

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CHEYENE ALMEIDA CELESTINO MENOZZI

**O PRIMEIRO ESTUDO AMPLO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE
DO BENZNIDAZOL: ATIVIDADES *IN VITRO* E *IN*
VIVO CONTRA *TRYPANOSOMA CRUZI* E NA ENZIMA NITROREDUTASE**

RIO DE JANEIRO

2025

Cheyene Almeida Celestino Menozzi

**O PRIMEIRO ESTUDO AMPLO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE
DO BENZNIDAZOL: ATIVIDADES *IN VITRO* E *IN*
VIVO CONTRA *TRYPANOSOMA CRUZI* E NA ENZIMA NITROREDUTASE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Orientadores: Dra. Nubia Boechat

Dr. Frederico Silva Castelo Branco

Rio de Janeiro

2025



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Ciências Biomédicas
Pós-Graduação em Farmacologia e Química
Medicinal

*"O primeiro estudo amplo da relação estrutura-atividade do
benznidazol: atividades in vitro e in vivo contra Trypanosoma cruzi e
na enzima nitroreductase"*

Cheyene Almeida Celestino Menozzi

Orientadora: Profa. Dra. Núbia Boechat; Coorientador: Prof. Dr. Frederico S.
Castelo Branco

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e
Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio
de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor(a) em
Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Aprovada por:

Prof. Dr. Floriano Paes Silva Junior – PPGFQM/IOC-Fiocruz

Documento assinado digitalmente
gov.br FLORIANO PAES SILVA JUNIOR
Data: 27/05/2025 12:22:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Lucienne da Silva Lara Morcillo – PPGFQM/UFRJ

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCIENNE DA SILVA LARA MORCILLO
Data: 29/05/2025 11:33:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Fernanda Costa Santos Boechat – UFF

Documento assinado digitalmente
gov.br FERNANDA DA COSTA SANTOS BOECHAT
Data: 23/05/2025 13:53:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marco Edilson Freire de Lima – UFRRJ

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA
Data: 29/05/2025 11:01:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Nubia Boechat
Orientadora, PPGFQM, FIOCRUZ

Documento assinado digitalmente
gov.br NUBIA BOECHAT ANDRADE
Data: 15/05/2025 11:00:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Frederico C. Branco
Coorientador FIOCRUZ

Documento assinado digitalmente
gov.br FREDERICO SILVA CASTELO BRANCO
Data: 15/05/2025 11:29:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rio de Janeiro
07 de abril de 2025

AGRADECIMENTOS

Durante vários momentos durante minha trajetória no doutorado, eu me peguei pensando justamente nesse momento, onde estaria encerrando esse ciclo com gratidão. Foi um longo caminho pra chegar até aqui, da menina nascida no interior, estudante de escola pública, bolsista ProUni, com um sonho de cursar na Federal. O mestrado foi concluído com êxito o que me convenceu de que eu era capaz de conquistar também o doutorado, a primeira da família com esse título. Durante o doutorado, muita coisa aconteceu, uma possível mudança de Estado, uma pandemia, uma gravidez e então, a conclusão desse trabalho tão importante, que por vezes parecia tão distante devido a tantos imprevistos no percurso. Hoje estou aqui para dizer que tudo é possível pra quem tem fé, perseverança e principalmente pessoas ao lado com quem se pode contar.

Dentre essas pessoas, primeiramente gostaria de agradecer a toda equipe de cientistas que me acompanhou, esse trabalho não teria acontecido sem vocês. Gostaria de expressar minha profunda gratidão à minha orientadora, Dra. Núbia Boechat, por ter me acompanhado em cada etapa da minha jornada científica, desde a iniciação científica, passando pelo mestrado e agora no doutorado. Sua disponibilidade, apoio e confiança em meu trabalho foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Sua dedicação à ciência e sua trajetória como pesquisadora e mulher são verdadeiramente inspiradoras, e tenho muito orgulho de tê-la como um exemplo em minha carreira.

Ao meu coorientador Dr. Frederico Castelo Branco, me faltam palavras para expressar minha gratidão. Desde os meus primeiros passos na iniciação científica, quando cheguei sem experiência alguma, você me recebeu e com paciência e dedicação ajudou a moldar a profissional que sou hoje. Nos últimos anos do doutorado, tive o privilégio em poder ajudá-lo a orientar novos alunos, e me orgulhei quando por vezes repeti muitas de suas frases e compartilhei os ensinamentos que recebi. Agradeço profundamente por seu apoio constante, por ser firme quando necessário e por sempre me desafiar a ser a melhor versão de mim mesma. Obrigada por me lembrar sempre o quanto o nosso trabalho é importante. Obrigada por confiar em mim e muitas das vezes enxergar o potencial que eu mesma não consigo enxergar. Sou muito feliz por ter tido a oportunidade de ser sua aluna, você é um exemplo como pesquisador e pessoa, e como costumo brincar “quero ser igual a você quando crescer”. Muito obrigada, Fred.

Gostaria de expressar minha gratidão aos meus amigos e colegas do LASFAR, que tornaram minha jornada acadêmica mais leve e significativa. Um agradecimento especial ao Dr. Rodolfo França, que foi meu "irmão científico" durante tantos anos. Obrigada por toda a atenção e paciência. Sou grata por toda a ajuda que me ofereceu e pelos ensinamentos que compartilhou comigo. Aos meus queridos amigos Gustavo Peixoto, Livia Feitosa, Marília Gandi e Mayara Ferreira, muito obrigada por tudo. Durante esses anos compartilhamos nossas conquistas, frustrações, conhecimentos à nível técnico e pessoal. Compartilhamos nossos dias e nossa vida, e tenho certeza que a amizade de vocês foi peça fundamental para ter força nos dias mais difíceis e conseguir chegar até aqui. Esse trabalho tem muito de vocês. Aos alunos Leonardo, Jonathan e Karen, obrigada pela amizade e por terem feito parte da minha trajetória acadêmica.

Agradeço profundamente aos pesquisadores MSc. Paula Miranda, Dr. João Mafra, Dr. Filipe Quirino e ao Dr. Tácio Fernandes por sua generosidade e dedicação. Vocês sempre se mostraram solícitos, dispostos a ajudar e a compartilhar seu conhecimento. Obrigada pela humildade, companheirismo e paciência que foram fundamentais para o meu crescimento, e sou imensamente grata por todas as vezes em que deixaram de lado seus afazeres para tirar minhas dúvidas e me orientar. Minha gratidão se estende também a todos os integrantes do grupo, por toda troca e colaboração.

Gostaria agora de agradecer as pessoas mais importantes da minha vida que são as que fazem parte da minha família. Nada disso seria possível sem o apoio de vocês. Ao meu esposo Diego, não há palavras que possam traduzir o quanto sou grata por ter você ao meu lado nesta jornada. Desde o início, você acreditou em mim, mesmo quando eu mesma duvidava. Obrigada por ser meu porto seguro nos momentos difíceis e por celebrar cada pequena e grande conquista comigo. Obrigada pela sua paciência e apoio incondicional, elas fizeram toda a diferença nos dias mais desafiadores e nos momentos em que os prazos eram apertados. Obrigada por todas as apresentações minhas que você assistiu inúmeras vezes só para me ver mais confiante. Você nunca questionou minhas escolhas e sempre esteve pronto para me incentivar, me acolher e me lembrar do meu próprio potencial. Sou imensamente grata por dividir a vida com você. Obrigada por sonhar comigo, caminhar ao meu lado e tornar essa trajetória mais leve.

A minha linda filha Helena que nasceu durante o meu doutorado, eu gostaria que soubesse que você chegou no momento certo e é a força que eu precisava para concluir esse trabalho. Eu cheguei até aqui por você, para que saiba que também é capaz de realizar

grandes conquistas e alcançar qualquer objetivo que tiver nessa vida. Obrigada por ser meu raio de sol e fazer dos meus dias mais felizes.

Aos meus pais, eu agradeço de todo o coração. Obrigada pela educação que me deram, por acreditarem sempre na minha capacidade, apoiarem minhas escolhas e celebrarem minhas conquistas. Esse trabalho leva muito de vocês. Obrigada mãe, por não me deixar desistir, por sempre me lembrar da profissional que sou, além de mãe. Obrigada por ter me ajudado com a Helena para que eu conseguisse concluir esse trabalho. Vocês são os melhores pais que eu poderia ter.

Sou profundamente grata pela minha avó Lina, as semanas em que ela ficou cuidando da Helena pra mim com todo cuidado e amor foram essenciais para que eu conseguisse concluir a escrita do meu trabalho. Vó, nunca vou me esquecer o que você fez por mim. Obrigada por todo amor e carinho de sempre. Aos meus irmãos João Victor e Caroline, vocês têm o mundo pela frente, que vocês alcancem voos mais altos do que os meus, obrigada pela amizade e companheirismo.

Aos demais integrantes da minha família, saibam que todos tem um papel fundamental na minha história. Obrigada vó, tias, tios, primas e primos por torcerem, orarem por mim e confiarem no meu potencial.

Aos meus queridos amigos Thayane, Teo, Joyce, Gabriel, Clara e Matheus, obrigada por serem sempre tão solícitos, estarem sempre dispostos a ajudar, por me apoiarem e por orarem por mim. A amizade de vocês é um presente.

Agradeço *in memoriam* a minha querida bisavó Dinah por ter sido um exemplo de mulher trabalhadora e estudiosa, por ser a frente do seu tempo e acreditar que o estudo muda vidas, você sempre foi um exemplo pra mim. Também ao meu querido avô Eli, como eu gostaria que você soubesse que eu finalmente concluí esta etapa, tenho certeza que estaria muito feliz. Obrigada por tudo.

Agradeço aos integrantes da plataforma de métodos analíticos, Alexandre, Vinícius, Rafaella e Virgínia, pelas análises de CG-MS, e principalmente à Cristiane e à Eliane pelas análises de RMN e ao pesquisador Licínio pelas análises de HPLC. Obrigada por toda atenção, por todas as vezes em que tiraram minhas dúvidas e por toda agilidade com os resultados das amostras.

Agradeço à Dra. Maria de Nazaré Soeiro e equipe pela colaboração, por realizarem as avaliações anti-*T. cruzi* e por terem me recebido tão bem em seu laboratório sempre que precisava tirar alguma dúvida e até mesmo para acompanhar um pouco e ter um maior entendimento de como é realizada a avaliação sobre a forma intracelular.

Também agradeço à Dra. Maria Cristina Nonato e equipe pela avaliação na enzima nitroredutase. Obrigada pela colaboração e por sempre se mostrarem solícitas.

Agradeço ao Dr. Floriano Paes Silva Junior por aceitar ser o revisor deste trabalho, a Banca avaliadora, doutor Marco Edilson Freire de Lima, doutoras Fernanda da Costa Santos Boechat e Lucienne da Silva Lara Morcillo pelo aceite e pelas considerações.

À Farmanguinhos e FIOCRUZ, por toda infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa de estudos.

Ao Programa de pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas e a UFRJ.

E por último, deixo o meu agradecimento mais importante, obrigada meu Deus, por ter colocado em minha vida pessoas que fizeram com que esse trabalho fosse possível. Obrigada por me dizer que eu sou mais do que vencedora, por me amparar nos momentos difíceis, por sempre me direcionar e cuidar de cada detalhe. Serei eternamente grata por tudo o que fez e por tudo o que tem feito na minha vida. A Ti, toda honra, toda glória e todo o louvor.

"Para que vejam, e saibam, e considerem, e juntamente entendam que a mão do
SENHOR fez isso" Isaías 41:20

RESUMO

MENOZZI, Cheyene Almeida Celestino. O primeiro estudo amplo da relação estrutura-atividade do benznidazol: atividades *in vitro* e *in vivo* contra *Trypanosoma cruzi* e na enzima nitroredutase. Tese (Doutorado em Farmacologia e Química Medicinal) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, continua sendo um desafio significativo para a saúde pública, especialmente devido às limitações dos tratamentos disponíveis. O benznidazol (BZN) é atualmente o único fármaco utilizado no Brasil para o tratamento da doença e, apesar de suas restrições, continua sendo a melhor alternativa terapêutica, conforme evidenciado em estudos clínicos recentes. Seu mecanismo de ação bem estabelecido e sua eficácia consolidada o tornam um protótipo valioso para o desenvolvimento de novas moléculas. Neste contexto, este trabalho propôs a síntese e avaliação de 27 derivados do BZN, buscando otimizar sua atividade anti-*T. cruzi* e realizar um estudo preliminar de relação estrutura-atividade (SAR), ainda não explorado e documentado na literatura. Os derivados foram obtidos através de uma rota sintética simples e de baixa custo, composta de duas etapas realizadas através do sistema *one-pot*. As predições *in silico* indicaram propriedades físico-químicas e farmacocinéticas favoráveis, incluindo boa solubilidade aquosa, excelente potencial de absorção gastrointestinal e conformidade com os principais critérios de *drug-likeness*. A atividade biológica foi determinada por meio de ensaios *in vitro* contra formas intracelulares do parasito (cepa Tulahuen) e tripomastigotas sanguíneos (cepa Y), além da citotoxicidade nas células L929. Nove compostos demonstraram maior potência e seletividade do que o BZN ($EC_{50} = 2,52 \pm 0,60 \mu M$) contra a forma intracelular do parasito, com destaque para os três compostos mais potentes, cujos EC_{50} variaram de 1,01 a 2,52 μM . Todos apresentaram $CC_{50} > 200 \mu M$, indicando alto índice de seletividade e ausência de citotoxicidade até a concentração máxima testada, evidenciando um perfil de segurança favorável. Contra tripomastigotas sanguíneos, 8 dos 17 compostos testados apresentaram EC_{50} inferiores ao do BZN (5,8 μM), variando de 2,37 a 5,18 μM . A avaliação *in vitro* na enzima nitroredutase (*TcNTR*) classificou nove derivados como substratos artificiais. As taxas de conversão enzimática, expressas em relação ao BZN (100%), foram iguais ou superiores a esse valor para oito compostos, reforçando a hipótese de envolvimento dessa via no mecanismo de ação. A análise de relação estrutura-atividade (SAR) permitiu a identificação de padrões estruturais que favorecem a atividade anti-*T. cruzi*, sugerindo possíveis direções para o desenvolvimento de novos compostos. Cinco dos derivados mais promissores foram avaliados *in vivo*, e o composto *N*-(2-metilbenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida foi capaz de reduzir 100% da parasitemia e garantir 100% de sobrevivência dos animais testados. Esses achados reforçam o potencial dessas moléculas como candidatos promissores para o desenvolvimento de novos agentes antichagásicos.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas, benznidazol, relação estrutura-atividade, nitroredutase.

ABSTRACT

MENOZZI, Cheyene Almeida Celestino. The first comprehensive structure–activity relationship study of benznidazole: *in vitro* and *in vivo* activities against *Trypanosoma cruzi* and its nitroreductase enzyme. Thesis (Doctorate in Pharmacology and Medicinal Chemistry) – Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, remains a significant public health challenge, particularly due to the limitations of current treatments. Benznidazole (BZN) is currently the only drug used in Brazil for the treatment of the disease and, despite its limitations, remains the best therapeutic alternative, as evidenced by recent clinical studies. Its well-established mechanism of action and consolidated efficacy make it a valuable prototype for the development of new molecules. In this context, this work proposed the synthesis and evaluation of 27 BZN derivatives, aiming to optimize their anti-*T. cruzi* activity and to carry out a preliminary structure–activity relationship (SAR) study, which has not yet been explored or documented in the literature. The derivatives were obtained through a simple and low-cost synthetic route, consisting of two steps performed using a one-pot system. *In silico* predictions indicated favorable physicochemical and pharmacokinetic properties, including good aqueous solubility, excellent gastrointestinal absorption potential, and compliance with major drug-likeness criteria. Biological activity was determined through *in vitro* assays against intracellular forms of the parasite (Tulahuen strain) and bloodstream trypomastigotes (Y strain), as well as cytotoxicity in L929 cells. Nine compounds exhibited greater potency and selectivity than BZN ($EC_{50} = 2.52 \pm 0.60 \mu\text{M}$) against the intracellular form of the parasite, with three of them standing out as the most potent, showing EC_{50} values ranging from 1.01 to 2.52 μM . All compounds showed $CC_{50} > 200 \mu\text{M}$, indicating a high selectivity index and no cytotoxicity up to the maximum concentration tested, highlighting a favorable safety profile. Against bloodstream trypomastigotes, 8 of the 17 compounds tested showed EC_{50} values lower than BZN (5.8 μM), ranging from 2.37 to 5.18 μM . The *in vitro* evaluation on the nitroreductase enzyme (*Tc*NTR) classified nine derivatives as artificial substrates. Enzymatic conversion rates, expressed relative to BZN (100%), were equal to or higher than this value for eight compounds, reinforcing the hypothesis of this pathway's involvement in the mechanism of action. The SAR analysis enabled the identification of structural patterns that enhance anti-*T. cruzi* activity, suggesting potential directions for the development of new compounds. Five of the most promising derivatives were evaluated *in vivo*, and the compound N-(2-methylbenzyl)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)acetamide was able to reduce parasitemia by 100% and ensure 100% survival of the treated animals. These findings reinforce the potential of these molecules as promising candidates for the development of new anti-Chagas agents.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, benznidazole, structure–activity relationship, nitroreductase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> : tripomastigota metacíclico (A), epimastigota (B), amastigota (C) e tripomastigota sanguíneo (D). (Adaptado de Kessler <i>et al.</i> , 2017).....	26
Figura 2. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> (adaptado de PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).....	27
Figura 3. Estruturas químicas do Benznidazol e nifurtimox.....	34
Figura 4. Estrutura química do fexinidazol.....	41
Figura 5. Estrutura química de alguns fármacos estudados contra a DC.....	42
Figura 6. Estrutura química dos derivados planejados análogos do BZN 1-27.....	52
Figura 7. Numeração utilizada para os derivados 1-27.....	66
Figura 8. Espectro de massas EMAR-IES (+) dos derivados finais com a massa molecular de 274,1066 g/mol. (A) composto 1; (B) composto 2; (C) composto 3; (D) composto 25; (E) composto 26; (F) composto 27.....	67
Figura 9. Espectro de massas EMAR-IES (+) do derivado 4	68
Figura 10. Espectro de IV da substância 18.....	70
Figura 11. Espectro de IV da substância 26.....	71
Figura 12. Espectro ampliado de RMN de ¹ H (400 MHz) do derivado 6. Solvente: DMSO-d6.....	74
Figura 13. Espectro de RMN bidimensional COSY (400 MHz) do derivado 6. À esquerda espectro completo e à direita ampliado.....	74
Figura 14. Espectro ampliado de RMN de ¹ H (400 MHz) dos derivados 4 A) e 5 B). Solvente: DMSO-d6.....	76

Figura 15. Espectro ampliado de RMN de ^1H (400 MHz) do derivado 25 . Solvente: DMSO- d_6	77
Figura 16. Espectro ampliado de RMN de ^1H (400 MHz) do derivado 27 . Solvente: DMSO- d_6	78
Figura 17. Espectro ampliado de RMN de ^1H (400 MHz) do derivado 26 . Solvente: DMSO- d_6 . Temperatura: 328 K.....	79
Figura 18. Estudo de temperatura espectro RMN de ^1H (400 MHz) do derivado 26 . Solvente: DMSO- d_6 . Temperaturas analisadas: 298K, 308K, 318K, 328K, 338K e 348K.....	81
Figura 19. Estudo de temperatura espectro RMN de ^1H (400 MHz) do derivado 26 expandido. Solvente: DMSO- d_6 . Temperaturas analisadas: 298K, 308K, 318K, 328K, 338K e 348K.....	82
Figura 20. Espectro de RMN bidimensional COSY (400 MHz) do derivado 26 . À esquerda espectro completo e à direita ampliado.....	83
Figura 21. Estruturas de ressonância que ocorrem entre o nitrogênio e o carbono da carbonila.....	84
Figura 22. Possíveis confômeros anti-periplanar (ap) e sin-periplanar (sp) presentes no derivado 26	84
Figura 23. Espectro ampliado de RMN de ^1H (400 MHz) do derivado 26 com os diferentes confômeros propostos à esquerda. Setas indicam os hidrogênios referentes no confômero anti-periplanar, mostrando que os hidrogênios mais próximos a metila apresentam maior definição na duplicidade de sinais. Solvente: DMSO- d_6 . Temperatura: 328 K.....	85
Figura 24. Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (100 MHz) do derivado 6 . Solvente: DMSO- d_6	88
Figura 25. Espectro ampliado de RMN bidimensional de HSQC do derivado 6	89
Figura 26. Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (100 MHz) do derivado 14 . Solvente: DMSO- d_6	90

Figura 27. Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (100 MHz) do derivado 14 , com ênfase nos sinais que foram sobrepostos. Solvente: DMSO- d_6	91
Figura 28. Espectro ampliado de RMN bidimensional de HSQC do derivado 14	91
Figura 29. Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (100 MHz) do derivado 21 . Solvente: DMSO- d_6	92
Figura 30. Espectro ampliado de RMN bidimensional de HSQC do derivado 21	93
Figura 31. Espectro ampliado de RMN de ^{19}F (377 MHz) do derivado 9 . Solvente: DMSO- d_6	96
Figura 32. Espectro ampliado de RMN de ^{19}F (377 MHz) do derivado 8 . Solvente: DMSO- d_6	97
Figura 33. Cromatograma de CLAE-UV do derivado 15 . $\lambda = 361 \text{ nm}$	98
Figura 34. Dados de predição <i>in silico</i> realizados pelo SwissADME para o derivado 11	101
Figura 35. Predição da absorção gastrointestinal e penetração da barreira hematoencefálica utilizando o gráfico BOILED-Egg.....	116
Figura 36. Avaliação preliminar da SAR dos derivados 1, 2 e 3 . Em lilás: substituinte em <i>orto</i> , em laranja: substituinte em <i>meta</i> e em verde: substituinte em <i>para</i>	117
Figura 37. Avaliação preliminar da SAR dos derivados 4-12 e 15-17 . Em lilás: substituinte em <i>orto</i> , em laranja: substituinte em <i>meta</i> e em verde: substituinte em <i>para</i>	118
Figura 38. A) Avaliação preliminar da SAR dos derivados 18 e 19 . B) Avaliação preliminar da SAR dos derivados 13 e 14 . Em laranja: substituinte em <i>meta</i> e em verde: substituinte em <i>para</i>	119
Figura 39. Avaliação preliminar da SAR dos derivados 15 e 1	126
Figura 40. Avaliação preliminar da SAR dos derivados mono substituídos na posição <i>orto</i> 1, 4, 7, 10 e 15	127
Figura 41. Avaliação preliminar da SAR do derivado 5	128

Figura 42. Avaliação preliminar da SAR dos derivados mono substituídos na posição <i>meta</i> 2, 5, 8, 11, 13 e 16	128
Figura 43. Avaliação preliminar da SAR dos derivados mono substituídos na posição <i>para</i> 3, 6, 9, 12, 14, 17, 18 e 19	129
Figura 44. Avaliação preliminar da SAR dos derivados dissustituídos na posição <i>orto</i> e <i>para</i> 20, 21 e 24	130
Figura 45. Avaliação preliminar da SAR dos derivados dimetoxi 23 e 24	131
Figura 46. A) Avaliação preliminar da SAR do derivado 22 . B) Avaliação preliminar da SAR dos derivados 13, 14 e 22	131
Figura 47. Comparação do aumento de potência dos derivados com relação a posição dos substituintes no anel aromático. Em lilás: substituintes em <i>orto</i> , em laranja: substituintes em <i>meta</i> , em verde: substituintes em <i>para</i> , em rosa: substituintes em <i>orto-para</i> , em cinza: substituintes em <i>meta-para</i> , em azul: substituintes em <i>meta-meta</i>	132
Figura 48. Avaliação preliminar da SAR dos derivados mais potentes da primeira série: 1, 15 e 20	133
Figura 49. Avaliação preliminar da SAR dos derivados 25 e 26	134
Figura 50. Avaliação preliminar da SAR do derivado 27	134
Figura 51. Avaliação preliminar da SAR dos derivados 4-9 em tripomastigotas.....	136
Figura 52. Avaliação preliminar da SAR dos derivados mais potentes 1, 4, 15, 20 e 24 em tripomastigotas.	137
Figura 53. Derivados com atividade sob a enzima <i>TcNTR</i>	141
Figura 54. Derivados menos ativos na enzima.....	142
Figura 55. Substâncias 1, 15, 20 e 24 , selecionadas como as mais promissoras em análise preliminar.....	145
Figura 56. Curva de Parasitemia- Evolução da parasitemia nos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com diferentes doses de benznidazol (BZ) e do composto 1 . O tratamento com BZ 100 mg/kg e 1 a 105,32 mg/kg resultou em uma redução completa da parasitemia.	147

Figura 57. Curva de Mortalidade - Mortalidade dos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com BZN e derivado 1 em diferentes doses. Benznidazol (BZ) a 100 mg/kg e o derivado 1 a 105,32 mg/kg evitaram a morte dos camundongos, resultando em 0% de mortalidade.....	147
Figura 58. Curva de Parasitemia - Evolução da parasitemia ao longo do tempo nos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com o derivado 4 em dose equimolar (11,3 e 112,9 mpk), em comparação com o BZN (10 e 100 mpk) e grupo controle.....	148
Figura 59. Curva de Mortalidade - Mortalidade dos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com o derivado 4 (11,3 e 112,9 mpk), comparada ao benznidazol (10 e 100 mpk) e grupo controle.....	149
Figura 60. Curva de Parasitemia - Evolução da parasitemia ao longo do tempo nos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com o derivado 20 em dose equimolar (12,6 e 126,04 mpk), em comparação com o BZN (10 e 100 mpk) e grupo controle....	149
Figura 61. Curva de Mortalidade - Mortalidade dos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com o derivado 20 (12,6 e 126,04 mpk), comparada ao benznidazol (10 e 100 mpk) e grupo controle.....	150
Figura 62. Curva de Parasitemia - Evolução da parasitemia ao longo do tempo nos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com o derivado 15 em dose equimolar (11,15 e 111,47 mpk), em comparação com o BZN (10 e 100 mpk) e grupo controle.....	151
Figura 63. Curva de Mortalidade - Mortalidade dos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com o derivado 15 (11,15 e 111,47 mpk), comparada ao benznidazol (10 e 100 mpk) e grupo controle.....	152
Figura 64. Curva de Parasitemia - Evolução da parasitemia ao longo do tempo nos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com o derivado 24 em dose equimolar (12,3 e 123 mpk), em comparação com o BZN (10 e 100 mpk) e grupo controle.....	152
Figura 65. Curva de Mortalidade - Mortalidade dos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com o derivado 24 (12,3 e 123 mpk), comparada ao benznidazol (10 e 100 mpk) e grupo controle.....	153

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Mecanismo de ação proposto para o nifurtimox (A) e BZN (B) (Adaptado de PATTERSON & WYLLIE, 2014).....	37
Esquema 2. Planejamento dos derivados 1-27.....	56
Esquema 3. Método de síntese tradicional para a obtenção dos derivados planejados, com o isolamento dos derivados clorados 55-81.	58
Esquema 4. Método de síntese escolhido para a obtenção dos derivados planejados 1-27 utilizando a técnica <i>one-pot</i>	58
Esquema 5. Mecanismo da Reação de Schotten-Baumann.....	60
Esquema 6. Método de síntese dos derivados planejados 1-27, com ênfase na etapa 1.1.....	60
Esquema 7. Método de síntese dos derivados planejados 1-27, com ênfase na etapa 1.2.....	61
Esquema 8. Mecanismo proposto para a reação de obtenção dos produtos finais 1-27.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Casos de doença de DCA nos anos de início de sintoma entre 2010 e 2020 segundo Unidade Federada de Infecção (UFI).....	33
Tabela 2. Referências dos estudos realizados em associação dos inibidores de CYP51 e BZN.....	44
Tabela 3. Alguns outros fármacos associados ao BZN avaliados contra a doença de Chagas.....	46
Tabela 4. Obtenção dos derivados finais 1-27	63
Tabela 5. Espectrometria de massas de alta resolução – EMAR-IES(+) dos derivados 1-27	69
Tabela 6. Dados espectroscópicos de IV dos derivados 1-27	71
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) para os derivados 1-27 . Solvente: DMSO- d_6	86
Tabela 8. Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz) para os derivados 1-27 . Solvente: DMSO- d_6	94
Tabela 9. Dados de RMN de ^{19}F (377 MHz) para os derivados 7-9, 13, 14, 18, 21 e 22 . Solvente: DMSO- d_6	97
Tabela 10. Dados de pureza por CLAE-UV dos derivados 1-27	98
Tabela 11. Predição da classe de propriedades físico-químicas dos derivados 1-27	102
Tabela 12. Predição da classe de lipofilicidade dos derivados 1-27	104
Tabela 13. Predição da classe de solubilidade aquosa dos derivados 1-27	107
Tabela 14. Predição dos descritores da classe farmacocinética dos derivados 1-27	109
Tabela 15. Predição dos descritores da classe de <i>drug-likeness</i> dos derivados 1-27	110
Tabela 16. Predição dos descritores da categoria de Química medicinal dos derivados 1-27	114

Tabela 17. Dados da avaliação <i>in vitro</i> contra <i>T. cruzi</i> em modelo intracelular.....	119
Tabela 18. Dados da avaliação anti- <i>T. cruzi</i> dos derivados selecionados sobre tripomastigotas.....	137
Tabela 19. Dados da avaliação <i>in vitro</i> na enzima NTR dos derivados 1-27	140

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AcOEt – Acetato de etila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

ALH – Aceptor de ligação hidrogênio

BENDITA - BZNe New Doses Improved Treatment & Therapeutic Associations

BHE – Barreira Hematoencefálica

BOILED-Egg - *Brain Or IntestinaL EstimateD permeation method*

BZN – Benznidazol

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CCF – Cromatografia em Camada Fina

CLUE-DAD – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos

cLogP – Coeficiente de partição octanol-água calculado

Log *P*_{o/w} – Coeficiente de partição octanol/água

COSY - Correlation Spectroscopy (espectroscopia de correlação)

CPCD – cromatografia preparativa em camada delgada

DC - Doença de Chagas

DCA – Doença de Chagas Aguda

DCC – Doença de Chagas Crônica

DLH – Doadores de ligação hidrogênio

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMSO D₆ – Dimetilsulfóxido deuterado

DNA - deoxyribonucleic acid

DNDi - Drugs for Neglected Diseases Initiative

EC₅₀ – Concentração Efetiva 50%

EC₉₀ - Concentração Efetiva 90%

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*

EMAR-IES - Espectrometria de massas com ionização por eletrospray de alta resolução

HAI - Hemaglutinação indireta

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (Coerência quântica heteronuclear simples)

Hz – Hertz

IFI - Imunofluorescência indireta

IS – Índice de Seletividade

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

IV – Infravermelho

J – Constante de acoplamento (em *Hz*)

Lafepe – Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco

LC₅₀ – Concentração letal 50%

Log *Po/w* – Coeficiente de partição octanol-água

MS – Ministério da Saúde

MM – Massa molecular

m/z - Relação massa/carga

NFX - Nifurtimox

NTR – Nitroredutase

NTR-I – Nitroredutase do tipo I

NTR-II – Nitroredutase do tipo II

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

P&D – Pesquisa e Desenvolvimento

PAINS - *Pan-Assay Interference Compounds*

PCR - *polymerase chain reaction*

P-gp – Glicoproteína P

ppm – Partes por milhão

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SAR- *Structure-Activity Relationship*

S_N2 – Substituição nucleofílica de segunda ordem

t.a. – Temperatura ambiente

TBAB - Brometo de tetrabutilamônio

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

TcNTR - Enzima nitroredutase de *T. cruzi*

TDR - *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*

TPSA - *Topological Polar Surface Area*

UFI – Unidade Federada de Infecção

δ – deslocamento químico (em ppm)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. A doença de Chagas.....	24
1.1.2. Formas Evolutivas e ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
1.1.2.1. Formas Evolutivas.....	25
1.1.2.2. Ciclo biológico.....	26
1.1.3. Aspectos clínicos.....	27
1.1.4. Epidemiologia.....	30
1.1.4.1. Epidemiologia da DC no Brasil.....	31
1.1.5. Quimioterapia da Doença de Chagas.....	34
1.1.5.1. Estudos de comparação de eficácia e segurança entre o NFX e o BZN.....	37
1.1.5.2. Estratégias empregadas na busca de novos antichagásicos.....	40
1.1.5.2.1. Reposicionamento de fármacos contra a Doença de Chagas.....	40
1.1.5.2.2. Associação de fármacos contra a Doença de Chagas.....	41
1.1.5.3. Benznidazol ao longo dos anos.....	47
2. OBJETIVO.....	50
2.1. Objetivos específicos.....	51
3. JUSTIFICATIVA.....	53
4. PLANEJAMENTO MOLECULAR.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1. Síntese orgânica.....	56
5.1.1. Obtenção dos derivados propostos 1-27.....	59
5.1.2. Caracterização dos derivados finais 1-27.....	65
5.1.2.1. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray de alta resolução (EMAR-IES)	66

5.1.2.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)	70
5.1.2.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	72
5.1.2.3.1. RMN de ^1H	72
5.1.2.3.2. RMN de ^{13}C	88
5.1.2.3.3. RMN de ^{19}F	96
5.1.2.4. Determinação de pureza por CLAE-UV.....	98
5.2. Predição <i>in silico</i> de parâmetros de farmacocinética	99
5.2.1. Categoria de predição das Propriedades Físico-químicas.....	101
5.2.2. Categoria de predição da Lipofilicidade.....	103
5.2.3. Categoria de predição da Solubilidade Aquosa.....	105
5.2.4. Categoria de predição dos descritores de farmacocinética.....	109
5.2.5. Predição da categoria de descritores de <i>Drug-likeness</i>	111
5.2.6. Predição da categoria de descritores de Química medicinal.....	113
5.2.7. Predição da penetração na barreira hematoencefálica e da absorção gastrointestinal utilizando o gráfico BOILED-Egg.....	115
5.3. Avaliação biológica.....	116
5.3.1. Avaliação <i>in vitro</i> anti- <i>T. cruzi</i> em modelo intracelular contra a cepa Tulahuen.....	117
5.3.1.1. Avaliação preliminar da Relação estrutura-atividade.....	121
5.3.2. Avaliação contra tripomastigotas sanguíneos de <i>T. cruzi</i> cepa Y.....	135
5.3.3. Avaliação na enzima nitroredutase de <i>T. cruzi</i> (<i>TcNTR</i>).....	139
5.4. Seleção preliminar dos derivados mais promissores.....	142
5.5. Avaliação <i>in vivo</i> dos derivados 1, 4, 15, 20 e 24 contra <i>T. cruzi</i>	145
6. CONCLUSÃO.....	154
7. PERSPECTIVA.....	157

8. PARTE EXPERIMENTAL.....	158
8.1. Materiais e métodos.....	158
8.2. Síntese dos derivados finais 1-27.....	159
8.2.1. Procedimento Geral.....	159
8.3. Ensaios de atividade enzimática (<i>Tc</i> NTR)	176
8.4. Avaliação anti- <i>T. cruzi in vitro</i> em modelo intracelular contra a cepa Tulahuen.....	177
8.5. Avaliação de citotoxicidade <i>in vitro</i> em células L929.....	177
8.6. Avaliação da atividade <i>in vitro</i> contra a forma tripóstigota sanguínea da cepa Y.....	178
8.7. Ensaios <i>in vivo</i> em modelo de infecção aguda por <i>Tc</i> cepa Y.....	178
REFERÊNCIAS.....	180
CADERNO DE ESPECTROS.....	192

1. Introdução

1.1. A doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, é uma enfermidade considerada como uma doença tropical negligenciada, causada pelo parasito protozoário hemoflagelado, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esta enfermidade foi assim nomeada em homenagem ao médico pesquisador Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, responsável pela sua descoberta no ano de 1909 (CHAGAS, 1909). O trabalho desenvolvido por Carlos Chagas foi considerado um marco na área da medicina tropical como um dos maiores feitos da ciência nacional, devido ao fato de ser o único caso na medicina, no qual o mesmo pesquisador foi capaz de descrever o agente etiológico, os hospedeiros, vetor, manifestações clínicas e epidemiologia de uma mesma enfermidade (Kropf, 2009).

O processo de infecção clássico desta doença envolve a participação de vetores da subfamília de insetos *Triatominae*, na qual cerca de 140 espécies são capazes de transmitir o parasito causador da doença, como *Triatoma pseudomacula*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidata*, entre outros, sendo o *Triatoma infestans* o principal vetor. Estes insetos artrópodes são hematófagos, ou seja, se alimentam de sangue de aves e mamíferos, incluindo seres humanos. São conhecidos popularmente como “barbeiros”, devido ao fato destes picarem os seres humanos principalmente na região da face, já que esta é mais acessível por permanecer descoberta durante o sono (PAHO/WHO, 2018; URBINA; DOCAMPO, 2003). O *T. cruzi* pode ser transmitido também para mais de 150 espécies de mamíferos além do homem, sejam estes silvestres como roedores, marsupiais e primatas, ou domésticos como cães e gatos (DEANE, 1964).

A infecção pelo *T. cruzi* pode ser descrita através de duas vias: a vetorial e a não vetorial, sendo que a primeira pode ser ainda subdividida em direta e indireta (DNDI, 2020).

O processo de infecção pela via vetorial direta ocorre da forma clássica, através da picada do vetor no repasto sanguíneo (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021; DNDI, 2020). Esta via de infecção ocorre somente em regiões endêmicas (onde se encontra o vetor), e está diretamente ligada aos aspectos sociais e econômicos da população local, visto que estes insetos costumam se esconder em rachaduras e frestas presentes nas residências consideradas rústicas (BRICEÑO-LEÓN; GALVÁN, 2007; HOCHBERG;

MONTGOMERY, 2023). Devido a isso, um controle vetorial intenso tem sido aplicado nas últimas décadas com o objetivo de reduzir a expansão da doença nas regiões endêmicas da América Latina (BRUNETO *et al.*, 2021; COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014).

A via vetorial indireta pode ocorrer através de diferentes formas, entre elas destacam-se a transmissão oral e a vertical (da mãe para o filho através da placenta), além da transfusão de sangue ou transplantes de órgãos infectados pelo parasito e até mesmo de forma acidental, pelo contato de mucosas ou feridas na pele com material contaminado durante manipulação em laboratório (HOCHBERG; MONTGOMERY, 2023; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a; PAHO/WHO, 2018; WENDEL, 2010). Atualmente a via oral de infecção é uma das mais importantes, ocorrendo através da ingestão de alimentos contaminados com o parasito, como a cana de açúcar e principalmente o açaí, que podem ser contaminados com as fezes do vetor, ou até mesmo com o próprio inseto esmagado durante a preparação. Nestes alimentos, o *T. cruzi* é capaz de sobreviver por mais de 24 horas, uma janela de tempo que permite que o parasita seja facilmente ingerido e possa proceder a infecção (PAHO/WHO, 2018; WENDEL, 2010). Devido à alta carga parasitária adquirida através da infecção oral, esta é conhecida por ser responsável por uma forma grave de infecção aguda (PEREIRA *et al.*, 2009).

1.1.2. Formas evolutivas e ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

1.1.2.1. Formas evolutivas

O *T. cruzi* possui o ciclo biológico do tipo heteroxênico, no qual quatro formas evolutivas, que diferem na morfologia e funcionalidade, alternam entre o vetor e o hospedeiro (Figura 1) (FIOCRUZ, 2017; KESSLER *et al.*, 2017). No vetor estão presentes as formas epimastigota (b) e tripomastigota metacíclica (a). A primeira é definida como a forma de multiplicação do parasito no vetor e se encontra no intestino, já a segunda é a forma infectante, que é encontrada nas fezes e urina. Nos mamíferos a amastigota (c) é a forma replicativa, sendo observada no interior das células, enquanto a tripomastigota sanguínea (d) é a forma circulante do *T. cruzi*, também infectante (Figura 1). Por serem formas presentes no ser humano, as duas últimas são as de maior relevância clínica e terão especial interesse no presente trabalho (FIOCRUZ, 2017; GARCIA, 2009; RASSI & MARIN-NETO, 2010).

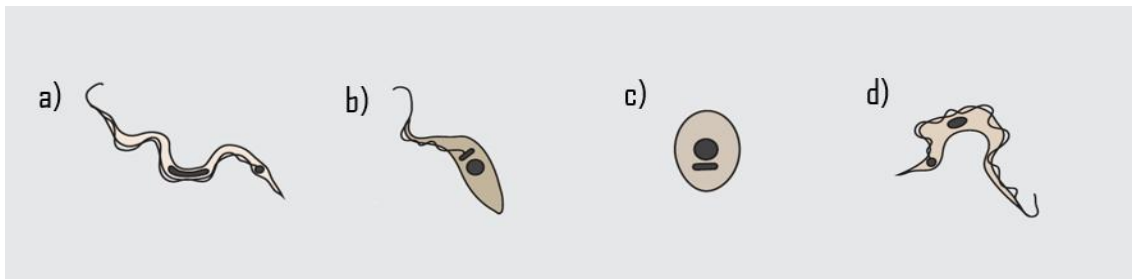


Figura 1. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*: tripomastigota metacíclico (A), epimastigota (B), amastigota (C) e tripomastigota sanguíneo (D). (Adaptado de Kessler *et al.*, 2017).

