de RMSD foi obtido para o ChemScore, esta função de pontuação foi utilizada nos estudos de *docking*. Para comparar os valores de pontuação de *docking* de 14DM, a função ChemScore também foi aplicada aos cálculos *in silico* desse alvo. Por outro lado, para HSA, utilizou-se a função de pontuação padrão ChemPLP devido à melhor correlação observada entre dados *in silico* e experimentais para este alvo (ACUNHA; CHAVES; IGLESIAS, 2021; CHAVES, OTÁVIO AUGUSTO *et al.*, 2024).

Cálculos de encaixe molecular foram realizados para um raio de 10 Å em torno dos domínios selecionados: o domínio de ligação de protoporfirina de ferro IX (HEME) para 14DM, enquanto os subdomínios IIA, IIIA e IB (sítios I, II e III, respectivamente) foram selecionados para HSA. O servidor web Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) foi usado para a identificação de interações proteína-ligante, e as figuras 3D foram geradas com o software PyMOL Molecular Graphics System, versão 1.0 (software Delano Scientific LLC, Schrödinger, Nova York, EUA) (ADASME *et al.*, 2021; YUAN; CHAN; HU, 2017a).

5. Avaliação ADME-Tox

O perfil farmacocinético e de semelhança a fármacos para os ligantes foi previsto com os servidores SwissADME (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2017), pkCSM (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015) e ADMETlab 3.0 (FU *et al.*, 2024). Os parâmetros de ADME-Tox desses servidores foram integrados para gerar uma análise propositiva mais abrangente e complementar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUNHA, Thiago V.; CHAVES, Otávio A.; IGLESIAS, Bernardo A. Fluorescent pyrene moiety in fluorinated C₆F₅-corroles increases the interaction with HSA and CT-DNA. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v. 25, n. 02, p. 75-94, 17 feb.

2021. Disponível em:
<<https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S1088424620500534>>.

ADASME, Melissa F *et al.* PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. W1, p. W530-W534, 2 jul. 2021. Disponível em:
<<https://academic.oup.com/nar/article/49/W1/W530/6266421>>.

ALCANTARA, Carolina de Lima *et al.* Host Organelle Interactions Facilitate Cholesterol Acquisition by *Trypanosoma cruzi* Amastigotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 72, n. 4, 20 jul. 2025. Disponível em:
<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jeu.70027>>.

ALENCAR, Mayke B. *et al.* Energy metabolism in *Trypanosoma cruzi*: the validated and putative bioenergetic and carbon sources. *mBio*, v. 16, n. 6, 11 juny 2025. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.02215-24>>.

ALSTON, Theodore A.; ABELES, Robert H. Enzymatic conversion of the antibiotic metronidazole to an analog of thiamine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 257, n. 2, p. 357-362, set. 1987. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003986187905777>>.

ANDRADE-NETO, Valter Viana *et al.* Host cholesterol influences the activity of sterol biosynthesis inhibitors in *Leishmania amazonensis*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 117, n. February, p. 3-8, 2022.

ANDRADE-NETO, Valter Viana *et al.* The pharmacological inhibition of sterol biosynthesis in *Leishmania* is counteracted by enhancement of LDL endocytosis. *Acta Tropica*, v. 119, n. 2-3, p. 194-198, 2011.

ANG, Chee Wei *et al.* Nitroimidazoles: Molecular Fireworks That Combat a Broad Spectrum of Infectious Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 60, n. 18, p. 7636-7657, 2017a.

ANG, Chee Wei *et al.* Nitroimidazoles: Molecular Fireworks That Combat a Broad Spectrum of Infectious Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 60, n. 18, p. 7636-7657, 28 set. 2017b. Disponível em:
<<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.7b00143>>.

ARAÚJO, Cleônia Roberta Melo *et al.* DRUG DEVELOPMENT BY MOLECULAR HYBRIDIZATION: A MEDICINAL CHEMISTRY PRACTICE CLASS USING PARACETAMOL AND SULFADIAZINE TABLETS AND THE VIRTUAL TOOL SciFinder ®. *Química Nova*, 2015. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20150053>>.

AZZAM, Rasha A. *et al.* Crystal structure of 2-{[5-(methylsulfanyl)-4-phenyl-4 H -1,2,4-triazol-3-yl]methyl}benzo[d]thiazole. *Acta Crystallographica Section E Crystallographic Communications*, v. 79, n. 9, p. 817-820, 1 set. 2023. Disponível em: <<https://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S2056989023007041>>.

BAHIA, Samara Ben B.B. *et al.* Molecular hybridization as a powerful tool towards multitarget quinoidal systems: Synthesis, trypanocidal and antitumor activities of naphthoquinone-based 5-iodo-1,4-disubstituted-, 1,4- and 1,5-disubstituted-1,2,3-triazoles. *MedChemComm*, v. 7, n. 8, p. 1555-1563, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C6MD00216A>>.

BARBARAS, Damien *et al.* Potent and selective antiplasmodial activity of the cyanobacterial alkaloid nostocarboline and its dimers. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 18, n. 15, p. 4413-4415, 2008a.

BARBARAS, Damien *et al.* Potent and selective antiplasmodial activity of the cyanobacterial alkaloid nostocarboline and its dimers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 18, n. 15, p. 4413-4415, ago. 2008b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X08006987>>.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal As Bases Moleculares Da Ação Dos Fármacos*. 2ª Edição ed. [S.l.: s.n.], 2008. Disponível em: <https://www.academia.edu/23615105/Eliezer_J._Barreiro_Química_Medicinal_As_Bases_Moleculares_Da_Ação_Dos_Fármacos_2a_Edição>. Acesso em: 21 abr. 2020.

BARRETT, Michael P. The rise and fall of sleeping sickness. *The Lancet*, v. 367, n. 9520, p. 1377-1378, abr. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673606685917>>.

BARROSO FERREIRA, Renata Trotta; BRANQUINHO, Maria Regina; CARDARELLI-LEITE, Paola. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. *Vigilância Sanitária em Debate*, v. 2, n. 4,

25 nov. 2014. Disponível em:
<<http://www.visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/358/160>>.

BATEMAN, Alex *et al.* UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Research*, v. 53, n. D1, p. D609-D617, 6 gen. 2025. Disponível em:
<<https://academic.oup.com/nar/article/53/D1/D609/7902999>>.

BELTRAN-HORTELANO, Iván *et al.* The role of imidazole and benzimidazole heterocycles in Chagas disease: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 206, p. 112692, nov. 2020. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523420306644>>.

BERUBE, Gervais. Natural and Synthetic Biologically Active Dimeric Molecules: Anticancer Agents, Anti-HIV Agents, Steroid Derivatives and Opioid Antagonists. *Current Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 2, p. 131-154, 2005.

BESTEIRO, Sébastien *et al.* Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux. *Trends in Parasitology*, v. 21, n. 4, p. 185-191, abr. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492205000486>>.

BOBBA, Viharika *et al.* Synthesis and biological evaluation of imidamide analogs as selective anti-trypanosomal agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 61, n. February, p. 116740, 2022. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2022.116740>>.

BRUKER (2007). APEX3 V2019.1-0. BRUKER AXS INC., MADISON, WISCONSIN, USA. No Title. [S.d.].

Bruker (2013). SAINT v8.40A. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA. [S.d.].

BRUN, Reto *et al.* Human African trypanosomiasis. *The Lancet*, v. 375, n. 9709, p. 148-159, gen. 2010. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673609608291>>.

BUCKNER, Frederick S *et al.* Efficient Technique for Screening Drugs for Activity against. *Microbiology*, v. 40, n. 11, p. 2592-2597, 1996.

BUSATTI, Haendel G. N. O. *et al.* Effect of metronidazole analogues on *Giardia lamblia* cultures. *Parasitology Research*, v. 102, n. 1, p. 145-149, 18 oct. 2007. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889312004440>>.

BÜSCHER, Philippe *et al.* Human African trypanosomiasis. *The Lancet*, v. 390, n. 10110, p. 2397-2409, 25 nov. 2017.

BUTLER, Mark S. *et al.* Natural product-derived compounds in clinical trials and drug approvals. *Natural Product Reports*, 2025. Disponível em: <<https://xlink.rsc.org/?DOI=D5NP00031A>>.

CANTEY, Paul T. *et al.* CDC - Chagas Disease - Epidemiology & Risk Factors. *Transfusion*, v. 52, n. 9, p. 1922-1930, set. 2019.

CARNEVALLIA, DENISE BERTIN; ARAÚJO, Ana Paula Serra De. Atividade Biológica da Pimenta Preta (*Piper nigrum* L.): Revisão de Literatura. *UNICIÊNCIAS*, v. 17, n., p. 41-46, 2013.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *American Trypanosomiasis*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>>. Acesso em: 26 juny 2024.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Tripanossomíase Africana*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisafrican/index.html>>. Acesso em: 21 nov. 2023.

CHAGAS, Carlos. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 1, n. 2, p. 159-218, ago. 1909. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761909000200008&lng=pt&tlng=pt>.

CHAVES, Otávio *et al.* Fluorescence and Docking Studies of the Interaction between Human Serum Albumin and Pheophytin. *Molecules*, v. 20, n. 10, p. 19526-19539, 27 oct. 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/20/10/19526>>.

CHAVES, Otávio A. *et al.* In situ ultra-fast heat deposition does not perturb the structure of serum albumin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 15, n. 12, p. 1524-1535, 1 des. 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1039/c6pp00209a>>.

CHAVES, Otávio A. *et al.* Increasing the polarity of β -lapachone does not affect its binding capacity with bovine plasma protein. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 263, p. 130279, abr. 2024. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813024010821>>.

CHAVES, Otávio A. *et al.* Interaction of Two Commercial Azobenzene Food Dyes, Amaranth and New Coccine, with Human Serum Albumin: Biophysical Characterization. *ACS Food Science & Technology*, v. 3, n. 5, p. 955-968, 19 maig 2023. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsfoodscitech.3c00125>>.

CHAVES, Otávio Augusto *et al.* A Study of the Interaction Between trans - Dehydrocrotonin, a Bioactive Natural 19- nor -Clerodane, and Serum Albumin. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2016. Disponível em: <https://jbcs.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=4608&nomeArquivo=160021AR.pdf>.

CHAVES, Otávio Augusto *et al.* Effect of peripheral platinum(II) bipyridyl complexes on the interaction of tetra-cationic porphyrins with human serum albumin. *Journal of Molecular Liquids*, v. 301, p. 112466, març 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732219335238>>.

CHAVES, Otávio Augusto *et al.* In Vitro Study of the Interaction Between HSA and 4-Bromindolylchalcone, a Potent Human MAO-B Inhibitor: Spectroscopic and Molecular Modeling Studies. *ChemistrySelect*, v. 4, n. 3, p. 1007-1014, 23 gen. 2019. Disponível em: <<https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/slct.201802665>>.

CHAVES, Otávio Augusto *et al.* Investigation of interaction between human plasmatic albumin and potential fluorinated anti-trypanosomal drugs. *Journal of Fluorine Chemistry*, v. 199, p. 103-112, jul. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022113917301409>>.

CHAVES, Otávio Augusto *et al.* Studies on the toxic effects of three regioisomeric methoxylated xanthenes against *Trypanosoma cruzi* amastigotes and their binding with human serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 323, p. 147020, set. 2025. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813025075774>>.

CHAVES, Otávio Augusto *et al.* Synthetic dimethoxyxanthenes bind similarly to human serum albumin compared with highly oxygenated xanthenes. *Chemical Physics Impact*,

v. 8, p. 100411, juny 2024. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2667022423002505>>.

CHEMAXON. *MarvinSketch* v23.1.0. . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.chemaxon.com>>. , 2024

CHEN, Shui-Sheng. The roles of imidazole ligands in coordination supramolecular systems. *CrystEngComm*, v. 18, n. 35, p. 6543-6565, 2016. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6CE01258B>>.

CHEN ZHONGPING *et al.* *Um Veículo de Medicamento de Lipossoma com Resposta a Hipóxia e seu Método de Preparação e Aplicação.* . China: [s.n.]. , 2017

CHENG, Weiyan *et al.* Identification of novel 4-anilinoquinazoline derivatives as potent EGFR inhibitors both under normoxia and hypoxia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 22, n. 24, p. 6796-6805, des. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096808961400769X>>.

CHOI, Jun Yong; PODUST, Larissa M.; ROUSH, William R. Drug Strategies Targeting CYP51 in Neglected Tropical Diseases. *Chemical Reviews*, v. 114, n. 22, p. 11242-11271, 26 nov. 2014. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr5003134>>.

CHOW, Larry; CHAN, Tak. Novel Classes of Dimer Antitumour Drug Candidates. *Current Pharmaceutical Design*, v. 15, n. 6, p. 659-674, 2009.

CHURCH, Deirdre L.; RABIN, Harvey R.; LAISHLEY, Edward J. Reduction of 2-, 4- and 5-nitroimidazole drugs by hydrogenase 1 in *Clostridium pasteurianum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 25, n. 1, p. 15-23, 1990.

CIRQUEIRA, Marília L. *et al.* Trypanosoma cruzi nitroreductase: Structural features and interaction with biological membranes. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 221, p. 891-899, nov. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813022020050>>.

CLAUDIO VIEGAS-JUNIOR; ELIEZER J. BARREIRO; CARLOS ALBERTO MANSSOUR FRAGA. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. *Current Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 17, p. 1829-1852, 1 jul. 2007. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929->

8673&volume=14&issue=17&spage=1829>.

COPPENS, Isabelle; COURTOY, Pierre J. Exogenous and endogenous sources of sterols in the culture-adapted procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 73, n. 1-2, p. 179-188, 1995.

COSAR, C; JULOU, L. [The activity of 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (R. P. 8823) against experimental *Trichomonas vaginalis* infections]. *Annales de l'Institut Pasteur*, v. 96, n. 2, p. 238-41, feb. 1959. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13627590>>.

COSTA-TUNA, Andreia *et al.* Interaction between a water-soluble anionic porphyrin and human serum albumin unexpectedly stimulates the aggregation of the photosensitizer at the surface of the albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 255, p. 128210, gen. 2024. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813023051097>>.

COURA, José Rodrigues; DE CASTRO, Solange L. A critical review on chagas disease chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

CROSSLAND, Ronald K.; SERVIS, Kenneth L. Facile synthesis of methanesulfonate esters. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 35, n. 9, p. 3195-3196, set. 1970. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo00834a087>>.

CUNHA, Eleonora Lima Alves *et al.* Benznidazole, itraconazole, and their combination for the treatment of chronic experimental Chagas disease in dogs. *Experimental Parasitology*, v. 238, n. January, 2022.

CUNHA, Eleonora Lima Alves *et al.* Benznidazole, itraconazole and their combination in the treatment of acute experimental chagas disease in dogs. *Experimental Parasitology*, v. 204, n. May, p. 107711, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.05.005>>.

DA ROSA, Rafael; SCHENKEL, Eloir Paulo; CAMPOS BERNARDES, LÍlian Sibelle. Semisynthetic and newly designed derivatives based on natural chemical scaffolds: moving beyond natural products to fight *Trypanosoma cruzi*. *Phytochemistry Reviews*, v. 19, n. 1, p. 105-122, 2020.

DA SILVA FERREIRA, Welisson *et al.* Novel 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine

chlorides derived from natural piperine as trypanocidal agents: chemical and biological studies. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 16, n. 6, p. 2984-91, 15 març 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18226906>>.

DA SILVA FERREIRA, Welisson. *PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E TRIPANOCIDA DA PIPERINA E DERIVADOS DO NÚCLEO 1,3,4-OXADIAZOL-2-TIONA*. 2014. 1-275 f. UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA, 2014.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. ILOGP: A simple, robust, and efficient description of n-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 54, n. 12, p. 3284-3301, 22 des. 2014. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ci500467k>>. Acesso em: 1 març 2023.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 42717, 3 març 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep42717>>.

DASILVA, E *et al.* Synthesis, and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against promastigotes and amastigotes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 37, n. 12, p. 979-984, 1 des. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523402014010>>.

DE CICCIO, Nuccia N.T. *et al.* LDL uptake by *Leishmania amazonensis*: Involvement of membrane lipid microdomains. *Experimental Parasitology*, v. 130, n. 4, p. 330-340, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.014>>.

DEMIR, Yeliz *et al.* Enzyme inhibition, molecular docking, and density functional theory studies of new thiosemicarbazones incorporating the 4-hydroxy-3,5-dimethoxy benzaldehyde motif. *Archiv der Pharmazie*, v. 356, n. 4, 27 abr. 2023. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.202200554>>.

DIAS, Luiz C. *et al.* Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova*, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-

40422009000900038&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

DIXON, Honor; GINGER, C.D.; WILLIAMSON, J. Trypanosome sterols and their metabolic origins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 41, n. 1, p. 1-18, gen. 1972. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0305049172900028>>.

DOMINGO-FERNÁNDEZ, Daniel *et al.* Natural Products Have Increased Rates of Clinical Trial Success throughout the Drug Development Process. *Journal of Natural Products*, v. 87, n. 7, p. 1844-1851, 26 jul. 2024. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.4c00581>>.

DUMOULIN, Peter C. *et al.* Endogenous Sterol Synthesis Is Dispensable for Trypanosoma cruzi Epimastigote Growth but Not Stress Tolerance. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 17 juny 2022. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.937910/full>>.

EDWARDS, David I. Mechanisms of selective toxicity of metronidazole and other nitroimidazole drugs. *Sexually Transmitted Infections*, v. 56, n. 5, p. 285-290, 1 oct. 1980. Disponível em: <<https://sti.bmj.com/lookup/doi/10.1136/sti.56.5.285>>.

EL-EMAM, Ali *et al.* Synthesis, antimicrobial, and anti-inflammatory activity, of novel S-substituted and N-substituted 5-(1-adamantyl)-1,2,4-triazole-3-thiols. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 8, p. 505, maig 2014. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/synthesis-antimicrobial-and-anti-inflammatory-activity-of-novel-s-subs-peer-reviewed-article-DDDT>>.

FERREIRA, C. *et al.* Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on Leishmania amazonensis. *Phytochemistry*, v. 72, n. 17, p. 2155-2164, 2011.

FERREIRA, Welisson S. *et al.* Piperine, its Analogues and Derivatives: Potencial as Antiparasitic Drugs. *Revista Virtual de Química*, v. 4, n. 3, 2012. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1984-6835.20120018>>.

FIOCRUZ. *CICLO EVOLUTIVO*. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/ciclo-evolutivo/#:~:text=cruzi possui variações morfológicas e,interior das células de mamíferos.>>. Acesso em: 9 jul. 2020.

FIOCRUZ. *Novo acordo da Fiocruz com a Bayer visa impulsionar tratamento da doença*

de Chagas. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/en/news/2023/12/new-fiocruz-agreement-bayer-aims-boost-chagas-disease-treatment>>. Acesso em: 26 juny 2024.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *STANDARD FOR BLACK, WHITE AND GREEN PEPPERS*. Disponível em: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fc odex%252FStandards%252FCXS%2B326-2017%252FCXS_326e.pdf>. Acesso em: 18 març 2024.

FRANCO, Caio H. *et al.* Novel structural CYP51 mutation in *Trypanosoma cruzi* associated with multidrug resistance to CYP51 inhibitors and reduced infectivity. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 13, p. 107-120, ago. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211320720300142>>.

FRANCO, Lucas Silva *et al.* Exploring the Conformational Effects of N - and C - Methylation of N -Acylhydrazones. *ACS Omega*, v. 10, n. 17, p. 17993-18004, 6 maig 2025. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.5c01289>>.

FRANKLIM, Tatiany *et al.* Design, Synthesis and Trypanocidal Evaluation of Novel 1,2,4-Triazoles-3-thiones Derived from Natural Piperine. *Molecules*, v. 18, n. 6, p. 6366-6382, 29 maig 2013. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/18/6/6366>>.

FREIRE-DE-LIMA, Leonardo *et al.* The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. *Parasitology Research*, v. 102, n. 5, p. 1059-1067, 29 abr. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-008-0876-9>>.

FU, Li *et al.* ADMETlab 3.0: an updated comprehensive online ADMET prediction platform enhanced with broader coverage, improved performance, API functionality and decision support. *Nucleic Acids Research*, v. 52, n. W1, p. W422-W431, 5 jul. 2024. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/52/W1/W422/7640525>>.

FUKUNISHI, Yoshifumi; MIKAMI, Yoshiaki; NAKAMURA, Haruki. The Filling Potential Method: A Method for Estimating the Free Energy Surface for Protein–Ligand Docking. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 107, n. 47, p. 13201-13210, 1 nov. 2003. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp035478e>>.

FUKUNISHI, Yoshifumi; NAKAMURA, Haruki. Improved Estimation of Protein-Ligand Binding Free Energy by Using the Ligand-Entropy and Mobility of Water Molecules. *Pharmaceuticals*, v. 6, n. 5, p. 604-622, 26 abr. 2013. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8247/6/5/604>>.

GARCIA, S. *et al.* Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 4, p. 1521-1528, 1 abr. 2005. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/2826>>.

GONZALEZ-SANZ, Marta *et al.* Chagas Disease in Europe. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 8, n. 12, p. 1-14, 2023.

GUEx, Nicolas; PEITSCH, Manuel C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *ELECTROPHORESIS*, v. 18, n. 15, p. 2714-2723, 14 gen. 1997. Disponível em: <<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.1150181505>>.

HALL, Belinda S.; WILKINSON, Shane R. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 1, p. 115-123, 2012.

HARADA, Shigeharu *et al.* Diversity of parasite complex II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, v. 1827, n. 5, p. 658-667, maig 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272813000091>>.

HOTEZ, Peter J. *et al.* Control of Neglected Tropical Diseases. *New England Journal of Medicine*, v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 6 set. 2007. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra064142>>.

IBGE. *LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA*. Disponível em: <https://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/2017/lspa_201709.pdf>. Acesso em: 26 juny 2024.

IHMT. *Doenças Tropicais Negligenciadas anotações preliminares I.* . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ihmt.unl.pt/glossary/doencas-tropicais-negligenciadas/>>. Acesso em: 16 abr. 2020. , 2020

IKAN, Raphael. *Natural Products*. 2nd Editio ed. [S.l.]: Elsevier, 1991. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/books/natural-products/ikan/978-0-08-051242-6>>.

IQVIA. *Medicine Spending and Affordability in the U.S.* Disponível em: <<https://www.iqvia.com/insights/the-iqvia-institute/reports-and-publications/reports/medicine-spending-and-affordability-in-the-us>>. Acesso em: 17 nov. 2023.

IZUMI, Erika *et al.* Natural products and Chagas' disease: A review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Natural Product Reports*, v. 28, n. 4, p. 809-823, 2011.

JAGTAP, Sangeeta. Heck reaction—State of the art. *Catalysts*, v. 7, n. 9, 2017.

JAYAKANTHAN, Mannu *et al.* Analysis of CYP3A4-HIV-1 protease drugs interactions by computational methods for Highly Active Antiretroviral Therapy in HIV/AIDS. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 28, n. 5, p. 455-463, gen. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1093326309001582>>.

JEYADEVAN, J. Prince *et al.* Antimalarial and Antitumor Evaluation of Novel C-10 Non-Acetal Dimers of 10 β -(2-Hydroxyethyl)deoxoartemisinin. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, n. 5, p. 1290-1298, 2004.

JI, Yi-Qiong; TIAN, Qiu; LIU, Yang. Crystal structure of (α)-N-tert-butyl-C-(3,4-methylenedioxyphenyl) nitron, C₁₂H₁₅NO₃. *Zeitschrift für Kristallographie - New Crystal Structures*, v. 223, n. 4, p. 531-532, des. 2008. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1524/ncrs.2008.0232/html>>.

JONES, Gareth *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. *Journal of Molecular Biology*, v. 267, n. 3, p. 727-748, abr. 1997. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283696908979>>.

JUN, Yuan *et al.* The crystal structure of 1-propyl-2-nitro-imidazole oxide, C₆H₉N₃O₃. *Zeitschrift für Kristallographie - New Crystal Structures*, v. 238, n. 5, p. 917-918, 26 oct. 2023. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/ncrs-2023-0274/html>>.

KANDE BETU KUMESU, Victor *et al.* Safety and efficacy of oral fexinidazole in

children with gambiense human African trypanosomiasis: a multicentre, single-arm, open-label, phase 2–3 trial. *The Lancet Global Health*, v. 10, n. 11, p. e1665-e1674, 1 nov. 2022. Disponível em: <<https://dndi.org/scientific-articles/2022/safety-efficacy-oral-fexinidazole-children-with-gambiense-human-african-trypanosomiasis/>>. Acesso em: 28 ago. 2025.

KAPIL, A. Piperine: A Potent Inhibitor of *Leishmania donovani* Promastigotes in vitro. *Planta Medica*, v. 59, n. 05, p. 474-474, 4 oct. 1993. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2006-959737>>.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research*, v. 90, p. S55-S62, 1 juny 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-002-0768-3>>.

KEDDERIS, Gregory L.; MIWA, Gerald T. The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents. *Drug Metabolism Reviews*, v. 19, n. 1, p. 33-62, 22 gen. 1988. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03602538809049618>>.

KELLEY, Lawrence A *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, v. 10, n. 6, p. 845-858, 7 juny 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nprot.2015.053>>.

KLAMT, A.; SCHÜÜRMAN, G. COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, n. 5, p. 799-805, 1993. Disponível em: <<https://xlink.rsc.org/?DOI=P29930000799>>.

KNOX, Richard J.; KNIGHT, Richard C.; EDWARDS, David I. Studies on the action of nitroimidazole drugs. *Biochemical Pharmacology*, v. 32, n. 14, p. 2149-2156, 1983.

KROPP, Paul J. Photobehavior of alkyl halides in solution: radical, carbocation, and carbene intermediates. *Accounts of Chemical Research*, v. 17, n. 4, p. 131-137, abr. 1984. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ar00100a003>>.

KUMAR, Priti; NAGARAJAN, Arvindhan; UCHIL, Pradeep D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2018, n. 6, p. pdb.prot095505, 1 juny 2018. Disponível em: <<http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.prot095505>>.

KUMARI, Shikha *et al.* Amide Bond Bioisosteres: Strategies, Synthesis, and Successes. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 63, n. 21, p. 12290-12358, 2020.

LEE, Bruce Y *et al.* Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 13, n. 4, p. 342-348, abr. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309913700021>>.

LEITSCH, David *et al.* Nitroimidazole drugs vary in their mode of action in the human parasite *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 2, p. 166-170, des. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211320712000176>>.

LEPESHEVA, Galina I. *et al.* CYP51: A Major Drug Target in the Cytochrome P450 Superfamily. *Lipids*, v. 43, n. 12, p. 1117-1125, 4 des. 2008. Disponível em: <<https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1007/s11745-008-3225-y>>.

LEPESHEVA, Galina I. *et al.* Structural Insights into Inhibition of Sterol 14 α -Demethylase in the Human Pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 33, p. 25582-25590, ago. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820599432>>.

LIEBESCHUETZ, John W.; COLE, Jason C.; KORB, Oliver. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 26, n. 6, p. 737-748, 28 juny 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10822-012-9551-4>>.

LIMA, Sérgio Beltrão de Andrade *et al.* Monitoramento de casos da Doença de Chagas Aguda no Brasil: um estudo descritivo. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 4, p. e27311427487, 18 març 2022. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/27487>>.

LIPINSKI, Christopher A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 46, n. SUPPL., p. 3-26, 2001.

LONG, Anthony; PARRICK, John; HODGKISS, Richard J. An Efficient Procedure for the 1-Alkylation of 2-Nitroimidazoles and the Synthesis of a Probe for Hypoxia in Solid Tumours. *Synthesis*, v. 1991, n. 09, p. 709-713, 1991. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-1991-26552>>.

LU, Shin-Hua *et al.* The discovery of potential acetylcholinesterase inhibitors: A combination of pharmacophore modeling, virtual screening, and molecular docking studies. *Journal of Biomedical Science*, v. 18, n. 1, p. 8, 21 des. 2011. Disponível em: <<https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/1423-0127-18-8>>.

MACHADO, Felipe P. *et al.* Synthesis of Novel Tetra-Substituted Pyrazole Derivatives Using Microwave Irradiation and Their Anti-Leukemic Activity Against Jurkat Cells. *Molecules*, v. 30, n. 13, p. 2880, 7 jul. 2025. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/30/13/2880>>.

Macrae, C. F., Edgington, P. R., McCabe, P., Pidcock, E., Shields, G. P., Taylor, R., Towler, M. & van de Streek, J., *J. Appl. Cryst.* 2006, 39, 453-457. [S.d.].

MARTÍN-ESCOLANO, Javier *et al.* An Updated View of the Trypanosoma cruzi Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. *ACS infectious diseases*, v. 8, n. 6, p. 1107-1115, 10 juny 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35652513/>>. Acesso em: 3 abr. 2025.

MARTINS, Francisco Mainardi *et al.* Synthesis, Structural Characterization, and In Silico Antiviral Prediction of Novel DyIII-, YIII-, and EuIII-Pyridoxal Helicates. *Inorganics*, v. 13, n. 8, p. 252, 23 jul. 2025. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2304-6740/13/8/252>>.

MAX W. MILLER, HAROLD L. HOWES, JR., ROBERT V. KASUBICK, AND ARTHUR R. ENGLIS. Alkylation of 2-Methyl-5-nitroimidazole. Some Potent Antiprotozoal Agents. v. 13, n. 1967, p. 849-852, 1970.

MAYA, Juan Diego *et al.* Trypanosoma cruzi: Effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives. *Biochemical Pharmacology*, v. 65, n. 6, p. 999-1006, 2003.

MAYER, João C. P. *et al.* Synthesis, spectroscopic characterization and DNA/HSA binding studies of (phenyl/naphthyl)ethenyl-substituted 1,3,4-oxadiazolyl-1,2,4-oxadiazoles. *New Journal of Chemistry*, v. 45, n. 1, p. 471-484, 2021. Disponível em: <<https://xlink.rsc.org/?DOI=D0NJ04530F>>.

MAZZETI, Ana Lia *et al.* Combination therapy using nitro compounds improves the efficacy of experimental Chagas disease treatment. *Parasitology*, v. 148, n. 11, p. 1320-1327, 2021.

MENDONÇA, Andréa Aparecida Santos *et al.* Relevance of Trypanothione Reductase Inhibitors on Trypanosoma cruzi Infection: A Systematic Review, Meta-Analysis, and In Silico Integrated Approach. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2018, p. 1-20, 24 oct. 2018. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/8676578/>>.

MICROSOFT CORPORATION. *Microsoft Excel*. . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://office.microsoft.com/excel>>. , 2025

MICSONAI, András *et al.* BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. W1, p. W315-W322, 2 jul. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/46/W1/W315/5035652>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BR. *Ministério da Saúde investiu mais de R\$27 milhões para combater transmissão da doença de Chagas no Brasil.* Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/dezembro/ministerio-da-saude-investiu-mais-de-r-27-milhoes-para-combater-transmissao-da-doenca-de-chagas-no-brasil#:~:text=Ao%20passado%2C%20o%20Minist%C3%A9rio%20da%20Sa%C3%ADde%20investiu%20mais%20de%20R%2427%20milhoes%20para%20combater%20a%20transmiss%C3%A3o%20da%20doen%C3%A7a%20de%20Chagas%20no%20Brasil.&contextual=1>>. Acesso em: 26 juny 2024.

MONTALTI, Marco *et al.* *Handbook of Photochemistry*. [S.l.]: CRC Press, 2006.
Disponível em: <<https://www.taylorfrancis.com/books/9781420015195>>.

MORALES, Jorge *et al.* Novel Mitochondrial Complex II Isolated from Trypanosoma cruzi Is Composed of 12 Peptides Including a Heterodimeric Ip Subunit. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 11, p. 7255-7263, març 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820326089>>.

MORENO, Maria João *et al.* Analysis of the Equilibrium Distribution of Ligands in Heterogeneous Media—Approaches and Pitfalls. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 17, p. 9757, 28 ago. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/23/17/9757>>.

MORETH, Marcele *et al.* Nitroimidazoles - a promising class of compounds for the treatment of Tuberculosis. *Revista Virtual de Química*, v. 2, n. 2, 2010. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1984-6835.20100010>>.

MOTT, Bryan T. *et al.* Synthesis and antimalarial efficacy of two-carbon-linked, artemisinin-derived trioxane dimers in combination with known antimalarial drugs.

Journal of Medicinal Chemistry, v. 56, n. 6, p. 2630-2641, 2013.

MSF. *Doença de Chagas*. Disponível em: <https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/doenca-de-chagas?utm_source=adwords_msf&utm_medium=&utm_campaign=doencas_geral_comunicacao&utm_content=_exclusao-saude_brasil_39923&gclid=CjwKCAjw4rf6BRAvEiwAn2Q76gyJ3s2isajllfzi3vw9CQ2NrZT-juwxxN0Ug>. Acesso em: 1 set. 2020.

MUKHERJEE, Sumit *et al.* Sterol 14- α -demethylase is vital for mitochondrial functions and stress tolerance in *Leishmania major*. *PLOS Pathogens*, v. 16, n. 8, p. e1008810, 20 ago. 2020. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1008810>>.

MUKHERJEE, Sumit *et al.* Sterol methyltransferase is required for optimal mitochondrial function and virulence in *Leishmania major*. *Molecular Microbiology*, v. 111, n. 1, p. 65-81, 21 gen. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mmi.14139>>.

MULLER, Christa E. Basic Chemistry of 2-Nitroimidazoles (Azomycin Derivatives). *ChemInform*, v. 31, p. 47-59, 1999.

MÜLLER KRATZ, Jadel *et al.* Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. *Expert review of clinical pharmacology*, v. 11, n. 10, p. 943-957, 3 oct. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30111183/>>. Acesso em: 2 gen. 2022.

NAESSENS, J. Bovine trypanotolerance: A natural ability to prevent severe anaemia and haemophagocytic syndrome? *International Journal for Parasitology*, v. 36, n. 5, p. 521-528, maig 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751906000695>>.

NAVEENRAJ, Selvaraj; ANANDAN, Sambandam. Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, v. 14, p. 53-71, març 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389556712000639>>.

NDJONKA, Dieudonné *et al.* Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 2, p. 3395-3439, 2013.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NIHASHI, Nozomu *et al.* Siccanin Is a Novel Selective Inhibitor of Trypanosomatid Complex II (Succinate-Ubiquinone Reductase) and a Potent Broad-Spectrum Anti-trypansomatid Drug Candidate. *Kala Azar in South Asia*. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 101-122. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-47101-3_9>.

OLIVEIRA, Ramon G. De; ALENCAR - FILHO, Edilson B.; VASCONCELLOS, Mário L. A. A. A influência da piperina na biodisponibilidade de fármacos: uma abordagem molecular. *Química Nova*, v. 37, n. 1, p. 69-73, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422014000100013&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.

OPAS; OMS. *Doenças Tropicais Negligenciadas: dia mundial chama a atenção para o fortalecimento de ações intersetoriais para melhorar a qualidade de vida das comunidades - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde*. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/30-1-2024-doencas-tropicais-negligenciadas-dia-mundial-chama-atencao-para-fortalecimento>>. Acesso em: 24 set. 2025.

OROSCO, Dayanna; MENDOZA, Arturo René; MELÉNDEZ, Carlos Mario. Exploring the Potential of Natural Products as Antiparasitic Agents for Neglected Tropical Diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 24, n. 2, p. 89-108, gen. 2024. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/222001/article>>.

ORPEN, A. G. *et al.* Appendix A: Typical Interatomic Distances in Organic Compounds and Organometallic Compounds and Coordination Complexes of the d- and f-block metals. *Structure Correlation*. [S.l.]: Wiley, 1994. p. 752-858. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527616091.app1>>.

PAHO/WHO. *Chagas Disease*. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease#:~:text=Chagas disease is endemic in,newborns become infected during gestation.>>. Acesso em: 25 juny 2024.

PAN, Yongping *et al.* Consideration of Molecular Weight during Compound Selection in Virtual Target-Based Database Screening. *Journal of Chemical Information and*

Computer Sciences, v. 43, n. 1, p. 267-272, 1 gen. 2002. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci020055f>>.

PAQUIN, Alexis; REYES-MORENO, Carlos; BÉRUBÉ, Gervais. Recent Advances in the Use of the Dimerization Strategy as a Means to Increase the Biological Potential of Natural or Synthetic Molecules. *Molecules*, v. 26, n. 8, p. 2340, 17 abr. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/26/8/2340>>.

PARKINSON, Gary N.; SKELLY, Jane V.; NEIDLE, Stephen. Crystal Structure of FMN-Dependent Nitroreductase from *Escherichia coli* B: A Prodrug-Activating Enzyme, *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, n. 20, p. 3624-3631, 1 oct. 2000. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm000159m>>.

PATTERSON, Stephen; WYLLIE, Susan. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends in Parasitology*, v. 30, n. 6, p. 289-298, juny 2014a. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492214000579>>.

PATTERSON, Stephen; WYLLIE, Susan. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends in Parasitology*, v. 30, n. 6, p. 289-298, 1 juny 2014b.

PEARSON, William R. An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. *Current Protocols in Bioinformatics*, v. 42, n. 1, juny 2013. Disponível em: <<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471250953.bi0301s42>>.

PÉREZ-MOLINA, José A.; MOLINA, Israel. Chagas disease. *The Lancet*, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PÉREZ MONTILLA, Carlos A. *et al.* Major benznidazole metabolites in patients treated for Chagas disease: Mass spectrometry-based identification, structural analysis and detoxification pathways. *Toxicology Letters*, v. 377, n. February, p. 71-82, 2023.

PINA, J. *et al.* Alternating Binaphthyl–Thiophene Copolymers: Synthesis, Spectroscopy, and Photophysics and Their Relevance to the Question of Energy Migration versus Conformational Relaxation. *Macromolecules*, v. 42, n. 5, p. 1710-1719, 10 març 2009. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ma802395c>>.

PIRES, Douglas E. V.; BLUNDELL, Tom L.; ASCHER, David B. pkCSM: Predicting

Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 14 maig 2015. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>>.

PITASSE-SANTOS, Paulo *et al.* A Novel Protocol for the Synthesis of 1,2,4-Oxadiazoles Active against Trypanosomatids and Drug-Resistant Leukemia Cell Lines. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 7, n. 12, p. 403, 28 nov. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2414-6366/7/12/403>>.

PRADHAN, Supratim *et al.* Scrutinized lipid utilization disrupts Amphotericin-B responsiveness in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *eLife*, v. 14, 27 maig 2025. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/102857>>.

PUBCHEM. *Metronidazole* | C6H9N3O3 | CID 4173 - PubChem. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metronidazole#section=Melting-Point&fullscreen=true>>. Acesso em: 23 oct. 2025.

RAMACHANDRAN, Srinivas *et al.* Automated minimization of steric clashes in protein structures. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 79, n. 1, p. 261-270, 5 gen. 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.22879>>.

RIBEIRO, Tatiana Santana *et al.* Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 14, n. 13, p. 3555-3558, jul. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X04005177>>.

RIBEIRO, Vanessa *et al.* Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 12, p. 7-17, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.11.004>>.

ROCHA, Sheisi F. L. S.; SANT'ANNA, Carlos M. R. A procedure combining molecular docking and semiempirical method PM7 for identification of selective Shp2 inhibitors. *Biopolymers*, v. 110, n. 11, 3 nov. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bip.23320>>.

ROCHA, Yancka Lener Hora *et al.* Perfil epidemiológico da doença de Chagas aguda no Brasil. *Research, Society and Development*, v. 12, n. 8, p. e8112842939, 18 ago. 2023. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/42939>>.

RODRIGUES COURA, José. *TRIPANOSOMOSE, DOENÇA DE CHAGAS. Ciência e Cultura (on-line version)*. [S.l.: s.n.], 2003. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000100022>. Acesso em: 20 abr. 2020.

RODRIGUES, Klinger Antonio da Franca *et al.* Eugenia uniflora L. Essential Oil as a Potential Anti- Leishmania Agent: Effects on Leishmania amazonensis and Possible Mechanisms of Action. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, p. 1-10, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/279726/>>.

ROSS, Philip D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, v. 20, n. 11, p. 3096-3102, 1 maig 1981. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00514a017>>.

SAADEH, Haythem A. *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of new 1,2,4-triazole-3-thiol metronidazole derivatives. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, v. 141, n. 4, p. 471-478, 28 abr. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00706-010-0281-9>>.

SAKYI, Patrick Opare *et al.* Therapeutic Potential of Natural Products as Innovative and New Frontiers for Combating Parasitic Diseases. *Parasitologia*, v. 5, n. 3, p. 49, 14 set. 2025. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2673-6772/5/3/49>>.

SCALESE, Gonzalo *et al.* Biosynthesis of ergosterol as a relevant molecular target of metal-based antiparasitic and antifungal compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 503, n. August 2023, 2024.

SEEBER, Frank; BOOTHROYD, John C. Escherichia coli β -galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite Toxoplasma gondii. *Gene*, v. 169, n. 1, p. 39-45, feb. 1996. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378111995007865>>.

SEMLER, Ursula; GROSS, Georg G. Distribution of piperine in vegetative parts of Piper nigrum. *Phytochemistry*, v. 27, n. 5, p. 1566-1567, gen. 1988. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031942288802498>>.

SHAO, Yihan *et al.* Advances in methods and algorithms in a modern quantum chemistry program package. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v. 8, n. 27, p. 3172-3191, 2006. Disponível

em: <<https://xlink.rsc.org/?DOI=B517914A>>.

Sheldrick, G.M. SADABS, Program for Empirical Absorption Correction of Area Detector Data, University of Göttingen, Germany, 1996. [S.d.].

SIJM, Maarten *et al.* Identification of Phenylpyrazolone Dimers as a New Class of Anti-Trypanosoma cruzi Agents. *ChemMedChem*, v. 14, n. 18, p. 1662-1668, 18 set. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.201900370>>.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. Clayton; MORRILL, Terence C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. California: [s.n.], 1994.

SIMÕES, Marcus Vinicius *et al.* Chagas Disease Cardiomyopathy. *International Journal of Cardiovascular Sciences*, 2018. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/2359-4802.20180011>>.

SMITH, Mark A.; EDWARDS, David I. Redox potential and oxygen concentration as factors in the susceptibility of helicobacter pylori to nitroheterocyclic drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 35, n. 6, p. 751-764, 1995.

SOEIRO, Maria de Nazaré Correia *et al.* In Vitro and In Vivo Studies of the Antiparasitic Activity of Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) Inhibitor VNI against Drug-Resistant Strains of Trypanosoma cruzi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 9, p. 4151-4163, set. 2013. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00070-13>>.

STEWART, J. J. P. Stewart Computational Chemistry. *MOPAC*. Colorado Springs, CO, EUA: [s.n.]. Disponível em: <<http://openmopac.net/>>. , 2016

STEWART, James J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *Journal of Molecular Modeling*, v. 13, n. 12, p. 1173-1213, 9 des. 2007. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s00894-007-0233-4>>.

STEWART, James J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *Journal of Molecular Modeling*, v. 19, n. 1, p. 1-32, 28 gen. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00894-012-1667-x>>.

STRIKER, George *et al.* Photochromicity and Fluorescence Lifetimes of Green

Fluorescent Protein. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 103, n. 40, p. 8612-8617, 1 oct. 1999. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp991425e>>.

SUETH-SANTIAGO, V. *et al.* CYP51: Is it a good idea? *Revista Virtual de Quimica*, v. 7, n. 2, p. 539-575, 2015.

TAKOOREE, Heerasing *et al.* A systematic review on black pepper (*Piper nigrum* L.): from folk uses to pharmacological applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 59, n. sup1, p. S210-S243, 27 juny 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2019.1565489>>.

TAMIZ, Amir P. *et al.* Application of the Bivalent Ligand Approach to the Design of Novel Dimeric Serotonin Reuptake Inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, v. 122, n. 22, p. 5393-5394, 1 juny 2000. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja000199f>>.

THOMAS-BROWN, P. G.; RUDDOCK, P. L.; GOSSELL-WILLIAMS, M. Pharmacokinetics. *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications, and Strategies, Second Edition*, p. 559-577, 30 jul. 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557744/>>. Acesso em: 14 oct. 2025.

THOMAS, Carol; GWENIN, Christopher D. *The role of nitroreductases in resistance to nitroimidazoles. Biology*. [S.l: s.n.], 2021

TOMINAGA, Hideyuki *et al.* A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Analytical Communications*, v. 36, n. 2, p. 47-50, 1999. Disponível em: <<https://xlink.rsc.org/?DOI=a809656b>>.

TROCHINE, Andrea *et al.* Benznidazole Biotransformation and Multiple Targets in *Trypanosoma cruzi* Revealed by Metabolomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 5, p. e2844, 22 maig 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002844>>.

TYAGI, Vikas *et al.* A natural product inspired hybrid approach towards the synthesis of novel pentamidine based scaffolds as potential anti-parasitic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 23, n. 1, p. 291-296, gen. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X12014035>>.

UCHIYAMA, Nahoko. Antichagasic Activities of Natural Products against

Trypanosoma cruzi. *JOURNAL OF HEALTH SCIENCE*, v. 55, n. 1, p. 31-39, 2009. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jhs/55.31?from=CrossRef>>.

URBINA, Julio A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 311-318, 2009.

USECHE, Yerly *et al.* Central nervous system commitment in Chagas disease. *Frontiers in Immunology*, v. 13, 10 nov. 2022. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.975106/full>>.

VELEZ, Afonso *et al.* Seasoning to Kill: the Example of the Natural Amide Piperine and Its Potential in the Design of New Antiparasitic Drugs. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2024. Disponível em: <https://jbcs.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=12713&nomeArquivo=2024-0061RV_MedChem.pdf>.

VELEZ, Afonso Santine M M *et al.* 2-Nitro-1-vinyl-1 H -imidazole. p. 1-6, 2022.

VERDONK, Marcel L. *et al.* Improved protein–ligand docking using GOLD. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 52, n. 4, p. 609-623, set. 2003. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.10465>>.

VLAHAKIS, Jason Z. *et al.* The anti-malarial activity of bivalent imidazolium salts. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 21, p. 6525-6542, nov. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089611004305>>.

WATERHOUSE, Andrew *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. W1, p. W296-W303, 2 jul. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/46/W1/W296/5000024>>.

WATERHOUSE, Andrew M *et al.* The structure assessment web server: for proteins, complexes and more. *Nucleic Acids Research*, v. 52, n. W1, p. W318-W323, 5 jul. 2024. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/52/W1/W318/7650609>>.

WAVEFUNCTION, Inc. *Spartan'24 v1.3.0*. Irvine, CA: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.wavefun.com/spartan>>. , 2025

WHO. *Celebrating World Chagas Disease Day for the first time in 2020*. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/events/detail/2020/04/14/default-calendar/celebrating-world-chagas-disease-day-for-the-first-time-in-2020>>. Acesso em:

1 set. 2020.

WHO. *Infectious and parasitic diseases*. Disponível em: <<https://platform.who.int/mortality/themes/theme-details/topics/topic-details/MDB/infectious-and-parasitic-diseases>>. Acesso em: 17 nov. 2023a.

WHO. *Tripanossomíase humana africana (doença do sono)*. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)#:~:text=Human African trypanosomiasis%2C also known,from infected humans or animals.](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)#:~:text=Human African trypanosomiasis%2C also known,from infected humans or animals.)>. Acesso em: 17 nov. 2023b.

XAVIER, Samanta Cristina das Chagas *et al.* Distantiae Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A New Epidemiological Feature of Acute Chagas Disease in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 5, p. e2878, 22 maio 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002878>>.

XAVIER, Sérgio Salles *et al.* Apical aneurysm in the chronic phase of Chagas disease: prevalence and prognostic value in an urban cohort of 1053 patients. *Rev SOCERJ*, n. 4, p. 351-356, 2005.

XIANG, Zhexin. Advances in Homology Protein Structure Modeling. *Current Protein & Peptide Science*, v. 7, n. 3, p. 217-227, 1 juny 2006. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2037&volume=7&issue=3&spage=217>>.

YAMASAKI, Keishi *et al.* Albumin–drug interaction and its clinical implication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1830, n. 12, p. 5435-5443, des. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416513002018>>.

YUAN, Shuguang; CHAN, H.C. Stephen; HU, Zhenquan. Using <scp>PyMOL</scp> as a platform for computational drug design. *WIREs Computational Molecular Science*, v. 7, n. 2, 5 març 2017a. Disponível em: <<https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wcms.1298>>.

YUAN, Shuguang; CHAN, H.C. Stephen; HU, Zhenquan. Using PyMOL as a platform for computational drug design. *WIREs Computational Molecular Science*, v. 7, n. 2, 5 març 2017b. Disponível em: <<https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wcms.1298>>.

ZHAO, Hongtao. Plasma Protein Binding as an Optimizable Parameter for In Vivo Efficacy. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 68, n. 11, p. 12136-12140, 12 juny 2025. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.5c00964>>.

ZHENG, Lei *et al.* HSADab: A comprehensive database for human serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 277, p. 134289, oct. 2024. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813024050943>>.

ZSILA, Ferenc. Subdomain IB Is the Third Major Drug Binding Region of Human Serum Albumin: Toward the Three-Sites Model. *Molecular Pharmaceutics*, v. 10, n. 5, p. 1668-1682, 6 maig 2013. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp400027q>>.

ANEXOS 1

Figura S1. Espectro FT-IR de 2	A8
Figura S2. Espectro ^1H -NMR de 2 em DMSO- d_6	A8
Figura S3. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de 2 em DMSO- d_6	A9
Figura S4. HRMS-TOF (MS+) de 2	A9
Figura S5. Cromatograma de CLAE de 2	A9
Figura S6. Espectro FT-IR de 3	A10
Figura S7. Espectro ^1H -NMR de 3 em DMSO- d_6	A11
Figura S8. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de 3 em DMSO- d_6	A11
Figura S9. CG-MS de 3	A12
Figura S10. CG Cromatograma de 3	A12
Figura S11. Espectro FT-IR de 4	A13
Figura S12. Espectro ^1H -NMR de 4 em DMSO- d_6	A14
Figura S13. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de 4 em DMSO- d_6	A14
Figura S14. CG-MS de 4	A15
Figura S15. CG Cromatograma de 4	A15
Figura S16. Espectro FT-IR de 5	A16
Figura S17. Espectro ^1H -NMR de 5 em CDCl_3	A17
Figura S18. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de 5 em CDCl_3	A17
Figura S19. CG-MS de 5	A18
Figura S20. CG Cromatograma de 5	A18
Figura S21. Espectro FT-IR de 6	A19
Figura S22. Espectro ^1H -NMR de 6 em CDCl_3	A20
Figura S23. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de 6 em CDCl_3	A20
Figura S24. CG-MS de 6	A21
Figura S25. LRMS de 6	A21
Figura S26. Cromatograma de CLAE de 6	A21
Figura S27. FT-IR Espectro FT-IR de 7	A22
Figura S28. Espectro ^1H -NMR de 7 em CDCl_3	A23

Figura S29. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de 7 em CDCl_3 .	A23
Figura S30. CG-MS de 7 .	A24
Figura S31. CG Cromatograma de 7 .	A24
Figura S32. Espectro FT-IR de 8 .	A25
Figura S33. Espectro ^1H -NMR de 8 em CDCl_3 .	A26
Figura S34. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de 8 em CDCl_3 .	A26
Figura S35. CG-MS de 8 .	A27
Figura S36. CG Cromatograma de 8 .	A27
Figura S37. Espectro FT-IR de 9 .	A28
Figura S38. Espectro ^1H -NMR de 9 em CDCl_3 .	A29
Figura S39. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de 9 em CDCl_3 .	A29
Figura S40. CG-MS de 9 .	A30
Figura S41. CG Cromatograma de 9 .	A30
Figura S42. Espectro FT-IR de 10 .	A31
Figura S43. Espectro ^1H -NMR de 10 em CDCl_3 .	A32
Figura S44. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de 10 em CDCl_3 .	A32
Espectro 44.1. Espectro bidimensional de RMN ^1H , ^{13}C - HSQC (J 1) (500 MHz/125 MHz, CDCl_3) do 1-(3-bromopropil)-2-metil-4-nitro-1 <i>H</i> -imidazol 10 .	A33
Espectro 44.2. Espectro bidimensional de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC (J 2, J 3) (500 MHz/125 MHz, CDCl_3) do 1-(3-bromopropil)-2-metil-4-nitro-1 <i>H</i> -imidazol 10 .	A34
Figura S45. LRMS de 10 .	A34
Figura S46. Cromatograma de CLAE de 10 .	A35
Figura S47. Espectro FT-IR de 11 .	A36
Figura S48. Espectro ^1H -NMR de 11 em CDCl_3 .	A37
Figura S49. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de 11 em CDCl_3 .	A37
Figura S50. LRMS de 11 .	A38
Figura S51. Cromatograma de CLAE de 11 .	A38
Figura S52. Espectro FT-IR de 12 .	A39
Figura S53. Espectro ^1H -NMR de 12 em CDCl_3 .	A40
Figura S54. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de 12 em CDCl_3 .	A40

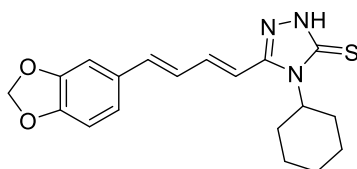
Figura S55. LRMS de 12	A41
Figura S56. Cromatograma de CLAE de 12	A41
Figura S57. Espectro FT-IR de 13	A42
Figura S58. Espectro ^1H -NMR de 13 em CDCl_3	A43
Figura S59. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de 13 em CDCl_3	A43
Figura S60. CG-MS de 13	A44
Figura S61. CG Cromatograma de 13	A44
Figura S62. Espectro FT-IR de 14	A45
Figura S63. Espectro ^1H -NMR de 14 em CDCl_3	A46
Figura S64. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de 14 em CDCl_3	A46
Figura S65. LRMS de 14	A47
Figura S66. Cromatograma de CLAE de 14	A47
Figura S67. Espectro FT-IR de H1	A48
Figura S68. Espectro ^1H -NMR de H1 em DMSO-d_6	A49
Figura S69. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de H1 em DMSO-d_6	A49
Figura S70. HRMS-TOF (MS+) de H1	A50
Figura S71. Cromatograma de CLAE de H1	A50
Figura S72. Espectro FT-IR de H2	A51
Figura S73. Espectro ^1H -NMR de H2 em CDCl_3	A52
Figura S74. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de H2 em CDCl_3	A52
Figura S75. Cromatograma de CLAE de H2	A53
Figura S76. HRMS-TOF (MS+) de H2	A53
Figura S77. Espectro FT-IR de H3	A54
Figura S78. Espectro ^1H -NMR de H3 em CDCl_3	A55
Figura S79. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de H3 em CDCl_3	A55
Figura S80. HRMS-TOF (MS+) de H3	A56
Figura S81. Cromatograma de CLAE de H3	A56
Figura S82. Espectro FT-IR de H4	A57
Figura S83. Espectro ^1H -NMR de H4 em CDCl_3	A58

Figura S84. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de H4 em CDCl_3	A58
Figura S85. HRMS-TOF (MS+) de H4	A59
Figura S86. Cromatograma de CLAE de H4	A59
Figura S87. Espectro FT-IR de H5	A60
Figura S88. Espectro ^1H -NMR de H5 em CDCl_3	A61
Figura S89. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de H5 em CDCl_3	A61
Figura S90. Cromatograma de CLAE de H5	A62
Figura S91. HRMS-TOF (MS+) de H5	A62
Figura S92. Espectro FT-IR de H6	A63
Figura S93. Espectro ^1H -NMR de H6 em CDCl_3	A64
Figura S94. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de H6 em CDCl_3	A64
Figura S95. HRMS-TOF (MS+) de H6	A65
Figura S96. Cromatograma de CLAE de H6	A65
Figura S97. Espectro FT-IR de H7	A66
Figura S98. Espectro ^1H -NMR de H7 em CDCl_3	A67
Figura S99. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de H7 em CDCl_3	A67
Figura S100. HRMS-TOF (MS+) de H7	A68
Figura S101. Cromatograma de CLAE de H7	A68
Figura S102. Espectro FT-IR de H8	A69
Figura S103. Espectro ^1H -NMR de H8 em CDCl_3	A70
Figura S104. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de H8 em CDCl_3	A70
Figura S105. HRMS-TOF (MS+) de H8	A71
Figura S106. Cromatograma de CLAE de H8	A71
Figura S107. Espectro FT-IR de H9	A72
Figura S108. Espectro ^1H -NMR de H9 em CDCl_3	A73
Figura S109. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de H9 em CDCl_3	A73
Figura S110. HRMS-TOF (MS+) de H9	A74
Figura S111. Cromatograma de CLAE de H9	A74
Figura S112. Espectro FT-IR de H10	A75

Figura S113. Espectro ^1H -NMR de H10 em CDCl_3	A76
Figura S114. Espectro ^{13}C -NMR DEPT-135 de H10 em CDCl_3	A76
Figura S115. HRMS-TOF (MS+) de H10	A77
Figura S116. Cromatograma de CLAE de H10	A77
Figura S117. ^1H -NMR de D1 em Acetona- d_6	A78
Figura S118. ^{13}C -NMR DEPT-135 de D1 em Acetona- d_6	A79
Figura S119. HRMS-TOF (MS+) de D1	A79
Figura S120. Cromatograma de CLAE de D1	A80
Figura S121. ^1H -NMR de D2 em Acetona- d_6	A81
Figura S122. ^{13}C -NMR DEPT-135 de D2 em Acetona- d_6	A82
Figura S123. HRMS-TOF (MS+) de D2	A82
Figura S124. Cromatograma de CLAE de D2	A83
Figura S125. ^1H -NMR de D3 em $\text{DMSO}-\text{d}_6$	A84
Figura S126. ^{13}C -NMR DEPT-135 de D3 em $\text{DMSO}-\text{d}_6$	A85
Figura S127. HRMS-TOF (MS+) de D3	A85
Figura S128. Cromatograma de CLAE de D3	A86
Figura S129. ^1H -NMR de D4 em $\text{DMSO}-\text{d}_6$	A87
Figura S130. ^{13}C -NMR DEPT-135 de D4 em $\text{DMSO}-\text{d}_6$	A88
Figura S131. HRMS-TOF (MS+) de D4	A88
Figura S132. Cromatograma de CLAE de D4	A89
Figura S133. ^1H -NMR de D5 em $\text{DMSO}-\text{d}_6$	A90
Figura S134. ^{13}C -NMR DEPT-135 de D5 em $\text{DMSO}-\text{d}_6$	A91
Figura S135. HRMS-TOF (MS+) de D5	A91
Figura S136. Cromatograma de CLAE de D5	A92
Figura S137. ^1H -NMR de D6 em CDCl_3	A93
Figura S138. ^{13}C -NMR DEPT-135 de D6 em CDCl_3	A94
Figura S139. HRMS-TOF (MS+) de D6	A94
Figura S140. Cromatograma de CLAE de D6	A95
Figura S141. ^1H -NMR de D7 em CDCl_3	A96

Figura S142. ^{13}C -NMR DEPT-135 de D7 em CDCl_3	A97
Figura S143. HRMS-TOF (MS+) de D7	A97
Figura S144. Cromatograma de CLAE de D7	A98
Figura S145. ^1H -NMR de D8 em CDCl_3	A99
Figura S146. ^{13}C -NMR DEPT-135 de D8 em CDCl_3	A100
Figura S147. HRMS-TOF (MS+) de D8	A100
Figura S148. Cromatograma de CLAE de D8	A101
Figura S149. Gráficos de inibição dos híbridos H1-H10 frente a amastigotas de <i>T. cruzi</i> 120h.....	A102
Figura S150. Gráficos de inibição dos híbridos H1-H10 frente a LLC-MK2 120h....	A103
Figura S151. Gráficos de inibição do híbrido H2 frente a epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em diferentes tempos de tratamento.	A104
Figura S152. Gráficos de inibição dos dímeros D1-D8 frente a amastigotas de <i>T. cruzi</i> 120h.....	A105
Figura S153. Gráficos de inibição dos dímeros D1-D8 frente a LLC-MK2 120h.....	A106
Figura S154. A densidade orbital molecular de fronteira e o intervalo de energia HOMO-LUMO correspondente para os compostos D1-D8 , calculados com DFT/B3LYP/6-31G*.....	A107
Tabela S1. Métricas de qualidade para as subunidades de TcSDH modeladas pelo servidor Swiss-Model.....	A107
Tabela S2. Métricas de qualidade para a subunidade TcSDHB modelada pelo servidor PHYRE ²	A108
Tabela S3. Parâmetros anteriores e posteriores à minimização de energia do modelo de TcSDH pelo servidor Chiron (Dokholyan Group, 2024)	A108
Tabela S4. Pontuações de docagem, pontuações normalizadas e valores de RMSD (Å) para os ligantes de referência fumarato e flutolanil, respectivamente, no sítio dicarboxilato e ubiquinona de TcSDH.....	A108
Tabela S5. Descritores de interação obtidos para os ligantes de referência fumarato e flutolanil, respectivamente, no sítio dicarboxilato e ubiquinona de TcSDH.....	A109
Tabela S6. Parâmetros calculados para a avaliação da perda entrópica e da energia de solvatação dos ligantes em água que foram utilizados na correlação estatística com regressão linear múltipla.....	A109
Tabela S7. Resultados da avaliação para os outros termos (variáveis independentes) referentes ao estudo estatístico de correlação dos dados teóricos e experimentais nos sítios	

ativos ubiquinona (Qp) e dicarboxilato de TcSHD. N = 13 ligantes (piperina, 2 , H1-H10 e benzonidazol)	A110
Detalhes computacionais para a minimização da energia estrutural dos compostos Azomicina e D1 a D8	A111



5-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4-cyclohexyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione

Chemical Formula: $C_{19}H_{21}N_3O_2S$

Exact Mass: 355,14

Molecular Weight: 355,46

Elemental Analysis: C, 64.20; H, 5.96; N, 11.82; O, 9.00; S, 9.02

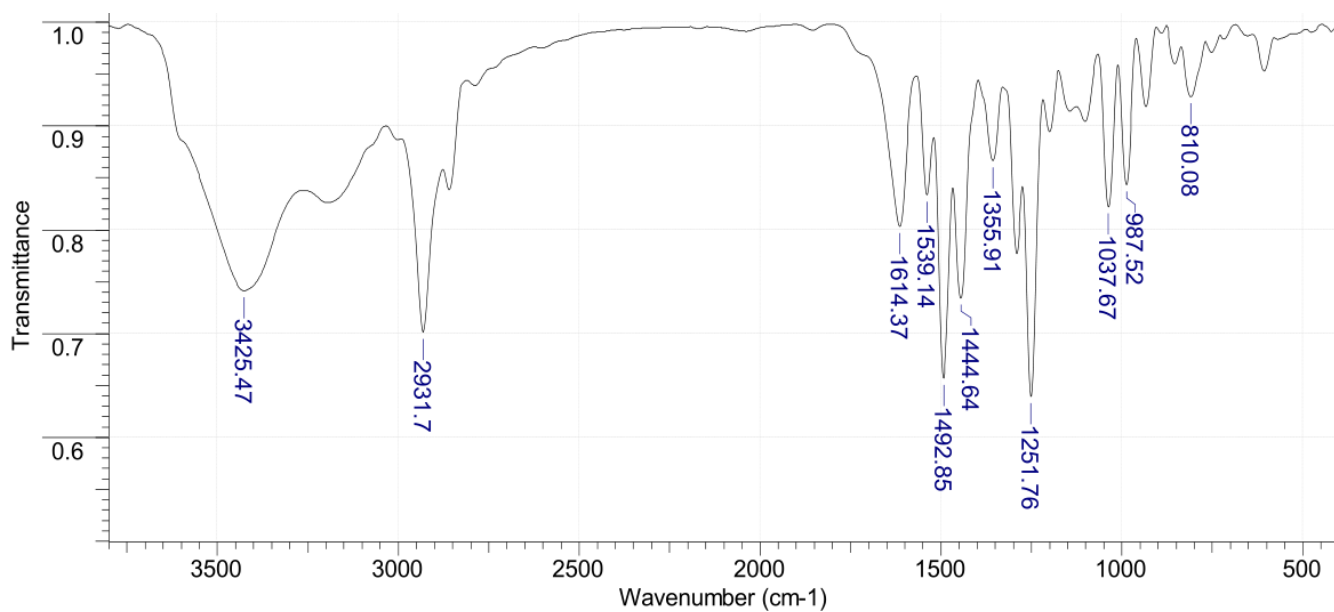


Figura S1. FT-IR de **2**.

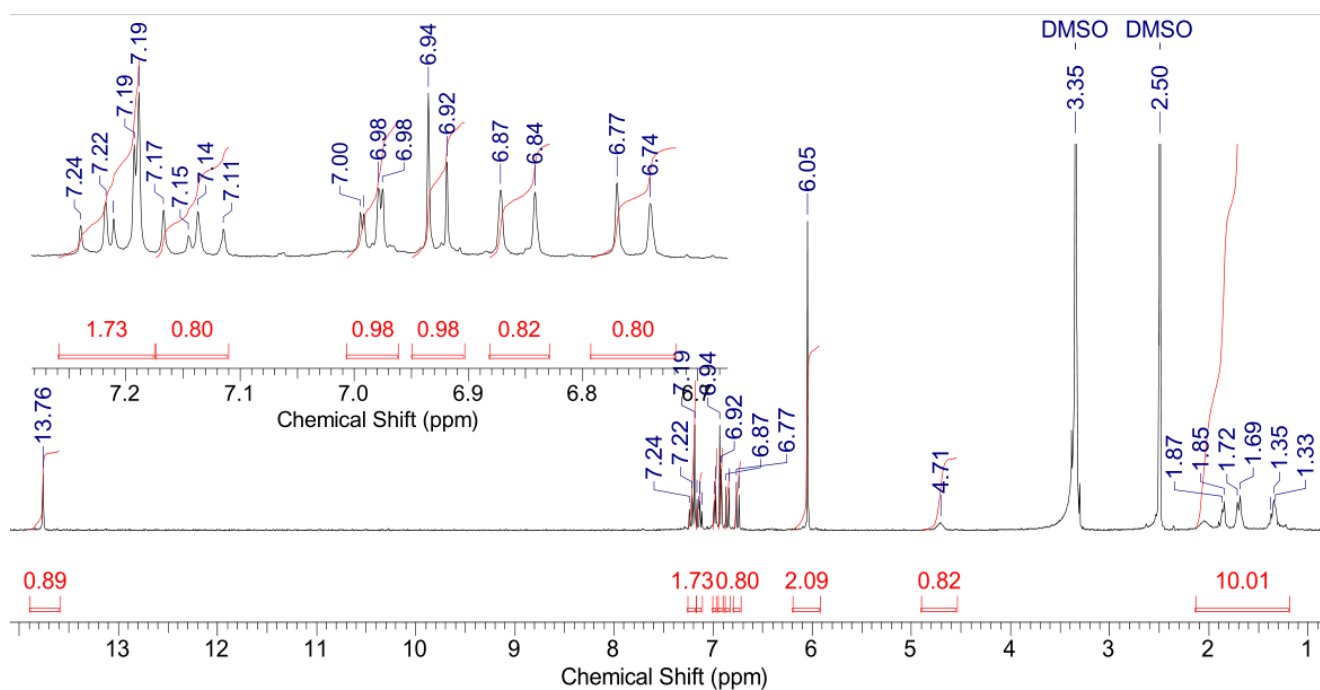


Figura S2. $^1\text{H-NMR}$ de **2** em DMSO-d_6 .

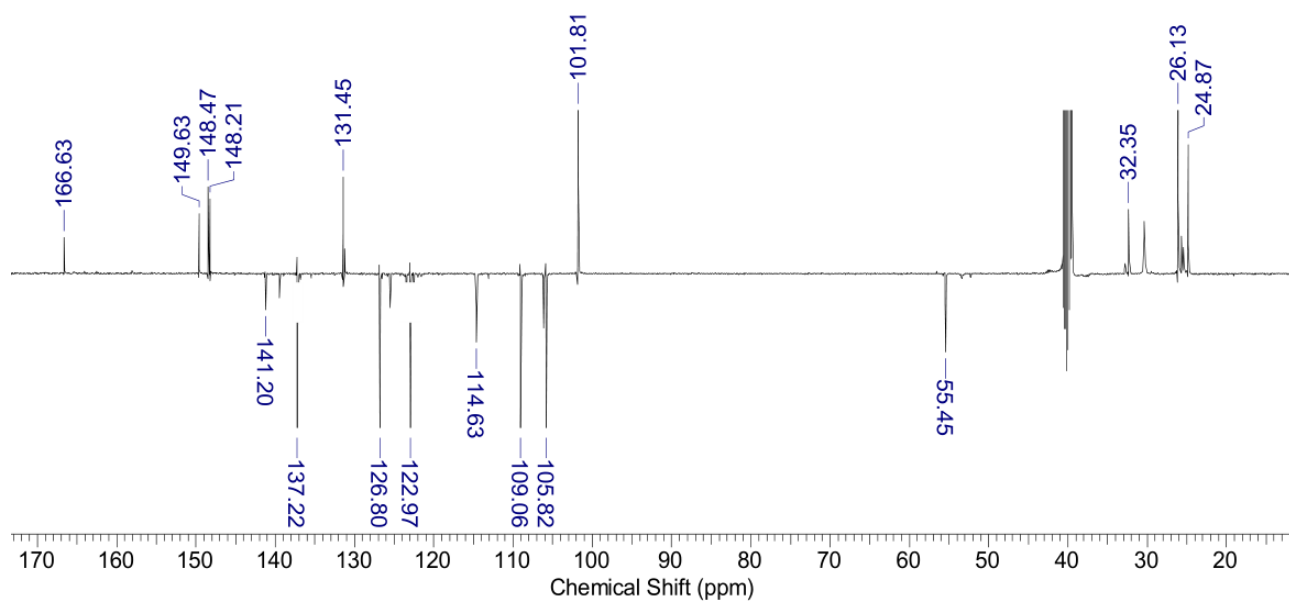


Figura S3. ^{13}C -NMR DEPT-135 de **2** em DMSO-d_6 .

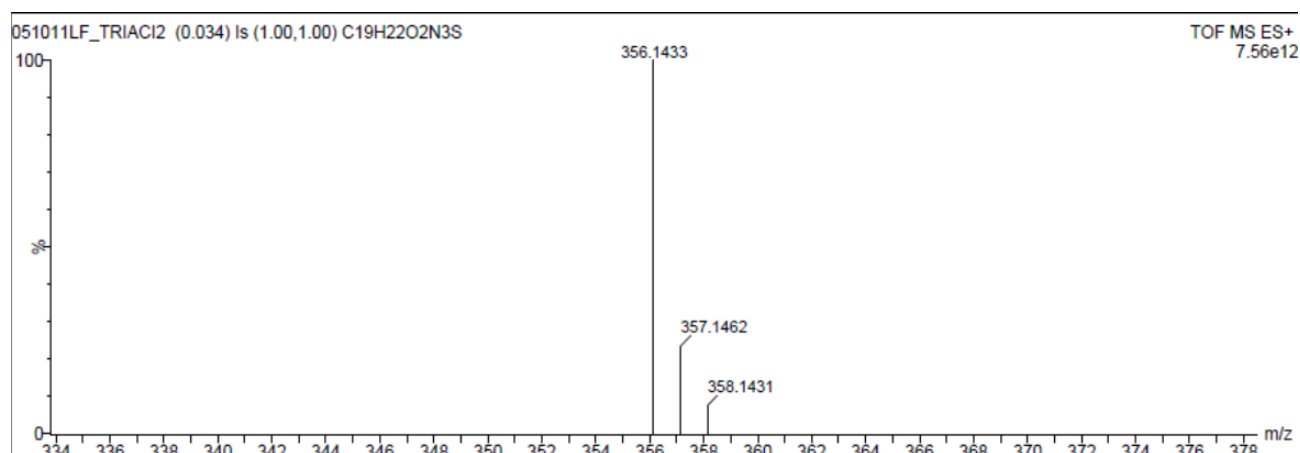
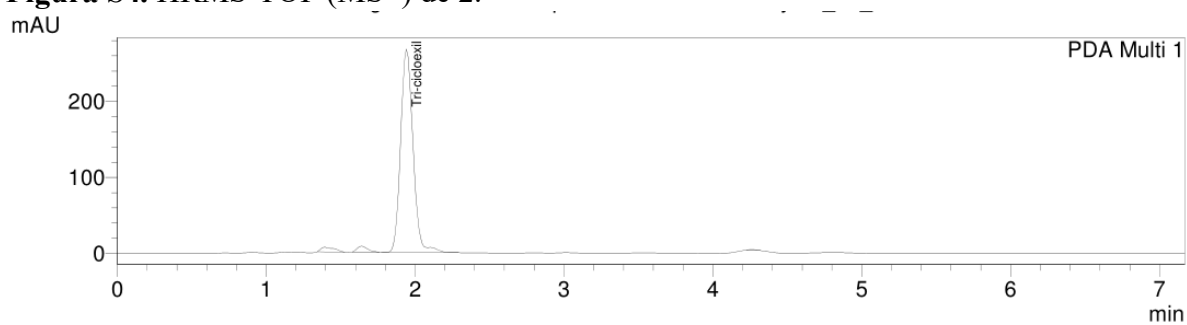


Figura S4. HRMS-TOF (MS^+) de **2**.



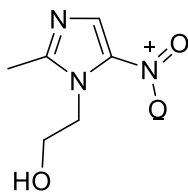
1 PDA Multi 1/360nm 4nm

PeakTable

PDA Ch1 360nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area %
1	1.385	38489	2.359
2	1.636	37099	2.274
3	1.936	1553345	95.214
4	4.255	2494	0.153
Total		1631427	100.000

Figura S5. Cromatograma de **2**.



2-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethan-1-ol

Chemical Formula: $C_6H_9N_3O_3$

Exact Mass: 171,06

Molecular Weight: 171,16

Elemental Analysis: C, 42.11; H, 5.30; N, 24.55; O, 28.04

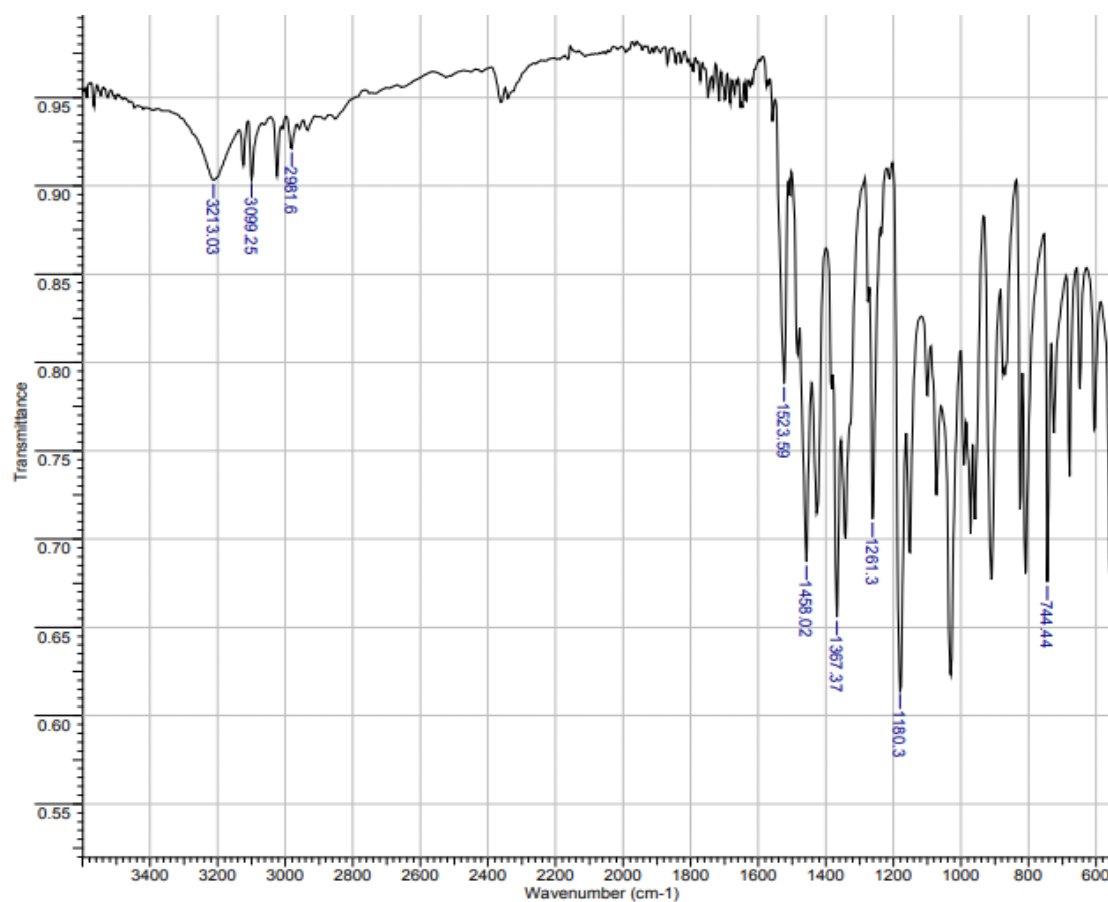


Figura S6. FT-IR de **3**.

