

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**Avaliação da Atividade Tóxica e Investigação Sobre
os Prováveis Mecanismos de Ação de
Diarileptanoides Naturais, Seus Derivados e
Análogos Frente ao *Trypanosoma cruzi***

Vitor Sueth Santiago

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA E INVESTIGAÇÃO SOBRE OS
PROVÁVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DE DIARILEPTANOIDES
NATURAIS, SEUS DERIVADOS E ANÁLOGOS FRENTE AO**
Trypanosoma cruzi

VITOR SUETH SANTIAGO

Sob a Orientação do Professor

Marco Edilson Freire de Lima

e Co-orientação da Professora

Débora Decoté-Ricardo

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica (Química Medicinal).

Seropédica, RJ
Outubro, 2015

615.19

S235a Santiago, Vitor Sueth, 1986-

T Avaliação da atividade tóxica e investigação dos prováveis mecanismos de ação de diarileptanoides naturais, seus derivados e análogos frente ao Trypanosoma cruzi / Vitor Sueth Santiago. - 2015.

274 f.: il.

Orientador: Marco Edilson Freire de Lima.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química, 2015.

Bibliografia: f. 129-144.

1. Química farmacêutica - Teses. 2. Chagas, Doenças de - Tratamento - Teses. 3. Cúrcuma - Teses. 4. Tripanossoma cruzi - Teses. 5. Produtos naturais - Teses. I. Lima, Marco Edilson Freire de, 1964- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

VITOR SUETH SANTIAGO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no
Curso de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Orgânica (Química
Medicinal)

TESE APROVADA EM __/__/____

Prof^a Débora Decoté-Ricardo
(Dep. Microbiologia e Imunologia Veterinária-IV-UFRRJ)
(Co-orientadora e Presidente)

Prof. Marco Edilson Freire de Lima
(Dep. de Química-ICE-UFRRJ)
(Orientador)

Prof. Alexandre Morrot
(Inst. Microbiologia Paulo de Góes-UFRJ)

Prof. Carlos Alberto Manssour Fraga
(ICB-UFRJ)

Prof. Fernando de Carvalho da Silva
(IQ-UFF)

Prof^a Wanda Pereira Almeida
(IQ-UNICAMP)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marco Edilson Freire de Lima, por ter me recebido prontamente em seu laboratório e pela condução da orientação do presente trabalho e pelas aulas e conversas sobre Química Medicinal, Síntese Orgânica, estratégia em ciência;

À Prof.^a Dra. Débora Decoté-Ricardo pela orientação e suporte em toda a parte biológica deste trabalho;

À Prof.^a Dra. Rosane Nora Castro por todos os ensaios de HPLC e por funcionar como terceira orientadora na correção dos relatórios anuais, leituras críticas dos materiais produzidos e ensinamentos dentro e fora do laboratório;

À aluna Julliane B. B. de Moraes pelo suporte nos experimentos biológicos preliminares sobre *Trypanosoma cruzi* e macrófagos murinos;

À Dra. Eliomara S. S. Alves e ao Prof. Marcos André Vannier-Santos pela realização dos experimentos de microscopia eletrônica;

Ao Prof. Dr. Célio Freire-de-Lima por permitir que grande parte deste trabalho fosse desenvolvido em seu laboratório;

À Dra. Juliana D. B. da Rocha pelos experimentos preliminares envolvendo citometria de fluxo;

Ao Prof. Dr. Carlos Maurício R. Santanna, Dra. Catarina N. del Cistia, e Gustavo P. Mendes-Silva pelos experimentos de modelagem molecular aqui apresentados;

Ao Prof. Adriano Andricopulo, Dra. Luma Godoy e Dr. Ricardo N. Santos pela colaboração nos experimentos de ciclo celular e tubulina;

À aluna de doutorado Fernanda Salgueiro pela realização dos ensaios de atividade antioxidante;

À aluna Isabel La Rocque pelo auxílio nos ensaios de viabilidade celular e infecção;

À Banca Avaliadora por aceitar o convite e pela leitura crítica da tese;

Aos meus pais, Sonia e Jorge, por terem me dado toda a estrutura e todo o amor do mundo, o que me permitiu chegar até aqui;

À minha irmã Gabriela, pela amizade e companheirismo durante toda a vida;

Ao Vinícius, meu companheiro e amuleto de sorte;

À Maria Clara, que ainda nem chegou e que já amo tanto;

Aos meus orixás, guias e protetores espirituais;

Aos amigos do Laboratório de Química Medicinal que tornaram memoráveis os quatro anos passados no laboratório: Lucas, Tatiany, Luiza, Fernanda, Juliana, Rodrigo, Welisson, Paulo, Leonardo e Gustavo.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado;

À CAPES-PROCAD e FAPERJ pelos auxílios financeiros para a execução dos projetos.

RESUMO

SUETH-SANTIAGO, Vitor. **Avaliação da Atividade Tóxica e Investigação Sobre os Prováveis Mecanismos de Ação de Diarileptanoides Naturais, Seus Derivados e Análogos Frente ao *Trypanosoma cruzi***. 2015, 274 p. Tese (Doutorado em Química, área de concentração Química Orgânica – Química Medicinal). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Este trabalho teve como principal objetivo a caracterização da atividade tripanocida da curcumina, bem como a síntese diversos derivados estruturalmente análogos a fim de investigar relações entre a estrutura química e a atividade biológica. O isolamento da curcumina da matriz natural foi realizado juntamente com outros dois curcuminoides, que em conjunto com um terceiro (ciclocurcumina) formou o primeiro conjunto de compostos submetido a uma triagem biológica sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c). Nesta triagem foi detectado como farmacóforo a subunidade 1,3-dicetona e o grupamento metoxila na posição 3 do anel aromático. Em seguida, foi sintetizada uma coleção de derivados com modificações em três subunidades estruturais da curcumina, os quais foram submetidos a uma triagem frente ao parasito. Três dos análogos sintéticos apresentaram atividade tóxica frente ao parasito de maneira superior ao produto natural. Em seguida, usando informações da primeira triagem, procedeu-se para a síntese de análogos estruturalmente restritos, os quais apresentaram um importante resultado acerca dos aspectos conformacionais associados ao tamanho do anel utilizado para a restrição. Em paralelo foi sintetizada uma série de derivados estruturalmente originais explorando a potencial relação bioisostérica entre a subunidade 1,3-dicetona e o anel pirimidínico. Após triagem de todos os derivados frente a formas epimastigotas de *T. cruzi*, foi realizado um ensaio de viabilidade celular onde três derivados sintéticos demonstraram toxicidade seletiva frente ao parasito nas concentrações testadas: (*E*)-2-(4-hidróxi-3-metoxibenzilideno)-6-((*E*)-3-(4-hidróxi-3-metoxifenil)acrilóil)ciclohexanona, (2*E*,6*E*)-2,6-bis(4-hidróxi-3-metoxibenzilideno)ciclohexanona e 2-cloro-4,4'-((1*E*,1'*E*)-pirimidina-4,6-diilbis(eteno-2,1-diil))bis(2-metoxifenol). Estes derivados foram utilizados em um modelo de macrófagos infectados, onde provaram ser tóxicos tanto para formas tripomastigotas quanto para formas amastigotas do parasito. Na investigação do provável mecanismo de ação desta classe de compostos, os parasitos tratados com curcumina foram submetidos à microscopia eletrônica, onde foram observadas alterações ultraestruturais no parasito que sugerem como alvos a CYP51 e a tubulina. O ensaio de quantificação dos lipídios não-saponificáveis da membrana celular de *T. cruzi* sugere que não houve inibição de CYP51, ao passo que a citometria de fluxo das culturas tratadas mostrou um perfil característico de substâncias que atuam sobre os microtúbulos das células, se ligando à tubulina. Foi então construída por modelagem molecular um modelo de tubulina de *T. cruzi* onde os curcuminoides naturais ativos foram ancorados, e as pontuações do ancoramento foram coerentes com os valores de CI₅₀ encontrados.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Química Medicinal. Curcumina.

ABSTRACT

SUETH-SANTIAGO, Vitor. **Evaluation of cytotoxic activity and investigation towards possible mechanisms of action of natural diarylheptanoids, derivatives and analogs against *Trypanosoma cruzi***. 2015, 274 p. Thesis (PhD in Chemistry, focused in Organic Chemistry - Medicinal Chemistry). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

This work aimed to characterize the trypanocidal activity of curcumin, as well as synthesise a set of structurally-related compounds to investigate the relationships between chemical structure and biological activity (SAR). The isolation of natural curcumin was carried along with two other natural curcuminoids, which together with a third (cyclocurcumin) formed the very first set of derivatives subjected to a screening against epimastigotes forms of *T. cruzi* (Dm28c strain). This screening pointed out the 1,3-diketone moiety as well as the methoxyl- group in the position 3 of the aromatic ring as potential pharmacophores. Then, a set of synthetic analogues were prepared based on rational changes on the three structural subunits present in curcumin. These synthetic derivatives were subjected to the same screening, and three of them showed superior trypanocidal activity compared to the natural product. Then, taking the informations obtained from this first screening, the synthesis of constrained analogues were performed which showed an interesting result based on the ring-size of the derivatives. In parallel, a series of 1,3-pyrimidine derivatives were prepared, based on potential bioisosteric relationships between the 1,3-diketone moiety and the 1,3-pyrimidine heterocycle. All the derivatives obtained were tested against *T. cruzi*, and those shown trypanocidal activity were submitted to a cell viability assay, where three of the synthetic derivatives demonstrated selective toxicity against the parasite: (E) - 2 - (4 - hydroxy - 3-methoxybenzylidene) - 6 - ((E) - 3 - (4 - hydroxy - 3 - methoxyphenyl) acryloyl) cyclohexanone; (2E,6E) - 2,6 - bis (4 - hydroxy - 3 - methoxybenzylidene) cyclohexanone and 4,4' - ((1E,1'E) - (2 - chloropyrimidine - 4,6 - diyl) bis (ethene - 2,1 - diyl)) bis (2 -methoxyphenol). These derivatives were tested in an assay of infected macrophages, and they prove to be toxic for both parasite forms (trypomastigote and amastigote). The investigation of the probable mechanism of action started with a scanning/transmission electronic microscopy of the curcumin-treated parasites in a sublethal dose. The analysis of ultrastructural changes in parasite treated cells suggested the enzyme CYP51 as well as tubulin as possible targets for curcumin. The HPLC analysis of the membrane lipids of treated parasites showed no difference when compared to non treated control. The flow cytometry analysis showed a characteristic profile similar to those compounds who binds to tubulin and disrupts microtubules. To improve this hypothesis, the *T. cruzi* tubulin was modelled by homology and the curcuminoids were docked at the literature known curcumin site. The results obtained showed a good correlation between the best-scored poses obtained from the docking study and the experimental IC₅₀ values obtained from the assays of the natural derivatives against parasite cells.

Key words: Chagas disease. Medicinal Chemistry. Curcumin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas, mostrando as formas celulares presentes nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. Traduzido de Centers for Disease Control and Prevention (www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html).

Figura 2: Transferência de ácido siálico de uma glicoproteína do hospedeiro para uma β -galactopirranose do parasito. A transferência ocorre especificamente na posição 3 do açúcar terminal do oligossacarídeo onde está ligado. Adaptado de Giorgi, 2011.

Figura 3: Modelo integrado de interação de formas tripomastigotas de *T. cruzi* com uma célula hospedeira não-fagocítica. Via I: invasão lisossomo-dependente. Via II: invasão lisossomo-independente. adaptada de Woolsey, 2004.

Figura 4: Regiões de prevalência da doença de Chagas na América Latina. Regiões coloridas em marrom representam os principais locais onde ocorre transmissão vetorial da doença de Chagas (REITHINGER, 2011).

Figura 5: Estruturas do benzonidazol (1) e do nifurtimox (2).

Figura 6: Nifurtimox (2) como gerador de espécies reativas de oxigênio (ROS, em vermelho). Adaptado de BOIANI *et al*, 2010; VIODÉ *et al*, 1999 e PATTERSON & WYLLIE, 2014.

Figura 7: Benzonidazol (1) convertido aos metabólitos nitroso e *N*-aril-hidroxilamina, o qual pode ser convertido enzimaticamente ao derivado reduzido 2-aminoimidazol correspondente ou ao íon nitrênio, que espontaneamente é di-hidroxlado para formar um intermediário que estabelece equilíbrio gerando uma molécula de glioxal e um derivado guanidínico. Adaptado de PATTERSON & WYLLIE, 2014 e TROCHINE *et al*, 2014.

Figura 8: Estrutura da curcumina (3)

Figura 9: Espécime de *Curcuma longa* com inflorescência (a); Rizomas frescos (b); Turmerico: rizomas secos e moídos (c) (Imagens gentilmente cedidas por Neide Rigo; <http://come-se.blogspot.com.br/>)

Figura 10. Estruturas de alguns curcuminoides, obtidos dos rizomas de *C. longa* (LI *et al*, 2009).

Figura 11: Similaridade estrutural entre o fármaco pentamidina (23) e o produto natural curcumina (3), ambos possuindo arcabouço molecular diarileptanoide (C₆-C₇-C₆).

Figura 12: Fluxograma esquemático mostrando o isolamento da curcumina (3) a partir de *C. longa*. Adaptado de GOEL *et al*, 2008.

Figura 13: Análises de CCD e CLAE da curcumina comercial. A) CCD usando hexano/acetato de etila 50% como eluente. B) CCD usando metanol/diclorometano 2% como eluente. C) CLAE em fase reversa em coluna C18 utilizando acetoneitrila e água como eluentes.

Figura 14: Espectro de HSQC da curcumina (**3**) em DMSO-*d*₆, a 500 MHz.

Figura 15: Equilíbrio tautomérico da curcumina (**3**)

Figura 16. Confômeros possíveis para a forma 1,3-dicetônica da curcumina (**3**). Adaptado de PRIYADARSINI, 2009.

Figura 17: Espectros de massas de alta resolução da curcumina (**3**). (A) Espectro de massas de alta resolução tipo quadrupolo-tempo de voo. (B) Fragmentação do íon molecular da curcumina (**3**).

Figura 18: Proposta de fragmentação da curcumina (**3**) para os principais sinais do espectro de massas obtido.

Figura 19. Síntese de Pabon realizada para preparação dos curcuminoides simétricos CUR (**3**) e BDMC (**5**).

Figura 20: Proposta de mecanismo para a síntese da curcumina (**3**) pelo método de Pabon, a partir de vanilina (**25**) e acetilacetona.

Figura 21: A) Reação de transformação de CUR (**3**) em CC (**8**) (KIUCHI, 1993); B) Proposta de mecanismo de adição de Michael intramolecular ácido-catalisada.

Figura 22: Representação das faces *re* e *si* do carbono acceptor de Michael e estruturas dos enantiômeros formados pela adição do oxigênio à face correspondente.

Figura 23: Espectro de RMN ¹H da ciclocurcumina (**8**) (CDCl₃, 500 MHz). Expansões: a) sinais de dois anéis aromáticos 1,3,5-trissubstituídos; b) sinais da olefina com geometria E; c) sinais do padrão ABX formado.

Figura 24: Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Dm28c. O parasito foi cultivado por 7 dias em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com hemina, ácido fólico e 10% de soro fetal bovino a 26 °C e prontamente tratado com CUR (**3**), DMC (**4**), BDMC (**5**) ou CC (**8**) em triplicatas nas concentrações indicadas. As formas viáveis foram contadas na câmara de Neubauer no sétimo dia. Resultado representativos de dois experimentos independentes.

Figura 25: Avaliação da viabilidade celular em macrófagos peritoneais murinos tratados com curcuminoides naturais nas concentrações indicadas. Os macrófagos foram cultivados em triplicatas na concentração de 5 x 10⁵ células mL⁻¹. As células foram tratadas por 48h com diferentes concentrações de CUR (**3**), DMC (**4**), BDMC (**5**) e CC (**8**) variando de 2 a 100 µM. A viabilidade celular foi obtida pelo método de exclusão utilizando azul de Trypan. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

Figura 26: Avaliação da viabilidade celular em população enriquecida de linfócitos esplênicos murinos tratados com os curcuminoides nas concentrações indicadas. Os esplênocitos foram cultivados em triplicatas na concentração de 5 x 10⁵ células mL⁻¹. As células foram tratadas por 48h com diferentes concentrações de CUR (**3**), DMC (**4**), BDMC (**5**) e CC (**8**) variando de 2 a 100 µM. A viabilidade celular foi obtida pelo método de exclusão utilizando azul de Trypan. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

Figura 27: Inibição da liberação de formas tripomastigotas de *T. cruzi in vitro* de macrófagos peritoneais murinos infectados. 10^5 macrófagos peritoneais foram plaqueados e infectados com tripomastigotas metacíclicas da cepa Dm28c na razão de 5 parasitos por célula. Algumas culturas foram tratadas com $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de benzonidazol (**1**), CUR (**3**), DMC (**4**), BDMC (**5**) e CC (**8**). Após 7 dias foram contadas as formas tripomastigotas celulares no sobrenadante. Dados representativos de dois experimentos independentes, culturas comparadas utilizando o teste T de Student não-pareados. * $p > 0,05$

Figura 28: Avaliação preliminar da relação estrutura x atividade tripanocida do protótipo natural curcumina (**3**) quando comparado aos curcuminoides naturais (**4**, **5** e **8**).

Figura 29: Principais propostas para o mecanismo antioxidante da curcumina (**3**), envolvendo a doação de hidrogênio radicalar pela hidroxila ou metileno (regiões verdes) para formar o radical-livre (em vermelho).

Figura 30: Estabilização do radical formado no metileno e no anel aromático, após doação de hidrogênio radicalar.

Figura 31: Mecanismo antioxidante de (**26**), proposto por Sugiyama e colaboradores (SUGIYAMA *et al*, 2011).

Figura 32: Representação dos principais metabólitos da curcumina (**3**), formados em duas diferentes vias de administração (adaptado de ANAND *et al*, 2007).

Figura 33: Modificações estruturais inicialmente planejadas em 3 subunidades da curcumina (**3**).

Figura 34: a) Esquema reacional para a preparação de (**33**). b) Proposta de mecanismo para a reação de metilação através de uma Substituição Nucleofílica Bimolecular.

Figura 35: Espectros de RMN ^1H (a) e DEPTQ (b) do derivado (**33**) a 500 MHz em DMSO- d_6 , com os sinais referentes às metoxilas assinalados em verde.

Figura 36: Esquema reacional para a preparação de (**34**) a partir de benzaldeído e acetilacetona.

Figura 37: Espectros de RMN ^1H (29a) e DEPTQ (29b) do derivado (**34**) a 500MHz em DMSO- d_6 .

Figura 38: Planejamento da série 2 envolvendo a troca isostérica não-clássica entre a subunidade 1,3-dicetona e heterociclos nitrogenados análogos ao pirazol.

Figura 39: Síntese dos isósteros heterocíclicos realizada por Mishra e colaboradores.

Figura 40: Proposta de mecanismo para a formação dos derivados heterocíclicos (**35-37**) através da reação entre a curcumina (**3**) e hidrazinas funcionalizadas.

Figura 41: Expansões das regiões correspondentes aos hidrogênios aromáticos do pirazol (**35**), do *N*-fenilpirazol (**36**) e isoxazol (**37**) (A, B e C, respectivamente). As atribuições dos sinais de forma completa encontra-se em anexo no caderno de espectros, páginas 208-219.

Figura 42: Esquema reacional para a preparação da tetraidrocurcumina (**30**) a partir da curcumina (**3**) utilizando hidrogenação catalítica em paládio sobre carbono.

Figura 43: Espectros de RMN ¹H (Figura 35A) e DEPTQ (Figura 35B) do derivado hidrogenado tetraidrocurcumina (**30**) com os sinais relacionados aos metilenos formados em destaque.

Figura 44: Planejamento estrutural da série de pirimidinonas derivadas da tetraidrocurcumina realizado por Arunkhamkaew e colaboradores (ARUNKHAMKAEW *et al*, 2013).

Figura 45: Planejamento dos derivados (**38**) e (**39**) por simplificação molecular e homologação inferior a partir da curcumina (**3**).

Figura 46: Estruturas do produto natural Tubocurarina (**43**) e do análogo sintético simplificado Decametônio (**44**).

Figura 47: Esquema reacional para a preparação de (**38**) (Figura 47A) e (**39**) (Figura 47B).

Figura 48: Reação de desprotonação da hidroxila fenólica da vanilina (**25**) e ressonância do fenolato formado, justificando a perda da nucleofilicidade da carbonila e sua falta de reatividade em meio básico.

Figura 49: Expansão do espectro de RMN ¹H (A) e o espectro de DEPTQ (B) do derivado (**38**), realizados a 500 e 125 MHz, respectivamente, em CDCl₃.

Figura 50: Estrutura de (**39**) e expansão do espectro de RMN ¹H na região de 6,8 a 7,8 ppm, realizado a 500 MHz em DMSO-*d*₆.

Figura 51: Triagem dos derivados naturais e sintéticos frente a formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c). O parasito foi cultivado por 7 dias em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com hemina, ácido fólico e 10% de soro fetal bovino a 26 °C. Algumas culturas foram prontamente tratadas com os controles benzonidazol (**1**) e curcumina (**3**), além derivados indicados pelo número da estrutura em triplicatas na concentração de 50 µM. As formas viáveis foram contadas na câmara de Neubauer no sétimo dia. Resultado representativos de dois experimentos independentes.

Figura 52: Planejamento dos análogos conformacionalmente restritos de (**3**) e (**38**).

Figura 53: Esquemas reacionais para a preparação dos análogos (**45-48**)

Figura 54: A) Gráfico de triagem dos derivados (**45-48**) sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*. O parasito foi cultivado por 7 dias em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com hemina, ácido fólico e 10% de soro fetal bovino a 26 °C. Algumas culturas foram prontamente tratadas com os controles benzonidazol (**1**) e curcumina (**3**), além derivados indicados pelo número da estrutura em triplicatas na concentração de 50 µM. As formas viáveis foram contadas na câmara de Neubauer no sétimo dia. Dados representativos de dois experimentos independentes.

Figura 55: Sobreposição dos derivados carbocíclicos (**45-48**) com o protótipo natural curcumina (**3**) após minimização de energia pelo método PM6 utilizando o programa Spartan

'14. Acima, (3) aparece em verde, (45) em roxo e (46) em ciano. Abaixo, (3) aparece em verde, (47) em ciano e (48) em roxo.

Figura 56: Planejamento das 4,6-*bis*-estirilpirimidinas 2-substituídas.

Figura 57: A) Esquema sintético para a preparação de (49) pela clássica reação de Pinner. B) Estratégia retrossintética para preparação de (49), identificando como precursores a vanilina (25) e a 4,6-dimetilpirimidina (57).

Figura 58: A) Esquema reacional para a preparação de (58). B) Espectro de RMN¹H (CD₃OD, 500 MHz), DEPTQ (DMSO-d₆, 125 MHz) com destaques para o sinal da metila e espectro de massas do derivado (58).

Figura 59: Esquema sintético para a preparação da vanilina protegida (62) a partir de anisaldeído (59).

Figura 60: Esquema reacional para a preparação das pirimidinas (49) e (50) a partir da vanilina protegida (62) e dos compostos heterocíclicos correspondentes (57, 63).

Figura 61: Assinalamento dos valores de pKa¹ para os hidrogênios mais ácidos das moléculas (57) e acetilacetona, na forma enólica.

Figura 62: Proposta de mecanismo para a formação de (64) a partir de uma reação semelhante à condensação de Knoevenagel entre a pirimidina (57) e o aldeído (62).

Figura 63: Esquema reacional da preparação dos derivados (52-56) passando pelos derivados protegidos (66-70). P = Grupo de Proteção (*p*-metoxibenzila).

Figura 64: Espectro de RMN ¹H do derivado morfolínico (55) como exemplo representativo da série pirimidínica inédita (52-56).

Figura 65: Triagem das pirimidinas sintetizadas sobre a forma epimastigota de *T. cruzi* (cepa Dm28c). O parasito foi cultivado por 7 dias em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com hemina, ácido fólico e 10% de soro fetal bovino a 26 °C. Algumas culturas foram prontamente tratadas com os controles benzonidazol (1) e curcumina (3), além derivados indicados pelo número da estrutura em triplicatas na concentração de 50 μM. As formas viáveis foram contadas na câmara de Neubauer no sétimo dia. Dados representativos de dois experimentos independentes.

Figura 66: Estruturas dos derivados da curcumina (3) mais ativos dentre os sintetizados no modelo de atividade tripanocida frente a formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Figura 67: A) Representação estrutural tridimensional da cruzaina cristalizada com o derivado vinil-sulfônico (57). Estrutura depositada no *Protein Data Bank* sob o código 1F2C (BRINNEN *et al.*, 2000). B) Representação esquemática em duas dimensões do modo de ligação de (57) à cruzaina. C) Estruturas dos derivados inibidores de cruzaina (57) e (58).

Figura 68: Esquema do equilíbrio entre a forma oxidada (TS₂) e reduzida (T(SH)₂) da tripanotona. O processo de redução ocorre com catálise da tripanotona redutase e o processo de oxidação ocorre espontaneamente pela ação oxidante de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Figura 69: Estruturas dos protótipos inibidores de tripanotona redutase de *T. cruzi* identificados após publicação dos trabalhos de Zhang e Jacoby. (ZHANG *et al*, 1996; JACOBY *et al*, 1996; BONSE *et al*, 1999; HORVATH, 1997; PRESTI *et al*, 2015; SOLA *et al*, 2015).

Figura 70: Biossíntese comparativa de esteroides estruturais de membrana de diferentes classes de seres vivos. Adaptado de BROWN *et al*, 1998.

Figura 71: Biossíntese do Ergosterol (**68**) em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), a partir do óxido de esqualeno (adaptado de SUETH-SANTIAGO *et al*, 2015b).

Figura 72: Estruturas dos substratos preferenciais de CYP51 de fungos (**71**), *T. cruzi* (**73**) e *T. brucei* (**74**).

Figura 73: Acima, estrutura de derivados azólicos ativos em modelos de infecção por *T. cruzi*. Cetoconazol (**70**), VNI (**75**), itraconazol (**76**) e fluconazol (**77**). Estrutura cristalográfica da CYP51 do *T. cruzi* com o fluconazol (**77**) ligado ao sítio catalítico da enzima, depositado no Protein Data Bank (PDB) sob o código 2WX2 (abaixo, à esquerda). Esquema bidimensional de interação do fluconazol (**77**) com o sítio catalítico da enzima, gerado pelo programa LigPlot a partir do mesmo código (abaixo, à direita).

Figura 74: Representação esquemática do mecanismo de ação dos compostos azólicos sobre a síntese de ergosterol (**68**) e subsequente alteração da composição e da organização da membrana celular (SHAPIRO *et al*, 2011; ABE *et al*, 2009).

Figura 75: Representação esquemática dos protofilamentos formados pela polimerização dos heterodímeros de α e β tubulina (Adaptado de WESTERMAN *et al*, 2003).

Figura 76: Representação esquemática da dinâmica de polimerização/despolimerização de microtúbulos. a) Formação do protofilamento com heterodímeros de α e β -tubulina; b) Formação do microtúbulo com as regiões (+) e (-); c) Relação entre os equilíbrios de polimerização e hidrólise do GTP, onde percebe-se (1) a polimerização do microtúbulo GTP-terminal, um intermediário onde as velocidades de hidrólise e polimerização são equivalentes (2), o microtúbulo despolimerizando quando a velocidade de hidrólise é superior (3) e o salvamento do microtúbulo mediante consumo de GTP (4). Adaptado de AKHAMOVA & STEINMETZ, 2008.

Figura 77: Estrutura dos antitubulínicos benzimidazólicos ativos em tubulina de leveduras (**78**) e nematoides (**79, 80**) mas inativos frente à tubulina de mamíferos.

Figura 78: Estrutura química da colchicina (**84**) à esquerda e flores de *Colchicum autumnale* à direita.

Figura 79: Imagem de *Catharanthus roseus* (vinca) à esquerda e estrutura dos alcaloides vimblastina (**85**) e vincristina (**86**), bem como seus precursores metabólicos catarantina (**87**) e vindolina (**88**).

Figura 80: À esquerda, apresentação do sítio de ligação do paclitaxel (**89**) na subunidade β da tubulina (adaptado de AMOS, 1999). Acima, à direita, estrutura química do paclitaxel (**89**). Abaixo, à direita, imagem das folhas de *Taxus brevifolia* var *brevifolia*.

Figura 81: Estratégia sintética de Ojima e colaboradores para síntese do paclitaxel (**89**) a partir do alcaloide natural 10-deacetilbacatina III (**90**) e da lactama correspondente (**91**) (OJIMA *et al.*, 1992).

Figura 82: Representação esquemática das localizações relativas dos sítios de ligação das principais classes de antitubulínicos.

Figura 83: Estruturas de alguns dos ligantes dos três principais sítios de ligação da tubulina: sítio do taxol (vermelho), sítio dos alcaloides da vinca (verde) e sítio da colchicina (azul).

Figura 84: Modelagem molecular da curcumina (**3**) ligada entre dois heterodímeros de tubulina (α em laranja, β em verde). Colchicina (**84**) está representada em vermelho e a curcumina (**3**) em magenta. Adaptado de CHAKRABORTI *et al.*, 2010.

Figura 85: Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c foram cultivados em triplicadas na concentração de $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$. As células foram tratadas por 48h com os derivados indicados na concentração de $100 \mu\text{M}$. A viabilidade celular foi quantificada pelo método de exclusão com azul de Trypan. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Figura 86: Estruturas dos derivados (**33**), (**37**) e (**38**), que apresentaram considerável toxicidade para macrófagos murinos na concentração de $50 \mu\text{M}$.

Figura 87: Formação do provável metabólito que justifica o perfil citotóxico de (**37**) frente a macrófagos peritoneais murinos.

Figura 88: Macrófagos peritoneais murinos foram infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) na razão de 5 parasitos/macrófago. Algumas culturas foram tratadas com os derivados (**45**), (**47**) e (**50**) nas concentrações indicadas. Após 9 dias o número de parasitos liberados no meio de cultura foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. Estes resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Figura 89: Macrófagos peritoneais murinos foram infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) na razão de 5 parasitos/macrófago. Algumas culturas foram tratadas com os derivados (**45**), (**47**) e (**50**) nas concentrações indicadas e em todas foi adicionada uma lamínula. Após 7 dias a lamínula foi corada com Panótico e o número de parasitos foi determinado por contagem em lente de imersão no microscópio óptico. Estes resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Figura 90: Macrófagos peritoneais murinos foram infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) na razão de 5 parasitos/macrófago. Algumas culturas foram tratadas com os derivados (**45**), (**47**) e (**50**) nas concentrações indicadas e em todas foi adicionada uma

lamínula. Após 7 dias a lamínula foi corada Panótico e a porcentagem de células infectadas foi determinado por contagem em lente de imersão no microscópio óptico. Estes resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Figura 91: Microscopia eletrônica de varredura de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Células não-tratadas (A) apresentam morfologia alongada usual e superfície celular lisa. Parasitos tratados com 10,23 μM de curcumina (**3**) por 24h (B-D) apresentam redução do volume celular (B), bem como corpo celular arredondado com múltiplas invaginações envolvendo a porção anterior do parasito (C, D). Algumas células apresentaram flagelos múltiplos e menores (C, setas). Protusões flagelares na membrana também foram observados (D, setas).

Figura 92: Microscopia eletrônica de varredura de epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas com 11,07 μM de desmetóxi-curcumina (DMC, **4**) por 24h (A, B). Há uma aparente diminuição do volume celular e presença de protusões por todo o corpo celular (setas).

Figura 93: Microscopia eletrônica de varredura de epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas por 72h com desmetóxi-curcumina (DMC, **4**) na concentração de 11,07 μM (A e B) e bisdesmetóxi-curcumina (BDMC, **5**) na concentração de 45,33 μM (C e D). Os corpos celulares dos parasitos apresentam superfícies onduladas (A) ou enrugadas (B), além da redução do volume celular (A-D). Grandes protuberâncias flagelares foram observadas (D, seta).

Figura 94: Microscopia eletrônica de varredura mostrando formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com curcumina (**3**) por 48h (A) e microscopia eletrônica de transmissão dos parasitos tratados por 72h (B-E). Curcumina (**3**) na concentração de 10,13 μM induziu a formação de protusões flagelares (A, setas). A haste paraflagelar (B, seta branca) está parcialmente desorganizada (B, seta preta). Além da desorganização intraflagelar (C, seta), parasitos tratados com (**3**) apresentaram destacamento da membrana flagelar (C, flechas). Essa desorganização foi observada no flagelo (F) e no lúmen da bolsa flagelar (D, seta) e pode estar associada a alterações do corpo basal (E, seta preta), que incluem microtúbulos ectópicos (E, seta branca).

Figura 95: Cromatogramas representativos da fração lipídica não-saponificável de formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidos por CLAE. (A) Controle negativo: epimastigotas cultivadas sem tratamento. (B) Controle do solvente: epimastigotas tratadas com DMSO 0,2%. (C) Controle positivo: epimastigotas tratadas com posaconazol a 0,05 μM . (D) Epimastigotas tratadas com curcumina (**3**) 10 μM .

Figura 96: Histogramas de fluorescência mostrando o conteúdo de DNA nas fases do ciclo celular (Sub-G1, G1, S e G2) dos parasitos (formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Dm28c). A) Controle negativo (DMSO 0,02%). B) Controle positivo (paclitaxel 20 μM). C) tratamento com 100 μM de BDMC (**5**). D) tratamento com 10 μM de curcumina (**3**). E) tratamento com 50 μM de (**3**). F) tratamento com 100 μM de (**3**). G) tratamento com 10 μM de DMC (**4**). H) tratamento com 50 μM de (**4**). I) tratamento com 100 μM de (**4**).

Figura 97: Porcentagem de epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) em diferentes fases do ciclo celular. Culturas foram tratadas com CUR (**3**) e DMC (**4**) nas concentrações de 10, 50 e 100 μM e BDMC (**5**) na concentração de 100 μM . Paclitaxel (**89**) foi utilizado como controle positivo (20 μM) e DMSO como controle negativo (0,02%). Resultados são representados

com a média de triplicatas com desvio-padrão representado pelas barras de erro. Significância estatística relativa ao controle * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Figura 98: Sobreposição dos melhores modos de ligação de curcumina (**3**, entrada A), DMC (**4**, entrada B) e BDMC (**5**, entrada C) após ancoramento no “sítio da curcumina” do modelo de tubulina de *T. cruzi*. Átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza. Átomos de carbono em verde: tubulina; amarelo: (**3**); ciano: (**4**); magenta: (**5**). Imagem gerada com PyMOL, DeLano Scientific LLC.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número estimado de DALYs (x1000) por causa e por região (excluindo-se a Europa), 2004.

Tabela 2. Estrutura e concentração dos principais componentes voláteis dos óleos essenciais de diferentes partes de *C. longa* (PARTHASATHY *et al*, 2008)

Tabela 3. Deslocamentos químicos relacionados aos átomos de carbono (C) e hidrogênio (H) nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da curcumina (**3**)

Tabela 4. Valores de CI_{50} para formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c), DL_{50} para duas linhagens celulares e atividade antioxidante pelo método do FRAP.

Tabela 5. CI_{50} e Concentração mínima inibitória (CMI) dos derivados **35-37** frente a *Plasmodium falciparum*. Valores para a curcumina (**3**): CI_{50} 3,25 μM , CMI 13,2 μM (MISHRA *et al*, 2005)

Tabela 6. Resultados da atividade anticolinesterásica de curcuminoides naturais (**3-5**) e sintéticos (**30, 40-41**) em modelo *in vitro* realizado por Arunkhamkaew e colaboradores (ARUNKHAMKAEW *et al*, 2013)

Tabela 7: Estrutura e valores de CI_{50} (em micromolar) da orizalina (**81**) e dos derivados dinitroanilina-sulfonamida frente a cinetoplastídeos e linhagens celulares de mamíferos (Adaptado de WERBOVETZ *et al*, 2003).

Tabela 8: Modelos das subunidades de tubulina de *T. cruzi*.

Tabela 9: Pontuações no ChemPLP e distância das ligações de hidrogênio entre os curcuminoides (**3-5**) no ancoramento na tubulina de *T. cruzi*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
<i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	1
Aspectos moleculares da infecção.....	3
Impacto socioeconômico da doença de Chagas.....	7
Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.....	9
OBJETIVOS	14
CAPÍTULO I: Caracterização da atividade tripanocida da curcumina e outros curcuminoides naturais.....	16
Resultados e Discussão I	21
Isolamento e caracterização dos curcuminoides naturais.....	21
Síntese e caracterização da ciclocurcumina.....	28
Avaliação da atividade tripanocida dos curcuminoides naturais.....	31
CAPÍTULO II: Planejamento, síntese e avaliação biológica de análogos estruturais da curcumina.....	38
Resultados e Discussão II	39
Planejamento, síntese e avaliação da atividade tripanocida dos análogos estruturais da curcumina.....	39
Planejamento, síntese e avaliação da atividade tripanocida dos derivados conformacionalmente restritos.....	55
Planejamento, síntese e avaliação da série pirimidínica.....	58
Avaliação da atividade tripanocida dos análogos ativos mais seletivos sobre células infectadas.....	68
CAPÍTULO III: Investigação dos prováveis mecanismos de ação da curcumina.....	70
Resultados e Discussão III	89
Avaliação de alterações ultraestruturais e investigação do mecanismo de ação da curcumina.....	89
Análise cromatográfica do perfil lipídico de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com curcuminoides naturais.....	92
Análise de citometria de fluxo de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com curcuminoides naturais.....	93
Construção do modelo de tubulina de <i>T. cruzi</i> e ancoramento dos diarileptanoides naturais por Modelagem Molecular.....	95
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	99
PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	101
Separação dos curcuminoides da matriz comercial.....	103
Procedimento geral para a síntese dos curcuminoides naturais simétricos.....	104
Procedimento para a síntese da ciclocurcumina.....	105
Procedimento para a síntese de 1,7-bis(4-hidróxi-3-metoxifenil)heptano-3,5-diona (30).....	106
Procedimento para a síntese de (1 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-1,7-bis(3,4-dimetoxifenil)hepta-1,6-dieno-3,5-diona (33).....	108
Procedimento para a síntese de (1 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-1,7-difenilepta-1,6-dieno-3,5-diona (34).....	109

Procedimento geral para a preparação dos derivados heterocíclicos (35-37).....	110
Procedimento para a síntese de (1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5-bis(4-hidróxi-3-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (38).....	112
Procedimento para a síntese de (<i>E</i>)-1,3-bis(4-hidróxi-3-metóxi)prop-2-en-1-ona (39).....	113
Procedimento para a síntese dos derivados dicarbonílicos carbocíclicos (45) e (46).....	114
Procedimento para a síntese dos derivados carbocíclicos (47) e (48).....	116
Procedimento para a síntese do cloreto de <i>p</i> -metoxibenzila (61).....	117
Procedimento para a síntese da vanilina protegida (62).....	118
Procedimento para a síntese dos derivados pirimidínicos protegidos (64) e (65).....	119
Procedimento para a síntese dos derivados pirimidínicos (49) e (50).....	120
Procedimento para a síntese dos derivados pirimidínicos 2-aminossustituídos protegidos (66-70).....	120
Procedimento para a síntese dos derivados pirimidínicos 2-aminossustituídos (52-56).....	122
Protocolos farmacológicos.....	124
Parasitas.....	124
Efeito anti-epimastigota.....	124
Efeito na viabilidade celular de macrófagos.....	124
Efeito na viabilidade celular em população enriquecida de linfócitos esplênicos.....	124
Efeito de inibição da liberação de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> in vitro.....	125
Microscopia eletrônica de transmissão.....	125
Microscopia eletrônica de varredura.....	125
Extração dos lipídios de membrana.....	125
Análise dos lipídios de membrana por CLAE.....	126
Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	126
Modelagem Molecular.....	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
ANEXOS	145

INTRODUÇÃO

***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas**

A tripanossomíase americana (ou doença de Chagas) é a doença resultante da infecção pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A descoberta do parasito se deu em 1908 por Carlos Chagas (CHAGAS, 1908), seguida da descrição completa da patologia da doença (CHAGAS, 1909) e da descrição de métodos diagnósticos para o que, à época, era considerado como uma tireoidite parasitária (CHAGAS, 1910). Essa sequência de eventos torna Carlos Chagas o único cientista da história da medicina a elucidar por completo os aspectos de uma doença infecciosa, *e. g.* agente etiológico, vetor, transmissão, hospedeiros e manifestações clínicas (DELAPORTE 1994), sendo esse cenário fomentado pela necessidade de legitimação da capacidade de produção científica brasileira durante a fase oligárquica da República Velha (BARATA, 2000), que tem como um dos eventos-chave a fundação do Instituto Sorológico Federal (posteriormente denominado Instituto Oswaldo Cruz).

A descoberta de Chagas caracteriza-se pelo raciocínio dedutivo incomum de identificação inicial do agente etiológico em primatas da região de Minas Gerais (e não da doença propriamente dita), seguida da identificação do vetor por associação à ocorrência de recorrentes infestações causadas por triatomíneos naquela região (predominantemente insetos hematófagos como o *Triatoma infestans*). A observação da doença, que normalmente é o primeiro passo na elucidação de um processo patológico infeccioso, se deu posteriormente com a observação dos protozoários na corrente sanguínea de indivíduos em condições sanitárias precárias daquela região e que apresentavam sintomas letárgicos característicos das doenças parasitárias então conhecidas (KROPF & SÁ, 2009). Esta sequência incomum das etapas de compreensão da doença de Chagas é fruto de um processo de estratificação social onde indivíduos mais pobres, que moravam em casas de pau-a-pique de zonas rurais, estavam em locais mais vulneráveis às infestações de *T. infestans*. Mesmo com o apontamento de Carlos Chagas no seu discurso de posse como primeiro professor da disciplina de “Medicina Tropical” (CHAGAS, 1935), onde as doenças ditas tropicais foram analisadas não como um evento nosológico específico, mas como um dispositivo biológico, cultural e econômico complexo (KROPF, 2006), a doença de Chagas se manteve negligenciada e até hoje não possui tratamento medicamentoso que possa levar à sua cura.

Após a publicação dos primeiros trabalhos sobre a doença de Chagas nas duas primeiras décadas do século XX, houve uma série de campanhas de descrédito contra a relevância do trabalho de Carlos Chagas, capitaneadas por membros da Academia Nacional de Medicina (COURA, 1997), o que minou o interesse de pesquisadores brasileiros na doença durante os anos seguintes. Entretanto, houve continuação dos estudos sobre a doença de Chagas por parte de pesquisadores estrangeiros, com destaque para a contribuição do argentino Cecílio Romaña, que auxiliou na classificação de vetores, formas de transmissão e diagnóstico. Romaña descreveu o primeiro sintoma patognomônico associado à doença de Chagas, um edema inflamatório bipalpebral unilateral denominado “conjuntivite esquizotripanósica unilateral”, que passou a ser conhecido como “marca de Romaña” por recomendação de Evandro Chagas (médico, filho de Carlos Chagas), como reconhecimento às contribuições de Cecílio Romaña para o conhecimento acerca da doença (DIAS, 1997). O mecanismo de infecção vetorial da doença de Chagas encontra-se descrito na Figura 1.

Tripanossomiase americana (doença de Chagas)
Trypanosoma cruzi

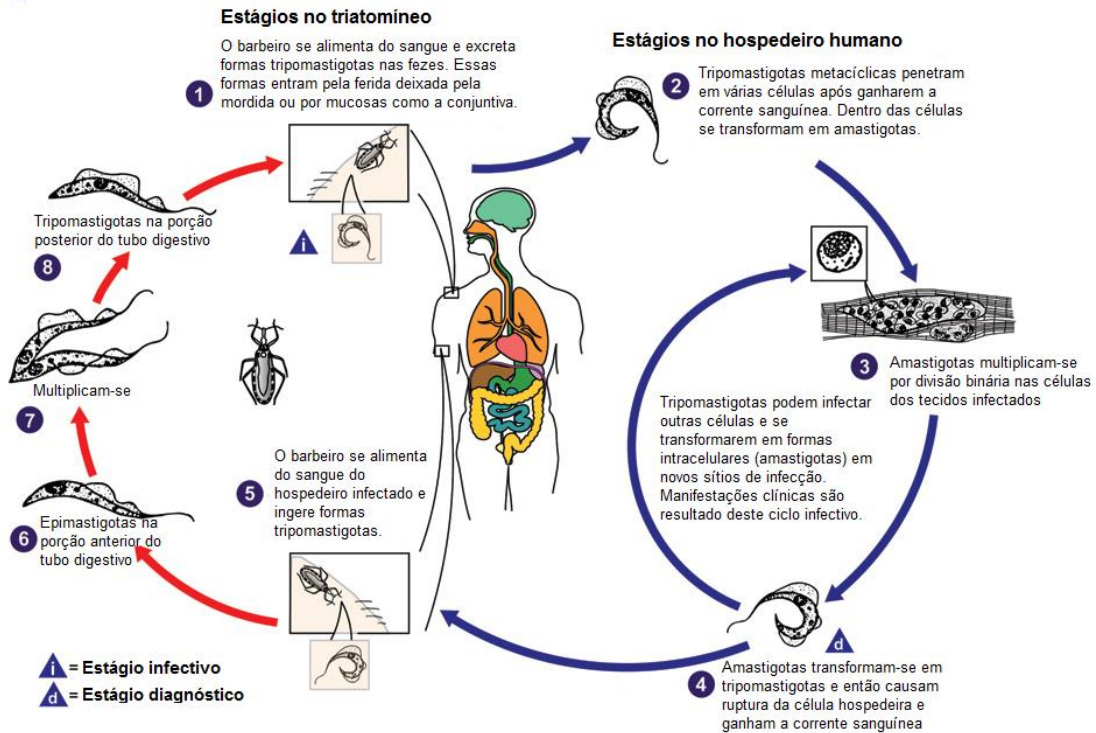


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas, mostrando as formas celulares presentes nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. Traduzido de *Centers for Disease Control and Prevention* (www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html).

A transmissão se dá através da picada de um triatomíneo infectado em um indivíduo sadio. Normalmente são triatomíneos pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, configurando mais de 140 espécies, das quais 61 são endêmicas do Brasil (COSTA & PATERSON, 2012). A picada do barbeiro *per se* não causa transmissão de formas viáveis de *T. cruzi*. Contudo, a fisiologia do triatomíneo é caracterizada por um aparelho digestivo relativamente curto, o que faz com que estes insetos defequem no momento da alimentação, e nas fezes estão as formas infectivas do parasito. O prurido causado pela picada faz com que ao coçar o local as formas infectivas sejam carregadas para a ferida e ganhem a corrente sanguínea (ARGOLO *et al*, 2008), causando a infecção. Apesar de a principal forma de contaminação ser a via vetorial, existem outras formas clinicamente relevantes (Gráfico 1), dentre elas a transfusão de sangue e transplante de órgãos (WENDEL, 2010), via vertical placentária ou por amamentação (DIAZ-LUJÁN *et al*, 2012) ou menos comumente a via oral (BENCHIMOL-BARBOSA, 2009)

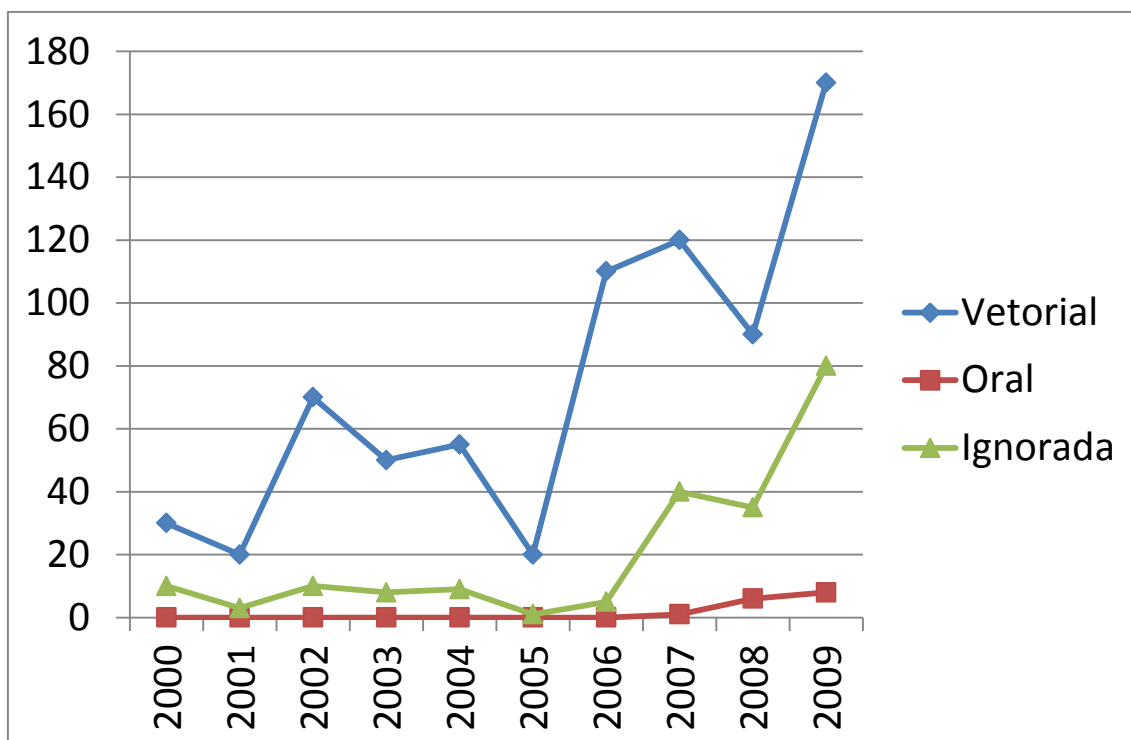


Gráfico 1: Forma de transmissão da doença de Chagas no Brasil, de 2000 a 2009. N=946. Adaptado de SOUZA, 2010.

Após a infecção, a doença no hospedeiro humano tem duas fases: uma aguda e uma crônica. A fase aguda, que ocorre nos primeiros meses após a infecção, é caracterizada por uma alta carga parasitária na corrente sanguínea e pode ser assintomática ou ter sintomas moderados e de pouco valor diagnóstico, o que torna difícil a intervenção medicamentosa nesta etapa. Quando sintomática, apresenta aumento do fígado e dos linfonodos, exantema, perda de apetite, um inchaço no local da picada (chagoma) e, em alguns casos, o sinal de Romana (REY, 2001). Após cessada a fase aguda, os indivíduos infectados passam longos períodos sem apresentar sintomas, quando então existe a observação de megacólon, megaesôfago e quadros de cardiomegalia (mais frequente) em pacientes que evoluírem para a forma crônica (COURA & BORGES-PEREIRA, 2011).

Aspectos moleculares da infecção

Uma vez caracterizada a infecção, as formas tripomastigotas na corrente sanguínea são capazes de invadir as células do hospedeiro através da ação de moléculas de adesão. Os mecanismos celulares e moleculares de patogenicidade de *T. cruzi* são extremamente complexos devido a fatores como grande número de cepas diferentes do parasito, diferentes formas evolutivas presentes no hospedeiro vertebrado (tripomastigota e amastigota), variedade na origem das formas tripomastigotas infectivas (tripomastigotas metacíclicas, sanguíneas ou celulares) e variedade no tipo de célula a ser infectada (ROMANO *et al*, 2012). Contudo, há elementos comuns que permitem a proposta de mecanismos de infecção envolvendo duas grandes classes de processos: fagocíticos e não-fagocíticos. No processo de invasão fagocítica, que é comum em células especializadas nesses processos (*e. g.* macrófagos) qualquer das formas evolutivas do parasito pode ser internalizada por processos de fagocitose. Após esse processo, formas epimastigotas passam a residir em vacúolos (denominados vacúolos parasitóforos) e podem ser destruídas (MILDER & KLOETZEL, 1980), caracterizando-a como uma forma não-infectiva para as células do hospedeiro. Formas

amastigotas e tripomastigotas, quando internalizadas, conseguem escapar dos vacúolos parasitóforos e realizar replicação (após diferenciação de tripomastigota em amastigota, se for o caso) no citoplasma da célula do hospedeiro (LEY *et al*, 1988).

A invasão de células através de processos não-fagocíticos pode ocorrer em qualquer tipo celular (inclusive em células especializadas em fagocitose, como os macrófagos) e envolve mecanismos mais complexos. Apesar de poder ocorrer com formas amastigotas (MORTARA, 1991), a forma evolutiva especializada na invasão de células do hospedeiro é a forma tripomastigota, a qual infecta as células através de um mecanismo distinto dos demais. O processo de infecção se inicia no contato entre o parasito e a célula hospedeira, onde glicoproteínas presentes no glicocálice do *T. cruzi* (e. g. fibronectina e, principalmente, mucinas e transialidases, que atuam em conjunto) realizam a adesão das membranas para posterior internalização do parasito e infecção da célula hospedeira.

Fibronectina é o nome dado a representantes de um conjunto de glicoproteínas de elevado peso molecular com função de adesão, podendo ligar a receptores proteicos da membrana celular (integrinas) ou à matriz extracelular. Ouassi e colaboradores demonstraram, em 1986, que a fibronectina interage com formas tripomastigotas de *T. cruzi* em receptores específicos que facilitam a adesão do parasito na célula hospedeira mediante integrinas (OUAISSI *et al*, 1986). As integrinas reconhecem a fibronectina devido à sequência de peptídeos Arg-Gly-Asp (RUOLAHSTI, 2003) ou Arg-Gly-Asp-Ser (OUAISSI *et al*, 1986), embora não se conheça a sequência que esteja envolvida no reconhecimento da fibronectina pelo parasito. Entretanto, em infecções crônicas, existe a depleção da fibronectina na matriz extracelular e a infecção continua ocorrendo, o que sugere que esta via não seja a única responsável pelo processo de invasão da célula hospedeira por formas tripomastigotas de *T. cruzi* (CALVET *et al*, 2004; CALVET *et al*, 2012).

As mucinas são as glicoproteínas mais abundantes presentes no *T. cruzi*, e configuram 1% de seu genoma (VILLALTA *et al*, 2009). Essas glicoproteínas possuem sítios com alta prevalência de resíduos de serina (Ser) e treonina (Tre), aminoácidos hidroxilados que podem formar *O*-glicosídeos com oligossacarídeos, tornando a mucina extremamente hidrofílica (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al*, 2000). A expressão de diversas mucinas com diferentes sítios ricos em Ser e Tre tem como principais vantagens a otimização da interação entre as membranas do parasito e da célula hospedeira e uma menor probabilidade de ativação de resposta imune. As mucinas são glicoproteínas-chave no processo de invasão do parasito, pois elas possuem características semelhantes às mucinas de mamíferos envolvidas nos processos de recrutamento de linfócitos (HOLLINGSWORTH & SWANSON, 2007; VILLALTA *et al*, 2009), o que pode facilitar a interação entre as duas células para posterior infecção. A variabilidade estrutural das mucinas também leva em conta a forma evolutiva do parasito; as mucinas expressas nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas (formas presentes no inseto vetor) são mais leves (35-50kDa) e bastante semelhantes entre si (PREVIATO *et al*, 1994), tendo como principal função a proteção do parasito frente às proteases presentes no trato intestinal do vetor (MORTARA *et al*, 1992). Entretanto, apenas as formas tripomastigotas metacíclicas possuem capacidade de mediar processos de infecção no hospedeiro (VILLALTA *et al*, 2009), o que justifica a virulência desta forma frente à forma epimastigota. Mucinas purificadas de formas tripomastigotas metacíclicas são fundamentais para o processo de invasão da célula hospedeira devido a sua capacidade de mobilização de cálcio, um requisito fundamental para o estabelecimento da infecção nos primeiros momentos (MORENO *et al*, 1994). A importância desta mucina para a infecção da célula é confirmada pelo fato do tratamento dos parasitos com anticorpos anti-mucina (tanto pela ligação do anticorpo ao oligossacarídeo quanto aos aminoácidos do sítio hidrofílico) inibirem o processo

infecioso da célula hospedeira (YOSHIDA *et al*, 1989; RUIZ *e al*, 1993). Já as mucinas isoladas de formas tripomastigotas celulares são mais pesadas (60-200 kDa) e possuem um epítipo específico contendo ácido siálico, que é fundamental no processo infectivo das células de mamíferos (SCHENCKMAN *et al*, 1991). Também é específico de formas tripomastigotas celulares a presença de um ácido graxo insaturado na posição *sn-2*² da subunidade glicerol (ALMEIDA *et al*, 2000), o que pode facilitar a liberação de citocinas e promover o estado de cronicidade da doença (ALMEIDA & GAZZINELLI, 2001).

As mucinas de *T. cruzi* trabalham em conjunto com outra classe de macromoléculas igualmente importantes para o processo de invasão celular, denominadas *trans*-sialidases (BUSCHIAZZO *et al*, 2012). Nas formas tripomastigotas, a *trans*-sialidase está ancorada como uma proteína não-integral de membrana ao glicosil-fosfatidil-inositol (AGUSTI *et al*, 1997). Estas enzimas tem a capacidade de realizar a sialização da mucina (GIORGI & LEDERKREMER 2011), através da transferência de ácido siálico da membrana do hospedeiro para uma β -galactopirranose presente no sítio hidrofílico glicosilado da mucina do parasito (Figura 2), haja visto que as formas tripomastigotas de *T. cruzi* são incapazes de sintetizar ácido siálico. Desta maneira, usando um carboidrato da membrana do hospedeiro (que está envolvido em processos de reconhecimento celular entre suas próprias células), o parasito consegue realizar o processo invasivo não-fagocítico sem que haja ativação de resposta imunológica (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al*, 2000).

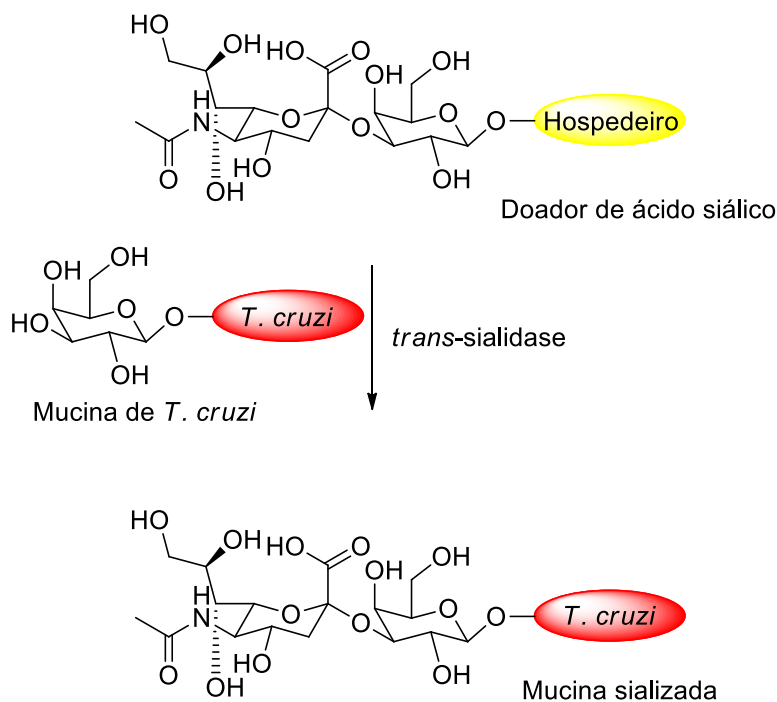


Figura 2: Transferência de ácido siálico de uma glicoproteína do hospedeiro para uma β -galactopirranose do parasito. A transferência ocorre especificamente na posição 3 do açúcar terminal do oligossacarídeo onde está ligado. Adaptado de GIORGI & LEDERKREMER, 2011.

Uma vez aderidos à membrana da célula a ser invadida, o parasito realiza o processo de internalização. Em células não-fagocíticas não há formação de pseudópodos para invaginação do parasita. Essa hipótese é confirmada pelo fato de a infecção ocorrer, normalmente, após adição de citocalasina D ao meio de cultura. Citocalasina D é um inibidor

² “*sn*”, *stereoespecific numbered*, corresponde a uma nomenclatura usual de triacilgliceróis, que neste caso corresponde ao carbono 2 da subunidade glicerol.

da polimerização dos filamentos de actina, que são essenciais para o processo de fagocitose, e é altamente eficiente para inibir a internalização de microrganismos que lançam mão de mecanismos fagocíticos de invasão celular (TARDIEUX *et al*, 1992; FALKOW *et al*, 1992). A inexistência de um processo fagocítico de internalização tem como primeiro questionamento a origem da membrana que formará o vacúolo parasitóforo que irá comportar o parasito dentro da célula em um primeiro momento. Essa resposta veio com o trabalho de Tardieux e colaboradores, que mostrou a participação de lisossomos no processo infectivo, através do seu recrutamento para o local de ancoramento do parasito na membrana e posterior internalização do parasito em vacúolos formados pela subversão de uma maneira cálcio-dependente do processo de exocitose de lisossomos (TARDIEUX *et al*, 1992; ANDREWS, 1995). O meio ácido formado no vacúolo parasitóforo, que tem a principal função de promover a digestão do seu conteúdo, é necessário para que o parasito possa então expressar um peptídeo formador de poros denominado TcTOX, que atua de forma análoga ao componente C-9 do sistema-complemento humano (ANDREOLI *et al*, 2006). TcTOX é ativado em meio ácido e visa destruir a membrana desse vacúolo, permitindo a saída do parasito para o citoplasma da célula, além de ser um fator importante na diferenciação da forma amastigota para a forma tripomastigotas (LEY *et al*, 1990). Uma releitura deste modelo foi proposta por Romano e colaboradores, e sugere que a presença desses lisossomos está intimamente ligada à ativação de sinalizações relacionadas à autofagia, devido à presença de proteínas normalmente encontradas em autofagolisossomos estarem presentes na membrana do vacúolo parasitóforo (ROMANO *et al*, 2009)

Alguns anos após a proposta deste modelo, denominado lisossomo-dependente, Woolsey e colaboradores propuseram uma nova forma de invasão das formas tripomastigotas em células não fagocíticas. Em seu trabalho, foi proposto que a entrada do parasito se dá pela formação de um vacúolo inicial, rico em fosfatidil-inositol-trifosfato, fosfatidil-inositol-3,4-bifosfato e isento de lisossomos (WOOLSEY *et al*, 2003). O vacúolo formado é então envolvido por endossomos (devido à presença do antígeno de endossomo precoce 1, EEA-1, em sua membrana) para posterior apresentação aos lisossomos. Este modo de invasão provavelmente ocorre nos primeiros minutos da interação parasito-hospedeiro, e é independente do modelo proposto por Tardieux (TARDIEUX *et al*, 1992) que ocorre em um período de tempo posterior. A representação esquemática destas duas formas independentes de invasão está retratada na Figura 3.

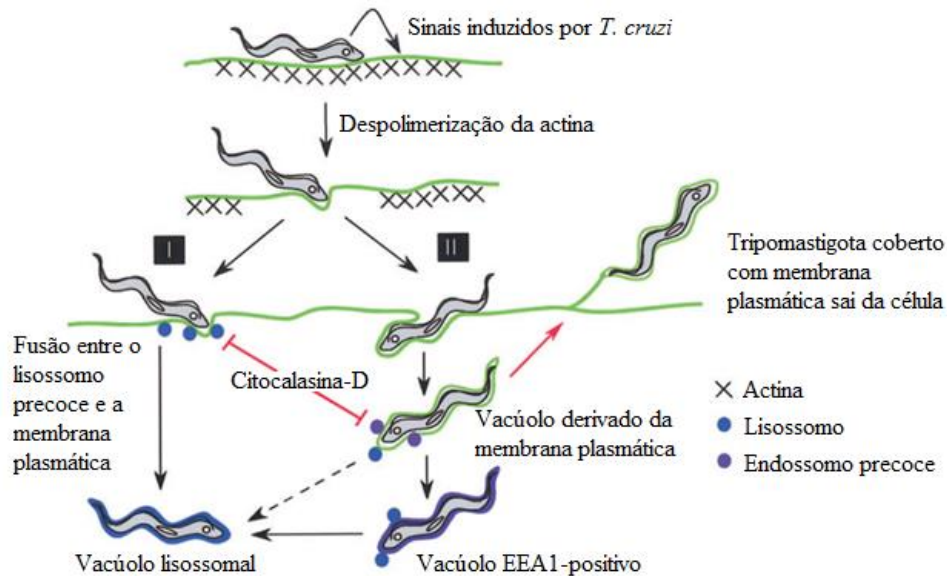


Figura 3: Modelo integrado de interação de formas tripomastigotas de *T. cruzi* com uma célula hospedeira não-fagocítica. Via I: invasão lisossomo-dependente. Via II: invasão lisossomo-independente. adaptada de WOOLSEY & BURLEIGH, 2004.

Após a saída da célula hospedeira sob a forma de tripomastigota celular, o parasito não tem capacidade de sobreviver indefinidamente na luz dos vasos sanguíneos (REY, 2011), pois eles não infectam hemácias e não são formas replicativas. Sendo assim, uma vez na corrente sanguínea, as formas tripomastigotas podem, eventualmente, retornar ao hospedeiro invertebrado caso este se alimente do sangue do mamífero infectado. Neste caso, os parasitos ingeridos tendem a se diferenciar em formas epimastigotas que se reproduzem por divisão binária no lúmen do intestino do inseto. Ao tomar a porção distal do trato intestinal, esses epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são eliminados nas fezes e podem infectar um indivíduo sadio. Se as formas tripomastigotas celulares não forem ingeridas por um vetor, elas tendem a se disseminar, atravessando a barreira endotelial do sistema circulatório do hospedeiro vertebrado, (ZINGALES & COLLI, 1995) e infectam células de órgãos como coração, esôfago e cólon, gerando danos irreversíveis a longo prazo nestes órgãos e comprometendo a saúde e a produtividade dos indivíduos portadores da doença de Chagas.

Impacto socioeconômico da doença de Chagas

A lesão em órgãos vitais como o coração compromete muito a capacidade produtiva de uma população de indivíduos e reflete nas suas condições econômicas e sociais. Essa abordagem é atualmente utilizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), através de um indicativo moderno para aferição do impacto econômico das doenças sobre determinadas regiões, através de uma grandeza denominada **DALY** (sigla correspondente à expressão em inglês *Disability-Adjusted Life Year*), que corresponde ao número de anos produtivos perdidos por morte ou incapacidade decorrente de uma doença em uma determinada população (OMS, 2002). Este indicador tem a vantagem de somar dois indicadores complementares: mortalidade, medida pelo número de anos perdidos em decorrência de morte prematura (*Years of Life Lost, YLL*) e um novo parâmetro, anos vividos com incapacidade de produção econômica (*Years Lived with Disability, YLD*), sendo este último indicador relacionado também aos aspectos de oneração dos sistemas de previdência em decorrência de aposentadorias precoces (OMS, 2015). YLL são calculados pelo produto entre o número de mortes pela expectativa de vida daquele determinado grupo de indivíduos; YLD pode ser

calculado pelo produto entre o número de casos, a duração da doença (parâmetro particularmente relevante em doenças crônicas) e uma constante para cada doença (DW) que varia em função da severidade da incapacitação causada, variando de zero (saudável) a um (morto). Dessa forma,

$$\text{DALY} = \text{YLL} + \text{YLD}$$

$$\text{YLL} = \text{N} \times \text{L}$$

$$\text{YLD} = \text{I} \times \text{DW} \times \text{L}'$$

Onde: N = número de mortes, L = expectativa de vida, I= número de indivíduos doentes, DW = *disability weight*, L'= período de duração da doença. A Tabela 1 abaixo mostra o impacto de diversas doenças negligenciadas sobre a economia de determinadas regiões.

Tabela 1. Número estimado de DALYs (x1000) por causa e por região (excluindo-se a Europa)¹, 2004.

Doença Negligenciada	Mundo ²	Região (critério da OMS)				
		África	Américas	Leste do Mediterrâneo	Sudeste da Ásia	Oeste do Pacífico
Doença do Sono	1673	1609	0	62	0	0
Doença de Chagas	430	0	426	0	0	0
Esquistossomose	1707	1502	46	145	0	13
Leishmaniose	1974	328	45	281	1264	51
Filariose	5941	2263	10	75	3525	65
Oncocercose	389	375	1	11	0	0
Hanseníase	194	25	16	22	118	13
Dengue	670	9	73	28	391	169
Tracoma	1334	601	15	208	88	419
Ascaridíase	1851	915	60	162	404	308
Tricuríase	1012	236	73	61	372	269
Ancilostomose ³	1092	377	20	43	286	364

¹ Fonte: *The global burden of disease: 2004 update*. Geneva, World Health Organization, (OMS, 2008)

² Como a Europa foi omitida, o somatório das regiões não será igual ao valor global.

³ Helmintíases transmitidas pelo solo.

Fazendo um recorte para a América Latina (Figura 4), observa-se que as regiões onde há infecção humana pelo *T. cruzi* são aquelas onde a população é tradicionalmente mais pobre, como por exemplo países como Panamá, Costa Rica, Bolívia e Venezuela e regiões interioranas como o Nordeste do Brasil e o Norte da Argentina (REITHINGER *et al*, 2011). Nessas regiões da América Latina é estimada a perda de 752.000 dias de trabalho por ano em decorrência de mortes prematuras de pessoas com doença de Chagas. Também são perdidos US\$1.2 bilhões por ano nos países latino americanos, sendo pelo menos US\$ 5.6 milhões no Brasil (CONTEH *et al*, 2010). Essa perda financeira, se considerada pertencente majoritariamente a um grupo de pessoas, torna a discussão sobre a doença de Chagas ainda mais complexa, pois a mesma deixa de ser apenas uma consequência e passa também a ser vista como agente mantenedor da pobreza em determinadas regiões, pela diminuição da

rendeu um conjunto de 11 publicações³ no *Boletín Chileno de Parasitología*, nas quais foram descritas evoluções clínicas de pacientes portadores da doença, bem como suas propriedades biológicas *in vivo* (BOCK *et al*, 1969). Apesar do nifurtimox ainda fazer parte da relação de medicamentos essenciais à saúde (OMS, 2013), sua distribuição foi descontinuada devido à baixa eficácia na fase crônica e aos severos efeitos adversos, como problemas gastrointestinais, distúrbios no sistema nervoso central e neuropatia periférica (COURA & DECASTRO, 2002). Seu mecanismo de ação (Figura 6) envolve a participação de nitrorredutases tipo I e II, presentes no parasito.

³ Publicações resultantes da busca do termo-chave “Bay 2502” no modo TITLE-ABS-KEY da base de dados Scopus <www.scopus.com>. Busca realizada em 14/06/2015

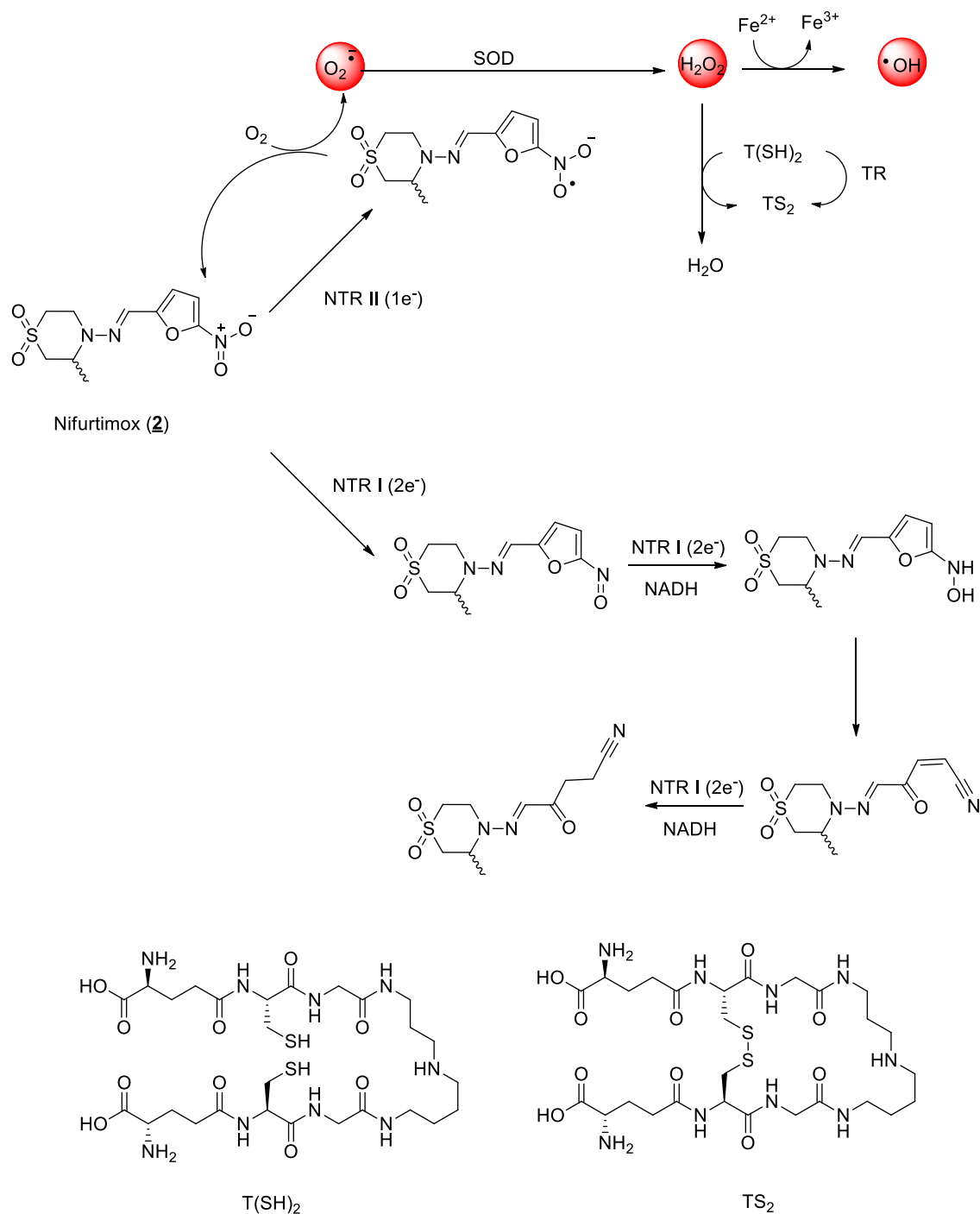


Figura 6: Nifurtimox (**2**) como gerador de espécies reativas de oxigênio (ROS, em vermelho). Adaptado de BOIANI *et al*, 2010; VIODÉ *et al*, 1999 e PATTERSON & WYLLIE, 2014.

Nitrorredutases tipo II realizam a transferência de um elétron, convertendo o nitrofurano (**2**) no nitroânion-radical correspondente, que converte o oxigênio molecular no ânion-radical superóxido. Esta espécie reativa de oxigênio (ROS) formada é substrato da enzima superóxido-dismutase (SOD), que desproporciona o superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (outra ROS). Peróxido de hidrogênio é convertido em água pela oxidação da tripanotonia em sua forma reduzida (T(SH)₂), processo que é revertido pela ação da enzima tripanotonia redutase (TR). H₂O₂ também pode oxidar o íon ferroso de

sistemas microssomais, através da clássica reação de Haber-Weiss, para formar radicais hidroxil, nocivos ao parasito (BOIANI *et al*, 2010; HABER & WEISS, 1932).

Através da ação das nitrorredutases tipo I, existe a transferência de dois elétrons (fornecidos por NADH), onde o nitrofurano (2) é reduzido diretamente ao derivado nitroso, que é sequencialmente reduzido a um intermediário do tipo *N*-furan-2-il-hidroxilamina, que sofre abertura de anel após perda de água, gerando uma nitrila insaturada, a qual pode ser reduzida novamente ao derivado saturado correspondente (PATTERSON & WYLLIE, 2014). A nitrila insaturada formada é igualmente tóxica para o parasito e para a célula hospedeira, devido à presença de um aceptor de Michael que pode se ligar irreversivelmente a bionucleófilos do hospedeiro ou do parasito (BARREIRO & FRAGA, 2008). Apesar da atividade relevante sobre formas intracelulares do parasito, o nifurtimox (2) não é mais comercializado no Brasil devido ao aparecimento de inúmeras cepas resistentes (COURA & DECASTRO, 2002) e dos expressivos efeitos genotóxicos (OHNISHI *et al*, 1980) causados pelos metabólitos provenientes da abertura do anel nitrofurânico (NAGEL, 1987).

O benzonidazol (1), um 2-nitroimidazol, é o fármaco de primeira escolha para o tratamento de pacientes infectados por *T. cruzi*, comercializado pela Roche® com o nome de Rochagan® no Brasil. Os direitos de produção e comercialização deste fármaco foram cedidos ao governo brasileiro em 2003⁴, sendo atualmente produzido, unicamente em todo o mundo, pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE, 2007). Apesar de também ser um derivado nitro-aromático, o mecanismo de ação do benzonidazol (1) se diferencia do mecanismo proposto para o nifurtimox (2), pois sua subunidade 2-nitroimidazol possui um potencial eletroquímico menor para a redução do que o 5-nitrofurano. Sendo assim, a concentração de ânions-radical superóxido formada é suficientemente baixa para que o parasito realize a detoxificação por si próprio (DOCAMPO, 1990). O que pode justificar a toxicidade seletiva do benzonidazol (1) é a transferência de um elétron para o nitro-aryl, que desproporciona (MAYA *et al*, 2003), gerando novamente um nitroimidazol e um nitrosoimidazol, o qual se liga de forma irreversível tripanotônica, que é um cofator essencial para a viabilidade do *T. cruzi* (MITSCHER *et al*, 2012). Acreditava-se que essa reação ocorria através do grupamento nitroso, mas o trabalho de Trochine e colaboradores mostrou que os adutos podem ser formados através de uma substituição eletrofílica aromática na posição 4 do anel imidazol (TROCHINE *et al*, 2014). Um outro possível mecanismo de ação é proposto por Patterson, onde o benzonidazol é convertido a uma *N*-aryl-hidroxilamina, tal qual ocorre com o nifurtimox (2). Em seguida, há uma série de reações não-enzimáticas, que culminam na formação de um metabólito contendo uma subunidade guanidina e uma molécula de glioxal, que possui propriedades citotóxicas capazes de explicar a atividade tripanocida do benzonidazol (1). Estes possíveis mecanismos estão representados na Figura 7.

⁴ Informação disponível em

http://www.roche.com/sustainability/for_patients/access_to_healthcare/delivering_innovation.htm, Acesso realizado em 11/06/2015.

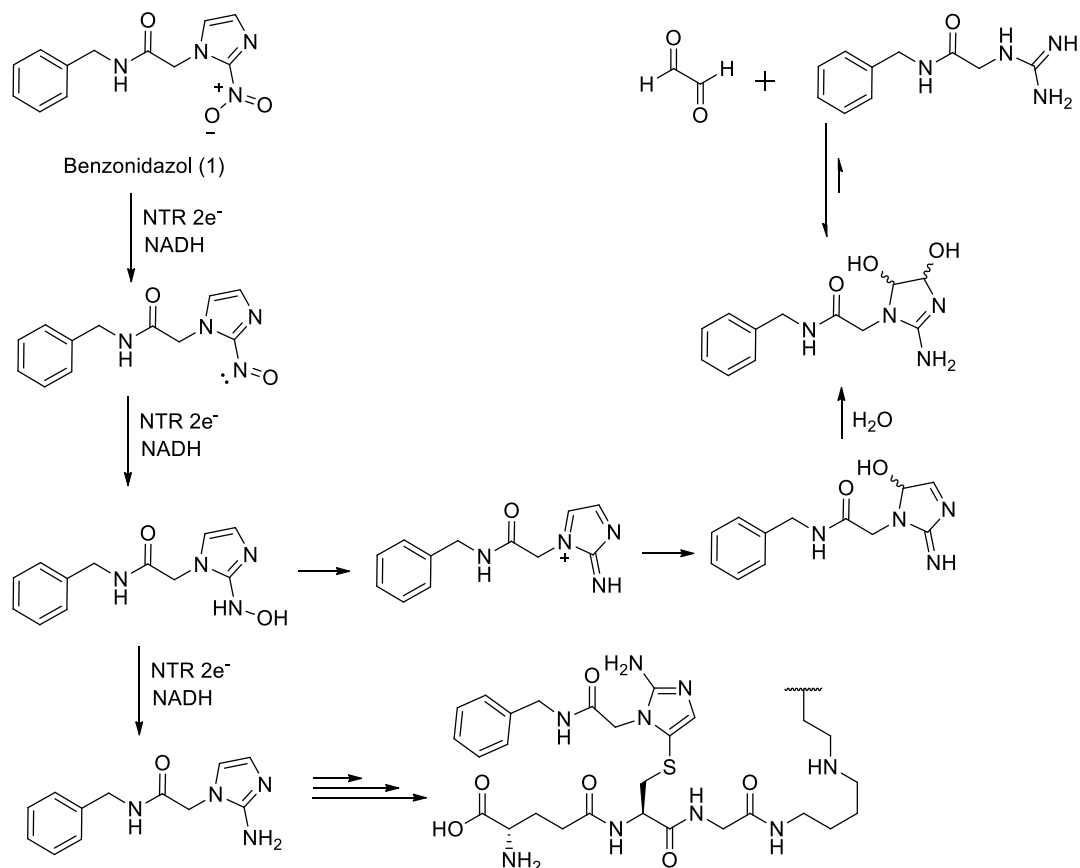


Figura 7: Benzonidazol (**1**) convertido aos metabólitos nitroso e *N*-aril-hidroxilamina, o qual pode ser convertido enzimaticamente ao derivado reduzido 2-aminoimidazol correspondente ou ao íon nitrênio, que espontaneamente é di-hidroxilado para formar um intermediário que estabelece equilíbrio gerando uma molécula de glicoxal e um derivado guanidínico. Adaptado de PATTERSON & WYLLIE, 2014 e TROCHINE *et al*, 2014.

Contudo, nifurtimox e benzonidazol são ativos apenas na fase aguda da doença de Chagas, que normalmente é assintomática e de curta duração. Na fase crônica, a relação custo x benefício inviabiliza o tratamento adequado, pois a longa administração destes nitroderivados acarreta no desenvolvimento de severos efeitos adversos sobre os pacientes.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho envolveu a realização de estudos sobre a atividade do diarileptanóide natural, curcumina (**3**, Figura 8) sobre o protozoário *Trypanosoma cruzi*, bem como a preparação de análogos estruturais deste produto natural. Os compostos obtidos foram submetidos a uma triagem frente a diferentes formas evolutivas do parasito e também linhagens celulares do hospedeiro, buscando o(s) derivado(s) mais ativo(s) e seletivo(s), que terá(ão) seu(s) mecanismo(s) de ação caracterizado(s), numa etapa final do trabalho.

Visando organizar os resultados obtidos de forma mais sistemática, esta tese foi escrita em três capítulos, resumidos a seguir:

- No Capítulo I encontra-se descrita a caracterização da curcumina (**3**) como composto-protótipo para a síntese de moléculas potencialmente úteis para o tratamento da doença de Chagas, bem como seu isolamento (Juntamente com outros curcuminóides minoritários) a partir da matriz comercial, síntese em laboratório e determinação da sua toxicidade seletiva frente à cepa Dm28c de *T. cruzi*.

- No Capítulo II está descrito o planejamento e a síntese de uma série de compostos, estruturalmente análogos à curcumina (**3**), bem como discussões acerca do planejamento racional de cada molécula, utilizando ferramentas clássicas da Química Medicinal, além das triagens que permitiram selecionar os diarileptanóides otimizados,

- No Capítulo III estão descritos e discutidos os métodos de avaliação biológica e modelagem molecular que permitiram investigar os prováveis mecanismos de ação tripanocida, além da caracterização da tubulina como alvo potencial da curcumina (**3**) sobre o parasito.

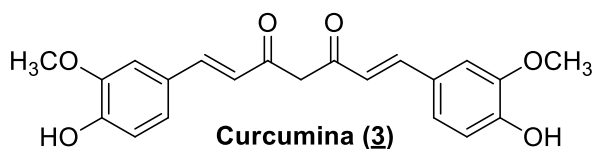


Figura 8: Estrutura da curcumina (**3**)

CAPÍTULO I
Caracterização da atividade tripanocida
da curcumina e outros curcuminoides
naturais.

Curcuma longa (Figura 9) é um arbusto perene, endêmico da Índia, havendo registros de sua utilização desde o século I AEC, embora haja referências à planta em manuscritos gregos do século IV AEC. Esta espécie desenvolveu relação com a expansão da civilização, sendo hoje encontrada apenas em regiões de cultivo humano, sem relato de espécimes crescendo em locais selvagens (DALBY, 2000). A parte do vegetal com maior utilização é o rizoma (Figura 9, b), que pode ser consumido fresco ou seco. Para fins de conservação, esse rizoma é desidratado e moído, gerando um pó de coloração dourada denominado turmérico (Figura 9, c). A utilização do turmérico remete às primeiras descrições de *C. longa*, e historicamente tem aplicação na culinária, medicina e religião (SUETH-SANTIAGO *et al*, 2015a).

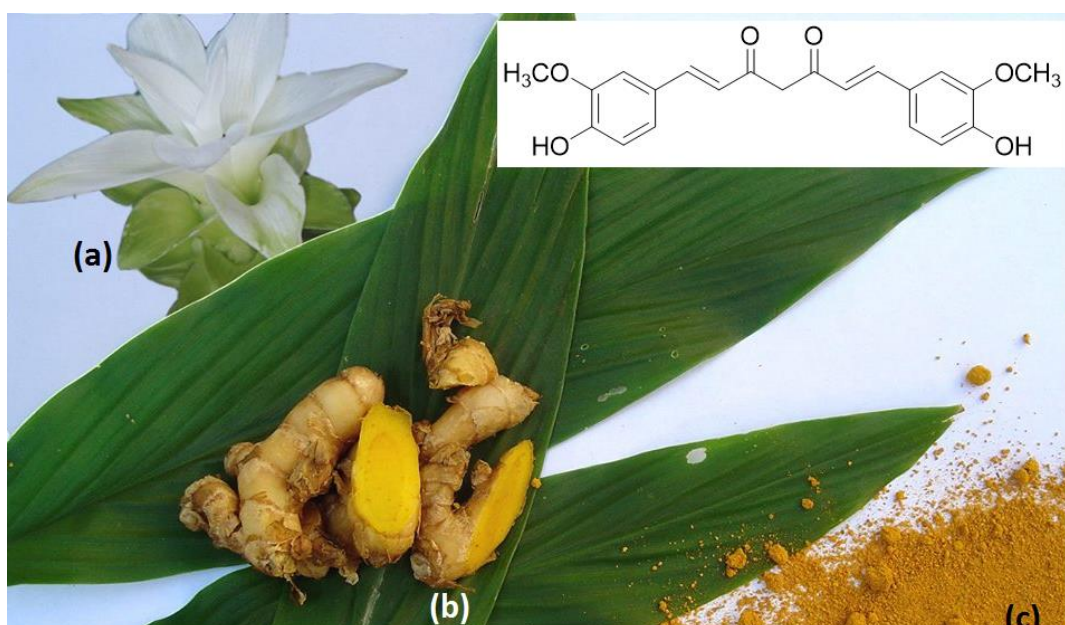


Figura 9: Espécime de *Curcuma longa* com inflorescência (a); Rizomas frescos (b); Turmérico: rizomas secos e moídos (c) (Imagens gentilmente cedidas por Neide Rigo; <http://come-se.blogspot.com.br/>)

A utilização de plantas medicinais como agentes terapêuticos remete à Antiguidade, e possui aplicação até os dias atuais. Apesar dessa extensa aplicação (primariamente baseadas em observações empíricas), a utilização desses princípios ativos como substâncias químicas isoladas, purificadas e caracterizadas só ocorreu a partir do século XIX (LIANG & FANG, 2006). Desde então, a participação de produtos naturais no escopo das substâncias bioativas que se tornam fármacos é marcante, através do isolamento direto da matriz natural, ou através da obtenção por síntese total ou semissíntese, ou ainda pela utilização dos padrões estruturais presentes nas substâncias de origem natural como inspiração para o planejamento de novos fármacos (NEWMAN & CRAGG, 2012). Dessa forma, os produtos naturais apresentam-se como importante recurso na busca de novas substâncias com atividades biológicas relevantes.

O turmérico, também conhecido na culinária como *curry spice*, é um dos temperos mais utilizados, especialmente na região continental da Índia. É consumido principalmente na forma de pó seco, utilizado para coloração alimentícia, devido à sua forte coloração amarela, associada a efeitos terapêuticos e dietéticos (SONY *et al*, 2014). Há registros de atividades biológicas devidas ao consumo do turmérico, como anti-inflamatório, antimicrobiano, cicatrizante e digestivo. Além disso, o turmérico apresenta efeito potencial em diferentes enfermidades, como a doença de Alzheimer, doenças parasitárias e em alguns tipos de cânceres (CHAKRABORTY & SENGUPTA, 2014). A composição química do turmérico é bastante variada, tendo como principal classe de compostos os curcuminoides, componentes

majoritários da fração não-volátil. Estes ocorrem em maior proporção nos rizomas da planta, com destaque para curcumina (**3**, CUR), desmetoxicurcumina (**4**, DMC) e bisdesmetoxicurcumina (**5**, BDMC), além de curcuminoides minoritários (Figura 10). A fração volátil é composta por terpenos, presentes no óleo essencial de diferentes partes do vegetal (Tabela 2).

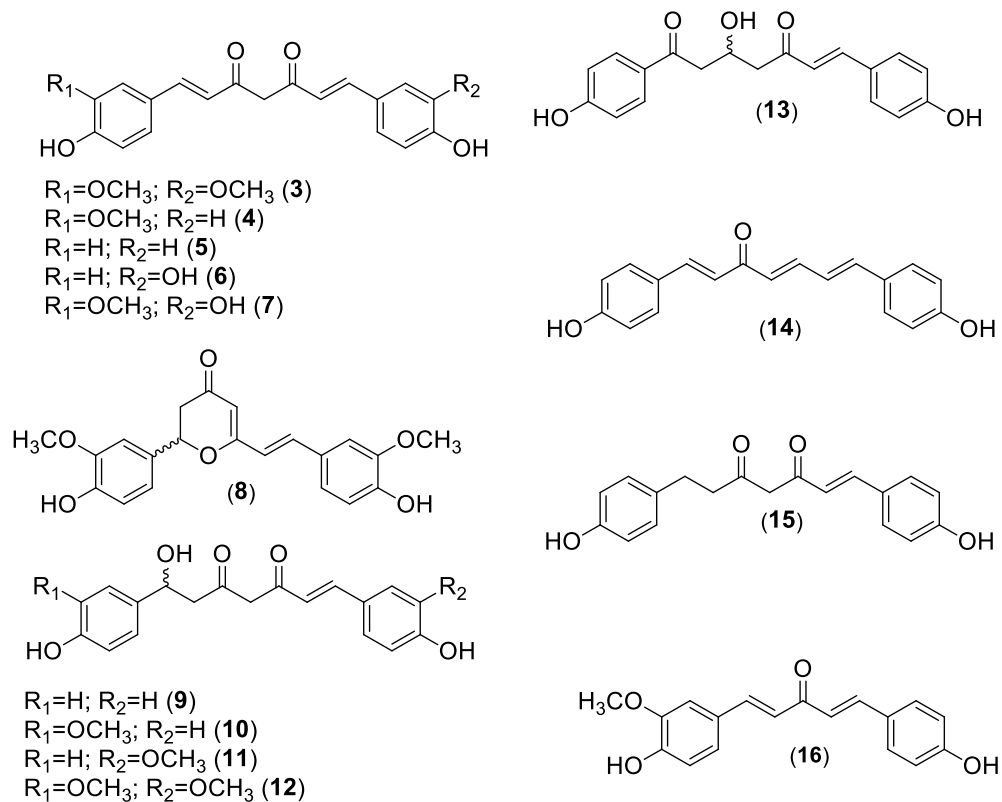
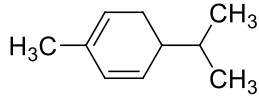
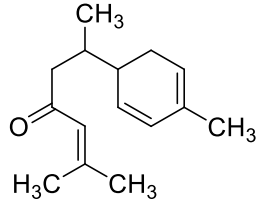
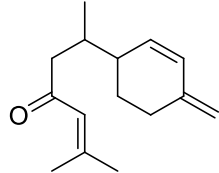
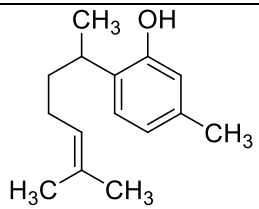
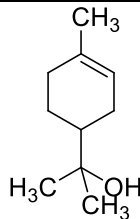
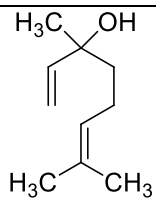


Figura 10. Estruturas de alguns curcuminoides, obtidos dos rizomas de *C. longa* (LI et al, 2009).

Tabela 2. Estrutura e concentração dos principais componentes voláteis dos óleos essenciais de diferentes partes de *C. longa* (PARTHASATHY *et al*, 2008)

Componente	Estrutura	Concentração (%)			
		Folha	Flor	Raiz	Rizoma
α -Felandreno (17)		32,6	-	0,1	0,1
Turmerona (18)		0,1	1,2	46,8	31,1
Curona (19)		0,9	1,0	-	10,0
Curcufenol (20)		0,2	0,3	0,6	10,6
Terpineol (21)		0,8	26,0	1,5	0,3
Linalol (22)		26,0	7,4	0,1	0,3

A curcumina (**3**) é o componente majoritário dos rizomas de *C. longa*, sendo responsável por cerca de 2% do peso seco dos rizomas. Atualmente a curcumina (**3**) pode ser obtida comercialmente como uma mistura de três componentes: curcumina (~77%); desmetoxicurcumina (~17%); e bisdesmetoxicurcumina (~3%) (GOEL *et al*, 2008). Na Índia pode-se encontrar esta mistura de curcuminoides na forma de cápsulas, pomadas, unguentos, cremes e curativos para aplicação tópica, misturada ou não com outros componentes. Contudo, a principal utilização destas substâncias ao redor do mundo é na culinária, como

componentes do açafrão-da-índia. O tipo de efeito apresentado por **(3)** depende, em parte, da via de administração (PRASAD *et al*, 2014). Até o momento, nenhum estudo realizado em animais ou homens relatou toxicidade com relação ao uso da curcumina, mesmo quando ela é utilizada em doses até 12 g ao dia. Apesar disso, alguns efeitos adversos relatados em alguns estudos foram atribuídos à curcumina, como supressão da agregação plaquetária, surgimento de dermatites de contato e urticária (GOEL *et al*, 2008).

A curcumina **(3)** apresenta em sua estrutura duas subunidades aril espaçadas por sete átomos de carbono, ou seja, um diarileptanoide. Um fármaco que possui estrutura diarileptanoide similar à curcumina é a pentamidina **(23)**, Figura 11), que é utilizada como fármaco no tratamento de leishmaniose e da doença do sono, causadas pelos tripanossomatídeos *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma brucei*, respectivamente. A pentamidina **(23)** também é ativa contra formas amastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen) apresentando o valor de CI_{50} de $7,1\mu M$ (LIU *et al*, 2014).

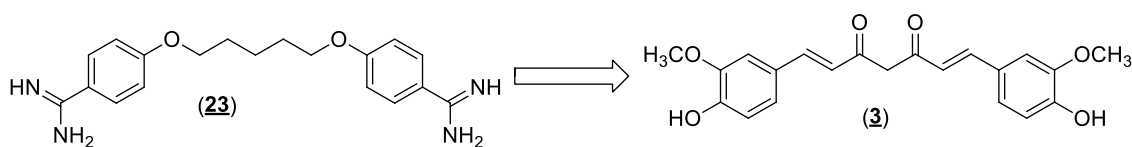


Figura 11: Similaridade estrutural entre o fármaco pentamidina **(23)** e o produto natural curcumina **(3)**, ambos possuindo arcabouço molecular diarileptanoide ($C_6-C_7-C_6$).

A curcumina **(3)** pode ser isolada do rizoma pulverizado de *C. longa*, através de diversos métodos. O mais simples envolve a extração do diarileptanoide com metanol ou clorofórmio, com filtração e posterior recristalização (Figura 12)

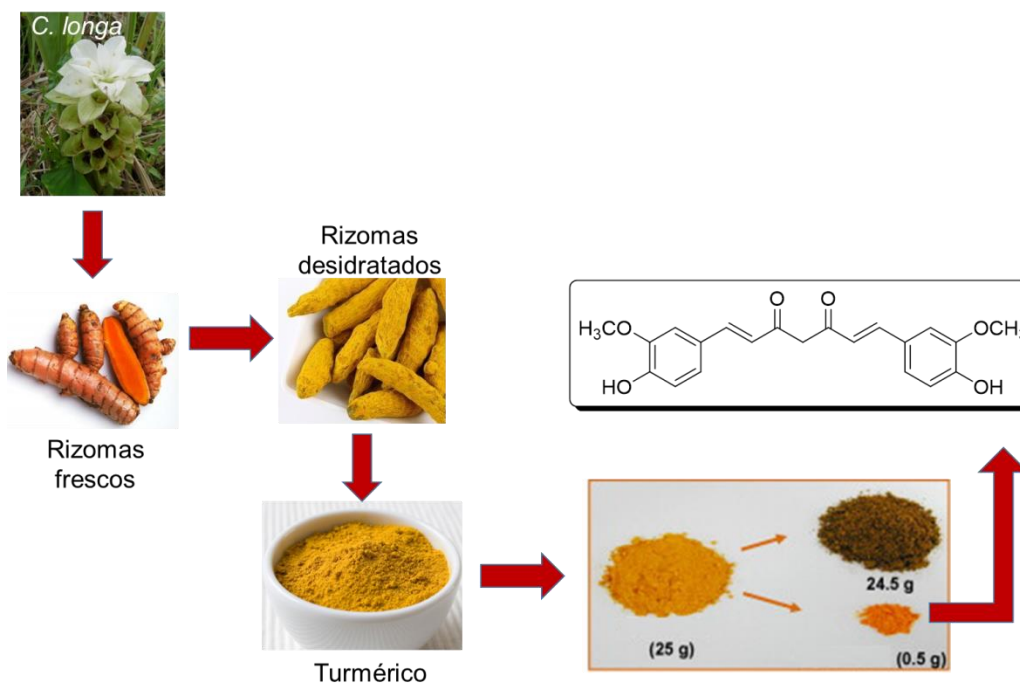


Figura 12: Fluxograma esquemático mostrando o isolamento da curcumina **(3)** a partir de *C. longa*. Adaptado de GOEL *et al*, 2008.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e caracterização dos curcuminoides naturais

A curcumina (**3**) já foi estudada como quimioterápico antiparasitário contra *Leishmania amazonensis* por nosso grupo de pesquisa (GOMES *et al*, 2002); contra *Plasmodium falciparum* (CUI *et al*, 2007); *Leishmania major* (RASMUSSEN *et al*, 2000); *Trypanosoma brucei* (CHANGTAM *et al*, 2010); além de *Schistosoma mansoni* (ALLAM, 2009). Entretanto, não há relatos de trabalhos que caracterizem a atividade tripanocida de (**3**) sobre *T. cruzi*.