1.1.2.2. Ciclo biológico

A infecção pelo *T. cruzi* ocorre quando o vetor infectado, realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero, ou seja, ao picar o indivíduo para se alimentar, elimina em suas fezes as formas tripomastigotas metacíclicas **(1)** (Figura 2). Ao coçar o local, os dejetos contaminados do inseto podem ser levados até o orifício da picada ou entrar em contato com mucosas, chegando até a corrente sanguínea, na qual essa forma do parasito pode se dispersar e infectar diferentes tecidos **(2)**. No interior das células infectadas, ocorre a diferenciação para a forma amastigota do *T. cruzi*, que é uma forma de divisão celular, na qual as células do parasito se multiplicam através de fissões binárias **(3)**. Após esse processo de multiplicação, as formas amastigotas se transformam em tripomastigotas sanguíneas **(4)** lisando a célula e sendo liberadas na corrente sanguínea, podendo infectar outras células e tecidos **(5)** ou um inseto vetor enquanto esse realiza o repasto sanguíneo **(6)**. Quando um triatomíneo pica o indivíduo contaminado, este ingere as formas tripomastigotas sanguíneas que em seu intestino são diferenciadas em epimastigotas **(7)**, forma de divisão celular no vetor. Após a multiplicação por divisão binária **(8)**, esses migram para a porção final do intestino, onde se transformam em tripomastigotas metacíclicos **(9)**. O ciclo é concluído através da liberação dessas formas nas fezes do inseto após o repasto sanguíneo, infectando outro mamífero (FIOCRUZ, 2017; KESSLER *et al.*, 2017; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

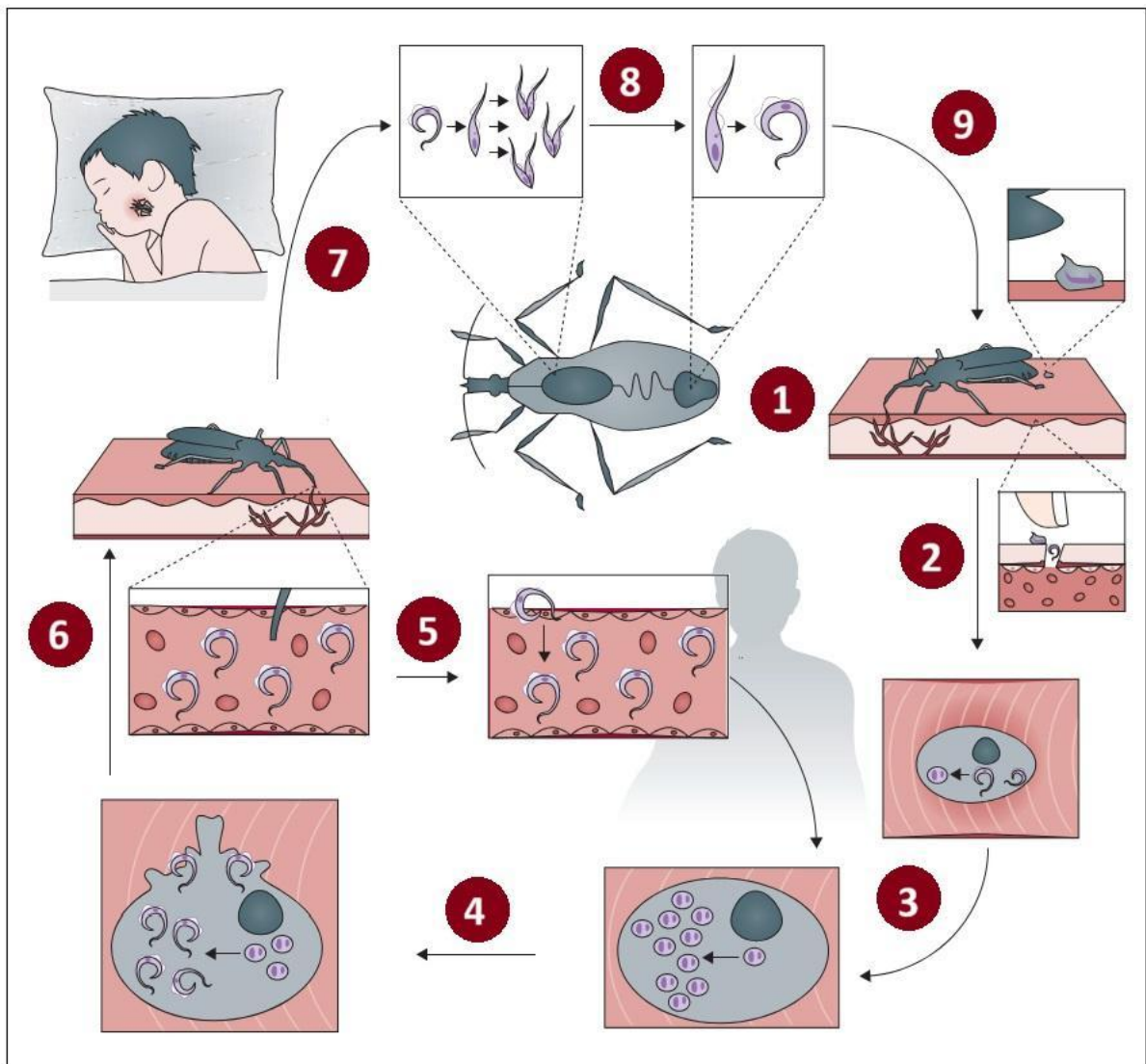


Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (adaptado de PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

1.1.3. Aspectos clínicos

A DC é dividida principalmente em duas fases clínicas que são caracterizadas em: aguda e crônica. A fase aguda ocorre no início da infecção, podendo durar, geralmente, até dois meses. Normalmente esta é assintomática ou pode se apresentar como uma doença febril de origem indeterminada, podendo também causar cefaleia, mal-estar, náuseas, astenia, diarreia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia entre outros. Estes sintomas podem ser confundidos facilmente com inúmeras enfermidades, dificultando o diagnóstico correto da DC (COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014; FIOCRUZ, 2017; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Quando a infecção é ocasionada por via vetorial pode ser

observado uma inflamação no local do inóculo, essas lesões cutâneas são chamadas de chagomas e quando ocorrem na região da face são conhecidas como *senal de Romana*, sendo este um sinal bastante característico da DC (DNDI, 2020; PRATA, 2001).

Os sintomas da fase aguda costumam demorar aproximadamente de 1 a 2 semanas para surgirem e as formas graves são raras, correspondendo a 1-5% dos casos. Suas manifestações costumam desaparecer espontaneamente em cerca de 90% dos indivíduos infectados, mesmo que a DC não seja tratada com medicamentos tripanocidas (COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Isto ocorre devido a ativação do sistema imune do hospedeiro, reduzindo a carga parasitária e controlando a infecção, de modo que esta possa atingir níveis indetectáveis (CHATELAIN, 2017).

Nesta fase o diagnóstico etiológico é realizado através de testes parasitológicos diretos como exame de sangue, esfregaço e gota espessa, onde a suspeita de casos são confirmadas através da detecção do parasito presente no sangue do indivíduo infectado (DNDI, 2020).

Pacientes não tratados na fase aguda irão desenvolver a fase crônica da DC. Esta fase é dividida em dois estágios: a fase crônica indeterminada e a fase crônica sintomática. Cerca de 60 a 70% dos indivíduos infectados na fase crônica não chegam a desenvolver sintomas clínicos, permanecendo na fase indeterminada que é caracterizada pela ausência total de sintomas. Nessa fase é possível encontrar anticorpos contra o *T. cruzi* no soro, porém exames radiológicos e eletrocardiograma apresentam resultados dentro da normalidade. Cerca de 30 a 40% dos indivíduos cronicamente infectados podem desenvolver sintomas em um período de 10 a 30 anos após a infecção (CHATELAIN, 2017; COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014; DNDI, 2020; FIOCRUZ, 2017; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Quando comparados com a fase aguda, os sintomas da fase crônica sintomática costumam ser mais graves. Estima-se que nessa fase 30-50% dos indivíduos infectados desenvolverão complicações cardíacas, que possui três formas de apresentação clínica: insuficiência cardíaca, síndrome arritmica, e complicações tromboembólicas sistêmicas e pulmonares. Através de diferentes mecanismos, as três reduzem a sobrevida dos pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024). Outras manifestações clínicas incluem patologias digestivas que acarretam o megacólon e megaesôfago (CHATELAIN, 2017; COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014; DNDI, 2020; FIOCRUZ, 2017; RASSI; MARIN-NETO,

2010). A reativação da doença de Chagas quando na fase indeterminada também pode ocorrer em pacientes cronicamente infectados imunologicamente comprometidos, como os que estão co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou aqueles que realizam tratamento com medicamentos imunossupressores (COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

O diagnóstico na fase aguda pode ser realizado através da presença de anticorpos no soro por meio de testes sorológicos como hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e através da detecção do parasito por métodos parasitológicos diretos ou indiretos. Na fase crônica, o parasito se encontra difundido nos tecidos e células, logo o diagnóstico parasitológico se torna comprometido pela baixa parasitemia. Dessa forma, para a definição da infecção pelo *T. cruzi* nessa fase, é necessária a realização de dois testes sorológicos para a detecção de anticorpo IgG. Os testes devem ser com princípios metodológicos diferentes, visto que estes não possuem acurácia suficiente para o diagnóstico correto de maneira isolada. Os principais utilizados são o ELISA (utilizando frações do parasito ou antígeno total), ou IFI como teste de elevada sensibilidade e ELISA (utilizando antígenos recombinantes do parasito) como teste de alta especificidade. O diagnóstico é confirmado através do resultado positivo em dois diferentes métodos (CARLOS PINTO DIAS *et al.*, 2016; FIOCRUZ, 2017). Testes moleculares utilizando *polymerase chain reaction* (PCR), também são indicados quando os exames sorológicos evidenciam resultados indeterminados ou para realizar um controle de cura após a conclusão do tratamento, mesmo apresentando limitações como a falta de padronização de protocolos. É importante ressaltar que nesse caso o teste de PCR deve ser realizado por laboratórios creditados com especialistas com experiência na área (FIOCRUZ, 2017).

Uma nova alternativa de diagnóstico molecular para DC foi recentemente aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA), o kit NAT CHAGAS. Através deste teste é possível detectar o material genético do parasito com alta sensibilidade, equivalente a um décimo do DNA presente na amostra. Além da alta sensibilidade, possui alta especificidade, sendo capaz de diagnosticar a doença tanto na fase aguda como na fase crônica dentro de algumas horas. Dessa forma, essa tem se mostrado uma alternativa promissora de diagnóstico molecular, tanto para rede pública como para a particular, uma conquista que pode aumentar o acesso ao diagnóstico precoce

da doença e consequentemente ao rápido início do tratamento dos portadores da doença (FIOCRUZ, 2022; MOREIRA *et al.*, 2023; RAMOS *et al.*, 2024)

1.1.4. Epidemiologia

A DC já foi uma enfermidade presente exclusivamente em áreas rurais do continente americano (WHO, 2024). Com o passar dos anos, fatores como a mobilidade populacional, migração e urbanização, contribuíram para a mudança desse panorama, de modo que a maioria dos infectados vivem hoje em ambientes urbanos (COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014; WHO, 2024).

Essa doença é endêmica em 21 países da América Latina, em regiões que compreendem o sul dos Estados Unidos ao sul do Chile e Argentina, onde a transmissão está profusamente relacionada com a presença do vetor (DNDI, 2020; PAHO, 2018; WHO, 2024). Atualmente, a DC já foi reportada em 44 países, distribuídos na América do Norte, continente europeu, africano e no Pacífico Ocidental, tornando essa doença um problema global de saúde pública (DNDI, 2020; WHO, 2024).

Estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas com o parasito causador da doença ao redor do mundo. No entanto, menos de 10% dos indivíduos infectados foram diagnosticados, o que, aliado ao número de pessoas não tratadas e à presença de áreas com transmissão ativa, contribui para que outros 75 milhões de indivíduos estejam em risco de contrair a enfermidade (DNDI, 2020; WHO, 2024). A DC causa aproximadamente 12 mil mortes por ano, matando mais pessoas na região endêmica do que outras doenças parasitárias, incluindo a malária. Cerca de 30 mil novos casos são reportados a cada ano no continente americano, sendo destes, aproximadamente 9.000 recém-nascidos infectados durante a gestação (DNDI, 2020; PAHO, 2024; WHO, 2024).

Devido aos sintomas e comorbidades ocasionadas devido a complicação da DC, é estimada ainda uma perda de cerca de 1,2 bilhões de dólares anualmente na América Latina. Isso ocorre devido a mais de 750.000 dias de trabalho perdidos devido a aposentadorias e óbitos precoces (CONTEH; ENGELS; MOLYNEUX, 2010). A carga financeira da DC nos serviços de saúde a nível global é calculada em mais de 600 milhões de dólares por ano, nos quais 10% acometem diretamente regiões não endêmicas (LEE *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2024).

1.1.4.1. Epidemiologia da DC no Brasil

No início dos anos 1950 a DC no Brasil era considerada uma endemia rural, na qual era predominante a transmissão direta por via vetorial, quadro que foi sendo modificado de acordo com o processo de industrialização do país (CARLOS PINTO DIAS *et al.*, 2016). Em 1975 o Ministério da Saúde do Brasil (MS) iniciou um protocolo de controle da transmissão da doença no país, com ações para o combate vetorial através de meios químicos e sistematizados, juntamente com a triagem de sangue e tecidos de doadores. Essas ações diminuíram significativamente o número de novos casos da DC, que entre os anos de 1975 e 1980 estavam contabilizados em 6,5 milhões de pessoas na área rural do Brasil (CARLOS PINTO DIAS *et al.*, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

No ano de 2022, O Brasil assinou um pacto visando exterminar a transmissão de doenças como HIV, Hepatite B, Sífilis, e a DC pela via vertical (LUQUETTI, *et al* 2015). Esse Pacto estabelece metas, condutas e os deveres acordados para que seja possível eliminar ou diminuir drasticamente a infecção através dessa via. Por meio do diagnóstico eficaz, tratamento e acompanhamento, pretende-se que os recém-nascidos de mães pacientes chagásicas nasçam saudáveis, livres da doença (LUQUETTI, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024a).

Estima-se que, atualmente, haja ao menos um milhão de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* no Brasil. Em relação ao número de doentes na fase crônica, estudos recentes demonstram uma prevalência de 1,0 a 2,4% da população, ou seja, cerca de 1,9 a 4,6 milhões de indivíduos infectados. Esses números acabam acarretando uma alta carga de mortalidade por DC no país. Entre os anos de 2010 e 2019 foram registradas 45.409 mortes relacionadas a essa doença, uma média de mais de 4.500 óbitos por ano, sendo o estado de Minas Gerais o que mais registrou número de mortes dentro desse período, com o estado de São Paulo logo em seguida, reforçando a questão da urbanização e migração de indivíduos contaminados para os grandes centros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022, 2024b).

Com relação aos casos de Doença de Chagas aguda (DCA) reportados no Brasil, entre os anos de 2010 e 2020, somam-se cerca de 2.777. Desses, a grande maioria são provenientes da região Norte do país, com o estado do Pará, seguido pelo Amazonas liderando nos números de novos casos (Tabela 1). A transmissão pela via oral, através de

alimentos contaminados, tem papel fundamental nesse índice, visto que foi a principal forma de transmissão nos últimos anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b, 2024b). Apesar disso, o risco de transmissão vetorial da DC ainda persiste, podendo ocorrer por questões como animais reservatórios do parasito e a proximidade do ser humano a eles, a presença de focos residuais do *T. infestans* na Bahia e de outras espécies de triatomíneos com alta capacidade de invasão e colonização de residências (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024b).

Em 2020, o MS definiu a DCC como de notificação compulsória nacionalmente, visto que o indivíduo contaminado nessa fase necessita de acompanhamento contínuo ao longo da vida. Dessa forma em janeiro de 2023, foi disponibilizado na plataforma e-SUS notifica um formulário para que os casos confirmados de DCC possam ser registrados e acompanhados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024a).

Uma análise foi realizada através dos cadastros realizados na plataforma entre janeiro de 2023 e janeiro de 2024. Nesse período mais de 5.460 notificações foram incluídas no sistema, distribuídos em 710 municípios, sendo 63% referentes a indivíduos que vivem em áreas urbanas, reforçando mais uma vez a questão da migração populacional para esses locais. A faixa etária majoritária nos cadastros foi entre 50 e 69 anos, mostrando que o controle da transmissão pela via vetorial fez com que diminuísse o número de jovens e crianças infectados. Dos indivíduos cadastrados, 42% eram do sexo feminino, sendo 1,5% gestantes. Além disso, foi identificada a condição clínica de todos os pacientes, entre estes, 42% apresentam alguma forma de cardiopatia, sendo 18% avançada e 24% de leve a moderada, confirmando a gravidade da doença na fase crônica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024a).

Tabela 1. Casos de doença de DCA nos anos de início de sintoma entre 2010 e 2020 segundo Unidade Federada de Infecção (UFI).

UF/Região de infecção	Ano de início dos sintomas											Total
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	
Norte	100	128	164	120	171	245	310	299	321	341	144	2343
Acre	5	0	0	1	2	6	22	2	8	20	1	67
Amapá	3	7	12	10	9	6	3	14	15	29	4	112
Amazonas	22	0	3	4	18	6	3	12	15	28	7	118
Pará	70	108	149	105	137	225	282	271	265	253	131	1996
Rondônia	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	4
Roraima	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	3
Tocantins	0	12	0	0	5	1	0	0	16	9	0	43
Nordeste	4	11	0	3	1	19	3	1	28	29	0	99
Alagoas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bahia	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2
Ceará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Maranhão	0	9	0	1	1	11	1	1	25	0	0	49
Paraíba	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
Pernambuco	4	1	0	0	0	0	0	0	0	29	0	34
Piauí	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Rio Grande do Norte	0	0	0	0	0	8	2	0	0	0	0	10
Sergipe	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Centro-Oeste	13	5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	19
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Goiás	12	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
Mato Grosso	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
Mato Grosso do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sudeste	0	0	2	0	1	0	0	2	0	0	4	9
Espírito Santo	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Minas Gerais	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	3
Rio de Janeiro	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	4
São Paulo	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Sul	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2
Paraná	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do Sul	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2
Santa Catarina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ignorado/exterior	19	26	33	28	35	24	46	36	35	14	9	305
Brasil	136	170	199	152	209	288	359	338	384	385	157	2777

Tabela retirada de Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas/situacao-epidemiologica>

1.1.5. Quimioterapia da Doença de Chagas

Mais de um século se passou desde a descoberta da DC, porém até os dias de hoje essa enfermidade carece de um tratamento ideal para ambas as fases clínicas. Apesar de haver tratamento que promova cura etiológica para a fase aguda, não existe no mercado um fármaco que seja capaz de eliminar, de forma substancial, o parasito na fase crônica da doença (COURA, 2002; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Entre os anos de 1912 e 1962 diversos compostos foram testados contra *T. cruzi*, entre eles mais de 30 antibióticos, porém, por mais que essas substâncias tivessem um efeito supressor sobre a parasitemia, elas não foram capazes de promover a cura, além de apresentarem alta toxicidade (BRENER, 1968; COURA, 2002).

Apenas dois fármacos, o benznidazol (BZN) e o nifurtimox (NFX) (Figura 3), são utilizados para o tratamento da DC. Ambos foram introduzidos no mercado no início da década de 1970 e têm sido a base do tratamento da doença até então, apesar de possuírem eficácia curativa limitada na fase crônica da doença e apresentarem uma série de efeitos adversos (COURA, 2002; OLIVERA, 2017; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

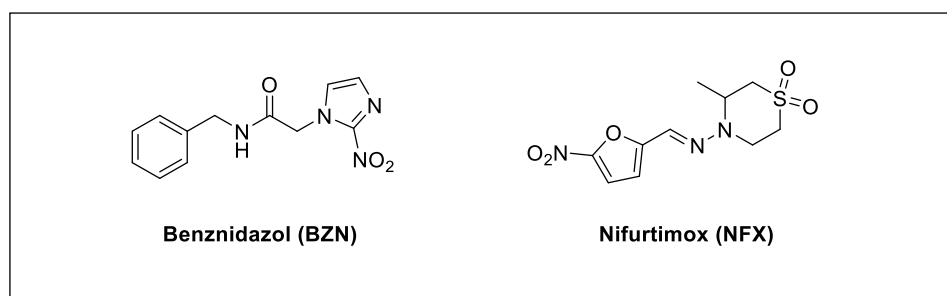


Figura 3. Estruturas químicas do BZN e NFX.

O NFX é um nitrofurano com o nome de mercado Lampit[®] que foi desenvolvido pela Bayer. Este fármaco apresenta eficácia na fase aguda, porém, enfrenta limitações de toxicidade e baixa eficácia na fase crônica. Devido a esses motivos, o NFX teve sua comercialização suspensa em alguns países da América do Sul na década de 1980, entre esses, o Brasil (COURA, 2002). Apesar disso, esse fármaco continua sendo empregado como alternativa quando o tratamento com BZN não traz os resultados esperados (DIAS, 2016). Entre os efeitos adversos mais comuns relatados com o uso do NFX estão os

distúrbios neuropsiquiátricos, além de náuseas e perda de apetite, o que dificulta sua aceitação por parte dos pacientes (VIOTTI *et al.*, 2020).

O BZN é um fármaco nitroimidazólico inicialmente desenvolvido pela Roche sobre os nomes comerciais de Rochagan® e Radanil® em 1974, sendo produzido atualmente pelos Laboratórios Elea Phoenix e Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe), na Argentina e Brasil, respectivamente. O desenvolvimento do BZN foi parte de esforços para encontrar novos agentes antiparasitários eficazes contra o *T. cruzi*, impulsionado pela necessidade de alternativas ao NFX. Sua descoberta ocorreu dentro do contexto de triagens de compostos nitroheterocíclicos, que já haviam demonstrado potencial atividade contra tripanossomatídeos (WINEHOLT, J. & LIEBMAN, K., 1972).

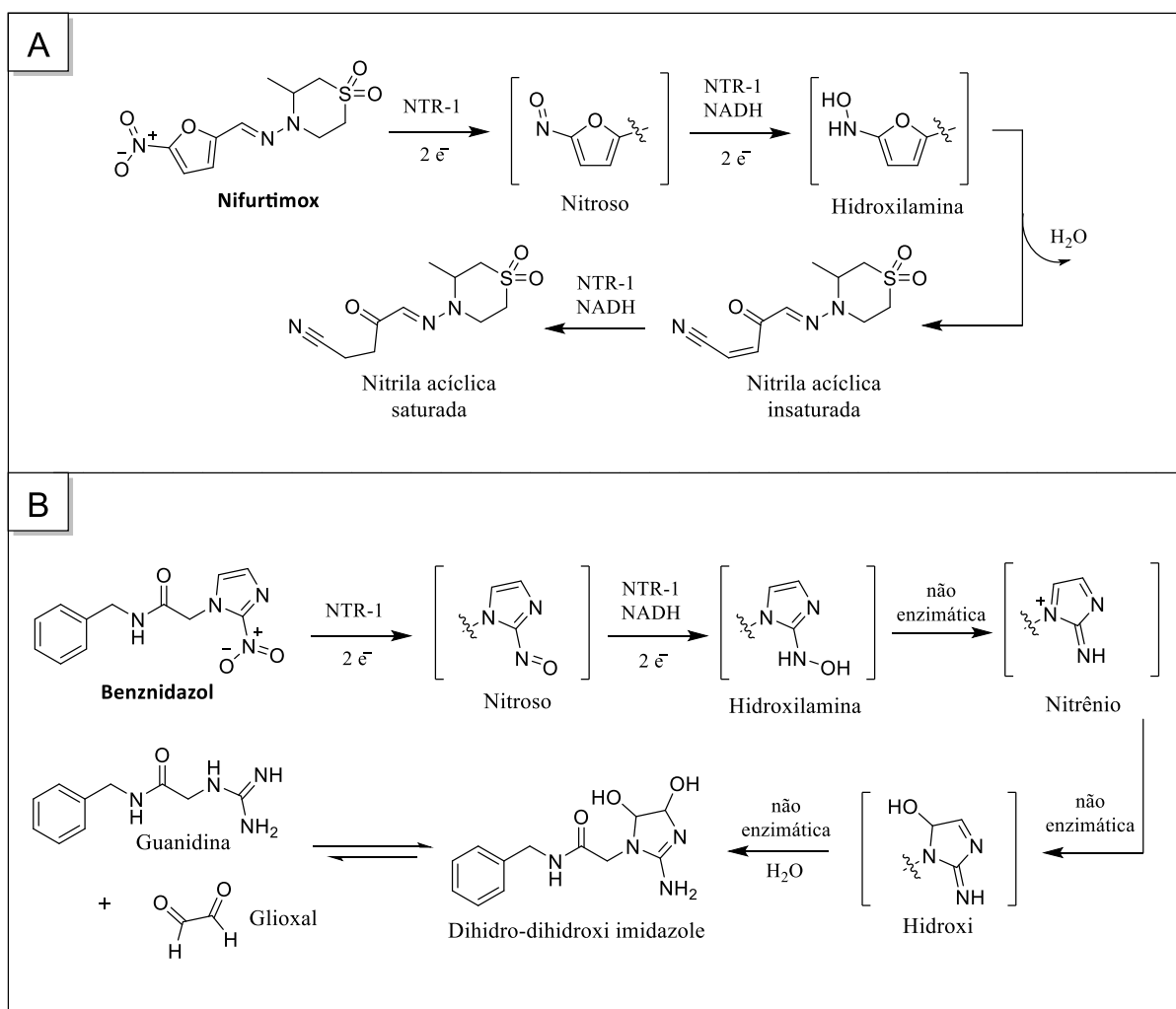
Atualmente é o tratamento de primeira linha para a fase aguda da doença de Chagas, sendo o único fármaco disponível em larga escala para o seu tratamento na maior parte dos países da América Latina. Estudos demonstram que, quando administrado precocemente, o BZN tem uma taxa de cura etiológica superior a 80% (PAHO/WHO, 2018). No entanto, sua eficácia na fase crônica da doença, especialmente em adultos, é consideravelmente reduzida, variando entre 10% e 30%, dependendo do estágio clínico e da idade do paciente. Embora eficaz na fase inicial da infecção, o tratamento com BZN está associado a reações adversas graves, como neuropatia periférica, dermatite, e distúrbios gastrointestinais, que frequentemente levam à interrupção do tratamento (MOLINA; SALVADOR; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, 2020; SALES JUNIOR, 2017).

O mecanismo de ação dos fármacos BZN e NFX, assim como a maioria dos compostos nitroheterocíclicos, está atrelado à sua ativação após serem biotransformados, atuando como pró-fármacos (Esquema 1). Eles agem através da enzima nitroredutase (NTR), comum em tripanossomatídeos, para qual não existe enzima homóloga em mamífero (BUSCHINI, 2009; PATTERSON; WYLLIE, 2014; SHANE *et al.*, 2010).

Estudos iniciais sugeriam que o NFX era bioativado por um mecanismo dependente de nitroredutase tipo II, promovendo estresse oxidativo. Atualmente, o mais aceito é que o NFX exerce sua atividade através de duas reduções sequenciais de dois elétrons do grupo nitro através de enzimas nitroredutases tipo I, resultando na fragmentação do anel heterocíclico e consequentemente na produção de nitrilas (Esquema 1-A). O mecanismo pelo qual a nitrila formada leva a morte do parasito não é totalmente

elucidado, porém, uma possibilidade é o fato dessa ser eletrofílica, podendo atuar como um aceptor de Michael. Esses são capazes de realizar ligações covalentes com resíduos de aminoácidos nucleofílicos, proteínas ou DNA, sendo altamente reativos e tóxicos (BARREIRO; FRAGA, 2015; PATTERSON; WYLLIE, 2014; URBINA; DOCAMPO, 2003).

Já o BZN é bioativado através de duas reduções pelas enzimas nitroredutases tipo I, mas, ao contrário do NFX, não ocorre a abertura do anel e sim uma série de reações não-enzimáticas, resultando na produção de metabólitos tóxicos e altamente reativos (Esquema 1-B). Entre essas espécies geradas, está o glioxal que é extremamente tóxico, possuindo potencial para modificar proteínas, lipídeos e o DNA do *T. cruzi* (COURA, 2002; PAPADOPOULOU *et al.*, 2011; PATTERSON; WYLLIE, 2014). Há também evidências de que o BZN pode ser capaz de induzir uma resposta imune no hospedeiro, estimulando a liberação de antígenos, potencializando a resposta imune contra o parasito (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012).



Esquema 1. Mecanismo de ação proposto para o NFX (A) e BZN (B) (Adaptado de PATTERSON & WYLLIE, 2014).

1.1.5.1. Estudos de comparação de eficácia e segurança entre o NFX e o BZN

Ao longo dos anos, diversos ensaios clínicos foram realizados para avaliar e comparar diretamente a eficácia e segurança do BZN e NFX. Esses estudos forneceram dados essenciais para a compreensão do impacto clínico de cada composto e de suas limitações no manejo da doença.

Um estudo de comparação de eficácia entre estes fármacos foi realizado logo no início dos anos 1960 no estado de Minas Gerais, no qual 100 pacientes na fase crônica indeterminada da DC, em sua maior parte crianças e adolescentes, foram avaliados. Neste estudo, os pacientes foram divididos em dois grupos: no primeiro foi administrado BZN (5-8 mg/kg/2x ao dia) durante 60 dias e no segundo, o NFX (15 mg/kg/3x ao dia para

crianças e 10 mg/kg/3x ao dia para adolescentes e adultos) por 60, 90 e 120 dias. Os resultados obtidos após 2 anos de acompanhamento, mostraram que dos pacientes testados com NFX, 50% negativaram no xenodiagnóstico, contra 70% do BZN, apontando os melhores resultados na utilização do último quando comparado ao NFX. Porém após 24 meses da obtenção dos dados, 92% dos pacientes participantes do estudo positivaram em ao menos um tipo de teste realizado, sendo 47% do grupo em que foi administrado o NFX contra 45% do grupo em que foi administrado o BZN (FERREIRA, 1990).

No ano de 1997 foi realizado um estudo no estado de Minas Gerais no Brasil, com 77 pacientes com a fase crônica da DC. Esses pacientes foram divididos em três grupos, sendo no primeiro administrado o BZN, no segundo o NFX, ambos na dosagem de 5mg/kg duas vezes ao dia por 30 dias, e o terceiro grupo recebeu o placebo. Os resultados mostraram que o primeiro grupo que recebeu o BZN, teve uma taxa de negatificação mais elevada (98,2%), quando comparada ao segundo grupo em que foi administrado o NFX (90,4%), e que o grupo placebo (65,6%). É importante ressaltar, no entanto, que as taxas dos pacientes que receberam BZN foram avaliadas após um ano de tratamento, contra apenas 3 meses dos pacientes que receberam NFX, o que pode indicar que a eficácia do primeiro fármaco aumentou com uma duração maior do tratamento. Apesar disso, um importante dado obtido, é que mesmo em dosagens inferiores às recomendadas, os pacientes em que foram administrados o NFX, apresentaram maiores taxas de efeitos colaterais do que os tratados com BZN, resultando em uma taxa de abandono de 29,6%, para 11,5% para os tratados com BZN (COURA *et al.*, 1997).

Em 2009, um ensaio realizado por Sosa-Estani e Segura, avaliou 300 pacientes com a forma crônica indeterminada, divididos em três grupos: um tratado com BZN (5 mg/kg/dia) e outro com NFX (8 mg/kg/dia), ambos por 60 dias, enquanto um terceiro grupo recebeu placebo. Este estudo mostrou que a negatificação de anticorpos foi significativamente maior com o BZN, alcançando 77% de eficácia, enquanto o NFX apresentou uma eficácia de 58%. Os pacientes tratados com placebo, como esperado, não mostraram negatificação parasitológica (SOSA-ESTANI; SEGURA, 2006a).

Já no ano de 2014, um ensaio realizado por Altcheh e colaboradores trouxe um foco específico na população pediátrica. Esse estudo incluiu 330 crianças e adolescentes, com idades variando de 0 a 18 anos, diagnosticados com Doença de Chagas na fase aguda ou crônica inicial. O objetivo foi comparar a eficácia e segurança do BZN e do NFX no

tratamento dessas faixas etárias. Os pacientes foram divididos em dois grupos: um tratado com BZN (5–7 mg/kg/dia por 60 dias) e o outro com NFX (10–15 mg/kg/dia por 60 dias). Os resultados revelaram que ambos os medicamentos foram eficazes na redução da parasitemia, com taxas de negatificação de 96% no grupo tratado com BZN e 98% no grupo tratado com NFX ao final do tratamento, conforme medido por métodos sorológicos e moleculares. No entanto, o perfil de segurança diferiu entre os dois medicamentos. Os efeitos adversos foram relatados em 35% dos pacientes tratados com BZN, sendo, em sua maioria, leves a moderados (como erupções cutâneas e desconforto gastrointestinal). No grupo NFX, 50% dos pacientes relataram eventos adversos, incluindo irritabilidade, insônia e perda de peso, o que resultou em maior taxa de interrupção do tratamento (ALTCHEH *et al.*, 2014).

Um dos estudos mais amplos e importantes realizado nessa área, foi o ensaio clínico randomizado administrado pela PAHO e apresentado em 2017, envolvendo um total de 1.240 pacientes com Doença de Chagas na fase crônica, distribuídos em vários centros na América Latina. Nesse estudo, os pacientes foram divididos em dois grupos: um grupo recebeu BZN (5–7,5 mg/kg/dia) por um período de 60 dias, enquanto o outro recebeu NFX (8–10 mg/kg/dia) pelo mesmo período. Ambos os grupos foram acompanhados de perto quanto à negatificação parasitológica e à tolerância ao tratamento. Os resultados mostraram que, no final do tratamento, a negatificação da parasitemia foi superior no grupo tratado com BZN (cerca de 80–90% dos pacientes apresentaram resultados negativos) em comparação ao NFX, que mostrou taxas de negatificação ligeiramente inferiores, em torno de 60–70%. Contudo, ambos os fármacos apresentaram taxas consideráveis de eventos adversos, com maior frequência de efeitos gastrointestinais e neurológicos no grupo tratado com NFX. O estudo também revelou que aproximadamente 30% dos pacientes em ambos os grupos tiveram que interromper o tratamento devido à intolerância (PAHO, 2017).

Esses ensaios reforçam a relevância do BZN como o tratamento de escolha para a Doença de Chagas, principalmente em crianças e na fase aguda, devido à sua eficácia superior e perfil de segurança relativamente melhor em relação ao NFX. Apesar disso, as altas taxas de efeitos adversos e as limitações na eficácia clínica, ressaltam a necessidade urgente de desenvolver novos fármacos ou estratégias terapêuticas para combater a doença.

1.1.5.2. Estratégias empregadas na busca de novos antichagásicos

1.1.5.2.1. Reposicionamento de fármacos contra a Doença de Chagas

O reposicionamento de fármacos tem se tornado uma importante estratégia na indústria farmacêutica, principalmente para doenças negligenciadas como a doença de Chagas, onde os recursos para pesquisa e desenvolvimento são frequentemente limitados (TALEVI; CARRILLO; COMINI, 2018). A reutilização de medicamentos já aprovados para novas indicações é extremamente vantajosa, visto que dados já estabelecidos sobre os perfis de segurança e farmacocinética são aproveitados. Esses reduzem significativamente o tempo e os custos necessários para o desenvolvimento de novas substâncias até estas chegarem ao mercado (ASHBURN; THOR, 2004; TORRELE *et al.*, 2019).

Através dessa abordagem, alguns medicamentos foram testados como possíveis alternativas para o tratamento da DC, dentre estes, o fexinidazol (Figura 4). Este fármaco registrado em 2018, é um derivado 5-nitroimidazólico que foi inicialmente desenvolvido para o tratamento da tripanossomíase africana, também conhecida como doença do sono causada pelo *Trypanosoma brucei*. Por apresentar eficácia previamente comprovada contra uma outra espécie de tripanosomatídeo, o fexinidazol se apresentou como uma alternativa promissora de reposicionamento contra a DC. Em testes preliminares em modelo murino utilizando cepas de *T. cruzi* suscetíveis, resistentes e parcialmente resistentes ao BZN, o fexinidazol apresentou um perfil farmacológico promissor, além de baixa citotoxicidade, tanto na fase aguda como na fase crônica e como consequência, seguiu para os testes em humanos (BAHIA *et al.*, 2012, 2014).

Os ensaios de Fase Clínica II, responsáveis por avaliar segurança e eficácia foram iniciados na Bolívia, onde os pacientes adultos receberam doses de fexinidazol de 1200 ou 1800 mg uma vez ao dia durante 2, 4 ou 8 semanas. Esse estudo foi descontinuado por acarretar neutropenia em 10% dos indivíduos participantes. Em 2017, um novo estudo de Fase Clínica II foi iniciado na Espanha, no qual doses mais baixas foram administradas em adultos (600-1200 mg/dia) durante um período mais curto de tempo (3, 7 ou 10 dias). Os resultados do estudo, no entanto, demonstraram que o fexinidazol não foi eficaz em um esquema terapêutico com doses mais baixas e por um curto período de contato, visto que não foi capaz de eliminar a parasitemia após 1 ano do tratamento. Dessa forma, a

abordagem deste como monoterapia para a DC foi cancelada pelo DNDi (PINAZO *et al.*, 2024).

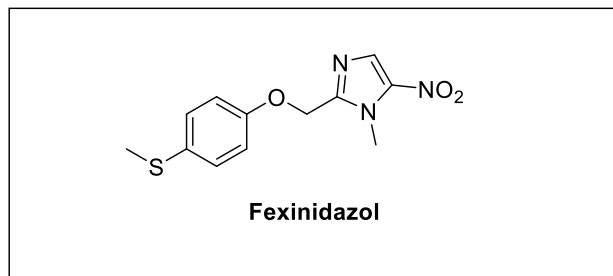


Figura 4. Estrutura química do fexinidazol.

1.1.5.2.2. Associação de fármacos contra a Doença de Chagas

A associação de fármacos é uma outra estratégia utilizada na química medicinal, que explora a combinação de duas ou mais substâncias distintas contra uma doença alvo. Essa abordagem é bastante promissora por apresentar diversos benefícios, como redução de custos, o potencial de aumentar a eficácia terapêutica, reduzir doses e diminuir efeitos adversos (MAZZETI *et al.*, 2021). Além disso, a associação de fármacos permite atingir múltiplos alvos moleculares ou vias metabólicas, podendo potenciar o efeito terapêutico e reduzir a chance de resistência, sendo uma excelente alternativa para a doença de Chagas (CHATELAIN; IOSET, 2011).

Nos últimos anos vários medicamentos foram testados em associação ao BZN em busca da cura da DC. Entre estes, podemos citar alguns antifúngicos azólicos (Figura 5) como cetoconazol, fluconazol, itraconazol, posaconazol, ravuconazol e seu pró-fármaco fosravuconazol e para além dessa classe, os fármacos amiodarona e alopurionol entre outros (Figura 4) (RAMOS *et al.*, 2024; SALES JUNIOR *et al.*, 2017).

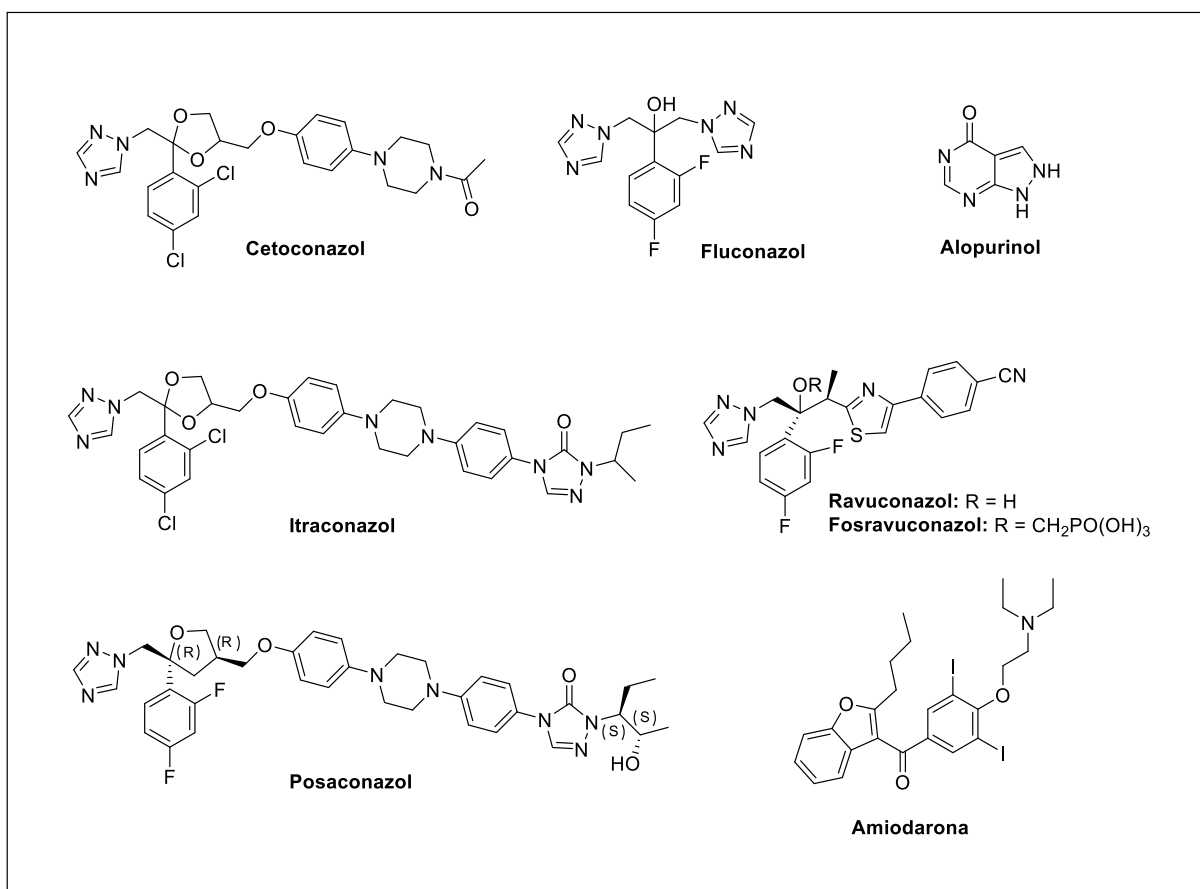


Figura 5. Estrutura química de alguns fármacos estudados contra a DC.