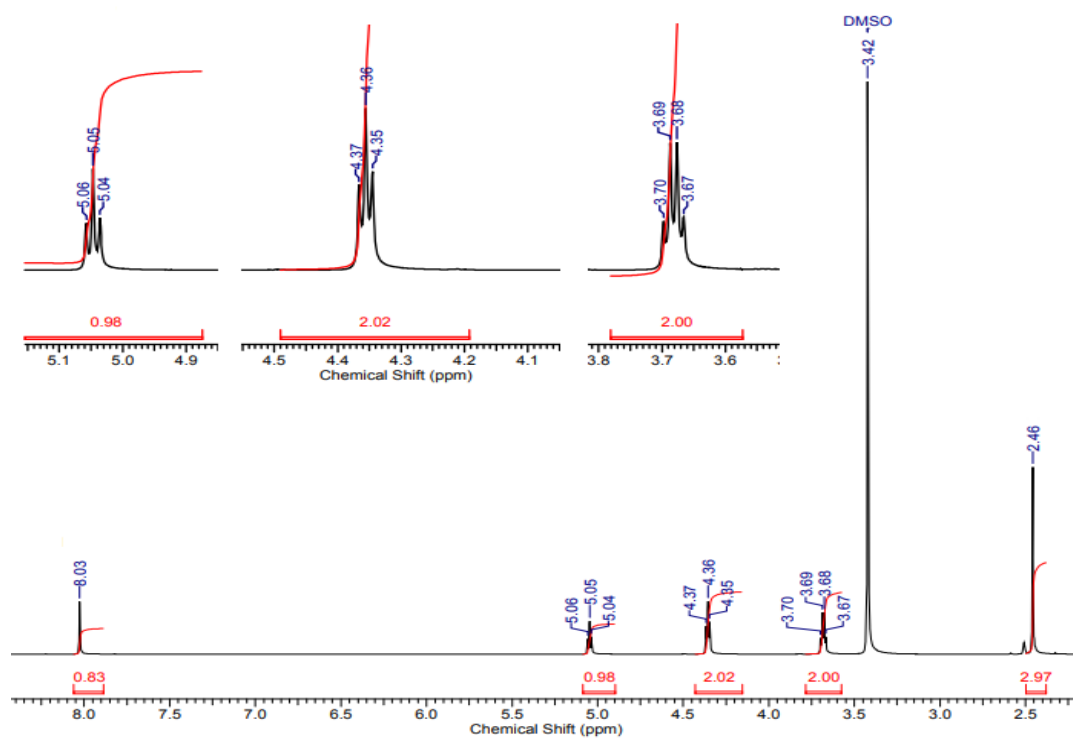


Figura S7. ^1H -NMR de 3 em DMSO- d_6 .

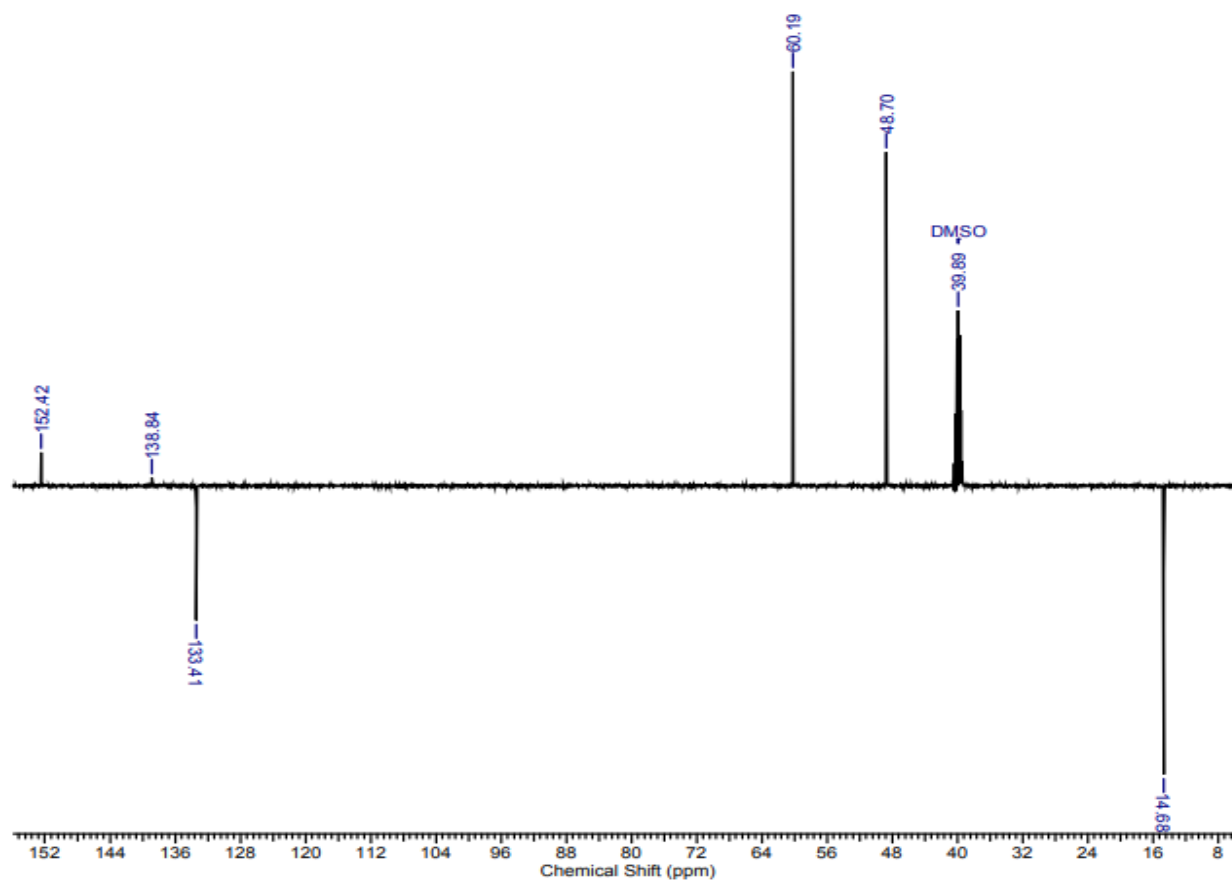


Figura S8. ^{13}C -NMR DEPT-135 de 3 em DMSO- d_6 .

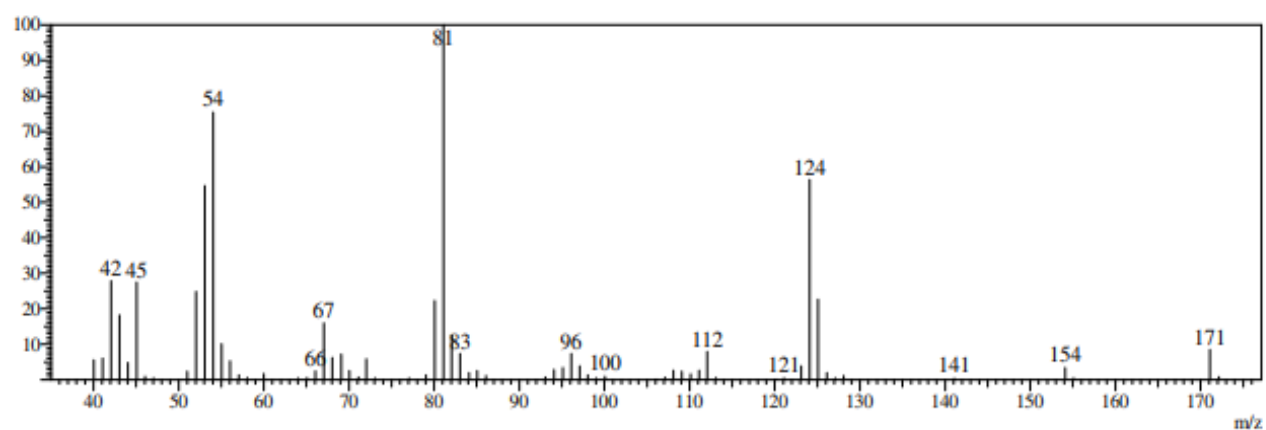


Figura S9. CG-MS de **3**.

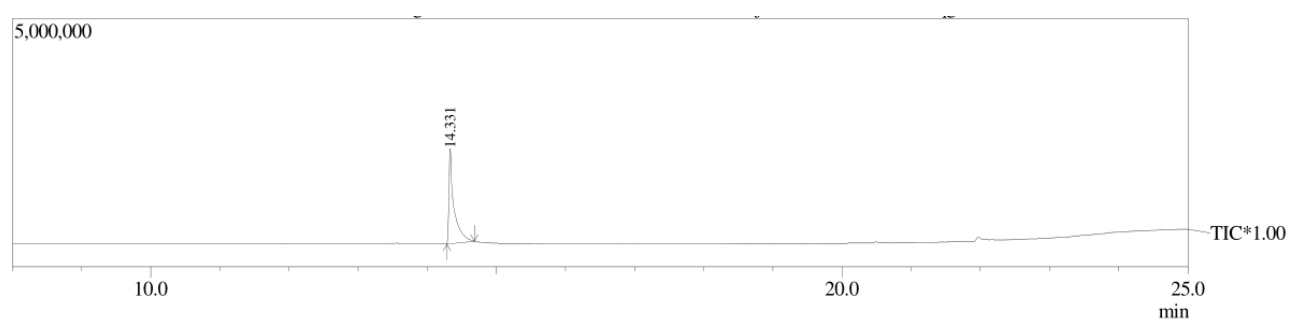
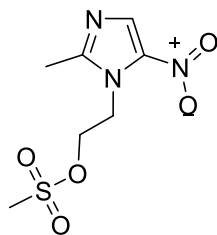


Figura S10. Cromatograma de **3**.



2-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethyl methanesulfonate

Chemical Formula: $C_7H_{11}N_3O_5S$

Exact Mass: 249,04

Molecular Weight: 249,24

Elemental Analysis: C, 33.73; H, 4.45; N, 16.86; O, 32.10; S, 12.86

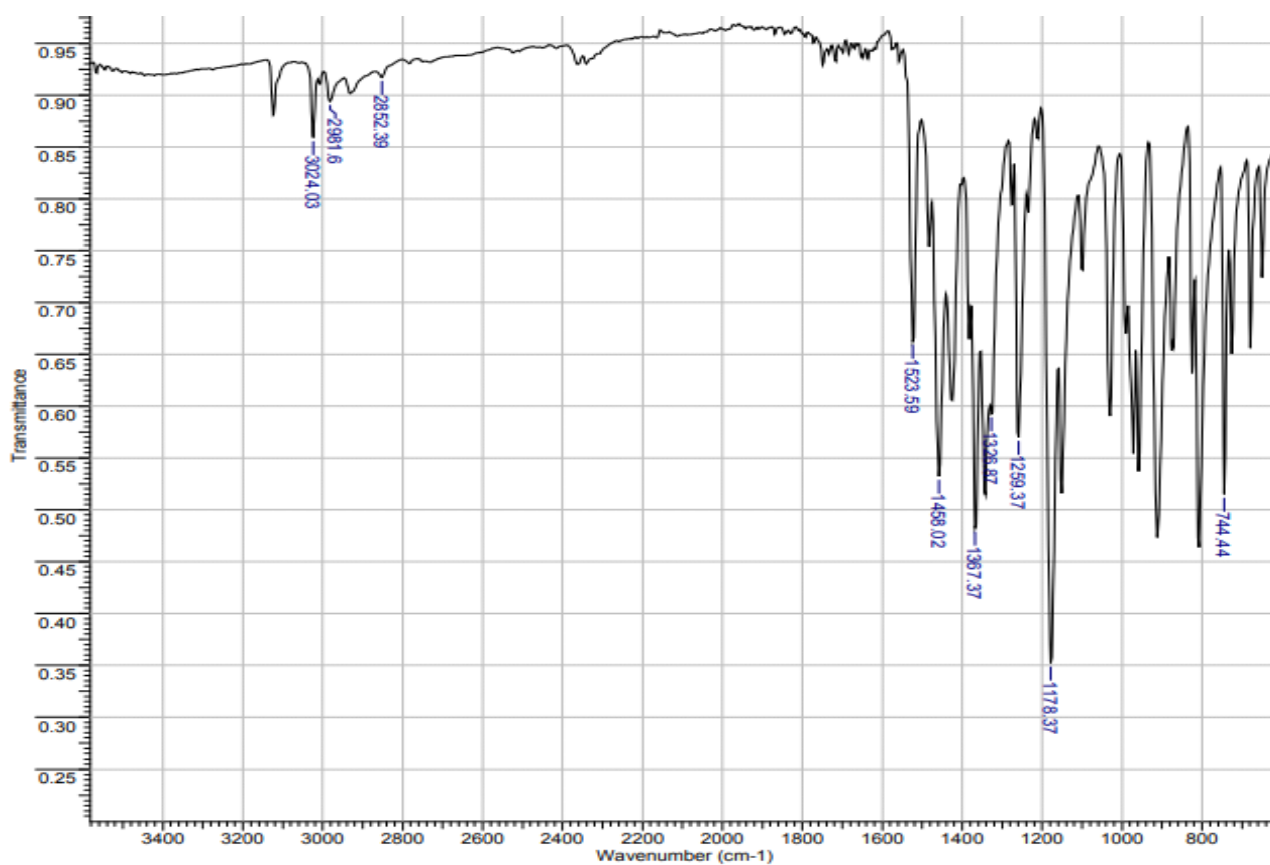


Figura S11. FT-IR de 4.

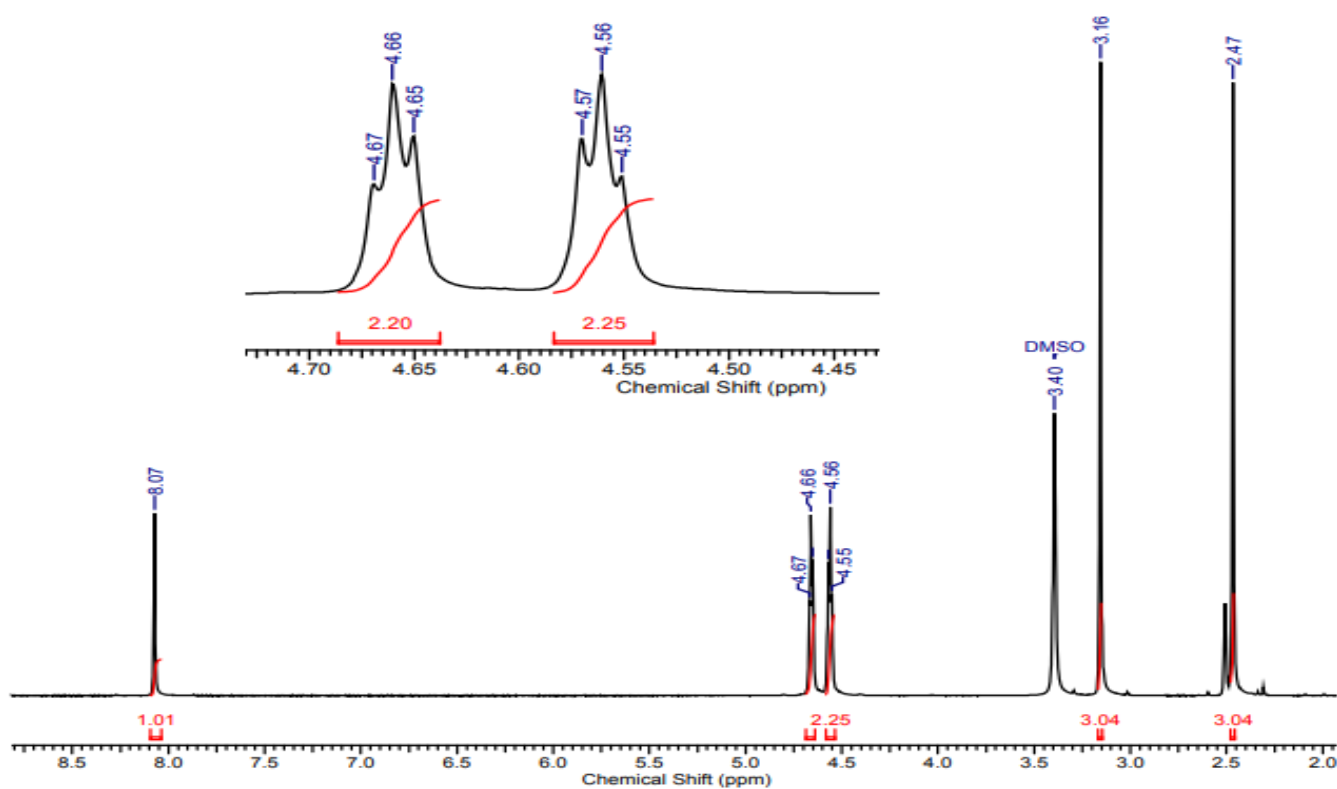


Figura S12. ¹H-NMR de 4 em DMSO-d₆.

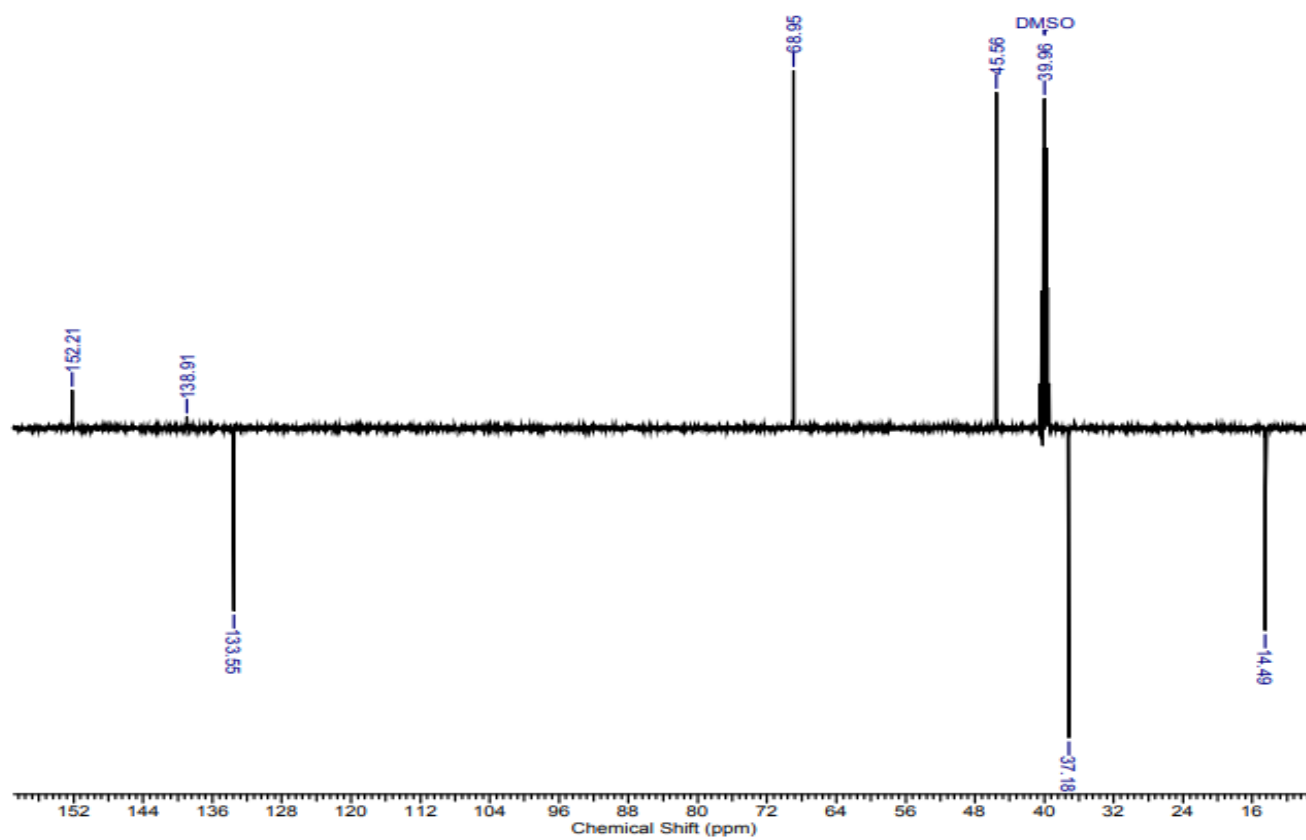


Figura S13. ¹³C-NMR DEPT-135 de 4 em DMSO-d₆.

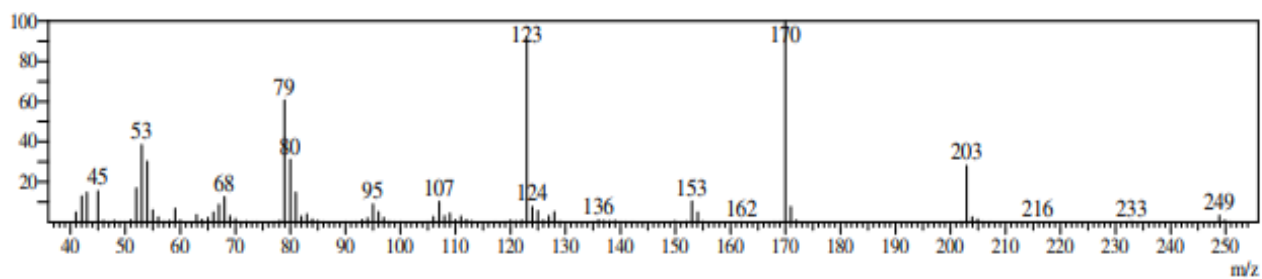


Figura S14. CG-MS de **4**.

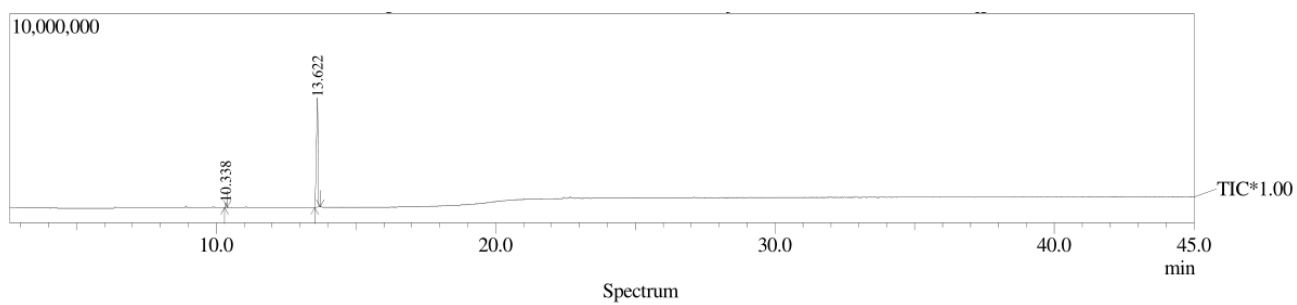
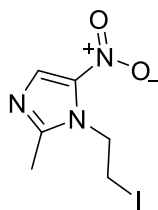


Figura S15. Cromatograma de **4**.



1-(2-iodoethyl)-2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazole

Chemical Formula: C₆H₈IN₃O₂

Exact Mass: 280,97

Molecular Weight: 281,05

Elemental Analysis: C, 25.64; H, 2.87; I, 45.15; N, 14.95; O, 11.39

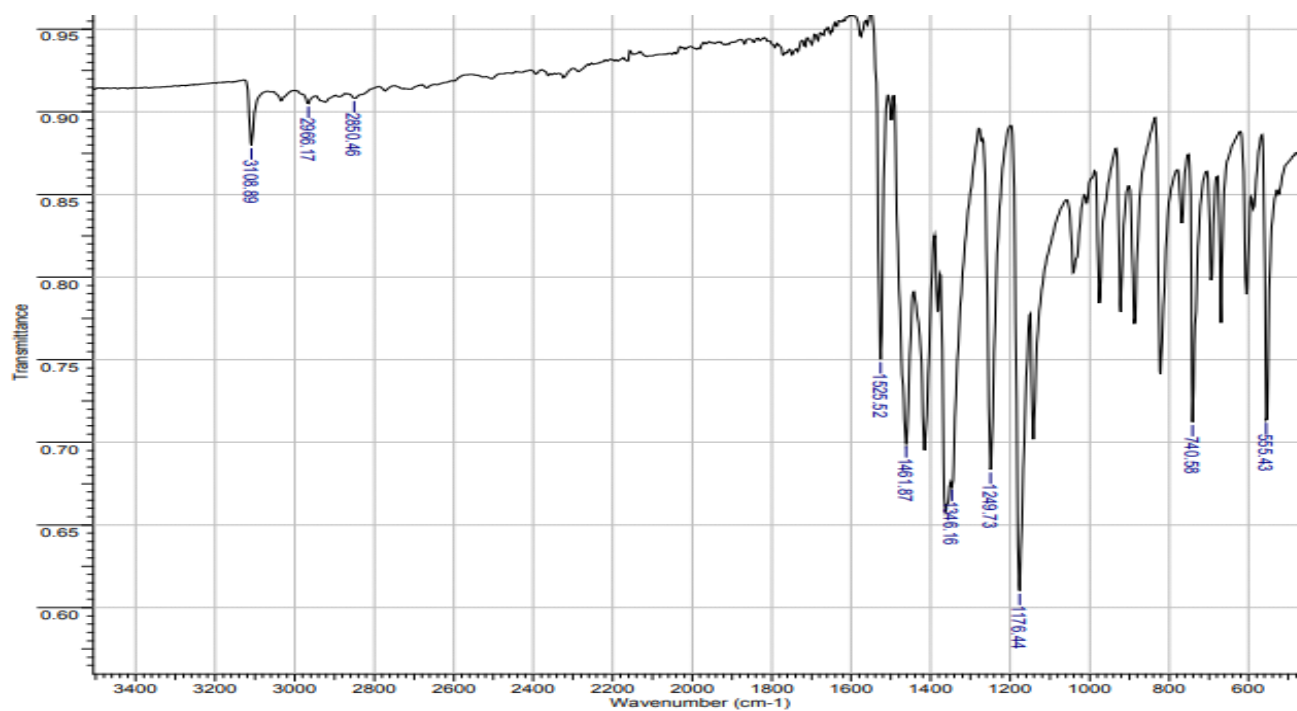


Figura S16. FT-IR de 5.

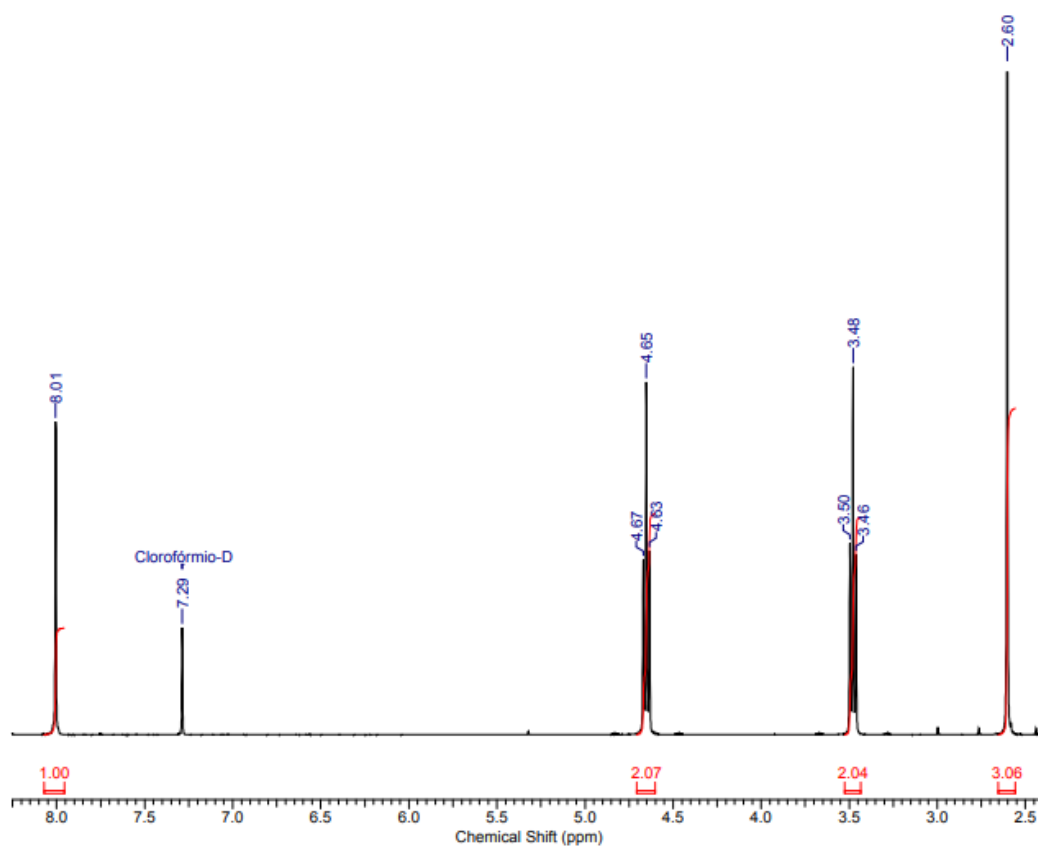


Figura S17. ¹H-NMR de **5** em CDCl₃.

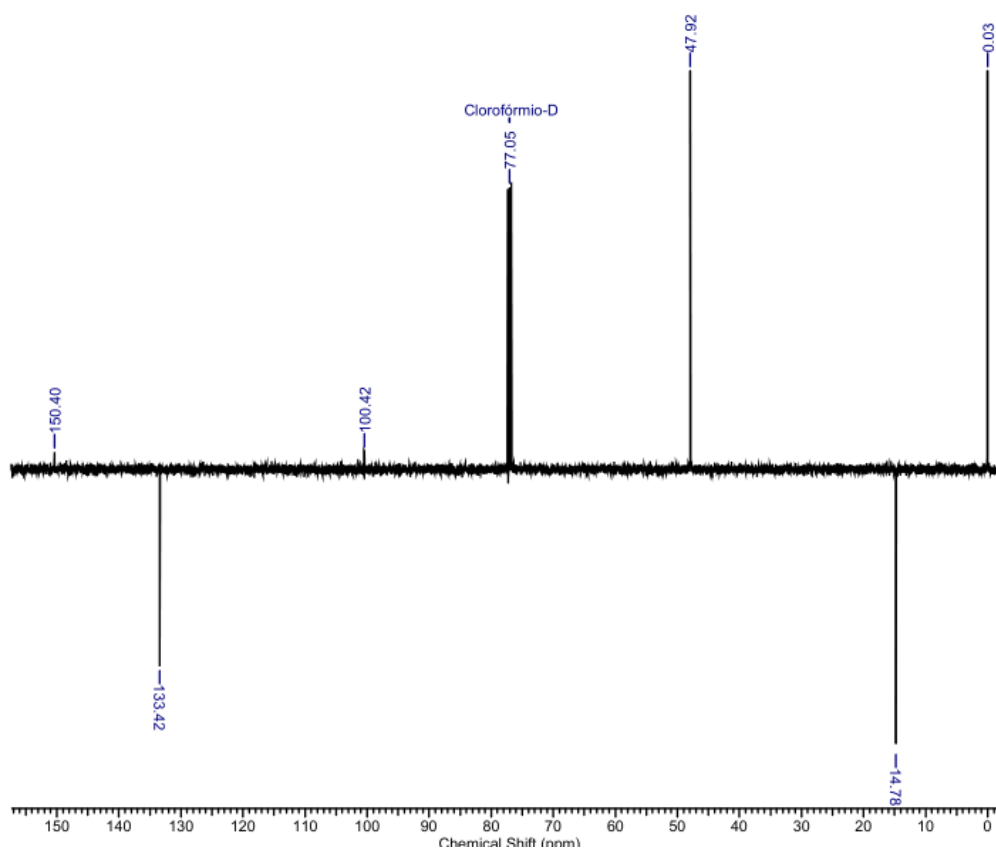


Figura S18. ¹³C-NMR DEPT-135 de **5** em CDCl₃.

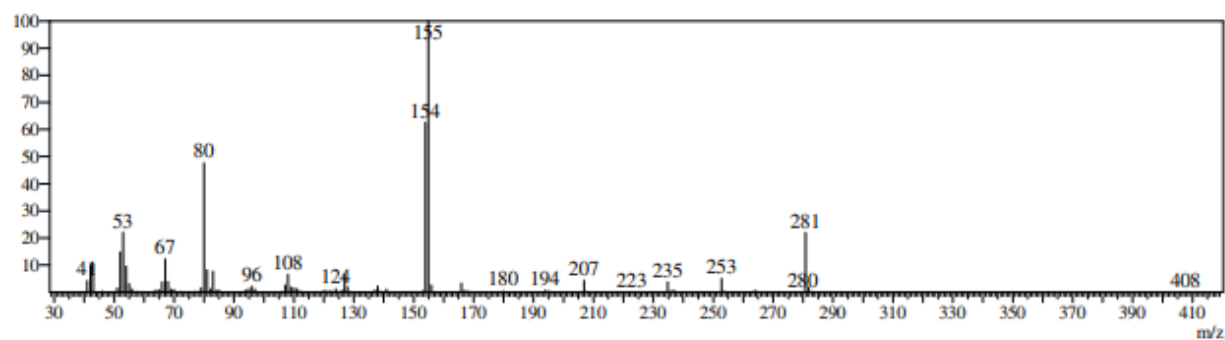


Figura S19. CG-MS de **5**.

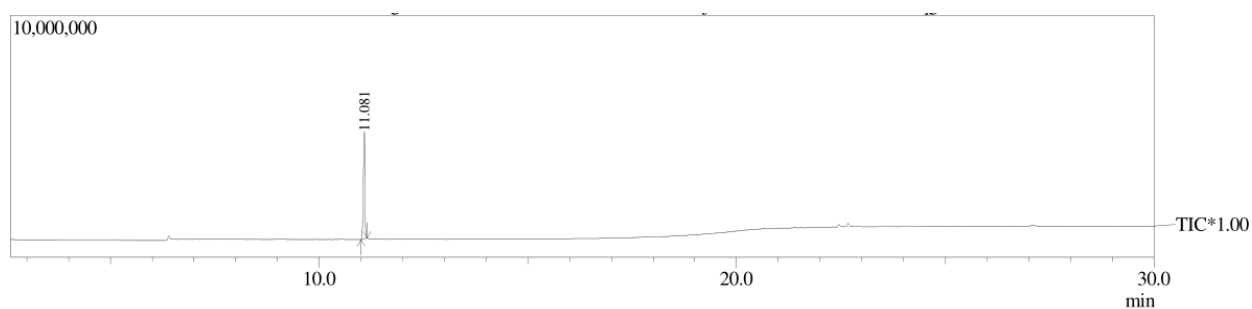
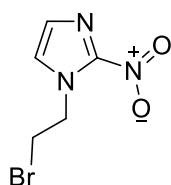


Figura S20. Cromatograma de **5**.



1-(2-bromoethyl)-2-nitro-1*H*-imidazole

Chemical Formula: $C_5H_6BrN_3O_2$

Exact Mass: 218,96

Molecular Weight: 220,03

Elemental Analysis: C, 27.29; H, 2.75; Br, 36.32; N, 19.10; O, 14.54

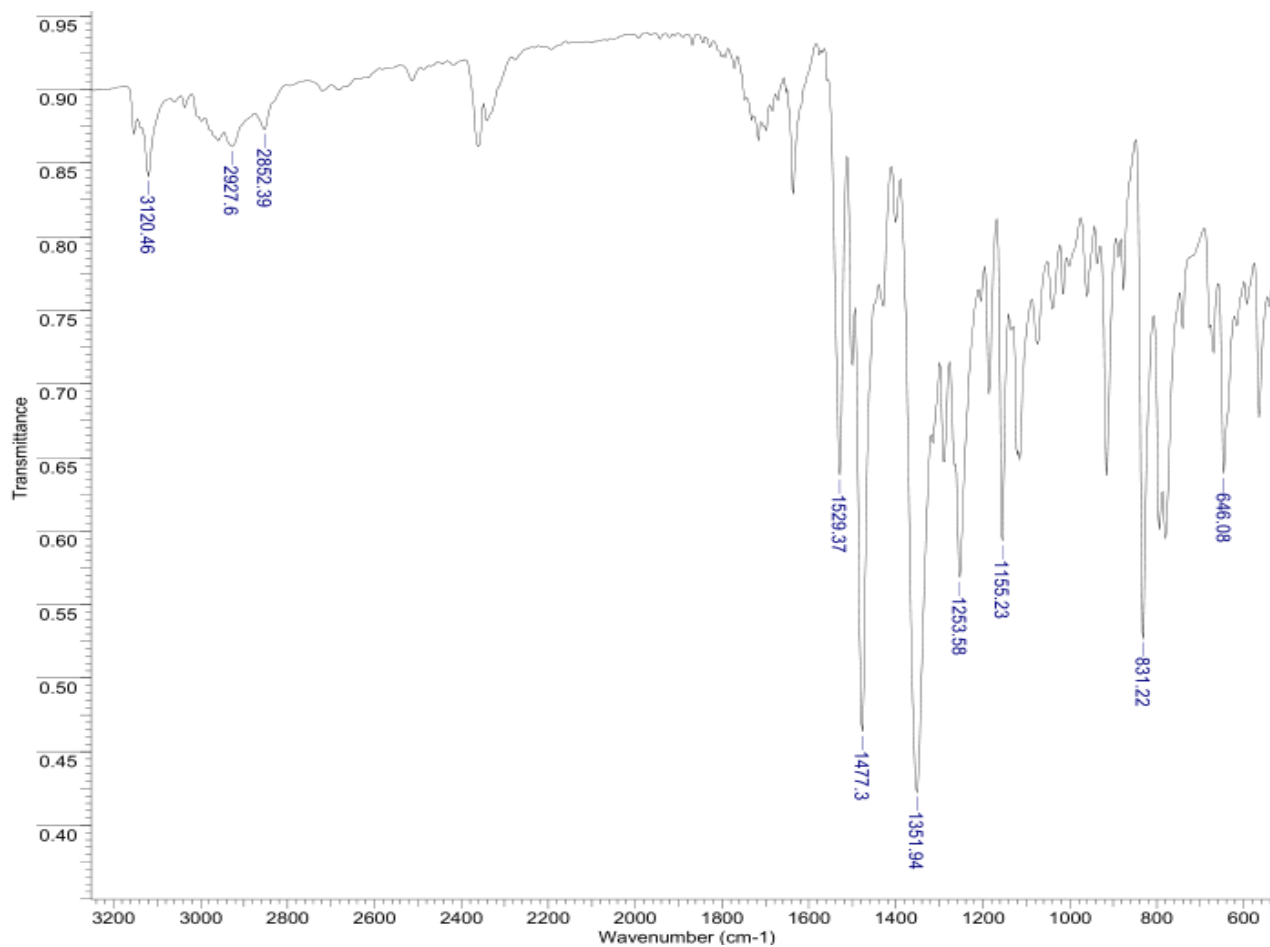


Figura S21. FT-IR de 6.

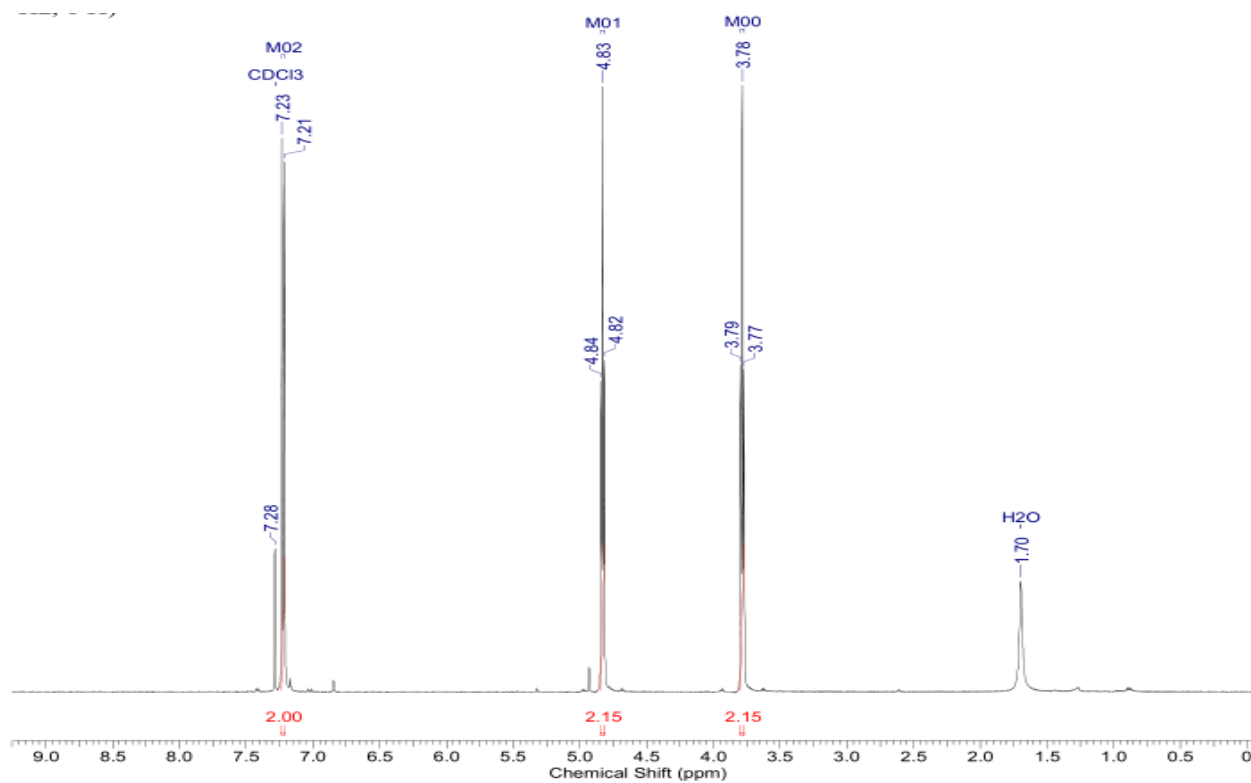


Figura S22. ¹H-NMR de **6** em CDCl₃.

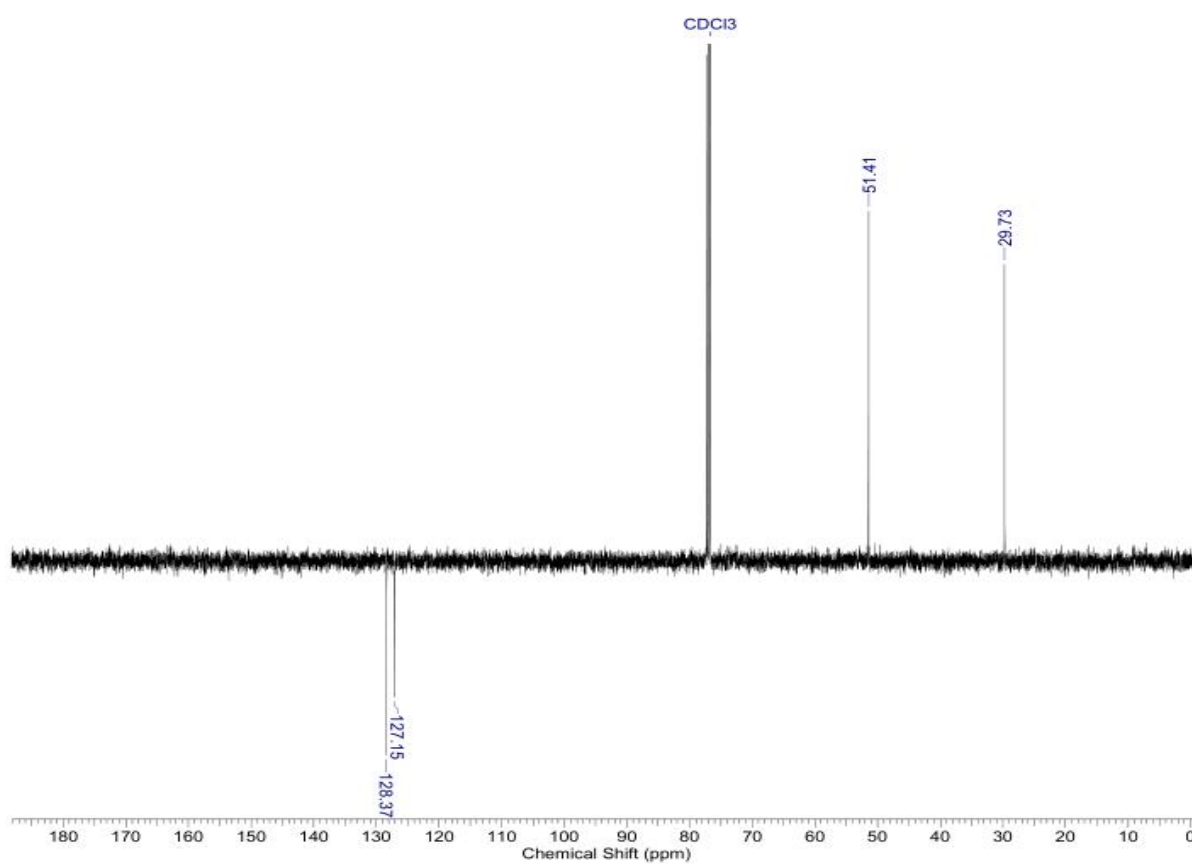


Figura S23. ¹³C-NMR DEPT-135 de **6** em CDCl₃.

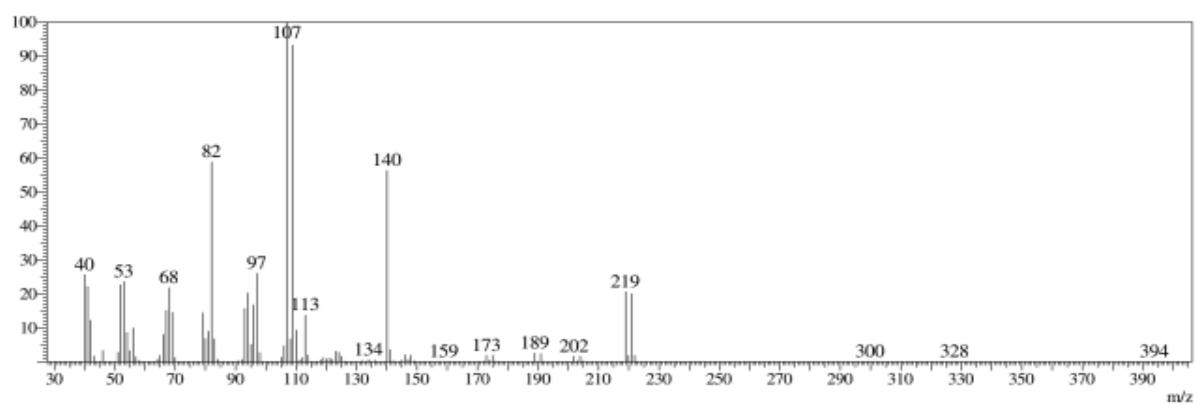


Figura S24. CG-MS de **6**.

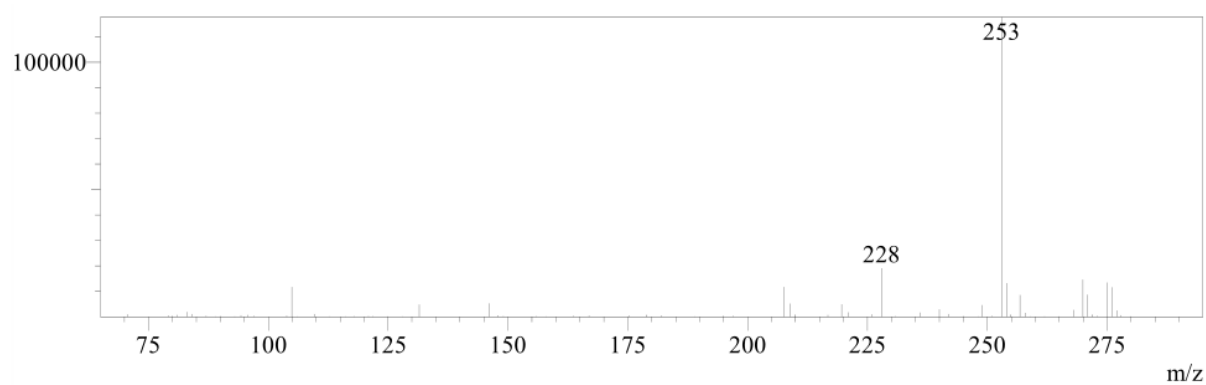


Figura S25. LRMS de **6**.

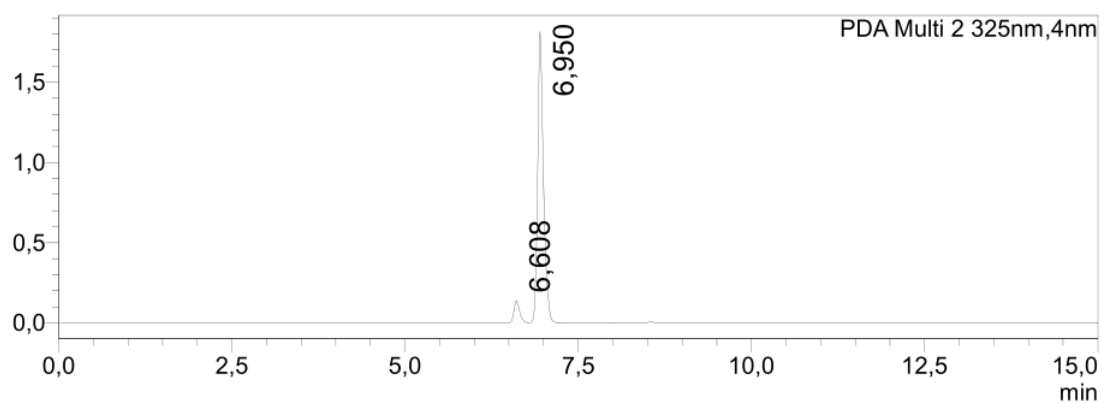
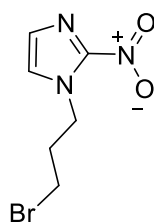


Figura S26. Cromatograma de CLAE de **6**.



1-(3-bromopropyl)-2-nitro-1*H*-imidazole

Chemical Formula: $C_6H_8BrN_3O_2$

Exact Mass: 232,98

Molecular Weight: 234,05

Elemental Analysis: C, 30.79; H, 3.45; Br, 34.14; N, 17.95; O, 13.67

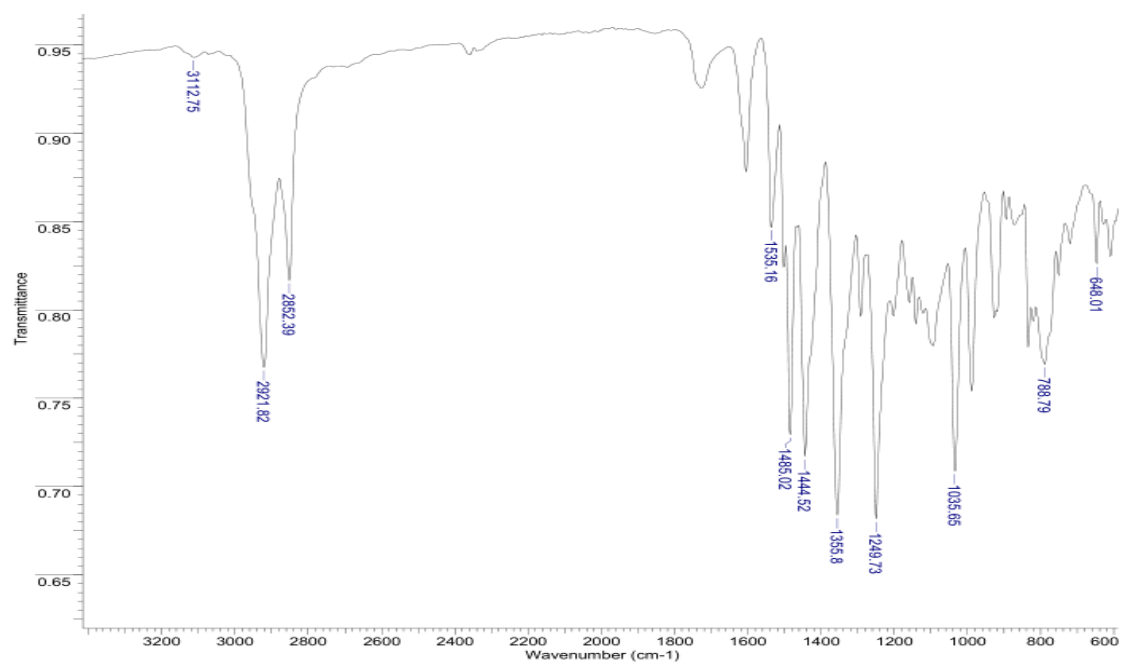


Figura S27. FT-IR de 7.

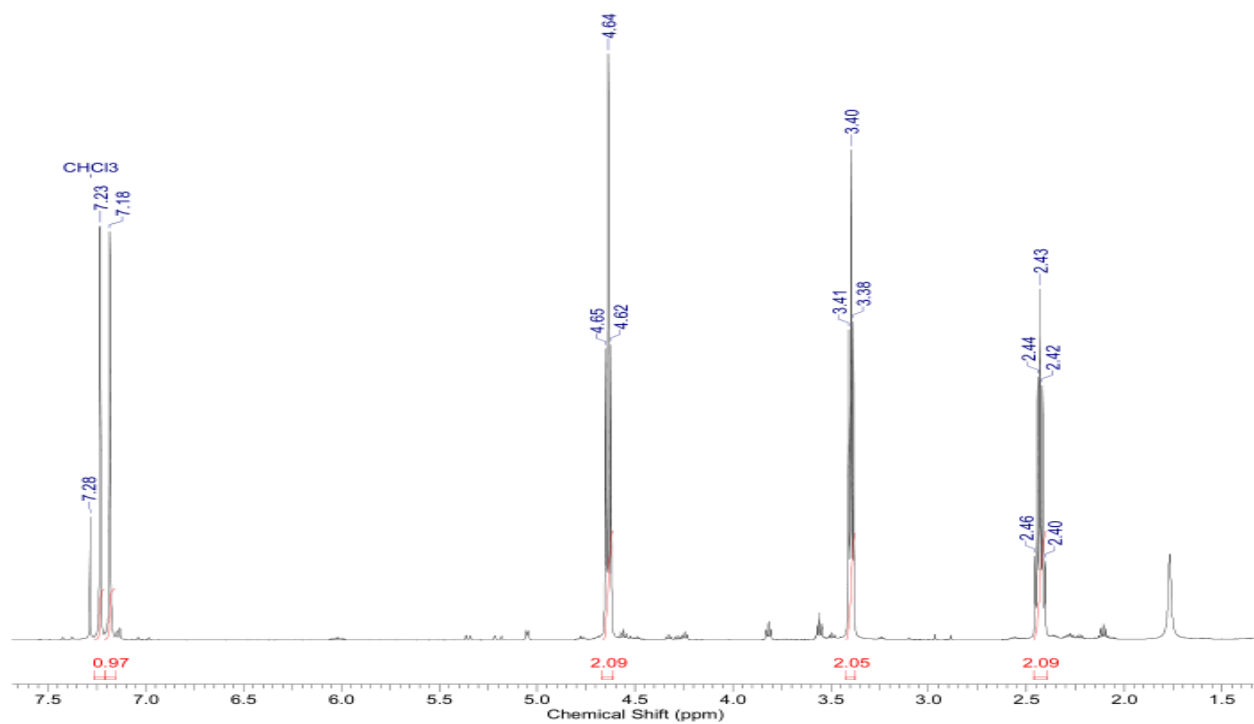


Figura S28. $^1\text{H-NMR}$ de **7** em CDCl_3 .

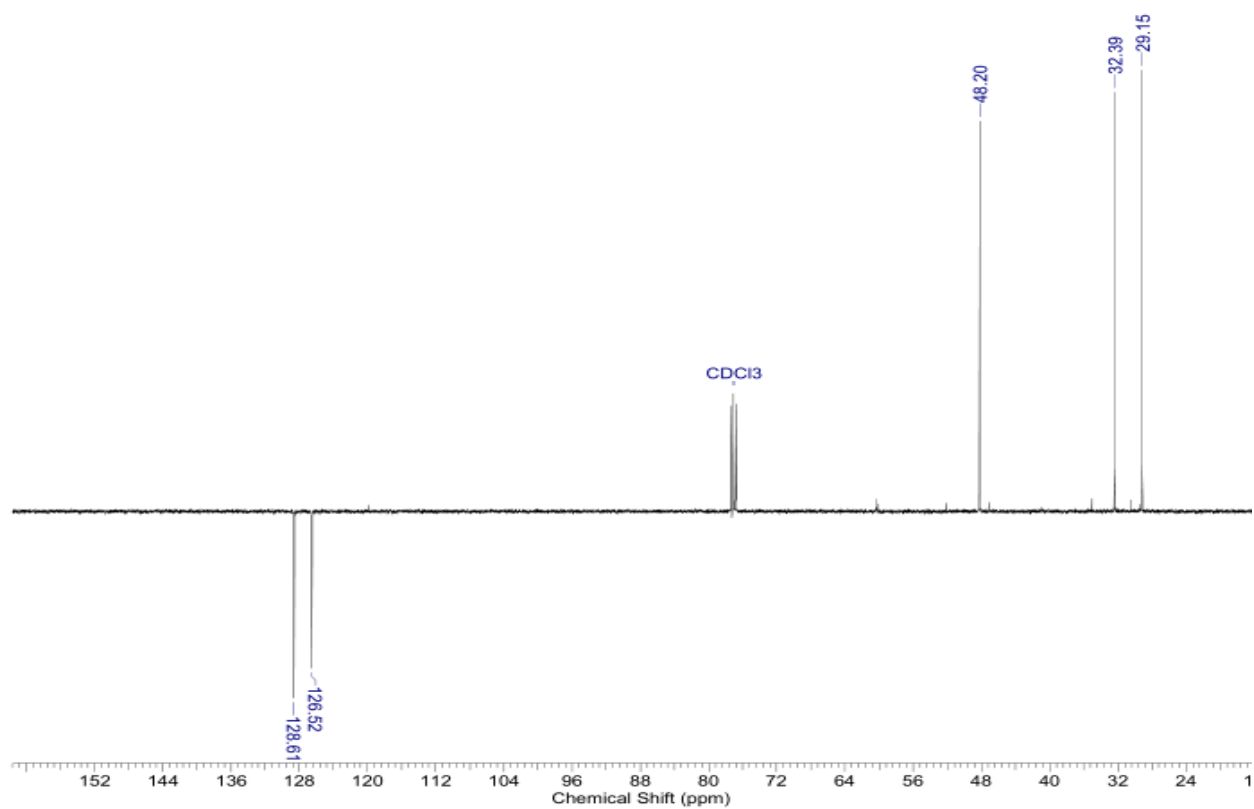


Figura S29. $^{13}\text{C-NMR}$ DEPT-135 de **7** em CDCl_3 .

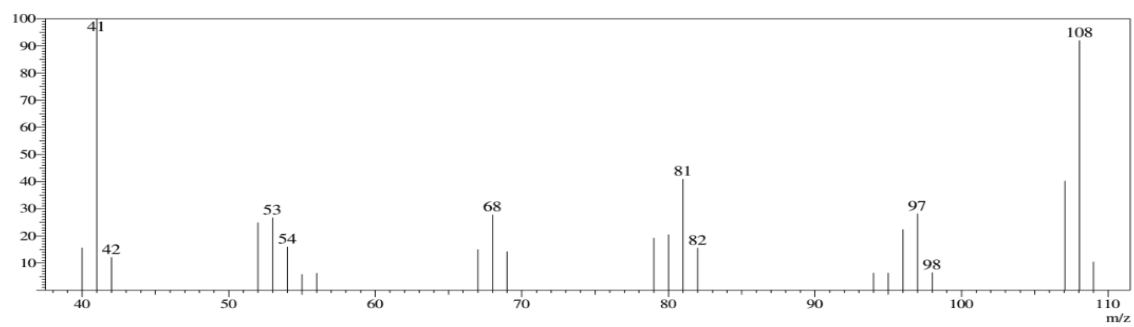


Figura S30. CG-MS de 7.

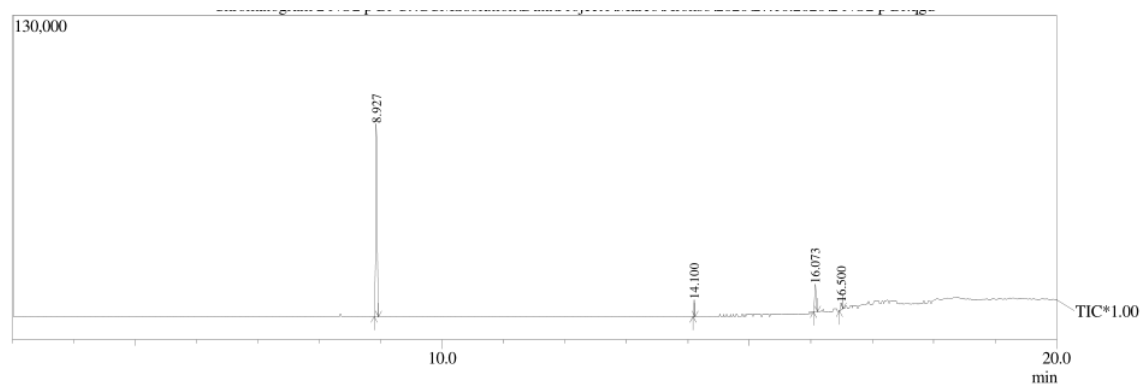
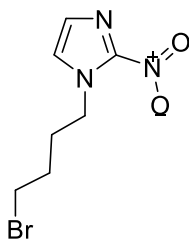


Figura S31. CG Cromatograma de 7.



1-(4-bromobutyl)-2-nitro-1*H*-imidazole

Chemical Formula: $C_7H_{10}BrN_3O_2$

Exact Mass: 247,00

Molecular Weight: 248,08

Elemental Analysis: C, 33.89; H, 4.06; Br, 32.21; N, 16.94; O, 12.90

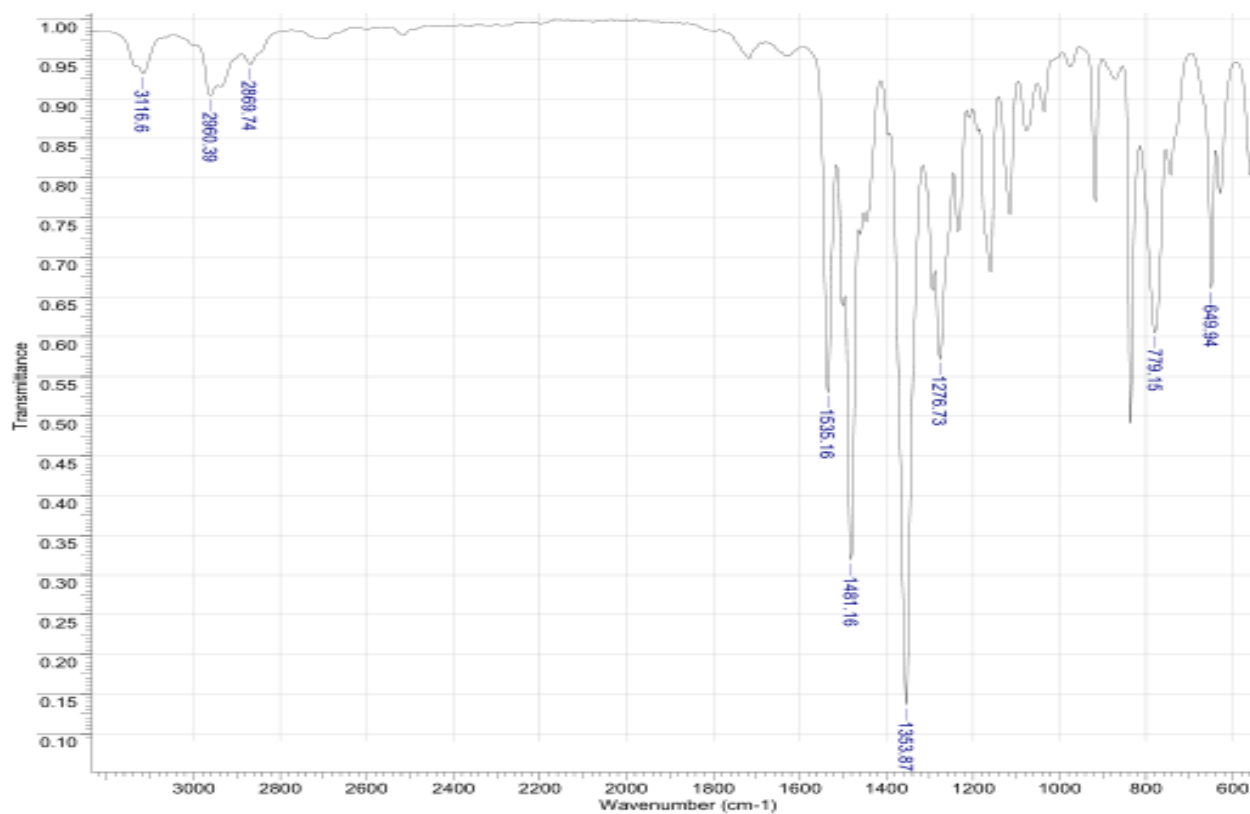


Figura S32. FT-IR de 8.

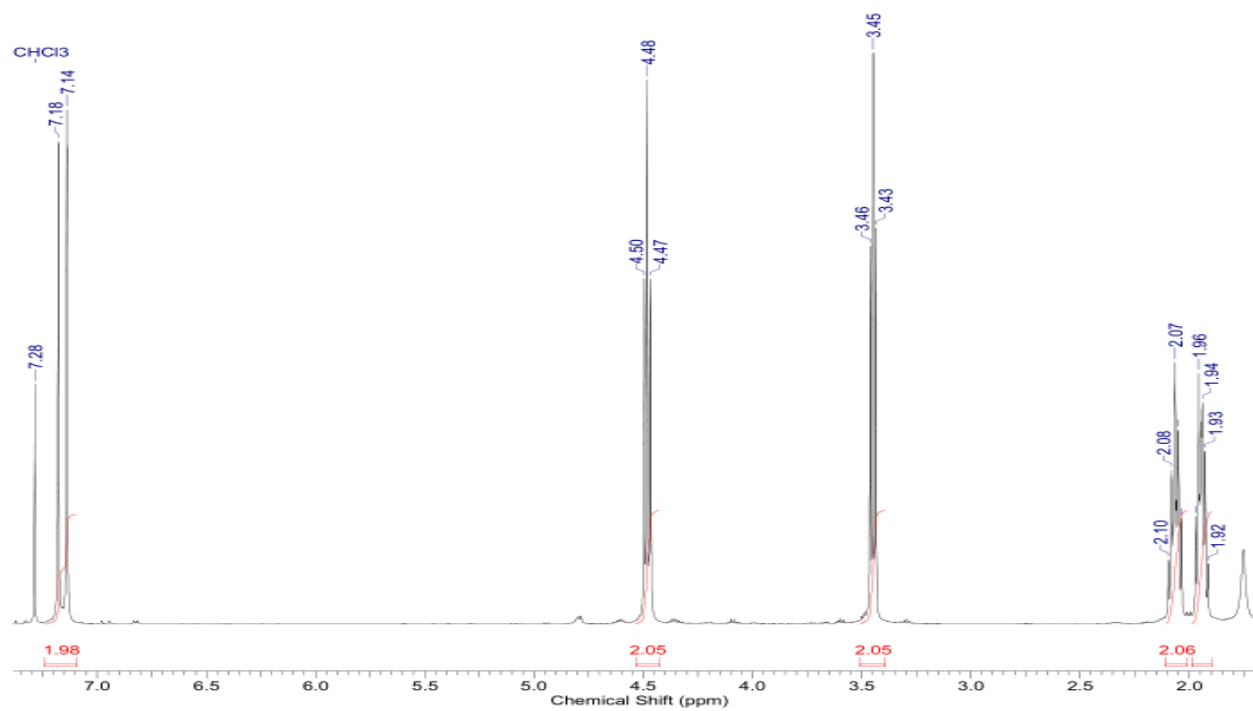


Figura S33. ¹H-NMR de **8** em CDCl₃.

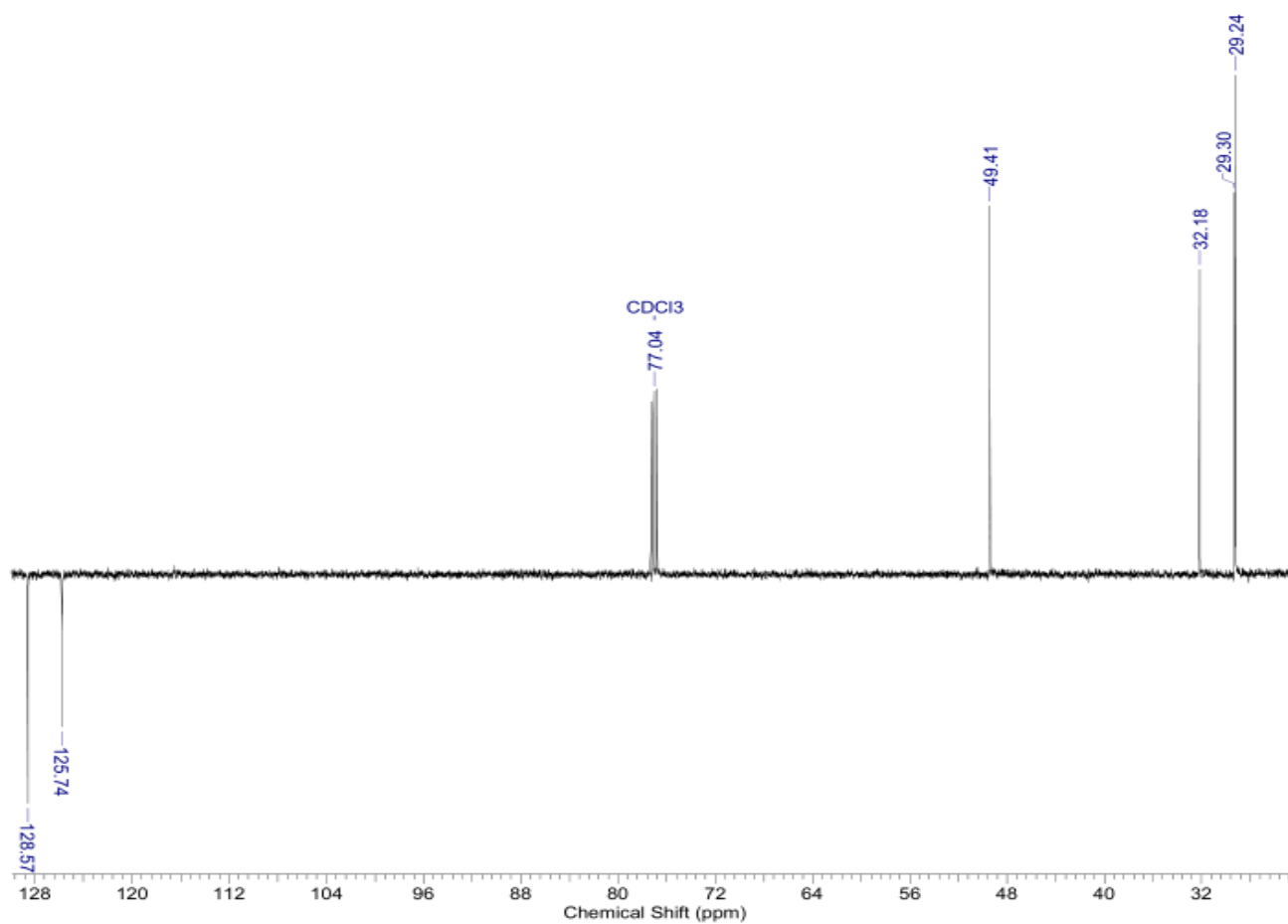


Figura S34. ¹³C-NMR DEPT-135 de **8** em CDCl₃.

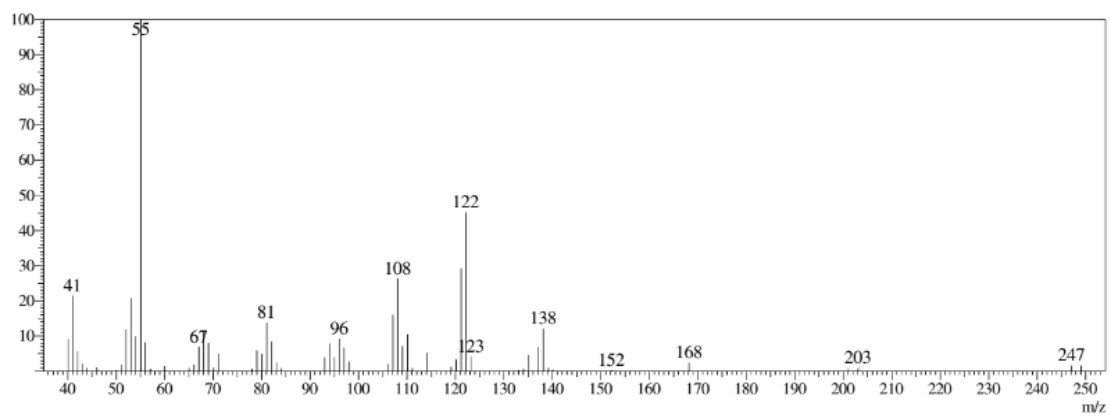


Figura S35. CG-MS de **8**.

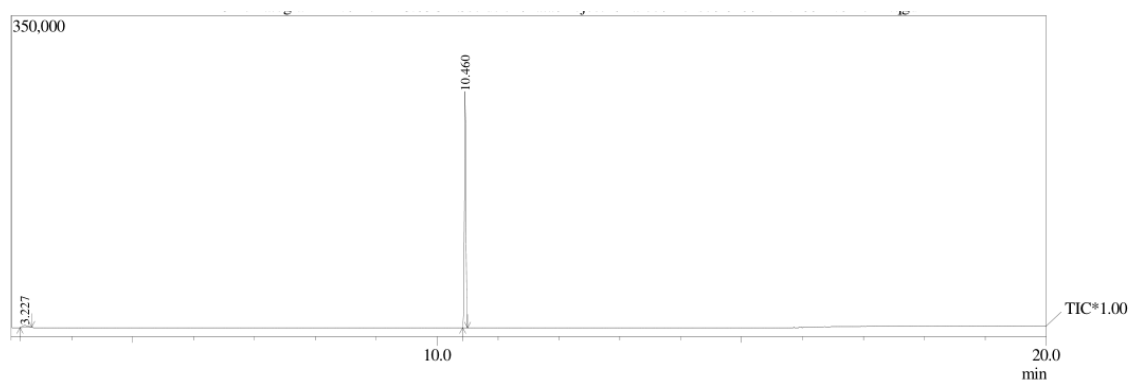
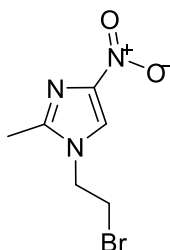


Figura S36. CG Cromatograma de **8**



1-(2-bromoethyl)-2-methyl-4-nitro-1*H*-imidazole

Chemical Formula: $C_6H_8BrN_3O_2$

Exact Mass: 232,98

Molecular Weight: 234,05

Elemental Analysis: C, 30.79; H, 3.45; Br, 34.14; N, 17.95; O, 13.67

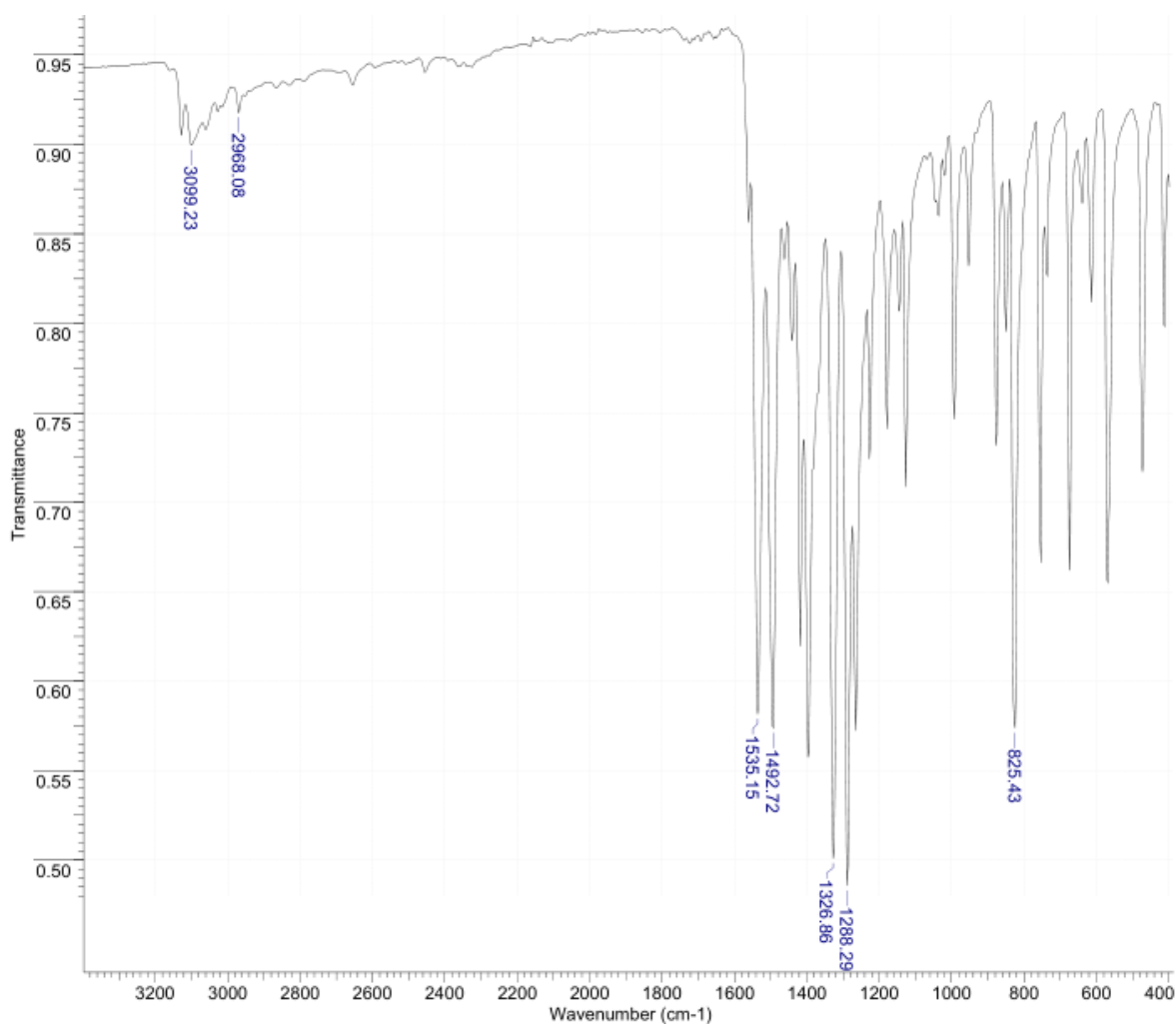


Figura S37. FT-IR de **9**.