No âmbito do desenvolvimento de novos fármacos com potencial aplicação em quimioterapia deve-se considerar a seletividade de suas atividades entre as células do hospedeiro e as células que causam a doença (sejam parasitas ou células tumorais). A curcumina (**3**) é, *a priori*, pouco nociva ao organismo humano, uma vez que está presente em quantidade considerável na alimentação. Dessa forma, pode-se pressupor uma administração relativamente segura dessa substância. Associando essa informação ao fato de a curcumina (**3**) já ter apresentado atividade frente a uma série de outros protozoários, como *Leishmania* e *T. brucei*, faz sentido verificar se esta pode ser um potencial protótipo para o desenvolvimento de substâncias com atividade tripanocida.

Contudo, o produto obtido comercialmente (Aldrich®) consiste em uma mistura de curcuminoides análogos (Figura 13), os quais foram isolados e purificados por recristalização e cromatografia em coluna empacotada com sílica e caracterizados por técnicas de infravermelho, espectrometria de massas de alta resolução e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13. Cabe ressaltar que nos trabalhos anteriormente citados, somente a curcumina (**3**) foi avaliada quanto a sua ação antiparasitária, ficando de lado os demais diarileptanóides minoritários. Em nossa avaliação, devido ao perfil estrutural apresentado pelos mesmos, torna-se extremamente relevante a avaliação do conjunto de diarileptanóides presentes na matriz natural, para um estudo de REA (relação estrutura-atividade) que possa fornecer subsídios para o planejamento de modificações estruturais e síntese de análogos.

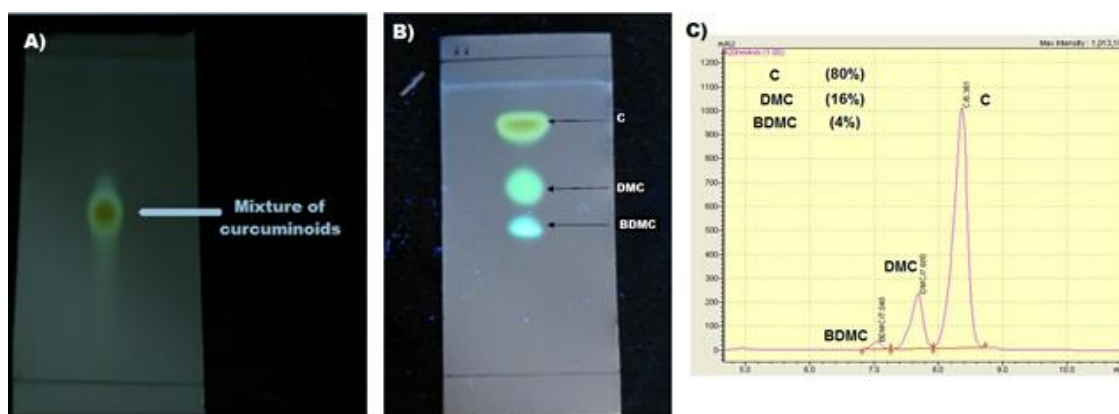


Figura 13: Análises de CCD e CLAE da curcumina comercial. A) CCD usando hexano/acetato de etila 50% como eluente. B) CCD usando metanol/diclorometano 2% como eluente. C) CLAE em fase reversa em coluna C18 utilizando acetonitrila e água como eluentes.

A observação mostrada na Figura 13 é extremamente importante, pois há diversos trabalhos na literatura que utilizam a curcumina comercial diretamente nos ensaios biológicos,

o que pode gerar resultados de confiabilidade duvidosa. A curcumina (**3**) isolada por recristalização foi caracterizada por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono-13 (DEPTQ), além de espectrometria de massas de alta resolução. A fim de tornar a atribuição dos sinais de RMN menos casuística, foi realizado um experimento de HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*), que está representado abaixo, na Figura 14, bem como os assinalamentos dos átomos de hidrogênio e carbono (Tabela 3).

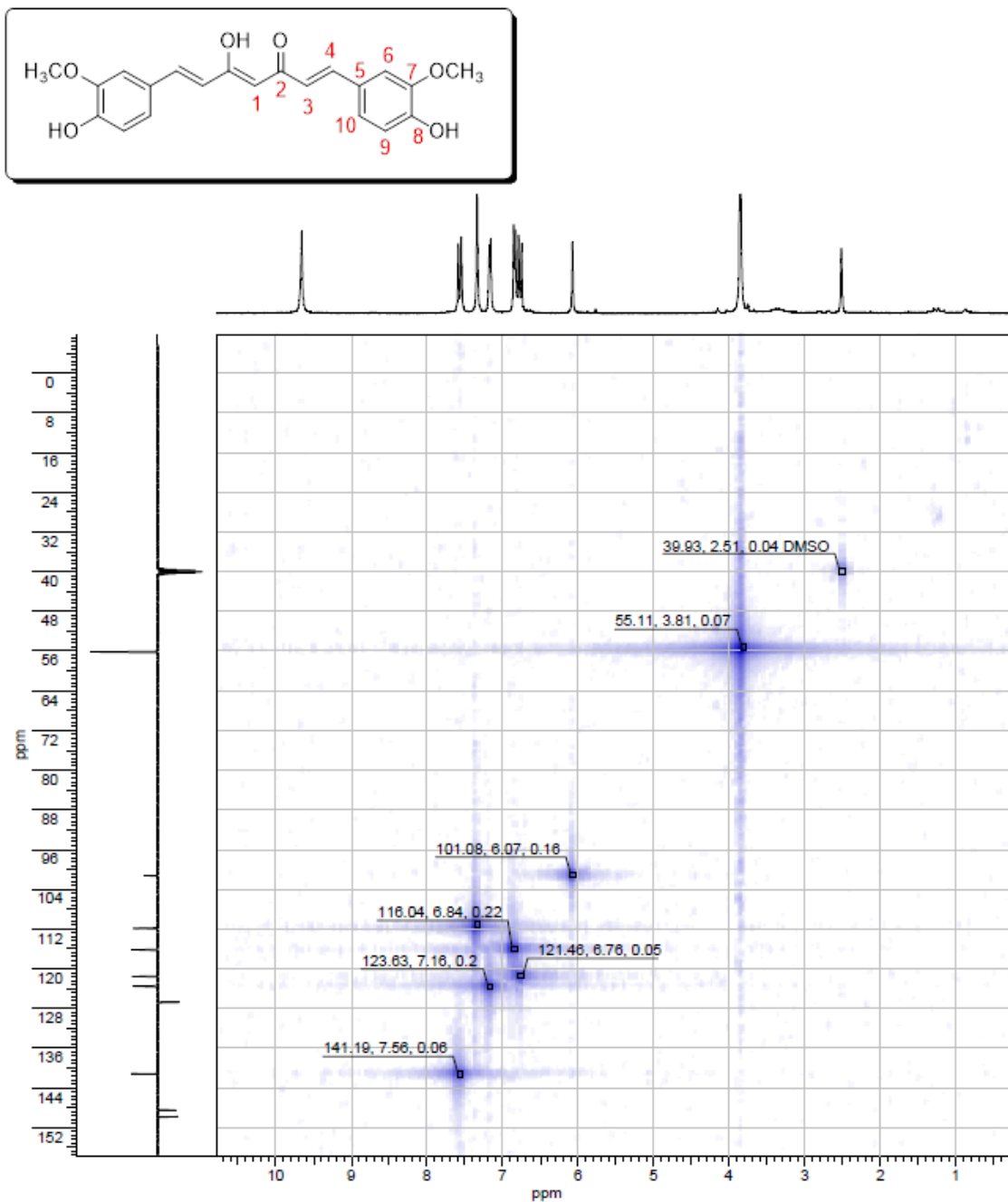


Figura 14. Espectro de HSQC da curcumina (**3**) em $\text{DMSO-}d_6$, a 500 MHz.

Tabela 3. Deslocamentos químicos relacionados aos átomos de carbono (C) e hidrogênio (H) nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da curcumina (**3**)

H	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,08	s	1	-
3	6,78	d	2	15
4	7,57	d	2	15
6	7,35	s	2	-
9	6,85	d	2	10
10	7,18	d	2	10
Ar-OH	9,70	s	2	-
Ar-OCH ₃	3,86	s	6	-

C	δ (ppm)	m
1	101,37	CH
2	183,71	C
3	123,64	CH
4	141,22	CH
5	126,82	C
6	111,79	CH
7	148,48	C
8	149,84	C
9	116,19	CH
10	121,57	CH
Ar-OCH ₃	56,16	CH ₃

Nas condições em que o experimento de RMN foi realizado (solução em DMSO-*d*₆, temperatura ambiente), a forma 1,3-dicetônica não é detectada, já que nos espectros de RMN de ^{13}C não é observado nenhum sinal referente ao metileno α às carbonilas, e sim um metino com deslocamento químico em δ 101,08 ppm (TØNNESEN *et al.*, 1995). No espectro de RMN de ^1H aparece um simpleto com integração para um hidrogênio em δ 6,07 ppm e o espectro de HSQC mostra o acoplamento entre esses dois sinais. Entretanto, mesmo com a presença do enol comprometendo a simetria da curcumina (eixo C2), todos os outros sinais se mantêm inalterados, o que sugere equivalência química entre a carbonila e o carbono do enol. O espectro de RMN ^1H também permite elucidar inequivocamente a geometria das ligações duplas, devido à constante de acoplamento dos hidrogênios olefínicos ($J = 15$ Hz, ligação dupla de geometria *E*). A ressonância presente no sistema também gera uma diferença significativa nos deslocamentos químicos dos hidrogênios olefínicos (H3 e H4). Como visto no espectro de HSQC, H4 encontra-se mais desblindado (δ 7,57 ppm), se comparado ao H3 α à carbonila (δ 6,78 ppm). Isso pode ser explicado em função das estruturas de ressonância da carbonila α,β -insaturada, que torna a posição 4 mais eletrofílica (um aceptor de Michael).

O equilíbrio tautomérico da curcumina (Figura 15) é sabidamente deslocado para a formação do enol na maioria dos casos. Todavia, a presença da subunidade 1,3-dicetônica é de fundamental importância para grande parte das suas propriedades. A forma enólica é mais estável, devido não apenas à presença de uma ligação de hidrogênio intramolecular, como também devido à planaridade, que permite uma melhor sobreposição dos orbitais π e, conseqüentemente, uma melhor conjugação eletrônica. A forma 1,3-dicetônica apresenta como confômero mais estável aquele com as carbonilas orientadas em direções opostas (confômero C, Figura 16). Esse confômero é cerca de 30 kJ.mol⁻¹ mais estável do que o

confômero A, devido ao maior distanciamento entre os orbitais não-ligantes dos átomos de oxigênio (KOLEV *et al*, 2005).

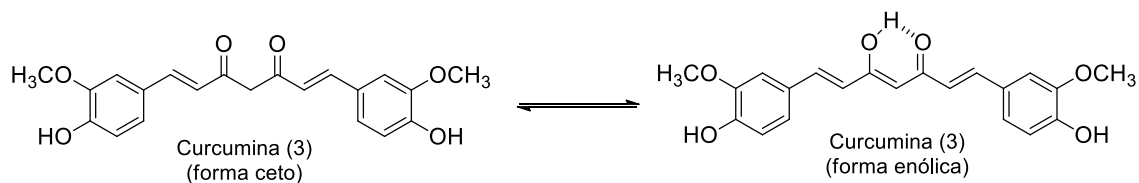


Figura 15: Equilíbrio tautomérico da curcumina (3)

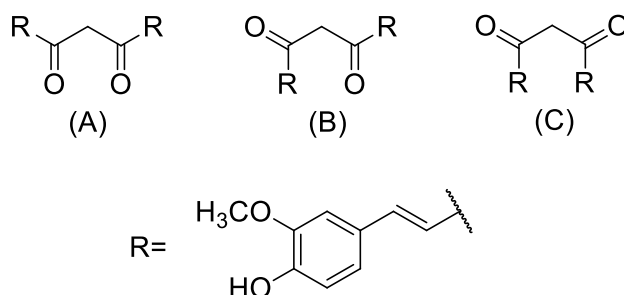


Figura 16. Confômeros possíveis para a forma 1,3-dicetônica da curcumina (3). Adaptado de PRIYADARSINI, 2009.

A caracterização por espectrometria de massas de alta resolução foi realizada utilizando um espectrômetro de massas Impact, calibrado de m/z 90 a 1200 usando formiato de sódio a 10 mM. Utilizando a curcumina (3) como modelo, são apresentados os espectros de MS e MS/MS (Figura 17) com propostas de mecanismos de fragmentação (Figura 18).

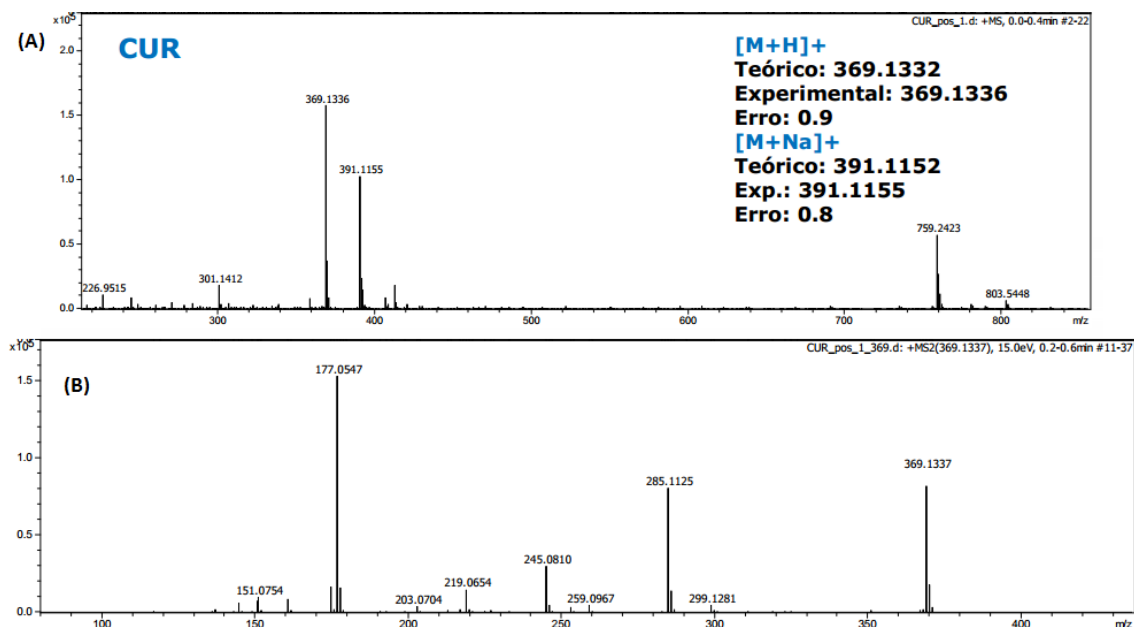


Figura 17: Espectros de massas de alta resolução da curcumina (3). (A) Espectro de massas de alta resolução tipo quadrupolo-tempo de voo. (B) Fragmentação do íon molecular da curcumina (3).

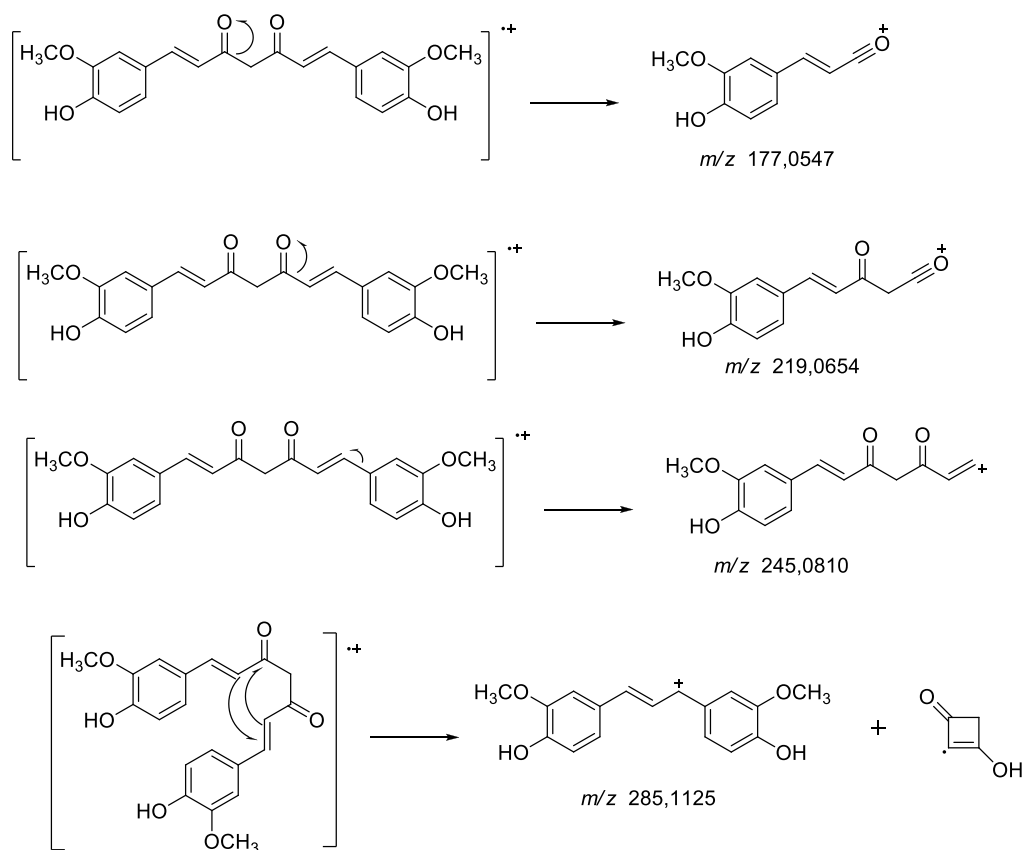


Figura 18: Proposta de fragmentação da curcumina (**3**) para os principais sinais do espectro de massas obtido.

Os fragmentos apresentados no espectro de massas são típicos de sistemas carbonilados, pois são decorrentes da cisão homolítica em α . Contudo, destaca-se o fragmento m/z 285,1125. Este fragmento é provavelmente decorrente da perda de um radical 1-hidróxi-3-ceto-ciclobutenona (curiosamente este processo só é possível a partir do tautômero contendo duas carbonilas, que não é o termodinamicamente mais estável).

Os outros curcuminoides naturais, DMC (**4**) e BDMC (**5**), foram isolados por cromatografia em coluna de sílica seguida por recristalização e caracterizados pelas mesmas técnicas que o curcuminoides majoritário (**3**), cujas atribuições encontram-se em anexo. O derivado BDMC (**5**) foi isolado em uma quantidade muito baixa, o que motivou a realização de sua síntese. Desta forma então foram sintetizados os curcuminoides simétricos CUR (**3**) e BDMC (**5**) de acordo com a síntese de Pabon, representada na Figura 19.

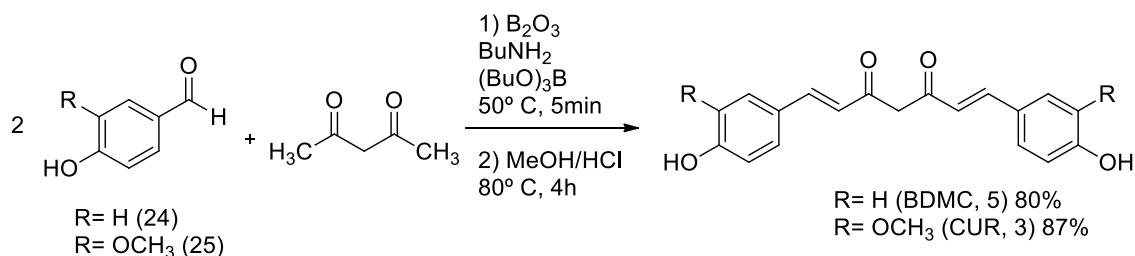


Figura 19. Síntese de Pabon realizada para preparação dos curcuminoides simétricos CUR (**3**) e BDMC (**5**).

No ano de 1964, Pabon e colaboradores desenvolveram uma metodologia que até hoje é a mais utilizada na síntese de diarileptanoides (PABON, 1964). Em seu trabalho, Pabon preparou a curcumina em duas etapas, iniciando o processo com a geração de um enolato de

boro com o composto β -dicarbonílico (*e. g.* acetilacetona), sobre o qual são adicionados a vanilina (**25**), *n*-butilamina e tributilborato. Em um segundo momento, o enolato de boro é desfeito através de hidrólise ácida, por adição de solução aquosa de HCl. O mecanismo proposto para a reação de preparação da curcumina (**3**) pelo método de Pabon está representado na Figura 20.

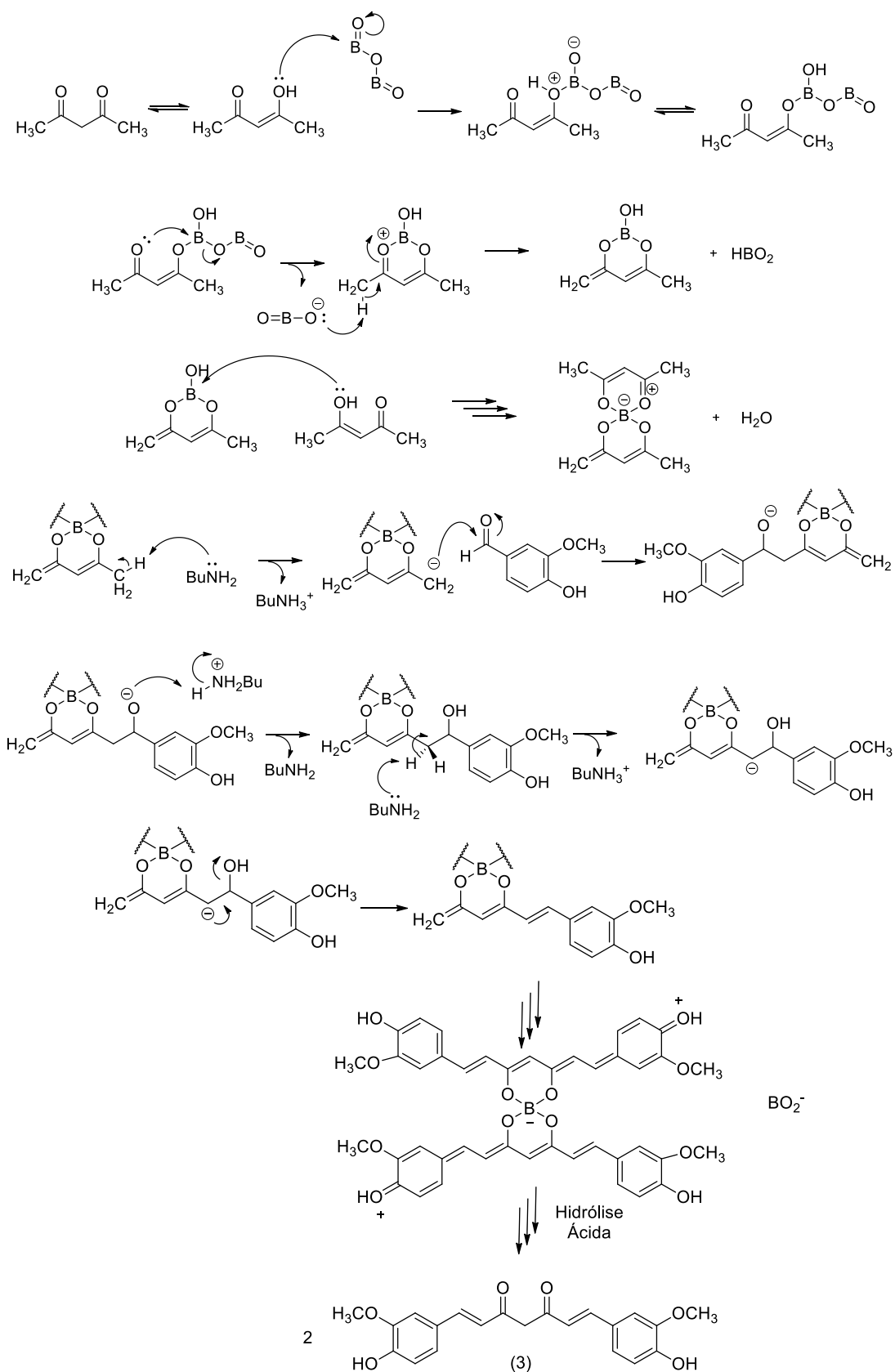


Figura 20: Proposta de mecanismo para a síntese da curcumina (**3**) pelo método de Pabon, a partir de vanilina (**25**) e acetilacetona.

O método de Pabon tem como justificativa para a primeira etapa a formação do enolato de boro, que impede a condensação de Knoevenagel no carbono 3 da acetilacetona, já que o enolato de boro torna esse hidrogênio menos ácido que as metilas terminais. Essa característica da acetilacetona de complexação com ácidos de Lewis se estende à maioria dos compostos 1,3-dicarbonílicos, incluindo a curcumina (3), que inclusive pode ser observada no espectro de massas de alta resolução (Figura 17a). O sinal correspondente à m/z 759,2423 se deve ao íon $[2M+Na]^+$, cuja estrutura, possivelmente, é aquela onde um íon Na^+ encontra-se complexado com duas moléculas de curcumina, a exemplo do que acontece com o boro na estrutura da rosocianina (SPICER & STRICKLAND, 1952).

Síntese e caracterização da ciclocurcumina.

A despeito dos outros dois curcuminoides presentes na matriz comercial (4 e 5, Figura 10) apresentarem similaridade estrutural com (3), também existe na literatura a descrição de um curcuminóide característico, fruto da adição de Michael intramolecular da curcumina (ciclocurcumina, 8, Figura 10), presente em baixa quantidade na matriz natural (KIUCHI *et al.*, 1993). Mesmo na matriz natural a ciclocurcumina (8) encontra-se na forma de mistura racêmica, e esta propriedade aponta para a hipótese de que ela não é oriunda de um processo enzimático. Este derivado foi originalmente descrito por Kiuchi e colaboradores, e consiste em uma diidropiranona, passível de isomerização fotoquímica (KIUCHI *et al.*, 1993). Desde sua primeira descrição na década de 90, apenas um trabalho foi publicado envolvendo avaliação das propriedades biológicas de (8), onde Simon e colaboradores realizaram ensaios de inibição da proliferação celular de células MCF-7, utilizando curcuminoides naturais, incluindo a ciclocurcumina (8), onde esta demonstrou uma atividade bem inferior aos demais compostos (SIMON *et al.*, 1998). Desde então a ciclocurcumina (8) aparece apenas em revisões e experimentos *in silico*, provavelmente devido às dificuldades de sua síntese em rendimentos adequados. Sua preparação foi realizada a partir da curcumina (3) pura em benzeno, catalisada por ácido trifluoracético. Essa reação ocorreu ao abrigo de luz para evitar a fotoisomerização do produto final.

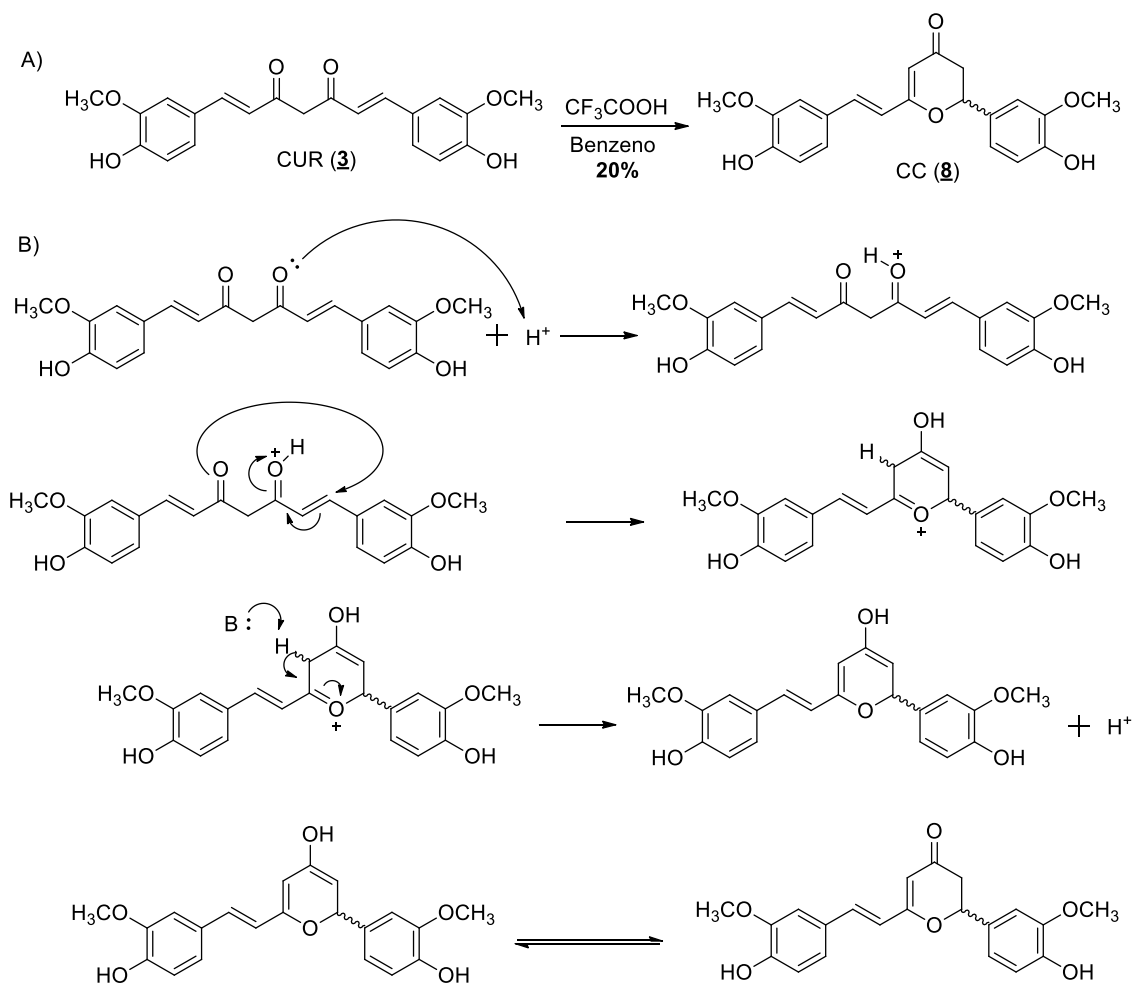


Figura 21: A) Reação de transformação de CUR (**3**) em CC (**8**) (KIUCHI, 1993); B) Proposta de mecanismo de adição de Michael intramolecular ácido-catalisada.

A reação tem início com a protonação de uma das carbonilas da curcumina (**3**) pelo ácido trifluoracético. Uma vez protonada, a carbonila é ativada e o carbono β torna-se ainda mais eletrofílico (um melhor aceptor de Michael). Em seguida, a ciclização se dá pela adição do oxigênio ao carbono β -carbonílico, conforme representado na Figura 21. Neste momento é justificada a hipótese da ciclização ser ácido-catalisada (e não enzimática) pois a ciclização pode se dar tanto pela face *re* quanto pela face *si* do carbono eletrofílico, que é hibridizado em sp^2 e tem geometria trigonal planar. Como a probabilidade de ataque é igual para ambas as faces, o produto final é uma mistura racêmica de (**8**) (Figura 22).

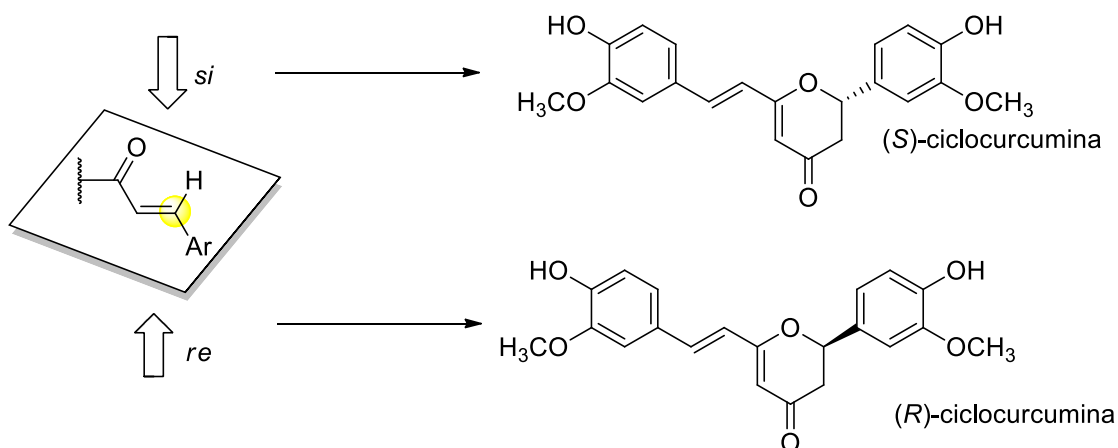


Figura 22: Representação das faces *re* e *si* do carbono aceptor de Michael e estruturas dos enantiômeros formados em igual proporção pela adição do oxigênio às faces correspondentes.

O produto formado foi caracterizado pela avaliação de seus espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C). O espectro de hidrogênio (Figura 23) mostrou dois grupos de sinais na região de aromáticos mostrando dois anéis 1,3,4-trissubstituídos não-equivalentes (Figura 23, a), um par de dupletos de constante de acoplamento 16 Hz (geometria *E*, Figura 23 b), um grupo de sinais com padrão ABX (Figura 23, c) e um sinal olefínico isolado em δ 5,62ppm. A atribuição completa dos sinais encontra-se em anexo no caderno de espectros (página 191). O rendimento desta reação foi de 20%, bastante baixo em termos comparativos, havendo recuperação de grande quantidade do produto de partida. Em decorrência disto, foram tentadas diversas alternativas para a ciclização da curcumina, mas nenhuma delas logrou êxito em promover a conversão do reagente em rendimentos satisfatórios. Entretanto, mesmo com este baixo rendimento foi possível obter quantidade de CC (**8**) para realização de ensaios biológicos preliminares, visando investigar as propriedades tripanocidas do conjunto de curcuminoides presentes na matriz natural.

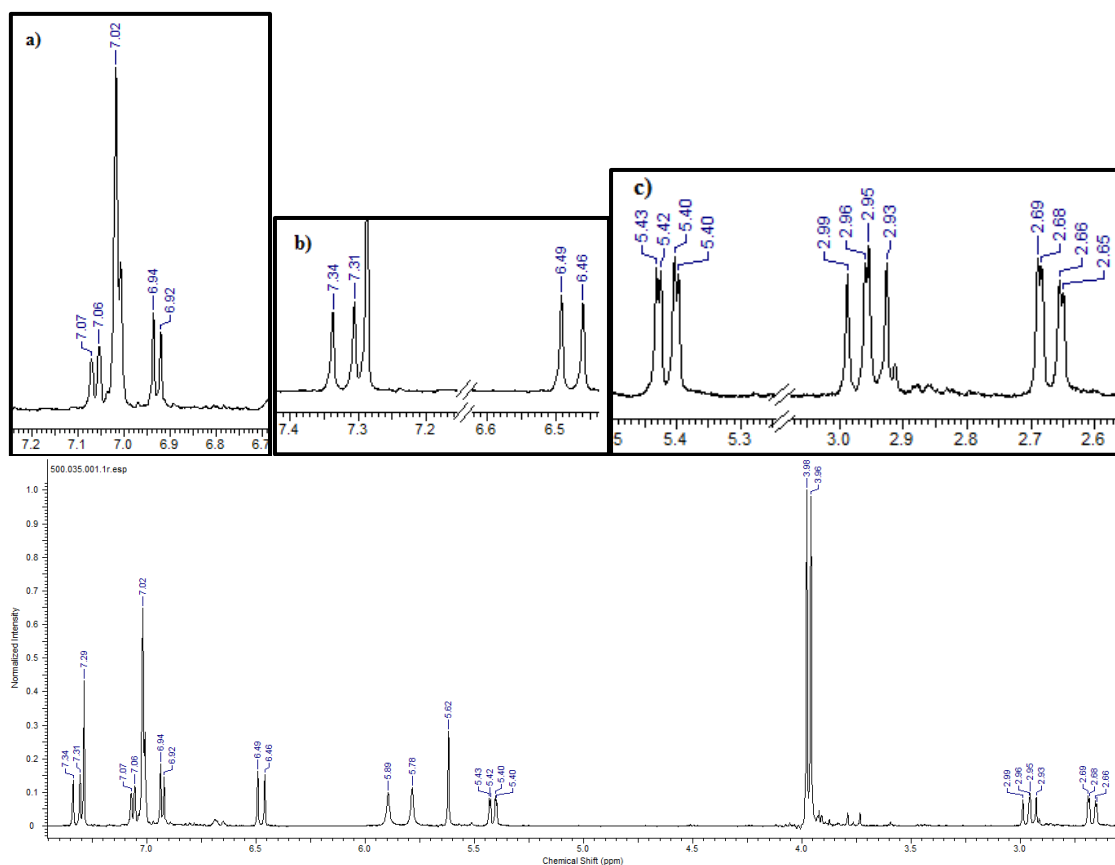


Figura 23: Espectro de RMN ^1H da ciclocurcumina (**8**) (CDCl_3 , 500 MHz). Expansões: a) sinais de dois anéis aromáticos 1,3,5-trissubstituídos; b) sinais da olefina com geometria E; c) sinais do padrão ABX formado.

Avaliação da atividade tripanocida dos curcuminoides naturais

Os quatro curcuminoides CUR (**3**), DMC (**4**), BDMC (**5**) e CC (**8**) foram avaliados frente às formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Dm28c, em diferentes concentrações (100, 50, 25 e 2 μM). O parasito foi cultivado por 7 dias em meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*) e algumas culturas foram tratadas com o respectivo produto natural nas concentrações indicadas. As formas viáveis foram contadas em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico em objetiva de 40X (Figura 24). Nesse modelo, todas as substâncias foram ativas, à exceção da ciclocurcumina. Este dado permite-nos inferir que o esqueleto diarileptanoide linear é fundamental para a atividade tripanocida exibida por esta família de substâncias.

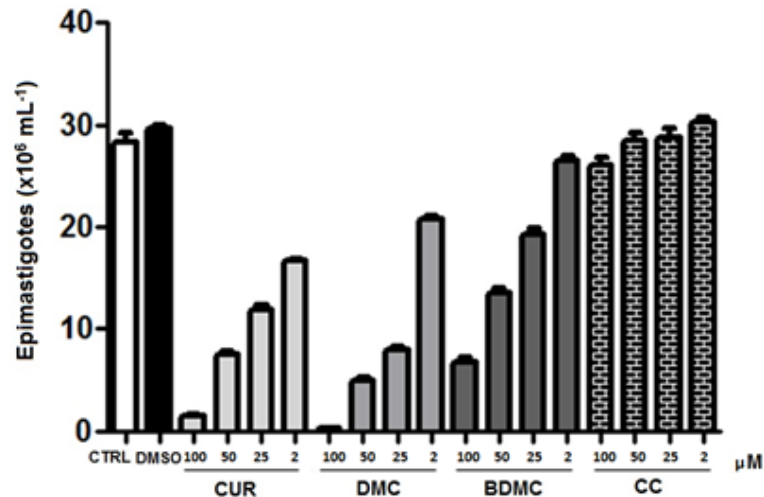


Figura 24: Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Dm28c. O parasito foi cultivado por 7 dias em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com hemina, ácido fólico e 10% de soro fetal bovino a 26 °C e prontamente tratado com CUR (3), DMC (4), BDMC (5) ou CC (8) em triplicatas nas concentrações indicadas. As formas viáveis foram contadas na câmara de Neubauer no sétimo dia. Resultado representativos de dois experimentos independentes.

Em seguida, os produtos naturais foram submetidos a um ensaio de viabilidade celular, frente a dois tipos distintos de células murinas. Em um primeiro momento, foram testados frente a macrófagos (Figura 25), que são células passíveis de infecção pelo *T. cruzi*. Macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c foram tratados por 48h com diferentes concentrações de cada substância testada. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão, utilizando o corante azóico azul de Trypan (MULLEN *et al*, 1975).

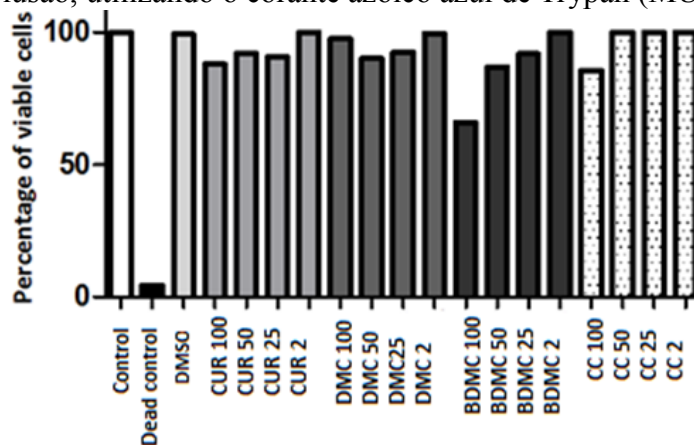


Figura 25: Avaliação da viabilidade celular em macrófagos peritoneais murinos tratados com curcuminoides naturais nas concentrações indicadas. Os macrófagos foram cultivados em triplicatas na concentração de 5×10^5 células.mL⁻¹. As células foram tratadas por 48h com diferentes concentrações de CUR (3), DMC (4), BDMC (5) e CC (8) variando de 2 a 100 μM. A viabilidade celular foi obtida pelo método de exclusão utilizando azul de Trypan. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

Também foi realizado um ensaio de viabilidade em uma população enriquecida de linfócitos esplênicos (Figura 26). Linfócitos são células mais sensíveis a agentes tóxicos, e a manutenção da viabilidade destas células frente aos curcuminoides pode indicar uma melhor tolerância de células de mamíferos frente a essas substâncias (SPIELBERG, 1980; SPIELBERG, 1984). Para este ensaio, uma população enriquecida de linfócitos esplênicos foi obtida do baço de camundongos BALB/c e cultivadas na concentração de 5×10^5 células mL⁻¹. As células foram tratadas, a exemplo do experimento com macrófagos, com as substâncias

nas concentrações indicadas. A viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão utilizando-se azul de Trypan.

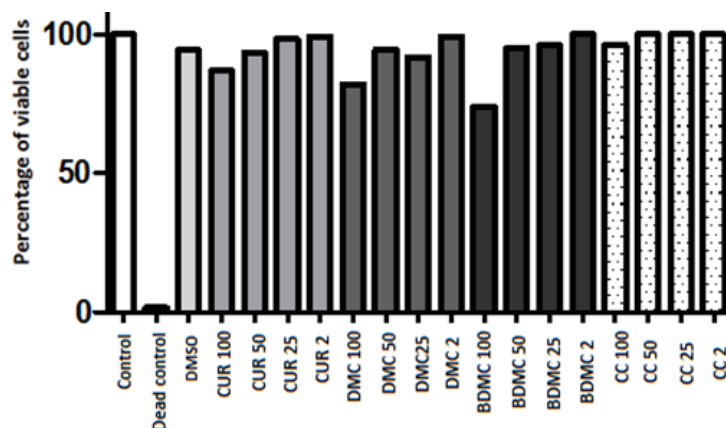


Figura 26: Avaliação da viabilidade celular em população enriquecida de linfócitos esplênicos murinos tratados com os curcuminoides nas concentrações indicadas. Os esplenócitos foram cultivados em triplicatas na concentração de 5×10^5 células mL^{-1} . As células foram tratadas por 48h com diferentes concentrações de CUR (3), DMC (4), BDMC (5) e CC (8) variando de 2 a 100 μM . A viabilidade celular foi obtida pelo método de exclusão utilizando azul de Trypan. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

Em paralelo foi realizado um experimento para verificar a atividade antioxidante dos curcuminoides naturais, devido à extensa quantidade de relatos na literatura atribuindo as propriedades biológicas da curcumina (3), pelo menos em parte, às suas propriedades antioxidantes (SUETH-SANTIAGO *et al*, 2015a). O método utilizado foi o método do FRAP (*Ferric reducing ability of plasma*) utilizando o TROLOX[®] como padrão positivo (SALGUEIRO, 2014), e os resultados da atividade tripanocida em epimastigotas, das viabilidades celulares nas duas populações testadas e a atividade antioxidante estão sumarizadas na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de CI_{50} para formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c), DL_{50} para duas linhagens celulares e atividade antioxidante pelo método do FRAP.

Substância	CI_{50} <i>T. cruzi</i> (μM)	DL_{50} <i>Mø</i> (μM)	DL_{50} Linfócitos (μM)	FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$)
CUR (3)	10,13	> 100	> 100	691,80
DMC (4)	11,07	> 100	> 100	692,23
BDMC (5)	45,33	> 100	> 100	176,02
CC (8)	> 100	> 100	> 100	116,78

Os resultados apresentados mostram que a CI_{50} e a atividade antioxidante são inversamente proporcionais, o que mostra que moléculas com maior atividade antioxidante são aquelas mais ativas, CUR (3) e DMC (4), o que pode indicar o envolvimento de processos de oxirredução no mecanismo de ação tripanocida da curcumina e seus análogos.

A atividade frente às formas epimastigotas do parasito e a manutenção da viabilidade celular nas células murinas permite a realização de um experimento de infecção *in vitro*, que avalia a atividade dos curcuminoides naturais sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*. Nesse experimento (Figura 27), macrófagos peritoneais murinos foram infectados (5 parasitos por célula) com formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) induzidas quimicamente através de metaciclo gênese. Algumas culturas foram tratadas com

benzonidazol (**1**), CUR (**3**), DMC (**4**), BDMC (**5**) e CC (**8**), na concentração de 100 μ M. Após 7 dias foi avaliado o número de formas tripomastigotas liberadas no sobrenadante das culturas.

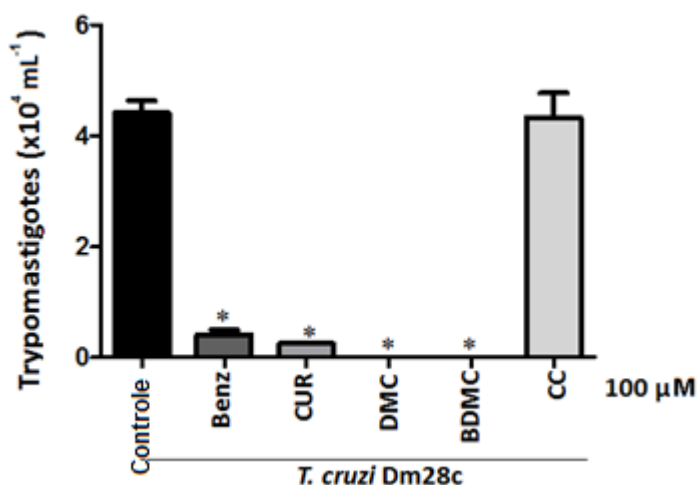


Figura 27: Inibição da liberação de formas tripomastigotas de *T. cruzi* *in vitro* de macrófagos peritoneais murinos infectados. 10^5 macrófagos peritoneais foram plaqueados e infectados com tripomastigotas metacíclicas da cepa Dm28c na razão de 5 parasitos por célula. Algumas culturas foram tratadas com 100 μ M de benzonidazol (**1**), CUR (**3**), DMC (**4**), BDMC (**5**) e CC (**8**). Após 7 dias foram contadas as formas tripomastigotas celulares no sobrenadante. Dados representativos de dois experimentos independentes, culturas comparadas utilizando o teste T de Student não-pareados. * $p > 0,05$

Os resultados apresentados mostram que a curcumina (**3**) e seus análogos estruturais naturais (**4** e **5**) possuem expressiva atividade tripanocida sobre diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) sem, entretanto, comprometer a viabilidade celular das populações testadas. Os valores de CI_{50} sobre as formas epimastigotas também permitem concluir que a subunidade 1,3-dicetônica parece ser farmacofórica para a atividade tripanocida, haja visto que o derivado cíclico (**8**) não teve atividade nas concentrações testadas. Essa toxicidade seletiva é importante para o cumprimento do principal requisito para que uma determinada substância possua atividade quimioterápica aplicável *in vivo*. O padrão de substituição dos anéis aromáticos parece ter papel relevante no perfil de atividade tripanocida; a dissecação molecular iniciada pela retirada da primeira metoxila de (**3**) gera o derivado (**4**), que é virtualmente equipotente, caracterizando-a como um grupamento auxofórico. Contudo, a retirada da segunda metoxila leva à formação de (**5**) e em uma perda significativa de atividade, o que leva à sugestão de que esta segunda metoxila realiza interações com o biorreceptor hipotético e, conseqüentemente, deve ter caráter farmacofórico (Figura 28). Essas informações foram utilizadas para planejar racionalmente uma série de análogos a fim de estabelecer uma Relação Estrutura x Atividade (REA) mais acurada, envolvendo um número maior de derivados.

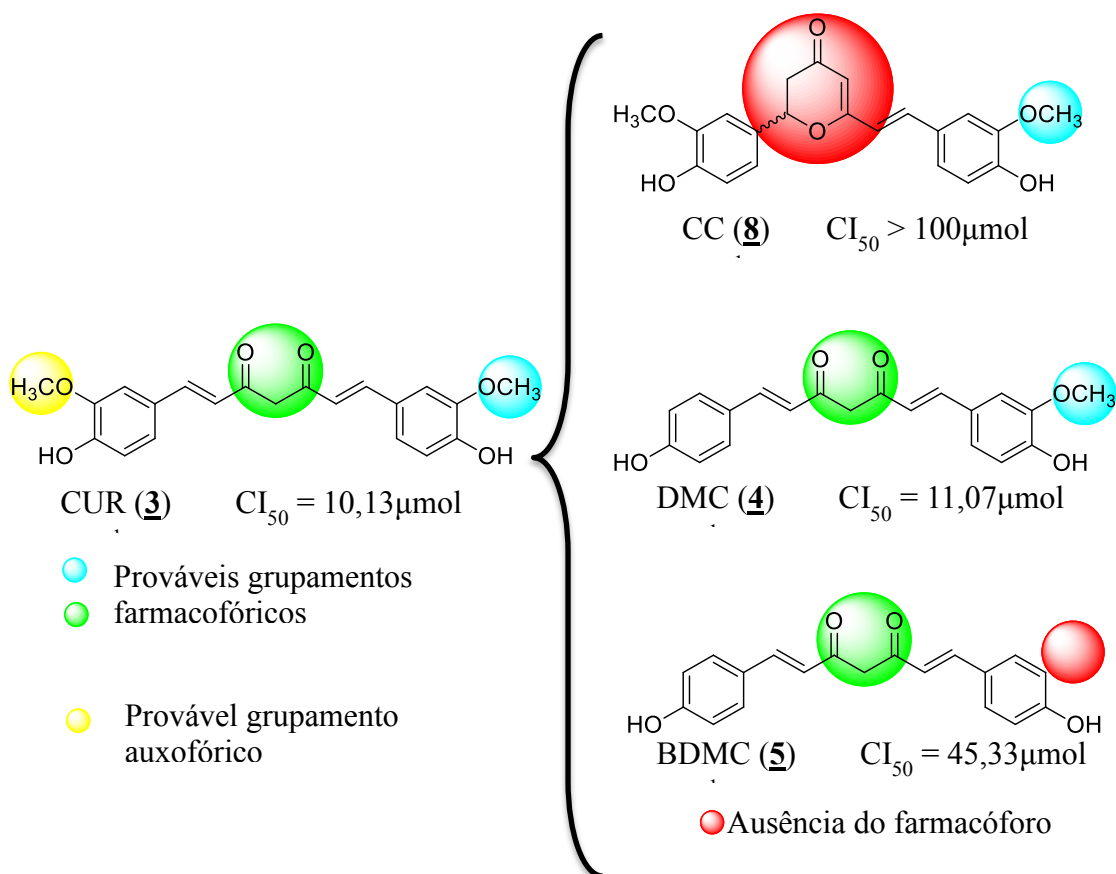


Figura 28: Avaliação preliminar da relação estrutura x atividade tripanocida do protótipo natural curcumina (**3**) quando comparado aos curcuminoides naturais (**4**, **5** e **8**).

As duas subunidades potencialmente farmacofóricas da estrutura da curcumina (**3**) estão diretamente ligadas às propriedades antioxidantes observadas no ensaio do FRAP: o metileno α às carbonilas (JOVANOVIC *et al*, 1999) e os anéis aromáticos contendo hidroxilas fenólicas (ROSS *et al*, 2000). Em ambos os casos, a atividade antioxidante está relacionada à doação de hidrogênio radicalar (Figura 29), que reage com espécies reativas de oxigênio (EROs) e neutraliza possíveis danos celulares, decorrentes da presença desses intermediários.

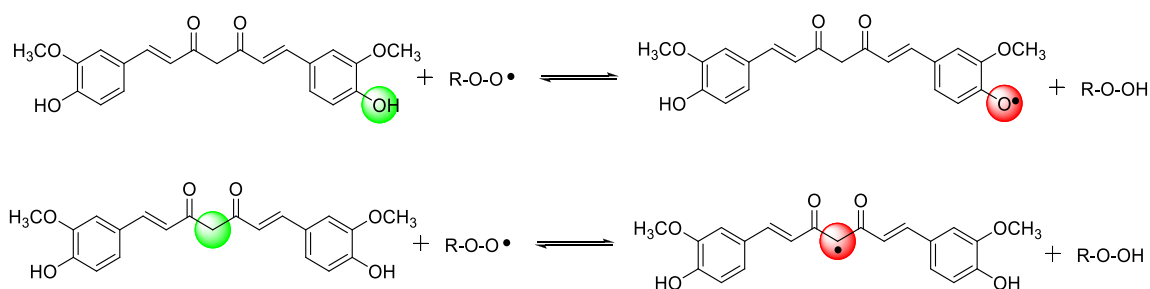


Figura 29. Principais propostas para o mecanismo antioxidante da curcumina (**3**), envolvendo a doação de hidrogênio radicalar pela hidroxila ou metileno (regiões verdes) para formar o radical-livre (em vermelho).

As duas propostas mostradas na Figura 29 são razoáveis, devido ao fato de em ambos os casos existir a estabilização do radical formado por ressonância, o que justifica as propriedades antioxidantes da curcumina (**3**) (Figura 30).

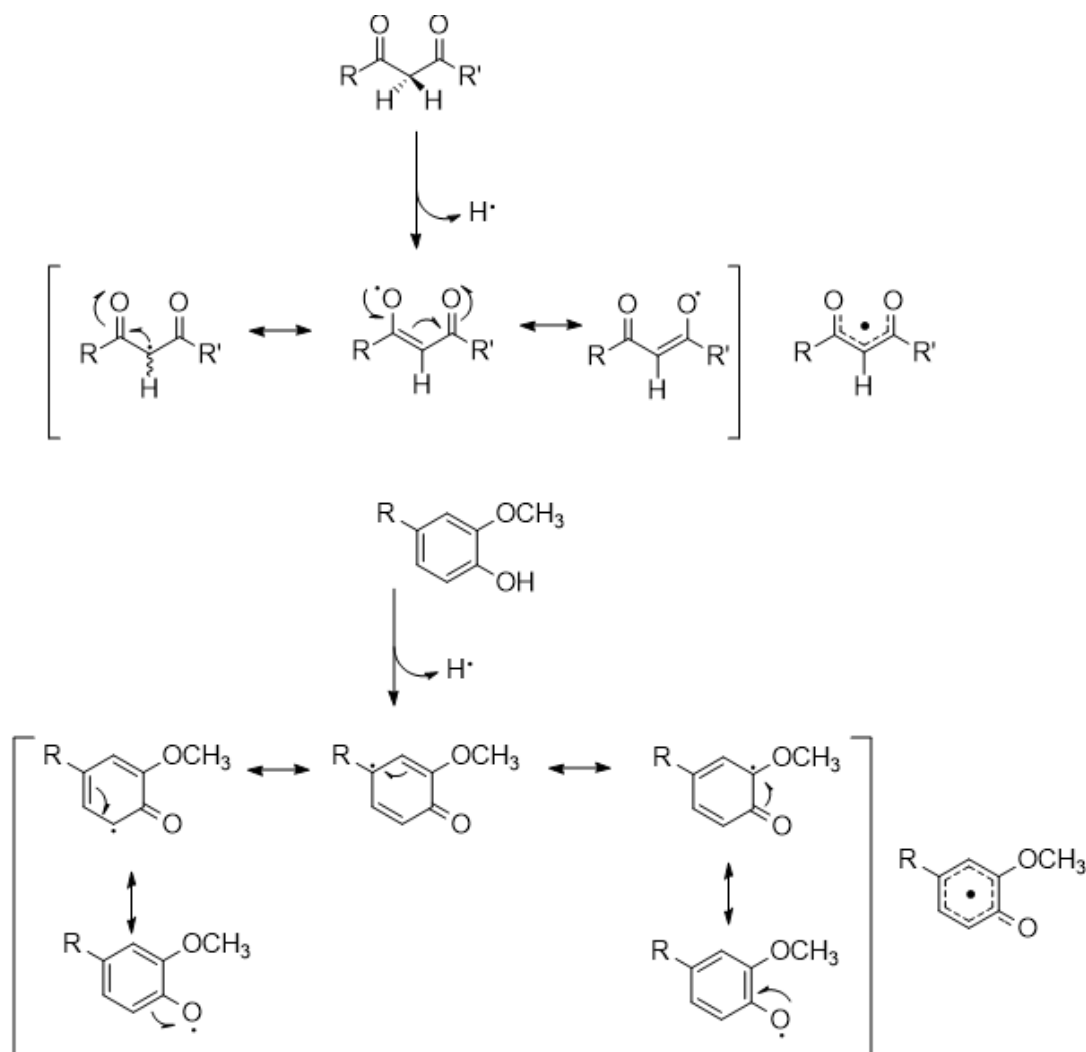


Figura 30. Estabilização do radical formado no metileno e no anel aromático, após doação de hidrogênio radicalar.

O trabalho de Jovanovic (JOVANOVIĆ *et al*, 1999) hierarquiza as duas propostas apresentadas (Figura 29), colocando a subunidade metilênica como sendo parte do mecanismo preferencial para a doação de hidrogênio. O ambiente químico desta subunidade faz com que a ligação C-H seja bastante enfraquecida, devido à presença de duas carbonilas vizinhas. Apesar do equilíbrio ceto-enólico da curcumina (**3**) estar normalmente deslocado para a forma enólica, a forma dicetônica pode estar presente em quantidade relevante em locais com pH ácido, como é o caso de tecidos com processos inflamatórios ou de algumas organelas celulares. Desta forma, há uma maior população de moléculas na forma dicetônica, o que pode justificar o mecanismo proposto para a atividade antioxidante da curcumina (**3**). Esse estudo ajudou a confirmar a hipótese de Sugiyama e colaboradores (SUGIYAMA *et al*, 1996), que sugeriu a participação da subunidade 1,3-dicetônica no processo antioxidante, além da previsível atividade relacionada às hidroxilas fenólicas (Figura 31). Nesse trabalho, o autor sintetizou um derivado reduzido e metilado (dimetóxi-tetraidrocurcumina, **26**), no qual tanto a

conjugação quanto as hidroxilas fenólicas foram suprimidas. Este derivado apresentou atividade antioxidante comparável àquela exibida pela curcumina (**3**).

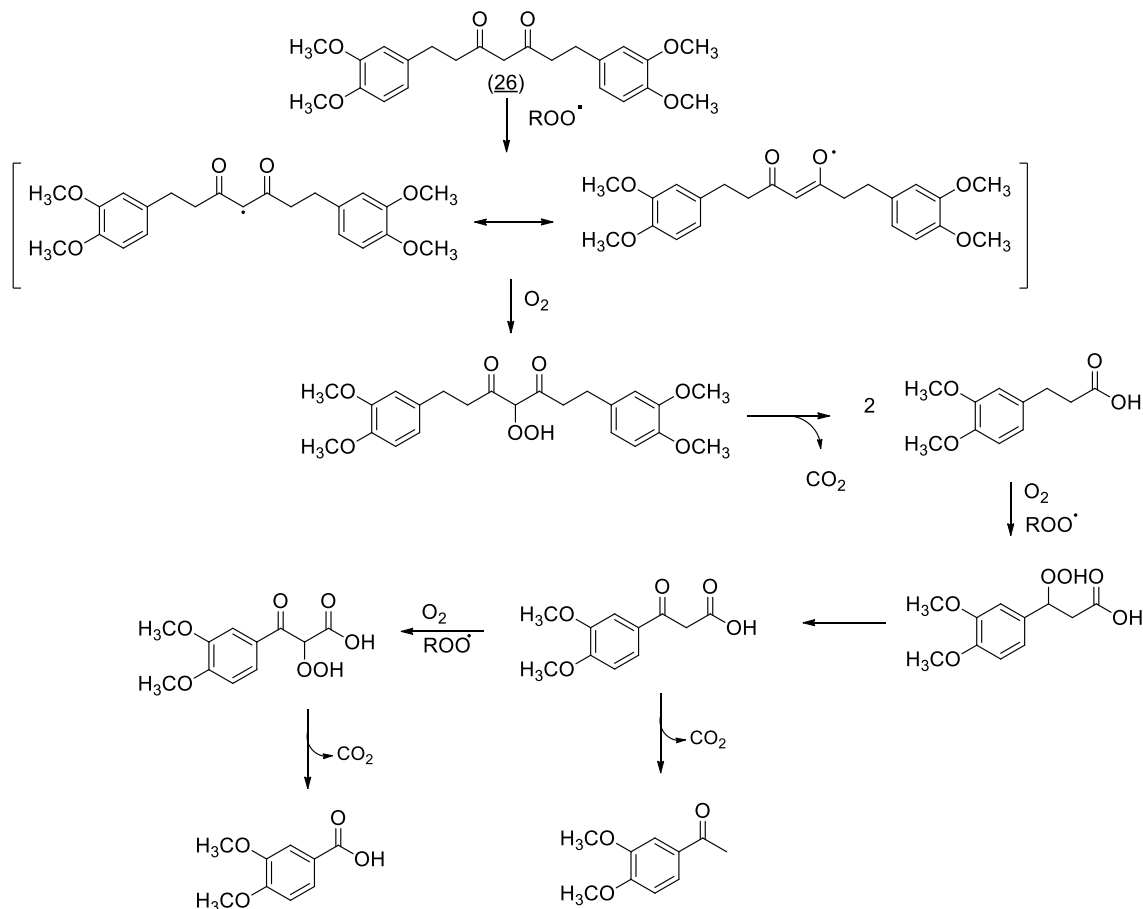


Figura 31. Mecanismo antioxidante de **(26)**, proposto por Sugiyama e colaboradores (SUGIYAMA *et al*, 2011).

Subsequentemente, em estudos teóricos realizados sobre as diferentes propostas mecanísticas para a atividade antioxidante da curcumina (**3**), os grupos de Ross (ROSS *et al*, 2000) e Sun (SUN *et al*, 2002) mostraram que a energia associada à abstração do hidrogênio do metileno é bem mais alta do que aquela referente ao grupamento Ar-OH. Os autores realizaram a síntese de derivados onde houve a supressão do metileno *alfa* e redução das insaturações, e em ambos os casos houve manutenção da atividade antioxidante. A análise conjunta destes trabalhos permite inferir que a atividade antioxidante da curcumina (**3**) decorre, provavelmente, do efeito conjunto dos grupos que compõem a sua estrutura.

CAPÍTULO II
Planejamento, síntese e avaliação
biológica de análogos estruturais da
curcumina.

Apesar de a doença de Chagas ser ainda considerada uma doença extremamente negligenciada, devido à reduzida quantidade de alternativas ao seu tratamento, nos últimos 10 anos houve um aumento no número de grupos de pesquisa com objetivo de desenvolver novas substâncias capazes de auxiliar no seu tratamento (CHATELAIN, 2015). Entretanto, nenhum fármaco comercialmente disponível logra sucesso no tratamento da fase crônica da doença de Chagas, o que faz com que seja necessário se pensar numa inovação no seu tratamento. A despeito da alta atividade tripanocida observada para a curcumina (**3**), seu comportamento *in vivo* encontra diversas barreiras de natureza farmacocinética, tanto pela sua baixa hidrossolubilidade, quanto pelo seu extenso metabolismo de primeira passagem hepático, cujos principais metabólitos estão representados na Figura 32 (ANAND *et al*, 2007).

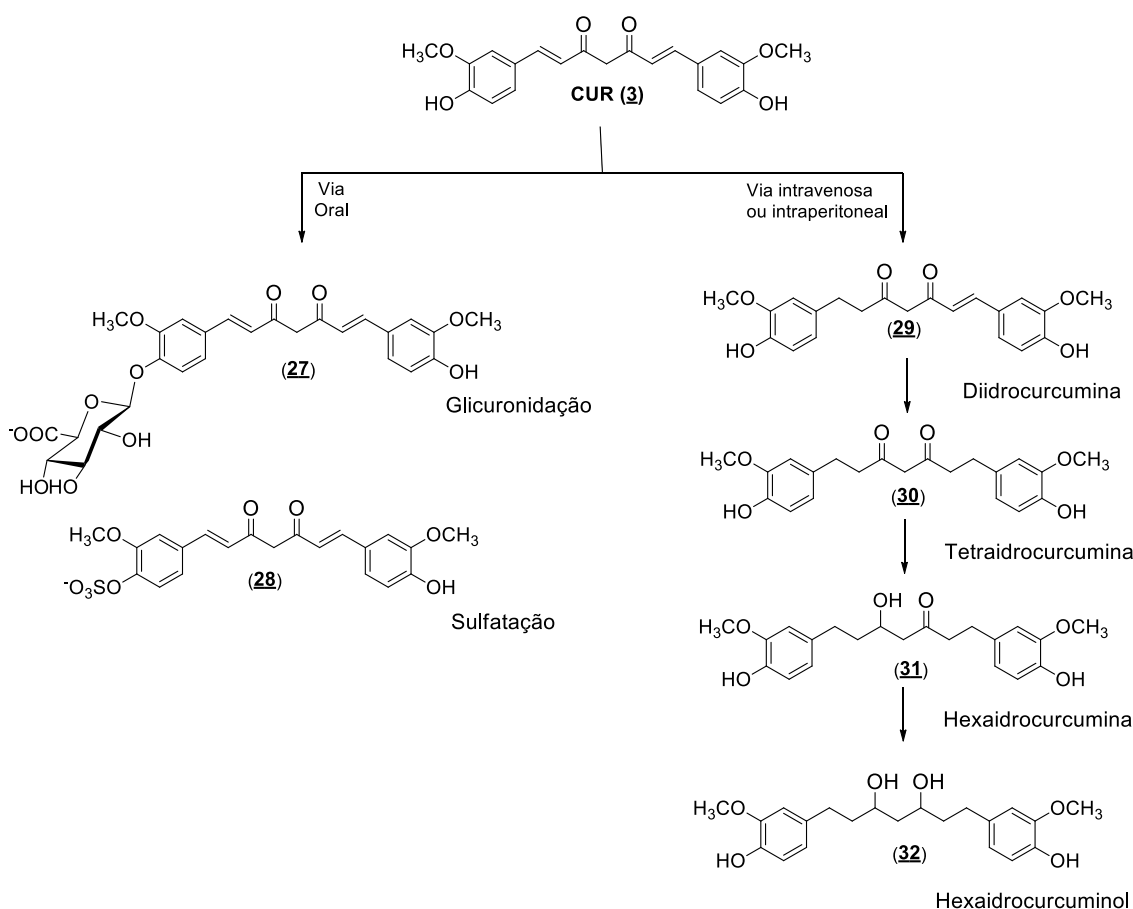


Figura 32. Representação dos principais metabólitos da curcumina (**3**), formados em duas diferentes vias de administração (adaptado de ANAND *et al*, 2007).

Planejamento dos análogos estruturais da curcumina

A análise dos resultados anteriores demonstra claramente a importância do esqueleto diarileptanoide $C_6-C_7-C_6$, já que a CC (**8**) não apresentou atividade nos modelos avaliados. Foram então propostos análogos estruturais da curcumina (**3**), explorando modificações em três regiões específicas da sua estrutura. A Figura 33 mostra o esboço do planejamento inicial de três séries de derivados, a fim de investigar com maiores detalhes a REA da curcumina no modelo de toxicidade frente a formas epimastigotas de *T. cruzi*.

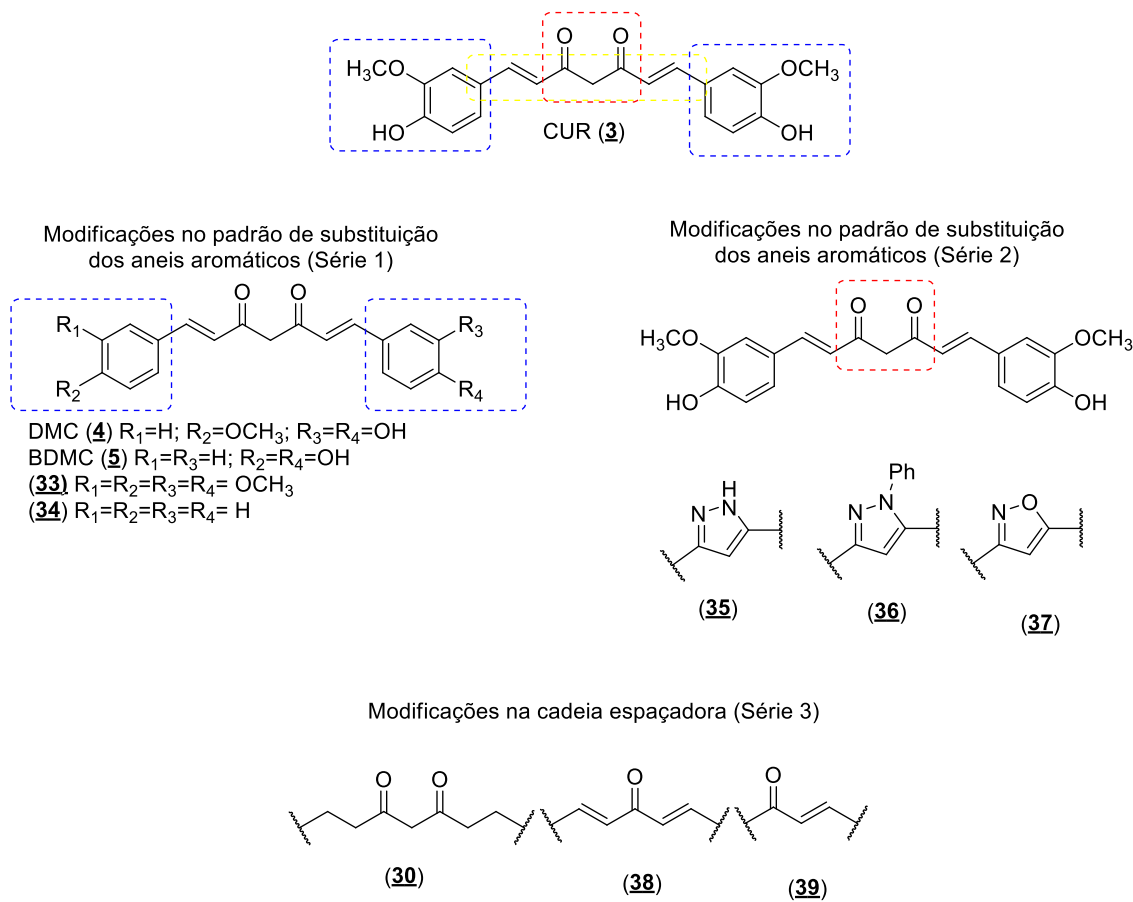


Figura 33: Modificações estruturais inicialmente planejadas em 3 subunidades da curcumina (**3**).

Na série 1 (Figura 33), que explora modificações no padrão de substituição dos anéis aromáticos, encontram-se os curcuminoides naturais DMC (**4**) e BDMC (**5**), além dos curcuminoides sintéticos (**33** e **34**). Esses derivados foram sintetizados visando investigar a importância da hidroxila fenólica e da metoxila na modulação da atividade tripanocida da curcumina (**3**). Para a síntese de (**33**) foi utilizada uma reação de metilação (Figura 34) com iodeto de metila em presença de K_2CO_3 em acetona, condição que favorece reações de substituição nucleofílica do tipo S_N2 (CHANGTAM *et al*, 2010). A presença do carbonato de potássio promove a ionização das hidroxilas fenólicas, tornando-as mais nucleofílicas e, portanto, mais propensas a reagir com o eletrófilo (iodeto de metila). Uma vez ionizado, o fenolato substitui o átomo de iodo ligado à metila através de uma S_N2 (favorecida tanto pela estrutura do eletrófilo, devido ao carbono metílico, quanto pelo solvente, polar aprótico) que vai gerar o produto em uma única etapa. Este método foi escolhido em detrimento do método de Pabon, devido à maior facilidade operacional, maior rendimento e melhor balanço de massas devido à não utilização dos reagentes de boro.

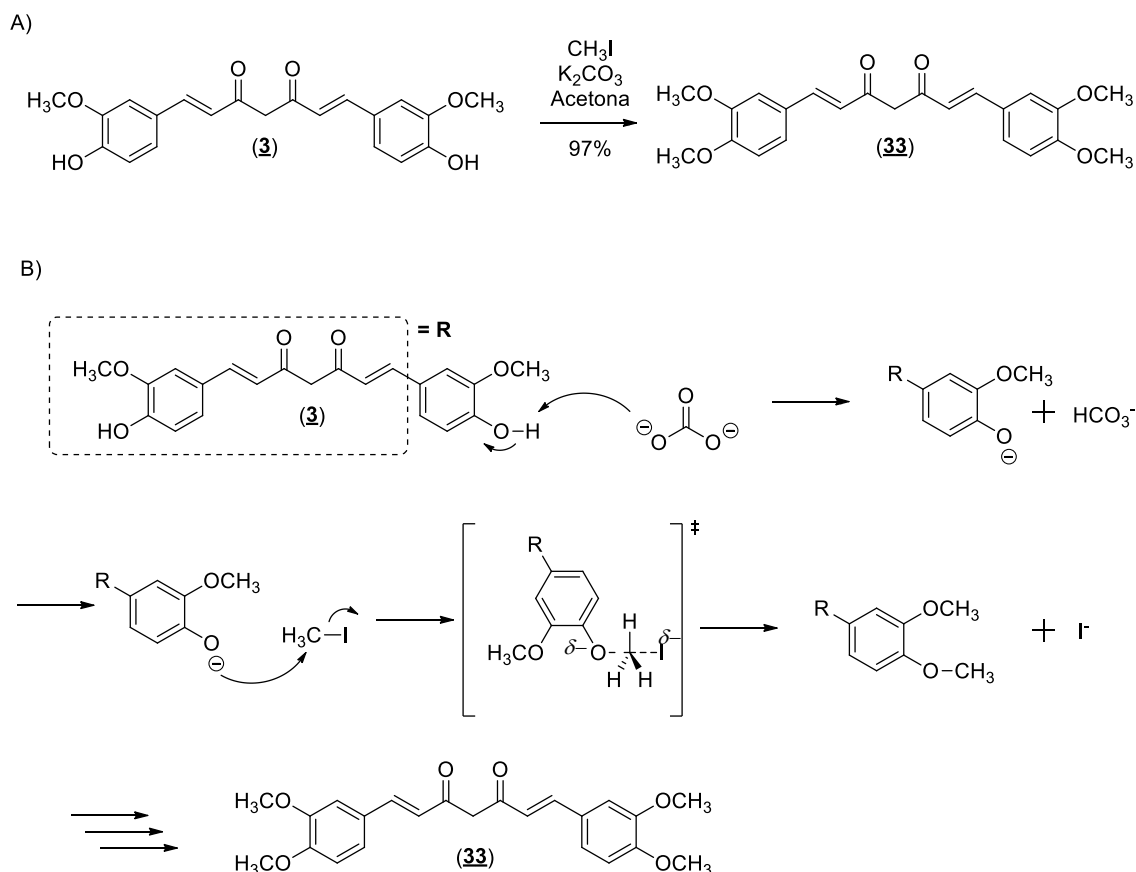
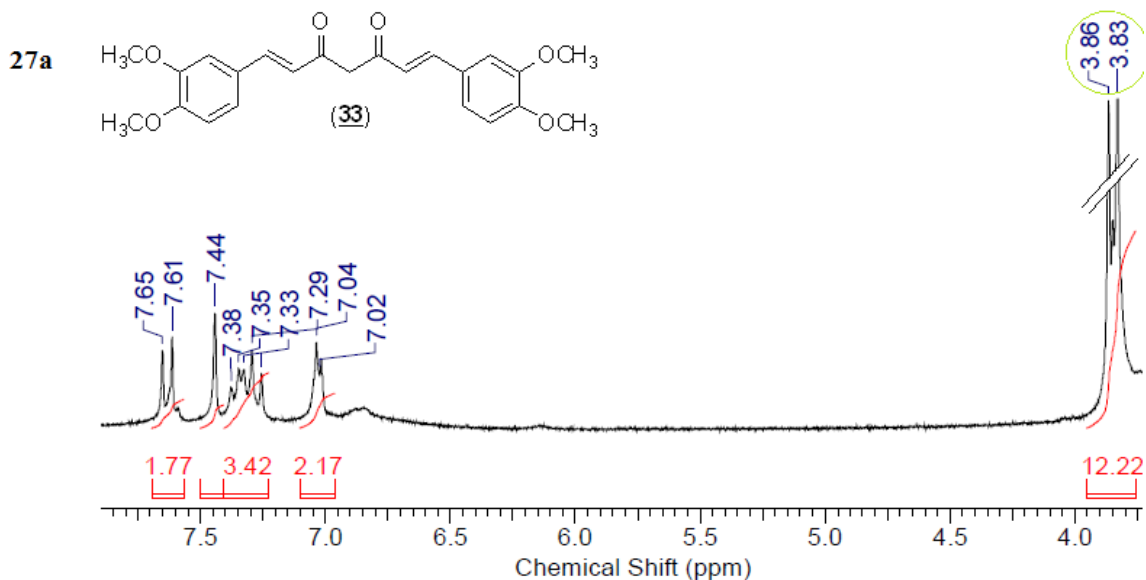


Figura 34: a) Esquema reacional para a preparação de **(33)**. b) Proposta de mecanismo para a reação de metilação através de uma Substituição Nucleofílica Bimolecular.

O derivado **(33)** já havia sido previamente preparado por Araújo e colaboradores e testado, em conjunto com a curcumina **(3)**, frente a formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Neste ensaio, **(33)** apresentou-se mais potente que **(3)**, com valores de $CI_{50} < 10 \mu M$ e $37,5 \mu M$ respectivamente. A administração de **(33)** em camundongos Balb/c (20 mg/kg) infectados também revelou uma redução de 65% do tamanho das lesões medidas 75 dias após a infecção. Adicionalmente, observou-se ausência de resposta inflamatória, provavelmente devido às propriedades anti-inflamatórias características de estruturas análogas a **(3)** (ARAÚJO *et al.*, 1999).

A estrutura de **(33)** foi confirmada pelo aparecimento de dois simpletos em δ 3,83 e 3,86 ppm, correspondentes às duas metilas nas posições 3 e 4 do anel aromático (Figura 35a), além dos sinais positivos, correspondentes a $-CH_3$ em δ 56,22 e 56,07 ppm no espectro de DEPTQ (Figura 35b)



27b

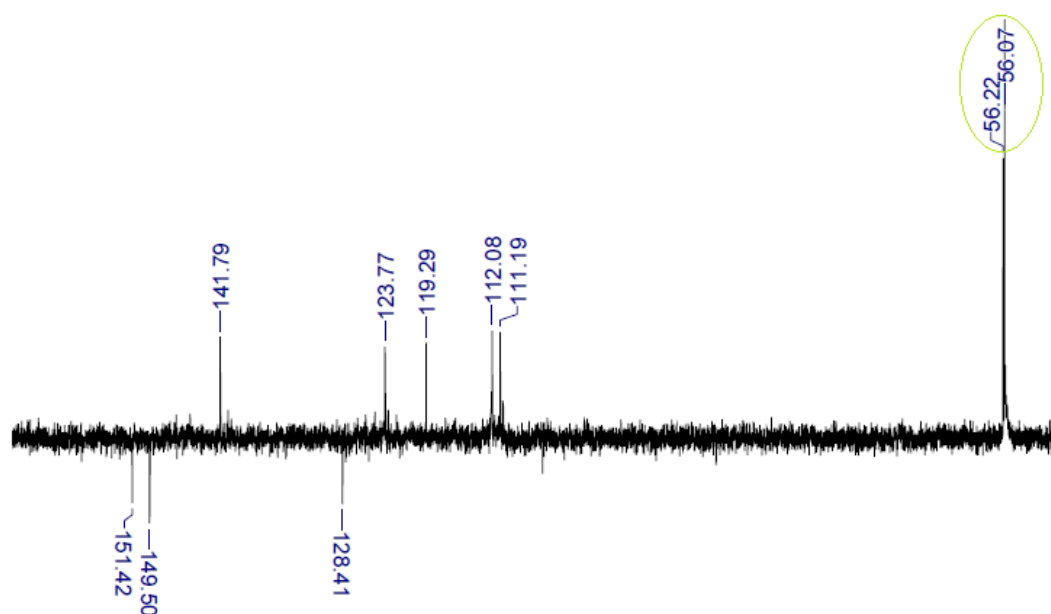


Figura 35: Espectros de RMN ^1H (a) e DEPTQ (b) do derivado **(33)** a 500 MHz em DMSO- d_6 , com os sinais referentes às metoxilas assinalados em verde.

A síntese de **(34)** ocorreu através do método de Pabon, semelhante àquele utilizado na síntese da curcumina **(3)** (PABON, 1964), através da reação da acetilacetona com o benzaldeído (Figura 36). Desta maneira, podemos dispor de um diarileptanoide sem substituintes oxigenados nas subunidades arila, que nos permitirá inferir sobre a importância da substituição no anel para a atividade tripanocida desta classe de compostos.

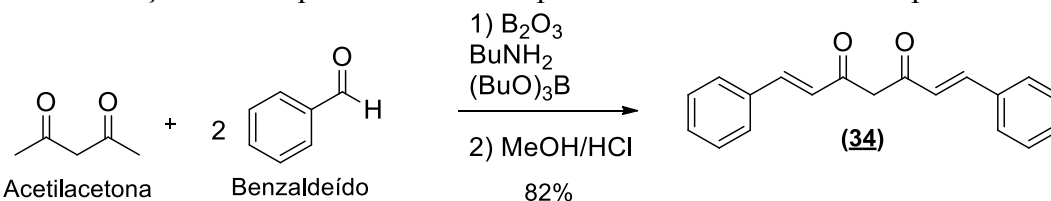


Figura 36: Esquema reacional para a preparação de **(34)** a partir de benzaldeído e acetilacetona.

O derivado (**34**) formado, isolado como um sólido alaranjado, apresentou em seu espectro de RMN ^1H (Figura 37a) sinais referentes aos hidrogênios aromáticos, característicos de um anel monossustituído, com um multipletto em δ 7,48 ppm, correspondente aos hidrogênios H7 e H8, e um duplo dupletto em δ 7,76 ppm de integral 4 correspondente ao hidrogênio H6. A formação das ligações duplas é confirmada pela presença de dois dupletos, com integração para 2 hidrogênios, correspondentes a H3 e H4 (δ 6,99 ppm e δ 7,69 ppm, respectivamente), e a geometria *E* é observada pela constante de acoplamento desses dupletos ($J = 20$ Hz). O hidrogênio H1 aparece como um simpleto de integral 1 em δ 6,24 ppm, o que mostra que, assim como a curcumina (**3**), o derivado (**34**) também está majoritariamente sob a forma de enol. Esta hipótese é confirmada no espectro de DEPTQ (Figura 37b), onde o sinal correspondente ao carbono α às carbonilas (em δ 102,30 ppm) aparece com sinal positivo (acima da linha de base), correspondente a um metino e não a um metileno.

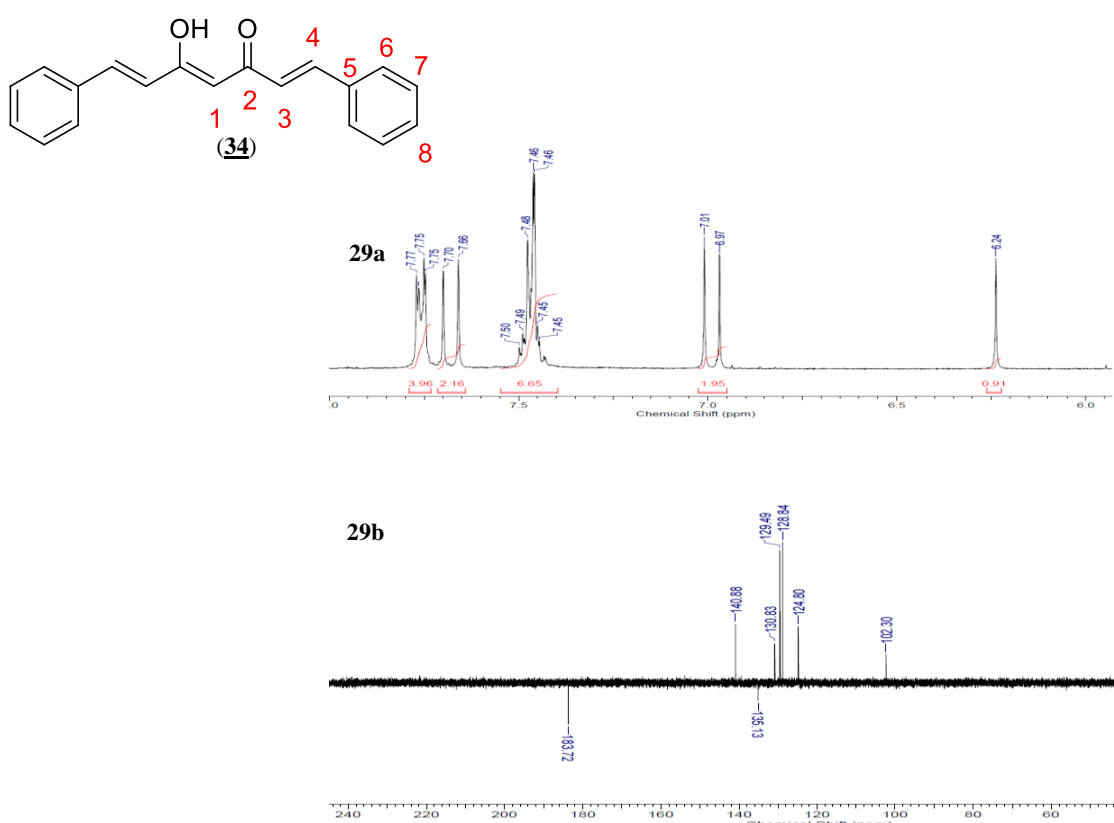


Figura 37: Espectros de RMN ^1H (29a) e DEPTQ (29b) do derivado (**34**) a 500MHz em $\text{DMSO-}d_6$.

Os derivados heterocíclicos da Série 2 (Figura 33), (**35**), (**36**) e (**37**), foram planejados a fim de explorar uma potencial relação bioisostérica não-clássica entre a subunidade 1,3-dicetônica e diferentes heterociclos nitrogenados (LIMA & BARREIRO, 2005). A troca isostérica, nesse caso, pode gerar vantagens do ponto de vista farmacocinético, pois a presença de um átomo de nitrogênio pode levar a um derivado mais solúvel, além de permitir a supressão do metileno α às carbonilas, que é um dos fatores estruturais responsáveis pelo extenso metabolismo de primeira passagem sofrido pela curcumina (Figura 38).

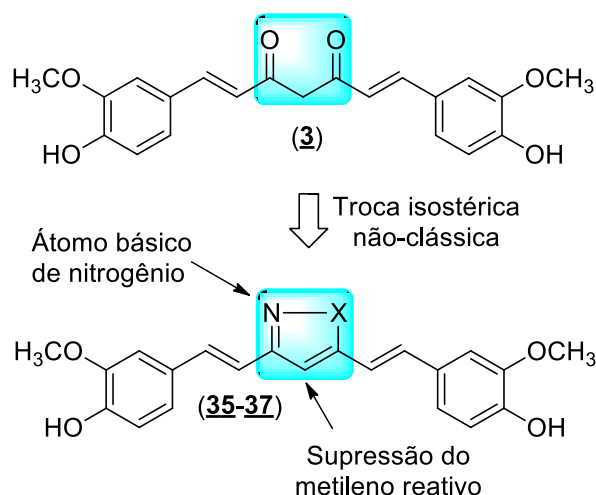


Figura 38: Planejamento da série 2 envolvendo a troca isostérica não-clássica entre a subunidade 1,3-dicetona e heterociclos nitrogenados análogos ao pirazol.

O derivado isoxazólico (**37**) foi utilizado por Lampe para auxiliar na elucidação estrutural de seu produto de síntese, a própria curcumina (**3**), por derivatização, pela reação da curcumina (**3**) com cloridrato de hidroxilamina em meio acético (LAMPE *et al*, 1910). A facilidade de preparação desses derivados heterocíclicos, a partir da reação da curcumina (**3**) com hidrazinas funcionalizadas ou com a hidroxilamina, gerou uma série de trabalhos publicados com essas moléculas. Essa relação bioisostérica foi observada primeiramente por Shim e colaboradores em 2002 (SHIM *et al*, 2002), que descreveu a preparação de pirazóis a partir de curcuminoides naturais, através da reação clássica de Knorr entre compostos 1,3-dicarbonílicos e hidrazinas (KNORR, 1884). No escopo da quimioterapia de doenças negligenciadas, Mishra e colaboradores publicaram um estudo envolvendo a avaliação de derivados heterocíclicos da curcumina, como isoxazol e pirazóis funcionalizados (**35-37**, Figura 39, Tabela 5) contra *Plasmodium falciparum*. No modelo utilizado pelo grupo, a substituição da subunidade 1,3-dicetônica por um pirazol (**35**) aumentou a potência da substância, evidenciando a possibilidade de se otimizar as propriedades biológicas da curcumina (**3**), através da utilização de ferramentas da Química Medicinal como, por exemplo, o bioisosterismo.

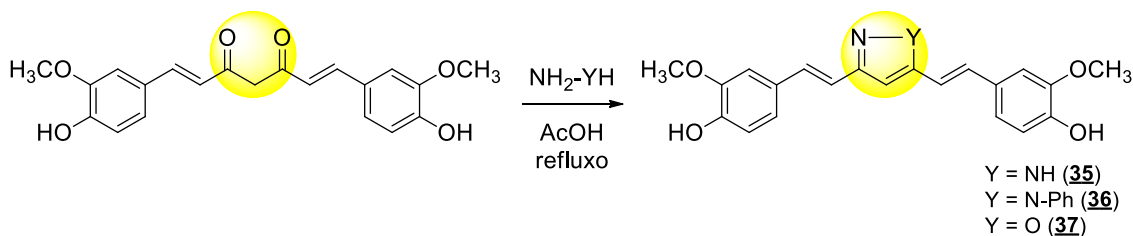


Figura 39. Síntese dos isósteros heterocíclicos realizada por Mishra e colaboradores (MISHRA *et al*, 2005).

Tabela 5. CI_{50} e Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos derivados **35-37** frente a *Plasmodium falciparum*. Valores para a curcumina (**3**): CI_{50} 3,25 μ M, CMI 13,2 μ M (MISHRA *et al*, 2005)

Derivado	Y	<i>P. falciparum</i> CI_{50} (μ M)	<i>P. falciparum</i> CMI (μ M)
35	N	0,48	3,9
36	N-Ph	8,48	22,4
37	O	8,44	27,3

Foram então sintetizados, de forma análoga ao descrito no trabalho de Mishra, os derivados (**35-37**) para composição da Série 2 do planejamento inicial. Curcumina (**3**) pura foi solubilizada em ácido acético glacial e foi então adicionado um equivalente de hidrato de hidrazina, *N*-fenil-hidrazina ou cloridrato de hidroxilamina para a síntese de (**35**), (**36**) e (**37**), respectivamente. Os sistemas foram aquecidos ao refluxo sob agitação até precipitação de sólidos amarelos, que foram filtrados e purificados por cromatografia em coluna de sílica, utilizando gradiente de metanol em diclorometano como eluentes. Após purificação, os produtos foram obtidos em rendimentos que variaram na faixa de 66-84%.

O mecanismo desta reação, representado na Figura 40, ocorre pela adição nucleofílica do nitrogênio das hidrazinas funcionalizadas à carbonila (etapa lenta), gerando uma imina intermediária que foi prontamente ciclizada para formar um anel de 5 membros, através de uma segunda adição nucleofílica do nitrogênio (ou do oxigênio no caso de **37**) à carbonila vizinha. Foram formados, respectivamente, os núcleos pirazol (**35**), *N*-fenil-pirazol (**36**) e isoxazol (**37**).

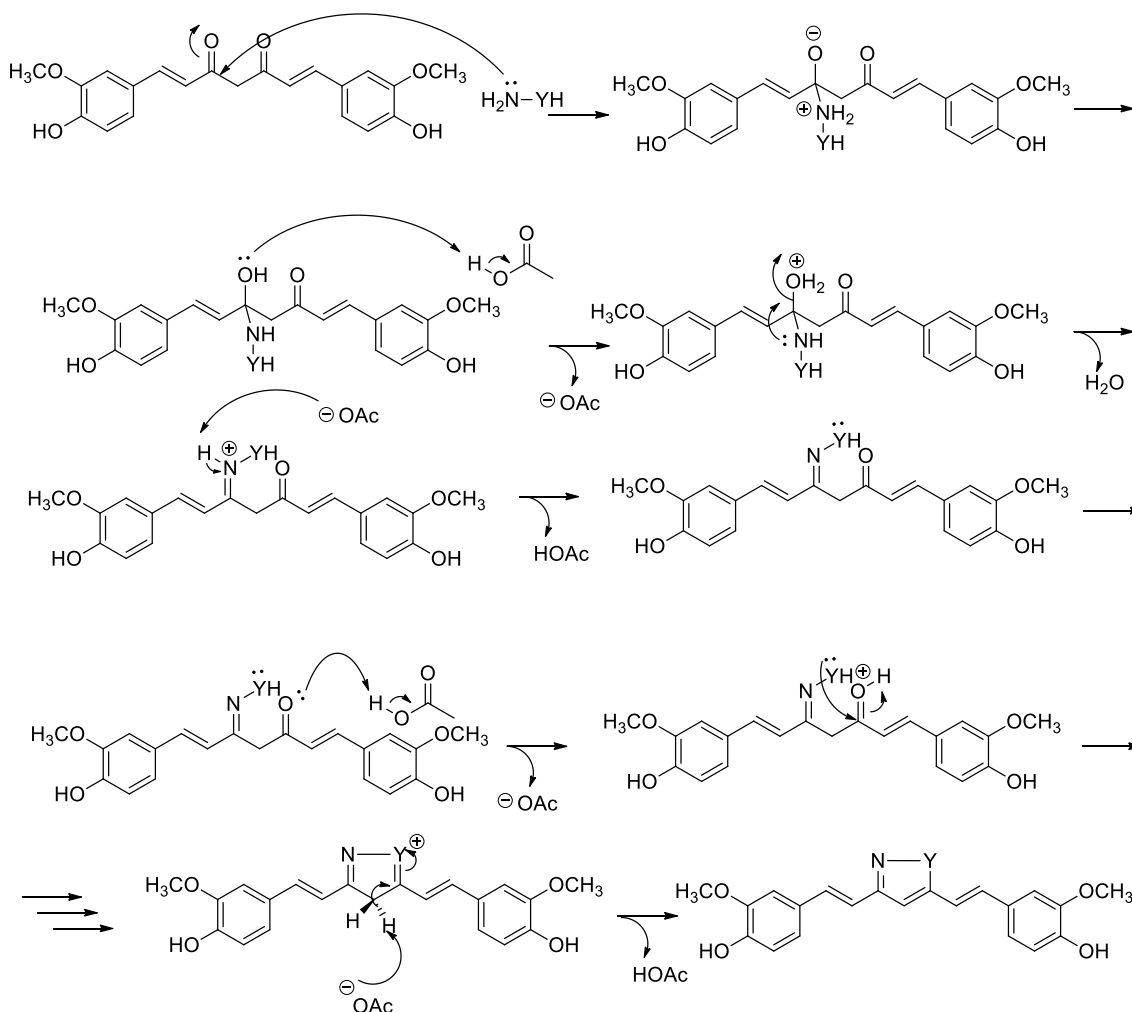


Figura 40: Proposta de mecanismo para a formação dos derivados heterocíclicos (**35-37**) através da reação entre a curcumina (**3**) e hidrazinas funcionalizadas.

No pirazol (**35**) os espectros de RMN ^1H e DEPTQ mostraram simetria nos sinais, o que pode ser explicado pelo fato de os dois possíveis regioisômeros do pirazol formados serem, em verdade, tautômeros. Em contrapartida, o *N*-fenil-pirazol (**36**) apresenta maior número de sinais devido à presença da fenila, que altera o ambiente químico em cada um dos anéis aromáticos (Figura 41). Nesse caso, devido à presença do substituinte fenila, não há possibilidade de equilíbrio tautomérico, tal qual no derivado isoxazólico (**37**). Contudo, o átomo de oxigênio causa alteração menos significativa no ambiente químico da vizinhança dos hidrogênios, fazendo com que os sinais do espectro de RMN ^1H de (**37**) sejam menos deslocados do que aqueles de (**36**) quando comparados a (**35**).