Os fármacos azólicos itraconazol, posaconazol, ravuconazol foram inicialmente desenvolvidos como inibidores da biossíntese de ergosterol em fungos, inibindo a enzima CYP 51 ou esterol 14- α -desmetilase. Como essa enzima também está presente no *T. cruzi*, essa série de medicamentos se mostrou promissora contra este parasito. O itraconazol, azol de segunda geração, foi primeiramente testado como monoterapia contra DC apresentando resultados positivos em ensaios *in vitro* e *in vivo* (URBINA, 2009). No entanto, estudos seguintes indicaram que apesar de esse ser altamente eficaz como antifúngico e possuir atividade supressora contra o *T. cruzi*, não foi capaz de alcançar a cura, tanto em modelos animais, quanto em humanos, sendo incapaz de interromper a progressão da doença na maior parte dos casos (URBINA, 2010). A associação itraconazol com o BZN foi avaliada até o momento apenas em modelos animais, roedores (MARTINS *et al.*, 2015) e cães (CUNHA *et al.*, 2022). No primeiro estudo, a utilização deste fármaco possibilitou a diminuição da dose de BZN em 25%, além de diminuir lesões no tecido cardíaco e o tempo para a redução da parasitemia, no entanto, mais estudos são

necessários para afirmar se existe potencial contra a DC em humanos (MARTINS *et al.*, 2015).

O posaconazol é um azol de terceira geração e foi um dos antifúngicos mais estudados contra DC (URBINA, 2010). Em estudos clínicos iniciais como monoterapia, apresentou resultados promissores, mas já nos estudos clínicos de fase II, especialmente em pacientes com infecção crônica, não conseguiu demonstrar uma cura parasitológica consistente. Pacientes que receberam posaconazol apresentaram redução temporária da carga parasitária, porém houve recorrência do parasita após o término do tratamento, o que indicou que a eficácia do fármaco era insuficiente para alcançar uma cura definitiva da infecção. Os resultados demonstraram que, apesar da capacidade do posaconazol de suprimir temporariamente o parasita, ele não era capaz de eliminar completamente a infecção, sendo ineficiente em 80 a 90% dos casos, contra apenas 6% do BZN. Esses resultados levaram a suspensão dos ensaios com o posaconazol para essa indicação (MOLINA *et al.*, 2014).

A associação do uso do posaconazol com o BZN foi estudada no ensaio clínico intitulado Stop Chagas. Este estudo conduzido pelo DNDi teve como objetivo avaliar a segurança e eficácia de novos esquemas terapêuticos baseados no BZN, incluindo regimes de curta duração e combinações com outros compostos promissores. O ensaio clínico envolveu 120 participantes e foi conduzido em 5 países. A duração do tratamento foi de 60 dias e a parasitemia foi medida por PCR qualitativa 120 dias após o fim do estudo (MOLINA *et al.*, 2014; MORILLO *et al.*, 2017).

Os resultados do estudo mostraram que 80% dos pacientes tratados com a associação posaconazol-BZN obtiveram resultado negativo no teste de PCR, contra aproximadamente 87% do grupo que utilizou apenas o BZN e 13% do que foi administrado o posaconazol como monoterapia. Dessa forma, a adição de posaconazol ao BZN não produziu melhorias na erradicação do parasita em comparação ao uso de BZN sozinho. Além disso, mesmo reduzindo temporariamente a parasitemia, o efeito tripanostático do posaconazol não foi capaz de impedir a recorrência do parasita após o término do tratamento, indicando que a combinação não foi suficiente para uma cura sustentada (MOLINA *et al.*, 2014; MORILLO *et al.*, 2017).

O fosravuconazol, pró-fármaco do ravuconazol, também foi avaliado como monoterapia contra a DC e como os demais, não se mostrou curativo após o período de

12 meses do fim do tratamento, diferentemente do BZN. Dessa forma, entre 2016 e 2018 foi realizado o ensaio clínico nomeado BENDITA (*Benznidazole New Doses Improved Treatment & Therapeutic Associations*) onde a combinação do fosravuconazol com BZN foi investigada em diferentes regimes terapêuticos (TORRICO *et al.*, 2021). Este estudo, conduzido de forma duplo-cega e randomizada em pacientes com doença de Chagas crônica, avaliou esquemas que variaram em duração e dosagem. Os resultados mostraram que todas as combinações testadas apresentaram altas taxas de resposta (acima de 80%), medidas pela ausência de DNA parasitário em testes de PCR até 12 meses após o tratamento. Porém, os pacientes testados apenas com o BZN, apresentaram taxas de resposta de até 89%, com resultados semelhantes (83-89%) para a terapia combinada. Dessa forma, a associação dos dois medicamentos não se mostrou justificável levando em consideração a eficácia e os custos (MOLINA *et al.*, 2014; TORRICO *et al.*, 2021).

A investigação de fármacos azólicos inicialmente apresentou resultados promissores, no entanto, esses compostos falharam em demonstrar eficácia curativa sustentada em ensaios clínicos, o que levou à sua exclusão como candidatos prioritários no desenvolvimento de novos tratamentos. Estudos indicaram que esses inibidores são predominantemente tripanostáticos, reduzindo a carga parasitária durante o tratamento, mas sem erradicar completamente o parasita. Além disso, altas taxas de recorrência de parasitemia após o término do tratamento foram observadas, comprometendo seu potencial como terapias curativas (MOLINA *et al.*, 2014; MORAES *et al.*, 2014). Além disso outras questões foram levantadas quanto ao fracasso dessas substâncias, como limitações farmacocinéticas, baixo perfil de segurança e toxicidade em regimes prolongados, especialmente em associação com o BZN (URBINA, 2010). Dessa forma, a relevância clínica de substâncias que atuam como inibidores de CYP51 tem sido questionada.

Tabela 2. Referências dos estudos realizados em associação dos inibidores de CYP51 e BZN.

Fármaco	Referência do estudo
Itraconazol	(Apt <i>et al.</i> , 1998, 2013)
Posaconazol	(Molina <i>et al.</i> , 2014)

	(Morilo <i>et al.</i> , 2017)
Fosravuconazol	(Torrico <i>et al.</i> , 2021)

A amiodarona, um antiarrítmico de classe III introduzido no mercado em 1967, é amplamente utilizada para o tratamento de arritmias ventriculares e supraventriculares (SINGH; VAUGHAN WILLIAMS, 1970). Esse fármaco despertou interesse para a DC devido à sua atividade observada em estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* em camundongos infectados com *T. cruzi* (BENAIM *et al.*, 2006; SERRANO-MARTÍN *et al.*, 2009). Nos testes em animais, a associação da amiodarona com o BZN na fase aguda da DC demonstrou redução significativa da parasitemia, sendo mais eficaz do que a administração de cada um dos fármacos separadamente (BARBOSA *et al.*, 2022).

Os ensaios clínicos para reposicionar a amiodarona no tratamento da doença de Chagas ainda são limitados, mas sua relevância no controle de arritmias chagásicas já está bem estabelecida. Nesse sentido, o estudo BENEFIT (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*), um ensaio multicêntrico de grande escala, avaliou o impacto do BZN na cardiomiopatia chagásica crônica. Esse estudo evidenciou que a amiodarona foi capaz de promover uma redução da incidência de hospitalização dos pacientes e diminuiu o risco de morte devido a problemas cardiovasculares (MORILLO *et al.*, 2015). Atualmente, a amiodarona permanece como uma das opções de tratamento para complicações arrítmicas na doença de Chagas, enquanto seu reposicionamento como agente antiparasitário segue em avaliação (RAMOS *et al.*, 2024). No entanto, é importante ressaltar que seu uso clínico a longo prazo é limitado devido ao seu perfil de toxicidade. Estudos indicam que a amiodarona pode induzir lesões hepáticas significativas, incluindo esteatose, inflamação e progressão para fibrose hepática, com manifestações histológicas semelhantes às da cirrose alcoólica, mesmo na ausência de consumo de álcool (BUGGEY *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2019). Essa toxicidade hepática representa um fator crítico a ser considerado na avaliação do potencial reposicionamento da amiodarona como agente antiparasitário. Dessa forma, a necessidade de estudos clínicos adicionais torna-se ainda mais evidente, especialmente no contexto de combinações terapêuticas, a fim de determinar não apenas sua eficácia na interrupção da progressão da doença de Chagas, mas também sua segurança a longo prazo (MAYA *et al.*, 2018).

O alopurinol, um inibidor da enzima xantina oxidase, foi introduzido no mercado em 1966, para o tratamento de hiperuricemia e gota, condições associadas ao acúmulo excessivo de ácido úrico no organismo (Day *et al.*, 2007). O interesse pelo alopurinol no contexto da doença de Chagas surgiu a partir de estudos *in vitro* e *in vivo*, os quais sugeriram que o fármaco interfere no metabolismo das purinas do parasita, um processo essencial para sua sobrevivência, dado que o *T. cruzi* é incapaz de sintetizar purinas e depende de sua captação do hospedeiro (Gutteridge, 1985). Essa peculiaridade tornou o alopurinol um candidato promissor para o reposicionamento terapêutico na doença de Chagas.

Ensaio clínico com alopurinol foram então realizados, principalmente em pacientes com a fase crônica da doença de Chagas. No entanto, os resultados desses estudos foram variados. Algumas pesquisas demonstraram redução da parasitemia, enquanto outras não evidenciaram impacto significativo na progressão clínica da doença, particularmente na cardiomiopatia chagásica crônica. Essa inconsistência, aliada à eficácia inferior em comparação ao BZN, limitou o avanço do alopurinol como uma opção terapêutica viável para a doença de Chagas (Apt *et al.*, 2005; Urbina, 2010).

Algumas outras associações de fármacos com o BZN, testadas para doença de Chagas podem ser encontradas na tabela 3 a seguir.

Tabela 3. Alguns outros fármacos associados ao BZN avaliados contra a doença de Chagas.

Fármaco	Referência do estudo
Clomipramina	(STRAUSS <i>et al.</i> , 2013, 2018)
Levamisol	(SIMÕES-SILVA <i>et al.</i> , 2019)
Fenofibrato	(CEVEY <i>et al.</i> , 2017)
Ácido ascórbico	(PROVIDELLO <i>et al.</i> , 2018)
Hidroximetilnitrofurazona	(SCARIM <i>et al.</i> , 2018)
Derivados imidazólicos	(DE ARAÚJO <i>et al.</i> , 2019)

1.1.5.3. Estudos clínicos do benznidazol

Diversos alvos moleculares têm sido estudados para a síntese de novos compostos ativos contra o *T. cruzi*, assim como diversas abordagens terapêuticas, porém, apesar de muitas substâncias promissoras terem sido desenvolvidas, até o momento, nenhuma foi capaz de promover a cura em ambas as fases da doença de Chagas, ou uma maior eficácia que o BZN na fase aguda (COURA, 2002; MOLINA *et al.*, 2014; SALES JUNIOR, 2017; URBINA, 2010)

O BZN, originalmente foi aprovado com base em estudos que mostraram sua capacidade de reduzir a parasitemia e a carga de *T. cruzi* em pacientes na fase aguda da doença, utilizando doses diárias de 5 a 7,5 mg/kg por um período de 60 dias. Esses estudos iniciais estabeleceram o fármaco como a principal terapia disponível (CASTRO; DE MECCA; BARTEL, 2006)

Apesar de todos os problemas relacionados ao uso do BZN, estudos clínicos têm mostrado evidências da eficácia no seu uso. Na infecção congênita, a eficácia com relação à negatificação sorológica (ELISA) varia entre 87-100%, em grupos de crianças até 2 anos de idade (CHIPPAUX *et al.*, 2013; RUSSOMANDO *et al.*, 1998; SCHIJMAN *et al.*, 2003). Na fase aguda, variam de 76-100% em menores de 18 anos (CANÇADO, 2002; FERREIRA, 1988). Na fase crônica inicial, variam de 60-89% em crianças entre 6-12 anos (ANDRADE *et al.*, 2004; DE ANDRADE *et al.*, 1996; SOSA-ESTANI; SEGURA, 2006b). Um estudo desenvolvido em 2009, mostrou a superioridade do BZN em relação ao placebo, aumentando 18 vezes a probabilidade de resposta terapêutica (PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2009). Pacientes adultos crônicos tratados com BZN e acompanhados por até 20 anos mostraram taxas de negatificação da sorologia entre 8-40% (FABBRO; MEIRELLES; RASSI, 2007; GALLERANO; SOSA, 2000)

Em 2006, um estudo conduzido por Viotti e colaboradores avaliou os efeitos do tratamento com BZN a longo prazo de pacientes entre 30 e 50 anos com cardiopatia chagásica crônica. Neste, 283 dos 566 participantes, foram tratados com BZN (5 mg/kg/dia por 30 a 60 dias). Os pesquisadores observaram que o BZN reduziu significativamente a progressão de anormalidades cardíacas, como insuficiência cardíaca e arritmias graves, ao longo de um seguimento de 10 anos (VIOTTI *et al.*, 2006)

O estudo demonstrou que pacientes tratados com BZN apresentaram menor taxa de progressão da doença cardíaca em comparação com aqueles que não receberam

tratamento, sugerindo um benefício em termos de controle parasitário e prevenção de complicações cardíacas. No entanto, também foi destacado que o tratamento com BZN não foi capaz de reverter completamente os danos estruturais já existentes no coração de pacientes com cardiopatia avançada. Os autores concluíram que o uso precoce do BZN pode proporcionar vantagens importantes em termos de desfechos cardíacos a longo prazo, reforçando a relevância de sua utilização na fase crônica inicial da doença (VIOTTI *et al.*, 2006).

O estudo BENEFIT já citado anteriormente, conduzido entre 2004 e 2011, avaliou 2.854 pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica provenientes de diversos países da América Latina. Os participantes foram tratados com BZN (5 mg/kg/dia por 40-80 dias) ou placebo e acompanhados por uma média de 5 anos. O estudo mostrou que o BZN reduziu significativamente a carga parasitária detectável por PCR, mas não houve diferença estatisticamente significativa na progressão clínica da cardiomiopatia chagásica, como insuficiência cardíaca ou morte. Isso indicou que, embora o BZN tenha efeito antiparasitário, sua capacidade de alterar desfechos clínicos em longo prazo na fase crônica é limitada (MORILLO *et al.*, 2015).

Outro estudo clínico realizado, intitulado como MULTIBENZ, teve como objetivo explorar novas estratégias de dose e duração do tratamento com BZN, incluindo regimes de menor duração ou doses ajustadas, visando melhorar a tolerabilidade e a adesão ao tratamento. O estudo randomizado e duplo-cego, incluiu 234 participantes que foram distribuídos em três grupos: controle, dose baixa e tratamento curto (BOSCH-NICOLAU *et al.*, 2024).

Os resultados mostraram negatificação sustentada em 54% dos pacientes no grupo controle (300 mg/dia por 60 dias), 61% no grupo de dose baixa (150 mg/dia por 60 dias) e 58% no grupo de tratamento curto (400 mg/dia por 15 dias). Em termos de segurança, a interrupção permanente do tratamento devido a eventos adversos ocorreu em 18% dos pacientes no grupo controle, 4% no grupo de dose baixa e 2% no grupo de tratamento curto (BOSCH-NICOLAU *et al.*, 2024).

Embora os regimes de dose reduzida e curta duração tenham demonstrado eficácia parasitológica comparável ao regime padrão, as taxas de negatificação ficaram abaixo do esperado em comparação com ensaios anteriores, como o BENDITA e STOP-CHAGAS, onde foram alcançadas taxas acima de 70% (BOSCH-NICOLAU *et al.*, 2024; MOLINA

et al., 2014; MORILLO *et al.*, 2015; TORRICO *et al.*, 2021). Um ponto de observação interessante é que os pacientes participantes do Brasil apresentaram taxa de negatificação entre 5% a 15% em todas as análises, índices menores do que os encontrados nos participantes de outros países do estudo. Essa diferença pode sugerir a possibilidade de variações intrínsecas entre as cepas do parasita encontradas em distintas regiões, sendo necessários mais estudos para confirmar essa hipótese (RAMOS *et al.*, 2024).

Em 2020, um estudo conduzido por Hasslocher-Moreno e colaboradores, avaliou os efeitos a longo prazo do BZN como tratamento na progressão da DC e na ocorrência de eventos cardiovasculares. A pesquisa foi direcionada a pacientes diagnosticados com a fase crônica indeterminada, que apresentavam função digestiva preservada, resultados normais no eletrocardiograma (ECG) e ausência de sinais de comprometimento cardíaco. O estudo incluiu 114 participantes nos quais foram administrados uma dose fixa de BZN (200 mg/dia ou 5 mg/kg/dia), por um período de 30 a 60 dias. Após o tratamento, os pacientes foram acompanhados por aproximadamente 15 anos (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2020).

Os resultados do estudo indicaram que houve uma associação à diminuição da progressão da doença de indeterminada para sintomática nos pacientes tratados com o BZN, além de uma redução no risco de eventos cardiovasculares (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2020). Um estudo anterior realizado em 2016 já havia chegado a uma conclusão parecida, aonde no grupo tratado, a incidência cumulativa de progressão foi de 7,9%, significativamente inferior aos 21,1% observados entre os pacientes que não receberam tratamento (FRAGATA-FILHO *et al.*, 2016).

Com base nos dados obtidos, os autores recomendam a adoção do BZN na prática clínica para pacientes com a forma indeterminada da DC, devido ao seu potencial de retardar a progressão da doença e mitigar o risco de complicações cardiovasculares (FRAGATA-FILHO *et al.*, 2016; HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, avanços importantes foram realizados para melhorar a formulação e a administração do BZN. Um marco importante na história deste fármaco ocorreu em 2018, onde foi introduzida uma formulação pediátrica do BZN, aprovada pela OMS e desenvolvida com apoio do DNDi. Registrada no Brasil em 2011, é resultado de uma colaboração entre a DNDi e o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco.

Em 2013, foi incluída na Lista de Medicamentos Essenciais para Crianças da OMS (DNDi, 2018).

Essa formulação foi adaptada para tratar crianças com doses mais precisas e menor risco de efeitos adversos, além de aumentar a adesão ao tratamento, uma mudança crítica para melhorar o manejo da doença de Chagas em populações vulneráveis (DNDI, 2018). Ao longo de diversos estudos clínicos realizados no decorrer dos anos, observou-se que a resposta biológica do tratamento com BZN é substancialmente influenciada pela idade dos pacientes (DE ANDRADE *et al.*, 1996; SOSA ESTANI *et al.*, 1998; STREIGER *et al.*, 2004), reforçando ainda mais a importância de uma formulação que atenda diretamente esse público.

Diante de todos os resultados, não restam dúvidas da relevância do BZN para o tratamento da DC, o que o torna um importante protótipo na química medicinal, na busca de novos análogos ou derivados.

Assim, embora existam alguns estudos na literatura nos quais foram desenvolvidas novas substâncias com base na estrutura do benznidazol (ANDRADE *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2023; PITOMBEIRA, M. C. S. R.; 2024; MELO *et al.*, 2025), ao melhor de nosso conhecimento, não há nenhum trabalho publicado que tenha investigado modificações estruturais com o foco em explorar, de forma detalhada, a relação entre estrutura e atividade (SAR) do esqueleto do benznidazol, inserindo substituintes no anel fenílico, além de modificações no espaçador metilênico e no grupo amida. Dessa forma, a análise dos padrões moleculares que influenciam a atividade biológica deste importante fármaco se torna essencial, possibilitando um entendimento mais detalhado de sua SAR e a eventual obtenção de novos análogos com melhores propriedades farmacológicas.

2. Objetivo

Este projeto teve como objetivo geral utilizar o BZN como protótipo para o planejamento racional, síntese e a avaliação biológica de 27 análogos **1-27** (Figura 6). Esses foram planejados como potenciais anti-*T. cruzi* e como possíveis substratos para a enzima nitroredutase, visando conduzir a um robusto estudo da relação estrutura-

atividade entre os análogos e o BZN. Também se objetivou o estudo *in vivo* dos produtos com melhores resultados nos testes propostos.

2.1. Objetivos específicos

- Síntese e caracterização dos 27 novos análogos do BZN (**1-27**).
- Avaliação *in vitro* da atividade anti-*T. cruzi* dos análogos **1-27** do BZN contra as formas amastigota e tripomastigota do parasito.
- Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos análogos **1-27** do BZN.
- Avaliação enzimática dos análogos **1-27** na nitroredutase de *T. cruzi* (TcNTR).
- Predição *in silico* das propriedades físico-químicas e parâmetros farmacocinéticos dos compostos **1-27**.
- Avaliação *in vivo* dos produtos que apresentarem melhores resultados nos testes propostos.

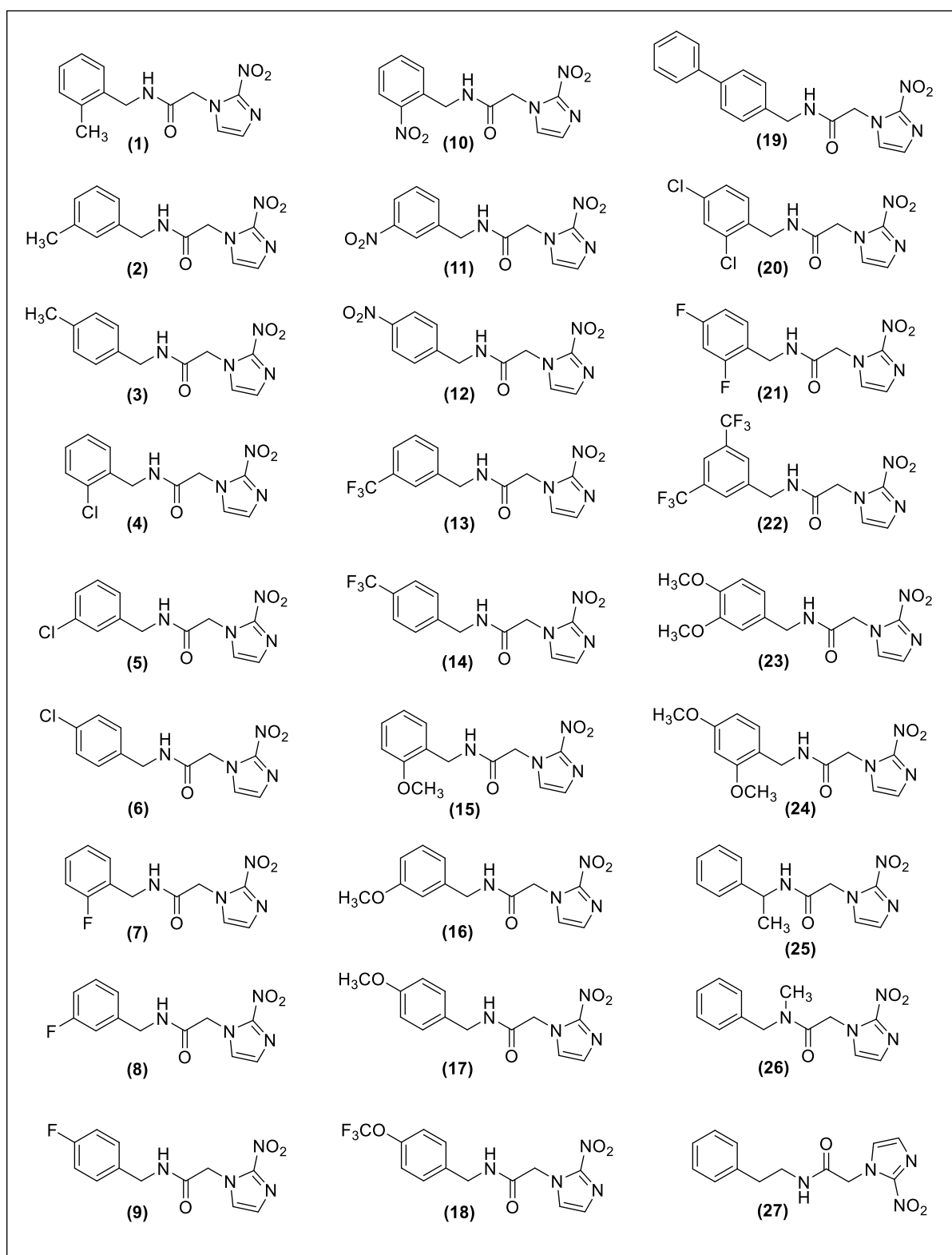


Figura 6. Estrutura química dos derivados planejados análogos do BZN 1-27.

3. Justificativa

O impacto social da DC é considerável, uma vez que desde a sua descoberta, em 1909, ainda é negligenciada pelas *big pharmas*, não tendo cura substancial na fase crônica e dependendo de um único fármaco na fase aguda. A DC é um problema global de saúde pública, ultrapassando fronteiras de países e acometendo pessoas de diferentes idades, sexos, etnias e condições socioeconômicas. Entretanto, a parcela mais pobre da população, principalmente nas regiões endêmicas, é a mais impactada pela doença, perpetuando ciclos de pobreza e exclusão social. Dados do DNDi mostram que menos que 10% dos pacientes são diagnosticados, ou seja, sabem que estão com a DC, e apenas 1% recebe tratamento (DNDI, 2020). Aspectos como a baixa taxa de cura na fase aguda e a ausência na fase crônica, reforçam a necessidade urgente de pesquisas que busquem alternativas terapêuticas eficazes e seguras para combater esta enfermidade.

Na 72ª Assembleia Mundial da Saúde em Genebra, Suíça, em 2019, oficializou o dia 14 de abril como o Dia Mundial do Combate à DC. A inclusão deste dia na agenda global de saúde visa contribuir para a visibilidade da doença, a mediação de políticas públicas e a potencialização de investimentos em pesquisa e desenvolvimento, a fim de impulsionar ações, no cenário nacional e internacional, para aumentar o acesso, o diagnóstico, o tratamento, e proporcionar melhor qualidade de vida às pessoas afetadas pela DC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020c). Tal fato corrobora com a importância do estudo nesta proposta.

Apesar de os esforços para o desenvolvimento de novos fármacos contra a DC terem se intensificado nos últimos anos, além de diversas outras estratégias como reposicionamento e até mesmo associação de fármacos, até o momento nenhuma abordagem apresentou resultados satisfatórios quando comparado ao BZN em monoterapia. Além disso, ensaios clínicos atuais demonstraram a importância desse fármaco para retardar a progressão da doença e diminuir o risco de complicações cardiovasculares, sem contar com o desenvolvimento da formulação pediátrica que melhorou a adesão e a precisão do tratamento em crianças (DNDI, 2018; FRAGATA-FILHO *et al.*, 2016; HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2020).

Diante destes resultados, apesar do BZN apresentar limitações, sem dúvida, ele se torna um importante protótipo na química medicinal, justificando o objetivo desta

proposta de buscar novos derivados e análogos do mesmo, que sejam seguros e eficazes em ambas as fases clínicas da doença.

Outro ponto importante que deve ser levado em consideração, é que mesmo após mais de 50 anos do seu desenvolvimento e uso, ao nosso conhecimento não foram realizados estudos de relação estrutura-atividade (SAR) com o BZN e seus análogos com essa proximidade estrutural, inserindo substituintes no anel aromático e modificações pontuais na cadeia, representando uma oportunidade de encontrar moléculas mais potentes e menos tóxicas.

Visando ainda uma análise SAR mais completa, foram adicionados ao grupo de moléculas planejadas quatro derivados já descritos na literatura, que são esses os compostos **4** (HOFFMANN-LA ROCHE, 1966), **9** (GARG *et al.*, 1992), **10** (BEAMAN; TAUTZ; DUSCHINSKY, 1962; HOFFMANN-LA ROCHE, 1966) e **17** (HOFFMANN-LA ROCHE, 1966) e que também foram sintetizados. Vale ressaltar que **4**, **9**, **10** e **17** foram desenvolvidos com outro foco, que não a atividade antichagásica, e sua ação contra *T. cruzi* não havia sido investigada. Nesse contexto, a síntese e avaliação desses foram fundamentais para aprofundar e enriquecer o estudo de SAR realizado neste trabalho.

As justificativas para a escolha dos derivados e análogos propostos está descrita detalhadamente no planejamento molecular a seguir.

4. Planejamento molecular

O BZN foi utilizado como protótipo para o planejamento racional dos derivados **1-27** propostos neste trabalho, pois até os dias atuais é o único fármaco disponível e amplamente utilizado no tratamento da DC no Brasil.

Para o desenvolvimento de todas as novas substâncias (**1-27**), foi mantido o núcleo 2-nitroimidazol (em lilás – Esquema 2), que é o grupamento farmacofórico presente no BZN. Como discutido anteriormente, este é responsável pela atividade do fármaco através da redução do grupo nitro presente em sua estrutura. Cabe ressaltar, que há relatos atribuindo ao grupamento nitroaromático a capacidade de introduzir propriedades tóxicas e mutagenicidade (BARREIRO; FRAGA, 2015), porém, em trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa, foi possível desmistificar que o grupo nitro é o único responsável pela mutagenicidade desta classe de substâncias, estabelecendo evidências de que a presença

de um núcleo nitroimidazólico pode levar ao desenvolvimento de fármacos eficazes e seguros (CARVALHO *et al.*, 2014, 2004).

As modificações estruturais propostas para os derivados podem ser divididas em dois grupos, o primeiro com a inclusão de diferentes substituintes (em verde) no anel aromático presente na estrutura original do BZN (em rosa); e o segundo com a modificação estrutural (em azul) com a inclusão de substituintes com características estéreo-eletrônicas diversas em diferentes posições na fenila (Esquema 2).

Os derivados **1-24** foram planejados através das modificações propostas para o primeiro grupo. Através desta, se pretende estabelecer uma relação entre o perfil de substituição no núcleo aromático e a atividade biológica. Através da inclusão desses substituintes, pretendeu-se avaliar a possível variação de fatores estéricos e eletrônicos que podem ser determinantes para a otimização da afinidade, eficácia terapêutica e seletividade, evitando interações indesejadas com alvos secundários, podendo também colaborar para uma possível redução na toxicidade.

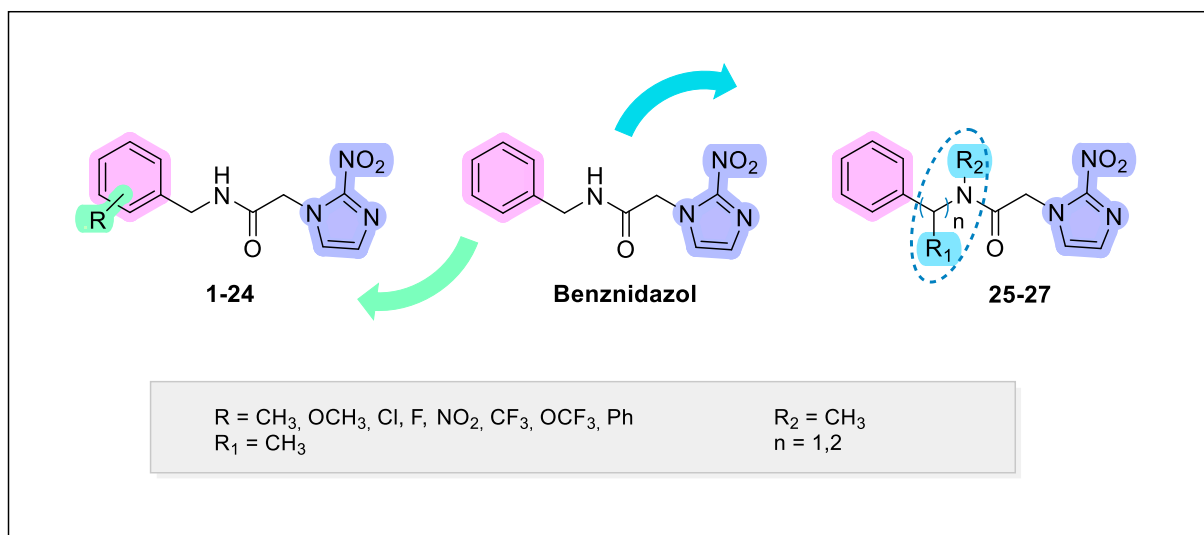
Além disso, a inclusão destes substituintes pode proporcionar mudanças no perfil farmacocinético das substâncias, através da variação das propriedades eletrônicas, que pode alterar o perfil de ionização da molécula, influenciando o pKa e assim podendo otimizar a solubilidade em diferentes ambientes fisiológicos. Além de parâmetros como a lipofilicidade, que é frequentemente expressa pelo coeficiente de partição octanol/água (logP), que indica a capacidade da molécula de se distribuir entre um solvente orgânico e a água, que é crucial para que as substâncias sejam absorvidas, principalmente na fase crônica da DC, onde o parasito se encontra difundido nas células e tecidos. Esses substituintes podem também impedir que os compostos sejam oxidados metabolicamente na posição em que estiverem presentes na fenila, bloqueando regiões suscetíveis a ataques enzimáticos, como oxidações ou hidrólises, podendo aumentar a meia-vida da substância no organismo, além da capacidade de evitar a formação de metabólitos potencialmente tóxicos.

Já para os derivados **25-27** o planejamento foi realizado através das modificações propostas no segundo grupo, onde, para o derivado **25** foi proposto o aumento da cadeia metilênica, com mais um carbono (n=2) (Esquema 2, em azul). Para os derivados **26** e **27** foi proposto a inclusão de uma metila em posições estratégicas, no nitrogênio amídico e no carbono metilênico, respectivamente (Esquema 2, em azul). Essas modificações visaram observar para além dos fatores descritos acima, a importância do maior grau de

liberdade conformacional dessas moléculas, quando comparadas ao BZN. Se a maior flexibilidade pode influenciar positivamente ou negativamente nas propriedades farmacocinéticas e a na interação das substâncias com o alvo terapêutico.

Como discutido anteriormente, é importante ressaltar que, embora o BZN seja o único fármaco aprovado há décadas para o tratamento da DC, até então, ao nosso conhecimento não foi realizado e reportado um estudo de relação estrutura-atividade de seus derivados. Desta forma, este estudo foi proposto no presente trabalho, visando verificar como as modificações estruturais podem influenciar na atividade anti-*T. cruzi* e na citotoxicidade quando comparado ao BZN.

Além disso, propôs-se observar como essas modificações influenciariam na taxa de conversão dessas substâncias pela enzima *TcNTR-I*.



Esquema 2. Planejamento dos derivados 1-27.

5. Resultados e discussão

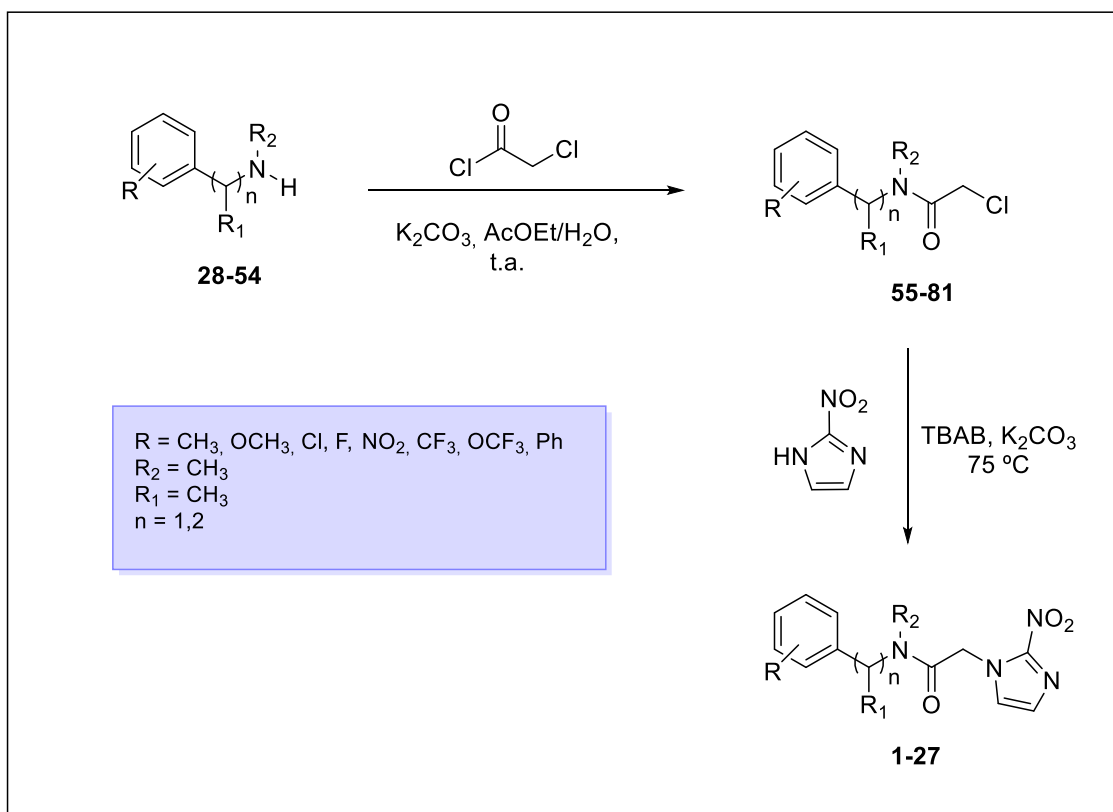
5.1. Síntese orgânica

Todos os derivados propostos neste projeto são obtidos através de uma rota sintética simples de apenas duas etapas que são realizadas *one-pot*. Essa estratégia na química orgânica sintética, compreende realizar duas ou mais etapas reacionais em um mesmo “pote”, ou seja, no mesmo meio de reação, sem a necessidade de isolar esses intermediários para que possam ser utilizados na próxima etapa (ISHIKAWA; SUZUKI; HAYASHI, 2009).

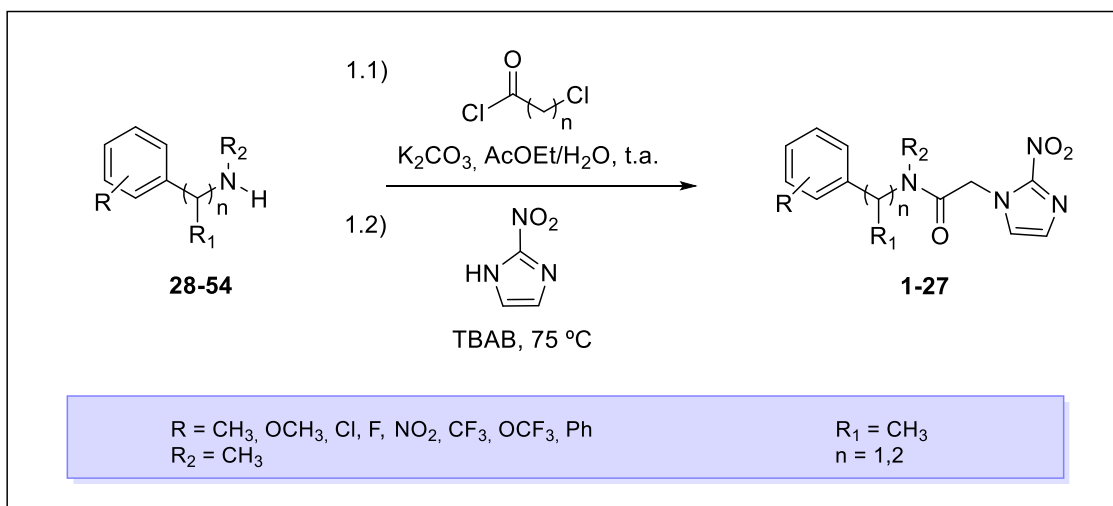
Essa técnica é bastante interessante, principalmente no caso de uma doença negligenciada como a DC, onde poucos recursos e investimentos são vertidos para a busca de novos compostos. Através do método *one-pot*, é possível economizar com solventes que seriam utilizados para extrair ou lavar esses intermediários após filtração e até mesmo com a purificação destes, etapa que encarece o processo. Além disso, tempo também é poupado, tornando o processo altamente escalonável, sendo sua produção futura em escala industrial mais economicamente e operacionalmente viável.