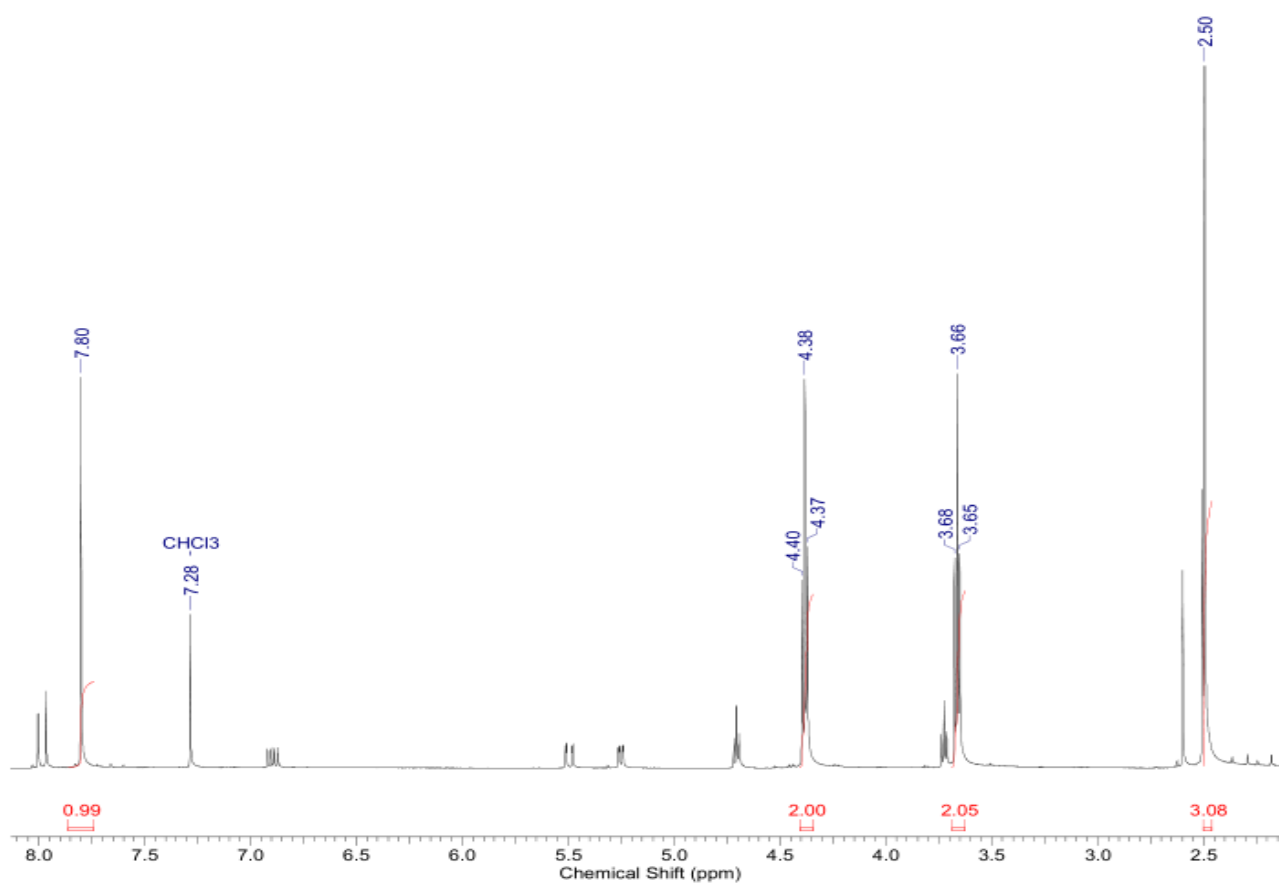


Figura S38. ¹H-NMR de **9** em CDCl₃.

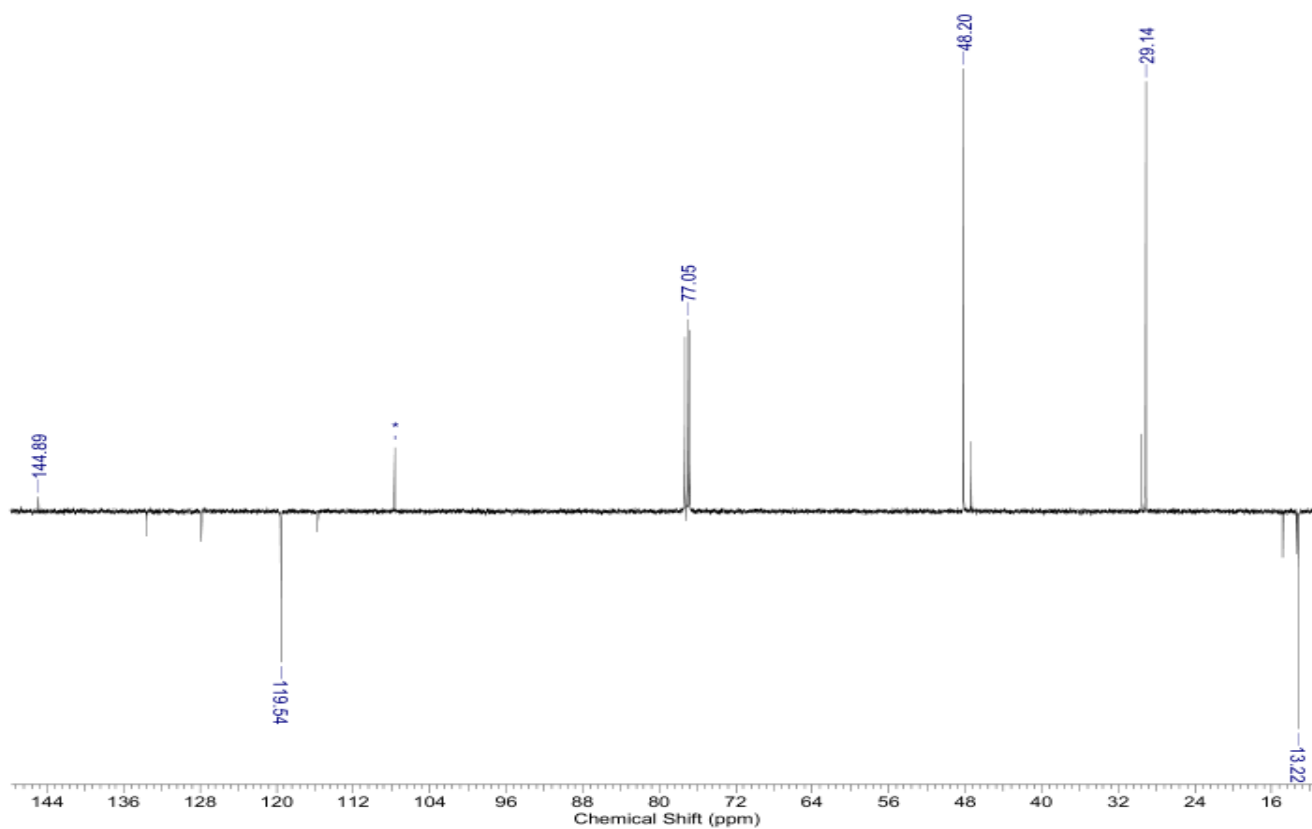


Figura S39. ¹³C-NMR DEPT-135 de **9** em CDCl₃.

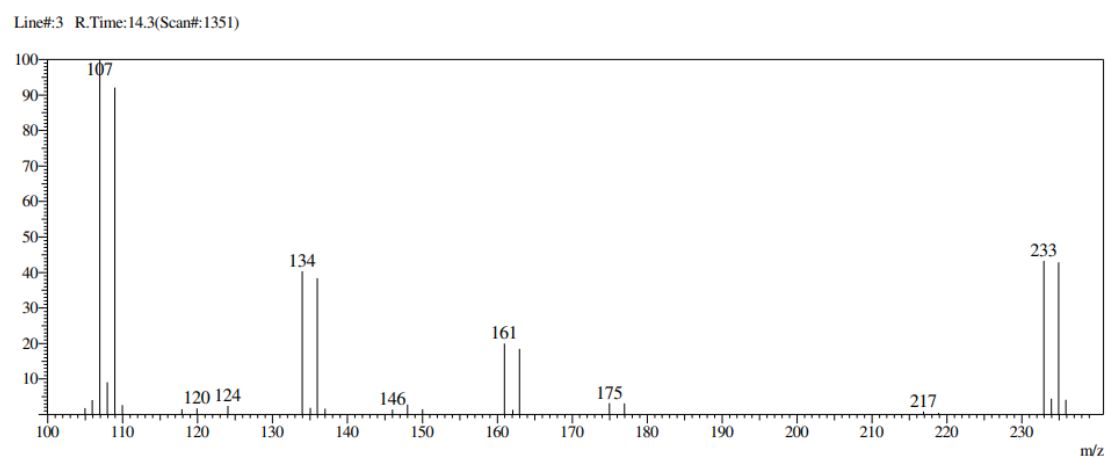


Figura S40. CG-MS de 9.

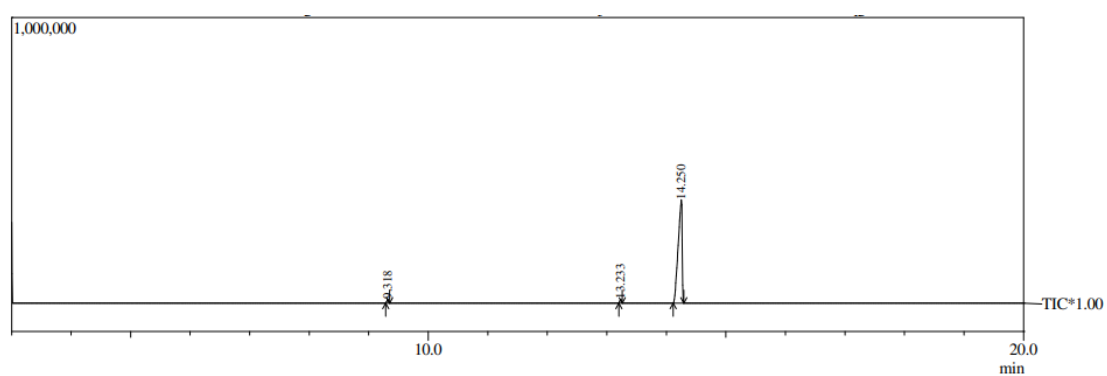
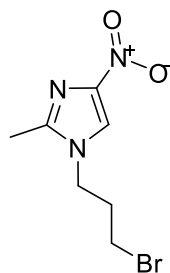


Figura S41. CG Cromatograma de 9.



1-(3-bromopropyl)-2-methyl-4-nitro-1*H*-imidazole

Chemical Formula: $C_7H_{10}BrN_3O_2$

Exact Mass: 247,00

Molecular Weight: 248,08

Elemental Analysis: C, 33.89; H, 4.06; Br, 32.21; N, 16.94; O, 12.90

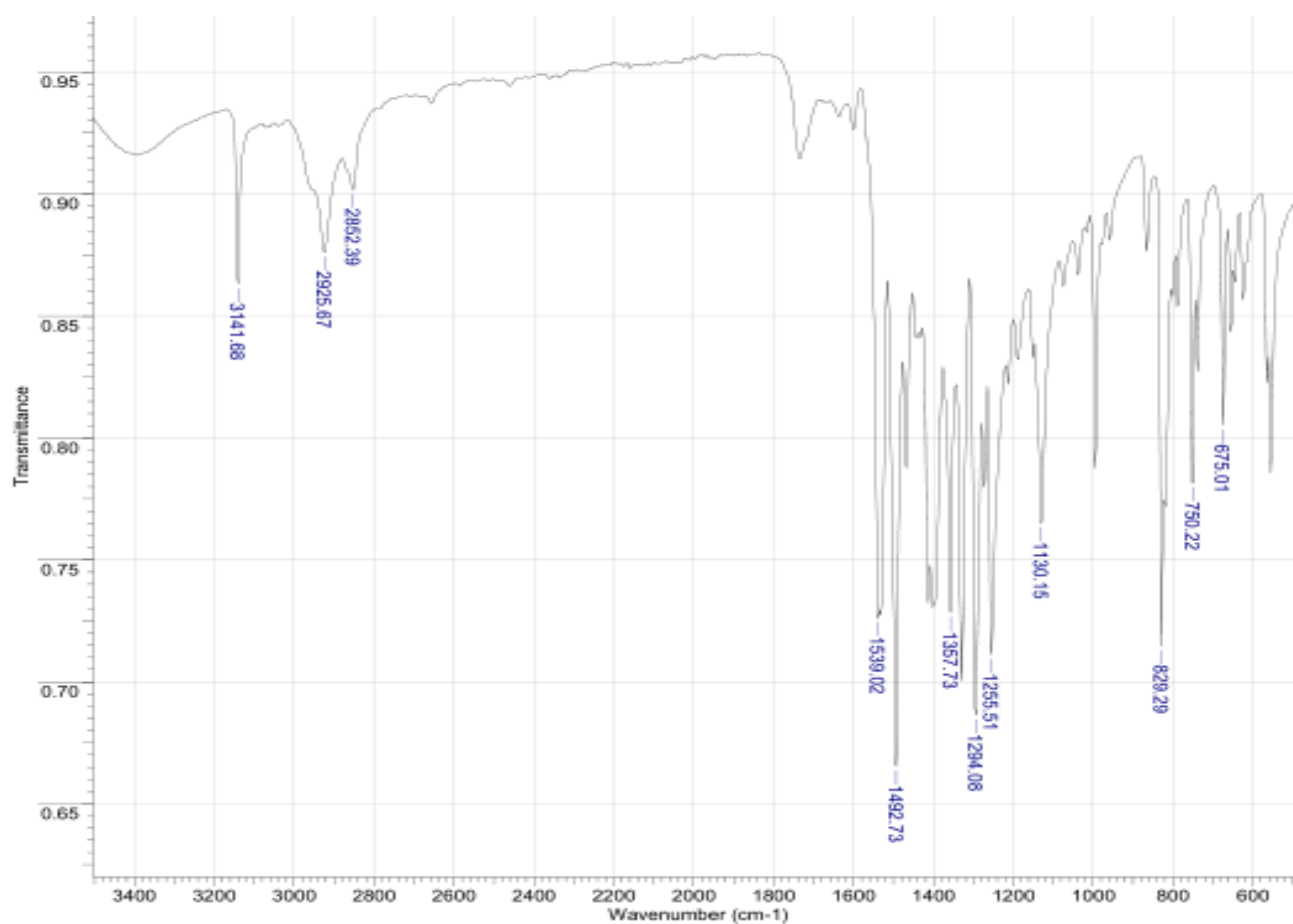


Figura S42. FT-IR de 10.

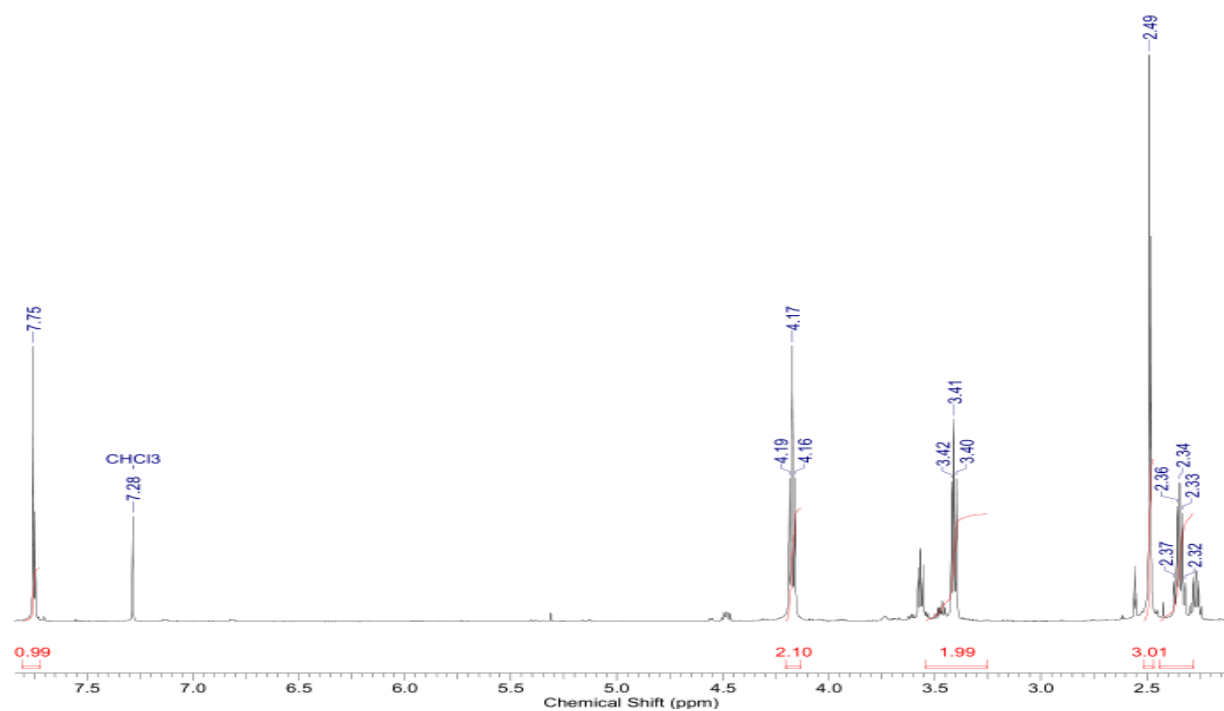


Figura S43. ¹H-NMR de **10** em CDCl₃.

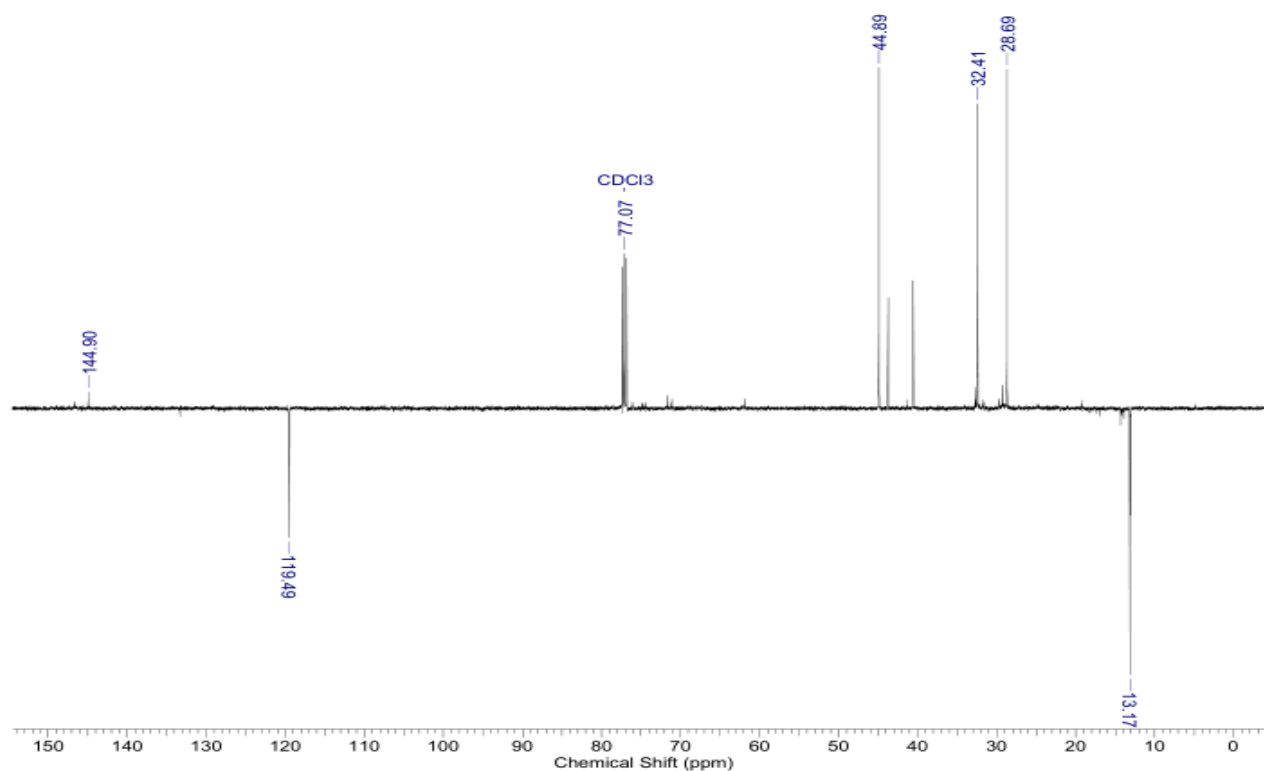
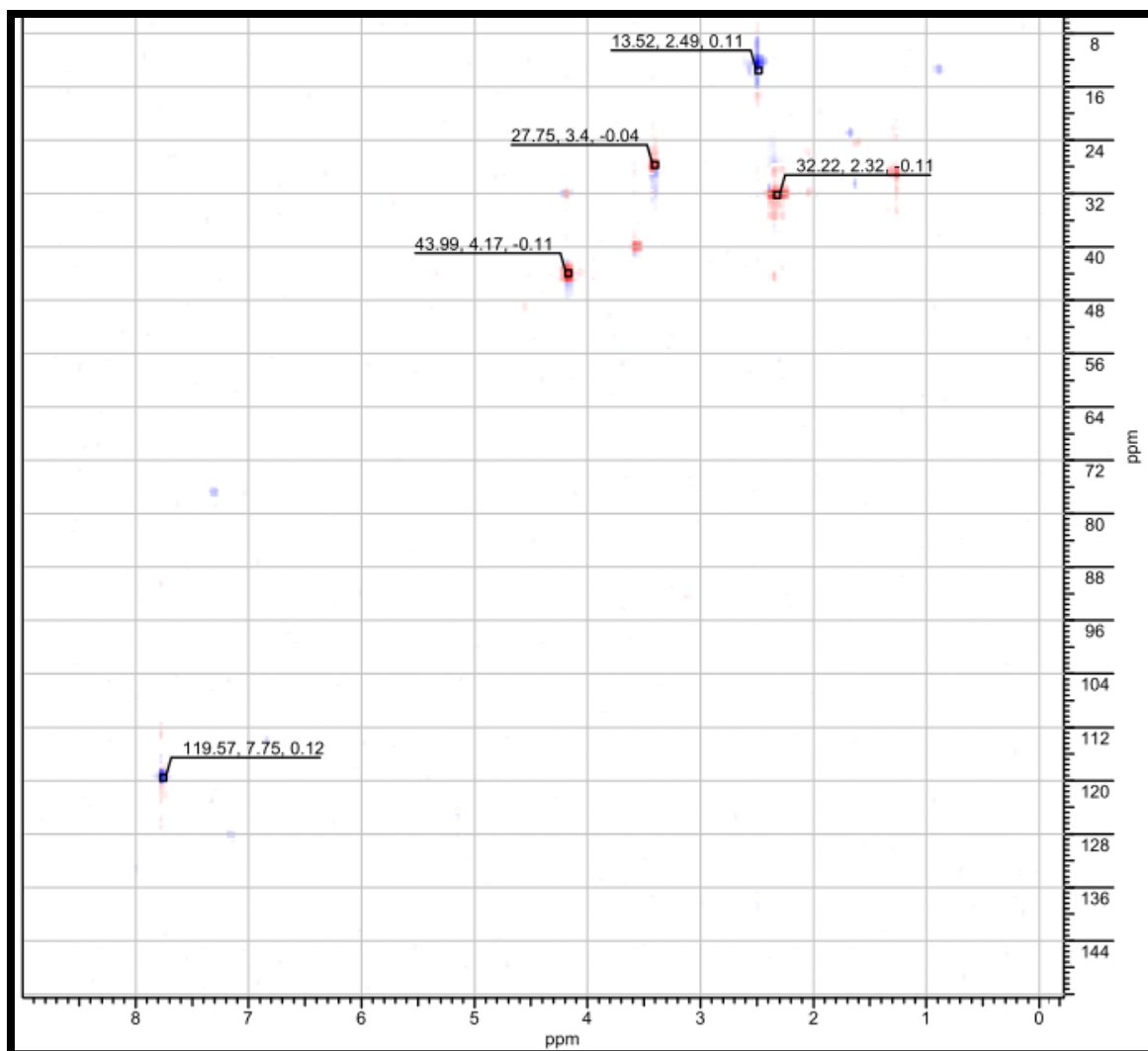
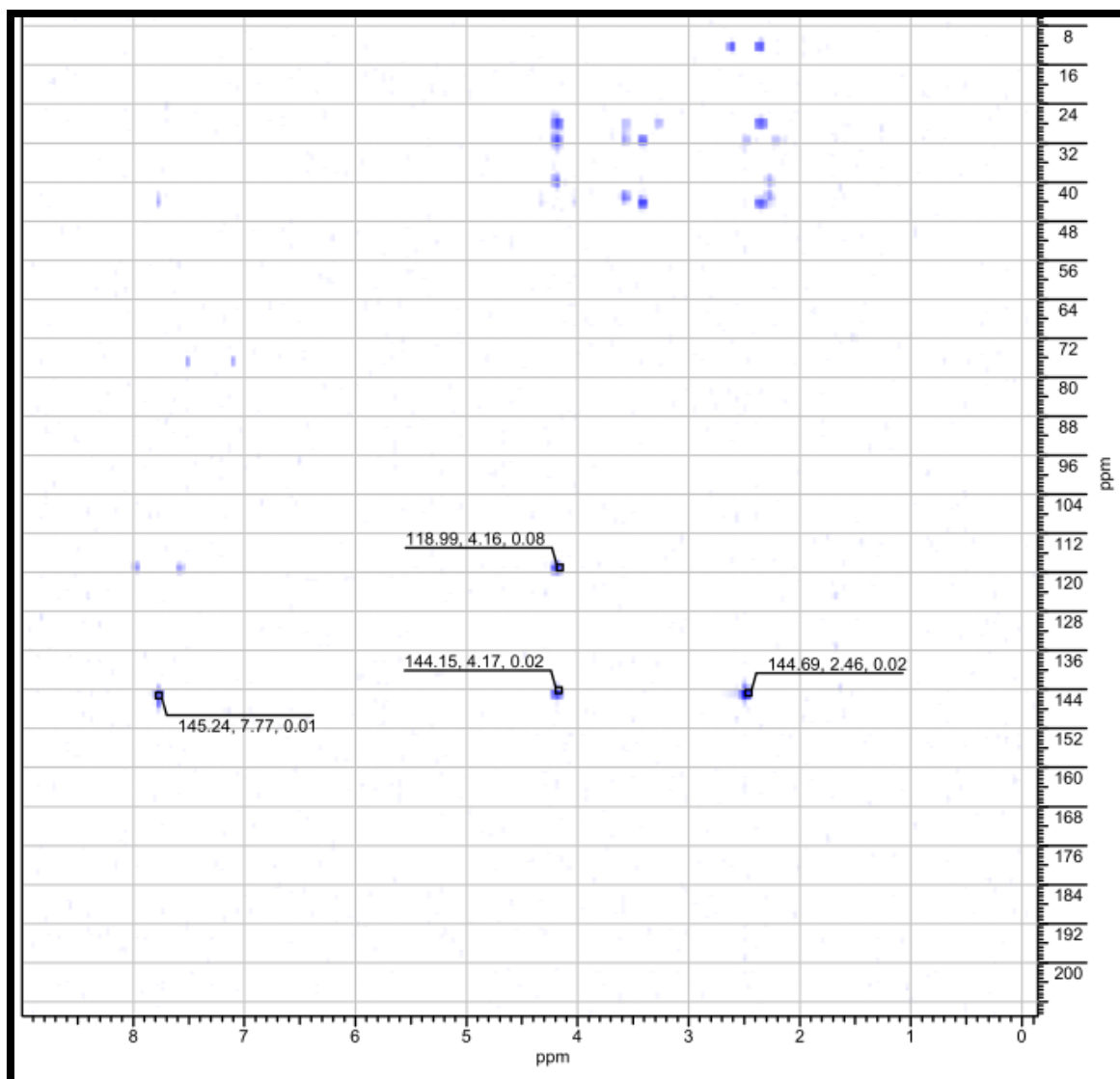


Figura S44. ¹³C-NMR DEPT-135 de **10** em CDCl₃.



Espectro 44.1. Espectro bidimensional de RMN ^1H , ^{13}C - HSQC (J 1) (500 MHz/125 MHz, CDCl_3) do 1-(3-bromopropil)-2-metil-4-nitro-1*H*-imidazol **10**.



Espectro 44.2. Espectro bidimensional de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC (J_2 , J_3) (500 MHz/125 MHz, CDCl_3) do 1-(3-bromopropil)-2-metil-4-nitro-1*H*-imidazol **10**.

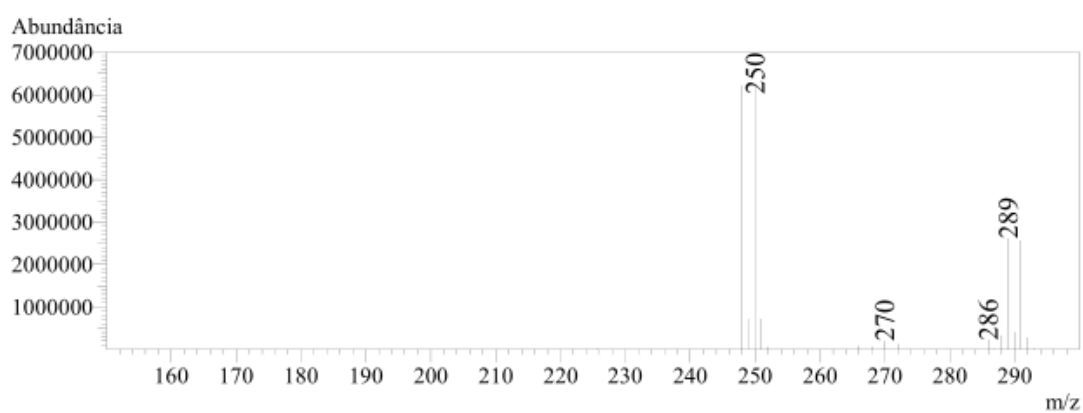


Figura S45. LRMS de **10**.

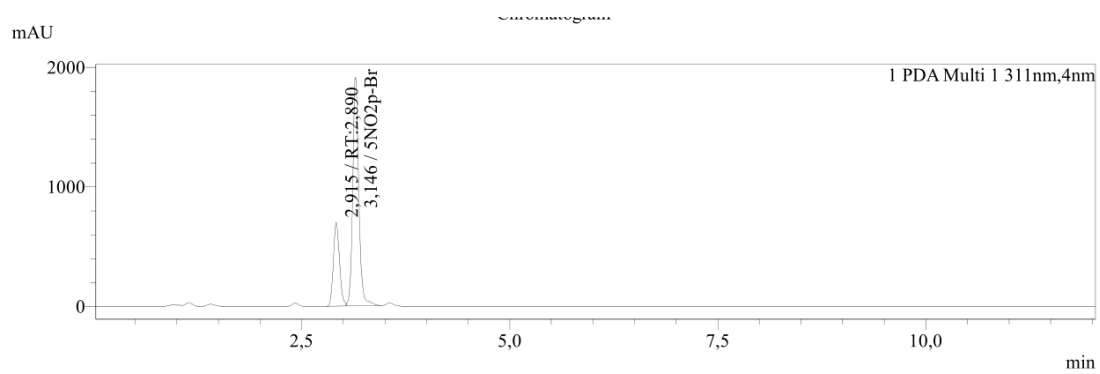
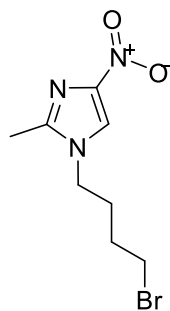


Figura S46. Cromatograma de CLAE de **10**.



1-(4-bromobutyl)-2-methyl-4-nitro-1*H*-imidazole

Chemical Formula: $C_8H_{12}BrN_3O_2$

Exact Mass: 261,01

Molecular Weight: 262,11

Elemental Analysis: C, 36.66; H, 4.61; Br, 30.49; N, 16.03; O, 12.21

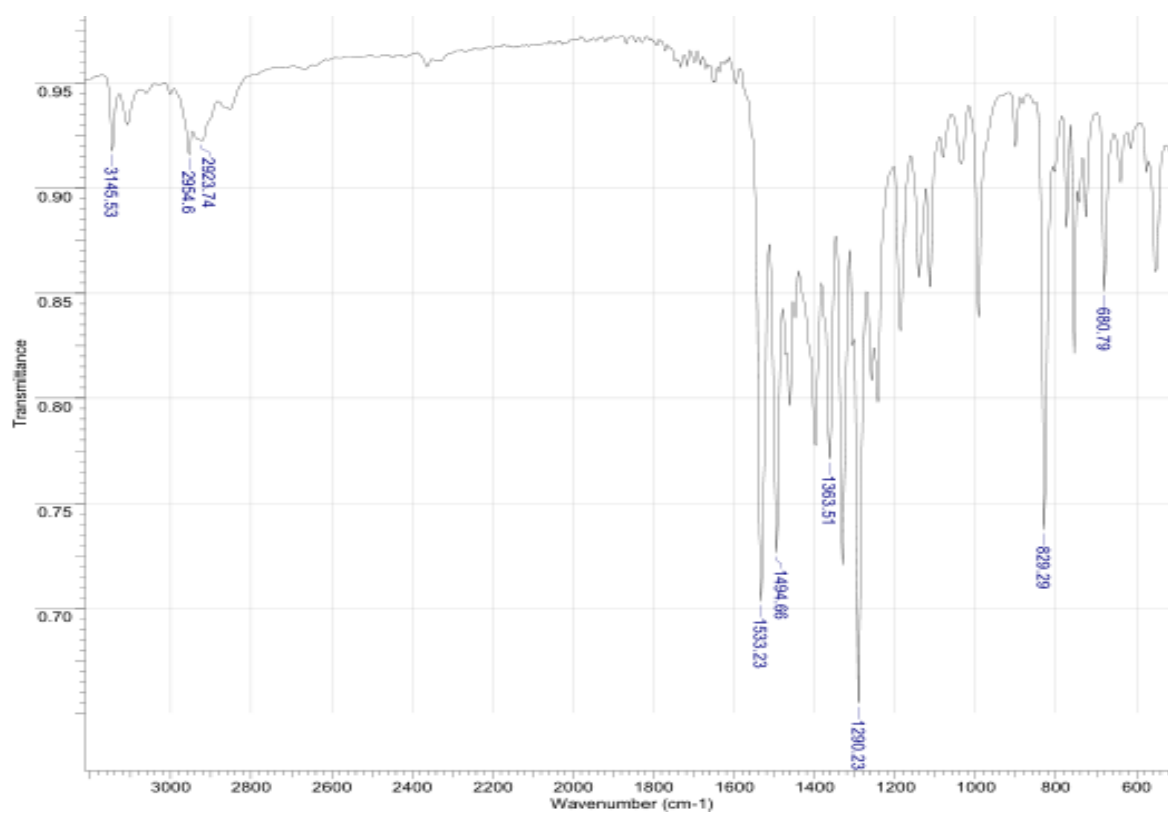


Figura S47. FT-IR de 11.

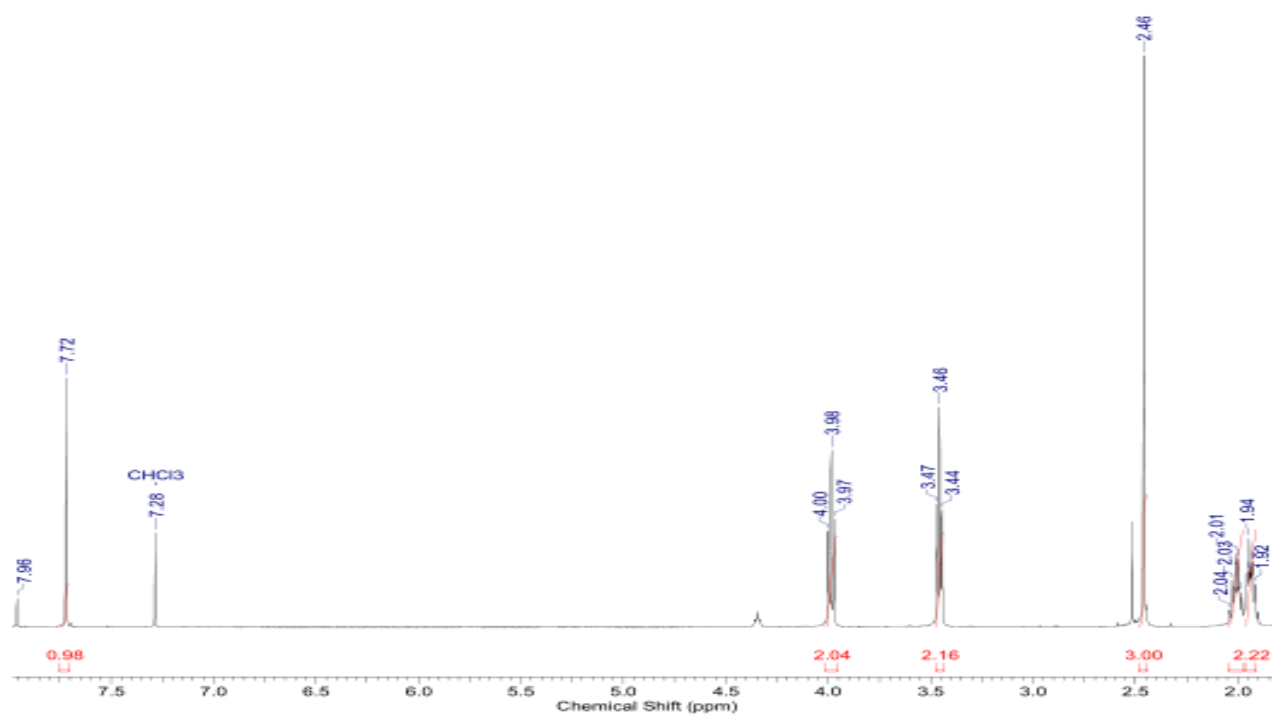


Figura S48. ¹H-NMR de **11** em CDCl₃.

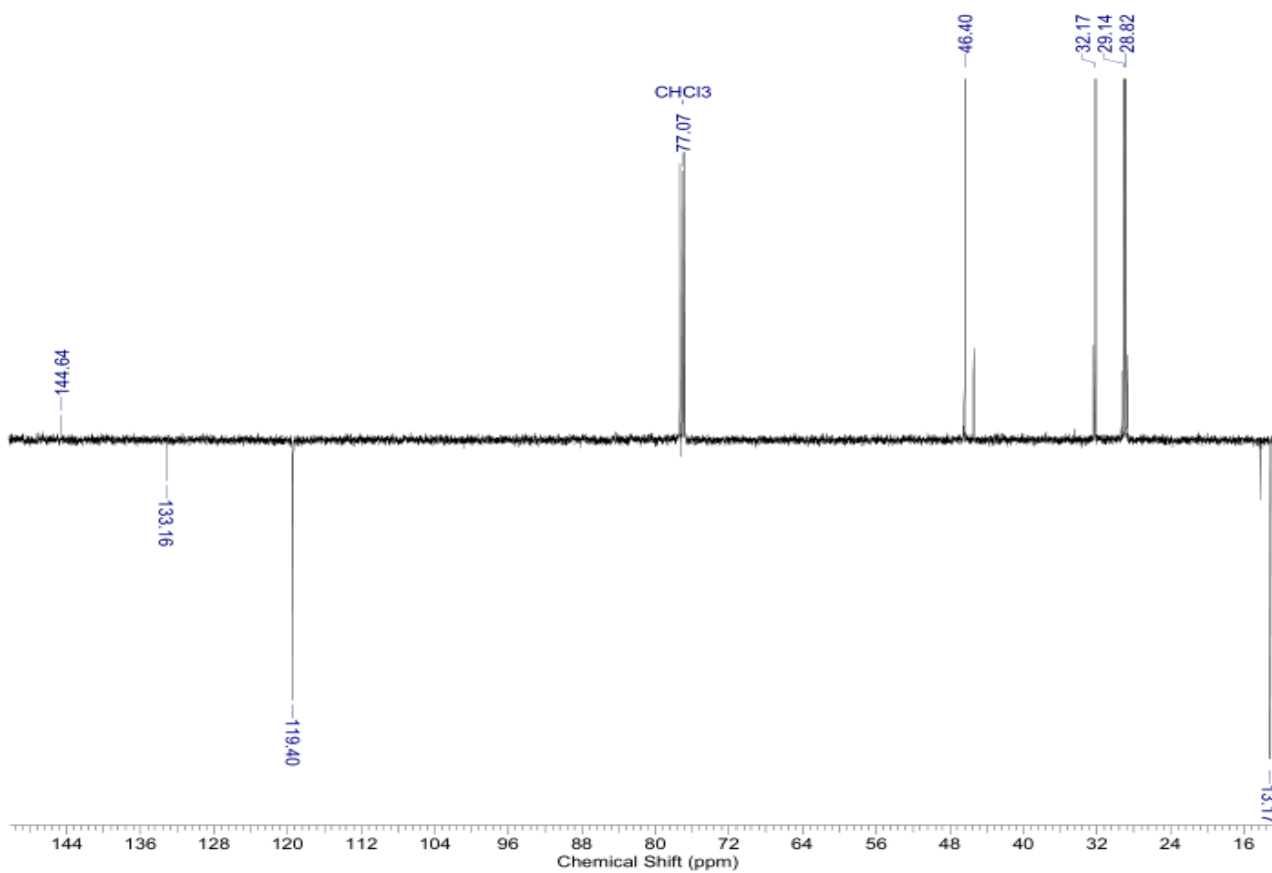


Figura S49. ¹³C-NMR DEPT-135 de **11** em CDCl₃.

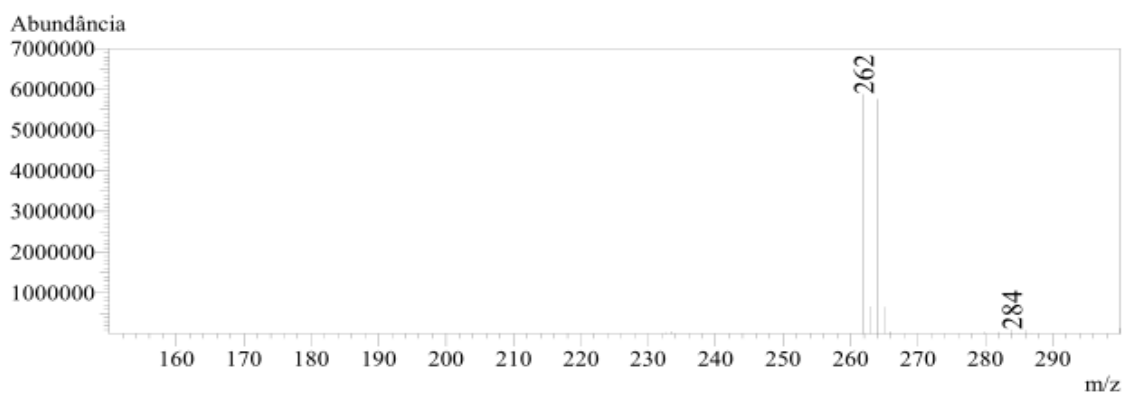


Figura S50. LRMS de 11.

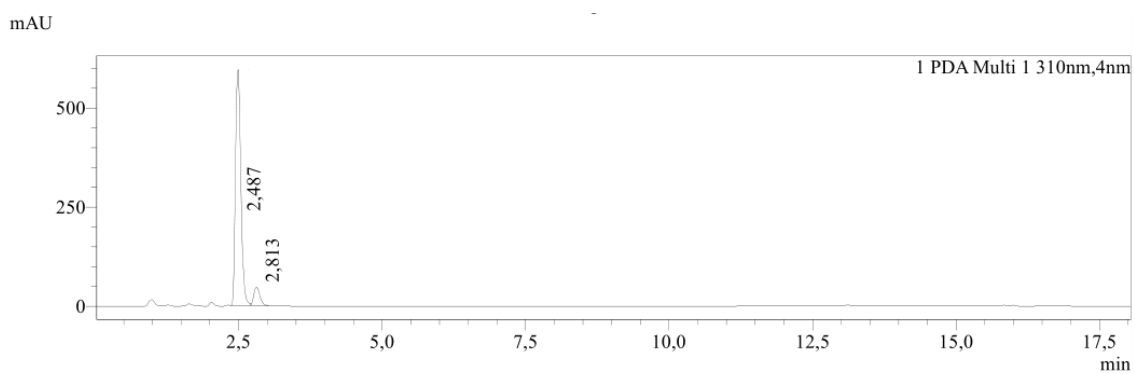
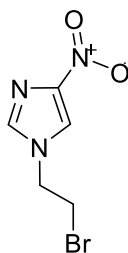


Figura S51. Cromatograma de CLAE de 11.



1-(2-bromoethyl)-4-nitro-1*H*-imidazole

Chemical Formula: $C_5H_6BrN_3O_2$

Exact Mass: 218,96

Molecular Weight: 220,03

Elemental Analysis: C, 27.29; H, 2.75; Br, 36.32; N, 19.10; O, 14.54

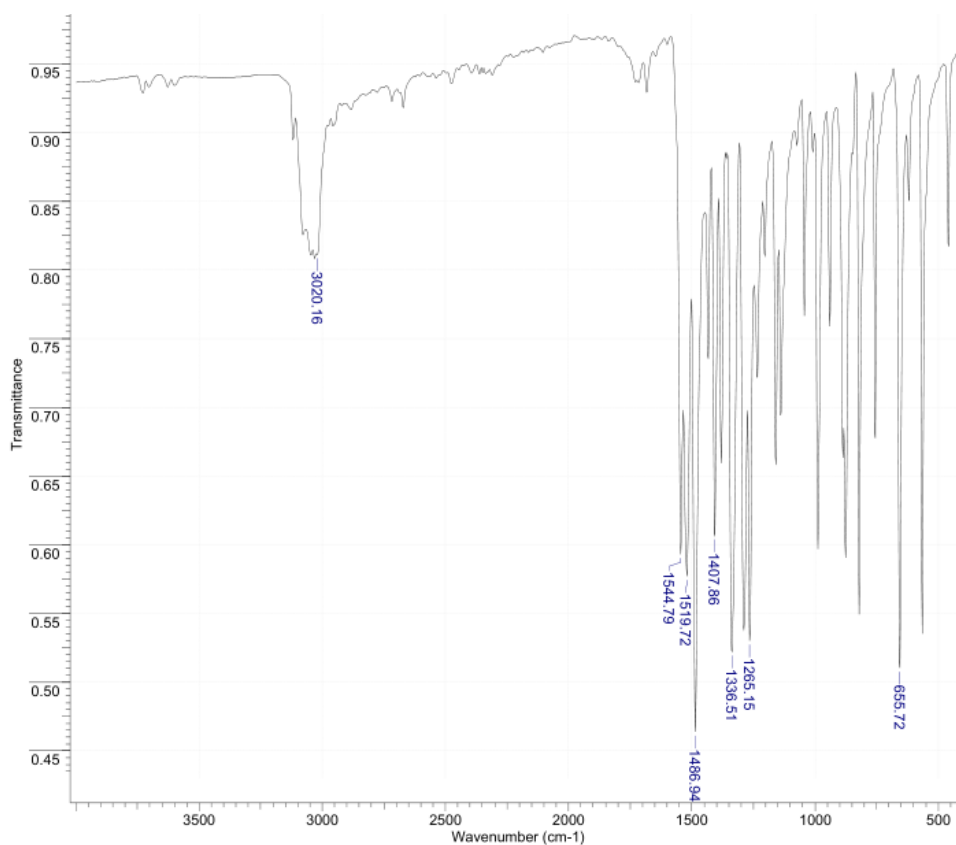


Figura S52. FT-IR de 12.

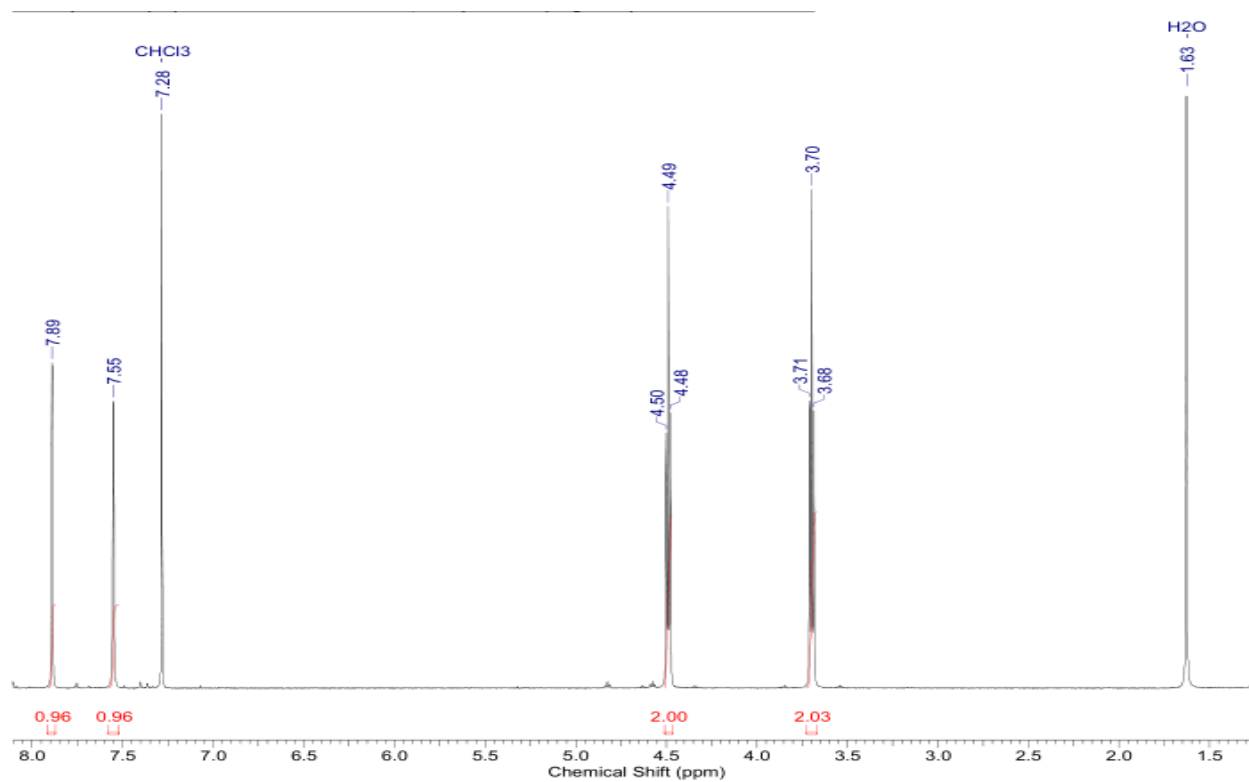


Figura S53. ¹H-NMR de **12** em CDCl₃.

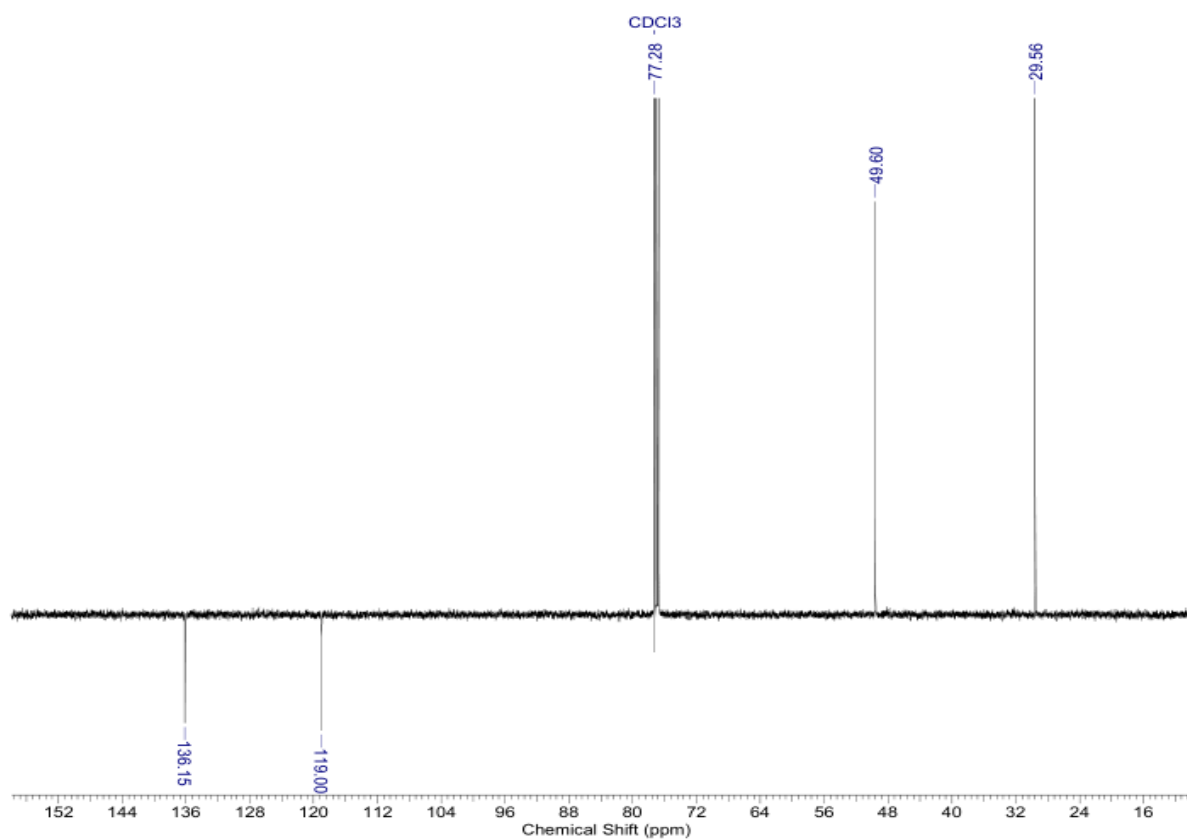


Figura S54. ¹³C-NMR DEPT-135 de **12** em CDCl₃.

R.Time:5,983(Scan#:
MassPeaks:249
Segment 1 - Event 1

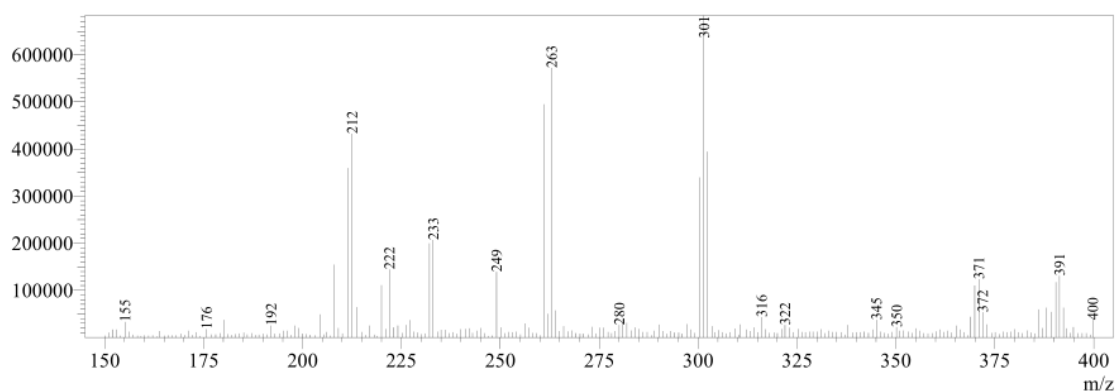


Figura S55. LRMS de 12.

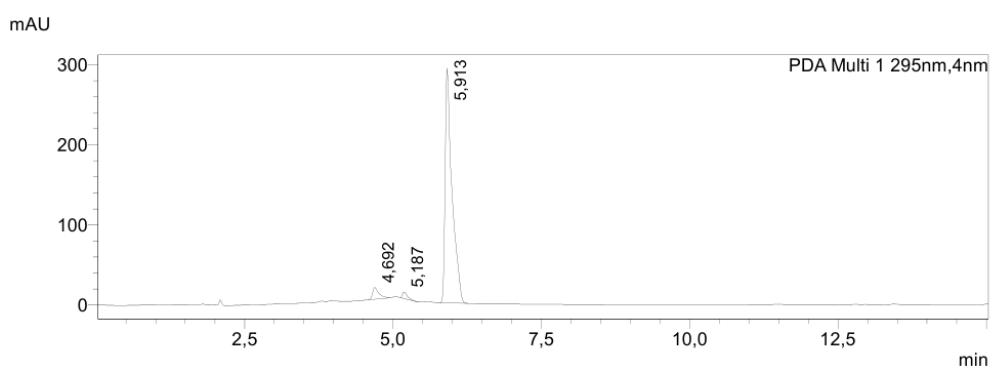
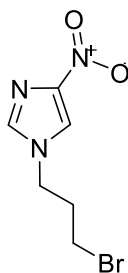


Figura S56. Cromatograma de CLAE de 12.



1-(3-bromopropyl)-4-nitro-1*H*-imidazole

Chemical Formula: $C_6H_8BrN_3O_2$

Exact Mass: 232,98

Molecular Weight: 234,05

Elemental Analysis: C, 30.79; H, 3.45; Br, 34.14; N, 17.95; O, 13.67

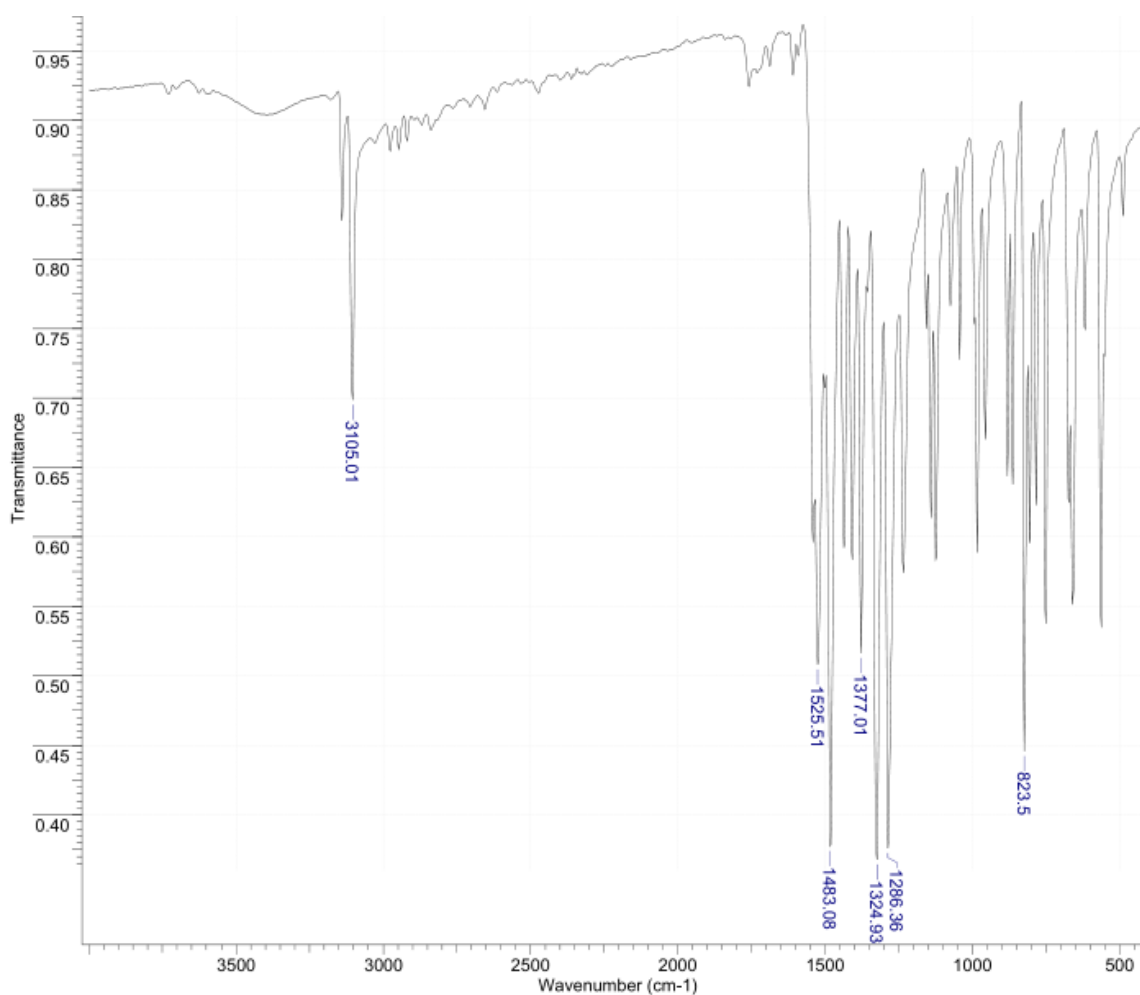


Figura S57. FT-IR de **13**.

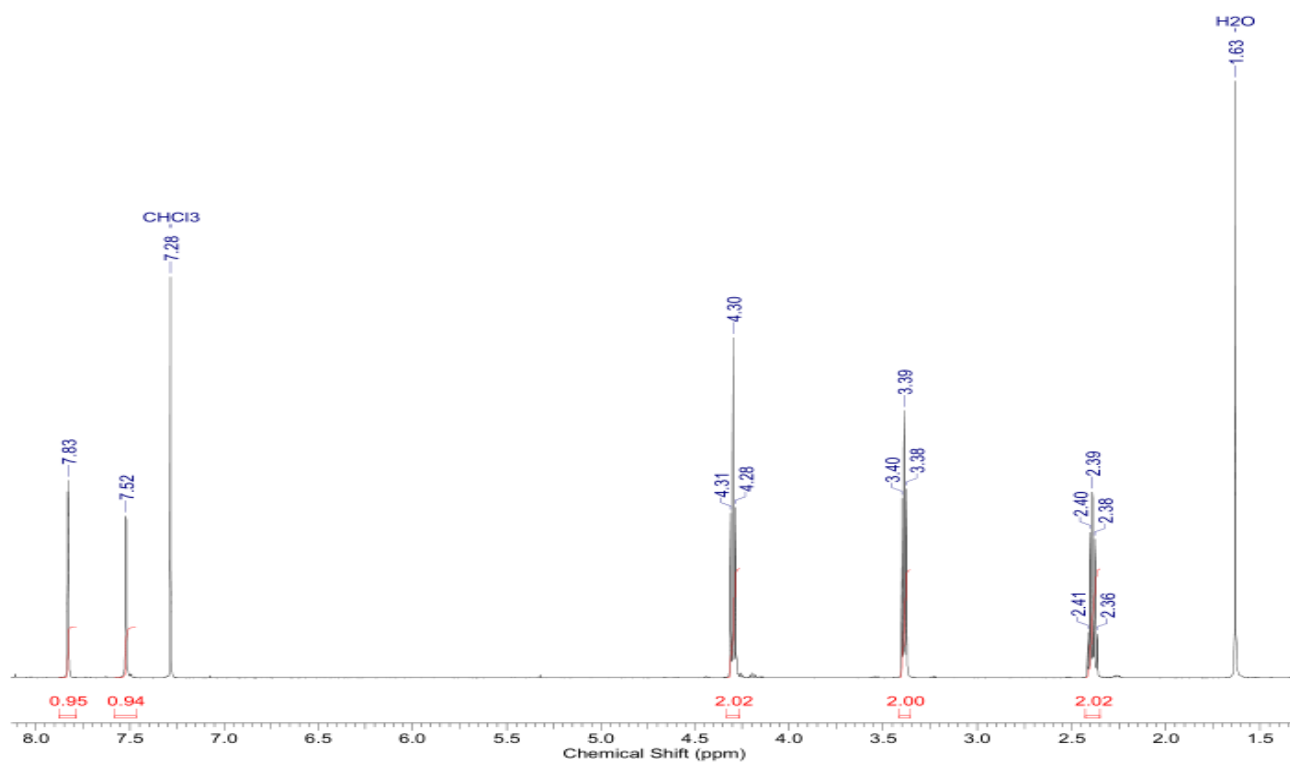


Figura S58. ¹H-NMR de **13** em CDCl₃.

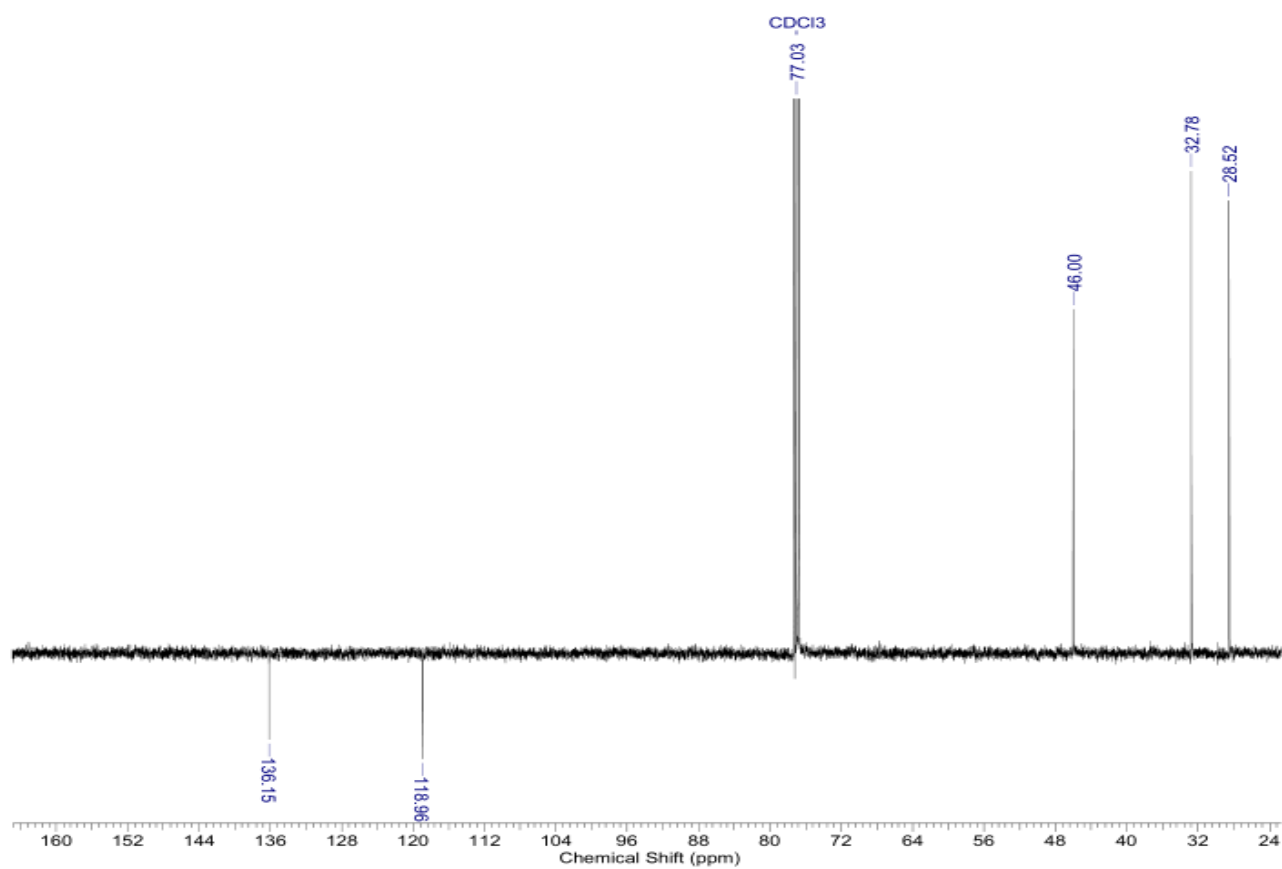


Figura S59. ¹³C-NMR DEPT-135 de **13** em CDCl₃.

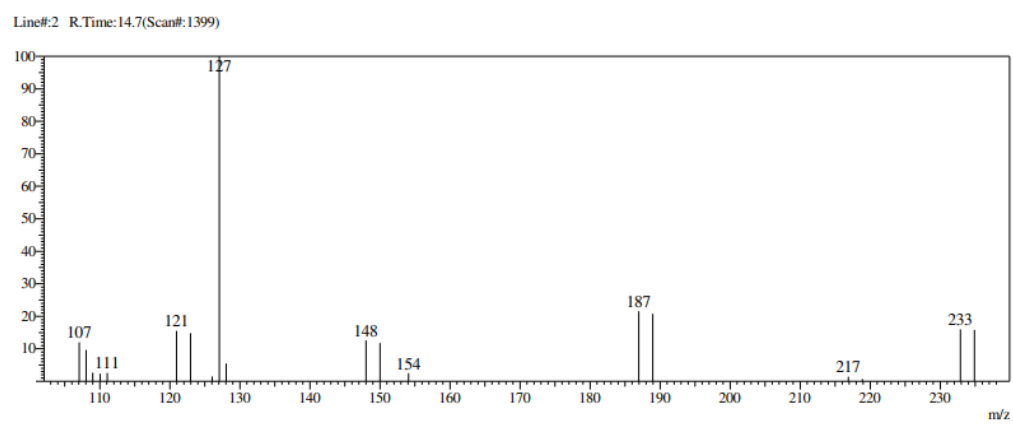


Figura S60. CG-MS de **13**.

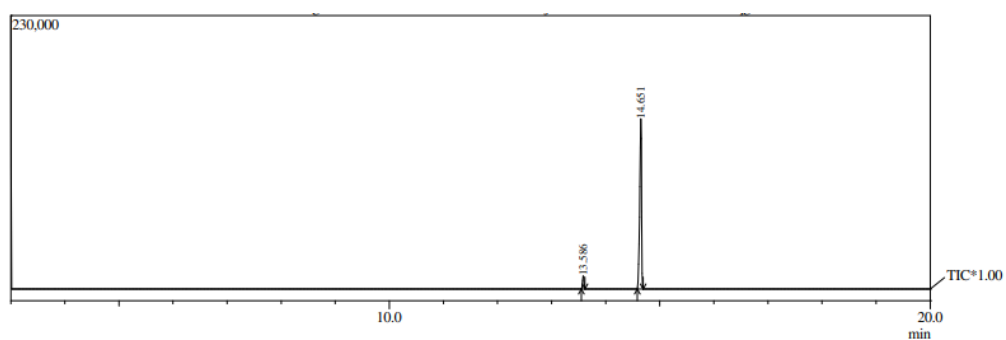
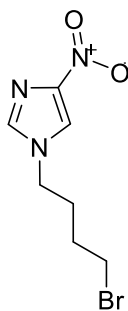


Figura S61. CG Cromatograma de **13**.



1-(4-bromobutyl)-4-nitro-1*H*-imidazole

Chemical Formula: $C_7H_{10}BrN_3O_2$

Exact Mass: 247,00

Molecular Weight: 248,08

Elemental Analysis: C, 33.89; H, 4.06; Br, 32.21; N, 16.94; O, 12.90

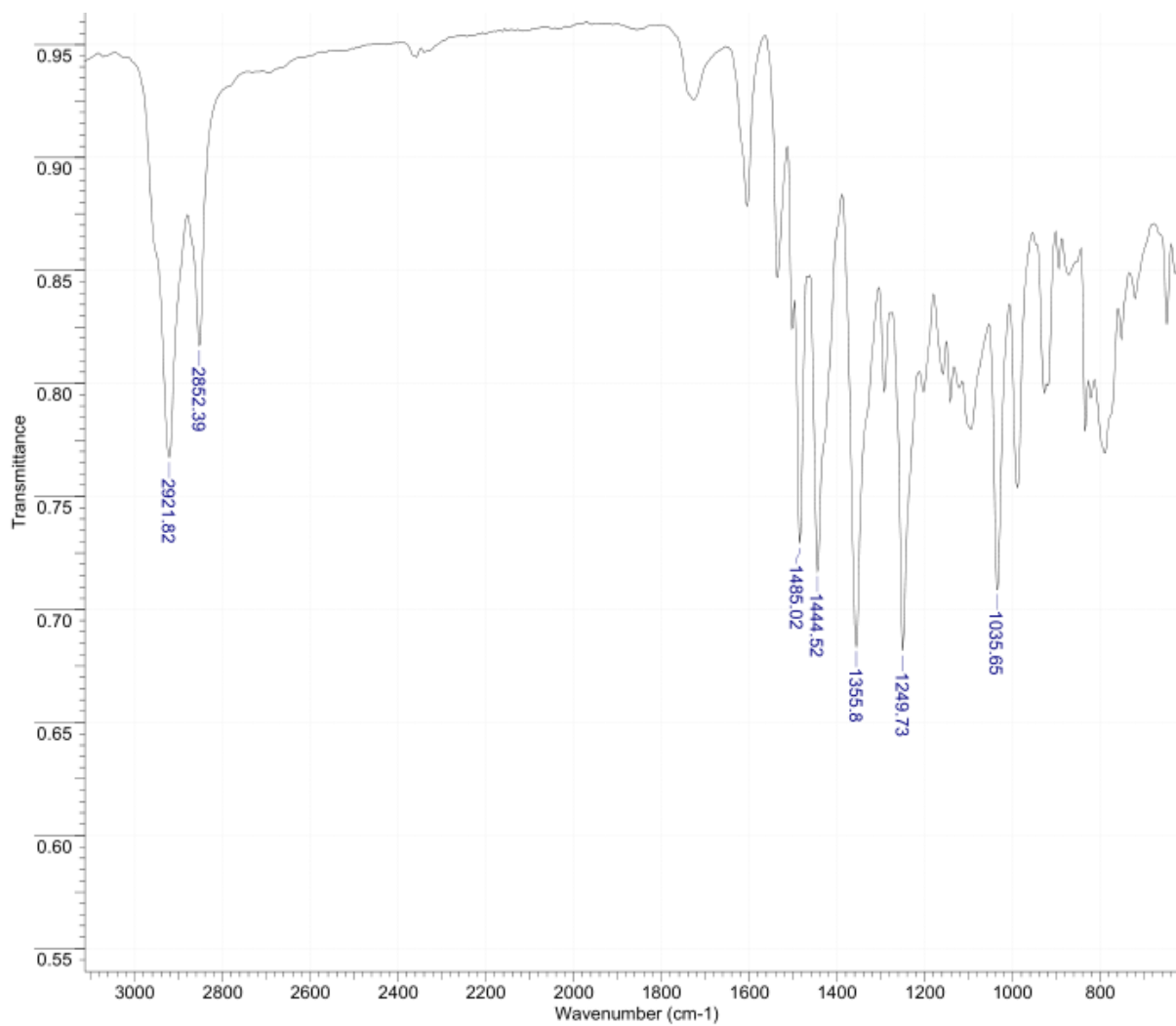


Figura S62. FT-IR de 14.

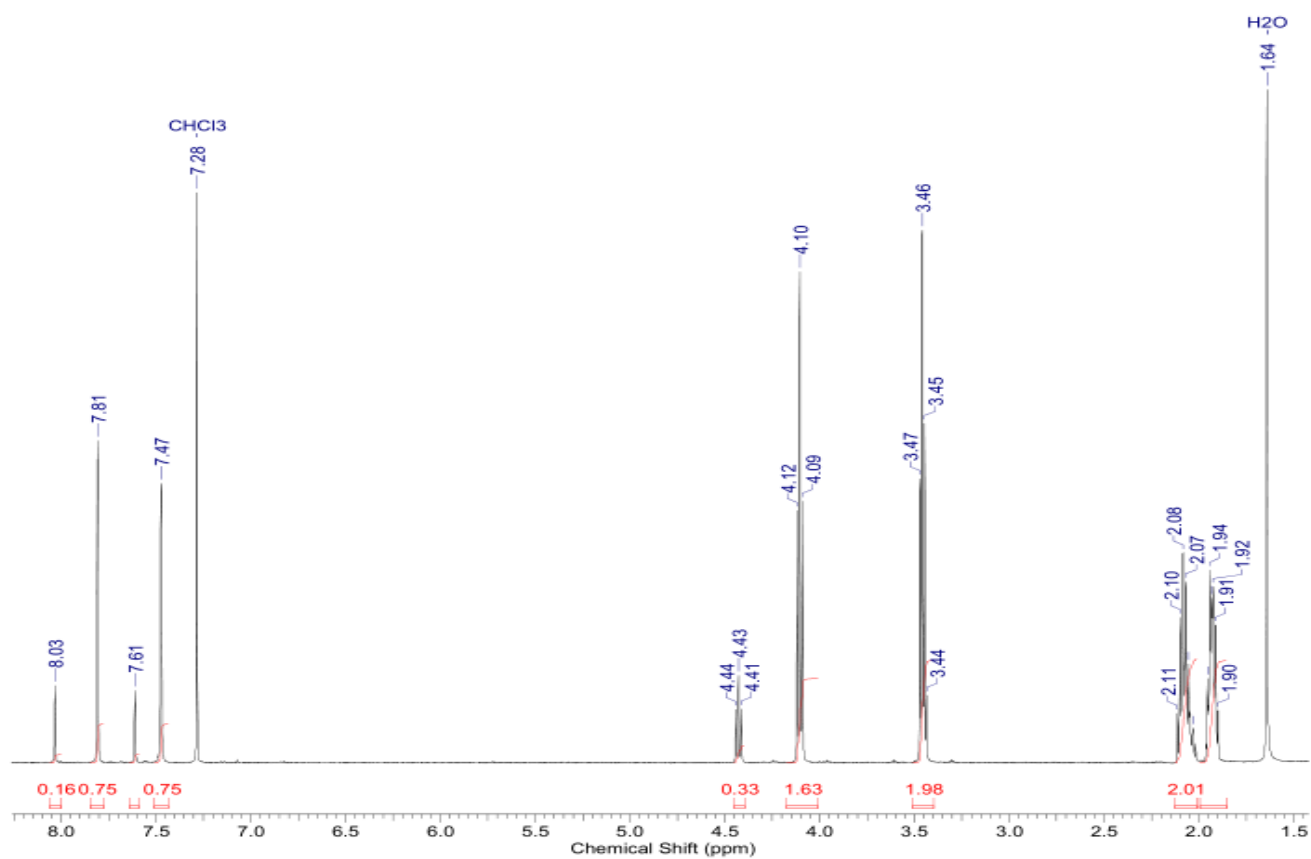


Figura S63. ¹H-NMR de 14 em CDCl₃.