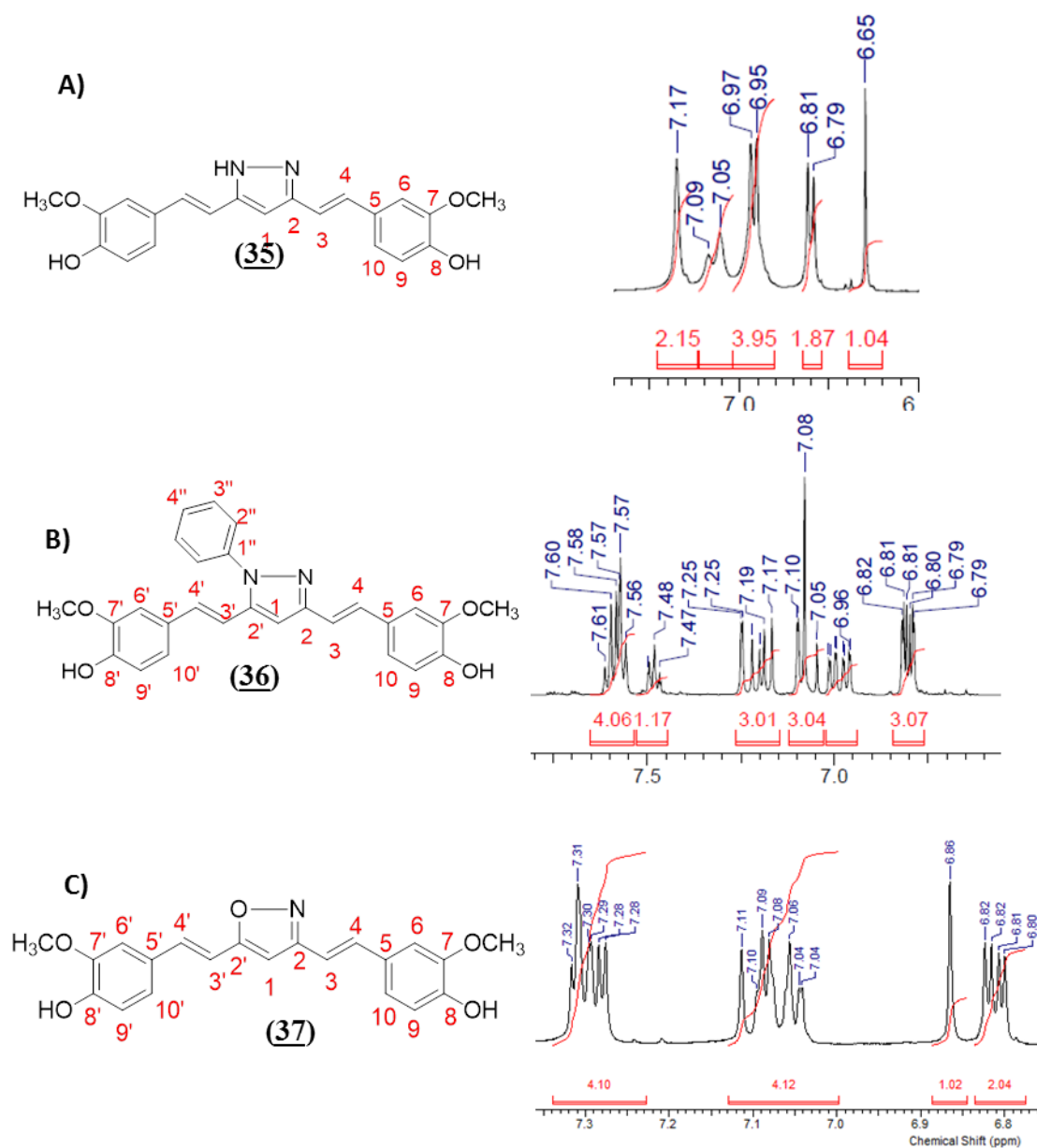


Figura 41: Expansões das regiões correspondentes aos hidrogênios aromáticos do pirazol (**35**), do *N*-fenilpirazol (**36**) e isoxazol (**37**) (A, B e C, respectivamente). As atribuições dos sinais de forma completa encontra-se em anexo, no caderno de espectros, páginas 208-219.

As modificações na cadeia espaçadora entre as subunidades arila (Série 3, Figura 33) foram realizadas para investigar a influência da extensão da conjugação desse sistema bem como da distância entre os anéis aromáticos. O derivado (**30**), a tetraidrocurcumina, é um dos possíveis metabólitos *in vivo* da curcumina (**3**), e é produto da redução das ligações duplas, o que impede a conjugação dos sistemas aromáticos. A redução das ligações C=C de (**3**) (Figura 42) foi realizada pela adição de paládio sobre carbono em atmosfera de hidrogênio tendo como solvente o etanol (CHANGTAM *et al*, 2010). Em alguns casos pode haver a formação do β -hidroxiálcool em sistemas 1,3-dicetônicos, devido à redução da ligação C=C do enol presente no equilíbrio ceto-enólico (SPRAGUE & ADKINS, 1934). Neste caso, a hidrogenação foi seletiva para as ligações duplas olefínicas, gerando apenas um produto majoritário. O primeiro sinal de término da reação foi o desaparecimento completo da coloração amarela intensa característica da curcumina (**3**), que foi confirmada por CCD. Após

filtração do paládio e purificação de **(30)** por coluna cromatográfica *flash*, foi isolado um sólido branco com rendimento de 64%.

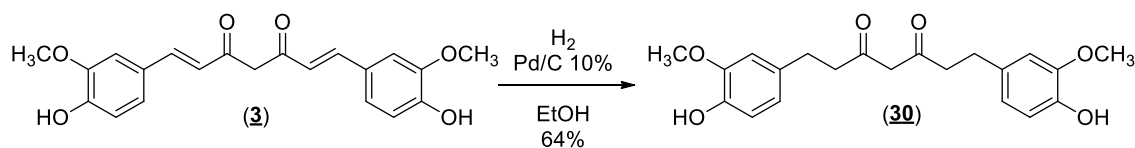


Figura 42: Esquema reacional para a preparação da tetraidrocurcumina (**30**) a partir da curcumina (**3**) utilizando hidrogenação catalítica em paládio sobre carbono.

A preparação do derivado hidrogenado (**30**) foi planejada a fim de verificar a influência da liberdade conformacional sobre suas atividades biológicas. Após hidrogenação, cadeia espaçadora da curcumina (**3**) passa a ter um número maior de ligações passíveis de rotação, o que permite que ela assuma um maior número possível de conformações ao se ancorar no sítio receptor, o que ocorre com menos extensão no sistema conjugado rígido da curcumina.

A elucidação da estrutura do produto de hidrogenação da curcumina (**3**) foi realizada através dos espectros de RMN 1H (Figura 43 A) e DEPTQ (Figura 43 B). No espectro de RMN 1H percebe-se a ausência dos dupletos de integral 2 referentes aos hidrogênios olefínicos da curcumina em δ 6,78 e 7,57 ppm, referentes aos hidrogênios das posições 3 e 4 respectivamente. Em contrapartida, percebe-se o aparecimento de dois tripletos de integral 4 em δ 2,87 e 2,59. A presença dos metilenos na estrutura de (**30**) também é confirmada pelos sinais negativos em δ 40,40 e 31,31 ppm respectivamente, orientados abaixo da linha de base como é característico de grupamentos $-CH_2-$ alifáticos

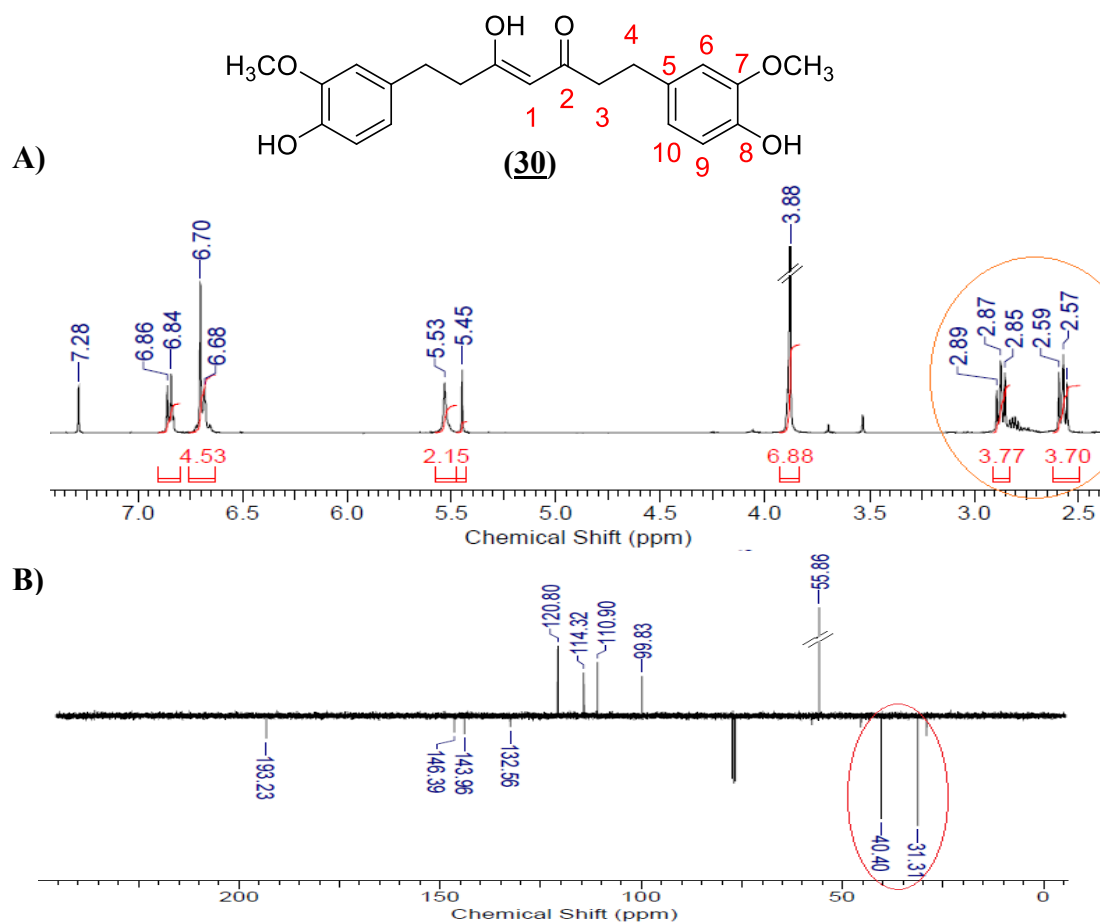
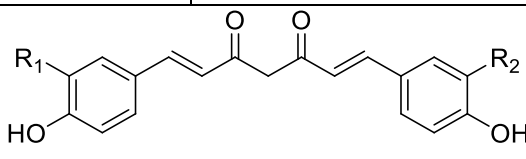
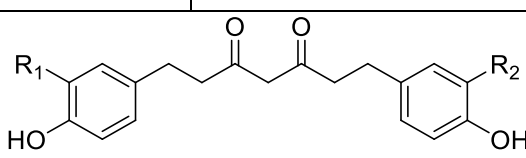


Figura 43: Espectros de RMN ^1H (Figura 35A) e DEPTQ (Figura 35B) do derivado hidrogenado tetraidrocurcumina (**30**) com os sinais relacionados aos metilenos formados em destaque.

Esta abordagem, envolvendo o aumento da liberdade conformacional de (**30**) quando comparado à curcumina (**3**), já foi previamente descrito em alguns modelos, como o de Sugiyama e colaboradores, onde (**30**) apresentou maior atividade antioxidante quando comparado à curcumina (**3**). A hidrogenação das ligações duplas retira a planaridade da molécula da curcumina, o que impede que haja conjugação dos elétrons dos anéis aromáticos com a subunidade 1,3-dicetônica, favorecendo a formação e a estabilização por ressonância de radicais formados pela remoção de um hidrogênio-radical do metileno entre as duas carbonilas (SUGIYAMA *et al*, 2011; JOVANOVIC *et al* 1999). Outro modelo, onde (**30**) mostrou-se bastante potente, foi aquele proposto por Arunkhamkaew e colaboradores (ARUNKHAMKAEW *et al*, 2013), onde a curcumina (**3**) foi utilizada como protótipo para a síntese de derivados com propriedades anticolinesterásicas, potencialmente úteis para o tratamento da doença de Alzheimer. Tanto a curcumina quanto os curcuminoides naturais DMC (**4**) e BDMC (**5**) foram submetidos à hidrogenação catalítica e o conjunto de diarileptanoides foi testado em modelo *in vitro* de inibição da acetilcolinesterase, e os resultados obtidos pelo grupo estão sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados da atividade anticolinesterásica de curcuminoides naturais (**3-5**) e sintéticos (**30, 40-41**) em modelo *in vitro* realizado por Arunkhamkaew e colaboradores (ARUNKHAMKAEW *et al*, 2013)

Composto	Estrutura	CI ₅₀ (μM)
		
Curcumina (3)	R1= R2 = OCH ₃	81,05 ± 2,51
Desmetoxicurcumina (4)	R1=H, R2=OCH ₃	34,74 ± 0,16
Bidesmetoxicurcumina (5)	R1=R2=H	18,27 ± 0,09
		
Tetraidrocurcumina (30)	R1= R2 = OCH ₃	41,16 ± 0,17
Tetraidro-DMC (40)	R1=H, R2=OCH ₃	20,55 ± 0,12
Tetraidro-BDMC (41)	R1=R2=H	7,89 ± 0,03
Galantamina*		1,45 ± 0,04

*Fármaco de referência.

Desta forma, utilizando tetraidrocurcuminoides (**30, 40 e 41**) como compostos β-dicarbonílicos, Arunkhamkaew e colaboradores realizaram uma série de reações de Biginelli com ureia e diversos benzaldeídos funcionalizados, gerando uma coleção de compostos que foram testados quanto à sua capacidade de inibição da acetilcolinesterase (Figura 44), sendo um deles (**42**) mais potente do que o fármaco de referência, a galantamina.

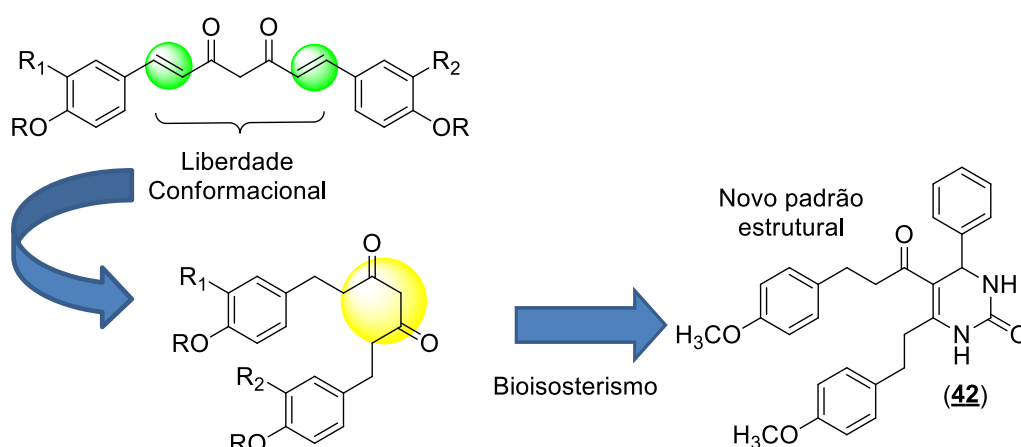


Figura 44: Planejamento estrutural da série de pirimidinonas derivadas da tetraidrocurcumina realizado por Arunkhamkaew e colaboradores (ARUNKHAMKAEW *et al*, 2013).

Os derivados **(38)** e **(39)** foram planejados utilizando a ferramenta de simplificação molecular (Figura 45). O planejamento destes derivados teve como principal motivação a melhoria das propriedades farmacocinéticas do composto-protótipo **(3)**. Sabendo-se que a curcumina **(3)** possui baixa biodisponibilidade devido também ao seu extenso metabolismo, e que este metabolismo está associado, em um primeiro momento, à presença de um metileno reativo em posição α às carbonilas, a supressão desse metileno poderia aumentar a meia-vida plasmática da curcumina **(3)** e, potencialmente, incrementar suas propriedades biológicas. Cabe ressaltar que a otimização das propriedades farmacocinéticas de novos fármacos desde as fases iniciais do planejamento é uma abordagem que tende a diminuir o número de moléculas sintetizadas numa série, que não passam das etapas de testes *in vitro* para *in vivo*, elevando significativamente a probabilidade de se chegar a um novo fármaco com perfil ótimo de atividade (ZHONG, 2013).

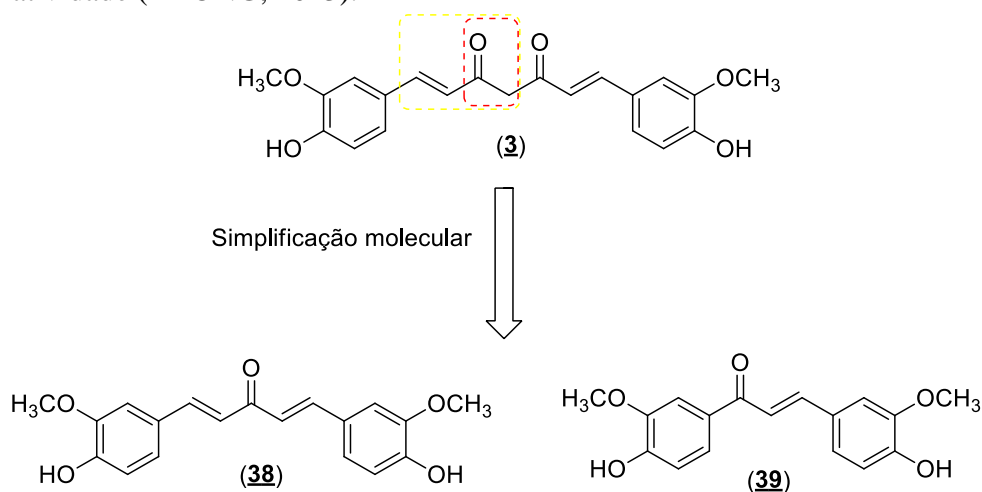
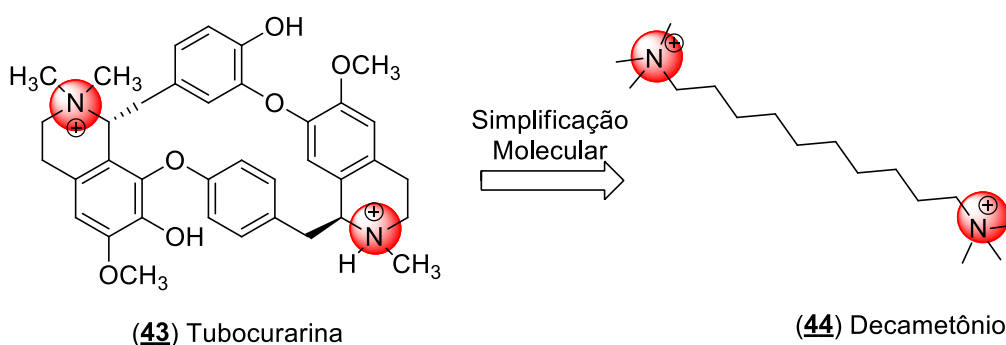


Figura 45: Planejamento dos derivados **(38)** e **(39)** por simplificação molecular a partir da curcumina **(3)**.

A simplificação molecular é uma estratégia essencial na otimização da atividade biológica de produtos naturais, pois além de diminuir o número de sítios lábeis ao metabolismo oxidativo também visa minimizar a quantidade de subunidades estruturais potencialmente toxicofóricas (BARREIRO & FRAGA, 2008), resguardando apenas os motivos estruturais farmacofóricos e, portanto, essenciais para a atividade. Um exemplo clássico da utilização da simplificação molecular envolve o produto natural tubocurarina **(43)** e o brometo de decametônio **(44)**, substâncias utilizadas como relaxantes musculares despolarizantes da placa motora cujas estruturas estão representadas na Figura 46.



Pontos Farmacofóricos

Figura 46: Estruturas do produto natural Tubocurarina **(43)** e do análogo sintético simplificado Decametônio **(44)**.

O derivado (**38**) foi sintetizado pela adição de acetona a dois equivalentes de (**25**), com catálise ácida (Figura 47, entrada A). Essa reação é decorrente da condensação aldólica, que explora a acidez dos hidrogênios em posição α à carbonila. De forma análoga foi sintetizada a chalcona (**39**) a partir da acetofenona correspondente e um equivalente de vanilina (Figura 47, entrada B).

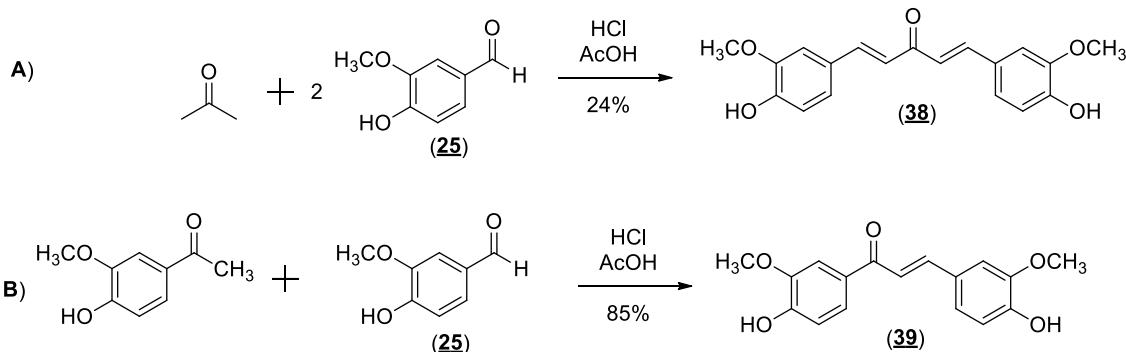


Figura 47: Esquema reacional para a preparação de (**38**) (Figura 47A) e (**39**) (Figura 47B).

A principal diferença operacional entre as duas metodologias foi o rendimento alcançado. Enquanto na reação para a síntese de (**38**) houve um rendimento baixo (cerca de 24%), a síntese da chalcona (**39**) se deu em rendimento mais adequado (85%). Esse problema não pode ser contornado adicionando excesso de acetona, pois caso isso ocorra será formado o derivado monossustituído. A catálise ácida é utilizada em detrimento da clássica catálise básica para esse tipo de condensação porque a hidroxila na posição 4 do anel aromático da vanilina (**25**) ioniza-se em meio básico e a carga formada entra em ressonância com o anel, tornando a carbonila aldeídica muito menos eletrofílica e, conseqüentemente, menos reativa (Figura 48).

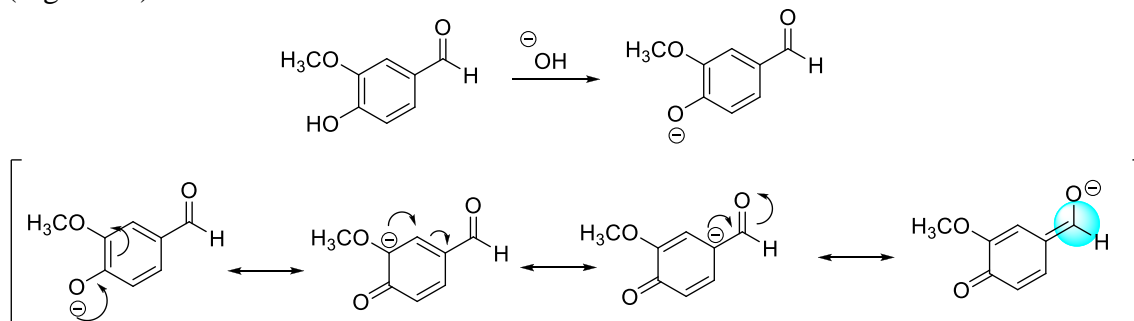


Figura 48: Reação de desprotonação da hidroxila fenólica da vanilina (**25**) e ressonância do fenolato formado, justificando a perda da nucleofilicidade da carbonila e sua falta de reatividade em meio básico.

O espectro de RMN ^1H de (**38**) mostra que este derivado não apresenta o sinal característico do hidrogênio entre a carbonila/enol (simpleto de integral 1 em δ 6,08ppm). Uma característica interessante ao se comparar os espectros de DEPTQ de (**38**) e (**3**) é o deslocamento químico da carbonila; devido ao equilíbrio ceto-enólico que ocorre na curcumina (**3**), a carbonila é representada com um sinal em δ 183,71ppm. A ausência deste equilíbrio, esperada para (**38**), desloca o sinal da carbonila para δ 188,82ppm (Figura 49). A confirmação da estrutura também foi realizada pela aquisição do espectro de massas de alta resolução, onde (**38**) apresentou íon molecular com m/z 326,1154.

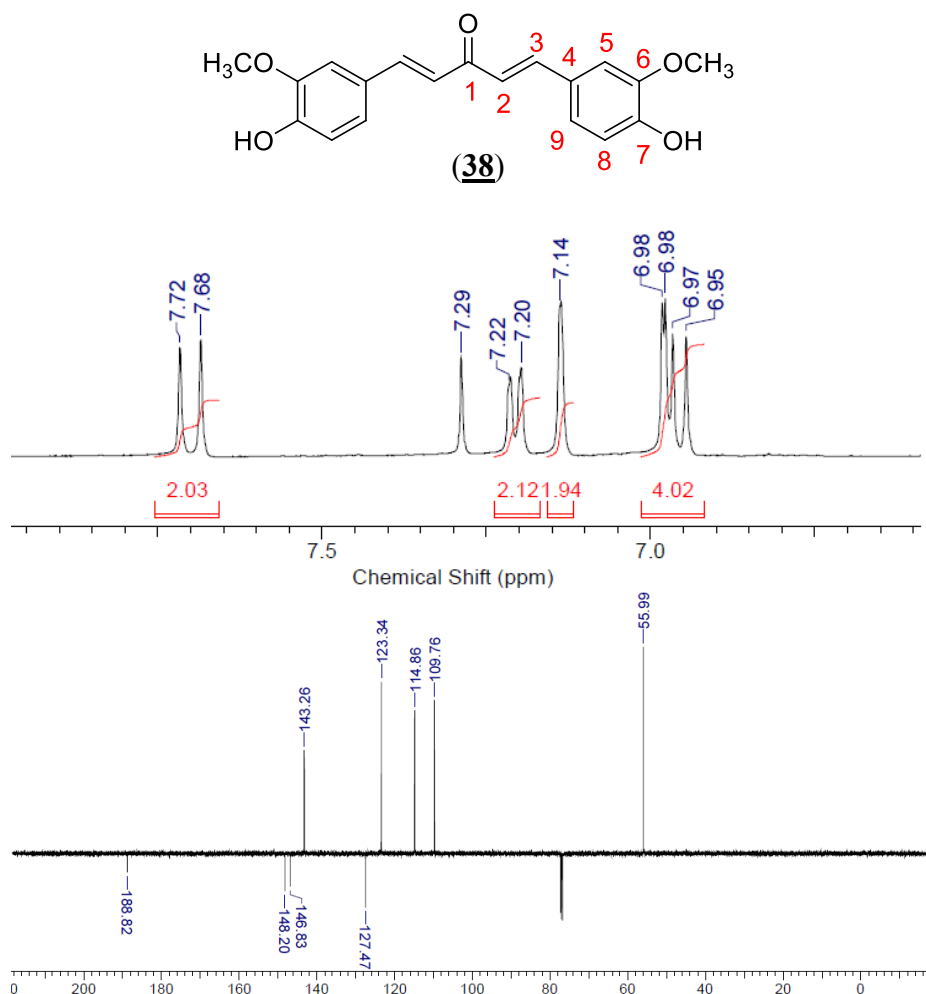


Figura 49: Expansão do espectro de RMN ¹H (A) e o espectro de DEPTQ (B) do derivado (38), realizados a 500 e 125 MHz, respectivamente, em CDCl₃.

A chalcona (39), apesar do menor número de átomos de hidrogênio, apresenta uma maior complexidade de sinais na região entre δ 6,8 a 7,8 ppm, devido ao fato de esta molécula não apresentar um plano de simetria que garanta equivalência magnética entre os hidrogênios. Desta forma, no espectro de RMN ¹H de (39) (Figura 50) pode-se perceber os dupletos de integral 1 e constante de acoplamento 20 Hz referentes aos hidrogênios olefínicos 2 e 3, além dos sinais aromáticos correspondentes a dois anéis não-equivalentes. Devido ao efeito retirador de elétrons da carbonila ligada diretamente ao anel A, os hidrogênios encontram-se mais desblindados e conseqüentemente apresentam maior deslocamento químico quando comparados aos hidrogênios do anel B, conforme mostra a Figura 42. Pode-se observar o hidrogênio H3' em um sinal em δ 7,61 ppm, mais deslocado do que o hidrogênio H5 presente no anel B, cujo deslocamento químico é de δ 7,48 ppm. O mesmo observa-se para os pares de dupletos referentes a H7' e H6' do anel A (δ 7,79 e 7,27 ppm respectivamente) quando comparados a H9 e H8 do anel B (δ 6,92 e 6,82 ppm respectivamente).

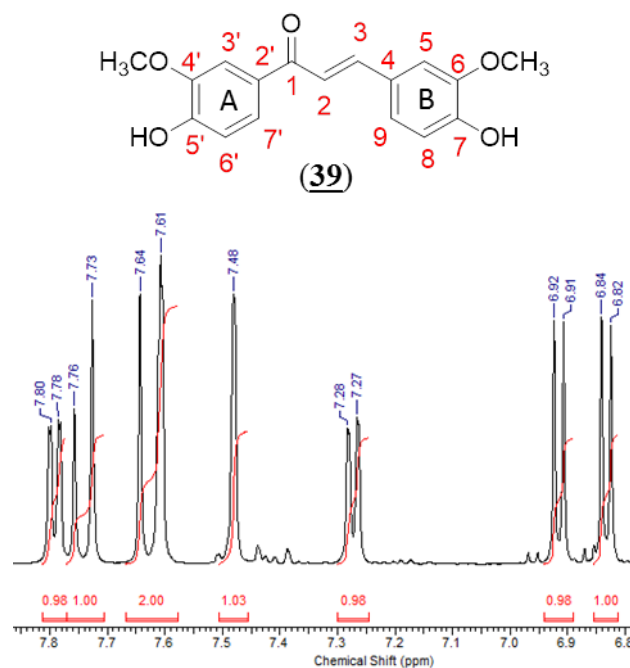


Figura 50: Estrutura de (39) e expansão do espectro de RMN ^1H na região entre δ 6,8 a 7,8 ppm, realizado a 500 MHz em $\text{DMSO-}d_6$.

Avaliação da atividade tripanocida dos análogos sintéticos

O conjunto de derivados sintetizados foi submetido a uma triagem (*screening*) para avaliar a influência das modificações estruturais na modulação da atividade tripanocida da curcumina (3). Nesse experimento, as substâncias então sintetizadas foram testadas na concentração de $50 \mu\text{M}$ e comparadas com os padrões curcumina (3) e benzonidazol (1), como mostra a Figura 51.

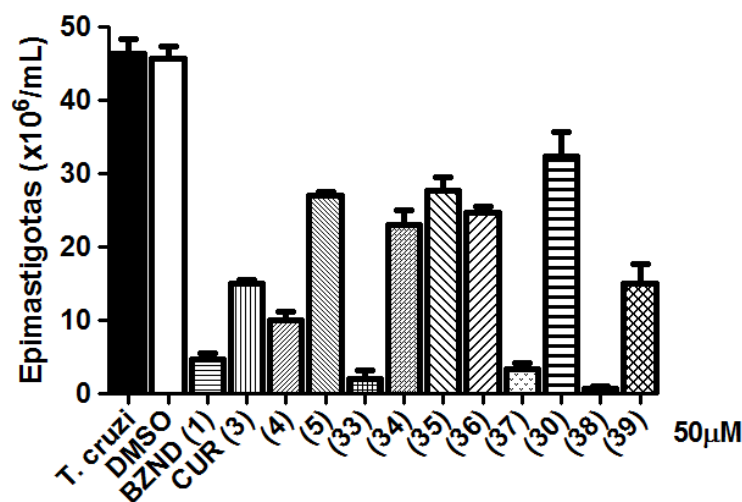


Figura 51: Triagem dos derivados naturais e sintéticos frente a formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c). O parasito foi cultivado por 7 dias em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com hemina, ácido fólico e 10% de soro fetal bovino a 26°C . Algumas culturas foram prontamente tratadas com os controles benzonidazol (1) e curcumina (3), além derivados indicados pelo número da estrutura em triplicatas na concentração de $50 \mu\text{M}$. As formas viáveis foram contadas na câmara de Neubauer no sétimo dia. Resultado representativos de dois experimentos independentes.

Nesse experimento pôde-se observar a relevância de cada subunidade estrutural da curcumina (**3**). Quanto ao padrão de substituição do anel aromático, curiosamente o derivado metilado (**33**) teve uma atividade superior ao protótipo, mostrando que a hidroxila fenólica em *para* não é essencial para a atividade tripanocida. Os derivados pirazólicos (**35**) e (**36**) foram menos ativos quando comparados à curcumina (**3**), mas o derivado isoxazólico (**37**) teve uma atividade bastante superior, o que mostra uma possível relação bioisostérica entre o grupo 1,3-dicetona e o isoxazol nesse modelo. Quanto às alterações na cadeia espaçadora, as ligações duplas se mostraram importantes para a atividade tripanocida, visto a perda da atividade após redução das duplas em (**30**). Contudo, o comprimento da cadeia se mantida a conjugação pode ser explorado; o derivado monocarbonilado (**38**), com cinco carbonos entre os anéis aromáticos, foi o mais ativo de toda a série, e a chalcona (**39**) teve uma atividade comparável à curcumina (**3**) propriamente dita com uma potencial vantagem no fato de provavelmente possuir maior estabilidade metabólica devido à supressão do metileno entre as carbonilas, que é o sítio mais lábil ao metabolismo em sua estrutura. Após a realização desta triagem, a estratégia sintética seguiu de forma racional para a síntese de derivados que possuíssem características comuns àqueles que apresentaram melhor atividade neste modelo, visando a otimização da atividade tripanocida obtida até então.

Planejamento e síntese dos análogos conformacionalmente restritos

O aumento da liberdade conformacional obtido em (**30**) teve efeito deletério na atividade tripanocida da curcumina (**3**). Isso pode ser decorrente do fato de que a curcumina já possui como confômero termodinamicamente mais estável um confômero próximo ao do bioativo; o aumento da liberdade conformacional conseguido pela hidrogenação das duplas gera uma maior população de confômeros diferentes o que minimiza a chance de ancoramento no biorreceptor com a conformação adequada. Desta forma, planejou-se a síntese de derivados conformacionalmente restritos da curcumina (**3**) (Figura 52). Os derivados 1,3-dicarbonílicos (**45**) e (**46**) foram sintetizados através de uma reação de Pabon modificada, usando o micro-ondas (NICHOLS *et al*, 2006) para aumento de rendimento e diminuição no tempo de reação, e os derivados monocarbonilados e (**48**) foram preparados através de uma condensação de Knoevenagel em meio ácido, tal qual o derivado (**38**) (Figura 53).

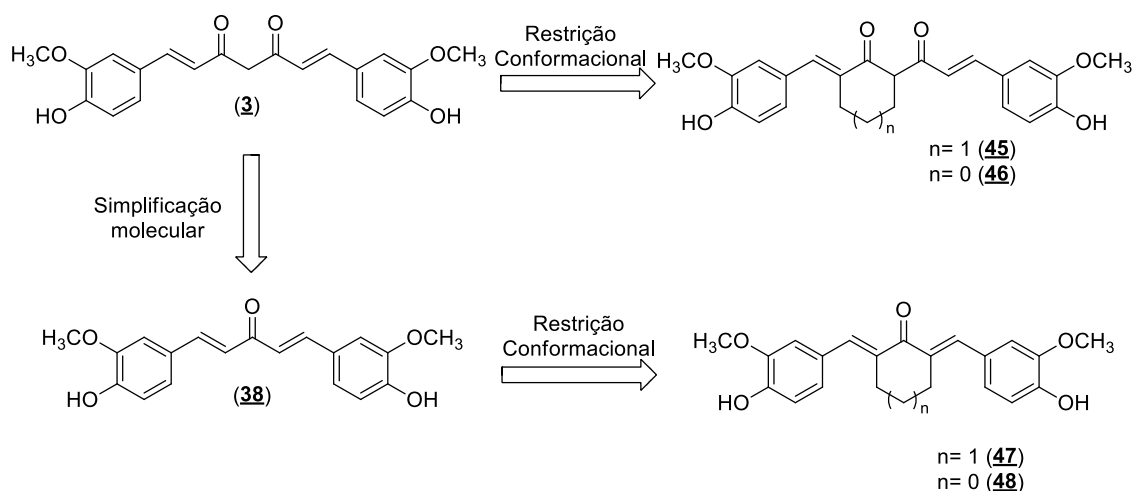


Figura 52: Planejamento dos análogos conformacionalmente restritos de (**3**) e (**38**).

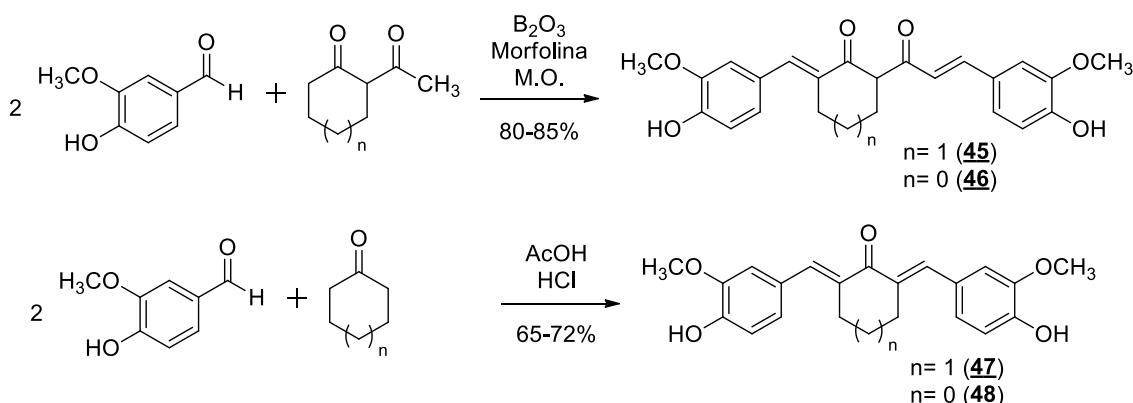


Figura 53: Esquemas reacionais para a preparação dos análogos (**45-48**)

Os quatro derivados conformacionalmente restritos (**45-48**) foram então submetidos a uma nova triagem frente a formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) a fim de verificar a influência da restrição conformacional e da simplificação molecular na atividade tripanocida. Os resultados mostraram uma interessante relação entre o tamanho do anel utilizado para a restrição conformacional e a atividade tripanocida no modelo testado. Os derivados contendo uma subunidade ciclopentanona (**46** e **48**) foram bem menos ativos do que aqueles contendo uma subunidade ciclohexanona (**45** e **47**), como mostrado na Figura 54.

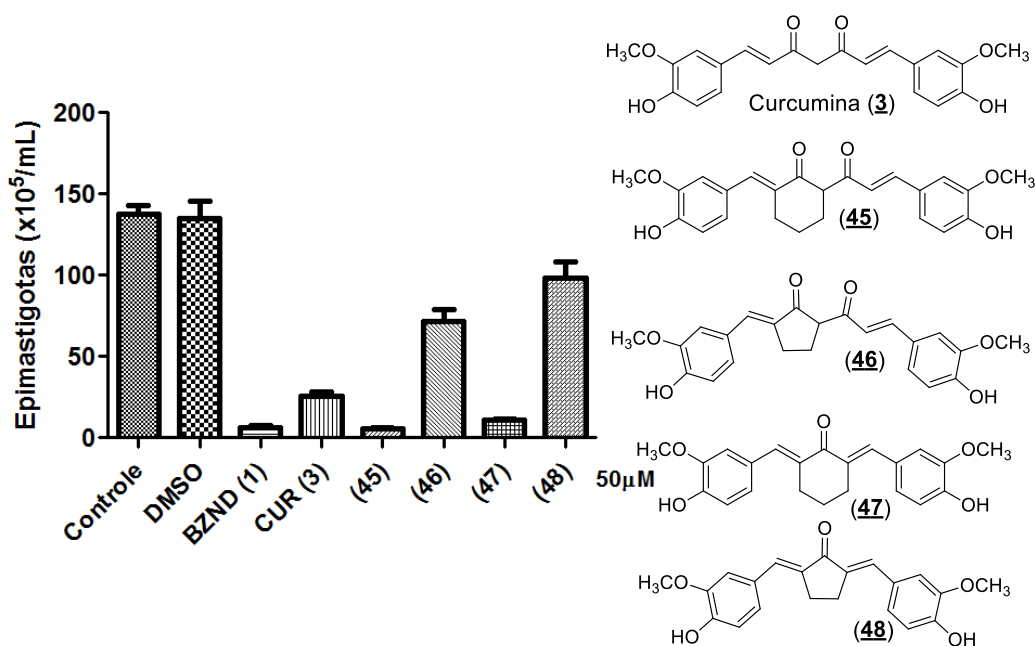


Figura 54: A) Gráfico de triagem dos derivados (**45-48**) sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*. O parasito foi cultivado por 7 dias em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com hemina, ácido fólico e 10% de soro fetal bovino a 26 °C. Algumas culturas foram prontamente tratadas com os controles benzonidazol (**1**) e curcumina (**3**), além derivados indicados pelo número da estrutura em triplicatas na concentração de 50 μ M. As formas viáveis foram contadas na câmara de Neubauer no sétimo dia. Dados representativos de dois experimentos independentes.

Este comportamento pode estar associado a aspectos espaciais nas subunidades arila desses derivados; a sobreposição das estruturas dos derivados (**45-48**) com a curcumina (**3**), após minimização pelo método PM6 no programa Spartan '14 (*Wavefunction Inc*), permitiu que fosse observada a influência da inserção do anel nos derivados diarileptanoides (Figura 55).

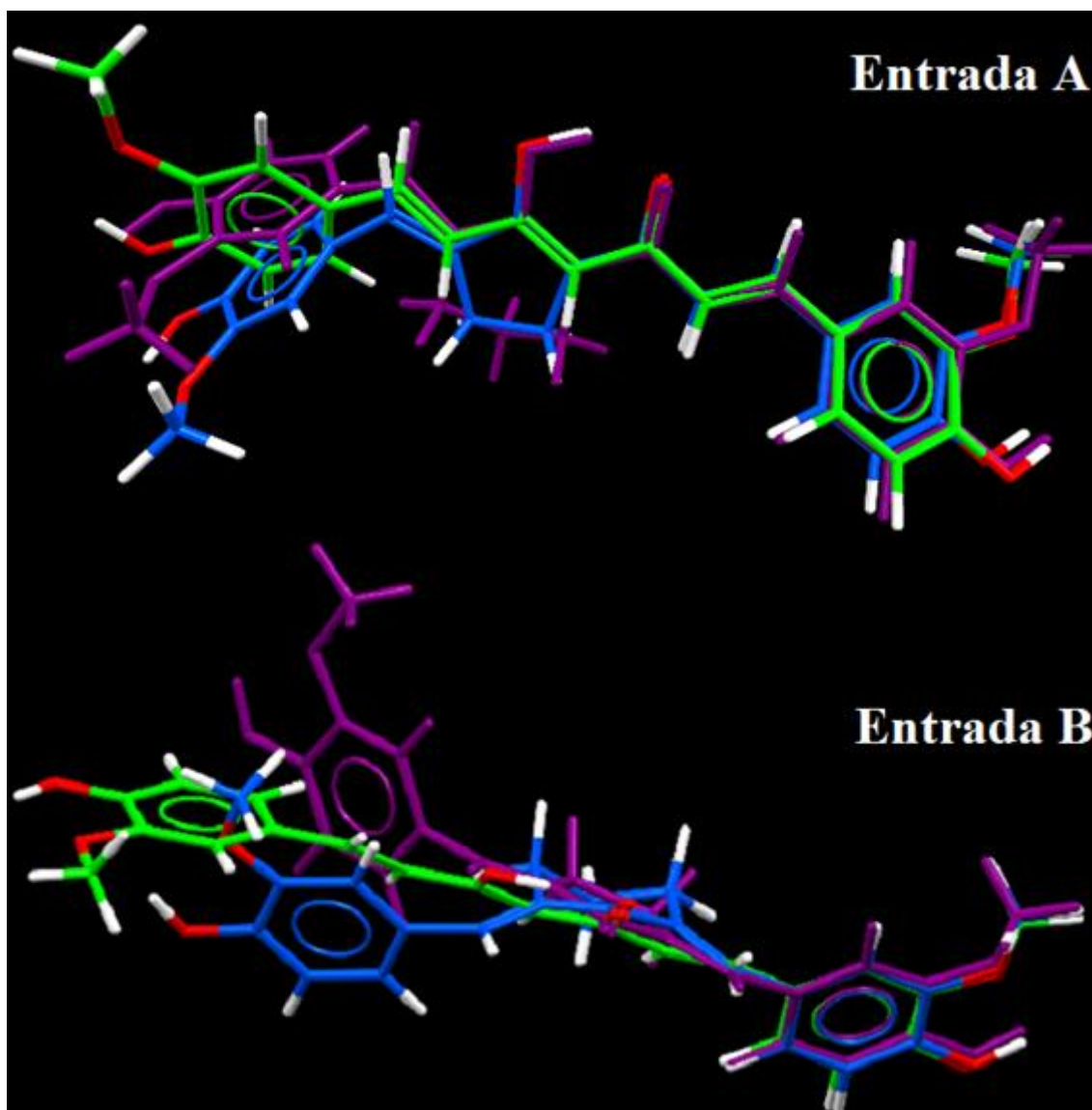


Figura 55: Sobreposição dos derivados carbocíclicos (**45-48**) com o protótipo natural curcumina (**3**) após minimização de energia pelo método PM6 utilizando o programa *Spartan '14*. Entrada A, (**3**) aparece em verde, (**45**) em roxo e (**46**) em ciano. Entrada B, (**3**) aparece em verde, (**47**) em ciano e (**48**) em roxo.

Através da inspeção das conformações sobrepostas na Figura 55, é possível observar que a inserção do anel na cadeia espaçadora entre as subunidades arila do arcabouço diarileptanoide original C6-C7-C6 faz com que este perca sua planaridade, provavelmente devido às interações estéricas dos hidrogênios metilênicos do anel alifático com o hidrogênio em *orto* do anel aromático mais próximo. Tal interação faz com que as subunidades arila tenham tendência a uma conformação onde o anel encontra-se perpendicular ao plano da orientação inicial, o que altera também a disposição espacial dos substituintes oxigenados – OH e –OCH₃, que são potencialmente farmacofóricos para a atividade tripanocida. Apesar de em ambos os casos os substituintes do anel aromático (principalmente a metoxila) estarem orientados de forma diferente do protótipo (**3**), elas ainda são diferentes entre si, o que sugere que a interação com o biorreceptor hipotético ocorra de forma mais eficiente em (**45**) e (**47**) do que em (**46**) e (**48**). A influência dos derivados de ciclopentanona é mais relevante devido ao fato de que neste caso o anel alifático não pode adotar conformações não-planares, diferente dos derivados de ciclohexanona, mais flexíveis, nos quais podem haver diferentes

conformações, onde os hidrogênios metilênicos encontram-se mais afastados do anel aromático.

Planejamento, síntese e avaliação da série pirimidínica

Outra série foi planejada baseada no bioisosterismo de anéis existente entre o núcleo isoxazol de **(37)** e pirimidinas, que culminou na síntese de *bis*-estiril-pirimidinas, planejadas por hibridação molecular e bioisosterismo (Figura 56).

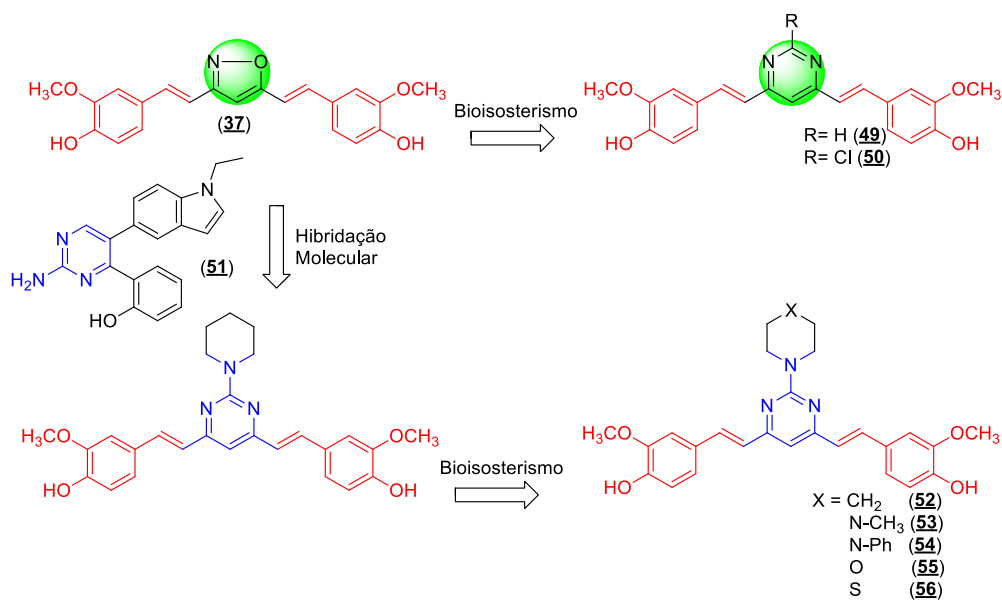


Figura 56: Planejamento das 4,6-*bis*-estirilpirimidinas 2-substituídas.

Este planejamento utilizou como base a relação potencialmente bioisostérica entre o isoxazol de **(37)**, que foi mais ativo que a 1,3-dicetona da curcumina **(3)** no modelo de atividade tripanocida, e anéis 1,3-pirimidínicos. Pirimidinas são bastante comuns em fármacos que atuam modulando ciclo celular (DRONTLE & WAGNER, 2004), em alvos bem definidos como, por exemplo, a tubulina. O trabalho de Xie e colaboradores (XIE *et al.*, 2011) mostrou uma série de derivados heterocíclicos nitrogenados inibidores da polimerização de tubulina, com destaque para a 2-aminopirimidina **(51)**. Sendo o heterociclo a subunidade farmacofórica do modelo de Xie, planejou-se então um híbrido entre **(51)** e **(3)** a fim de ter um agente tripanocida dual, que mantenha propriedades antioxidantes da curcumina, relevantes no quadro de estresse oxidativo do parasito, e que também seja capaz de inibir a polimerização da tubulina, prejudicando a replicação do parasito.

A abordagem sintética para esta série teve início com a tentativa de síntese de **(49)** diretamente a partir da curcumina **(3)**, através da clássica reação de Pinner (PINNER, 1884) conforme ilustrado na Figura 57, entrada A. Contudo, a síntese deste derivado não logrou sucesso, o que levou ao estudo de uma outra abordagem para a síntese de **(49)** (Figura 57, entrada B).

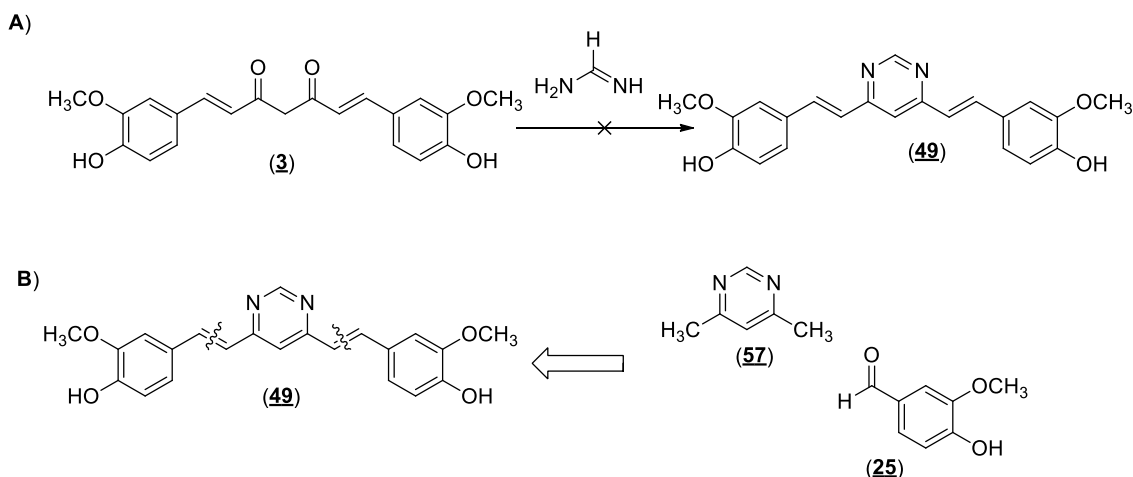
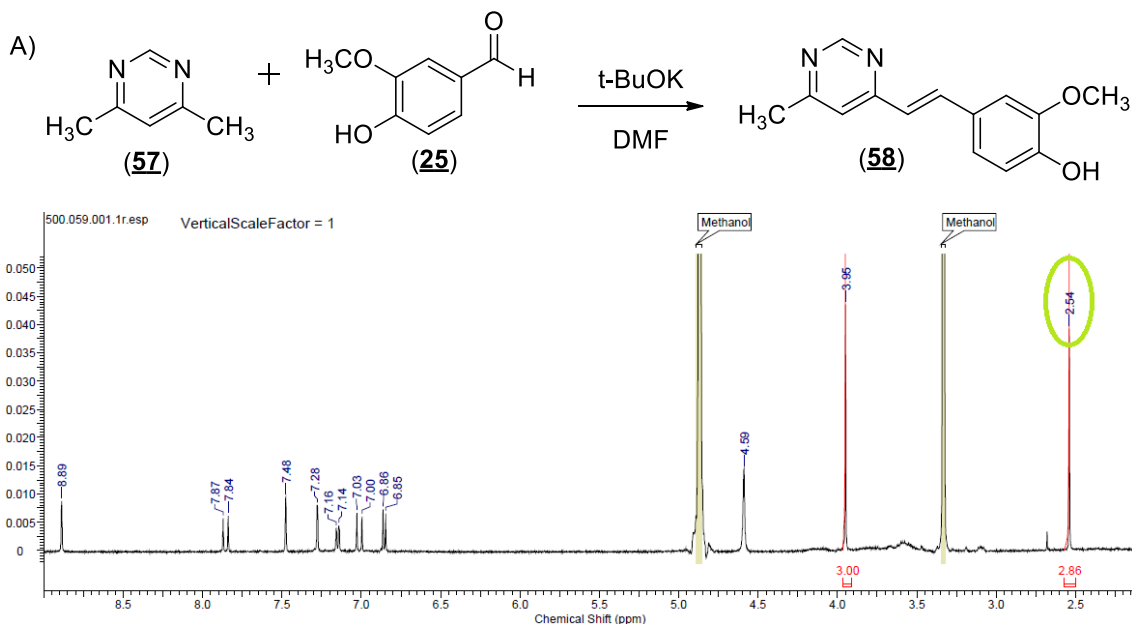
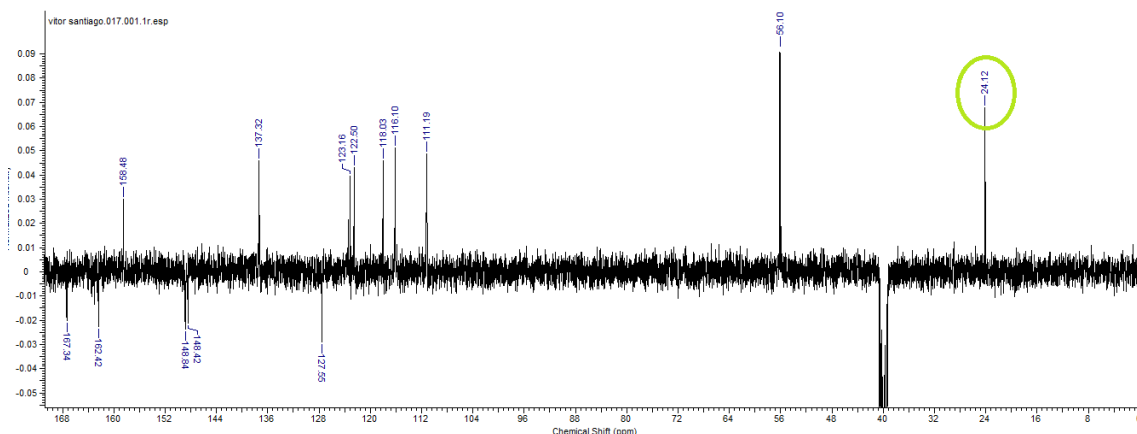


Figura 57: A) Esquema sintético para a preparação de **(49)** pela clássica reação de Pinner. B) Estratégia retrossintética para preparação de **(49)**, identificando como precursores a vanilina **(25)** e a 4,6-dimetilpirimidina **(57)**.

Dessa forma, procedeu-se para a reação de condensação entre a pirimidina **(57)** e a vanilina **(25)**, explorando a acidez dos hidrogênios metílicos do heterociclo para formar um nucleófilo enolato-like capaz de reagir com a carbonila da vanilina **(25)** (BOLÄNDER *et al*, 2012). Entretanto, o produto majoritário dessa reação foi o produto monossustituído **(58)**, que foi caracterizado devido à presença do sinal correspondente à metila ligada ao heterociclo (observada no espectro de RMN ^1H em δ 2,54 ppm, integral 3H e no espectro de DEPTQ como um sinal positivo em δ 24,12 ppm), e à massa do íon molecular no espectro de massas em m/z 242, conforme mostra a Figura 58.





Line#1 R.Time:7.5(Scan#:600)

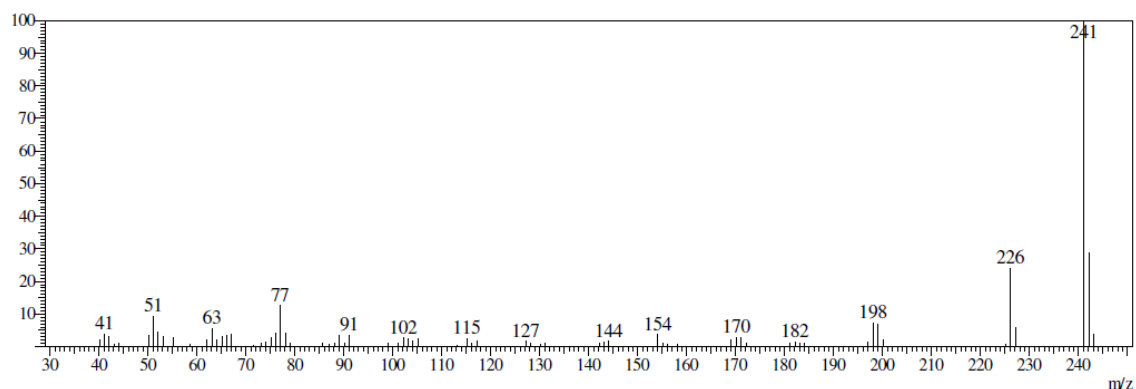


Figura 58: A) Esquema reacional para a preparação de **(58)**. B) Espectro de RMN¹H (CD₃OD, 500 MHz), DEPTQ (DMSO-*d*₆, 125 MHz) com destaques para o sinal da metila e espectro de massas do derivado **(58)**.

Esse fenômeno provavelmente é decorrente do fato de que após a primeira condensação, os hidrogênios da metila se tornam muito menos ácidos devido ao efeito de ressonância que ocorre com a carga negativa da hidroxila fenólica em meio básico, a exemplo do que ocorre com a vanilina **(25)**. Sendo assim, optou-se por trabalhar com a vanilina protegida, de modo a impedir a formação do fenolato em meio básico. A síntese da vanilina protegida ocorreu segundo reações clássicas presentes na literatura, e está sumarizada na Figura 59.

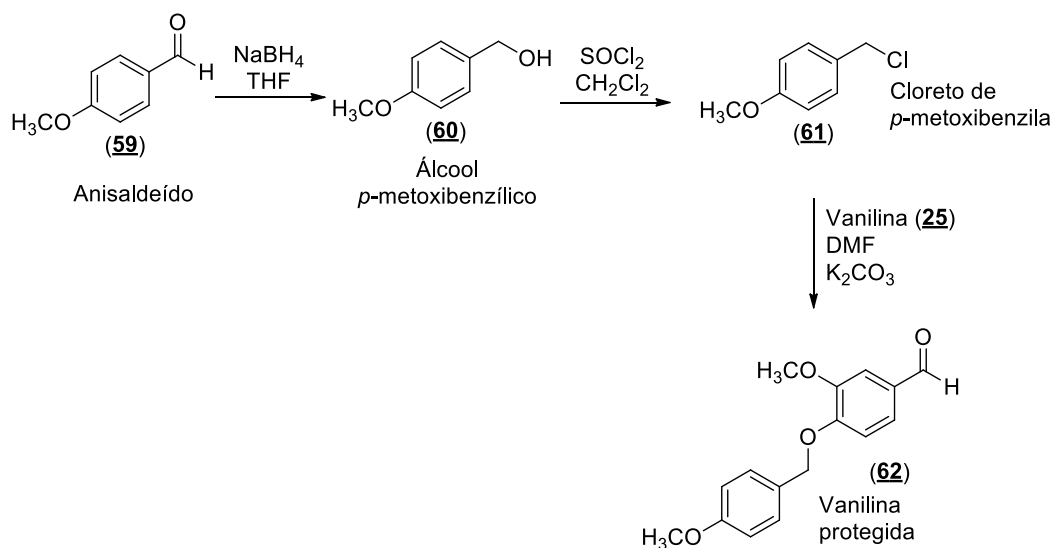


Figura 59: Esquema sintético para a preparação da vanilina protegida **(62)** a partir de anisaldeído **(59)**.

A vanilina protegida então reagiu com 4,6-dimetil-pirimidina (**57**) ou 2-cloro-4,6-dimetil-pirimidina (**63**) para gerar os derivados apropriadamente substituídos (**49** e **50**, respectivamente). A desproteção desses grupos se deu em solução hidroalcoólica ácida, conforme mostra a Figura 60.

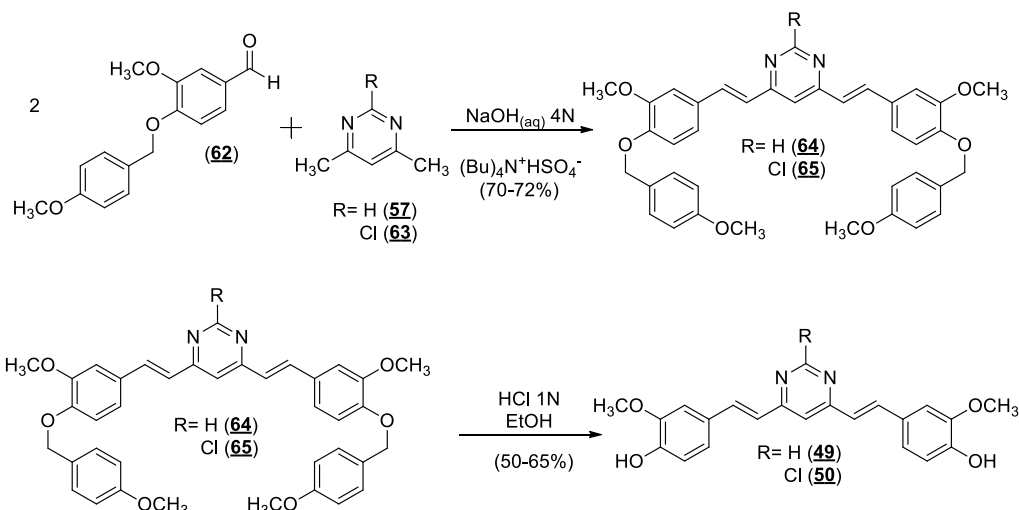


Figura 60: Esquema reacional para a preparação das pirimidinas (**49**) e (**50**) a partir da vanilina protegida (**62**) e dos compostos heterocíclicos correspondentes (**57**, **63**).

Esta abordagem sintética, proposta por Lee e colaboradores (LEE *et al*, 2012), para a síntese de pirimidinas com atividade anti-amiloidogênica, envolve a reação entre aldeídos e metilpirimidinas em condições fortemente básicas e com o auxílio de um catalisador de transferência de fases, como é o caso do bissulfato de tetrabutilamônio, $(\text{Bu})_4\text{N}^+\text{HSO}_4^-$. O catalisador de transferência de fase, neste caso, auxilia no processo de ionização da pirimidina (LUCCHESI & MARZORATTI, 2000), transportando os íons OH^- da fase aquosa para a fase orgânica composta pelas pirimidinas propriamente ditas, haja visto que os hidrogênios da metila de (**57**) são bem menos ácidos do que os hidrogênios α -carbonílicos como por exemplo os da acetilacetona (Figura 61). Normalmente a desprotonação destas pirimidinas ocorre com a adição de bases mais fortes como, por exemplo, organólitos. O catalisador de transferência de fases permite, então, que esta reação ocorra mediante ação de íons hidróxido em meio aquoso (LANG & COMASSETO, 1988), desde que observado o fato de que podem haver reações cruzadas caso o composto eletrofílico também possua hidrogênios α à carbonila.

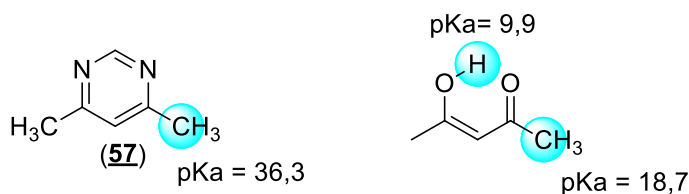


Figura 61: Assinalamento dos valores de pKa^5 para os hidrogênios mais ácidos das moléculas (**57**) e acetilacetona, na forma enólica.

Sendo assim, o mecanismo proposto para esta reação, representado na Figura 62 pela formação de (**64**) a partir de (**57**), se inicia com a ionização da pirimidina para formação da base conjugada correspondente. Esta base conjugada, que é nucleofílica, realiza uma adição à

⁵ Valores obtidos em <https://epoch.uky.edu/ace/public/pKa.jsp>, acesso em 15/08/2015

carbonila aldeídica da vanilina protegida (**62**) para formar um intermediário aldol-*like* que sofrerá desidratação em meio básico através de um mecanismo de eliminação unimolecular, via base conjugada (E1cB). A base conjugada é estabilizada por ressonância no anel aromático, o que pode justificar sua estabilidade e formação no meio reacional. O processo é repetido a partir da ionização da segunda metila para formar então a 4,6-*bis*-estirilpirimidina protegida de interesse (**64**). O processo de desproteção (WUTS & GREENE, 2007) a despeito de ter uma execução simples (refluxo em mistura hidroalcoólica ácida) logrou rendimentos baixos (variando de 50 a 65%) o que indica necessidade de otimização desta etapa devido ao fato de ser a última da rota sintética. Existem alguns métodos mais brandos utilizados para a desproteção de derivados *p*-metóxi-benzilados, como por exemplo HCl catalítico em 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP) como solvente (VOLBEDA *et al*, 2015).

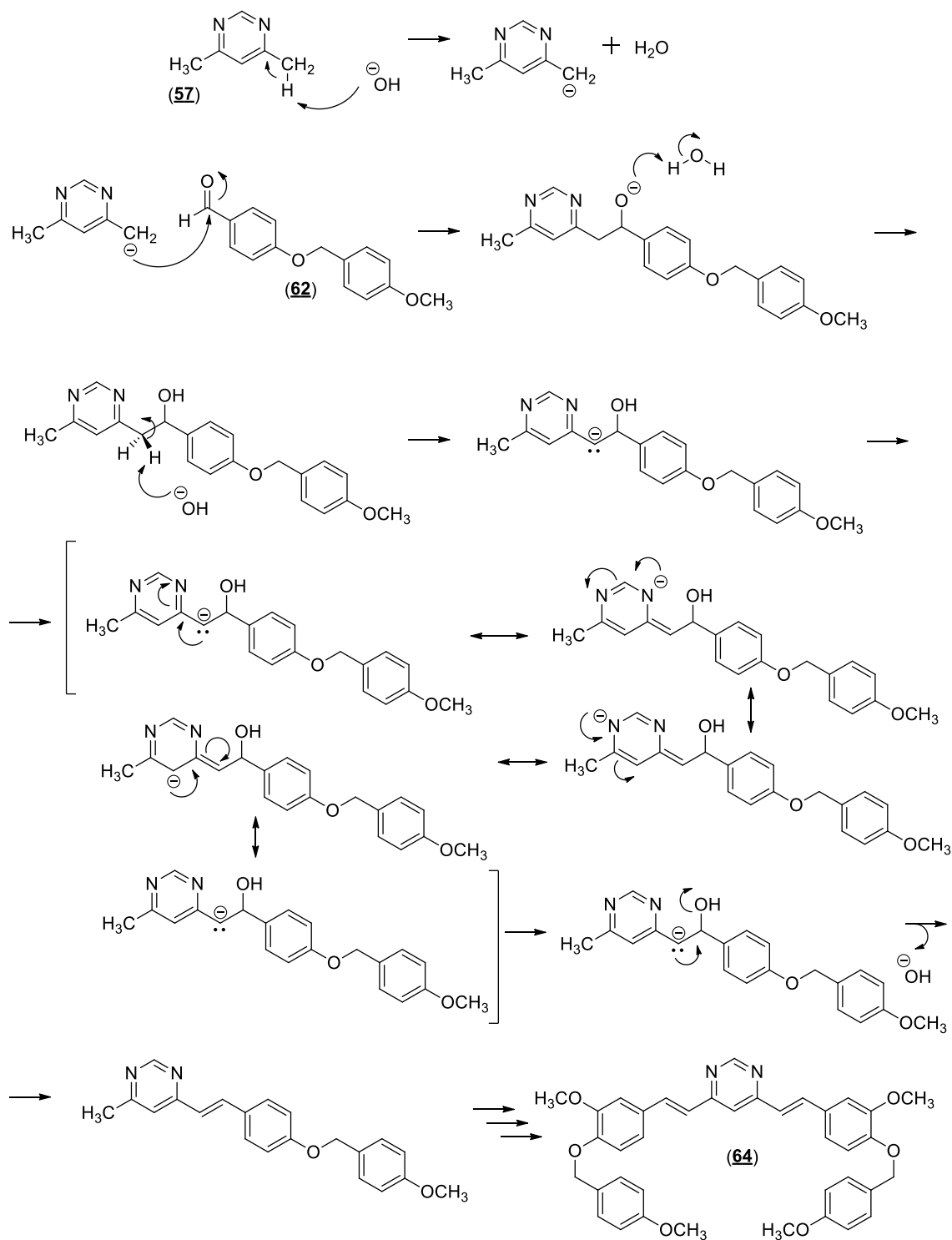


Figura 62: Proposta de mecanismo para a formação de **(64)** a partir de uma reação semelhante à condensação de Knoevenagel entre a pirimidina **(57)** e o aldeído **(62)**.

Nesse ponto, o derivado clorado **(65)** funcionou como intermediário-chave para a síntese de toda a série de 2-amino-4,6-bis-estirilpirimidinas **(52-56)**, através de uma reação de substituição nucleofílica aromática ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) deste derivado com aminas cíclicas funcionalizadas (Figura 63). A desproteção destes derivados ocorreu de forma análoga aos anteriores.

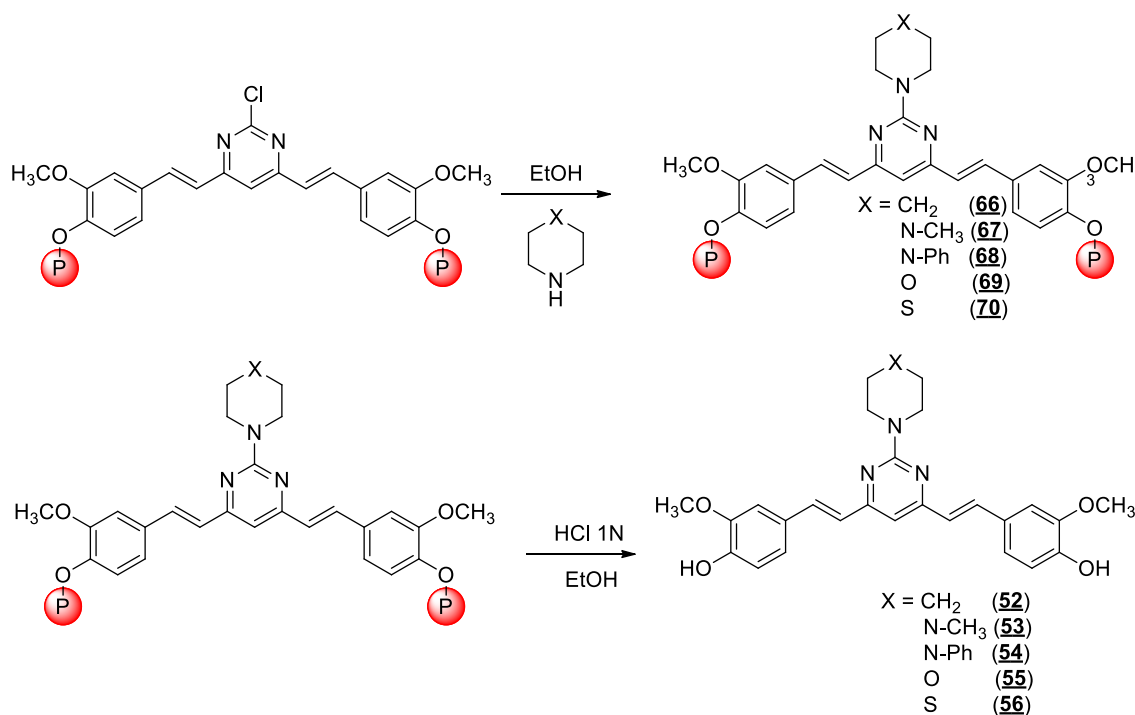


Figura 63. Esquema reacional da preparação dos derivados (52-56) passando pelos derivados protegidos (66-70). P = Grupo de Proteção (*p*-metoxibenzila).

A estrutura da série final (52-56) foi elucidada por espectrometria de massas de alta resolução, RMN ¹H e DEPTQ. A Figura 64 mostra o espectro de RMN ¹H do derivado (55) como um exemplo representativo da série sintetizada. Pode-se observar o sinal do hidrogênio pirimidínico H1 como um simpleto de integral 1 em δ 6,84ppm, além dos sinais dos hidrogênios olefínicos H3 e H4 como dupletos de integral 2 e constante de acoplamento $J = 15\text{Hz}$ em δ 6,93ppm e δ 7,70ppm, o que mostra a formação da ligação dupla com geometria *E*, em conformidade com a proposta mecanística anteriormente mostrada (Figura 62). O anel morfólico presente no derivado (55) aparece como dois multipletos referentes aos metilenos H2' e H3', em δ 3,70ppm e δ 3,81ppm respectivamente, muito próximo aos sinais da metoxila em δ 3,80ppm. A ausência de sinais referentes ao grupo protetor mostra que a reação ocorreu em extensão adequada.

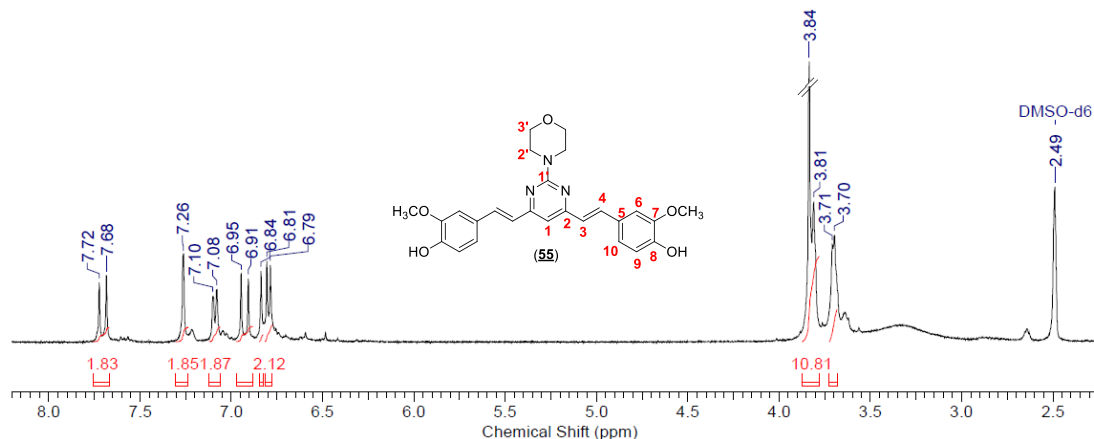


Figura 64: Espectro de RMN ¹H do derivado morfólico (55) como exemplo representativo da série pirimidínica inédita (52-56).

Os produtos finais (**52-56**) são inéditos na literatura e após caracterização foram submetidos a uma triagem frente a formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) para análise da influência dos substituintes na posição 2 do anel pirimidínico na atividade tripanocida (Figura 65).

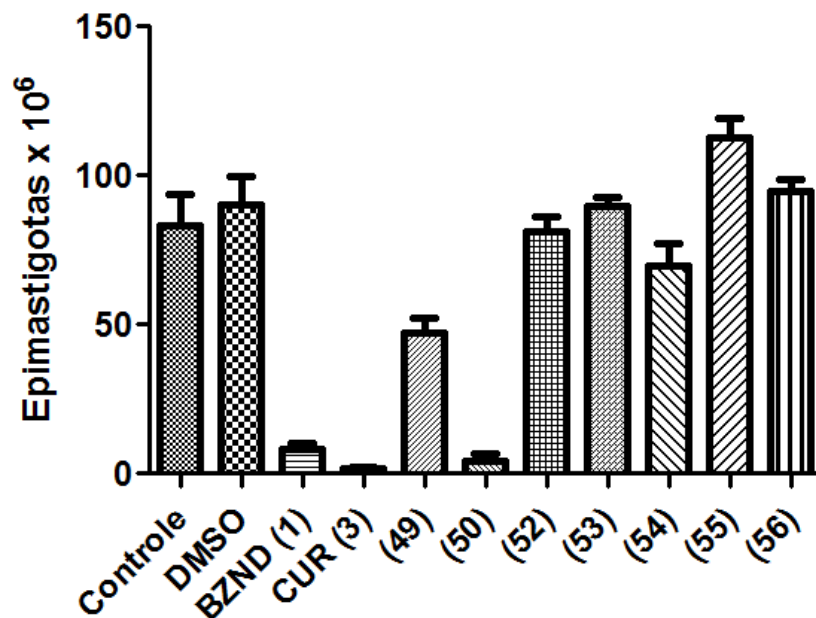


Figura 65: Triagem das pirimidinas sintetizadas sobre a forma epimastigota de *T. cruzi* (cepa Dm28c). O parasito foi cultivado por 7 dias em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com hemina, ácido fólico e 10% de soro fetal bovino a 26 °C. Algumas culturas foram prontamente tratadas com os controles benzonidazol (**1**) e curcumina (**3**), além derivados indicados pelo número da estrutura em triplicatas na concentração de 50 μ M. As formas viáveis foram contadas na câmara de Neubauer no sétimo dia. Dados representativos de dois experimentos independentes.

A triagem mostrou que a série de pirimidinas planejadas não foi ativa neste modelo. Entretanto, esta apresentou atividade *in vitro* sobre modulação da tubulina porcina, cujos resultados aparecem em anexo. Neste modelo, porém, o derivado clorado (**50**) apresentou atividade comparável ao controle, o que fez com que ele tenha sido eleito como a pirimidina mais ativa da série sintetizada. Dessa forma, após sucessivas triagens e planejamentos para otimização, foram eleitos 6 derivados (Figura 66) que apresentaram atividade superior à da curcumina (**3**) para ensaios de viabilidade celular, cálculo de CI₅₀ e investigação da atividade tripanocida sobre as outras formas do parasito (amastigota e tripomastigotas), a serem discutidas no Capítulo 3.

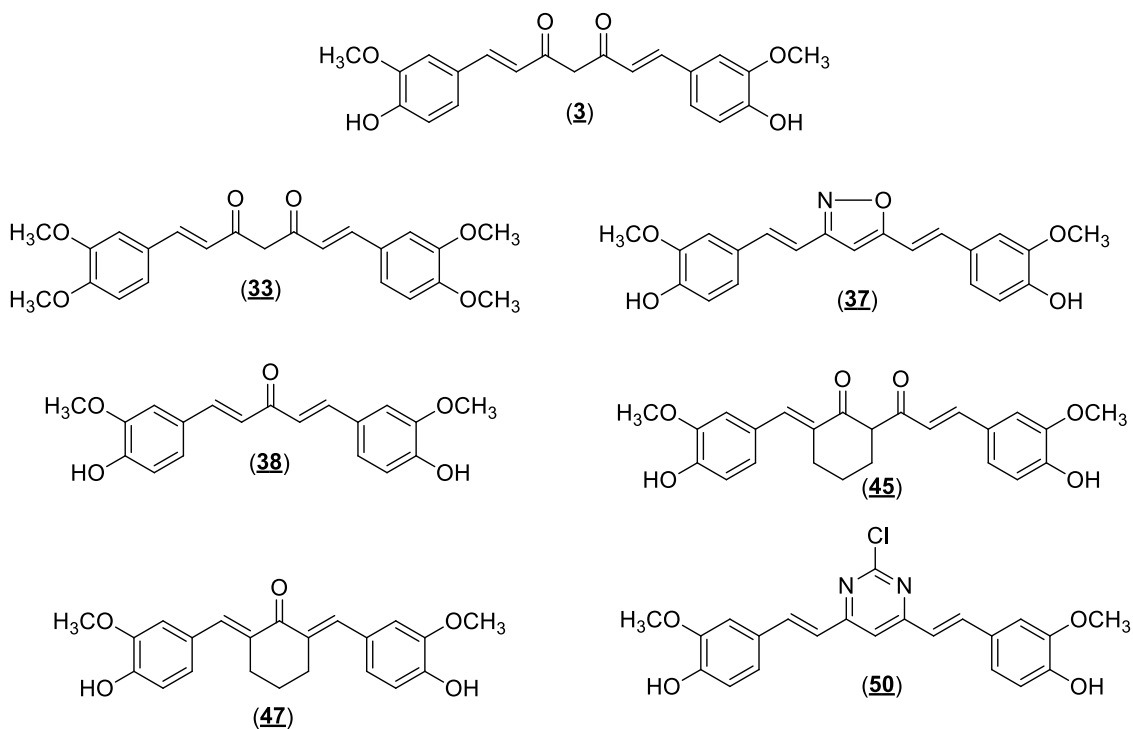


Figura 66: Estruturas dos derivados da curcumina (**3**) mais ativos dentre os sintetizados no modelo de atividade tripanocida frente a formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Apesar de mais ativos contra as formas epimastigotas de *T. cruzi*, deve-se garantir que estes derivados sejam seletivamente tóxicos para o parasito (e não para a célula hospedeira) de modo a cumprir um requisito fundamental para um candidato a fármaco quimioterápico. Desta forma, foi realizado um ensaio de viabilidade celular com os derivados mais ativos nas triagens anteriores (Figuras 51, 54 e 65) a fim de verificar se eles, apesar de tóxicos para as formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) não eram tóxicos para macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c, que foram tratados com os derivados (**33**), (**37**), (**38**), (**45**), (**47**) e (**50**), além dos controles adequados. No momento da leitura, as células foram diluídas em azul de Trypan e contadas em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Foram realizadas leituras em 24h e 48h, e os resultados representativos dos dois tempos de leitura estão expressos na Figura 85.

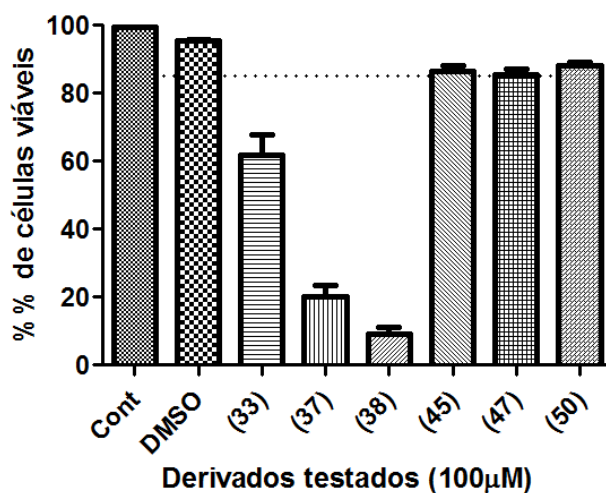


Figura 85: Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c foram cultivados em triplicadas na concentração de $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$. As células foram tratadas por 48h com os derivados indicados na concentração de $100 \mu\text{M}$. A viabilidade celular foi quantificada pelo método de exclusão com azul de Trypan. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

A análise deste experimento permite observar que dos seis derivados sintéticos mais ativos frente à forma epimastigota, três deles apresentaram relevante toxicidade para os macrófagos murinos (**33**, **37** e **38**, Figura 86). Este resultado se deve provavelmente à presença de subunidades toxicofóricas em suas estruturas ou de metabólitos que possam ser tóxicos.

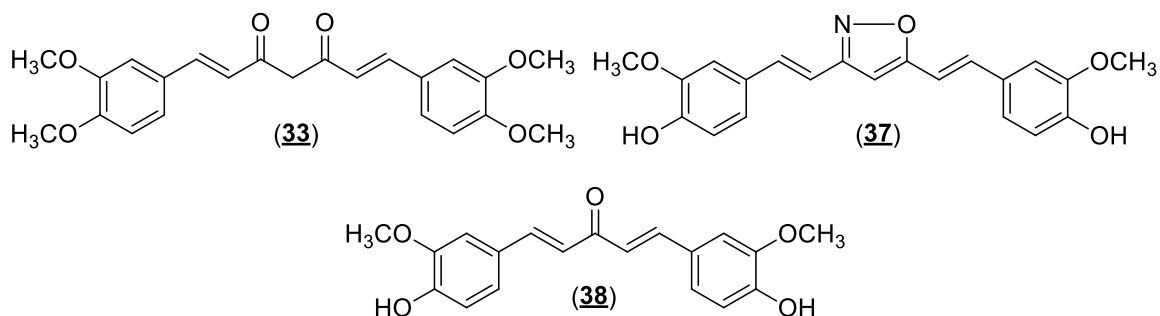


Figura 86: Estruturas dos derivados (**33**), (**37**) e (**38**), que apresentaram considerável toxicidade para macrófagos murinos na concentração de $50 \mu\text{M}$.

De uma maneira geral, núcleos isoxazólicos sofrem metabolismo redutor com muito mais facilidade do que os pirazóis, formando normalmente um enol (que na maioria das vezes será encontrado na forma de cetona) e uma imina (ZHANG, 2008). Neste caso, o metabólito correspondente à abertura do anel isoxazólico, por metabolismo redutor do derivado (**37**), formaria uma imina α,β -insaturada (Figura 87), que é um grupo extremamente tóxico (SMITH, 2011). Entretanto, à luz do conjunto de resultados observados, não foi possível justificar as toxicidades dos derivados (**33**) e (**38**) no modelo testado, o que aponta para a necessidade de estudos associados ao metabolismo destas substâncias pelas células murinas a fim de investigar eventuais metabólitos tóxicos formados.

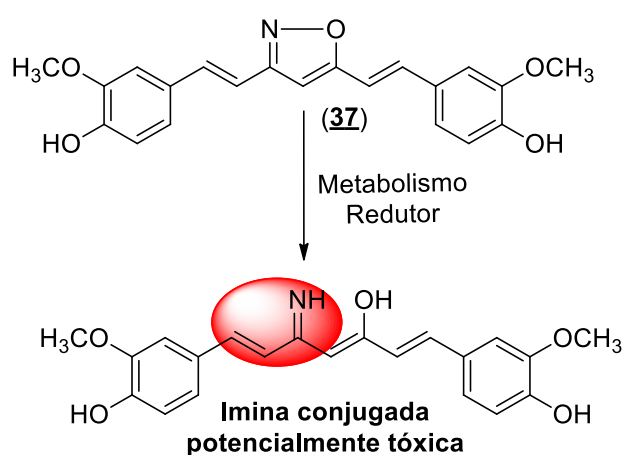


Figura 87: Formação do provável metabólito que justifica o perfil citotóxico de (**37**) frente a macrófagos peritoneais murinos.

Avaliação da atividade tripanocida dos análogos ativos mais seletivos sobre células infectadas

A partir do experimento anterior, então, foi realizado um corte onde aquelas substâncias que permitiram a viabilidade de pelo menos 85% das células fossem eleitas para os ensaios seguintes. Procedeu-se para o cálculo de CI_{50} destes derivados frente a formas epimastigotas (**45**, $CI_{50} = 0,60 \pm 0,09 \mu\text{M}$; **47** $CI_{50} = 2,30 \pm 0,13 \mu\text{M}$ e **50** $CI_{50} = 6,50 \pm 0,19 \mu\text{M}$;) para que então fosse realizado um experimento envolvendo a atividade destes derivados em células infectadas com *T. cruzi*. Macrófagos murinos foram infectados com formas tripomastigotas metacíclicas induzidas quimicamente através do cultivo de formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) em meio TAU-P (urina artificial de triatomíneo suplementado com *L*-prolina, CONTRERAS *et al*, 1993). Este meio é capaz de induzir a diferenciação de formas epimastigotas para formas tripomastigotas metacíclicas pois mimetiza a urina do barbeiro, onde essa diferenciação ocorre naturalmente. Após a metaciclogênese, os parasitos diferenciados foram coletados e adicionados à culturas de macrófagos peritoneais murinos na razão de 5 tripomastigotas para cada macrófago. Após 24h de infecção, as culturas foram lavadas e tratadas com os derivados que apresentaram toxicidade seletiva frente ao parasito, *e. g.* (**45**), (**47**) e (**50**). Os ensaios com a célula infectada permitem a observação de três fenômenos distintos: a liberação de formas tripomastigotas, a proliferação de formas amastigotas e a quantidade de células infectadas com formas amastigotas. Desta forma, ao analisar os três fenômenos, pode-se obter informações sobre potenciais mecanismos de ação das substâncias ou de eventuais seletividades frente a uma forma evolutiva específica do parasito.

A inibição da liberação das formas tripomastigotas celulares de *T. cruzi* (Figura 88) foi investigada pela contagem de formas viáveis no sobrenadante das culturas 9 dias após o tratamento. Neste ensaio pode-se verificar a toxicidade seletiva das substâncias frente a uma forma do parasito que possui grande relevância clínica, uma vez que as formas tripomastigotas celulares liberadas *in vivo* são aquelas responsáveis pela manutenção da infecção e proliferação do parasito nos tecidos do hospedeiro.

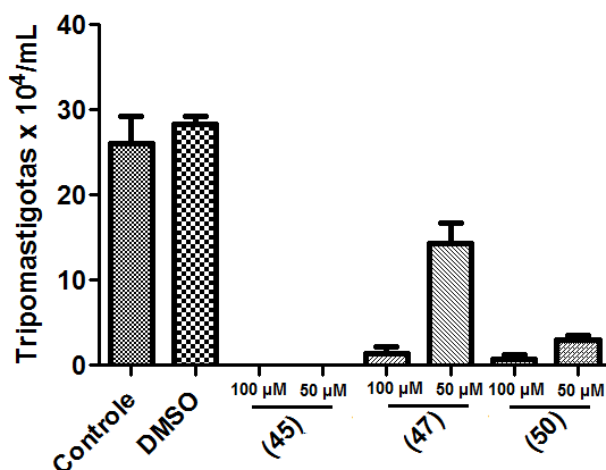


Figura 88: Macrófagos peritoneais murinos foram infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) na razão de 5 parasitos/macrófago. Algumas culturas foram tratadas com os derivados (**45**), (**47**) e (**50**) nas concentrações indicadas. Após 9 dias o número de parasitos liberados no meio de cultura foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. Estes resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Nesse experimento pode-se observar que os derivados (**45**) e (**50**) apresentam-se bastante ativos quando comparado ao (**47**). O derivado (**47**) e perde sensivelmente sua

atividade ao ser utilizado em uma concentração mais baixa, o que pode representar um entrave caso haja utilização desta substância *in vivo*, já que sua concentração tende a diminuir no decorrer do tempo. Em paralelo a este ensaio, foram realizados ensaios para verificar a atividade destes derivados frente a formas amastigotas do parasito. A preparação dos meios de cultura seguiu o mesmo protocolo, com o diferencial de que em cada cultura foi adicionada uma lamínula de vidro estéril para que esta pudesse ser corada e analisada no microscópio óptico para contagem de parasitos e de número de células infectadas. Dessa forma, podemos obter informações sobre a atividade destas substâncias no interior da célula e/ou sua capacidade de dificultar a internalização do parasito no processo infectivo.

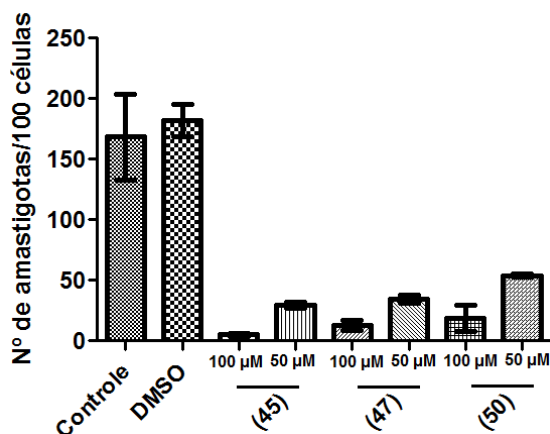


Figura 89: Macrófagos peritoneais murinos foram infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) na razão de 5 parasitos/macrófago. Algumas culturas foram tratadas com os derivados (45), (47) e (50) nas concentrações indicadas e em todas foi adicionada uma lamínula. Após 7 dias a lamínula foi corada com Panótico e o número de parasitos foi determinado por contagem em lente de imersão no microscópio óptico. Estes resultados são representativos de dois experimentos independentes.

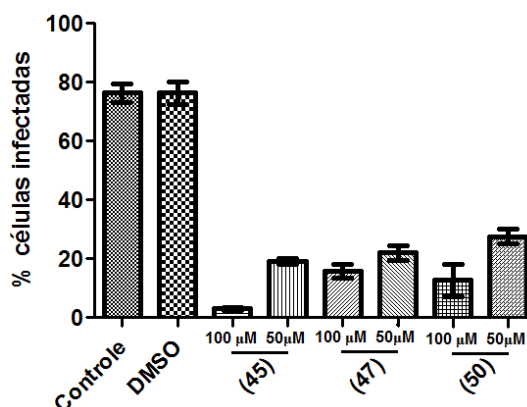


Figura 90: Macrófagos peritoneais murinos foram infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) na razão de 5 parasitos/macrófago. Algumas culturas foram tratadas com os derivados (45), (47) e (50) nas concentrações indicadas e em todas foi adicionada uma lamínula. Após 7 dias a lamínula foi corada Panótico e a porcentagem de células infectadas foi determinado por contagem em lente de imersão no microscópio óptico. Estes resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Os resultados mostrados nas figuras 89 e 90 mostram que as substâncias são consideravelmente ativas, tanto na diminuição do número de amastigotas quanto na diminuição do número de células infectadas. Entretanto, nenhuma delas foi capaz de inibir a infecção das células, mesmo em concentrações elevadas, o que pode significar um problema no que diz respeito à administração destes derivados *in vivo*, pois esse comportamento deve ser decorrente da dificuldade em atravessar a membrana celular.

CAPÍTULO III

Investigação dos prováveis mecanismos de ação da curcumina

A busca por moléculas que sejam seletivamente nocivas ao parasito sem que haja comprometimento da saúde do hospedeiro é o principal paradigma na pesquisa de novas substâncias com atividade antiparasitária. Uma vez caracterizada a toxicidade seletiva do quimioterápico deve-se buscar a elucidação do mecanismo de ação daquela substância, processo que demanda conhecimento dos diversos possíveis alvos presentes no parasito. Dentre os alvos mais estudados em *Trypanosoma cruzi*, estão a cruzipaína, a tripanotiona redutase e a glicosil 3-fostato desidrogenase (FERREIRA, 2012). A cruzipaína (MURTA *et al*, 1990), também denominada GP 57/51 (e cuja forma recombinante é a cruzaiína) é uma cisteíno-protease da família da papaína cuja principal particularidade é um segmento C-terminal atípico altamente glicosilado (MENDONÇA-PREVIATO *et al*, 1983). A cruzipaína é codificada por um gene polimórfico (*i. e.*, possui sua expressão diferentemente regulada nos diferentes estágios evolutivos do parasito), o que sugere o desempenho de funções específicas em cada forma do parasito. Na forma tripomastigota, a cruzipaína encontra-se localizada em lisossomos, ao passo que na forma amastigota ela está presente majoritariamente na superfície da célula e na forma epimastigota encontra-se compartimentalizada em reservossomos (SOUTO-PADRON *et al*, 1990; ALVAREZ *et al*, 2012), estando então ligadas a processos de penetração na célula hospedeira, nutrição intracelular e no mecanismo de escape da célula sob a forma infectiva tripomastigota (STEERT *et al*, 2010). Por se tratar de uma cisteíno-protease, os primeiros inibidores de cruzipaína identificados foram derivados peptídeo-miméticos capazes de se ligar de forma irreversível à enzima, *e. g.* a vinil-sulfona (**57**). Em seguida, com utilização de ferramentas computacionais, foram planejados derivados não-peptídicos, *e. g.* (**58**) (FERREIRA *et al*, 2010) mais potentes frente à enzima (Figura 67, entrada A).

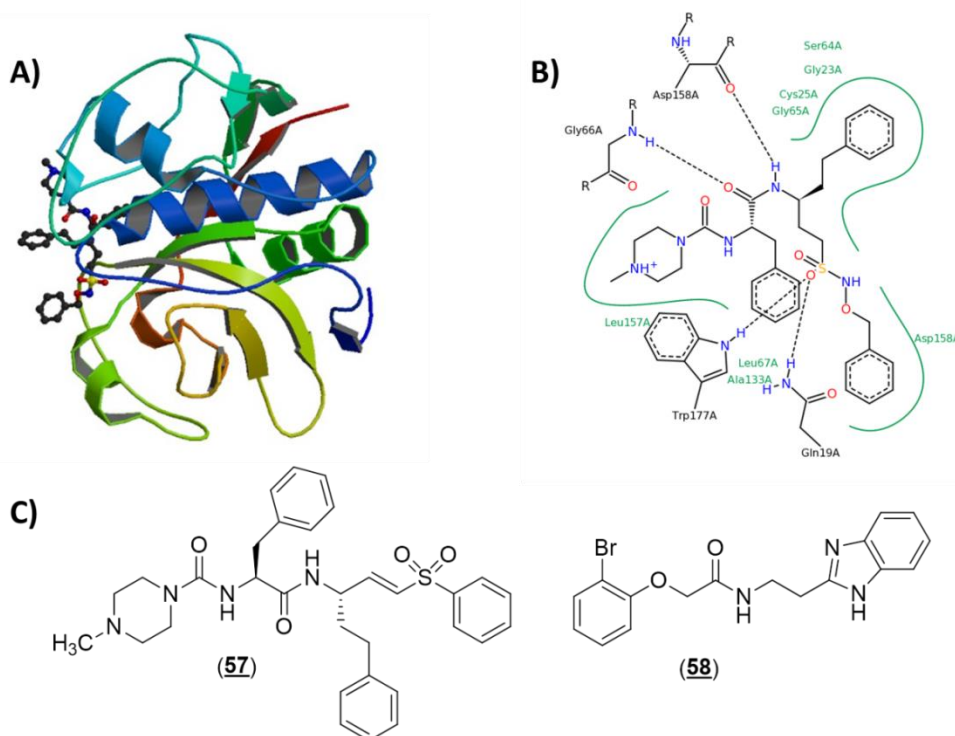


Figura 67 A) Representação estrutural tridimensional da cruzaiína cristalizada com o derivado vinil-sulfônico (**57**). Estrutura depositada no *Protein Data Bank* sob o código 1F2C (BRINNEN *et al*, 2000). B) Representação esquemática em duas dimensões do modo de ligação de (**57**) à cruzaiína. C) Estruturas dos derivados inibidores de cruzaiína (**57**) e (**58**).