Enquanto a rota sintética do modo tradicional ocorreria em duas etapas, necessitando primeiramente da síntese, isolamento, purificação e caracterização de 27 intermediários clorados (Esquema 3), para depois seguir para uma segunda etapa de obtenção dos 27 derivados finais, através desse método proposto as duas etapas são realizadas de uma forma simplificada, como podemos observar no esquema 4.

Desta forma, a rota sintética proposta é iniciada através de uma reação de Schotten-Baumann onde ocorre a acilação das benzilaminas correspondentes (**28-54**), utilizando cloreto de cloroacetila. Na etapa seguinte realizada em mesmo pote, esses intermediários formados, sofrem, então, uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) utilizando o 2-nitroimidazol como nucleófilo, fornecendo então os derivados finais **1-27** (Esquema 4).



Esquema 3. Método de síntese tradicional para a obtenção dos derivados planejados, com o isolamento dos derivados clorados **55-81**.



Esquema 4. Método de síntese escolhido para a obtenção dos derivados planejados **1-27** utilizando a técnica *one-pot*.

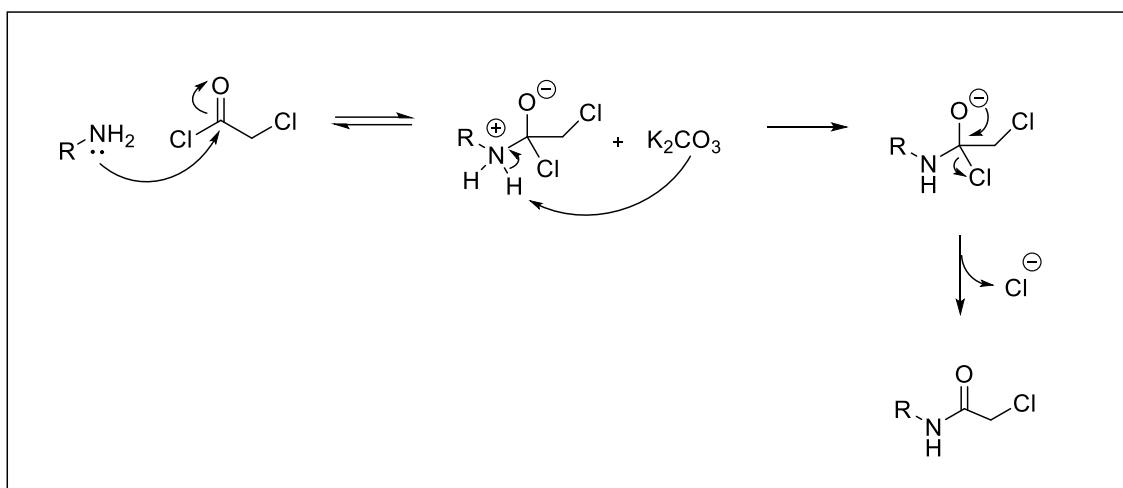
5.1.1. Obtenção dos derivados propostos 1-27

A obtenção destes derivados foi realizada através de duas etapas *one-pot* que serão descritas a seguir.

A primeira etapa consiste em uma acilação das benzilaminas correspondentes (28-54), através de uma reação que foi descrita pelos químicos alemães Carl Schotten e Eugen Baumann, por esse motivo ela recebe o nome de “Reação de Schotten-Baumann” (BAUMANN; SCHOTTEN, 1889). Essa reação é um método conhecido para a obtenção de amidas através de aminas e cloretos de acila, por vezes também é utilizada para a formação de ésteres através de cloreto de ácido e um álcool.

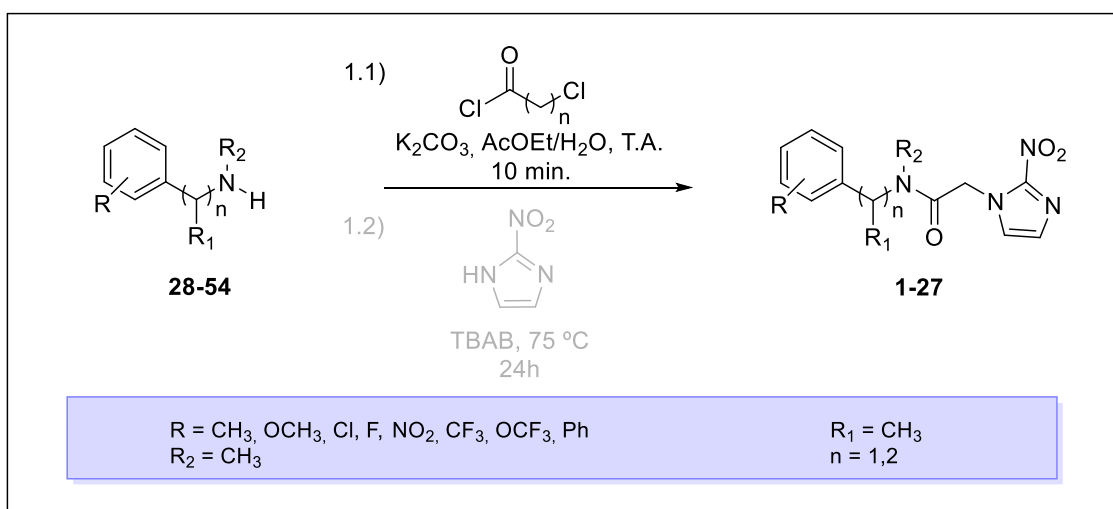
A acilação de aminas com cloretos de acila, leva à produção de uma amida correspondente e de ácido clorídrico. Dessa forma, visando deslocar o equilíbrio da reação no sentido dos produtos, uma base inorgânica é adicionada ao meio para neutralizar o ácido formado. A reação de Schotten-Baumann também possui como característica a utilização de um sistema de solvente bifásico, que consiste em água e em um solvente orgânico imiscível. Nesse sistema, a base inorgânica utilizada fica presente na fase aquosa neutralizando o ácido que é formado e impulsionando o equilíbrio para a formação da amida, enquanto o material de partida (amina) e o produto formado (amida) permanecem na fase orgânica.

Através dessa reação, o intermediário clorado é formado através do ataque da dupla de elétrons livres presentes na amina ao cloreto de ácido, formando o intermediário tetraédrico. Em seguida, a base utilizada no meio reacional, abstrai um dos hidrogênios deste intermediário, enquanto os pares de elétrons do ânion, se deslocalizam e eliminam o cloreto, dando origem ao intermediário desejado (cloroacetamida) para a próxima etapa (Esquema 5).



Esquema 5. Mecanismo da Reação de Schotten-Baumann.

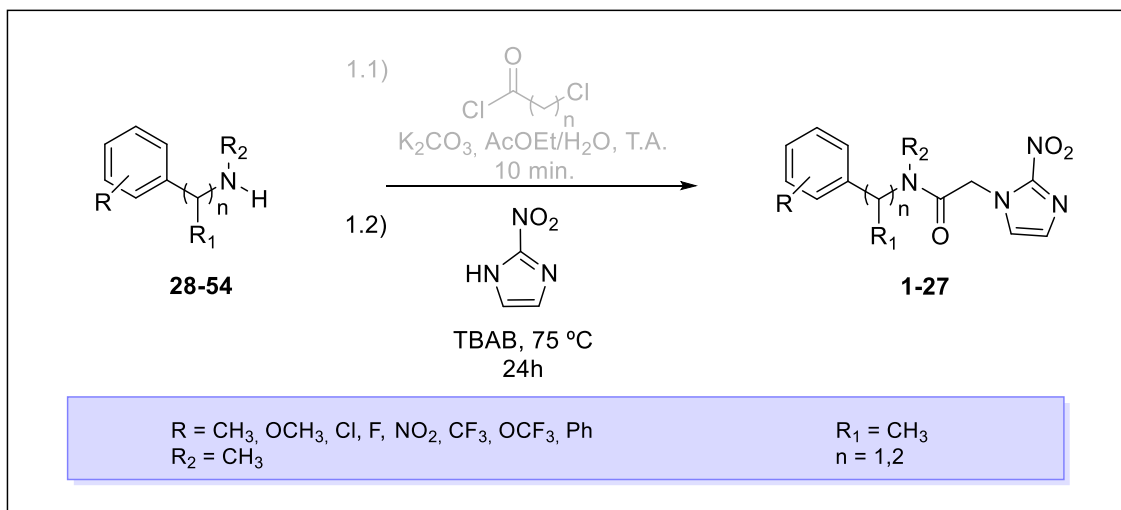
A reação foi realizada adicionando as benzilaminas correspondentes **28-54** em um sistema bifásico como solvente, contendo água e acetato de etila em uma proporção (1:1) e carbonato de potássio como base em excesso. O cloreto de cloroacetila foi adicionado lentamente em seguida para todos os derivados, com exceção do derivado **54**, onde o cloreto de acila utilizado foi o cloreto de 3-cloropropanoíla (Esquema 6). A reação foi mantida em temperatura ambiente por 10 minutos para todos os derivados. Através da cromatografia em camada fina (CCF) foi possível observar que todo o material de partida havia sido consumido após esse tempo.



Esquema 6. Método de síntese dos derivados planejados **1-27**, com ênfase na etapa 1.1.

A etapa seguinte consiste em uma substituição nucleofílica bimolecular do cloro presente no intermediário gerado *in situ*, utilizando o 2-nitroimidazol como nucleófilo (Esquema 7). Para esta etapa, além do 2-nitroimidazol, foi adicionado ao meio reacional o catalisador de transferência de fase brometo de tetrabutilamônio (TBAB). O carbonato de potássio, que foi a base adicionada na primeira etapa reacional em excesso, tem uma função essencial também nesta etapa, sendo o responsável pela desprotonação do 2-nitroimidazol aumentando sua nucleofilicidade.

Visto que, tanto o carbonato de potássio, quanto o ânion do 2-nitroimidazol, têm uma maior solubilidade na fase aquosa do que na fase orgânica do sistema bifásico de solventes, enquanto os intermediários formados (cloroacetamidas) têm uma maior solubilidade na fase orgânica, o uso do TBAB se mostrou essencial. Por contar com uma porção apolar e outra catiônica, os catalisadores de transferência de fases são capazes de formar um par iônico com a espécie aniônica presente na fase aquosa, a transferindo para a fase orgânica devido a sua capacidade de particionar em ambas as fases. Assim sendo, esta etapa foi realizada na temperatura de 75 °C por 24h para todos os derivados, os rendimentos de todos os compostos podem ser encontrados na Tabela 4 (Esquema 7).



Esquema 7. Método de síntese dos derivados planejados **1-27**, com ênfase na etapa 1.2.

Dos 27 derivados finais sintetizados, 17 já foram isolados do meio de reação com uma pureza cromatográfica maior que 95% no CLUE-DAD (**1-7**, **9-11**, **13**, **16-18**, **20-21**

e **24**), considerados aptos para os testes biológicos. Para os demais derivados, foi necessário que esses passassem por um processo de purificação.

Visando o menor gasto de solventes e uma melhor aplicabilidade para a síntese desses derivados em maior escala, foi decidido a recrystalização como primeira escolha para a purificação dos derivados **8, 12, 14, 15, 19, 22 e 23**, já que estes também foram obtidos como sólido, os tornando aptos para esse processo. Dessa forma, foram realizados testes com vários solventes e sistemas de solventes em cada composto para observar qual seria a melhor escolha para esse processo de purificação. Os solventes utilizados nos testes foram acetonitrila, acetato de etila, acetona, metanol, etanol, tetraidrofurano e como sistema de solvente, etanol 50% e 75%. Para a maioria desses derivados, o etanol se mostrou o melhor solvente para a recrystalização, de forma que 5 dos 7 produtos (**8, 12, 14, 15 e 22**) foram purificados através da utilização deste. Para o derivado final **19**, no entanto, o etanol não se mostrou eficiente, dessa forma, este foi recrystalizado utilizando tetraidrofurano.

Para o derivado **23**, foi encontrada uma grande dificuldade no seu processo de purificação, devido ao fato da baixa solubilidade do mesmo em todos os solventes e sistemas de solventes testados. Dessa forma, para a purificação deste composto foi realizada uma cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa, sendo o produto aplicado na placa quando utilizado etanol à quente com algumas gotas de dimetilsulfóxido. Provavelmente essa maior dificuldade na purificação influenciou o rendimento global deste derivado, que teve o rendimento mais baixo da série (Tabela 4). No entanto, através desse método foi possível purificá-lo, apresentando uma pureza cromatográfica acima de 95%.

Os derivados **24, 26 e 27** foram obtidos como um óleo, dessa forma estes foram também purificados através de uma CCD preparativa. Para todas as purificações por CCD, o sistema de eluente utilizado foi acetato de etila e hexano (4:6).

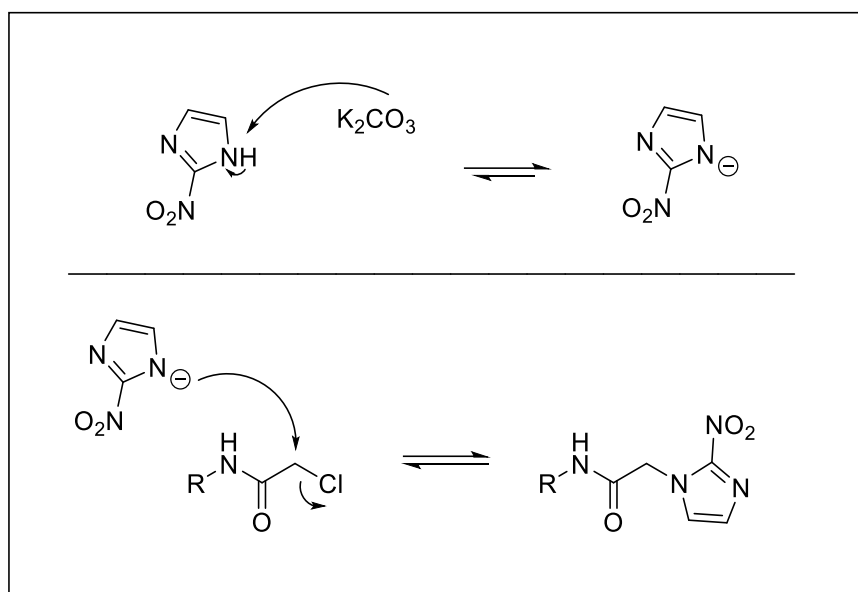
Todos os derivados **1-27** foram obtidos com rendimentos globais variando entre 27% e 84% após o processo de purificação (Tabela 4). É importante ressaltar também que o objetivo principal na química medicinal, é a obtenção dos compostos puros para serem testados. Dessa forma, aqueles que se mostrarem mais promissores terão sua síntese otimizada futuramente, visando aumentar o rendimento, melhorar as condições reacionais e de purificação.

Tabela 4. Obtenção dos derivados finais **1-27**.

Derivado	Estrutura	Método de purificação	Rendimento Global (%)
1		-	68
2		-	57
3		-	59
4		-	72
5		-	45
6		-	70
7		-	49
8		Recristalização	37
9		-	66
10		-	62
11		-	47
12		Recristalização	60
13		-	33
14		Recristalização	41

15		Recristalização	63
16		-	35
17		-	84
18		-	46
19		Recristalização	54
20		-	62
21		-	46
22		Recristalização	42
23		CCD	27
24		-	49
25		CCD	39
26		CCD	58
27		CCD	40

Como descrito, o mecanismo dessa segunda etapa é uma S_N2 , que ocorre através da desprotonação do 2-nitroimidazol com a base carbonato de potássio, o convertendo em seu ânion. Esse então, é responsável por atacar o carbono ligado ao cloro, eliminando, de forma concertada, o cloreto e formando os derivados finais planejados (Esquema 8).



Esquema 8. Mecanismo proposto para a reação de obtenção dos produtos finais **1-27**.

5.1.2. Caracterização dos derivados finais 1-27

A caracterização de todos os derivados foi feita por Espectrometria de massas com ionização por eletrospray de alta resolução (EMAR-IES), Espectroscopia na região de infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C (também de ^{19}F para as moléculas fluoradas), e suas técnicas bidimensionais homonuclear $^1\text{H}/^1\text{H}$ (COSY, do inglês *CORrelation SpectroscopY*) ou heteronuclear $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HSQC, do inglês *Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy*), para auxílio na atribuição dos sinais. Além disso, todas as substâncias tiveram sua pureza relativa cromatográfica determinadas por cromatografia à líquido de ultra eficiência (CLUE-DAD) para que fossem qualificados para os testes farmacológicos, sendo a pureza mínima aceitável de 95% no comprimento de onda analisado.

As estruturas dos derivados finais apresentados neste trabalho foram numeradas de forma diferente da numeração adotada pela IUPAC (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), a qual divide a molécula em diferentes unidades, diferenciadas por cores na Figura 6, e adota numerações independentes para cada unidade. Apresentamos aqui a numeração de forma contínua, cujo objetivo conforme apresentado na Figura 7 pelo exemplo do derivado **1**, é facilitar a compreensão e discussão das atribuições dos sinais nas análises de RMN.

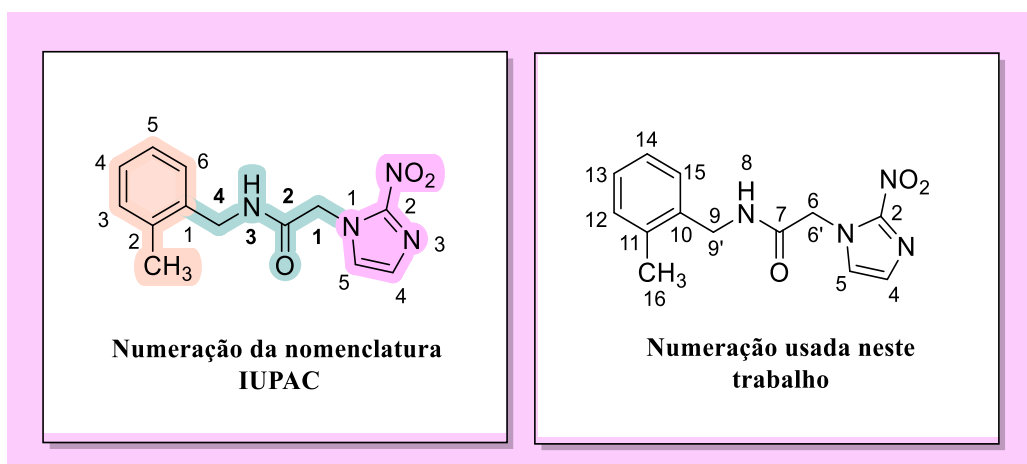


Figura 7. Numeração utilizada para os derivados 1-27.

5.1.2.1. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray de alta resolução (EMAR-IES)

O EMAR-IES dos derivados foram realizados em modo positivo. Nesta técnica é possível observar os íons *quasi*-moleculares ou adutos metálicos, que são provenientes da adição da massa de um próton ou de sódio/potássio à massa do composto. Nos espectros das substâncias **1-3** e **25-27** que possuem a mesma massa molecular de 274,1066 g/mol, foi possível observar os sinais de m/z 297,0957 para **A**, m/z 297,0943 para **B**, m/z 297,0961 para **C**, m/z 297,0973 para **D**, m/z 297,0957 para **E** e m/z 297,0957 para **F**, que são os valores referentes à massa do produto formando aduto com sódio (Figura 8). Com esse exemplo podemos observar também que através desse método não é possível diferenciar substâncias com a mesma massa molecular, por isso outras análises são realizadas em conjunto para juntas fornecerem os dados necessários para a elucidação de cada composto. Apesar disto, essa técnica é extremamente importante para identificar que de fato os derivados finais foram formados.

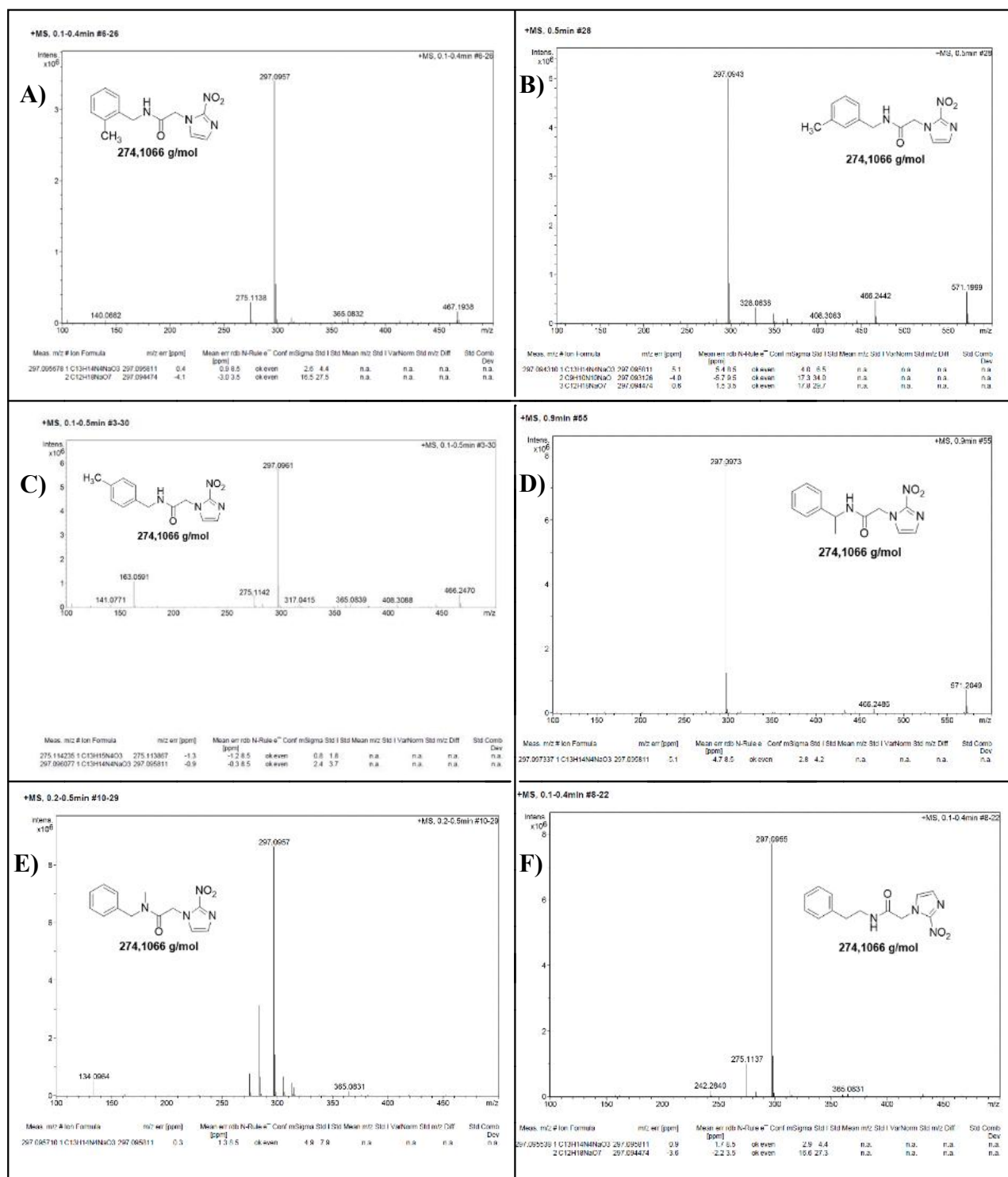


Figura 8. Espectro de massas EMAR-IES (+) dos derivados finais com a massa molecular de 274,1066 g/mol. **A)** composto 1; **B)** composto 2; **C)** composto 3; **D)** composto 25; **E)** composto 26; **F)** composto 27.

No EMAR-IES de algumas substâncias, foi possível observar além do sinal referente à massa do composto formando aduto com o sódio, também um sinal referente à massa mais um próton (íon *quasi*-molecular), como o caso do derivado 4. Neste derivado foi encontrado o sinal de m/z 317,0412 referente à massa do composto mais sódio, e o sinal com de m/z 295,0520, referente à massa do derivado 4 mais um próton (Figura 9).

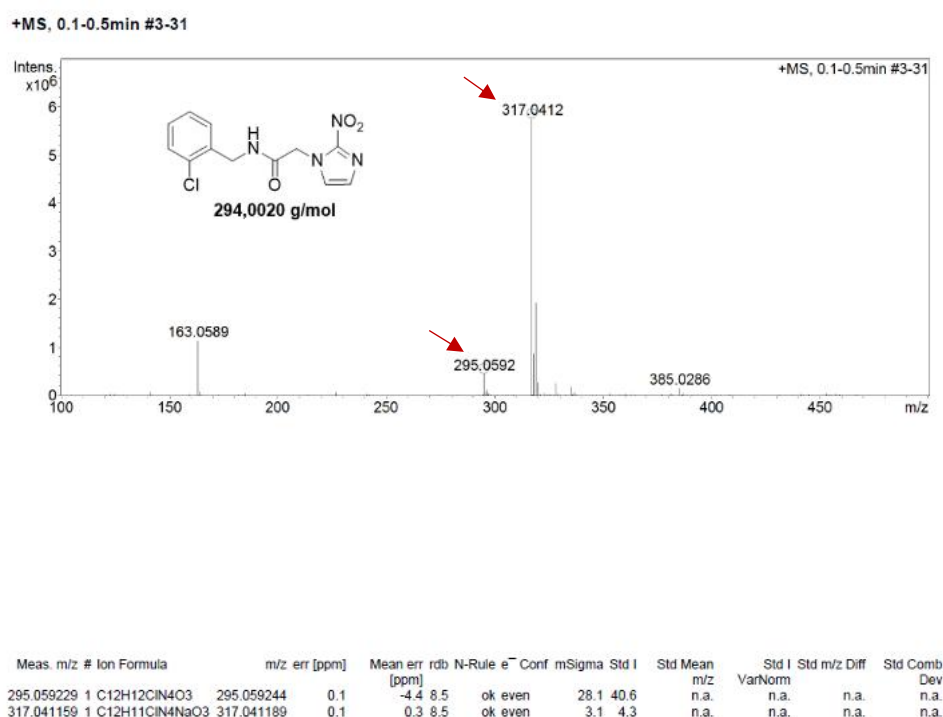


Figura 9. Espectro de massas EMAR-IES (+) do derivado 4.

Todos os derivados sintetizados tiveram os seus íons *quasi*-moleculares ou adutos metálicos identificados e as massas encontradas são próximas aos valores teóricos, respeitando o erro limite de variação de ± 5 ppm. Os dados referentes estão discriminados na Tabela 5.

Tabela 5. Espectrometria de massas de alta resolução – EMAR-IES(+) dos derivados 1-27.

Derivado	Teórico (M+23)	Experimental (M+23)	Erro (ppm)
1	297,1066	297,0957	-0,4
2	297,1066	297,0943	5,0
3	297,1066	297,0961	-0,9
4	317,0520	317,0412	0,1
5	317,0520	317,0418	-3,9
6	317,0520	317,0398	4,5
7	301,0815	301,0695	4,1
8	301,0815	301,0720	-4,2
9	301,0815	301,0706	0,6
10	328,0760	328,0665	-4,0
11	328,0760	328,0642	3,2
12	328,0760	328,0667	-4,4
13	351,0783	351,0668	2,2
14	351,0783	351,0690	-4,3
15	313,1015	313,0910	-0,9
16	313,1015	313,0904	1,1
17	313,1015	313,0902	1,7
18	367,0732	367,0637	2,2
19	359,1222	359,1104	3,0
20	351,0130	351,0016	1,8
21	319,0721	319,0601	3,8
22	419,0657	419,0542	1,8
23	343,1121	343,1016	-0,9
24	343,1121	343,1017	-1,1
25	297,1066	297,0973	-5,0
26	297,1066	297,0957	0,3
27	297,1066	297,0957	0,9

5.1.2.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)

Uma técnica muito utilizada para a elucidação de estruturas químicas é a espectroscopia na região do infravermelho (IV), principalmente em substâncias funcionalizadas. Grupos funcionais como amidas e o nitro são facilmente identificados através desta análise por gerarem bandas muito características, como por exemplo, na região de 3.200 cm^{-1} e 1.600 cm^{-1} , referentes a absorção da ligação N-H e da carbonila de amida secundária presente nos compostos. Ou também, como nas regiões de 1.500 cm^{-1} e 1.300 cm^{-1} referentes a absorção do grupamento nitro, que foram encontradas em todos os compostos.

No espectro do derivado **18** na região do IV, podemos observar essas bandas características, como na deformação axial em 3.289 cm^{-1} referente a absorção da ligação N-H e em 1.660 cm^{-1} referente a absorção da ligação C=O, ambas do grupamento amida. Em 1.536 cm^{-1} foi possível observar uma deformação axial assimétrica e uma deformação axial simétrica em 1.367 cm^{-1} da ligação N-O, que são referentes ao grupamento NO_2 . Além dessas bandas características, foi possível observar uma deformação angular em 1.219 cm^{-1} referente a ligação C-F e em 1.156 cm^{-1} referente a ligação C-O (Figura 10).

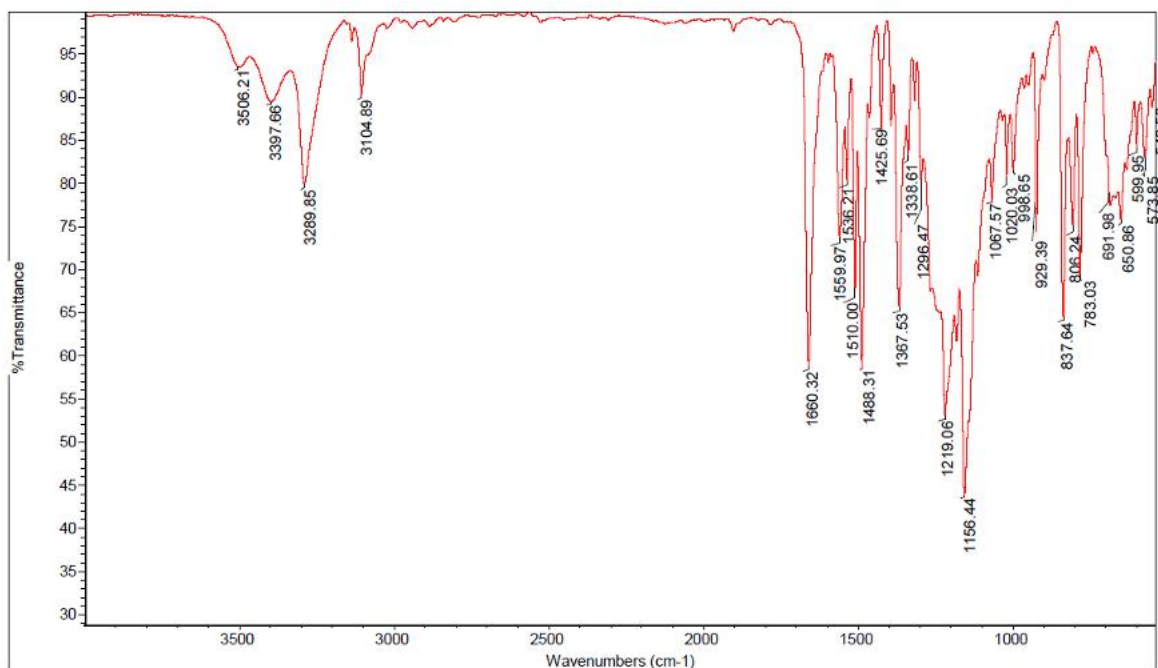


Figura 10. Espectro de IV da substância **18**.

Já na substância **26**, diferentemente de todos os outros derivados, podemos notar a ausência da banda na região de 3.200 cm^{-1} , visto que nessa substância a ligação N-H foi substituída por ligação C-N, transformando a amida secundária em uma amida terciária. A deformação axial referente a carbonila está presente em 1.655 cm^{-1} , em 1.537 cm^{-1} e em 1.359 cm^{-1} estão as deformações axiais assimétrica e simétrica, respectivamente, referente ao grupamento nitro, e podemos observar o surgimento do estiramento proveniente da deformação axial da ligação C-N em 1.292 cm^{-1} (Figura 11).

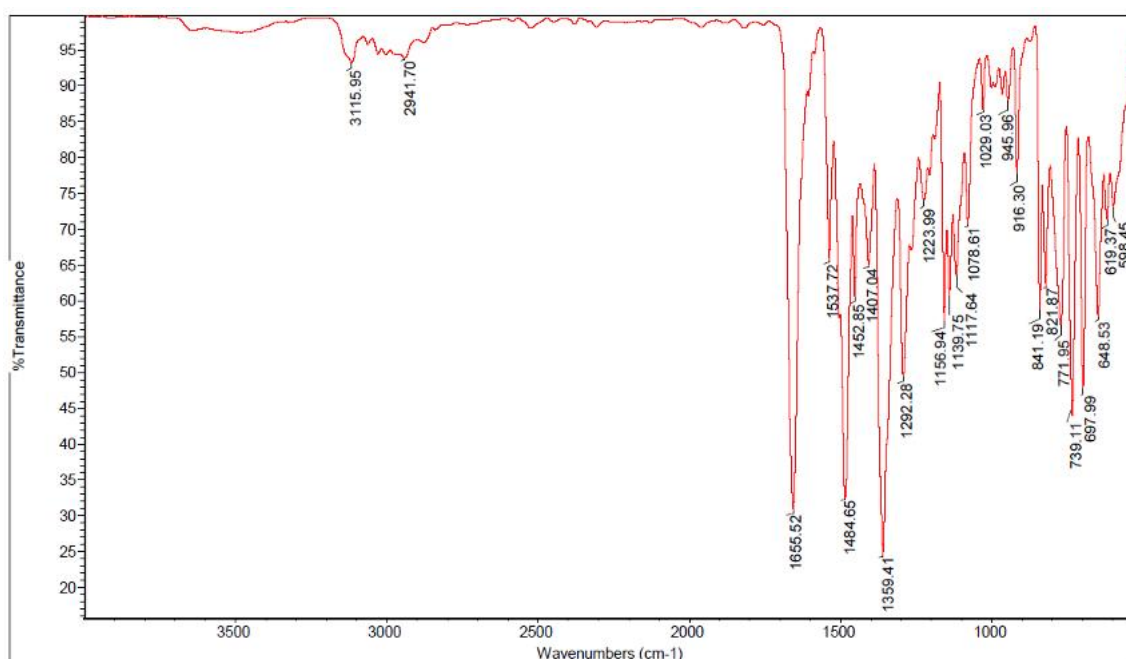


Figura 11. Espectro de IV da substância **26**.

Tabela 6. Dados espectroscópicos de IV dos derivados **1-27**.

Derivados	v (cm ⁻¹) /estiramento					
	N-H	C=O	N-O	C-Cl	C-F	C-O
1	3.238	1.658	1.530 e 1.357	-	-	-
2	3.266	1.657	1.536 e 1.357	-	-	-
3	3.297	1.661	1.536 e 1.365	-	-	-
4	3.236	1.657	1.529 e 1.356	784	-	-
5	3.230	1.655	1.530 e 1.358	773	-	-
6	3.293	1.659	1.529 e 1.357	780	-	-

7	3.264	1.656	1.535 e 1.357	-	1.233	-
8	3.285	1.654	1.537 e 1.357	-	1.251	-
9	3.290	1.661	1.536 e 1.365	-	1.243	-
10	3.265	1.659	1.539 e 1.357	-	-	-
11	3.289	1.661	1.529 e 1.345	-	-	-
12	3.264	1.679	1.515 e 1.346	-	-	-
13	3.234	1.659	1.534 e 1.328	-	1.120	-
14	3.283	1.679	1.528 e 1.327	-	1.110	-
15	3.219	1.650	1.536 e 1.359	-	-	1.159
16	3.283	1.656	1.543 e 1.359	-	-	1.157
17	3.258	1.653	1.530 e 1.353	-	-	1.157
18	3.289	1.660	1.536 e 1.367	-	1.219	1.156
19	3.291	1.661	1.531 e 1.359	-	-	-
20	3.255	1.663	1.531 e 1.359	775	-	-
21	3.243	1.656	1.530 e 1.359	-	1.262	-
22	3.342	1.676	1.544 e 1.376	-	1.287	-
23	3.272	1.655	1.550 e 1.351	-	-	1.145
24	3.264	1.647	1.536 e 1.361	-	-	1.156
25	3.224	1.672	1.544 e 1.360	-	-	-
26	-	1.655	1.537 e 1.359	-	-	-
27	3.290	1.681	1.528 e 1.358	-	-	-

5.1.2.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

5.1.2.3.1. RMN de ^1H

A discussão da caracterização por RMN será feita inicialmente considerando os sinais referentes ao núcleo em comum a todos os derivados. O derivado **6** será inicialmente usado como exemplo para discussão porque seus sinais não se sobrepuseram, e em seguida alguns casos específicos serão discutidos. A atribuição dos sinais dos espectros de RMN foram realizadas com o auxílio dos espectros bidimensionais (COSY e HSQC) e por simulação computacional utilizando o programa MestReNova 14.0. Os sinais relativos a todos os hidrogênios dos derivados **1-27** podem ser encontrados na tabela 7.

No espectro da substância **6**, foi possível observar que os hidrogênios metilênicos presentes na molécula, H-9,9' e H-6,6' são quimicamente e magneticamente equivalentes.

Dessa forma, H-6,6' formam um simpleto em 5,17 ppm. Já H-9 e H-9' acoplam com o hidrogênio vizinho da amida H-8 ($J = 5,9$ Hz), formando um duplete em 4,31 ppm. Os hidrogênios presentes no anel imidazólico H-4 e H-5 acoplam entre si ($J = 1,1$ Hz), formando um duplete cada em 7,19 ppm e 7,63 ppm respectivamente. H-5 se encontra em uma região mais desblindada do espectro quando comparado à H-4 devido a sua maior proximidade aos demais heteroátomos presentes na cadeia da molécula. H-8 por ser um hidrogênio amídico, ligado diretamente ao átomo de nitrogênio se encontra na região mais desblindada do espectro, formando um tripleto por conta de seu acoplamento ($J = 5,9$ Hz) com os hidrogênios H-9 e H-9'. Devido ao plano de simetria presente no anel aromático do composto, causado pelo átomo de cloro presente na posição *para*, os hidrogênios H-11 e H-15, e os hidrogênios H-12 e H-14 são equivalentes. Dessa forma H-11 e H-15 formam um multiplete em 7,29 ppm e H-12 e H-14 formam outro multiplete em 7,39 ppm. Esses deslocamentos químicos ocorrem devido a presença do cloro como substituinte no anel. O átomo de cloro é eletronegativo e poderia compartilhar o seu par de elétrons com o anel, tornando os hidrogênios H-12 e H-14 mais blindados pelo efeito de ressonância, visto que a carga negativa passaria pelos átomos de carbono onde se encontram esses hidrogênios. No entanto, o cloro também é considerado um átomo grande, de forma que essa deslocalização de seus elétrons para o anel é prejudicada, prevalecendo então o efeito indutivo, e como o cloro é um grupo retirador de elétrons, acaba por desblindar os hidrogênios mais próximos a ele. Por esse motivo H-12 e H-14 se encontram em uma área mais desblindada do espectro quando comparados a H-11 e H-15 que se encontram mais distantes do átomo de cloro (Figura 12). Na figura 13 está apresentado o espectro bidimensional COSY deste derivado, o qual foi utilizado para o auxílio das atribuições dos sinais.

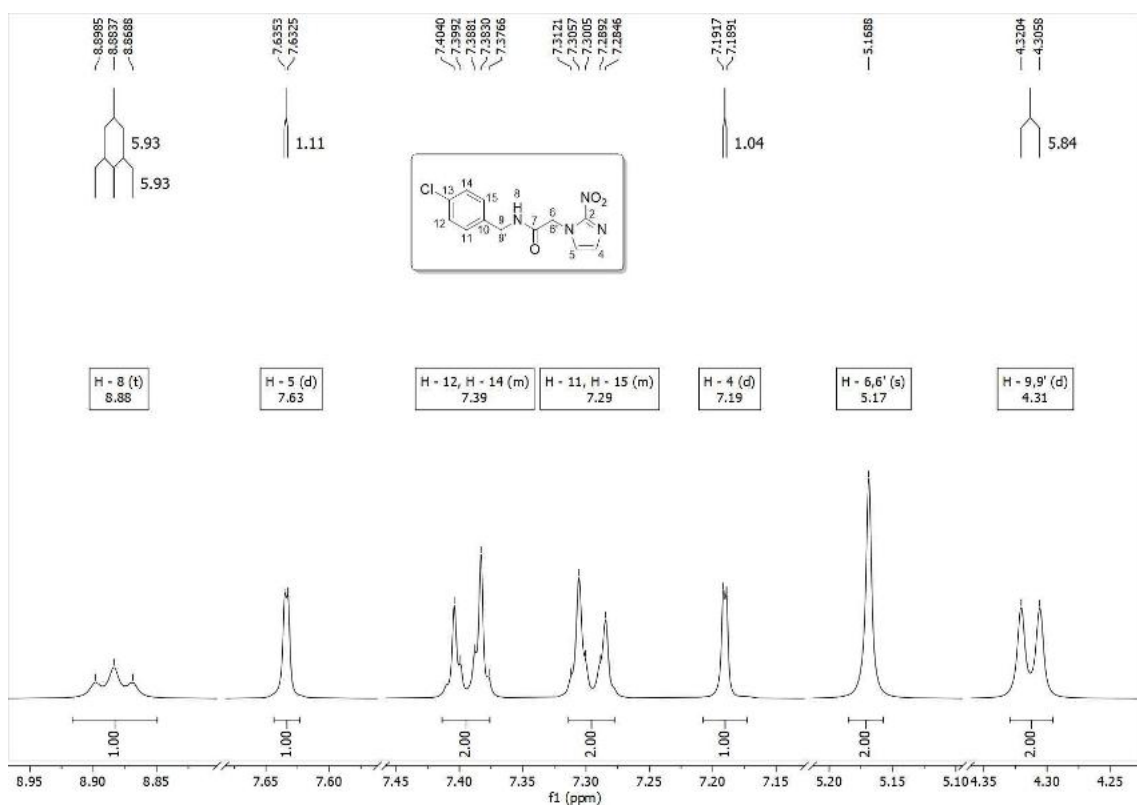


Figura 12. Espectro ampliado de RMN de ^1H (400 MHz) do derivado **6**. Solvente: DMSO- d_6 .