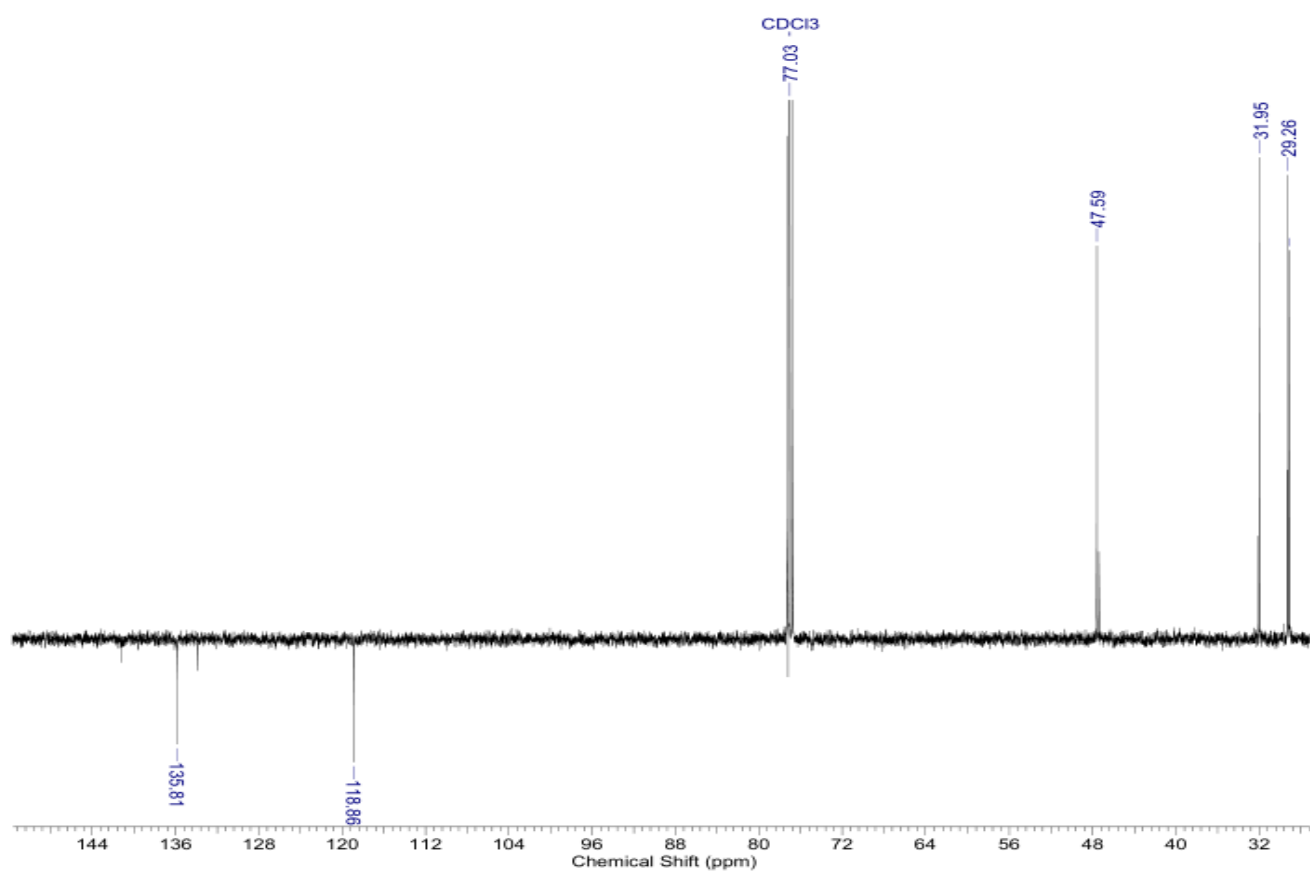


Figura S64. ¹³C-NMR DEPT-135 de 14 em CDCl₃.

R.Time:5,683(Scan#:
MassPeaks:249
Segment 1 - Event 1

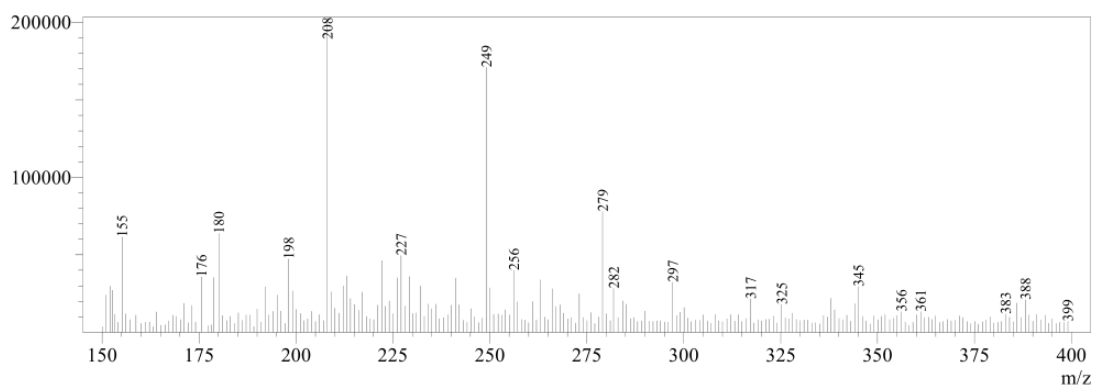


Figura S65. LRMS de 14.

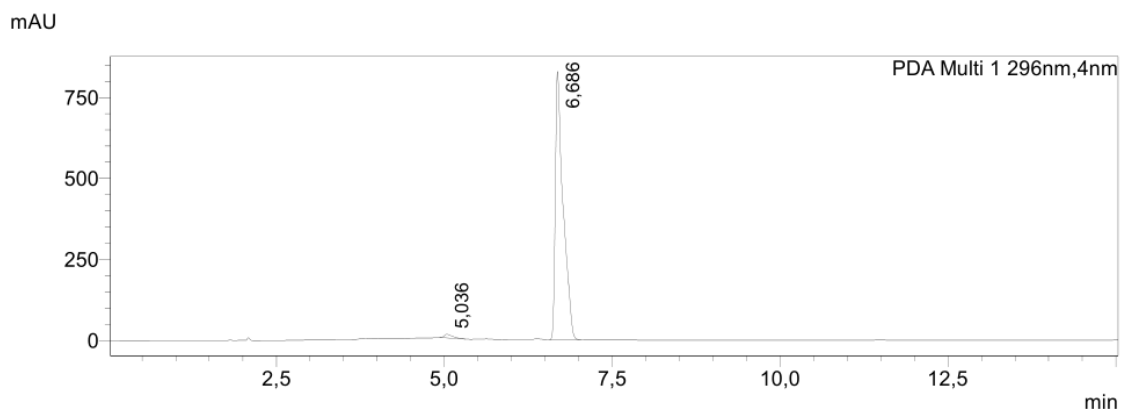
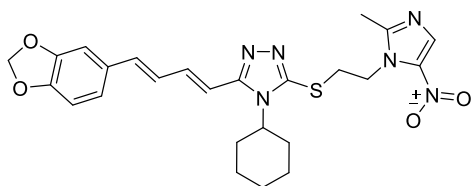


Figura S66. Cromatograma de CLAE de 14.

H1



3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4-cyclohexyl-5-((2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethyl)thio)-4H-1,2,4-triazole

Chemical Formula: $C_{25}H_{28}N_6O_4S$

Exact Mass: 508,19

Molecular Weight: 508,60

Elemental Analysis: C, 59.04; H, 5.55; N, 16.52; O, 12.58; S, 6.30

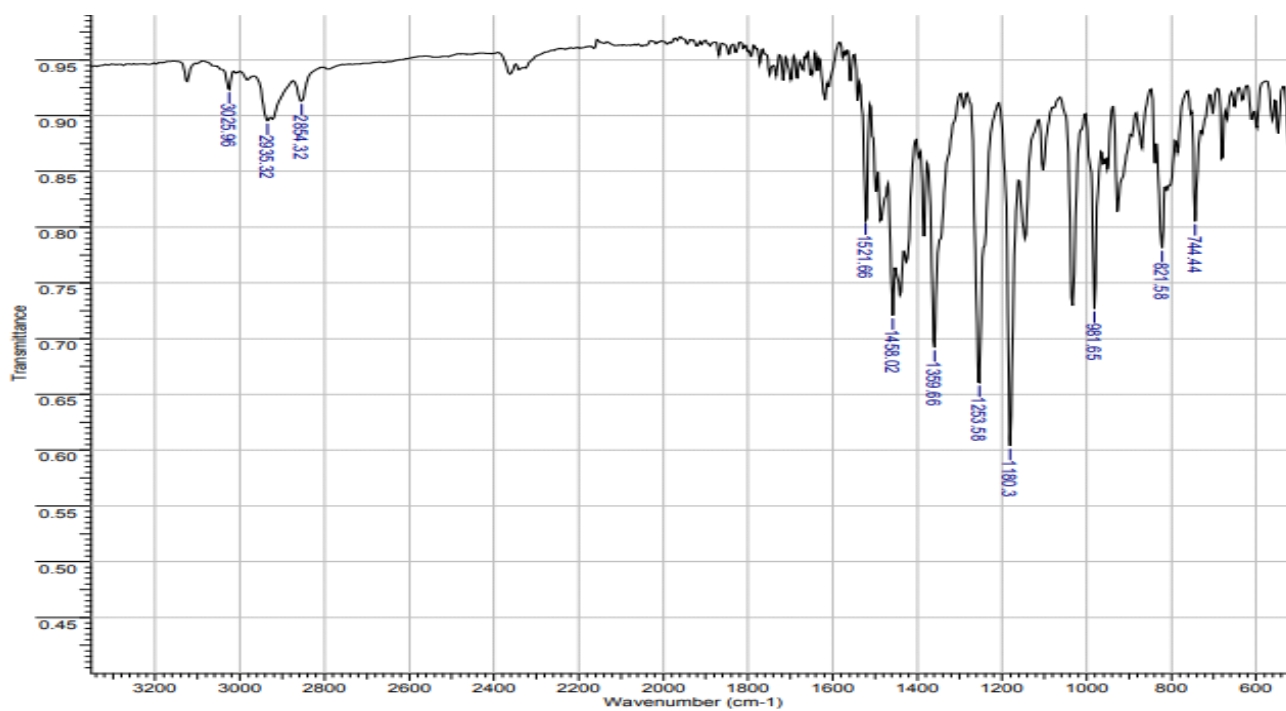


Figura S67. FT-IR de **H1**.

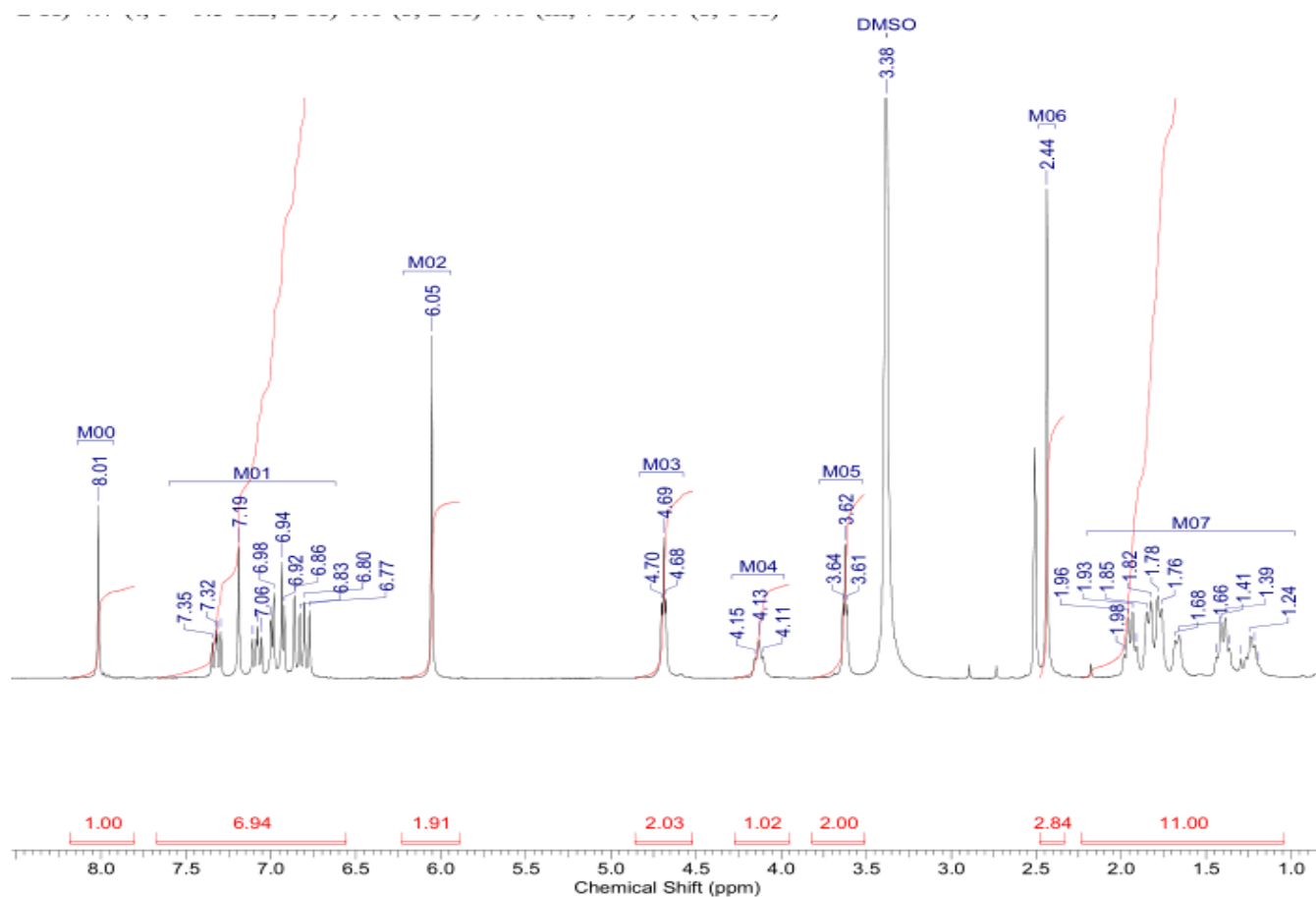


Figura S68. ¹H-NMR de H1 em DMSO-d₆.

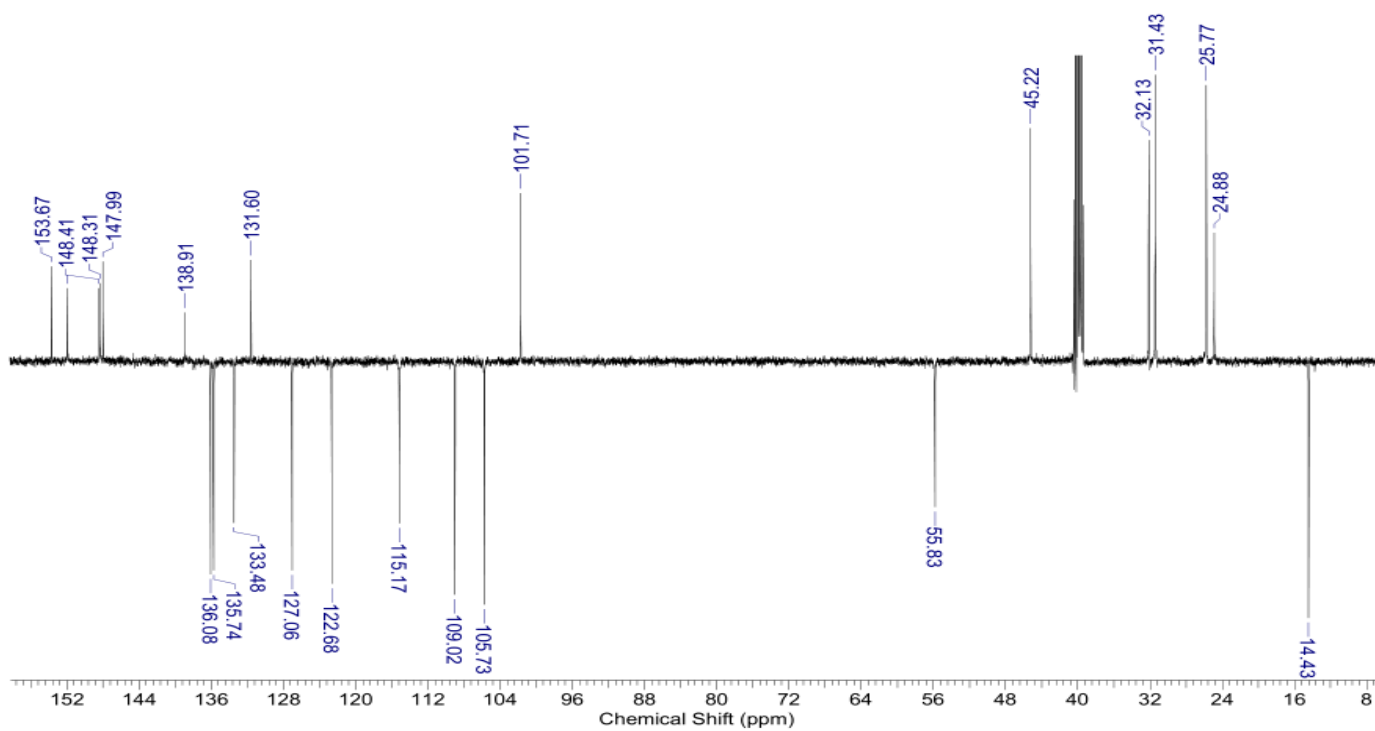


Figura S69. ¹³C-NMR DEPT-135 de H1 em DMSO-d₆.

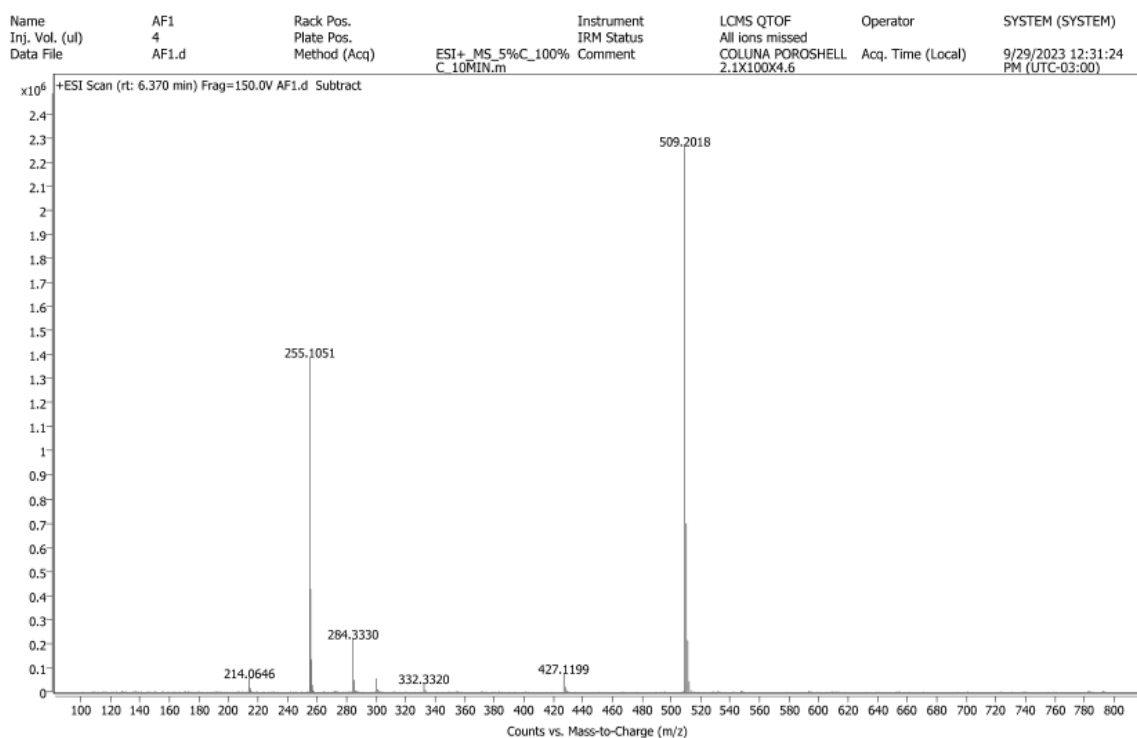
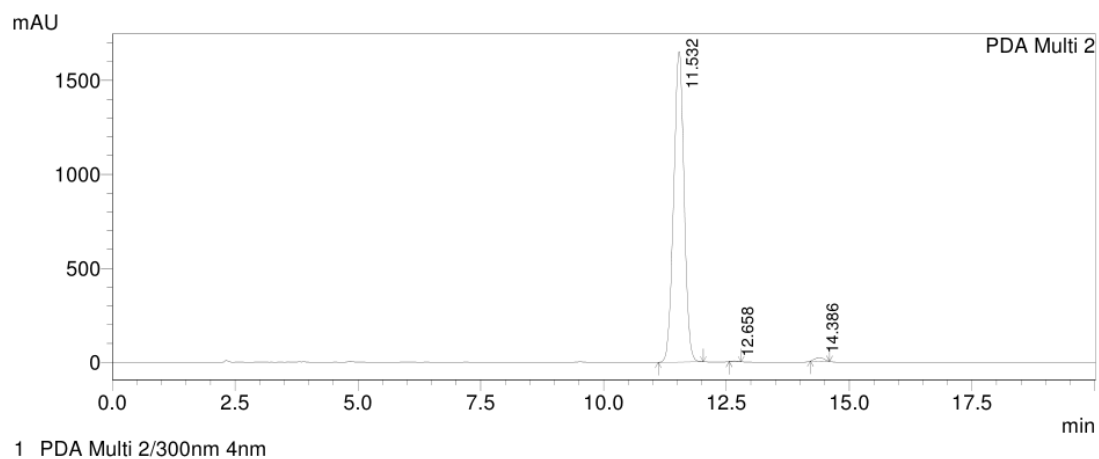


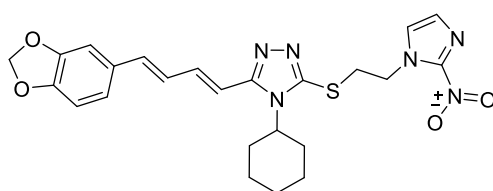
Figura S70. HRMS-TOF (MS+) de **H1**.



PeakTable			
Ch2 300nm 4nm			
Peak#	Ret. Time	Area %	Height %
1	11.532	98.869	98.700
2	12.658	0.111	0.180
3	14.386	1.021	1.120
Total		100.000	100.000

Figura S71. Cromatograma de CLAE de **H1**.

H2



3-((1*E*,3*E*)-4-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4-cyclohexyl-5-((2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethyl)thio)-4*H*-1,2,4-triazole

Chemical Formula: C₂₄H₂₆N₆O₄S

Exact Mass: 494,17

Molecular Weight: 494,57

Elemental Analysis: C, 58.29; H, 5.30; N, 16.99; O, 12.94; S, 6.48

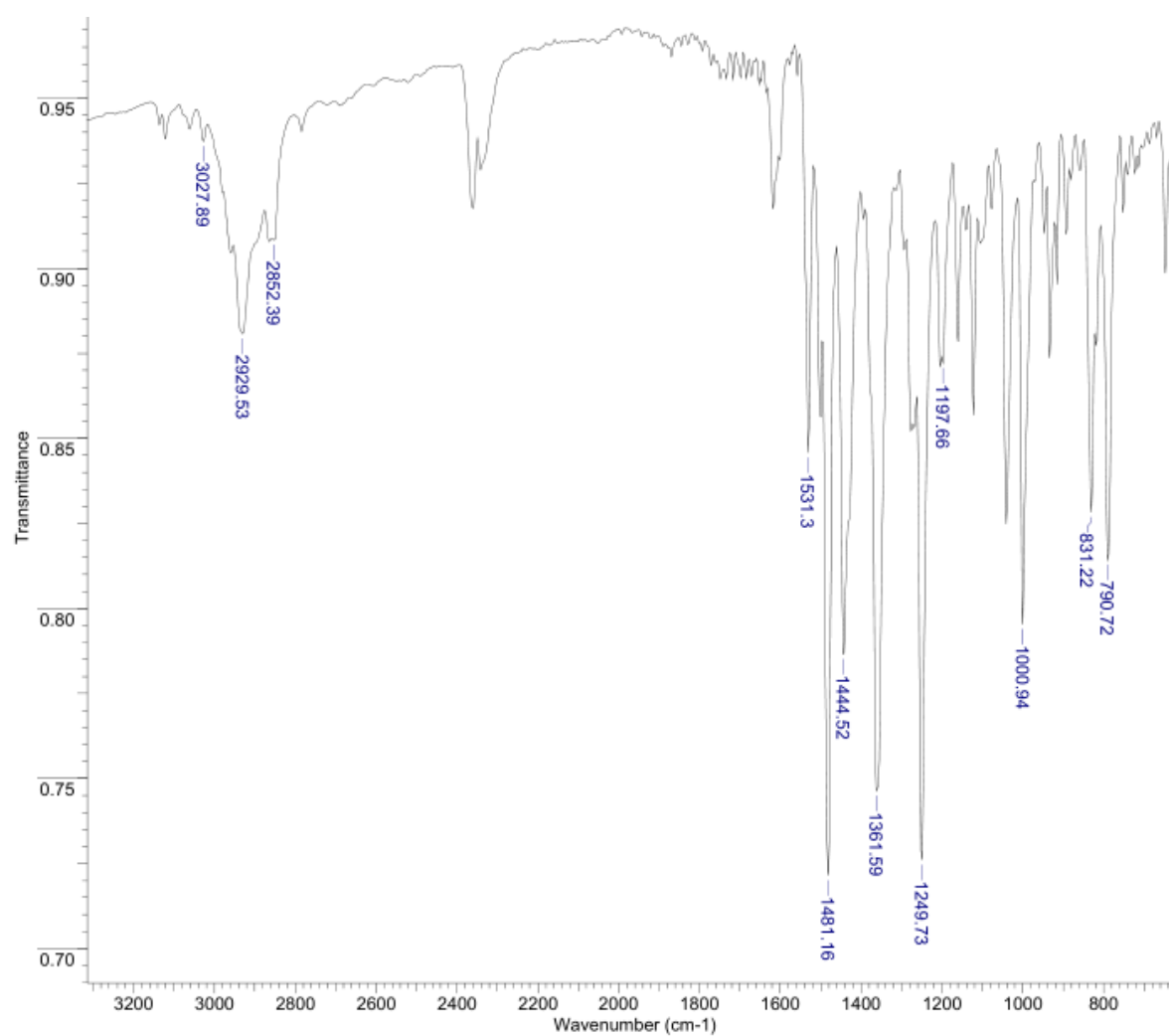


Figura S72. FT-IR de H2.

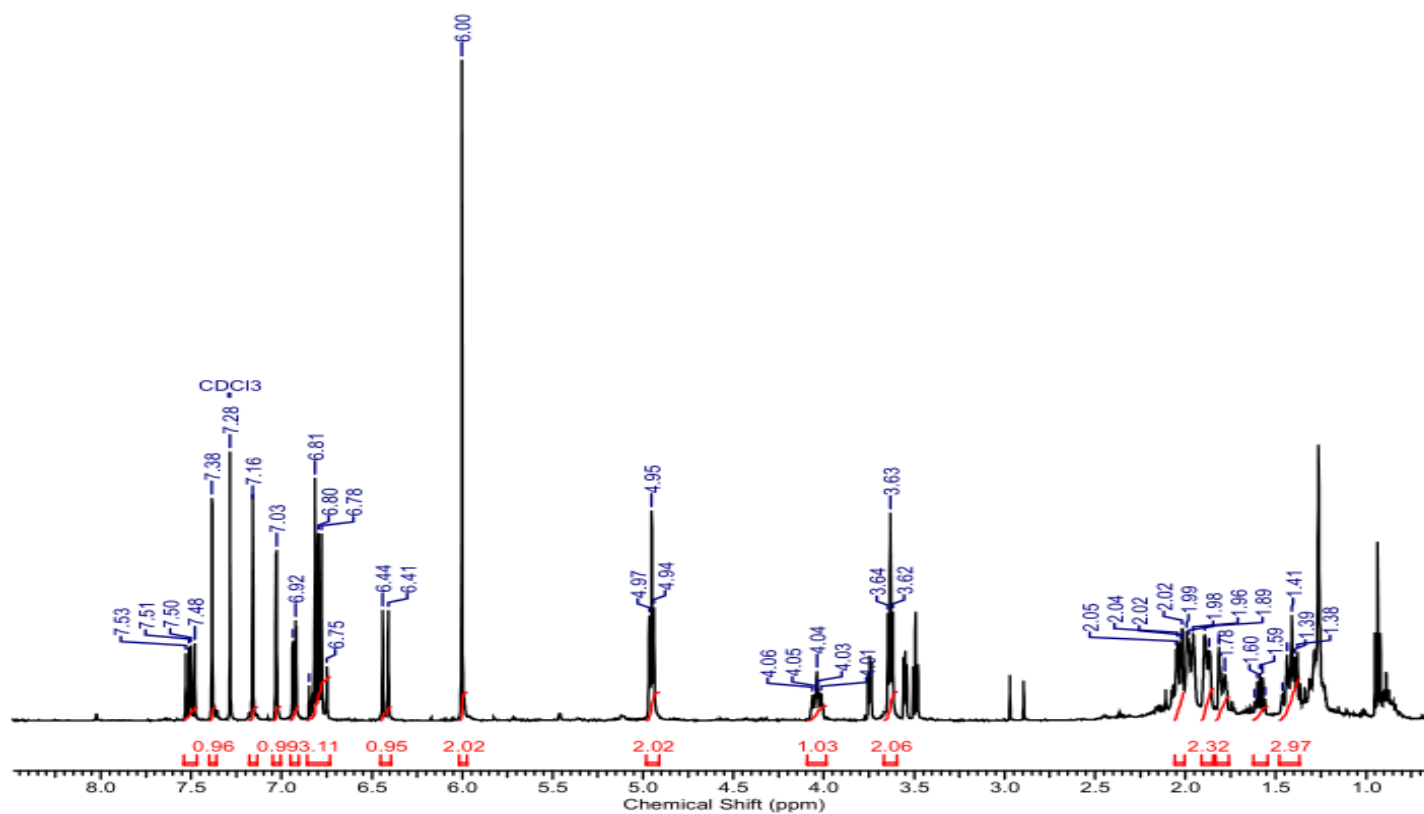


Figura S73. ¹H-NMR de **H2** em CDCl₃.

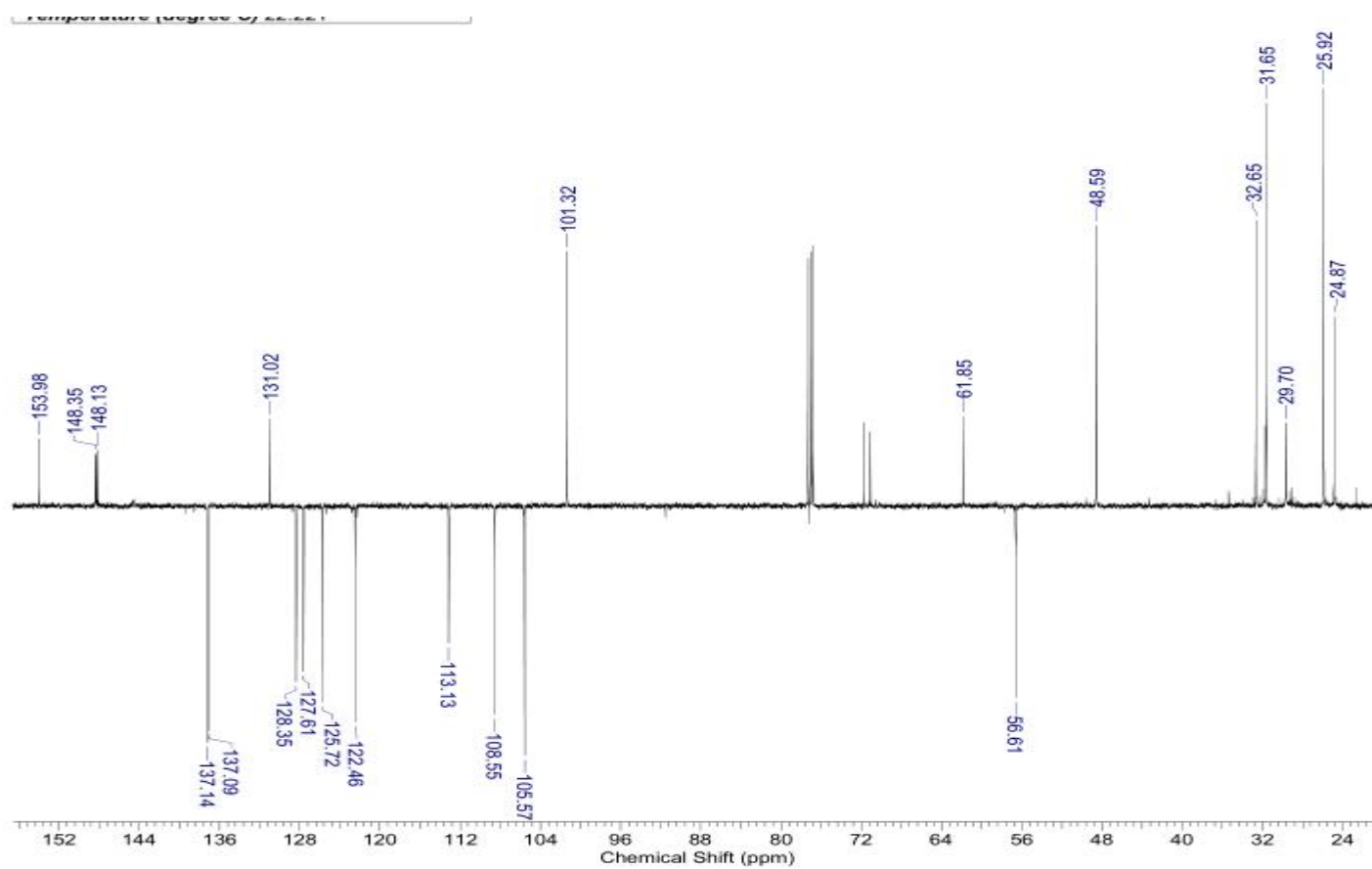
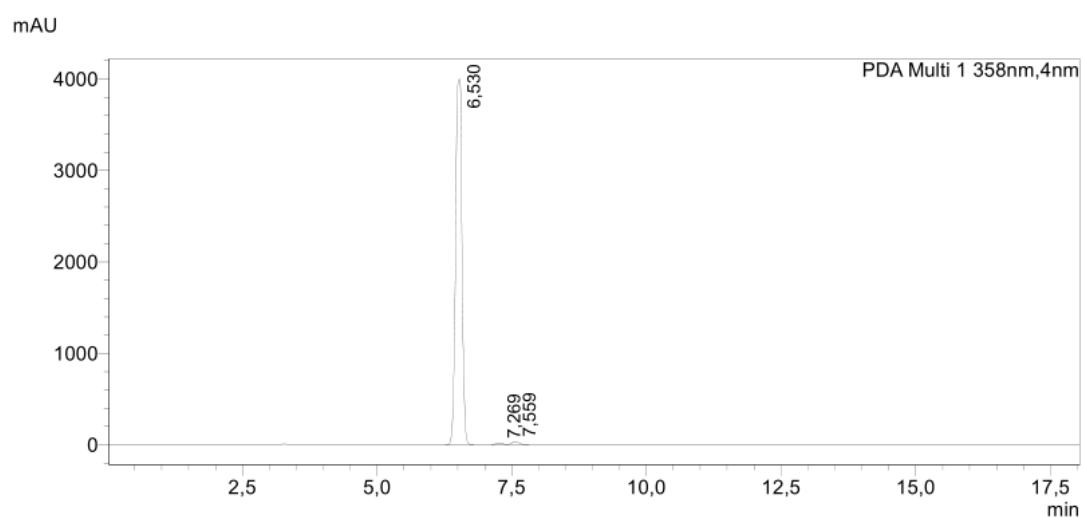


Figura S74. ¹³C-NMR DEPT-135 de **H2** em CDCl₃.



Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Height%	Area%
1	6,530	32930204	3995832	99,005	98,785
2	7,269	118702	12477	0,309	0,356
3	7,559	286419	27696	0,686	0,859
Total		33335325	4036004	100,000	100,000

Figura S75. Cromatograma de CLAE de **H2**.

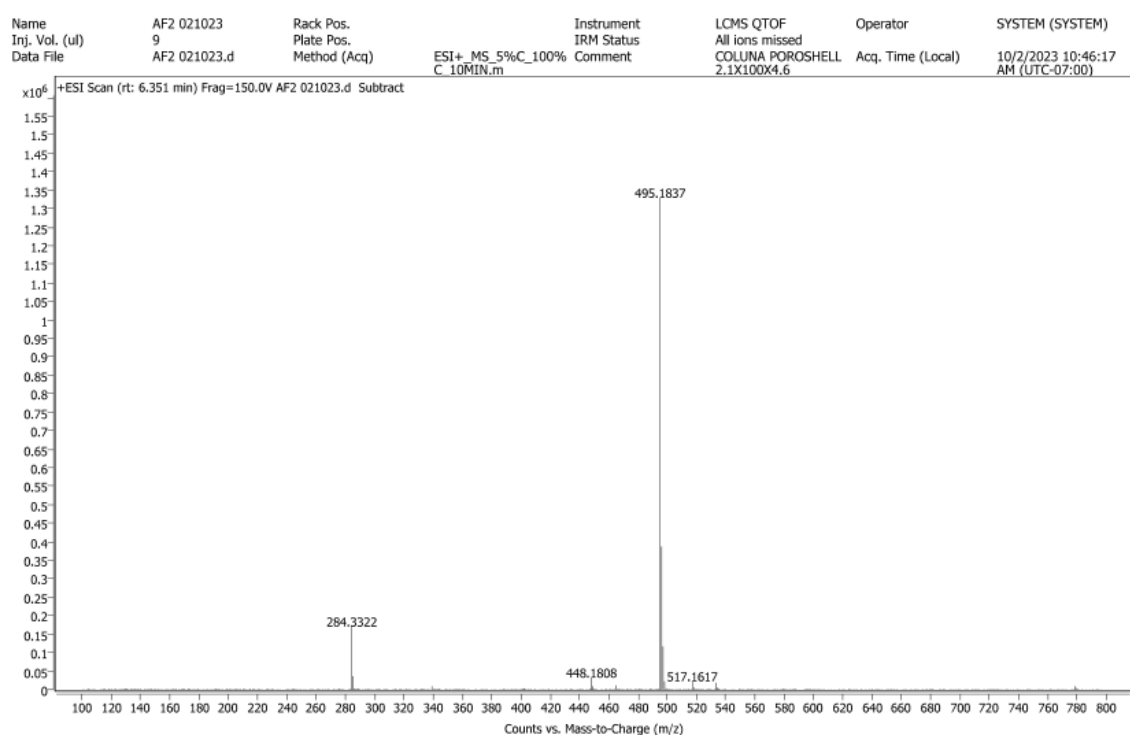
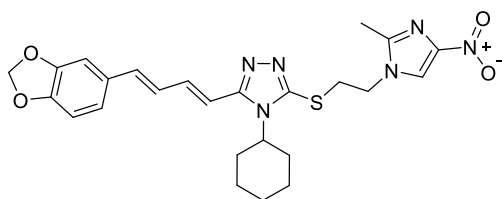


Figura S76. HRMS-TOF (MS⁺) de **H2**.

H3



3-((1*E*,3*E*)-4-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4-cyclohexyl-5-((2-(2-methyl-4-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethyl)thio)-4*H*-1,2,4-triazole

Chemical Formula: C₂₅H₂₈N₆O₄S

Exact Mass: 508,19

Molecular Weight: 508,60

Elemental Analysis: C, 59.04; H, 5.55; N, 16.52; O, 12.58; S, 6.30

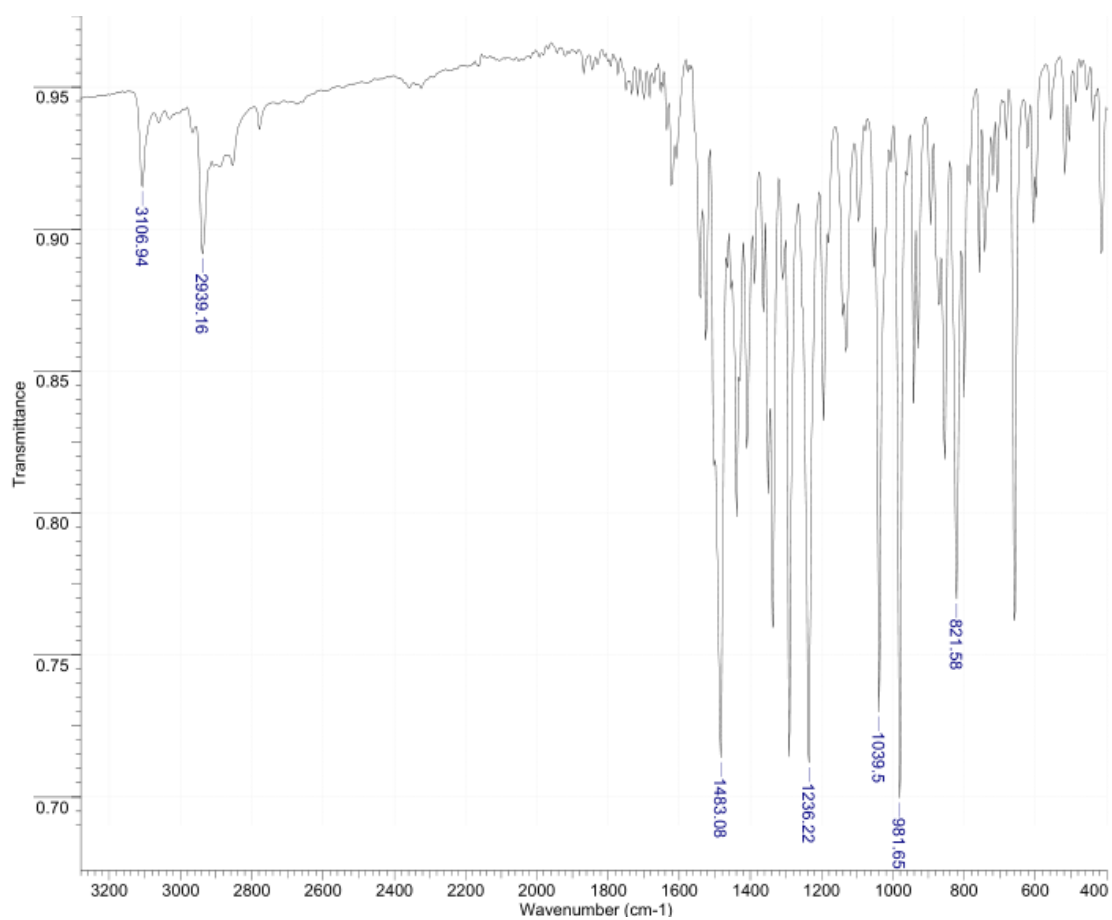


Figura S77. FT-IR de **H3**.

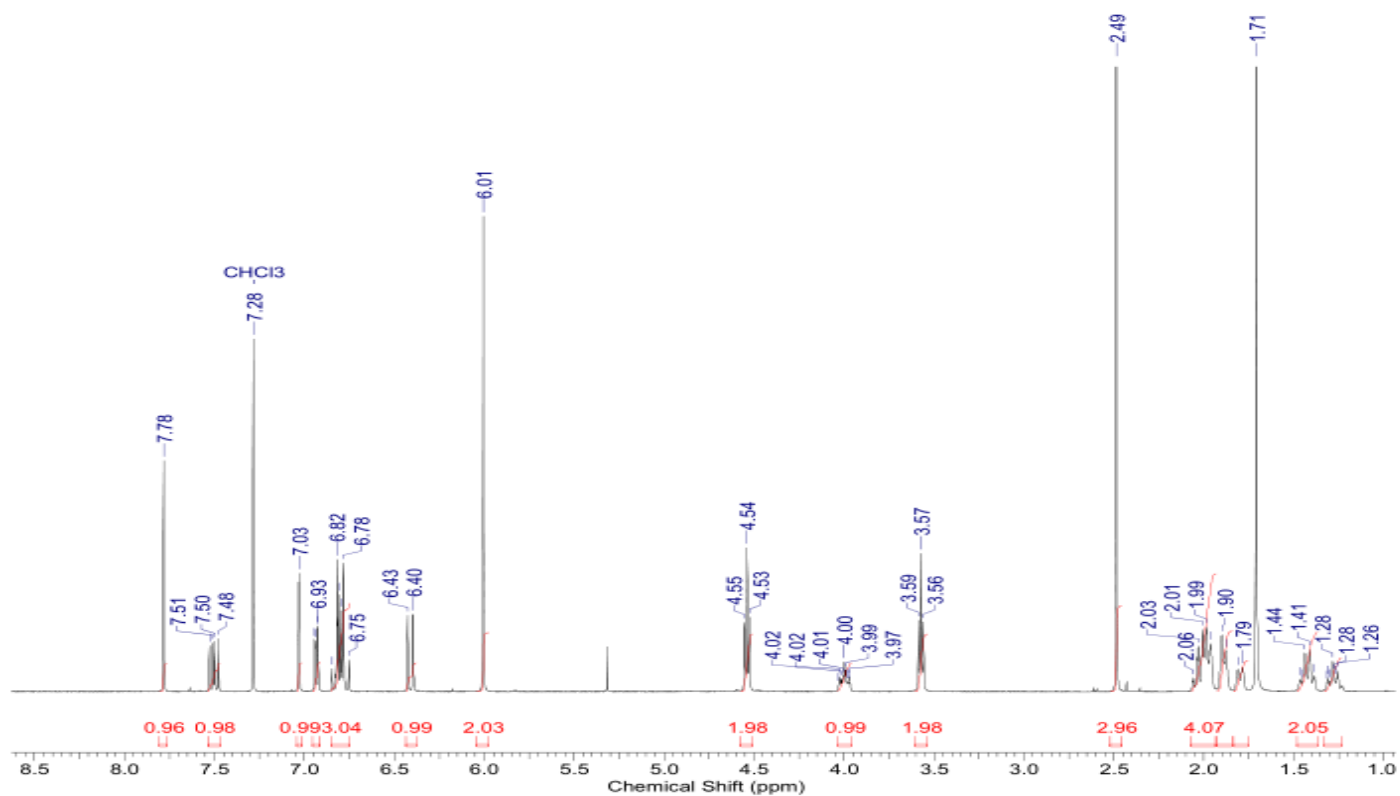


Figura S78. ^1H -NMR de **H3** em CDCl_3 .

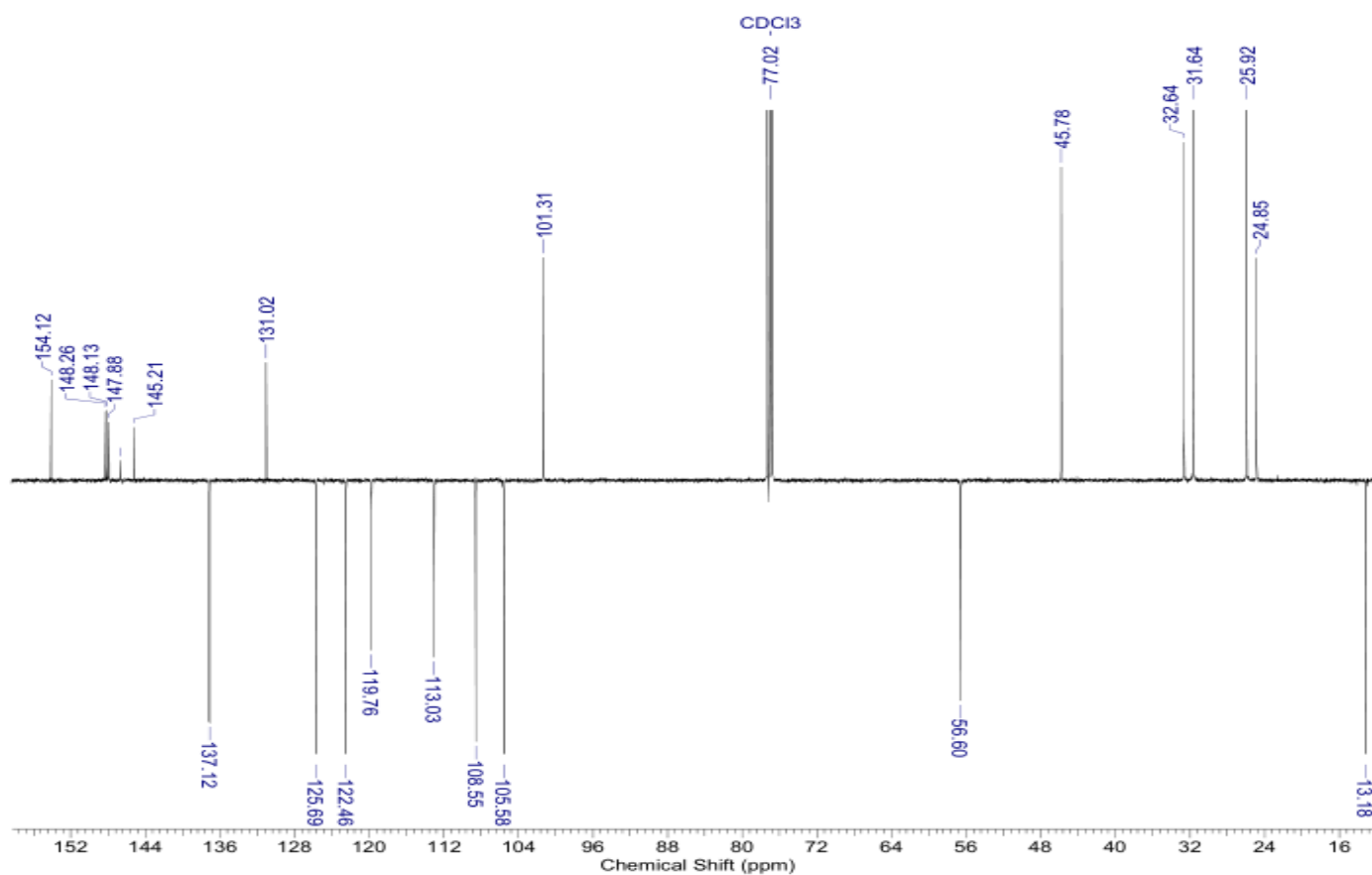


Figura S79. ^{13}C -NMR DEPT-135 de **H3** em CDCl_3 .

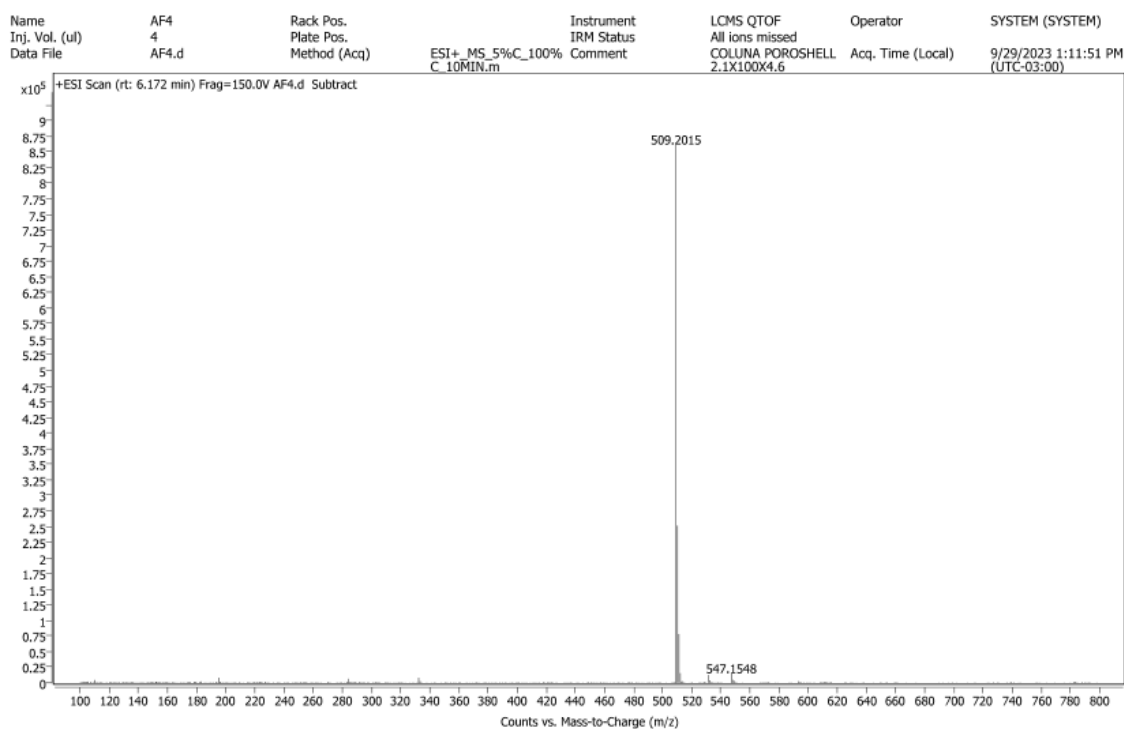


Figura S80. HRMS-TOF (MS⁺) de **H3**.

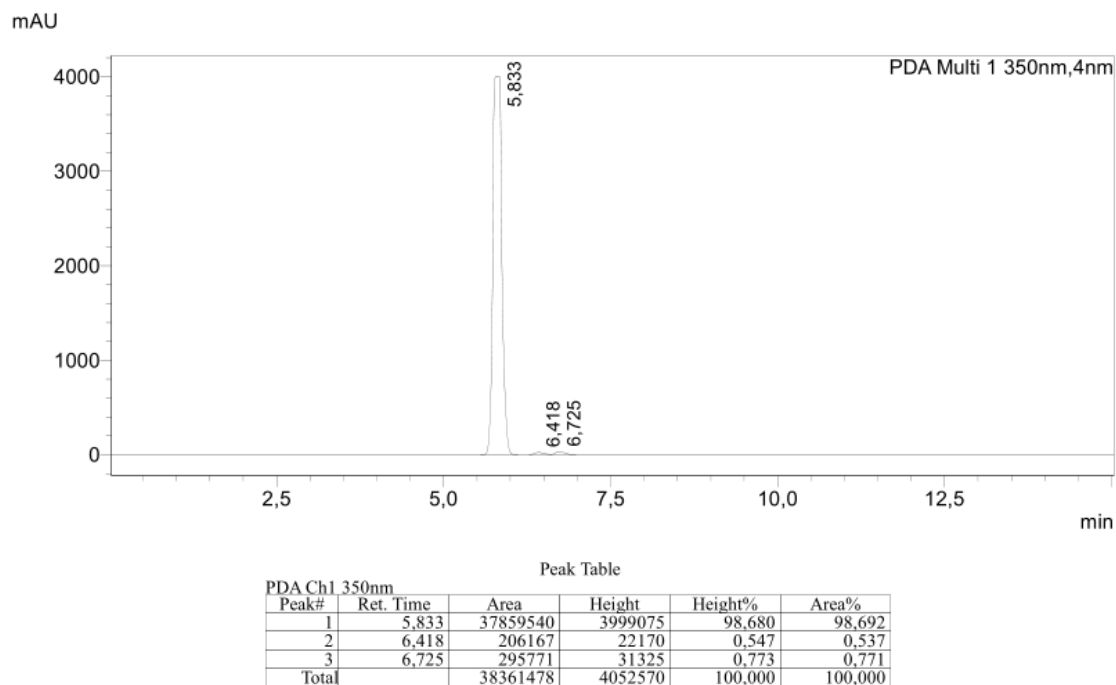
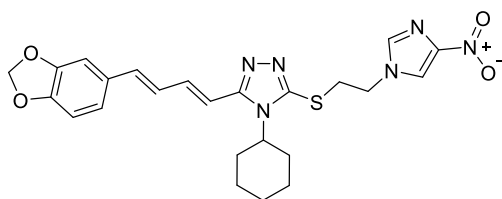


Figura S81. Cromatograma de CLAE de **H3**.

H4



3-((1*E*,3*E*)-4-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4-cyclohexyl-5-((2-(4-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethyl)thio)-4*H*-1,2,4-triazole

Chemical Formula: C₂₄H₂₆N₆O₄S

Exact Mass: 494,17

Molecular Weight: 494,57

Elemental Analysis: C, 58.29; H, 5.30; N, 16.99; O, 12.94; S, 6.48

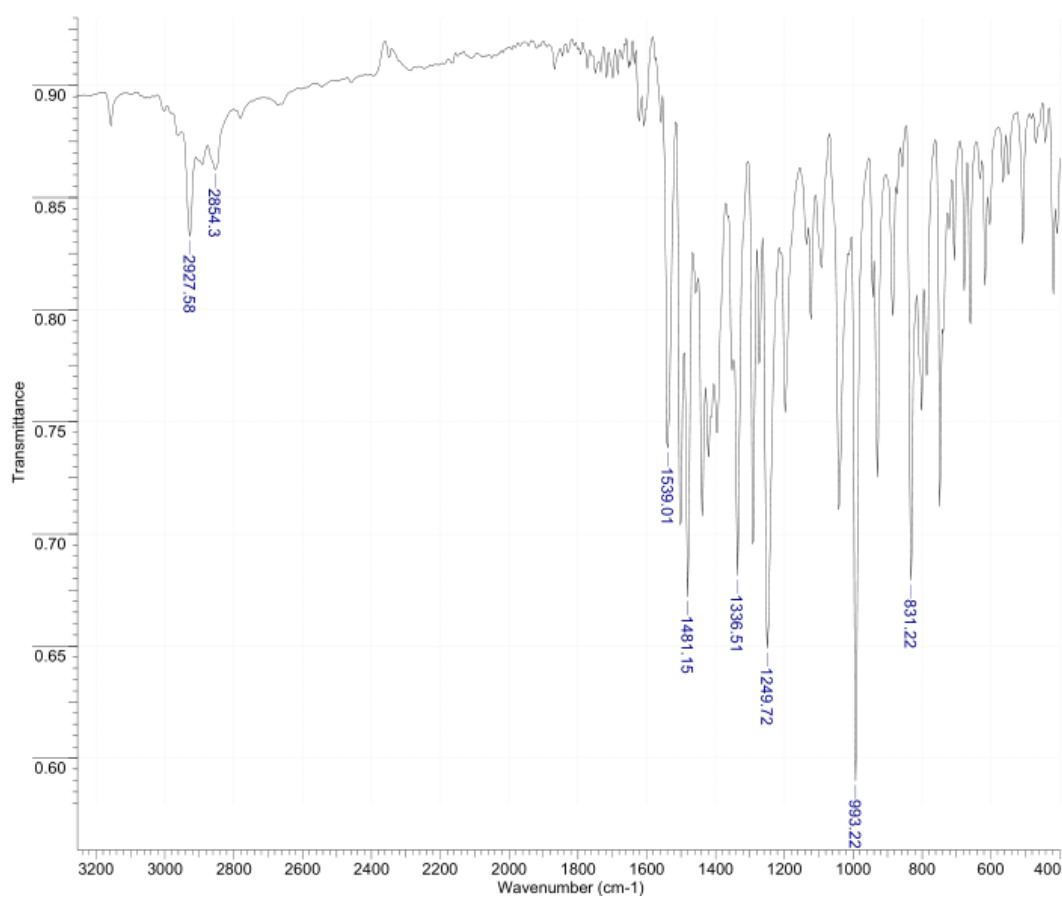


Figura S82. FT-IR de **H4**.

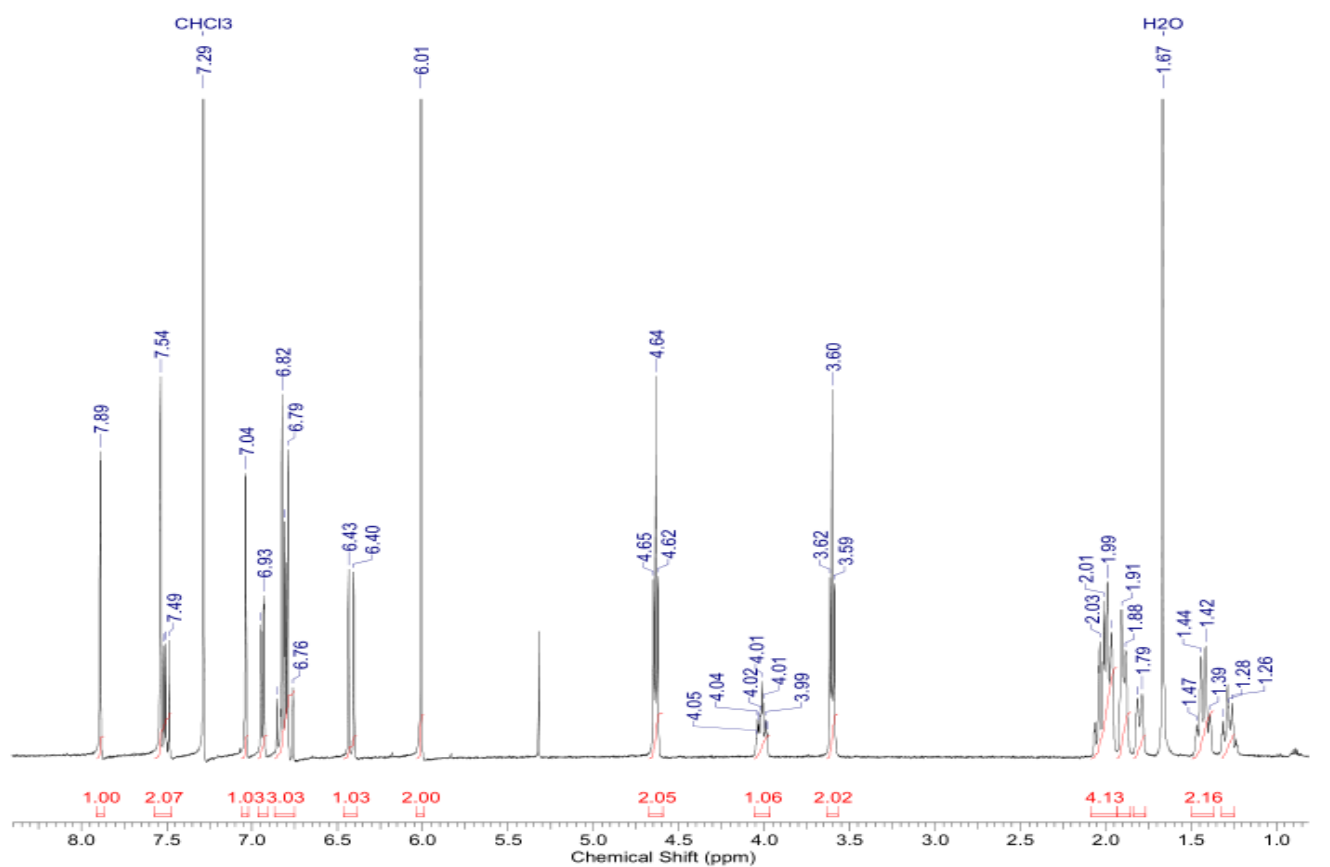


Figura S83. ¹H-NMR de H4 em CDCl₃.

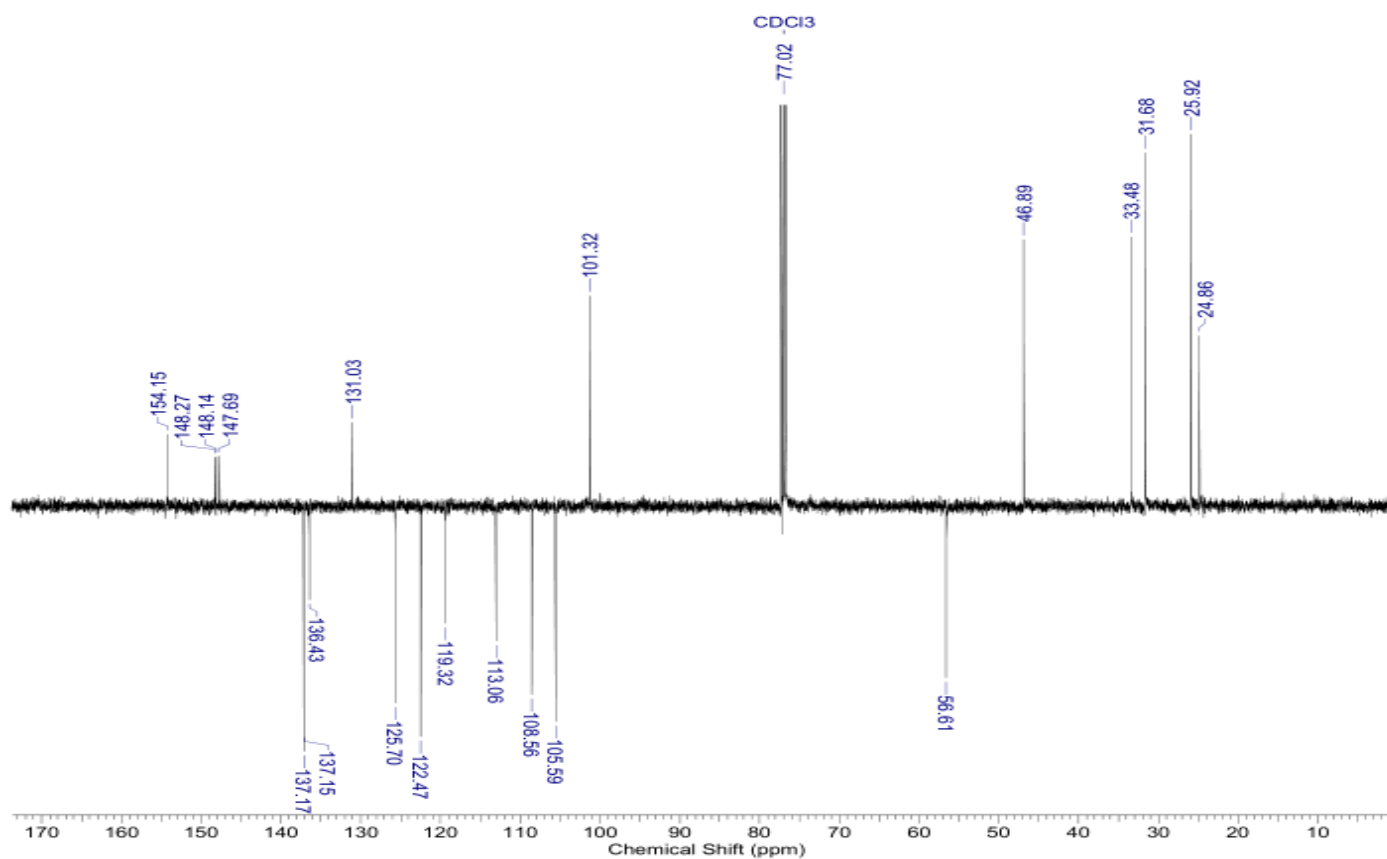


Figura S84. ¹³C-NMR DEPT-135 de H4 em CDCl₃.

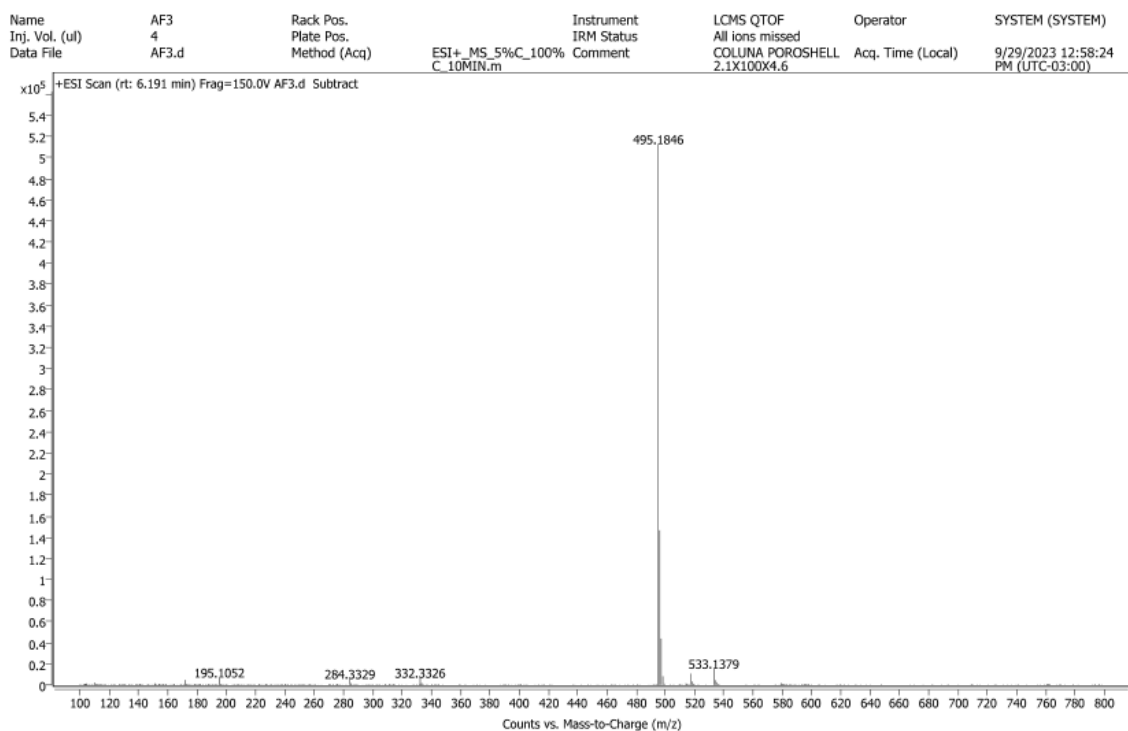


Figura S85. HRMS-TOF (MS⁺) de **H4**.

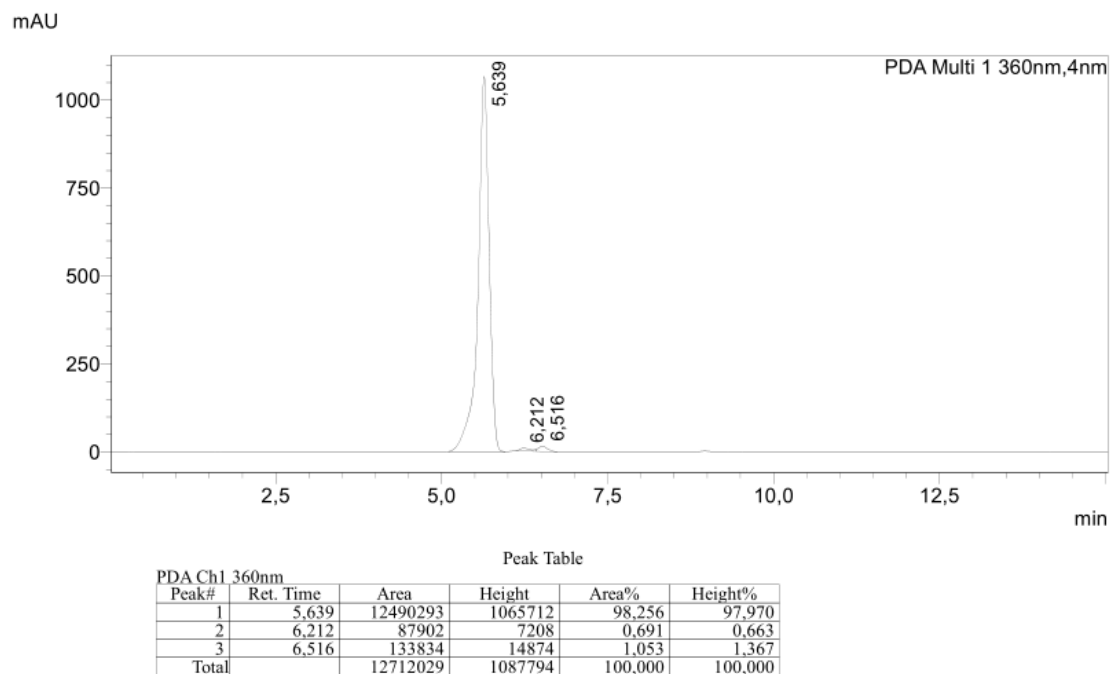
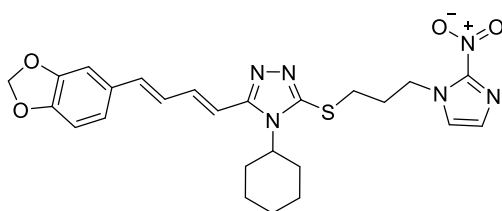


Figura S86. Cromatograma de CLAE de **H4**.

H5



3-((1*E*,3*E*)-4-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4-cyclohexyl-5-((3-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propyl)thio)-4*H*-1,2,4-triazole

Chemical Formula: C₂₅H₂₈N₆O₄S

Exact Mass: 508,19

Molecular Weight: 508,60

Elemental Analysis: C, 59.04; H, 5.55; N, 16.52; O, 12.58; S, 6.30

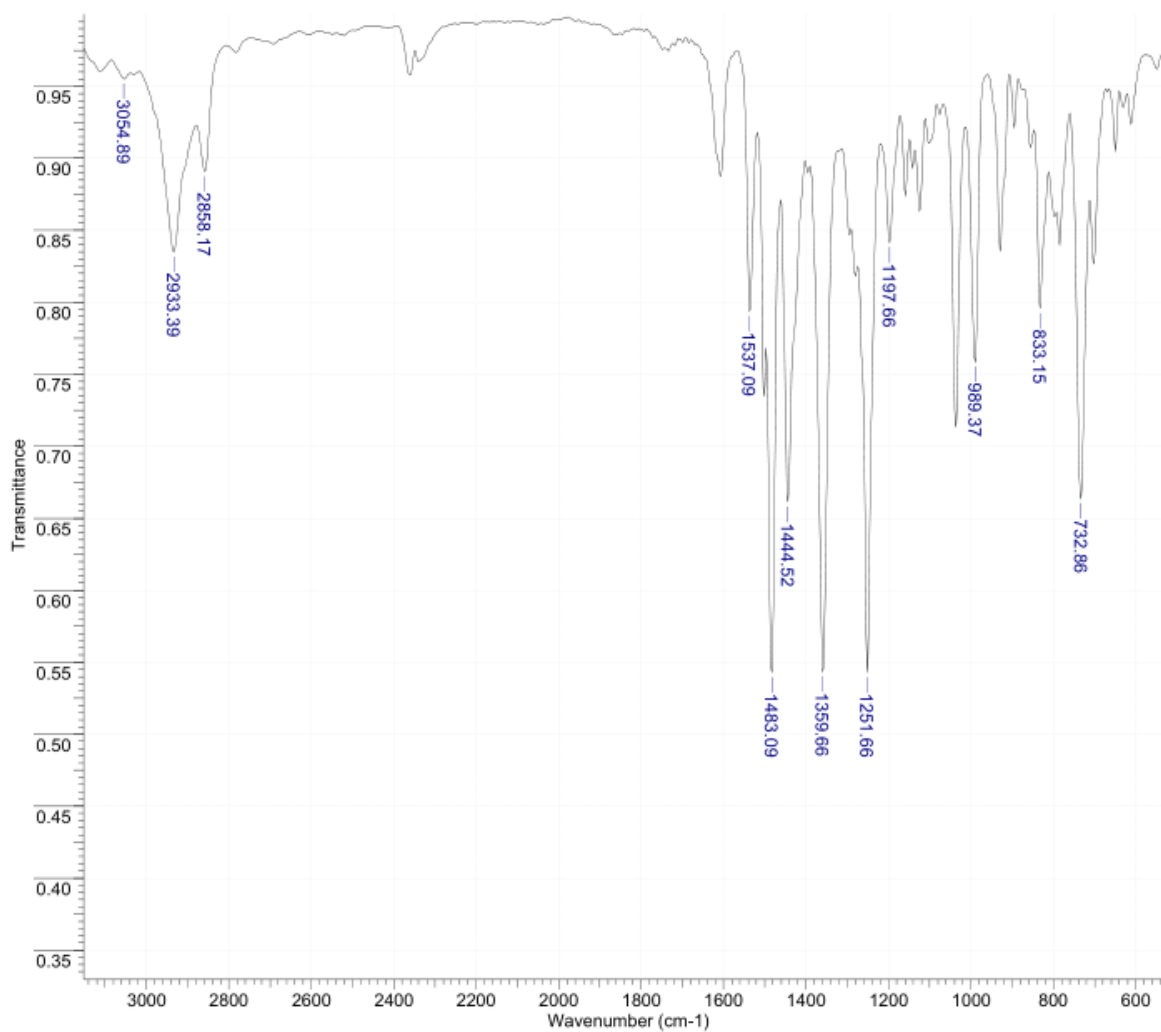


Figura S87. FT-IR de **H5**.