A tripanotiona redutase é uma enzima presente em diversos tripanossomatídeos (*e. g.* gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Crithidia*), responsável pela catálise da reação mostrada na Figura 68. Esta enzima mantém o equilíbrio de oxirredução da tripanotiona e é responsável pela manutenção de um ambiente intracelular redutor através da diminuição da concentração de espécies reativas de oxigênio e demais radicais livres, os quais são consumidos pela forma reduzida da tripanotiona (HEBY *et al.*, 2007).

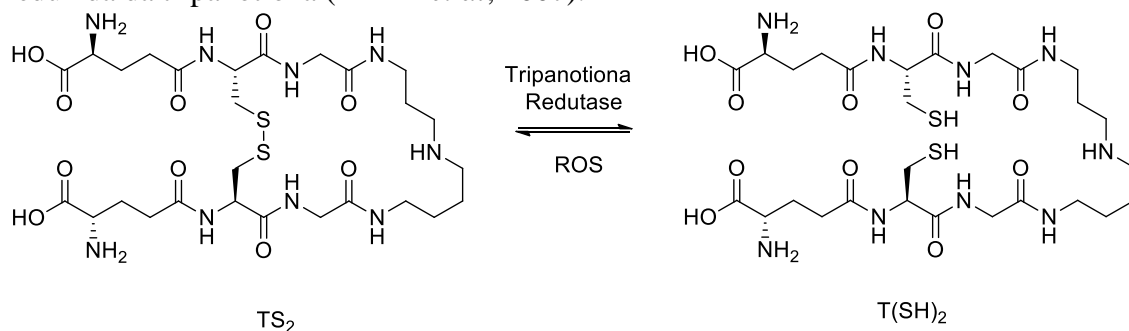


Figura 68: Esquema do equilíbrio entre a forma oxidada (TS_2) e reduzida ($T(SH)_2$) da tripanotiona. O processo de redução ocorre com catálise da tripanotiona redutase e o processo de oxidação ocorre espontaneamente pela ação oxidante de espécies reativas de oxigênio (ROS).

A inibição desta enzima gera um acúmulo de espécies reativas de oxigênio no interior do parasito, causando um estresse oxidativo potencialmente letal para a célula do *T. cruzi*. O desenvolvimento de inibidores da tripanotiona redutase teve início em 1992 com o trabalho de Benson e colaboradores, onde foi realizado o isolamento da tripanotiona redutase de *Trypanosoma cruzi* e ensaio *in vitro* de inibição da enzima por diversas moléculas. Esse trabalho identificou como primeiro protótipo inibidor seletivo de tripanotiona redutase o já conhecido antidepressivo tricíclico clomipramina (**59**) quando comparado ao sistema de oxirredução da glutaciona, presente no hospedeiro vertebrado (BENSON *et al.*, 1992). No trabalho de Benson e colaboradores, a clomipramina (**59**) apresentou constante de inibição $K_i = 6,53 \pm 0,59 \mu M$ para a tripanotiona redutase de *T. cruzi* e não inibiu a glutaciona redutase humana na concentração máxima testada de 1 mM. Na primeira metade da década de 90, a maioria dos inibidores de tripanotiona redutase racionalmente planejados possuíam como referência a estrutura do substrato, o que normalmente gerava inibições irreversíveis e pouca seletividade. O trabalho de Zhang e colaboradores (1996) configurou um marco importante no desenvolvimento de inibidores da tripanotiona redutase, pois a partir dele iniciaram-se estudos computacionais de inibidores não-peptídicos e planejados racionalmente utilizando informações estruturais do alvo. Zhang e colaboradores utilizaram a estrutura cristalográfica conhecida da tripanotiona redutase de *Crithidia fasciculata* para criar um modelo por homologia para a enzima correspondente à homônima de *T. cruzi* (ZHANG *et al.*, 1996). *C. fasciculata* é um cinetoplastídeo capaz de estabelecer relação de parasitismo apenas com mosquitos, sendo inofensivo ao homem. Contudo, sua tripanotiona redutase possui 69% de identidade com a de tripanossomatídeos, semelhança essa que é ainda maior quando se comparam os sítios ativos das duas enzimas (ABOAGYE-KWARTENG *et al.*, 1992). No mesmo ano, Jacoby e colaboradores elucidaram a estrutura da enzima a partir da cristalografia de tripanotiona redutase de *T. cruzi* com a mepacrina (**60**). A partir de então, diversos inibidores de tripanotiona redutase foram descobertos utilizando os modelos de Zhang e Jacoby, com destaque para a aminoacridina (**61**), homólogo superior de (**60**) descrito por Bonse e colaboradores; a piridazina (**62**) e o carbazol (**63**) descritos por Horvath. Mais recentemente, foram descritas as atividades inibitórias de derivados mais potentes como a tioridazina (**64**) e a aminoquinolina (**65**) descritas por Presti e Sola, respectivamente (Figura 69).

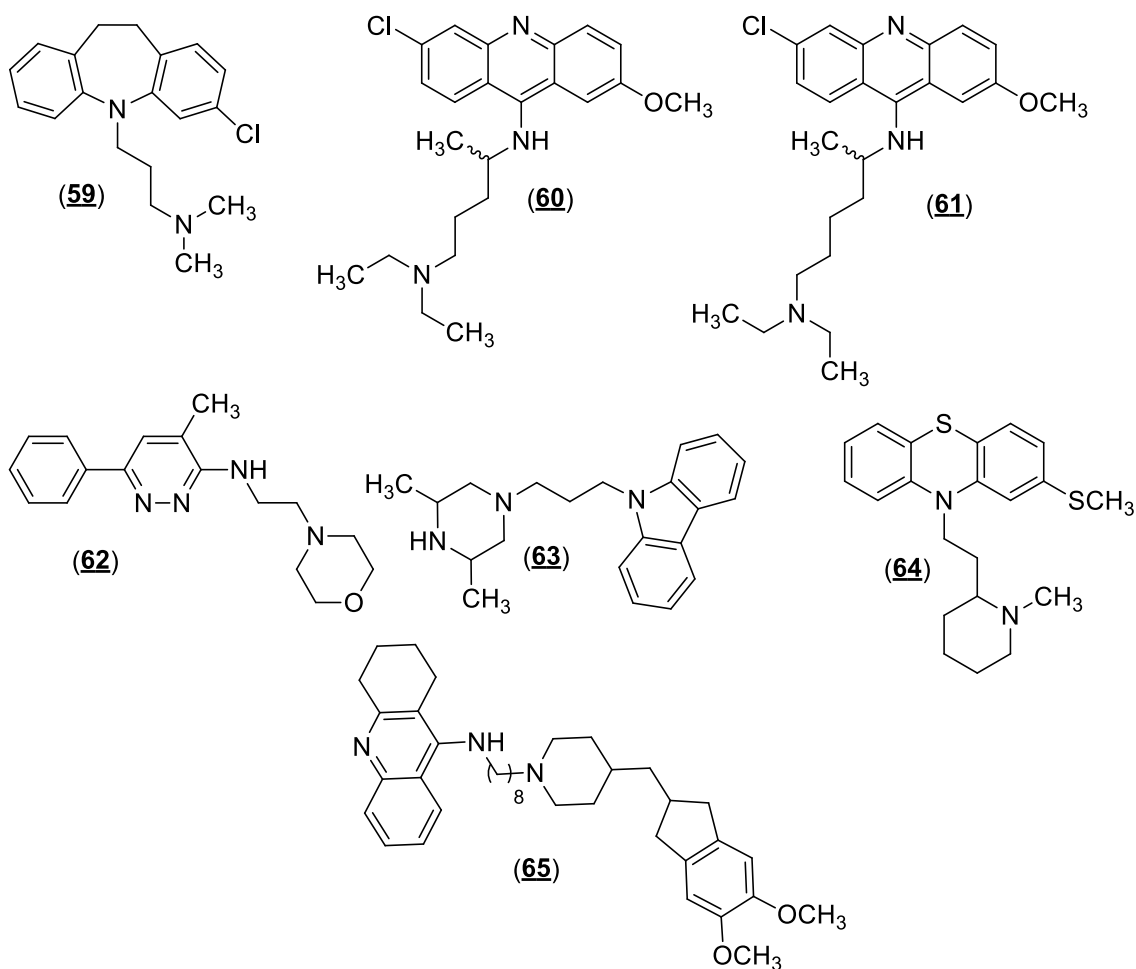


Figura 69: Estruturas dos protótipos inibidores de tripanotriazinone redutase de *T. cruzi* identificados após publicação dos trabalhos de Zhang e Jacoby. (ZHANG *et al*, 1996; JACOBY *et al*, 1996; BONSE *et al*, 1999; HORVATH, 1997; PRESTI *et al*, 2015; SOLA *et al*, 2015).

Além daqueles supracitados, diversos outros alvos tem sido pesquisados no âmbito da quimioterapia antichagásica, como fosfatases, diidroorotato desidrogenase, topoisomerase, glicosil-3-fostato desidrogenase e diidrofolato redutase (FERREIRA, 2012), com destaque para enzimas envolvidas na biossíntese de esteroides e na síntese de microtúbulos. Esteroides são biomoléculas lipofílicas que atuam na membrana celular modulando sua fluidez, integridade e permeabilidade, sendo então uma classe de moléculas indispensável à manutenção da vida. A biossíntese desses esteroides difere significativamente entre os Reinos, sendo o óxido de esqualeno um intermediário comum a todos os eucariotos. A partir deste ponto, há uma divergência de rotas biossintéticas que dão origem a diferentes esteroides: no reino animal, o principal esteroide é o colesterol (67). Nos fungos e protozoários, o principal esteroide é o ergosterol (68) e nas plantas, o sitosterol (69), conforme é mostrado na Figura 70.

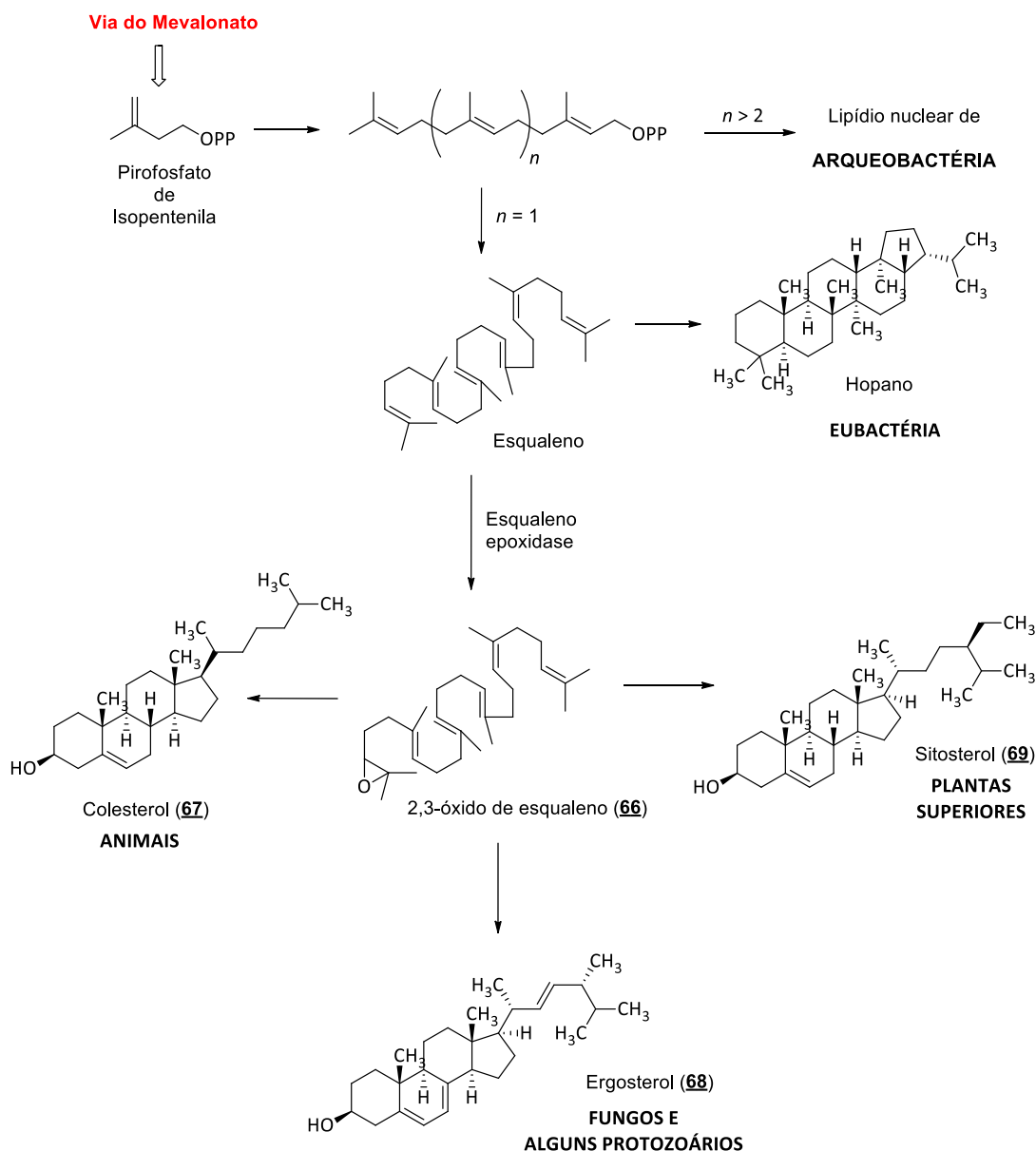


Figura 70: Biossíntese comparativa de esteroides estruturais de membrana de diferentes classes de seres vivos. Adaptado de BROWN, 1998.

Essa diferença nas rotas biossintéticas pode apresentar-se como uma vantagem no planejamento de substâncias com atividade biológica, uma vez que esta condição permite o estudo de compostos quimioterápicos seletivos para um parasito e inócuos para o hospedeiro, já que a partir do 2,3-óxido de esqualeno (**66**) as vias bioquímicas são diferentes para a síntese do colesterol (**67**) (um lipídeo de membrana presente nos mamíferos) e do ergosterol (**68**) (lipídeo equivalente, presente nas membranas de fungos e alguns protozoários, como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp.*). A utilização de derivados que modulam a biossíntese de esteroides já é bem explorada no tratamento de infecções fúngicas, a exemplo dos antifúngicos azólicos. Nas infecções por tripanossomatídeos, a utilização de um derivado azólico previamente conhecidos como antifúngico, o cetoconazol (**70**), foi realizada de forma pioneira nos trabalhos de McCabe (McCABE, 1983) e seus resultados deram início a uma série de estudos abordando a inibição da enzima CYP51 (ou esterol 14α -desmetilase), uma das enzimas-chave na regulação da biossíntese de esteroides em organismos eucariotos (Figura 71).

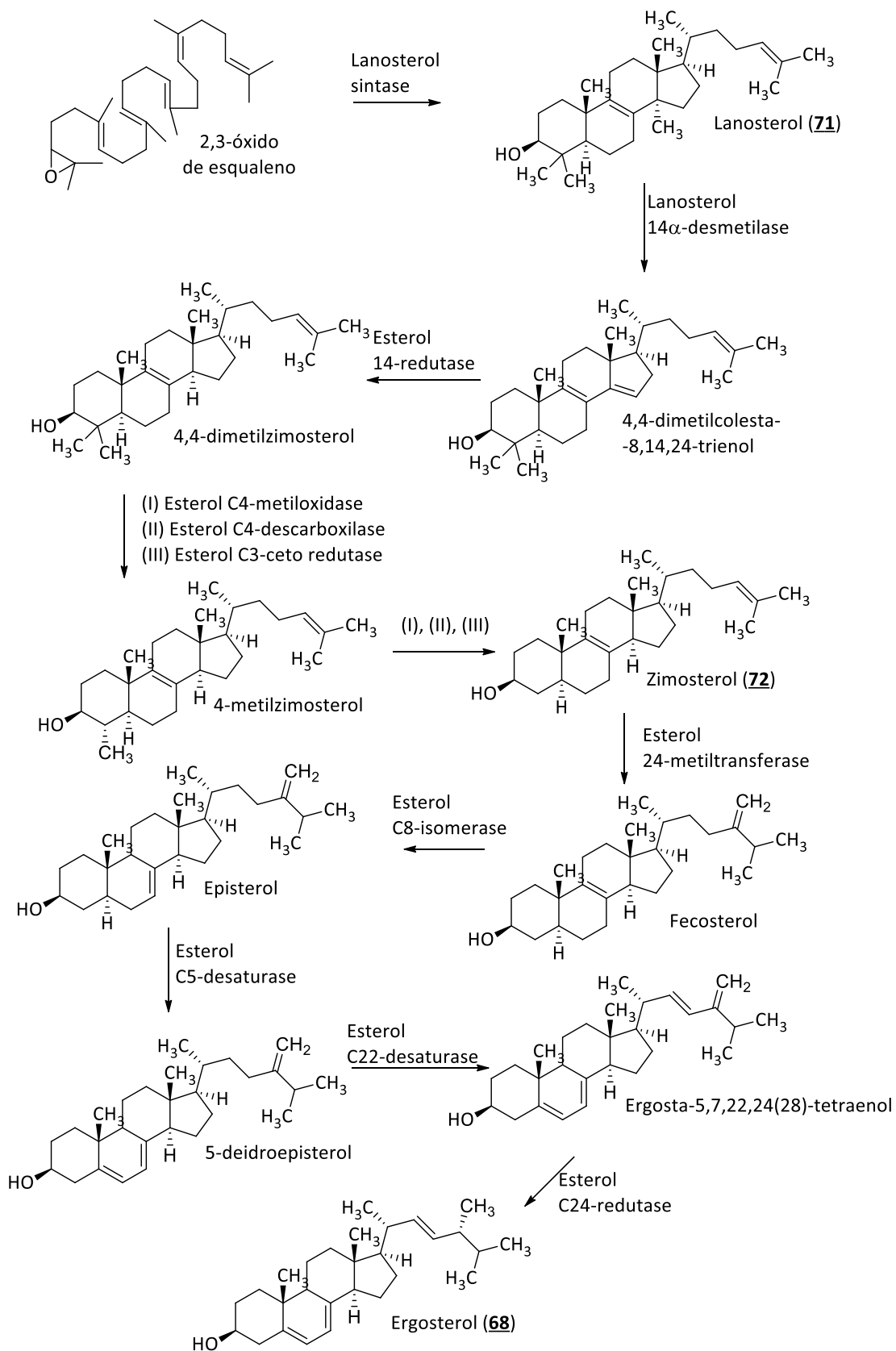


Figura 71: Biossíntese do Ergosterol (68) em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), a partir do óxido de esqualeno (adaptado de SUETH-SANTIAGO *et al*, 2015b).

No *T. cruzi*, os esteroides endógenos possuem função direta na viabilidade celular e na regulação da atividade de enzimas de membrana (URBINA, 1997). Apesar de o ergosterol (**68**) ser um produto final, comum às vias biossintéticas tanto de tripanossomatídeos quanto de fungos, existem peculiaridades no que tange à síntese desse lipídeo, principalmente na etapa de desmetilação mediada pela CYP51 de cada espécie. A despeito da baixa similaridade entre as isoformas de CYP51 nos diferentes Reinos, entre 22 e 33% na sequência primária de aminoácidos (LEPESHEVA *et al*, 2003), todas as enzimas possuem elevadas régio- e estereosseletividades nas reações que catalisam, o que diminui muito o número de substratos possíveis. Até o momento, são conhecidos apenas três substratos para todas as famílias de esterol-14 α -desmetilases, sendo todos 14-metil-esteroides pós-esqualeno na via de biossíntese, por exemplo: lanosterol (**71**), eburicol (**73**) e obtusifoliol (**74**) (LEPESHEVA *et al*, 2006). Este fenômeno, entretanto, faz com que não seja possível extrapolar as propriedades de um antifúngico azólico capaz de inibir a CYP51 de um fungo para a CYP51 de um tripanossimatídeo, já que cada uma delas tem afinidades diferenciadas, por substratos distintos (Figura 72).

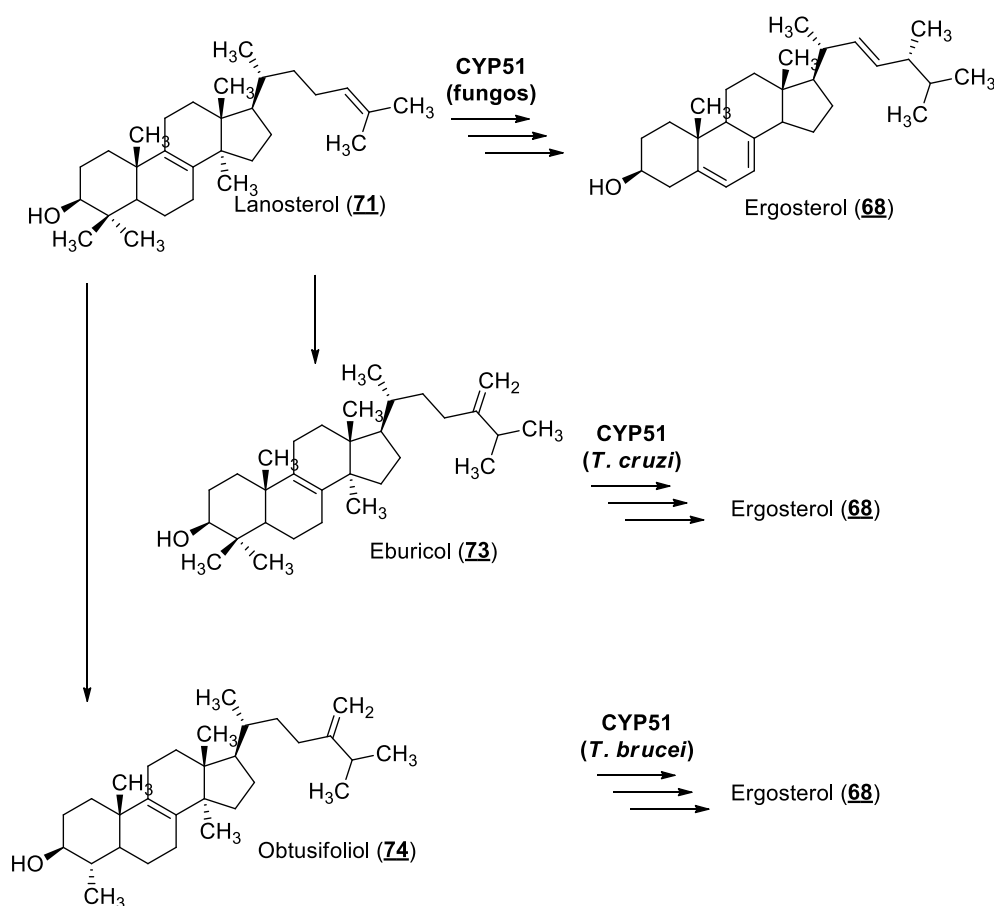


Figura 72: Estruturas dos substratos preferenciais de CYP51 de fungos (**71**), *T. cruzi* (**73**) e *T. brucei* (**74**).

A inibição de CYP51 em *T. cruzi* tem sido explorada com sucesso, resultando frequentemente no surgimento de novos inibidores ativos por via oral tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença, sendo a única classe de compostos com candidatos a fármacos que alcançaram triagens clínicas para o tratamento quimioterápico da doença de Chagas (DIAS *et al*, 2009), a exemplo do derivado imidazólico VNI (**75**), que se mostrou ativo na fase crônica da doença em experimentos *in vivo* (VILLALTA *et al*, 2013). A utilização de inibidores de CYP51 com atividade tripanocida aconteceu antes da elucidação

desta enzima como um alvo potencial. Antifúngicos como itraconazol (**76**) e cetoconazol (**70**) foram testados *in vitro* e *in vivo* em modelos de Chagas ainda na década de 80, com diminuição da carga parasitária nos animais infectados (McCABE *et al*, 1983; McCABE *et al*, 1987). A motivação para o primeiro trabalho de McCabe envolvendo a atividade de cetonazol (**70**) em um modelo murino de infecção por *T. cruzi* ocorreu devido a relatos prévios da atividade deste azol contra *Plasmodium falciparum* (PFALLER & KROGSTAD, 1981) e *Leishmania tropica* (BERMAN, 1981). Os compostos azólicos apresentados, de uma maneira geral, agem sobre a CYP51 do *T. cruzi* através da interação de um dos nitrogênios heterocíclicos com um átomo de ferro presente no centro HEME (Figura 73) da enzima responsável pela desmetilação do eburicol (**73**), impossibilitando a formação do intermediário zimosterol (**72**) a partir do lanosterol (**71**), impedindo assim a formação do ergosterol (**68**) (URBINA, 1997; URBINA, 2009). Desta forma, o resultado da inibição nas etapas finais da biossíntese de (**68**) é o acúmulo de precursores biossintéticos tóxicos na membrana celular do *T. cruzi*, comprometendo sua integridade, de forma similar ao que acontece nos fungos (Figura 74) o que caracteriza a inibição de CYP51 como uma abordagem importante no desenvolvimento de novas moléculas com potencial antichagásico.

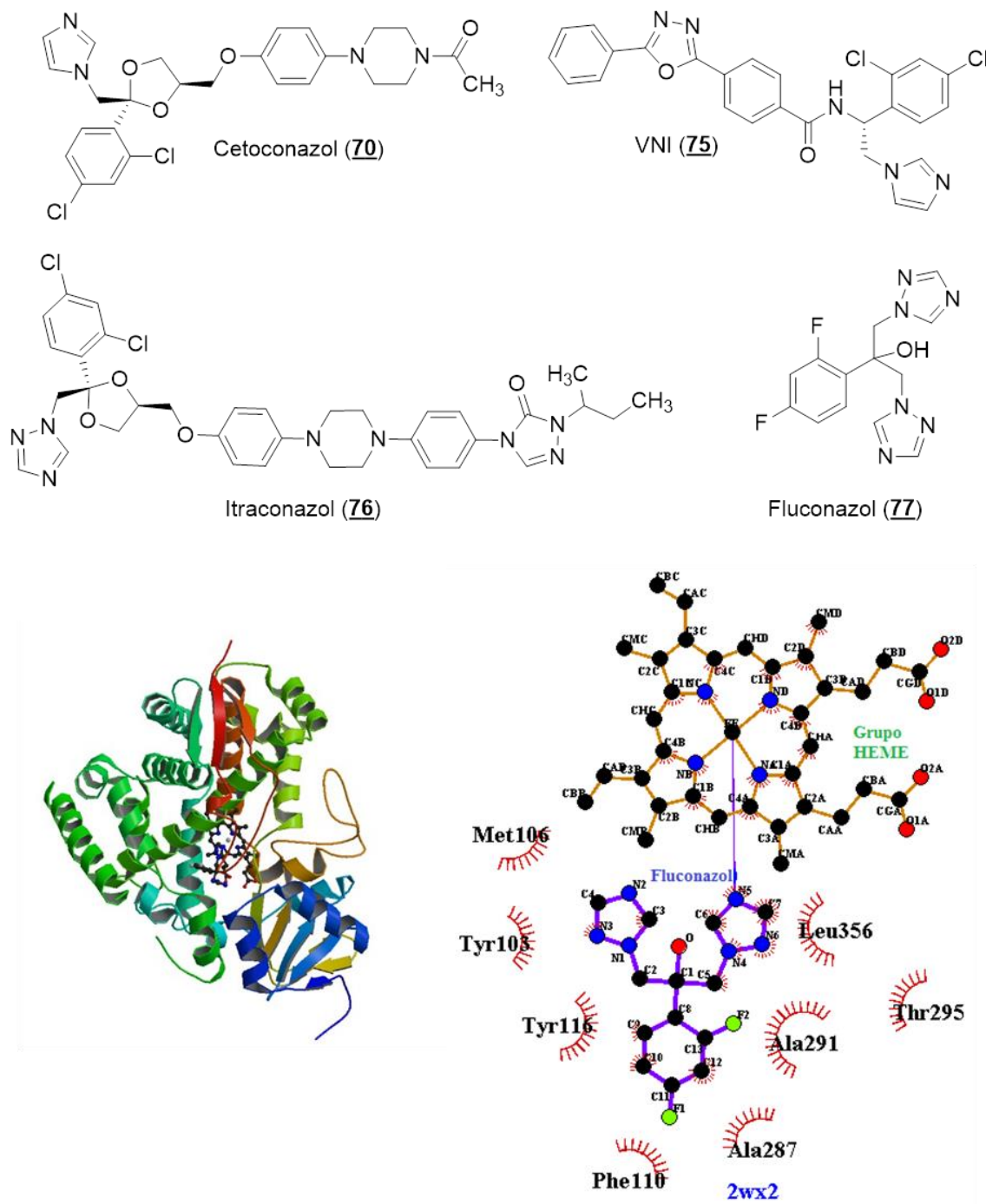


Figura 73: Acima, estrutura de derivados azólicos ativos em modelos de infecção por *T. cruzi*. Cetoconazol (**70**), VNI (**75**), itraconazol (**76**) e fluconazol (**77**). Estrutura cristalográfica da CYP51 do *T. cruzi* com o fluconazol (**77**) ligado ao sítio catalítico da enzima, depositado no Protein Data Bank (PDB) sob o código 2WX2 (abaixo, à esquerda). Esquema bidimensional de interação do fluconazol (**77**) com o sítio catalítico da enzima, gerado pelo programa LigPlot a partir do mesmo código (abaixo, à direita).

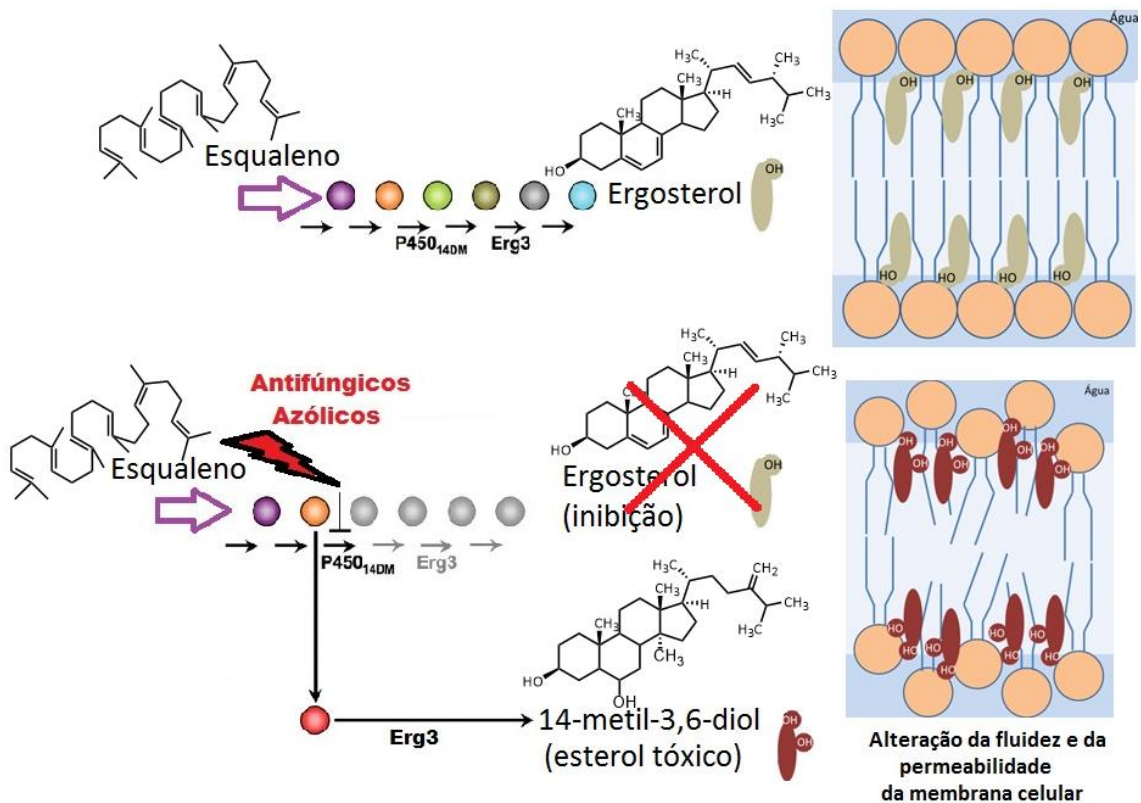


Figura 74: Representação esquemática do mecanismo de ação dos compostos azólicos sobre a síntese de ergosterol (68) e subsequente alteração da composição e da organização da membrana celular (SHAPIRO *et al*, 2011; ABE *et al*, 2009).

Além de CYP51, a tubulina é um outro alvo bastante promissor no desenvolvimento de moléculas que modulem o ciclo celular de *Trypanosoma cruzi*. Tubulina é uma classe de proteínas globulares cujas isoformas compõem os microtúbulos, que são filamentos do citoesqueleto responsáveis pela manutenção de uma série de funções vitais para as células eucarióticas, como por exemplo a separação dos cromossomos durante a divisão celular, o transporte de componentes intracelulares, a manutenção do formato da célula, da mobilidade celular e da distribuição de componentes da membrana plasmática (HEALD & NOGALES, 2002). A formação do microtúbulo ocorre pela polimerização de duas isoformas de tubulina, α e β . As duas subunidades formam um heterodímero de α e β -tubulina, que se polimeriza formando uma estrutura cilíndrica filamentosa no sentido “cabeça-cauda”, onde a subunidade α de um dímero se liga à subunidade β de outro. Este polímero inicial gera um protofilamento, que se agrupa a outros protofilamentos semelhantes para formar o microtúbulo propriamente dito (PEREZ, 2009) conforme mostra a Figura 75.

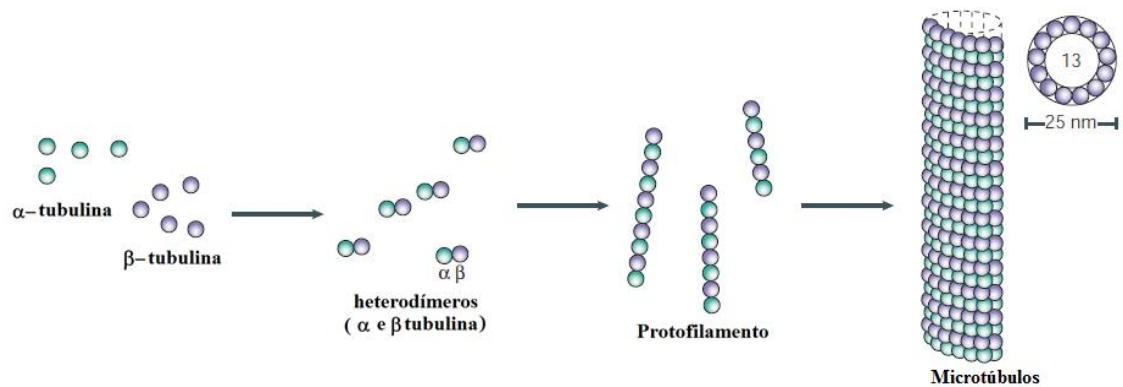


Figura 75: Representação esquemática dos protofilamentos formados pela polimerização dos heterodímeros de α e β tubulina (Adaptado de WESTERMAN & WEBER, 2003).

Uma vez formado, o microtúbulo torna-se uma estrutura dinâmica, onde existe um processo contínuo de polimerização e depolimerização em equilíbrio, que pode se deslocar alterando o tamanho do filamento para que este se adapte ao comprimento adequado em cada situação. A porção α -terminal (ou região (-)) é menos dinâmica, ao passo que a região β -terminal, ou região (+), é mais dinâmica e pode se alongar/encurtar mais rapidamente (ZHOU & GIANNAKAKOU, 2005). Tal característica confere polaridade ao microtúbulo em termos espaciais, o que faz com que as pontas (+) e (-) tenham diferentes propriedades e possam ser orientadas em diferentes direções. Essa característica se dá pelo fato de que cada subunidade de tubulina (tanto α quanto β) possui um sítio de ligação para guanosina-trifosfato (GTP), o qual se liga mais fortemente à α do que à β -tubulina. Dessa forma, o GTP ligado à β -tubulina é mais facilmente hidrolisado a GDP (guanossina-difostato) após a polimerização (NOGALES, 2001). A cinética da polimerização nesse caso é mais favorável do que a cinética da hidrólise do GTP, permitindo então o crescimento do microtúbulo. Nesse caso, o crescimento ou encurtamento do comprimento do microtúbulo na região (+) depende intimamente do nucleotídeo ligado à β -tubulina; um microtúbulo cuja subunidade β -terminal esteja associada a uma molécula de GTP tende a polimerizar, ao passo que aquelas associadas a GDP tentem a despolimerizar (JORDAN & WILSON, 2004), conforme mostra de forma esquemática a Figura 76.

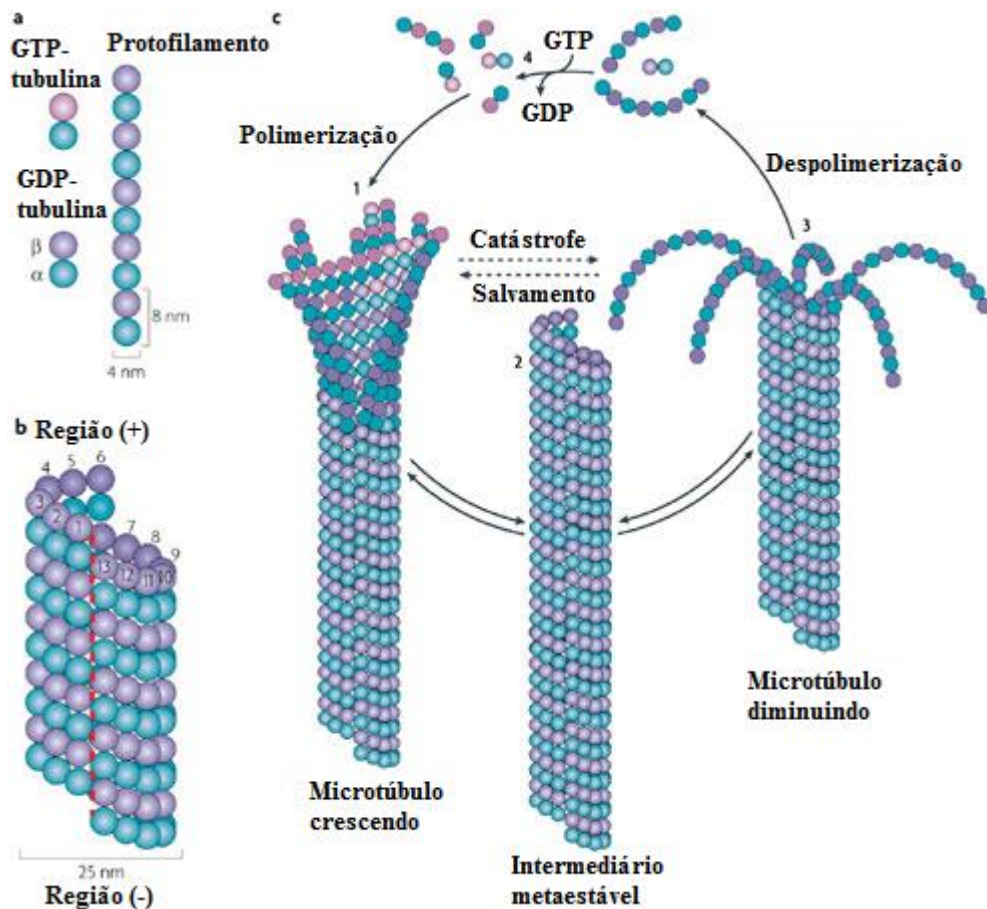


Figura 76: Representação esquemática da dinâmica de polimerização/despolimerização de microtúbulos. a) Formação do protofilamento com heterodímeros de α e β -tubulina; b) Formação do microtúbulo com as regiões (+) e (-); c) Relação entre os equilíbrios de polimerização e hidrólise do GTP, onde percebe-se (1) a polimerização do microtúbulo GTP-terminal, um intermediário onde as velocidades de hidrólise e polimerização são equivalentes (2), o microtúbulo despolimerizando quando a velocidade de hidrólise é superior (3) e o salvamento do microtúbulo mediante consumo de GTP (4). Adaptado de AKHAMOVA & STEINMETZ, 2008.

Por ser componente fundamental da proliferação celular, a tubulina já é um alvo reconhecido no desenvolvimento da quimioterapia antineoplásica, sendo os inibidores de tubulina os fármacos anti-câncer com maior eficácia no controle da doença (KUPPENS, 2006). Da mesma maneira, a tubulina desempenha o mesmo papel na divisão celular de parasitos como, por exemplo, *T. cruzi*. Os processos de divisão binária do parasito são estritamente dependentes de processos de polimerização/despolimerização de tubulina (WERBOVETZ, 2002), além de atuar no processo de motilidade do parasito, o que é fundamental para a manutenção do processo infeccioso no hospedeiro.

Apesar de haver alta identidade entre as sequências de aminoácidos de tubulinas de diferentes organismos (por exemplo, células de mamíferos e leveduras podem possuir identidade de 70 a 90% em suas isoformas de tubulina), existem diversos relatos de fármacos antitubulínicos utilizados em quimioterapia antiparasitária descritos na literatura. Por exemplo, o fármaco antifúngico benzimidazólico Benomyl[®] (78) apresenta alta seletividade para a tubulina de leveduras; Kilmartin e colaboradores mostraram que (78) é 300 vezes mais potente para a inibição da tubulina de *S. cerevisiae* quando comparada à tubulina de cérebro bovino (KILMARTIN, 1981). Os derivados representados na Figura 77, oxfendazol (79) e tiabendazol (80), por exemplo, são muito mais seletivos para a tubulina de nematoides do que para a tubulina de mamíferos (DAWSON *et al*, 1984). Sendo assim, apesar da alta semelhança estrutural entre as proteínas de diferentes espécies, provavelmente as diferenças

encontram-se em pontos importantes para o reconhecimento biológico dessas moléculas entre diferentes espécies.

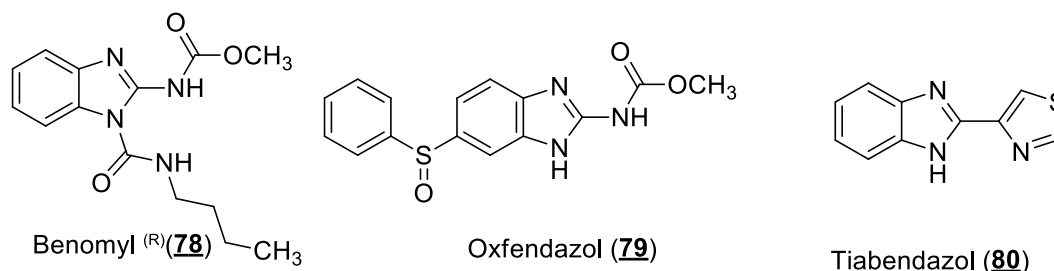
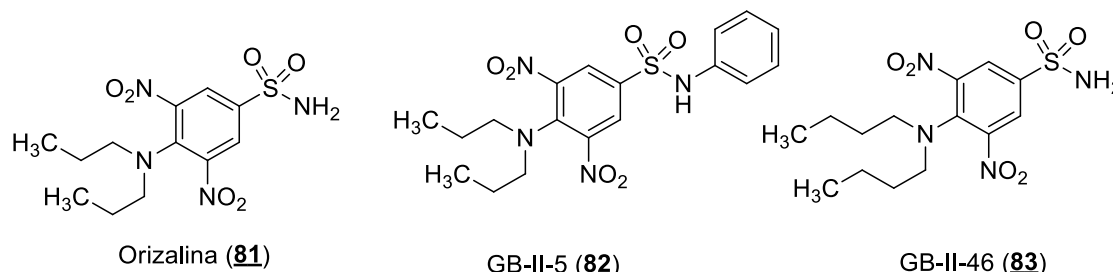


Figura 77: Estrutura dos antitubulínicos benzimidazólicos ativos em tubulina de leveduras (**78**) e nematoides (**79**, **80**) mas inativos frente à tubulina de mamíferos.

A busca por antitubulínicos seletivos é, então, um desafio atual no desenvolvimento de candidatos a fármacos antichagásicos. O trabalho de Werbovetz e colaboradores, por exemplo, identificou alguns derivados do tipo dinitroanilina-sulfonamida estruturalmente análogos à orizalina (**81**), um herbicida que atua despolimerizando os microtúbulos de plantas e impedindo assim seu crescimento anisotrópico (WERBOVETZ *et al*, 2003). Neste trabalho, observou-se que o derivado GB-II-5 (**82**) possui maior potência frente aos cinetoplastídeos quando comparado às células de mamíferos, conforme mostra a Tabela 7.

Tabela 7: Estrutura e valores de CI_{50} (em micromolar) da orizalina (**81**) e dos derivados dinitroanilina-sulfonamida frente a cinetoplastídeos e linhagens celulares de mamíferos (Adaptado de WERBOVETZ *et al*, 2003).



Composto	<i>L. donovani</i> (amastigotas)	<i>T. b. brucei</i> (variante 221)	<i>T. b. brucei</i> (Lab 110 EATRO)	J774 (macrófagos)	PC3 (próstata)
Orizalina (81)	72 ± 10	11 ± 0	6,6 ± 1,0	41 ± 5	57 ± 4
GB-II-5 (82)	5,0 ± 0,6	0,41 ± 0,02	0,73 ± 0,09	29 ± 1	35 ± 1
GB-II-46 (83)	20 ± 2	2,6 ± 0,3	1,9 ± 0,7	9,4 ± 2,0	23 ± 4

Os derivados sulfonamídicos (**81-83**) exercem atividade pela ligação em uma região da tubulina que é denominada “sítio da colchicina” (ZHONG *et al*, 2012), que é uma região entre as subunidades α e β da tubulina. Neste sítio liga-se a colchicina (**84**), que é um produto natural extraído de *Colchicum sp.* (e. g. *Colchicum autumnale* ou açafão-do-prado, Figura 78) usado no tratamento da gota (LU *et al*, 2012). A colchicina (**84**) ao se ligar na região entre as duas subunidades do heterodímero de tubulina induz a despolimerização dos microtúbulos pela alteração na conformação adotada pela subunidade β após sua ligação; uma vez ligada a

(**84**), o dímero toma uma conformação curva que gera impedimentos estéricos no momento da formação dos protofilamentos que irão gerar os microtúbulos (RAVELLI *et al*, 2004).

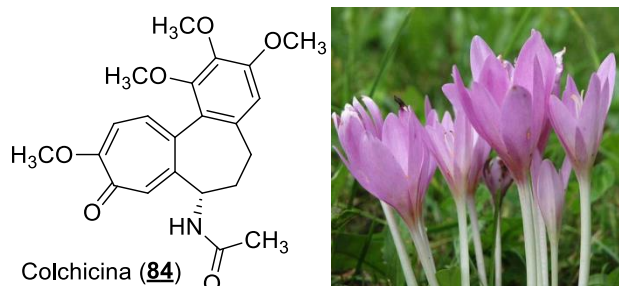


Figura 78: Estrutura química da colchicina (**84**) à esquerda e flores de *Colchicum autumnale* à direita.

Outro sítio de ligação explorado na tubulina envolve uma região situada na interface entre dois heterodímeros de tubulina, na subunidade β (CHI, 2015). Nessa região se ligam os alcaloides da vinca (*Catharanthus roseus*), *e. g.* vimblastina (**85**) e vincristina (**86**). Apesar de ter sido utilizada em medicina popular durante muito tempo em vários locais do mundo como Índia, China e Havaí, a partir dos anos 50 *C. roseus* despertou o interesse de um grupo de cientistas do Canadá ao estudar o uso popular desta espécie na Jamaica no tratamento da diabetes (NOBLE, 1990). Apesar de os esforços na busca de substâncias antidiabéticas ter sido em vão, curiosamente foi percebida atividade citostática do extrato bruto de *C. roseus*, o que levou ao isolamento dos alcaloides (**85**) e (**86**), aos quais foram atribuídas estas propriedades. Estes alcaloides bis-indólicos monoterpênicos diméricos são produzidos em quantidades mínimas nos mesófilos das folhas de *C. roseus* (SOTTOMAYOR *et al*, 1998) através da ligação entre dois outros alcaloides, catarantina (**87**) e vindolina (**88**) (ALMAGRO *et al*, 2015), conforme apresentado na Figura 79. O mecanismo de ação de (**85**), (**86**) e demais alcaloides estruturalmente análogos envolve basicamente a supressão da polimerização dos microtúbulos na região (+) (BRANDÃO *et al*, 2010) e promovendo a despolimerização na região (-), o que faz com que estes derivados consigam alterar a dinâmica dos microtúbulos do fuso mitótico e bloquear os processos de divisão celular (PANDA *et al*, 1996). Além da alteração nos processos de polimerização/despolimerização, os alcaloides da vinca também promovem a fragmentação dos microtúbulos existentes através do destacamento de subunidades na região (-) do biopolímero (YANG *et al*, 2010).

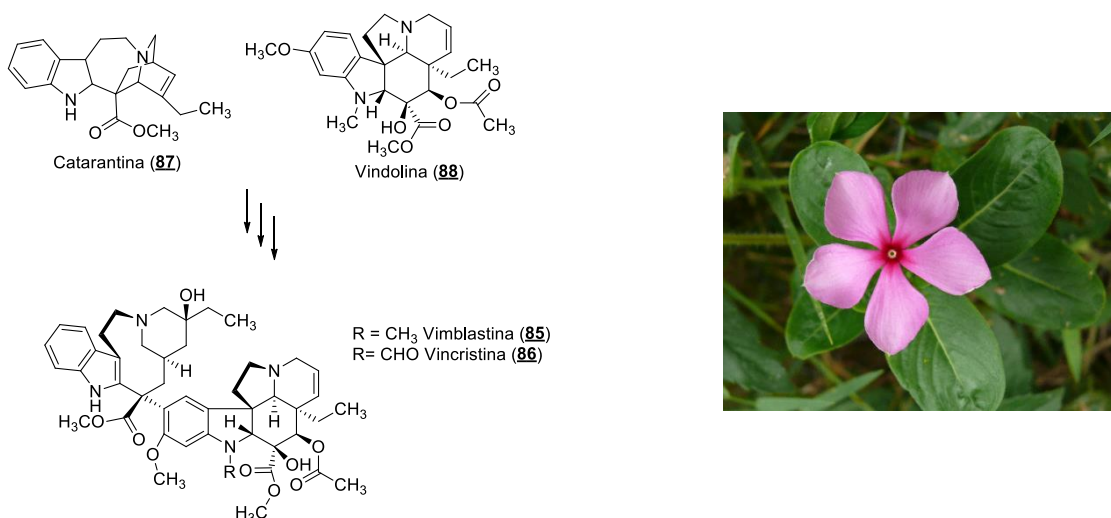


Figura 79: Imagem de *Catharanthus roseus* (vinca) à esquerda e estrutura dos alcaloides vimblastina (**85**) e vincristina (**86**), bem como seus precursores metabólicos catarantina (**87**) e vindolina (**88**).

A terceira abordagem mais frequente na alteração da dinâmica dos microtúbulos envolve não o aumento da despolimerização, mas sim o seu bloqueio; dessa forma, ao se estabilizar o microtúbulo, ele perde sua instabilidade dinâmica, que é necessária para o desempenho de suas funções. Este fenômeno ocorre por exemplo quando o paclitaxel (**89**), princípio ativo do Taxol[®], se liga a um local específico da subunidade β da tubulina (AMOS & LÖWE, 1999), conforme mostrado na Figura 80. O paclitaxel (**89**) é um produto natural identificado inicialmente como metabólito secundário do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*). Devido à pequena quantidade disponível na matriz natural e da dificuldade de manejo sustentável de culturas de *T. brevifolia*, passaram a ser utilizados métodos de semissíntese a partir do alcaloide 10-deacetilbacatina III (**90**) obtido das folhas de *Taxus baccata*, como por exemplo o método de Ojima e colaboradores onde o alcaloide (**90**) protegido é acoplado em C-13 com uma lactama (**91**) (OJIMA *et al*, 1992), conforme mostra a Figura 81. Posteriormente, uma série de abordagens biotecnológicas envolvendo cultura de células e expressão gênica em bactérias permitiu a obtenção de quantidades apreciáveis de (**89**) de forma menos custosa, apesar de o Taxol[®] ainda ser um medicamento bastante caro (FU *et al*, 2009).

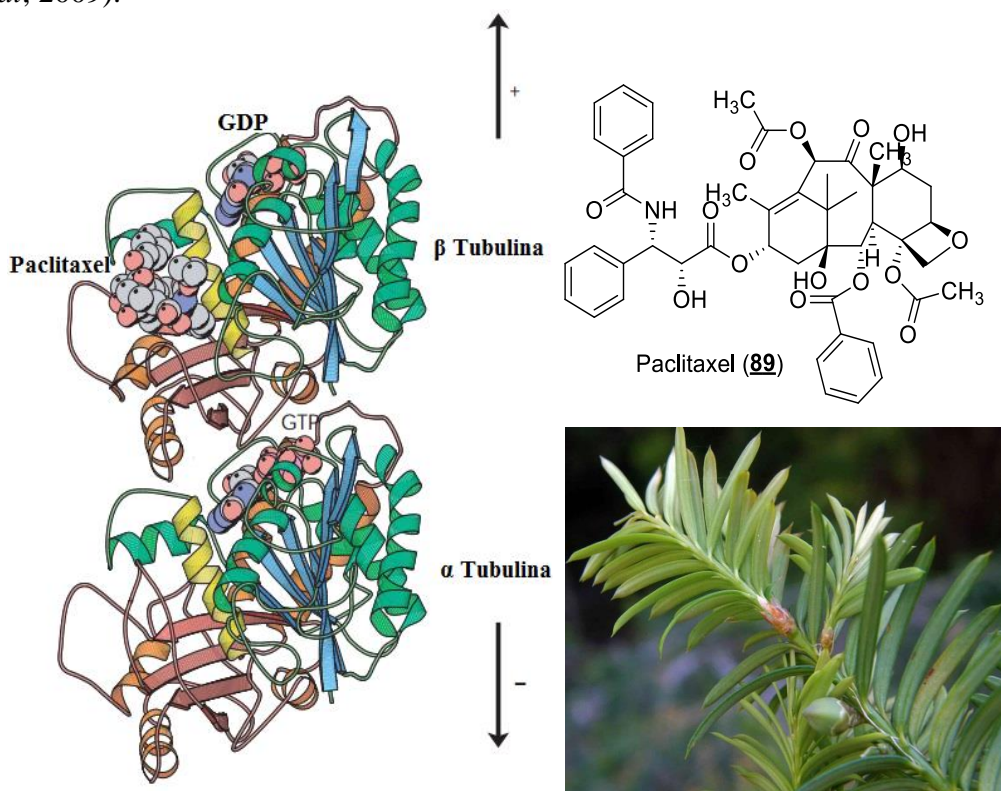


Figura 80: À esquerda, apresentação do sítio de ligação do paclitaxel (**89**) na subunidade β da tubulina (adaptado de AMOS & LÖWE, 1999). Acima, à direita, estrutura química do paclitaxel (**89**). Abaixo, à direita, imagem das folhas de *Taxus brevifolia* var *brevifolia*.

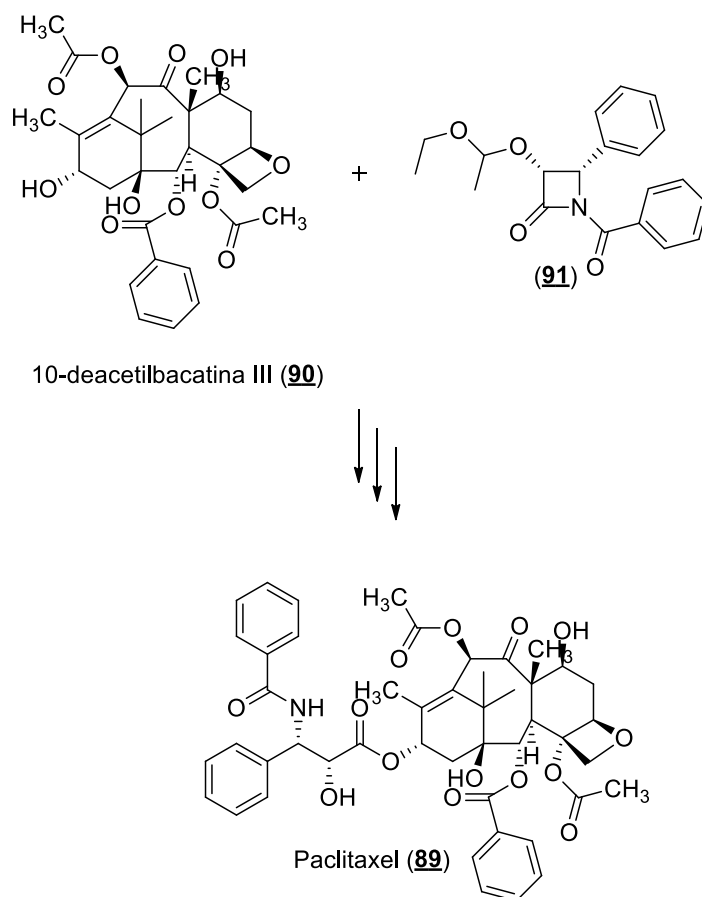


Figura 81: Estratégia sintética de Ojima e colaboradores para síntese do paclitaxel (**89**) a partir do alcaloide natural 10-deacetylbatatina III (**90**) e da lactama correspondente (**91**) (OJIMA *et al.*, 1992).

Na subunidade β -terminal da tubulina (região (+)), a natureza do nucleotídeo ali ancorado define se haverá polimerização ou despolimerização. A presença de GTP propicia polimerização e a presença de GDP, ao contrário, promove a despolimerização do microtúbulo naquela região. Isto ocorre porque a hidrólise do GDP altera a conformação da β -tubulina, o que causa uma cascata de eventos que altera a estrutura dos protofilamentos, tornando-os mais curvos e fazendo com que eles se projetem para fora dos microtúbulos (estrutura previamente mostrada na Figura 76, item 3). A presença do paclitaxel (**89**) ancorado na região adjacente ao sítio de ligação do GDP (denominada então “sítio do Taxol”) promove a estabilização do polímero, impedindo que aconteça então o equilíbrio necessário para a dinâmica de funcionamento correto do microtúbulo. Desta forma, então, os processos dependentes da dinâmica dos microtúbulos (*e. g.* mitose) são interrompidos e a célula torna-se incapaz de realizar sua duplicação.

Estes 3 sítios são os principais paradigmas na pesquisa e desenvolvimento de substâncias com propriedades de modular os fenômenos celulares decorrentes da ação dos microtúbulos, e estão esquematizados na Figura 82. Cada um destes sítios possui uma série de ligantes conhecidos, cujas estruturas estão representadas na Figura 83.



Figura 82: Representação esquemática das localizações relativas dos sítios de ligação das principais classes de antitubulínicos.

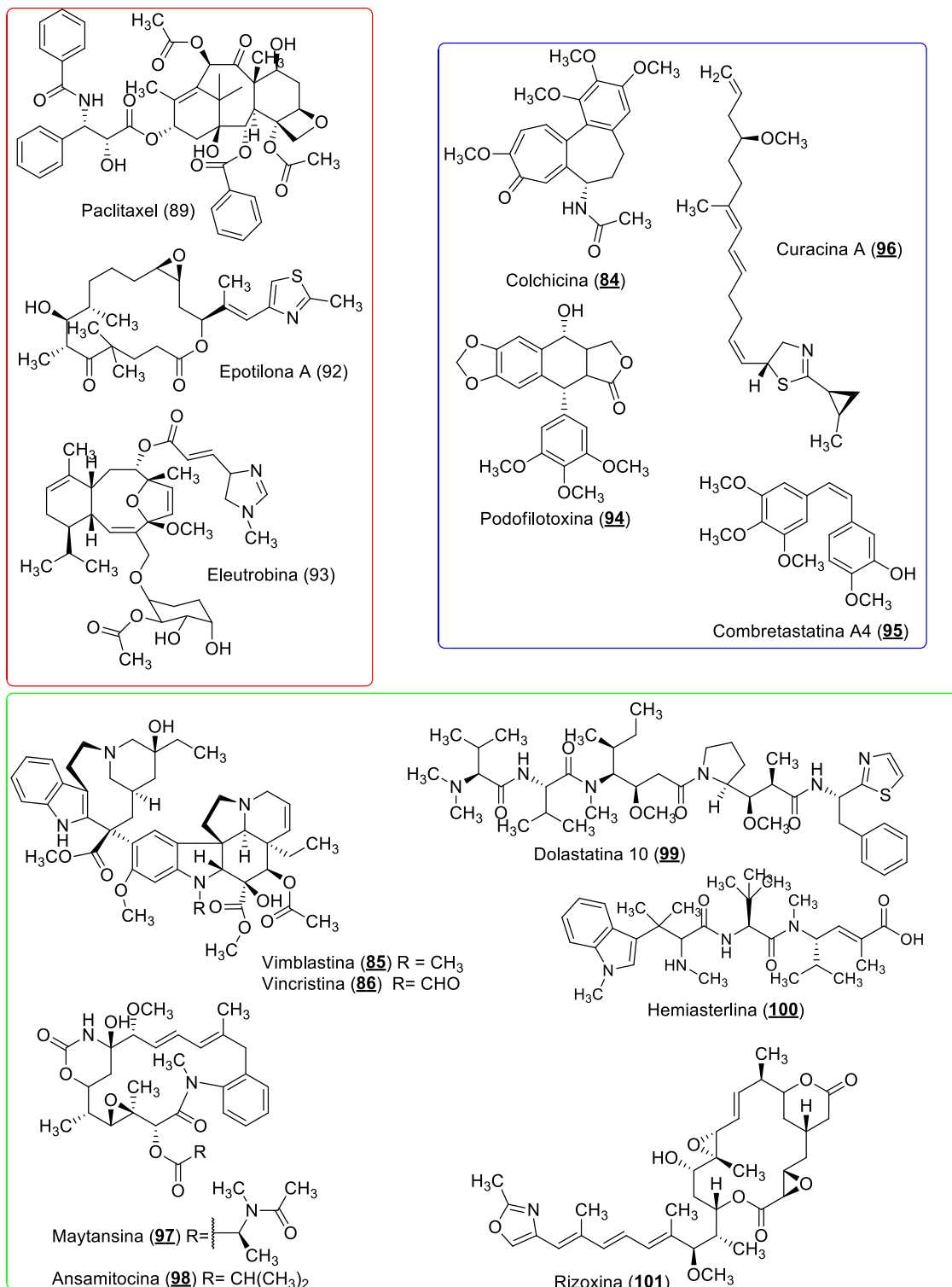


Figura 83: Estruturas de alguns dos ligantes dos três principais sítios de ligação da tubulina: sítio do taxol (vermelho), sítio dos alcaloides da vinca (verde) e sítio da colchicina (azul).

Alguns ligantes reconhecidamente inibidores de polimerização ou despolimerização dos microtúbulos podem, entretanto, se ligarem a outros pontos da tubulina. A curcumina (**3**), por exemplo, tem reconhecida participação na modulação do ciclo celular através de ligação em tubulina de células HeLa e MCF-7, reduzindo a atividade GTPase e parcialmente inibindo a atividade da colchicina (**84**) nestas células (GUPTA *et al*, 2006). Também foi reportado no trabalho de Banerjee e colaboradores que a curcumina (**3**) atua suprimindo a instabilidade

dinâmica de microtúbulos em células MCF-7 mantendo os microtúbulos em um estado metaestável tal qual o paclitaxel (**89**) (BANERJEE *et al*, 2010). Entretanto, o trabalho de Banerjee e colaboradores sugeriu que a curcumina (**3**) não interagia em nenhum dos três sítios mais conhecidos da tubulina (sítios do taxol, dos alcaloides da vinca e da colchicina), o que levou Chakraborti e colaboradores a realizarem experimentos que permitissem elucidar o local de ligação da curcumina (**3**) na tubulina. Utilizando um experimento de Transferência Ressonante de Energia por Fluorescência (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET), Chakraborti e colaboradores definiram que a curcumina (**3**) se liga entre dois heterodímeros de α,β -tubulina, a 32Å do sítio da colchicina (CHAKRABORTI *et al*, 2010), conforme mostra a Figura 84.

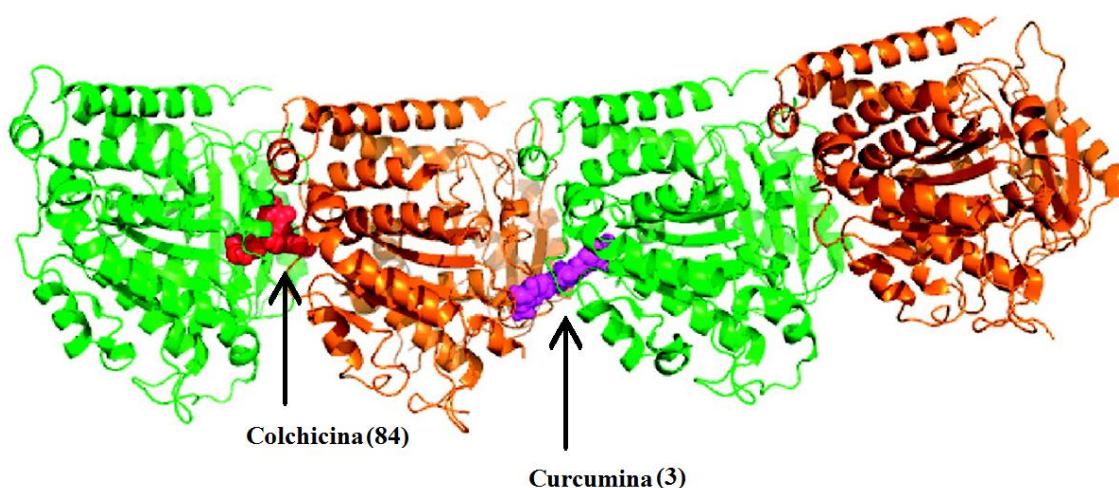


Figura 84: Modelagem molecular da curcumina (**3**) ligada entre dois heterodímeros de tubulina (α em laranja, β em verde). Colchicina (**84**) está representada em vermelho e a curcumina (**3**) em magenta. Adaptado de CHAKRABORTI *et al*, 2010.

Esses resultados em células eucarióticas de mamíferos agrupam uma série de diretrizes que permitem extrapolar informações para sistemas celulares de tripanossomatídeos, a fim de caracterizar a tubulina como alvo também no controle do ciclo celular destes protozoários.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação de alterações ultraestruturais e investigação do mecanismo de ação da curcumina (3)

Os resultados apresentados pela curcumina (3) e seus análogos mostrou este produto natural como um protótipo promissor na pesquisa de novas moléculas com potencial tripanocida, devido a sua toxicidade seletiva frente ao parasito. Foram então realizados experimentos para verificar que tipo de alteração morfológica a curcumina (3) causa em formas epimastigotas de *T. cruzi* no nível subcelular do parasito, o que pode permitir uma compreensão mais detalhada acerca dos possíveis mecanismos de ação antiparasitária de (3) (VANNIER-SANTOS *et al*, 2009). Foram então realizados experimentos de Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Eletrônica de Transmissão de parasitos tratados tanto com a curcumina (3) quanto com os curcuminoídeos naturais (4) e (5), cujos resultados são apresentados e discutidos a seguir.

A ação dos compostos (3-5) na sobrevivência e proliferação das células de *T. cruzi* parecem estar relacionadas com seus efeitos em vias metabólicas associadas à síntese de ergosterol (68) e de poliaminas, os quais podem alterar a arquitetura celular (SOARES-BEZERRA *et al*, 2004). Diferentes antimicrobianos podem gerar protusões na superfície da célula de *T. cruzi* como as que foram vistas, como por exemplo derivados da lapachona, ésteres de forbol e diaminas estruturalmente análogas à putrescina (VANNIER-SANTOS *et al*, 2009). O tratamento de *T. cruzi* com (3) na concentração de 10,23 μM , como mostra a Figura 91, causa a formação de múltiplos flagelos, que se apresentam em tamanho menor, o que também foi previamente observado em células de *T. cruzi* tratadas com ácido arjunólico, o que pode indicar interferência na polimerização dos microtúbulos (SOUZA-NETO *et al*, 2014). Corpos celulares arredondados apresentando diversas invaginações longitudinais características de divisão celular incompleta também foram observados; imagens similares foram obtidas com promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com vimblastina (85), que é um reconhecido antitubulínico causador de alterações na polimerizações de microtúbulos (BORGES, 2005). As protusões flagelares também podem estar envolvidas com o conteúdo fosfolipídico da membrana celular (SANTA-RITA *et al*, 2000). O destacamento de porções do flagelo também foram observados em *Trypanosoma* e *Leishmania* tratados com inibidores da síntese de esteroides (GRANTHON *et al*, 2009) e ésteres de forbol (DeCARVALHO *et al*, 1987). Este conjunto de alterações flagelares e no corpo celular devem então ser decorrentes da atividade da curcumina (3) sobre a organização do citoesqueleto do parasito. Já foi previamente observado que (3) causa desorganização nos microtúbulos de células tumorais (JIANG, 2013 *et al*; BLAKEMORE *et al*, 2013) e em *Plasmodium falciparum* (CHAKRABARTI *et al*, 2013).

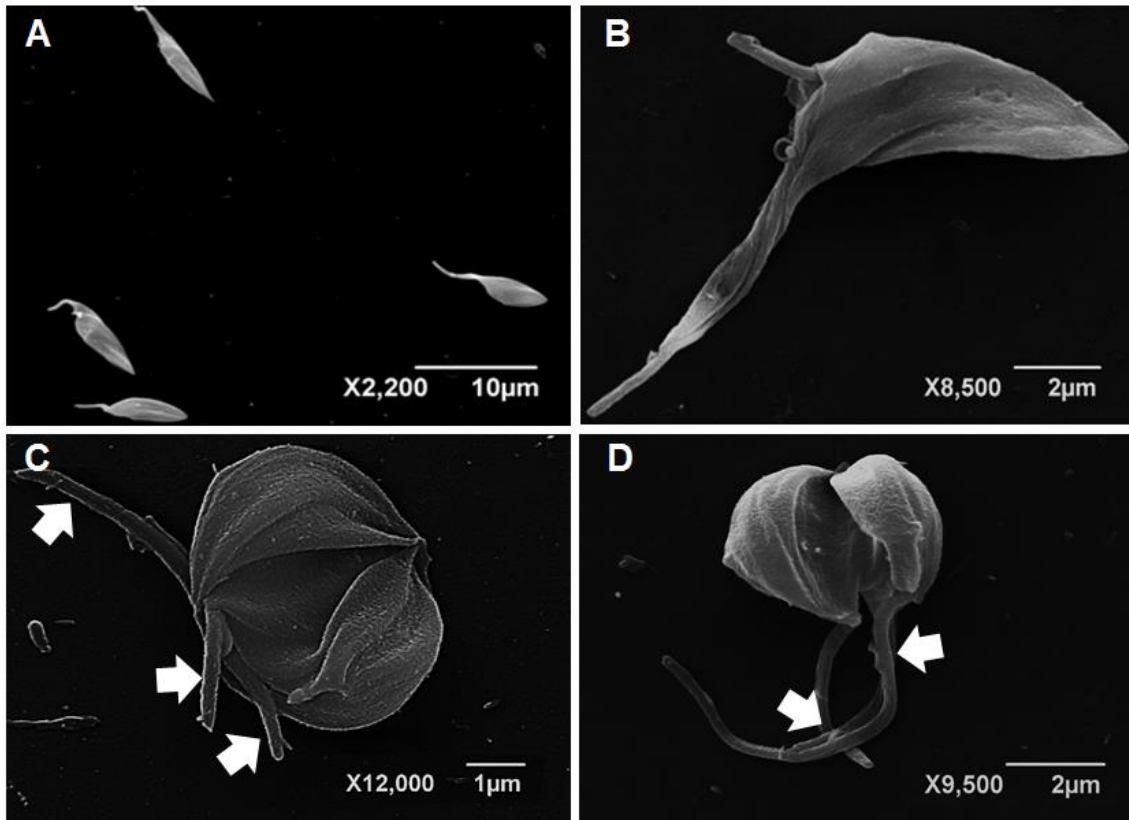


Figura 91: Microscopia eletrônica de varredura de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Células não-tratadas (A) apresentam morfologia alongada usual e superfície celular lisa. Parasitos tratados com 10,23 μM de curcumina (3) por 24h (B-D) apresentam redução do volume celular (B), bem como corpo celular arredondado com múltiplas invaginações envolvendo a porção anterior do parasito (C, D). Algumas células apresentaram flagelos múltiplos e menores (C, setas). Protusões flagelares na membrana também foram observados (D, setas).

Parasitos tratados com os curcuminoides (4) e (5) apresentaram aparente decréscimo no volume celular (Figuras 92 e 93), possivelmente devido à perda de conteúdo citoplasmático decorrente da desorganização do citoesqueleto.

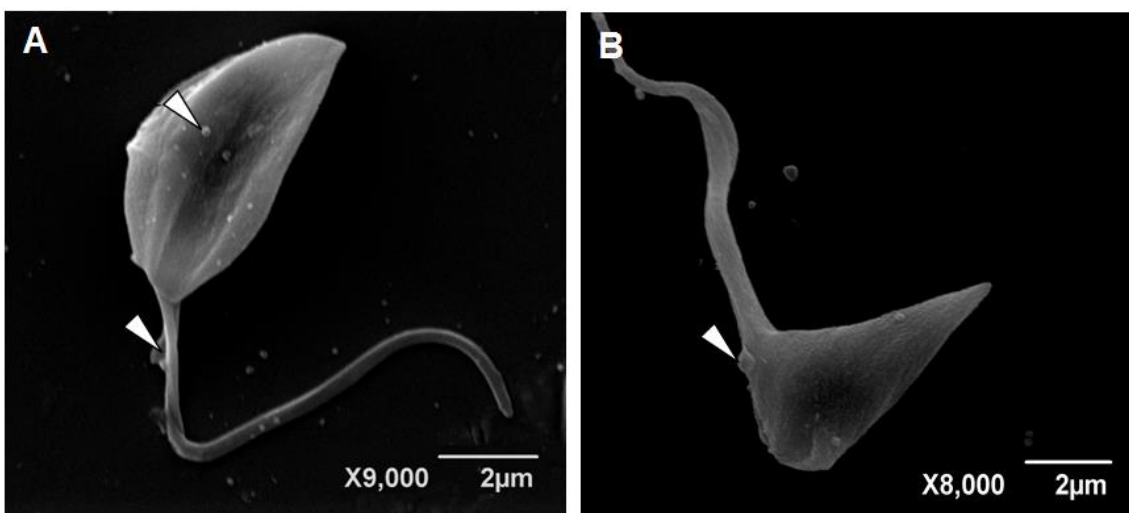


Figura 92: Microscopia eletrônica de varredura de epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas com 11,07 μM de desmetóxi-curcumina (DMC, 4) por 24h (A, B). Há uma aparente diminuição do volume celular e presença de protusões por todo o corpo celular (setas).

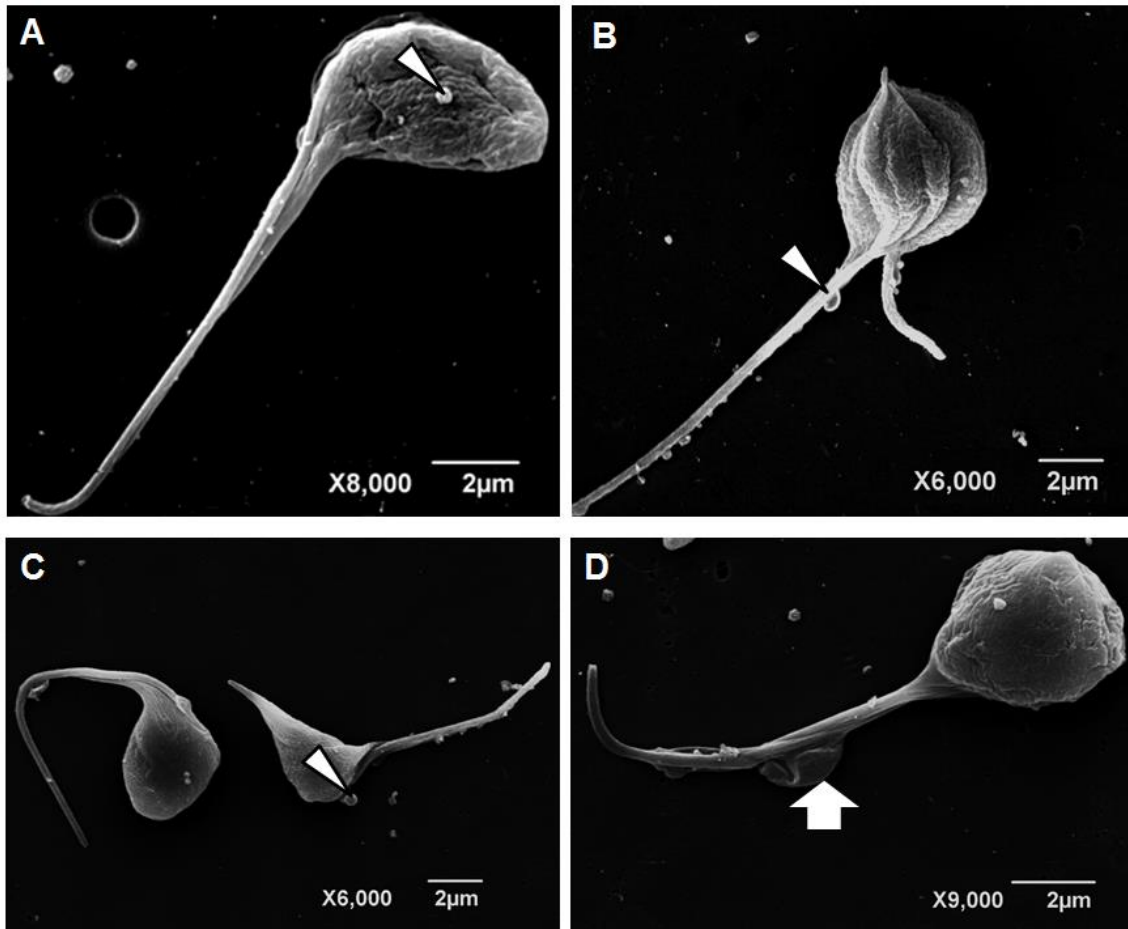


Figura 93: Microscopia eletrônica de varredura de epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas por 72h com desmetóxi-curcumina (DMC, **4**) na concentração de 11,07 μM (A e B) e bisdesmetóxi-curcumina (BDMC, **5**) na concentração de 45,33 μM (C e D). Os corpos celulares dos parasitos apresentam superfícies onduladas (A) ou enrugadas (B), além da redução do volume celular (A-D). Grandes protuberâncias flagelares foram observadas (D, seta).

Epimastigotas tratadas com curcumina (**3**) apresentaram desorganizações na base do flagelo, comumente associadas à desorganização dos microtúbulos, e as protusões da membrana apresentaram-se desprovidas de conteúdo citoplasmático, indicando também alteração da dinâmica dos microtúbulos. Estas alterações, apresentadas na Figura 94, apontam para um citoesqueleto funcionalmente debilitado.

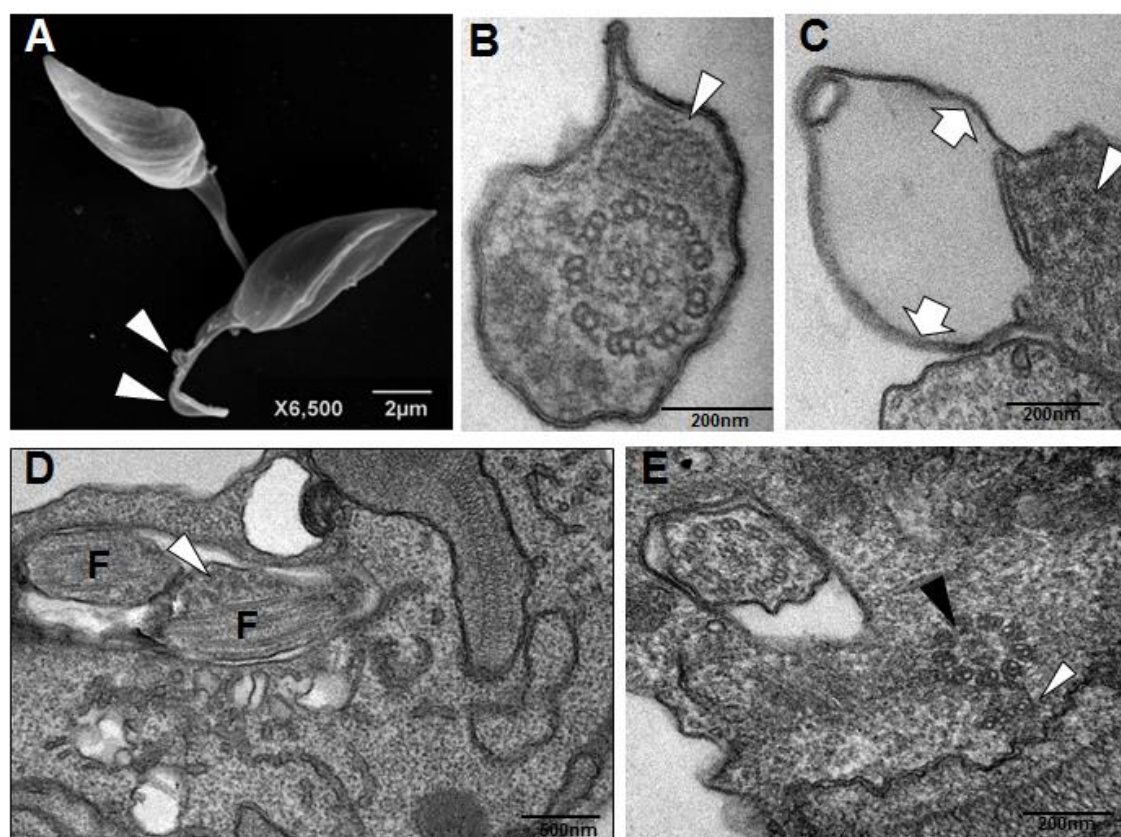


Figura 94: Microscopia eletrônica de varredura mostrando formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com curcumina (**3**) por 48h (A) e microscopia eletrônica de transmissão dos parasitos tratados por 72h (B-E). Curcumina (**3**) na concentração de 10,13 μM induziu a formação de protusões flagelares (A, setas). A haste paraflagelar (B, seta branca) está parcialmente desorganizada (B, seta preta). Além da desorganização intraflagelar (C, seta), parasitos tratados com (**3**) apresentaram destacamento da membrana flagelar (C, flechas). Essa desorganização foi observada no flagelo (F) e no lúmen da bolsa flagelar (D, seta) e pode estar associada a alterações do corpo basal (E, seta preta), que incluem microtúbulos ectópicos (E, seta branca).

Análise cromatográfica do perfil lipídico de epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com curcuminoides naturais.

O destacamento da membrana flagelar foi observado em *T. cruzi* e *L. amazonensis* tratados com inibidores da biossíntese de esteróis (VANNIER-SANTOS *et al*, 2009). Foi, então, investigada a composição lipídica das membranas de *T. cruzi* tratados com curcumina (**3**) a fim de verificar sua eventual influência sobre essa via bioquímica. A esterol 14 α -desmetilase (CYP51) é a enzima envolvida na conversão de lanosterol (**71**) a ergosterol (**68**) no parasito pela remoção oxidativa do grupamento metila na posição 14 α do esqueleto ciclopentano-peridrofenantreno do lanosterol (**71**), sendo então uma etapa-chave na biossíntese dos lipídios de membrana, *e. g.* ergosterol (**68**), e consequente manutenção da viabilidade celular (SUETH-SANTIAGO *et al*, 2015b). O método utilizado foi adaptado de Pinto e colaboradores, que realizou a quantificação dos lipídios de membrana de fungos (PINTO *et al*, 2011). Formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) foram cultivadas em meio de cultura BHI em tubo cônico. Algumas culturas foram tratadas com curcumina (**3**) na concentração de 10 μM . Após 7 dias, os tubos foram submetidos à centrifugação e o conteúdo depositado no fundo sob a forma de *pellets* foi submetido à saponificação com solução alcoólica de hidróxido de potássio. Nesse momento, todos os fosfolipídios de membrana com grupamentos ácidos encontram-se ionizados, ao passo que os esteróis, por não possuírem prótons suficientemente ácidos, são mantidos na forma molecular. É então realizada uma

partição com *n*-hexano para que os lipídios não-saponificáveis, *e. g.* ergosterol (**68**) e lanosterol (**71**), sejam extraídos pela fase orgânica e analisados por CLAE. Os cromatogramas referentes a este experimento estão agrupados na Figura 95.

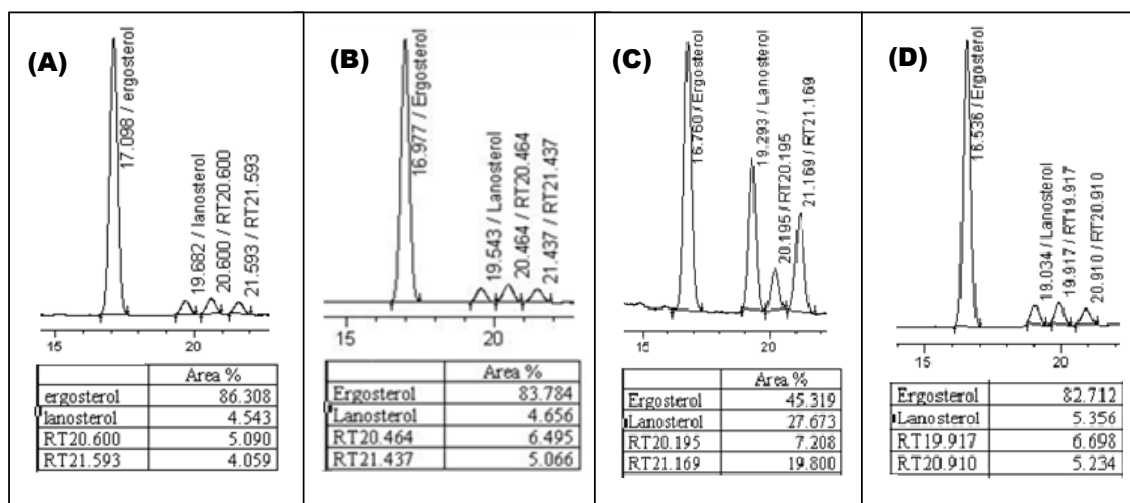


Figura 95: Cromatogramas representativos da fração lipídica não-saponificável de formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidos por CLAE. (A) Controle negativo: epimastigotas cultivadas sem tratamento. (B) Controle do solvente: epimastigotas tratadas com DMSO 0,2%. (C) Controle positivo: epimastigotas tratadas com posaconazol a 0,05 μ M. (D) Epimastigotas tratadas com curcumina (**3**) 10 μ M.

Apesar de os resultados de microscopia eletrônica indicarem uma possível inibição das vias bioquímicas de síntese de lipídios de membrana que pudesse justificar o mecanismo de citotoxicidade de (**3**) frente a *T. cruzi*, a análise cromatográfica da razão lanosterol/ergosterol mostrou que não havia diferença significativa entre as situações tratadas com (**3**) e os controles não-tratados (Figura 95 A, B e D). Além disso, o controle positivo, tratado com posaconazol, um conhecido inibidor de CYP51 de *T. cruzi*, mostrou uma diferença significativa na quantidade relativa destes dois esteróis (Figura 95 C). Estes resultados apontam então para outro possível mecanismo de ação, envolvido no comprometimento do citoesqueleto do parasito.

Análise de citometria de fluxo de epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com curcuminoides naturais

Foi então realizada uma análise de citometria de fluxo de culturas de *T. cruzi* a fim de verificar os efeitos dos curcuminoides naturais no ciclo celular (representada por um histograma típico, como mostra a Figura 96), onde foi observado que o tratamento com curcumina (**3**) e DMC (**4**) resultou no acúmulo de células na fase G2/M e redução de células na fase G1 de uma maneira dependente de concentração (Figura 97). Nas culturas tratadas com (**3**), (**4**) e (**5**) na concentração de 100 μ M foi observado um acúmulo de, respectivamente, 45%, 52% e 40% das células na fase G2, ao passo que no controle não-tratado esta população era de 20%. A capacidade de acumular células na fase G2/M é característica de derivados que interagem com os microtúbulos (CASTEDO *et al*, 2004). Por esta razão, foi utilizado paclitaxel (**89**) como controle positivo, já que este derivado é reconhecidamente ativo contra tripanossomatídeos (DOSTÁL & LIBUSOVÁ, 2014; BAUM *et al*, 1981). Consistente com sua atividade nos microtúbulos, (**89**) provocou um acúmulo de 57% das células na fase G2. Desta forma, a atividade dos curcuminoides (3-5) no ciclo celular de *T. cruzi* podem ser explicados, pelo menos em parte, pela perturbação da instabilidade dinâmica dos microtúbulos de forma análoga ao paclitaxel (**89**). No controle tratado com (**89**), contudo, há

uma quantidade expressiva de parasitos na fase sub-G1, o que é possivelmente decorrente da presença de células em apoptose. Este fenômeno não foi observado no tratamento com os curcuminoides, o que pode indicar que a morte celular não é decorrente de fenômenos apoptóticos.

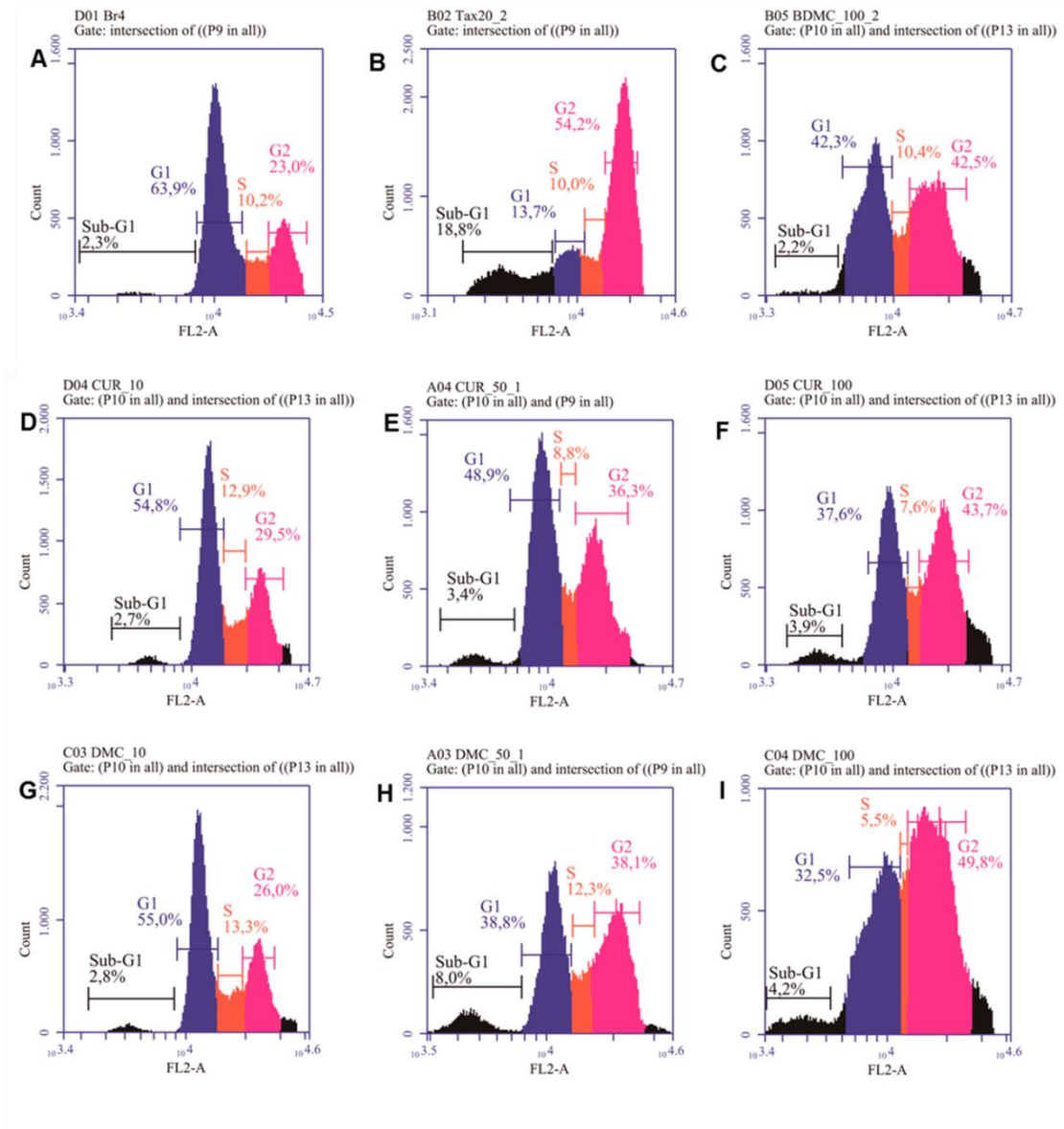


Figura 96: Histogramas de fluorescência mostrando o conteúdo de DNA nas fases do ciclo celular (Sub-G1, G1, S e G2) dos parasitos (formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Dm28c). A) Controle negativo (DMSO 0,02%). B) Controle positivo (paclitaxel 20 μ M). C) tratamento com 100 μ M de BDMC (5). D) tratamento com 10 μ M de curcumina (3). E) tratamento com 50 μ M de (3). F) tratamento com 100 μ M de (3). G) tratamento com 10 μ M de DMC (4). H) tratamento com 50 μ M de (4). I) tratamento com 100 μ M de (4).

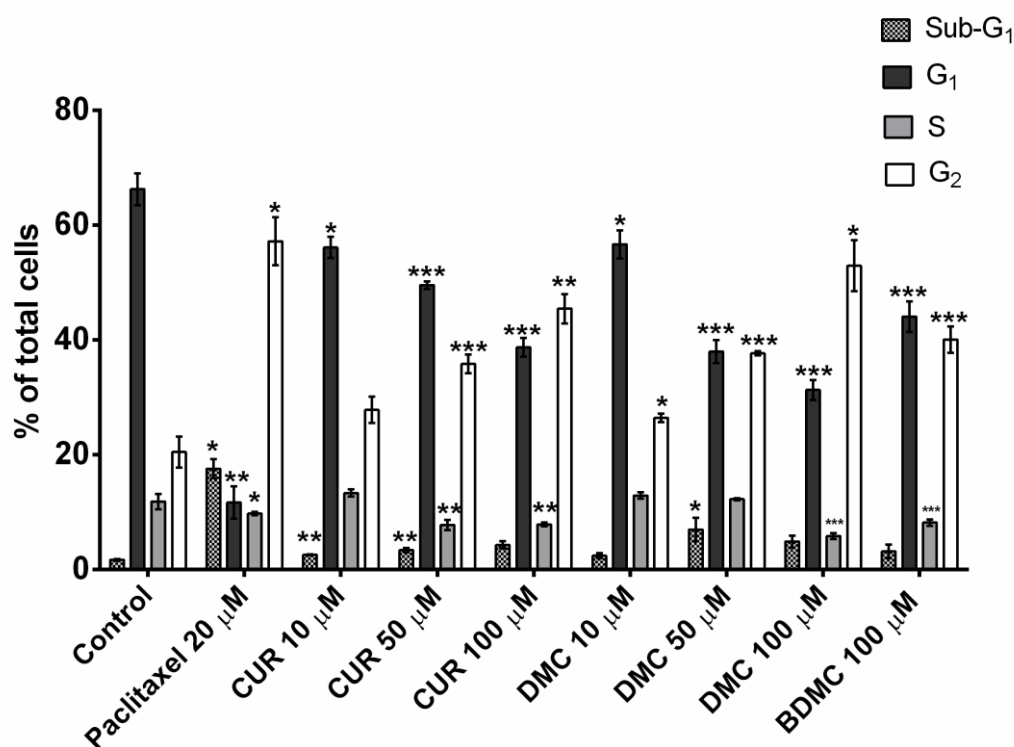


Figura 97: Porcentagem de epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) em diferentes fases do ciclo celular. Culturas foram tratadas com CUR (**3**) e DMC (**4**) nas concentrações de 10, 50 e 100 μM e BDMC (**5**) na concentração de 100 μM . Paclitaxel (**89**) foi utilizado como controle positivo (20 μM) e DMSO como controle negativo (0,02%). Resultados são representados com a média de triplicatas com desvio-padrão representado pelas barras de erro. Significância estatística relativa ao controle * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Construção do modelo de tubulina de *T. cruzi* e ancoramento dos diarileptanoides naturais por Modelagem Molecular

Com base em dados da literatura que indicam a tubulina como possível alvo na quimioterapia antichagásica, foi realizada a construção de um modelo teórico da tubulina a fim de verificar o modo de ligação dos curcuminoides no sítio ativo adequado e justificar as diferenças observadas para as atividades da curcumina (**3**) e seus análogos naturais (**4**) e (**5**). Não existe estrutura cristalográfica disponível da tubulina de *T. cruzi*, por isso foi necessário a construção de um modelo tridimensional para os estudos de ancoragem molecular. As sequências de aminoácidos de α e β tubulina de *T. cruzi*, entretanto, estão disponíveis na base de dados Swiss-Prot UniProtKB (Q27352 para a α -tubulina e P08562 para a β -tubulina), que foram utilizados separadamente para a construção de modelos de homologia. De modo a abranger todos os possíveis sítios de interação da tubulina, tanto nas interfaces α/β quanto β/α , foi construído um heterotrímero de tubulina. O β - α - β heterotrímero foi construído utilizando como molde as cadeias B, C e D de uma estrutura depositada no PDB sob o código 4I50, que contém um complexo de tubulina bovina com epotilona-A (PROTA, 2013). A Tabela 8 apresenta alguns detalhes acerca dos moldes de tubulina: código no PDB, identidade na sequência de aminoácidos, GMQE (*Global Model Quality Estimation*), que é um parâmetro que oscila entre 0 e 1 e expressa a exatidão do modelo construído entre a estrutura teórica e a experimental (BIASIANI *et al*, 2014), QMEAN4, que é uma função de pontuação para a estimativa de qualidade do modelo global e local, que consiste em quatro descritores estruturais (BENKERT *et al*, 2011) e possui informações de estrutura quaternária entre os modelos.

Tabela 8: Modelos das subunidades de tubulina de *T. cruzi*.