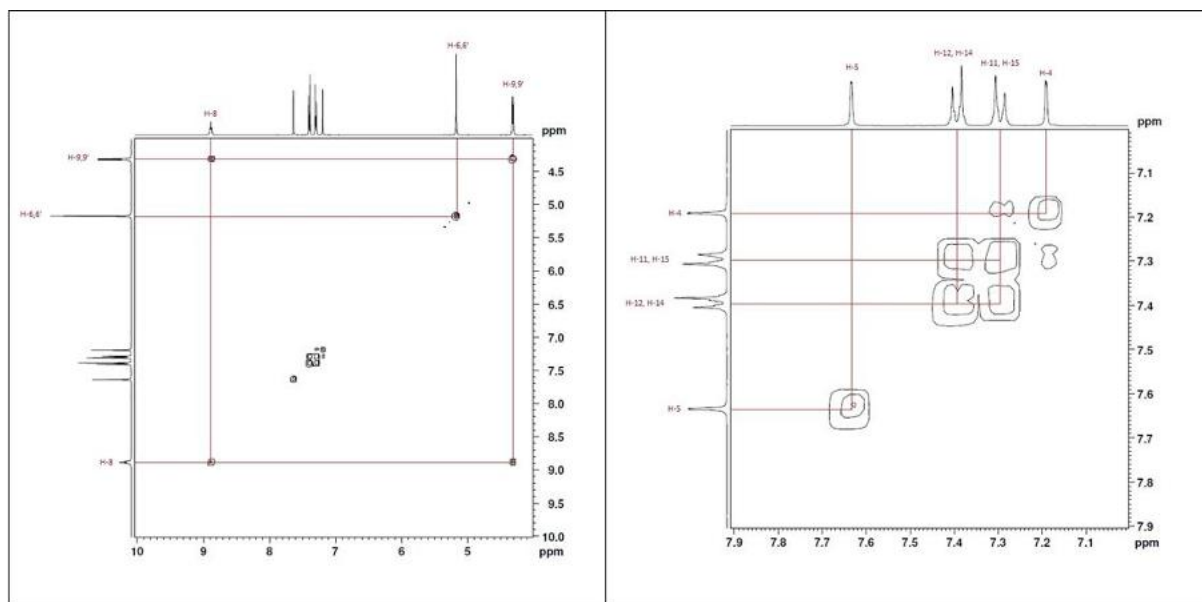


Figura 13. Espectro de RMN bidimensional COSY (400 MHz) do derivado **6**. À esquerda espectro completo e à direita ampliado.

Através da técnica de RMN, também foi possível identificar e diferenciar os compostos contendo os mesmos substituintes, porém em diferentes posições no anel, como podemos observar na figura 13, onde na imagem **A** se encontra o espectro da substância **4** e na imagem **B**, o espectro da **5**, ambas contendo o átomo de cloro como substituinte, porém na posição *orto* e *meta*, respectivamente. Os compostos apresentam as mesmas multiplicidades de sinais e deslocamentos químicos próximos ao do composto **6** que foi discutido anteriormente, com exceção apenas dos sinais relativos ao anel aromático com o cloro. No espectro da substância **4**, é possível observar H-15 formando um duplo duplete em 7,45 ppm, referente ao seu acoplamento com H-14 ($J = 1,6$ Hz) e com H-13 ($J = 7,5$ Hz) à distância. H-12 também forma um duplo duplete em 7,40 ppm por acoplar com H-13 ($J = 2,0$ Hz) e com H-14 ($J = 7,5$ Hz) à distância, enquanto H-13 e H-14 tem seus sinais sobrepostos, formando um sinal múltiplo em 7,33 ppm. Já no espectro da substância **5**, H-11, H-13 e H-15 tem seus sinais sobrepostos, formando um sinal múltiplo em 7,34 ppm, enquanto H-14 forma um duplete de tripletos referente ao seu acoplamento com H-13 e H-15 ($J = 1,5$ Hz) e com H-11 à distância ($J = 7,3$ Hz) (Figura 14).

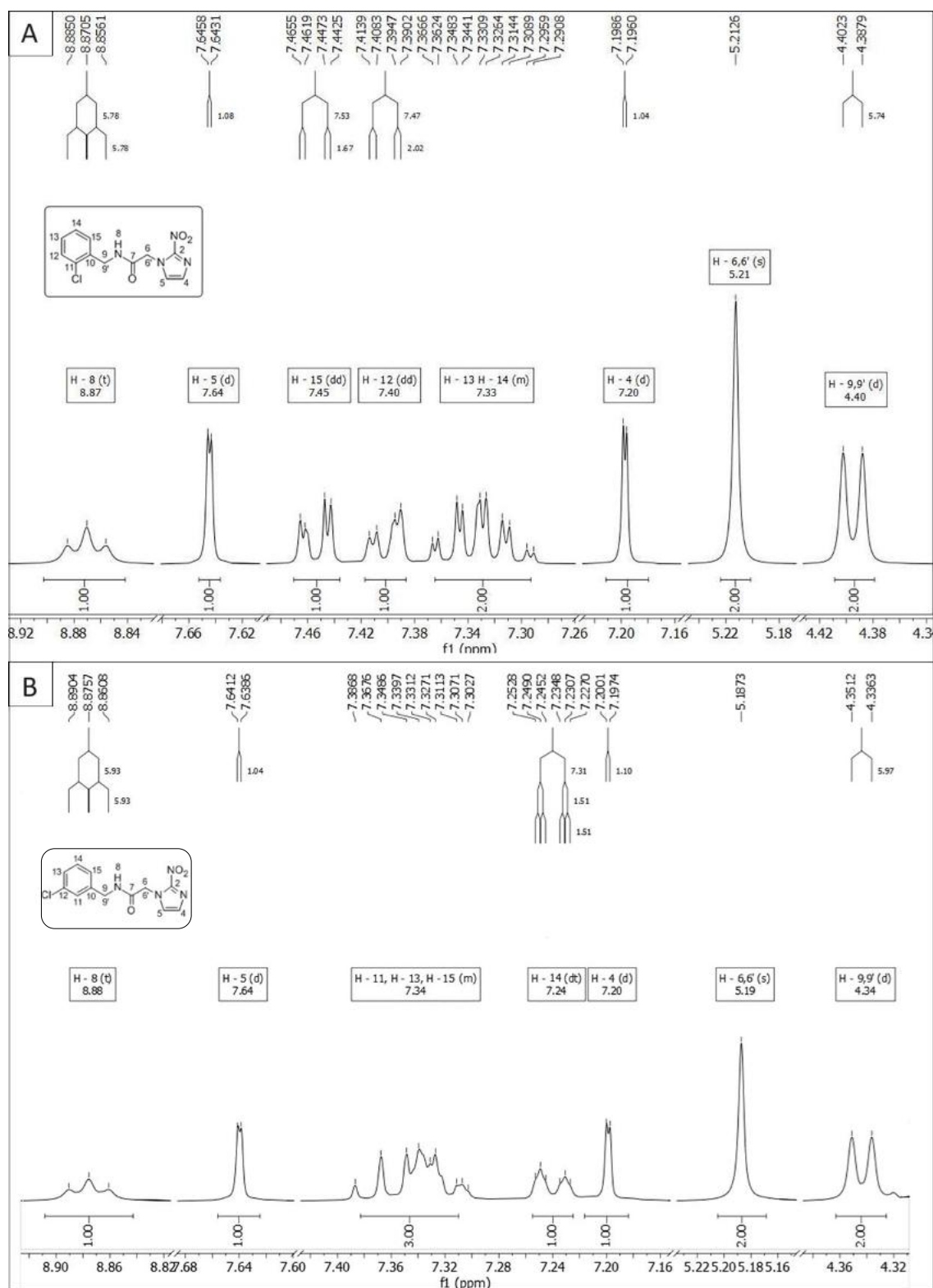


Figura 14. Espectro ampliado de RMN de ^1H (400 MHz) dos derivados **4 A**) e **5 B**). Solvente: DMSO- d_6 .

Diferentemente dos espectros de RMN das substâncias discutidas até o momento, os compostos **25**, **26** e **27**, apresentam padrões diferentes de sinais devido ao fato de não possuírem substituições no anel aromático, mas sim alterações estruturais na cadeia.

No espectro da substância **25**, há o surgimento de um sinal em 1,30 ppm, referente aos hidrogênios da metila H-16, quimicamente e magneticamente equivalentes, que formam um duplete com H-9 ($J = 7,0$ Hz). H-9 agora, forma um pentano em 4,92 ppm, devido ao acoplamento com os hidrogênios da metila H-16 e com o hidrogênio da amida H-8 ($J = 7,1$ Hz), enquanto na área mais desblindada do espectro, H-8 forma um duplete, referente ao acoplamento com o hidrogênio H-9 (Figura 15).

Na substância **27** foi possível observar o surgimento de um sinal em 2,71 ppm referente aos hidrogênios H-10 e H-10', presentes no carbono metilênico adicionado ao composto. Estes formam um triplete, referente ao acoplamento com os hidrogênios H-9 e H-9' ($J = 7,3$ Hz), que agora formam um triplete de dupletos em 3,31 ppm por acoplar com H-10 e H-10' ($J = 7,3$ Hz) e com H-8 ($J = 5,6$ Hz) (Figura 16).

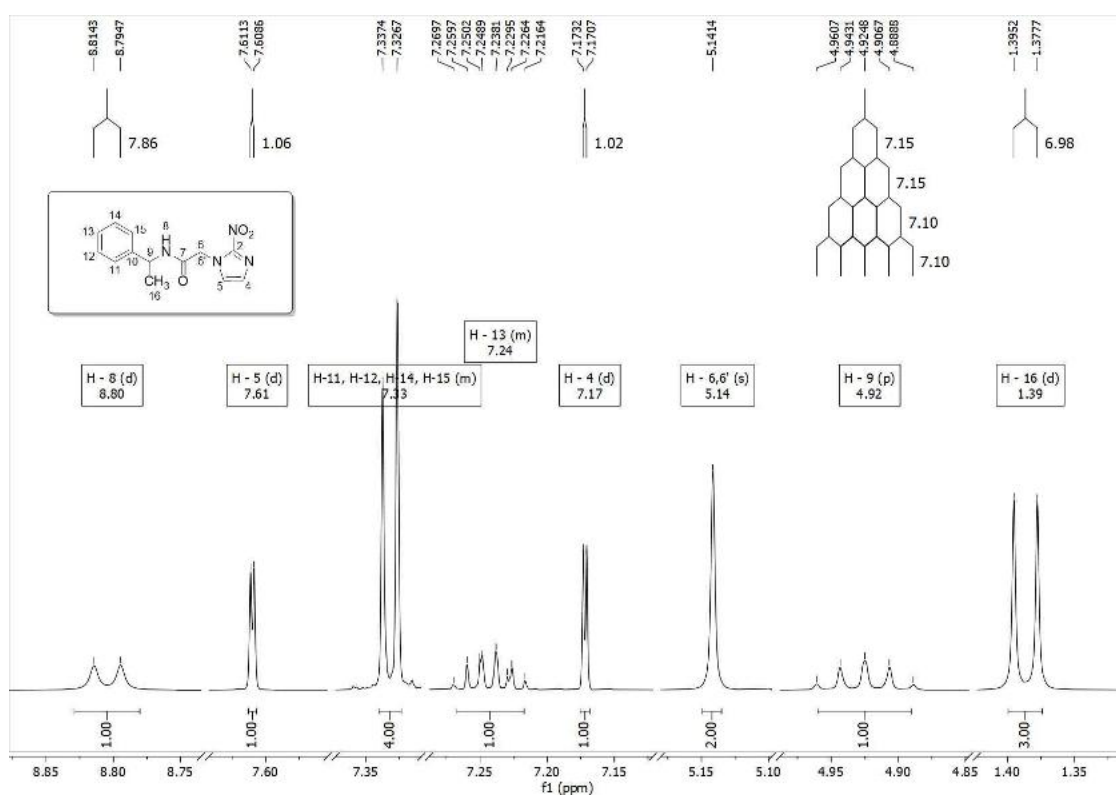


Figura 15. Espectro ampliado de RMN de ^1H (400 MHz) do derivado **25**. Solvente: DMSO- d_6 .

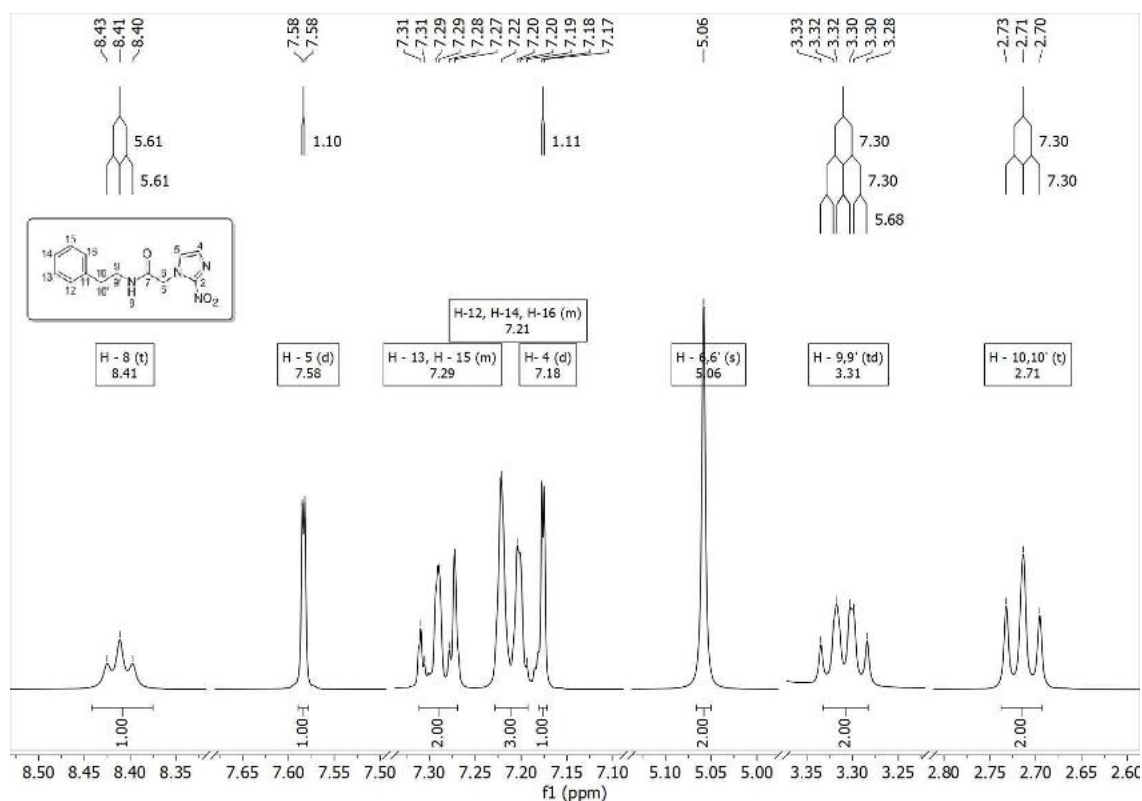


Figura 16. Espectro ampliado de RMN de ^1H (400 MHz) do derivado **27**. Solvente: DMSO- d_6 .

No espectro de ressonância da substância **26**, tanto de ^1H (Figura 17) quanto de ^{13}C , pudemos observar uma duplicidade nos sinais do composto, fugindo do padrão das demais moléculas sintetizadas. Dessa forma, em 2,82 / 3,00 ppm, observamos dois simples referentes aos hidrogênios H-8 da metila ligada ao nitrogênio da amida. Em 4,54 / 4,64 ppm dois simples referentes aos hidrogênios H-9,9'. H-6,6' formam um único simples em 5,50 ppm. H-4 acopla com H-5, formando dois dupletos ($J = 1,1$ Hz) cujos sinais se sobrepõem parcialmente em 7,18 / 7,19 ppm. Os sinais dos hidrogênios aromáticos da fenila H-12, H-14 formam dois sinais múltiplos em 7,23 / 7,29 ppm, e H-11, H-13 e H-15 formam dois sinais múltiplos em 7,35 / 7,43 ppm. H-5 forma um único duplete em 7,57 ppm referente a seu acoplamento ($J = 1,1$ Hz) com H-4.

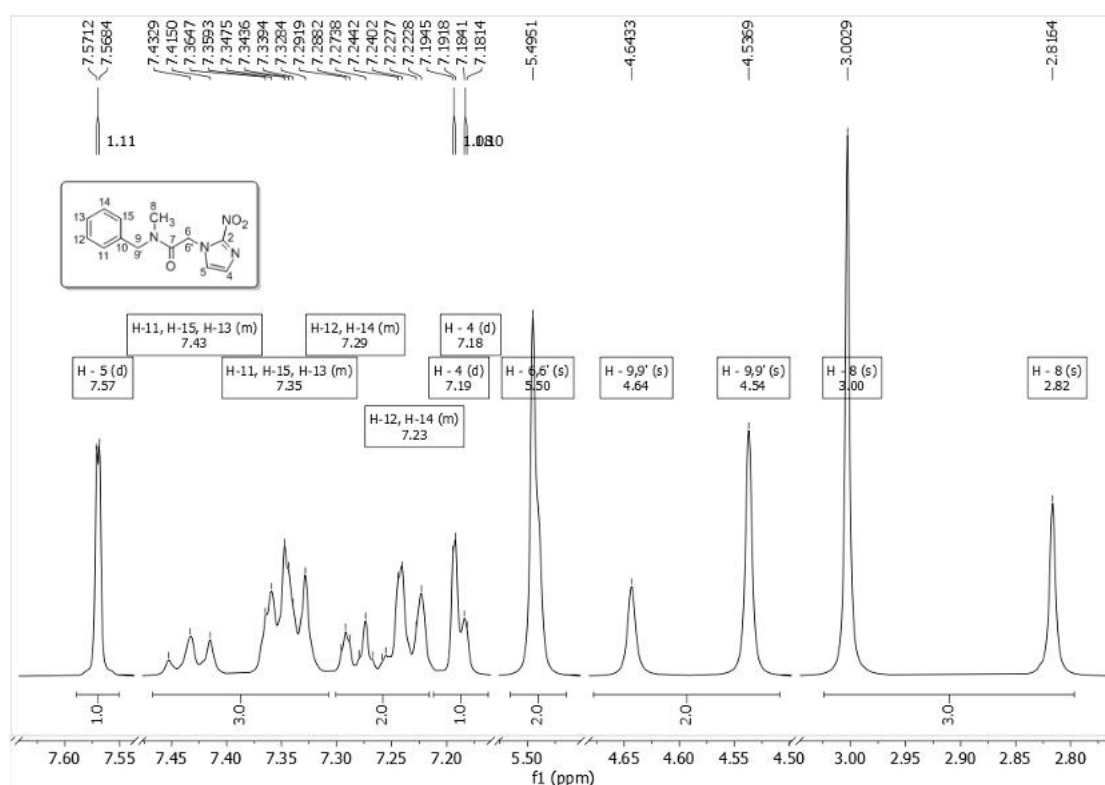


Figura 17. Espectro ampliado de RMN de ^1H (400 MHz) do derivado **26**. Solvente: DMSO- d_6 . Temperatura: 328 K.

Essa duplicidade nos sinais de RMN normalmente é ocasionada devido a presença de isômeros conformacionais em compostos, sendo uma característica bastante comum para indicar a presença de confôrmeros *anti*-periplanar (*ap*) e *sin*-periplanar (*sp*). Dessa forma, visando entender se realmente a duplicidade dos sinais era proveniente da presença de confôrmeros e não de possíveis impurezas ou outras substâncias presentes na molécula, foi realizado um estudo de temperatura do derivado **26** utilizando a técnica de RMN. Conformações diferentes podem também possuir energias relativas diferentes, de forma que a temperatura pode influenciar a população relativa dessas conformações, aumentando a proporção de um dos confôrmeros com relação ao outro. Dessa forma, diminuir/aumentar a proporção de um dos sinais, indica a presença de isômeros conformacionais.

Na Figura 18, está presente o espectro da substância **26** em seis temperaturas diferentes, variando entre 298K a 348K, onde na temperatura mais baixa é possível observar dois sinais de simpletos para os hidrogênios H-6, H-9,9' e H-8. Na temperatura de 308K, H-6 já se encontra em um sinal único, e é possível notar que a presença de um

dos sinais ficou em maior proporção quando se trata dos hidrogênios H-9,9' e H-8. Em 338K, tanto H-9,9' como H-8 se encontram praticamente em apenas um único sinal. Esses dados corroboram com a ideia de que a molécula possui confôrmeros, e que um deles está sendo mais favorecido pela energia fornecida devido ao aumento da temperatura, de forma que este tem sua proporção aumentada com relação ao outro, “unificando” os sinais. Essa questão também pode ser observada para os hidrogênios H-4 e H-5 (Figura 19), onde na temperatura de 328K H-5 já apresenta um sinal único, que é alcançado por H-4 em 338K.

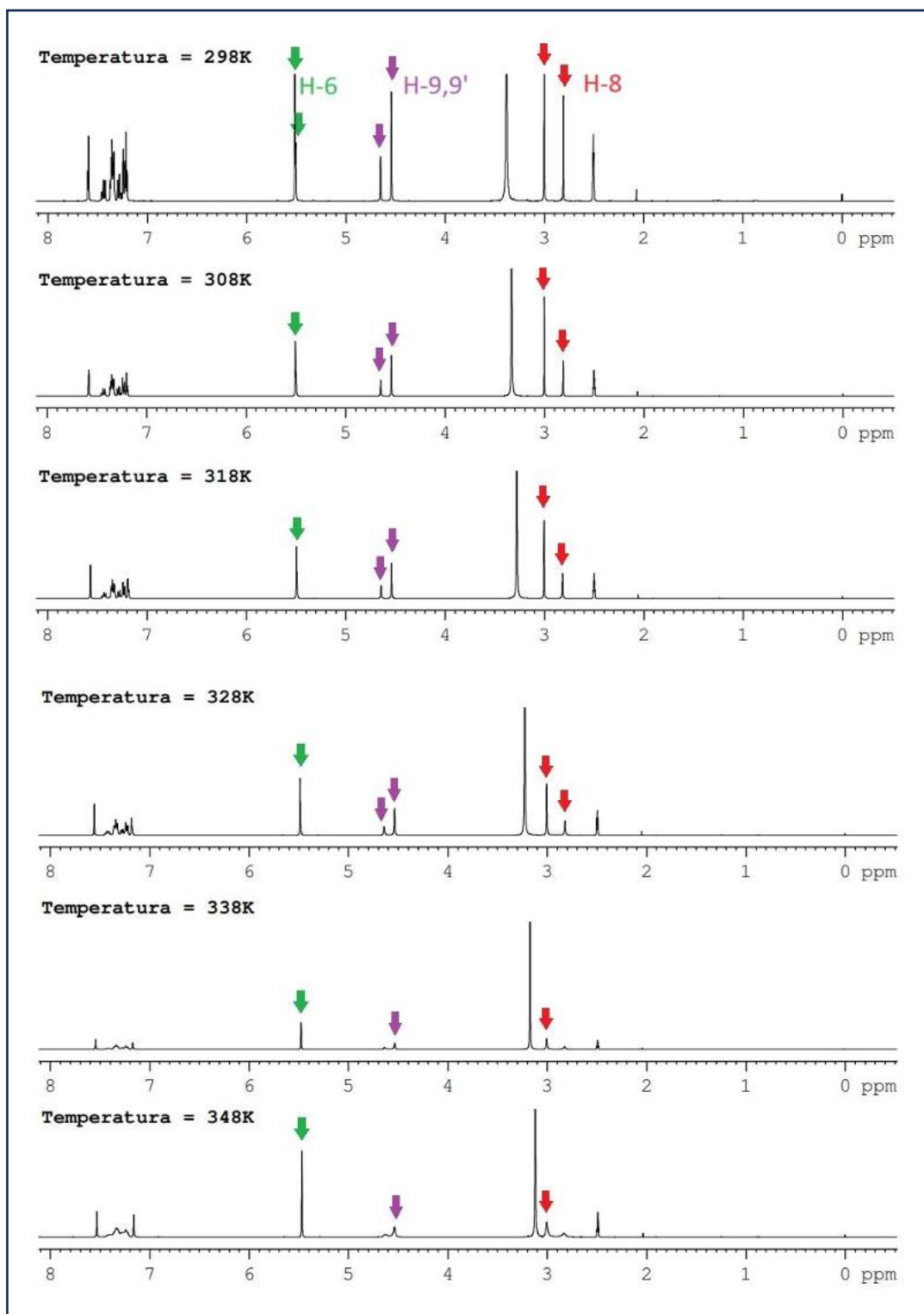


Figura 18. Estudo de temperatura espectro RMN de ^1H (400 MHz) do derivado **26**. Solvente: DMSO- d_6 . Temperaturas analisadas: 298K, 308K, 318K, 328K, 338K e 348K.

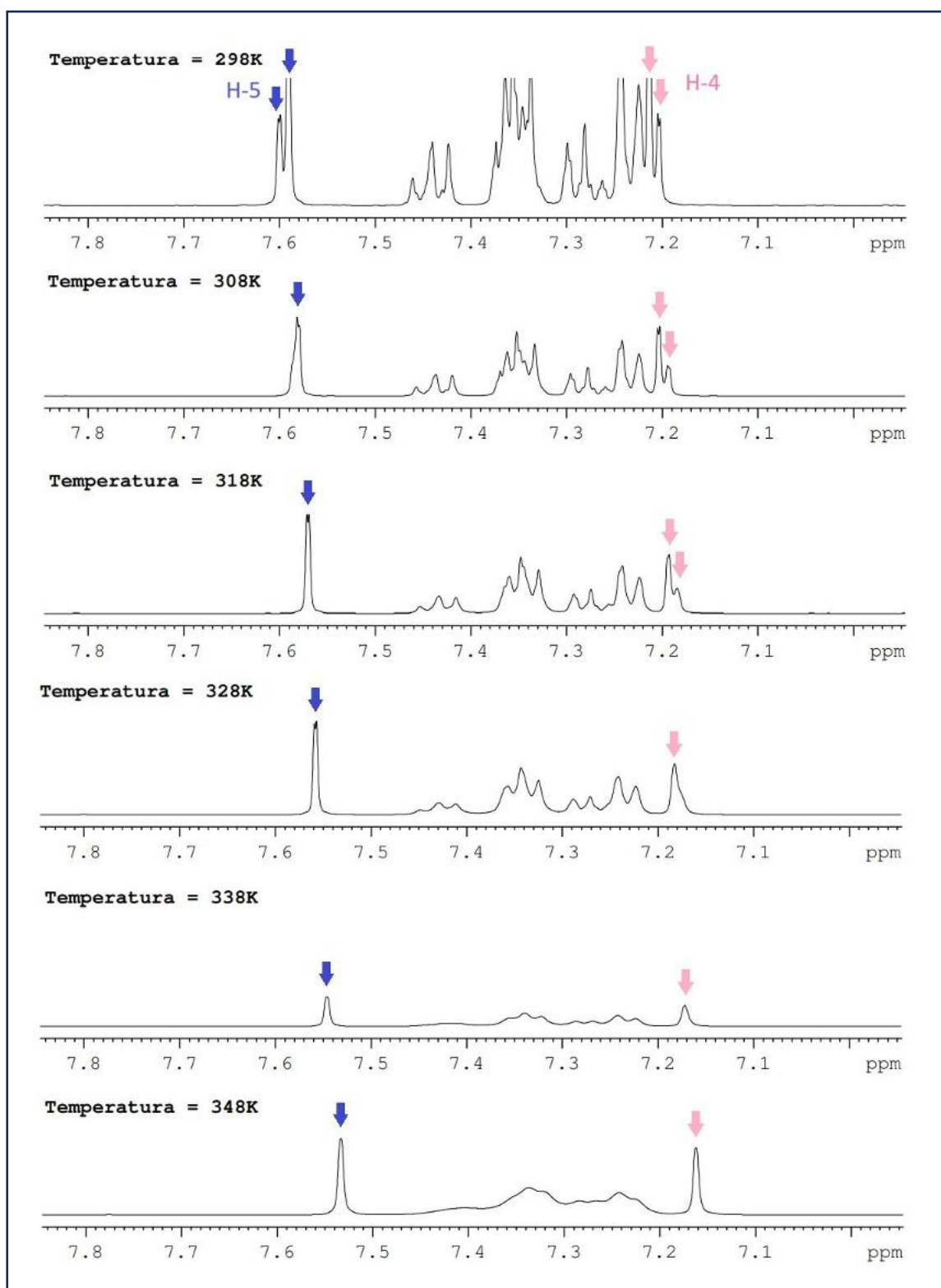


Figura 19. Estudo de temperatura espectro RMN de ^1H (400 MHz) do derivado **26** expandido. Solvente: DMSO-d_6 . Temperaturas analisadas: 298K, 308K, 318K, 328K, 338K e 348K.

Outras maneiras de confirmar se de fato estão presentes isômeros conformacionais no composto, e não outras substâncias, são através da comprovação da pureza cromatográfica do mesmo, esta foi determinada em 95,6%, por CLUE-DAD e através da análise dos espectros de RMN bidimensional, como o caso do COSY (Figura 20), onde como podemos observar, todos os sinais de hidrogênio do derivado **26** se correlacionam.

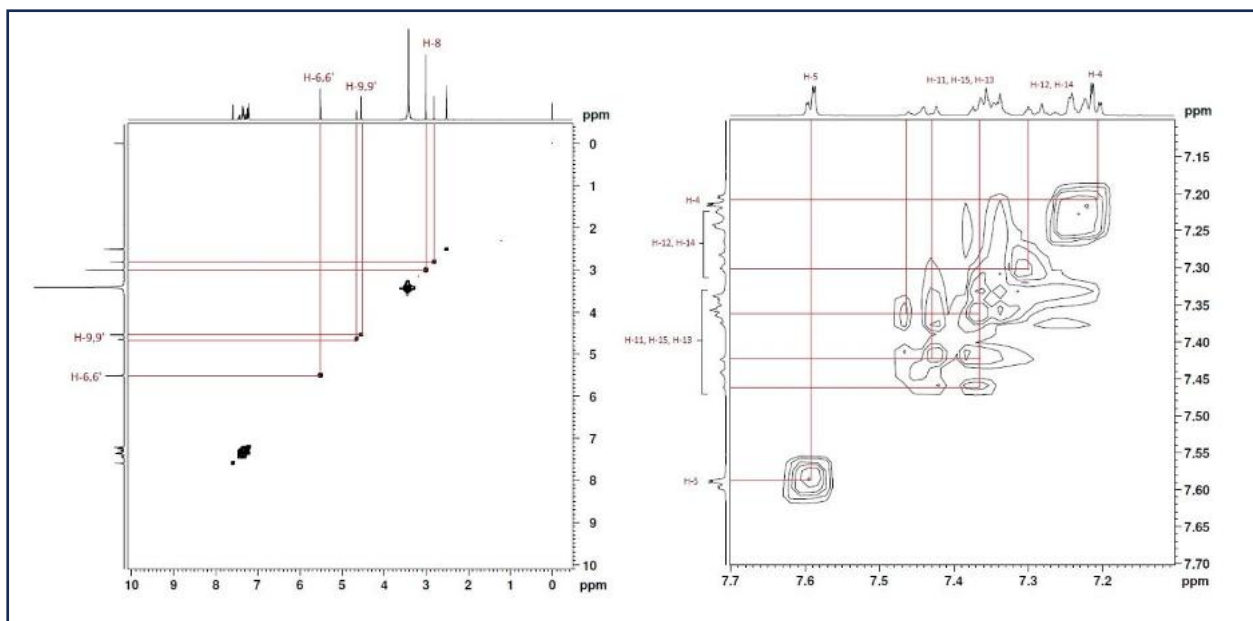


Figura 20. Espectro de RMN bidimensional COSY (400 MHz) do derivado **26**. À esquerda espectro completo e à direita ampliado.

O motivo que pode ter levado a formação desses dois isômeros conformacionais é o diferente ambiente químico que é promovido pela substituição do átomo de hidrogênio da amida por uma metila. Moléculas podem adotar diferentes conformações espaciais devido à rotação em torno de ligações simples, e essas conformações podem ter ambientes químicos distintos, resultando nos sinais de RMN duplicados.

No caso da substância **26**, essa rotação na ligação simples entre o carbono da carbonila e o nitrogênio seria impossibilitada, devido a ressonância que ocorre pelo par de elétrons livre do nitrogênio e da dupla da carbonila, de forma que essa ligação se comporta praticamente como uma ligação dupla (Figura 21).

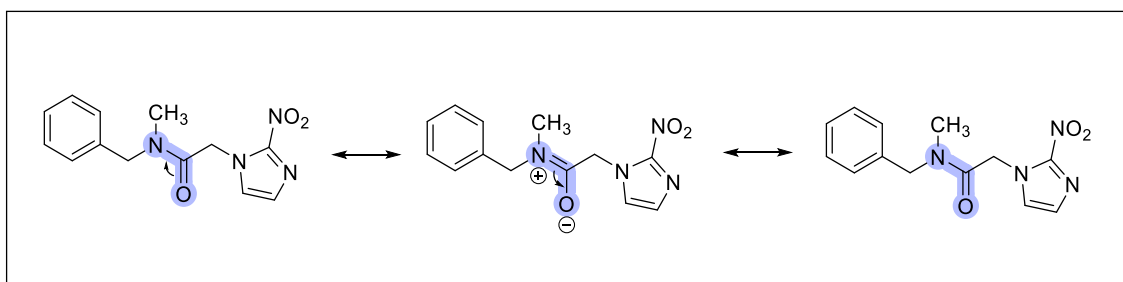


Figura 21. Estruturas de ressonância que ocorrem entre o nitrogênio e o carbono da carbonila.

Dessa forma, analisando os dados obtidos de multiplicidade dos sinais no espectro de RMN, do estudo de temperatura e na estrutura química do derivado **26**, foi possível chegar à conclusão de que os isômeros conformacionais são provenientes da rotação da ligação simples entre o carbono da carbonila e o carbono metilênico que está ligado ao nitroimidazol (Figura 22). Isso explica o porquê sinais como H-4 precisaram de mais energia, um maior aumento da temperatura para que tivesse a presença de apenas um confôrmero no espectro de RMN, visto que na posição *ap*, este se encontra mais próximo da metila que foi introduzida do que H-5 por exemplo (Figura 23). Quanto mais próximo ao diferente ambiente químico que foi introduzido pela presença da metila, maior energia é necessária para que apenas um confôrmero seja predominante, de forma que os hidrogênios H-9 e H-9' mesmo na maior temperatura testada, ainda foi possível observar um sinal muito pequeno indicando a duplicidade no espectro (Figura 23).

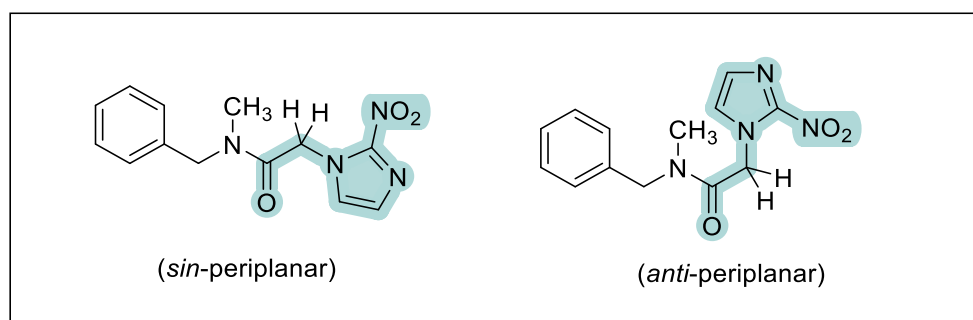


Figura 22. Possíveis confôrmeros *anti*-periplanar (*ap*) e *sin*-periplanar (*sp*) presentes no derivado **26**.

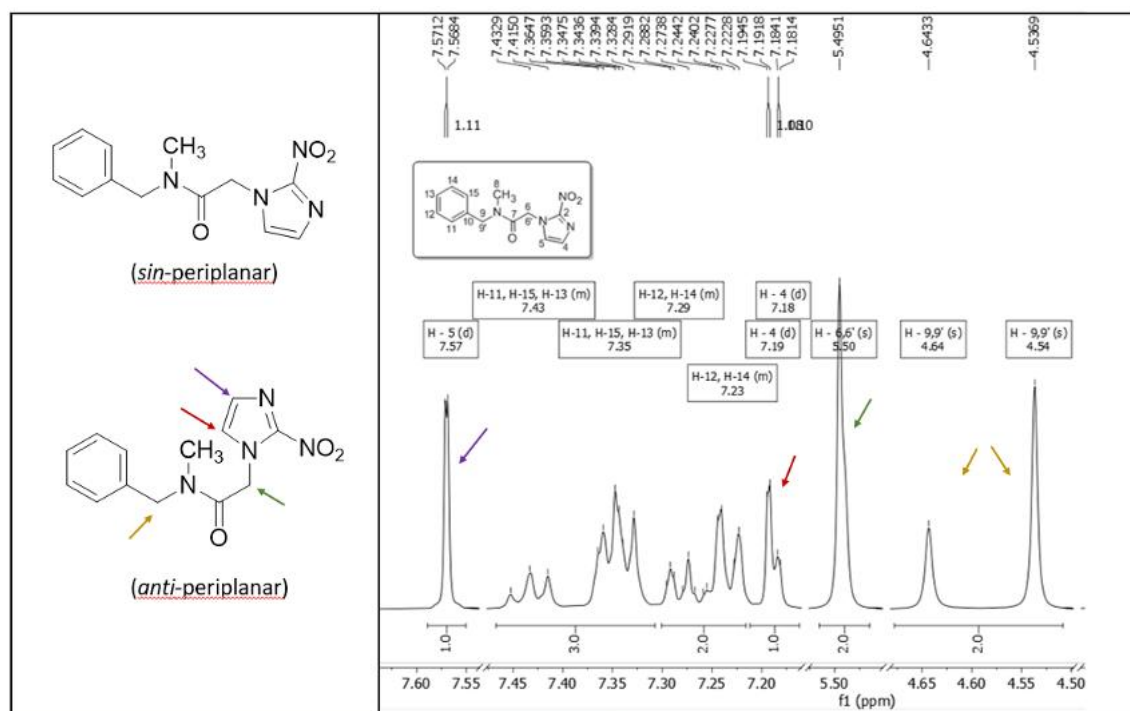
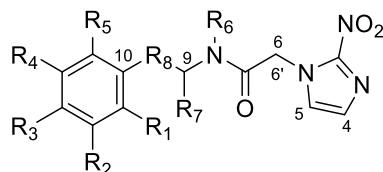


Figura 23. Espectro ampliado de RMN de ^1H (400 MHz) do derivado **26** com os diferentes conformeros propostos à esquerda. Setas indicam os hidrogênios referentes no conformero *anti-periplanar*, mostrando que os hidrogênios mais próximos a metila apresentam maior definição na duplicidade de sinais. Solvente: DMSO- d_6 . Temperatura: 328 K.

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) para os derivados **1-27**. Solvente: DMSO- d_6 .