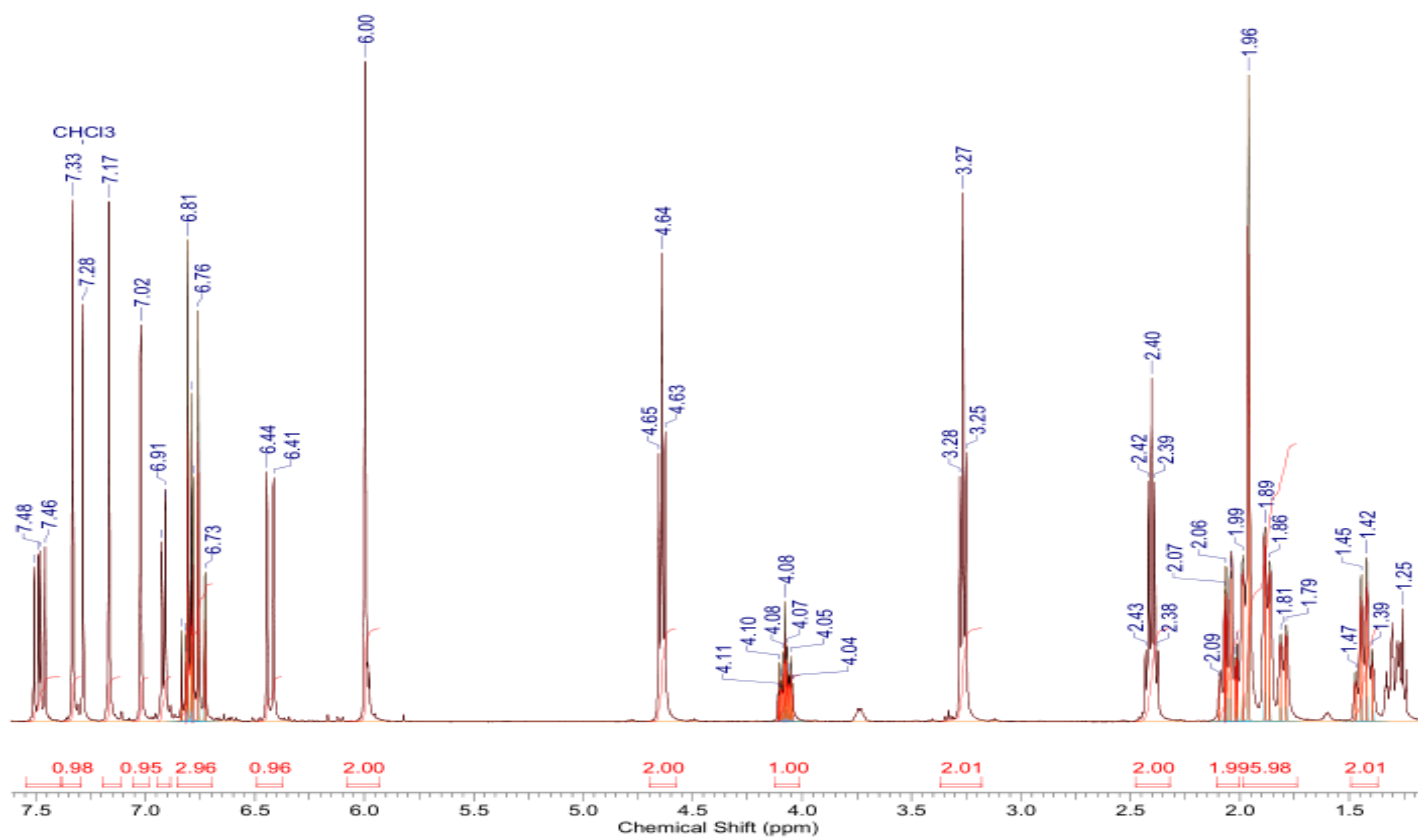


Figura S88. ¹H-NMR de **H5** em CDCl₃.

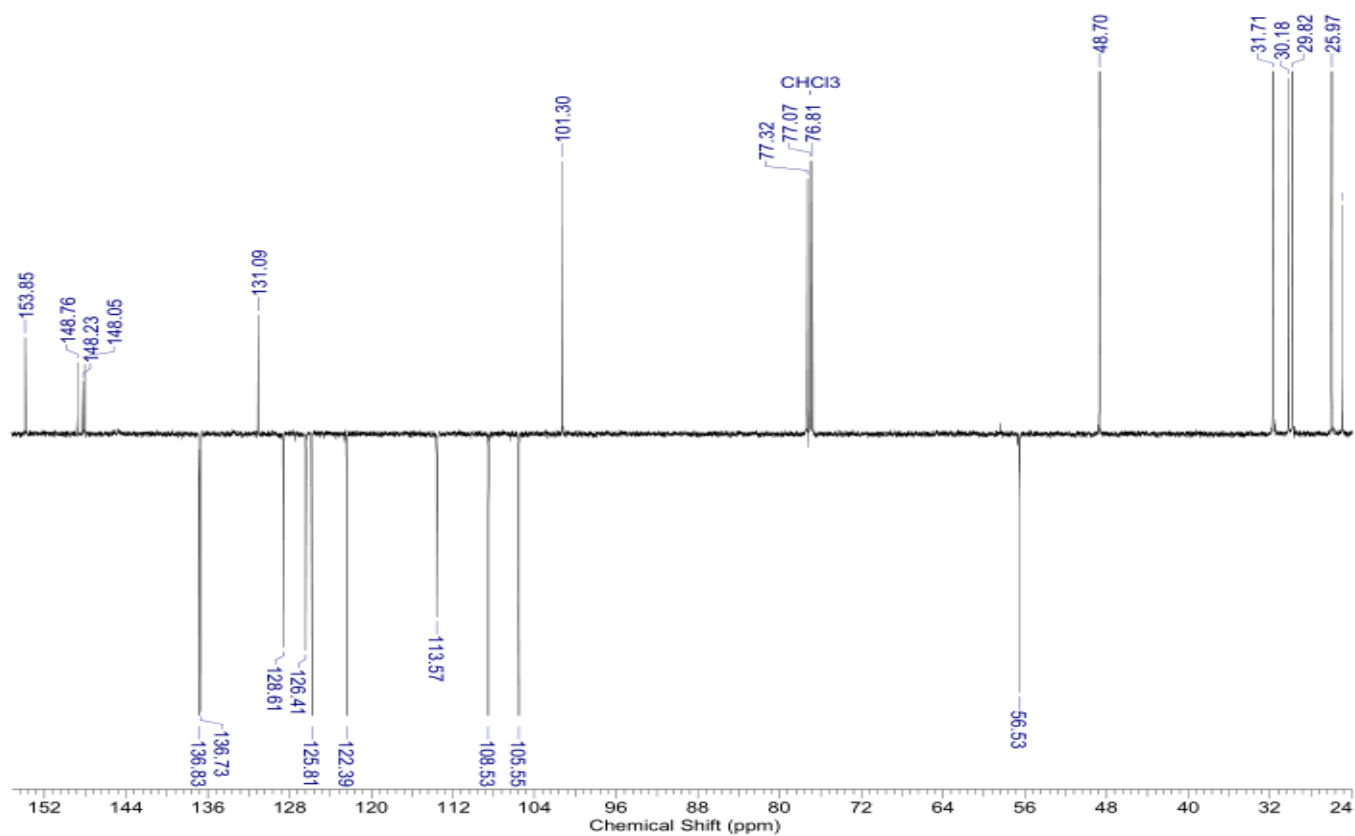


Figura S89. ¹³C-NMR DEPT-135 de **H5** em CDCl₃.

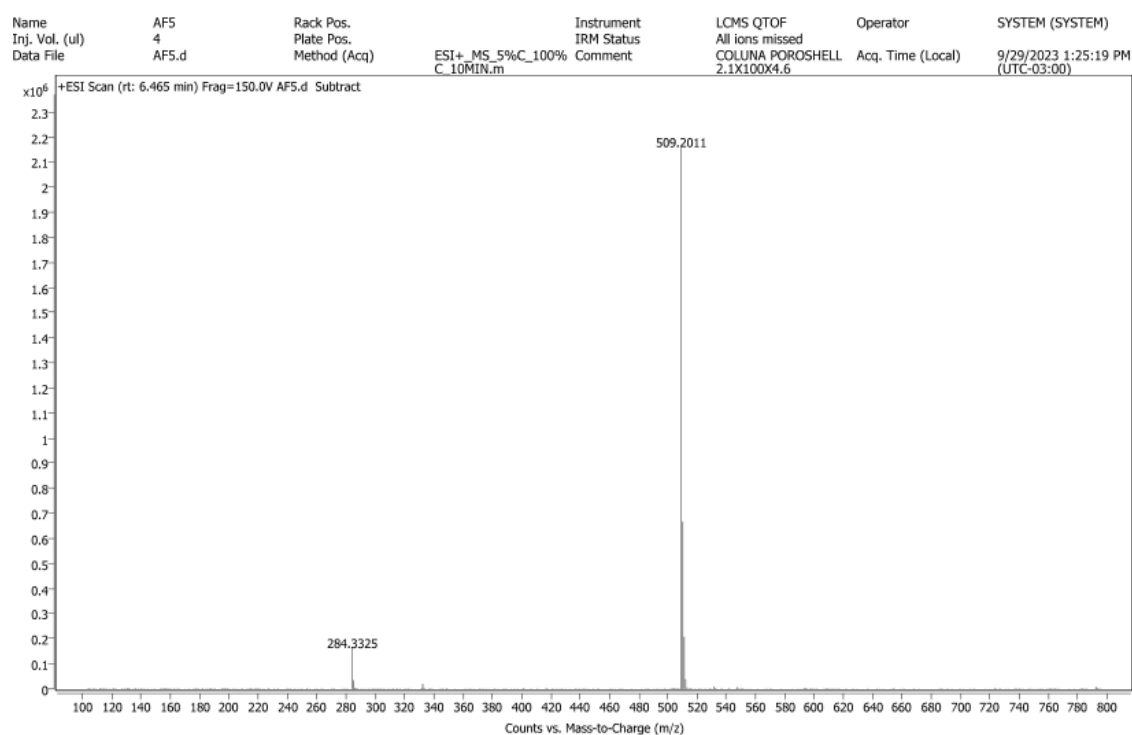


Figura S90. HRMS-TOF (MS+) de **H5**.

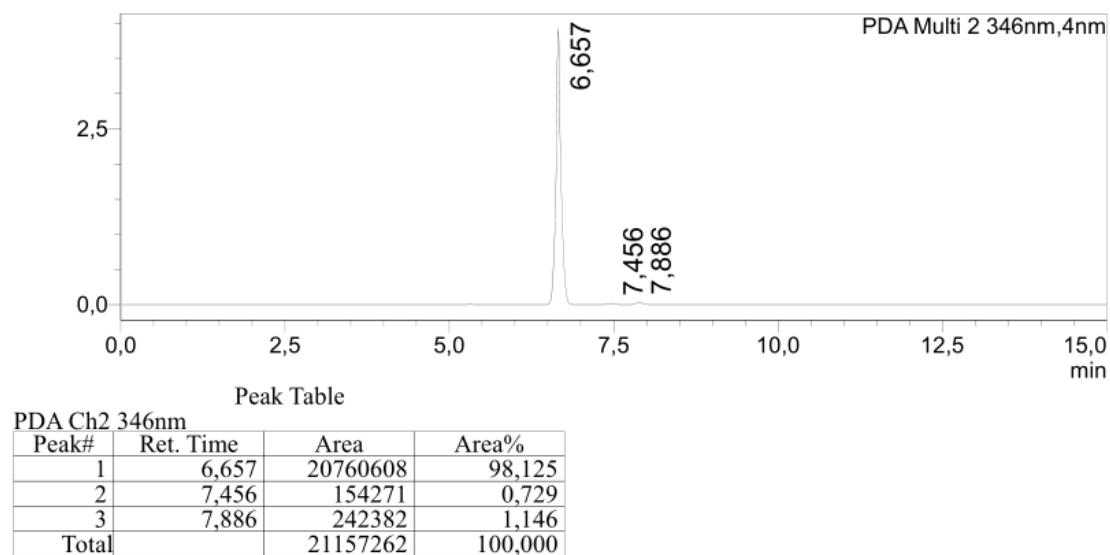
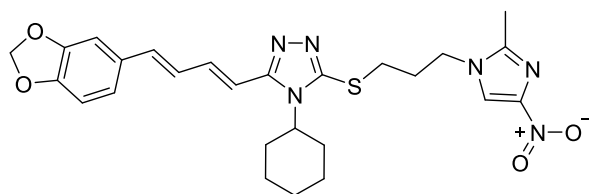


Figura S91. Cromatograma de CLAE de **H5**.

H6



3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4-cyclohexyl-5-((3-(2-methyl-4-nitro-1H-imidazol-1-yl)propyl)thio)-4H-1,2,4-triazole

Chemical Formula: $C_{26}H_{30}N_6O_4S$

Exact Mass: 522,20

Molecular Weight: 522,62

Elemental Analysis: C, 59.75; H, 5.79; N, 16.08; O, 12.25; S, 6.13

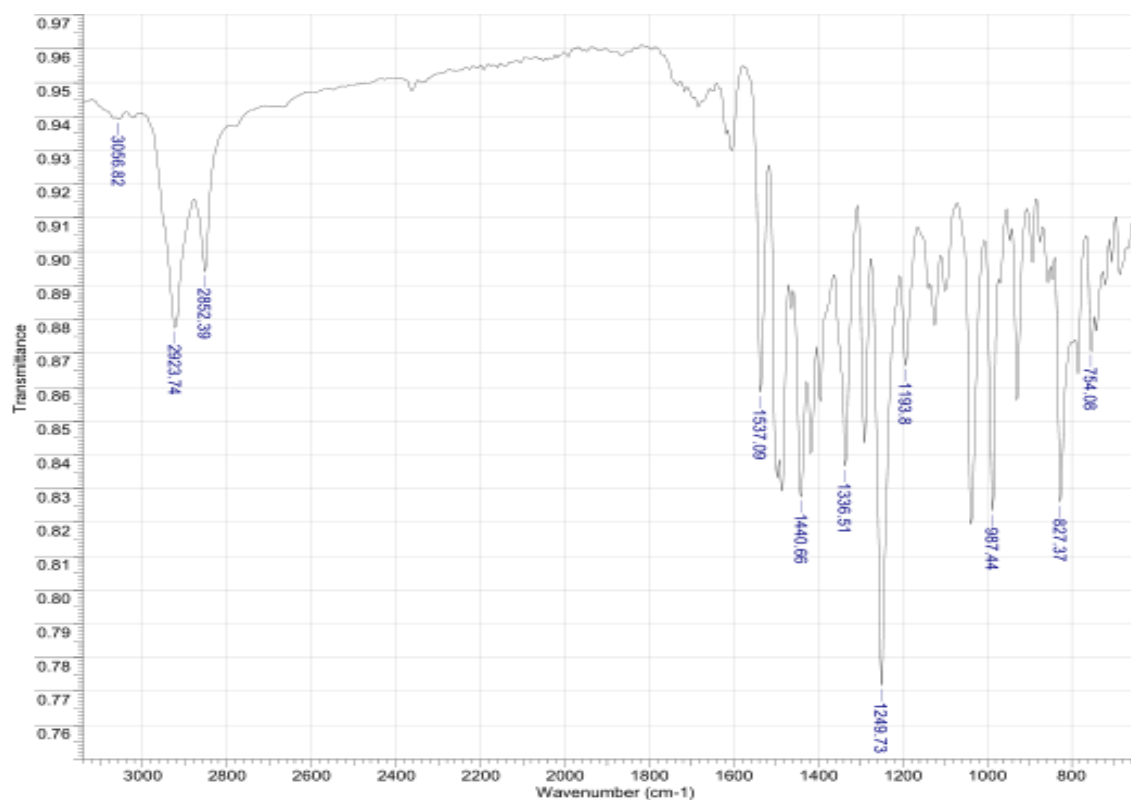


Figura S92. FT-IR de H6.

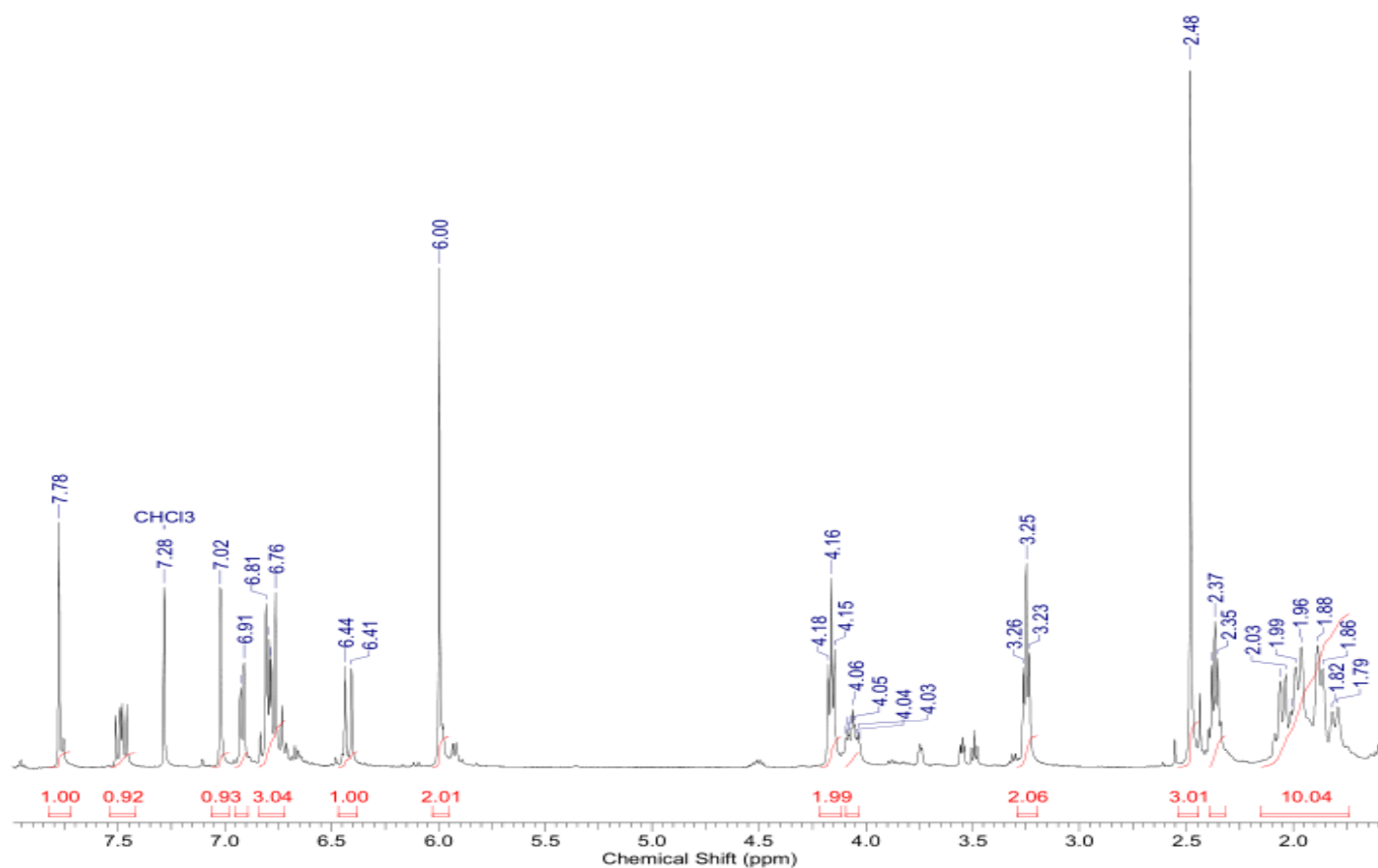


Figura S93. ¹H-NMR de **H6** em CDCl₃.

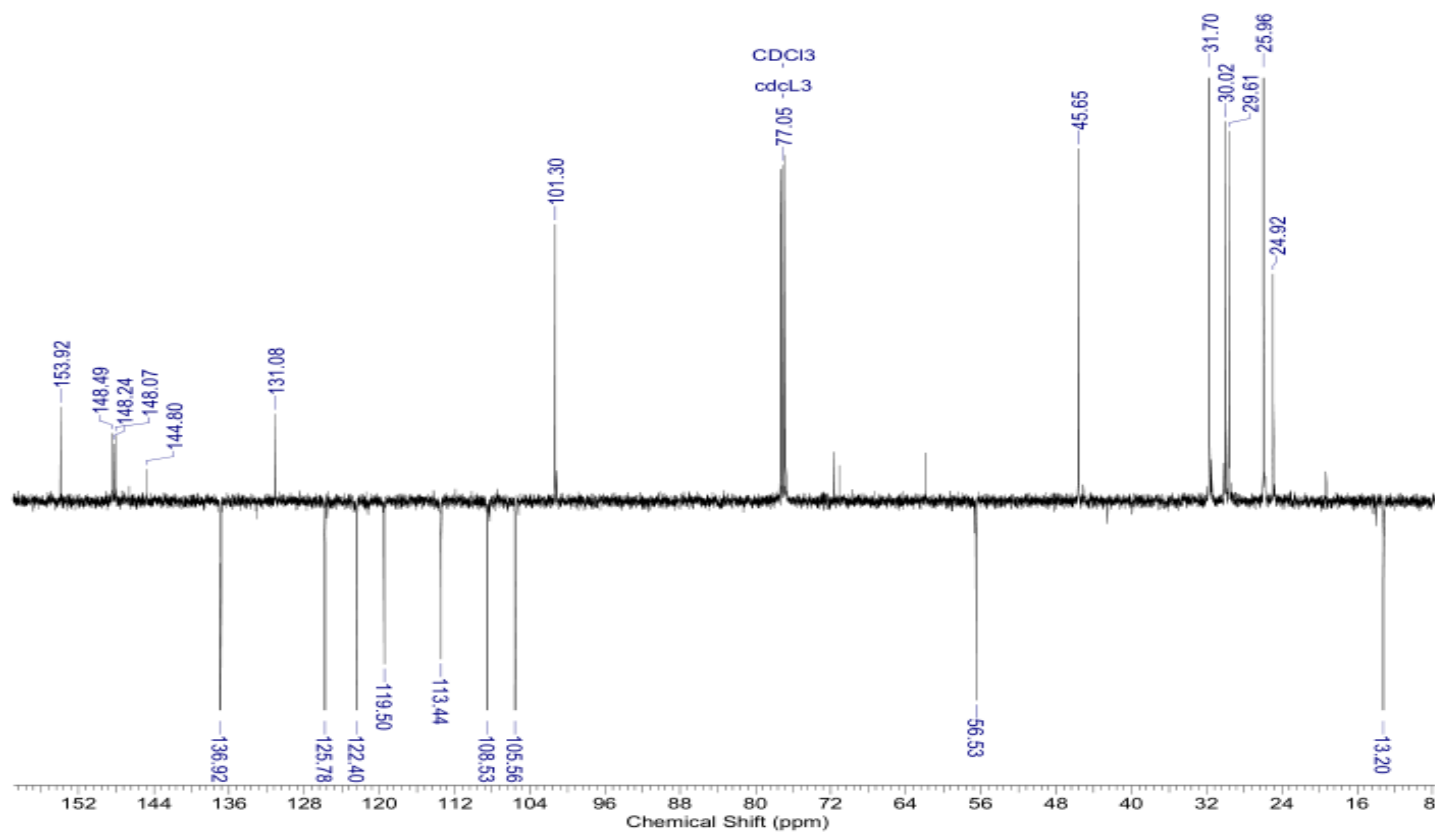


Figura S94. ¹³C-NMR DEPT-135 de **H6** em CDCl₃.

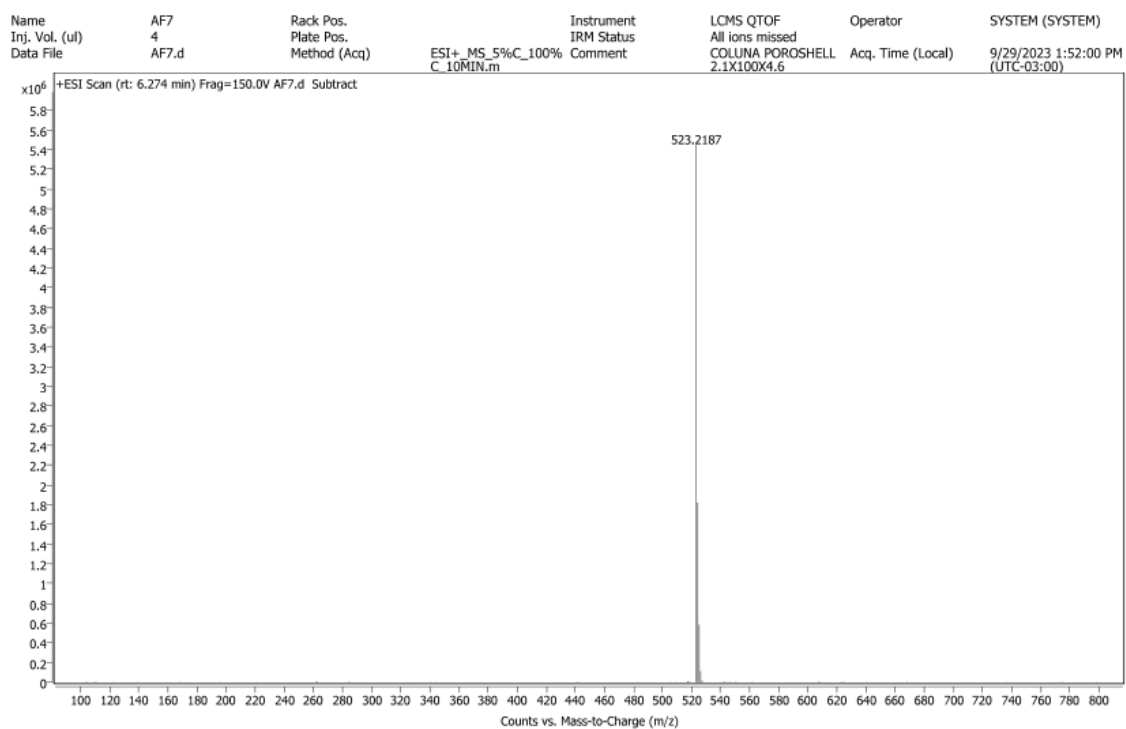


Figura S95. HRMS-TOF (MS+) de **H6**.

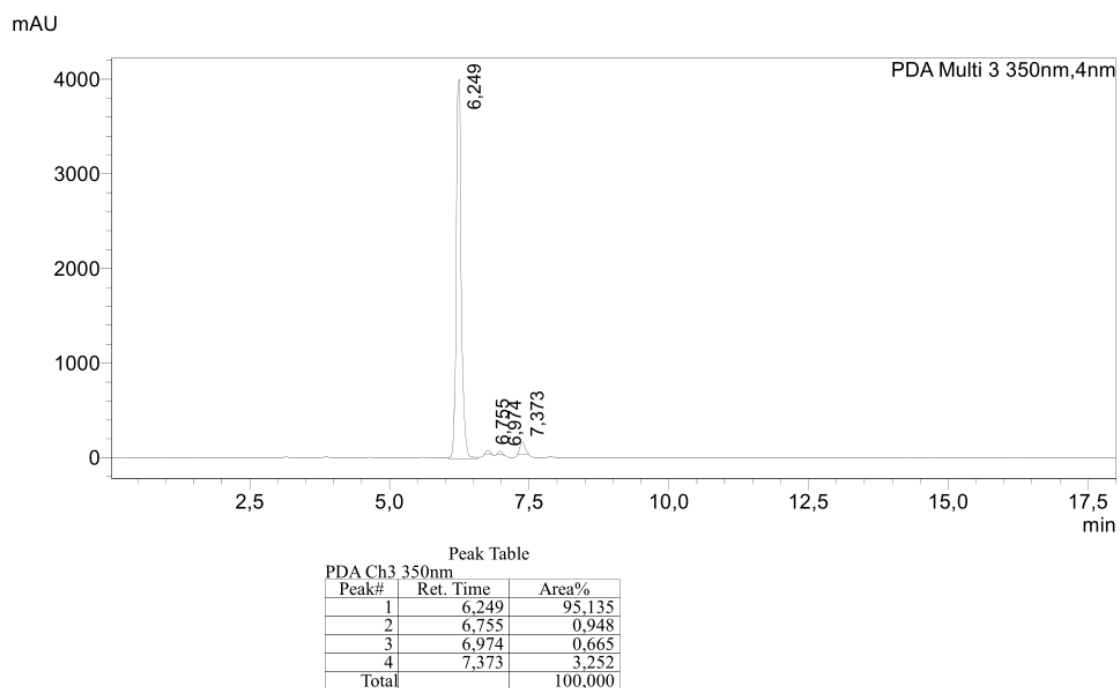
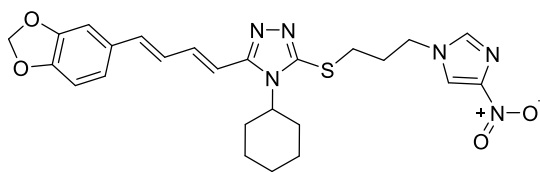


Figura S96. Cromatograma de CLAE de **H6**.

H7



3-((1*E*,3*E*)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4-cyclohexyl-5-((3-(4-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propyl)thio)-4*H*-1,2,4-triazole

Chemical Formula: C₂₅H₂₈N₆O₄S

Exact Mass: 508,19

Molecular Weight: 508,60

Elemental Analysis: C, 59.04; H, 5.55; N, 16.52; O, 12.58; S, 6.30

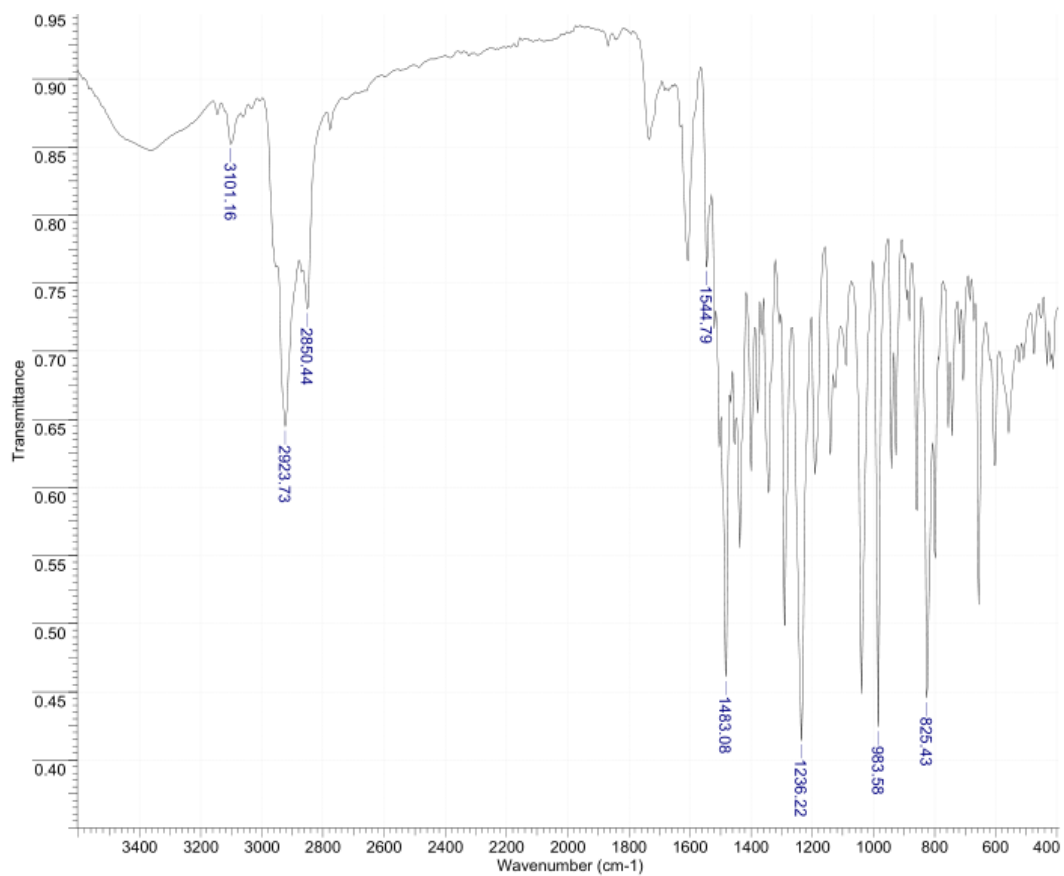


Figura S97. FT-IR de H7.

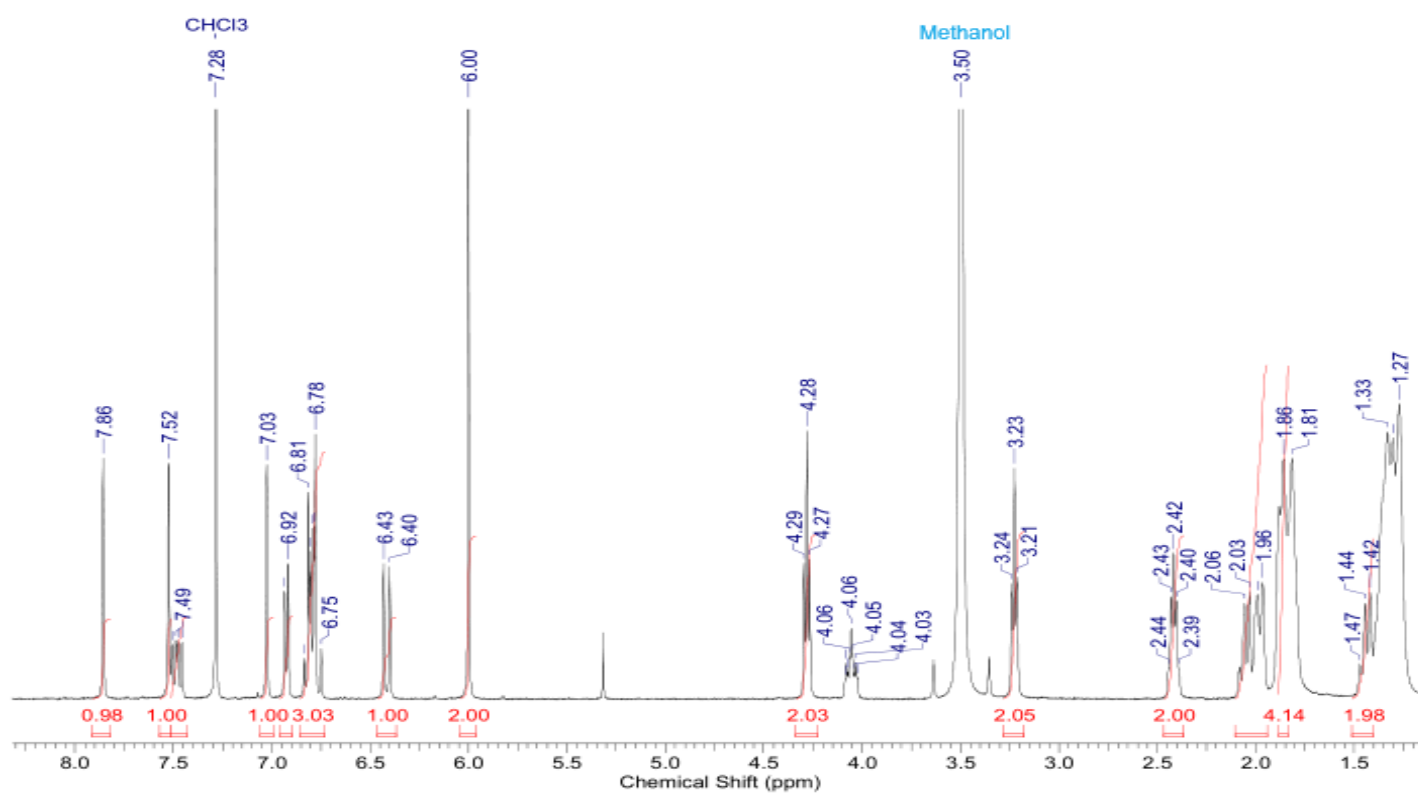


Figura S98. ¹H-NMR de **H7** em CDCl₃.

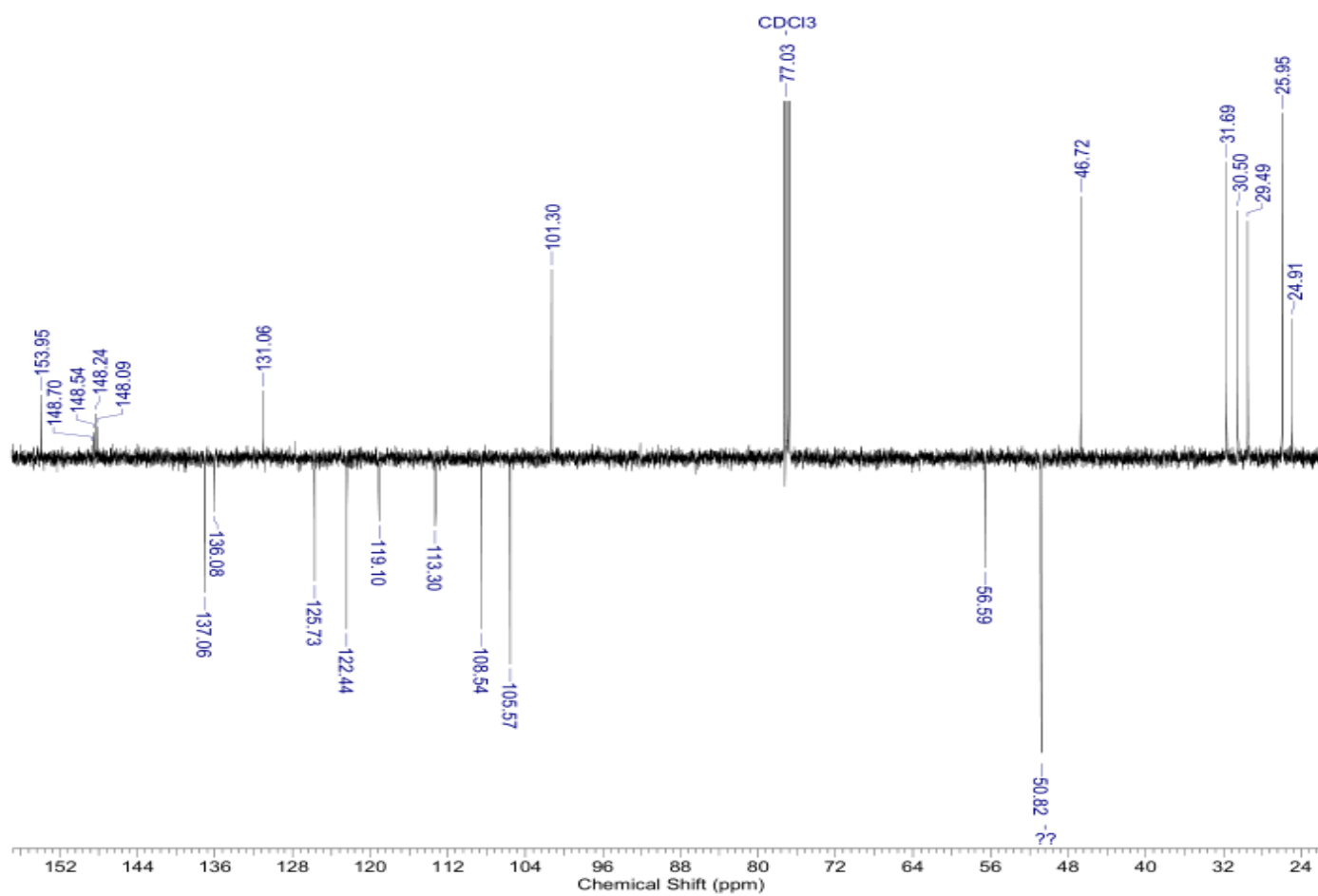


Figura S99. ¹³C-NMR DEPT-135 de **H7** em CDCl₃.

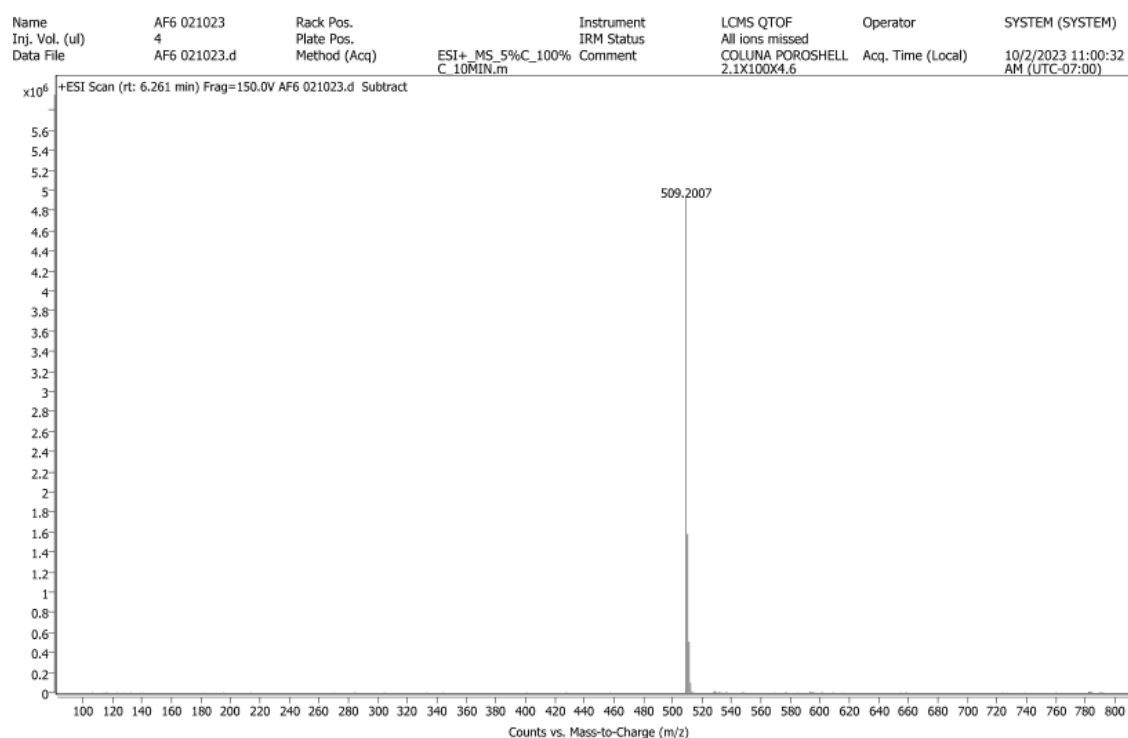
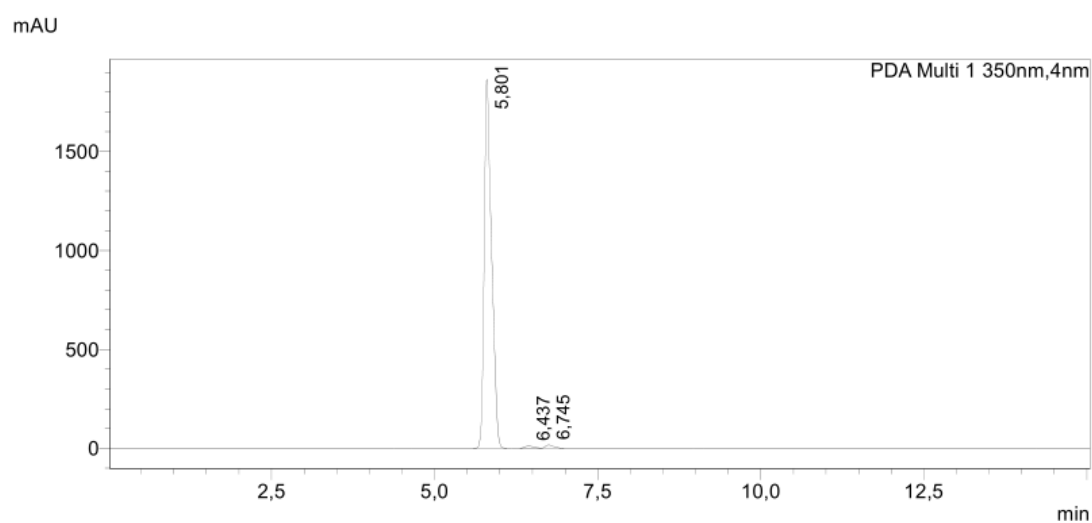


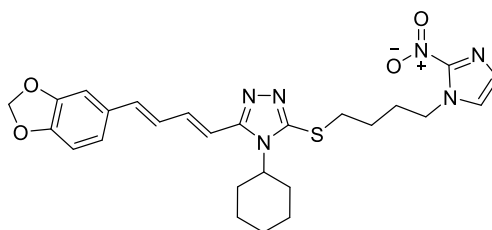
Figura S100. HRMS-TOF (MS+) de **H7**.



Peak Table					
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	5.801	14645667	1861860	98.361	98.507
2	6.437	98825	11666	0.664	0.617
3	6.745	145169	16557	0.975	0.876
Total		14889660	1890083	100.000	100.000

Figura S101. Cromatograma de CLAE de **H7**.

H8



3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4-cyclohexyl-5-((4-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)butyl)thio)-4H-1,2,4-triazole

Chemical Formula: C₂₆H₃₀N₆O₄S

Exact Mass: 522,20

Molecular Weight: 522,62

Elemental Analysis: C, 59.75; H, 5.79; N, 16.08; O, 12.25; S, 6.13

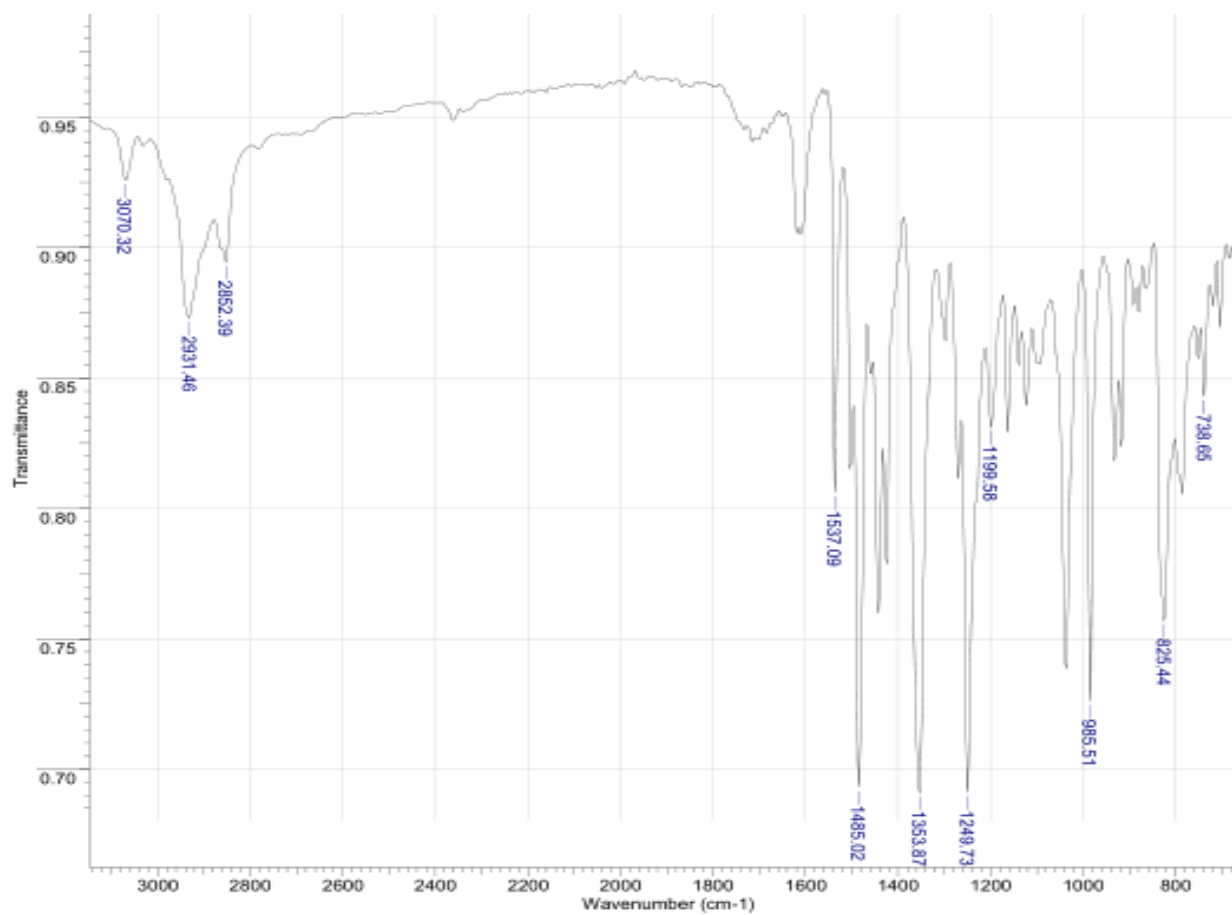


Figura S102. FT-IR de **H8**.

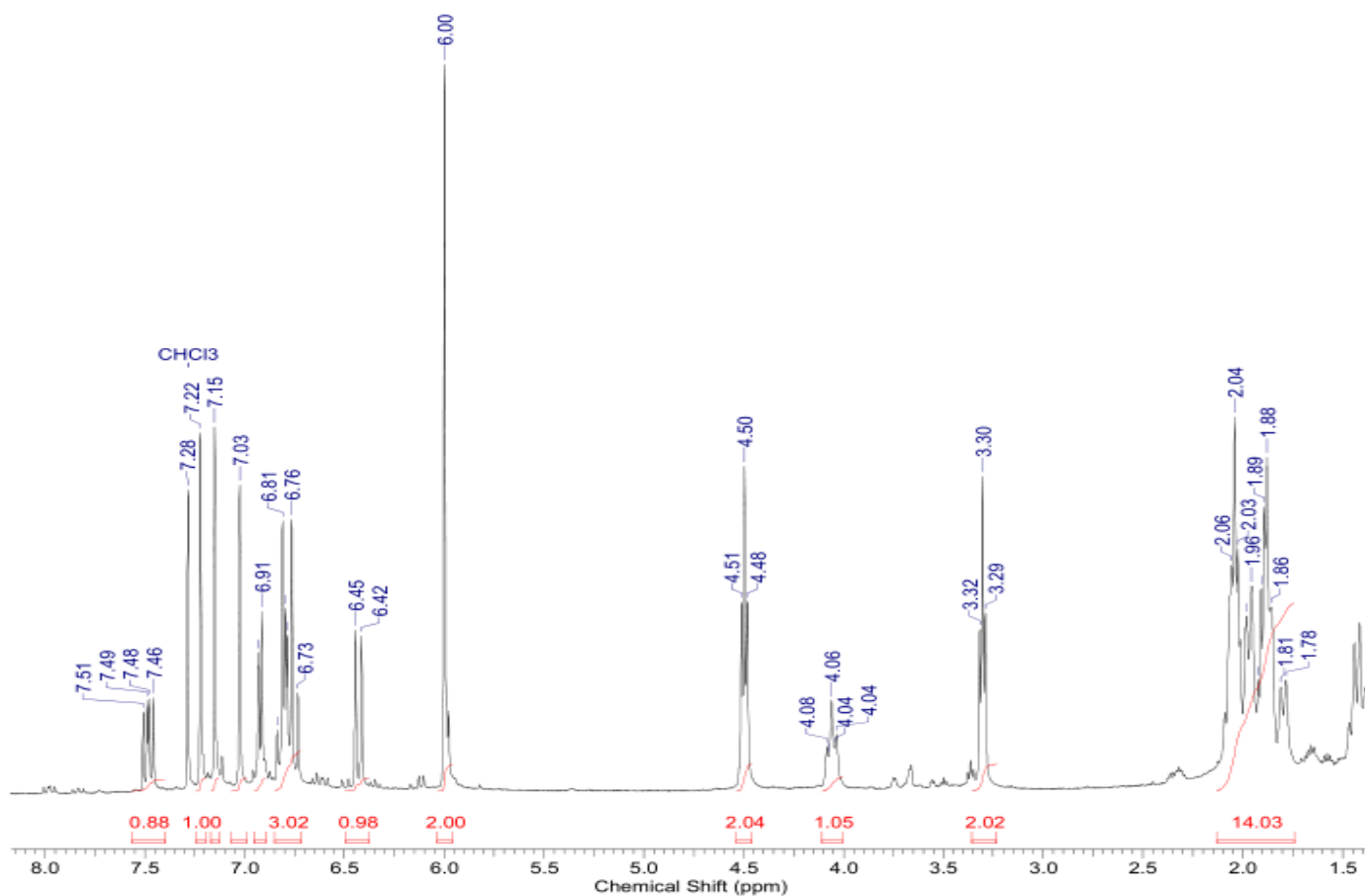


Figura S103. ¹H-NMR de H8 em CDCl₃.

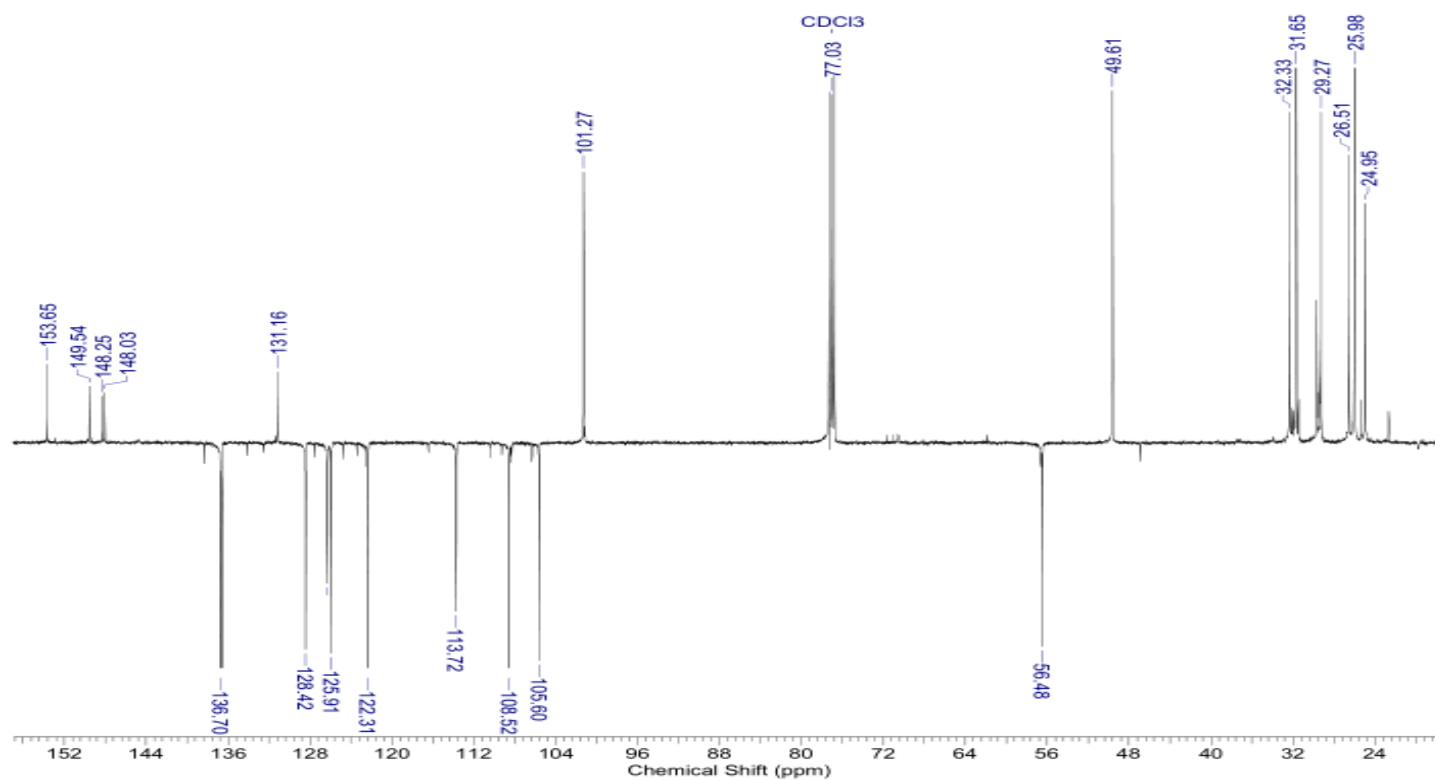


Figura S104. ¹³C-NMR DEPT-135 de H8 em CDCl₃.

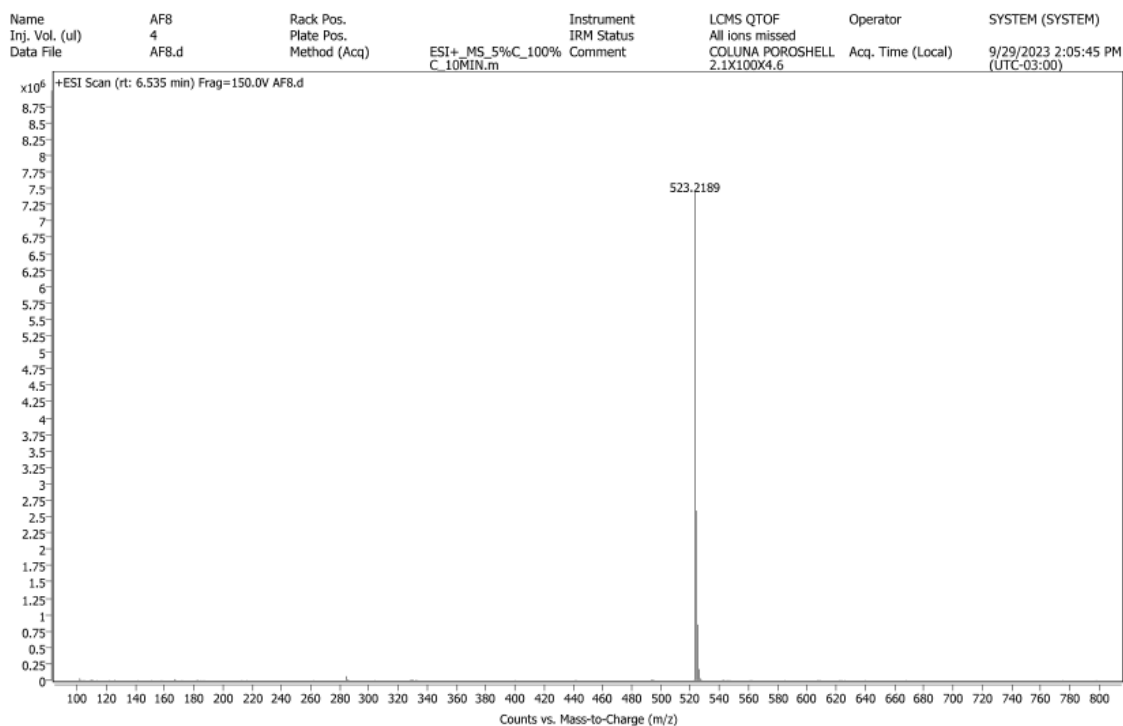
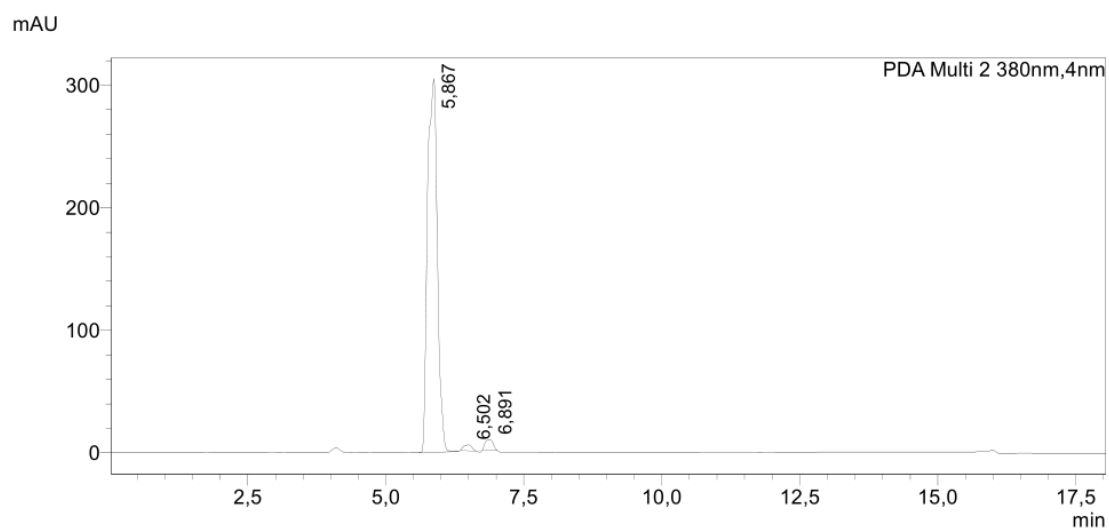


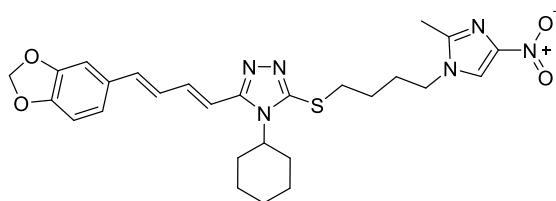
Figura S105. HRMS-TOF (MS+) de **H8**.



Peak Table		
Peak#	Ret. Time	Area%
1	5.867	96.377
2	6.502	1.293
3	6.891	2.329
Total		100.000

Figura S106. Cromatograma de CLAE de **H8**.

H9



3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4-cyclohexyl-5-((4-(2-methyl-4-nitro-1H-imidazol-1-yl)butyl)thio)-4H-1,2,4-triazole

Chemical Formula: $C_{27}H_{32}N_6O_4S$

Exact Mass: 536,22

Molecular Weight: 536,65

Elemental Analysis: C, 60.43; H, 6.01; N, 15.66; O, 11.93; S, 5.97

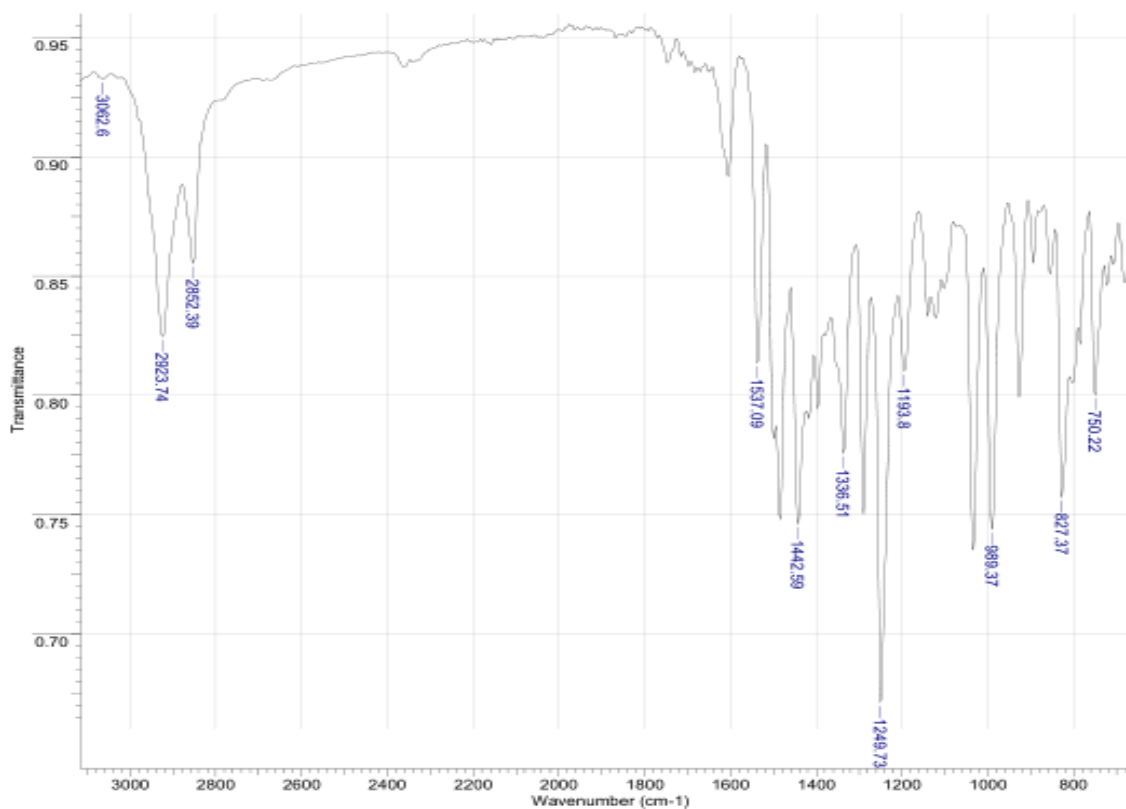


Figura S107. FT-IR de H9.

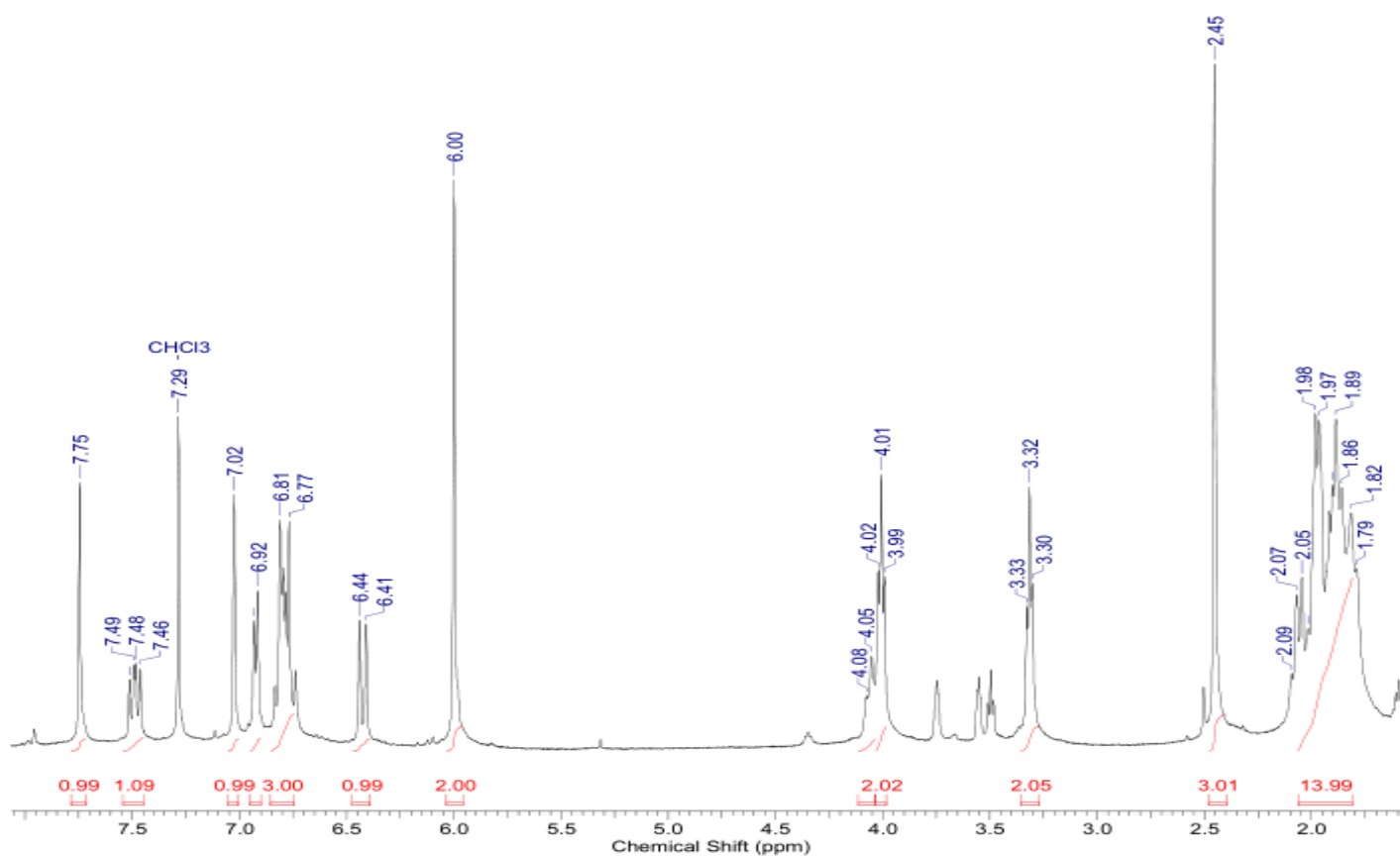


Figura S108. ¹H-NMR de **H9** em CDCl₃.

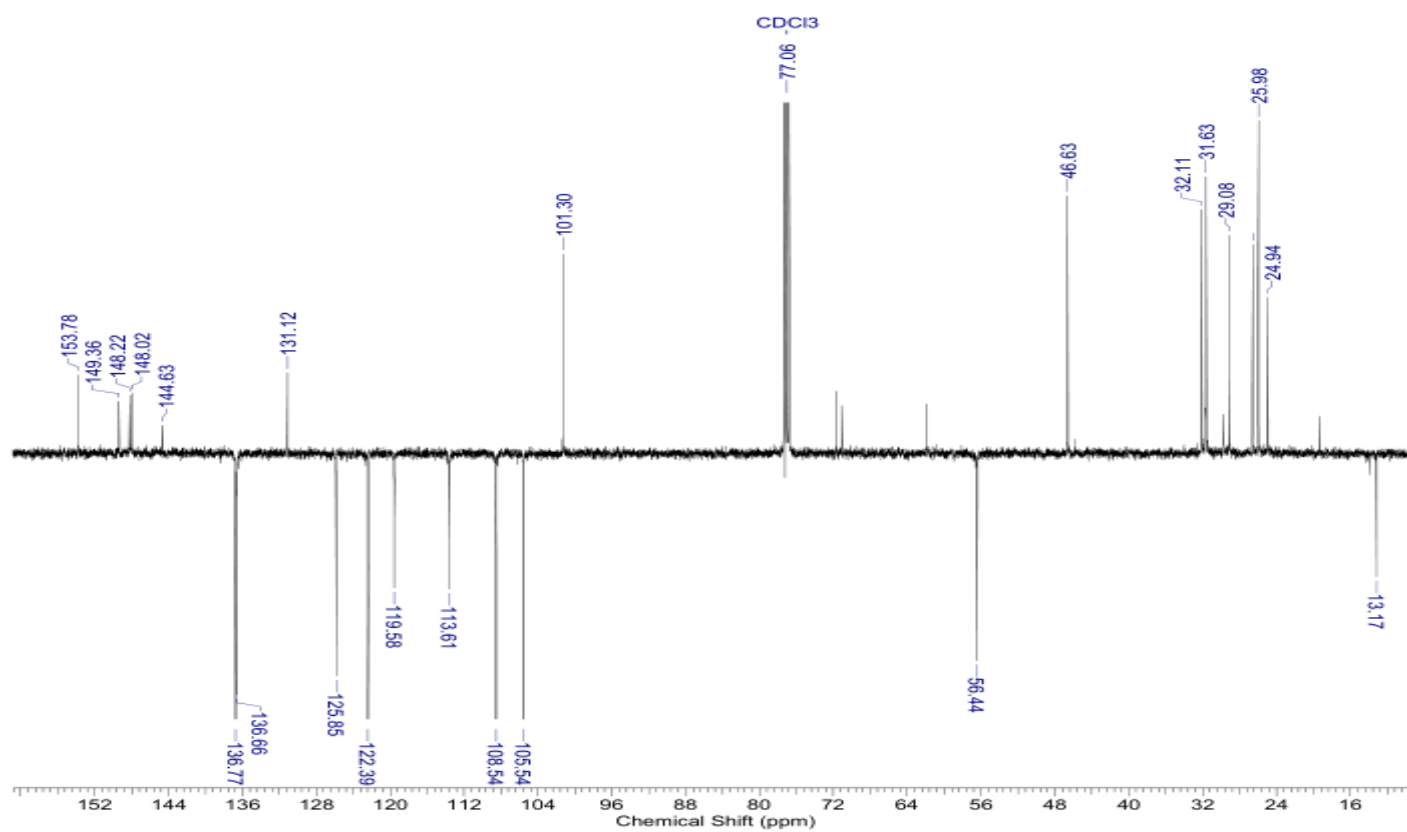


Figura S109. ¹³C-NMR DEPT-135 de **H9** em CDCl₃.

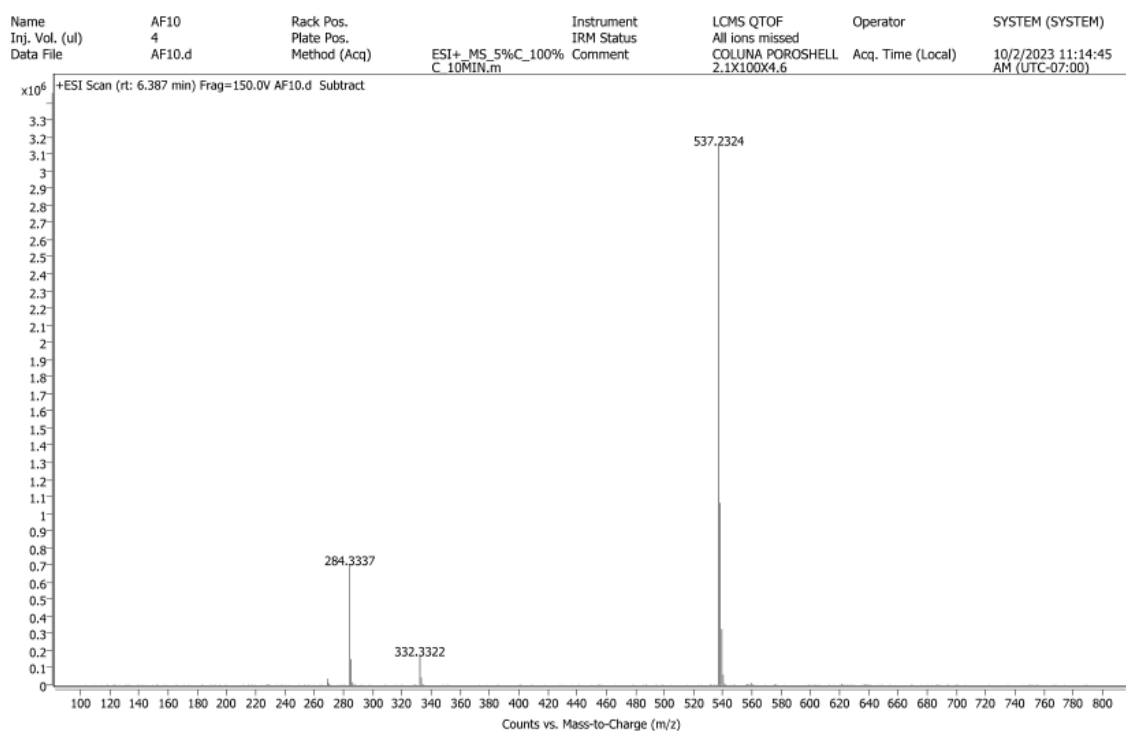


Figura S110. HRMS-TOF (MS⁺) de **H9**.

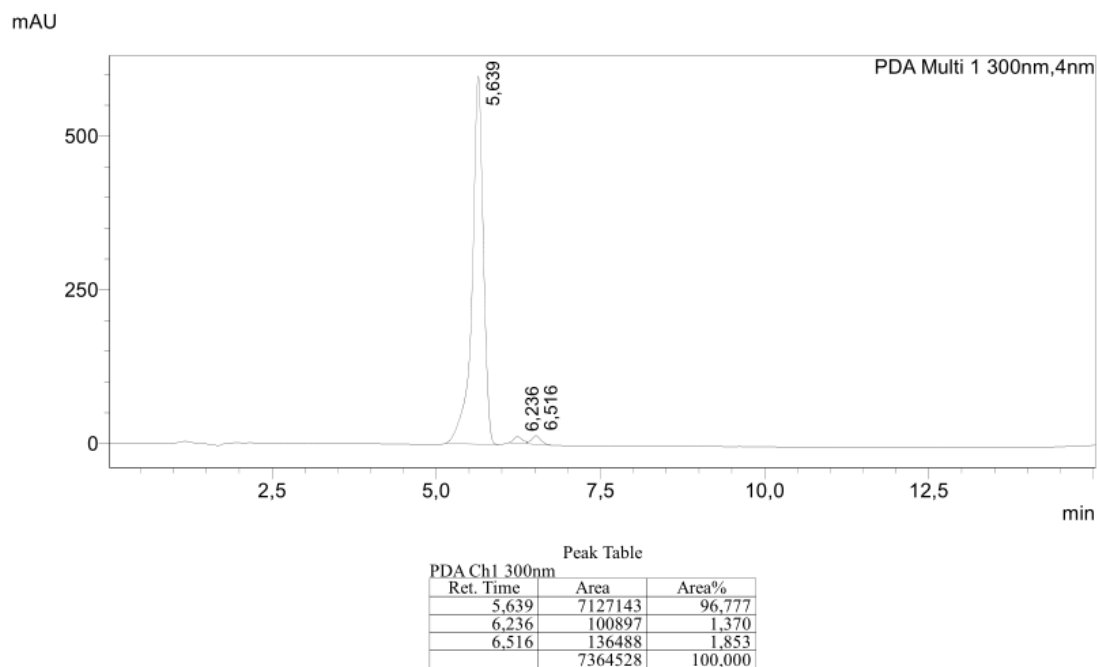
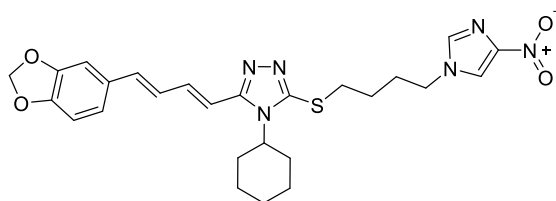


Figura S111. Cromatograma de CLAE de **H9**.