Subunidade da tubulina	Código no PDB do molde (cadeia)	Identidade (%)	GMQE	QMEAN4
β -tubulina	4I50 (B)	85.27	0.98	-1.61
α -tubulina	4I50 (C)	84.04	0.94	-1.38
β -tubulina	4I50 (D)	84.74	0.93	-1.47

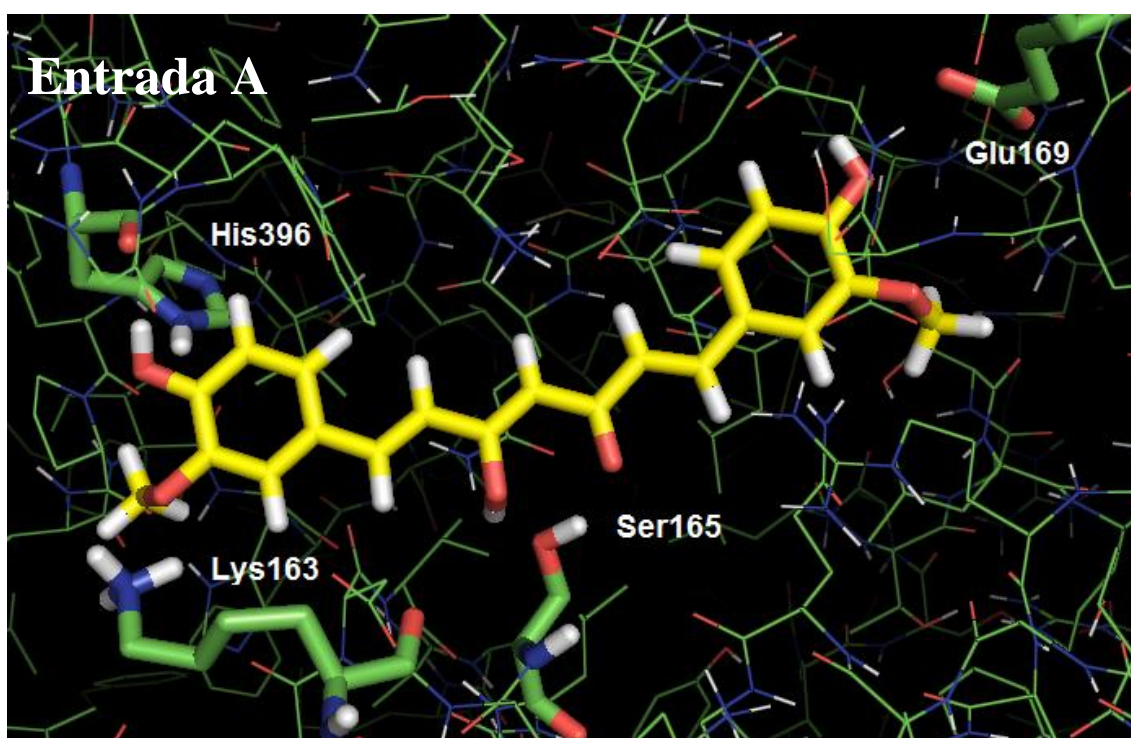
O heterotrímero foi construído com o programa Swiss PDB-Viewer 4,01 por sobreposição de cada modelo monomérico das subunidades de *T. cruzi* com as cadeias B, C e D da tubulina-molde 4I50. O modelo de tubulina de *T. cruzi*, após minimização de energia com o campo de forças GROMOS96 (VAN GUNSTEREN *et al*, 1996), disponível no Swiss PDB-Viewer 4.01, apresentou um valor de RMSD (*Root-mean-square deviation*) bastante baixo quando comparado com 4I50 (0.36 Å) e foi usado para subseqüente estudos de ancoragem molecular dos derivados naturais previamente testados no experimento de citometria de fluxo.

Os experimentos de ancoramento molecular foram iniciados com o *re-docking* de colchicina (**84**) e vimblastina (**85**) (conhecidos ligantes de tubulina) nos seus respectivos sítios com as quatro funções de pontuação disponíveis no *software* GOLD 5.2. A função de pontuação padrão, ChemPLP (KORB *et al*, 2009) foi escolhida para o experimento de ancoramento dos curcuminoides (3-5) devido à sua maior eficiência tanto para predição dos modos de ligação quanto para triagens virtuais de compostos. Com o ChemPLP, o valor de RMSD entre as melhores formas de ligação e as respectivas estruturas cristalográficas da vimblastina (**85**) e colchicina (**84**) foram de 0.98 e 0.21 Å, respectivamente, indicando uma boa qualidade da predição do modo de ligação do modelo escolhido.

Como esperado dos resultados obtidos de Chakraborti e colaboradores com a tubulina de *B. taurus*, todos os três curcuminoides puderam ser eficientemente ancorados na tubulina de *T. cruzi* no “sítio de ligação da curcumina” (CHAKRABORTI *et al*, 2011) descrito por este grupo, localizado na interface entre as subunidades β e α das subunidades de tubulina. As pontuações observadas para os melhores modos de ligação possuem relevante correlação com os valores de CI_{50} observados experimentalmente, pois foi observada uma semelhança nos modos de interação de (**3**) e (**4**), e uma interação menos eficiente em (**5**), conforme mostra a Tabela 9. A análise destes resultados mostra que apesar dos modos de ligação serem bastante similares, (**3**) e (**4**) realizam uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo de lisina Lys163 com a segunda metoxila (Figura 98 A e B), que por estar ausente em (**5**), impede que haja essa interação favorável no sítio do receptor (Figura 98 C). A falta da metoxila não diminui a atividade de (**4**) pois apenas uma das aril-metoxilas de (**3**) realiza ligação de hidrogênio com a lisina Lys135 do biorreceptor (Figura 98, Tabela 9).

Tabela 9: Pontuações no ChemPLP e distância das ligações de hidrogênio entre os curcuminoides (3-5) no ancoramento na tubulina de *T. cruzi*.

Ligante	Pontuação no ChemPLP	Distâncias das ligações de hidrogênio (Å)			
		Glu169	Lys163	Ser165	His396
CUR (3)	51.56	2.90	2.83	2.35	2.88
DMC (4)	50.06	2.99	2.63	2.43	2.92
BDMC (5)	46.49	2.96	-	2.57	3.05



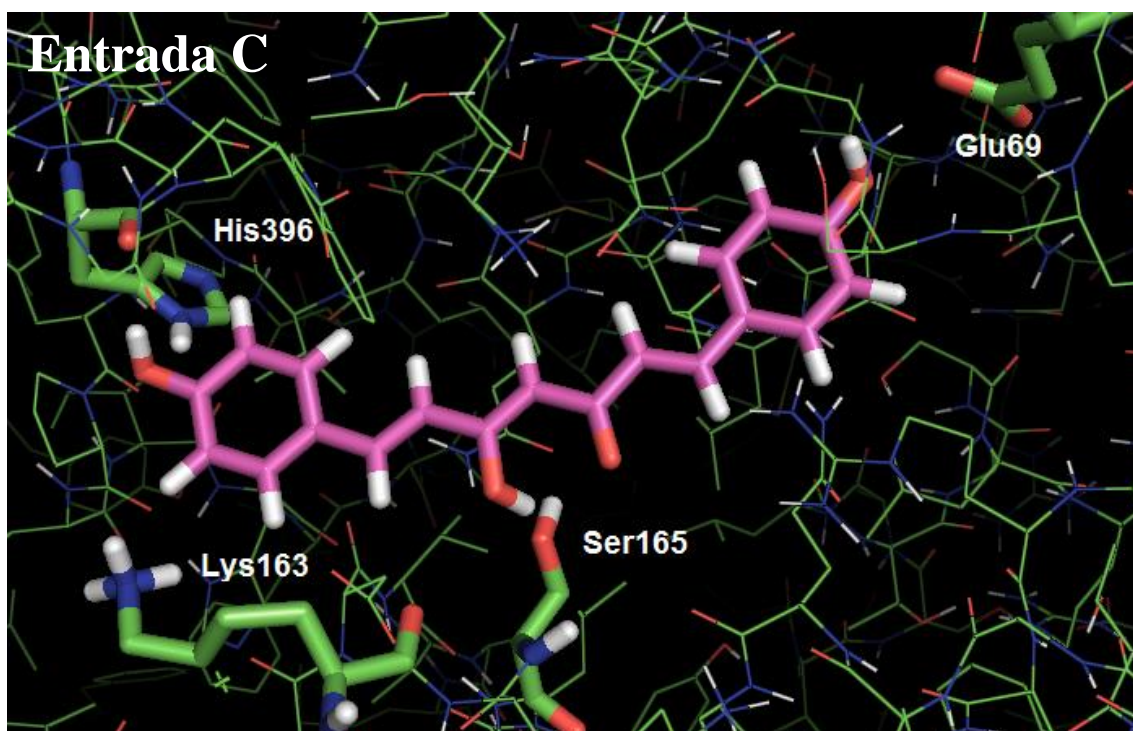
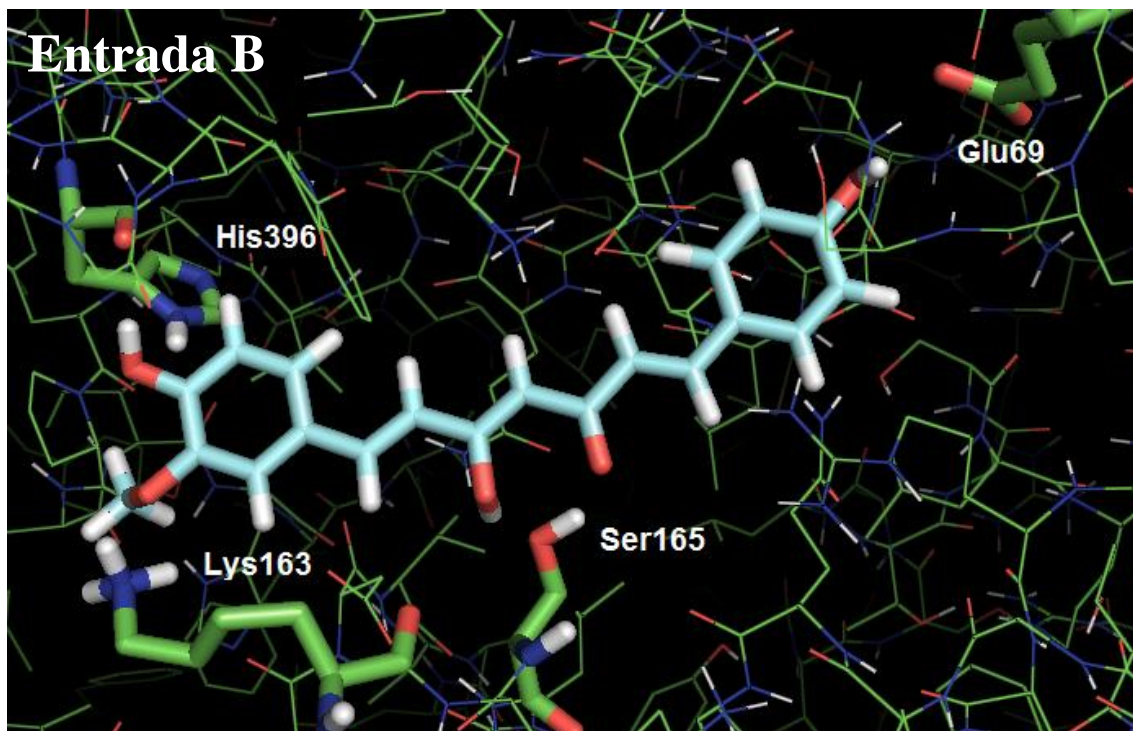


Figura 98: Sobreposição dos melhores modos de ligação de curcumina (3, entrada A), DMC (4, entrada B) e BDMC (5, entrada C) após ancoramento no “sítio da curcumina” do modelo de tubulina de *T. cruzi*. Átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza. Átomos de carbono em verde: tubulina; amarelo: (3); ciano: (4); magenta: (5). Imagem gerada com PyMOL, DeLano Scientific LLC.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A análise da atividade tripanocida dos quatro curcuminoides naturais **(3)**, **(4)**, **(5)** e **(8)** sugere que a subunidade 1,3-dicetônica e o padrão estrutural C₆-C₇-C₆, característico dos diarileptanóides, são fundamentais para a atividade tripanocida, haja visto que a ciclocurcumina **(8)**, uma diidropiranona, não apresentou atividade no modelo e nas concentrações testadas. Comparando os valores de CI₅₀ dos outros três derivados, também percebe-se que uma das metoxilas é importante para a atividade, já que a remoção da primeira metoxila (comparação entre **(3)** e **(4)**) não acarreta perda de atividade, mas a retirada das duas leva a um decréscimo nas propriedades tóxicas do composto sobre *T. cruzi*.

Ao sintetizar um conjunto de derivados da curcumina **(3)**, inicialmente pode-se perceber que a metilação da hidroxila fenólica leva a um incremento da atividade, bem como a provável relação isostérica entre a subunidade 1,3-dicetona de **(3)** e o anel isoxazol de **(37)**. A hidrogenação das ligações duplas, com conseqüente aumento da liberdade conformacional da curcumina no sítio do receptor, leva a um decréscimo expressivo na atividade tripanocida. Tendo a informação de que o aumento da liberdade conformacional diminui a atividade biológica, foram sintetizados então quatro análogos conformacionalmente restritos, a fim de aumentar a atividade tóxica destas substâncias frente a *T. cruzi*. Curiosamente, apenas os derivados **(45)** e **(47)** (com anéis de seis membros) foram ativos, sendo **(46)** e **(48)**, derivados carbocíclicos de cinco membros, bem menos ativos que o protótipo natural. Ao ser feita a sobreposição as estruturas tridimensionais minimizadas foi possível observar que a presença dos metilenos próximos ao anel aromático (onde estão ligados substituintes potencialmente farmacofóricos) faz com que este anel adquira uma conformação espacial perpendicular à orientação inicial; os anéis de 6 membros possivelmente permitiram uma orientação mais adequada ao receptor hipotético, enquanto os anéis de 5 geraram um conformero de menor energia desprovido de atividade.

As pirimidinas 2-aminossustituídas, planejadas como inibidoras de tubulina, apesar de terem apresentado atividade estabilizadora de microtúbulos *in vitro* frente à tubulina bovina (resultados não reportados), não tiveram atividade tripanocida nos modelos testados, à exceção do derivado **(50)**, que originalmente foi concebido como intermediário-chave da rota sintética para uma síntese mais convergente. Este conjunto de moléculas, estruturalmente originais, pode ser utilizado em outros modelos biológicos, associados à dinâmica dos microtúbulos, como por exemplo em linhagens de células tumorais (trabalho em andamento). Esta rota sintética apresentou rendimentos razoáveis, tendo como principal desvantagem o baixo rendimento na última etapa, de desproteção das hidroxilas fenólicas, o que coloca como perspectivas duas abordagens: realizar a SNAr sobre a cloropirimidina desprotegida **(50)** ou ainda, utilizar um meio reacional mais seletivo para a remoção dos grupos protetores.

Os derivados **(45)**, **(47)** e **(50)** apresentaram toxicidade para todas as formas evolutivas de *T. cruzi*, sem comprometer a viabilidade dos macrófagos murinos nos modelos testados, além de serem mais potentes do que a curcumina. Todos os três derivados foram capazes de diminuir expressivamente tanto a quantidade de tripomastigotas liberados dos macrófagos infectados, quando a quantidade de amastigotas intracelulares, bem como o número de células infectadas.

O próximo passo na utilização destas substâncias envolverá a realização de ensaios *in vivo*, onde espera-se que estes possuam maior biodisponibilidade, quando comparados à curcumina, haja visto que o metileno reativo, responsável por grande parte do metabolismo de primeira passagem de **(3)** não está presente nas estruturas de **(45)**, **(47)** e **(50)**.

Os experimentos de microscopia eletrônica mostram alterações ultraestruturais no corpo celular do parasito tratado com curcumina apontaram para dois principais alvos: CYP 51 e tubulina. Apesar da curcumina não ter inibido CYP51 no modelo utilizado, o histograma da citometria de fluxo dos parasitos marcados com iodeto de propídio mostram uma quantidade expressiva de células estacionadas em fase G2, onde o DNA já está duplicado mas não há possibilidade de duplicação celular, uma vez que a alteração da instabilidade dinâmica dos microtúbulos impede que haja o aparecimento do fuso mitótico para dar continuidade aos processos de divisão celular. Desta forma, acredita-se que a curcumina é capaz de atuar, tal qual o paclitaxel, estabilizando microtúbulos e impedindo seu correto funcionamento.

Os experimentos de modelagem molecular corroboraram essa hipótese, haja visto que no modelo utilizado (tubulina de *T. cruzi* construída por homologia) o ancoramento dos curcuminoides naturais gerou um perfil muito semelhante àquele que foi observado, *in vitro*, com a (3) e (4) tendo propriedades semelhantes e (5) sendo bem menos ativo, possivelmente pela falta da interação entre a metoxila ausente em (5) e um resíduo de lisina do sítio presente na tubulina.

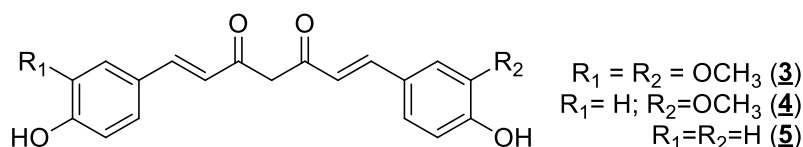
PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Generalidades:

O curso das reações foi monitorado por cromatografia em camada fina (CCF), realizada em placas de alumínio revestidas com sílica-gel (0,25 mm de espessura) em solvente apropriado e os *spots* visualizados sob luz ultravioleta (254 e 356 nm). As fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio anidro e os solventes removidos sob pressão reduzida e aquecimento em evaporador rotativo. As purificações por cromatografia em coluna, salvo exceções descritas no procedimento experimental, foram realizadas em coluna aberta utilizando sílica gel Aldrich 230-440 mesh.

Pontos de fusão (PF) foram determinados em um aparelho Büchi B-510 e não foram corrigidos. Os espectros de RMN ^1H (500 ou 400 MHz) e DEPTQ (125 ou 100 MHz) foram adquiridos a partir de um Bruker Ultrashield Plus Spectrometer (BrukerBioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemanha), Deslocamentos químicos (δ) foram reportados em partes por milhão (ppm) com relação ao DMSO- d_6 (2,50 ppm para ^1H e 39,7 ppm para ^{13}C) ou ao solvente indicado. As constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hertz (Hz). A multiplicidade dos sinais foi assinalada como simpleto (s), duplete (d), duplo-duplete (dd), tripleto (t), quarteto (q), multiplete (m) e sinal largo (sl). Todas as reações envolvendo aquecimento por micro-ondas foram realizadas em um sistema Discover SP (CEM Inc., Matthews, NC, USA) e foram realizadas à pressão atmosférica. Os espectros de Infravermelho (IV) foram obtidos nos espectrômetros Pekin-Elmer 1600 FT (PPGQO – UFRRJ), utilizando-se pastilhas de KBr para as amostras sólidas. As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu (LC-20AT), forno CTO 20A; detector PDA (SPD-M20A), auto-injetor Sil-10AF e controlador CBM-20A e coluna C18 Betasil-THERMO, 25 cm x 4,6 mm x 5 μm .

- Separação dos curcuminoides da matriz comercial (RASMUSSEN, 2000)



2g de curcumina, adquiridas da Aldrich[®], foram dissolvidos em 200 mL de metanol, mediante aquecimento. Após completa solubilização, 50mL de água destilada foram adicionados aos poucos. A solução foi filtrada a quente e após resfriamento os cristais formados foram coletados por filtração a vácuo. Após sucessivas recristalizações, 1,2g de curcumina pura foi coletada como um sólido alaranjado (60% de rendimento) e P. F. 182-185 (Lit. 183° C, RASMUSSEN, 2000).

(1E,6E)-1,7-bis(4-hidróxi-3-metoxifenil)hepta-1,6-dieno-3,5-diona

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9,70 (s, 2H, -OH); 7,57 (d, 2H, *J* = 15 Hz); 7,35 (s, 2H); 7,18 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 6,86–6,77 (m, 4H); 6,08 (s, 1H); 3,85 (s, 6H, -OCH₃).

DEPTQ (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 183,72; 149,84; 148,46; 141,22; 126,82; 123,64; 121,57; 116,19; 111,80; 101,37; 56,16.

IV (cm⁻¹): 3502, 3400, 3014, 2970, 2848, 1627, 1602, 1510, 1429, 1282, 1205, 1153, 1114, 1028, 962, 856, 808, 466.

MS/MS: *m/z* 369,1337 [M+H]⁺; 285,1126; 245,0809; 219,0653; 177,0548; 151,0754.

HRMS calculado para [C₂₁H₂₀O₆+H]⁺: 369,3878; encontrado: 369,1337.

A água-mãe das recristalizações foi reunida e o solvente evaporado sob pressão reduzida, gerando 0,72g de um sólido alaranjado enriquecido com os curcuminoides minoritários (**4**) e (**5**). Este sólido foi submetido a separação em coluna cromatográfica aberta recheada de sílica-gel, contendo NaH₂PO₄ adsorvido (a sílica-gel utilizada foi previamente adsorvida com diidrogenofosfato de sódio em acetona e após remoção do solvente foi ativada em estufa a 200° C por uma noite para minimizar a oxidação dos curcuminoides). Diclorometano foi utilizado como fase móvel e as frações recolhidas foram agrupadas de acordo com seu perfil em cromatografia em camada fina. A partir desta separação foram recolhidos os diarileptaóides (**3**), (**4**) e (**5**), os quais foram apropriadamente caracterizados.

Desmetóxi-curcumina (DMC, **4**) foi isolada como um sólido amorfo alaranjado, em rendimento de 14.25 %. PF 179-183°C (Lit.: 181-182 °C, RASMUSSEN, 2000).

(1E,6E)-1-(4-hidróxi-3-metóxfenil)-7-(4-hidroxifenil)hepta-1,6-dieno-3,5-diona

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 10,08 (sl, 1H, -OH); 9,72 (sl, 1H, -OH); 7,61-7,56 (m, 4H); 7,36 (s, 1H); 7,17 (s, 1H); 6,86-6,71 (m, 5H); 6,07 (s, 1H); 3,87 (s, 3H, -OCH₃).

DEPTQ (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 183,78; 183,65; 160,31; 149,85; 148,49; 141,22; 140,88; 130,86; 123,72; 121,52; 121,31; 116,41; 116,17; 111,70; 101,46; 56,16.

IV (cm⁻¹): 3390; 2922; 2848; 1625; 1571; 1510; 1431; 1280; 1261; 1136; 960, 827; 472.

MS/MS: *m/z* 339.1230 [M+H]⁺; 255,1018; 177,0547; 147,0441; 135,0028.

Bisdesmetóxi-curcumina (BDMC, **5**) foi isolada como um sólido avermelhado em 3,0 % de rendimento. PF 230-233 °C. (Lit.: 232-234 , RASMUSSEN, 2000)

(1E,6E)-1,7-bis(4-idroxifenil)hepta-1,6-dieno-3,5-diona

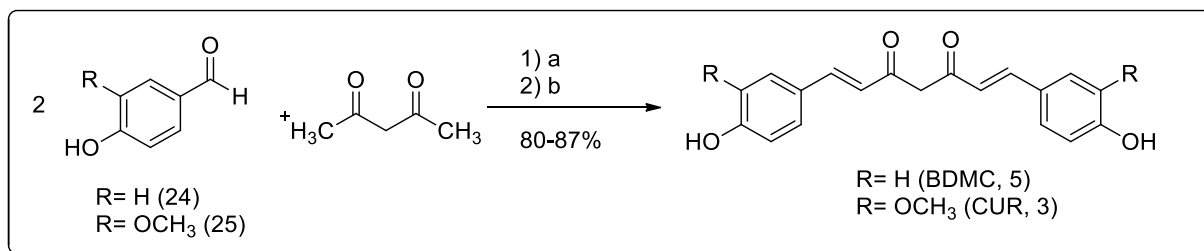
RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 10,09 (s, 2H, -OH), 7,58-7,54 (m, 4H), 6,83 (d, 4H, 8Hz), 6,71 (d, 2H, *J* = 18 Hz), 6,05 (s, 1H).

DEPTQ (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 183,68, 160,28, 140,84, 130,82, 126,27, 121,23, 116,37, 101,45.

IV (cm⁻¹): 3411, 3240, 2958, 2932, 2852, 1622, 1600, 1564, 1512, 1440, 1271, 1168, 1139, 983, 975, 831, 524, 474.

MS/MS: *m/z* 309.1126 [M+H]⁺; 225,0913; 189,0548; 147,0441.

Procedimento geral para a síntese dos curcuminoides naturais simétricos (3) e (4)
(WICHITNITHAD *et al*, 2011)



Reagentes: a) B₂O₃, B(BuO)₃, CH₃(CH₂)₃NH₂, Acetato de etila. b) HCl 1N

Acetilacetona (1,03 mL, 10 mmol) foi adicionada a uma solução de anidrido bórico (0,35 g, 5,0 mmol) em acetato de etila (30 mL), seguido da adição do aldeído (**24**) ou (**25**) (20 mmol) e tributilborato (10,8 mL, 40 mmol). A reação foi agitada a 50° C por 5min. Em seguida, foi adicionada *n*-butilamina (0,4 mL, 5,0 mmol) em acetato de etila (5 mL) gota-a-gota e o sistema foi aquecido a 80° C por 4 horas. 30 mL de ácido clorídrico 1N foi adicionado e a mistura foi agitada vigorosamente por 30 minutos. As fases foram separadas em funil de separação e a fase orgânica foi lavada 3x com solução de NaHCO₃ 5% e solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente retirado sob pressão reduzida. Os produtos crus correspondentes a (**3**) e (**5**) foram recristalizados e caracterizados, apresentando propriedades físico-químicas e espectros idênticos aos isolados da matriz comercial.

Procedimento para a síntese da ciclocurcumina (CC, **8**) (KIUCHI *et al*, 1993)



Reagentes e condições reacionais: a) Benzeno seco, ácido trifluoracético, t. a. 72h.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL de capacidade, 100 mg de curcumina (**3**) foi solubilizada em 20 mL de benzeno seco em peneira molecular. 0,6 mL de ácido trifluoracético foi adicionado e o sistema foi deixado em refluxo à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 72h. A mistura foi concentrada em pressão reduzida e submetida à coluna cromatográfica. 20mg (20% de rendimento) de ciclocurcumina (**8**) foi isolada como um óleo amarelo.

(E)-2-(4-hidróxi-3-metoxifenil)-6-(4-hidróxi-3-metoxiestiril)-2H-piran-4(3H)-ona

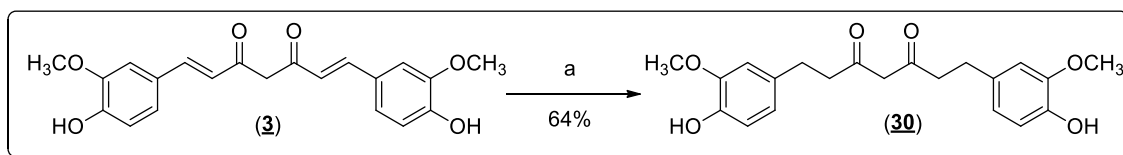
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,32 (d, 1H, $J=10$ Hz); 7,06 (d, 1H, $J=5$ Hz); 7,02 (m, 4H); 6,93 (d, 1H, $J=10$ Hz); 6,47 (d, 1H, $J=15$ Hz); 5,86 (s, 1H); 5,78 (s, 1H); 5,62 (s, 1H); 5,41 (dd, 1H, $J_1=15$ Hz, $J_2=5$ Hz); 3,98 (s, 3H); 3,96 (s, 3H); 2,96 (dd, 1H, $J_1=15$ Hz, $J_2=10$ Hz); 2,68 (dd, 1H, $J_1=15$ Hz, $J_2=5$ Hz).

DEPTQ (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 193,07; 168,90; 147,54; 146,61; 146,70; 146,23; 137,67; 130,38; 127,76; 122,52; 119,91; 118,93; 114,79; 114,55; 109,11; 109,00; 105,56; 80,88; 56,07; 56,00; 43,25.

IV (cm⁻¹): 3421; 2962; 2923; 2850; 1679; 1616; 1589; 1556; 1514; 1400; 1282; 1205; 1143; 1128; 1031; 846; 819; 723; 455.

MS/MS: m/z 369,1337 [M+H]⁺; 285,1126; 245,0809; 219,0653; 161,0958.

Procedimento para a síntese de **(30)** (GOMES *et al*, 2002)



Reagentes e condições reacionais: a) H₂, Pd/C 10%, EtOH, t.a. 4h

Em um balão de fundo redondo, 100 mg (0,27 mmol) de **(3)** foram solubilizados em 10 mL de etanol. A essa solução foram adicionados 50 mg de paládio sobre carbono 10%, e a mistura foi agitada, à temperatura ambiente, sob atmosfera de hidrogênio por 4h. A mistura foi filtrada sobre celite para remoção do catalisador, e a solução filtrada teve seu solvente removido sob pressão reduzida, gerando um óleo castanho. O produto bruto foi submetido à purificação em coluna empacotada com sílica-gel, utilizando CH₂Cl₂/MeOH 1% como eluente. O produto purificado (65mg, 64%, PF= 97°C) foi obtido como um sólido amorfo branco.

1,7-bis(4-hidróxi-3-metoxifenil)heptano-3,5-diona

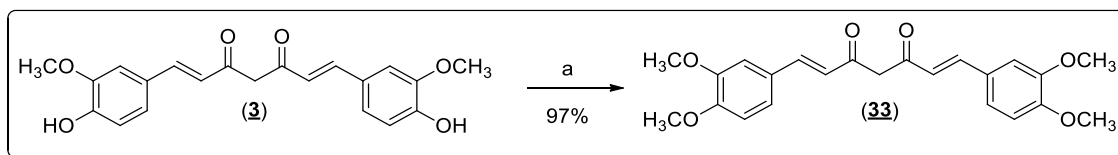
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 15,51 (sl, 1H); 6,85 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 6,70 (s, 2H); 6,68 (m, 2H); 5,53 (s, 2H); 5,45 (s, 1H); 3,88 (s, 6H); 2,87 (t, 4H, *J* = 10Hz); 2,57 (t, 4H, *J* = 10Hz);

DEPTQ (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 193,23; 146,39; 143,96; 120,80; 114,32; 110,90; 99,83; 55,86; 40,40; 31,31.

IV (cm⁻¹): 3409, 3015, 2930, 2846, 1707, 1607, 1030, 930, 861.

HRMS: *m/z* 372,1573 [M+H]⁺

Procedimento para a síntese do derivado **(33)** (HAHM *et al*, 2002)



Reagentes e condições reacionais: CH₃I, K₂CO₃, Acetona, refluxo, 6h.

Em um balão de fundo redondo com capacidade para 50 mL foram adicionados 500mg de curcumina comercial, que foram dissolvidos em 20 mL de acetona, seca em peneira molecular. Sobre esta solução foram adicionados 403 mg de K₂CO₃ e o conteúdo reacional foi agitado, vigorosamente, em banho de gelo. Gota a gota foram adicionados 6,1 mL de CH₃I. Em seguida, foi acoplado um condensador ao balão e o sistema foi mantido sob refluxo por 6 horas. Após arrefecimento, foram adicionados 20 mL de água gelada e foi realizada uma extração com CH₂Cl₂ em 3 porções de 20 mL. As fases orgânicas agrupadas foram lavadas com NaHCO₃ (aq) 5%, solução de NaCl saturada e, em seguida, seca com Na₂SO₄ anidro. A fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida, fornecendo um sólido que foi purificado por cromatografia em coluna aberta, empacotada com sílica-gel. Na purificação foi utilizado um gradiente de AcOEt/hexano. Foram isolados 235mg de sólido de coloração laranja (97%), PF= 123° C.

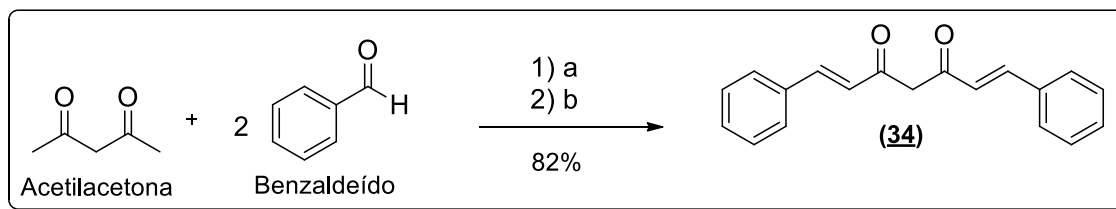
(1E,6E)-1,7-bis(3,4-dimetoxifenil)hepta-1,6-dieno-3,5-diona

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7,64 (d, 2H, *J* = 20 Hz); 7,44 (s, 2H); 7,38 (m); 7,34 (m); 7,03 (m, 2H); (7,03 (m, 2H); 6,80 (sl); 3,86 (s, 6H); 3,83 (s, 6H)

DEPTQ (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 182,89; 151,42; 149,50; 141,79; 128,41; 123,77; 119,29; 112,08; 111,19;

HRMS: *m/z* 396,1573 [M+H]⁺

Procedimento para a síntese de **(34)** (PABON, 1964)



Reagentes e condições reacionais: a) B_2O_3 , $B(BuO)_3$, $CH_3(CH_2)_3NH_2$, Acetato de etila, $80^\circ C$, 4h. b) HCl 1N, 30 min

Acetilacetona (0,5 mL, 5 mmol) foi adicionada a uma solução de anidrido bórico (0,17 g, 2,5 mmol) em acetato de etila (15 mL), seguido da adição do aldeído benzaldeído (1,0 mL, 10 mmol) e tributilborato (5,4 mL, 20 mmol). A reação foi agitada a $50^\circ C$ por 5 min. Em seguida, foi adicionada uma solução de *n*-butilamina (0,2 mL, 2,5 mmol) em acetato de etila (2 mL), gota-a-gota, e o sistema foi aquecido a $80^\circ C$ por 4 horas. Passado esse tempo, 10 mL de ácido clorídrico 1N foram adicionados e a mistura foi agitada vigorosamente por 30 minutos adicionais. As fases foram separadas em funil de separação e a fase orgânica foi lavada 3x com solução de $NaHCO_3$ 5% e solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca sob sulfato de sódio anidro, sendo então evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi submetido à cromatografia em coluna aberta, empacotada com sílica-gel, fornecendo 1,2g de um sólido amarelo-pálido de PF= $140^\circ C$.

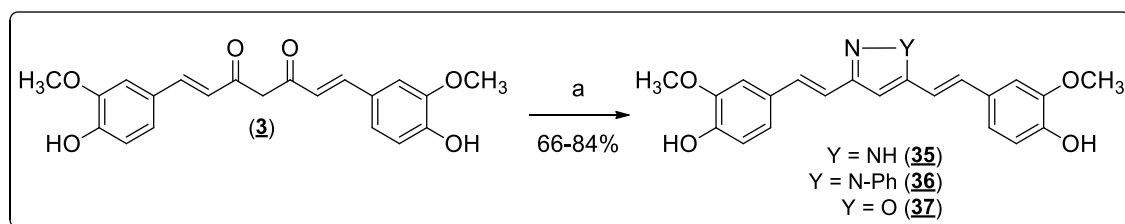
(1E,6E)-1,7-difenilepta-1,6-dieno-3,5-diona

RMN 1H (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 7,76 (dd, 4H, $J = 10$ Hz); 7,69 (d, 2H, $J = 20$ Hz); 7,48 (m, 2H); 7,46 (m, 4H); 6,99 (d, 2H, $J = 20$ Hz); 6,24 (s, 1H)

DEPTQ (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 183,72; 140,88; 135,13; 130,83; 129,49; 128,84; 124,80; 102,30.

HRMS: m/z 276,3291 $[M+H]^+$

Procedimento geral para a preparação dos derivados heterocíclicos (35-37) (FLYNN *et al*, 1991)



Reagentes e condições reacionais: a) NH_2YH (1eq), CH_3COOH , refluxo, 8-12h.

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 300 mg de curcumina comercial Aldrich[®], 5 mL de ácido acético e 1 equivalente do nucleófilo nitrogenado (hidrazina, Y = NH; fenil-hidrazina, Y = N-Ph; hidroxilamina, Y = O). O sistema foi submetido à refluxo e agitação por um período de 8 a 12h. Após resfriamento, o produto foi filtrado a vácuo e os cristais obtidos foram filtrados em coluna de sílica, utilizando diclorometano como eluente. As frações foram agrupadas em função de sua cromatografia em camada fina e o solvente foi retirado, com rendimentos de 66 a 84%.

(35): Y = N-H. Sólido bege, rendimento 75%, P.F.= 195° C

4,4'-((1E,1'E)-(1H-pirazol-3,5-diil)bis(eteno-2,1-diil))bis(2-metoxifenol)

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12,86 (s, 1H); 9,22 (sl, 2H); 7,17 (s, 2H); 7,06 (sl, 2H); 6,96 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 6,80 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 6,55 (s, 1H); 3,86 (s, 6H)

DEPTQ (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 183,71; 148,39; 147,28; 130,10; 128,84; 120,58; 116,12; 116,08; 109,99; 99,85; 56,07

HRMS: *m/z* 364,1423 [M+H]

(36): Y = N-Ph. Sólido amarelo claro, rendimento 66%, P.F.= 93° C

4,4'-((1E,1'E)-(1-fenil-1H-pirazol-3,5-diil)bis(eteno-2,1-diil))bis(2-metoxifenol)

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9,33 (s, 1H); 9,22 (s, 1H); 7,59 (m, 2H); 7,58 (m, 1H); 7,48 (t, 1H, *J* = 5 Hz); 7,25 (d, 1H, *J* = 1 Hz); 7,21 (d, 1H, *J* = 15 Hz); 7,18 (d, 1H, *J* = 15 Hz); 7,10 (d, 1H, *J* = 1 Hz); 7,05 (dd, 1H, *J* = 5 Hz); 6,97 (dd, 1H, *J* = 5 Hz); 6,81 (d, 1H, *J* = 5 Hz); 6,80 (d, 1H, *J* = 15 Hz); 6,79 (d, 1H, *J* = 5 Hz); 3,86 (s, 3H); 3,80 (s, 3H)

DEPTQ (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 151,55; 148,38; 148,30; 147,87; 147,33; 142,82; 139,77; 133,34; 131,22; 129,87; 128,85; 128,27; 128,14; 125,23; 120,71; 120,76; 117,87; 116,22; 116,05; 112,70; 111,01; 110,05; 101,26; 56,12; 56,07.

HRMS: *m/z* 440,1736 [M+H]⁺

(37): Y = O. Sólido amarelo, rendimento 84%, P.F.= 165° C(d)

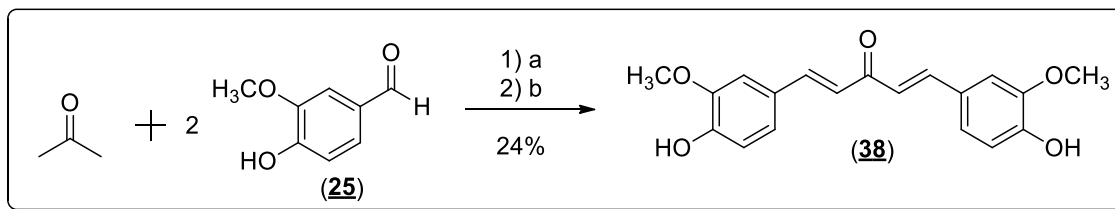
4,4'-((1*E*,1'*E*)-isoxazol-3,5-diilbis(eteno-2,1-diil))bis(2-metoxifenol)

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9,42 (s, 1H); 9,34 (s, 1H); 7,31 (m, 4H); 7,09 (m, 4H); 6,86 (s, 1H); 6,82 (d, 1H, *J* = 5 Hz); 6,81 (d, 1H, *J* = 5 Hz); 3,85 (s, 6H).

DEPTQ (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 168,31; 162,20; 148,12; 147,91; 147,79; 136,40; 134,75; 127,29; 126,95; 121,66; 121,28; 115,56; 115,50; 112,59; 110,30; 110,06; 97,82; 55,64.

HRMS: *m/z* 365,1263 [M+H]⁺

Procedimento para a síntese de (38) (WEBER *et al*, 2005)



Reagentes e condições reacionais: a) HCl 37%, 48h. b) H₂O: CH₃COOH (1:1)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 367 μ L (5 mmol) de acetona e 1,51g (10 mmol) de (23). Após homogeneização do sistema, foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico 37% e o sistema foi agitado à temperatura ambiente por 48h. A subsequente adição de 10 mL de solução gelada de ácido acético em água (1:1) gerou um precipitado negro, que foi filtrado em sílica usando como eluente uma mistura de CH₂Cl₂:MeOH 5%. As frações foram agrupadas de acordo com seu perfil de cromatografia em camada fina e o solvente foi evaporado, gerando 432 mg de um sólido alaranjado de PF 87° C.

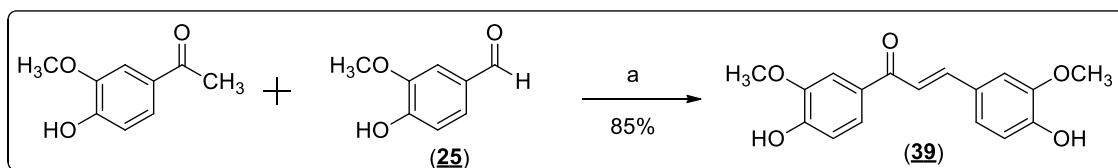
(1E,4E)-1,5-bis(4-hidróxi-3-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9,85 (s, 2H); 7,70 (d, 2H, *J* = 20 Hz); 7,21 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 7,14 (s, 2H); 6,98 (d, 2H, *J* = 5 Hz); 6,96 (d, 2H, *J* = 20 Hz); 3,98 (s, 6H)

DEPTQ (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 188,82; 148,20; 146,83; 143,26; 127,47; 123,39; 123,34; 114,86; 109,76; 55,99.

HRMS: *m/z* 326,1154 [M+H]⁺

Procedimento para a síntese de **(39)** (WEBER *et al*, 2005)



Reagentes e condições reacionais: a) HCl 37%, 48h. b) H₂O: CH₃COOH (1:1)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 166 mg (1 mmol) de acetovalona e 152 mg (1 mmol) de **(23)**. Após homogeneização do sistema, foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico 37% e o sistema foi agitado à temperatura ambiente por 48h. A subsequente adição de 10 mL de solução gelada de ácido acético em água (1:1) gerou um precipitado vermelho, que foi filtrado em sílica usando como eluente uma mistura de CH₂Cl₂:MeOH 5%. As frações foram agrupadas de acordo com seu perfil de cromatografia em camada fina e o solvente foi evaporado, gerando 250 mg de um sólido alaranjado de PF 114° C.

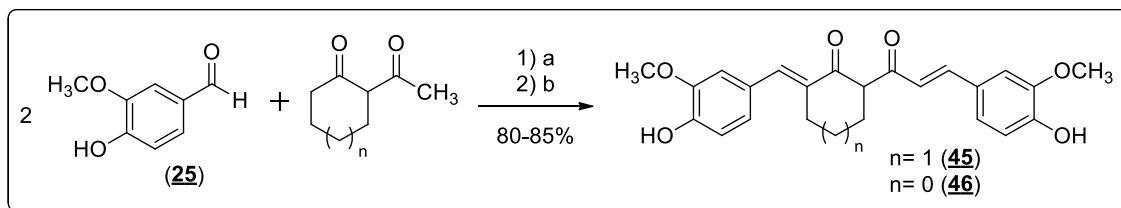
(E)-1,3-bis(4-hidróxi-3-metóxi)prop-2-en-1-ona

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 10,00 (s, 1H); 9,64 (s, 1H); 7,79 (d, 1H, *J* = 10 Hz); 7,74 (d, 1H, *J* = 20 Hz); 7,53 (m, 2H); 7,48 (s, 1H); 7,27 (d, 1H, *J* = 10 Hz); 6,91 (d, 1H, *J* = 10 Hz); 6,81 (d, 1H, *J* = 10 Hz); 3,87 (s, 6H).

DEPTQ (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 187,06; 151,67; 149,42; 147,98; 147,79; 143,61; 129,87; 126,53; 123,70; 123,56; 118,74; 115,63; 114,94; 111,82; 111,62; 55,87; 55,73.

HRMS: *m/z* 300,0998 [M+H]⁺

Procedimento para a síntese dos derivados dicarbonílicos carbocíclicos (45) e (46) (NICHOLS *et al*, 2006)



Reagentes: a) B₂O₃, morfolina. B) MeOH, refluxo.

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 152 mg de vanilina, 0,5eq de dicetona, 35 mg de anidrido bórico e quantidade catalítica de morfolina. O sistema foi submetido à radiação de micro-ondas 300 Watts, 100° C e pressão atmosférica por 5 minutos. Foi formado um óleo vermelho que originou um precipitado alaranjado após adição de metanol com refluxo ou ultrassom, conforme o caso. O precipitado alaranjado foi submetido à filtração em sílica para obtenção dos produtos em grau de pureza adequado.

(45) n = 1, Rendimento 80% PF: 176° C

(E)-2-(4-hidróxi-3-metoxibenzilideno)-6-((E)-3-(4-hidróxi-3-metoxifenil)acrilóil)cicloexanona

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9,70 (d, 1H); 9,51 (s, 1H); 7,63 (d, 1H, *J* = 20 Hz); 7,55 (s, 1H); 7,21 (m, 4H); 6,89 (m, 3H); 3,87 (s, 3H); 3,83 (s, 3H); 2,77 (t, 2H); 2,71 (m, 2H); 1,74 (sl, 2H).

DEPTQ (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 185,01; 179,05; 150,00; 148,47; 147,99; 147,88; 142,95; 133,75; 130,76; 127,63; 127,04; 124,39; 124,19; 123,57; 119,92; 117,76; 116,12; 115,98; 114,92; 112,08; 56,27; 56,10; 27,33; 23,95; 23,07.

HRMS: *m/z* 408,1573 [M+H]⁺

(46) n = 0, Rendimento 85% PF: 224° C

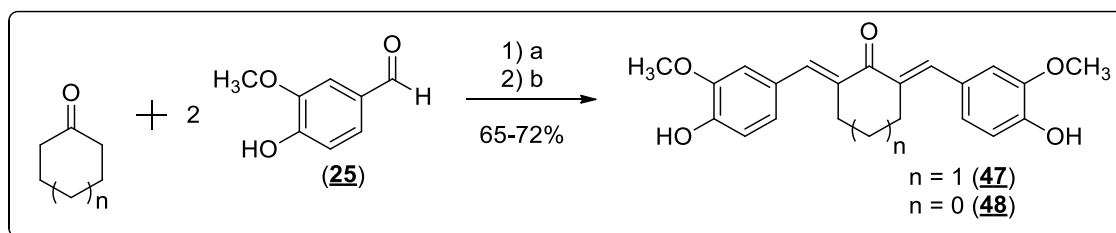
(E)-2-(4-hidróxi-3-metoxibenzilideno)-6-((E)-3-(4-hidróxi-3-metoxifenil)acrilóil)ciclopentanona

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9,66 (s, 1H); 9,63 (s, 1H); 7,50 (d, 1H, *J* = 20 Hz); 7,36 (sl, 1H); 7,22 (m, 3H); 7,14 (dd, 2H, *J* = 10 Hz); 6,89 (d, 1H, *J* = 10 Hz); 6,84 (d, 1H, *J* = 10 Hz); 6,76 (d, 1H, *J* = 20 Hz); 3,86 (s, 3H); 3,85 (s, 3H); 3,01 (sl, 2H); 2,90 (m, 2H).

DEPTQ (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 197,23; 170,22; 150,41; 149,77; 148,66; 148,04; 140,47; 136,47; 130,88; 127,73; 125,93; 124,70; 123,53; 118,42; 117,72; 116,36; 116,21; 114,75; 112,13; 56,30; 56,12; 26,42; 22,92.

HRMS: *m/z* 394,1416 [M+H]⁺

Procedimento para a síntese dos derivados carbocíclicos (47) e (48) (WEBER *et al*, 2005)



Reagentes e condições reacionais: a) HCl 37%, 48h. b) H₂O: CH₃COOH (1:1)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 5 mmol da cetona e 1,51g (10 mmol) de (**23**). Após homogeneização do sistema, foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico 37% e o sistema foi agitado à temperatura ambiente por 48h. A subsequente adição de 10 mL de solução gelada de ácido acético em água (1:1) gerou um precipitado escuro, que foi filtrado em sílica usando diclorometano como eluente. As frações foram agrupadas de acordo com seu perfil de cromatografia em camada fina e o solvente foi evaporado, gerando os produtos adequados.

(**47**) $n = 1$, Rendimento 65% PF: 98° C

(2E,6E)-2,6-bis(4-hidróxi-3-metoxibenzilideno)cicloexanona

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9,55 (s, 2H); 7,58 (s, 2H); 7,13 (sl, 2H); 7,05 (d, 2H, $J = 10$ Hz); 6,87 (d, 2H $J = 10$ Hz); 3,83 (s, 6H); 2,91 (t, 4H); 1,74 (sl, 2H).

DEPTQ (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 188,95; 148,29; 147,90; 136,63; 127,39; 124,69; 116,01; 115,27; 56,10; 28,43; 23,05.

HRMS: m/z 366,1467 [M+H]⁺

(**48**) $n = 0$, Rendimento 72% PF: 87° C

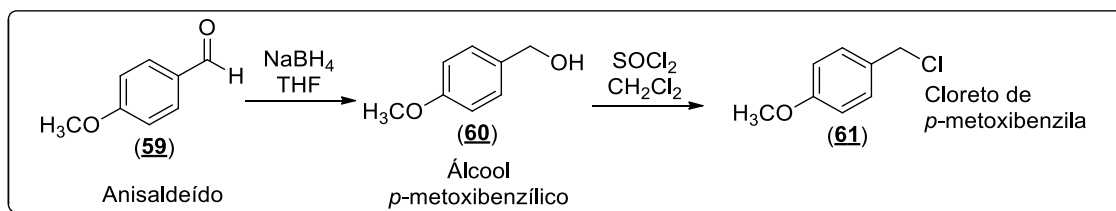
(2E,6E)-2,6-bis(4-hidróxi-3-metoxibenzilideno)ciclopentanona

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9,67 (s, 2H); 7,37 (s, 2H); 7,25 (s, 2H); 7,17 (d, 2H, $J = 10$ Hz); 6,90 (d, 2H, $J = 10$ Hz); 3,85 (s, 6H); 3,07 (s, 4H).

DEPTQ (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 195,24; 148,98; 148,16; 135,19; 133,25; 127,61; 125,21; 116,36; 115,01; 56,04; 26,34.

HRMS: m/z 352,1311 [M+H]⁺

Procedimento para a síntese do cloreto de *p*-metoxibenzila (**61**)

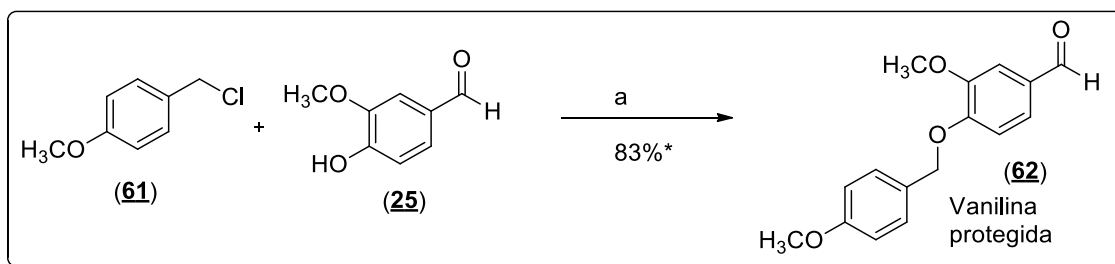


Reagentes e condições reacionais: a) NaBH₄; THF seco; 12h. b) SOCl₂, CH₂Cl₂, 6h.

A uma solução de 1,8 mL (15 mmol) de (**59**) em 50 mL de THF seco e banho de gelo foram adicionados lentamente 0,5 eq de NaBH₄ (0,28 g, 7,5 mmol). A solução foi agitada à temperatura ambiente por 12 horas e a reação foi interrompida com a adição de 50 mL de água destilada. O produto foi extraído com éter etílico (2x 50mL) e as fases orgânicas foram combinadas, lavadas com solução saturada de NaCl (2x 50 mL), secas com sulfato de sódio anidro e o solvente removido sob pressão reduzida sem aquecimento. Foi formado um sólido branco (**60**) que foi dissolvido em 30 mL de CH₂Cl₂ seco em peneira molecular e levado a banho de gelo. Em seguida, foram adicionados gota a gota 1,5 mL de SOCl₂ (2,46 g, 20 mmol). A mistura formada foi mantida em atmosfera de nitrogênio com possibilidade de saída do gás formado através de um fluxímetro de vidro. Após o término da reação, o solvente e o excesso de cloreto de tionila foram retirados em evaporador rotativo. O produto bruto foi isolado como um óleo incolor caracterizado por espectrometria de massas e prontamente utilizado na etapa seguinte.

MS/MS: m/z 158 [M+2]⁺; 156 [M]⁺; 121; 77; 51.

Procedimento para a síntese da vanilina protegida (**62**) (LEE, 2012)



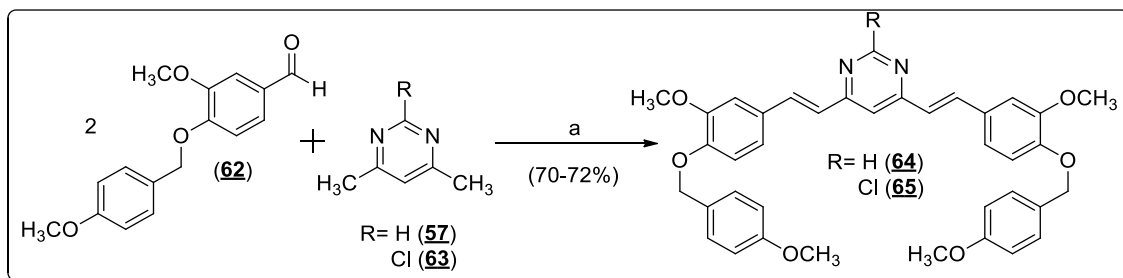
Reagentes e condições reacionais: DMF, K_2CO_3 , 60° C, 18h

O óleo obtido na etapa anterior, derivado (**61**), foi solubilizado em 30 mL de DMF seca em peneira molecular, à qual foi adicionado carbonato de potássio previamente seco em estufa (2,4g, 18 mmol, 1,2 eq) e 15 mmols de vanilina (**25**) (2,2g, 15 mmol) previamente solubilizada em DMF. A suspensão formada foi acoplada a um fluxímetro de vidro para alívio de pressão e mantida à pressão ambiente sob agitação por 18h. O meio reacional foi vertido sobre gelo picado, gerando um sólido branco de aspecto cristalino que foi filtrado e recristalizado em acetato de etila.

* O rendimento foi calculado em função da quantidade inicial de anisaldeído utilizado na etapa anterior.

MS/MS: m/z 272 $[M]^+$; 121; 77.

Procedimento para a síntese dos derivados pirimidínicos protegidos (64) e (65) (LEE, 2012)



Reagentes e condições reacionais: a) NaOH 4N, [(Bu)₄NH₄]HSO₄ (0,15 eq), refluxo, 2-4h.

2 mmols da pirimidina correspondente e 4 mmols de (62) foram adicionados à 20mL de uma solução aquosa de NaOH 4N contendo 0,29mmol de bissulfato de tetrabutilamônio. O sistema foi levado a refluxo até aparecimento de uma goma amarela. Em seguida a goma foi filtrada e recristalizada em acetato de etila, gerando sólidos de coloração amarela intensa.

(64) R= H. Rendimento: 70%

4,6-bis((E)-3-metóxi-4-((4-metoxibenzil)oxi)estiril)pirimidina

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9,08 (s, 1H); 7,84 (d, 2H, J = 16 Hz); 7,40 (d, 6H); 7,19-6,93 (m, 11H); 5,15 (s, 4H); 3,96 (s, 6H); 3,83 (s, 6H).

DEPTQ (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163,06; 159,69; 158,86; 150,07; 149,87; 137,02; 129,24; 128,96; 124,14; 121,83; 115,83; 114,25; 113,98; 110,31; 70,96; 56,21; 55,51.

HRMS: 616,2573 [M+H]⁺

(65) R= Cl. Rendimento: 72%

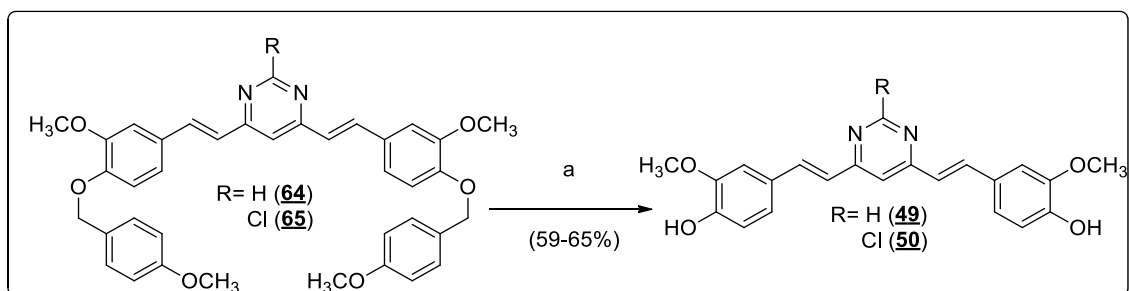
2-cloro-4,6-bis((E)-3-metóxi-4-((4-metoxibenzil)oxi)estiril)pirimidina

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7,87 (d, 2H, J = 16 Hz); 7,61 (s, 1H); 7,40 (m, 6H); 7,27 (d, 2H, J = 5 Hz); 7,20 (d, 2H, J = 16 Hz); 7,12 (d, 2H, J = 5 Hz); 6,96 (d, 4H, J = 7 Hz); 5,07 (s, 4H); 3,95 (s, 6H); 3,77 (s, 6H).

DEPTQ (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 166,28; 160,82; 159,57; 150,11; 149,81; 138,72; 130,18; 129,12; 128,69; 123,13; 122,63; 114,94; 114,30; 113,78; 111,00; 70,11; 56,09; 55,58.

HRMS: 650,2184 [M+H]⁺

Procedimento para a síntese dos derivados pirimidínicos (**49**) e (**50**) (LEE, 2012)



Reagentes: a) HCl 1N/EtOH (1:3), refluxo 4h, agitação por uma noite.

400 mg das pirimidinas protegidas (**64** ou **65**) foram adicionadas a uma solução hidroalcoólica ácida composta por 15 mL de etanol e 5 mL de HCl 1N. O sistema foi mantido sob refluxo por quatro horas, seguido de agitação à temperatura ambiente por uma noite. O meio reacional tornou-se uma solução avermelhada, sendo então neutralizado com $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ 5%, até o aparecimento de um precipitado laranja, que foi extraído com CH_2Cl_2 . Após secagem da fase orgânica e evaporação do solvente, formou-se um óleo vermelho que ao ser deixado no ultrassom, gerou um precipitado correspondente aos produtos finais, que foram purificados por recristalização em mistura de hexano e acetato de etila.

(49) R= H. Rendimento: 59%

4,4'-((1E,1'E)-pirimidina-4,6-diilbis(eteno-2,1-diil))bis(2-metoxifenol)

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 7,32 (s, 1H); 6,28 (d, 2H, $J = 20$ Hz); 6,04 (s, 1H); 5,70 (s, 2H); 5,59 (d, 2H, $J = 10$ Hz); 5,46 (d, 2H, $J = 20$ Hz); 5,28 (d, 2H, $J = 10$ Hz); 2,37 (s, 6H).

DEPTQ (125 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 163,40; 159,06; 148,45; 148,02; 137,92; 127,79; 122,06; 122,01; 115,13; 114,99; 109,94; 55,03.

HRMS: 376,1463 $[\text{M}+\text{H}]^+$

(50) R= Cl. Rendimento: 65%

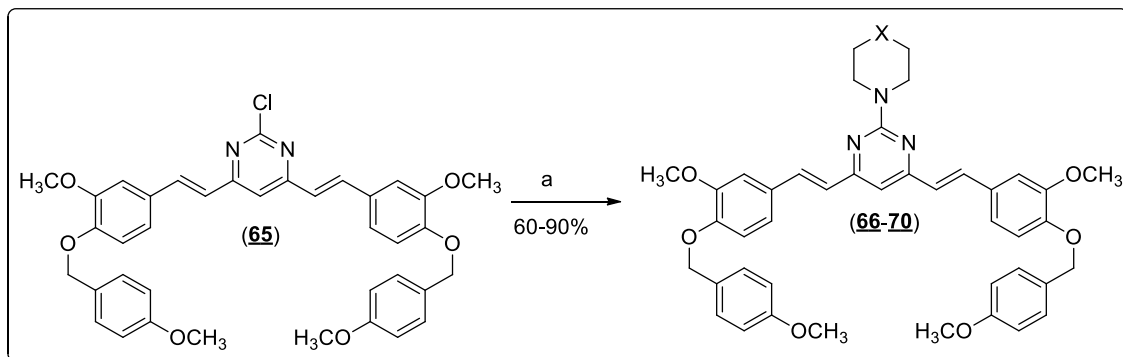
2-cloro-4,4'-((1E,1'E)-pirimidina-4,6-diilbis(eteno-2,1-diil))bis(2-metoxifenol)

RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 7,87 (d, 2H, $J = 18$ Hz); 7,60 (s, 1H); 7,39 (m, 2H); 7,26 (d, 2H, $J = 5$ Hz); 7,18 (d, 2H, $J = 18$ Hz); 7,09 (d, 2H, $J = 5$ Hz); 3,84 (s, 6H).

DEPTQ (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 165,81; 159,10; 149,64; 149,33; 138,25; 128,65; 122,65; 122,15; 114,47; 113,31; 110,53; 55,11.

HRMS: 410,1033 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Procedimento para a síntese dos derivados pirimidínicos 2-aminossustituídos protegidos (66-70) (ABDULLAH *et al*, 2004)



Reagentes e condições reacionais: Etanol, aminas cíclicas, refluxo, 2h.

X = CH₂ (66)
N-CH₃ (67)
N-Ph (68)
O (69)
S (70)

500mg do intermediário-chave (65) foram solubilizados em 5 mL de etanol e 5mL da amina cíclica correspondente. O sistema foi mantido sob refluxo por duas horas. O meio reacional teve o solvente evaporado sob pressão reduzida, até formação de um óleo avermelhado ou um sólido amarelo. Sobre o óleo/sólido foram adicionados 10 mL de éter etílico gelado, gerando precipitados amarelos, que foram filtrados a vácuo e lavados com éter gelado. Os produtos brutos obtidos foram prontamente utilizados nas etapas seguintes.

(66) X= CH₂. Produto isolado como um sólido amarelo, com 90% de rendimento.

4,6-bis((E)-3-metóxi-4-((4-metoxibenzil)oxi)estiril)-2-(piperidin-1-il)pirimidina

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7,72 (d, 2H, *J* = 15 Hz); 7,39-7,33 (m); 7,19 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 7,08 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 7,2-6,83 (m); 5,04 (s, 4H); 3,84 (m, 10H); 3,76 (s, 6H); 1,57 (m, 6H).

DEPTQ (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm):163,05; 159,07; 149,27; 148,86; 134,91; 129,72; 128,91; 128,77; 125,24; 121,19; 131,81; 113,28; 110,117; 105,28; 69,90; 55,56; 55,12; 44,14; 25,53; 24,53.

HRMS: 699,3308 [M+H]⁺

(67) X= N-CH₃. Produto isolado como um sólido amarelo, com 72% de rendimento.

4,6-bis((E)-3-metóxi-4-((4-metoxibenzil)oxi)estiril)-2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidina

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,70 (d, 2H, *J* = 20 Hz); 7,38 (d, 4H, *J* = 10 Hz); 7,14 (s, 2H); 7,08 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 6,92-6,90 (m, 6H); 6,83 (d, 2H, *J* = 20 Hz); 6,61 (s, 1H); 5,12 (s, 4H); 4,03 (sl, 4H); 3,94 (s, 6H); 3,81 (s, 6H); 2,61 (t, 4H); 2,41 (s, 3H).

DEPTQ (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163,35; 161,81; 159,43; 149,80; 149,22; 135,19; 129,65; 129,03; 128,87; 125,33; 121,17; 113,99; 113,81; 110,12; 106,28; 70,77; 56,00; 55,27; 54,83; 45,85; 43,43.

HRMS: 714,3417 [M+H]⁺

(68) X= N-Ph. Produto isolado como um sólido amarelo, com 81% de rendimento

4,6-bis((E)-3-metóxi-4-((4-metoxibenzil)oxi)estiril)-2-(4-fenilpiperazin-1-il)pirimidina

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,74 (d, 2H, *J* = 20 Hz); 7,39 (d, 4H, *J* = 10 Hz); 7,32 (t, 3H, *J* = 5 Hz); 7,16 (s, 2H); 7,10 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 7,03 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 6,93-6,91 (m, 9H); 6,82 (d, 2H, *J* = 20 Hz); 6,64 (s, 1H); 5,12 (s, 4H); 4,14 (t, 4H, *J* = 5 Hz); 3,95 (s, 6H); 3,82 (s, 6H); 3,33 (sl, 4H).

DEPTQ (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163,37; 161,87; 159,43; 151,55; 149,81; 149,23; 135,23; 129,65; 129,35; 129,03; 128,66; 125,33; 121,20; 120,00; 116,85; 116,49; 113,98; 113,81; 110,12; 106,34; 70,76; 56,00; 55,26; 49,55; 43,89.

HRMS: 776,3574 [M+H]

(69) X= O. Produto isolado como um sólido amarelo, com 87% de rendimento

4-(4,6-bis((E)-3-metóxi-4-((4-metoxibenzil)oxi)estiril)pirimidin-2-il)morfolina

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,71 (d, 2H, *J* = 20 Hz); 7,38 (d, 4H, *J* = 10 Hz); 7,14 (s, 2H); 7,09 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 6,92-6,85 (m, 8H); 6,65 (s, 1H); 5,12 (s, 4H); 3,96-3,94 (m, 10H); 3,85-3,82 (m, 10H).

DEPTQ (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163,31; 159,44; 148,81; 149,31; 137,47; 129,55; 129,02; 128,83; 125,04; 121,26; 113,99; 113,80; 110,14; 106,41; 70,76; 67,02; 55,00; 55,26; 44,48.

HRMS: 701,3101 [M+H]⁺

(70) X= S. Produto isolado como um sólido amarelo, com 60% de rendimento.

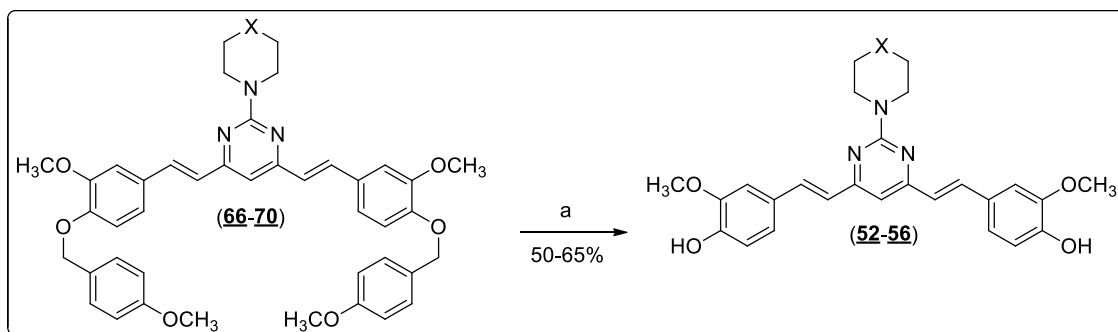
4-(4,6-bis((E)-3-metóxi-4-((4-metoxibenzil)oxi)estiril)pirimidin-2-il)tiomorfolina

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,69 (d, 2H, *J* = 20 Hz); 7,38 (d, 4H, *J* = 10 Hz); 7,16 (s, 2H); 7,09 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 6,91 (m, 8H); 6,66 (s, 1H); 5,12 (s, 4); 4,33 (sl, 4H); 3,95 (s, 6H); 3,81 (s, 6H); 2,78 (sl, 4H).

DEPTQ (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169,55; 149,44; 149,84; 149,51; 135,12; 129,38; 129,03; 128,77; 125,00; 121,51. 113,99; 113,77; 110,18; 105,31; 70,76; 56,02; 55,27; 46,80; 27,20.

HRMS: 717,2873 [M+H]⁺

Procedimento para a síntese dos derivados pirimidínicos 2-aminossustituídos (52-56)



Em um balão de fundo redondo de 50 mL de capacidade, 500 mg dos derivados (66-70) foram solubilizados em de 15 mL de etanol e 5 mL de HCl 1N. O sistema foi deixado sob refluxo por quatro horas, seguido de agitação à temperatura ambiente por uma noite. O meio reacional tornou-se uma solução vermelha, que foi neutralizado com $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$, 5% até o aparecimento de um precipitado laranja. O sólido formado foi extraído com CH_2Cl_2 , seco com sulfato de sódio anidro e evaporação do solvente sob pressão reduzida. Houve então a formação de um óleo vermelho gerou os sólidos correspondentes aos produtos finais após banho de ultrassom. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna aberta, empacotada com sílica-gel.

Derivado (52): Produto isolado como um sólido amarelo, com 63% de rendimento

4,4'-((1*E*,1'*E*)-(2-(piperidin-1-il)pirimidina-4,6-diil)bis(eteno-2,1-diil))bis(2-metoxifenol)

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 7,69 (d, 2H, $J = 20$ Hz); 7,30 (s, 2H); 7,11 (d, 2H, $J = 5$ Hz); 6,94 (d, 2H, $J = 20$ Hz); 6,90 (s, 1H); 6,81 (d, 2H, $J = 5$ Hz); 3,87 (sl, 8H); 1,59 (m, 6H).

DEPTQ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 163,09; 161,25; 147,97; 147,90; 135,19; 127,41; 124,21; 121,49; 115,61; 110,70; 104,97; 55,62; 44,13; 25,48; 24,50.

HRMS: 459,2158 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Derivado (53): Produto isolado como um sólido amarelo, com 51% de rendimento

4,4'-((1*E*,1'*E*)-(2-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidina-4,6-diil)bis(eteno-2,1-diil))bis(2-metoxifenol)

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 7,74 (d, 2H, $J = 20$ Hz); 7,15 (s, 2H); 7,10 (d, 2H, $J = 10$ Hz); 6,94 (m, 2H); 6,84 (d, 2H, $J = 20$ Hz); 6,63 (s, 1H); 4,04 (sl, 4H); 3,96 (s, 6H); 2,62 (sl, 4H); 2,42 (s, 3H).

DEPTQ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 163,86; 161,16; 149,10; 148,52; 138,40; 127,49; 123,98; 122,22; 116,18; 111,28; 108,79; 64,58; 50,09; 46,35; 43,80.

HRMS: 474,2267 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Derivado (**54**): Produto isolado como um sólido amarelo, com 50% de rendimento.

4,4'-((1E,1'E)-(2-(4-fenilpiperazin-1-il)pirimidina-4,6-diil)bis(eteno-2,1-diil))bis(2-metoxifenol)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7,74 (d, 2H, *J* = 15 Hz); 7,30 (s, 2H); 7,25 (t, 3H); 7,12 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 7,02 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 6,97 (d, 2H, *J* = 15 Hz); 6,87 (s, 1H); 6,81 (d, 2H, *J* = 10 Hz).

DEPTQ (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 163,73; 161,79; 151,67; 148,56; 148,41; 136,05; 129,46; 127,87; 124,46; 122,09; 119,87; 116,38; 116,14. 111,25. 106,40; 56,14; 49,03; 43,86.

HRMS: 536,2424 [M+H]⁺

Derivado (**55**): Produto isolado como um sólido amarelo, com 65% de rendimento.

4,4'-((1E,1'E)-(2-morfolinopirimidina-4,6-diil)bis(eteno-2,1-diil))bis(2-metoxifenol)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7,71 (d, 2H, *J* = 18 Hz); 7,27 (s, 2H); 7,10 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 6,94 (d, 2H, *J* = 18 Hz); 6,82 (s, 1H); 6,81 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 3,85 (s, 6H); 3,82 (sl, 4H); 3,71 (sl, 4).

DEPTQ (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 163,15; 163,30; 148,27; 147,93; 135,58; 127,19; 123,75; 121,58; 115,85; 110,77; 106,13; 66,17; 55,81; 43,99.

HRMS: 461,1951 [M+H]⁺

Derivado(**56**): Produto isolado como um sólido amarelo, com 52% de rendimento.

4,4'-((1E,1'E)-(2-tiomorfolinopirimidina-4,6-diil)bis(eteno-2,1-diil))bis(2-metoxifenol)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7,71 (d, 2H, *J* = 18 Hz); 7,29 (s, 2H); 7,11 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 6,94 (d, 2H, *J* = 18 Hz); 6,86 (s, 1H); 6,82 (d, 2H, *J* = 10 Hz); 4,20 (sl, 4H); 3,86 (s, 6H); 2,67 (sl, 4H).

DEPTQ (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 163,79; 161,32; 148,57; 148,41; 136,05; 127,86; 124,51; 122,09; 116,14; 111,26; 105,93; 56,16; 47,81; 27,70.

HRMS: 477,1722 [M+H]⁺

Protocolos farmacológicos

Parasitas:

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) foram cultivadas a 27° C em meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*) Bacto™ (*Becton Dickinson Company*, EUA) suplementado com 10µg/mL de hemina e 0,02g/L de ácido fólico (*Sigma-Aldrich*, EUA) e 10% de Soro Bovino Fetal (DBF, *Gibco/Lifetechnologies*).

Formas tripomastigotas metacíclicas foram preparadas de forma extemporânea por adição de formas epimastigotas ao meio TAU-P (urina artificial de triatomíneo suplementado com *L*-prolina) acondicionadas a 27° C e utilizadas após 4 dias caso houvesse número adequado de formas tripomastigotas, observadas em microscópio óptico e contadas em câmara de Neubauer.

Efeito anti-epimastigota (Experimentos realizados com auxílio da aluna Julliane Moraes, Dra. sob orientação da Profª Débora Decoté-Ricardo)

Formas epimastigotas de *T. cruzi*, cepa Dm28c ($2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$) foram cultivadas por 7 dias em meio de cultura BHI suplementado com hemina, ácido fólico e 10% de soro bovino fetal em estufa BOD a 27° C. As culturas foram tratadas com as substâncias e concentrações indicadas. As formas viáveis foram contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico em objetiva de 40X. Os dados apresentados são representativos de no mínimo dois experimentos independentes.

Efeito na viabilidade celular de macrófagos (Experimentos realizados com auxílio da aluna Julliane Moraes, sob orientação da Profª Dra. Débora Decoté-Ricardo)

Macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c foram cultivados na concentração de $5 \times 10^5/\text{mL}$, em triplicatas. As células foram tratadas por 48 horas com as concentrações indicadas das substâncias utilizadas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão, utilizando-se azul de Trypan e o resultado expresso é representativo de dois experimentos independentes.

Efeito na viabilidade celular em população enriquecida de linfócitos esplênicos (Experimentos realizados com auxílio da aluna Julliane Moraes, sob orientação da Profª Dra. Débora Decoté-Ricardo)

População enriquecida de linfócitos esplênicos foram obtidos do baço de camundongos BALB/c e cultivados na concentração de $5 \times 10^5/\text{mL}$ em triplicatas. As células foram tratadas por 48h com as doses indicadas das substâncias avaliadas. A viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão utilizando-se azul de Trypan e o resultado expresso é representativo de dois experimentos independentes.

Efeito de inibição da liberação de formas tripomastigotas de T. cruzi in vitro. (Experimentos realizados com auxílio da aluna de doutorado Isabel La Rocque, sob orientação da Profª Dra. Débora Decoté-Ricardo)

Macrófagos peritoneais murinos foram infectados com 10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Dm28c induzidas quimicamente. Algumas culturas foram tratadas com as substâncias-teste. Após 7 ou 9 dias foi avaliado o número de formas tripomastigotas liberadas

no sobrenadante das culturas que foram feitas em triplicatas. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. As culturas foram comparadas através do teste T de Student não pareadas (*Prism Graph Pad*) $p^* > 0,05$.

Efeito de inibição da liberação de formas amastigotas de T. cruzi in vitro. (Experimentos realizados com auxílio da aluna de doutorado Isabel La Rocque, sob orientação da Prof^a Dra. Débora Decoté-Ricardo)

Macrófagos peritoniais murinos foram infectados com 10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Dm28c induzidas quimicamente. Todas as culturas foram realizadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéril, e algumas culturas foram tratadas com as substâncias-teste nas concentrações adequadas. Após 7 dias a lamínulas foram fixadas e coradas para contagem. Foram avaliados em microscópio óptico com lente de imersão, de forma independente, o número de formas amastigotas por 100 células e a porcentagem de células infectadas. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. As culturas foram comparadas através do teste T de Student não pareadas (*Prism Graph Pad*) $p^* > 0,05$.

Microscopia eletrônica de transmissão (Os resultados de Microscopia Eletrônica de Transmissão foram obtidos pela Dra. Eliomara S. S. Alves, no Laboratório de Biologia Parasitária da FIOCRUZ-BA, sob supervisão do Prof. Dr. Marcos André Vannier-Santos)

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) foram cultivadas em meio BHI suplementada com 10% de SBF a 25° C. Os protozoários foram lavados com PBS e fixados em Karnovsky por 24h. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1X, ferricianeto de potássio 0,8% e 5 mM de CaCl₂, mantidos ao abrigo da luz por 40 minutos e então desidratados com concentrações crescentes de acetona (15-100%). As amostras foram incorporadas em resina de epóxi Polybed (*Polysciences Inc*) e após 72h a 60° C as amostras foram seccionadas com um ultramicrotomo (Reichert, Leica), contrastadas em soluções aquosas de 2% de acetato de uranila por 20 minutos e 1% de citrato de chumbo por 5 minutos, e então observadas em um microscópio eletrônico de transmissão (*Zeiss EM 109* a 80kV) (VANNIER-SANTOS & De CASTRO, 2009).

Microscopia eletrônica de varredura (Os resultados de Microscopia Eletrônica de Varredura foram obtidos pela Dra. Eliomara S. S. Alves, no Laboratório de Biologia Parasitária da FIOCRUZ-BA, sob supervisão do Prof. Dr. Marcos André Vannier-Santos)

Os parasitos foram fixados como descrito anteriormente e aderidos a lamelas previamente recobertas com uma solução de poli-L-lisina. Em seguida, desidratados com soluções de acetona em concentração crescente (15-100%). As amostras foram submetidas a secagem e metalizadas com uma camada de ouro metálico de aproximadamente 20nm de espessura. Em seguida, foram observadas em um microscópio JEOL modelo JEOL (VANNIER-SANTOS & DE CASTRO, 2009).

Extração dos lipídios de membrana

6×10^6 epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) foram cultivadas por 7 dias em 30 mL de meio BHI a 26° C. Algumas culturas foram tratadas com (3) a 5 e 10 μ M e com posaconazol a 0,05 e 0,1 μ M. As culturas foram submetidas a centrifugação a 2100 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os pellets com *T. cruzi* foram submetidos à extração de lipídios de membrana. 100 mg do conteúdo dos pellets foram suspensos em uma solução alcoólica de hidróxido de potássio (25% m/v) seguido de uma vigorosa agitação por 1

minuto. Após homogeneização, as suspensões foram mantidas a 80° C por 1h. Os sistemas foram resfriados e a cada um foi adicionado 1 mL de água destilada gelada. A extração foi realizada adicionando-se 3 mL de *n*-hexano, seguido de uma agitação vigorosa durante 3 minutos. Após separação das fases, a fase orgânica foi transferida para um frasco previamente tarado e o *n*-hexano removido por fluxo de nitrogênio ultrasseco. Os esteróis foram então redissolvidos em *n*-hexano de grau espectroscópico para análise por CLAE (PINTO *et al*, 2011).

Análise dos lipídios de membrana por CLAE. (Experimento realizado pela Prof^a Dra. Rosane Nora Castro, do Departamento de Química da UFRRJ)

A análise da fração lipídica isolada de epimastigotas de *T. cruzi* foi realizada em um aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência da marca *Shimadzu*, modelo LC-20AT, forno CTO 20A, detector PDA (SPD-M20A), autoinjeter Sil-10AF e controlador CBM 20A. A separação ocorreu em uma coluna de fase reversa (C18 *Betasil-THERMO*, 25cm x 4,6 mm x 5 µm) em modo isocrático utilizando metanol (98%) e acetonitrila (2%) como eluentes, em uma vazão de 1,1 mL/min. A detecção ocorreu a 280 nm (ergosterol) e 243 nm (lanosterol). O volume de injeção foi de 20 µL e a temperatura do forno, 27° C. A identificação dos esteroides ocorreu por comparação com os tempos de retenção e curvas de ultravioleta dos padrões comercialmente disponíveis (*Sigma-Aldrich*).

Análise do ciclo celular por citometria de fluxo (Resultados obtidos pela Dra. Luma Godoy Magalhães no Laboratório de Química Medicinal e Computacional, sob supervisão do Prof. Dr. Adriano Ancricopulo)

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) foram cultivadas em meio BHI a 28° C na concentração de 2 x 10⁶ /mL em placas de cultura de 12 poços (TPPTM, Suíça). As substâncias-teste (3), (4) e (5) foram adicionadas em triplicadas nas concentrações de 10, 50 e 100 µM. Os controles utilizados foram o veículo (DMSO 0,02%) e paclitaxel (20 µM). Após 48h de incubação, os parasitos foram ficados em etanol 70% por 30 min a -20° C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 200 rcf por 8 minutos e lavadas com PBS. Então as amostras foram incubadas por 10 minutos com um tampão de permeabilização (0,2M de Na₂HPO₄ e 0,005% de Triton-X, pH 7,8). As células novamente foram centrifugadas a 200 rcf por 8 minutos e ressuspensas em uma solução de iodeto de propídio (PI, 50 µg/mL) e 0,2 µg/mL de RNase por 30 minutos à temperatura ambiente. O conteúdo genético foi analisado medindo a fluorescência do PI em um citômetro BD Accuri C5 (*Becton Dickinson Company*, EUA) a 488 nm de comprimento de onda excitatório e filtro de emissão de 585/40nm.

Análise estatística

Análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism 4*, utilizando o teste T de Student ou o teste ANOVA. Resultados são expressos como a média ± desvio-padrão. Diferenças entre o controle e as situações tratadas foram consideradas estatisticamente relevantes quando P ≤ 0,05.

Modelagem Molecular

(Os resultados de Modelagem Molecular relacionados ao ancoramento da tubulina foram obtidos pela Dra. Catarina Nigris del Cistia e pelo aluno Gustavo Peron Mendes-Silva, sob supervisão e orientação do Prof. Dr. Carlos Maurício R. Sant'anna no Laboratório de Modelagem Molecular da UFRRJ)

Os experimentos de sobreposição dos confôrmeros de menor energia foram realizados no programa *Spartan '14 (Wavefunction Inc)* pelo método de cálculo semi-empírico PM6. As estruturas dos derivados foram representadas na forma enólica a fim de manter a ligação de hidrogênio intramolecular característica destes sistemas 1,3-dicarbonílicos.

As seqüências dos aminoácidos da tubulina de *T. cruzi* foram obtidas através da base de dados *UniProtKB/Swiss-Prot* (Q27352 para a α -tubulina e P08562 para a β -tubulina), as quais foram usadas separadamente para a construção do modelo por homologia. A fim de abranger os quatro sítios possíveis (sítios da colchicine, taxol, alcaloides da vinca e curcumina), foi planejado um heterotrímico de tubulinas, β - α - β , de modo a abranger tanto a interface β - α quanto α - β . Os sítios ativos de tubulina bovina (utilizada como molde para a modelagem por homologia), à exceção do sítio da curcumina, possuem estruturas co-cristalizadas disponíveis. Dessa forma, para checar a confiabilidade do modelo criado, foi realizado o re-ancoramento de estruturas previamente conhecidas nos seus sítios ativos. Como um ensaio preliminary para a habilidade de ancoramento do programa *GOLD 5.2 (CCDC Software Ltd. Cambrige, Reino Unido)*, foi realizado o reancoramento de ligantes conhecidos tanto no sítio da colchicine quanto no sítio dos alcaloides da vinca. Todas as funções de pontuação disponíveis no programa foram testadas através do reancoramento dos ligantes nas estruturas depositadas no PDB (4EB6, tubulina de *Ovis aries* co-cristalizada com vimblastina e 4O2B, tubulina de *Bos Taurus* co-cristalizada com colchicina). Foram adicionados os átomos de hidrogênio à estrutura da proteína baseados em estados de ionização e equilíbrio tautomérico definidos pelo programa. Devido às ligações de hidrogênio, os átomos de hidrogênio ligados a N ou O de serina, treonina, tirosina e lisina foram configurados para girar livremente. Cem mil operações genéticas (cruzamento, migração e mutação) foram usados em cada ancoramento. O raio do sítio de ligação foi definido em 10 Å de distância a partir de um determinado átomo de um aminoácido do sítio predefinido baseado nas informações da literature.

Spartan '14 [Wavefunction Inc] foi utilizado para construir e otimizar as estruturas através do método PM3 ou PM6. Diversas posições foram obtidas pelos compostos em todas as proteínas e aquelas com melhor pontuação foram escolhidas para análise de interações com os resíduos de aminoácidos. No programa *GOLD*, o ancoramento gera valores adimensionais de pontuação, onde os valores mais altos indicam interações favoráveis com o receptor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F.; USUI, K.; HIRAKI, T. Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity, and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 48, 8494-8504, **2009**.

ABOAGYE-KWARTENG, T.; SMITH, K.; FAIRLAMB, A. H. Molecular characterization of the trypanothione reductase gene from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*: comparison with other flavoprotein disulphide oxidoreductases with respect to substrate specificity and catalytic mechanism. *Molecular Microbiology*, 6, 3089-3099, **1992**.

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

AKHAMOVA, A. & STEINMETZ, M. O. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 309-322, **2008**.

ALLAM, G. Immunomodulatory effects of curcumin treatment on murine schistosomiasis mansoni. *Immunobiology*, 214, 712-727, **2009**.

ALMAGRO, L.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, F.; PEDREÑO, M. A. Indole alkaloids from *Catharanthus roseus*: bioproduction and their effect on human health. *Molecules*, 20, 2973-3000, **2015**.

ALMEIDA, I. C.; CAMARGO, M. C.; PROCÓPIO, D. O.; SILVA, L. S.; MEHLERT, A.; TRAVASSOS, L. R.; GAZZINELLI, R. T.; FERGUSON, M. A. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *The EMBO Journal*, 19, 1476-1485, **2000**.

ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *Journal of Leukocyte Biology*, 70, 467-477, **2001**.

ALVAREZ, V. E.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochimica Biophysica Acta*, 1, 195-206, **2012**.

AMOS, L. A. & LOWE, J. How taxol stabilises microtubule structure. *Chemistry & Biology*, 6, R65-R69, **1999**.

ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AHARWAL, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular Pharmaceutics*, 4, 807-818, **2007**.

ANDREOLI, W. K.; TANIWAKI, N. N.; MORTARA, R. A. Survival of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes within *Coxiella burnetii* vacuoles: differentiation and replication within an acidic milieu. *Microbes and Infection*, 8, 172-182, **2006**.

ANDREWS, N. W. Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Cell Biology*, 5, 133-137, **1995**.

ARAÚJO, C. A. C.; ALEGRIO, L. V.; GOMES, D. C. F.; LIMA, M. E. F.; GOMES-CARDOSO, L.; LEON, L. L. Studies on the effectiveness of diarylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 791-794, **1999**.

ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. *Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, **2008**.

ARUNKHAMKAEW, S.; ATHIPORNCHAI, A.; APIRATIKUL, N.; SUKSAMRARN, A.; AJAVAKOM, V. Novel racemic tetrahydrocurcuminoid dihydropyrimidinone analogues as potente acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23, 2880-2882, **2013**.

BARATA, R. B. Cem anos de endemias e epidemias. *Ciência e Saúde Coletiva*, 5, 333-345, **2000**.

BANERJEE, M.; SINGH, P.; PANDA, D. Curcumin suppresses the dynamic instability of microtubules, activates the mitotic checkpoint and induces apoptosis in MCF-7 cells. *The FEBS Journal*, 277, 3437-3448, **2010**.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, **2008**.

BAUM, S. G.; WITTNER, M.; NADLER, J. P.; Taxul, a microtubule stabilizing agente, blocks the replication of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedures of the National Academy of Science*, 78, 4571-4575, **1981**.

BENCHIMOL-BARBOSA, P. R. Trends on acute Chagas' disease transmitted by oral route in Brazil: Steady increase in new cases and a concealed residual fluctuation. *International Journal of Cardiology*, 145, 494-496, **2010**.

BENKERT, P., BIASINI, M., SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27, 343-350, **2011**.

BENSON, T. J.; MCKIE, J. H.; GARFORTH, J.; BORGES, A.; FAIRLAMB, A. H.; DOUGLAS, K. T. Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase. *Biochemical Journal*, 286, 9-11, **1992**.

BERMAN, J. D. Activity of imidazoles against *Leishmania tropica* in human macrophage cultures. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30, 566-569, **1981**.

BIASINI, M., BIENERT, S., WATERHOUSE, A., ARNOLD, K., STUDER, G., SCHMIDT, T., KIEFER, F., CASSARINO, T. G., BERTONI, M., BORDOLI, L., SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42, W252-258, **2014**.

BITTENCOURT, N. T.; UEDA-NAKAMURA, B.; NAKAMURA, C. Antitrypanosomal activity of a semi-purified subfraction rich in labdane sesquiterpenes, obtained from flowers of *Anthemis tinctoria*, against *Trypanosoma cruzi*. *Pharmacology & Pharmacy*, 2, 47-55, **2011**.

BLAKEMORE, L. M.; BOES, C.; CORDELL, R.; MANSON, M. M. Curcumin-induced mitotic arrest is characterized by spindle abnormalities, defects in chromosomal congression and DNA damage. *Carcinogenesis*, 34, 351-360, **2013**,

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

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

BOLÄNDER, A.; KIESER, D.; VOSS, C.; BAUER, S.; SCHLÖN, C.; BURGOLD, S.; BITNER, T.; HÖLZER, J.; HAUBEN, R. H.; MALL, G.; GOETSCHY, V.; CZECH, C.; KNUST, H.; BERGER, R.; HERMS, J.; HILGER, I.; SCHIMIDT, B. Bis(arylvinyl)pyrazines, -pyrimidines, and -pyridazines as imaging agents for tau fibrils and β -amyloid plaques in alzheimer's disease models. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 9170-9180, **2012**.

BONSE, S.; SANTELLI-ROUVIER, C.; BARBE, J.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by acridines: kinetic studies and structure-activity relationships. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 5448-5454, **1999**.

BORGES, V. M.; LOPES, U. G.; DE SOUZA, W.; VANNIER-SANTOS, M. A. Cell structure and cytokinesis alterations in multidrug-resistant *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology Research*, 95, 90-96, **2005**.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia dos quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, 33, 1359-1369, **2010**.

BROWN, G. D. The biosynthesis of steroids and triterpenoids. *Natural Product Reports*, 15, 653-696, **1998**.

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

CALVET, C. M.; MEUSER, M.; ALMEIDA, D.; MEIRELLES, M. N.; PEREIRA, M. C. *Trypanosoma cruzi* – cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression *in vitro* and *in vivo*. *Experimental Parasitology*, 107, 20-30, **2004**.

CALVET, C. M.; MELO, T. G.; GARZONI, L. R.; OLIVEIRA, F. O. R.; SILVA-NETO, D. T.; MEIRELLES, M. N.; PEREIRA, M. C. Current understanding of the *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction. *Frontiers in Immunology*, 3, 1-8, **2012**.

CASTEDO, M.; PERFETTINI, J.; ROUMIER, T. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23, 2825-2837, **2004**.

CHAGAS, C. 'Trypanosoma minasense (Nota preliminar)'. *Brazil Médico*, 22, 48, **1908**.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíaze humana. Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homén. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1, 159-218, **1909**.

CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem. *Brazil Médico* 24, 423-447, **1910**.

CHAGAS, C. Aula inaugural da cadeira de medicina tropical - 14 de setembro de 1926. In: Chagas, Carlos. Discursos e conferências. Rio de Janeiro: A Noite. p.137-166. **1935**.

CHAKRABARTI, R.; RAWAT, P. S.; COOKE, B. M.; COPPEL, R. L.; PATANKAR, S. Cellular effects of curcumin on *Plasmodium falciparum* include disruption of microtubules. *PLoS One*, 8, e57302 **2013**.

CHAKRABORTY, B.; SENGUPTA, M. Boosting of nonspecific host response by aromatic spices turmeric and ginger in immunocompromised mice. *Cellular Immunology*, 280, 92-100, **2012**.

CHAKRABORTI, S.; DAS, L.; KAPOOR, N.; DAS, A.; DWIVEDI, V.; PODDAR, A.; CHAKRABORTI, G.; BASU, G.; PANDA, D.; CHAKRABARTI, P.; SUROLIA, A.; BHATTACHARYYA, B. Curcumin recognizes a unique binding site of tubulin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 6123-6196, **2011**.

CHANGTAM, C.; KONING, H.P.; IBRAHIM, H.; SAJID, M. S.; GOULD, M. K.; SUKSAMRARN, A. Curcuminoid analogs with potente activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 941-956, **2010**.

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

CONTRERAS, V. T.; ARAQUE, W. H.; DELGADO, V. S. Biological properties of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes: usefulness for studying Chagas' disease (brief report). *Biological Research*, 26, 315-316, **1993**.

COSTA, J. & PETERSON, T. *Ecological niche modeling as a tool for understanding distributions and interactions of vectors, hosts and etiologic agentes of Chagas disease*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, **2012**. cap 7, 59-70.

COURA, J. R. *Síntese histórica e evolução dos conhecimentos sobre a doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, **1997**. cap. 27, 469-486.

COURA, J. R. & BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 642-645, **2011**.

COURA, J. R.; DECASTRO, S. L. A critical review on Chagas' disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 3-24, **2002**.

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

CUI, L.; MIAO, J.; CUI, L. Cytotoxic effect of curcumin on malaria parasite *Plasmodium falciparum*: inhibition of histone acetylation and generation of reactive oxygen species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 488-494, **2007**.

DALBY, A. *Dangerous tastes: the story of spices*. 2ed, Londres:British Museum Press, **2000**.

DAWSON, P. J.; GUTTERIDGE, W. E.; GULL, K. A comparison of the interaction of antihelminthic benzimidazoles with tubulin isolated from mammalian tissue and the parasitic nematode *Ascaridia galli*. *Biochemical Pharmacology*, 33, 1069-1074, **1984**.

DE CARVALHO, T. U.; DE SOUZA, W. Effect of phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) on the fine structure of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with activated and resident macrophages. *Parasitology Research*, 74, 11-17, **1987**.

DELAPORTE, F. Chagas, a lógica e a descoberta. *História, Ciências e Saúde: Manguinhos*, 1, 39-53, **1994**.

DIAS, J. C. P. Cecílio Romãna, o sinal de Romãna e a doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30, 407-413, **1997**.

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

DIAZ-LUJÁN, C.; TRIQUELL, M. F.; MEZZANO, L.; FRETES, R. E. *Placental infection by Trypanosoma cruzi, the causal agente of Chagas' disease*. La Rioja: Intechopen, **2012**. cap 7, 127-148.

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

DOSTÁL, V.; LIBUSOVÁ, L. Microtubule drugs: action, selectivity and resistance across the kingdoms of life. *Protoplasma*, 251, 991-1005, **2014**.

DRONTLE, D. P. & WAGNER, C. R. Designing a pronucleotide stratagem: lessons from amino acid phosphoramidates of anticancer and antiviral pyrimidines. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 4, 409-419, **2004**.

FALKOW, S.; ISBERG, R.R.; PORTNOY, D. A. The interaction of bacteria with mammalian cells. *Annual Reviews on Cell and Developmental Biology*, 8, 333-363, **1992**.

FERREIRA, E. I. Planejamento de fármacos na área de doença de Chagas: avanços desafios. *Revista Virtual em Química*, 4, 225-246, **2012**.

FERREIRA, R. S.; SIMEONOV, A.; JADHAV, A. J.; EIDAM, O.; MOTT, B. T; KEISER, M. J.; MCKERROW, J. H.; MALONEY, D. J.; IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 4891-4905, **2010**.

FU, Y.; LI, S.; ZU, Y.; YANG, G.; YANG, Z.; LUO, M.; JIANG, S.; WINK, M.; EFFERTH, T. Medicinal chemistry of paclitaxel and its analogues. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 3966-3985, **2009**.

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

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology*, 17, 787-809, **2008**.

GOMES, D. C.; ALEGRIO, L. V.; LIMA, M. E. F.; LEON, L. L.; ARAÚJO, C. A. C. Synthetic derivatives of curcumin and their activity against *Leishmania amazonensis*. *Arzneimittel Forschung Drug Research*, 52, 120-124, **2002**.

GRANTHON, A. C.; BRAGA, M. V.; RODRIGUES, J. C.; CAMMERER, S.; LORENTE, S. O.; GILBERT, I. H.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W. Alterations on the growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* induced by squalene synthase inhibitors. *Veterinary Parasitology*, 146, 25-34, **2007**.

GUEX, N. E.; PEITSCH, M. C.; SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18, 2714-2723, **1997**.

GUPTA, K. K.; BHARNE, S. S.; RATHINASAMY, K.; NAIK, N.; PANDA, D. Dietary antioxidant curcumin inhibits microtubule assembly through tubulin binding. *FEBS Journal*, 273, 5320-5332, **2006**.

HABER, F & WEISS, J. Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwissenschaften* 20, 948-950, **1932**. HEALD, R. & NOGALES, E. Molecular dynamics. *Journal of the Cell Science*, 115, 3-4, **2002**.

HEBY, O.; PERSSON, L.; RENTALA, M. Targeting polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of african sleeping sickness, Chagas' disease and leishmaniasis. *Amino Acids*, 33, 359-366, **2007**.

HOLLINGSWORTH, M. A.; & SWANSON, B. J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews Cancer*, 4, 45-60, **2007**.

HORVATH, D. A virtual screening approach applied to the search for trypanothione reductase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 2412-2423, **1997**.

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

JACOBY, E. M.; SCHILICHTING, I.; LANTWIN, C. B.; KABSCH, W.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Crystal structure of the *Trypanosoma cruzi*, trypanothione reductase-mepacrine complex. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 24, 73-80, **1996**.

JACKSON, S.J., MURPHY, L. L., VENEMA, R. C., SINGLETARY, K. W., YOUNG, A. J. Curcumin binds tubulin, induces mitotic catastrophe, and impedes normal endothelial cell proliferation. *Food Chemistry and Toxicology*, 60, 431-438 **2013**.

JIANG, J.; JIN, H.; LIU, L.; PI, J.; YANG, F.; CAI, J. Curcumin disturbed cell-cycle distribution of HepG2 cells via cytoskeletal arrangement. *Scanning*, 35, 253-260, **2013**.

JORDAN, M. A. & WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews in Cancer*, 4, 253-265, **2004**.