Subs.	H-4	H-5	H-6,6'	H-9,9'	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
001	7,19 (d; J = 1,1 Hz)	7,64 (d; J = 1,1 Hz)	5,17 (s)	4,30 (d; J = 5,5 Hz)	2,27 (s)	7,20 – 7,15 (m)	7,20 – 7,15 (m)	7,20 – 7,15 (m)	7,27 – 7,23 (m)	8,69 (t; J = 5,6 Hz)	-	-
002	7,25 – 7,18 (m)	7,64 (d; J = 1,1 Hz)	5,17 (s)	4,29 (d; J = 5,9 Hz)	7,11 – 7,04 (m)	2,29 (s)	7,11 – 7,04 (m)	7,25 – 7,18 (m)	7,11 – 7,04 (m)	8,80 (t; J = 5,9 Hz)	-	-
003	7,19 (d; J = 1,1 Hz)	7,63 (d; J = 1,1 Hz)	5,15 (s)	4,28 (d; J = 5,8 Hz)	7,18 – 7,12 (m)	7,18 – 7,12 (m)	2,28 (H-16; s)	7,18 – 7,12 (m)	7,18 – 7,12 (m)	8,77 (t; J = 5,9 Hz)	-	-
004	7,20 (d; J = 1,0 Hz)	7,64 (d; J = 1,1 Hz)	5,21 (s)	4,40 (d; J = 5,7 Hz)	-	7,40 (dd; J = 7,5/2,0 Hz)	7,37 – 7,28 (m)	7,37 – 7,28 (m)	7,45 (dd; J = 7,5/1,7 Hz)	8,87 (H-8; t; J = 5,8 Hz)	-	-
005	7,20 (d; J = 1,1 Hz)	7,64 (d; J = 1,0 Hz)	5,19 (s)	4,34 (d; J = 6,0 Hz)	7,41 – 7,28 (m)	-	7,41 – 7,28 (m)	7,41 – 7,28 (m)	7,24 (dt; J = 7,3, 1,5 Hz)	8,88 (t; J = 5,9 Hz)	-	-
006	7,19 (J = 1,0 Hz)	7,63 (d; J = 1,1 Hz)	5,17 (s)	4,31 (d; J = 5,8 Hz)	7,32 – 7,27 (m)	7,42 – 7,36 (m)	-	7,42 – 7,36 (m)	7,32 – 7,27 (m)	8,88 (t; J = 5,9 Hz)	-	-
007	7,23 – 7,15 (m)	7,63 (s)	5,17 (s)	4,36 (d; J = 5,8 Hz)	-	7,23 – 7,15 (m)	7,39 – 7,29 (m)	7,23 – 7,15 (m)	7,39 – 7,29 (m)	8,84 (t; J = 5,8 Hz)	-	-
008	7,20 (s)	7,64 (s)	5,19 (s)	4,35 (d; J = 5,9 Hz)	7,13 – 7,05 (m)	-	7,13 – 7,05 (m)	7,39 – 7,35 (m)	7,13 – 7,05 (m)	8,88 (t; J = 6,0 Hz)	-	-
009	7,20 – 7,13 (m)	7,63 (s)	5,16 (s)	4,31 (d; J = 5,8 Hz)	7,34 – 7,29 (m)	7,20 – 7,13 (m)	-	7,20 – 7,13 (m)	7,34 – 7,29 (m)	8,84 (t; J = 5,9 Hz)	-	-
010	7,20 (d; J = 1,0 Hz)	7,64 (d; J = 1,1 Hz)	5,22 (s)	4,63 (d; J = 5,7 Hz)	-	8,06 (dd; J = 8,1, 1,3 Hz)	7,61 – 7,53 (m)	7,75 (td; J = 7,6/1,3 Hz)	7,61 – 7,53 (m)	8,94 (t; J = 5,8 Hz)	-	-
011	7,20 (d; J = 1,1 Hz)	7,64 (d; J = 1,1 Hz)	5,20 (s)	4,47 (d; J = 5,9 Hz)	8,18 – 8,10 (m)	-	8,18 – 8,10 (m)	7,65 (t; J = 7,9 Hz)	7,74 (dt; J = 7,7/1,4 Hz)	9,00 (t; J = 6,0 Hz)	-	-

012	7,20 (d; $J = 1,1$ Hz)	7,64 (d; $J = 1,1$ Hz)	5,21 (s)	4,47 (d; $J = 5,9$ Hz)	7,58 – 7,52 (m)	8,24 – 8,18 (m)	-	8,24 – 8,18 (m)	7,58 – 7,52 (m)	8,99 (t; $J = 6,0$ Hz)	-	-
013	7,20 (d; $J = 1,1$ Hz)	7,66 – 7,56 (m)	5,20 (s)	4,43 (d; $J = 5,9$ Hz)	7,66 – 7,56 (m)	-	7,66 – 7,56 (m)	7,66 – 7,56 (m)	7,66 – 7,56 (m)	8,94 (t; $J = 6,0$ Hz)	-	-
014	7,19 (d; $J = 1,0$ Hz)	7,61 (d; $J = 1,1$ Hz)	5,18 (s)	4,41 (d; $J = 5,9$ Hz)	7,49 (d; $J = 8,0$ Hz)	7,69 (d; $J = 8,1$ Hz)	-	7,69 (d; $J = 8,1$ Hz)	7,49 (d; $J = 8,0$ Hz)	8,94 (t; $J = 6,0$ Hz)	-	-
015	7,19 (d; $J = 1,1$ Hz)	7,63 (d; $J = 1,1$ Hz)	5,18 (s)	4,28 (d; $J = 5,7$ Hz)	3,80 (s)	6,99 (dd; $J = 8,2/1,1$ Hz)	7,28 – 7,23 (m)	6,92 (td; $J = 7,4/1,1$ Hz)	7,21 (dd; $J = 7,5/1,7$ Hz)	8,65 (t; $J = 5,8$ Hz)	-	-
016	7,20 (d; $J = 1,1$ Hz)	7,64 (d; $J = 1,1$ Hz)	5,18 (s)	4,31 (d; $J = 5,9$ Hz)	6,87 – 6,80 (m)	3,75 (s)	6,87 – 6,80 (m)	7,24 (t; $J = 8,0$ Hz)	6,87 – 6,80 (m)	8,82 (t; $J = 5,9$ Hz)	-	-
017	7,23 – 7,16 (m)	7,63 (s)	5,14 (s)	4,25 (d; $J = 5,8$ Hz)	7,23 – 7,16 (m)	6,93 – 6,85 (m)	3,73 (s)	6,93 – 6,85 (m)	7,23 – 7,16 (m)	8,75 (t; $J = 5,8$ Hz)	-	-
018	7,20 (d; $J = 1,1$ Hz)	7,63 (d; $J = 1,1$ Hz)	5,18 (s)	4,36 (d; $J = 5,9$ Hz)	7,43 – 7,38 (m)	7,37 – 7,30 (m)	-	7,37 – 7,30 (m)	7,43 – 7,38 (m)	8,88 (t; $J = 5,9$ Hz)	-	-
019	7,21 (s)	7,69 – 7,61 (m)	5,20 (s)	4,38 (d; $J = 5,8$ Hz)	7,41 – 7,32 (m)	7,69 – 7,61 (m)	7,69 – 7,61 (m) 7,46 (t; $J = 7,6$ Hz) 7,41 – 7,32 (m)	7,69 – 7,61 (m)	7,41 – 7,32 (m)	8,87 (t; $J = 5,9$ Hz)	-	-
020	7,19 (d; $J = 1,1$ Hz)	7,62 (d; $J = 1,2$ Hz)	5,19 (s)	4,36 (d; $J = 5,7$ Hz)	-	7,61 (d; $J = 2,0$ Hz)	-	7,43 (dd; $J = 8,3/2,0$ Hz)	7,39 (d; $J = 8,4$ Hz)	8,89 (t; $J = 5,8$ Hz)	-	-
021	7,19 (d; $J = 1,1$ Hz)	7,62 (d; $J = 1,1$ Hz)	5,15 (s)	4,33 (d; $J = 5,7$ Hz)	-	7,23 (ddd; $J = 10,4/9,3/2,5$ Hz)	-	7,08 (tdd; $J = 8,6/2,6/1,1$ Hz)	7,40 (td; $J = 8,7/6,6$ Hz)	8,84 (t; $J = 5,8$ Hz)	-	-
022	7,19 (d; $J = 1,1$ Hz)	7,62 (d; $J = 1,0$ Hz)	5,20 (s)	4,52 (d; $J = 5,9$ Hz)	7,95 (s)	-	7,98 (s)	-	7,95 (s)	9,02 (t; $J = 6,0$ Hz)	-	-
023	7,20 (d; $J = 1,1$ Hz)	7,63 (d; $J = 1,1$ Hz)	5,15 (s)	4,26 (d; $J = 5,8$ Hz)	6,87 (d; $J = 2,0$ Hz)	3,73 (s)	3,75 (s)	6,90 (d; $J = 8,2$ Hz)	6,79 (dd; $J = 8,2/2,0$ Hz)	8,76 (t; $J = 5,8$ Hz)	-	-
024	7,18 (d; $J = 1,1$ Hz)	7,62 (d; $J = 1,1$ Hz)	5,14 (s)	4,19 (d; $J = 5,6$ Hz)	3,79 (s)	6,55 (d; $J = 2,4$ Hz)	3,75 (s)	6,48 (dd; $J = 8,3/2,4$ Hz)	7,11 (d; $J = 8,3$ Hz)	8,55 (t; $J = 5,7$ Hz)	-	-
025	7,17 (d; $J = 1,0$ Hz)	7,61 (d; $J = 1,1$ Hz)	5,14 (s)	4,92 (p; $J = 7,1$ Hz)	7,35 – 7,32 (m)	7,35 – 7,32 (m)	7,28 – 7,21 (m)	7,35 – 7,32 (m)	7,35 – 7,32 (m)	8,80 (d; $J = 7,9$ Hz)	1,39 (d; $J = 7,0$ Hz)	-
026	7,19, 7,18 (d; $J = 1,1$ Hz)	7,57 (d; $J = 1,1$ Hz)	5,50 (s)	4,64, 4,54 (s)	7,46 – 7,40, 7,37 – 7,32 (m)	7,30 – 7,26, 7,26 – 7,21 (m)	7,46 – 7,40, 7,37 – 7,32 (m)	7,30 – 7,26, 7,26 – 7,21 (m)	7,46 – 7,40, 7,37 – 7,32 (m)	3,00, 2,82 (s)	-	-
027	7,18 (d; $J = 1,1$ Hz)	7,58 (d; $J = 1,1$ Hz)	5,06 (s)	3,31 (td; $J = 7,3/5,7$ Hz)	7,23 – 7,19 (m)	7,32 – 7,26 (m)	7,23 – 7,19 (m)	7,32 – 7,26 (m)	7,23 – 7,19 (m)	8,41 (t; $J = 5,6$ Hz)	2,71 (t; $J = 7,3$ Hz)	-

5.1.2.3.2. RMN de ^{13}C

Para introduzir os resultados obtidos de RMN de ^{13}C , novamente será o usado o espectro da substância **6** como exemplo para a discussão dos sinais. Os sinais referentes a todos os carbonos dos derivados **1-27** estão organizados na Tabela 8.

Os carbonos metilênicos C-9 e C-6 se encontram na região mais blindada do espectro, em 42,10 ppm e 52,05 ppm respectivamente. Em seguida podemos encontrar os carbonos aromáticos, C-4 em 127,97 ppm e C-5 em 129,29 ppm. Devido ao plano de simetria do anel aromático, os carbonos C-12 e C-14 formam um único sinal em 128,72 ppm e os carbonos C-11 e C-15 em 129,57 ppm. C-10 se encontra em 131,97 ppm, enquanto C-13 devido a maior proximidade ao átomo de cloro, se encontra mais desblindado em relação ao primeiro, em 138,48 ppm. Na região mais desblindada do espectro, se encontram os carbonos C-2, ligado diretamente ao grupo nitro e o carbono C-7 por ser um carbono carbonílico (Figura 24). As atribuições foram realizadas com o auxílio do RMN bidimensional heteronuclear HSQC (Figura 25), que correlaciona núcleos de ^1H com ^{13}C ligados diretamente, e pelo *software MestReNova 14.0*.

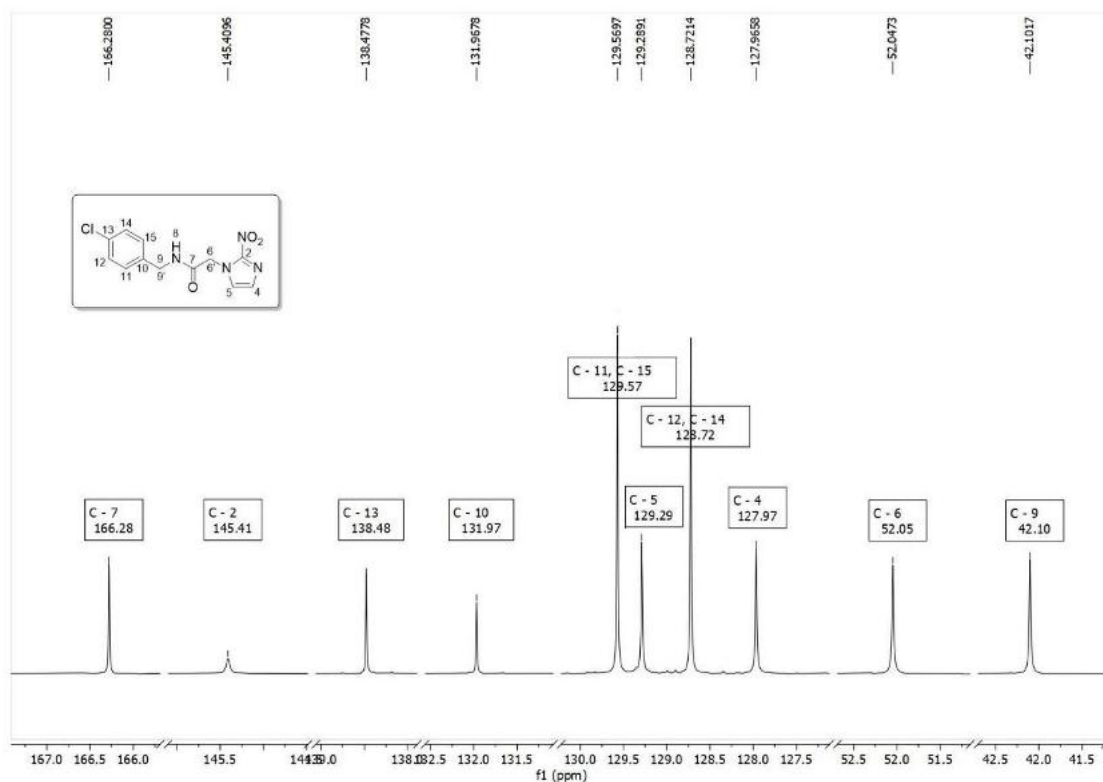


Figura 24. Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (100 MHz) do derivado **6**. Solvente: DMSO- d_6 .

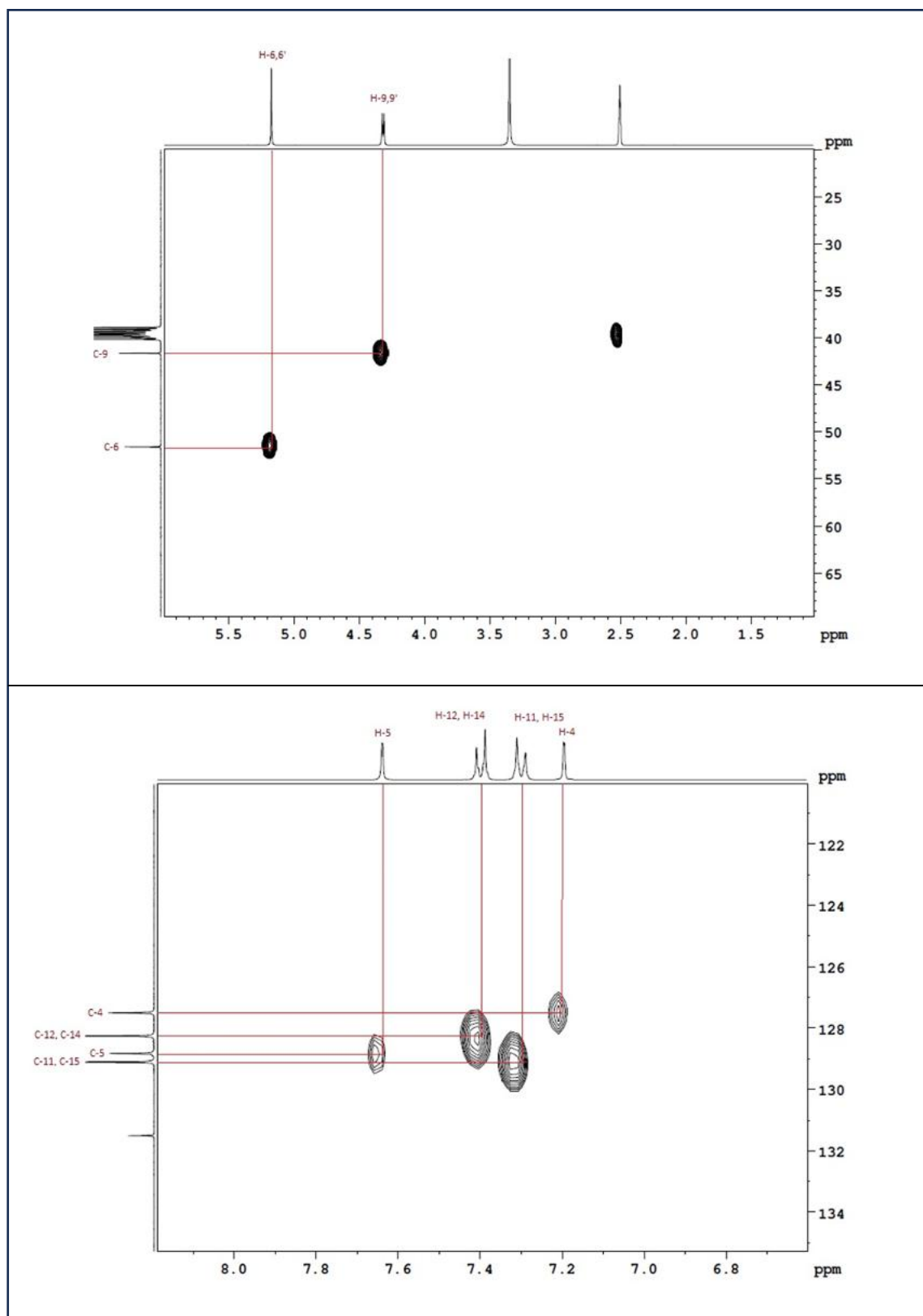


Figura 25. Espectro ampliado de RMN bidimensional de HSQC do derivado 6.

Devido à presença dos átomos de flúor nos derivados **7-9**, **13**, **14**, **18**, **21** e **22**, o espectro de RMN ^{13}C dos mesmos mostraram alguns sinais com maior multiplicidade, devido ao acoplamento C-F. Devido a esta diferença em relação aos demais espectros, os sinais das substâncias **14** e **21** serão discutidos como exemplo, com exceção dos carbonos que apresentam deslocamentos químicos semelhantes à **6**, de modo a não ficar repetitivo.

Devido ao plano de simetria presente no anel aromático do derivado **14**, os carbonos C-11 e C-15, assim como C-12 e C-14 formaram um sinal único no espectro. Os carbonos C-11 e C-15 formam um simpleto em 128,02 ppm, enquanto C-12 e C-14 formam um quarteto em 125,35 ppm devido ao acoplamento ($J = 3,8$ Hz) com os átomos de flúor do grupo CF_3 à longa distância. O carbono C-13 mais próximo aos átomos de flúor, forma também um quarteto em 127,82 ppm devido ao seu acoplamento ($J = 31,8$ Hz) com estes. Seu sinal é sobreposto pelos sinais de C-4 e C-11/C-15. O carbono C-16 por estar ligado diretamente aos átomos de flúor, acoplam com estes com uma constante de acoplamento ainda maior ($J = 271,9$ Hz), formando um quarteto em 124,47 ppm com seu sinal sobreposto pelos sinais de C-12/C-14, C-11/C-15, C-4 e C-13 (Figura 26 e Figura 27). As atribuições foram realizadas com o auxílio do RMN bidimensional HSQC (Figura 28) e pelo *software MestReNova 14.0*.

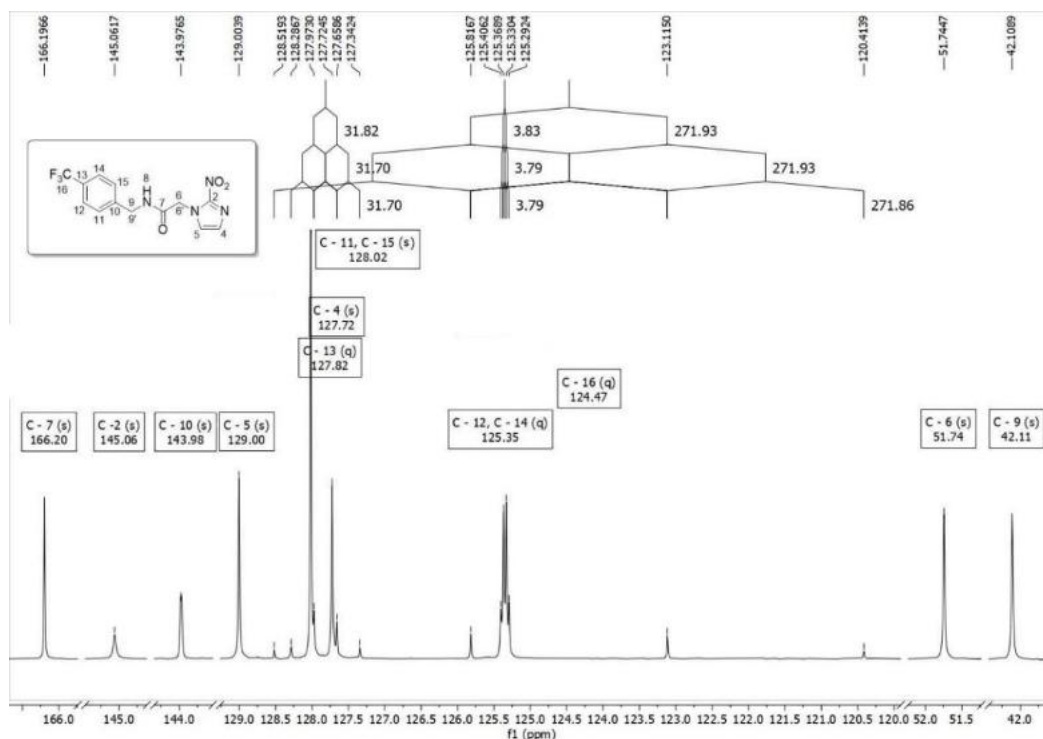


Figura 26. Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (100 MHz) do derivado **14**. Solvente: DMSO- d_6 .

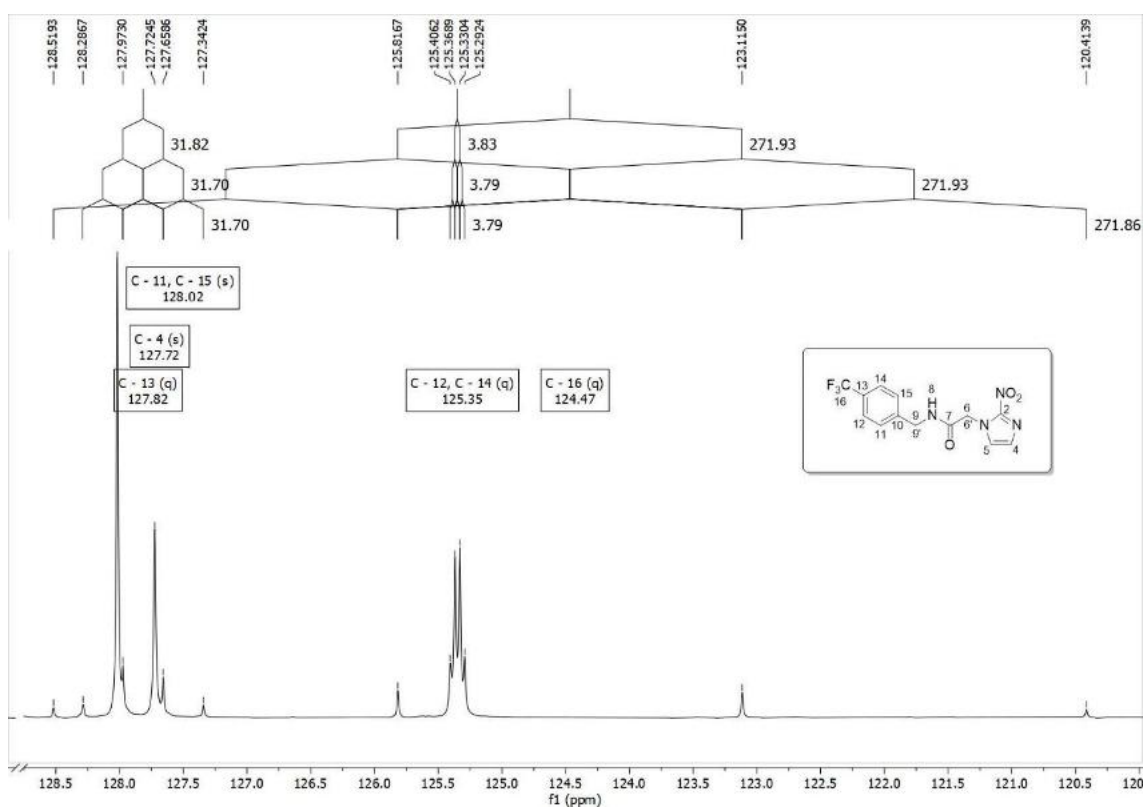


Figura 27. Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (100 MHz) do derivado **14**, com ênfase nos sinais que foram sobrepostos. Solvente: DMSO- d_6 .

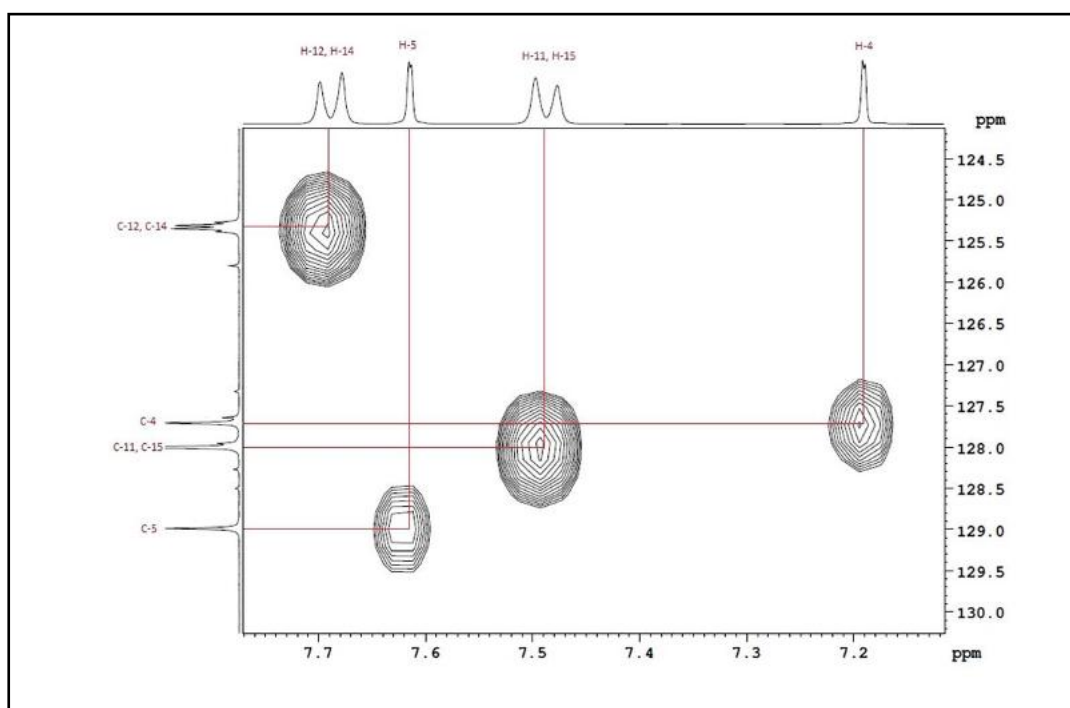


Figura 28. Espectro ampliado de RMN bidimensional de HSQC do derivado **14**.

Devido a presença de dois átomos de flúor no anel aromático nas posições *orto* e *para*, o espectro da substância **21** apresentou padrões diferentes de multiplicidade nos carbonos do anel. Dessa forma, C-12 se apresentou como um tripleto em 103,74 ppm devido ao acoplamento ($J = 25,8$ Hz) de mesma intensidade com F-16 e F-17. C-14 e C-10 formam um duplo duplete em 111,33 ppm 121,90 ppm respectivamente, devido ao acoplamento ($J = 21,1$ Hz e 3,67 Hz para C-14 e $J = 15,1$ Hz e 3,67 Hz para C-10) com os átomos de flúor. C-15 também se apresentou como um duplo duplete com baixa constante de acoplamento, por acoplar com F-16 e F-17 à distância ($J = 9,9$ Hz e 5,9 Hz). C-13 ligado diretamente à F-17 e C-11 ligado diretamente à F-16, também acoplam com F-16 e F-17 à distância, respectivamente. Dessa forma, estes se apresentam em dois duplos dupletos com $J = 148,92$ Hz e 12,3 Hz para C-13 e $J = 146,81$ Hz e 12,3 Hz para C-11. Além disso, C-9 também acopla a distância com F-16 ($J = 3,7$ Hz), formando um duplete (Figura 29). As atribuições foram realizadas com o auxílio do RMN bidimensional HSQC (Figura 30) e pelo programa computacional *MestReNova 14.0*.

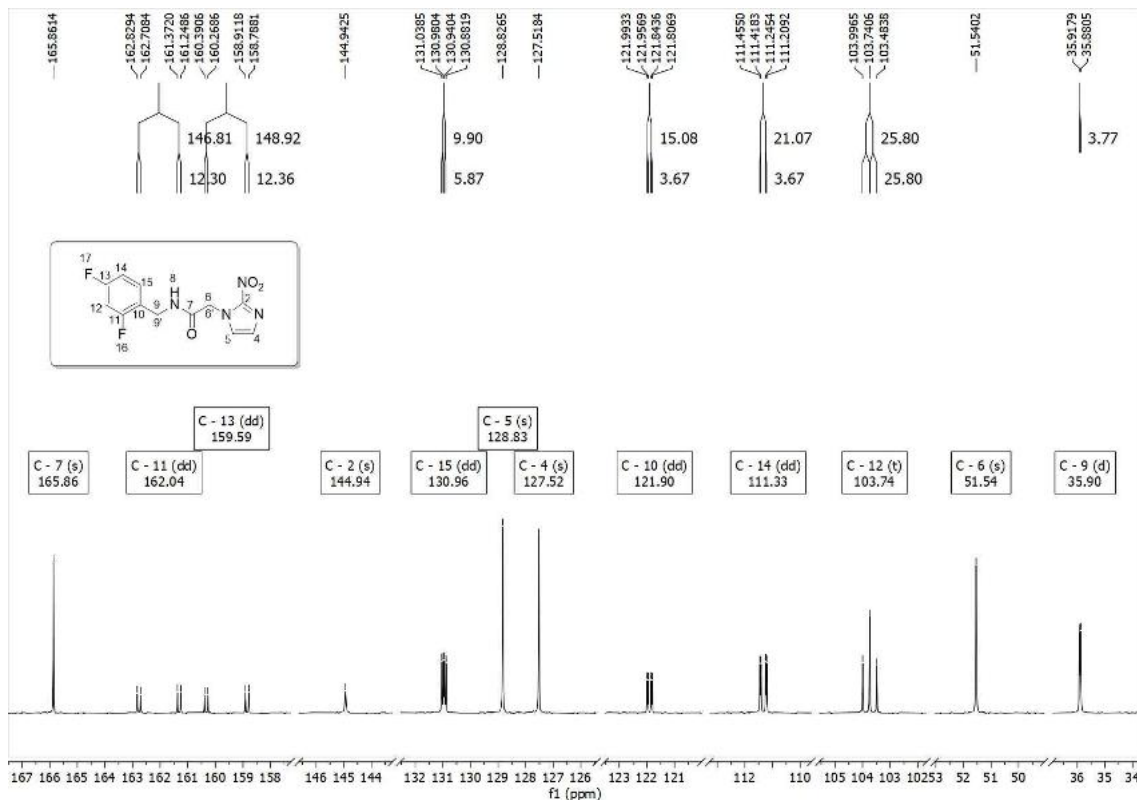


Figura 29. Espectro ampliado de RMN de ¹³C (100 MHz) do derivado **21**. Solvente: DMSO-d₆.

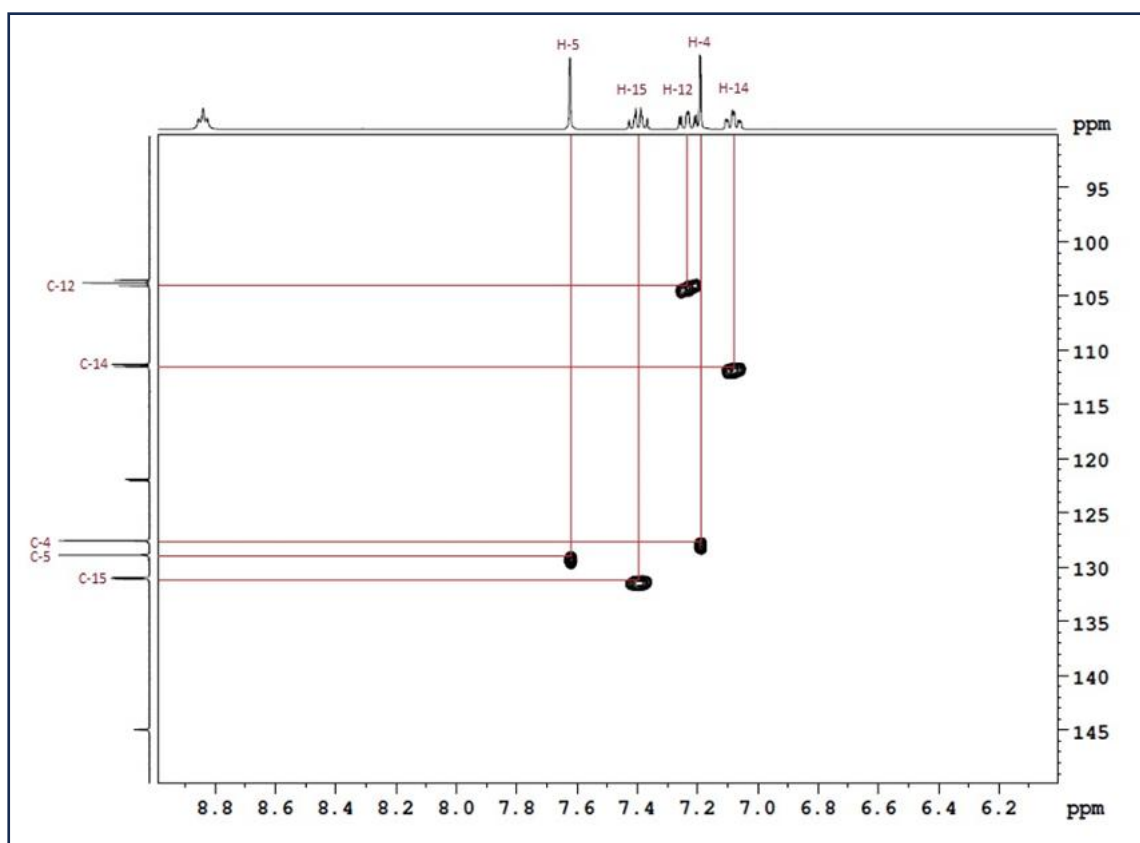
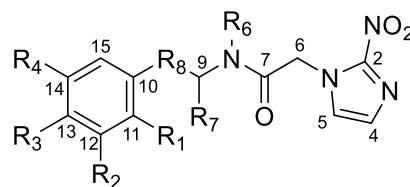


Figura 30. Espectro ampliado de RMN bidimensional de HSQC do derivado **21**.

Tabela 8. Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz) para os derivados **1-27**. Solvente: DMSO- d_6 .



Subs.	C-2	C-4	C-5	C-6	C-7	C-9	C-10	C-11	C-12	C-13	C-14	C-15	R1	R2	R3	R4	R6	R7	R8
001	144,98	130,01	128,85	51,56	165,49	40,67	136,39	135,86	127,49	127,17	125,80	127,89	18,59	-	-	-	-	-	-
002	144,98	128,25	128,86	51,63	165,68	42,30	138,75	127,54	137,44	127,54	127,88	124,34	-	21,02	-	-	-	-	-
003	144,94	127,45	128,79	51,57	165,56	42,06	136,02	127,22	128,84	135,79	128,84	127,22	-	-	20,64	-	-	-	-
004	144,95	127,52	128,84	51,57	165,96	40,30	135,76	132,13	129,18	129,00	127,20	128,88	-	-	-	-	-	-	-
005	144,55	127,12	128,44	51,20	165,53	41,33	141,16	126,58	132,67	126,49	129,80	125,45	-	-	-	-	-	-	-
006	145,41	127,97	129,29	52,05	166,28	42,10	131,97	129,57	128,72	138,48	128,72	129,57	-	-	-	-	-	-	-
007	144,96	127,51	128,84	51,56	165,84	36,26 (d; J = 4,5 Hz)	125,46 (d; J = 14,7 Hz)	160,09 (d; J = 244,6 Hz)	115,15 (d; J = 21,0 Hz)	129,19 (d; J = 8,1 Hz)	124,37 (d; J = 3,5 Hz)	129,66 (d; J = 4,3 Hz)	-	-	-	-	-	-	-
008	144,97	127,56	128,87	51,63	165,96	41,78 (d; J = 1,8 Hz)	142,00 (d; J = 7,1 Hz)	113,63 (d; J = 10,0 Hz)	162,29 (d; J = 243,3 Hz)	113,85 (d; J = 10,7 Hz)	130,29 (d; J = 8,1 Hz)	123,16 (d; J = 2,8 Hz)	-	-	-	-	-	-	-
009	144,32	126,86	128,18	50,95	165,09	40,97	134,48 (d; J = 3,0 Hz)	128,60 (d; J = 8,1 Hz)	114,42 (d; J = 21,3 Hz)	160,63 (d; J = 242,4 Hz)	114,42 (d; J = 21,3 Hz)	128,60 (d; J = 8,1 Hz)	-	-	-	-	-	-	-
010	145,39	128,01	129,32	52,03	166,81	40,57	134,14	148,33	125,16	128,98	134,27	130,04	-	-	-	-	-	-	-
011	144,81	127,42	128,72	51,49	166,03	41,53	141,34	121,70	147,73	121,85	129,76	133,83	-	-	-	-	-	-	-
012	144,83	127,44	128,73	51,47	166,02	41,75	146,45	128,10	123,37	146,95	123,37	128,10	-	-	-	-	-	-	-

013	145,39	127,99	129,30	52,08	166,53	42,28	140,96	124,39 – 123,76 (m)	129,61 (q; $J =$ 31,4 Hz)	124,39 – 123,76 (m)	131,77	129,83	-	124,70 (q; $J =$ 272,4 Hz)	-	-	-	-	-
014	145,06	127,72	129,00	51,74	166,20	42,11	143,98	128,01	125,35 (q; $J =$ 3,8 Hz)	127,82 (q; $J =$ 31,7 Hz)	125,35 (q; $J =$ 3,8 Hz)	128,01	-	-	124,47 (q; $J =$ 271,9 Hz)	-	-	-	-
015	145,00	127,49	128,84	51,62	165,69	37,55	126,17	156,71	110,55	127,91	120,15	128,35	55,36	-	-	-	-	-	-
016	144,97	127,52	128,86	51,64	165,73	42,23	140,52	112,57	159,38	112,57	129,39	119,35	-	54,98	-	-	-	-	-
017	144,97	127,47	128,81	51,59	165,49	41,80	130,78	128,63	113,73	158,34	113,73	128,63	-	-	55,09	-	-	-	-
018	144,85	127,42	128,73	51,48	165,75	41,52	138,40	129,00	120,91	147,19 (q; $J =$ 1,8 Hz)	120,91	129,00	-	-	120,00 (q; $J =$ 256,0 Hz)	-	-	-	-
019	144,97	127,50	128,83	51,61	165,71	42,04	138,90	127,89	126,61	138,11	126,61	127,89	-	-	139,87 128,93 127,37 126,61	-	-	-	-
020	145,37	128,00	129,29	79,61	166,52	52,00	135,50	133,56	129,11	132,96	127,76	130,85	-	-	-	-	-	-	-
021	144,94	127,52	128,83	51,54	165,86	35,90 (d; $J =$ 3,8 Hz)	121,90 (dd; $J =$ 15,1, 3,7 Hz)	162,04 (dd; $J =$ 146,8, 12,3 Hz)	103,74 (t; $J = 25,8$ Hz)	159,59 (dd; $J =$ 148,9, 12,4 Hz)	111,33 (dd; $J =$ 21,1, 3,7 Hz)	130,96 (dd; $J =$ 9,9, 5,9 Hz)	-	-	-	-	-	-	-
022	145,30	128,04	129,32	52,11	166,93	41,96	143,11	128,29 (q; $J =$ 3,8 Hz)	130,70 (q; $J =$ 32,8 Hz)	121,12 (p; $J =$ 3,9 Hz)	130,70 (q; $J =$ 32,8 Hz)	128,29 (q; $J =$ 3,8 Hz)	-	123,80 (q; $J =$ 272,8 Hz)	-	123,80 (q; $J =$ 272,8 Hz)	-	-	-
023	144,84	127,38	128,72	51,53	165,44	41,93	131,20	111,03	148,59	147,74	111,54	119,21	-	55,46	55,22	-	-	-	-
024	144,87	127,32	128,67	51,46	165,33	37,12	118,24	157,64	98,13	159,78	104,18	128,91	55,12	-	55,31	-	-	-	-
025	144,82	127,30	128,71	51,49	164,59	48,18	143,88	125,84	128,19	126,70	128,19	125,84	-	-	-	-	-	22,34	-
026	145,10	127,49 127,43	128,71 128,50	51,11 50,96	165,69 165,42	51,37 50,32	136,84 136,25	128,41 128,32	127,40 127,34	127,15 126,84	127,40 127,34	128,41 128,32	-	-	-	-	33,64 33,37	-	-
027	145,07	127,62	128,95	51,72	165,70	40,68	139,36	128,81	128,54	126,35	128,54	128,81							35,15

5.1.2.3.3. RMN de ^{19}F

As análises de RMN de ^{19}F de todos os derivados fluorados, **7-9**, **13**, **14**, **18**, **21** e **22**, foram realizadas com acoplamento com hidrogênios. É importante ressaltar que o átomo de flúor gera sinais extremamente blindados, geralmente com valores negativos, devido sua natureza eletrônica. Na tabela 9 é possível observar os dados espectrais de todos os derivados fluorados.