H10



3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4-cyclohexyl-5-((4-(4-nitro-1H-imidazol-1-yl)butyl)thio)-4H-1,2,4-triazole

Chemical Formula: $C_{26}H_{30}N_6O_4S$

Exact Mass: 522,20

Molecular Weight: 522,62

Elemental Analysis: C, 59.75; H, 5.79; N, 16.08; O, 12.25; S, 6.13

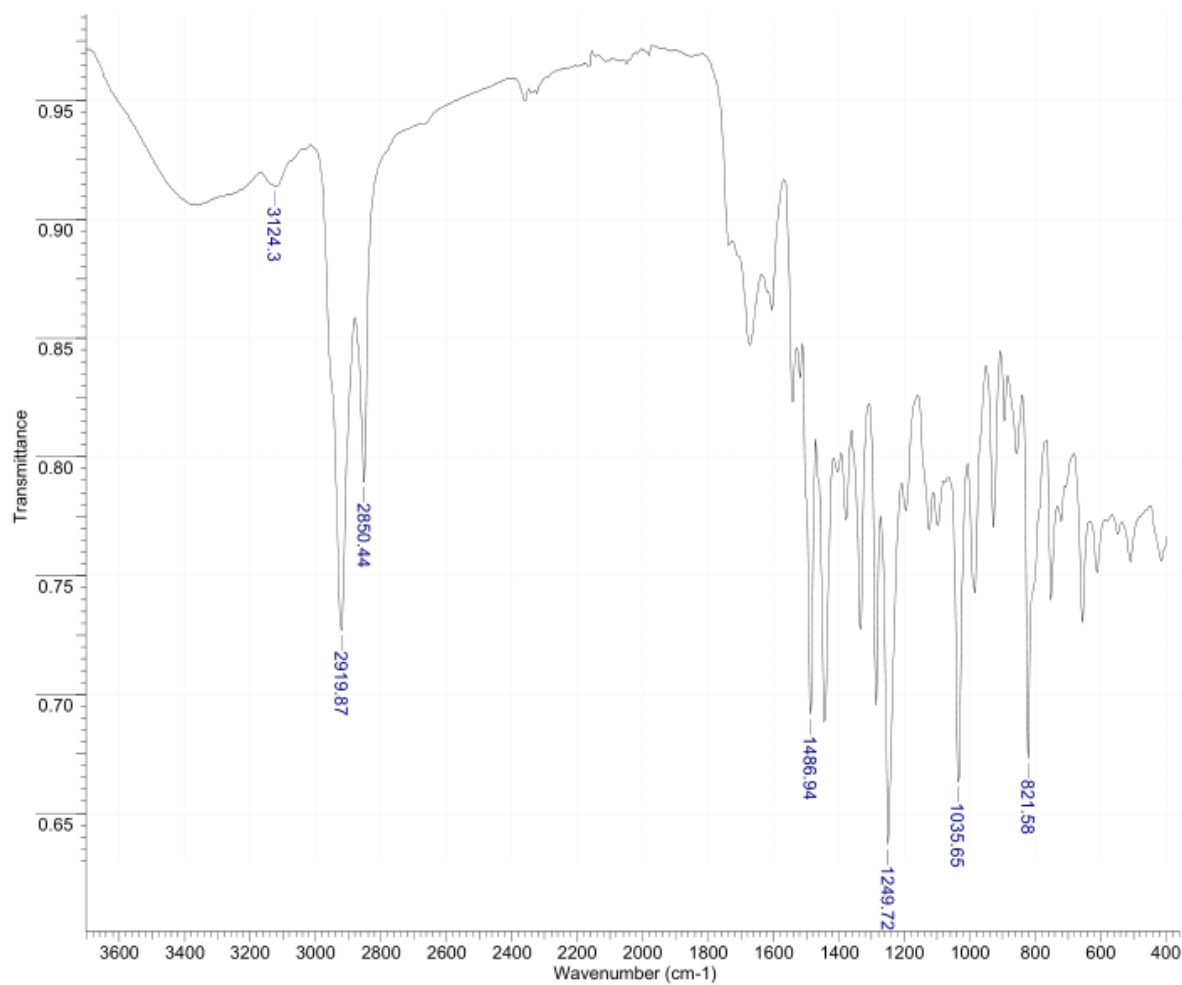


Figura S112. FT-IR de **H10**.

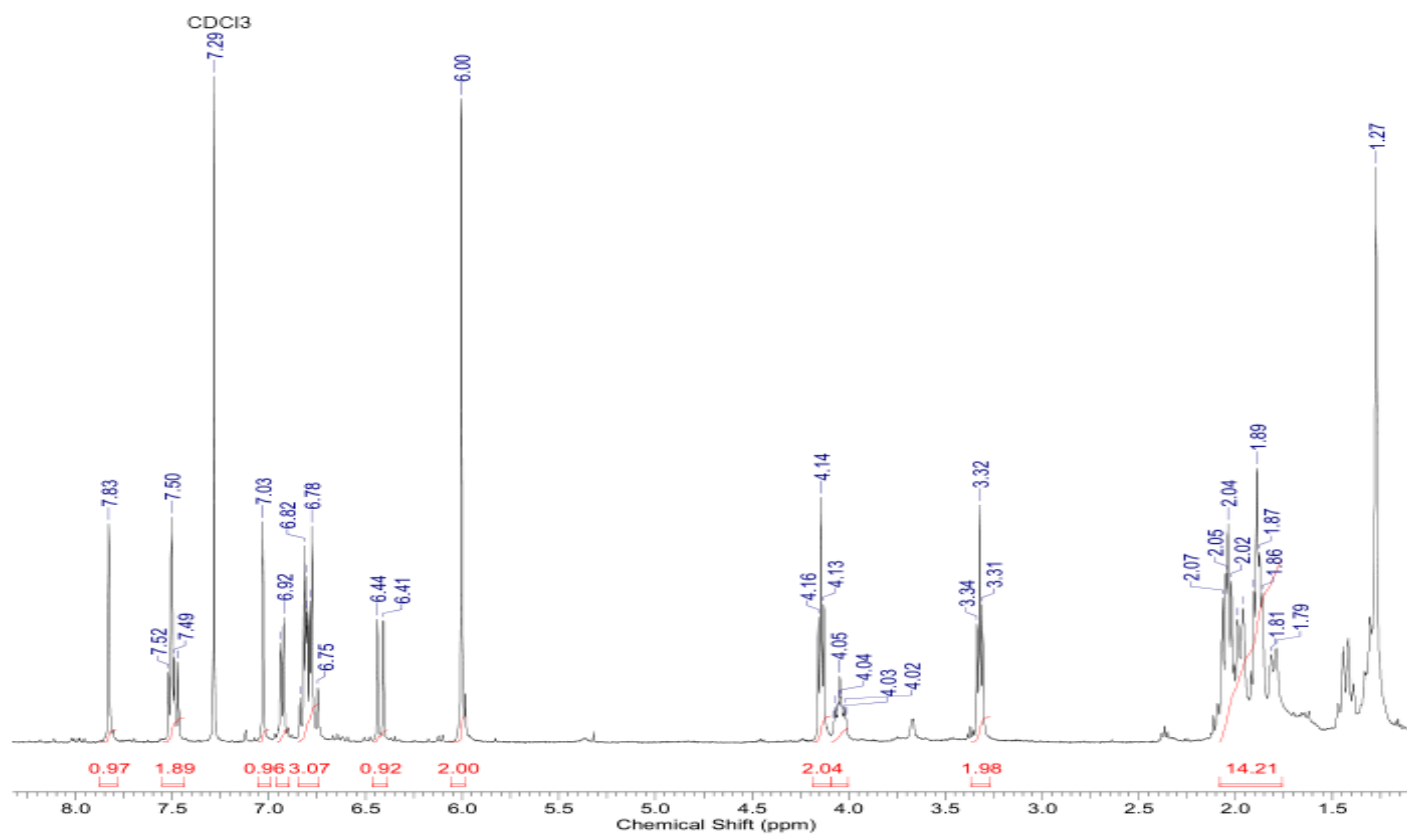


Figura S113. ¹H-NMR de **H10** em CDCl₃.

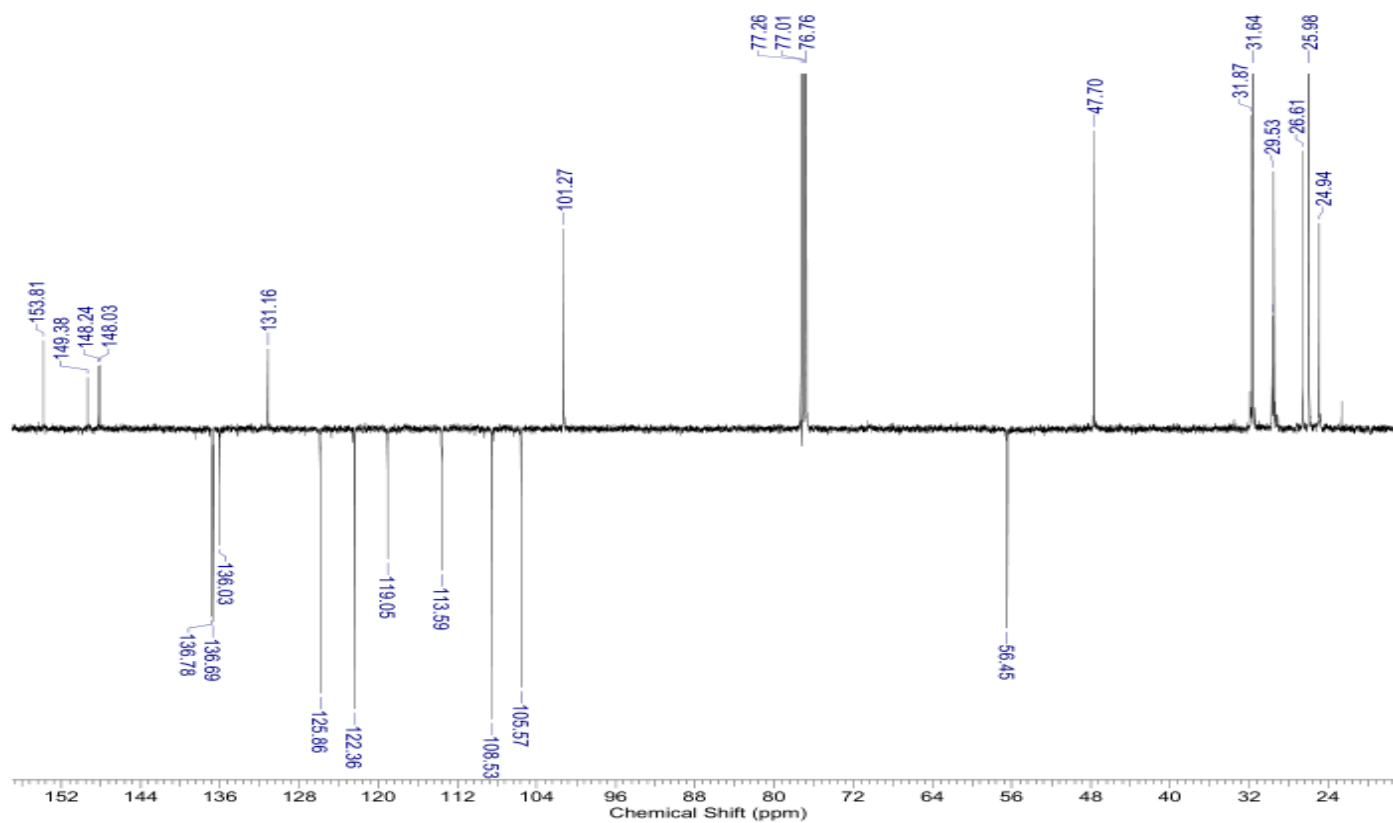


Figura S114. ¹³C-NMR DEPT-135 de **H10** em CDCl₃.

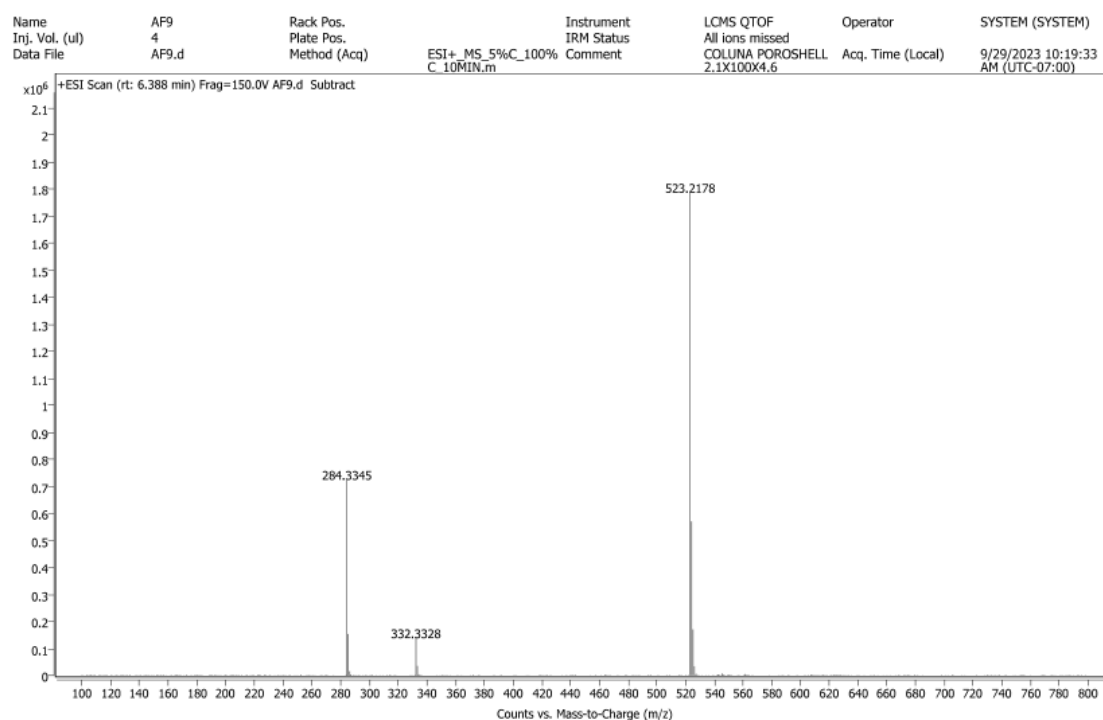


Figura S115. HRMS-TOF (MS⁺) de **H10**.

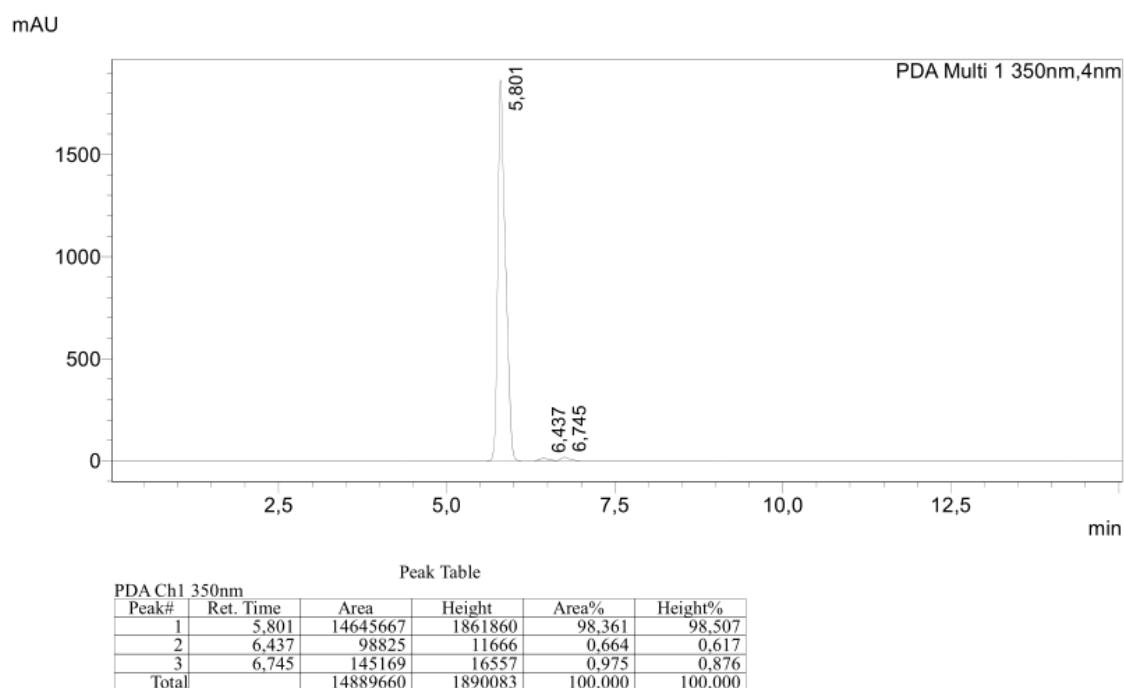
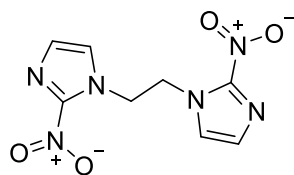


Figura S116. Cromatograma de CLAE de **H10**.

D1



1,2-bis(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethane

Chemical Formula: C₈H₈N₆O₄

Exact Mass: 252,06

Molecular Weight: 252,19

Elemental Analysis: C, 38.10; H, 3.20; N, 33.32; O, 25.38

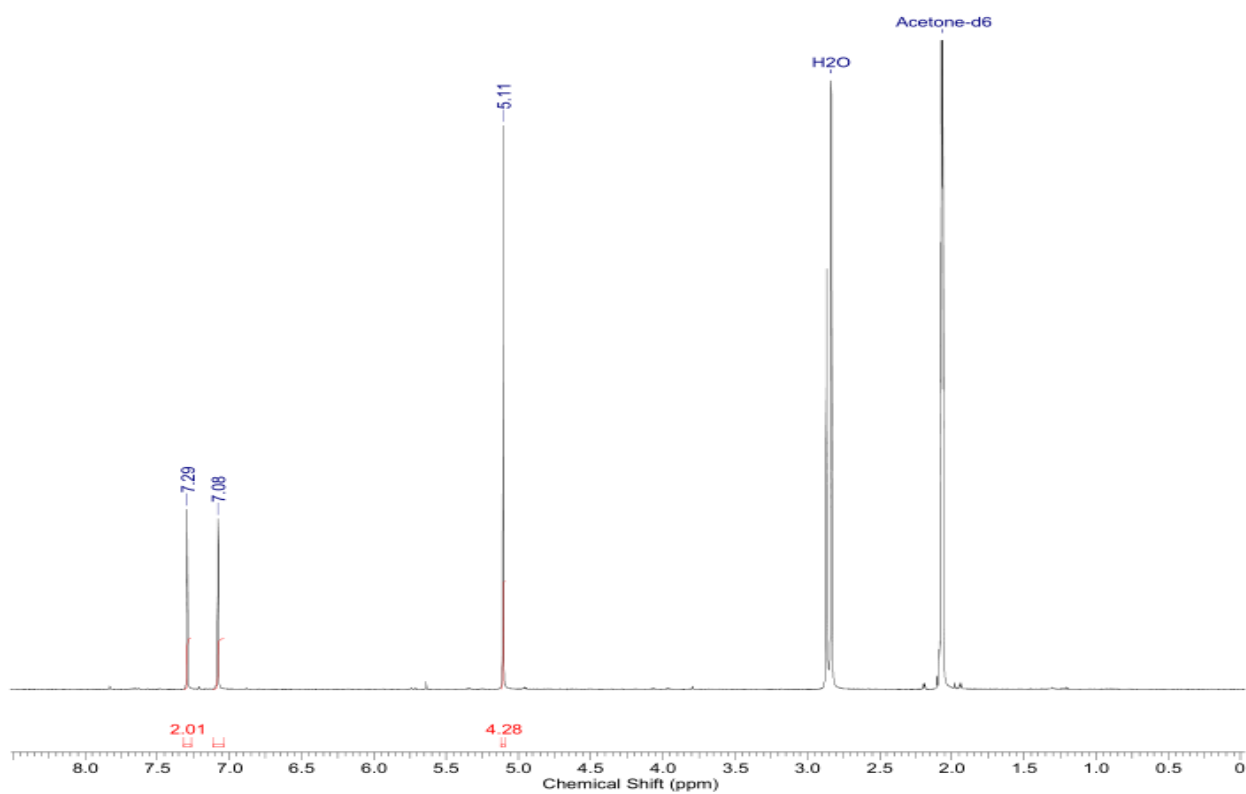


Figura S117. ¹H-NMR de **D1** em Acetona-d₆.

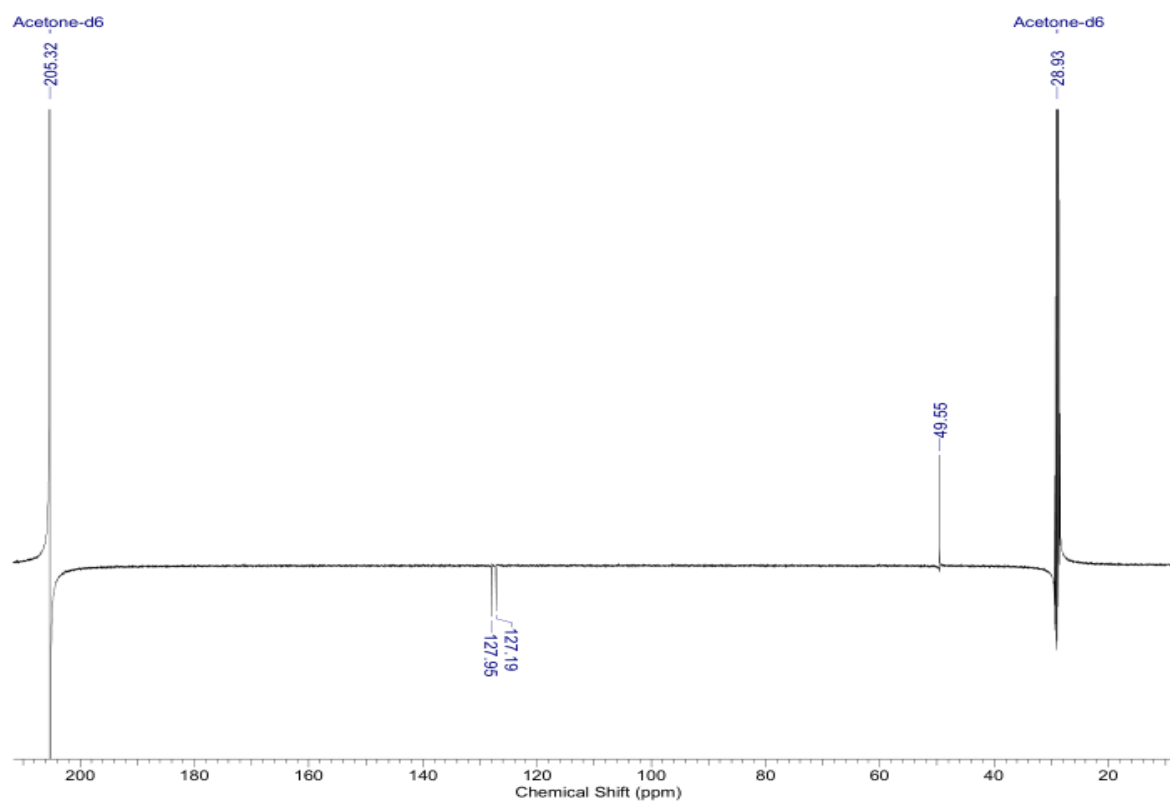


Figura S118. ¹³C-NMR DEPT-135 de D1 em Acetona-d₆.

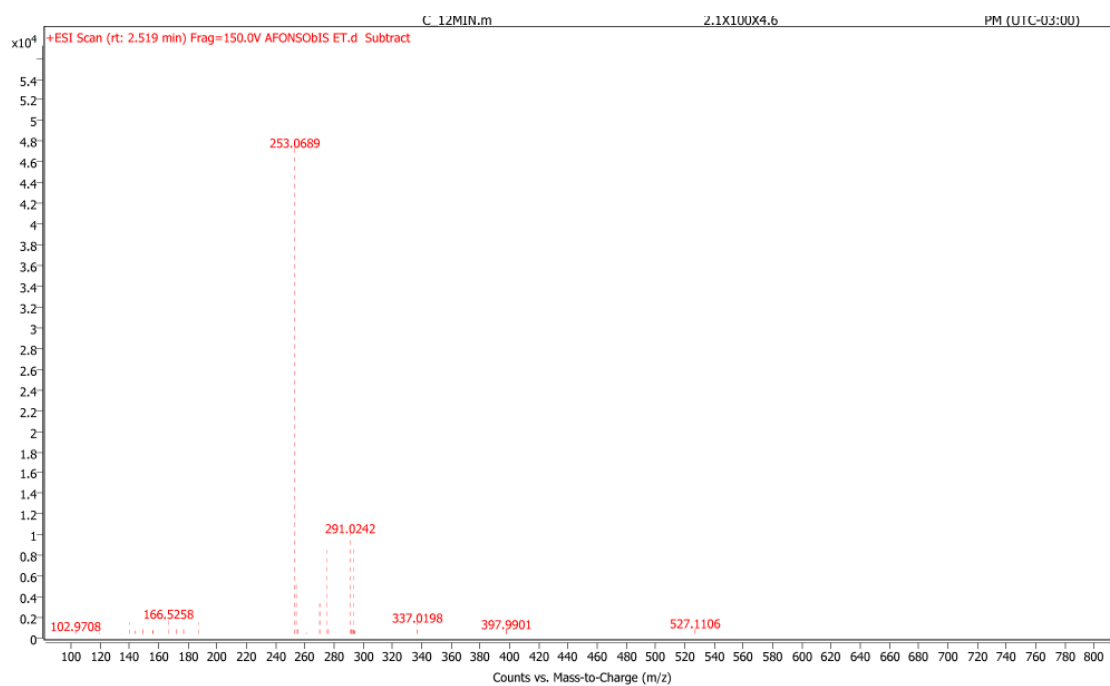
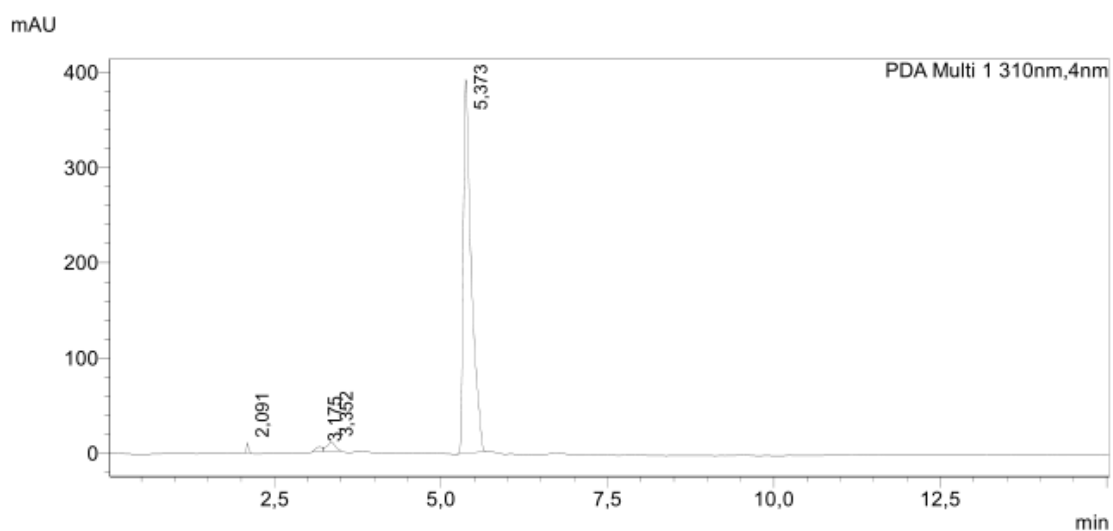


Figura S119. HRMS-TOF (MS⁺) de D1.

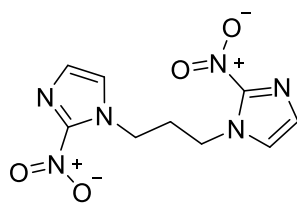


Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	2,091	23815	0,703
2	3,175	37394	1,103
3	3,352	81910	2,417
4	5,373	3246094	95,777
Total		3389213	100,000

Figura S120. Cromatograma de CLAE de **D1**.

D2



1,3-bis(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propane

Chemical Formula: C₉H₁₀N₆O₄

Exact Mass: 266,08

Molecular Weight: 266,22

Elemental Analysis: C, 40.61; H, 3.79; N, 31.57; O, 24.04

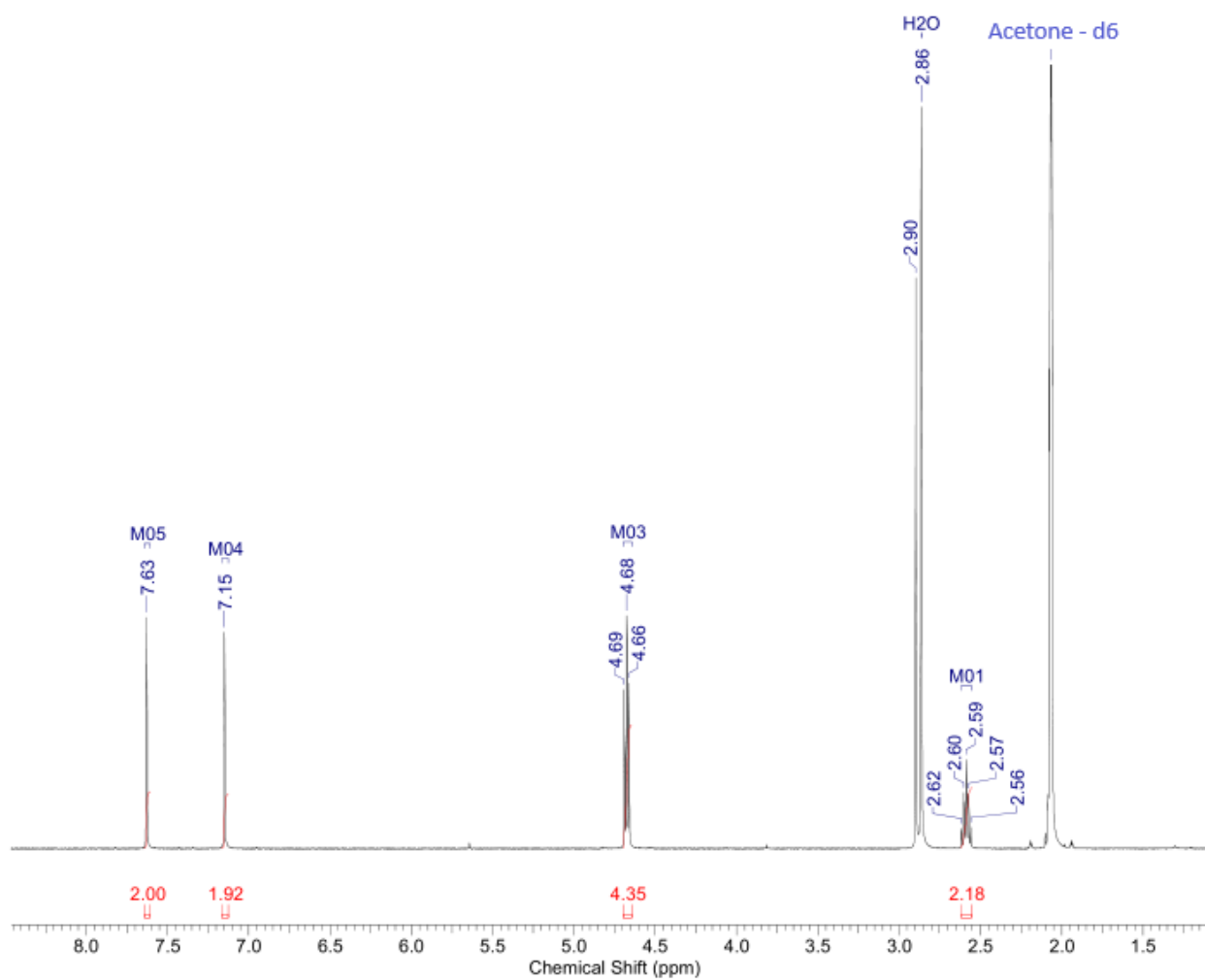


Figura S121. ¹H-NMR de **D2** em Acetona-d₆.

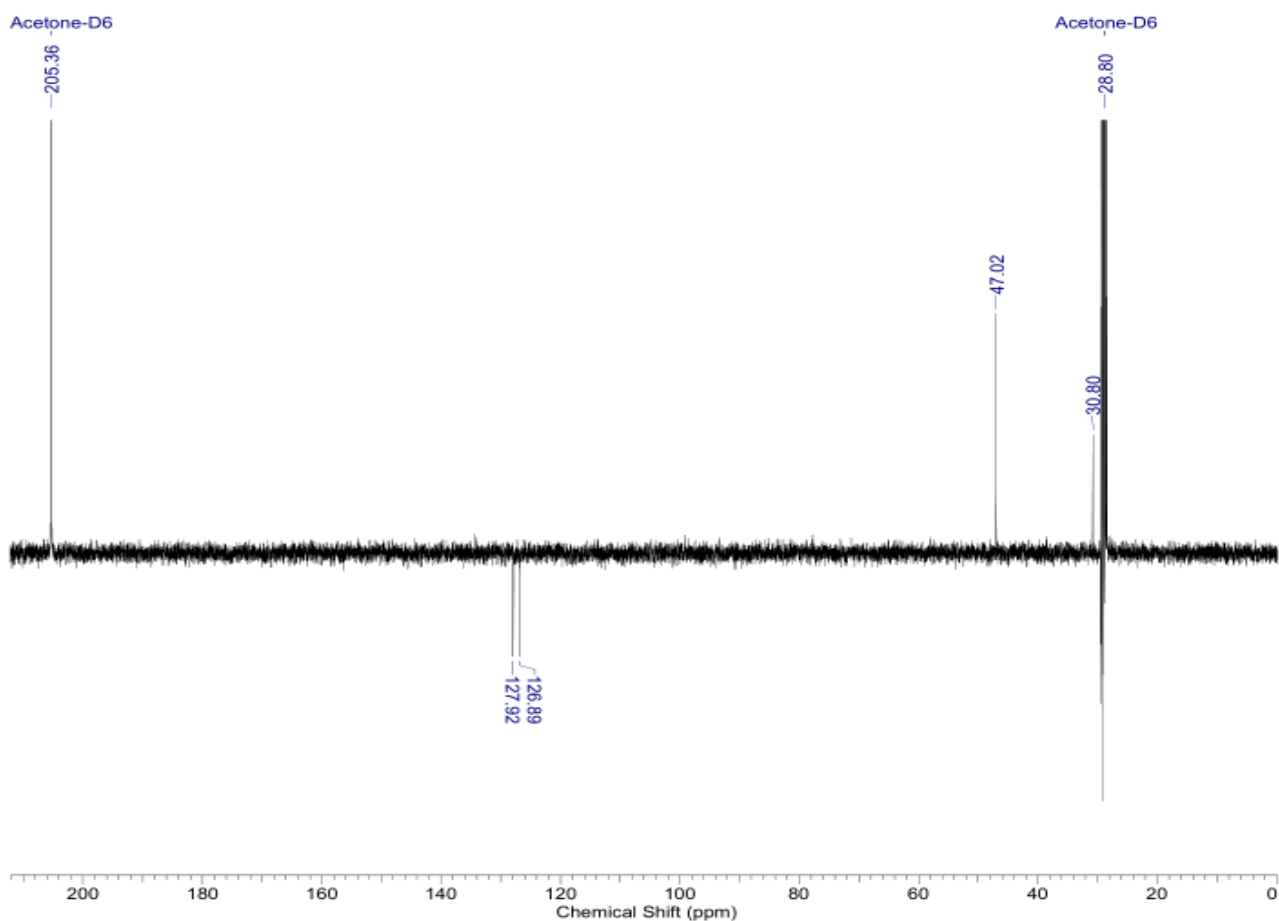


Figura S122. ¹³C-NMR DEPT-135 de D2 em Acetona-d6.

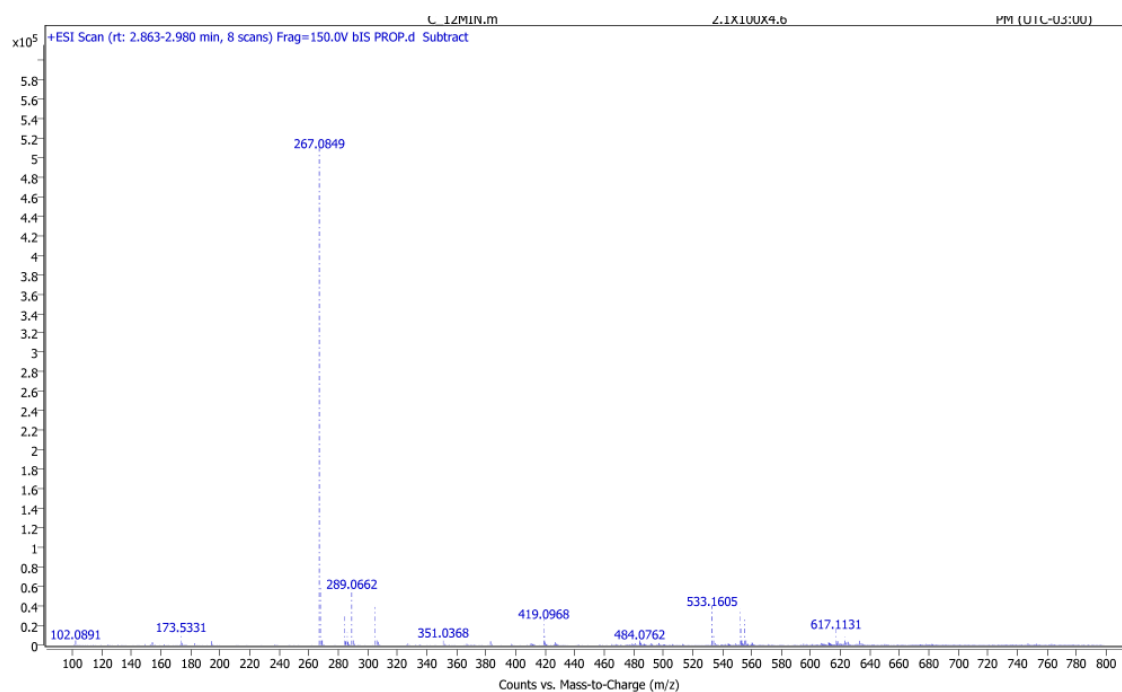
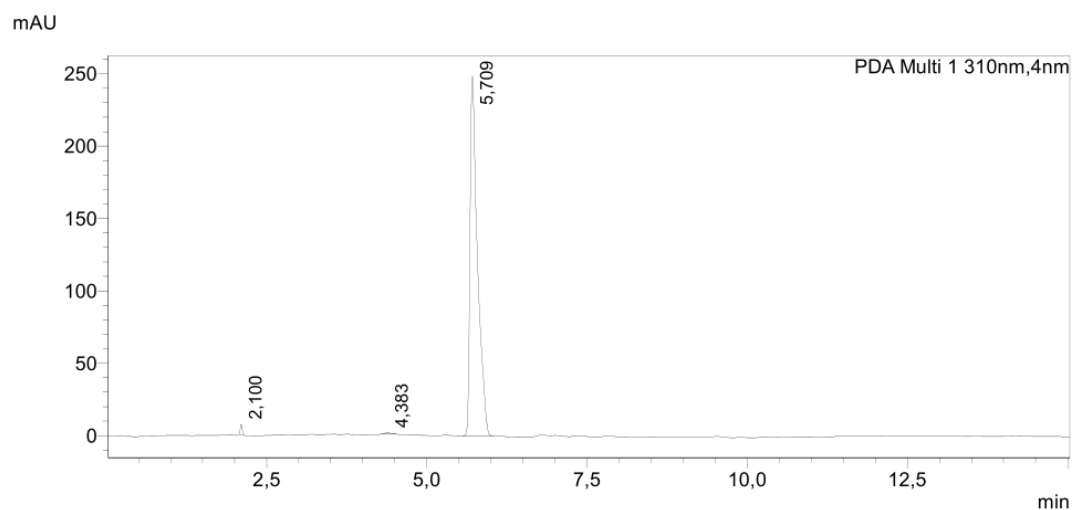


Figura S123. HRMS-TOF (MS+) de D2.

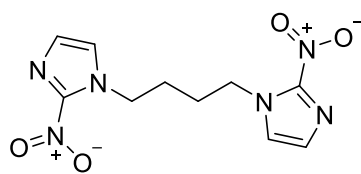


Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	2.100	14929	0.730
2	4.383	6296	0.308
3	5.709	2022725	98.962
Total		2043950	100.000

Figura S124. Cromatograma de CLAE de **D2**.

D3



1,4-bis(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)butane

Chemical Formula: C₁₀H₁₂N₆O₄

Exact Mass: 280,09

Molecular Weight: 280,24

Elemental Analysis: C, 42.86; H, 4.32; N, 29.99; O, 22.84

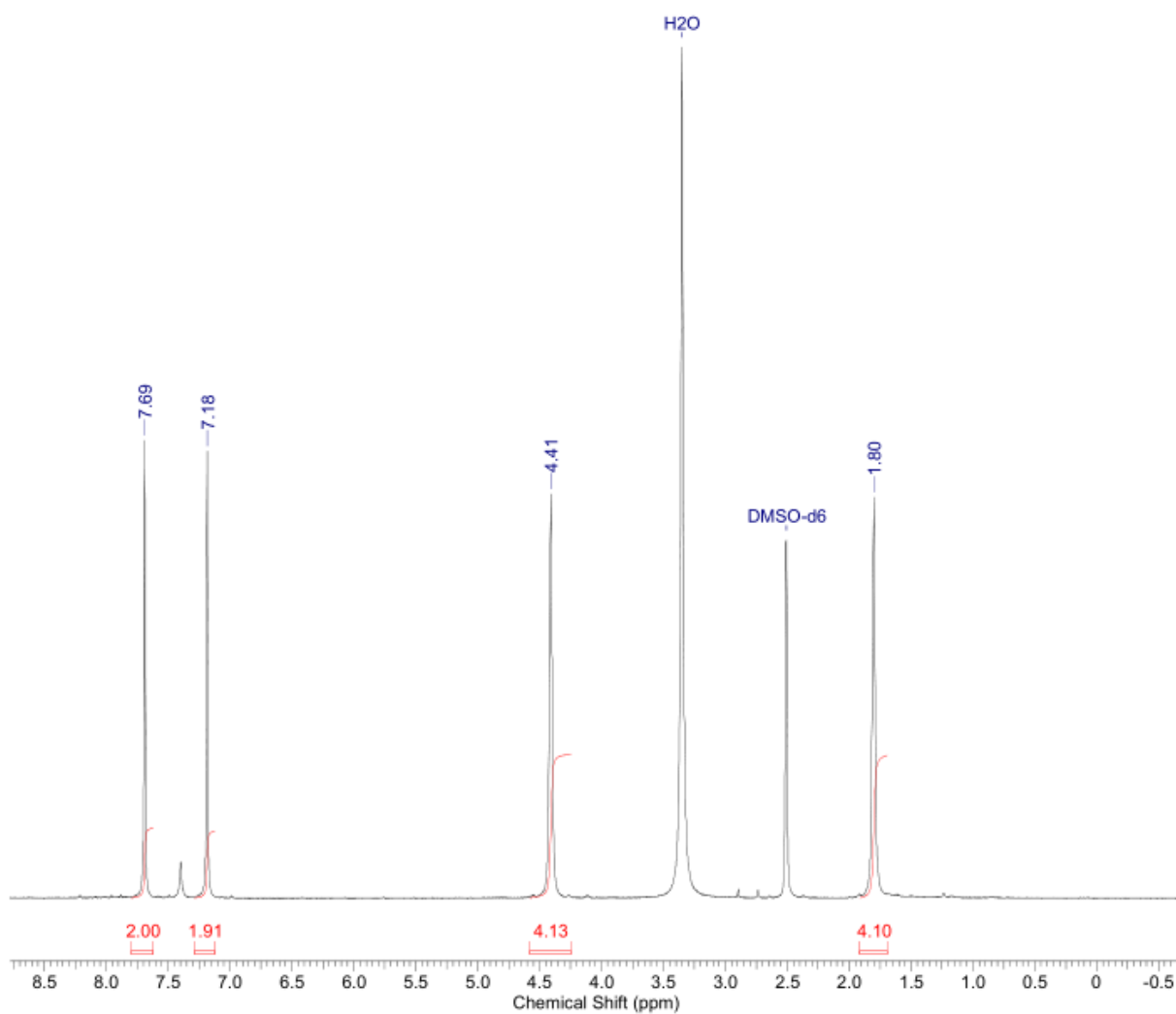


Figura S125. ¹H-NMR de **D3** em DMSO-d₆.

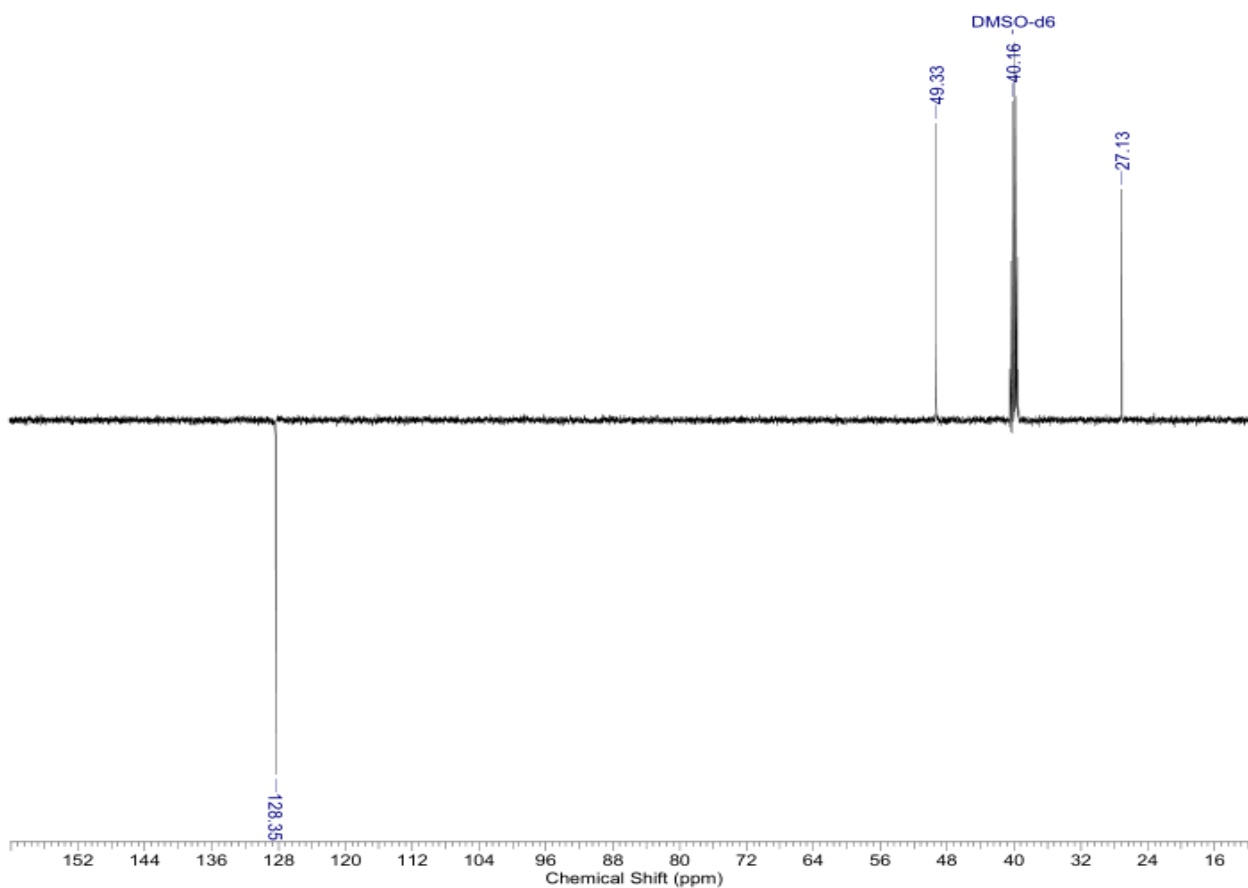


Figura S126. ¹³C-NMR DEPT-135 de **D3** em DMSO-d₆.

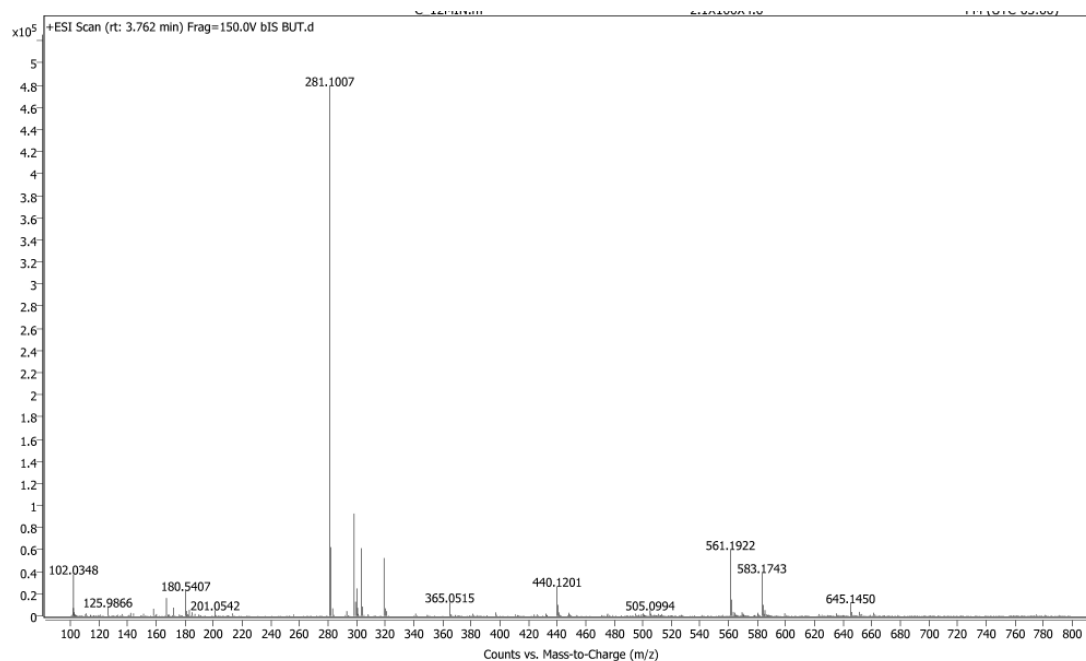


Figura S127. HRMS-TOF (MS⁺) de **D3**.

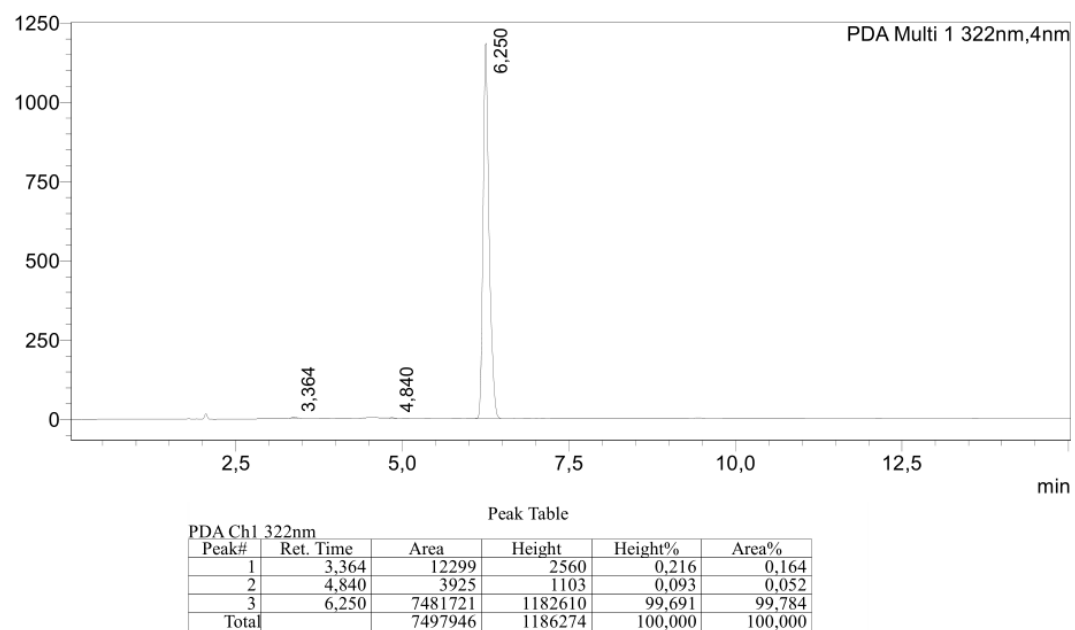
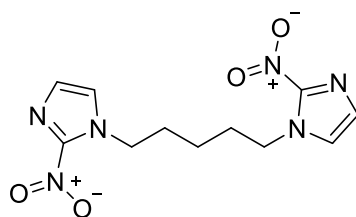


Figura S128. Cromatograma de CLAE de **D3**.

D4



1,5-bis(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)pentane

Chemical Formula: C₁₁H₁₄N₆O₄

Exact Mass: 294,11

Molecular Weight: 294,27

Elemental Analysis: C, 44.90; H, 4.80; N, 28.56; O, 21.75

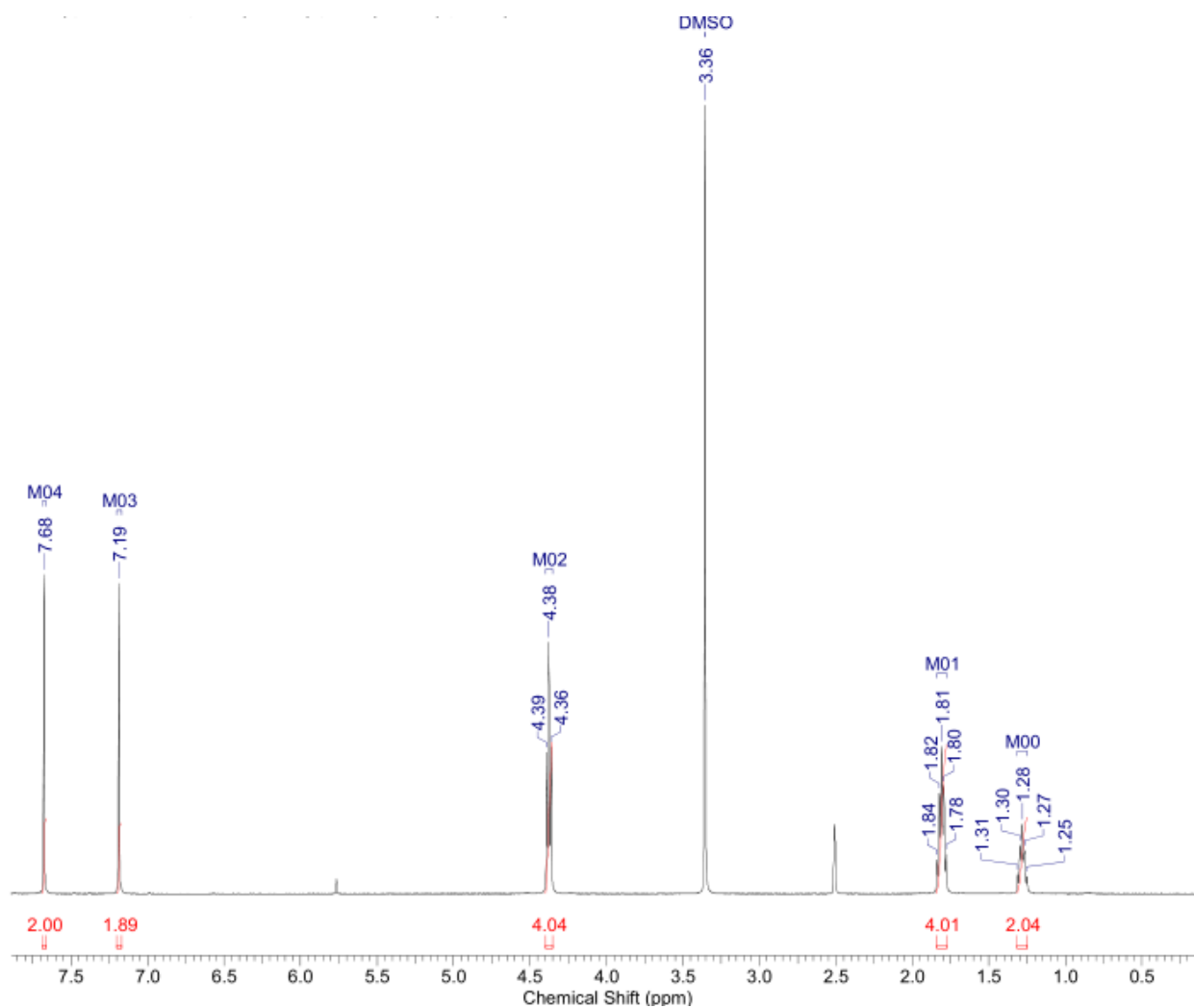


Figura S129. ¹H-NMR de D4 em DMSO-d₆.

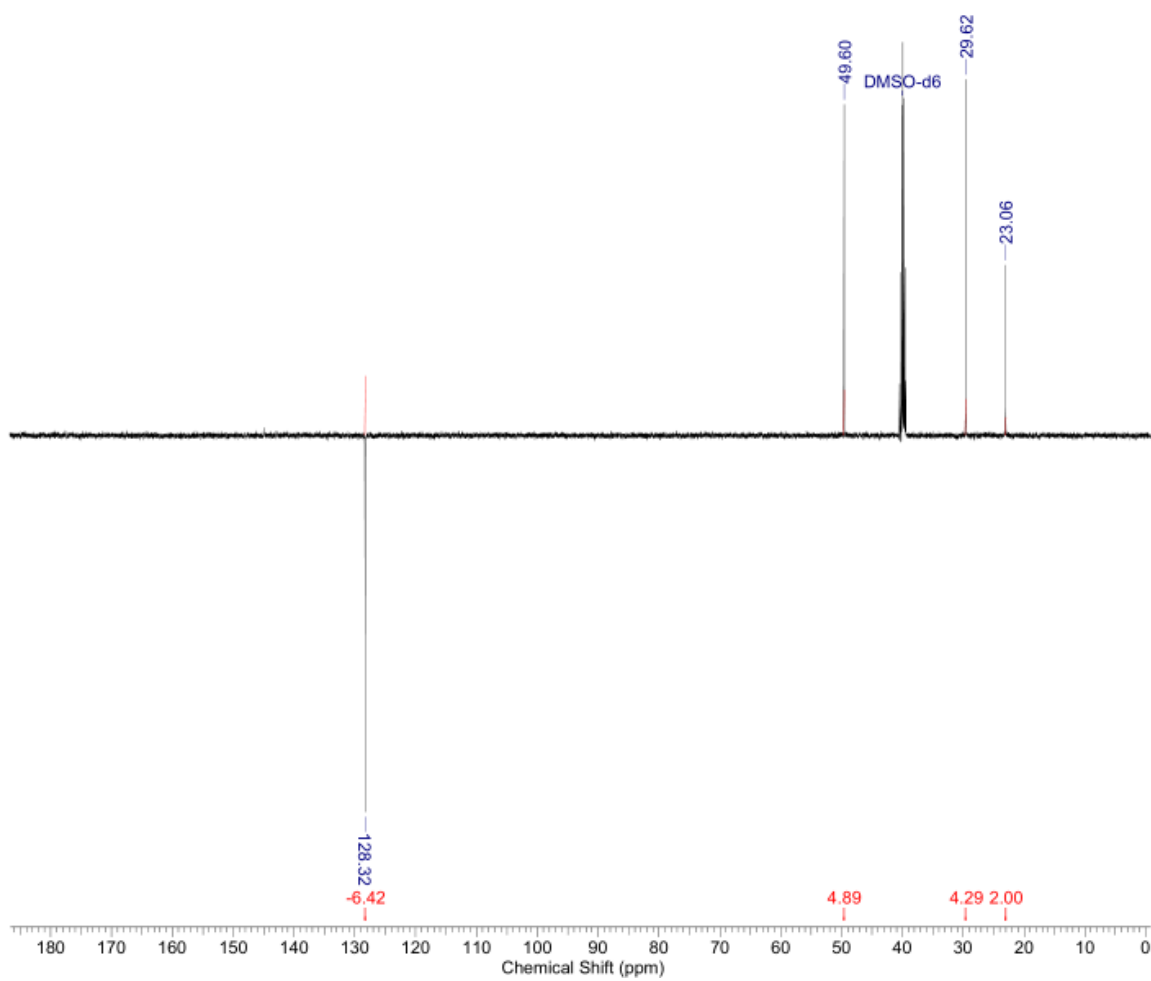


Figura S130. ¹³C-NMR DEPT-135 de D4 em DMSO-d₆.

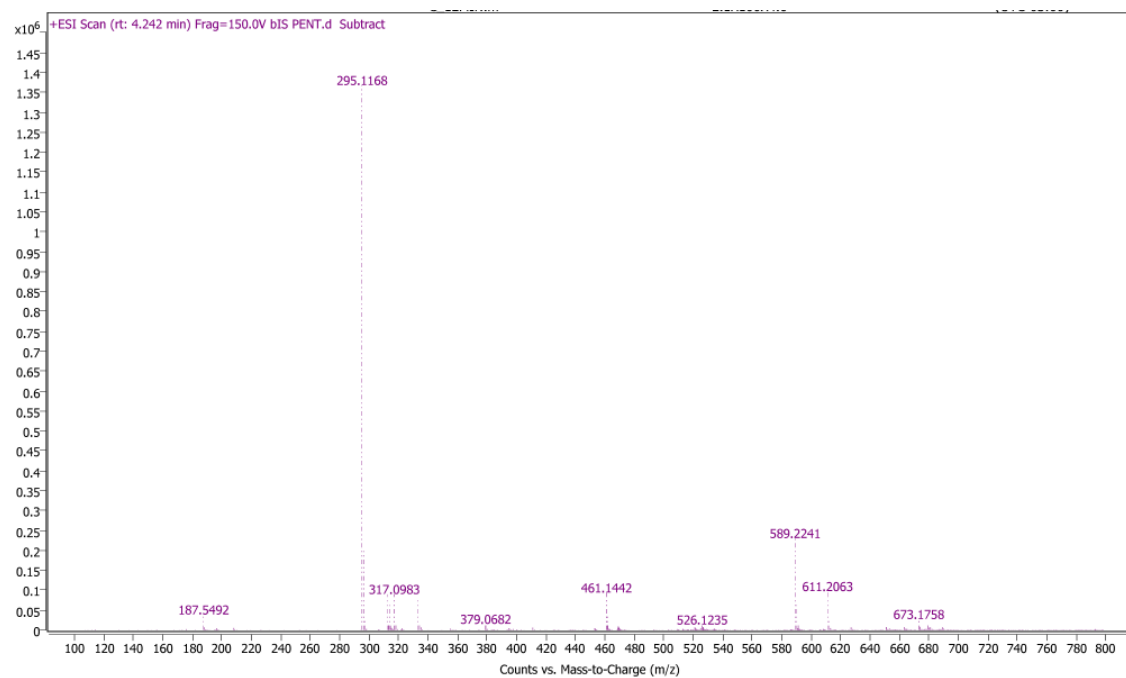


Figura S131. HRMS-TOF (MS⁺) de D4.

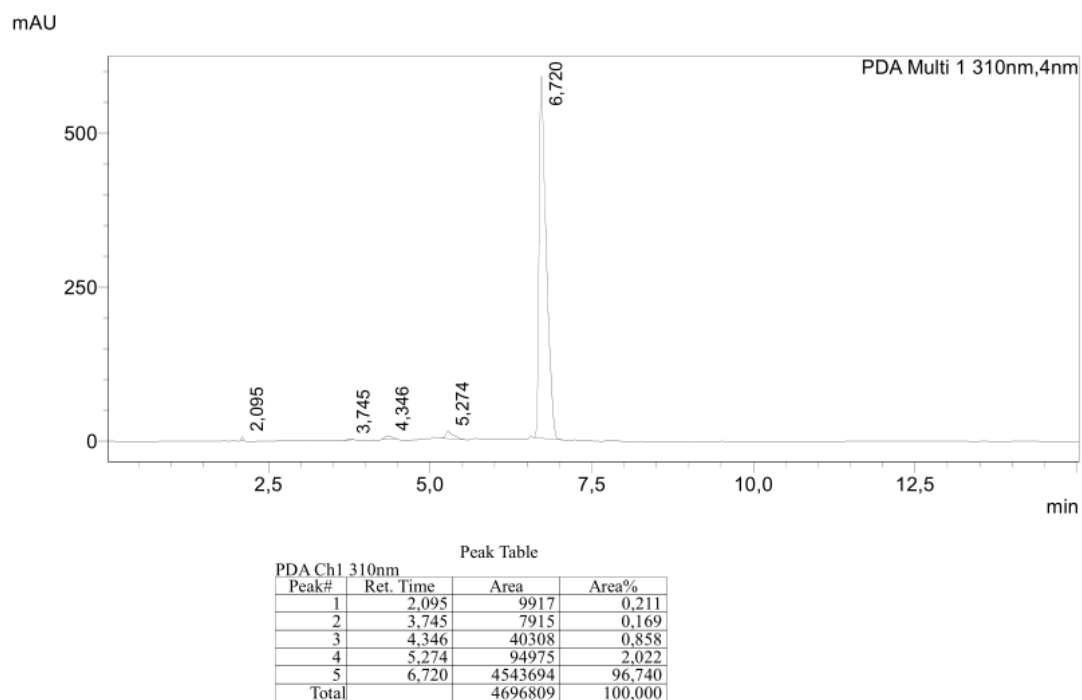
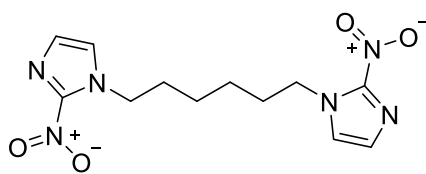


Figura S132. Cromatograma de CLAE de **D4**.

D5



1,6-bis(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)hexane

Chemical Formula: C₁₂H₁₆N₆O₄

Exact Mass: 308,12

Molecular Weight: 308,30

Elemental Analysis: C, 46.75; H, 5.23; N, 27.26; O, 20.76

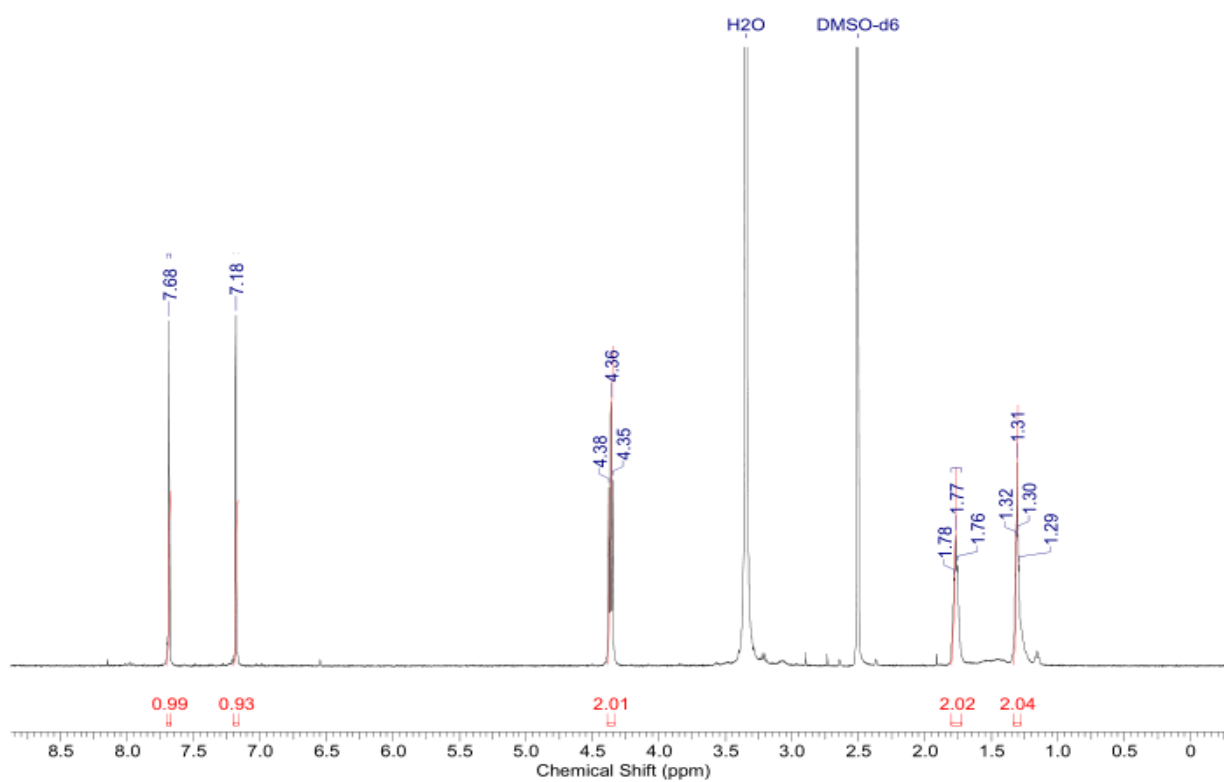


Figura S133. ¹H-NMR de **D5** em DMSO-d₆.

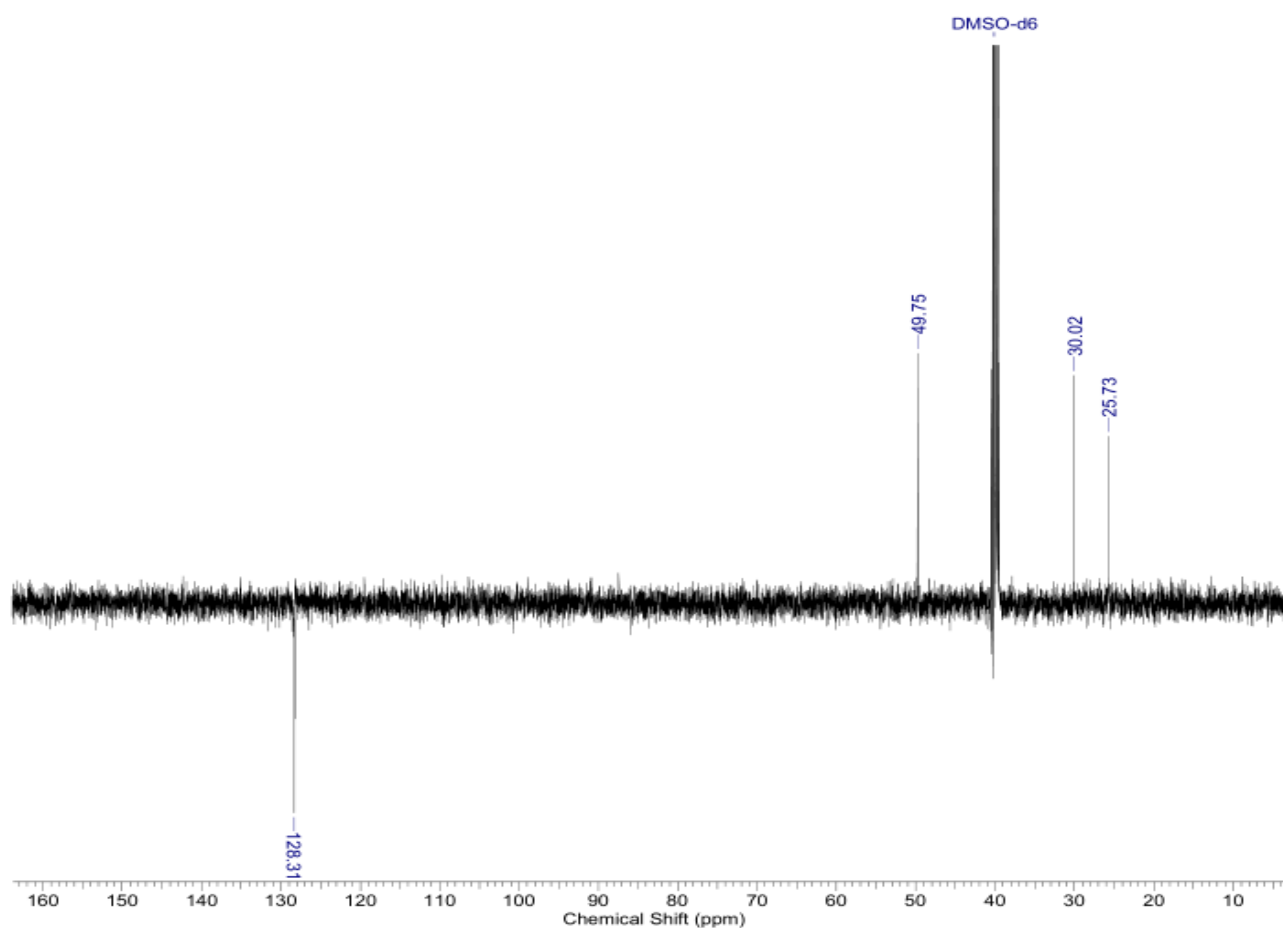


Figura S134. ¹³C-NMR DEPT-135 de **D5** em DMSO-d₆.

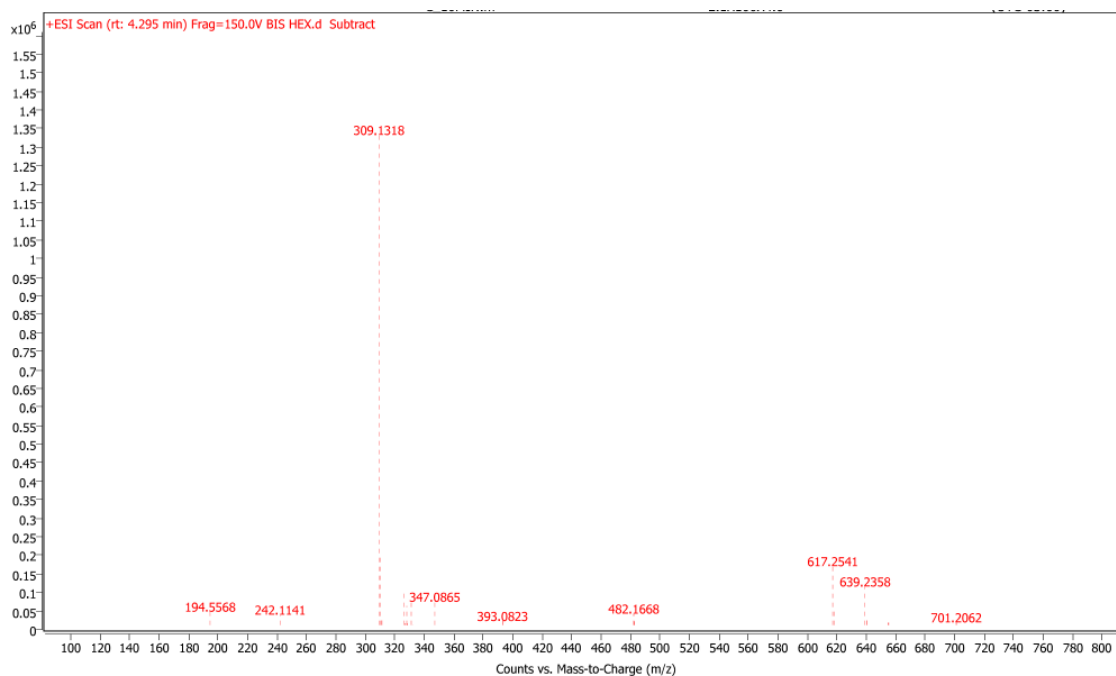


Figura S135. HRMS-TOF (MS+) de **D5**.