JOVANOVIĆ, S. V.; STEENKEN, S.; BOONE, C. W.; SIMIĆ, M. G. H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *Journal of the American Chemical Society*, 121, 9677-9681, **1999**.

KILMARTIN, J. V. Purification of yeast tubulin by self-assembly *in vitro*. *Biochemistry*, 20, 3629-3633, **1981**.

KIUCHI, F.; GOTO, Y.; SUGIMOTO, N.; AKAO, N.; KONDO, K.; TSUDA, Y. Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41, 1640-1643, **1993**.

KNORR, L. Synthese von Pyrrolderivaten. *Berichte der deutschen Chemischen Gesellschaft*, 17, 1635-1642, **1884**.

KOLEV, T. M.; VELCHEVA, E. A.; STAMBOLIYSKA, B. A.; SPITELLER, M. DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin. *International Journal of Quantum Chemistry*. 102, 1069-1079, **2005**.

KORB, O.; STÜTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *Journal of Informatic Model.*, 49, 84-96 **2009**.

KROPF, S. P. *Doença de Chagas, doença do Brasil: ciência, saúde e nação (1909-1962)*. **2006**. 546f. Tese (Doutorado em História Social) - Faculdade de História. Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ.

KROPF, S. P. & SÁ, M. R. A descoberta do *Trypanosoma cruzi* e da doença de Chagas (1908-1909): medicinal tropical no Brasil. *História, Ciências e Saúde: Manguinhos*, 16, 13-34, **2009**.

KUPPENS, I. E. L. M. Current State of the art of new tubulin inhibitors in the clinic. *Current Clinical Pharmacology*, 1, 57-70, **2006**.

LAMPE, V.; MILOBEDESKA, J.; KOSTANECKI, V. Structure of curcumin. *Berichte der deutschen Chemischen Gesellschaft*, 43, 2163-2170, **1910**.

LANG, E. S. & COMASSETO, J. V. Catálise por transferência de fase, *Química Nova*, 11, 238-257, **1988**.

LEE, Y. S.; KIM, H. Y.; KIM, Y.; SEU, J. H.; ROH, E. J.; HAN, H.; SHIN, K. J. Small molecules that protect against β -amyloid-induced cytotoxicity by inhibiting aggregation of β -amyloid. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20, 4921-4935, **2012**.

LEPESHEVA, G.; VIRUS, C.; WATERMAN, M. R.; Conservation in the CYP51 family. Role of the B' helix/BC loop and hélices F and G in enzymatic function. *Biochemistry*, 42, 9091-9101, **2003**.

LEPESHEVA, G.; ZAITSEVA, N. G.; NES, W. D.; ZHOU, W.; ARASE, M.; LIU, J.; HILL, G. C.; WATERMAN, N. CYP51 from *Trypanosoma cruzi* a phyla-specific residue in the B' helix defines substrate preferences of sterol 14 α -demethylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 3577-3585, **2006**.

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

LEY, V.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V.; ANDREWS, N. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *Journal of Experimental Medicine*, 171, 401-413, **1990**.

LI, W.; WANG, S.; FENG, J.; XIAO, Y.; XUE, X.; ZHANG, H.; WANG, Y.; LIANG, X. Structure elucidation and NMR assignments for curcuminoids from the rhizomes of *Curcuma longa*. *Magnetic Resonance Chemistry*, 47, 902-908, **2009**.

LIANG, X. T.; FANG, W. S. *Medicinal Chemistry of Bioactive Natural Products*. Nova Jérsei: Wiley, **2006**.

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

LIU, Z.; WENZLER, T.; BRUN, R.; ZHU, X.; BOYKIN, D. Synthesis and antiparasitic activity of new bis-arylimidamides: DB766 analogs modified in the terminal groups. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 83, 167-173, **2014**.

LU, Y.; CHEN, J.; XIAO, M.; MILLER, D. Na overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharmaceutical Research*, 29, 2943-2971, **2012**.

LUCCHESI, A. M.; MARZORATI, L. Catálise de transferência de fase. *Química Nova*, 23, 641-652, **2000**.

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

MCCABE, R. E.; ARAUJO, F. G.; REMINGTON, J. S. Ketoconazole protects against infection with *Trypanosoma cruzi* in a murine model. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32, 960-962, **1983**.

MCCABE, R. E.; REMINGTON, J. S.; ARAÚJO, F. G. Ketoconazole promotes parasitological cure of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 613-615, **1987**.

MENNA-BARRETO, R. F.; GONÇALVES, R. I.; COSTA, E. M.; PINTO, A. V.; OLIVEIRA, M. F.; DE CASTRO, S. L. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radical Biological Medicine*, 47, 644-653, **2009**.

MENDONÇA-PREVIATO, L.; GORIN, P.; BRAGA, A.; SCHARFSTEIN, J.; PREVIATO, J. Chemical structure and antigenic aspects of complexes obtained from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry*, 22, 4980-4987, **1983**.

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

MISHRA, S.; KARMODIYA, K.; SUROLIA, N.; SUROLIA, A. Synthesis and exploration of novel curcumin analogues as anti-malarial agents. *Bioorganical and Medicinal Chemistry*, 16, 1894-2902, **2008**.

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

MORENO, S. N. J.; SILVA, J.; VERCESI, A. E.; DOCAMPO, R. Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *Journal of Experimental Medicine*, 180, 1535-1540, **1994**.

MORTARA, R. A.; SILVA, S.; ARAGUTH, M. F.; BLANCO, S. A.; YOSHIDA, N. Polymorphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Infection and Immunity*, 60, 4673-4678, **1992**.

MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Experimental Parasitology*, 73, 1-14, **1991**.

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

MURTA, A. C.; PERSECHINI, P. M.; PADRON, T. S.; DE SOUZA, W.; GUIMARÃES, J. A.; SCHARFSTEIN, J. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Molecular Biochemistry and Parasitology*, 1, 27-38, **1990**.

NAGEL, R. Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. *Mutation Research*, 191, 17-20, **1987**.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75, 311-335, **2012**.

NICHOLS, C. E.; YOUSSEF, D.; HARRIS, R. G.; JHA, A. Microwave-assisted synthesis of curcumin analogs. *Arkivoc*, xiii, 64-72, **2006**.

NOBLE, R. L. The discovery of the vinca alkaloids—chemotherapeutic agents against cancer. *Biochemistry and Cell Biology*, 68, 1344-1351, **1990**.

NOGALES, E. Structural insight into microtubule function. *Annual Review Biophysical and Biomolecular Structure*, 30, 397-420, **2001**.

OHNISHI, T.; OHASHI, Y.; NOZU, K.; INOKI, S. Mutagenicity of nifurtimox in *Escherichia coli*. *Mutation Research*, 77, 241-244, **1980**.

OJIMA, I.; HABUS, I.; ZHAO, M.; ZUCCO, M.; PARK, Y.H.; SUN, C. M.; BRIGAUD, T. New and efficient approaches to the semisynthesis of taxol and its C-13 side chain analogs by means of b-lactam synthon method. *Tetrahedron*, 48, 6985-7012, **1992**.

OMS, "Death and DALY estimates for 2004 by cause for WHO Member States: Persons, all ages" (XLS). World Health Organization. **2002**. Acessado em 20/07/2015, disponível em <http://www.who.int/entity/healthinfo/global_burden_disease/gbddeathdalycountryestimates2004.xls>

OMS, "Metrics: Disability-Adjusted Life year (DALY)". World Health Organization, **2015**. Acessado em 27/09/2015, disponível em <http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/metrics_daly/en/>

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

OMS, "WHO Model List of Essential Medicine". World Health Organization, **2015**. Acessado em 28/09/2015, disponível em <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/93142/1/EML_18_eng.pdf?ua=1>

OUAISSI, M. A.; CORNETTE, J.; AFCHAIN, D.; CAPRON, A.; GRAS-MASSE, H.; TARTAR, A. *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. *Science*, 234, 603-607, **1986**.

PABON, H. J. J. A synthesis of curcumin and related compounds. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 83, 379-386, **1964**.

PANDA, D.; JORDAN, M. A.; CHU, K. C.; WILSON, L. Differential Effects of vinblastine on polymerization and dynamics at opposite microtubule ends. *The Journal of Biological Chemistry*, 47, 28807-28812, **1996**.

PARTHASATHY, V.A.; CHEMPAKAM, B.; ZACHARIAH, T. J.; *Chemistry of Spices*. 1ed. Oxfordshire: CAB International, **2008**.

PATTERSON, S. & WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present and future prospects. *Trends in Parasitology*, 30, 289-298, **2014**.

PEPIN, J.; MILORD, F.; MPIA, B.; MEURICE, F.; ETHIER, L.; DEGROOF, D.; BRUNEEL, H. An open clinical trial of nifurtimox for arseno-resistant *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in central Zaire. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83, 514-517, **1989**.

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

PEREZ, E. Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agentes based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. *Molecular Cancer Therapy*, 8, 2086-2094, **2009**.

PFALLER, M. A. & KROGSTAD, D. J. Imidazole and polyene activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Journal of Infectious Disease*, 144, 372-375, **1981**.

PINHO, R.T.; VANNIER-SANTOS, M. A.; ALVES, C. R.; MARINO, A. P.; CASTELLO BRANCO, L. R.; LANNES-VIEIRA, J. Effect of *Trypanosoma cruzi* Released Antigens Binding to Non-Infected Cells on Anti-Parasite Antibody Recognition and Expression of Extracellular Matrix Components. *Acta Tropica*, 83, 103-115, **2002**.

PINNER, A. Ueber die Einwirkung von Acetessigäther auf die Amidine *Berichte der Deutschen Chemischen Gessellschaft*, 2519-2520, **1884**.

PINTO, E.; AFONSO, C.; DUARTE, S.; VALE-SILVA, L.; COSTA, E. Antifungal activity of xanthenes: evaluation of their effect on ergosterol biosynthesis by high-performance liquid chromatography. *Chemical Biology Drug Design*, 77, 212-222, **2011**.

PRASAD, S.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer Research and Treatment*, 46, 2-18, **2014**.

PRESTI, M. S. L.; BAZÁN, C.; STRAUSS, M.; BÁEZ, A. L.; RIVAROLA, H. W.; PAGLINI-OLIVA, P. A. Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the actio of thioridazine in different stages of Chagas disease. *Acta Tropica*, 145, 79-87, **2015**.

PREVIATO, J. O.; JONES, C.; GONÇALVES, L. P. B.; WAIT, R.; TRAVASSOS, L. R.; MENDONÇA-PREVIATO, L. O-Glycosidically linked N-acetylglucosamine-bound oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal*, 301, 151-159, **1994**.

PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 10, 81-95, **2009**.

RASMUSSEN, H. B.; CHRISTENSEN, S. B.; KVIST, L. P.; KARAZMI, A. A simple and eficiente separation of the curcumins, the antiprotozoal constituents of *Curcuma longa*. *Planta Medica*, 66, 396-398, **2000**.

RAVELLI, R. B.; GIGANT, B.; CURMI, P. A.; JOURDAIN, I.; LACHKAR, S.; SOBEL, A.; Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*, 428, 198-202, **2004**.

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

REY, L. *Parasitologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **2001**. 856 p.

RODRIGUES, J. C.; ATTIAS, M.; RODRIGUEZ, C.; URBINA, J. A., DE SOUZA, W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46, 487-499, **2002**.

ROMANO, P. S.; ARBOIT, M. A.; VAZQUEZ, C. L.; COLOMBO, M. I. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. *Autophagy*, 5, 6-18, **2009**.

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

ROSS, L.; BARCLAY, C.; VINQVIST, M. R.; GOTO, H.; HASHIMOTO, Y.; TOKUNAGA, A.; UNO, H. On the antioxidant mechanism of curcumin: classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity. *Organic Letters*, 2,2841-2843, **2000**.

RUIZ, R. C.; RIGONI, V. L.; GONZALEZ, J.; YOSHIDA, N. The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. *Parasite Immunology*, 15, 121,125, **1993**.

RUOSLAHTI, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 12, 697-715, **1996**.

SALGUEIRO, F. B.; LIRA, A. F.; RUMJANEK, V. M.; CASTRO, R. N. Phenolic composition and antioxidant properties of Brazilian honeys. *Química Nova*, 37, 821-826, **2014**.

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

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75, 213-267, **2011**.

SHIM, J.P.; KIM, D. H.; JUNG, H. J.; KIM, J. H.; LIM, D. L.; LEE, D.; KIM, K.; AHN, J. W.; YOO, J.; RHO, J.; SHIN, J.; KWON, H. J. Hydrazinocurcumin, a novel synthetic curcumin derivative, is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10, 2439-2444, **2002**.

SIMON, A.; ALLAIS, D. P.; DUROUX, J. L.; BASLY, J. P.; DURAND-FONTANIER, S.; DELAGE, C. Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-y cell proliferation and structure-activity relationships. *Cancer Letters*, 128, 111-116, **1998**.

SMITH, G. F. Design drugs to avoid toxicity. *Progress in Medicinal Chemistry*, 50, 1-53, **2011**.

SANTA-RITA, R. M.; SANTOS, B. H.; MEIRELLEZ, M. N.; DE CASTRO, S. L. Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 75, 219-28, **2000**.

SARAIVA, E. M.; VANNIER-SANTOS, M. A.; SILVA-FILHO, F. C.; DE SOUZA, W. Anionic site behavior in *Leishmania* and its role in the parasite-macrophage interaction. *Journal of Cell Science*, 93, 481-489 **1989**.

SCHWEDE, T.; KOPP, J.; GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31, 3381. **2003**.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40, **2004**.

SOLA, I.; CASTELLÁ, S.; VIAYNA, E.; GALDEANO, C.; TAYLOR, M. C.; GBEDEMA, S.; PÉREZ, B.; CLOS, M. V.; JONES, D. C.; FAIRLAMB, A. H.; WRIGHT, C.W.; KELLO, J. M.; MUÑOZ-TORRERO, D. Synthesis, biological profiling and mechanistic studies of 4-aminoquinoline-based heterodimeric compounds with dual trypanocidal-antiplasmodial activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23, 5156-5167, **2015**.

SONY, D.; LATHEEF, L.; KAMATH, K.; KHALED, M.; WILKINS, J.; KOCHIKUZHIL, B. M.; MALIGA, M. S.; *Polyphenols in Human Health and Disease*. Academic Press, **2014**.

SOTTOMAYOR, M.; LÓPEZ-SERRANO, M.; DICOSMO, F.; ROSBARCELÓ, A. Purification and characterization of alpha-3',4'-anhydrovinblastine synthase (peroxidase-like) from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *FEBS Letters*, 428, 299-303, **1998**.

SOUTO-PADRÓN, T.; CAMPETELLA, O. E.; CAZZULO, J.J.; DE SOUZA, W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *Journal of Cell Science*, 96, 485-490, **1990**.

SOUZA, W. *Doenças negligenciadas*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, **2010**.

SPICER, G. S. & STRICKLAND, J. D. H. 906. Compounds of curcumin and boric acid. Part I. The structure of rosocyanin. *Journal of the Chemical Society*, 4644-4650, **1952**.

SPRAGUE, J. M. & ADKINS, H. Hydrogenation and Hydrogenolysis of 1,3-diketones. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 2669-2675, **1934**.

STEERT, K.; BERG, M.; MOTTRAM, J. C.; WESTROP, G. D.; COOMBS, G. H.; COS, P.; MAES, L.; JOOSSENS, J.; VEKEN, P.; HAEMERS, A.; AUGUSTYNS, K. α -

ketoheterocycles as inhibitors of *Leishmania mexicana* cysteine protease CPB. *Chemistry and Medicinal Chemistry*, 5, 1734-1748, **2010**.

STEWART, J. J. P., Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. *Journal of Computational Chemistry*, 10, 209-220 **1989**.

SUETH-SANTIAGO, V.; MENDES-SILVA, G. P.; DECOTÉ-RICARDO, D.; LIMA, M. E. F. Curcumina, o pó dourado do açafão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. *Química Nova*, 38, 538-532, **2015a**.

SUETH-SANTIAGO, V.; FRANKLIM, T. N.; LOPES, N. D.; LIMA, M. E. F. CYP51: Uma boa ideia? *Revista Virtual em Química*, 7, 539-575, **2015b**.

SUGIYAMA, Y.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Involvement of beta-diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochemical Pharmacology*, 23, 519-525, **1996**.

SUN, Y.; ZHANG, H.; CHEN, D.; LIU, C. Theoretical elucidation on the antioxidante mechanism of curcumin: a DFT study. *Organic Letters*, 4, 2909-2911, **2002**.

TARDIEUX, I.; WEBSTER, P.; RAVESLOOT, J.; BORON, W.; LUNN, J. A.; HEUSER, J. E.; ANDREWS, N. W. Lysosome recruitment and fusion are early events required for *Trypanosoma* invasion of mammalian cells. *Cell*, 71, 1117-1130, **1992**.

TROCHINE, A.; CREEK, D. J.; FARAL-TELLO, P.; BARRET, M.P.; ROBELLO, C. Benzimidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. *PLoS Neglected tropical Diseases*, 8, 1-15, **2014**.

TØNNESEN H. H.; ARRIETA, A. F.; LERNER, D. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIV: Characterization of the spectroscopic properties of the naturally occurring curcuminoids and selected derivatives. *Pharmazie*, 50, 689-693, **1995**.

URBINA, J. A.; Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology*, 114, s91-s99, **1997**.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 311-318, **2009**.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BILLETER, S. R.; EISING, A. A.; HUNENBERGER, P. H.; KRUGER, P.; MARK, A. E.; SCOTT, W. R. P.; TIRONI, I. G.; Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide; vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich and BIOMOS b.v.: Zürich, Groningen, **1996**.

VANNIER-SANTOS, M. A.; PIMENTA, P. F.; DE SOUZA, W. Effects of phorbol ester on *Leishmania mexicana amazonensis*: an ultrastructural and cytochemical study. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 20, 583-593, **1988**.

VANNIER-SANTOS, M. A.; PIMENTA, D. F.; DE SOU SA, W. Effects of phorbol ester on *Leishmania mexicana amazonensis*: an ultrastructural and cytochemical study. *Journal of Submicroscopic Pathology*, 20, 583-593, **1988**.

VANNIER-SANTOS, M. A.; SARAIVA, E. M.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W. Fibronectin Shedding by *Leishmania* may influence the parasite-macrophage Interaction. *European Journal of Cell Biology*, 59, 389-397, **1992**.

VANNIER-SANTOS, M. A.; DE CASTRO, S. L. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. *Current Drug Targets*, 10, 246-260, **2009**.

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

VILLALTA, F.; DOBISH, MC.; NDE, P.N.; KLESCHENKO, Y.Y.; HARGROVE, T.Y.; JOHNSON, C. A.; WATERMAN, M. R.; JOHNSTON, J. N.; LEPESHEVA, G. I. VNI cures acute and chronic experimental Chagas disease. *Journal of Infectious Disease*, 208, 504-511, **2013**.

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

VOLBEDA, A. G.; KISTEMAKER, A. V.; OVERKLEEF, H. S.; MAREL, G. A.; FILIPPOV, D. V.; CODÉE, J. D. C. Chemoselective cleavage of p-methoxybenzyl and 2-naphthylmethyl ethers using a catalytic amount of HCl in hexafluoro-2-propanol. *Journal of Organic Chemistry*, 80, 8796-8806, **2015** WENDEL, S. Transfusion transmitted Chagas disease: Is it really under control? *Acta Tropica*, 115, 28-34, **2010**.

WERBOVETZ, K. A. Tubulin as na antiprotozoal drug target. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2, 519-529, **2002**.

WERBOVETZ, K. A.; SACKETT, D. L.; DELFÍN, D.; BHATTACHARYA, G.; SALEM, M.; OBRZUT, TOMASZ. RATTENDI, D.; BACCHI, CYRUS. Selective antimicrotubule activity of *N*1-phenyl-3,5-dinitro-*N*4,*N*4-di-*n*-propylsulfanilamide (GB-II-5) against kinetoplastid parasites. *Molecular Pharmacology*, 64, 1325-1333, **2003**.

WESTERMAN, S. & WEBER, K. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nature Reviews Molecular Cellular Biology*, 4, 938-947, **2003**.

WOOLSEY, A. M.; SUNWOO, L.; PETERSEN, C. A.; BRACHMANN, S. M.; CANTLEY, L. C.; BURLEIGH, B. A. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *Journal of Cell Science*, 116, 3611-3622, **2003**.

WOOLSEY, A. M. & BURLEIGH, B. A. Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cellular Microbiology*, 6, 829-838, **2004**.

WUTS, P. G. & GREENE, T. W. *Greene's protective groups in organic synthesis*. 4ed. Canada: Wiley, **2007**.

XIE, F.; ZHAO, H.; LI, D.; CHEN, H.; QUAN, H.; SHI, X.; LOU, L.; HU, Y. Synthesis and biological evaluation of 2,4,5-substituted pyrimidines as a new class of tubulin polymerization inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 3200-3205, **2011**.

YANG, H.; GANGULY, A.; CABRAL, F. Inhibition of cell migration and cell division correlates with distinct effects of microtubule inhibiting agents. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 32242-32250, **2010**

YOSHIDA, N.; MORTARA, R. A.; ARAGUTH, M. F.; GONZALEZ, J. C.; RUSSO, M. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, 57, 1663-1667, **1989**.

ZHANG, D.; RAGHAVAN, N.; CHEN, S.; ZHANG, H.; QUAN, M.; LECUREUX, L.; PATRONE, L.M.; LAM, P. Y.S.; BONACORSI, S. J.; KNABB, R. M.; SKILES, G.; HE, K. Reductive isoxazole ring opening of the anticoagulant razaxaban is the major metabolic clearance pathway in rats and dogs. *Drug Metabolism and Disposition*, 36, 303-315, **2008**.

ZHANG, Y.; BOND, C. S.; BAILEY, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H.; HUNTER, W. N. The Crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at 2.3^Å resolution. *Protein Science*, 5, 52-61, **1996**.

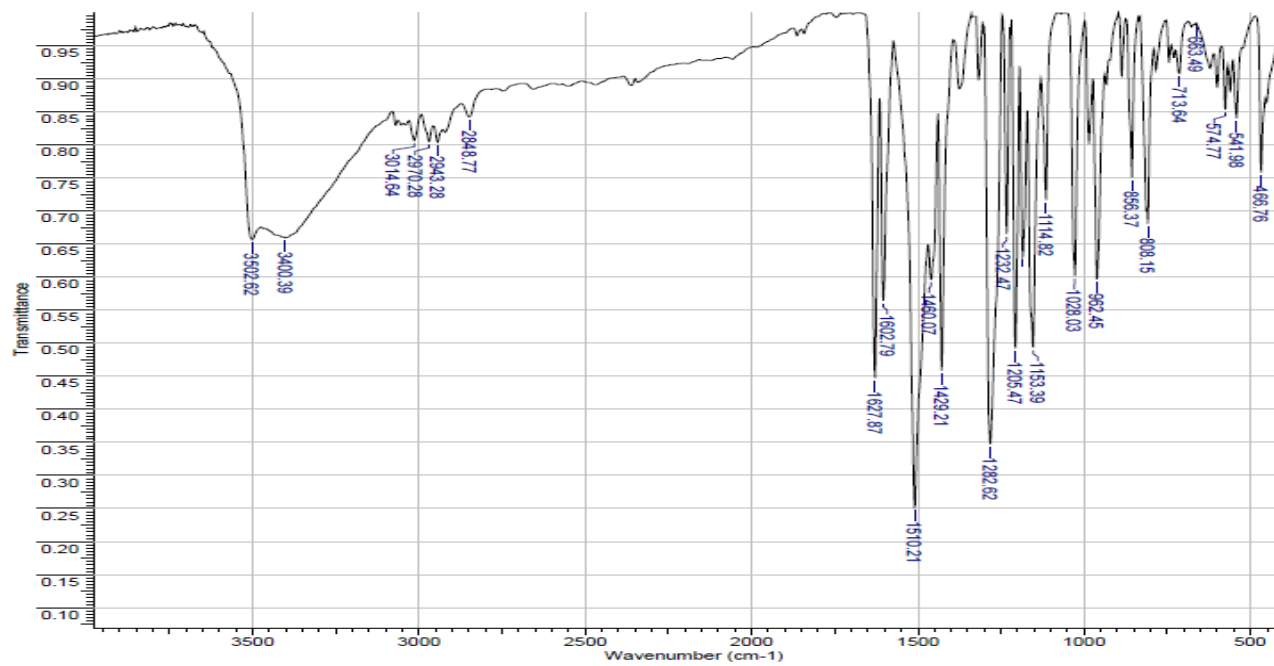
ZHONG, H. A. ADME and toxicity in early drug discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13, 1255-1256, **2013**.

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

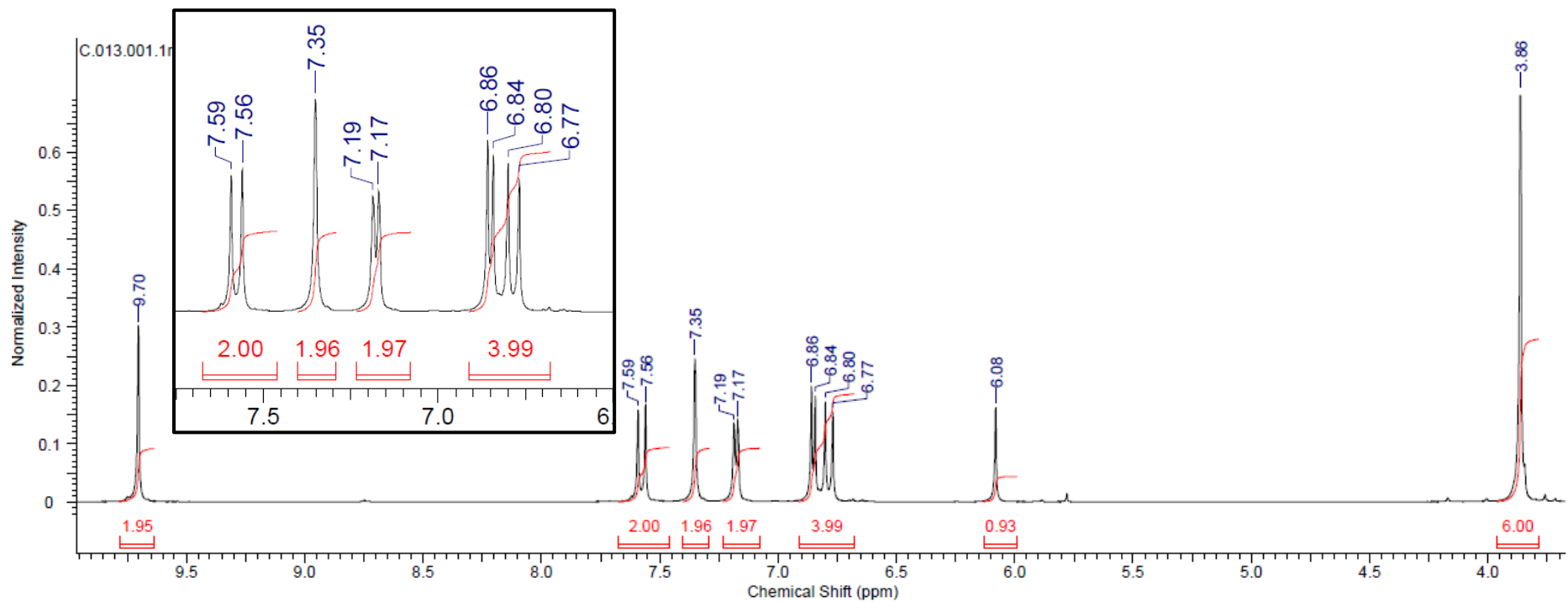
ZHOU, J. & GIANNAKAKOU, P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents*, 5, 65-71, **2005**.

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

ANEXOS



E1: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr da curcumina (3).



E2: Espectro de RMN ^1H da curcumina (**3**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

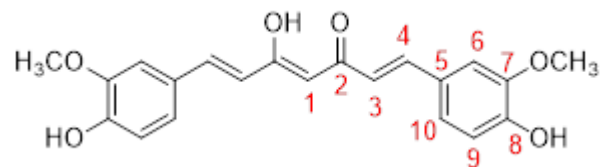
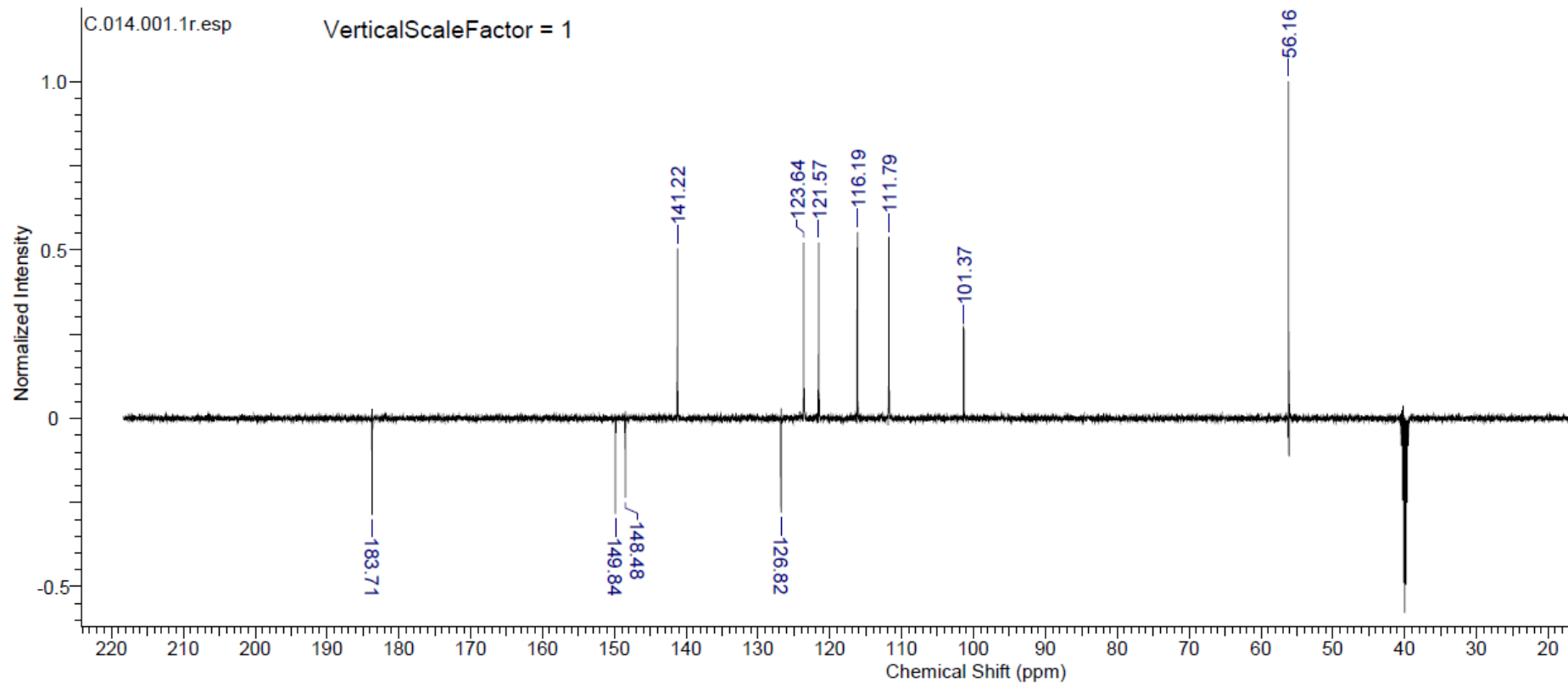


Tabela E2: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H da curcumina (3)

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,08	s	1	-
3	6,78	d	2	15
4	7,57	d	2	15
6	7,35	s	2	-
9	6,85	d	2	10
10	7,18	d	2	10
Ar-OH	9,70	s	2	-
Ar-OCH ₃	3,86	s	6	-



E3: Espectro de DEPTQ da curcumina (**3**) em DMSO- d_6 a 125 MHz.

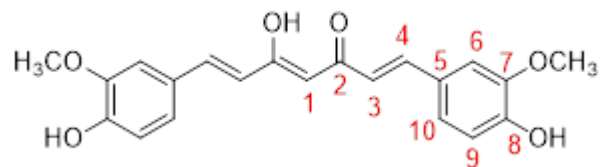
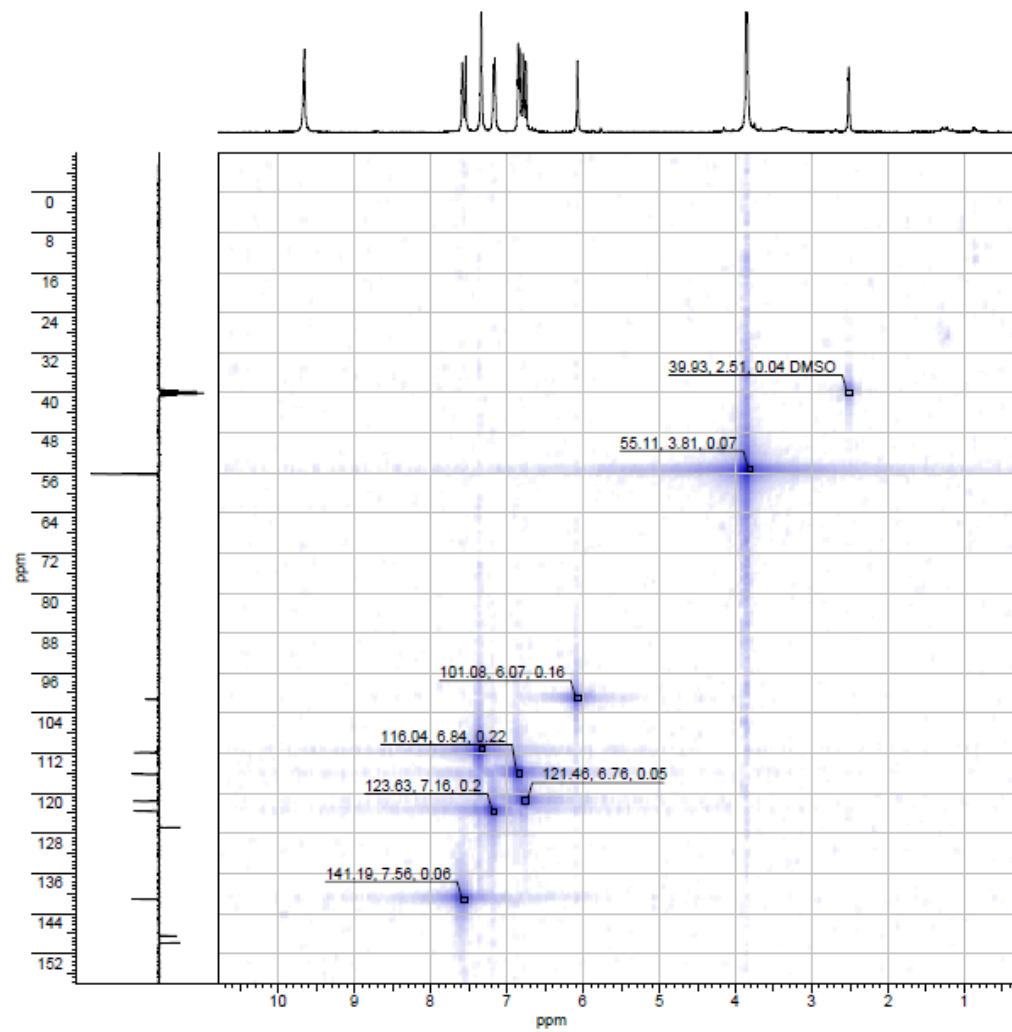


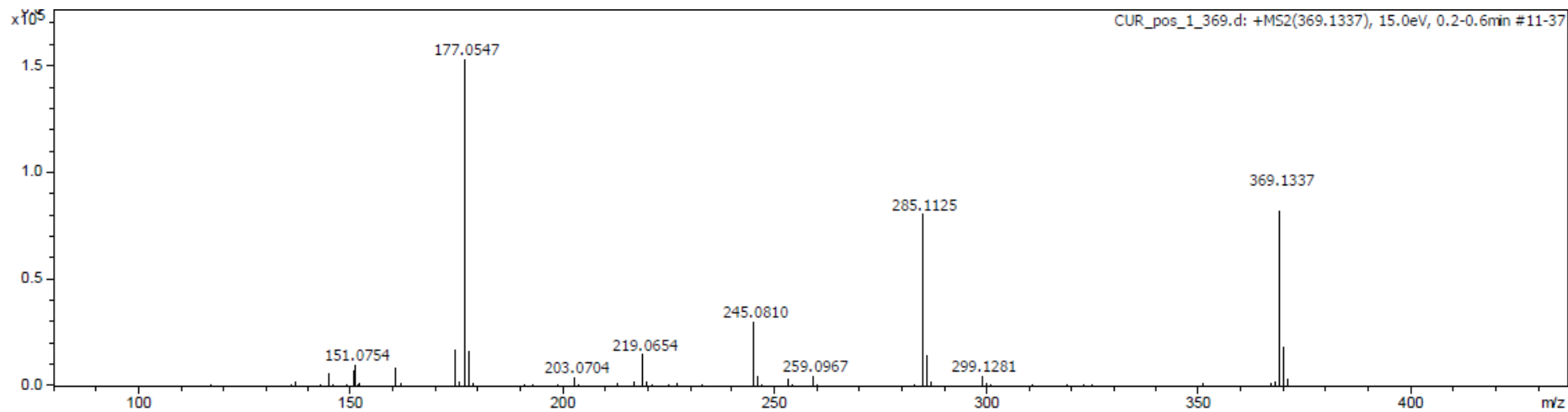
Tabela E3: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ da curcumina (3)

Carbono	δ (ppm)	m
1	101,37	CH
2	183,71	C
3	123,64	CH
4	141,22	CH
5	126,82	C
6	111,79	CH

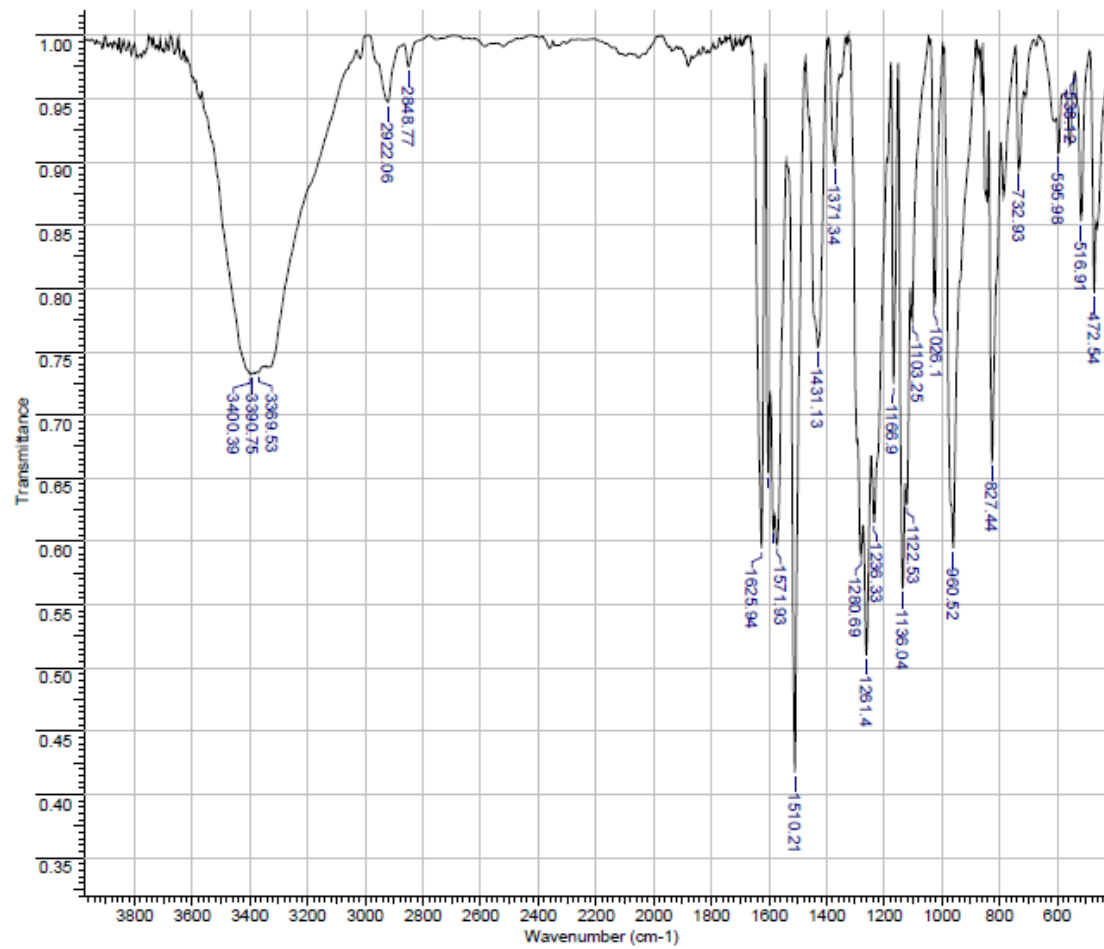
Carbono	δ (ppm)	m
7	148,48	C
8	149,84	C
9	116,19	CH
10	121,57	CH
Ar-OCH ₃	56,16	CH ₃



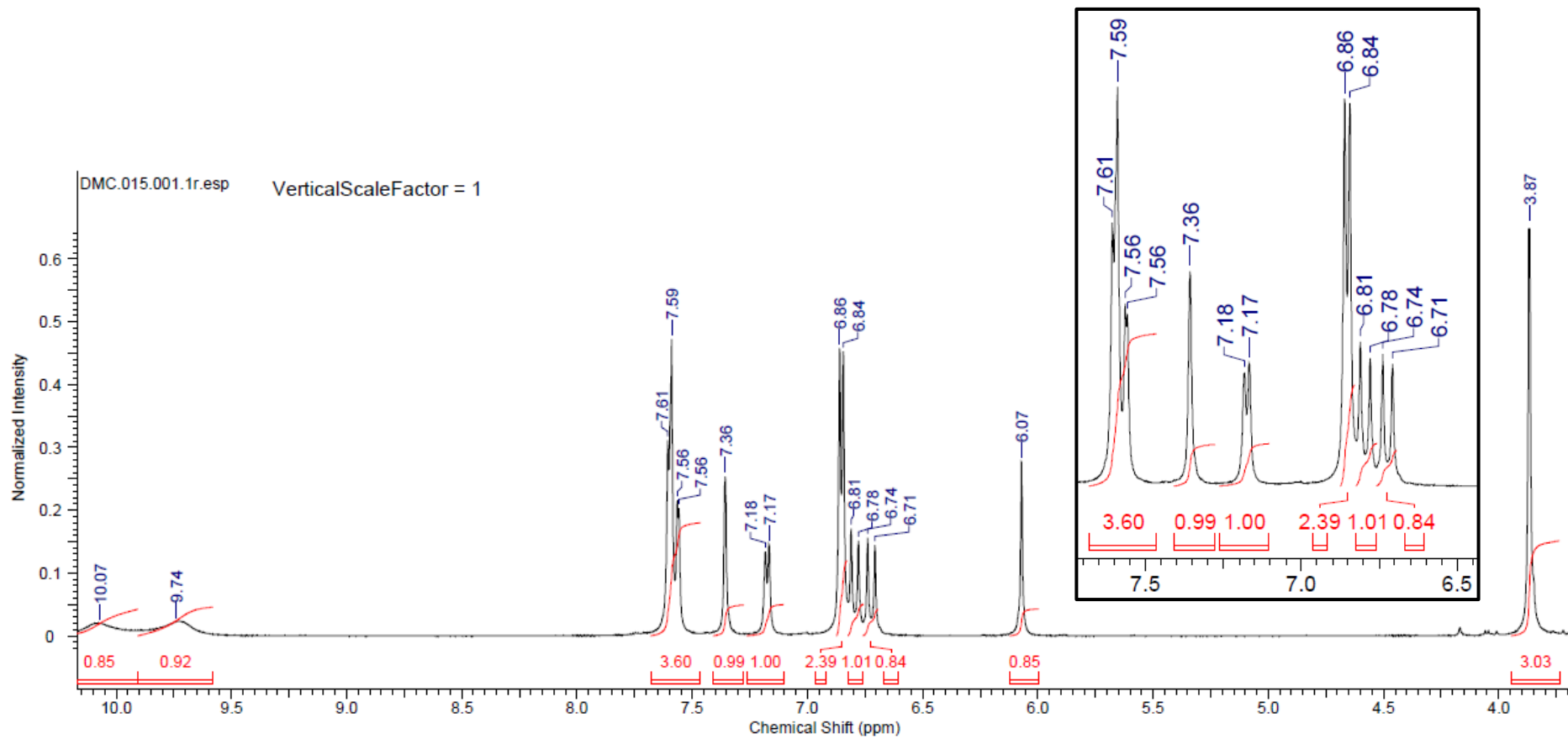
E4: Espectro de HSQC da curcumina (**3**) em DMSO-*d*₆ a 500 MHz.



E5: Espectro de massas em alta resolução (tipo quadrupolo tempo de voo) da curcumina (3)



E6: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr de DMC (4).



E7: Espectro de RMN ^1H de DMC (**4**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

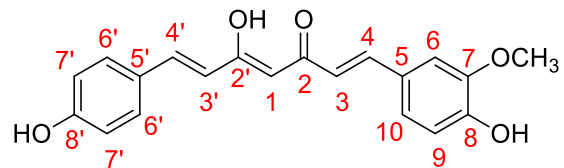
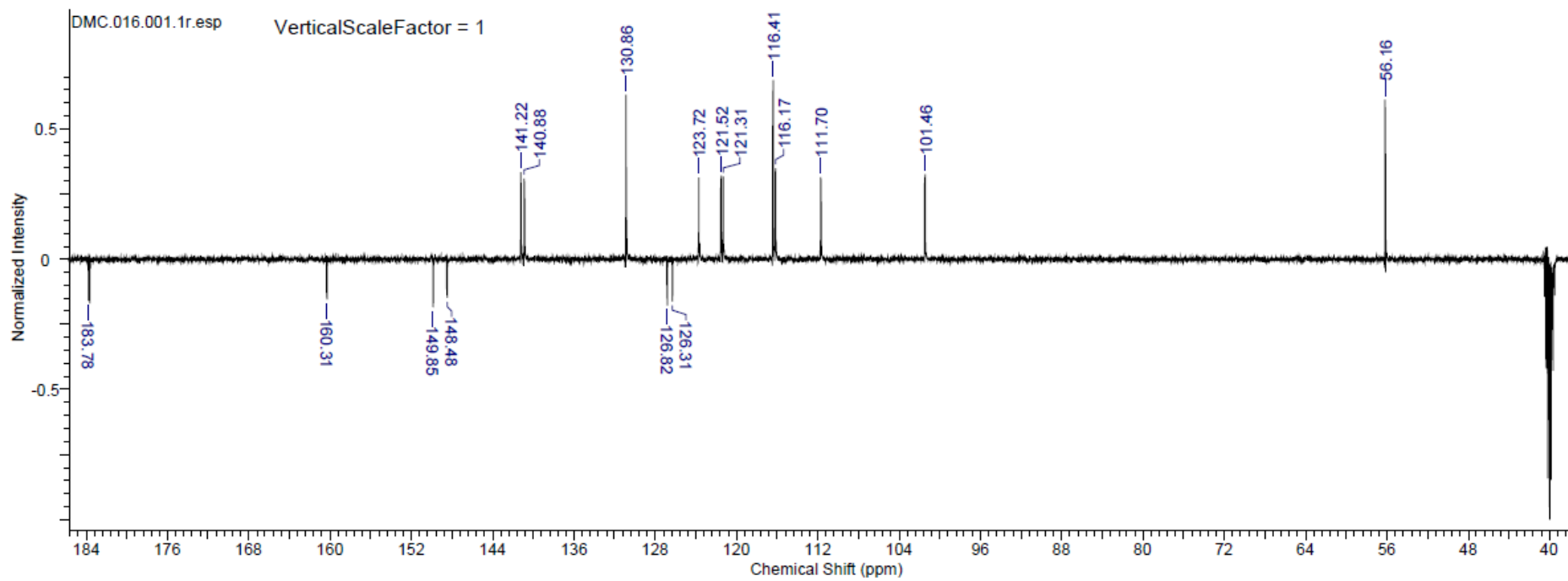


Tabela E7: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de DMC (4)

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,07	s	1	-
3	6,78	d	1	15
3'	6,74	d	1	15
4	7,56	m	-	-
4'	7,61	m	-	-
6	7,36	s	2	-
6'	7,59	m	-	-

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
7'	7,59	m	-	-
9	6,85	d	2	10
10	7,18	d	2	10
Ar-OH	9,74	sl	1	-
Ar-OH'	10,07	sl	1	-
Ar-OCH ₃	3,86	s	6	-



E8: Espectro de DEPTQ de DMC (**4**) em DMSO- d_6 a 125 MHz.

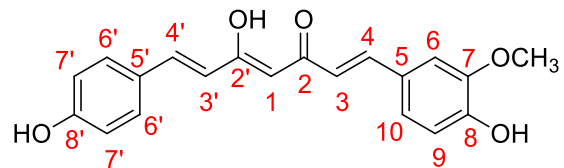
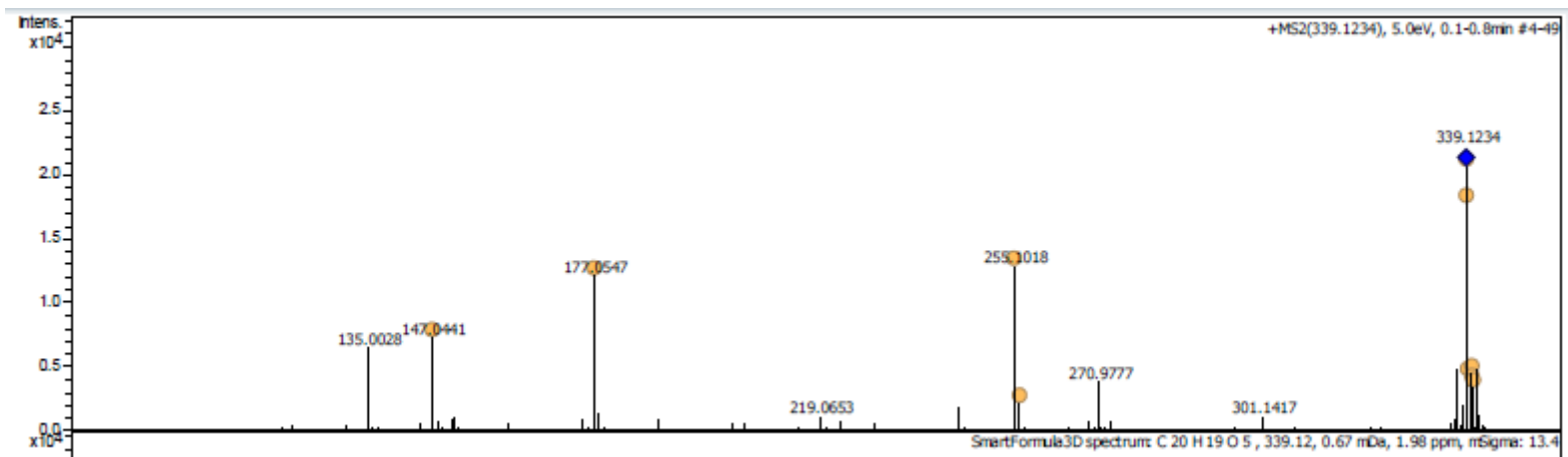


Tabela E8: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de DMC (4)

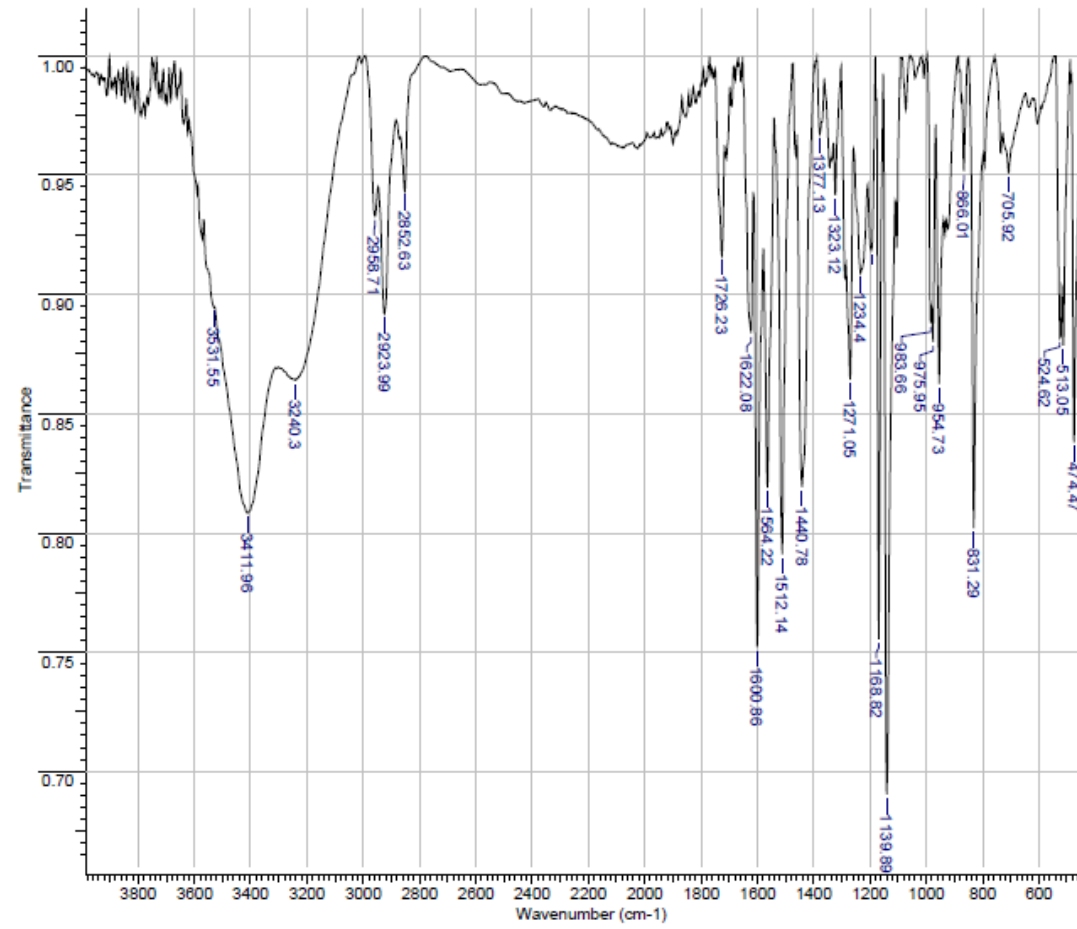
Carbono	δ (ppm)	m
1	101,46	CH
2	183,78	C
2'	183,78	C
3	121,31	CH
3'	121,52	CH
4	141,22	CH

4'	140,88	CH
5	126,31	C
5'	126,82	C
6	111,70	CH
6'	130,86	CH
7	148,48	C
7'	116,41	CH

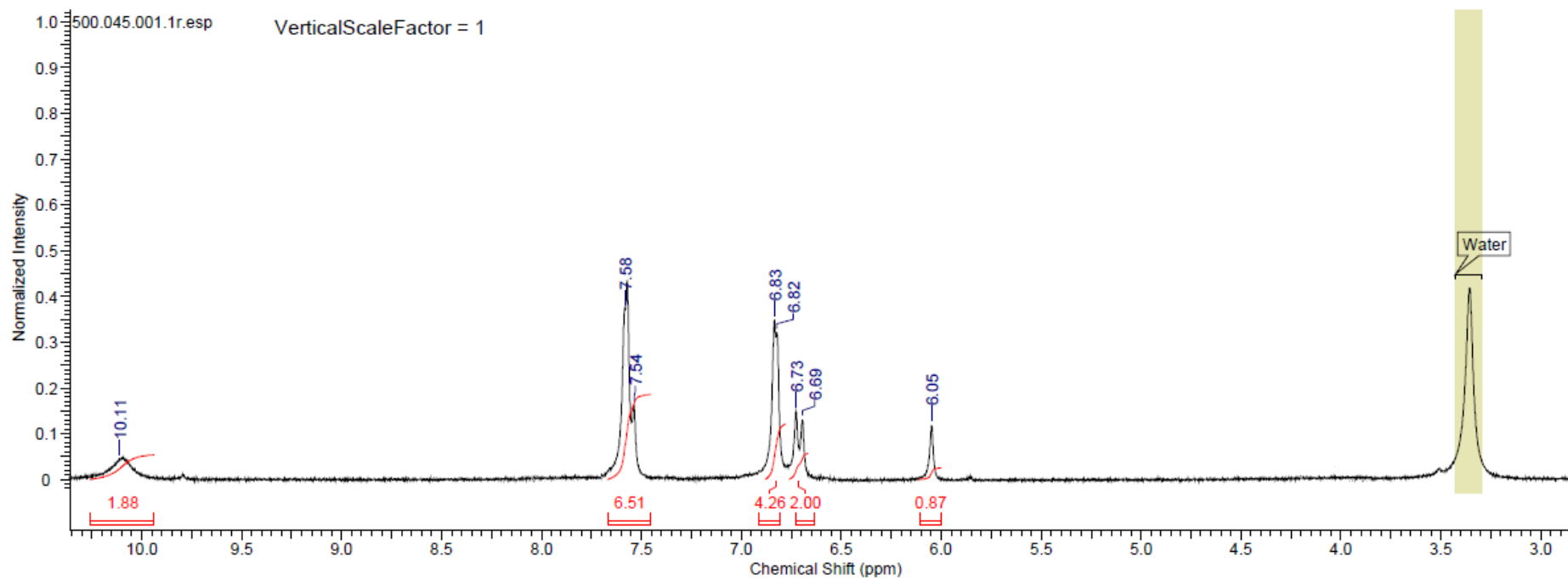
8	149,85	C
8'	160,31	C
9	116,17	CH
10	123,27	CH
Ar-OCH ₃	56,16	CH ₃



E9: Espectro de massas em alta resolução (tipo quadrupolo tempo de voo) de DMC (4)



E10: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr de BDMC (5).



E11: Espectro de RMN ^1H de BDMC (**5**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

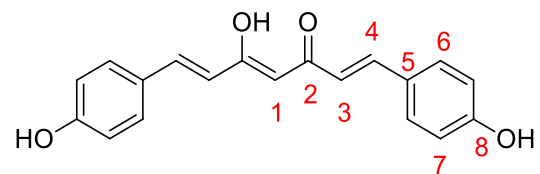
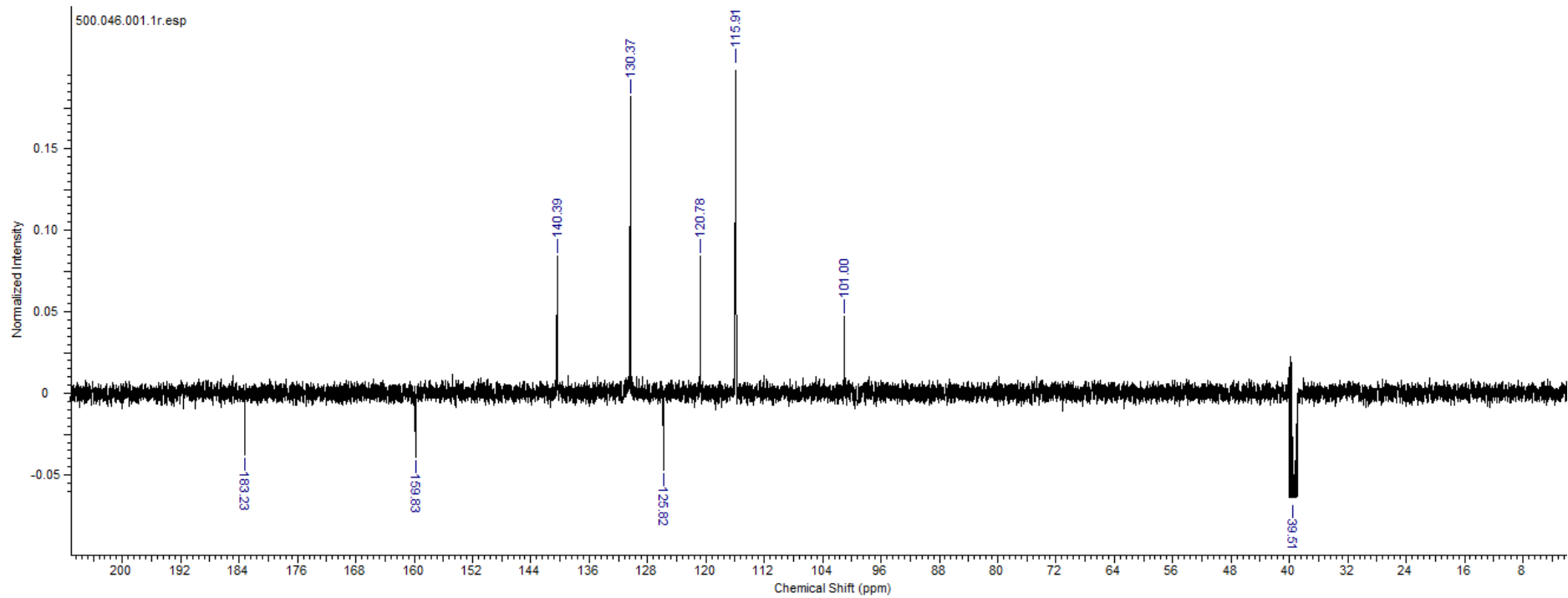


Tabela E11: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de BDMC (5)

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,05	s	1	-
3	6,71	d	2	20
4	7,54	m	-	-
6	7,57	m	-	-
7	6,83	d	4	10
Ar-OH	10,10	sl	2	-



E12: Espectro de DEPTQ de BDMC (5) em DMSO- d_6 a 125 MHz.

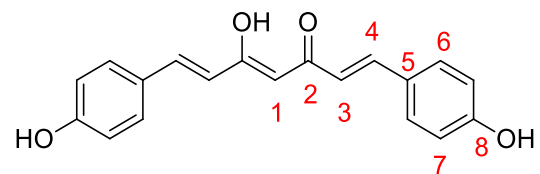
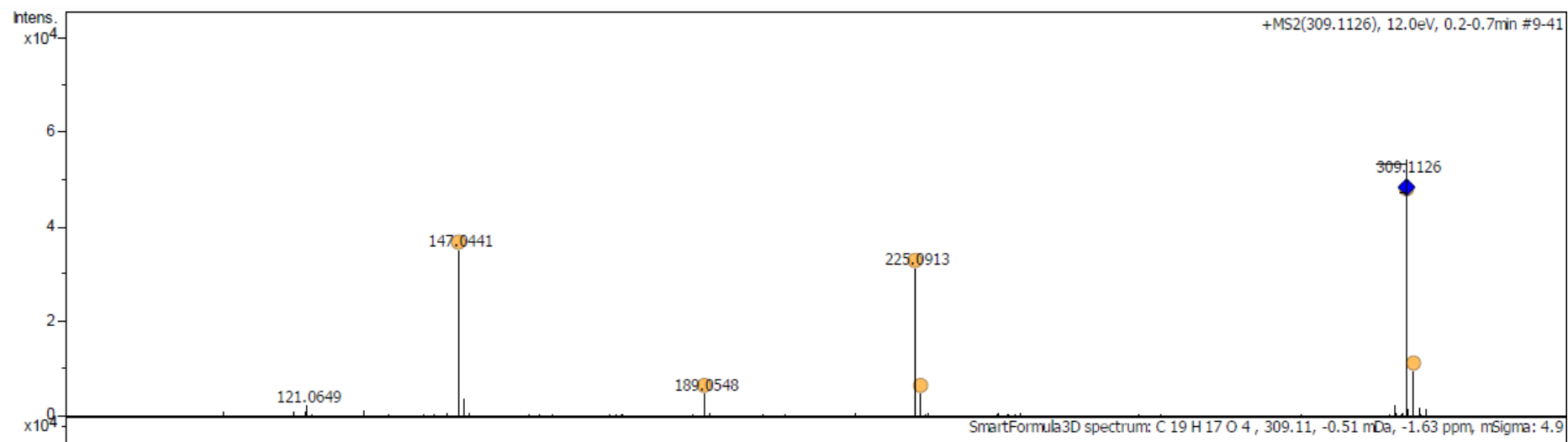
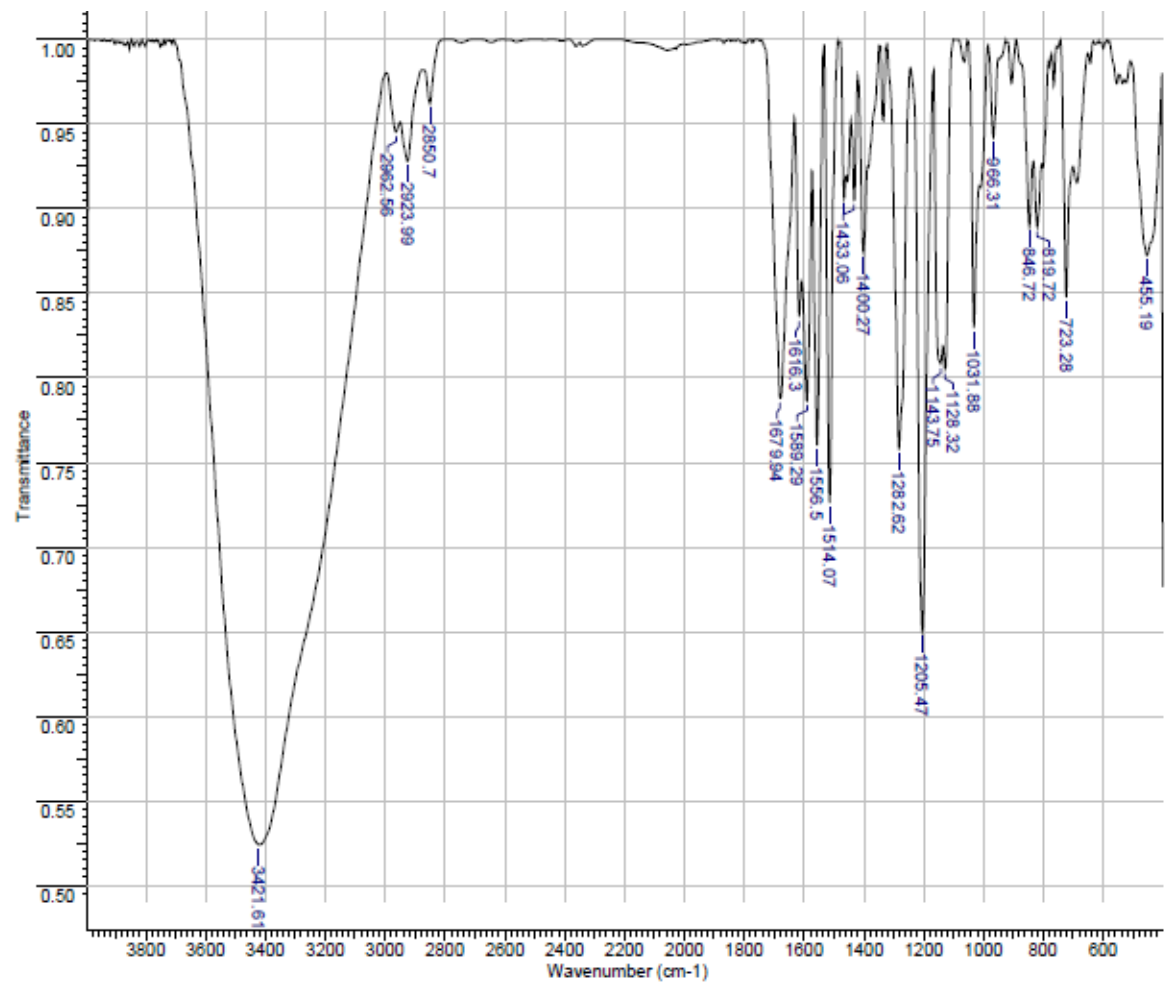


Tabela E12: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de BDMC (5)

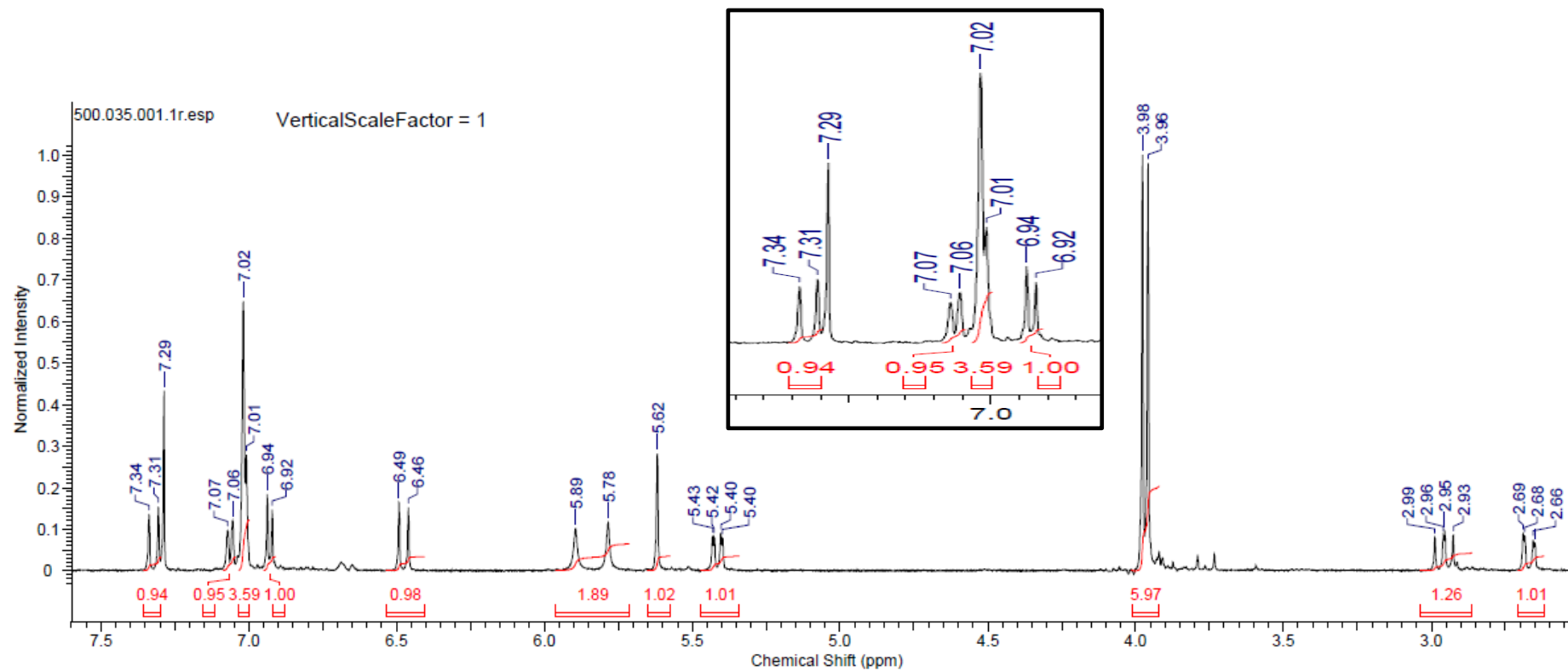
Carbono	δ (ppm)	m
1	101,00	CH
2	183,23	C
3	120,78	CH
4	140,39	CH
5	126,82	C
6	115,91	CH
7	130,37	CH
8	159,83	C



E13: Espectro de massas em alta resolução (tipo quadrupolo tempo de voo) de BDMC (5)



E14: Espectro de infravermelho em pastilha de KBr de CC (8).



E15: Espectro de RMN ^1H de CC (**8**) em CDCl_3 a 500 MHz.

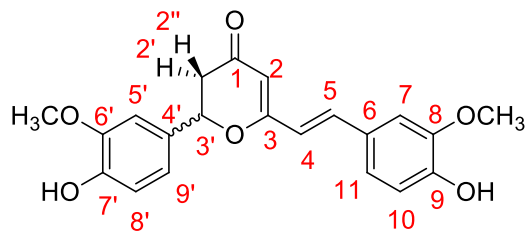
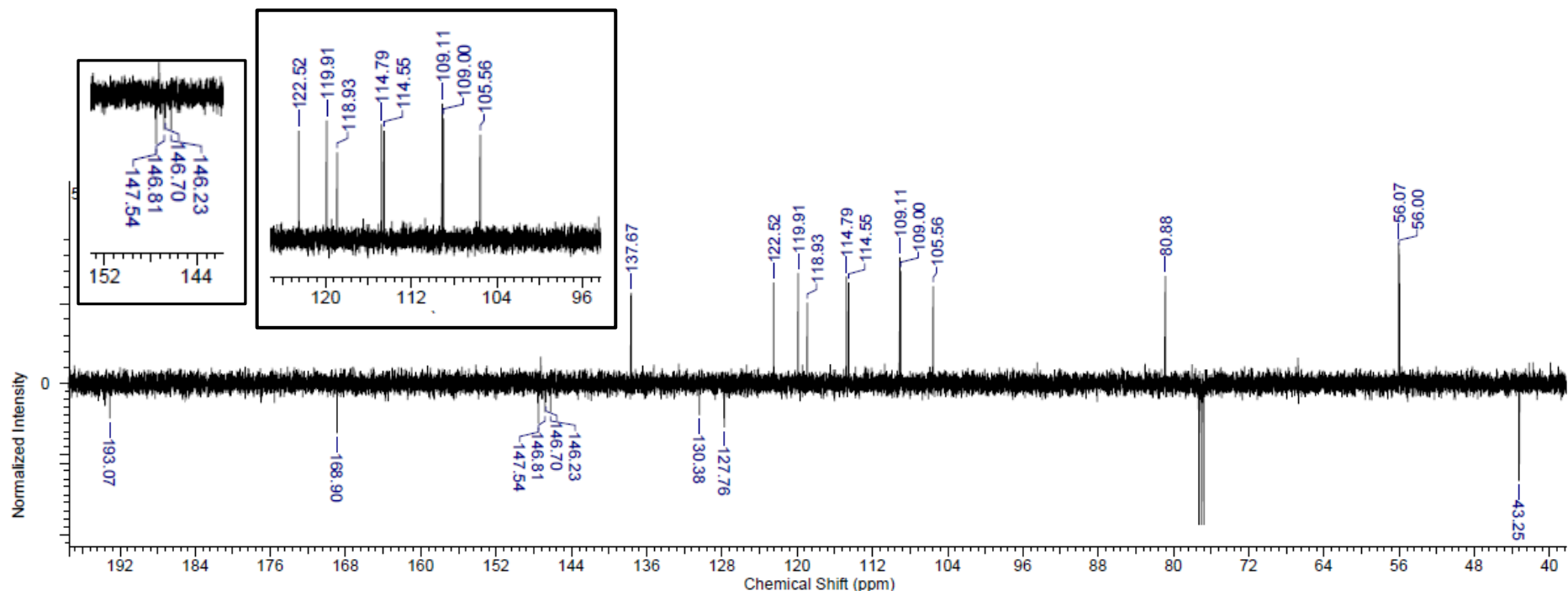


Tabela E15: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de CC (8)

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
2	5,62	s	1	-
4	6,47	d	1	20
5	7,34	d	1	20
7	7,02	m	-	-
10	7,07	d	1	10
11	6,93	d	1	10
2'	2,95	dd	1	$J_1 = 15\text{Hz}$ $J_2 = 10\text{Hz}$
2''	2,68	dd	1	$J_1 = 15\text{Hz}$ $J_2 = 5\text{Hz}$

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
3'	5,41	dd	1	$J_1 = 15\text{Hz}$ $J_2 = 5\text{Hz}$
5'	7,02	m	-	-
8'	7,02	m	-	-
9'	7,02	m	-	-
Ar-OCH ₃	3,98	s	3	-
Ar-OCH ₃	3,96	s	3	-



E16: Espectro de DEPTQ de CC (**8**) em CDCl₃ a 125 MHz.

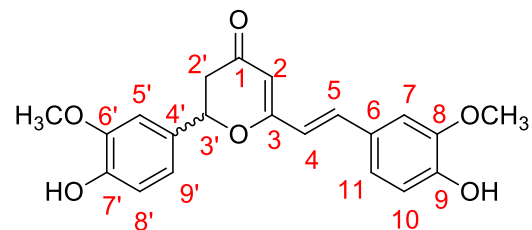
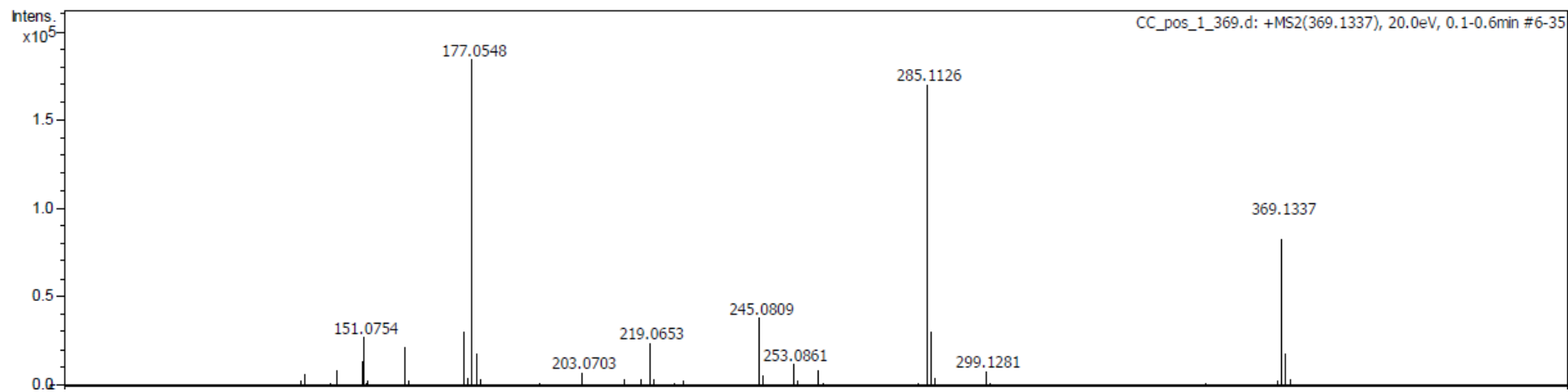


Tabela E16: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de CC (8)

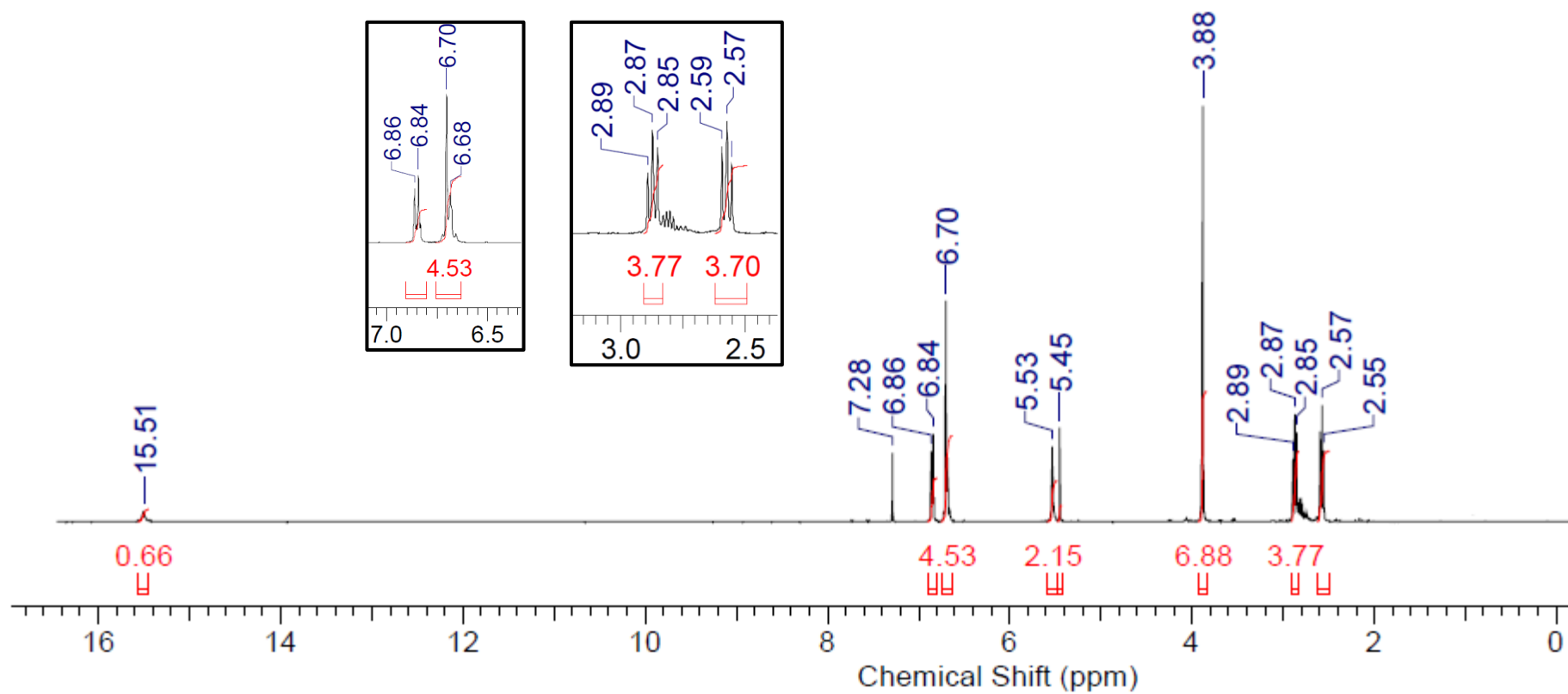
Carbono	δ (ppm)	m
1	193,07	C
2	105,56	CH
2'	43,25	CH ₂
3	168,90	C
3'	80,88	C
4	119,91	CH
4'	127,76	C

Carbono	δ (ppm)	m
5	137,67	CH
5'	109,00	CH
6	130,38	C
6'	146,23	C
7	109,11	CH
7'	147,54	C
8	146,70	C

Carbono	δ (ppm)	m
8'	114,55	CH
9	146,81	C
10	114,79	CH
11	122,52	CH
Ar-OCH ₃	56,07	CH ₃
Ar-OCH ₃	56,00	CH ₃



E17: Espectro de massas em alta resolução (tipo quadrupolo tempo de voo) de CC (8)



E19: Espectro de RMN ^1H de **(30)** em CDCl_3 a 500 MHz.

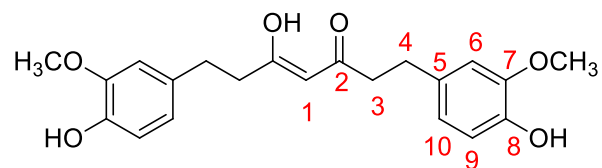
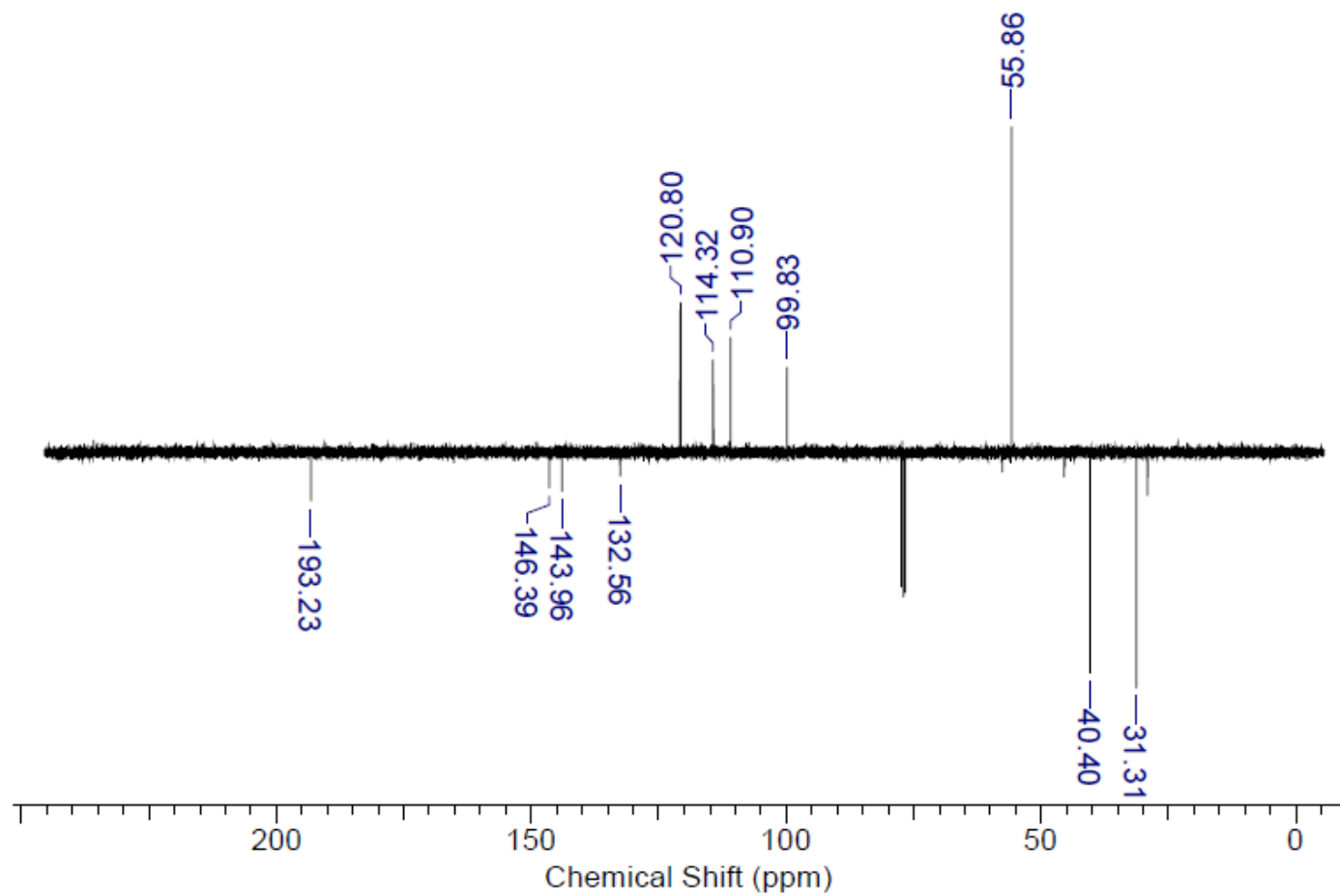


Tabela E19: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(30)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	5,45	s	1	-
3	2,57	t	4	10
4	2,87	t	4	10
6	6,70	s	2	-
9	6,68	m	2	-
10	6,85	d	2	10
Ar-OH	5,53*	s	2	-
Ar-OCH ₃	3,88	s	6	-
OH _(enol)	15,51	s	1	-



E20: Espectro de DEPTQ de **(30)** em CDCl_3 a 125 MHz.

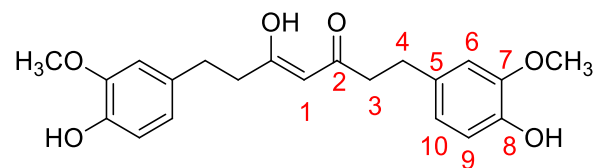
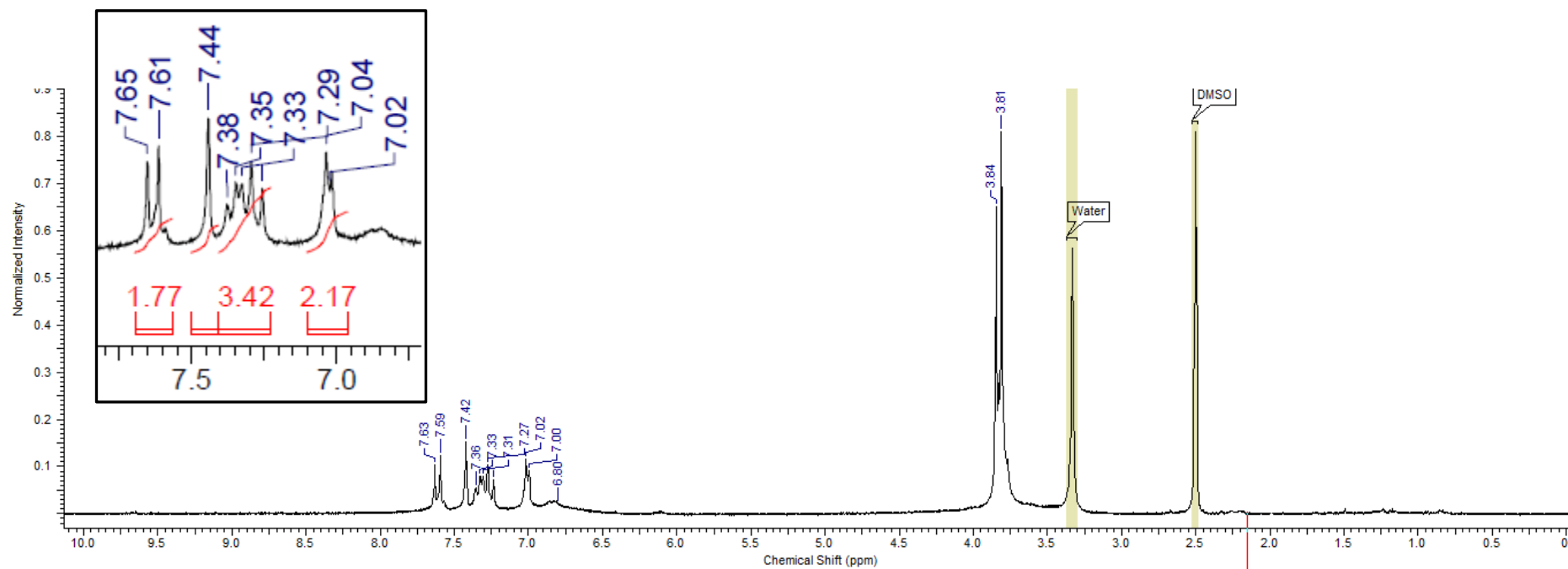


Tabela E20: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(30)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	99,83	CH
2	193,23	C
3	40,40	CH ₂
4	31,31	CH ₂
5	132,56	C
6	110,90	CH

Carbono	δ (ppm)	m
7	146,39	C
8	143,96	C
9	114,32	CH
10	120,80	CH
Ar-OCH ₃	55,86	CH ₃



E22: Espectro de RMN ^1H de **(33)** em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

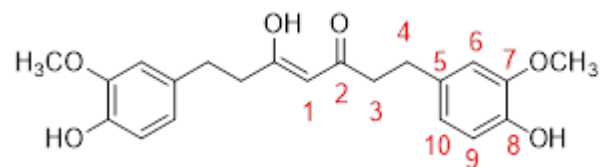
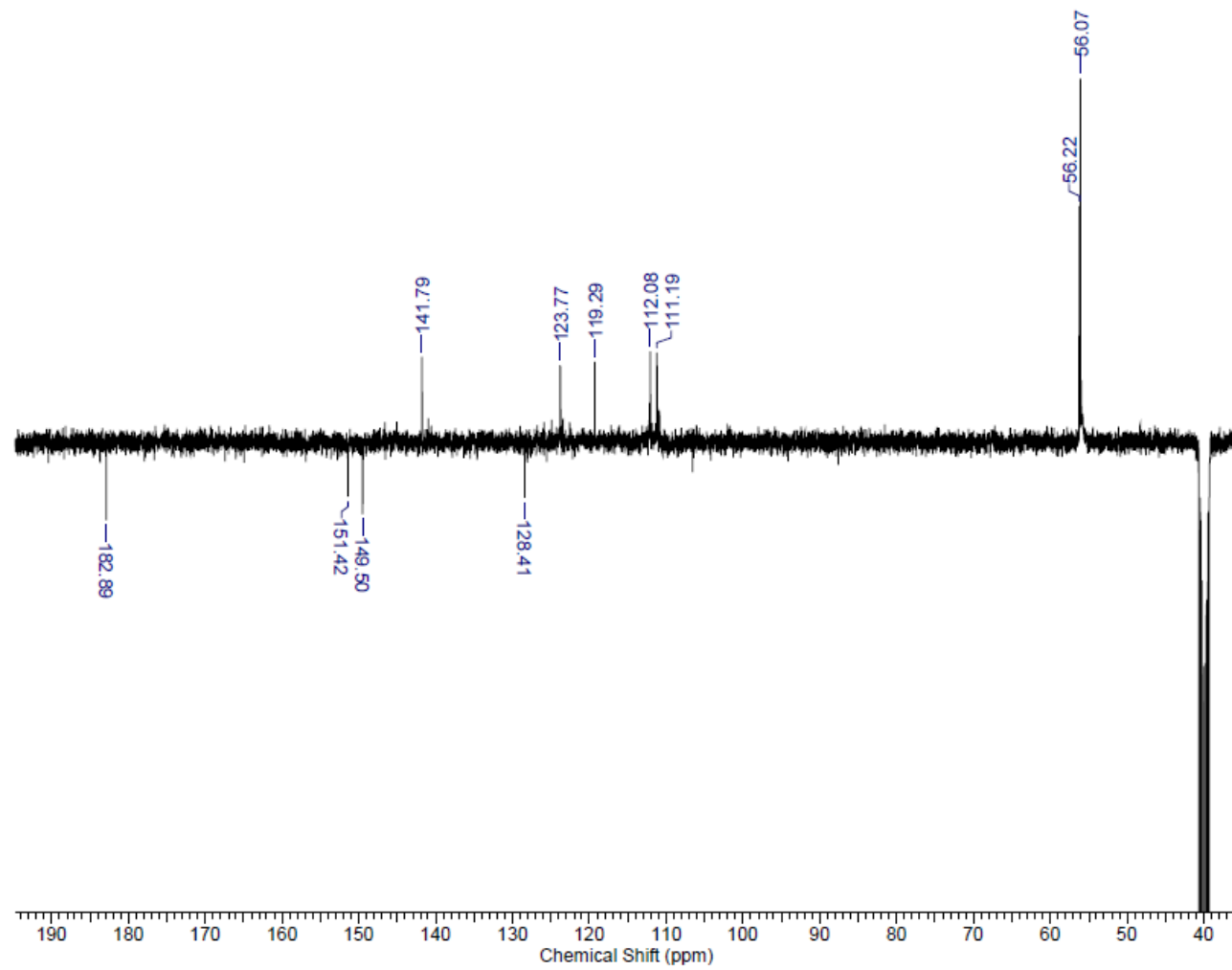


Tabela E22: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(33)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,80	sl	-	-
3	7,34	m	-	-
4	7,64	d	2	20
6	7,44	s	2	-
9	7,03	m	2	-
10	7,38	m	-	-
$\text{C}_8\text{-OCH}_3$	3,83	s	6	-
$\text{C}_7\text{-OCH}_3$	3,86	s	6	-



E23: Espectro de DEPTQ de **(33)** em DMSO-*d*₆ a 125 MHz.

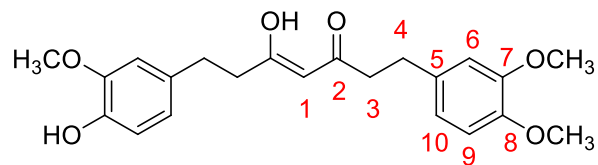
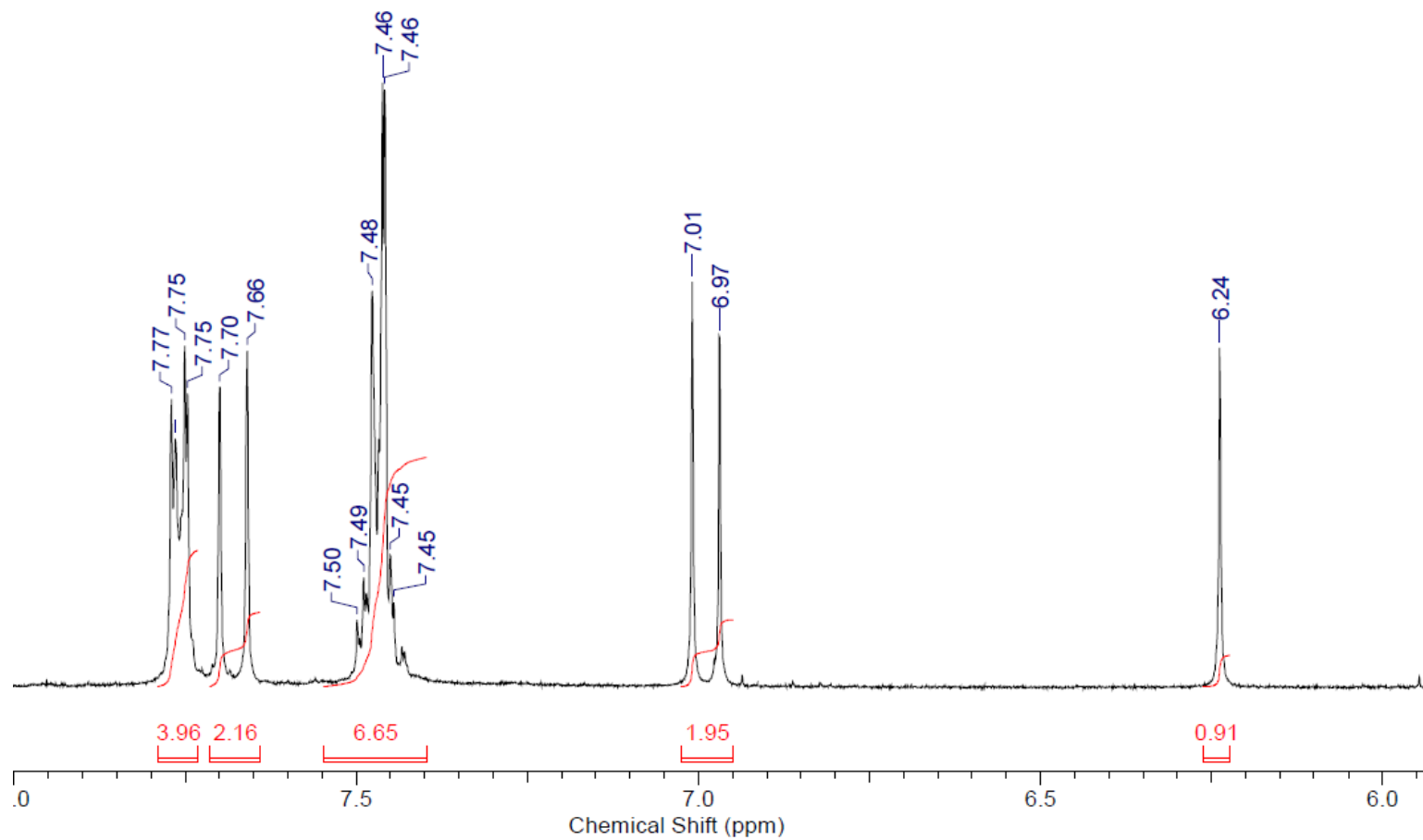


Tabela E23: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(33)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	105,00	CH
2	182,89	C
3	123,77	CH
4	141,79	CH
5	128,41	C
6	111,19	CH

Carbono	δ (ppm)	m
7	149,50	C
8	151,42	C
9	112,08	CH
10	119,29	CH
C ₇ -OCH ₃	56,22	CH ₃
C ₈ -OCH ₃	56,07	CH ₃



E24: Espectro de RMN ^1H de **(34)** em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

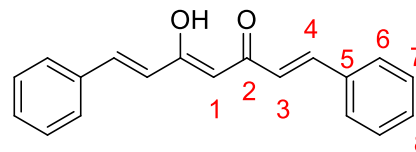
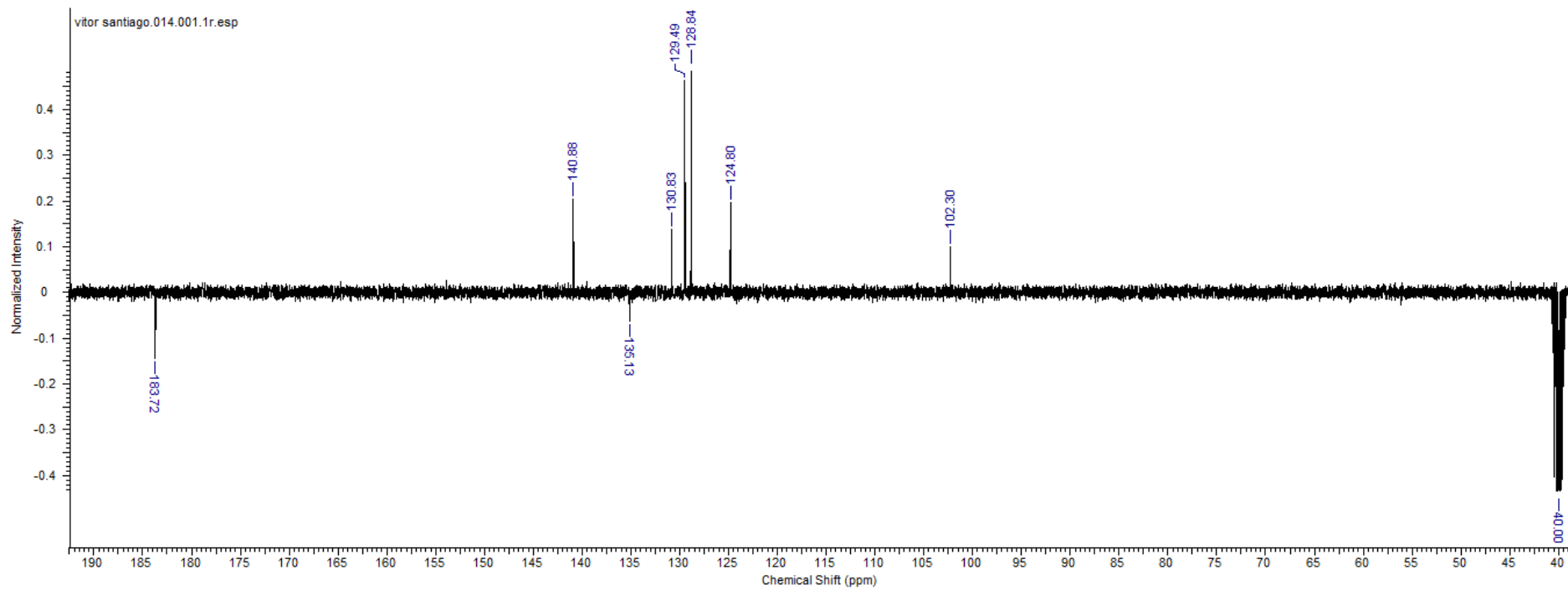


Tabela E24: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(34)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,24	s	1	-
3	6,99	d	2	20
4	7,69	d	2	20
6	7,76	dd	4	10
7	7,46	m	4	-
8	7,48	m	2	-



E25: Espectro de DEPTQ de (**34**) em DMSO- d_6 a 125 MHz.