No espectro de flúor do derivado **9**, é possível observar um tripleto de tripletos em -115,93 ppm com integração para um flúor. Essa multiplicidade se dá pelo acoplamento do átomo de flúor com os hidrogênios H-12 e H-14 ($J = 9,7$ Hz) e pelo acoplamento à distância com os hidrogênios aromáticos H-11 e H-15 ($J = 5,5$ Hz) (Figura 31).

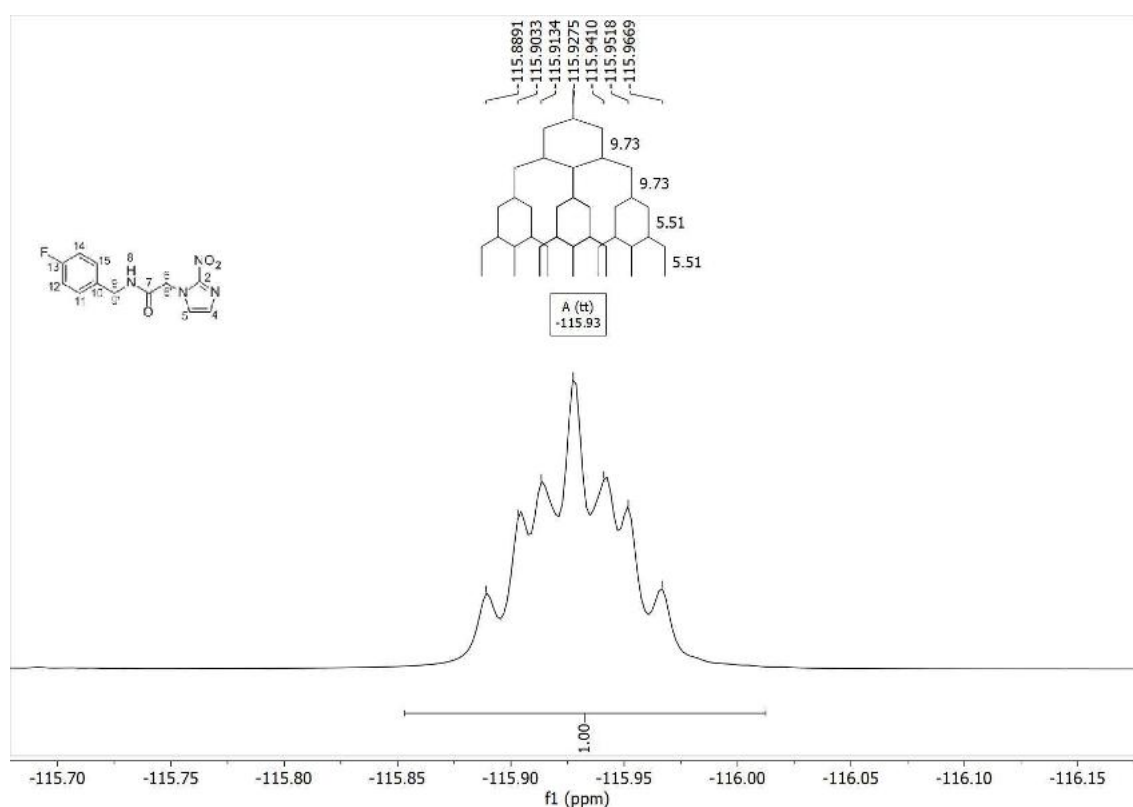


Figura 31. Espectro ampliado de RMN de ^{19}F (377 MHz) do derivado **9**. Solvente: DMSO- d_6 .

Já no espectro da substância **8**, é possível observar um tripleto de dupletos em -113,43 ppm referente ao acoplamento do átomo de flúor com H-11 e H-13 ($J = 9,6$ Hz) e à distância com H-14 ($J = 6,1$ Hz) (Figura 32).

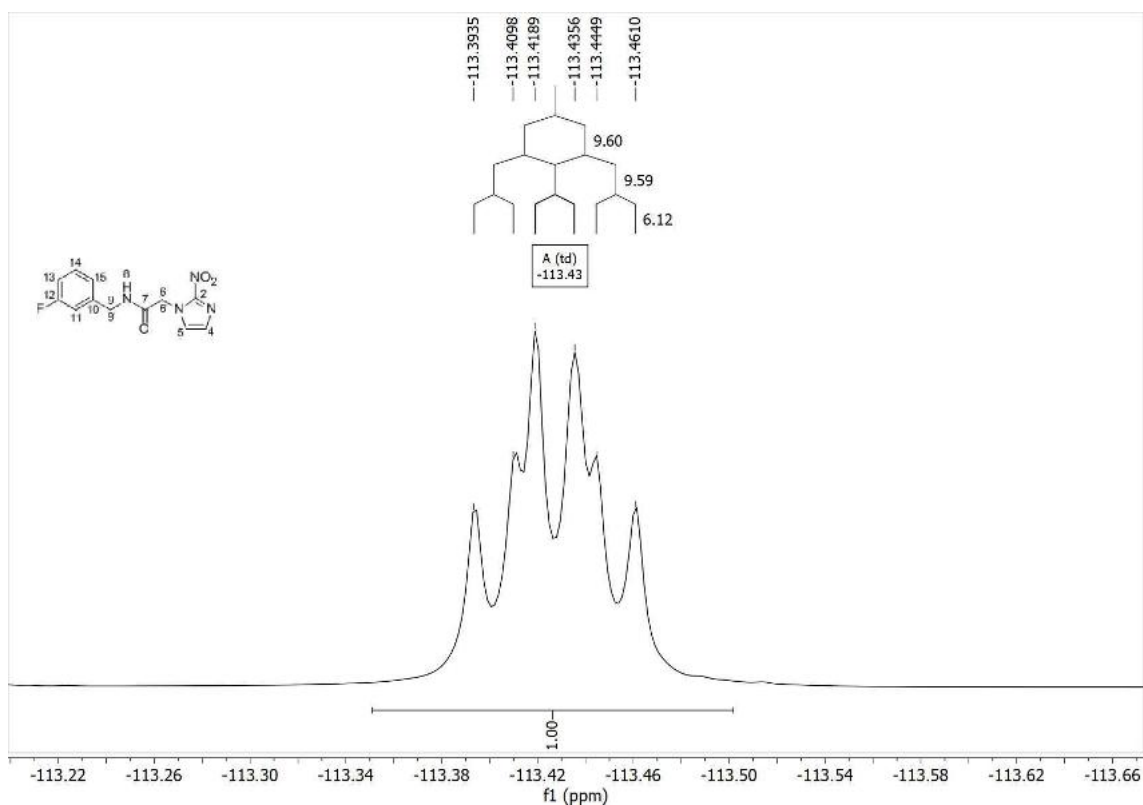
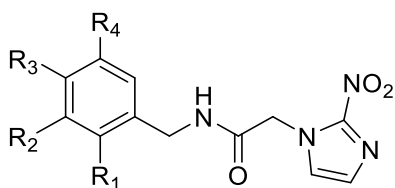


Figura 32. Espectro ampliado de RMN de ^{19}F (377 MHz) do derivado **8**. Solvente: DMSO- d_6 .

Tabela 9. Dados de RMN de ^{19}F (377 MHz) para os derivados **7-9**, **13**, **14**, **18**, **21** e **22**. Solvente: DMSO- d_6 .



Subs.	R1	R2	R3	R4
007	-118,84 (dt, $J = 11,8; 6,5$ Hz)	-	-	-
008	-	-113,43 (td; $J = 9,6, 6,1$ Hz)	-	-
009	-	-	-115,93 (tt; $J = 9,7, 5,5$ Hz)	-
013	-	-61,06 (s)	-	-
014	-	-	-60,82 (s)	-
018	-	-	-56,86 (s)	-
021	-111,65–-111,78 (m)	-	-114,21–-114,34 (m)	-
022	-	-61,34 (s)	-	-61,34 (s)

5.1.2.4. Determinação de pureza cromatográfica por CLUE-DAD

Para que pudessem prosseguir para os testes biológicos, todos os derivados finais foram analisados por CLUE-DAD no comprimento de onda de 361 nm. Todos os derivados **1-27** apresentaram pureza cromatográfica superior à 95%, que como dito anteriormente, é a porcentagem mínima necessária para que uma substância seja qualificada para os testes farmacológicos, evidenciando o alto grau de pureza das substâncias sintetizadas.

O cromatograma da substância **15** é apresentado como exemplo na Figura 33 e os dados de todas as substâncias são apresentados na Tabela 10.

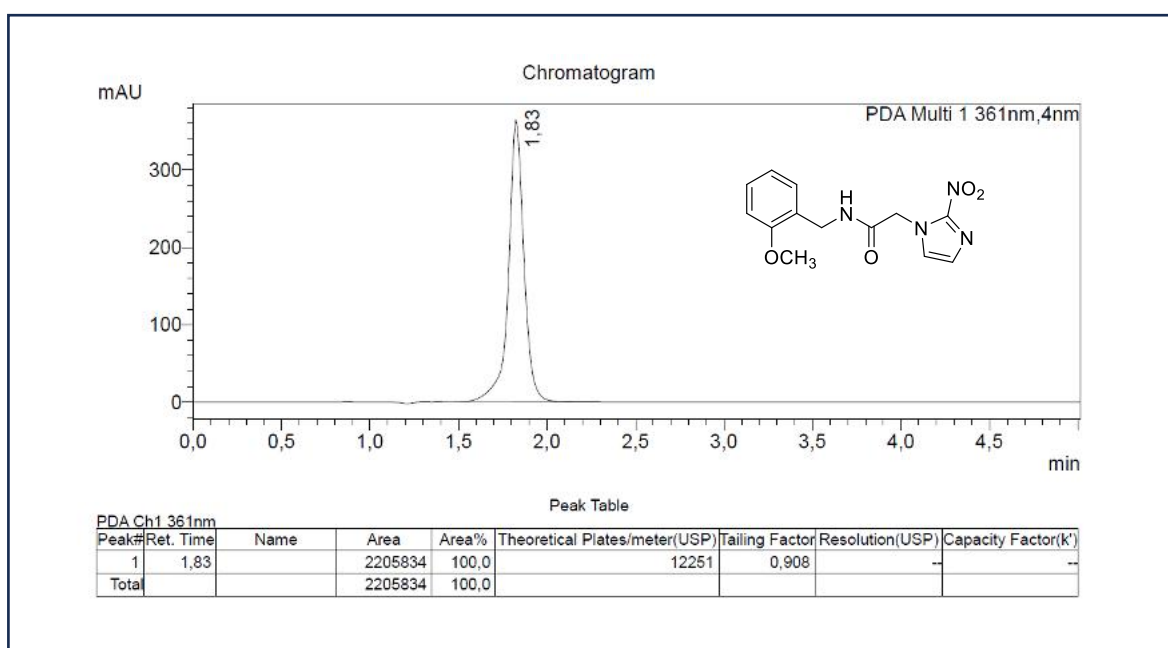


Figura 33. Cromatograma de CLAE-UV do derivado **15**. $\lambda = 361$ nm.

Tabela 10. Dados de pureza por CLAE-UV dos derivados **1-27**.

Substância	Pureza cromatográfica (%)
1	100
2	99,6
3	100
4	100
5	100
6	100

7	100
8	100
9	100
10	100
11	100
12	100
13	97,5
14	100
15	100
16	100
17	100
18	99,2
19	100
20	99,4
21	100
22	100
23	100
24	97,8
25	100
26	95,5
27	100

5.2. Predição *in silico* de parâmetros de farmacocinética

A descoberta de novos fármacos, desde o desenvolvimento da substância até a aprovação com o órgão regulador, é um processo notoriamente caro e demorado. Segundo um trabalho publicado por Michael e colaboradores em 2022, estima-se que para se desenvolver um fármaco, cerca de 161 milhões a 4,5 bilhões de dólares são gastos em um processo que pode durar mais de uma década (PAUL *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2022; WARING *et al.*, 2015). Além desses desafios encontrados no desenvolvimento de novos fármacos, outro contratempo é o fato de que a maioria das substâncias falham nos testes, de forma que a cada 10.000 substâncias desenvolvidas, cerca de 250 vão para os estudos pré-clínicos, podendo cair para cerca de 5 nos estudos clínicos e desses, apenas 1 é aprovado (SUN *et al.*, 2022).

Durante esse processo, uma grande parcela dos candidatos a fármacos falha nos estágios pré-clínicos e clínicos, frequentemente devido a problemas relacionados à farmacocinética e à

toxicidade (HARRISSON, 2016; PANTALEÃO *et al.*, 2022). Sendo assim, no processo de desenvolvimento de um novo fármaco deve haver um equilíbrio entre farmacodinâmica e farmacocinética, afinal de contas, apesar de a potência ser primordial, um fator determinante nas fases iniciais do desenvolvimento de fármacos, as propriedades farmacocinéticas e de toxicidade determinam mais a frente se a substância irá avançar e se terá sucesso terapêuticamente (LIN; LU, 2003).

A farmacocinética é dividida em quatro componentes principais que constituem a sigla ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) e os testes destes desempenham um papel crucial na avaliação da viabilidade de compostos candidatos a fármacos, sendo determinantes para prever a eficácia e a segurança (LIN; LU, 2003; VAN DE WATERBEEMD; GIFFORD, 2003). No entanto, apesar de sua importância, os testes empíricos de ADME apresentam dificuldades significativas, como o alto custo, longo tempo necessário para sua realização, além da complexidade em ajustar doses e prever a resposta em humanos com base nos testes realizados em animais. Essas limitações podem atrasar o processo de desenvolvimento e aumentar os custos totais, especialmente em estágios iniciais, onde um grande número de compostos precisa ser avaliado (HARRISSON, 2016; VAN DE WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; WARING *et al.*, 2015).

A predição de parâmetros farmacocinéticos *in silico* é uma abordagem que utiliza modelos computacionais para estimar propriedades essenciais de um composto, como ADME e toxicidade (VAN DE WATERBEEMD; GIFFORD, 2003). Essa estratégia baseia-se em algoritmos matemáticos e estatísticos alimentados por grandes bancos de dados experimentais, permitindo avaliar rapidamente um grande número de compostos antes de avançar para etapas mais dispendiosas. Dessa forma, a aplicação de métodos *in silico* pode não apenas reduzir o número de compostos descartados em fases tardias do desenvolvimento, mas também direcionar os esforços de síntese e testes experimentais para moléculas com maior probabilidade de sucesso (PANTALEÃO *et al.*, 2022). Estudos têm demonstrado que o uso dessas ferramentas pode reduzir substancialmente os custos e aumentar a eficiência no desenvolvimento de novos fármacos (SUN *et al.*, 2022; WARING *et al.*, 2015).

Todos os derivados desenvolvidos nesse trabalho foram avaliados utilizando a plataforma SwissADME (disponível em <http://www.swissadme.ch/>), uma ferramenta *in silico* capaz de prever propriedades farmacocinéticas e de *drug-likeness* (semelhança com fármacos) de moléculas. A plataforma possui acesso gratuito e foi desenvolvida pelo Instituto Suíço de

Bioinformática (*Swiss Institute of Bioinformatics*) (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2017). Os dados obtidos através da plataforma, são divididos em 6 categorias, que são essas: Propriedades físico-químicas, Lipofilicidade, Solubilidade Aquosa, Farmacocinética, *Druglikeness* e Química Medicinal, como pode ser observado através da Figura 34, onde temos a representação da predição gerada para o composto **1** na plataforma, que foi escolhido como exemplo. Além disso, essa plataforma conta um gráfico de radar para a biodisponibilidade e é capaz de gerar um modelo gráfico BOILED-Egg (*Brain Or IntestinaL EstimateD permeation method*) que será discutido adiante.

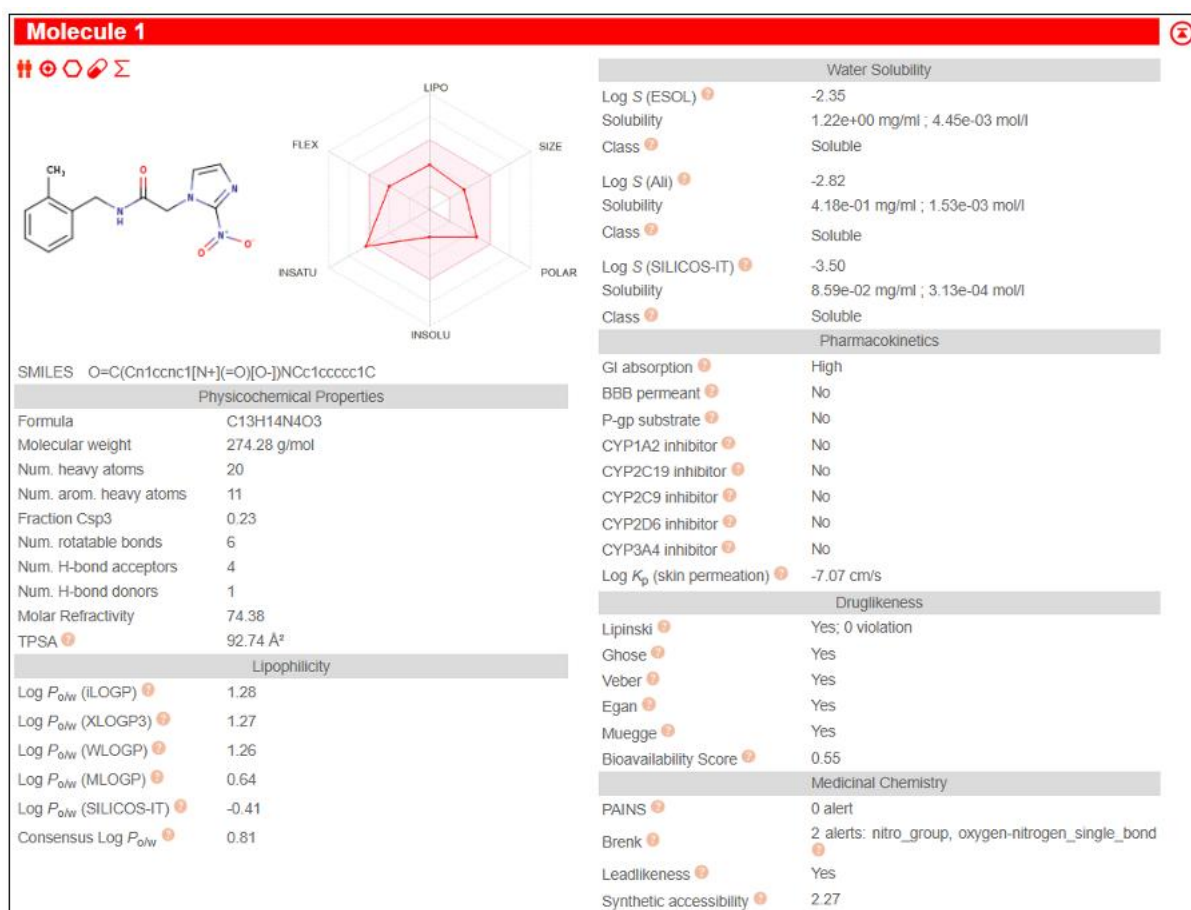


Figura 34. Dados de predição *in silico* realizados pelo SwissADME para o derivado **1**.

5.2.1. Categoria de predição das Propriedades Físico-químicas

A categoria de propriedades físico-químicas fornece informações essenciais para a caracterização molecular dos compostos. Essas propriedades incluem parâmetros

fundamentais, como a massa molecular (MM), número de átomos pesados aromáticos ou não, fração de Csp³, número de átomos de hidrogênio doadores (DLH) e aceptores (ALH), número de rotações livres (LR), refratividade molar (RM) e a área de superfície polar topológica (TPSA, do inglês *Topological Polar Surface Area*). Esses dados são cruciais para prever o comportamento da molécula em um ambiente biológico, influenciando sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Além disso, a análise dessas propriedades auxilia na compreensão da conformação espacial do composto, bem como em sua flexibilidade e potencial de interação com biomoléculas-alvo. Os dados preditos para os derivados **1-27** estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Predição da classe de propriedades físico-químicas dos derivados **1-27**

Derivados	Propriedades Físico-químicas								
	MM	Átomos pesados	Átomos aromáticos pesados	Fração Csp ³	LR	ALH	DLH	RM	TPSA
BZN	260,25	19	11	0,17	6	4	1	69,41	92,74
1	274,28	20	11	0,23	6	4	1	74,38	92,74
2	274,28	20	11	0,23	6	4	1	74,38	92,74
3	274,28	20	11	0,23	6	4	1	74,38	92,74
4	294,69	20	11	0,17	6	4	1	74,42	92,74
5	294,69	20	11	0,17	6	4	1	74,42	92,74
6	294,69	20	11	0,17	6	4	1	74,42	92,74
7	278,24	20	11	0,17	6	5	1	69,37	92,74
8	278,24	20	11	0,17	6	5	1	69,37	92,74
9	278,24	20	11	0,17	6	5	1	69,37	92,74
10	305,25	22	11	0,17	7	6	1	78,24	138,56
11	305,25	22	11	0,17	7	6	1	78,24	138,56
12	305,25	22	11	0,17	7	6	1	78,24	138,56
13	328,25	23	11	0,23	7	7	1	74,42	92,74
14	328,25	23	11	0,23	7	7	1	74,42	92,74
15	290,27	21	11	0,23	7	5	1	75,91	101,97
16	290,27	21	11	0,23	7	5	1	75,91	101,97
17	290,27	21	11	0,23	7	5	1	75,91	101,97
18	344,25	24	11	0,23	8	8	1	76,10	101,97
19	336,34	25	17	0,11	7	4	1	94,85	92,74

20	329,14	21	11	0,17	6	4	1	79,43	92,74
21	296,23	21	11	0,17	6	6	1	69,33	92,74
22	396,24	27	11	0,29	8	10	1	79,42	92,74
23	320,30	23	11	0,29	8	6	1	82,40	111,20
24	320,30	23	11	0,29	8	6	1	82,40	111,20
25	274,28	20	11	0,23	6	4	1	74,22	92,74
26	274,28	20	11	0,23	6	4	0	74,31	83,95
27	274,28	20	11	0,23	7	4	1	74,22	92,74

MM = peso molecular; LR = número de ligações rotacionáveis; ALH = número de aceptores de ligação hidrogênio; DLH = doadores de ligação hidrogênio; RM = refratividade molar; TPSA = área de superfície polar topológica.

5.2.2. Categoria de predição da Lipofilicidade

A lipofilicidade desempenha um papel muito importante no desenvolvimento de novos fármacos, pois influencia diretamente a absorção, a permeabilidade através das membranas biológicas e a interação com proteínas plasmáticas e metabolizadoras (LOMBARDO *et al.*, 2002). Compostos muito lipofílicos tendem a apresentar baixa solubilidade em meio aquoso, podendo comprometer sua biodisponibilidade (DI; KERNS; CARTER, 2012). Além disso, moléculas muito lipofílicas podem apresentar alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas, sofrer rápido metabolismo, e ter maior potencial de toxicidade (LEESON; SPRINGTHORPE, 2007). Por outro lado, compostos com baixa lipofilicidade podem apresentar dificuldade em atravessar as membranas celulares, reduzindo sua eficácia (WARING, 2009). Dessa forma, o equilíbrio adequado da lipofilicidade é fundamental.

Como discutido anteriormente, a lipofilicidade é frequentemente expressa pelo coeficiente de partição octanol/água (logP), que indica a capacidade da molécula de se distribuir entre um solvente orgânico e a água. A plataforma SwissADME calcula a lipofilicidade utilizando diferentes métodos, incluindo iLOGP, XLOGP3, WLOGP, MLOGP e SILICOS-IT, fornecendo uma visão abrangente desse parâmetro, e dispõe do valor consensual de Log *Po/w* é a média aritmética dos valores preditos nos modelos citados.

Para a análise das substâncias **1-27**, foram levados em consideração os valores de Log *Po/w* obtidos através do método XLOGP3 por ser considerado um dos melhores para predição de lipofilicidade em moléculas pequenas com átomos e grupos funcionais comuns, além de ser um método amplamente validado e confiável para moléculas orgânicas típicas (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). O valor encontrado através desse método para o BZN também é

o mais próximo do encontrado em valores experimentais para esse fármaco, que é em torno de 0,77 Log *Po/w* em água destilada, 0,78 Log *Po/w* em fluido gástrico e 0,76 Log *Po/w* no fluido entérico (MAXIMIANO, *et al.*, 2010).

Dessa forma, todos os derivados apresentaram bons valores de log *Po/w* e se encaixam dentro das faixas estabelecidas de todas as regras de *drug-likeness* avaliadas pela plataforma, que utilizam log P em um dos seus descritores, que são essas as regras de Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 2001), Egan (EGAN; MERZ; BALDWIN, 2000), Ghose (GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999) e Muegge (MUEGGE; HEALD; BRITTELLI, 2001). Esses resultados obtidos são importantes, já que como discutido anteriormente, a lipofilicidade é um parâmetro importante principalmente na fase crônica da DC. Todos os valores preditos de lipofilicidade dos compostos **1-27** estão disponíveis na Tabela 12.

Tabela 12. Predição da classe de lipofilicidade dos derivados **1-27**

Derivados	Lipofilicidade					
	iLOGP	XLOGP3	WLOGP	MLOGP	Silicos-IT	LogP
	Consensual					
BZN	1,15	0,91	0,96	0,37	-0,91	0,49
1	1,28	1,27	1,26	0,64	-0,41	0,81
2	1,78	1,27	1,26	0,64	-0,41	0,91
3	1,53	1,27	1,26	0,64	-0,41	0,86
4	1,83	1,54	1,61	0,91	-0,26	1,13
5	1,23	1,54	1,61	0,91	-0,26	1,01
6	1,72	1,54	1,61	0,91	-0,26	1,10
7	1,24	1,01	1,52	0,78	-0,48	0,81
8	1,33	1,01	1,52	0,78	-0,48	0,83
9	1,93	1,01	1,52	0,78	-0,48	0,95
10	0,35	0,74	0,86	-0,49	-3,02	-0,31
11	1,08	0,74	0,86	-0,49	-3,02	-0,17
12	0,77	0,74	0,86	-0,49	-3,02	-0,23
13	1,10	1,79	3,13	1,30	0,19	1,50
14	1,32	1,79	3,13	1,30	0,19	1,55
15	1,36	0,88	0,96	0,12	-0,86	0,49
16	1,63	0,88	0,96	0,12	-0,86	0,55

17	1,36	0,88	0,96	0,12	-0,86	0,49
18	1,57	2,09	3,12	0,52	-0,25	1,41-
19	1,93	2,54	2,62	1,67	0,68	1,89
20	1,36	2,17	2,26	1,44	0,40	1,53-
21	1,41	1,11	2,07	1,18	-0,04	1,15
22	1,56	2,68	5,30	2,19	1,33	2,61
23	1,61	0,85	0,97	-0,12	-0,79	0,50
24	2,09	0,85	0,97	-0,12	-0,79	0,60
25	1,62	1,31	1,34	0,64	-0,71	0,84
26	1,50	1,09	1,30	0,64	-0,99	0,71
27	1,21	1,30	1,15	0,64	-0,54	0,75

5.2.3. Categoria de predição da Solubilidade Aquosa

Assim como a lipofilicidade, a solubilidade aquosa da molécula é um parâmetro essencial, pois pode influenciar diretamente na absorção, biodisponibilidade e distribuição de um composto no organismo. Compostos altamente insolúveis podem apresentar dificuldades na formulação e comprometimento da absorção após administração oral. Por outro lado, compostos muito solúveis podem ser rapidamente eliminados do organismo, reduzindo seu tempo de meia vida, além de apresentar dificuldade em ser absorvida, devido a sua alta polaridade que diminui sua lipofilicidade, dificultando assim a difusão da substância pela bicamada lipídica das células.

A solubilidade aquosa é predita por meio de três modelos no SwissADME. O modelo ESOL (Estimated SOLubility), que fornece uma estimativa baseada em características estruturais do composto, como log P e número de átomos polares, o modelo Ali que correlaciona propriedades físico-químicas com dados experimentais de solubilidade e o modelo SILICOS-IT, que combina regras heurísticas e aprendizado de máquina para estimar a solubilidade, permitindo uma análise comparativa entre diferentes abordagens (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Os resultados são expressos em mg/L e mol/L, e classificados qualitativamente nas categorias insolúvel (I), pouco solúvel (PS), moderadamente solúvel (MdS), solúvel (S), muito solúvel (MS) e altamente solúvel (AS).

Todos os derivados **1-27** se mostraram como solúveis ou moderadamente solúvel de acordo com os valores preditos. Através do modelo ESOL, todos foram considerados como solúvel, no modelo ALI, apenas os derivados **19** e **22** foram considerados moderadamente

solúveis, contra os demais sendo caracterizados como solúveis. Os derivados **19** e **22** também foram considerados moderadamente solúveis, juntamente com o derivado **20** no modelo SILICOS-IT, enquanto os demais foram considerados solúveis. Nota-se que os derivados avaliados como moderadamente solúvel nos métodos ALI e SILICOS-IT são substâncias mais lipofílicas, no caso do derivado **19**, o substituinte é uma fenila, enquanto no derivado **22**, estão presentes dois grupos trifluorometila e no derivado **20**, dois átomos de cloro como substituintes. Por serem mais apolares e volumosos, esses substituintes podem atrapalhar moderadamente a solubilidade aquosa. Apesar disso, todos os derivados apresentaram um bom valor de solubilidade.

Quando comparado aos valores experimentais encontrados na literatura para o BZN, observamos uma certa discrepância com os valores preditos *in silico*, visto que a solubilidade experimental em água destilada para este fármaco é na faixa de 0,2-0,4 mg/mL (LAMAS, M., 2006; MAXIMIANO, *et al.*, 2010), enquanto os métodos apresentaram valores de 2,27e+00, 9,38e-01 e 1,97e-01 nos modelos ESOL, Ali e Silicos-IT, respectivamente. Podemos observar que apesar da diferença significativa, o modelo Silicos-IT foi o que melhor se aproximou do resultado experimental. Vale ressaltar que os próprios valores experimentais desse parâmetro divergem entre si, e também que os modelos *in silico* nem sempre correspondem exatamente aos valores experimentais, no entanto, são ferramentas importantes para a predição das propriedades, auxiliando na etapa de triagem e otimização estrutural dos compostos.

Todos os valores obtidos se encontram na Tabela 13.

Tabela 13. Predição da classe de solubilidade aquosa dos derivados 1-27

Derivados	Solubilidade Aquosa											
	ESOL				Ali				Silicos-IT			
	Log S	mg/mL	mol/L	Classe	Log S	mg/mL	mol/L	Classe	Log S	mg/mL	mol/L	Classe
BZN	-2,06	2,27e+00	8,72e-03	S	-2,44	9,38e-01	3,61e-03	S	-3,12	1,97e-01	7,57e-04	S
1	-2,35	1,22e+00	4,45e-03	S	-2,82	4,18e-01	1,53e-03	S	-3,50	8,59e-02	3,13e-04	S
2	-2,35	1,22e+00	4,45e-03	S	-2,82	4,18e-01	1,53e-03	S	-3,50	8,59e-02	3,13e-04	S
3	-2,35	1,22e+00	4,45e-03	S	-2,82	4,18e-01	1,53e-03	S	-3,50	8,59e-02	3,13e-04	S
4	-2,65	6,62e-01	2,25e-03	S	-3,10	2,36e-01	8,00e-04	S	-3,73	5,55e-02	1,88e-04	S
5	-2,65	6,62e-01	2,25e-03	S	-3,10	2,36e-01	8,00e-04	S	-3,73	5,55e-02	1,88e-04	S
6	-2,65	6,62e-01	2,25e-03	S	-3,10	2,36e-01	8,00e-04	S	-3,73	5,55e-02	1,88e-04	S
7	-2,21	1,71e+00	6,13e-03	S	-2,55	7,90e-01	2,84e-03	S	-3,40	1,12e-01	4,03e-04	S
8	-2,21	1,71e+00	6,13e-03	S	-2,55	7,90e-01	2,84e-03	S	-3,40	1,12e-01	4,03e-04	S
9	-2,21	1,71e+00	6,13e-03	S	-2,55	7,90e-01	2,84e-03	S	-3,40	1,12e-01	4,03e-04	S
10	-2,11	2,39e+00	7,82e-03	S	-3,23	1,80e-01	5,90e-04	S	-2,48	1,00e+00	3,28e-03	S
11	-2,11	2,39e+00	7,82e-03	S	-3,23	1,80e-01	5,90e-04	S	-2,48	1,00e+00	3,28e-03	S
12	-2,11	2,39e+00	7,82e-03	S	-3,23	1,80e-01	5,90e-04	S	-2,48	1,00e+00	3,28e-03	S
13	-2,89	4,18e-01	1,27e-03	S	-3,36	1,45e-01	4,40e-04	S	-3,98	3,45e-02	1,05e-04	S
14	-2,89	4,18e-01	1,27e-03	S	-3,36	1,45e-01	4,40e-04	S	-3,98	3,45e-02	1,05e-04	S
15	-2,12	2,20e+00	7,59e-03	S	-2,61	7,20e-01	2,48e-03	S	-3,24	1,67e-01	5,77e-04	S
16	-2,12	2,20e+00	7,59e-03	S	-2,61	7,20e-01	2,48e-03	S	-3,24	1,67e-01	5,77e-04	S
17	-2,12	2,20e+00	7,59e-03	S	-2,61	7,20e-01	2,48e-03	S	-3,24	1,67e-01	5,77e-04	S
18	-3,10	2,72e-01	7,90e-04	S	-3,86	4,74e-02	1,38e-04	S	-3,71	6,73e-02	1,95e-04	S

19	-3,57	9,12e-02	2,71e-04	S	-4,13	2,47e-02	7,34e-05	MdS	-5,60	8,39e-04	2,49e-06	MdS
20	-3,24	1,90e-01	5,76e-04	S	-3,75	5,85e-02	1,78e-04	S	-4,32	1,56e-0	4,75e-05	MdS
21	-2,37	1,27e+00	4,29e-03	S	-2,65	6,62e-01	2,24e-03	S	-3,67	6,38e-02	2,15e-04	S
22	-3,76	6,91e-02	1,74e-04	S	-4,28	2,08e-02	5,25e-05	MdS	-4,82	6,07e-03	1,53e-05	MdS
23	-2,19	2,08e+00	6,50e-03	S	-2,77	5,46e-01	1,70e-03	S	-3,35	1,42e-01	4,45e-04	S
24	-2,19	2,08e+00	6,50e-03	S	-2,77	5,46e-01	1,70e-03	S	-3,35	1,42e-01	4,45e-04	S
25	-2,38	1,15e+00	4,20e-03	S	-2,86	3,80e-01	1,39e-03	S	-3,15	1,95e-01	7,11e-04	S
26	-2,24	1,58e+00	5,78e-03	S	-2,45	9,84e-01	3,59e-03	S	-2,79	4,46e-01	1,63e-03	S
27	-2,30	1,36e+00	4,96e-03	S	-2,85	3,89e-01	1,42e-03	S	-3,52	8,26e-02	3,01e-04	S

Insolúvel (I); Pouco solúvel (PS); Moderadamente solúvel (MdS); Solúvel (S); Muito solúvel (MS); Altamente solúvel (AS).

5.2.4. Categoria de predição dos descritores de farmacocinética

A predição farmacocinética é uma ferramenta essencial para compreender como os compostos sintetizados podem interagir com sistemas biológicos. Dentro dessa categoria, destacam-se parâmetros que avaliam a interação com transportadores e enzimas metabólicas, além da capacidade de permeação através de barreiras biológicas. Na plataforma SwissADME são realizadas as predições de absorção gastrointestinal e permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), que serão tratadas mais a frente juntamente com o gráfico BOILED-Egg. Além dessas, são realizadas predições que avaliam se as substâncias têm possibilidade de serem inibidores das enzimas do citocromo P450 (CYPs), substratos da Glicoproteína-P (P-gp) e avaliam a permeabilidade na pele.

A Glicoproteína-P é um transportador de efluxo muito presente em barreiras biológicas como o intestino, o fígado e a barreira hematoencefálica. Ela atua como um mecanismo de defesa, bombeando substâncias estranhas para fora das células, o que pode limitar a absorção e a distribuição de fármacos. Quando um composto é identificado como substrato da P-gp, sugere que ele pode ser rapidamente expulso das células, reduzindo sua biodisponibilidade e eficácia terapêutica. Entre todos os derivados, apenas **23** e **24** foram avaliados como possíveis substratos da Glicoproteína-P.

O metabolismo mediado pelas CYPs, desempenham um papel muito importante na biotransformação de fármacos, sendo as principais responsáveis pelo metabolismo de fármacos na Fase I. Após serem metabolizadas, as substâncias podem ser inativadas pela CYP, podem se tornar espécies tóxicas ou serem ativadas, como é o caso dos medicamentos pró-fármacos. Algumas isoformas de CYP possuem maior relevância no quesito à metabolismo de fármacos, como a CYP3A4, que é responsável por metabolizar cerca de 50% dos fármacos existentes, representando cerca de 30% das CYPs totais presentes no fígado. O SwissADME permite prever se um composto atua como inibidor de isoformas específicas dessa família, como as CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4. Essas enzimas são responsáveis pelo metabolismo de grande parte dos fármacos, e sua inibição pode levar a interações medicamentosas significativas, além de inferir na diminuição no processo de excreção dessas substâncias, elevando em ambos os casos o risco de toxicidade. Assim, a predição da inibição das CYPs é essencial para garantir a segurança de uma substância.

Das 27 substâncias avaliadas, apenas 8 (**4**, **13**, **14**, **18-20**, **22** e **25**) foram consideradas como possíveis inibidores de CYP, entre esses inibidores, todos foram considerados como

possíveis inibidores da CYP2C19. Além disso, os derivados **20** e **22** foram avaliados como possíveis inibidores da CYP1A2, e o **19** também da CYP2C9 e CYP3A4, um resultado desfavorável quando comparado aos demais derivados. Apesar disso, é válido ressaltar que 19 dos derivados desenvolvidos, não inibem nenhuma isoforma CYP da predição, isso pode sugerir um baixo risco de interações medicamentosas relacionadas ao metabolismo hepático, que pode contribuir para um perfil farmacocinético mais seguro e previsível, reduzindo a probabilidade de efeitos adversos causados pela interferência no metabolismo de outros fármacos. Além disso, a não inibição das CYPs pode indicar uma maior estabilidade metabólica, vantajoso para a duração da ação terapêutica e para a otimização de doses caso alguma dessas substâncias venha a se tornar um fármaco. Todos os valores obtidos estão presentes na Tabela 14.

Tabela 14. Predição dos descritores da classe farmacocinética dos derivados **1-27**.

Farmacocinética							
Derivados	Substrato de P-gp	Inibidor CYP1A2	Inibidor CYP2C19	Inibidor CYP2C9	Inibidor CYP2D6	Inibidor CYP3A4	Log K _p (cm/s)
BZN	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,24
1	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,07
2	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,07
3	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,07
4	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	-7,00
5	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,00
6	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,00
7	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,28
8	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,28
9	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,28
10	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,64
11	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,64
12	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,64
13	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	-7,03
14	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	-7,03
15	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,45
16	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,45
17	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,45
18	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	-6,92

19	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	-6,55
20	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	-6,77
21	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,32
22	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	-6,81
23	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	-7,65
24	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	-7,65
25	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	-7,04
26	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,20
27	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7,05

5.2.5. Predição da categoria de descritores de *Drug-likeness*

A categoria *drug-likeness* é baseada em regras amplamente utilizadas na descoberta de fármacos, que ajudam a prever através de características físico-químicas e estruturais das substâncias se um composto possui propriedades adequadas para ser administrado por via oral e atingir seu alvo terapêutico. A plataforma SwissADME conta com 5 dessas regras que são elas: Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 2001), Ghose (GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999), Veber (VEBER *et al.*, 2002), Egan (EGAN; MERZ; BALDWIN, 2000) e Muegge (MUEGGE; HEALD; BRITTELLI, 2001). A plataforma também realiza a predição de uma pontuação de biodisponibilidade que é a probabilidade de uma substância ter uma biodisponibilidade oral maior do que 10% em ratos. A escala varia de 0 a 1, onde valores mais próximos de 1 indicam maior probabilidade de boa biodisponibilidade.