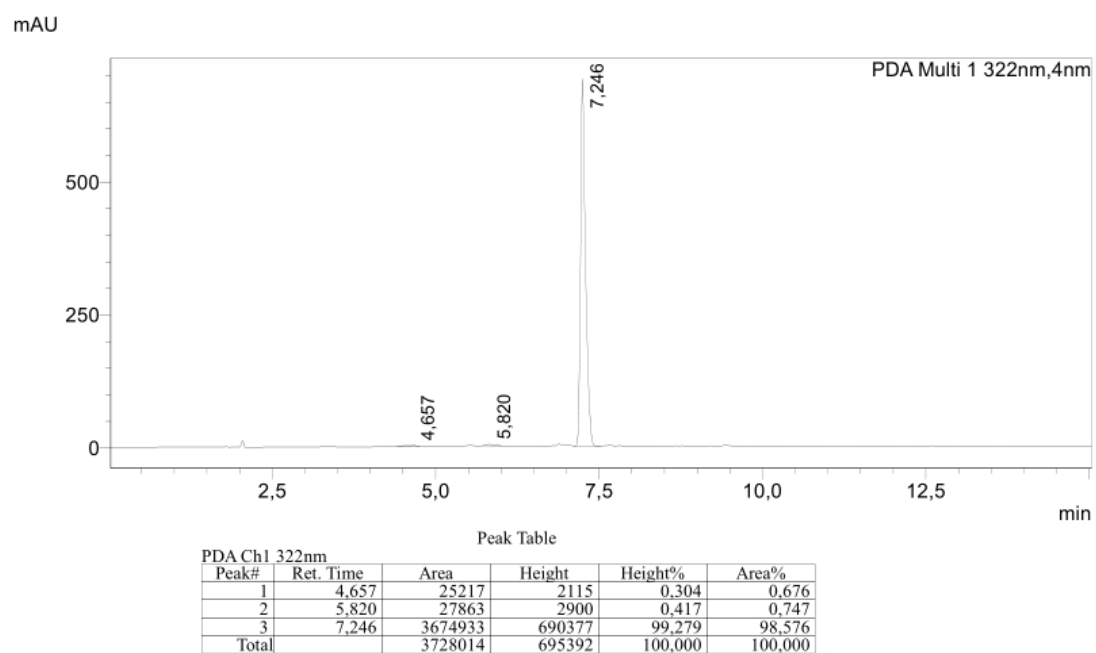
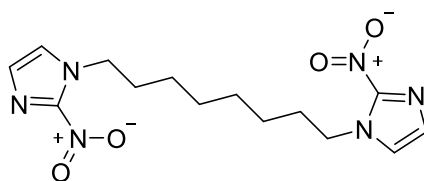


Figura S136. Cromatograma de CLAE de **D5**.

D6



1,8-bis(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)octane

Chemical Formula: C₁₄H₂₀N₆O₄

Exact Mass: 336,15

Molecular Weight: 336,35

Elemental Analysis: C, 49.99; H, 5.99; N, 24.99; O, 19.03

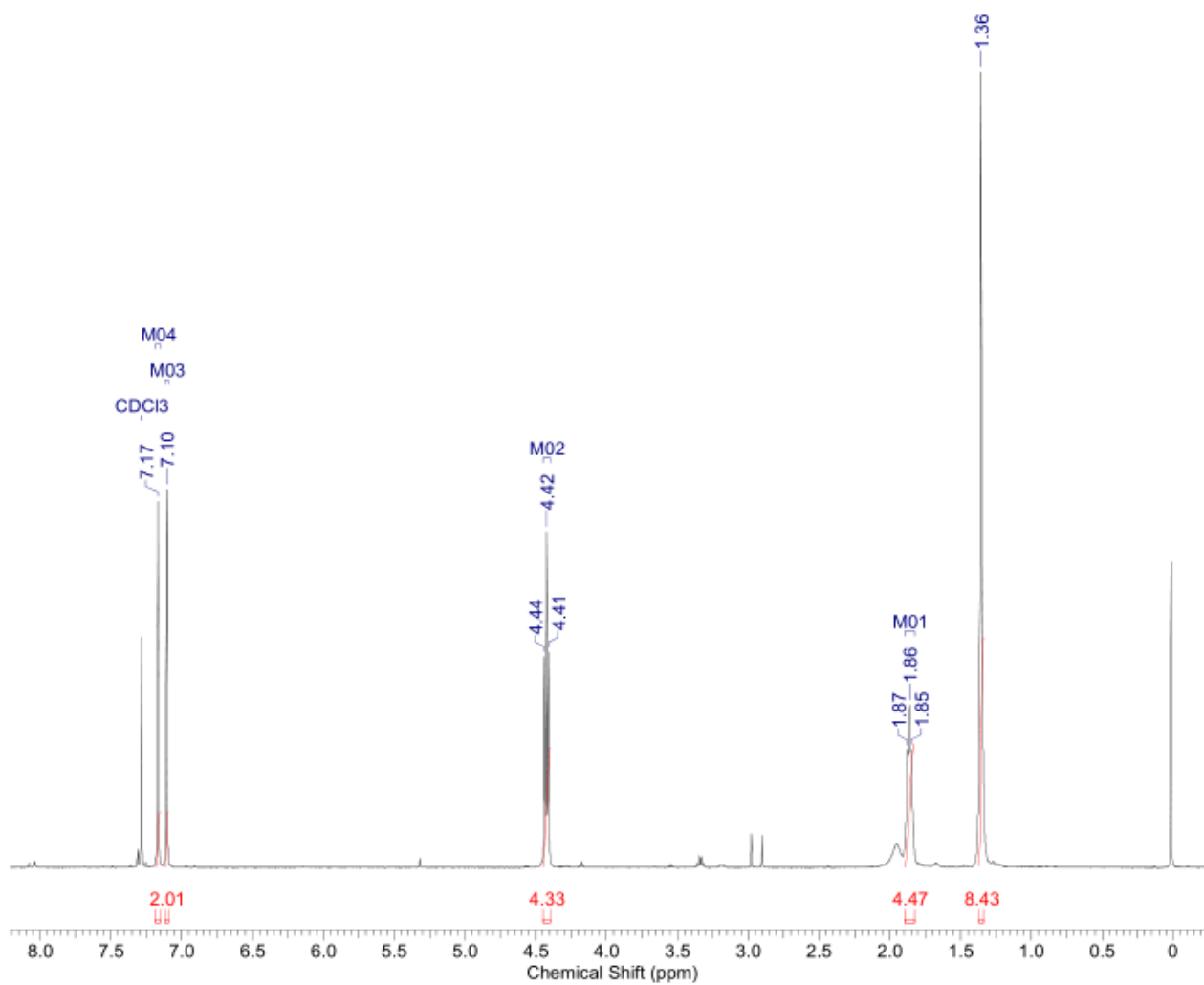


Figura S137. ¹H-NMR de **D6** em CDCl₃.

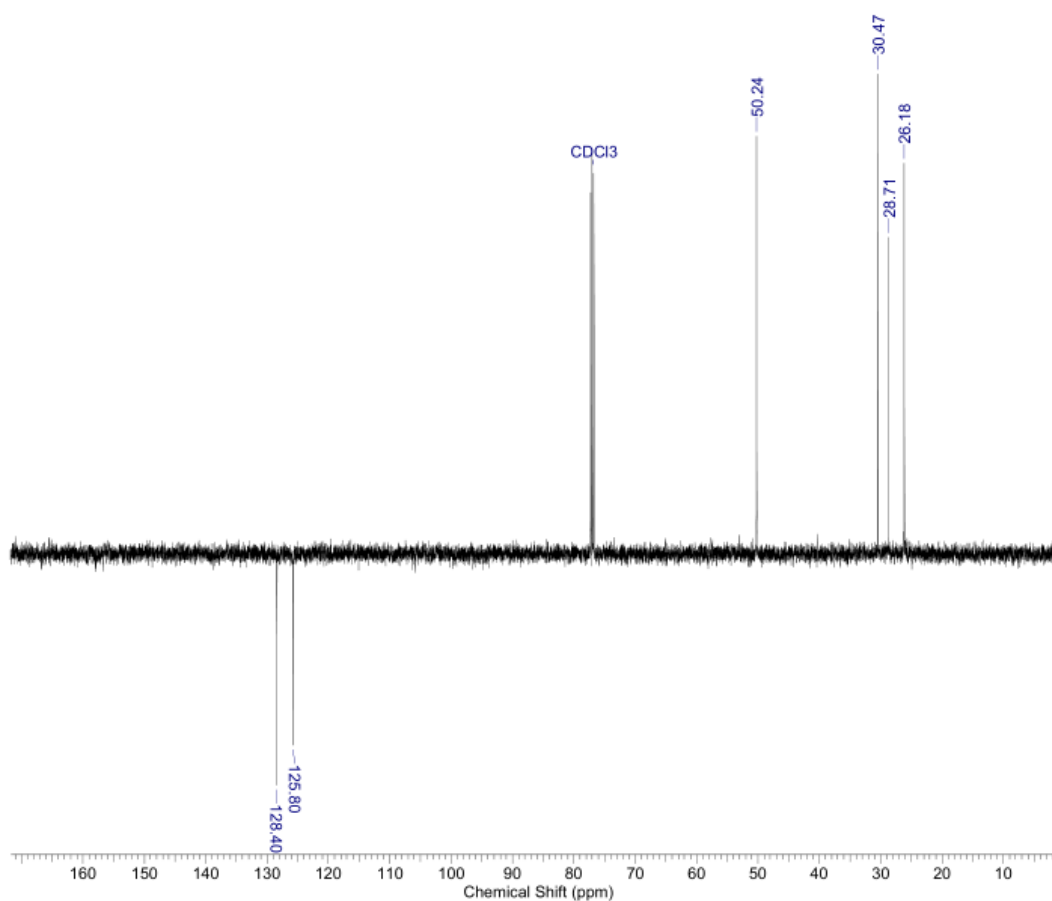


Figura S138. ^{13}C -NMR DEPT-135 de D6 em CDCl_3 .

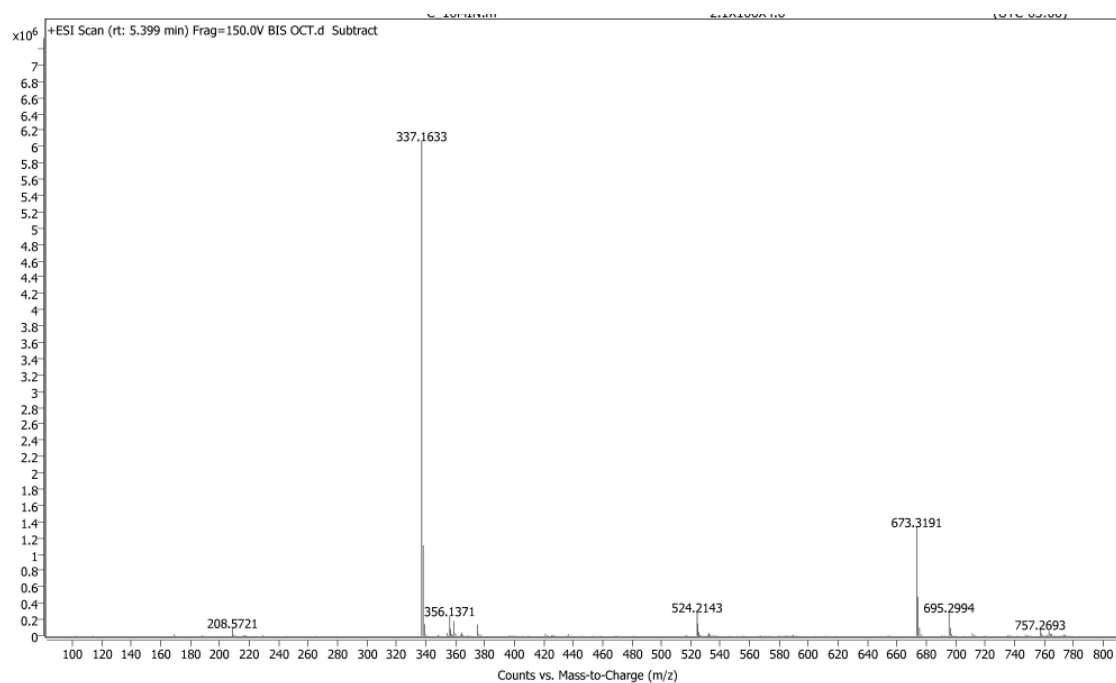
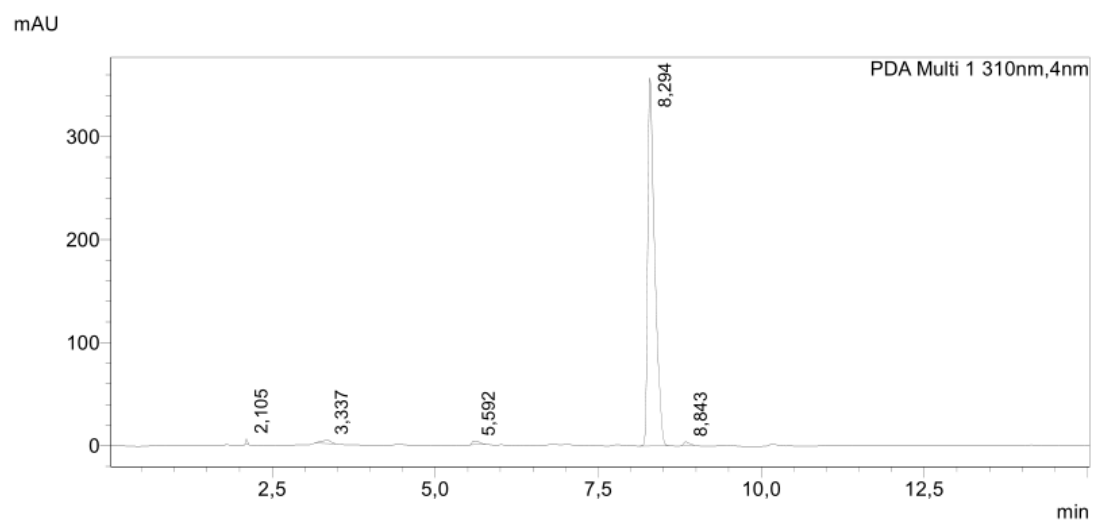


Figura S139. HRMS-TOF (MS^+) de D6.

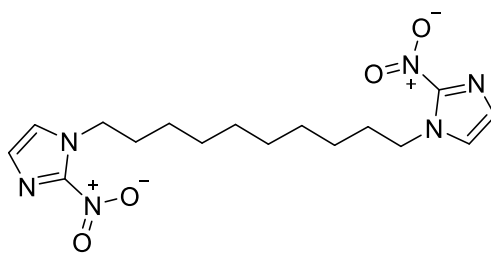


Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	2,105	8166	0,296
2	3,337	33556	1,217
3	5,592	27957	1,014
4	8,294	2667948	96,763
5	8,843	19559	0,709
Total		2757186	100,000

Figura S140. Cromatograma de CLAE de **D6**.

D7



1,10-bis(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)decane

Chemical Formula: C₁₆H₂₄N₆O₄

Exact Mass: 364,19

Molecular Weight: 364,41

Elemental Analysis: C, 52.74; H, 6.64; N, 23.06; O, 17.56

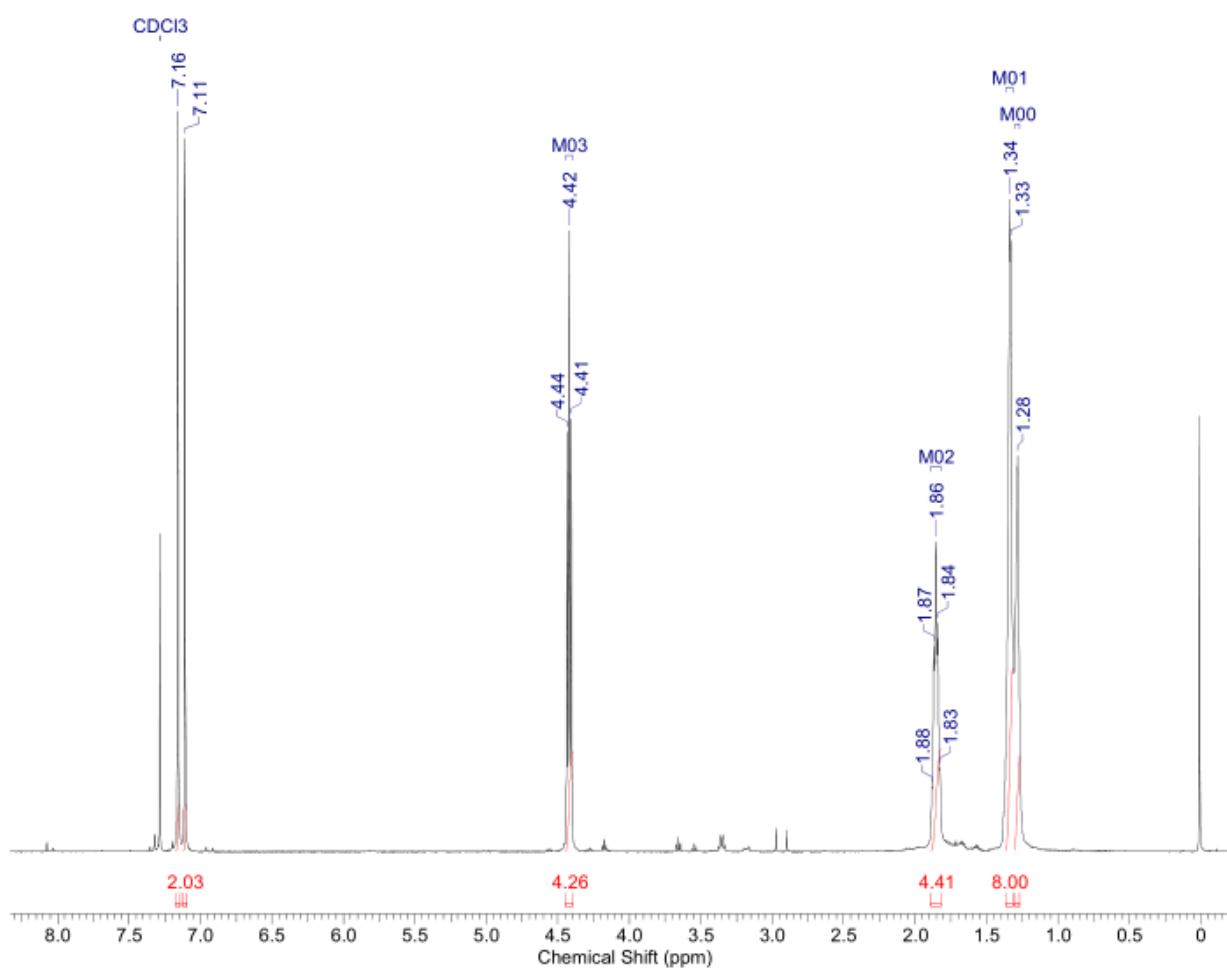


Figura S141. ¹H-NMR de **D7** em CDCl₃.

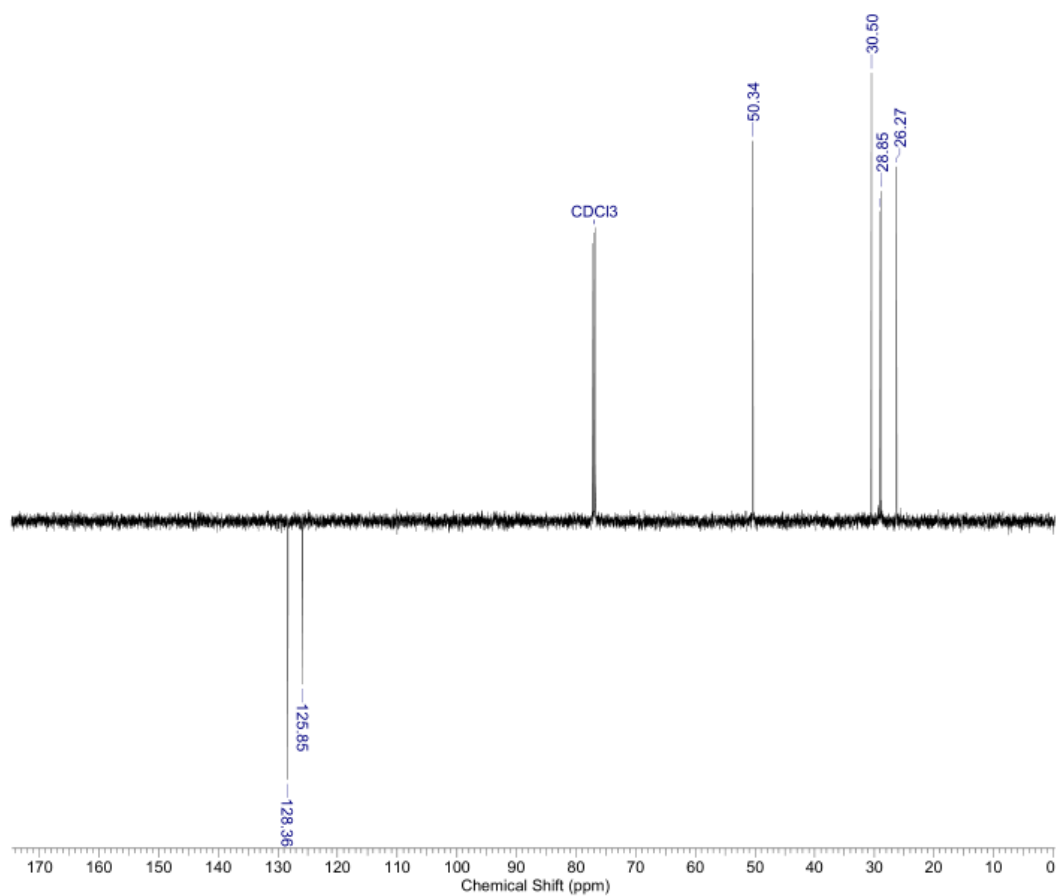


Figura S142. ^{13}C -NMR DEPT-135 de **D7** em CDCl_3 .

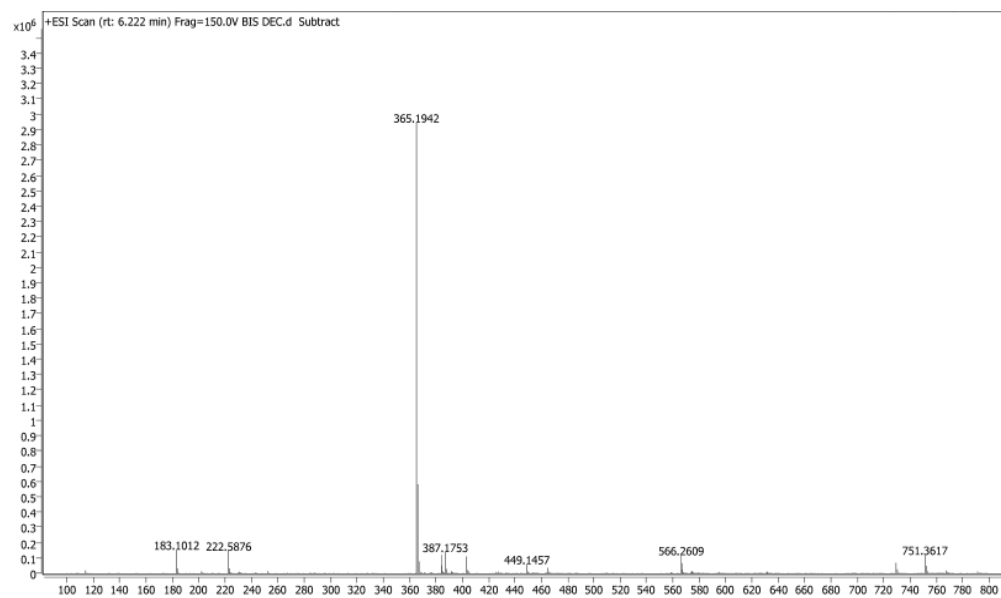
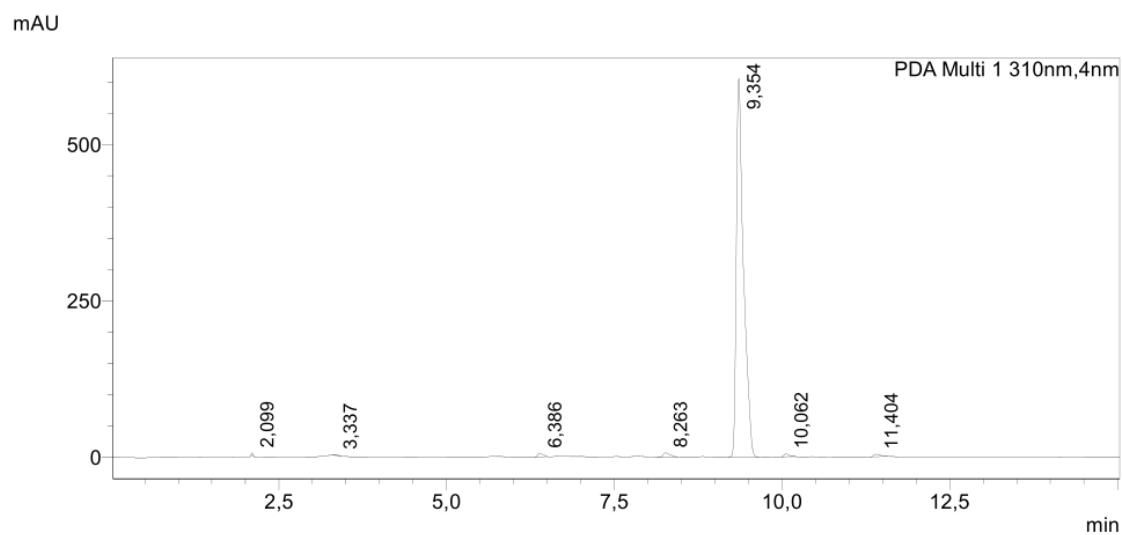


Figura S143. HRMS-TOF (MS+) de **D7**.

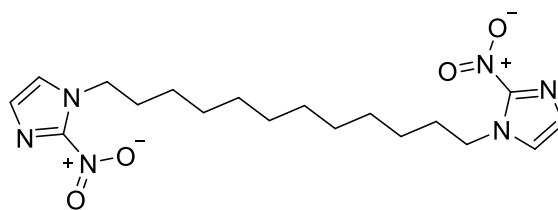


Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	2,099	5718	0,122
2	3,337	6150	0,131
3	6,386	34075	0,728
4	8,263	48285	1,032
5	9,354	4529335	96,804
6	10,062	26016	0,556
7	11,404	29270	0,626
Total		4678849	100,000

Figura S144. Cromatograma de CLAE de **D7**.

D8



1,12-bis(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)dodecane

Chemical Formula: $C_{18}H_{28}N_6O_4$

Exact Mass: 392,22

Molecular Weight: 392,46

Elemental Analysis: C, 55.09; H, 7.19; N, 21.41; O, 16.31

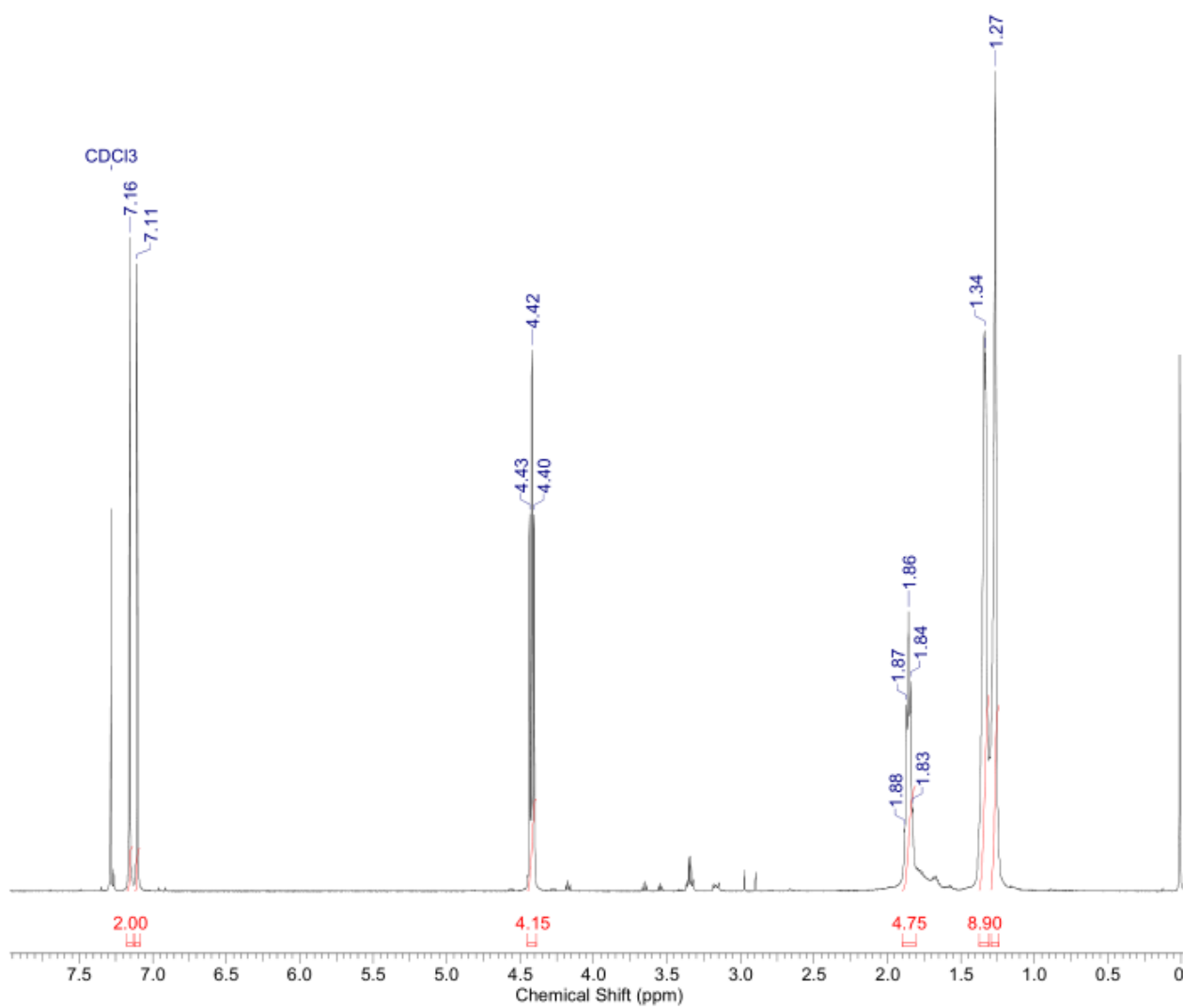


Figura S145. ^1H -NMR de D8 em CDCl_3 .

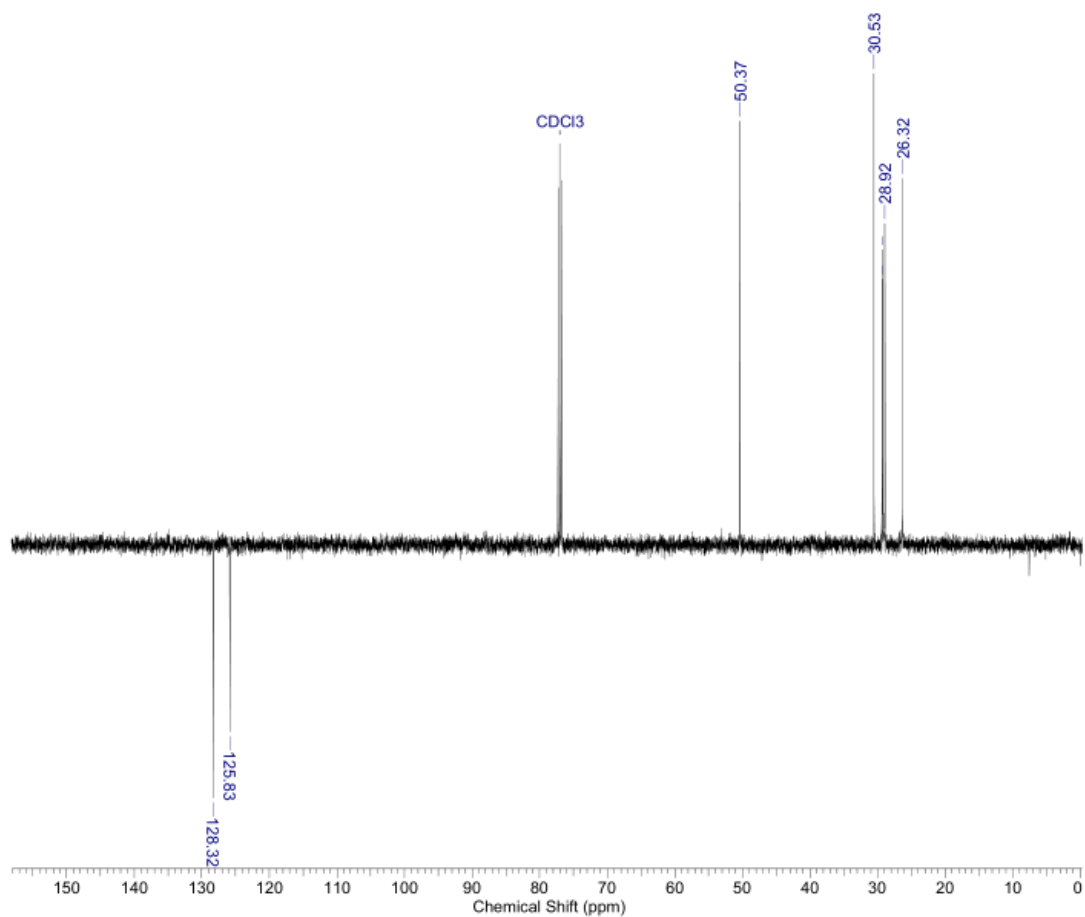


Figura S146. ¹³C-NMR DEPT-135 de **D8** em CDCl₃.

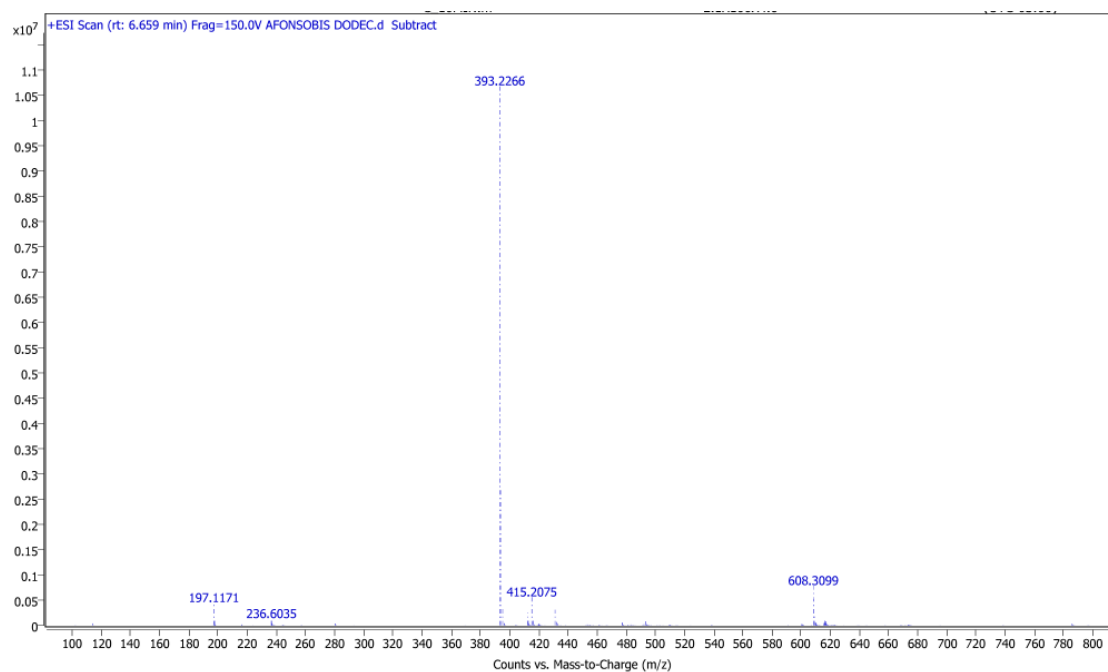
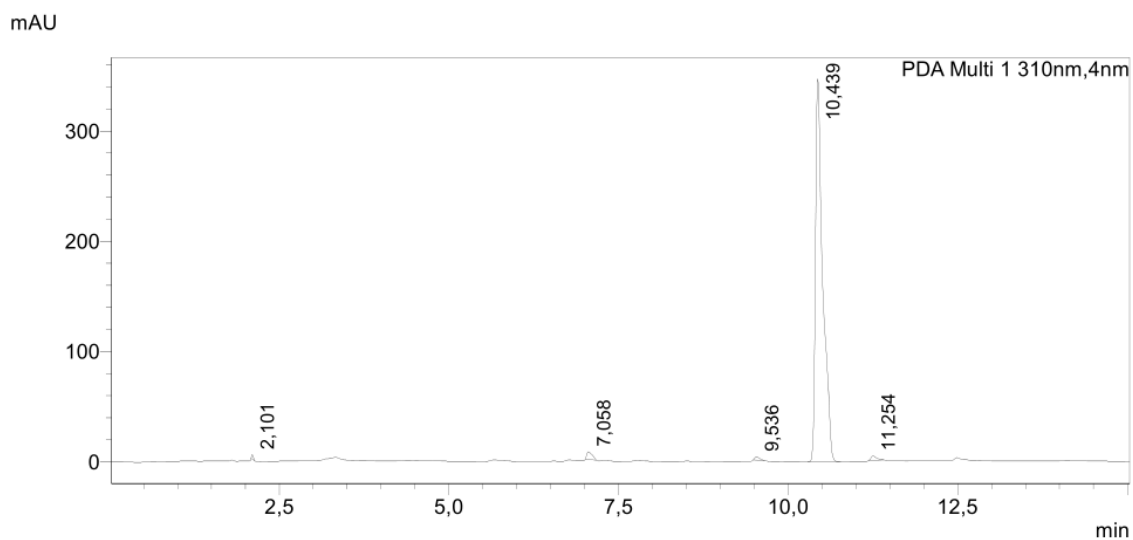


Figura S147. HRMS-TOF (MS⁺) de **D8**.



Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	2,101	6008	0,225
2	7,058	36764	1,376
3	9,536	14511	0,543
4	10,439	2592177	97,035
5	11,254	21920	0,821
Total		2671381	100,000

Figura S148. Cromatograma de CLAE de **D8**.

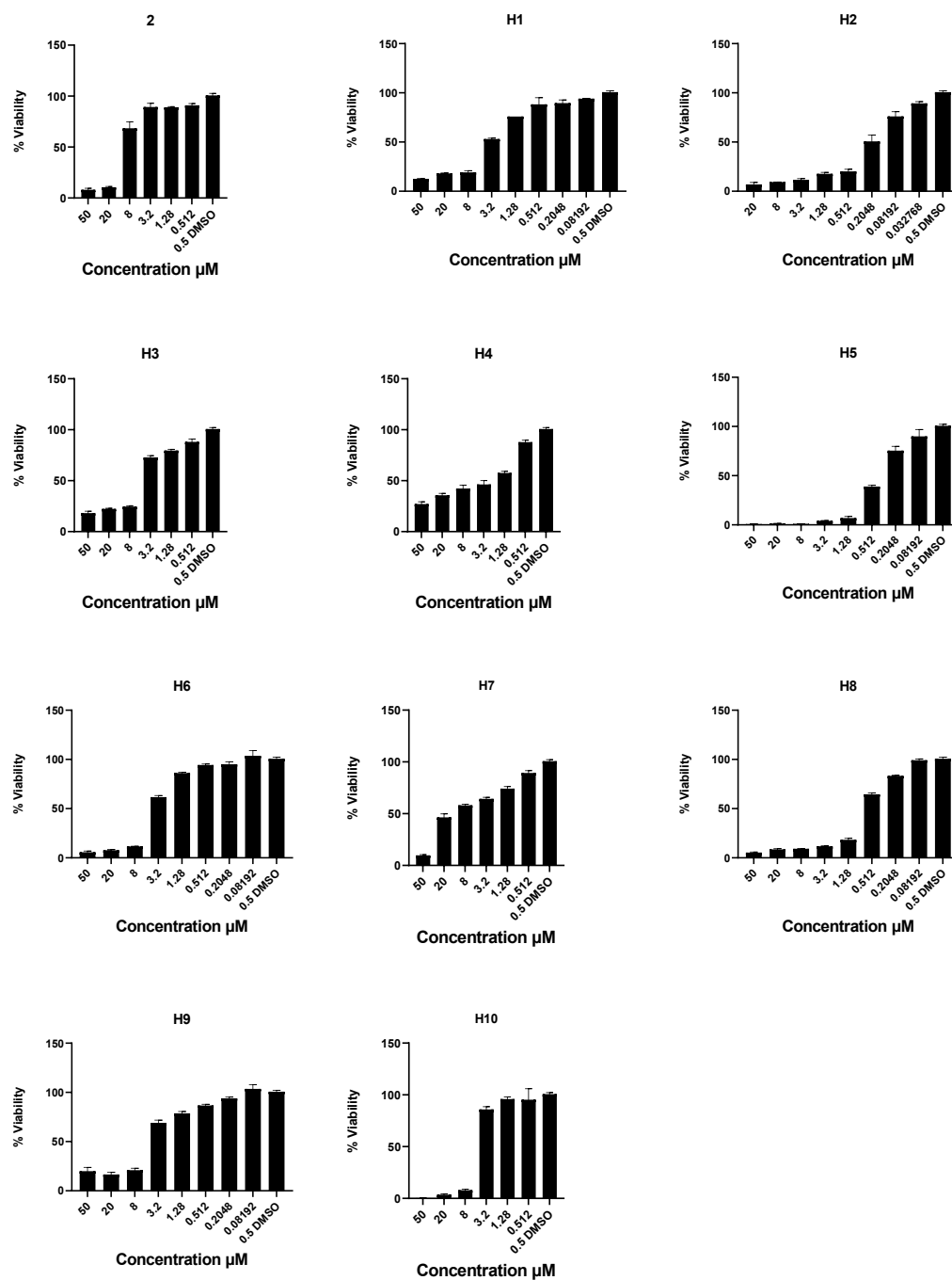


Figura S149. Gráficos de inibição dos híbridos **H1-H10** frente a amastigotas de *T. cruzi* 120h.

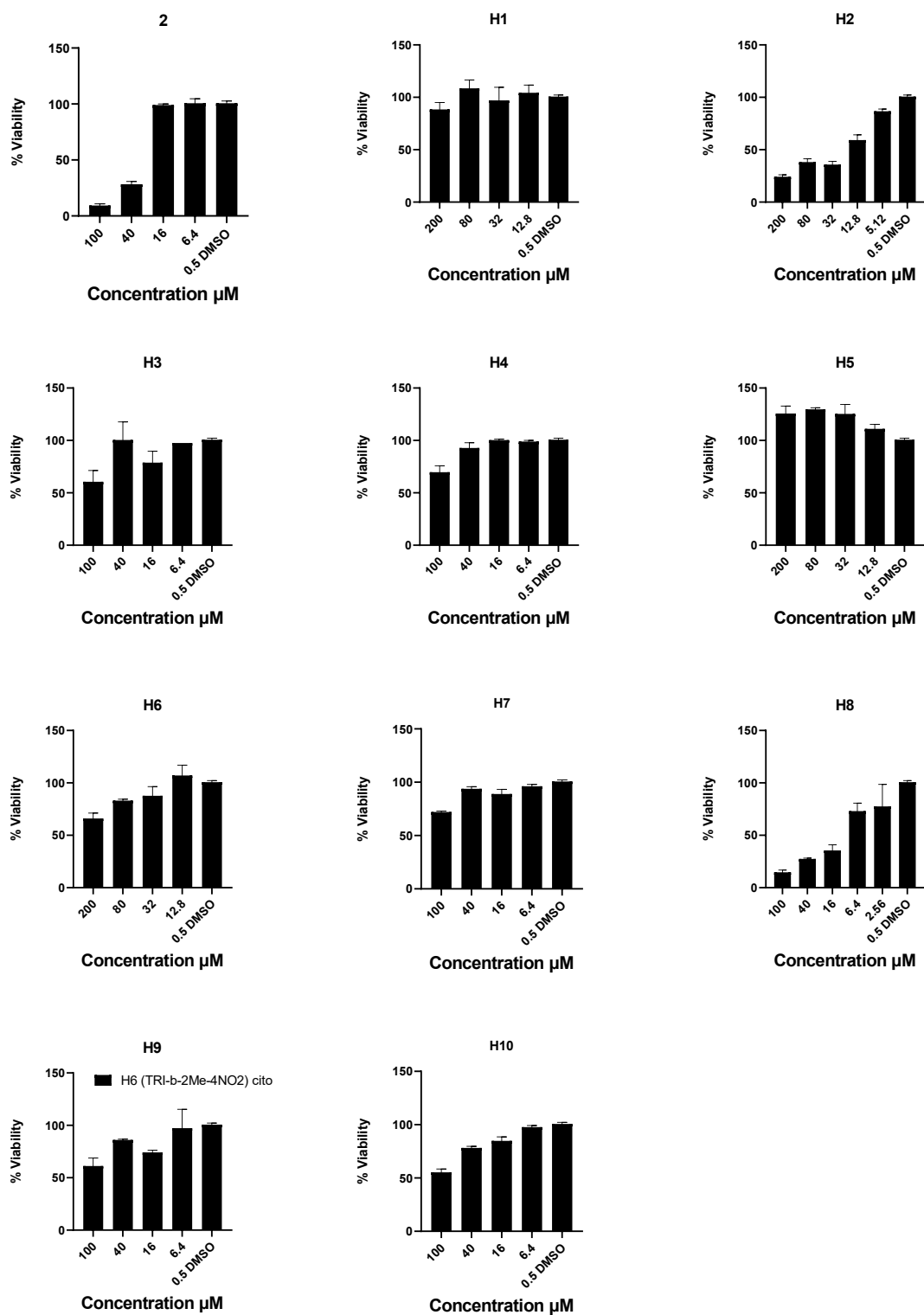


Figura S150. Gráficos de inibição dos híbridos **H1-H10** frente a LLC-MK2 120h.

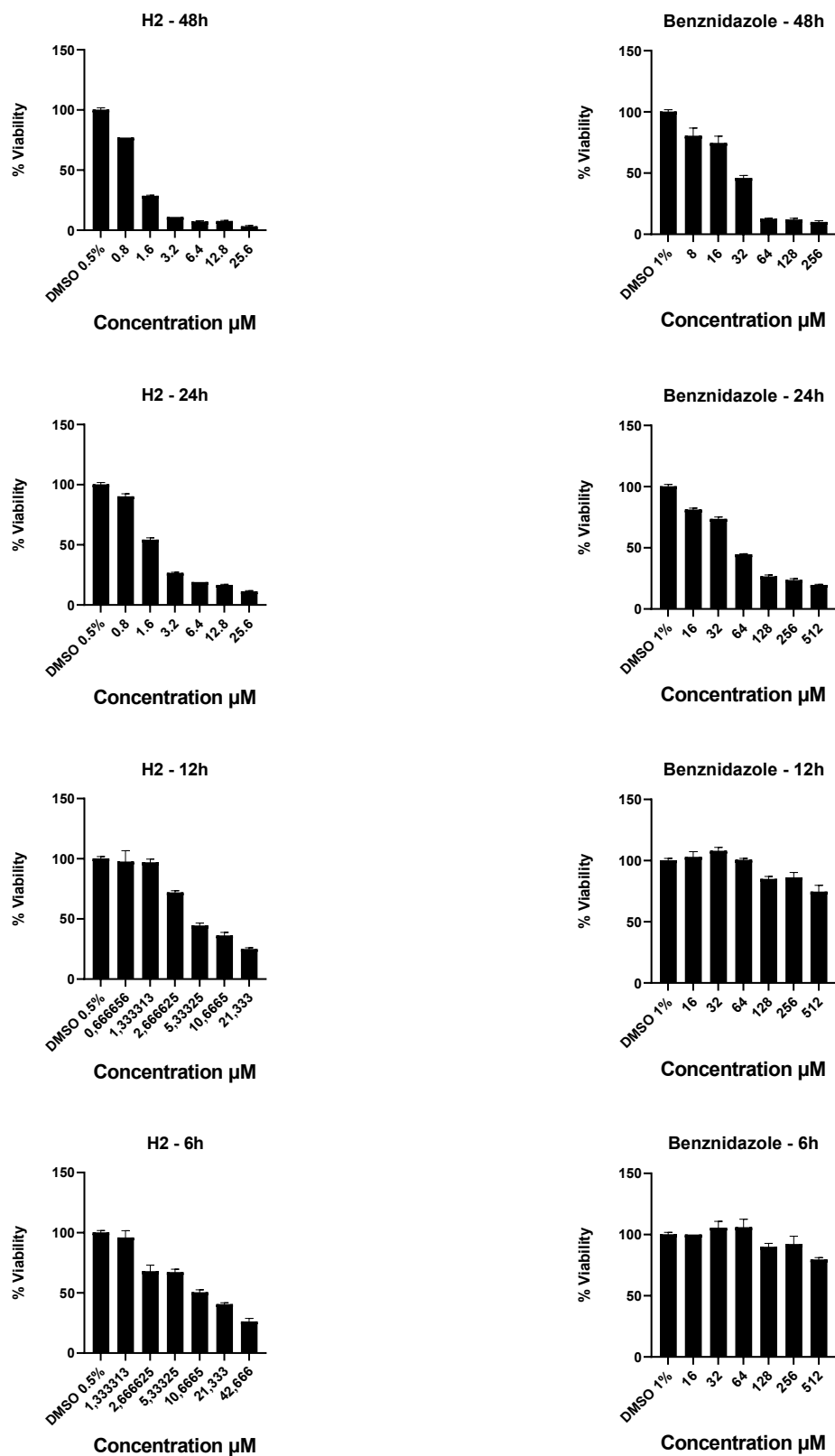


Figura S151. Gráficos de inibição do híbrido **H2** frente a epimastigotas de *T. cruzi* em diferentes tempos de tratamento.

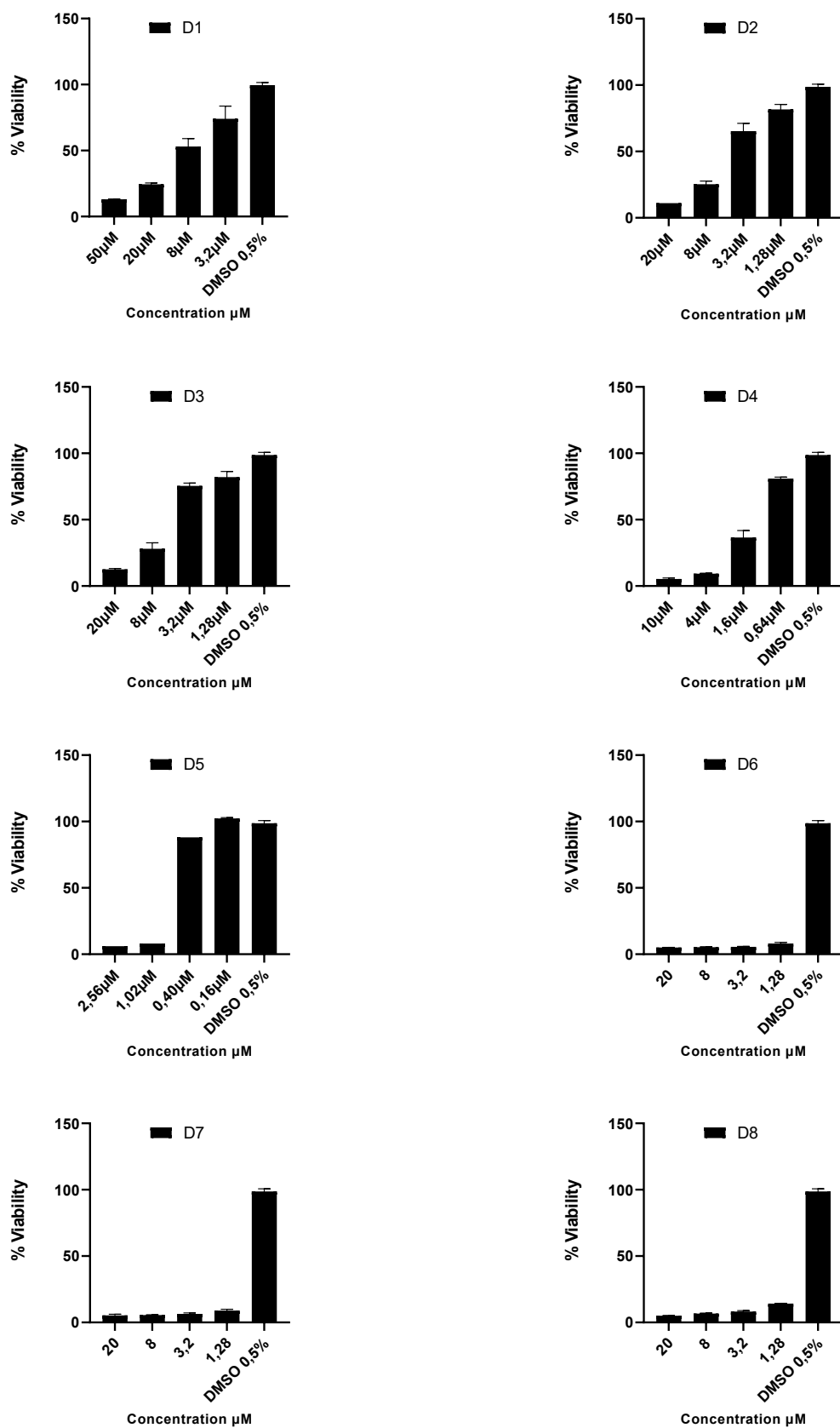


Figura S152. Gráficos de inibição dos dímeros **D1-D8** frente a amastigotas de *T. cruzi* 120h.

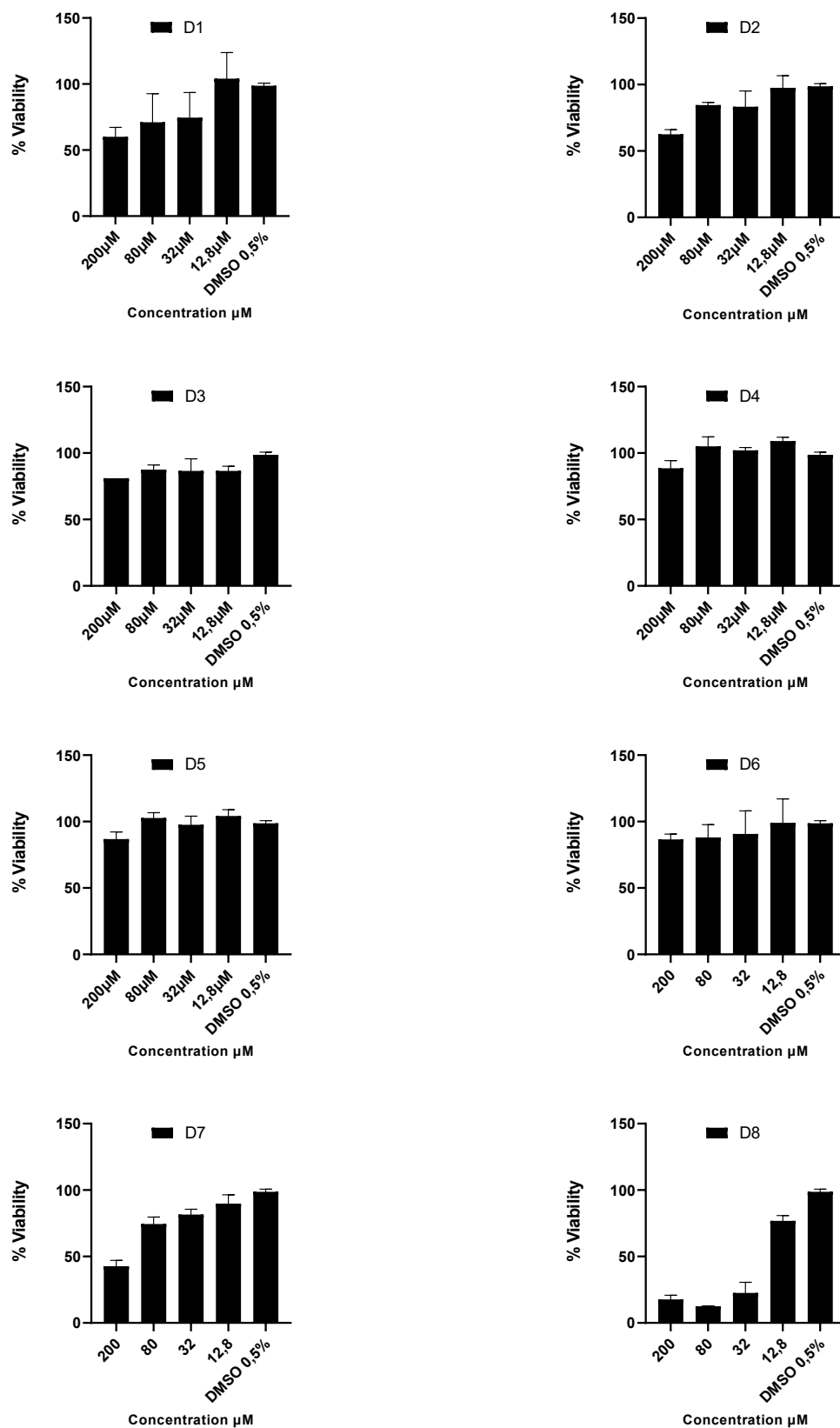


Figura S153. Gráficos de inibição dos dímeros **D1-D8** frente a LLC-MK2 120h.

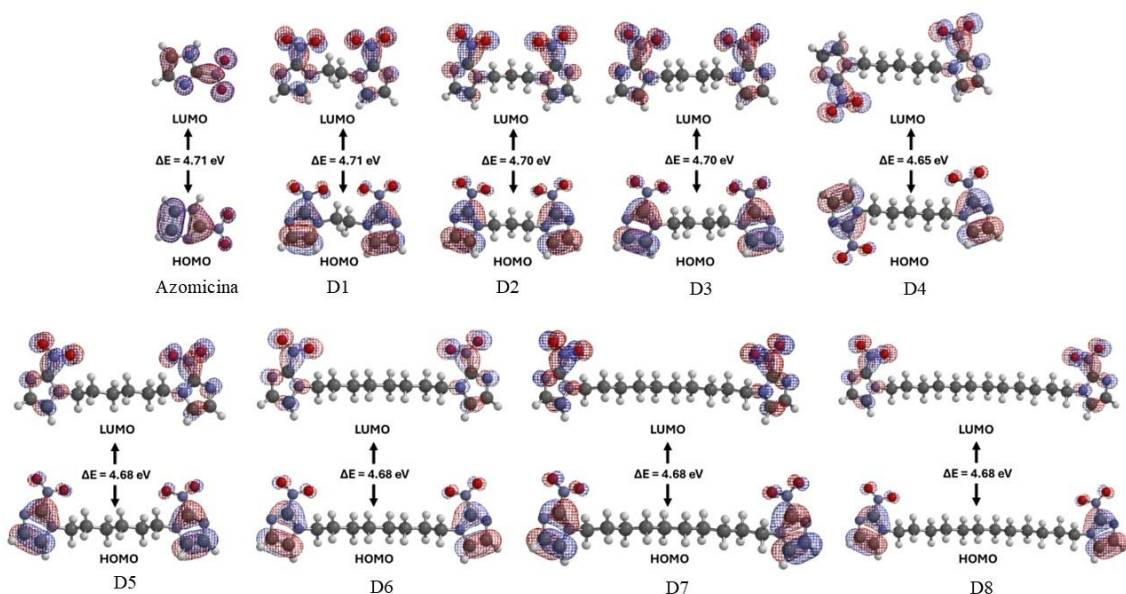


Figura S154. A densidade orbital molecular de fronteira e o intervalo de energia HOMO-LUMO correspondente para os compostos **D1-D8**, calculados com DFT/B3LYP/6-31G*.

Tabela S1. Métricas de qualidade para as subunidades de TcSDH modeladas pelo servidor Swiss-Model.

Métricas de qualidade	TcSDHA	TcSDHC	TcSDHD
GMQE	0.86	0.82	0.79
Cobertura do modelo	99%	89%	84%
Identidade de sequência	62.33%	62%	68.80%
QMEANDisCo Global	0.83	0.73	0.74
Similaridade de sequência	49%	51%	47%
Faixa de abrangência (resíduos)	13-609	1-129	2-109
Confiança do modelo	>90%	>85%	>92%
Pontuação Z-QMEAN	TcSDHA	TcSDHC	TcSDHD
QMEAN	-1.43	-2.98	-1.98
C-β	-1.92	-0.81	-3.40
Todos os átomos	-0.97	0.53	1.27
Solvatação	-0.25	0.30	1.26
Torção	-1.00	-3.15	-3.51
Avaliação MolProbity	TcSDHA	TcSDHC	TcSDHD
Pontuação	1.56	1.50	1.69
Pontuação de colisão	3.86	1.45	0.55
Gráfico de Ramachandran (favorecido)	94.45%	93.70%	98.13%
Gráfico de Ramachandran (atípico)	0.84%	1.57%	0.00%
Valores atípicos de rotâmeros	1.04%	1.83%	0.00%
Desvios de C-β	3	2	2
Ligações ruins	0/4697	0/1030	2/921
Ângulos ruins	40/6363	12/1396	12/1260

Tabela S2. Métricas de qualidade para a subunidade TcSDHB modelada pelo servidor PHYRE².

Métricas de qualidade	
Confiança	>90%
Cobertura do modelo	92%
Identidade de sequência	49%
E-value	2E ⁻³⁹
Qualidade estrutural	Alta (>95%)
Desordem estrutural	Baixa (<1%)
Conflito estrutural	Baixo (<1%)

Tabela S3. Parâmetros anteriores e posteriores à minimização de energia do modelo de TcSDH pelo servidor Chiron (Dokholyan Group, 2024).

Parâmetros de minimização	Iniciais	Finais
Colisões	919	63
Energia de repulsão (kcal/mol)	1643.47	134.10
Razão de colisão	0.08	0.018

Tabela S4. Pontuações de docagem, pontuações normalizadas e valores de RMSD (Å) para os ligantes de referência fumarato e flutolanil, respectivamente, no sítio dicarboxilato e ubiquinona de TcSDH.

Fumarato	ChemPLP	ChemScore	GoldScore	ASP
RMSD (Å)	0.4656	0.7523	0.9465	0.7240
Pontuação de docagem	44.39	23.96	61.88	19.76
Pontuação normalizada	22.19	11.98	30.94	9.88
Flutolanil	ChemPLP	ChemScore	GoldScore	ASP
RMSD (Å)	0.6087	0.8216	0.6415	0.7530
Pontuação de docagem	58.51	30.13	55.76	36.05
Pontuação normalizada	20.57	10.59	19.60	12.67

Tabela S5. Descritores de interação obtidos para os ligantes de referência fumarato e flutolanil, respectivamente, no sítio dicarboxilato e ubiquinona de TcSDH.

Ligantes	Fumarato	Flutolanil
Pontuação de docagem (ChemPLP)	44.39	58.51
Pontuação normalizada	22.19	20.57
ΔH_{int} (kcal/mol)	-31.63	-28.92
ΔG_{bind} (kcal/mol)	-7.33	-9.75
ChemScore.Rot	0.00	1.1542
E_{solv} (KJ/mol)	-66.71	-34.94

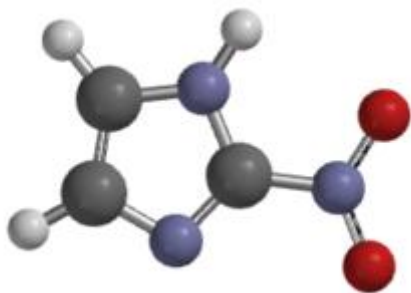
Tabela S6. Parâmetros calculados para a avaliação da perda entrópica e da energia de solvatação dos ligantes em água que foram utilizados na correlação estatística com regressão linear múltipla.

Ligantes	ChemScore.Rot	E _{solv} (KJ/mol)
Piperina	0,0000	-63,74
2	1,0000	-95,39
H1	2,1640	-115,51
H2	2,2028	-110,09
H3	2,1640	-138,11
H4	2,4596	-149,02
H5	2,4299	-135,01
H6	2,3942	-151,88
H7	2,7327	-155,24
H8	2,6373	-139,72
H9	2,6059	-166,13
H10	2,9810	-167,90
Benzonidazol	1,9609	-77,22

Tabela S7. Resultados da avaliação para os outros termos (variáveis independentes) referentes ao estudo estatístico de correlação dos dados teóricos e experimentais nos sítios ativos ubiquinona (Qp) e dicarboxilato de TcSHD. N = 13 ligantes (piperina, 2, H1-H10 e benzonidazol).

Regressão linear simples					
Sítio dicarboxilato			Sítio ubiquinona (Qp)		
Descritor de interação	R ²	Equação da reta	Descritor de interação	R ²	Equação da reta
Pontuação de docagem	0,1590	y = -0,1334x + 17,534	Pontuação de docagem	0,3025	y = -0,4181x + 38,166
Pontuação normalizada	0,0887	y = -0,4661x + 18,622	Pontuação normalizada	0,0979	y = -1,6911x + 46,937
ΔG _{bind} (kcal/mol)	0,2828	y = 0,6751x + 16,646	ΔG _{bind} (kcal/mol)	0,5278	y = 1,6521x + 24,299
Variável dependente (Y) = CI ₅₀ amastigotas de <i>T. cruzi</i> (μM).					

Detalhes computacionais para a minimização da energia estrutural do composto Azomicina



SPARTAN '14 MECHANICS PROGRAM: (Win/64b) Release 1.1.4

Frequency Calculation

Reason for exit: Successful completion

Mechanics CPU Time : .22

Mechanics Wall Time: .18

SPARTAN '14 Quantum Mechanics Driver: (Win/64b) Release 1.1.4

Job type: Geometry optimization.

Method: RB3LYP

Basis set: 6-31G(D)

Number of shells: 38

Number of basis functions: 126

Multiplicity: 1

Parallel Job: 8 threads

SCF model:

A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:

Step Energy Max Grad. Max Dist.

1 -430.711175 0.010997 0.031386

2 -430.711653 0.004128 0.010268

3 -430.711730 0.001029 0.002249

4 -430.711735 0.000344 0.000764

5 -430.711735 0.000036 0.000180

Reason for exit: Successful completion

Quantum Calculation CPU Time : 13.30

Quantum Calculation Wall Time: 1:08.94

SPARTAN '14 Semi-Empirical Program: (Win/64b) Release 1.1.4
Semi-empirical Property Calculation

M0001

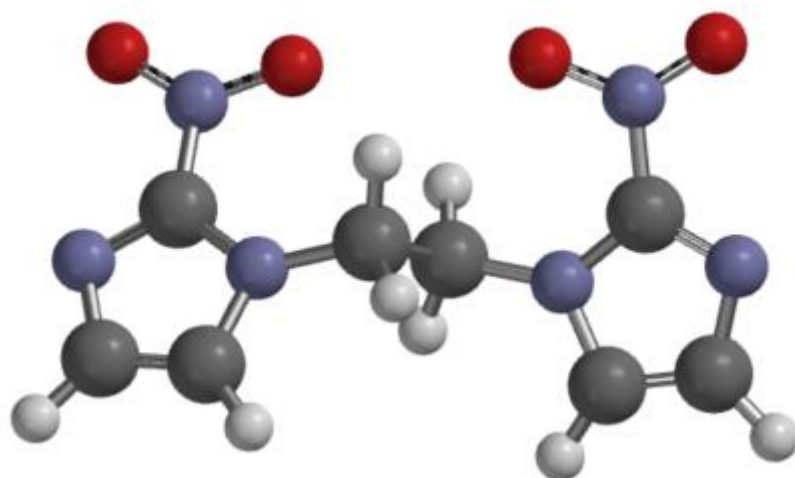
Guess from Archive
Energy Due to Solvation
Solvation Energy SM5.4/A -40.024
Memory Used: 440.80 Kb

Reason for exit: Successful completion
Semi-Empirical Program CPU Time : .23
Semi-Empirical Program Wall Time: .06

SPARTAN '14 Properties Program: (Win/64b) Release 1.1.4

Reason for exit: Successful completion
Properties CPU Time : .30
Properties Wall Time: .14

Detalhes computacionais para a minimização da energia estrutural do composto D1



SPARTAN '14 MECHANICS PROGRAM: (Win/64b) Release 1.1.4

Frequency Calculation

Adjusted 3 (out of 78) low frequency modes

Reason for exit: Successful completion

Mechanics CPU Time : .17

Mechanics Wall Time: .22

SPARTAN '14 Quantum Mechanics Driver: (Win/64b) Release 1.1.4

Job type: Geometry optimization.

Method: RB3LYP

Basis set: 6-31G(D)

Number of shells: 88

Number of basis functions: 286

Multiplicity: 1

Parallel Job: 8 threads

SCF model:

A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:

Step Energy Max Grad. Max Dist.

1 -938.829689 0.019855 0.144101

2 -938.833636 0.005649 0.125931

3 -938.834729 0.002939 0.120121

4 -938.835242 0.001747 0.091108

5 -938.835419 0.001299 0.028734

6 -938.835478 0.001080 0.025314
7 -938.835513 0.001047 0.034825
8 -938.835542 0.000908 0.028282
9 -938.835565 0.000501 0.039933
10 -938.835591 0.000688 0.035069
11 -938.835607 0.000741 0.048074
12 -938.835623 0.000514 0.107421
13 -938.835703 0.001231 0.123386 1
14 -938.836074 0.002592 0.137080 1
15 -938.836666 0.003732 0.146951 1
16 -938.837325 0.002697 0.141612
17 -938.837775 0.002215 0.102056
18 -938.837966 0.002590 0.054996
19 -938.838036 0.001399 0.017779
20 -938.838048 0.000372 0.023756
21 -938.838054 0.000451 0.006427
22 -938.838056 0.000171 0.005527
23 -938.838056 0.000098 0.003503

Reason for exit: Successful completion
Quantum Calculation CPU Time : 5:00.98
Quantum Calculation Wall Time: 15:50.02

SPARTAN '14 Semi-Empirical Program: (Win/64b) Release 1.1.4
Semi-empirical Property Calculation

M0001

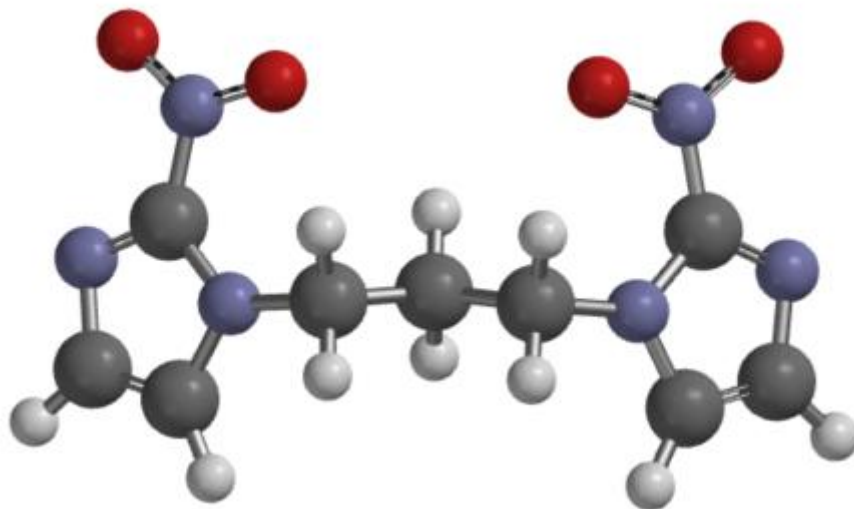
Guess from Archive
Energy Due to Solvation
Solvation Energy SM5.4/A -56.689
Memory Used: 2.871 Mb

Reason for exit: Successful completion
Semi-Empirical Program CPU Time : .30
Semi-Empirical Program Wall Time: .11

SPARTAN '14 Properties Program: (Win/64b) Release 1.1.4

Reason for exit: Successful completion
Properties CPU Time : .59
Properties Wall Time: .43

Detalhes computacionais para a minimização da energia estrutural do composto D2



SPARTAN '14 MECHANICS PROGRAM: (Win/64b) Release 1.1.4

Frequency Calculation

Adjusted 4 (out of 87) low frequency modes

Reason for exit: Successful completion

Mechanics CPU Time : .28

Mechanics Wall Time: .05

SPARTAN '14 Quantum Mechanics Driver: (Win/64b) Release 1.1.4

Job type: Geometry optimization.

Method: RB3LYP

Basis set: 6-31G(D)

Number of shells: 96

Number of basis functions: 305

Multiplicity: 1

Parallel Job: 8 threads

SCF model:

A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:

Step Energy Max Grad. Max Dist.

1 -978.150395 0.019163 0.127868

2 -978.153804 0.005767 0.209252

3 -978.154502 0.002903 0.175777

4 -978.154709 0.002282 0.107743

5 -978.154784 0.001211 0.020009

6 -978.154817 0.000435 0.016430
7 -978.154820 0.000231 0.008725
8 -978.154821 0.000126 0.008520

Reason for exit: Successful completion
Quantum Calculation CPU Time : 2:11.39
Quantum Calculation Wall Time: 6:14.04

SPARTAN '14 Semi-Empirical Program: (Win/64b) Release 1.1.4
Semi-empirical Property Calculation

M0001

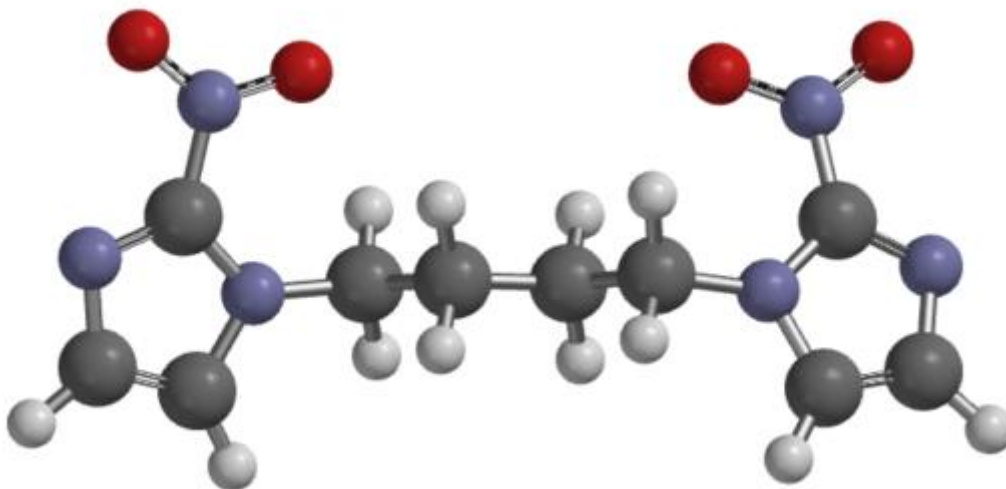
Guess from Archive
Energy Due to Solvation
Solvation Energy SM5.4/A -71.084
Memory Used: 3.501 Mb

Reason for exit: Successful completion
Semi-Empirical Program CPU Time : .28
Semi-Empirical Program Wall Time: .13

SPARTAN '14 Properties Program: (Win/64b) Release 1.1.4

Reason for exit: Successful completion
Properties CPU Time : 1.06
Properties Wall Time: .66

Detalhes computacionais para a minimização da energia estrutural do composto D3



SPARTAN '14 MECHANICS PROGRAM: (Win/64b) Release 1.1.4

Frequency Calculation

Adjusted 5 (out of 96) low frequency modes

Reason for exit: Successful completion

Mechanics CPU Time : .20

Mechanics Wall Time: .04

SPARTAN '14 Quantum Mechanics Driver: (Win/64b) Release 1.1.4

Job type: Geometry optimization.

Method: RB3LYP

Basis set: 6-31G(D)

Number of shells: 104

Number of basis functions: 324

Multiplicity: 1

Parallel Job: 8 threads

SCF model:

A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:

Step Energy Max Grad. Max Dist.