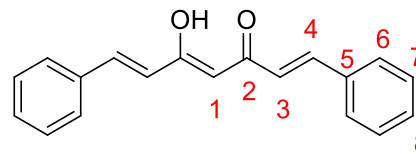
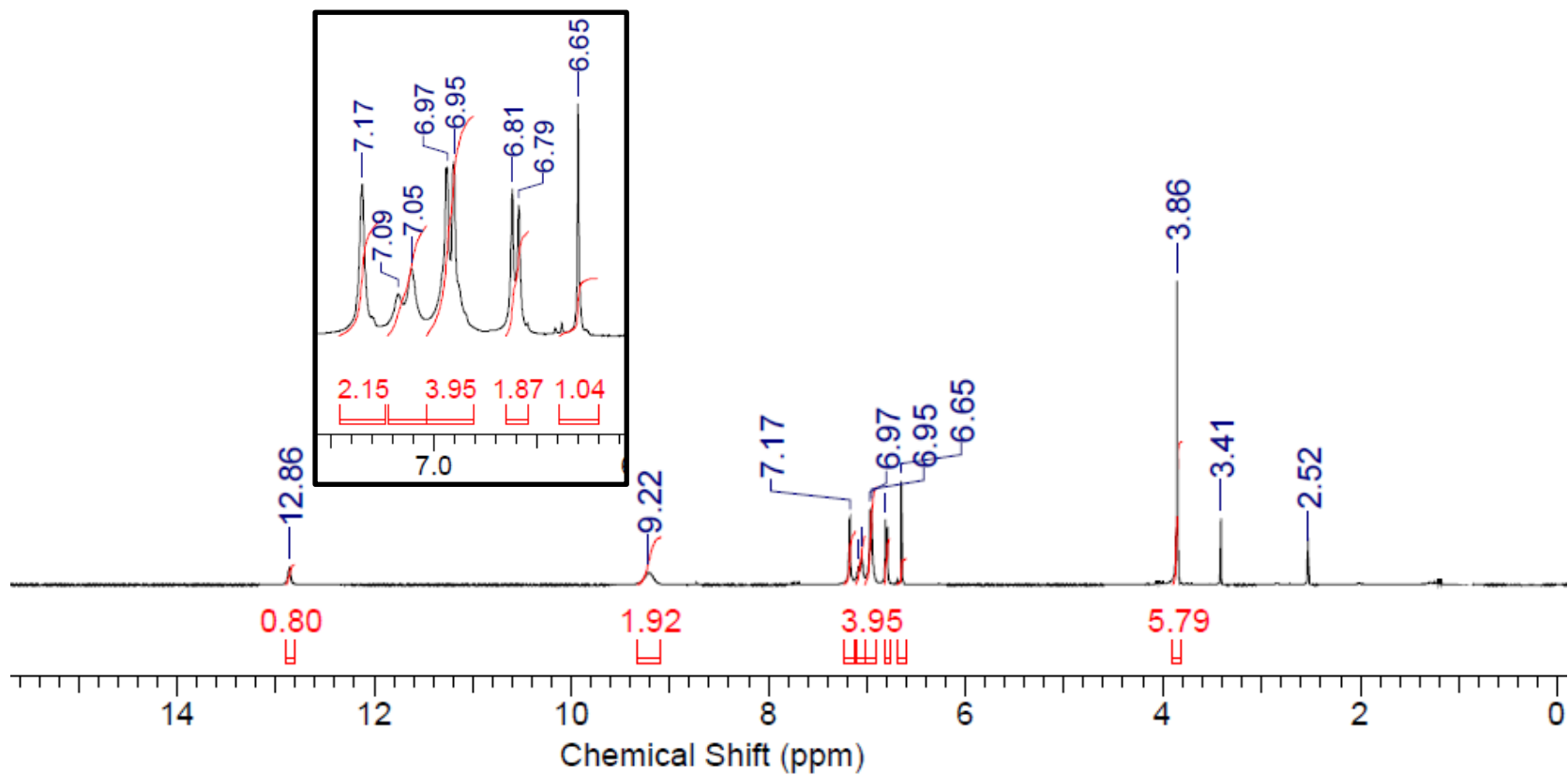


Tabela E25: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(34)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	102,30	CH
2	183,72	C
3	124,80	CH
4	140,88	CH
5	135,13	C
6	111,79	CH
7	148,48	CH
8	149,84	CH



E26: Espectro de RMN ^1H de (**35**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

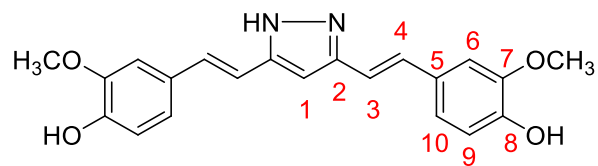
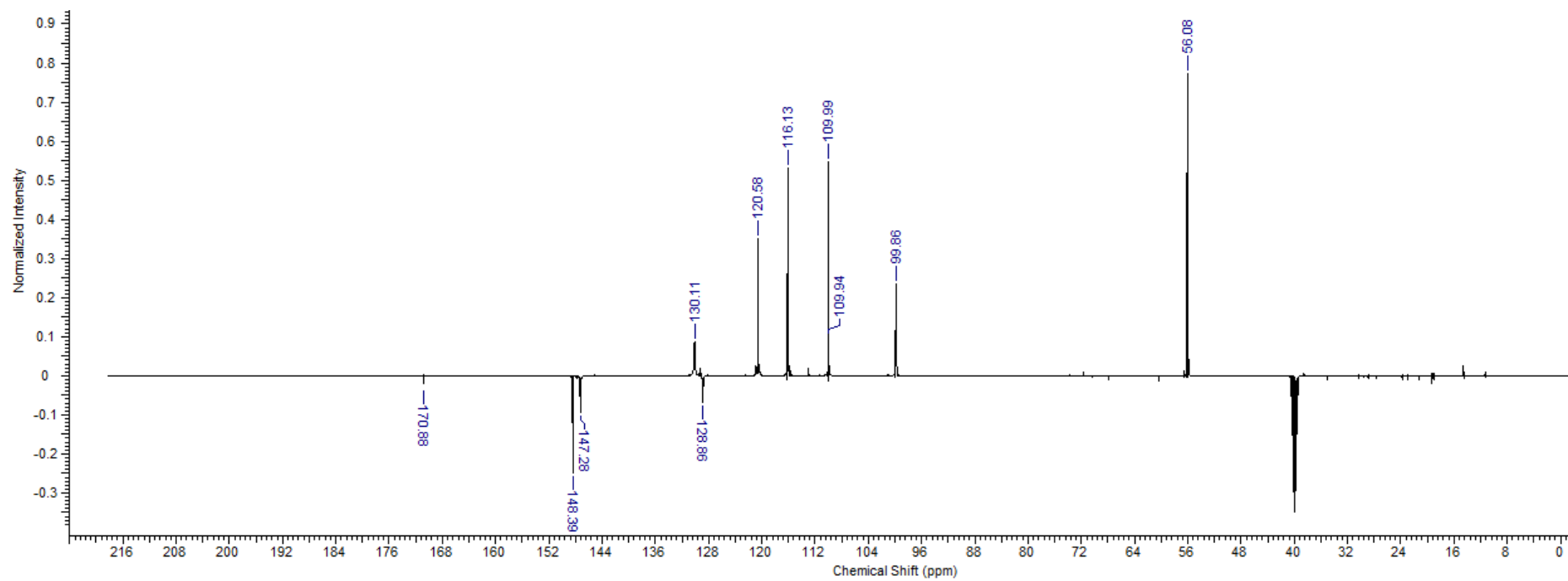


Tabela E26: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(35)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,55	s	1	-
3	6,80	d	2	10
4	6,96	d	2	10
6	7,17	s	2	-
9	7,06	sl	2	-
10	7,06	sl	2	-
Ar-O <u>H</u>	9,22	sl	2	-
Ar-O <u>CH</u> ₃	3,86	s	6	-
N- <u>H</u>	12,86	s	1	-



E27: Espectro de DEPTQ de **(35)** em DMSO-*d*₆ a 125 MHz.

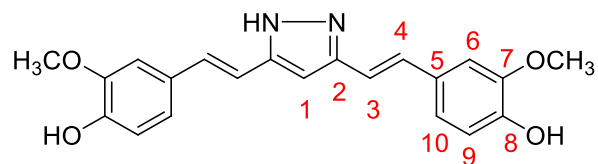
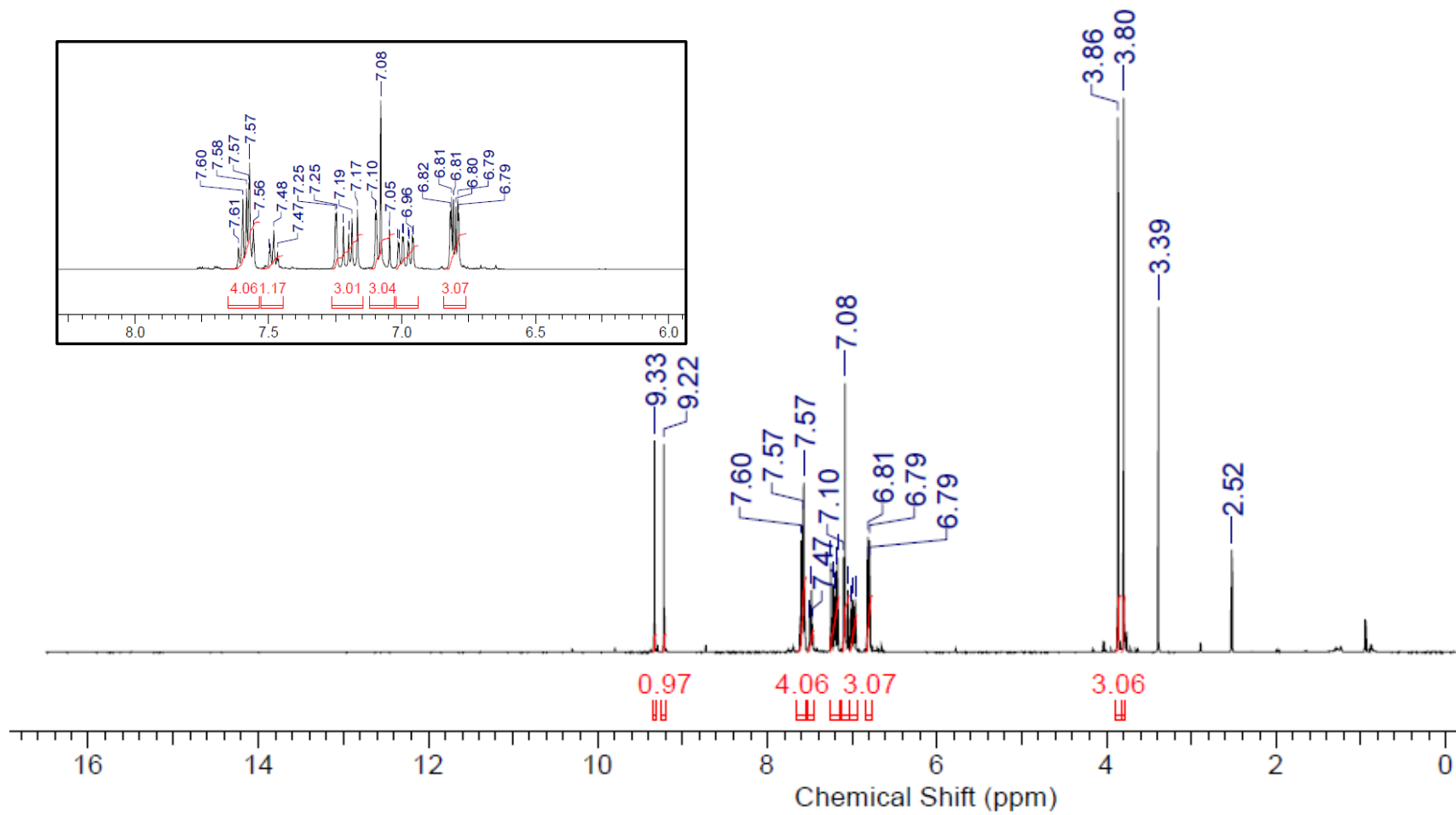


Tabela E26: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(35)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	99,85	CH
2	170,88	C
3	120,58	CH
4	130,10	CH
5	128,85	C
6	109,99	CH
7	147,28	C
8	148,39	C
9	116,08	CH
10	116,12	CH
Ar-OCH ₃	56,07	CH ₃



E28: Espectro de RMN ^1H de **(36)** em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

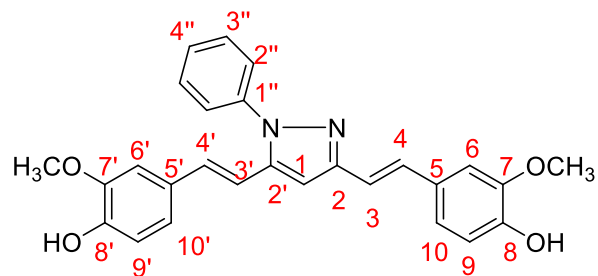
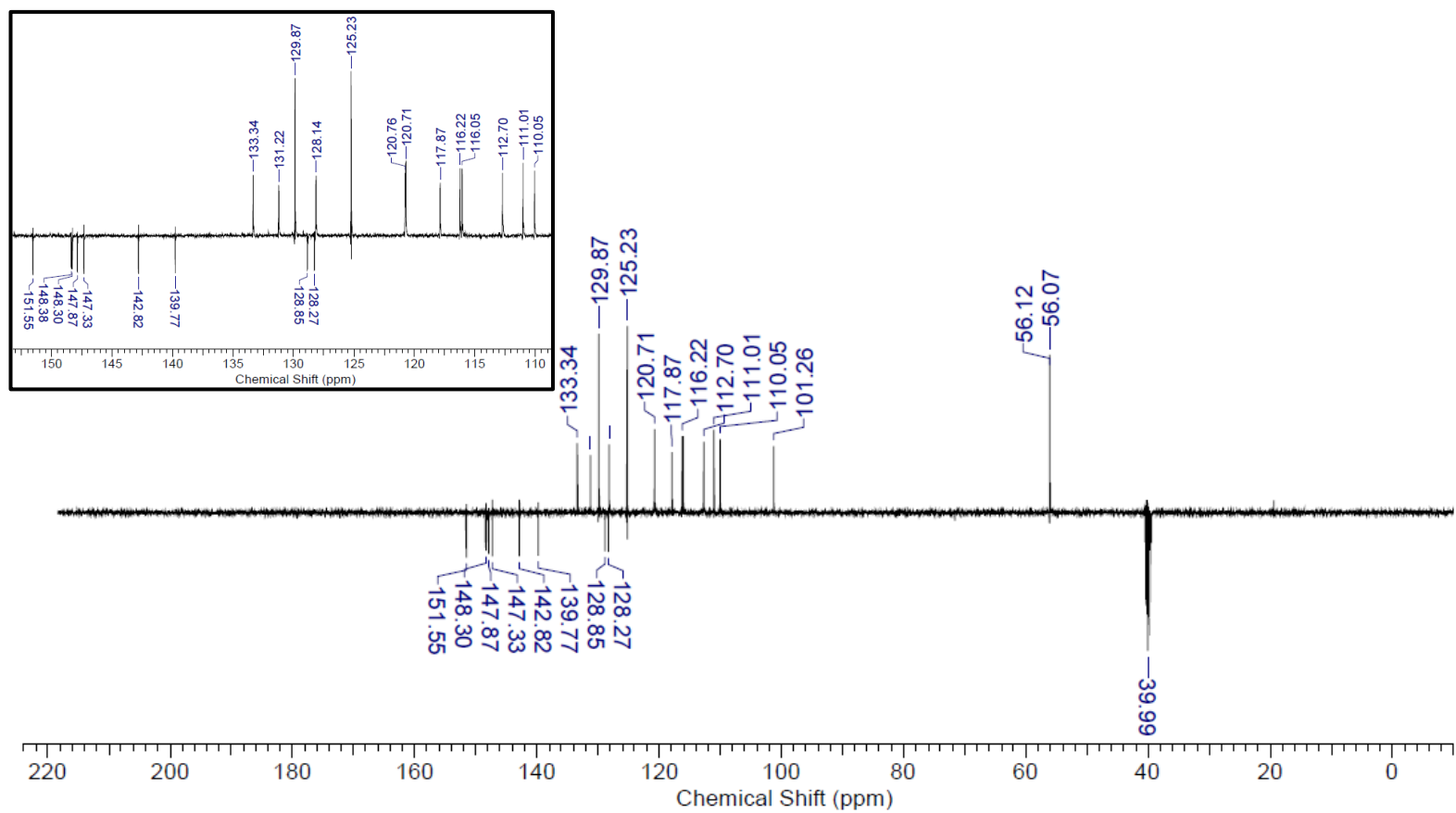


Tabela E28: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(36)**

Hidrogênio	δ	m	J	J	Hidrogênio	δ	m	J	J
1	7,05	s	1	-	4''	7,48	t	1	5
2''	7,59	m	2	-	6	7,25	d	1	1
3	6,80	d	1	15	6'	7,10	d	1	1
3'	7,21	d	1	15	9	6,97	dd	1	5
3''	7,59	m	2	-	9'	7,05	dd	1	5
4	7,58	m	1	-	10	6,79	d	1	5
4'	7,18	d	1	15	10'	6,81	d	1	5
C ₇ -OCH ₃	3,86	s	3	-	C ₈ -OH	9,33	s	1	-
C _{7'} -OCH ₃	3,80	s	3	-	C _{8'} -OH	9,22	s	1	-



E29: Espectro de DEPTQ de **(36)** em DMSO- d_6 a 125 MHz.

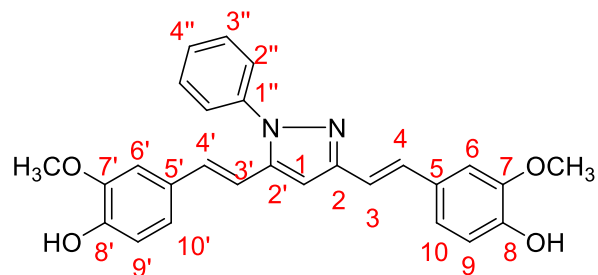
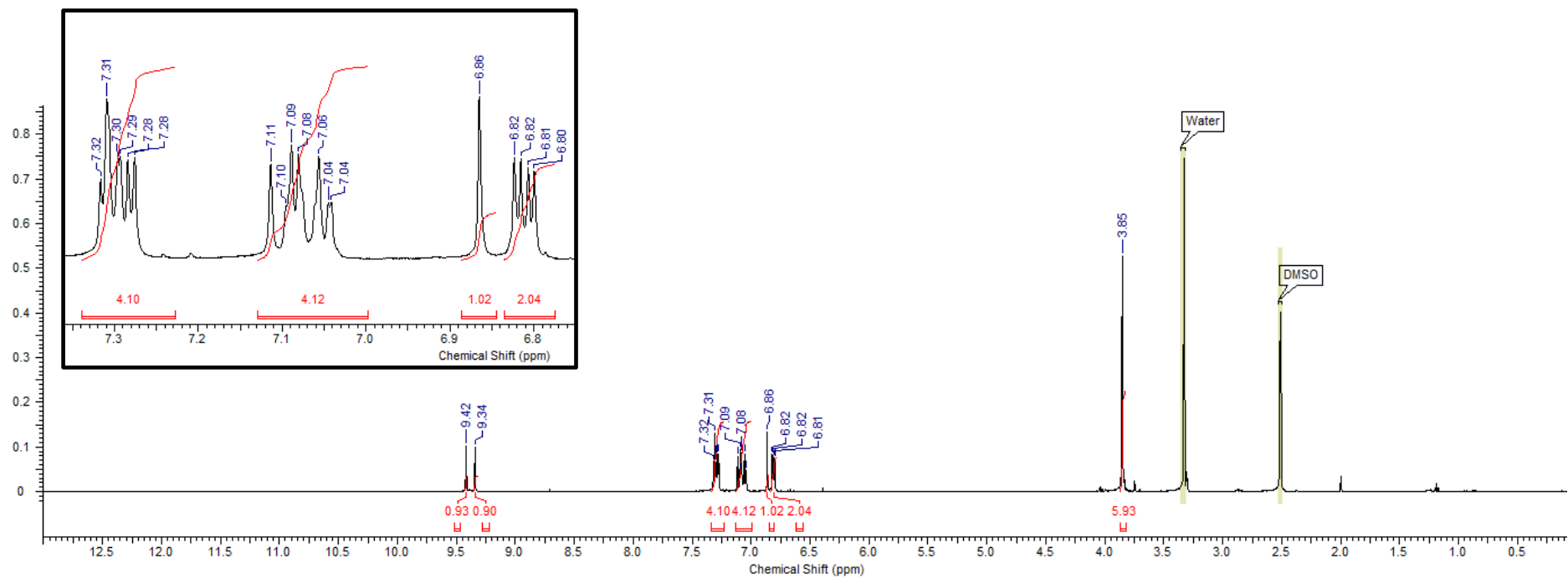


Tabela E29: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(36)**

Carbono	δ (ppm)	m	Carbono	δ (ppm)	m
1	101,26	CH	6	111,01	CH
1''	139,77	C	6'	110,05	CH
2	142,82	C	7	147,33	C
2'	151,55	C	7'	147,87	C
2''	128,14	CH	8	148,30	C
3	125,23	CH	8'	148,38	C
3'	129,87	CH	9	116,05	CH
3''	112,70	CH	9'	116,22	CH
4	131,22	CH	10	120,71	CH
4'	133,34	CH	10'	120,76	CH
4''	117,87	CH	C ₇ -OCH ₃	56,12	CH ₃
5	128,27	C	C _{7'} -OCH ₃	56,07	CH ₃
5'	128,85	C			



E30: Espectro de RMN ^1H de **(37)** em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

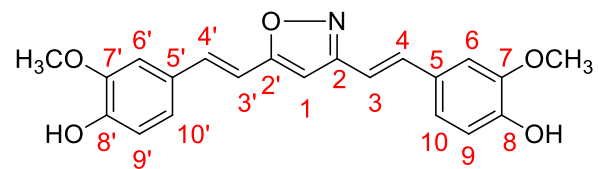
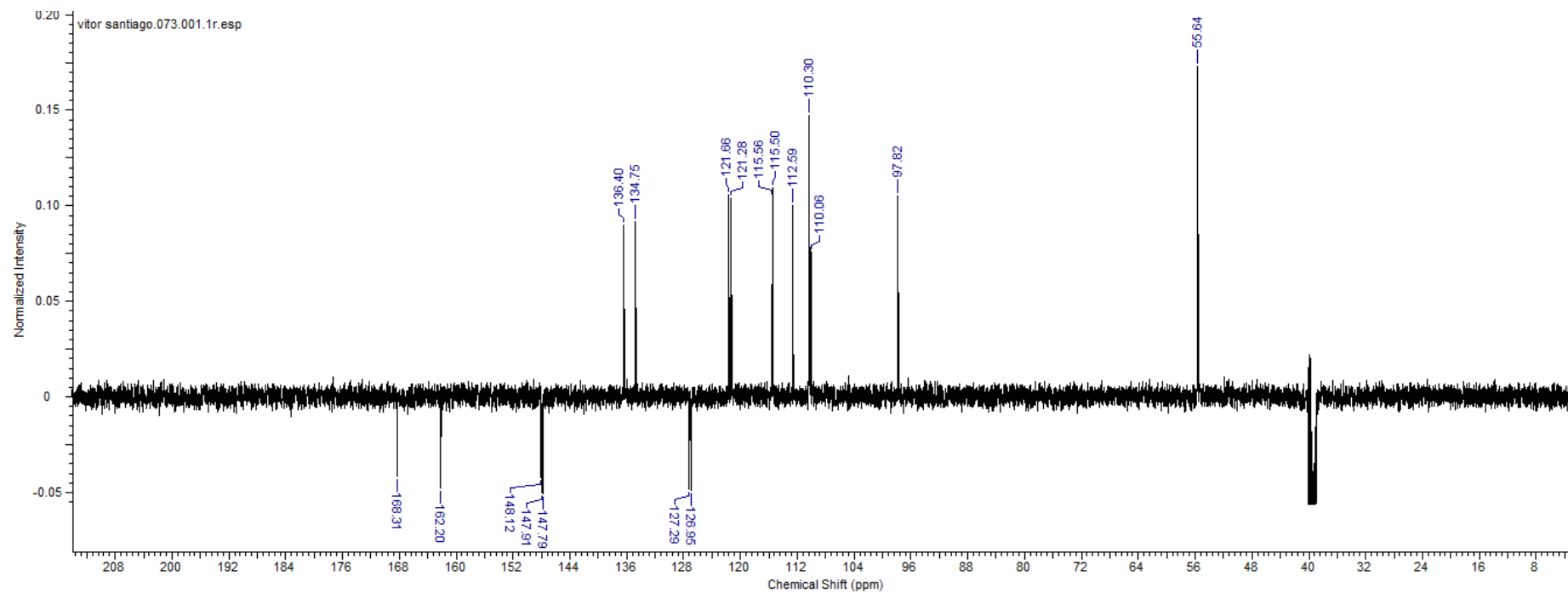


Tabela E30: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(37)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,86	s	1	-
3	7,09	m	-	-
3'	7,09	m	-	-
4	7,31	m	-	-
4'	7,31	m	-	-
6	7,31	m	-	-
6'	7,31	m	-	-
9	6,81	d	1	5
9'	6,82	d	1	5
10	7,09	m	-	-
10'	7,09	m	-	-
Ar-OCH ₃	3,85	s	6	-



E31: Espectro de DEPTQ de **(37)** em DMSO- d_6 a 125 MHz.

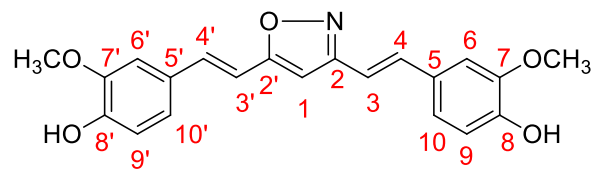
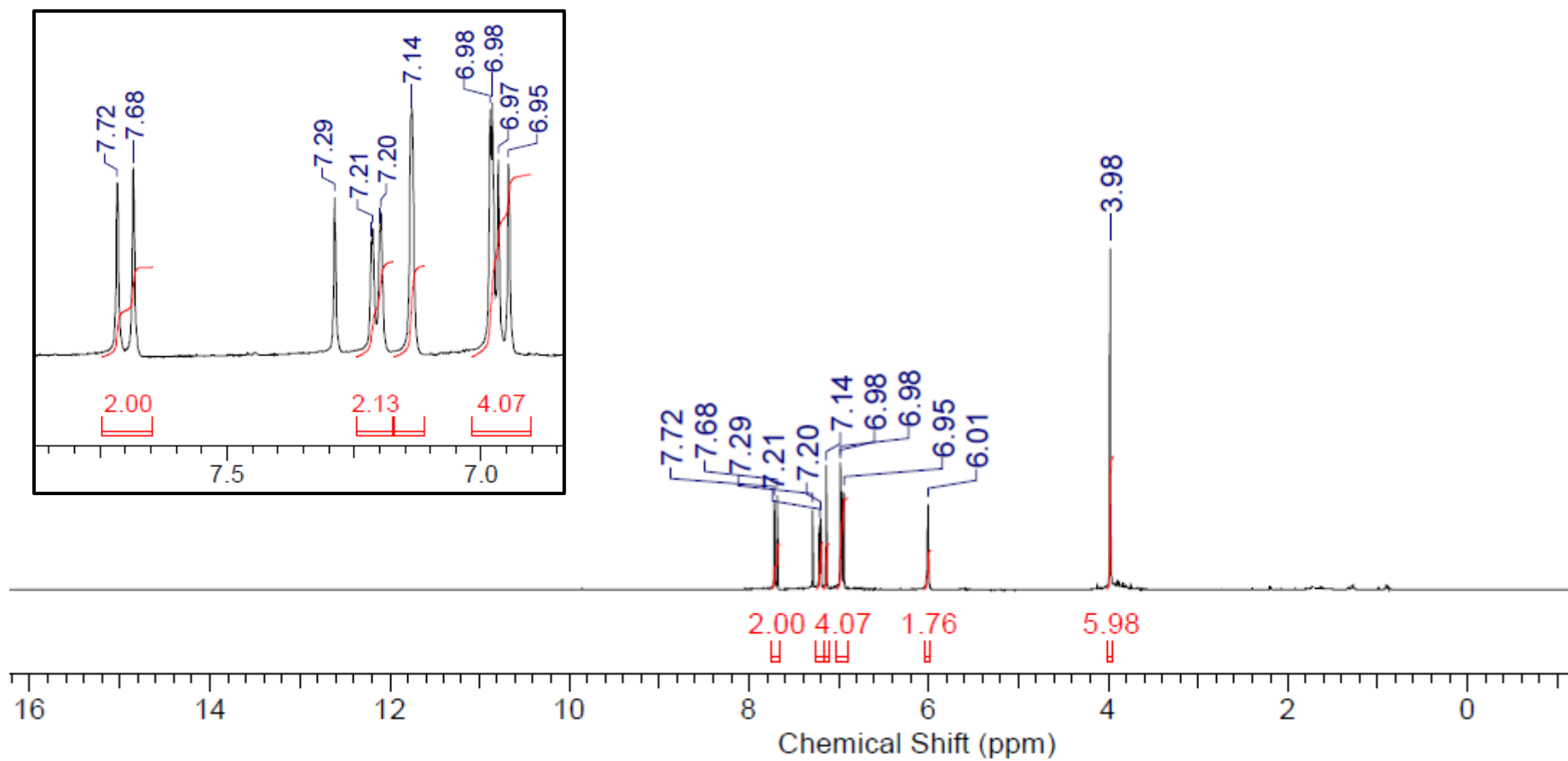


Tabela E31: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(37)**

Carbono	δ (ppm)	m	Carbono	δ (ppm)	m
1	97,82	CH	8	147,91	C
2	168,31	C	8'	147,79	C
2'	162,20	C	9	115,56	CH
3	112,59	CH	9'	115,50	CH
3'	110,06	CH	10	121,66	CH
4	134,75	CH	10'	121,28	CH
4'	136,40	CH	C ₇ -OCH ₃	55,64	CH ₃
5	127,29	C	C _{7'} -OCH ₃	55,64	CH ₃
5'	126,95	C			
6	110,30	CH			
6'	110,30	CH			
7	148,12	C			
7'	147,94	C			



E32: Espectro de RMN ^1H de **(38)** em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

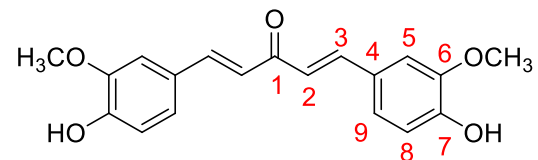
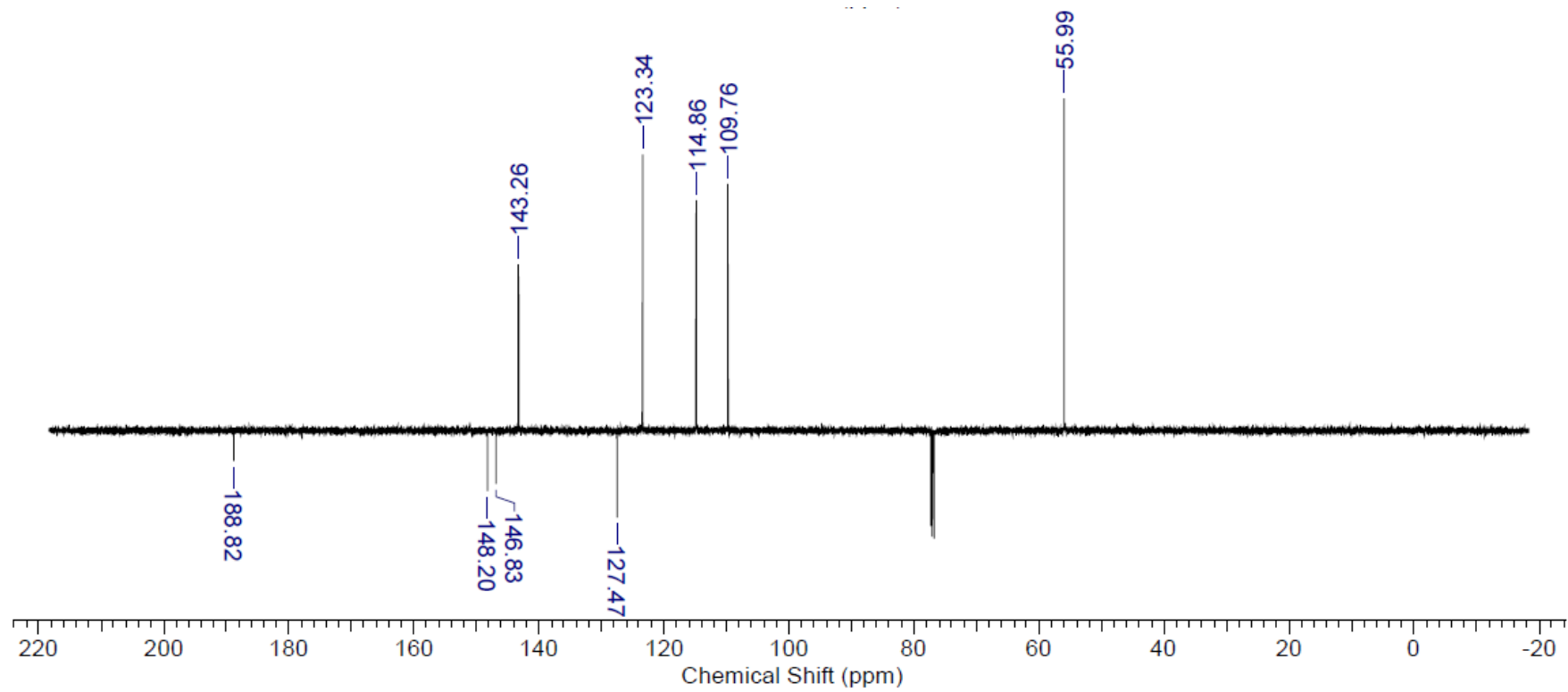


Tabela E32: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(38)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
2	6,96	d	2	20
3	7,70	d	2	20
5	7,14	s	2	-
8	6,98	d	2	5
9	7,21	d	2	10
Ar-OH	9,85	s	2	-
Ar-OCH ₃	3,98	s	6	-



E33: Espectro de DEPTQ de **(38)** em DMSO- d_6 a 125 MHz.

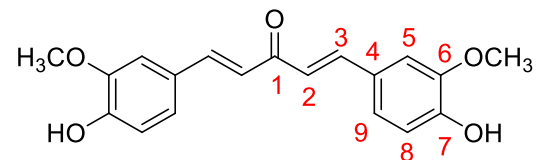
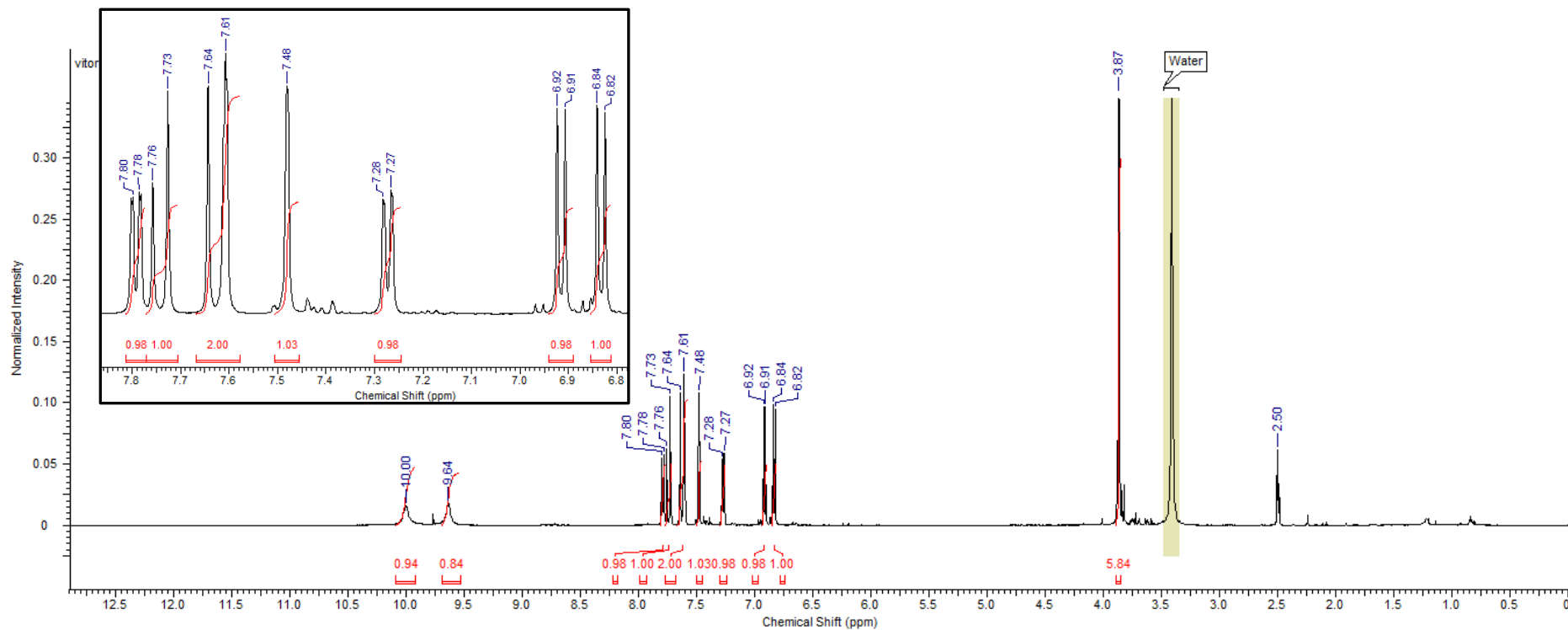


Tabela E33: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(38)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	188,82	C
2	123,39	CH
3	143,26	CH
4	127,47	C
5	109,76	CH
6	146,83	C
7	148,20	C
8	114,86	CH
9	123,34	CH
Ar-OCH ₃	55,99	CH ₃



E34: Espectro de RMN ¹H de (**39**) em DMSO-*d*₆ a 500 MHz.

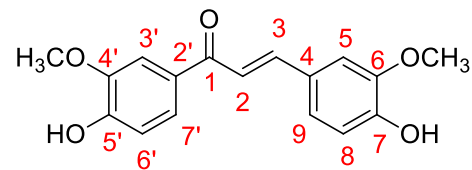
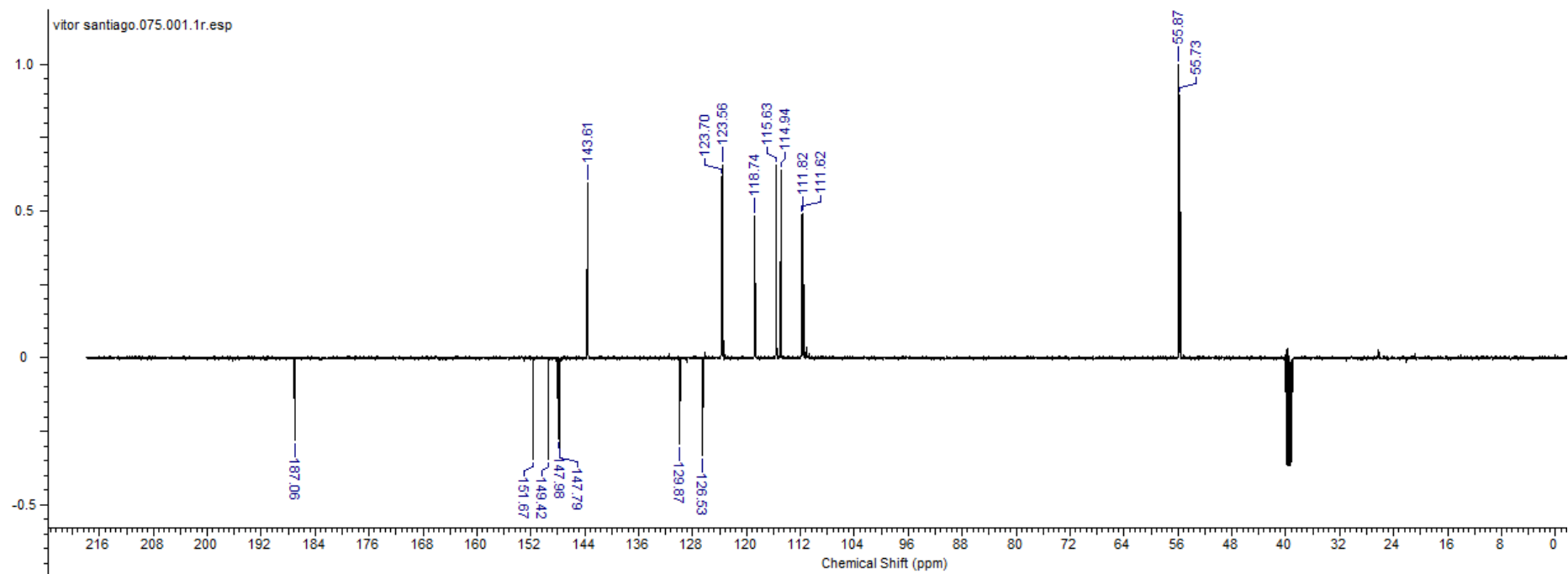


Tabela E34: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(39)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
2	7,63	m	-	-
3	7,74	d	1	20
3'	7,61	m	-	-
5	7,48	s	1	-
6'	7,27	d	1	10
7'	7,79	dd	1	10
8	6,82	d	1	10
9	6,92	d	1	10
$\text{C}_7\text{-OH}$	9,64	s	1	-
$\text{C}_{5'}\text{-OH}$	10,00	s	1	-
Ar-OCH_3	3,87	s	6	-



E35: Espectro de DEPTQ de (**39**) em DMSO-*d*₆ a 125 MHz.

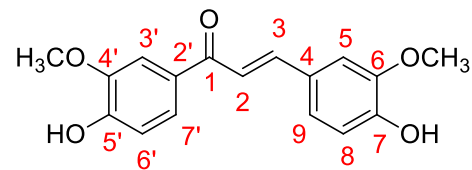
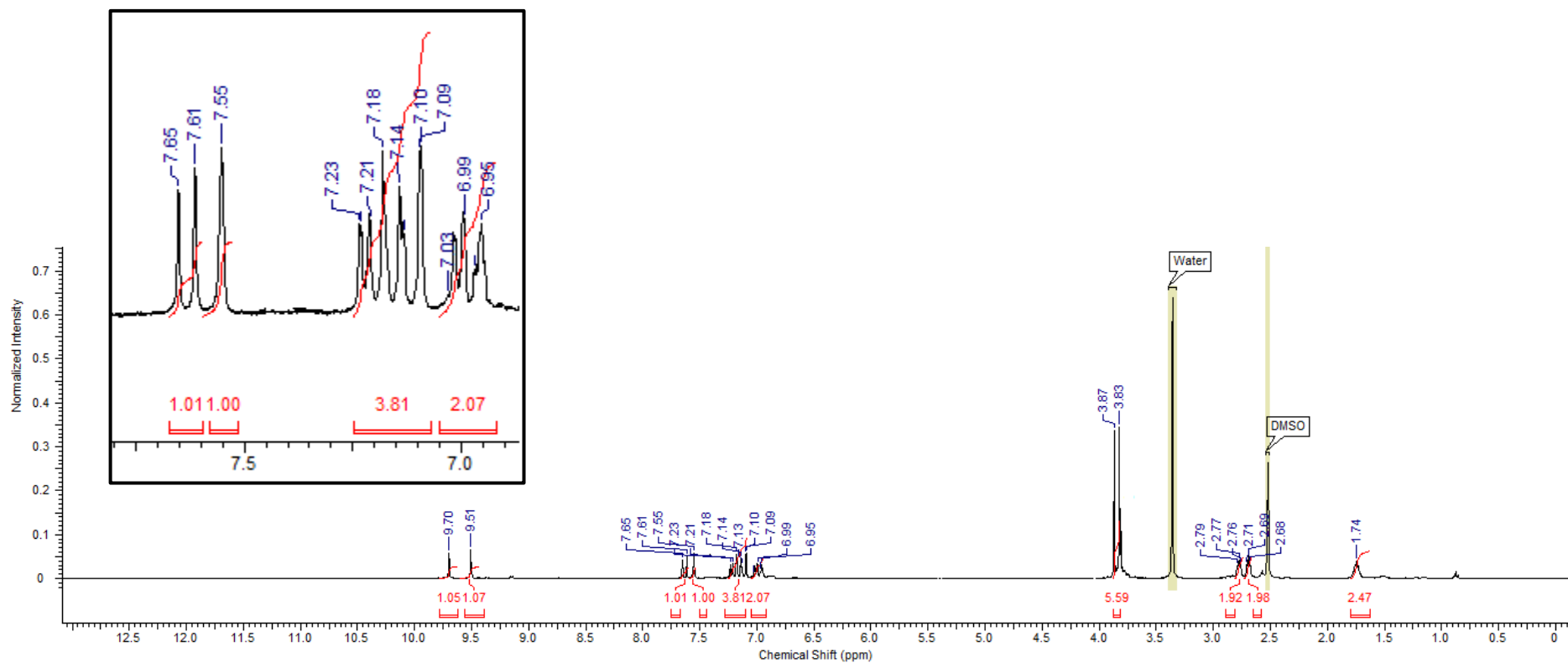


Tabela E35: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(39)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	187,06	C
2	118,74	CH
3	143,61	CH
4	129,87	C
5	111,62	CH
6	147,98	C
7	147,79	C
8	114,94	CH
9	123,56	CH

Carbono	δ (ppm)	m
2'	126,53	CH
3'	111,82	CH
4'	149,43	C
5'	151,67	C
6'	115,53	CH
7'	123,70	CH
C _{4'} -OCH ₃	55,87	CH ₃
C ₆ -OCH ₃	55,73	CH ₃



E36: Espectro de RMN ^1H de **45** em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

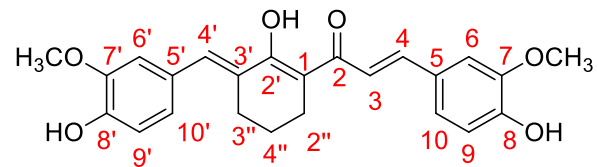
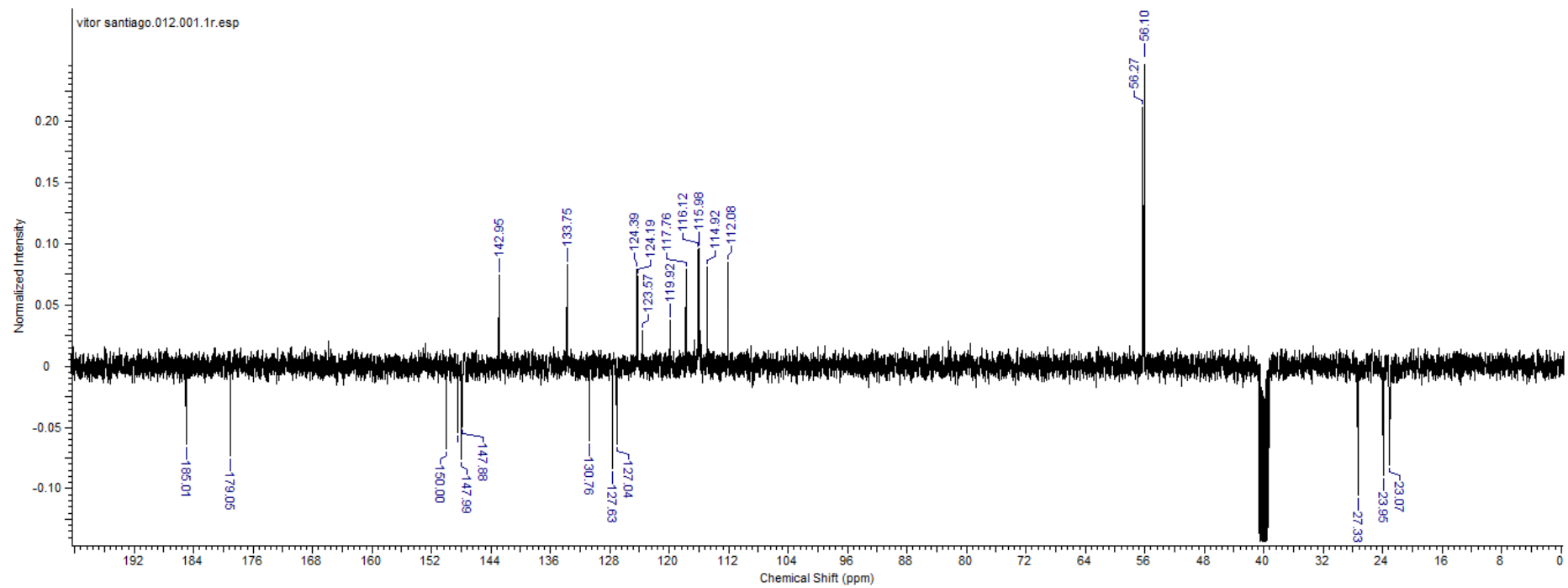


Tabela E36: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(45)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
2'	2,69	m	2	-
3''	2,77	m	2	-
4''	1,74	m	2	-
3	7,20	m	4	-
4	7,63	d	1	15
4'	7,55	s	1	-
6	7,20	m	4	-
6'	6,99	m	3	-

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
9	7,20	m	4	-
9'	6,99	m	3	-
10	7,20	m	4	-
10'	6,99	m	3	-
$\text{C}_7\text{-OCH}_3$	3,87	s	3	-
$\text{C}_7\text{'-OCH}_3$	3,83	s	3	-
$\text{C}_7\text{-OH}$	9,70	s	3	-
$\text{C}_7\text{'-OH}$	9,51	s	3	-



E37: Espectro de DEPTQ de (**45**) em DMSO-*d*₆ a 125 MHz.

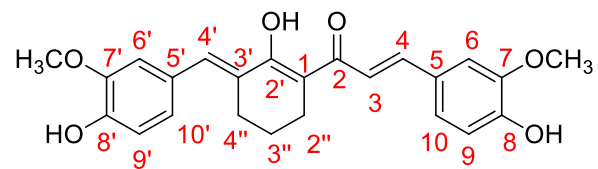
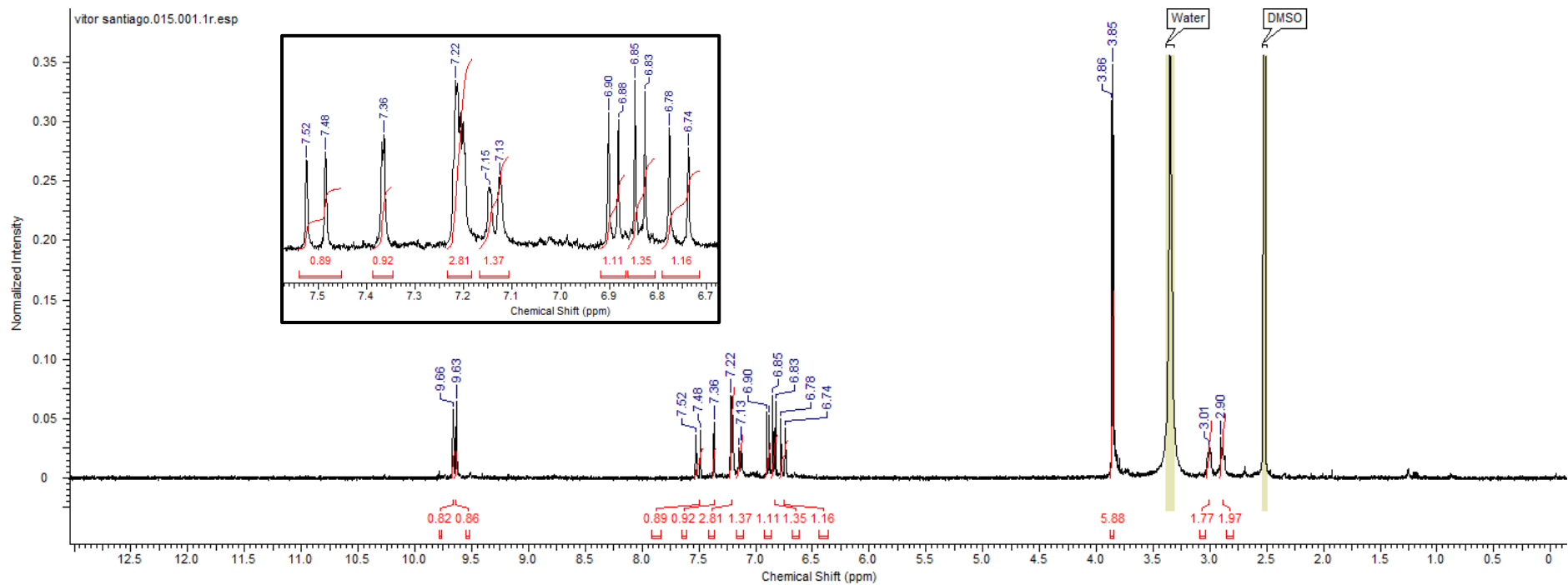


Tabela E37: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(45)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	112,08	C
2	179,05	C
3	119,92	CH
4	142,95	CH
5	127,04	C
6	114,92	CH
7	150,00	C
8	147,99	C
9	116,12	CH
10	123,57	CH
2'	185,01	C
2''	27,33	CH ₂

Carbono	δ (ppm)	m
3''	23,07	CH ₂
4''	23,95	CH ₂
3'	130,76	C
4'	124,39	CH
5'	127,63	C
6'	124,19	CH
7'	148,47	C
8'	147,88	C
9'	115,96	CH
10'	117,76	CH
C ₇ -OCH ₃	56,27	CH ₃
C _{7'} -OCH ₃	56,10	CH ₃



E38: Espectro de RMN ^1H de (**46**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

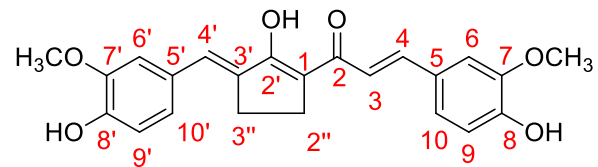
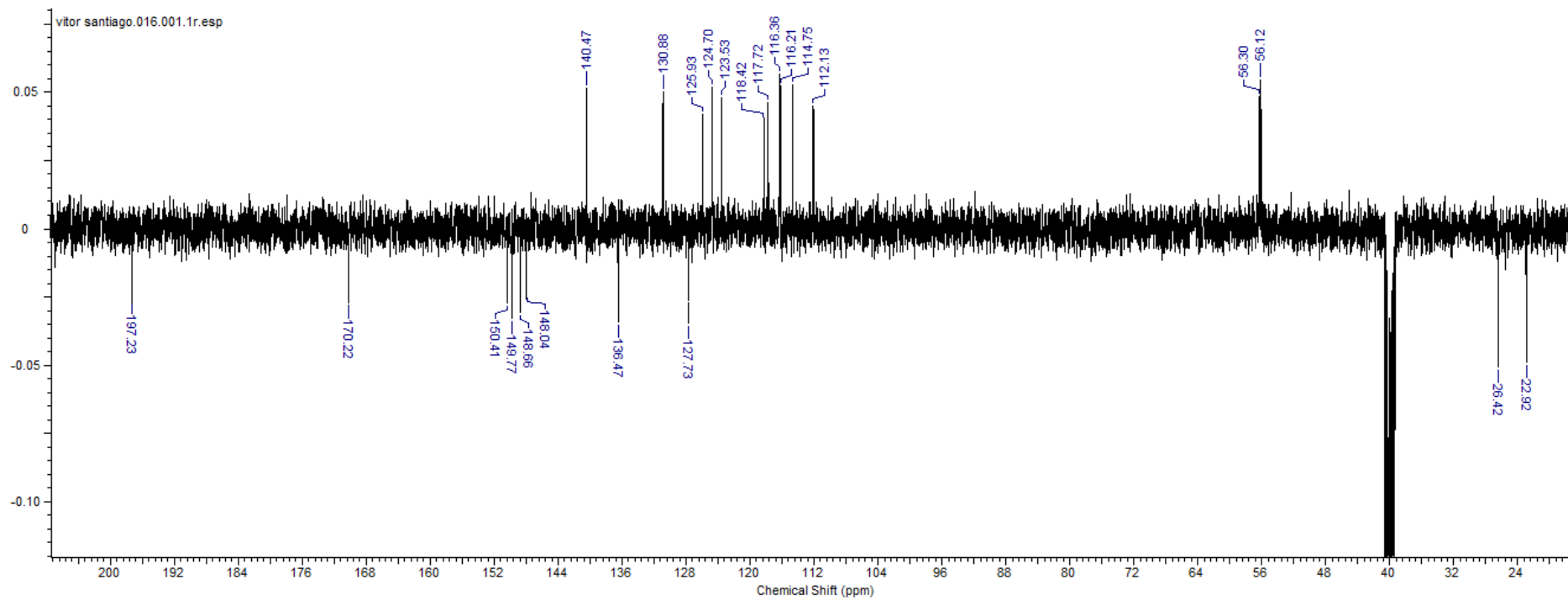


Tabela E38: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(46)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
2''	3,01	sl	2	-
3''	2,90	sl	2	-
3	7,22	m	3	-
4	7,50	d	1	20
4'	7,36	s	1	-
6	7,22	m	3	-
6'	7,22	m	3	-
9	6,84	d	1	10

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
9'	6,89	d	1	10
10	7,14	d	2	10
10'	7,14	d	2	10
C ₇ -OCH ₃	3,86	s	3	-
C _{7'} -OCH ₃	3,85	s	3	-
C ₈ -OH	9,66	s	1	-
C _{8'} -OH	9,63	s	1	-



E39: Espectro de DEPTQ de **(46)** em DMSO- d_6 a 125 MHz.

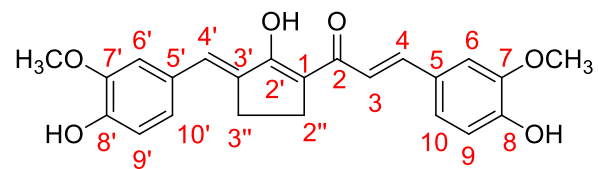
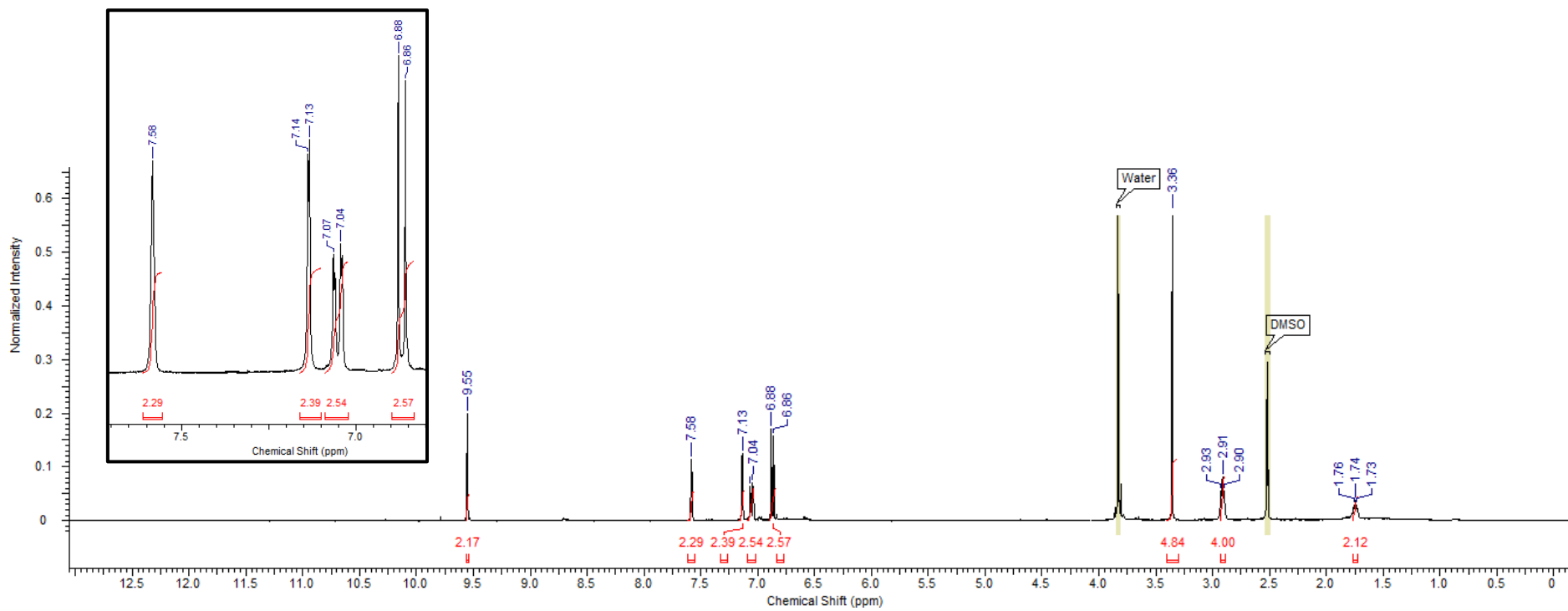


Tabela E39: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(46)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	112,13	C
2	170,22	C
3	123,53	CH
4	140,47	CH
5	136,47	C
6	117,72	CH
7	147,77	C
8	150,41	C
9	116,36	CH
10	124,70	CH
2'	197,23	C
2''	26,42	CH ₂

Carbono	δ (ppm)	m
3''	22,92	CH ₂
3'	130,88	C
4'	130,88	CH
5'	127,73	C
6'	118,42	CH
7'	148,04	C
8'	148,66	C
9'	114,75	CH
10'	125,93	CH
C ₇ -OCH ₃	56,30	CH ₃
C _{7'} -OCH ₃	56,12	CH ₃



E40: Espectro de RMN ^1H de **(47)** em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

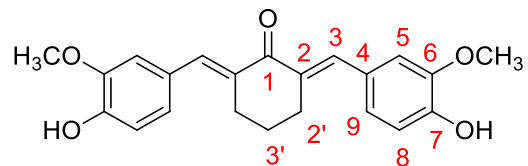
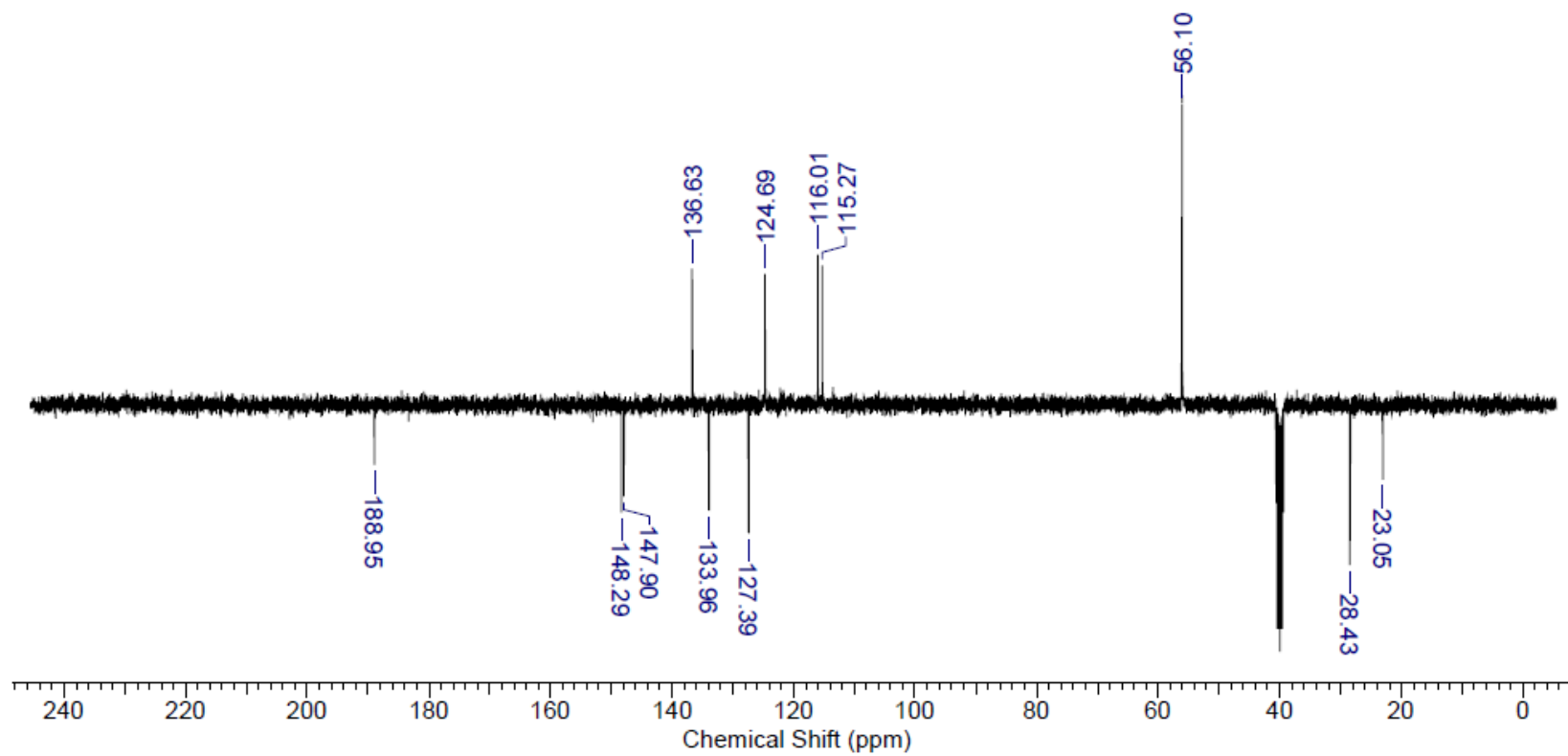


Tabela E40: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(47)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
2'	2,91	t	4	-
3	7,58	s	2	-
3'	1,74	m	2	-
5	7,14	sl	2	-
8	6,87	d	2	10
9	7,05	s	2	10
Ar-OH	9,55	s	2	-
Ar-OCH ₃	3,83	s	6	-



E41: Espectro de DEPTQ de (**47**) em DMSO- d_6 a 125 MHz.

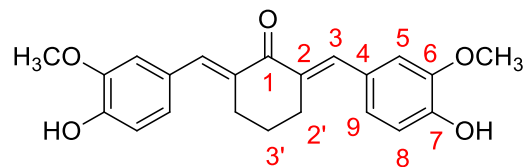
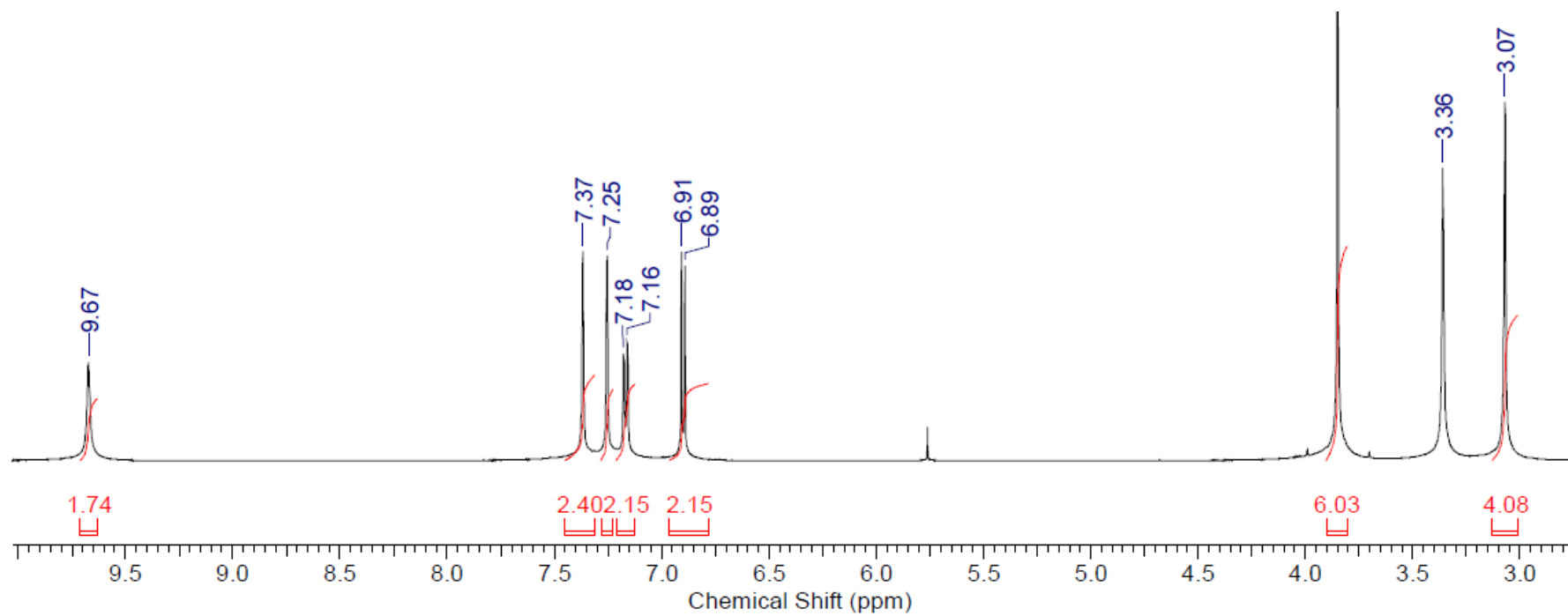


Tabela E41: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de (**47**)

Carbono	δ (ppm)	m
1	188,95	C
2	133,96	C
2'	28,43	CH ₂
3	136,63	CH
3'	23,05	CH ₂
4	127,30	C
5	124,69	CH
6	147,90	C
7	148,29	C
8	116,01	CH
9	115,27	CH
Ar-OCH ₃	56,10	CH ₃



E42: Espectro de RMN ^1H de **(48)** em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

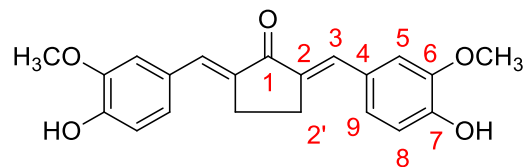
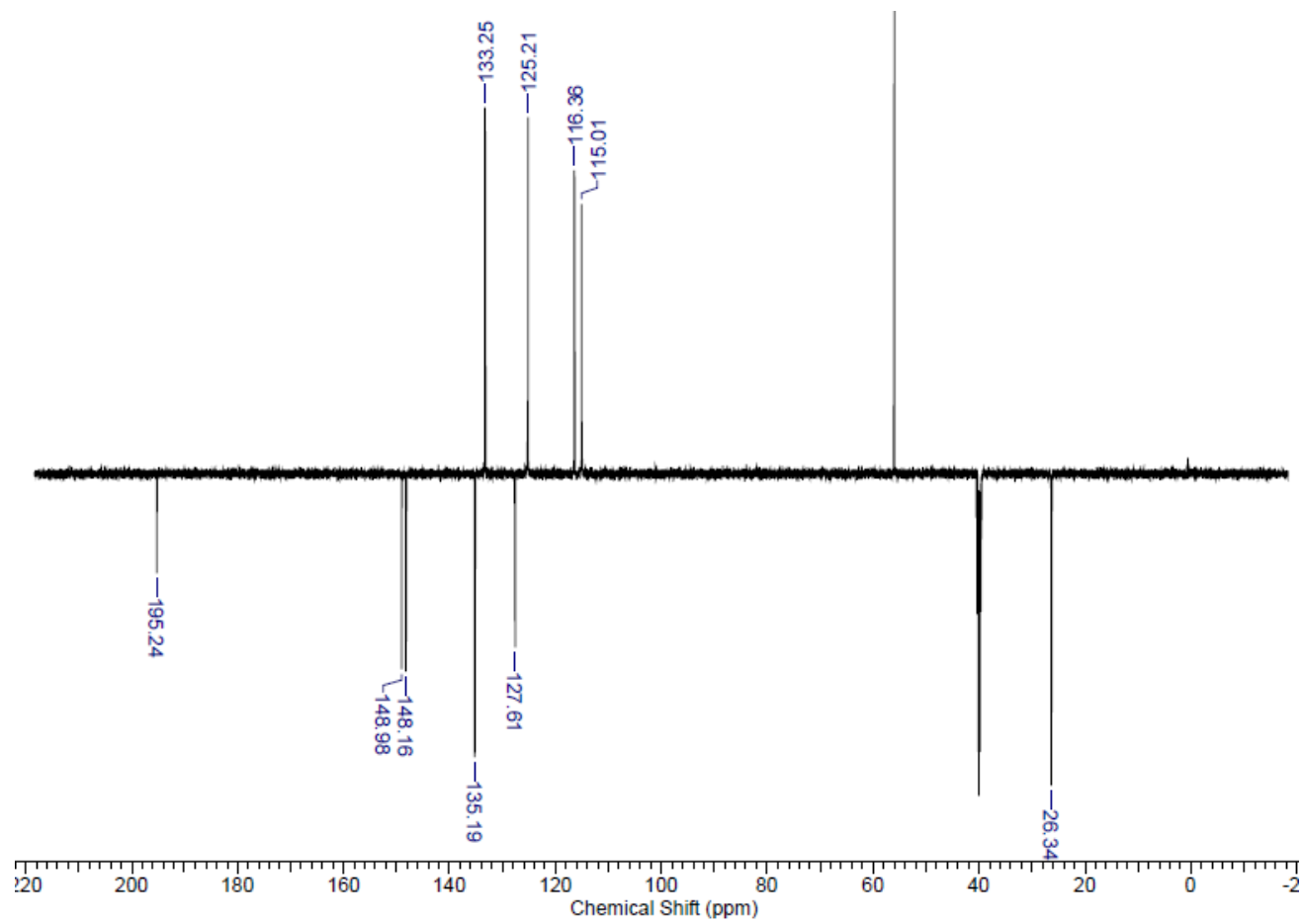


Tabela E41: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(48)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
2'	3,07	s	4	-
3	7,37	s	2	-
5	7,25	s	2	-
8	6,90	d	2	10
9	7,17	d	2	10
Ar-OH	9,67	s	2	-
Ar-OCH ₃	3,83	s	6	-



E42: Espectro de DEPTQ de (**48**) em DMSO- d_6 a 125 MHz.

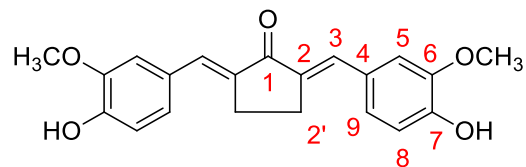
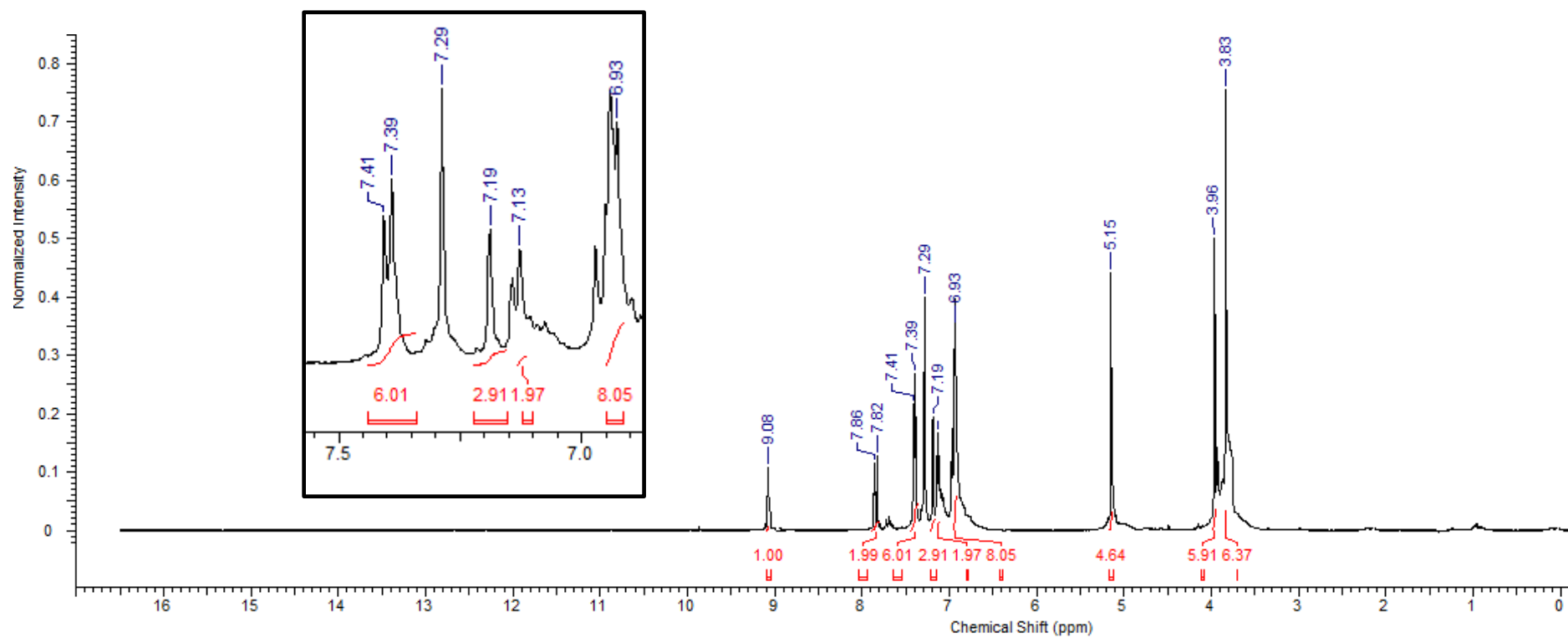


Tabela E42: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(48)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	195,24	C
2	133,96	C
2'	26,34	CH ₂
3	133,25	CH
4	127,30	C
5	125,21	CH
6	148,98	C
7	148,16	C
8	116,36	CH
9	115,01	CH
Ar-OCH ₃	56,04	CH ₃



E43: Espectro de RMN ^1H de (**64**) em CDCl_3 a 500 MHz.

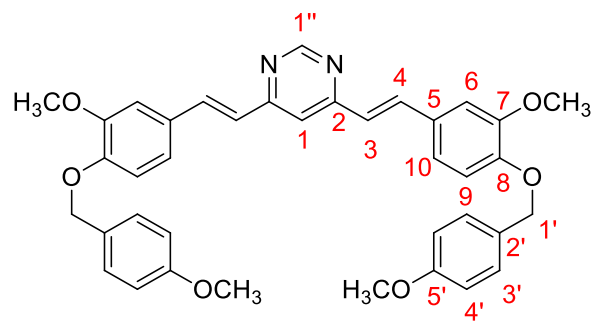
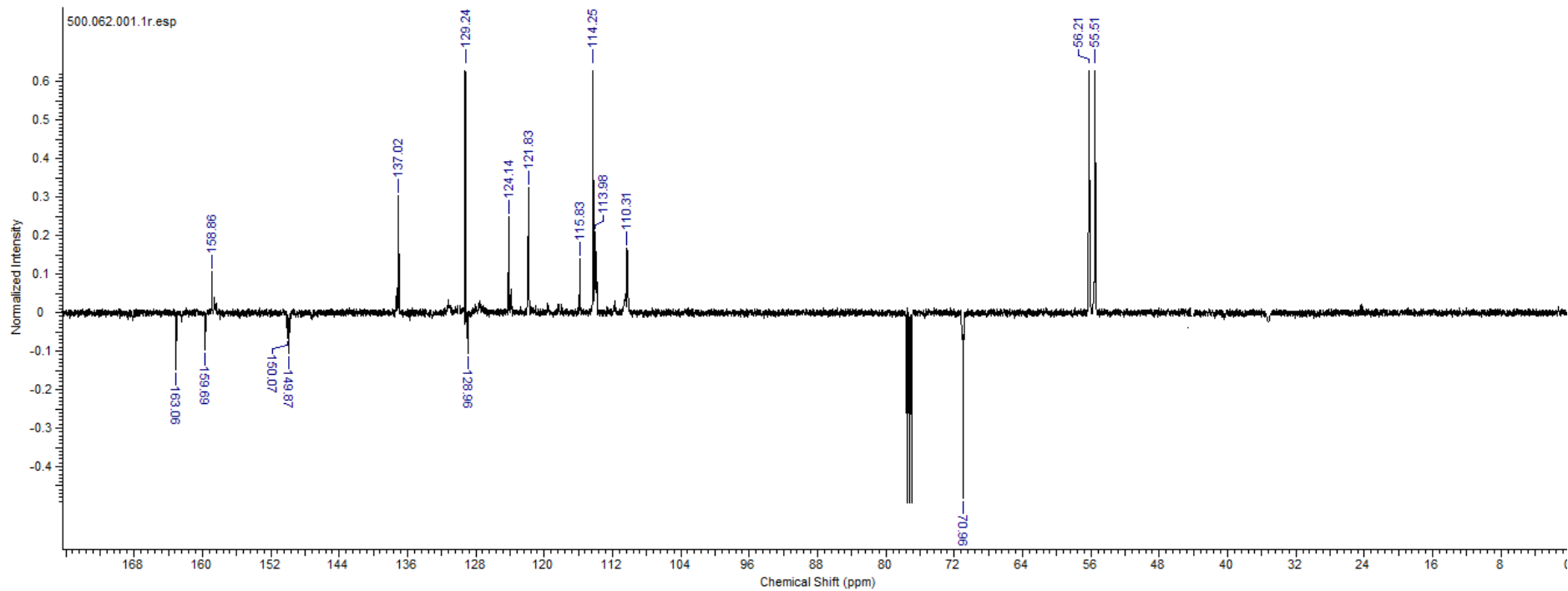


Tabela E43: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ¹H de **(64)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	<i>J</i> (Hz)
1	7,13	m	-	-
1'	5,15	s	4	-
1''	9,08	s	1	-
3	6,93	m	-	-
3'	6,93	m	-	-
4	7,84	d	2	20
4'	7,40	m	-	-
6	6,93	m	-	-
9	6,93	m	-	-
10	7,40	m	-	-
C ₇ -OCH ₃	3,83	s	-	-
C _{5'} -OCH ₃	3,96	s	-	-



E44: Espectro de DEPTQ de (**64**) em CDCl_3 a 125 MHz.

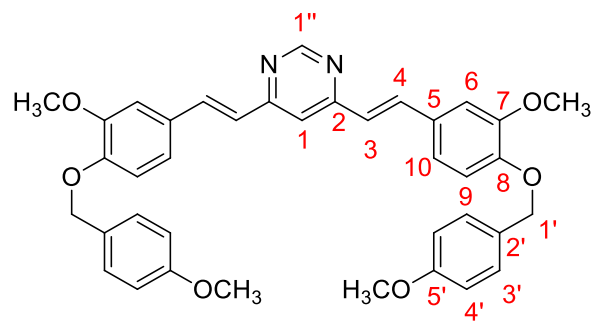
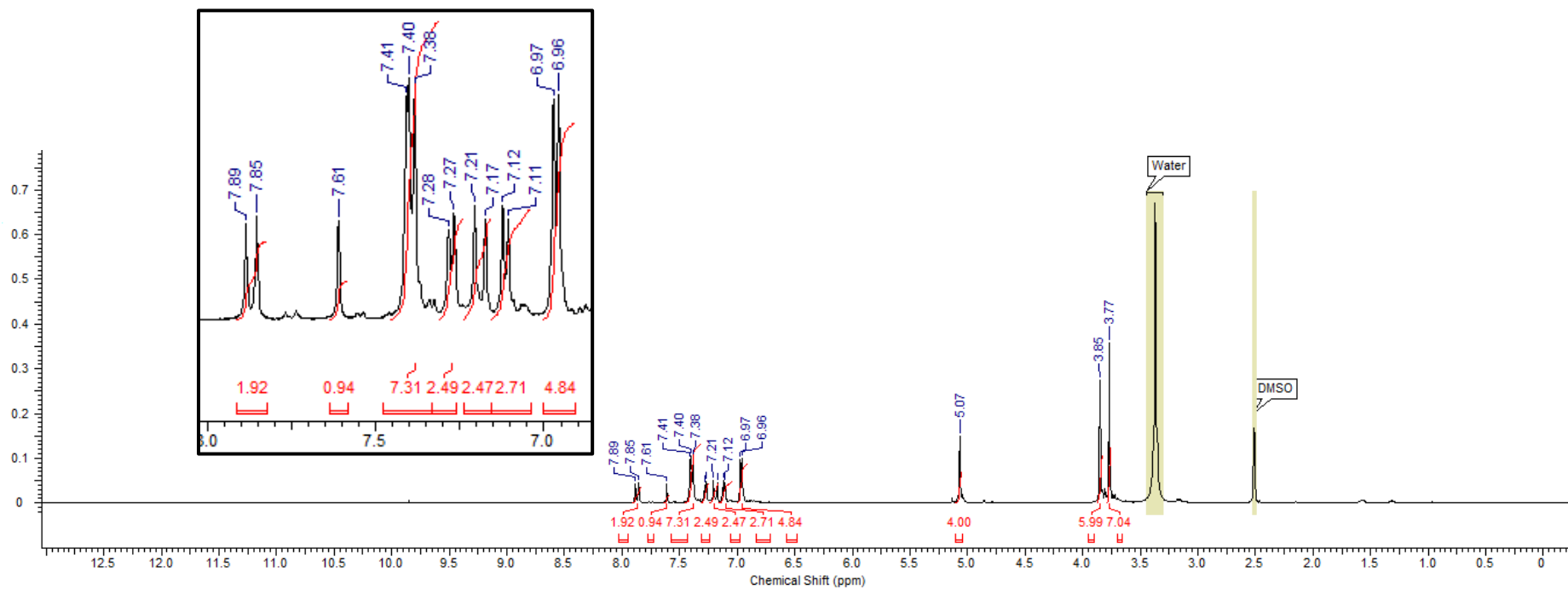


Tabela E44: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(64)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	110,31	CH
1''	158,86	CH
2	163,06	C
3	124,14	CH
4	137,02	CH
5	128,96	C
6	121,83	CH
7	150,07	C
8	149,97	C

Carbono	δ (ppm)	m
10	115,83	CH
1'	70,96	CH ₂
2'	128,96	C
3'	129,24	CH
4'	114,25	CH
5'	150,07	C
C ₇ -OCH ₃	56,21	CH ₃
C _{5'} -OCH ₃	55,51	CH ₃



E45: Espectro de RMN ^1H de (**65**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

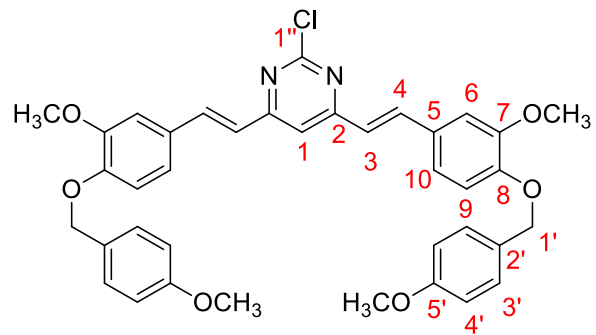
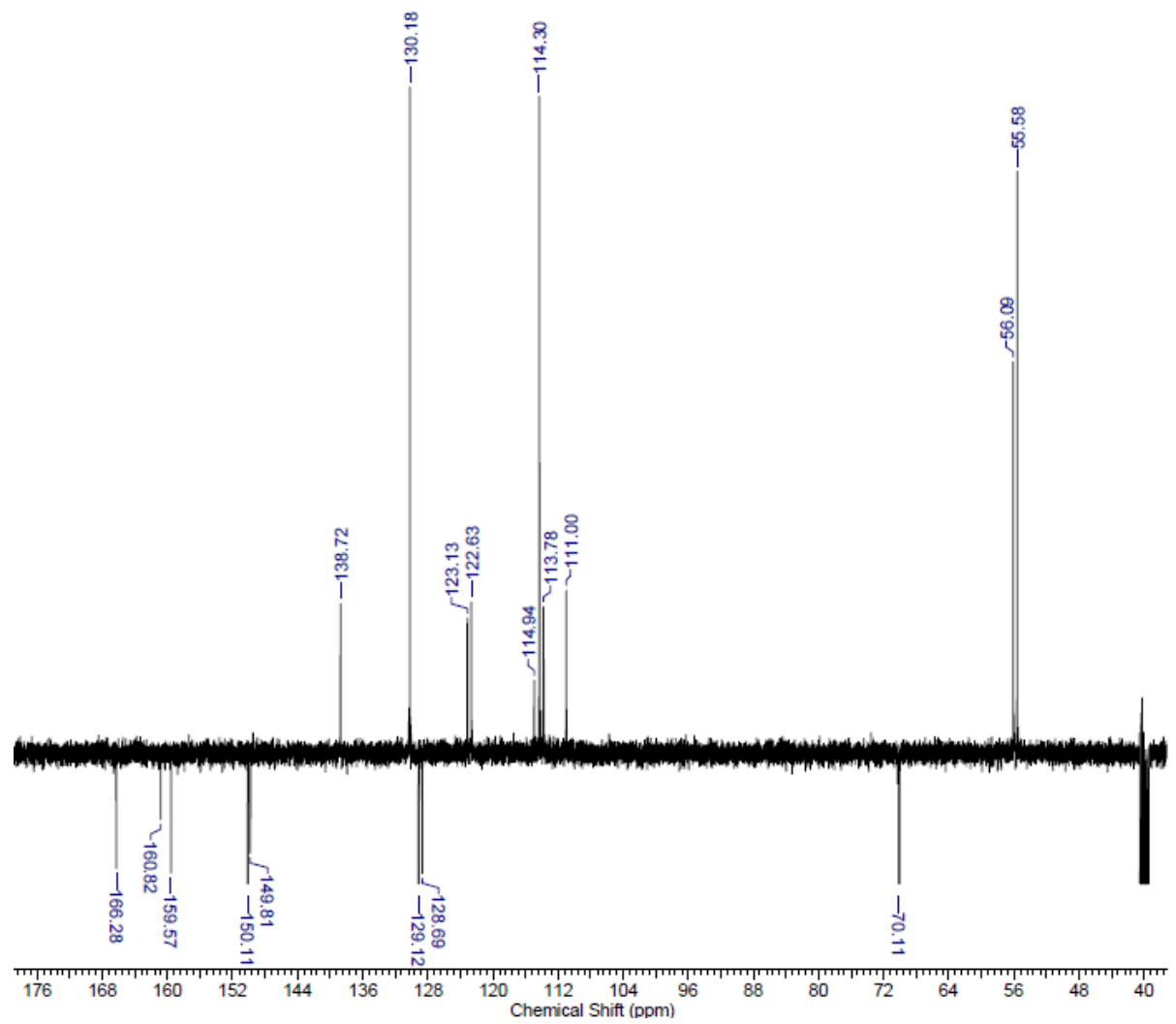


Tabela E45: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(65)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	7,61	s	1	-
1'	5,07	s	4	-
3	7,19	d	2	16
3'	7,4	m	6	-
4	7,87	s	2	16
4'	6,96	s	4	7
6	7,4	m	6	-
9	7,12	d	2	5
10	7,27	d	2	5
$\text{C}_7\text{-OCH}_3$	3,85	s	6H	-
$\text{C}_5'\text{-OCH}_3$	3,77	s	6H	-



E46: Espectro de DEPTQ de (**65**) em DMSO-*d*₆ a 125 MHz.

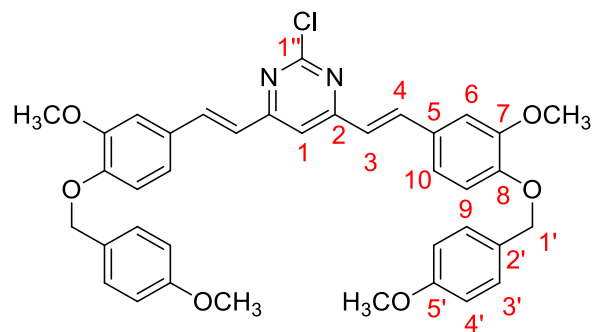
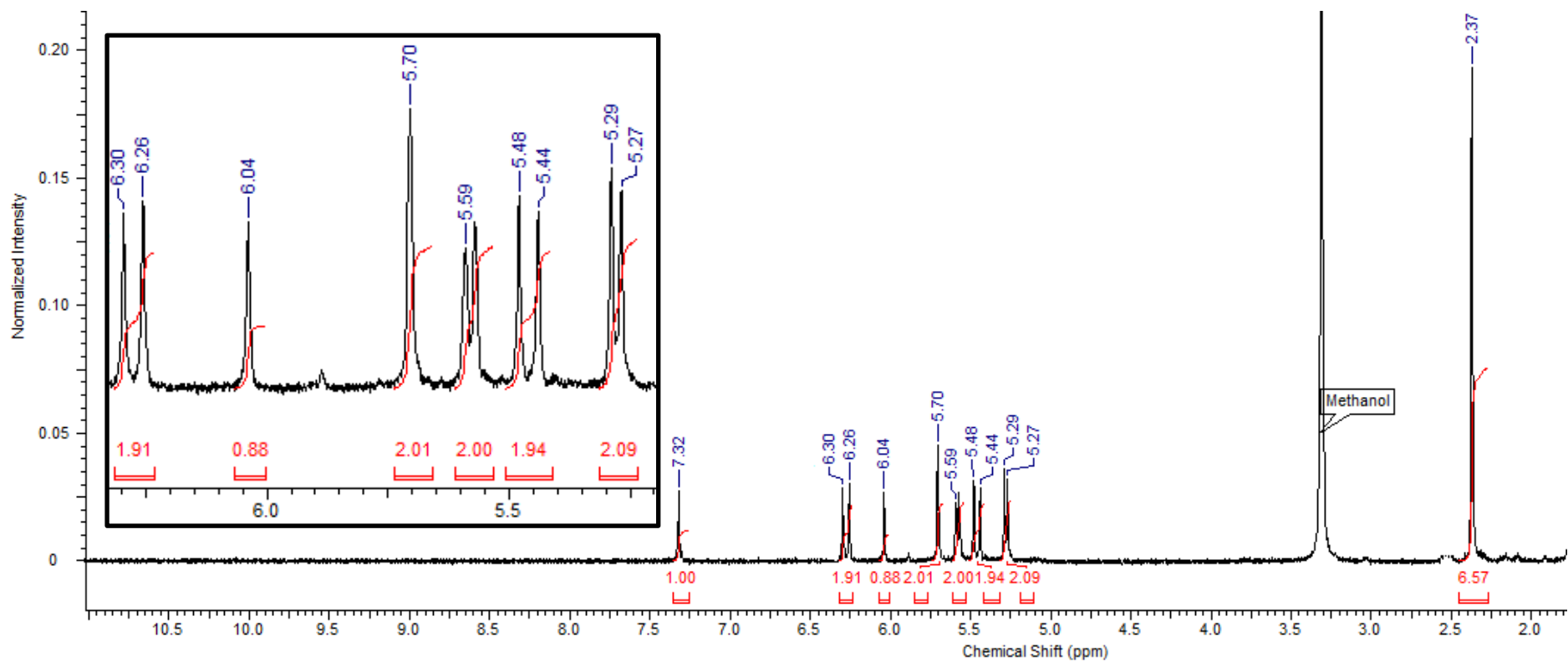


Tabela E46: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(65)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	111,00	CH
1''	166,28	CH
2	160,82	C
3	123,13	CH
4	138,72	CH
5	129,12	C
6	114,94	CH
7	149,81	C
8	150,11	C

Carbono	δ (ppm)	m
9	113,78	CH
10	122,63	CH
1'	70,11	CH ₂
2'	128,69	C
3'	130,18	CH
4'	114,30	CH
5'	159,57	C
C ₇ -OCH ₃	56,09	CH ₃
C _{5'} -OCH ₃	55,58	CH ₃



E47: Espectro de RMN ^1H de **(49)** em CD_3OD a 500 MHz.

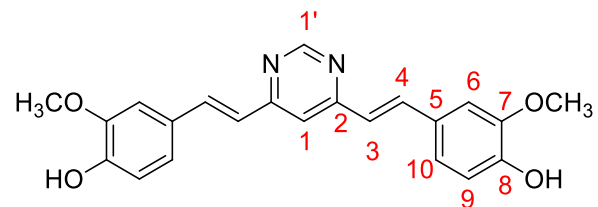
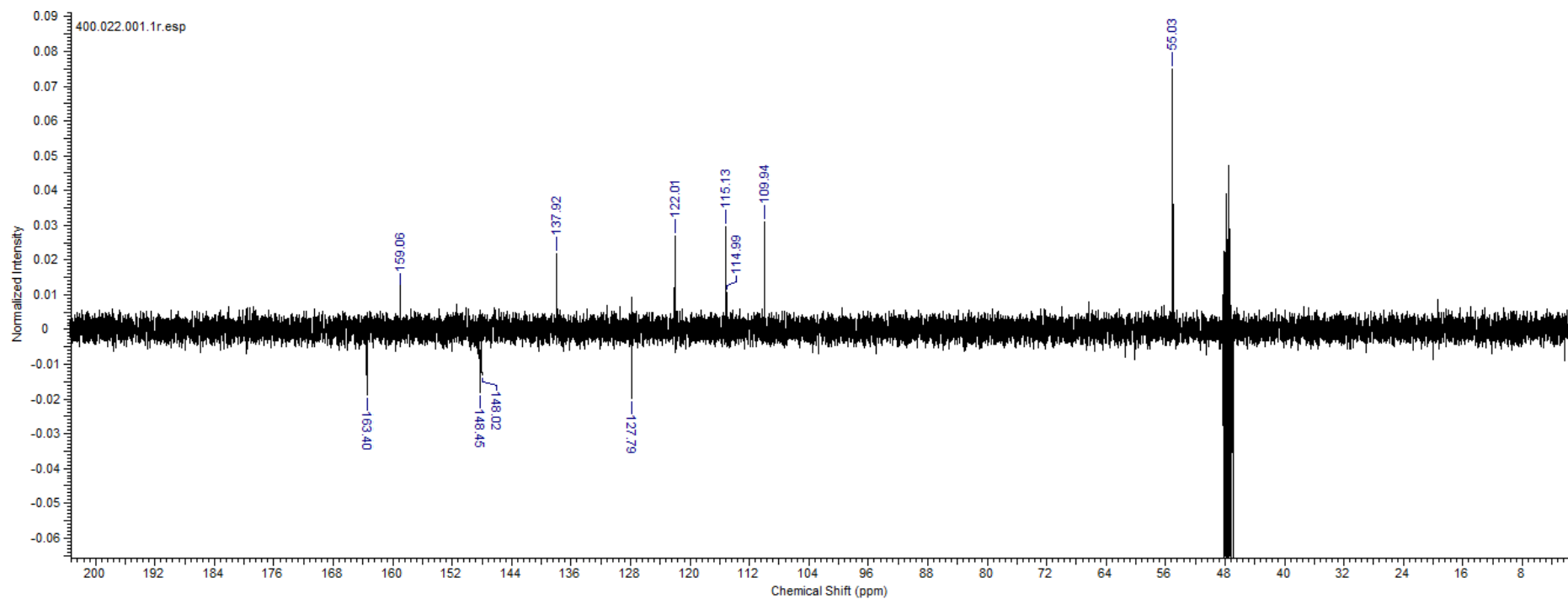


Tabela E47: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(49)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,04	s	1	-
1'	7,32	s	1	-
3	5,46	d	2	20
4	6,28	d	2	20
6	5,70	s	2	-
9	5,59	d	2	10
10	5,28	d	2	10
$\text{C}_7\text{-OCH}_3$	2,37	s	6	-



E48: Espectro de DEPTQ de (**49**) em CD₃OD a 125 MHz.

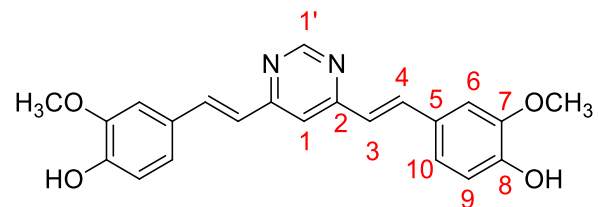
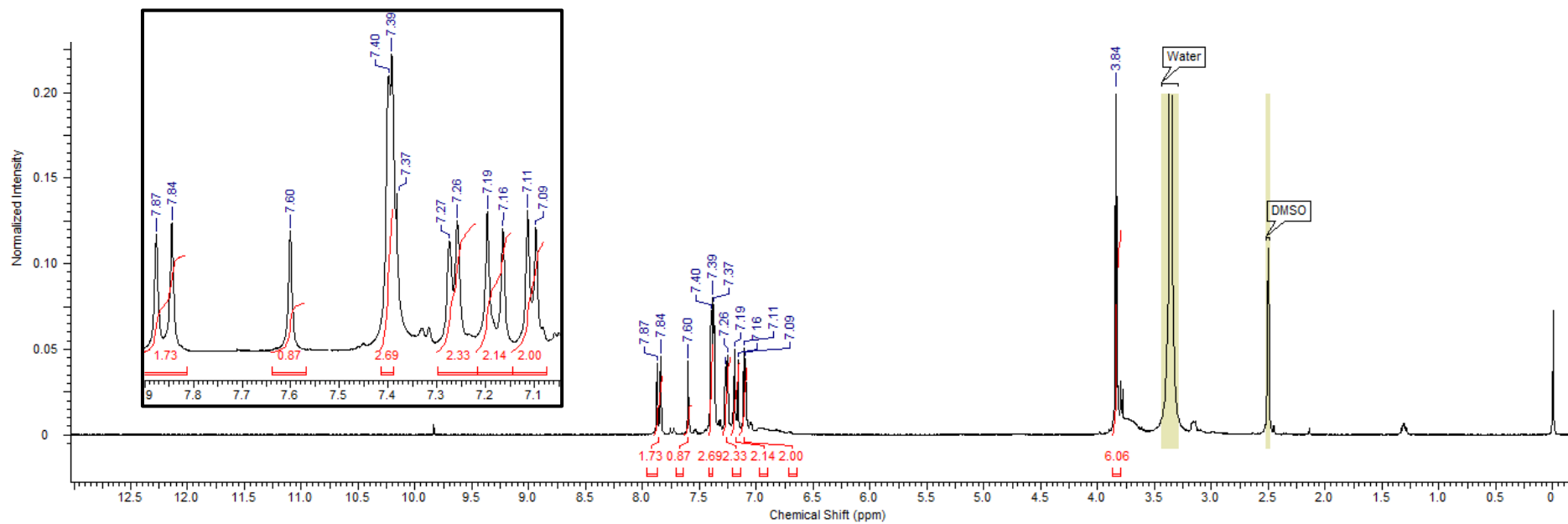


Tabela E48: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(49)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	109,94	CH
1'	159,05	CH
2	163,40	C
3	122,01	CH
4	137,92	CH
5	127,79	C

Carbono	δ (ppm)	m
6	114,99	CH
7	148,45	C
8	148,02	C
9	115,13	CH
10	122,06	CH
C ₇ -OCH ₃	55,03	CH ₃



E49: Espectro de RMN ^1H de (**50**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

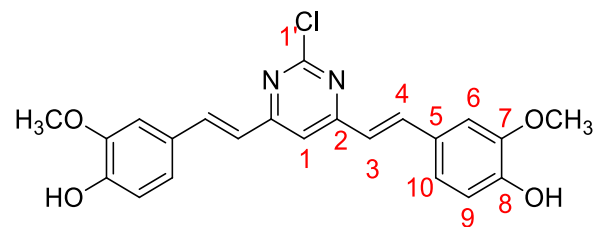
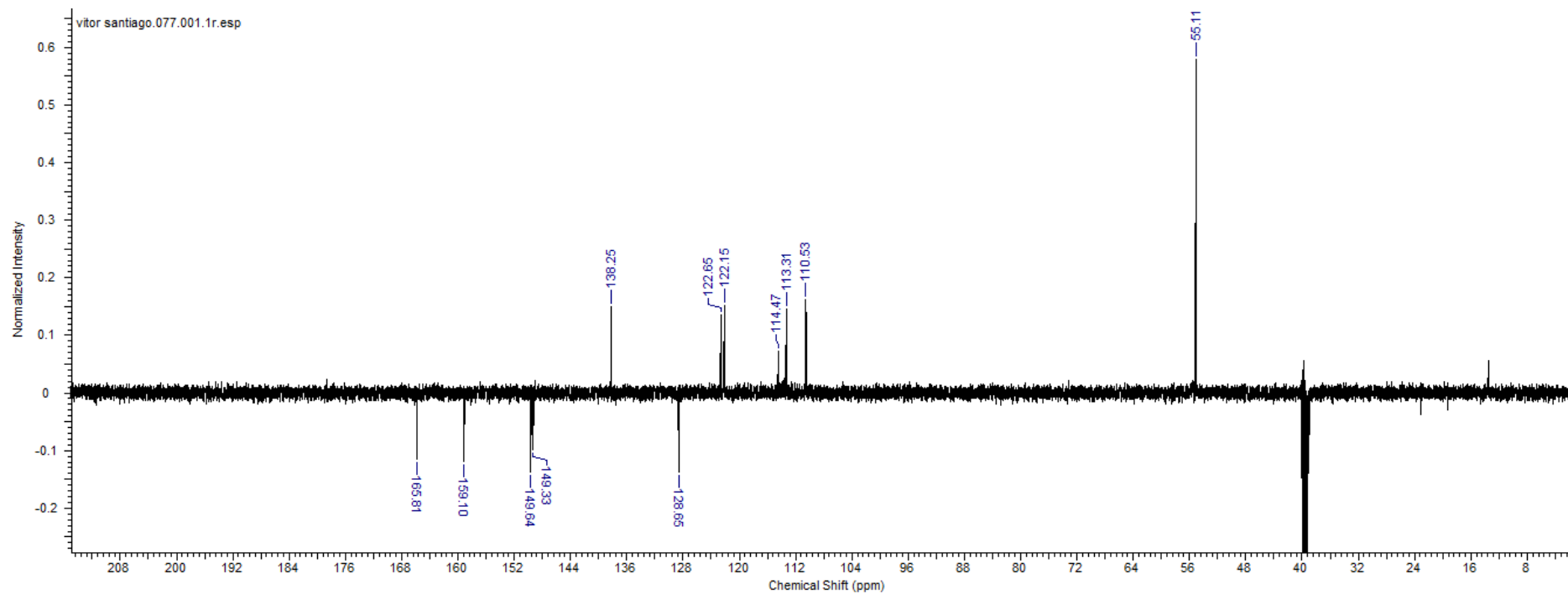


Tabela E49: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de (**50**)

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	7,60	s	1	-
3	7,18	d	2	18
4	7,87	d	2	18
6	7,39	m	2	-
9	7,09	d	2	5
10	7,26	d	2	5
$\text{C}_7\text{-OCH}_3$	3,84	s	6	-



E50: Espectro de DEPTQ de (**50**) em DMSO- d_6 a 125 MHz.

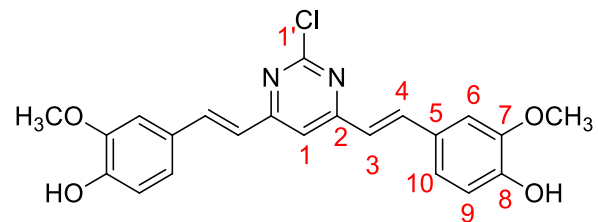
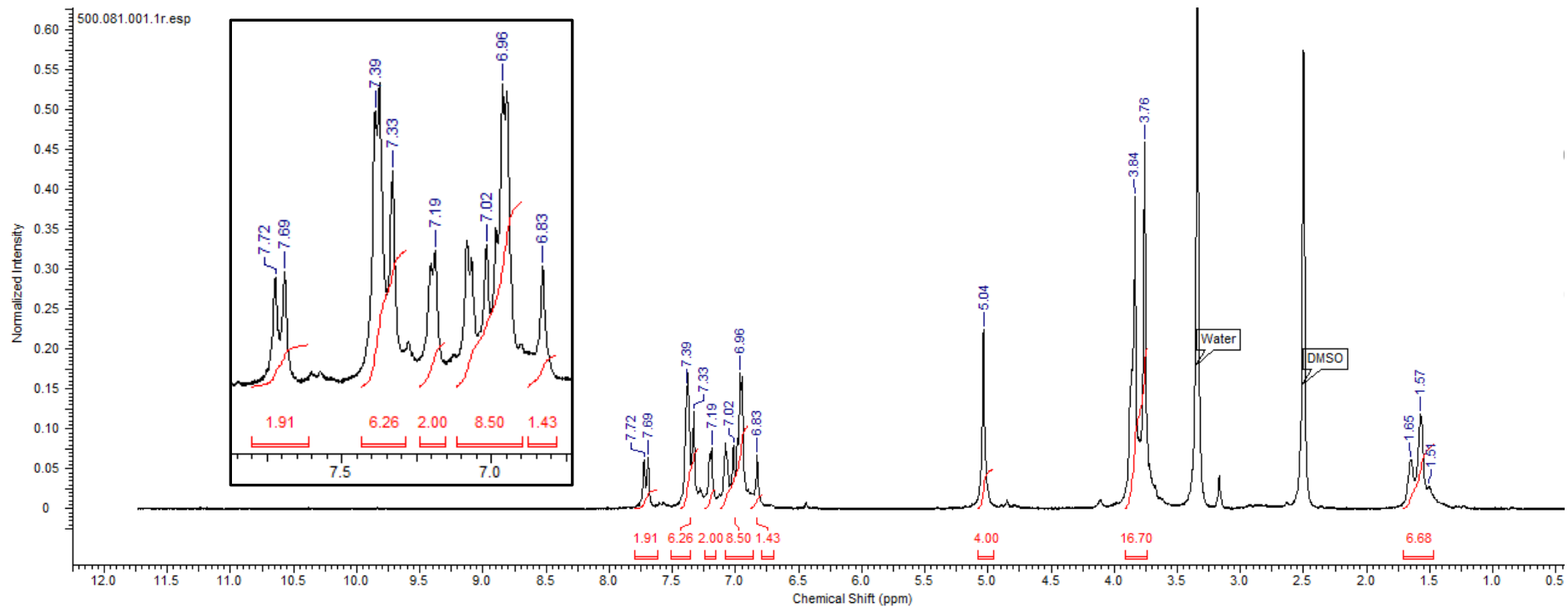


Tabela E50: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de (**50**)

Carbono	δ (ppm)	m
1	110,53	CH
1'	165,81	CH
2	159,10	C
3	122,65	CH
4	138,25	CH
5	128,65	C

Carbono	δ (ppm)	m
6	114,47	CH
7	149,54	C
8	149,33	C
9	113,32	CH
10	122,15	CH
C ₇ -OCH ₃	55,11	CH ₃



E51: Espectro de RMN ^1H de (**66**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

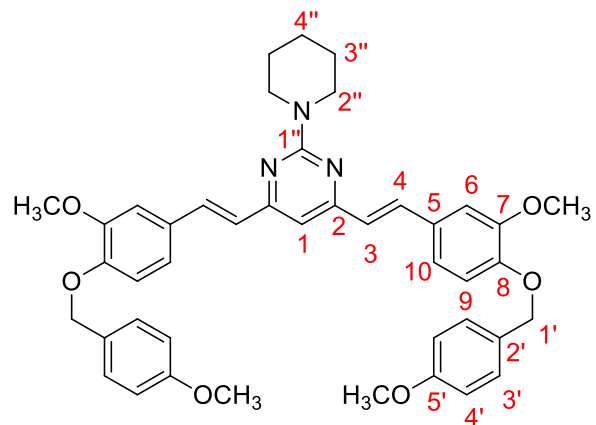
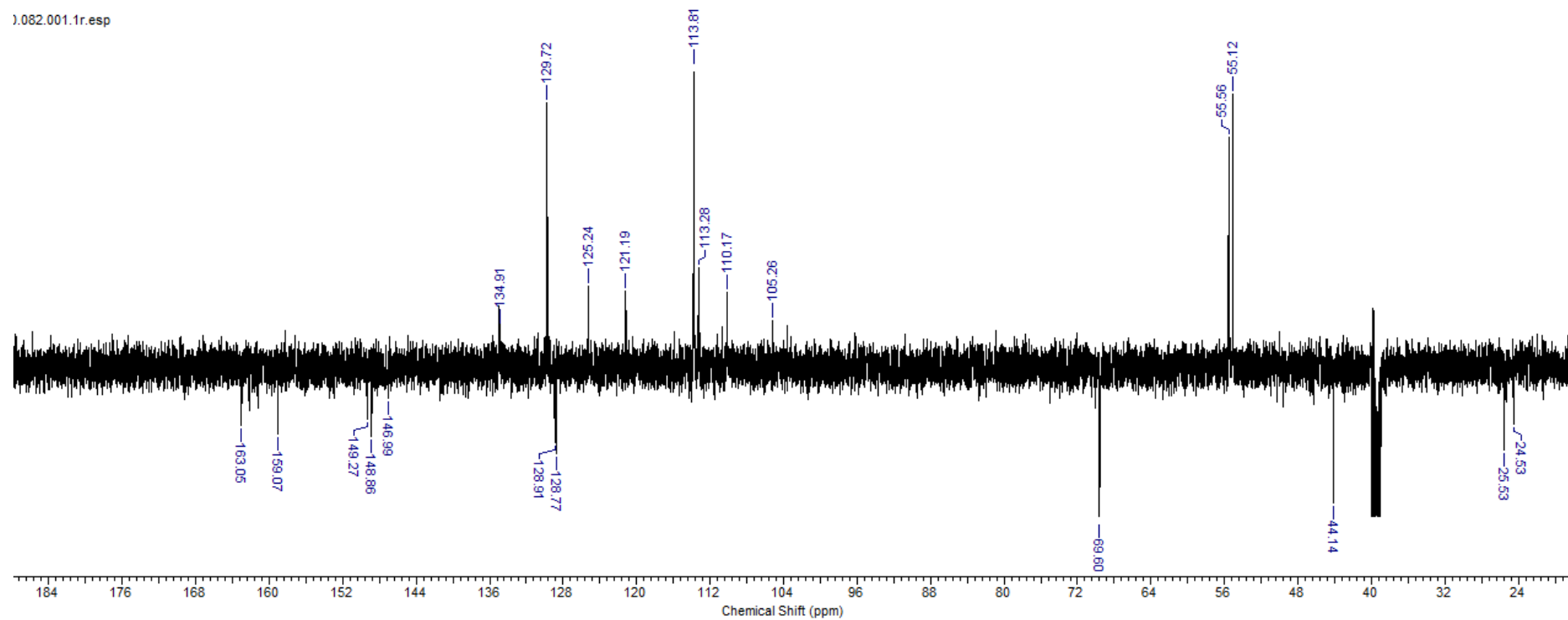


Tabela E51: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(66)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	7,33	m	6	-
1'	5,04	s	4	-
2''	3,84	m	-	-
3	7,02	m	-	-
3'	6,96	m	-	-
3''	1,57	sl	6	-
4	7,70	d	2	15

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
4'	7,39	m	-	-
4''	1,57	sl	6	-
6	7,39	m	-	-
9	7,08	d	2	10
10	7,19	d	2	10
$\text{C}_7\text{-OCH}_3$	3,84	m	-	-
$\text{C}_5'\text{-OCH}_3$	3,76	s	6	-

1.082.001.1r.esp



E52: Espectro de DEPTQ de (**66**) em DMSO- d_6 a 125 MHz.

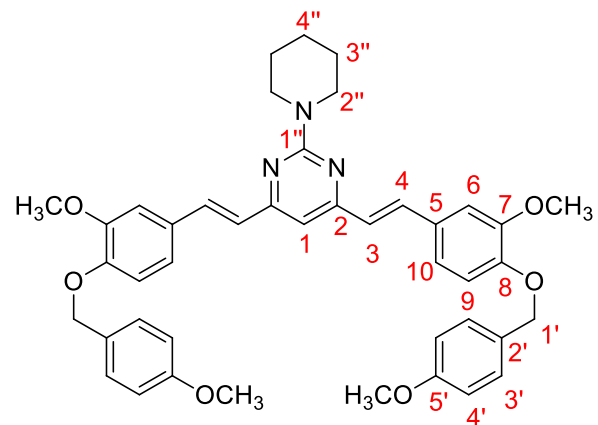
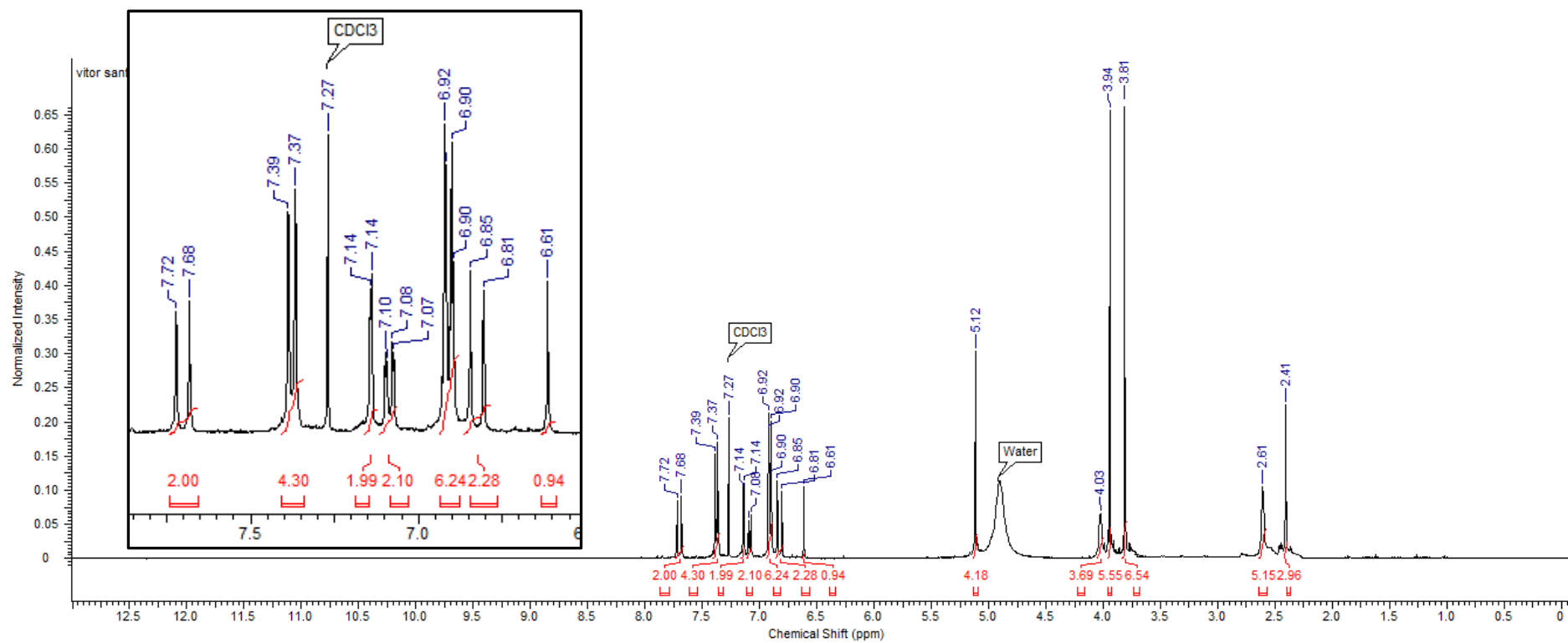


Tabela E52: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de (**66**)

Carbono	δ (ppm)	m
1	105,26	CH
1''	163,05	CH
2	159,07	C
3	125,24	CH
4	134,91	CH
5	128,91	C
6	121,19	CH

Carbono	δ (ppm)	m
7	149,27	C
8	148,86	C
9	113,28	CH
10	121,19	CH
1'	69,60	CH ₂
2'	128,77	C
3'	129,72	CH

Carbono	δ (ppm)	m
4'	113,81	CH
5'	159,07	C
2''	44,14	CH ₂
3''	25,53	CH ₂
4''	24,53	CH ₂
C ₇ -OCH ₃	55,56	CH ₃
C _{5'} -OCH ₃	55,12	CH ₃



E53: Espectro de RMN ^1H de **(67)** em CDCl_3 a 400 MHz.

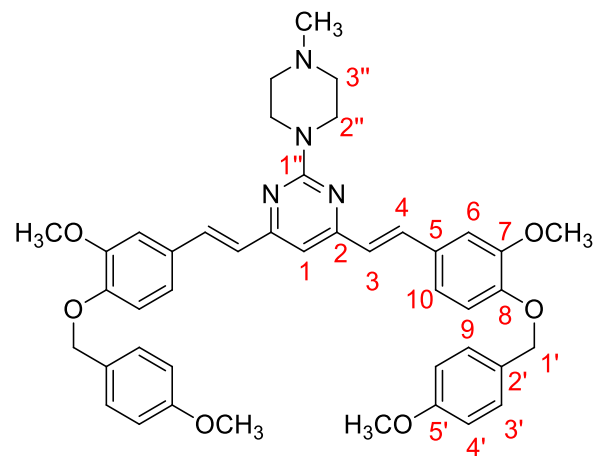
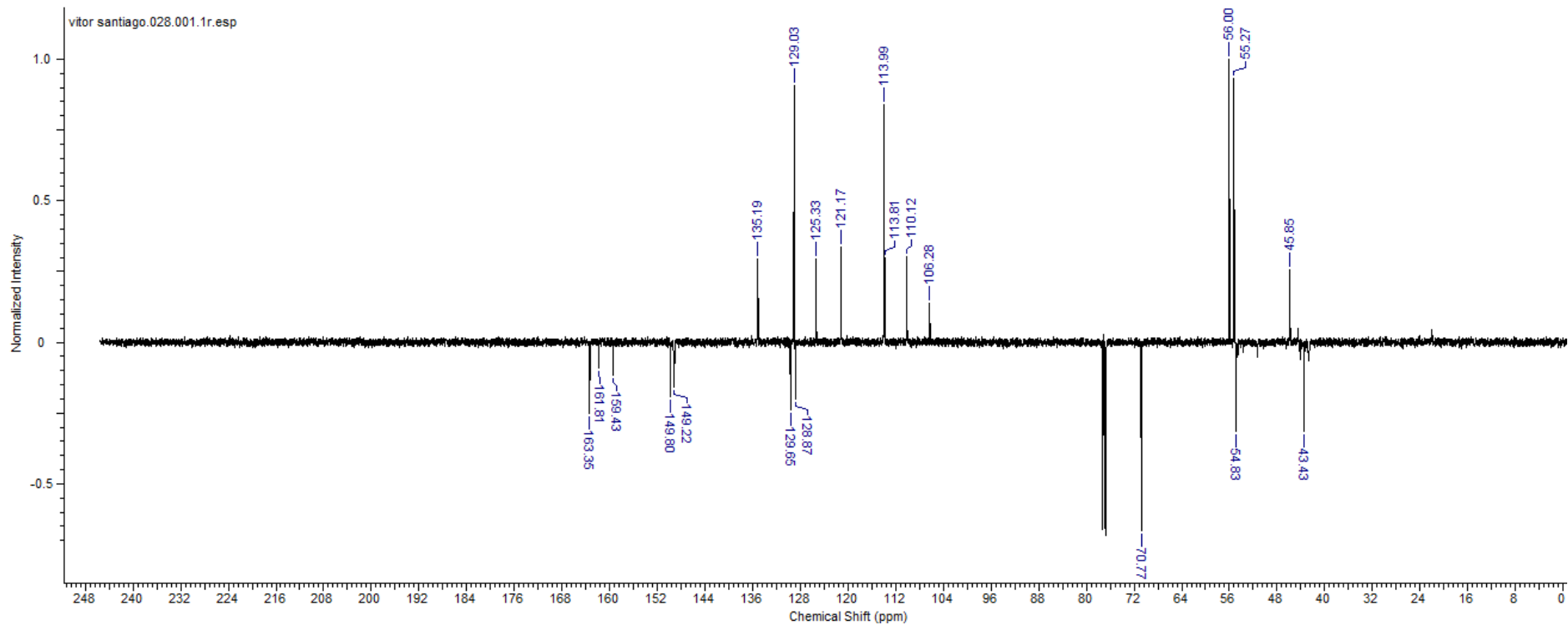


Tabela E53: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de (**67**)

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,66	s	1	-
1'	5,12	s	4	-
2''	4,03	sl	4	-
3	6,83	d	2	20
3'	7,38	d	4	10
3''	2,61	sl	4	-
4	7,70	d	2	20

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
4'	6,92	m	-	-
6	7,14	s	2	-
9	6,92	m	-	-
10	7,08	d	2	10
N- <u>CH</u> ₃	2,41	s	3	-
C ₇ - <u>OCH</u> ₃	3,94	s	6	-
C _{5'} - <u>OCH</u> ₃	3,81	s	6	-



E54: Espectro de DEPTQ de **(67)** em CDCl_3 a 100 MHz.

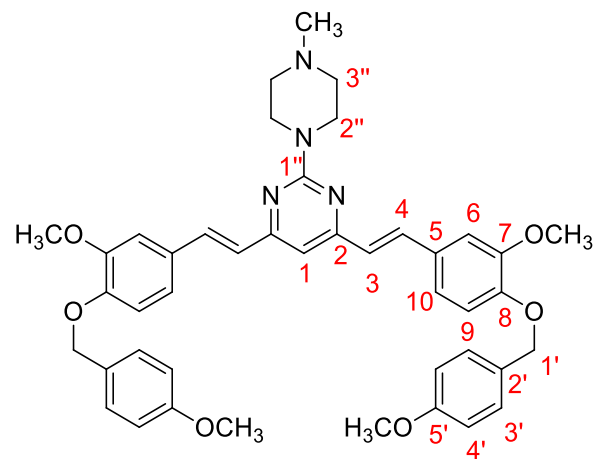
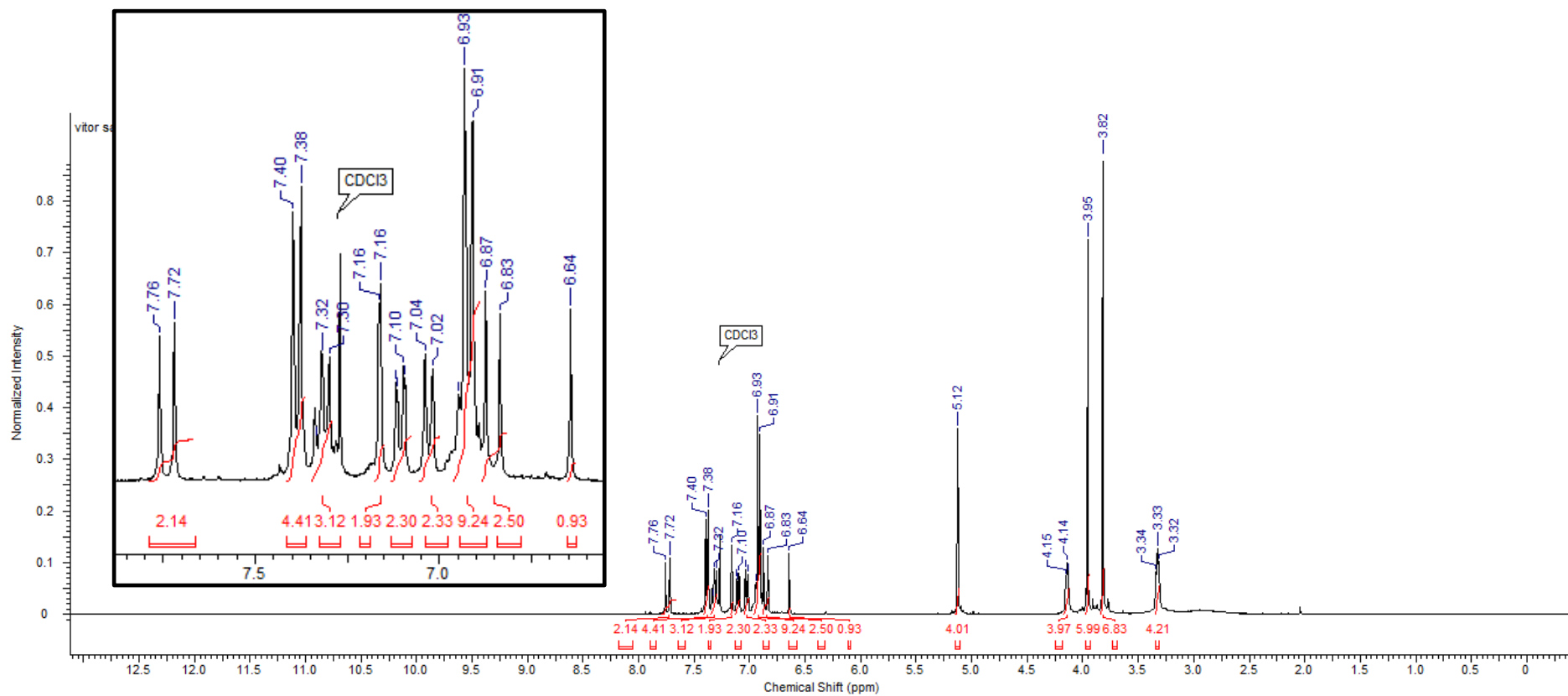


Tabela E54: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(67)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	106,28	CH
1''	163,35	CH
2	161,81	C
3	125,33	CH
4	135,19	CH
5	129,95	C
6	121,17	CH

Carbono	δ (ppm)	m
7	149,80	C
8	149,22	C
9	110,12	CH
10	113,81	CH
1'	70,77	CH ₂
2'	128,87	C
3'	129,03	CH

Carbono	δ (ppm)	m
4'	113,99	CH
5'	159,43	C
2''	54,83	CH ₂
3''	43,43	CH ₂
N-CH ₃	45,85	CH ₃
C ₇ -OCH ₃	55,27	CH ₃
C _{5'} -OCH ₃	56,00	CH ₃



E55: Espectro de RMN ^1H de (68) em CDCl_3 a 400 MHz.

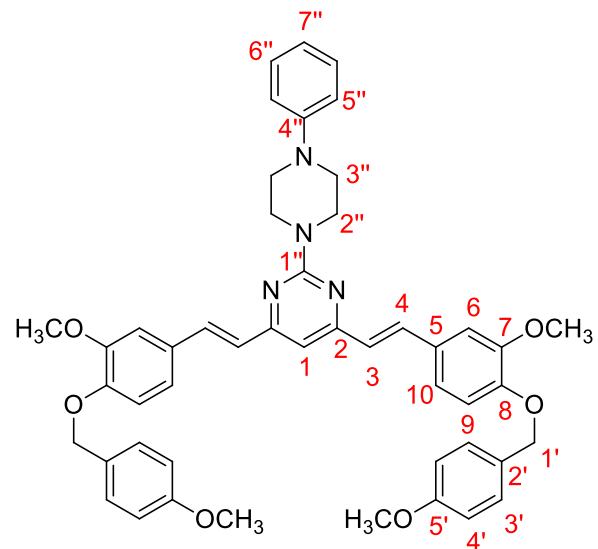
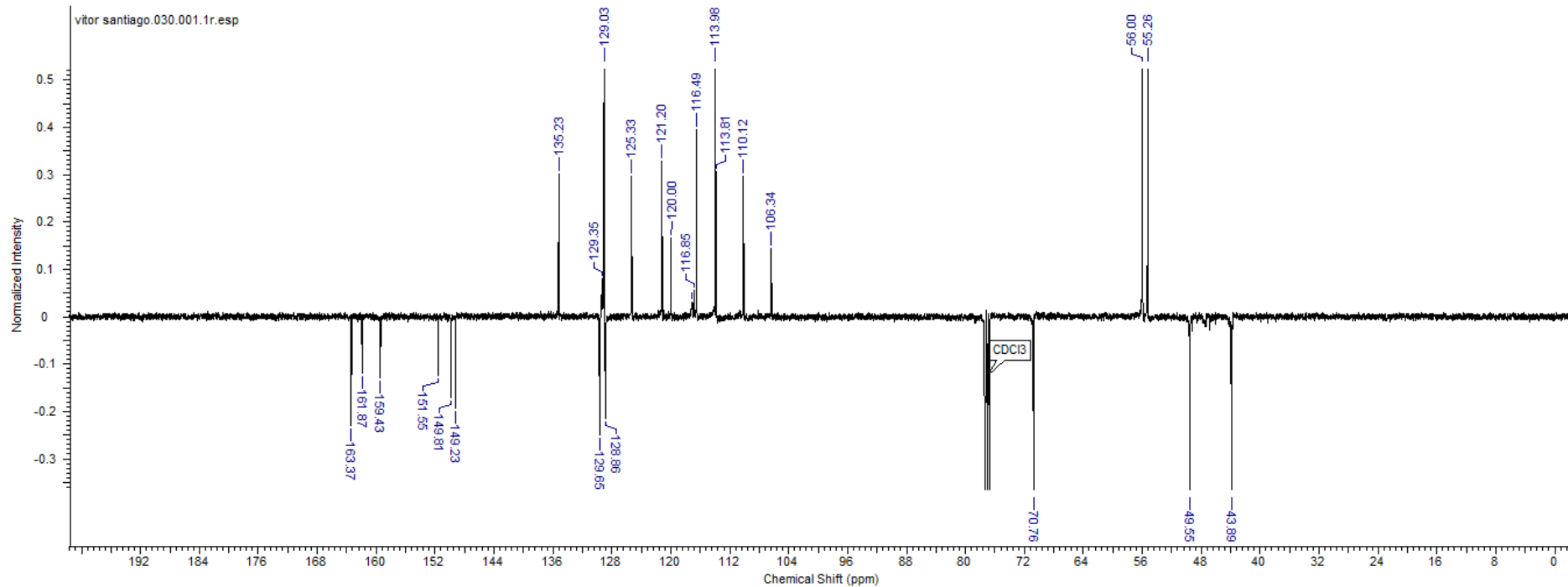


Tabela E53: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de (**68**)

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,64	s	1	-
3	6,85	d	2	20
4	7,74	d	2	20
6	7,16	s	2	-
9	6,93	m	-	-
10	7,10	dd	2	10
1'	5,12	s	4	-
3'	7,42	d	4	10

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
4'	6,93	m	-	-
2''	4,14	sl	4	-
3''	3,33	sl	4	-
5''	6,93	m	-	-
6''	7,32	dt	3	-
7''	7,32	dt	3	-
$\text{C}_7\text{-OCH}_3$	3,82	s	6	-
$\text{C}_5\text{'-OCH}_3$	3,95	s	6	-



E56: Espectro de DEPTQ de (**68**) em CDCl₃ a 100 MHz.

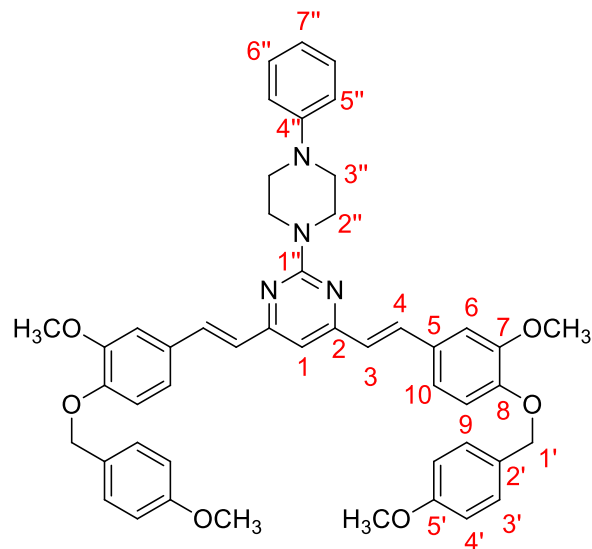


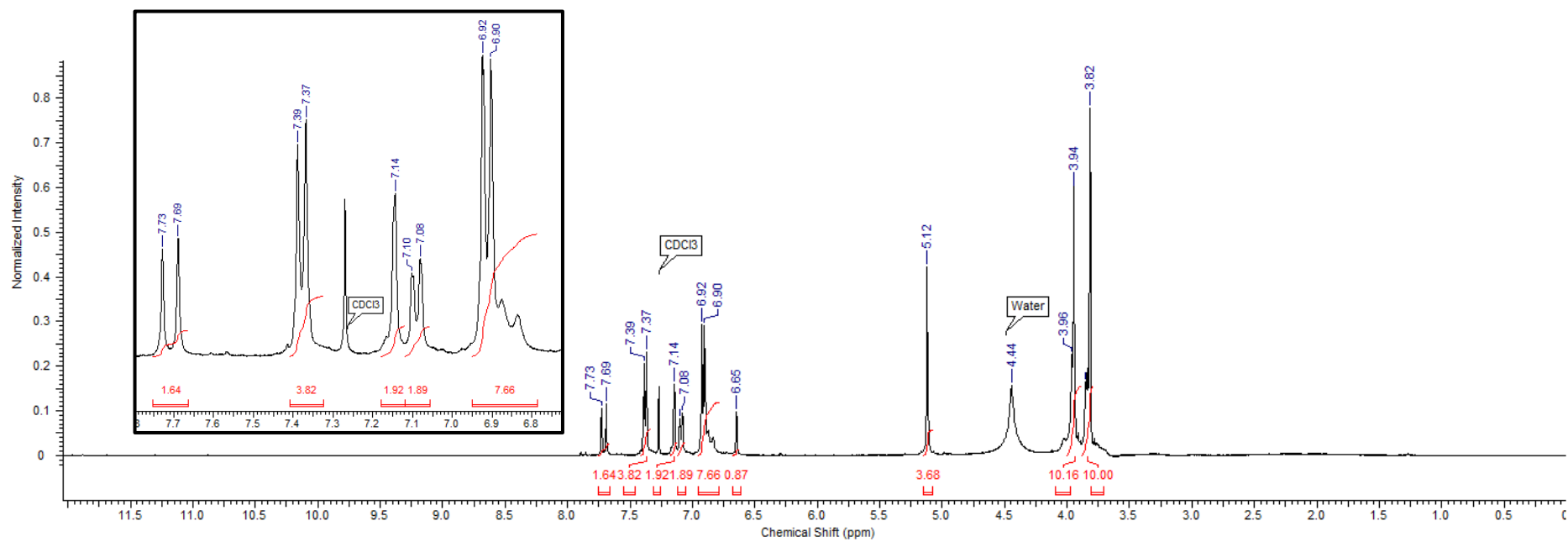
Tabela E54: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(68)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	106,34	C
2	161,87	C
3	125,33	CH
4	135,23	CH
5	129,65	C
6	113,81	CH

Carbono	δ (ppm)	m
7	149,81	C
8	151,55	C
9	121,20	CH
10	116,49	CH
1'	70,76	CH ₂
2'	128,86	C

Carbono	δ (ppm)	m
3'	129,03	CH
4'	113,98	CH
5'	159,43	C
1''	163,37	C
2''	49,55	CH ₂
3''	43,89	CH ₂

Carbono	δ (ppm)	m
4''	149,23	C
5''	120,00	CH
6''	129,35	CH
7''	116,85	CH
C ₇ -OCH ₃	56,00	CH ₃
C _{5'} -OCH ₃	55,28	CH ₃



E55: Espectro de RMN ^1H de (**69**) em CDCl_3 a 400 MHz.

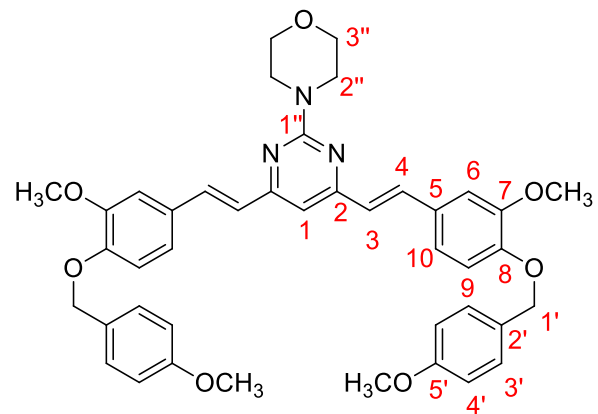
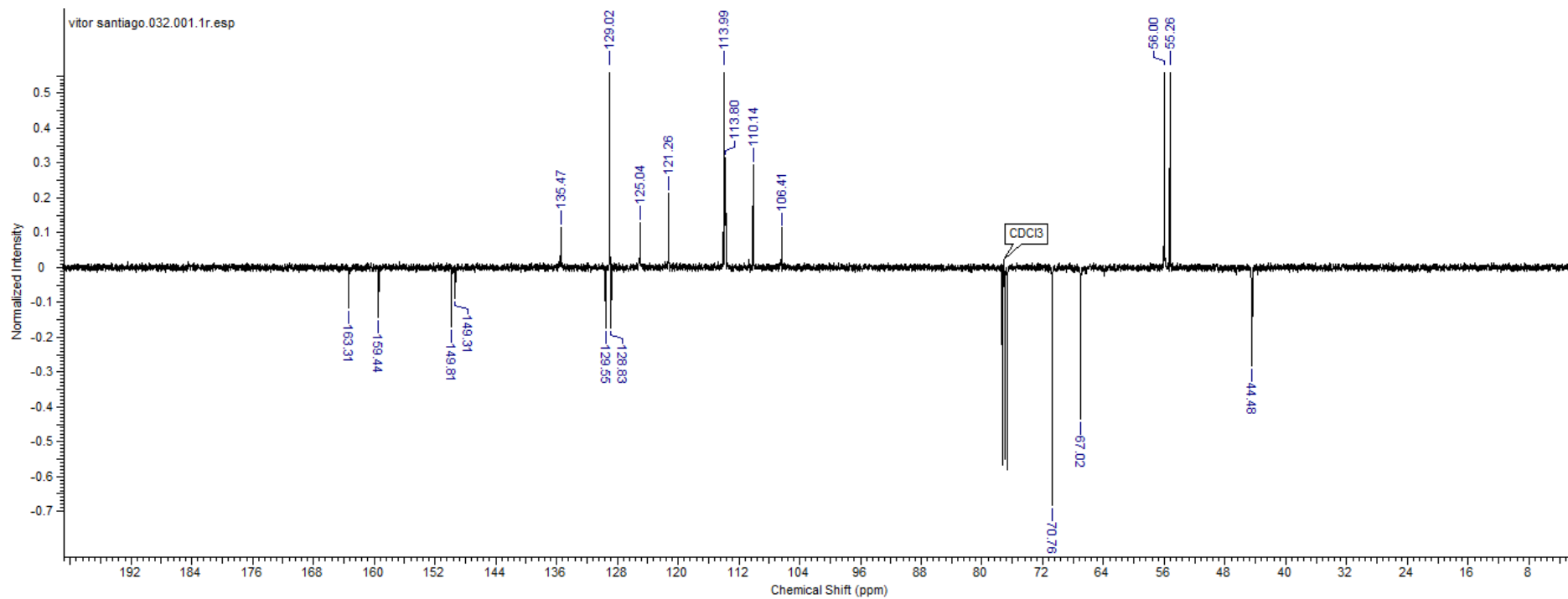


Tabela E55: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de (**69**)

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,65	s	1	-
1'	5,12	s	4	-
2''	3,96	m	4	-
3	6,85	m	2	-
3'	7,38	d	4	10
3''	3,85	m	4	-
4	7,71	d	2	20

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
4'	6,92	m	4	-
6	7,14	s	2	-
9	6,92	m	2	-
10	7,09	d	2	10
$\text{C}_7\text{-OCH}_3$	3,94	s	6	-
$\text{C}_5'\text{-OCH}_3$	3,82	s	6	-



E56: Espectro de DEPTQ de (**69**) em CDCl₃ a 100 MHz.

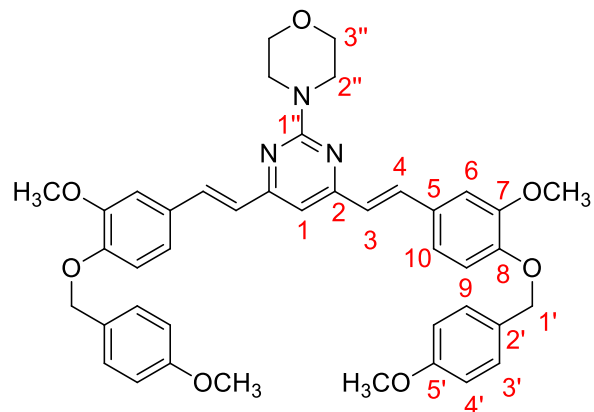
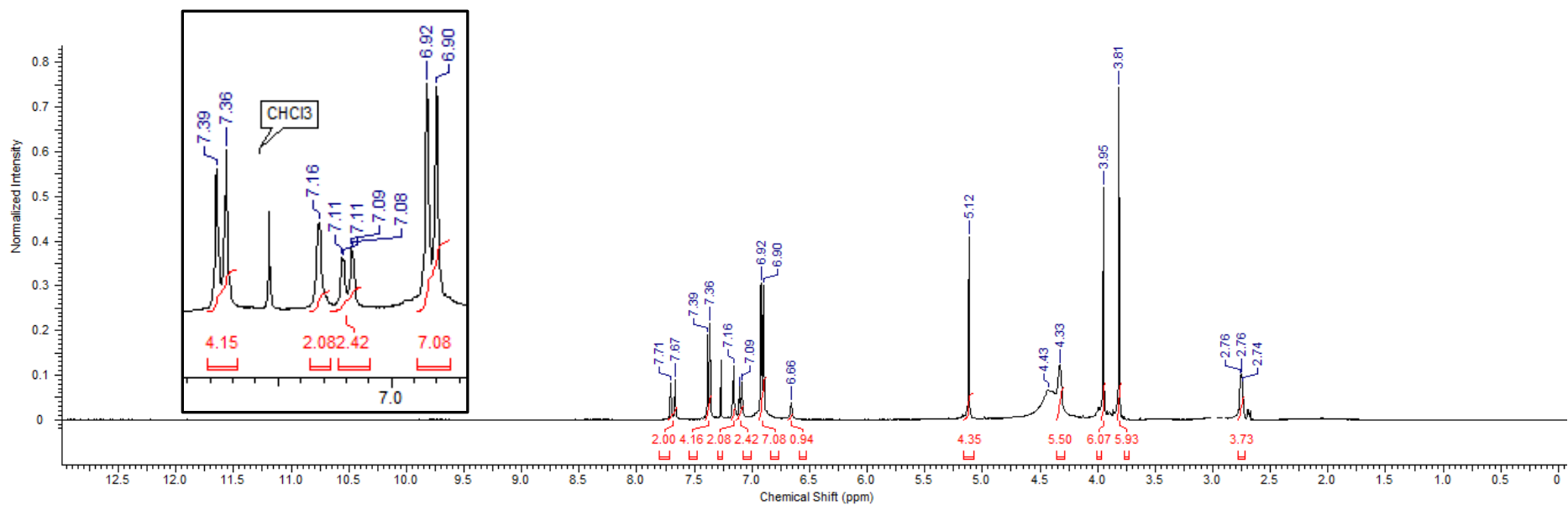


Tabela E56: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de (**69**)

Carbono	δ (ppm)	m
1	106,41	CH
1''	163,31	C
2	159,44	C
3	125,04	CH
4	135,47	CH
5	129,55	C
6	110,14	CH

Carbono	δ (ppm)	m
7	149,81	C
8	149,31	C
9	113,90	CH
10	121,26	CH
1'	70,76	CH ₂
2'	128,83	C
3'	129,02	CH

Carbono	δ (ppm)	m
4'	113,99	CH
5'	159,44	C
2''	44,48	CH ₂
3''	67,02	CH ₂
C ₇ -OCH ₃	56,00	CH ₃
C _{5'} -OCH ₃	55,26	CH ₃



E57: Espectro de RMN ¹H de (**70**) em CDCl₃ a 400 MHz.

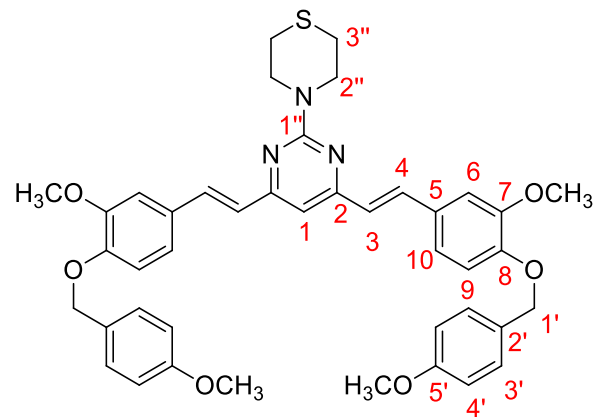
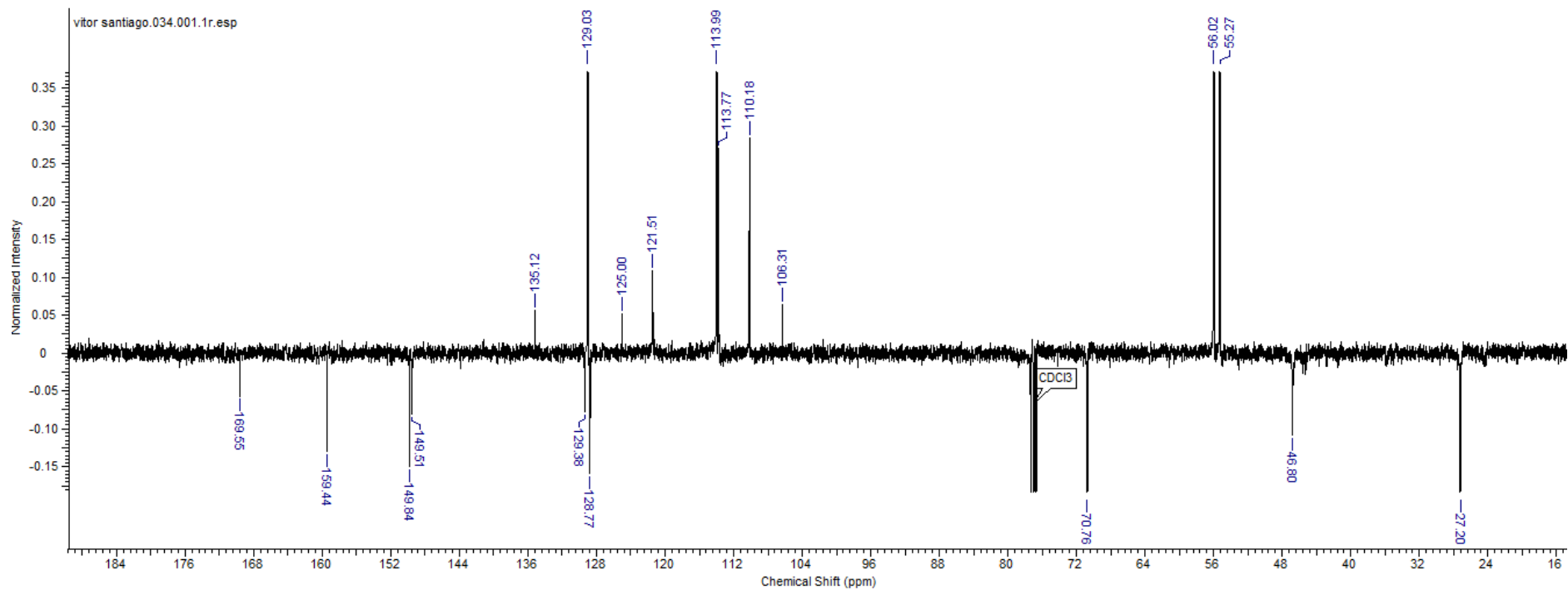


Tabela E57: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ¹H de (**70**)

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	<i>J</i> (Hz)
1	6,66	s	1	-
1'	5,12	s	4	-
2''	2,76	sl	4	-
3	6,91	m	2	-
3'	7,37	d	4	10
3''	4,37	sl	4	-
4	7,69	d	2	20

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	<i>J</i> (Hz)
4'	6,91	m	2	-
6	7,16	s	2	-
9	6,91	m	4	-
10	7,09	dd	2	10
C ₇ -OCH ₃	3,81	s	6	-
C _{5'} -OCH ₃	3,95	s	6	-



E58: Espectro de DEPTQ de (**70**) em CDCl₃ a 10 MHz.

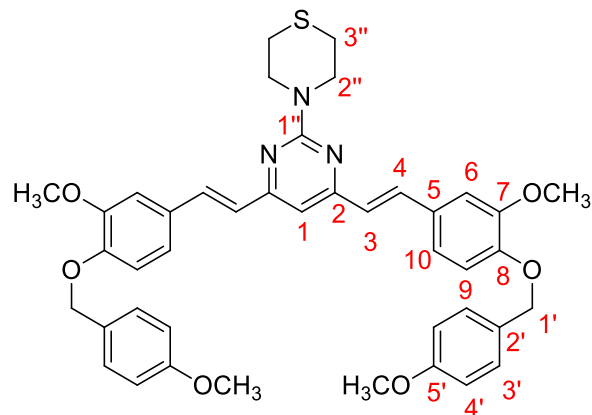
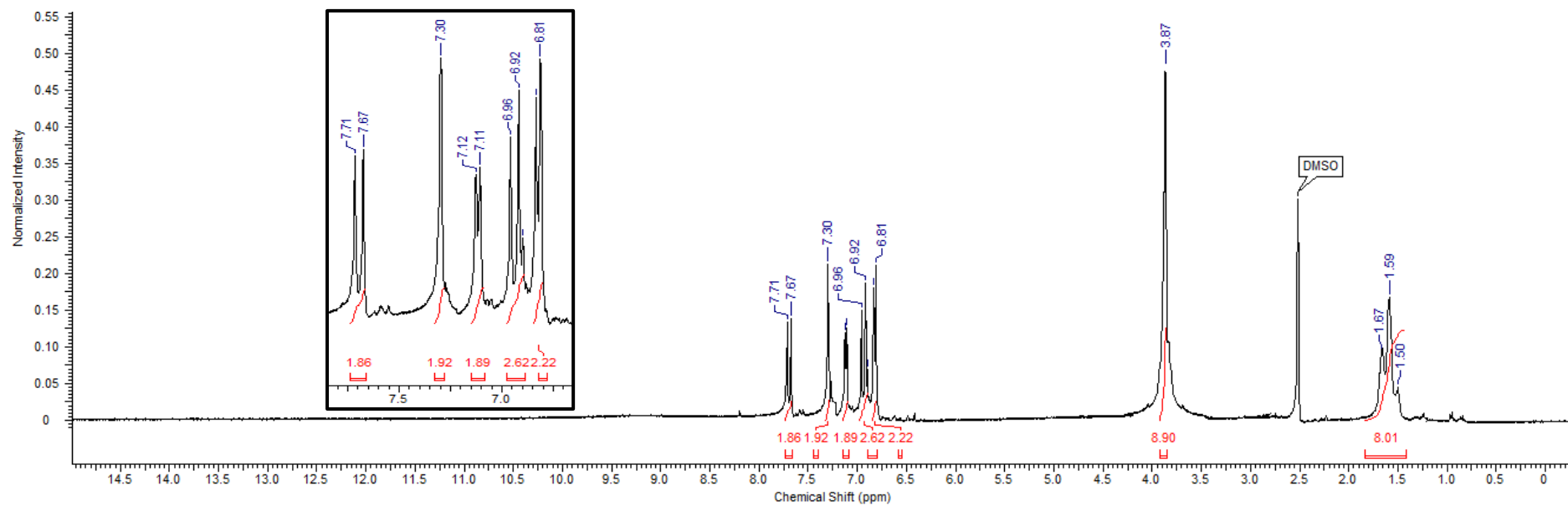


Tabela E58: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de (**70**)

Carbono	δ (ppm)	m
1	106,31	CH
1''	169,55	C
2	159,44	C
3	125,00	CH
4	135,12	CH
5	129,38	C
6	110,18	CH

Carbono	δ (ppm)	m
7	149,84	C
8	149,51	C
9	113,77	CH
10	121,51	CH
1'	70,76	CH ₂
2'	128,77	C
3'	129,03	CH

Carbono	δ (ppm)	m
4'	113,99	CH
5'	159,44	C
2''	44,40	CH ₂
3''	27,20	CH ₂
C ₇ -OCH ₃	56,02	CH ₃
C _{5'} -OCH ₃	55,27	CH ₃



E59: Espectro de RMN ^1H de (**52**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.

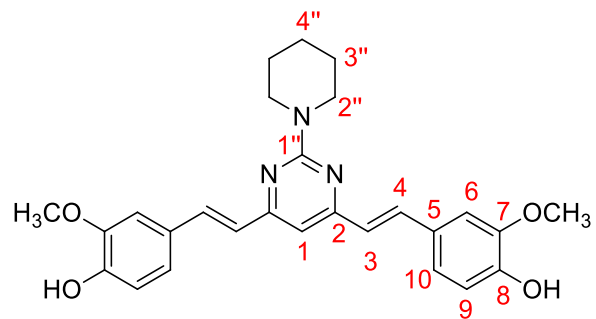
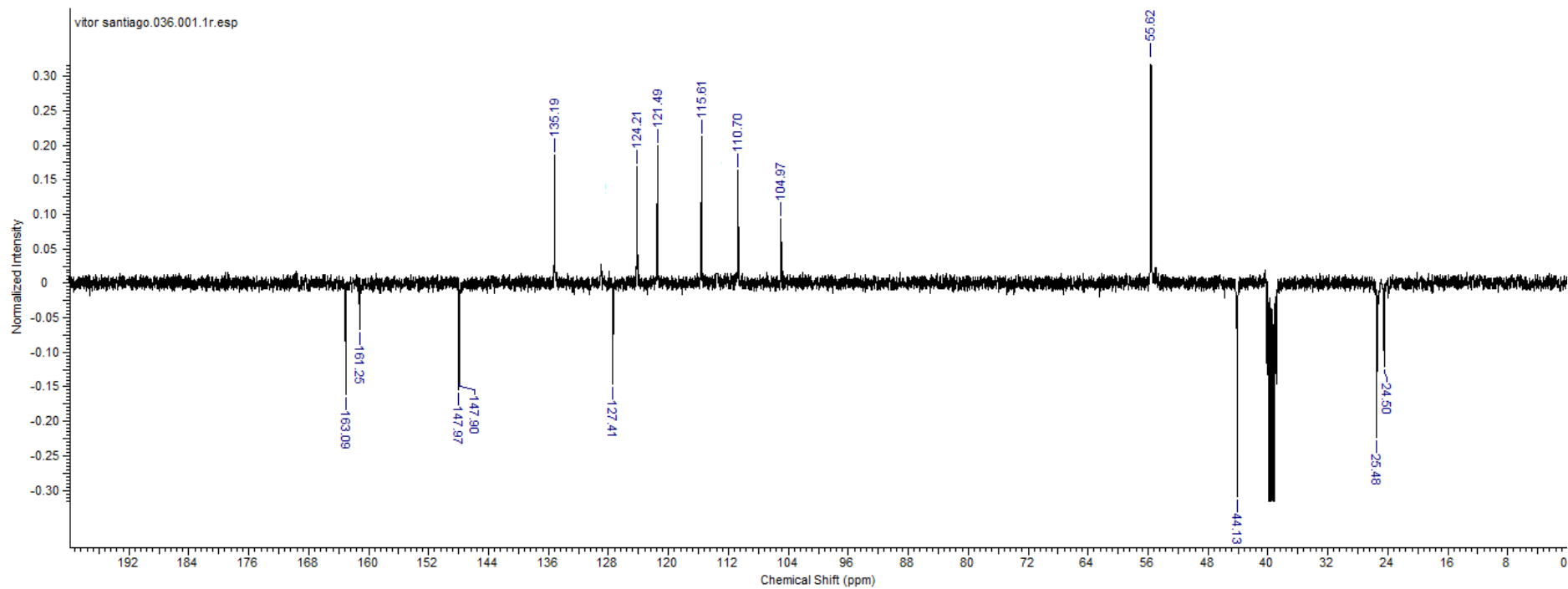


Tabela E59: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de (**52**)

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,90	s	1	-
2''	3,87	sl	4	-
3	6,93	d	2	18
3''	1,59	m	4	-
4	7,68	d	2	18

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
4''	1,59	m	2	-
6	7,30	s	2	-
9	6,81	d	2	10
10	7,11	d	2	10
$\text{C}_7\text{-OCH}_3$	3,87	sl	6	-



E60: Espectro de DEPTQ de (52) em DMSO- d_6 a 100 MHz.

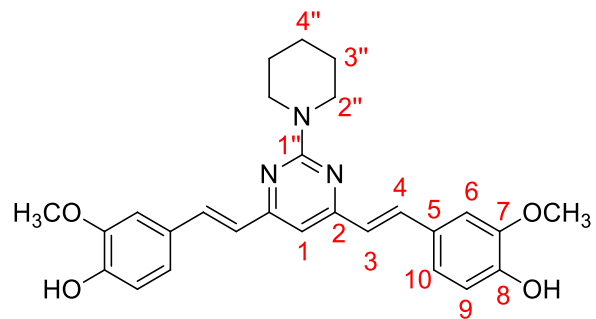
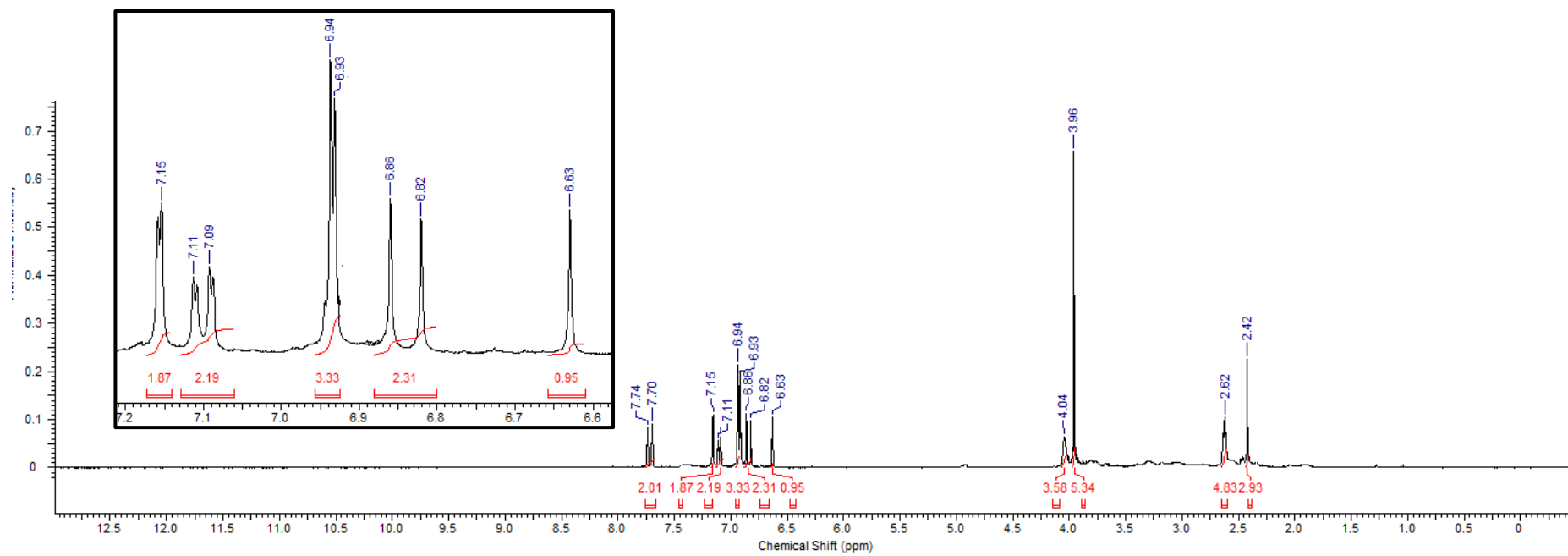


Tabela E58: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de (**52**)

Carbono	δ (ppm)	m
1	104,97	CH
1''	163,09	C
2	161,25	C
3	121,49	CH
4	135,19	CH

Carbono	δ (ppm)	m
5	127,41	C
6	110,70	CH
7	147,97	C
8	147,90	C
9	115,61	CH

Carbono	δ (ppm)	m
10	124,21	CH
2''	44,13	CH ₂
3''	25,48	CH ₂
4''	24,50	CH ₂
C- <u>O</u> CH ₃	55,62	CH ₃



E61: Espectro de RMN ¹H de **(53)** em DMSO-*d*₆ a 400 MHz.

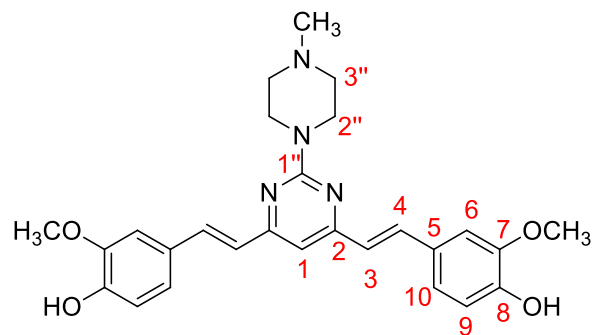
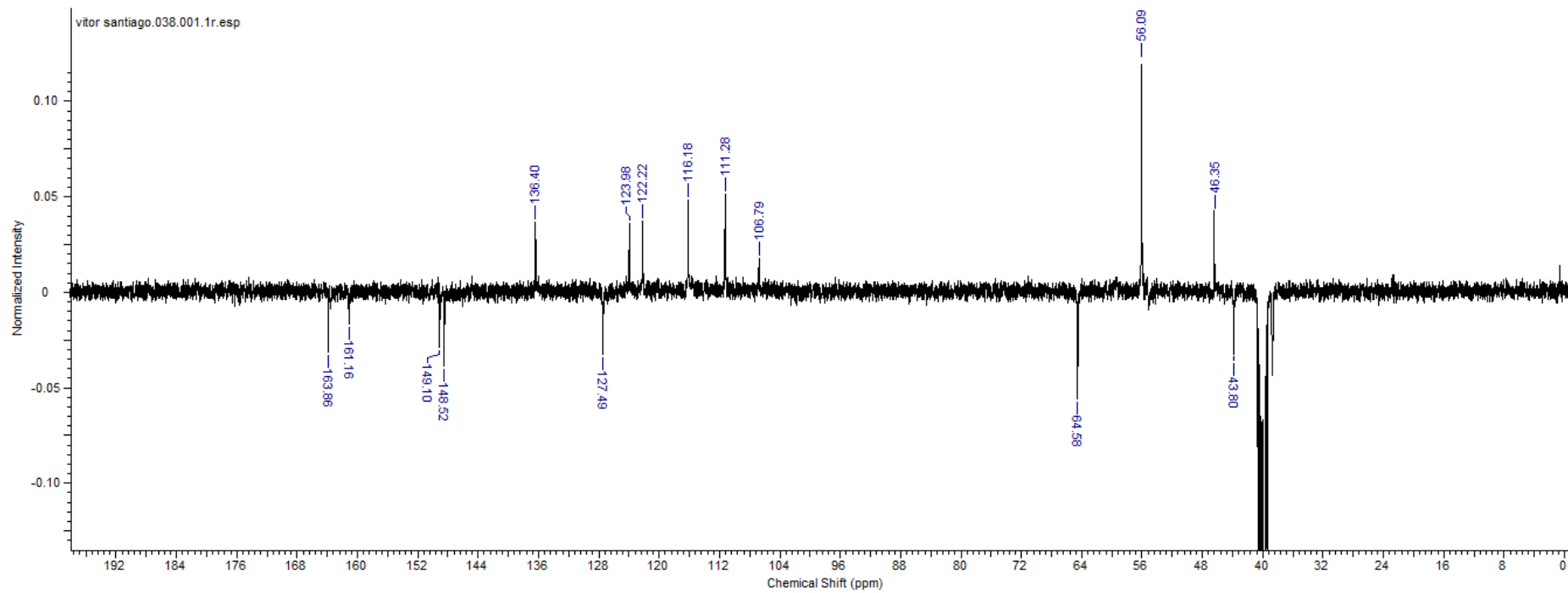


Tabela E61: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de (**53**)

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,83	s	1	-
2''	4,04	sl	4	-
3	6,84	d	2	20
3''	2,62	sl	4	-
4	7,42	d	2	20

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
6	7,15	s	2	-
9	6,84	m	2	-
10	7,10	d	2	10
N- <u>CH</u> ₃	2,42	s	3	-
C ₇ - <u>OCH</u> ₃	3,96	s	6	-



E62: Espectro de DEPTQ de (**53**) em DMSO- d_6 a 100 MHz.

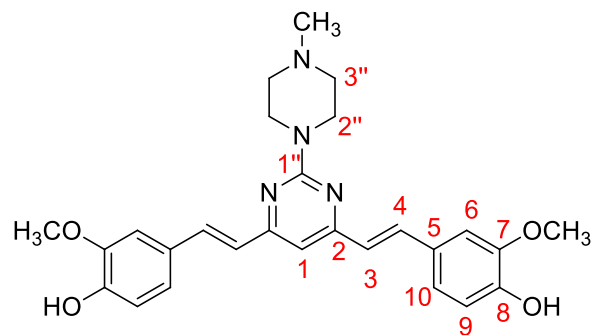
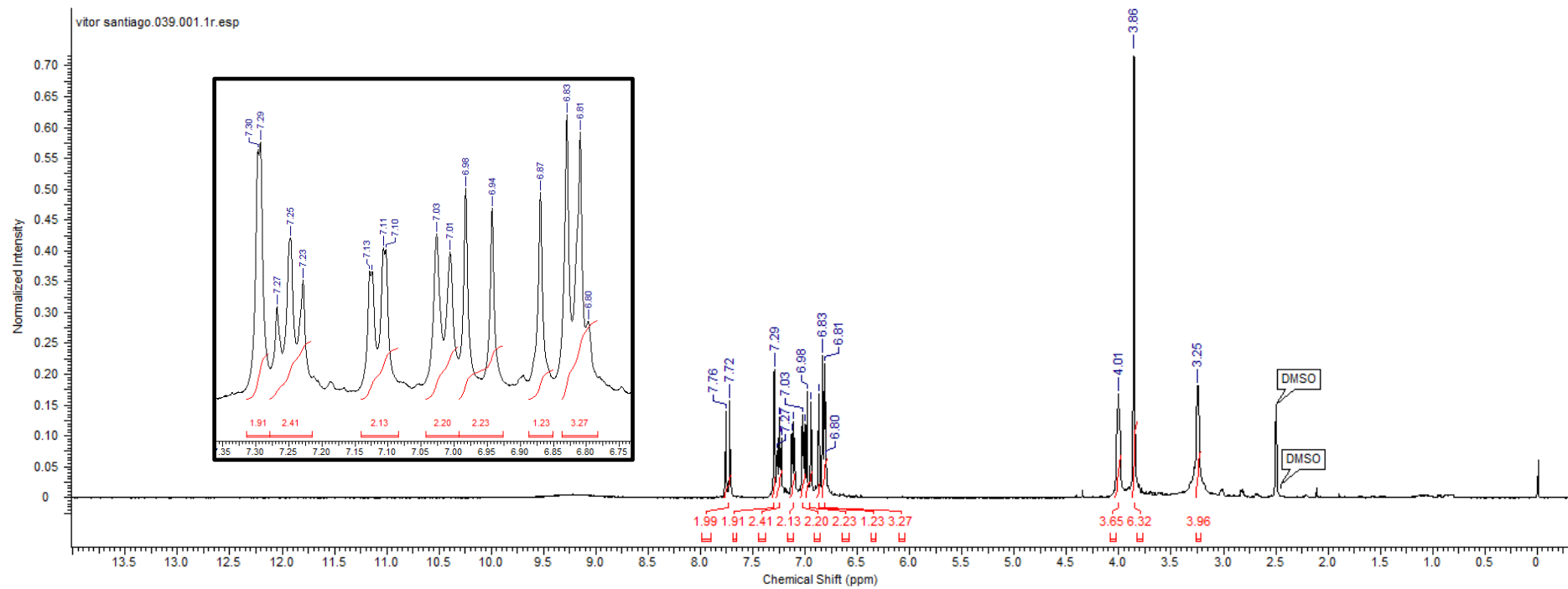


Tabela E62: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(53)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	106,79	CH
1''	163,86	C
2	161,16	C
3	122,22	CH
4	136,40	CH

Carbono	δ (ppm)	m
5	127,49	C
6	111,28	CH
7	149,10	C
8	148,52	C
9	116,18	CH

Carbono	δ (ppm)	m
10	123,98	CH
2''	64,58	CH ₂
3''	43,80	CH ₂
N-CH ₃	46,35	CH ₃
C ₇ -OCH ₃	56,09	CH ₃



E63: Espectro de RMN ^1H de (**54**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.

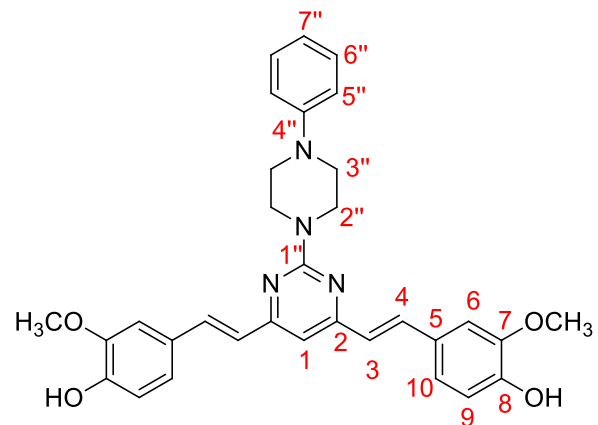
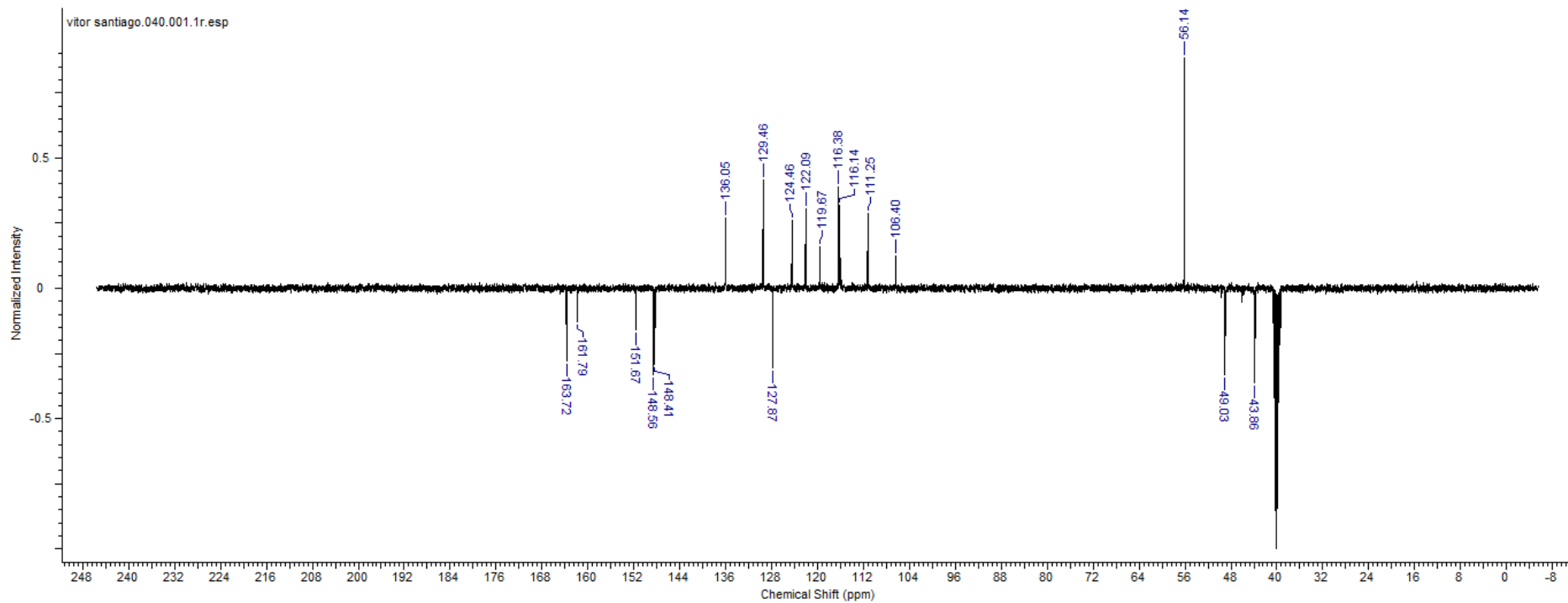


Tabela E63: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(54)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,87	s	1	-
3	6,96	d	2	15
4	7,76	d	2	15
6	7,30	s	2	-
9	6,82	d	2	10
10	7,02	d	2	10

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
2''	3,25	sl	4	-
3''	4,01	sl	4	-
5''	7,11	dd	2	8
6''	7,25	t	3	8
7''	7,25	t	3	8
Ar-OCH ₃	3,86	s	6	-



E64: Espectro de DEPTQ de (**54**) em DMSO- d_6 a 100 MHz.

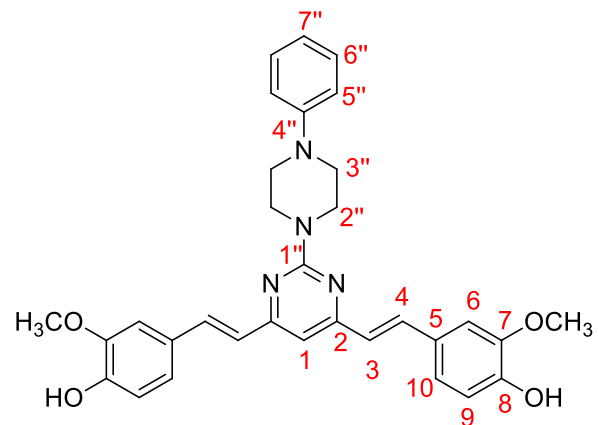
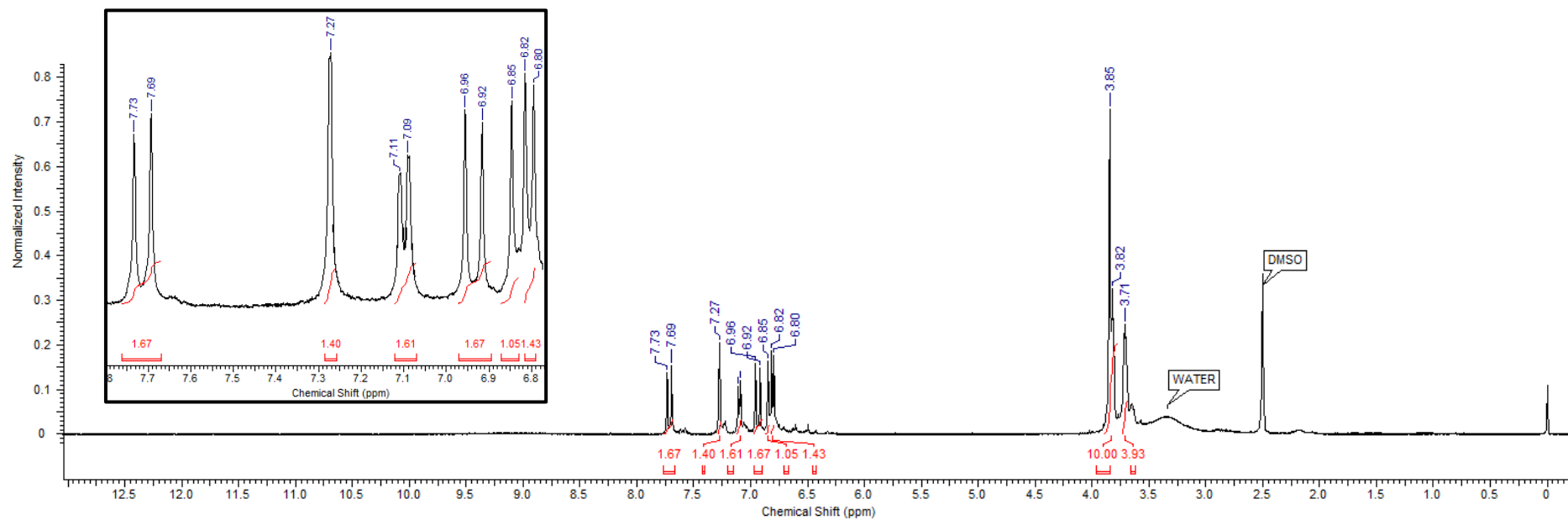


Tabela E64: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(54)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	106,40	CH
2	161,79	C
3	124,46	CH
4	136,05	CH
5	127,87	C
6	111,27	CH

Carbono	δ (ppm)	m
7	148,56	C
8	148,41	C
9	116,14	CH
10	122,09	CH
1''	163,72	C
2''	43,86	CH ₂

Carbono	δ (ppm)	m
3''	49,03	CH ₂
4''	151,67	C
5''	129,46	CH
6''	116,38	CH
7''	119,67	CH
Ar-OCH ₃	56,14	CH ₃



E65: Espectro de RMN ^1H de (**55**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.

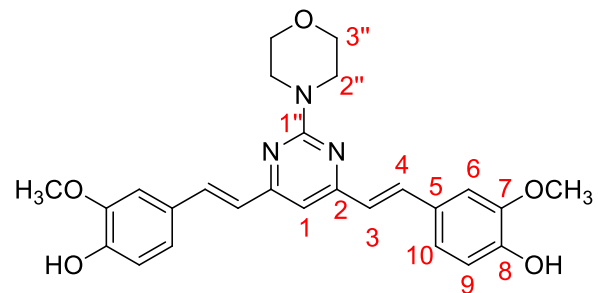
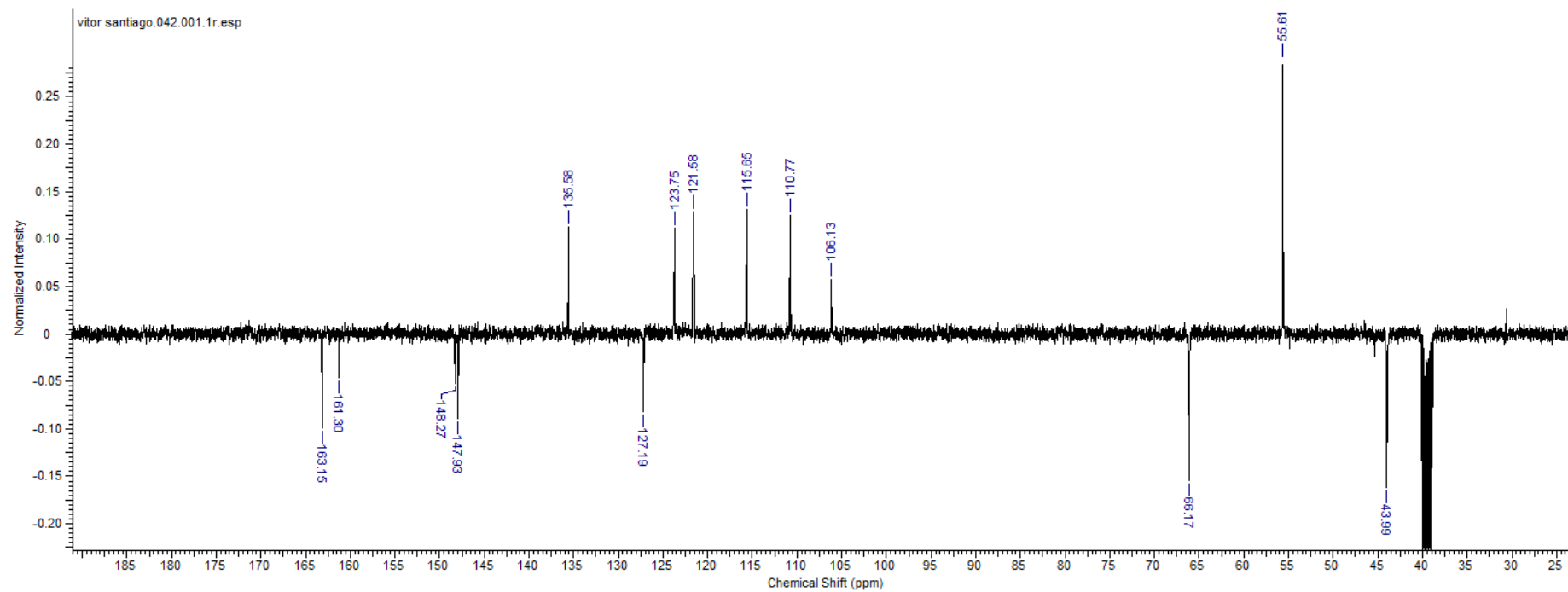


Tabela E65: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de (**55**)

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,85	s	1	-
3	6,94	d	2	18
4	7,71	d	2	18
6	7,27	s	2	-
9	6,81	d	2	10

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
10	7,10	d	2	10
2''	3,82	m	4	-
3''	3,71	m	4	-
Ar-OCH ₃	3,85	s	6	-



E66: Espectro de DEPTQ de (**55**) em DMSO- d_6 a 100 MHz

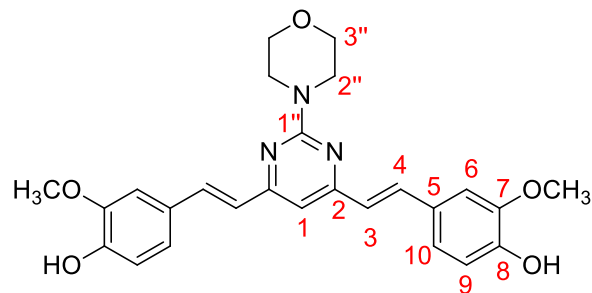
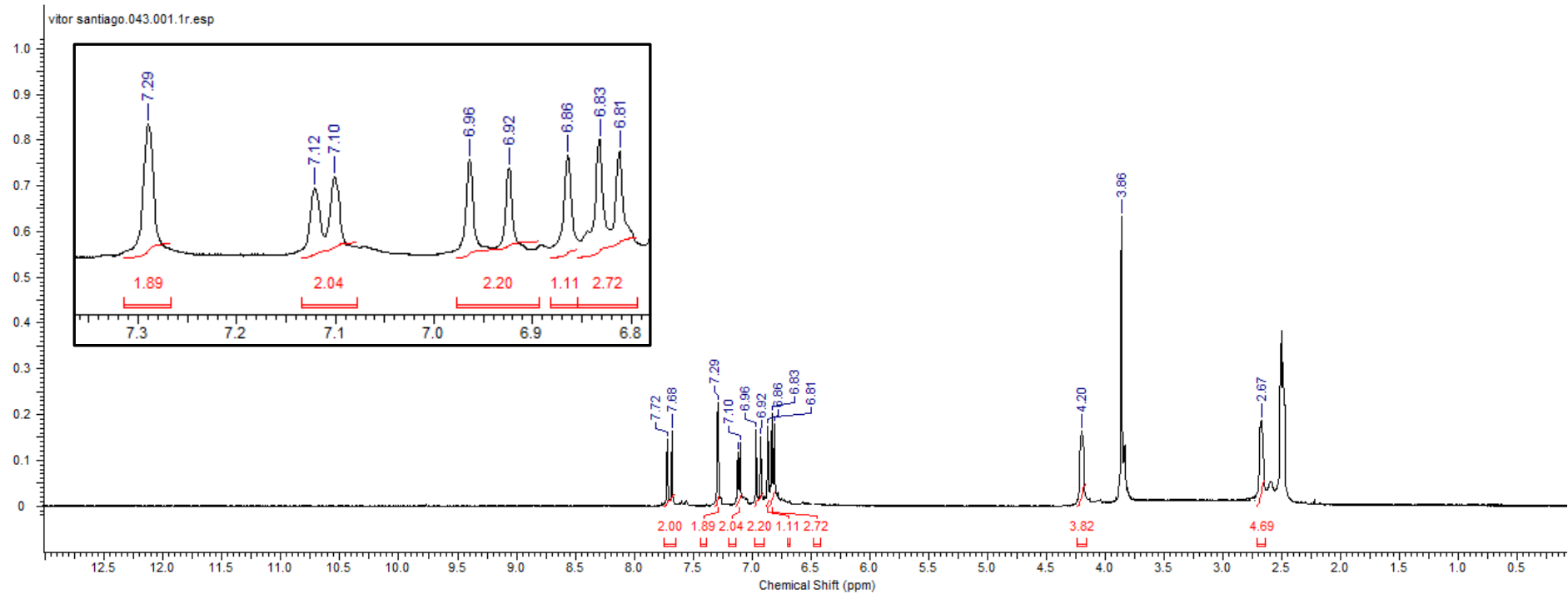


Tabela E66: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de (**55**)

Carbono	δ (ppm)	m
1	106,13	CH
2	161,30	C
3	123,75	CH
4	145,58	CH
5	127,19	C

Carbono	δ (ppm)	m
6	110,77	CH
7	148,27	C
8	147,93	C
9	115,65	CH
10	121,58	CH

Carbono	δ (ppm)	m
1''	163,15	C
2''	66,17	CH ₂
3''	43,99	CH ₂
Ar-OCH ₃	55,61	CH ₃



E67: Espectro de RMN ^1H de (**56**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.

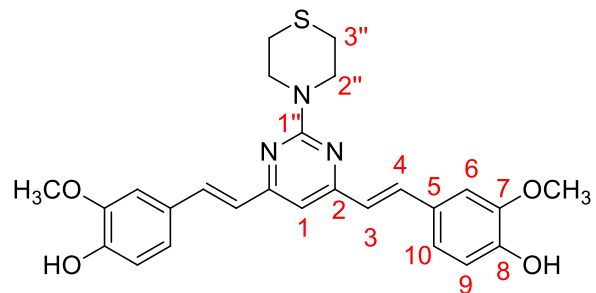
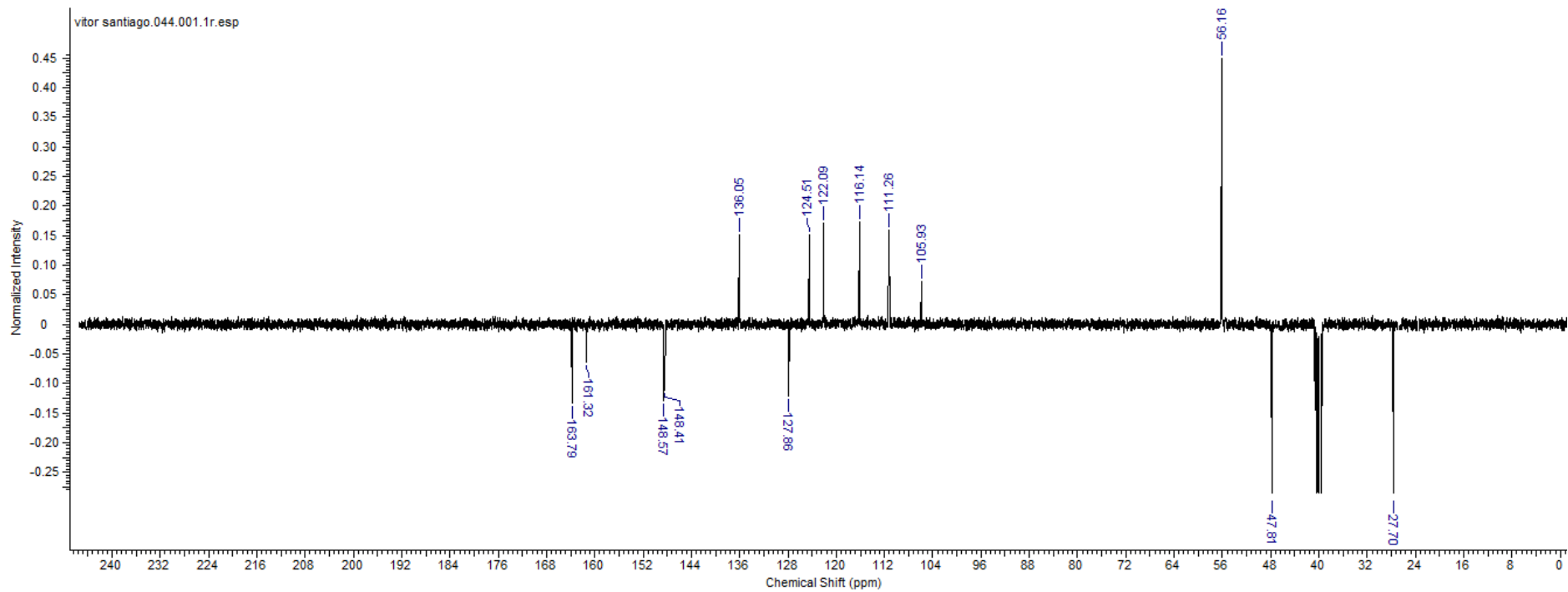


Tabela E67: Atribuição dos sinais do espectro de RMN ^1H de **(56)**

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
1	6,86	s	1	-
3	6,94	d	2	18
4	7,71	d	2	18
6	7,29	s	2	-
9	6,86	d	2	10

Hidrogênio	δ (ppm)	m	Integração	J (Hz)
10	7,11	d	2	10
2''	4,20	m	4	-
3''	2,67	m	4	-
Ar-OCH ₃	3,86	s	6	-



E68: Espectro de DEPTQ de (**56**) em DMSO- d_6 a 100 MHz

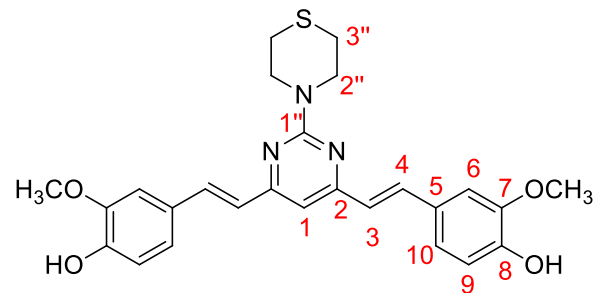


Tabela E68: Atribuição dos sinais do espectro de DEPTQ de **(56)**

Carbono	δ (ppm)	m
1	105,93	CH
2	161,32	C
3	125,51	CH
4	136,58	CH
5	127,86	C
6	111,26	CH
7	148,57	C
8	148,41	C
9	116,14	CH
10	122,09	CH
1''	163,79	C
2''	47,81	CH ₂
3''	27,70	CH ₂
Ar-OCH ₃	56,16	CH ₃