1 -1017.466833 0.016734 0.133198

2 -1017.470714 0.005014 0.185002

3 -1017.471471 0.003469 0.159541

4 -1017.471753 0.001605 0.102392

5 -1017.471839 0.001231 0.036964

6 -1017.471906 0.001114 0.043691

7 -1017.471943 0.000885 0.054017
8 -1017.471964 0.001056 0.034677
9 -1017.471972 0.001052 0.014817
10 -1017.471984 0.000691 0.036849
11 -1017.472005 0.000516 0.130286
12 -1017.472084 0.001229 0.041263
13 -1017.472097 0.001370 0.048375
14 -1017.472093 0.000606 0.019623
15 -1017.472103 0.000081 0.003966
16 -1017.472103 0.000050 0.000443

Reason for exit: Successful completion
Quantum Calculation CPU Time : 5:54.25
Quantum Calculation Wall Time: 16:24.75

SPARTAN '14 Semi-Empirical Program: (Win/64b) Release 1.1.4
Semi-empirical Property Calculation

M0001

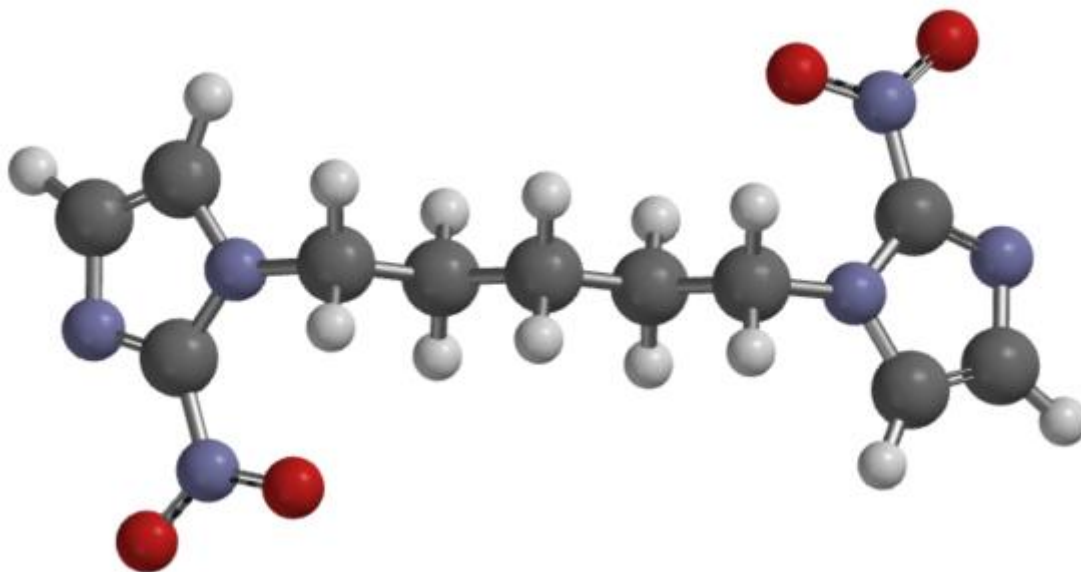
Guess from Archive
Energy Due to Solvation
Solvation Energy SM5.4/A -62.858
Memory Used: 4.213 Mb

Reason for exit: Successful completion
Semi-Empirical Program CPU Time : .30
Semi-Empirical Program Wall Time: .10

SPARTAN '14 Properties Program: (Win/64b) Release 1.1.4

Reason for exit: Successful completion
Properties CPU Time : .73
Properties Wall Time: .49

Detalhes computacionais para a minimização da energia estrutural do composto D4



SPARTAN '14 MECHANICS PROGRAM: (Win/64b) Release 1.1.4

Frequency Calculation

Adjusted 5 (out of 105) low frequency modes

Reason for exit: Successful completion

Mechanics CPU Time : .23

Mechanics Wall Time: .23

SPARTAN '14 Quantum Mechanics Driver: (Win/64b) Release 1.1.4

Job type: Geometry optimization.

Method: RB3LYP

Basis set: 6-31G(D)

Number of shells: 112

Number of basis functions: 343

Multiplicity: 1

Parallel Job: 8 threads

SCF model:

A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:

Step Energy Max Grad. Max Dist.

1 -1056.783204 0.022191 0.111752

2 -1056.787111 0.005661 0.214324

3 -1056.787861 0.004179 0.122092

4 -1056.788136 0.001980 0.100072

5 -1056.788295 0.001724 0.067581
6 -1056.788407 0.001013 0.057448
7 -1056.788462 0.001288 0.029248
8 -1056.788474 0.000362 0.017094
9 -1056.788478 0.000181 0.005493
10 -1056.788479 0.000138 0.002266
11 -1056.788479 0.000038 0.000688

Reason for exit: Successful completion
Quantum Calculation CPU Time : 4:32.30
Quantum Calculation Wall Time: 12:25.34

SPARTAN '14 Semi-Empirical Program: (Win/64b) Release 1.1.4
Semi-empirical Property Calculation

M0001

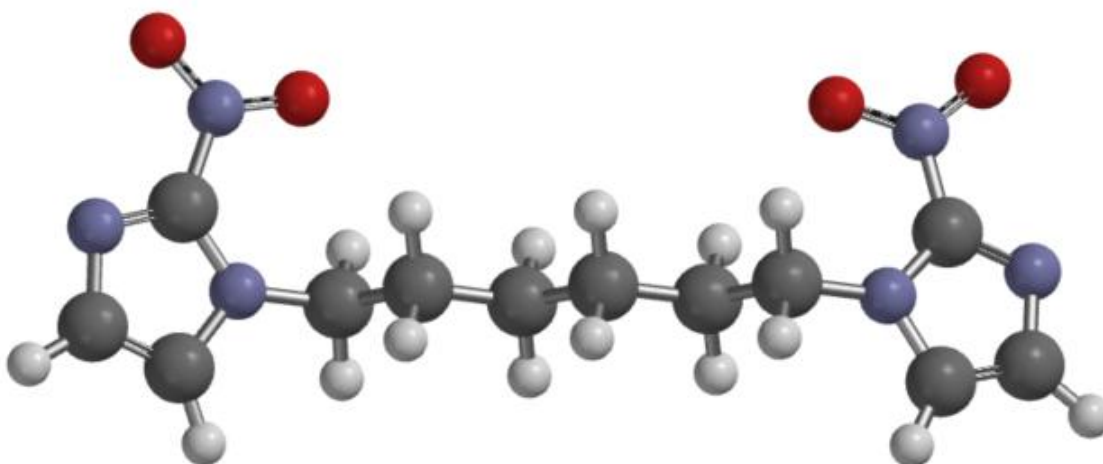
Guess from Archive
Energy Due to Solvation
Solvation Energy SM5.4/A -54.565
Memory Used: 5.012 Mb

Reason for exit: Successful completion
Semi-Empirical Program CPU Time : .28
Semi-Empirical Program Wall Time: .25

SPARTAN '14 Properties Program: (Win/64b) Release 1.1.4

Reason for exit: Successful completion
Properties CPU Time : .77
Properties Wall Time: .59

Detalhes computacionais para a minimização da energia estrutural do composto D5



SPARTAN '14 MECHANICS PROGRAM: (Win/64b) Release 1.1.4

Frequency Calculation

Adjusted 6 (out of 114) low frequency modes

Reason for exit: Successful completion

Mechanics CPU Time : .20

Mechanics Wall Time: .11

SPARTAN '14 Quantum Mechanics Driver: (Win/64b) Release 1.1.4

Job type: Geometry optimization.

Method: RB3LYP

Basis set: 6-31G(D)

Number of shells: 120

Number of basis functions: 362

Multiplicity: 1

Parallel Job: 8 threads

SCF model:

A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:

Step Energy Max Grad. Max Dist.

1 -1096.095853 0.020044 0.111921

2 -1096.100024 0.004837 0.191151

3 -1096.100807 0.002907 0.168942

4 -1096.101112 0.002226 0.109243

5 -1096.101206 0.001314 0.037851

6 -1096.101273 0.000966 0.019995

7 -1096.101293 0.000879 0.040876

8 -1096.101316 0.000609 0.079767
9 -1096.101344 0.000890 0.025820
10 -1096.101357 0.000257 0.011966
11 -1096.101361 0.000252 0.005396
12 -1096.101362 0.000042 0.000685

Reason for exit: Successful completion
Quantum Calculation CPU Time : 3:18.73
Quantum Calculation Wall Time: 10:45.13

SPARTAN '14 Semi-Empirical Program: (Win/64b) Release 1.1.4
Semi-empirical Property Calculation

M0001

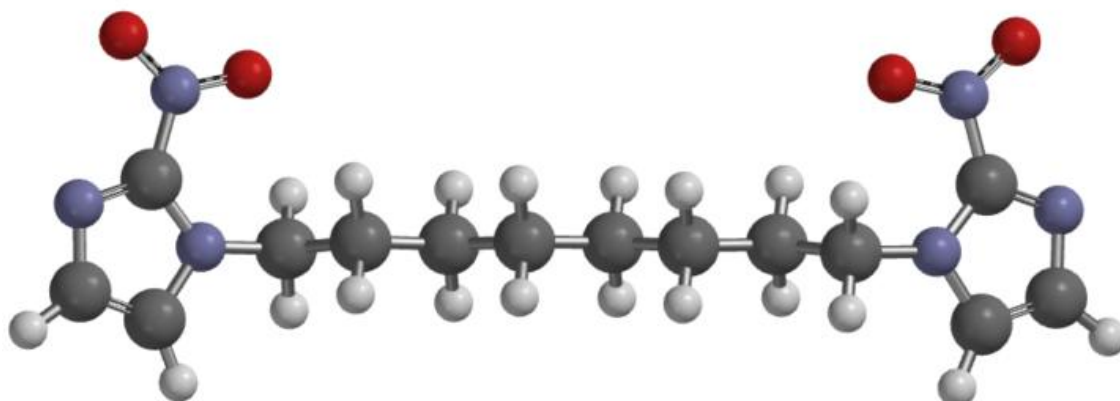
Guess from Archive
Energy Due to Solvation
Solvation Energy SM5.4/A -59.159
Memory Used: 5.904 Mb

Reason for exit: Successful completion
Semi-Empirical Program CPU Time : .34
Semi-Empirical Program Wall Time: .11

SPARTAN '14 Properties Program: (Win/64b) Release 1.1.4

Reason for exit: Successful completion
Properties CPU Time : .84
Properties Wall Time: .66

Detalhes computacionais para a minimização da energia estrutural do composto D6



SPARTAN '14 MECHANICS PROGRAM: (Win/64b) Release 1.1.4

Frequency Calculation

Adjusted 6 (out of 132) low frequency modes

Reason for exit: Successful completion

Mechanics CPU Time : .17

Mechanics Wall Time: .05

SPARTAN '14 Quantum Mechanics Driver: (Win/64b) Release 1.1.4

Job type: Geometry optimization.

Method: RB3LYP

Basis set: 6-31G(D)

Number of shells: 136

Number of basis functions: 400

Multiplicity: 1

Parallel Job: 8 threads

SCF model:

A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:

Step Energy Max Grad. Max Dist.

1 -1174.723386 0.021198 0.097755

2 -1174.728057 0.004547 0.180716

3 -1174.728894 0.002856 0.142910

4 -1174.729235 0.002379 0.138770

5 -1174.729358 0.001300 0.047450

6 -1174.729439 0.000741 0.018782

7 -1174.729451 0.001086 0.008804

8 -1174.729455 0.000820 0.006168

9 -1174.729460 0.000495 0.011758

10 -1174.729465 0.000309 0.017107

11 -1174.729471 0.000309 0.012213
12 -1174.729474 0.000105 0.002999
13 -1174.729475 0.000049 0.000844

Reason for exit: Successful completion
Quantum Calculation CPU Time : 5:29.30
Quantum Calculation Wall Time: 1:04:20.92

SPARTAN '14 Semi-Empirical Program: (Win/64b) Release 1.1.4
Semi-empirical Property Calculation

M0001

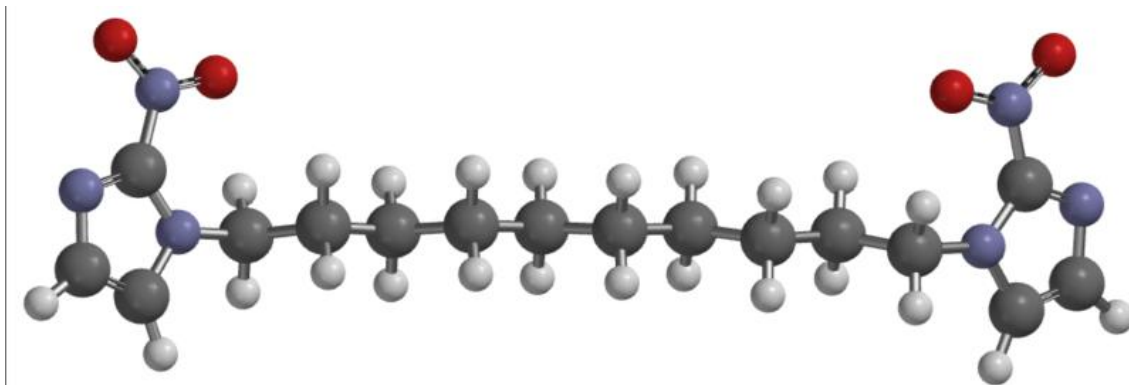
Guess from Archive
Energy Due to Solvation
Solvation Energy SM5.4/A -55.489
Memory Used: 7.984 Mb

Reason for exit: Successful completion
Semi-Empirical Program CPU Time : .52
Semi-Empirical Program Wall Time: .26

SPARTAN '14 Properties Program: (Win/64b) Release 1.1.4

Reason for exit: Successful completion
Properties CPU Time : 1.55
Properties Wall Time: 1.36

Detalhes computacionais para a minimização da energia estrutural do composto D7



SPARTAN '14 MECHANICS PROGRAM: (Win/64b) Release 1.1.4

Frequency Calculation

Adjusted 9 (out of 150) low frequency modes

Reason for exit: Successful completion

Mechanics CPU Time : .58

Mechanics Wall Time: .14

SPARTAN '14 Quantum Mechanics Driver: (Win/64b) Release 1.1.4

Job type: Geometry optimization.

Method: RB3LYP

Basis set: 6-31G(D)

Number of shells: 152

Number of basis functions: 438

Multiplicity: 1

Parallel Job: 8 threads

SCF model:

A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:

Step Energy Max Grad. Max Dist.

1 -1253.350689 0.027475 0.099212

2 -1253.355817 0.005722 0.143505

3 -1253.356685 0.003922 0.114736

4 -1253.356981 0.002229 0.095731

5 -1253.357087 0.001343 0.049245

6 -1253.357176 0.000863 0.037518

7 -1253.357204 0.001390 0.025107

8 -1253.357217 0.001294 0.028092

9 -1253.357239 0.001051 0.047753

10 -1253.357279 0.001236 0.038372

11 -1253.357322 0.001053 0.027056
12 -1253.357351 0.000382 0.009818
13 -1253.357354 0.000143 0.005974
14 -1253.357355 0.000172 0.002083

Reason for exit: Successful completion
Quantum Calculation CPU Time : 8:03.27
Quantum Calculation Wall Time: 23:53.84

SPARTAN '14 Semi-Empirical Program: (Win/64b) Release 1.1.4
Semi-empirical Property Calculation

M0001

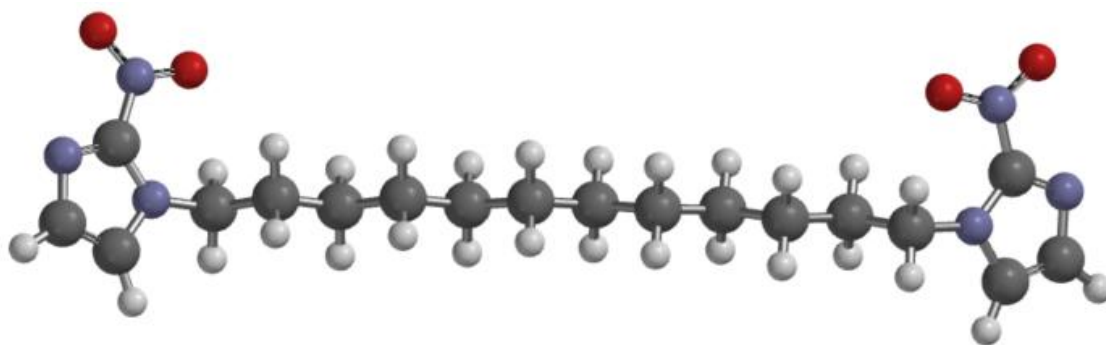
Guess from Archive
Energy Due to Solvation
Solvation Energy SM5.4/A -52.852
Memory Used: 10.494 Mb

Reason for exit: Successful completion
Semi-Empirical Program CPU Time : .58
Semi-Empirical Program Wall Time: .33

SPARTAN '14 Properties Program: (Win/64b) Release 1.1.4

Reason for exit: Successful completion
Properties CPU Time : 1.84
Properties Wall Time: 1.59

Detalhes computacionais para a minimização da energia estrutural do composto D8



SPARTAN '14 MECHANICS PROGRAM: (Win/64b) Release 1.1.4

Frequency Calculation

Adjusted 9 (out of 168) low frequency modes

Reason for exit: Successful completion

Mechanics CPU Time : .33

Mechanics Wall Time: .10

SPARTAN '14 Quantum Mechanics Driver: (Win/64b) Release 1.1.4

Job type: Geometry optimization.

Method: RB3LYP

Basis set: 6-31G(D)

Number of shells: 168

Number of basis functions: 476

Multiplicity: 1

Parallel Job: 8 threads

SCF model:

A restricted hybrid HF-DFT SCF calculation will be performed using Pulay DIIS + Geometric Direct Minimization

Optimization:

Step Energy Max Grad. Max Dist.

1 -1331.977626 0.032288 0.114390

2 -1331.983351 0.005984 0.184164

3 -1331.984236 0.004070 0.140416

4 -1331.984556 0.001817 0.133523

5 -1331.984674 0.001206 0.058906

6 -1331.984792 0.001517 0.066321

7 -1331.984859 0.002031 0.037227

8 -1331.984902 0.001875 0.053380

9 -1331.984973 0.001297 0.044037

10 -1331.985038 0.001243 0.040541

11 -1331.985079 0.000659 0.027550

12 -1331.985092 0.000183 0.010953

13 -1331.985094 0.000197 0.002938
14 -1331.985095 0.000071 0.002005
15 -1331.985095 0.000029 0.000284

Reason for exit: Successful completion
Quantum Calculation CPU Time : 9:28.16
Quantum Calculation Wall Time: 44:32.65

SPARTAN '14 Semi-Empirical Program: (Win/64b) Release 1.1.4
Semi-empirical Property Calculation

M0001

Guess from Archive
Energy Due to Solvation
Solvation Energy SM5.4/A -50.813
Memory Used: 13.471 Mb

Reason for exit: Successful completion
Semi-Empirical Program CPU Time : .66
Semi-Empirical Program Wall Time: .34

SPARTAN '14 Properties Program: (Win/64b) Release 1.1.4

Reason for exit: Successful completion
Properties CPU Time : 2.22
Properties Wall Time: 2.83



Short Note

2-Nitro-1-vinyl-1H-imidazole

Afonso Santine M. M. Velez ^{1,†}, Gabriela Alves de Souza ^{1,†}, Paulo Pitasse-Santos ¹,
Douglas Chaves de Alcântara Pinto ¹, Debora Decote-Ricardo ² and Marco Edilson Freire de Lima ^{1,*}

¹ Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23890-000, Brazil; afonsov30@gmail.com (A.S.M.M.V.); gabrielakrt@hotmail.com (G.A.d.S.); paulopitasse@gmail.com (P.P.S.); douglasdoti@hotmail.com (D.C.d.A.P.)

² Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23890-000, Brazil; decoter Ricardo@ufrj.br

* Correspondence: marcoedilson@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Nitroimidazoles are pharmacophoric groups responsible for important antiparasitic activity against several infectious diseases. 2-Nitroimidazoles are found in some antiparasitic drugs and are one of the main moieties responsible for the biological activities exhibited. As an example, we can mention the drug benznidazole, the only drug available in Brazil for the treatment of Chagas disease. This work describes an efficient methodology for the synthesis of 2-nitro-1-vinyl-1H-imidazole through a simple and direct approach, as well as its full characterization and biological assessment. The antiparasitic evaluation of 2-nitro-1-vinyl-1H-imidazole against *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen C2C4-LacZ strain) showed IC₅₀ = 4.8 μM on amastigotes and low cytotoxicity against LLC-MK2 cells (IC₅₀ > 500 μM), validating 2-nitro-1-vinyl-1H-imidazole as a biologically active structural subunit for anti-*T. cruzi* activity. The results presented herein demonstrate that 2-nitro-1-vinyl-1H-imidazole can be easily obtained, possessing great potential for use in the design of new antichagasic drugs through a molecular hybridization strategy using known coupling reactions.

Keywords: imidazole alkylation; Chagas disease; antiparasitic drugs; *Trypanosoma cruzi*



Citation: Velez, A.S.M.M.; de Souza, G.A.; Pitasse-Santos, P.; de Alcântara Pinto, D.C.; Decote-Ricardo, D.; de Lima, M.E.F. 2-Nitro-1-vinyl-1H-imidazole. *Molbank* **2022**, *2022*, M1326. <https://doi.org/10.3390/M1326>

Academic Editor: Fang-Rong Chang

Received: 5 January 2022
Accepted: 25 January 2022
Published: 27 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Nitroimidazoles are a class of molecules that present in their structure a five-membered heterocycle, with two nitrogen atoms in the 1 and 3 positions and a nitro group that can appear in the 2, 4 or 5 position. The first nitroimidazole isolated and characterized from a natural source was azomycin **1** (2-nitroimidazole), a natural antibiotic from *Streptomyces eurocidicus*, in the 1950s, while a group of scientists analyzed the activity of this extract against *Trichomonas vaginalis* [1,2]. 2-Nitro-1-vinyl-1H-imidazole **2** was first described in the 1984 Hoffman-La Roche patent as an antiparasitic agent with filaricidal activity, exhibiting average ED₉₀ values against *Litomosoides sigmodontis*, formerly known as *L. carinii*, in cotton rats at doses of 12 mg/kg [3,4]. Despite its description in this patent, which, as far as we know, is the only description of derivative **2** in the literature, the work does not describe characterization data or even further details on the methodology used in its preparation. The use of nitroimidazoles as antiparasitic agents deserves significant attention, since important drugs currently used to treat both parasitic and bacterial infections have a nitroheterocycle group in their structure, such as benznidazole **3** (2-nitroimidazole) and nifurtimox **4** (5-nitrofuran). These are the only drugs used to treat Chagas disease that possess protozoa hemoflagellate *T. cruzi* as an etiologic agent [5–7], in addition to meglazine **5** and fexinidazol **6** (both 1-methyl-5-nitroimidazole), which have great antichagasic potential [8], and metronidazole **7** (2-methyl-5-nitroimidazole) for the treatment of infections caused by protozoa such as *Trichomonas vaginalis* [1], *Giardia Lamblia* [9] and bacterial infections. The nitroheterocyclic portion is pharmacophoric to the drugs shown in Figure 1, characterizing this core as a fundamental subunit in the structure of this set of drugs.

O POTENCIAL DA XANTONA NATURAL α -MANGOSTINA NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES ANTI-INFECCIOSOS: UMA REVISÃO

Douglas Chaves de Alcântara Pinto^a, Gabriela Alves de Souza^a, Paulo Pítasse-Santos^a, Afonso Santine M. M. Velez^a, Debora Decote-Ricardo^b, Debora Regina Lopes dos Santos^b, Leonardo Freire-de-Lima^a, Célio G. Freire-de-Lima^a e Marco Edilson Freire de Lima^{a,*}

^aDepartamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000 Seropédica – RJ, Brasil

^bDepartamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000 Seropédica – RJ, Brasil

^cInstituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 20/05/2022; aceito em 06/09/2022; publicado na web 27/09/2022

THE POTENTIAL OF NATURAL XANTHONE α -MANGOSTIN IN THE DEVELOPMENT OF NOVEL ANTIINFECTION AGENTS: A REVIEW. The mangosteen (*Garcinia mangostana*, Linn.) is a tropical fruit cultivated in the tropical forests of Southeast Asian countries. It is recognized as the queen of fruits due to its unique color, aroma, and flavor. It has been used for centuries in Southeast Asian traditional medicine for the treatment of various diseases. Many functional molecules with high medicinal value are obtained from the pericarp of mangosteen fruit, whose major constituent is xanthone α -mangostin. Several studies have been carried out over the last decades to further investigate and understand the pharmacological properties associated with the plant and its main chemical constituents, belonging to the class of xanthenes. In addition, numerous *in vitro* and *in vivo* studies related to mangosteen have been published, indicating its importance and its potential application in medicinal chemistry. Prenylated xanthenes, which include α -mangostin, are secondary metabolites particularly common in plants belonging to the Clusiaceae family. These substances have been intensively investigated for their potential as biologically active agents. This article describes a critical analysis of published data related to the properties of α -mangostin, aiming to provide a more detailed view of its potential as a chemotherapeutic agent for the prevention and treatment of infectious diseases.

Keywords: *Garcinia mangostana*; antiviral; antiparasitic; antibacterial; antifungal.

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais (PNs) são reconhecidos historicamente por sua grande importância e contribuição na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos, sendo uma fonte extremamente relevante para a busca de novas alternativas terapêuticas, prevenção e tratamento de diversas doenças. PNs têm como principais características elevadas diversidade e complexidade estruturais, agregando grandes vantagens ao processo de descoberta de novas substâncias potencialmente bioativas.^{1,2} Para suprir as funções biológicas essenciais durante a evolução, os PNs passaram por otimização de suas estruturas, permitindo o controle dos mais diversos mecanismos de defesa endógenos, bem como propiciando mecanismos de competição com outros organismos. Isso explicaria a grande relevância nos estudos e aplicação destas substâncias para o tratamento de doenças infecciosas e do câncer. A sua longa utilização na medicina tradicional, por diferentes povos pertencentes a culturas distintas, é uma fonte de informações valiosas sobre o perfil de eficácia e segurança dos produtos de origem natural. Além disso, os efeitos adversos, observados para fármacos de origem sintética, devido principalmente ao seu uso em maior escala, despertaram crescente interesse por PNs derivados de plantas.^{3,4}

Outro ponto relevante é que os produtos químicos de origem natural, mesmo aqueles de origem vegetal, que são os mais estudados, ainda estão longe de serem investigados de forma exaustiva.⁵ Geralmente, as substâncias naturais apresentam massa molecular elevada, maior número de átomos de Carbono sp^3 e átomos de

Oxigênio, e um menor número de átomos de Nitrogênio e Halogênios. Devido às suas características estruturais, os PNs possuem, em geral, maior número de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, um ponto de grande relevância para as interações destes com os diferentes tipos de receptores biológicos. Além disso, os produtos de origem natural, normalmente, detêm um menor coeficiente de partição, o que indica uma maior hidrofobicidade. Eles podem ainda apresentar maior rigidez molecular, em relação aos compostos de origem sintética.⁶ Essas características e circunstâncias revitalizaram o interesse dos pesquisadores na descoberta de medicamentos com base em produtos obtidos de fontes naturais. Para o aproveitamento mais racional de todo esse potencial, é de fundamental importância a adoção de uma abordagem interdisciplinar: aliar conhecimento etnofarmacológico a outras importantes áreas do conhecimento, como a botânica, a fitoquímica, a química computacional, as estratégias biotecnológicas e sintéticas, além de testes farmacológicos, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. O trabalho coordenado entre as diferentes áreas é crucial para o sucesso das pesquisas na área da química medicinal de produtos naturais.⁷ Nesta revisão serão discutidos os aspectos químicos e de atividade biológica da xantona natural α -mangostina, presente no pericarpo dos frutos do mangostão e que possui promissora aplicabilidade no desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos.

A QUÍMICA DA XANTONA NATURAL α -MANGOSTINA**Xantonas**

As xantonas são estruturas de origem natural, presentes como metabólitos secundários em famílias de plantas superiores, mas

*e-mail: marcoedilson@gmail.com

MINI REVIEW

The Brazilian Increase in Cases of Lung Cancer and COVID-19, Can They be related?

Lorrane de Souza Chaves¹, Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez²,
Leonardo Freire-de-Lima^{1*} and Marco Edilson Freire de Lima^{2*}

¹Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 21941-902, Brazil

²Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 23897-000, Brazil

Abstract

Last year in Brazil, lung cancer was the third most common tumor in men and the fourth in women, without counting non-melanoma skin cancer. It is the first in the world in incidence among men and the third among women. When we talk about mortality, it is the first among the male audience and the second among the female audience. But what are its main causes? Did COVID-19 contribute to the increase in cases of this neoplasm?

Introduction

Since the 1960s, changes have been observed in the profile of diseases that affect human populations. Infectious and parasitic diseases ceased to be the main cause of death and were replaced by diseases of the circulatory system and cancers [1].

Smoking is, without a doubt, an important risk factor for the development of lung cancer. For this reason, quitting smoking is essential, the risk factor does not decrease immediately, but it gets smaller over time, studies have shown that ex-smokers always have a slightly higher risk than those who have never smoked, but even so, it is much lower than for people who continue to smoke. In addition to smoking, there are other possible causes of lung cancer, such as environmental pollution, exposure to radiation and genetic issues.

In 2022, cases of lung cancer in Brazil had the following proportions: 18.020 new cases in men, representing 7.5% of all cancers and 14.540 new cases in women, which represented 6.0% of all cancers. In 2018, pre-COVID-19, that number was 6.042 for men and 4.747 for women, a 33% increase for both [2]. Nowadays, the question is: With the pandemic, people smoked more or less? COVID-19 helped to increase cases?

What about COVID-19?

COVID-19 emerged in China in late 2019 and quickly reached pandemic status and studies have shown that smoking could be a risk factor for severe manifestations of COVID-19, other studies have shown that lung cancer patients are four times more likely to die if they are infected with COVID-19 [3].

*Corresponding author(s)

Marco Edilson Freire de Lima,
Departamento de Química Orgânica,
Instituto de Química, Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ,
23897-000, Brazil

ORCID: 0000-0003-0563-3483

Email: marco@ufrj.br

Leonardo Freire-de-Lima, Instituto
de Biofísica Carlos Chagas Filho,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro 21941-902, Brazil

ORCID: 0000-0003-3013-3173

Email: leolima@biof.ufrj.br

DOI: 10.37871/jbres1731

Submitted: 27 March 2023

Accepted: 15 April 2023

Published: 17 April 2023

Copyright: © 2023 de Souza Chaves L, et al.
Distributed under Creative Commons CC-BY
4.0 ©

OPEN ACCESS

Keywords

- Lung cancer
- COVID-19
- Smoking
- Cancer

MEDICINE GROUP

CANCER

PULMONOLOGY

PUBLIC HEALTH

VOLUME: 4 ISSUE: 4 - APRIL, 2023



How to cite this article: de Souza Chaves L, Magalhães Mesquita Velez AS, Freire-de-Lima L, de Lima MEF. The Brazilian Increase in Cases of Lung Cancer and COVID-19, Can They be related? J Biomed Res Environ Sci. 2023 Apr 17; 4(4): 736-737. doi: 10.37871/jbres1731, Article ID: JBRES1731, Available at: <https://www.jelsciences.com/articles/jbres1731.pdf>



Chemodiversity and Trypanocidal Activity of the Volatile Oils of Tropical Black Sage

Elisabeth Alves Duarte Pereira de Medeiros¹ · Rayssa Vicente Nascimento¹ · Eduardo Barros Duarte Junior¹ · Camila da Silva Barbosa Pereira¹ · Ygor Nunes Moreira¹ · Rafael Torre¹ · Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez² · Debora Decote-Ricardo³ · Marco Edilson Freire de Lima² · André Marques dos Santos¹ · Pedro Corrêa Damasceno Junior⁴ · Marco Andre Alves de Souza¹

Received: 9 January 2024 / Accepted: 17 May 2024 / Published online: 11 June 2024
© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Farmacognosia 2024

Abstract

Tropical black sage (*Varronia curassavica* Jacq., Cordiaceae) is a species native to ecosystems subject to strong anthropic action, and thus is at risk of genetic erosion. However, little is known about this important genetic resource, with possible uses in the aromas, fragrances, and pharmaceutical sectors. The objective of this work was to prospect and study native specimens of tropical black sage regarding the content (% w/w), chemical profile, and trypanocidal activity of the volatile oils. For this purpose, we collected *in situ* 47 specimens. The volatile oils were obtained by distillation from leaves, quantified, and analyzed by gas chromatography with flame ionization detection and gas chromatography coupled with mass spectrometry. The resulting data were submitted to descriptive statistical and multivariate analyses. The content of volatile oil ranged from 0.3 to 4.2% based on dry leaves. The volatile oils had average contents of 33.4 and 44.9% of oxygenated and non-oxygenated sesquiterpenes, respectively. The proportion of the compound α -humulene varied from 0.3 to 11.1%, with frequency of 100%. Cluster analysis indicated the formation of 10 groups with 50% similarity among the volatile oil samples. The sample with the best trypanocidal activity was ESB45, with IC_{50} of 74.6 μ g/ml and 100% inhibition of the viability of the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* at the concentration of 300 μ g/ml. Tropical black sage is a source of oxygenated sesquiterpenes, an important chemical class for synthesis and development of medicines. For this reason, efforts are necessary to preserve the genetic information about the species.

Keywords *Cordia curassavica* · *Cordia verbenacea* · Essential oil · Genetic resources · Chemical diversity · Terpenoids

Introduction

Restinga is common ecosystem in the Atlantic Forest biome, with specific morphoclimatic conditions due to marine and estuarine influences, causing the formation of habitats with great diversity (Marques et al. 2011). It is estimated that some 370 species of plants are endemic to restinga, many needing scientific analysis (Zappi et al. 2015; Costa et al. 2018). The expanding urbanization of the Brazilian coastline, including irregular and disorderly occupation of areas reserved for permanent preservation, such as vegetation near beaches, rivers, and wetlands, is causing genetic erosion of sensitive species such as tropical black sage (Ribeiro et al. 2011; Cunha et al. 2020; Dos Santos and Pedrosa Junior 2021).

Tropical black sage (*Varronia curassavica* Jacq., Cordiaceae, syn.: *Cordia verbenacea* DC.; *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult) is a shrub species with a strong

✉ Marco Andre Alves de Souza
decoerej@ufrj.br

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

² Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

³ Instituto de Veterinária, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Departamento de Agrotecnologia e Sustentabilidade, Instituto de Agronomia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Seasoning to Kill: the Example of the Natural Amide Piperine and Its Potential in the Design of New Antiparasitic Drugs

Afonso S. M. M. Velez,^a Paulo Pitasse-Santos,^b Leonardo Freire-de-Lima,^c
Célio G. Freire-de-Lima,^c Debora Decoté-Ricardo^d and Marco E. F. de Lima^{a,*}^aDepartamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000 Seropédica-RJ, Brazil^bLeicester Institute of Structural and Chemical Biology and School of Chemistry, University of Leicester, LE1 7RH Leicester, UK^cInstituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21941-902 Rio de Janeiro-RJ, Brazil^dDepartamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000 Seropédica-RJ, Brazil

Natural products have long been explored in the history of most cultures worldwide. They have been mainly applied in the therapy of some diseases and for food preservation due to the antimicrobial properties of some condiments. Most of this knowledge was empirically discovered and passed from generation to generation. Over the last few years, the evolution of organic chemistry and the techniques of analysis and purification of compounds from complex matrices enabled a significant increase in research to identify bioactive products isolated from plants. In this paper, we briefly discuss the relevance of natural products on drug development, mainly focusing on amide piperine, the main chemical constituent of black pepper (*Piper nigrum*). Its antiparasitic activities and the knowledge of possible mechanisms of action against different parasites provide essential information for drug development. Furthermore, its compatibility with medicinal and synthetic chemistry techniques allows the development of more effective drug candidates.

Keywords: *Piper nigrum*, black pepper, piperamides, chemotherapy, parasitic diseases, NTDs

1. Introduction

Since antiquity, the use of medicinal plants directly or in the form of infusions in the therapy of the most diverse diseases has been known in several cultures. This knowledge of traditional medicine was passed down through generations, accumulating and improving in the most diverse cultures and societies. Over the last two centuries, it has made remarkable contributions to the development of the chemistry of natural products and medicinal chemistry as we know it today.^{1,2}

*e-mail: marcoedilson@gmail.com

Editor handled this article: Hector Henrique F. Koolen (Associate)

This review is dedicated to the memory of the brilliant Brazilian scientist Prof Eliezer J. Barreiro in recognition of his outstanding contribution to the development of Brazilian medicinal chemistry, mainly in training an entire generation of researchers now working in institutions both in Brazil as abroad.



Natural products are the largest known source of bioactive molecules. Their great chemical diversity spans an extensive variety of structures capable of interacting with different biochemical models present in living organisms.³ Primary metabolites present in plants, such as polysaccharides, proteins, and fatty acids, mostly have plastic, structural, and energy storage functions. Special metabolites, on the other hand, are biosynthesized by plant organisms and are not necessarily used in the maintenance of their vital functions.^{4,5} These metabolites present a greater chemical diversity and are, generally, products that had their synthesis naturally selected and modulated throughout evolutionary cycles, because of a given species' adaptation mechanisms. Their function in nature includes defense against pests and pathogenic microorganisms, or as an attractive (visual or olfactory) for pollinators.^{2,4,6-8} It is important to highlight the relationship of the interaction of these special metabolites with biochemical targets of



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.



Article

Design and Synthesis of Bis-Chalcones as Curcumin Simplified Analogs and Assessment of Their Antiproliferative Activities Against Human Lung Cancer Cells and *Trypanosoma cruzi* Amastigotes [†]

Gabriela Alves de Souza ^{1,†}, Lorrane de Souza Chaves ^{2,3,†}, Afonso Santine M. M. Velez ¹, Jorge Lucas F. Lacerda ¹, Paulo Pitasse-Santos ^{4,5}, Jayane Clys Conceição dos Santos ¹, Otávio Augusto Chaves ^{6,7}, Carlos Serpa ⁶, Raphael do Carmo Valente ⁸, Leonardo Marques da Fonseca ^{2,9}, Marcos André Rodrigues da Costa Santos ², Jhenifer Santos dos Reis ², Carlos Antônio do Nascimento Santos ², Lucia Mendonça-Previato ², Jose Osvaldo Previato ², Celio Geraldo Freire-de-Lima ², Debora Decoté-Ricardo ¹⁰, Leonardo Freire-de-Lima ^{2,3,11,*} and Marco Edilson Freire de Lima ^{1,*}

¹ Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23.897-000, RJ, Brazil; gabrielakrt@hotmail.com (G.A.d.S.); afonsosv30@gmail.com (A.S.M.M.V.); jl.lacerda4@gmail.com (J.L.F.L.); jaycly@ufrj.br (J.C.C.d.S.)

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil; lochaves8@gmail.com (L.d.S.C.); lfonseca@biof.ufrj.br (L.M.d.F.); rodrigues8mr@gmail.com (M.A.R.d.C.S.); jhnffrrs8@gmail.com (J.S.d.R.); cansantos.bio@gmail.com (C.A.d.N.S.); luciamp@biof.ufrj.br (L.M.-P.); previato@biof.ufrj.br (J.O.P.); celio@biof.ufrj.br (C.G.F.-d.-L.)

³ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil

⁴ Leicester Institute of Structural and Chemical Biology, University of Leicester, Leicester LE1 7HB, UK; paulopitasse@gmail.com

⁵ School of Chemistry, University of Leicester, Leicester LE1 7RH, UK

⁶ Department of Chemistry, Coimbra Chemistry Centre-Institute of Molecular Science, University of Coimbra, 3004-535 Coimbra, Portugal; otavioaugustochaves@gmail.com (O.A.C.); serpasoa@ci.uc.pt (C.S.)

⁷ Laboratory of Immunopharmacology, Centro de Pesquisa, Inovação e Vigilância em COVID-19 e Emergências Sanitárias, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro 21040-361, RJ, Brazil

⁸ Campus Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Duque de Caxias 25.240-005, RJ, Brazil; raphael.valente@caxias.ufrj.br

⁹ Curso de Medicina, Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro 21.710-255, RJ, Brazil

¹⁰ Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23.897-000, RJ, Brazil; decoter Ricardo@ufrj.br

¹¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil

* Correspondence: leolima@biof.ufrj.br (L.F.-d.-L.); marcoedilson@gmail.com (M.E.F.d.L.)

[†] The authors dedicate this work to the memory of Professor Carlos Alberto Manssour Fraga, who passed away prematurely in May 2024. Although his absence is deeply felt, his legacy and contributions to science live on. His memory will be remembered forever for his colleagues, students, and all who had the honor of having a close relationship with him and witnessing his passion for medicinal chemistry.

[‡] These authors contributed equally to this work.



Academic Editor: Emmanuel Moreau

Received: 19 February 2025

Revised: 10 March 2025

Accepted: 12 March 2025

Published: 24 March 2025

Citation: de Souza, G.A.; Chaves, L.d.S.; Velez, A.S.M.M.; Lacerda, J.L.F.; Pitasse-Santos, P.; dos Santos, J.C.C.; Chaves, O.A.; Serpa, C.; Valente, R.d.C.; Fonseca, L.M.d.; et al. Design and Synthesis of Bis-Chalcones as Curcumin Simplified Analogs and Assessment of Their Antiproliferative Activities Against Human Lung Cancer Cells and *Trypanosoma cruzi* Amastigotes. *Pharmaceuticals* **2025**, *18*, 456. <https://doi.org/10.3390/ph18040456>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: Anticancer therapies represent the primary treatment option for a significant number of cancer patients globally; however, many of these treatments are associated with severe side effects as they target molecular structures present in both cancerous and healthy cells. In a similar context, the treatment of Chagas disease, a neglected tropical illness, is hindered by the high toxicity of the currently available drugs. Researchers are increasingly focusing on the development of safer and more selective alternatives, with natural compounds being studied as potential starting points for the creation of more effective drug candidates with a favorable therapeutic index. **Objectives:** The aim of this study was to design simplified curcumin-derived structures that preserved or enhanced their therapeutic activity against human lung cancer cell lines and *T. cruzi*, while also improving bioavailability and minimizing toxicity. **Methods:** In this study,

C-methylated Flavanones with Antitrypanosomal Activity Isolated of Geopropolis from *Melipona mondury*

Rafael Ferreira dos Santos, Afonso Santine M. M. Velez, Gabriel Fulgencio dos Santos, Paulo Pitasse-Santos, Bruno Sena de Oliveira, Marco Edilson Freire de Lima, Carlos Mauricio R. Sant'Anna, Raimundo Braz Filho, Debora Decote-Ricardo, and Rosane Nora Castro*



Cite This: *ACS Omega* 2025, 10, 23397–23408



Read Online

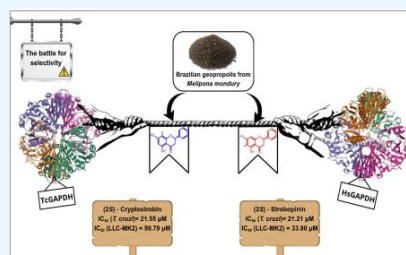
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Geopropolis is a natural antibiotic produced by stingless bees, supplemented with earth and clay. Bee products are a promising source of natural bioactive compounds with potential for the development of new drugs for neglected tropical diseases, such as Chagas disease. This study analyzed extracts of *Melipona mondury* geopropolis from the Bosque da Barra da Tijuca (RJ, Brazil) and evaluated their activity against *Trypanosoma cruzi*. The extracts were obtained using commercial grain alcohol 96° GL and fractionated with hexane and dichloromethane. The antichagasic activity was determined, with IC_{50} values ranging from 4.54 to 53.02 $\mu\text{g/mL}$. Phytochemical investigation of the dichloromethane fraction resulted in the isolation of two C-methylated flavanones, (2S)-strobopinin and (2S)-cryptostrobin, which were identified for the first time in Brazilian geopropolis. These compounds showed IC_{50} values of 21.21 μM and 21.55 μM , respectively, with distinct cytotoxicities: 33.80 μM for strobopinin and 99.79 μM for cryptostrobin. Molecular modeling studies were conducted to propose a mechanism of action on a candidate enzyme target, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and possible reasons for the selectivity differences caused by C-methylation. The results highlight *M. mondury* geopropolis as a promising natural source of antiparasitic agents, supporting its potential for drug development.



INTRODUCTION

Natural products, especially bee products, have contributed significantly to the supply of bioactive substances used in treating various diseases that affect animals and humans.¹ Among the products bees produce geopropolis stands out, which has increasingly motivated the scientific community to develop new studies to understand the chemical composition and potential biological properties of this resin.²

Geopropolis, also known as batume, consists of a mixture of vegetable resins with clay, made by different species of stingless bees, designed to seal cracks, form the walls and entrance of colonies in hives, and mummify insects that come to invade it, preventing the occurrence of possible putrefaction due to the proliferation of fungi and bacteria.^{3,4}

There are more than 400 species of stingless bees in Brazil, with the genera *Plebeia*, *Trigona*, *Melipona*, *Scaptotrigona*, and *Trigonisca* being the best-known. These bees play an essential role in preserving biodiversity, pollinating around 40 to 90% of floral species in Brazilian territory.^{5,6}

Geopropolis has been used in traditional medicine for centuries in several countries, including Mexico, Brazil, Argentina, India, and Vietnam. This material is utilized in the treatment of various diseases due to its numerous

therapeutic properties, including antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, gastroprotective, and immunomodulatory activities, which makes it a multifunctional matrix of interest for the isolation of substances with biological activities.^{7,8}

The chemical composition of geopropolis is closely tied to the local flora. Furthermore, other factors also influence the chemical composition of this matrix, such as the season, climate, seasonality, soil composition, and the genetic characteristics of the bees themselves.⁹ Thus, geopropolis behaves as a matrix of high chemical complexity, which justifies the need for consistent data regarding the chemical substances responsible for the biological properties presented by this product, particularly those produced by the stingless bee species *Melipona mondury*, as there are few studies on this species of bee.^{10,11}

Received: February 26, 2025

Revised: April 30, 2025

Accepted: May 13, 2025

Published: May 27, 2025



ACS Publications

© 2025 The Authors. Published by
American Chemical Society

23397

<https://doi.org/10.1021/acsomega.5c01804>
ACS Omega 2025, 10, 23397–23408

Article

Studies on a New 1,3,4-Oxadiazole Bixin Dimer for Potential Application in Dye-Sensitized Solar Cells

Afonso Santine M. M. Velez ¹, Daniela Pinheiro ^{2,3}, Carlos Serpa ², Rosane Nora Castro ¹, Marco Edilson Freire de Lima ^{1,*} and Otávio Augusto Chaves ^{2,4,*}

¹ Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica 23890-000, Brazil; afonsov30@gmail.com (A.S.M.M.V.); noraufrrj@gmail.com (R.N.C.)

² Department of Chemistry, Coimbra Chemistry Centre—Institute of Molecular Sciences (CQC-IMS), University of Coimbra, Rua Larga, 3004-545 Coimbra, Portugal; dpinheiro@qui.uc.pt (D.P.); serpasoa@ci.uc.pt (C.S.)

³ Center of Potential and Innovation of Natural Resources (CPIRN-IPG), Polytechnic of Guarda, 6300-559 Guarda, Portugal

⁴ Laboratory of Immunopharmacology, Centro de Pesquisa, Inovação e Vigilância em COVID-19 e Emergências Sanitárias (CPIV), Oswaldo Cruz Institute (IOC), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro 21040-361, Brazil

* Correspondence: marcoedilson@gmail.com (M.E.F.d.L.); otavioaugustochaves@gmail.com (O.A.C.)

Abstract

Dye-sensitized solar cells (DSSCs) have emerged as a promising technology for converting sunlight into electricity at a low cost; however, it is still necessary to find a photostable, low-cost, and efficient photosensitizer. In this sense, the natural product bixin (**Dye 1**) has previously been reported as a potential photosensitizer. Thus, the present work reports the full synthesis of diester and diacid hybrids (**Dyes 2 and 3**, respectively, with corresponding yields of 93% and 52%) using the natural product bixin as a starting material and 1,3,4-oxadiazole ring as a connected point. The hydrolysis step of **Dye 2** aims to obtain **Dye 3** with a structural capacity to anchor the titanium dioxide (TiO₂) nanofilms via the carboxylic acid group. Both compounds (**Dyes 1 and 3**) can be adsorbed via pseudo-first order on the surface of TiO₂ nanofilms, reaching saturation after 10 and 6 min of exposure in an organic solution (1×10^{-5} M), respectively, with adsorption kinetics of the semisynthetic compound almost twofold higher than the natural product. Contrary to expectations, **Dye 3** had spectral behavior similar to **Dye 1**, but with better frontier molecular orbital (FMO) parameters, indicating that **Dye 3** will probably behave very similarly or have slightly better photovoltaic performance than **Dye 1** in future DSSC measurements.

Keywords: natural product bixin; semisynthetic hybrids; TiO₂ nanofilms; photostability; electrochemistry; frontier molecular orbitals



Academic Editor: Serge Thorimbert

Received: 31 May 2025

Revised: 1 July 2025

Accepted: 10 July 2025

Published: 13 July 2025

Citation: Velez, A.S.M.M.; Pinheiro, D.; Serpa, C.; Castro, R.N.; Lima, M.E.F.d.; Chaves, O.A. Studies on a New 1,3,4-Oxadiazole Bixin Dimer for Potential Application in Dye-Sensitized Solar Cells. *Reactions* **2025**, *6*, 39. <https://doi.org/10.3390/reactions6030039>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Sunlight remains one of the essential energy sources expected to provide electric energy for the future. However, harvesting solar light and converting it into electricity at low cost with high efficiency continues to present a significant challenge. In this regard, dye-sensitized solar cells (DSSCs) have emerged as a promising technology for this conversion, primarily due to their high light-to-electricity conversion efficiencies, ease of fabrication, low production costs, and the capacity to modulate physical and chemical properties by inserting specific chemical groups in the organic dye (photosensitizer) [1–3].

Humankind has widely used natural dyes to achieve different physicochemical properties in certain products, such as candles, cosmetics, textiles, and foods. Depending on the



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac

Studies on the toxic effects of three regioisomeric methoxylated xanthenes against *Trypanosoma cruzi* amastigotes and their binding with human serum albumin

Otávio Augusto Chaves^{a,b,*}, Cosme H.C. dos Santos Oliveira^c, Dari Cesarin-Sobrinho^c, Telma Costa^a, Antonio Eduardo da Hora Machado^d, Thiago de Souza Dias Silva^c, Afonso Santine M.M. Velez^c, Debora Decote-Ricardo^e, Marco Edilson Freire de Lima^c, Carlos Serpa^a, José Carlos Netto-Ferreira^{c,**}

^a Department of Chemistry, Coimbra Chemistry Centre – Institute of Molecular Sciences, University of Coimbra, 3004-535 Coimbra, Portugal

^b Laboratory of Immunopharmacology, Centro de Pesquisa, Inovação e Vigilância em COVID-19 e Emergências Sanitárias (CPIV), Oswaldo Cruz Institute (IOC), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), 21040-361 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^d Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

^e Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Antiparasitic chemotherapy
Biophysical characterization
HSA-binding

ABSTRACT

The synthetic 1-methoxyxanthone, 2-methoxyxanthone, and 4-methoxyxanthone (compounds 1, 2, and 3, respectively) were tested against amastigotes of *Trypanosoma cruzi* (C2C4, LacZ), showing an activity profile that depends on the position of the methoxy group in the xanthone ring, targeting pteridine reductase 1 of *T. cruzi* (TcPTR1). The initial pharmacokinetic assessment involved biophysical characterization of the interaction between the xanthenes and human serum albumin (HSA, the main globular protein responsible for drug distribution), using circular dichroism (CD), steady-state and time-resolved fluorescence measurements, combined with *in silico* calculations. Monomethoxyxanthone 3 exhibited the highest potency ($37.37 \pm 1.25 \mu\text{M}$) against *T. cruzi* amastigotes, likely due to its ability to form the most hydrogen bonds with TcPTR1. Both HSA:1–3 interactions involved spontaneous and strong binding, with minimal disruption to albumin's secondary structure. The methoxy group at position 4 of the xanthone aromatic ring reduces binding affinity by approximately tenfold. Nonetheless, all methoxyxanthenes demonstrated higher binding affinity than the reported synthetic dimethoxyxanthenes. The main binding site was identified in the positive electrostatic potential pocket in subdomain IIA (site 1), suggesting that compounds 1–3 could be transported in the human bloodstream via albumin.

1. Introduction

The 9H-xanthen-9-ones, commonly known as xanthenes, are naturally occurring compounds classified within the polyphenol group (secondary metabolites), predominantly found in plants belonging to the families of Clusiaceae [1], Polygalaceae [2], Gentianaceae [3], and Moraceae [4]. Nevertheless, it has been documented that the

biosynthesis of xanthenes also takes place in particular bacterial species [5], fungi, and lichens [6]. The fundamental structure comprises a planar heterocyclic system with an *ortho*-pyranic moiety fused to two conjugated benzene rings containing a carbonyl group [3]. From a chemical perspective, the xanthone framework exhibits distinct features for various derivatives, such as the position, type, and number of substituents on one or both aromatic rings, which can affect their chemical

* Correspondence to: O.A.Chaves, Department of Chemistry, Coimbra Chemistry Centre – Institute of Molecular Sciences, University of Coimbra, 3004-535 Coimbra, Portugal.

** Corresponding author.

E-mail addresses: otavioaugustochaves@gmail.com (O.A. Chaves), jcnnetto.ufrj@gmail.com (J.C. Netto-Ferreira).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.147020>

Received 19 June 2025; Received in revised form 16 August 2025; Accepted 19 August 2025

Available online 21 August 2025

0141-8130/© 2025 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.



Article

The Capsular Polysaccharides GXM and GXMGal from *Cryptococcus neoformans* Modulate Macrophages Infected with *Leishmania major*

Idália Maria Ferreira-dos-Santos ¹, Elias Barbosa da Silva-Junior ¹, Afonso Santine M. M. Velez ², Leonardo Freire-de-Lima ¹, Alexandre Morrot ^{3,4}, Marco Edilson Freire de Lima ², Gustavo José Makhoul ¹, Joyce Cristina Guimarães-de-Oliveira ¹, Israel Diniz-Lima ¹, Luciana Polaco Covre ^{1,5}, Renata Quintanilha dos Santos ⁶, Fernanda de Paula Pepino ⁶, Letícia Seabra Abrantes ⁶, Lucia Helena Pinto-da-Silva ⁶, José Osvaldo Previato ¹, Lucia Mendonça-Previato ¹, Celio Geraldo Freire-de-Lima ^{1,*} and Debora Decote-Ricardo ^{6,*}

- ¹ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil; idaliamaiaa@gmail.com (I.M.F.-d.-S.); eliasbarbosa@biof.ufrj.br (E.B.d.-S.-J.); leolima@biof.ufrj.br (L.F.-d.-L.); gustavoj.makhoul@gmail.com (G.J.M.); joycristina4@biof.ufrj.br (J.C.G.-d.-O.); israel@biof.ufrj.br (I.D.-L.); l.covre@biof.ufrj.br (L.P.C.); previato@biof.ufrj.br (J.O.P.); luciamp@biof.ufrj.br (L.M.-P.)
- ² Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23897-000, Brazil; afonsosv30@gmail.com (A.S.M.M.V.); marcoedilson@gmail.com (M.E.F.d.L.)
- ³ Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil; alexandre.morrot@ioc.fiocruz.br
- ⁴ Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil
- ⁵ Departamento de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória 29047-100, Brazil
- ⁶ Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23890-000, Brazil; renataquintanilha@ufrj.br (R.Q.d.S.); fernandapepino@ufrj.br (F.d.P.P.); leticiaseabra@gmail.com (L.S.A.); lpinto@ufrj.br (L.H.P.-d.-S.)
- * Correspondence: celio@biof.ufrj.br (C.G.F.-d.-L.); decoter Ricardo@ufrj.br (D.D.-R.)



Academic Editors: Hiroyuki Kimura and Isabel Mauricio

Received: 26 May 2025

Revised: 18 August 2025

Accepted: 24 September 2025

Published: 28 September 2025

Citation: Ferreira-dos-Santos, I.M.; da Silva-Junior, E.B.; Velez, A.S.M.M.; Freire-de-Lima, L.; Morrot, A.; de Lima, M.E.F.; Makhoul, G.J.; Guimarães-de-Oliveira, J.C.; Diniz-Lima, I.; Covre, L.P.; et al. The Capsular Polysaccharides GXM and GXMGal from *Cryptococcus neoformans* Modulate Macrophages Infected with *Leishmania major*. *Microorganisms* **2025**, *13*, 2272. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13102272>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract

Leishmania spp. are obligatory intracellular parasites that primarily infect macrophages. The macrophage immune response plays a pivotal role in determining the control or progression of infection. “M1-like” macrophages mediate parasite clearance through the production of nitric oxide, pro-inflammatory cytokines, and reactive oxygen species, whereas “M2-like” macrophages contribute to infection progression by exerting anti-inflammatory effects. The capsular polysaccharides Glucuronoxylomannan (GXM) and glucuronoxylomannogalactan (GXMGal) from *Cryptococcus neoformans* are capable of immunomodulating the macrophage response. GXM exhibits immunoregulatory activity, whereas GXMGal induces a pro-inflammatory response. Although the activity of these polysaccharides has been studied in cryptococcosis, their immunomodulatory potential in other infectious models remains largely unexplored. Here, we investigated the effects of GXM and GXMGal on *Leishmania major* infection in murine peritoneal macrophages. Murine peritoneal macrophages were infected with *L. major* and, 24 h post-infection, treated with 50 µg of either GXM or GXMGal. Our data revealed that GXM treatment enhanced *L. major* infection, while GXMGal treatment had no significant effect on the parasitic load in infected macrophages.

Keywords: *Leishmania major*; immunomodulatory; capsular polysaccharides; macrophages; GXM; GXMGal; infection



Immunomodulatory effects of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharides on macrophage infected with *Trypanosoma cruzi*

Joyce Cristina Guimarães-de-Oliveira ^{a,*,}, Elias Barbosa da Silva-Junior ^{a,},
Mayra Silva Machado Meyrelles ^{a,b,}, Letícia R. Vilas Diniz ^{a,}, Luciana Polaco Covre ^{a,c,},
Leonardo Freire-de-Lima ^{a,}, Israel Diniz-Lima ^{a,}, Afonso Santine M.M. Velez ^{b,},
Lucia Mendonça-Previato ^{a,}, Jose Osvaldo Previato ^{a,}, Alexandre Morrot ^{d,e,},
Herbert Leonel de Matos Guedes ^{d,f,}, Debora Decote-Ricardo ^{b,*},
Celio Geraldo Freire-de-Lima ^{a,*}

^a Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21944-970, Brazil

^b Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23890-000, Brazil

^c Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória 29047-105, Brazil

^d Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil

^e Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-17 902, Brazil

^f Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21944-970, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Cryptococcus neoformans
Trypanosoma cruzi
Capsular Polysaccharides
Immunomodulation
Macrophages

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is an opportunistic fungal pathogen with a global distribution and is the causative agent of cryptococcosis, a disease that primarily affects immunocompromised individuals. The infection typically begins in the lungs and, in severe cases, can progress to meningoencephalitis and even death. Biochemical studies have shown that the fungal capsule is predominantly composed of glucuronoxylomannan (GXM), which accounts for approximately 88% of the total composition, followed by glucuronoxylomannogalactan (GXMGal, ~10%) and mannoproteins (~2%). Purified capsular components have been reported to exhibit distinct immunomodulatory effects: while GXM predominantly exerts immunosuppressive activity, inhibiting immune responses, GXMGal has been associated with immunoprotective properties.

To evaluate these differential immunomodulatory effects in another infection model, we employed an *in vitro* system using murine macrophages infected with the *Trypanosoma cruzi* DM28c strain, followed by treatment with either GXM or GXMGal. Our results demonstrated that at 7 and 10 days post-infection, the number of trypanomastigotes released was higher in GXM-treated conditions compared to GXMGal-treated conditions, even when macrophages were stimulated with interferon- γ . Additionally, amastigote counts were higher in macrophages treated with GXM, whereas GXMGal-treated conditions showed increased nitric oxide production. Cytokine quantification by ELISA revealed elevated TGF- β levels in GXM-treated cells and increased TNF- α levels in GXMGal-treated conditions. Furthermore, inhibition assays confirmed that these effects were reversed upon treatment with specific inhibitors.

The preliminary *in vitro* infection and treatment model indicates that the immunomodulatory effects of *C. neoformans* capsular components persist even in a distinct infection setting.

These findings reinforce the role of GXM as an immunosuppressive factor and GXMGal as an immunoprotective agent, suggesting that capsular components may differentially modulate host immune responses in various infectious contexts.

* Corresponding author at: Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23890-000, Brazil.

** Corresponding author at: Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21944-970, Brazil.
E-mail addresses: decotecarico@ufrj.br (D. Decote-Ricardo), celio@biof.ufrj.br (C.G. Freire-de-Lima).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2025.107849>

Received 8 July 2025; Received in revised form 15 September 2025; Accepted 20 September 2025

Available online 21 September 2025

0001-706X/© 2025 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Contribution to the Chemotherapy of Human Trypanosomiasis: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Dimeric 2-Nitroimidazoles Against *Trypanosoma cruzi* Amastigotes and Bloodstream *Trypanosoma brucei*

Afonso Santine M. M. Velez¹, Otávio Augusto Chaves^{2,3}, Carlos Serpa,² Fatma M. Salem⁴, Bibo Li⁵, Bin Su⁴, Célio Geraldo Freire-de-Lima⁶, Débora Decoté-Ricardo^{7*}, Marco Edilson Freire de Lima^{1,8*}

¹ Programa de Pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23.897-000, RJ, Brazil.

² Department of Chemistry, Coimbra Chemistry Center - Institute of Molecular Science (CQC-IMS), University of Coimbra, Rua Larga, 3004-535 Coimbra, Portugal.

³ Laboratory of Immunopharmacology, Centro de Pesquisa, Inovação e Vigilância em COVID-19 e Emergências Sanitárias (CPIV), Oswaldo Cruz Institute (IOC), Rio de Janeiro 21040-361, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁴ Department of Chemistry, College of Sciences and Health Professions, Cleveland State University, 2121 Euclid Avenue, Cleveland, Ohio, 44115, United States of America.

⁵ Department of Biology, Geo. & Env. Sciences, College of Sciences and Health Professions, Cleveland State University, 2121 Euclid Avenue, Cleveland, Ohio, 44115, United States of America.

⁶ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21.941-902, RJ, Brasil.

⁷ Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

⁸ Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23.897-000, RJ, Brasil.

Corresponding authors: M.E.F.L. (marcoedilson@gmail.com); D.D.-R. (decoter Ricardo@ufrj.br).

Abstract:

Effective and safe treatments for neglected tropical diseases caused by parasites, such as Chagas disease and sleeping sickness, are still lacking, presenting a significant challenge for researchers worldwide. Rational design of dimeric compounds inspired solely by the pharmacophoric core of benznidazole (2-nitroimidazole) has proven to be a promising strategy. Increasing the linker between the active units improved interaction with TcNTR, facilitating the bioactivation of these longer dimers compared to shorter ones. Biological evaluation confirmed this, demonstrating that all compounds were active against



Certificate of Poster Presentation

This is to certify that the work entitled:

Piperine-2-nitroimidazole molecular hybrid: selective toxic effects on amastigotes and interference with the growth kinetics of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*

authored by Afonso Santine Velez, Gabriel Amaral da Rocha Silva, Debora Decoté Ricardo, Marco Edilson Freire Lima

was presented during the poster session of the 11th
Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry,
held in Salvador, Bahia, Brazil, from October 24th to October 27th, 2023.



Marcelo Santos Castilho
Chair of BrazMedChem 2023



Gustavo H. G. Trossini
MED/BIO division of SBQ



@brazmedchem2023



www.brazmedchem.org/2023

47^areunião anual
da SBQ

www.s bq.org.br

22 a 25 de maio de 2024 - Águas de Lindóia



Sociedade Brasileira de Química

A CENTRALIDADE DA QUÍMICA NA
EDUCAÇÃO DO CIDADÃO E NA INOVAÇÃO
CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

Atestamos que o trabalho "**Design, synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* evaluation of naphthoimidazole-nitroimidazole hybrids, derived from β -lapachone.**", autoria de **Thiago de Souza Dias Silva, Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez, Gabriel Amaral da Rocha Silva, Débora Decoté Ricardo e MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA**, foi apresentado na forma de pôster durante a 47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Shirley Nakagaki Bastos
Presidente da SBQ
Luiz Gonzaga de França Lopes
Secretário Geral da SBQ

Verifique o código de autenticidade 77496764.5546138.7054364.7.8461814774109283649148 em <https://www.even3.com.br/documentos>

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **One-pot esterification-click (CuAAC) synthesis of a novel lapachol-5- nitroimidazole hybrid** de autoria de **Tiago Ribeiro Rodriguez, Thiago de Souza Dias Silva, João Vitor da Costa Silva, Afonso S. M. M. Velez, Debora Decote Ricardo de Lima e Marco Edilson F. de Lima**, foi apresentado na forma de pôster no evento **XIX Encontro Regional da SBQ**, realizado entre nos dias 13, 14 e 15 de agosto de 2025 no Reserva Cultural de Niterói.

Niterói, Agosto de 2025

Even3

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **Synthesis and evaluation of activity against *T. cruzi* of hybrid bis-chalcones derived from curcumin with nitroimidazole cores** de autoria de João Vitor da Costa Silva, Afonso S. M. M. Velez, Thiago De Souza Dias Silva, Tiago Ribeiro Rodriguez, Debora Decote Ricardo de Lima e Marco Edilson F. de Lima, foi apresentado na forma de pôster no evento **XIX Encontro Regional da SBQ**, realizado entre nos dias 13, 14 e 15 de agosto de 2025 no Reserva Cultural de Niterói.

Niterói, Agosto de 2025

Even3

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of anti-*T. cruzi*, anti-*Leishmania* activity, and cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages of the 1,4-Naphthoquinone-AZT hybrid** de autoria de Thiago de Souza Dias Silva, Tiago Ribeiro Rodriguez, Afonso S. M. M. Velez, Henrique Previtali Da Silva, FLAVIA DE OLIVEIRA CARDOSO, Debora Decote Ricardo de Lima e Marco Edilson F. de Lima, foi apresentado na forma de pôster no evento **XIX Encontro Regional da SBQ**, realizado entre nos dias 13, 14 e 15 de agosto de 2025 no Reserva Cultural de Niterói.

Niterói, Agosto de 2025

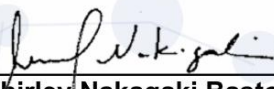
Even3

46ª Reunião Anual da SBQ

28 a 31 de Maio de 2023

Águas de Lindóia · SP

Atestamos que o trabalho "**Design, synthesis, and biological evaluation of new selective dimeric 2-nitroimidazoles against Trypanosoma cruzi amastigotes**", de autoria de **Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez**, foi apresentado na sessão de **Flash Poster Presentation** durante a 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, ocorrida no período de 28-31/05/2023 em Águas de Lindóia/SP.



Shirley Nakagaki Bastos
Presidente da SBQ

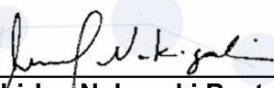
Luiz Gonzaga de França Lopes
Secretário Geral da SBQ

46ª Reunião Anual da SBQ

28 a 31 de Maio de 2023

Águas de Lindóia · SP

Atestamos que o trabalho "**Isolation Of C-Methylated Flavanones From Geopropolis Melipona rufiventris With Potential Trypanocidal Activity.**", autoria de **Rafael Ferreira dos Santos, Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez, Paulo Pitasse-Santos, MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA, Débora Decoté Ricardo e Rosane Nora Castro**, foi apresentado na forma de pôster durante a 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.



Shirley Nakagaki Bastos
Presidente da SBQ

Luiz Gonzaga de França Lopes
Secretário Geral da SBQ



MELHOR POSTER NO XVIII ENCONTRO REGIONAL DA SBQ-RIO

Certifico que o trabalho **Novel dimeric 2-nitroimidazole derivatives: design, synthesis and biological evaluation against amastigotes of Trypanosoma cruzi**, dos autores **Afonso Santine M. M. Velez, Gabriel A. da Rocha-Silva, Douglas Chaves Alcântara-Pinto, Paulo Pitasse-Santos, Gabriela Alves de Souza, Debora Decoté-Ricardo, Marco Edilson F. de Lima** foi premiado como um dos melhores posters, no XVIII Encontro Regional da SBQ-Rio, realizado no CCMN-UFRJ dos dias 4 a 7 de outubro de 2022.

Rio de Janeiro, 07/10/2022

Profa. Dra. Neílma Correia Romelro
Presidente da Comissão Organizadora
Secretária Regional da SBQ-Rio (UFRJ)





The 7th World Congress on Leishmaniasis
certifies that the work entitled

**ANALYSIS OF LEISHMANICIDAL AND IMMUNOMODULATORY
ACTIVITY OF NATURAL AND SYNTHETIC PRODUCTS**

whose authors are:

RAISSA COUTO SANTANA, MARIA ARMANDA VIANA RODRIGUES, AFONSO SANTINE
MAGALHÃES MESQUITA VELEZ, PAULO SANTOS-PITASSE, MARCO EDILSON FREIRE
DE LIMA, DEBORA DECOTÉ-RICARDO, CELIO GERALDO FREIRE-DE-LIMA, LUCIA
HELENA PINTO DA SILVA, GABRIELA SANTOS-GOMES

was presented as a

POSTER PRESENTATION

in **WorldLeish7** held in Cartagena, Colombia
from August 1 - 6, 2022.

And for the record, we sign the present document on the date and
place mentioned above.

Iván Darío Vélez
Chair

Jorge Alvar
Co-chair



XVIII Encontro Regional
da Sociedade Brasileira
de Química - SBQ-RJ

4 a 7 de outubro de 2022
Centro Cultural Professor Horácio Macedo
CCMN - UFRJ

Certificado



APRESENTAÇÃO DE TRABALHO NO XVIII ENCONTRO REGIONAL DA SBQ-RIO

Certifico que o trabalho "**Avaliação da atividade tóxica do óleo essencial de *Varronia curassavica* Jacq. contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi***", apresentado por **Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez**, dos autores **Elisabeth Alves Duarte Pereira, Afonso Santine M. M. Velez, Debora Decoté-Ricardo, Marco Edilson F. de Lima, Marco André Alves de Souza**, foi selecionado e premiado na sessão coordenada de Produtos Naturais, no XVIII Encontro Regional da SBQ-Rio, realizado no CCMN-UFRJ dos dias 4 a 7 de outubro de 2022.

Rio de Janeiro, 07/10/2022

Neilma C. Romão
Neilma Correia Romão
Presidente da Comissão Organizadora -
Secretaria Regional da SBQ-Rio (UFARJ)



47^a

reunião anual
da SBQ www.s bq.org.br

22 a 25 de maio de 2024 - Águas de Lindóia



Sociedade Brasileira de Química

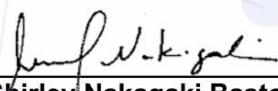
A CENTRALIDADE DA QUÍMICA NA
EDUCAÇÃO DO CIDADÃO E NA INOVAÇÃO
CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

Atestamos que o trabalho "**Novel curcuminoids with anti-*Trypanosoma cruzi* activity against amastigotes forms, a structural design study**", autoria de **Jorge Lucas Ferreira Lacerda, MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA, Carlos Mauricio Rabello de Sant Anna, Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez, Jayane Clys Conceição dos Santos e Débora Decoté-Ricardo**, foi apresentado na forma de pôster durante a 47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Shirley Nakagaki Bastos
Shirley Nakagaki Bastos
Presidente da SBQ

Luiz Gonzaga de França Lopes
Luiz Gonzaga de França Lopes
Secretário Geral da SBQ

Atestamos que o trabalho "**Molecular hybridization: a useful tool in the design of novel curcumin-nitroimidazole derivatives potentially active against Trypanosoma cruzi**", autoria de **Jayane Clys Conceição dos Santos, Jorge Lucas F. Lacerda, Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez, Débora Decoté-Ricardo e MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA**, foi apresentado na forma de pôster durante a 47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.


Shirley Nakagaki Bastos
Presidente da SBQ


Luiz Gonzaga de França Lopes
Secretário Geral da SBQ



XVIII Encontro Regional
da Sociedade Brasileira
de Química - SBQ-RJ
4 a 7 de outubro de 2022
Centro Cultural Professor Horácio Macedo
CCMN - UFRJ

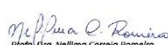
Certificado



COMUNICAÇÕES ORAIS NO XVIII ENCONTRO REGIONAL DA SBQ-RIO

Certifico que o trabalho "**Avaliação da atividade tóxica do óleo essencial de Varronia curassavica Jacq. contra formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi**", apresentado por **Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez**, dos autores **Elisabeth Alves Duarte Pereira, Afonso Santine M. M. Velez, Debora Decoté-Ricardo, Marco Edilson F. de Lima, Marco André Alves de Souza**, foi apresentado como Comunicação Oral, no XVIII Encontro Regional da SBQ-Rio, realizado no CCMN-UFRJ dos dias 4 a 7 de outubro de 2022.

Rio de Janeiro, 07/10/2022


Prof. Dra. Nelma Correia Almeida
Presidente da Comissão Organizadora
Secretaria Regional da SBQ-Rio (UFRJ)

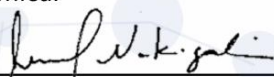


46ª Reunião Anual da SBQ

28 a 31 de Maio de 2023

Águas de Lindóia · SP

Atestamos que o trabalho "**Design and synthesis of bis-chalcones as curcumin analogues and evaluation of their toxic activities against Trypanosoma cruzi amastigotes**", autoria de **MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA, Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez, Douglas Chaves de Alcantara Pinto, Gabriela Alves de Souza, Geovana Andrade da Silva, Lorrane de Souza Chaves, Leonardo Freire-de-Lima, Débora Decoté Ricardo e Gabriel Amaral da Rocha Silva**, foi apresentado na forma de pôster durante a 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.


Shirley Nakagaki Bastos
Presidente da SBQ

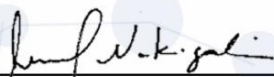

Luiz Gonzaga de França Lopes
Secretário Geral da SBQ

46ª Reunião Anual da SBQ

28 a 31 de Maio de 2023

Águas de Lindóia · SP

Atestamos que o trabalho "**Isolation Of C-Methylated Flavanones From Geopropolis Melipona rufiventris With Potential Trypanocidal Activity.**", autoria de **Rafael Ferreira dos Santos, Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez, Paulo Pitasse-Santos, MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA, Débora Decoté Ricardo e Gabriel Fulgencio dos Santos**, foi apresentado na forma de pôster durante a 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.


Shirley Nakagaki Bastos
Presidente da SBQ

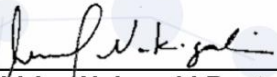

Luiz Gonzaga de França Lopes
Secretário Geral da SBQ

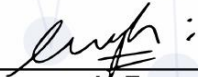
46ª Reunião Anual da SBQ

28 a 31 de Maio de 2023

Águas de Lindóia · SP

Atestamos que o trabalho "**Design and synthesis of 4,6-stiryl-pyrimidines as curcumin analogues with potential activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes.**", autoria de **Jorge Lucas Ferreira Lacerda, MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA, Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez, Gabriela Alves de Souza e Paulo Pitasse-Santos**, foi apresentado na forma de pôster durante a 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.


Shirley Nakagaki Bastos
Presidente da SBQ

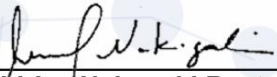

Luiz Gonzaga de França Lopes
Secretário Geral da SBQ

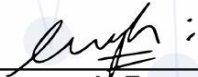
46ª Reunião Anual da SBQ

28 a 31 de Maio de 2023

Águas de Lindóia · SP

Atestamos que o trabalho "**Design, synthesis, and biological evaluation of new selective dimeric 2-nitroimidazoles against *Trypanosoma cruzi* amastigotes**", autoria de **Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez, Gabriel Amaral da Rocha Silva, Douglas Chaves de Alcantara Pinto, Paulo Pitasse Santos, Gabriela Alves de Souza, Débora Decoté Ricardo e MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA**, foi apresentado na forma de pôster durante a 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

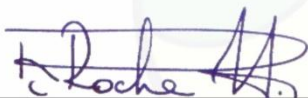

Shirley Nakagaki Bastos
Presidente da SBQ


Luiz Gonzaga de França Lopes
Secretário Geral da SBQ

ATESTADO

Atestamos que o trabalho "**Design and synthesis of new hybrids from a 1,2,4-triazole, prepared from piperine, and known nitroimidazolic drugs**", autoria de **Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez, DOUGLAS CHAVES ALCÂNTARA PINTO, GABRIELA CALHEIROS MAGALHÃES, PAULO PITASSE SANTOS, DÉBORA DECOTÉ RICARDO e MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA**, foi apresentado na forma de pôster durante a 45ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Maceió, 03 de junho de 2022.



Romeu Cardozo Rocha Filho
Presidente da SBQ



Fernando de Carvalho da Silva
Secretário Geral da SBQ



Certificate of Poster Presentation

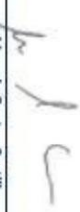


This is to certify that the work entitled:

Design, synthesis and evaluation of new hybrids from piperine and nitazoxanide active against Trypanosoma cruzi amastigotes

authored by Luiz Henrique de Carvalho Oliveto, Gabriel Amaral da Rocha Silva, Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez, Debora Decoté-Ricardo, Marco Edison Freire de Lima

was presented during the poster session of the 11th
Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry,
held in Salvador, Bahia, from October 24th to October 27th, 2023.



Marcelo Santos Castilho
Chair of BrazMedChem 2023



Gustavo H. G. Trossing
MED/BIO division of SBQ



@brazmedchem2023



www.brazmedchem.org/2023



48ª Reunião Anual da
Sociedade Brasileira de Química

Emergências Climáticas?
A Química Age e Reage!

8 a 11 de Junho de 2025
Campinas - SP

Atestamos que o trabalho "**Design and synthesis of bis-chalcones as curcumin simplified analogs and evaluation of their antiproliferative activities against lung cancer cells.**", autoria de **Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez, Gabriela Alves de Souza, Lorrane de Souza Chaves, Jayane Clys Conceição dos Santos, Thiago de Souza Dias Silva, Tiago Ribeiro Rodrigues, Débora Decoté Ricardo, Leonardo Freire-de-Lima e MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA**, foi apresentado na forma de pôster durante a 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Rossimiriam Pereira de Freitas
Presidente da SBQ

Elisa Souza Orth
Secretária Geral da SBQ



48ª Reunião Anual da
Sociedade Brasileira de Química

Emergências Climáticas?
A Química Age e Reage!

8 a 11 de Junho de 2025
Campinas - SP

Atestamos que o trabalho "**Design, synthesis and trypanocidal evaluation of 1,2,4-triazole-3-thioalkyl-nitroimidazole hybrids derived from natural piperine**", autoria de **Afonso Santine Magalhães Mesquita Velez, Bibo Li, Bin Su, Débora Decoté Ricardo e MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA**, foi apresentado na forma de pôster durante a 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Rossimiriam Pereira de Freitas
Presidente da SBQ

Elisa Souza Orth
Secretária Geral da SBQ