Todos os derivados, com exceção apenas de **10**, **11** e **12**, estão de acordo com todos os descritores de todas as 5 regras analisadas pela plataforma. Além disso, os valores obtidos dos derivados **10**, **11** e **12** correspondem a 4 das 5 regras, infringindo apenas um descritor da regra de Egan, que é a área de superfície polar topológica maior do que 131,6 Å², já que esses apresentam o valor de TPSA de 138.56 Å², no entanto esse parâmetro está dentro da regra de Veber por exemplo, que diz que o valor de TPSA deve ser de até 140 Å². Esses dados de *drug-likeness* obtidos reforçam a possibilidade de os compostos sintetizados terem um maior potencial de biodisponibilidade oral, boa absorção e menor risco de problemas relacionados à permeabilidade e solubilidade. Em relação a pontuação de biodisponibilidade, todos os derivados apresentaram o mesmo valor de 0,55. Todos os dados preditos estão presentes na Tabela 15.

Tabela 15. Predição dos descritores da classe de *drug-likeness* dos derivados **1-27**

<i>Drug-likeness</i>						
Derivados	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge	Pontuação de Biodisponibilidade
BZN	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
1	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
3	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
5	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
6	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
7	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
8	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
9	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
10	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	0,55
11	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	0,55
12	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	0,55
13	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
14	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
15	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
16	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
17	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
18	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
19	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
20	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
21	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
22	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
23	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
24	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
25	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
26	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55
27	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55

5.2.6. Predição da categoria de descritores de Química Medicinal

A categoria de química medicinal da plataforma fornece informações sobre o potencial dos compostos, avaliando a presença de alertas estruturais, viabilidade e complexidade sintética. Os métodos analisados nessa categoria são o filtro PAINS (*Pan-Assay Interference Compounds*), filtro de Brenk, *Leadlikeness* e a acessibilidade sintética.

O filtro PAINS identifica compostos que apresentam padrões estruturais frequentemente associados a interferências inespecíficas em ensaios biológicos, podendo gerar falsos positivos nos testes de atividade. A ausência de alertas PAINS nos compostos sintetizados é desejável, pois aumenta a probabilidade de que a atividade observada seja real. De todos os compostos **1-27**, nenhum apresentou alertas estruturais para o filtro PAINS.

O filtro de Brenk detecta fragmentos estruturais indesejáveis que podem impactar negativamente a biodisponibilidade, estabilidade metabólica ou segurança dos compostos. Grupos funcionais considerados como problemáticos geram alerta nesse filtro. Todos os derivados **1-27**, assim como o BZN apresentaram dois alertas no filtro de Brenk e ambos são relacionados ao grupo nitro. Como descrito anteriormente na introdução, o grupo nitro é constantemente associado a problemas de toxicidade e mutagenicidade, o que não é uma verdade absoluta.

O método de *Leadlikeness* avalia se um composto possui características de um *lead*, uma substância ponto de partida na otimização de novos fármacos. Diferente dos critérios de *drug-likeness*, que visam moléculas já otimizadas para uso clínico, a *leadlikeness* considera descritores mais flexíveis, permitindo ajustes estruturais durante o processo de desenvolvimento. Compostos que atendem a esses critérios têm maior probabilidade de serem modificados para melhorar suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas sem comprometer sua atividade biológica. No SwissADME esse filtro é calculado se baseando em 3 descritores: lipofilicidade, peso molecular e número de ligações rotacionáveis.

Entre os 27 compostos sintetizados, apenas 4 apresentaram alguma violação. Os derivados **18**, **23** e **24** violaram apenas o critério de número de ligações rotacionáveis ($LR > 7$), enquanto o composto **22**, além desse critério, violou também o peso molecular desejável pelo filtro ($MW > 350$). É importante destacar que 23 dos derivados desse trabalho não violaram nenhum dos descritores, e que mesmo aos que violaram, que esse é um critério utilizado para a

identificação de possíveis *leads*, e que esses mesmos compostos foram aprovados nos critérios preditos para *drug-likeness*.

Por fim, o filtro de acessibilidade sintética fornece um índice de dificuldade para a síntese química do composto, variando de 1 (fácil de sintetizar) a 10 (sinteticamente desafiador). Esse parâmetro é relevante porque compostos altamente complexos podem exigir rotas sintéticas longas e dispendiosas, dificultando sua produção em larga escala. Assim, moléculas com boa acessibilidade sintética são preferidas no desenvolvimento de novos fármacos, pois facilitam a escalabilidade da síntese e reduzem custos operacionais. A pontuação predita para os derivados variou entre 2,19 e 2,67. Todos os valores preditos de todas as avaliações dessa categoria estão presentes na Tabela 16.

Tabela 16. Predição dos descritores da categoria de Química medicinal dos derivados **1-27**

Química Medicinal				
Derivados	PAINS (Alertas)	Brenk (Alertas)	Leadlikeness (Violações)	Acessibilidade sintética
BZN	0	2	0	2,16
1	0	2	0	2,27
2	0	2	0	2,27
3	0	2	0	2,27
4	0	2	0	2,26
5	0	2	0	2,23
6	0	2	0	2,19
7	0	2	0	2,26
8	0	2	0	2,21
9	0	2	0	2,20
10	0	2	0	2,44
11	0	2	0	2,37
12	0	2	0	2,31
13	0	2	0	2,37
14	0	2	0	2,33
15	0	2	0	2,30
16	0	2	0	2,27
17	0	2	0	2,24
18	0	2	1	2,34

19	0	2	0	2,58
20	0	2	0	2,33
21	0	2	0	2,31
22	0	2	2	2,52
23	0	2	1	2,45
24	0	2	1	2,51
25	0	2	0	2,67
26	0	2	0	2,26
27	0	2	0	2,29

5.2.7. Predição da penetração na barreira hematoencefálica e da absorção gastrointestinal utilizando o gráfico BOILED-Egg

A ferramenta BOILED-Egg (*Brain Or Intestinal Estimated permeation method*), disponível na plataforma SwissADME, é um modelo gráfico utilizado para prever a permeabilidade de compostos bioativos na barreira hematoencefálica (BHE) e no trato gastrointestinal. Essa predição é baseada em dois descritores fundamentais: o coeficiente de partição octanol/água (Log Po/w), que reflete a lipofilicidade da molécula, e a polaridade molecular representada pela TPSA, que indica a capacidade da molécula de interagir por ligações de hidrogênio.

A avaliação da permeabilidade à barreira hematoencefálica é um fator crítico, especialmente no que diz respeito à segurança e ao perfil toxicológico, já que fármacos que não são direcionados a doenças do sistema nervoso central podem representar um risco significativo à toxicidade. Enquanto uma boa absorção no trato gastrointestinal é essencial, pois garante biodisponibilidade adequada e eficácia terapêutica, se a absorção for baixa, a concentração sistêmica do composto pode ser insuficiente, comprometendo sua ação.

O modelo BOILED-Egg classifica os compostos em duas regiões distintas no gráfico: a região amarela (gema), que corresponde a moléculas com alta probabilidade de atravessar a BHE e, portanto, com potencial de exercer efeitos no sistema nervoso central, e a região branca (clara), onde se encontram os compostos mais propensos a serem bem absorvidos pelo trato gastrointestinal. Além da permeabilidade, o modelo BOILED-Egg também fornece informações sobre a interação do composto com a Glicoproteína-P, que é representada por cores distintas nos pontos do gráfico: compostos classificados como substratos são indicados como

um círculo azul, enquanto os reconhecidos como não substratos são representados por círculos vermelhos.

Na Figura 34 está representado o gráfico gerado pela plataforma. Como podemos observar, todas as substâncias desenvolvidas nesse projeto foram categorizadas com uma boa absorção gastrointestinal, visto que todas se encontram dentro da área branca do gráfico. Ainda segundo a predição, nenhuma das substâncias são capazes de permear a BHE, se encontrando todas fora da área amarela do gráfico. Além disso, entre todos os 27 derivados desenvolvidos, apenas dois, que são os derivados **23** e **24**, que estão sobrepostos na figura, foram considerados como substratos da P-gp (Figura 35).

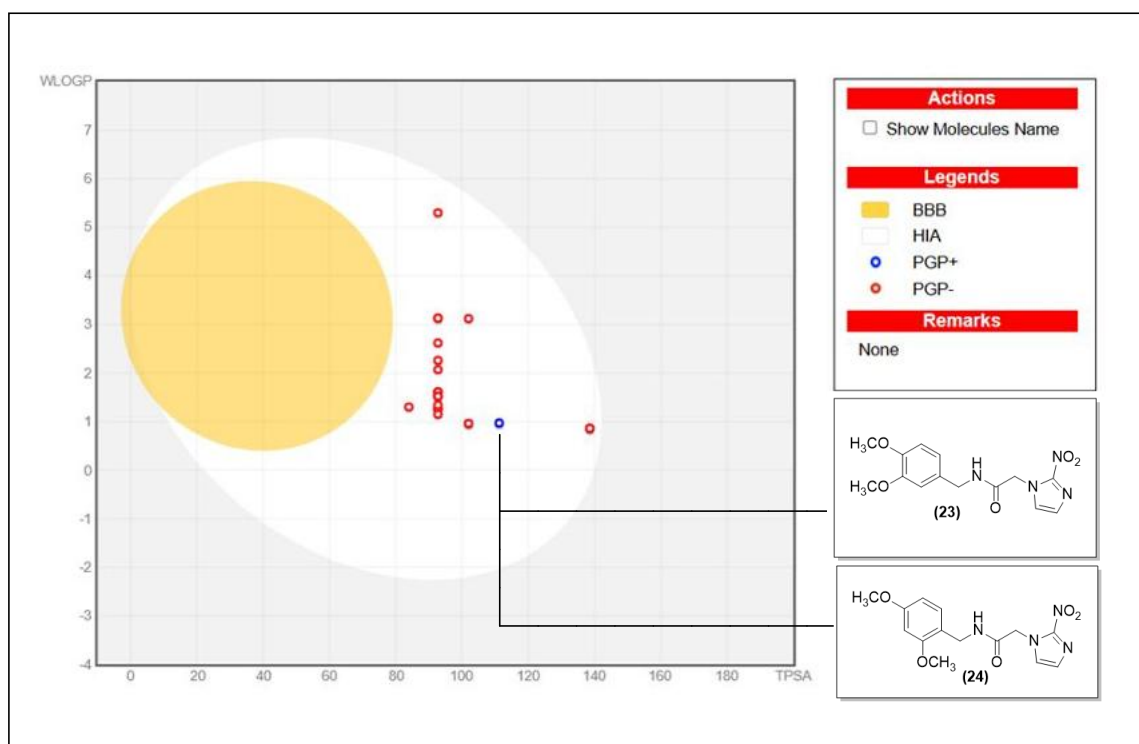


Figura 35. Predição da absorção gastrointestinal e penetração da barreira hematoencefálica utilizando o gráfico BOILED-Egg.

5.3. Avaliação biológica

Os derivados **1-27** foram submetidos a avaliações biológicas, englobando ensaios enzimáticos e celulares para investigar tanto a atividade contra o *T. cruzi* quanto a segurança dessas substâncias. A atividade biológica anti-*T. cruzi* foi analisada utilizando um modelo

intracelular com amastigotas e tripomastigotas e através da forma tripomastigota sanguínea isolada, enquanto a citotoxicidade foi determinada nas células hospedeiras. Além disso, foi avaliada a atividade enzimática na enzima nitroredutase de *T. cruzi*, contribuindo para um entendimento mais detalhado de seu possível mecanismo de ação. Os compostos mais promissores foram avaliados também *in vivo*.

5.3.1. Avaliação *in vitro* anti-*T. cruzi* em modelo intracelular contra a cepa Tulahuen

Os ensaios de avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* em modelo intracelular foram realizados conforme o método adaptado descrito por Romanha e colaboradores (SOEIRO *et al.*, 2007). Através desse método é possível refletir a interação do composto com as diferentes formas do parasito durante a infecção. No ambiente intracelular, são avaliadas tanto a forma amastigota, que se replica dentro das células hospedeiras, quanto a forma tripomastigota, que é liberada para o meio extracelular após o ciclo replicativo. Essa característica é essencial para compreender a eficácia de compostos que possam agir em diferentes estágios do ciclo de vida do parasito (ROMANHA *et al.*, 2010; SOEIRO *et al.*, 2007).

A avaliação é realizada utilizando a cepa Tulahuen devido às características únicas dessa, que facilitam a quantificação da carga parasitária e permitem uma análise eficiente da eficácia dos compostos testados. Essa cepa foi geneticamente modificada para expressar a enzima β -galactosidase (BUCKNER *et al.*, 1996). Esta enzima reage com o indicador vermelho de fenol- β -D-galactopiranosídeo liberando no meio o corante vermelho de fenol, desta forma é possível realizar a quantificação do processo através de espectrofotometria com absorbância em 570 nm. A escolha da cepa Tulahuen também está relacionada ao fato de que ela é bem adaptada ao modelo intracelular e reflete com fidelidade o comportamento do *T. cruzi* durante o ciclo de vida em um hospedeiro mamífero, além de possuir relevância clínica pois é capaz de infectar o ser humano. Nesse modelo, utiliza-se a linhagem de fibroblastos murinos L929 como células hospedeiras. Essas células são escolhidas por sua robustez, fácil cultivo em laboratório e alta capacidade de suportar a infecção pela cepa Tulahuen do *T. cruzi*.

Neste modelo de avaliação, os parasitas na forma tripomastigotas são inoculados ao meio contendo as células L929, estes infectam as células e se diferenciam para a forma amastigota dentro de 24 horas. Passado esse tempo, as substâncias são aplicadas ao meio, permanecendo em contato com as células infectadas por 96 horas à 37 C°. Durante esse período,

as formas amastigotas se dividem se diferenciando novamente em tripomastigotas, lisando a célula. Consequentemente, essas duas formas do parasito se encontram presentes no meio, sendo avaliada a atividade das substâncias sobre ambas, não sendo possível avaliar, através desse método, a atividade dos derivados sobre cada forma separadamente. Neste ensaio foi utilizado o BZN como controle positivo e como fármaco de referência. Esta avaliação foi realizada em colaboração com a Dra. Maria de Nazaré Correia Soeiro do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz (LBC/IOC/FIOCRUZ).

A atividade das substâncias é avaliada através de um sistema concentração-resposta, no qual são avaliadas diferentes concentrações. Desta forma, é possível estabelecer uma curva correlacionando estes dois parâmetros. Neste ensaio foram determinadas as concentrações efetivas dos derivados EC₅₀ e EC₉₀, que são os valores necessários para alcançar 50% e 90%, respectivamente, do efeito máximo desejado, que é eliminar o parasito da cultura. Paralelamente, é avaliada a concentração letal (LC₅₀) à célula hospedeira (L929) através do método colorimétrico com uso do indicador de atividade celular Alamar Blue. Esse método é amplamente utilizado para avaliar a viabilidade celular e determinar a toxicidade de substâncias. Ele contém um corante de coloração azul não fluorescente, a resazurina, que é reduzido a resorufina, um composto rosa fluorescente, por células metabolicamente ativas. Esse processo reflete a atividade mitocondrial, indicando a saúde das células. A intensidade da fluorescência ou da mudança de cor é proporcional à viabilidade celular.

Através dos valores de LC₅₀ e EC₅₀ é possível calcular o índice de seletividade (IS) que é uma métrica amplamente utilizada no processo de avaliação de compostos bioativos. Esse parâmetro é calculado como a razão entre o valor de LC₅₀, que representa a concentração do composto capaz de causar a morte de 50% das células hospedeiras, e o valor de EC₅₀, que corresponde à concentração necessária para inibir 50% do crescimento ou da atividade do patógeno. Dessa forma, o IS é expresso pela fórmula: $IS = LC_{50}/EC_{50}$. Um índice de seletividade elevado indica que o composto é eficaz contra o patógeno, enquanto apresenta baixa toxicidade para as células hospedeiras. Esse parâmetro é de extrema importância, visto que para que o composto avance para as avaliações *in vivo*, este necessita possuir um IS maior que 50 (ROMANHA *et al.*, 2010).

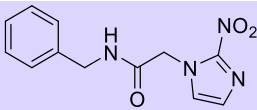
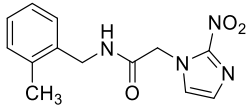
A classificação dos derivados referente a sua atividade antiparasitária e seletividade contra o *T. cruzi* seguiu os parâmetros estabelecidos pelo Programa Especial para Pesquisa em Doenças Tropicais (*Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*, TDR),

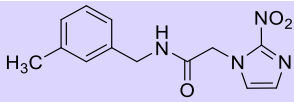
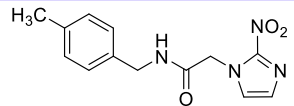
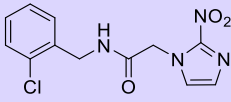
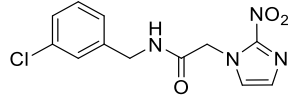
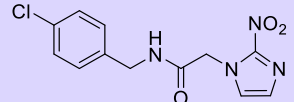
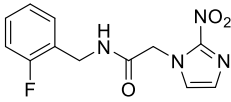
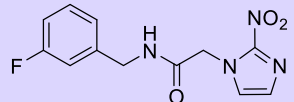
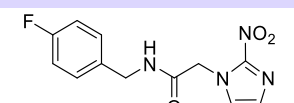
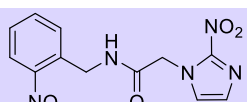
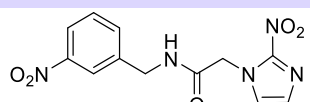
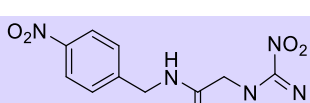
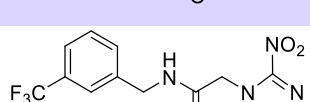
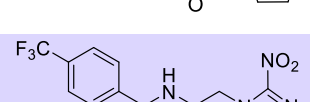
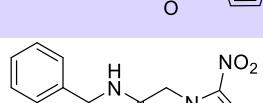
vinculado à Organização Mundial da Saúde (OMS). Este estabelece critérios utilizados para classificar a atividade de substâncias candidatas contra patógenos tropicais, incluindo o *T. cruzi*. Esses critérios categorizam os compostos com base em seus valores de EC₅₀ obtidos em ensaios *in vitro*. Compostos com valores de EC₅₀ inferiores a 4 µM são considerados ativos, enquanto aqueles com EC₅₀ entre 4 e 60 µM apresentam atividade moderada. Substâncias com EC₅₀ acima de 60 µM são classificadas como inativas. Ter um IS maior ou igual a 50 é o desejável (NWAKA; *et al.*, 2009).

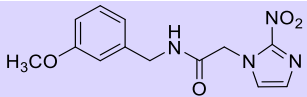
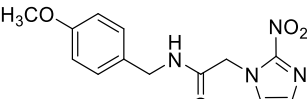
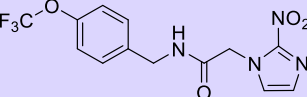
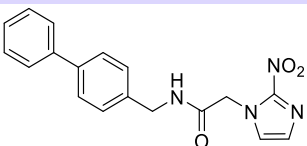
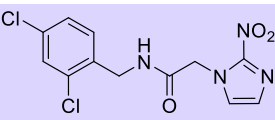
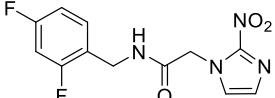
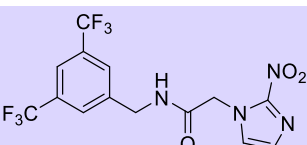
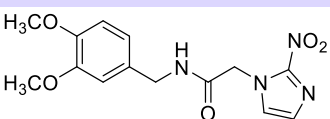
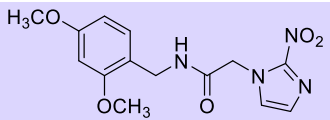
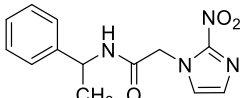
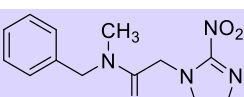
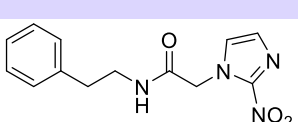
Da primeira série de derivados **1-24**, os compostos **1, 2, 4-8, 10, 11, 15, 16, 20 e 24** apresentaram atividade inibitória com valores de EC₅₀ menores do que 4 µM. Com exceção do composto **6** (> 49), todos esses apresentaram também alta seletividade (> 50). Entre esses derivados com boa atividade inibitória, os compostos **1, 5, 7, 8, 15, 20 e 24** apresentaram valores de EC₅₀ e EC₉₀ menores ou equivalentes ao do fármaco de referência, BZN (EC₅₀ = 2,52± 0,60 µM, EC₉₀ = 5,40 ± 0,54 µM). Os derivados **1** (EC₅₀ = 2,52± 0,60 µM), **15** (EC₅₀ = 1,01 ± 0,15 µM) e **20** (EC₅₀ = 1,73 ± 0,11 µM) foram os mais potentes da série, sendo 2,3, 2,5 e 1,5 vezes, respectivamente, mais potentes e mais seletivos do que o BZN (Tabela 17). Além disso, essas substâncias obtiveram valores de EC₉₀ maiores do que o fármaco de referência em 2,6, 2,4 e 4,2 vezes, respectivamente. O EC₉₀ é relevante, pois indica a eficácia do composto em uma concentração mais elevada, refletindo um cenário mais próximo das condições terapêuticas reais.

Dos derivados desenvolvidos da segunda série **25-27**, apenas o **27** apresentou atividade contra o *T. cruzi* (EC₅₀ = 5,25 ± 0,60 µM), no entanto foi menos potente e menos seletivo do que o fármaco de referência. Nenhum dos derivados desenvolvidos de ambas as séries apresentaram toxicidade mesmo na maior dose avaliada (LC₅₀ > 200 µM) (Tabela 17).

Tabela 17. Dados da avaliação *in vitro* contra *T. cruzi* em modelo intracelular.

Derivado	Estrutura	EC ₅₀	EC ₉₀	LC ₅₀	IS
BZN		2,52± 0,60	5,40 ± 0,54	> 200	>79
1		1,07 ± 0,02	2,09 ± 0,75	>200	>185

2		$3,79 \pm 0,46$	$10,55 \pm 0,24$	>200	>53
3		>10	ND	>200	ND
4		$3,38 \pm 0,61$	$8,23 \pm 2,11$	> 200	>59
5		$2,16 \pm 0,52$	$6,74 \pm 1,22$	>200	>93
6		$4,07 \pm 0,32$	$13,6 \pm 0,26$	>200	>49
7		$2,58 \pm 0,48$	$5,1 \pm 0,99$	>200	>77
8		$2,94 \pm 0,37$	$7,6 \pm 0,76$	>200	>68
9		$5,70 \pm 1,94$	$13,6 \pm 4,39$	>200	>35
10		$3,53 \pm 0,96$	$8,36 \pm 2,83$	>200	>57
11		$3,28 \pm 0,17$	$11,02 \pm 3,50$	>200	>61
12		$10,44 \pm 2,08$	$77,34 \pm 3,90$	>200	>19
13		>10	ND	>200	>16
14		$9,11 \pm 1,47$	$15,34 \pm 0,53$	>200	>22
15		$1,01 \pm 0,15$	$2,2 \pm 0,11$	>200	>198

16		$3,30 \pm 0,74$	122	>200	>60
17		>10	ND	>200	ND
18		>10	ND	>200	ND
19		$10,39 \pm 0,90$	$40,66 \pm 0,005$	>200	>19
20		$1,73 \pm 0,11$	$1,28 \pm 0,83$	>200	>115
21		$5,12 \pm 2,54$	$11,91 \pm 1,29$	>200	>39
22		>10	ND	>200	ND
23		>10	ND	>200	>10
24		$2,83 \pm 0,53$	$5,87 \pm 1,31$	>200	>71
25		>10	ND	>200	ND
26		>10	ND	>200	ND
27		$5,25 \pm 0,60$	$15,03 \pm 0,70$	>200	>38

ND = Não determinado

5.3.1.1. Avaliação da Relação estrutura-atividade anti-*T. cruzi*

A determinação do efeito biológico de uma molécula ocorre através da capacidade de esta interagir com alvos específicos no organismo, modulando vias bioquímicas ou processos fisiológicos. A interação entre o ligante e o alvo depende tanto da conformação que o ligante assume no sítio de ligação quanto das suas propriedades estruturais, dessa forma o estudo da relação estrutura-atividade (*Structure-Activity Relationship* - SAR) para determinar como as modificações estruturais realizadas nas moléculas afetam a atividade biológica se torna bastante relevante (HANSCH; LEO; HOEKMAN, 1995). Idealmente, um estudo completo de SAR deve levar em conta múltiplos parâmetros, incluindo afinidade ao alvo, permeabilidade, metabolismo, além de valores como EC₅₀ e índice de seletividade (HOPKINS; GROOM; ALEX, 2004). No entanto, neste trabalho, foi desenvolvido um estudo de SAR baseado exclusivamente nos valores de EC₅₀ das substâncias sintetizadas, que refletem sua potência contra o *T. cruzi*. Embora essa abordagem inicial não considere outros parâmetros, ela permite identificar tendências importantes entre a estrutura molecular e a atividade biológica.

Como os derivados desenvolvidos são análogos do BZN, para realizar a análise de SAR, foi utilizado esse fármaco como referência, dessa forma podemos analisar como a inclusão dos diferentes substituintes no anel aromático, além da modificação na cadeia entre o anel e o nitroimidazol, influenciam na atividade biológica dessas substâncias.

Dessa forma, analisando as estruturas químicas dos derivados **1**, **2** e **3** que tiveram a inclusão do grupo metila no anel aromático nas posições *orto*, *meta* e *para*, respectivamente, podemos observar que a inclusão de um substituinte na posição *orto* do anel promoveu um acréscimo de potência, fazendo com que o derivado **1** se tornasse 2,3 vezes mais potente do que o fármaco de referência. A alteração dessa metila para a posição *meta*, acarretou uma diminuição da atividade, de forma que o derivado **1** foi 3,5 vezes mais potente do que o derivado **2**, que também teve uma potência menor do que o BZN. Já com a inclusão da metila na posição *para*, no derivado **3**, nós notamos uma perda da atividade, onde mesmo na maior concentração testada, de 10 µM, a substância não foi capaz de inibir 50% da atividade parasitária (Figura 36).

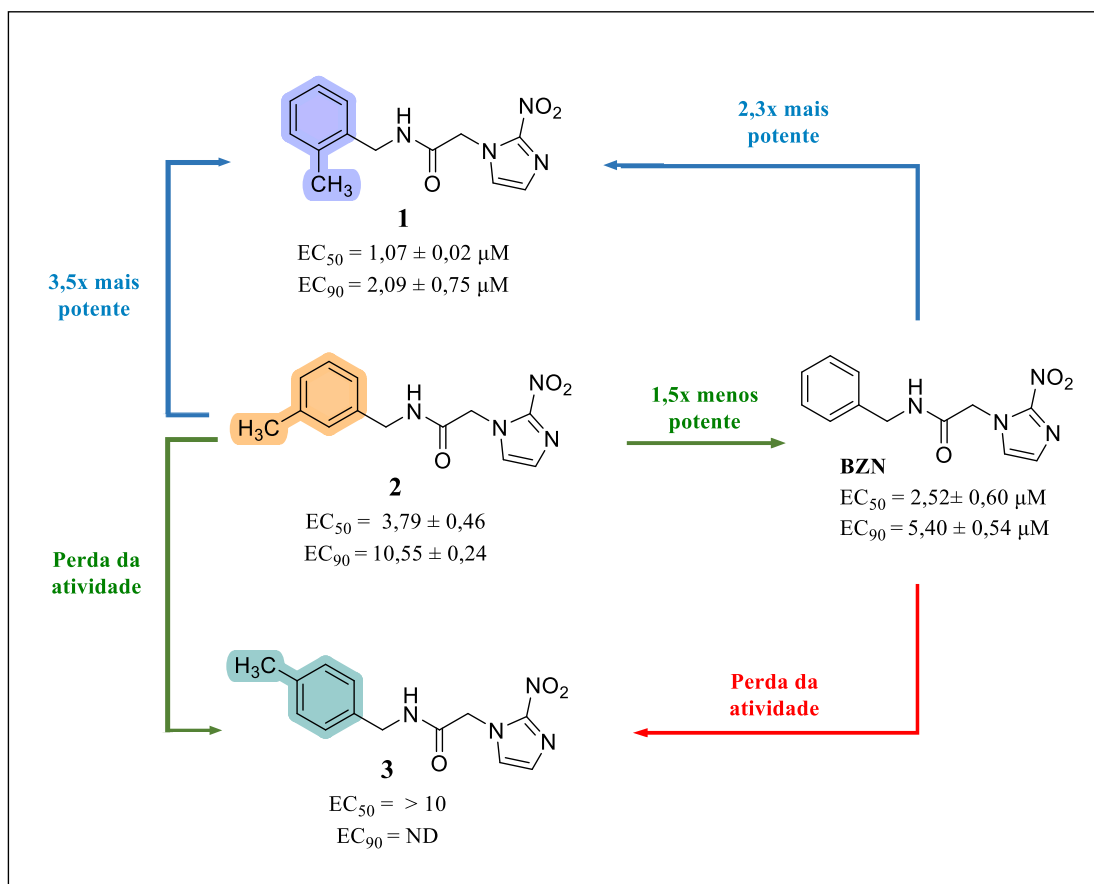


Figura 36. Avaliação preliminar da SAR dos derivados **1**, **2** e **3**. Em lilás: substituinte em *orto*, em laranja: substituinte em *meta* e em verde: substituinte em *para*.

Assim como para os derivados **1**, **2** e **3**, quando comparamos a maioria dos derivados que tiveram apenas uma substituição no anel aromático entre si, podemos observar que quando a substituição ocorre na posição *para*, independentemente do substituinte ser retirador ou doador de elétrons, ou independente do volume que este acrescenta, ocorre uma diminuição significativa ou perda da atividade contra *T. cruzi* (Figura 37). Uma possibilidade seria de que os substituintes em *para* podem dificultar estericamente a ligação da substância ao sítio ativo da enzima ou receptor, influenciando diretamente sua interação com o alvo molecular.

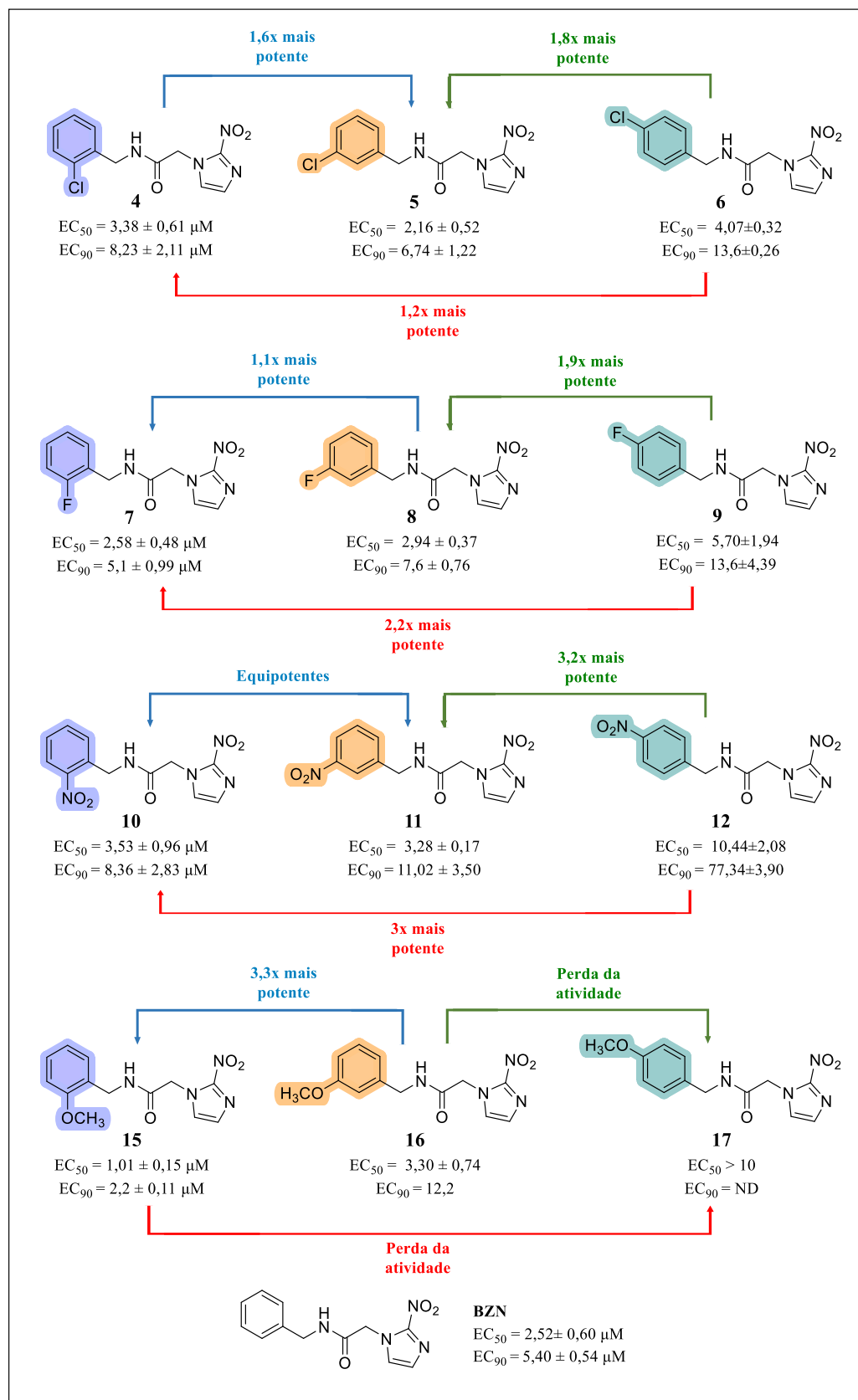


Figura 37. Avaliação preliminar da SAR dos derivados 4-12 e 15-17. Em lilás: substituinte em *orto*, em laranja: substituinte em *meta* e em verde: substituinte em *para*.

Esse padrão se repetiu também com a inclusão de substituintes mais volumosos na posição *para*, como nos derivados **18** e **19** (Figura 38A), reforçando a hipótese de um possível impedimento estérico nessa posição. Quando comparados ao BZN, o derivado **19** se mostrou menos potente enquanto o derivado **18** não apresentou atividade contra *T. cruzi*. A única exceção foi observada nos derivados **13** e **14** (Figura 38B), onde o derivado **13** com substituinte na posição *meta* se mostrou ineficaz contra o *T. cruzi*, enquanto **14** apresentou uma baixa atividade, mas ainda assim insuficiente segundo o TDR, sendo acima de 4 μM .

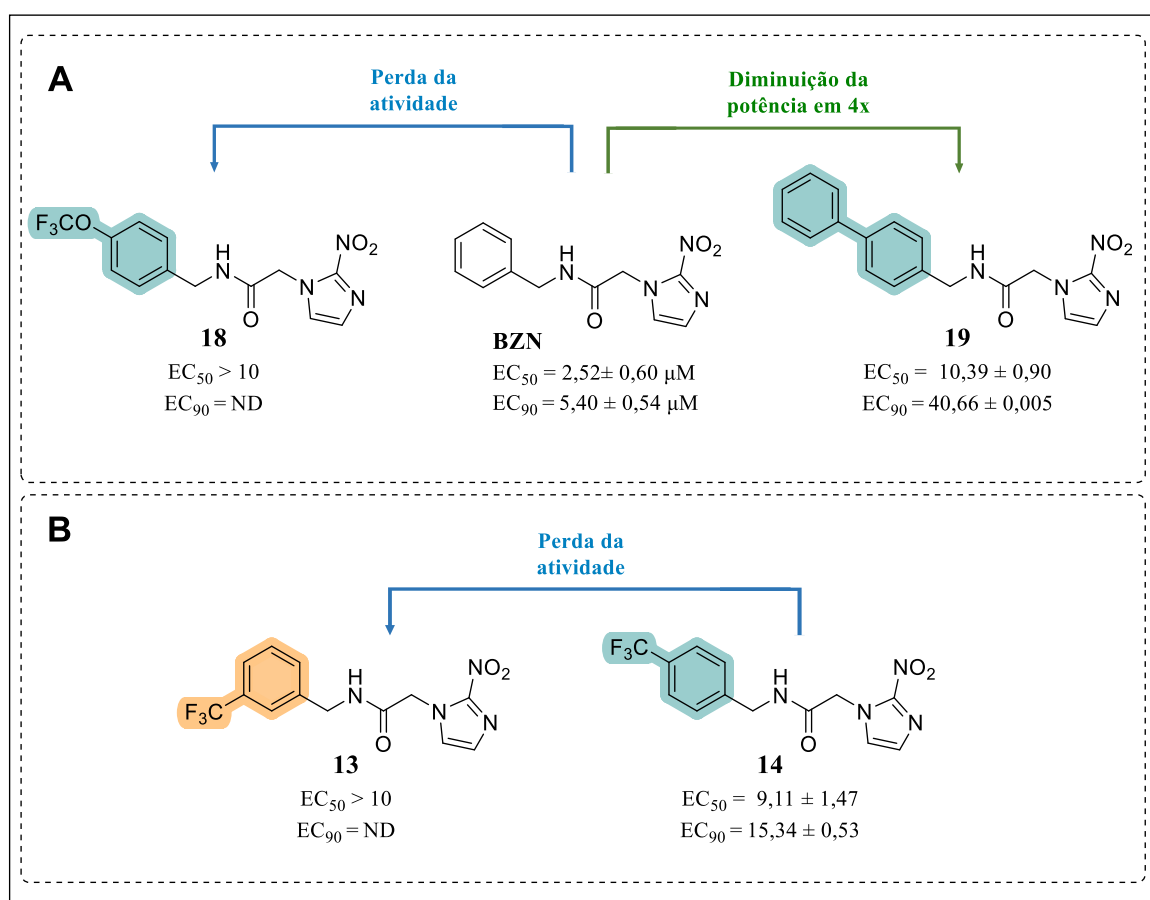


Figura 38. A) Avaliação preliminar da SAR dos derivados **18** e **19**. B) Avaliação preliminar da SAR dos derivados **13** e **14**. Em laranja: substituinte em *meta* e em verde: substituinte em *para*.

Com relação a alteração de substituintes na mesma posição, na posição *orto* observamos que a inclusão do grupo metoxi e metila, derivados **15** e **1**, respectivamente foram as mais importantes no quesito atividade, de forma que ambos foram cerca de 3,5 vezes mais potentes que o fármaco de referência, BZN (Figura 39). Esses compostos foram cerca de 2,6 vezes mais

potentes que o derivado fluorado (7), e cerca de 3,5 vezes mais potentes do que o derivado clorado (4) e o derivado com o grupo nitro (10), que apresentaram potência menor do que o BZN (Figura 40).

Uma característica que os grupos metila e metoxi tem em comum, é o fato de serem ambos doadores de elétrons, a metila via efeito indutivo, e o metoxi por ressonância, aumentando a densidade eletrônica do anel, efeito que pode ser importante para a atividade na posição *orto* do anel, favorecendo a interação com o alvo. Apesar do flúor e do cloro serem substituintes eletronegativos e reduzirem a densidade eletrônica do anel, fazem isso em menor proporção quando comparados ao grupo nitro que é um forte retirador de elétrons tanto por efeito indutivo quanto por ressonância, reduzindo drasticamente a densidade eletrônica do anel. Essa diminuição pode ter afetado negativamente a interação do composto com o sítio de ligação nessa posição do anel. Nesta posição, o efeito estérico também é importante, visto que é uma posição mais impedida, logo, átomos mais volumosos como o cloro, por exemplo, tendem a ter um maior impedimento estérico podendo prejudicar a atividade.

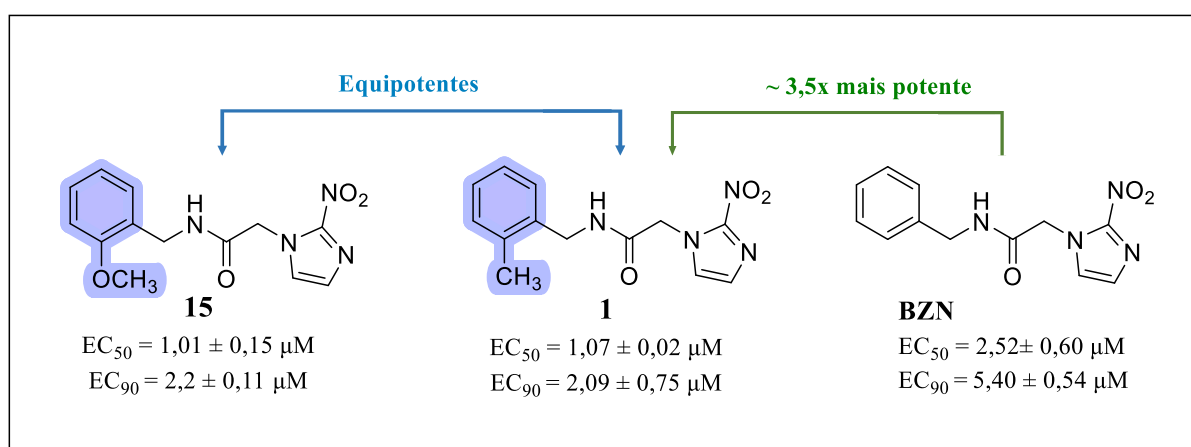


Figura 39. Avaliação preliminar da SAR dos derivados **15** e **1**.

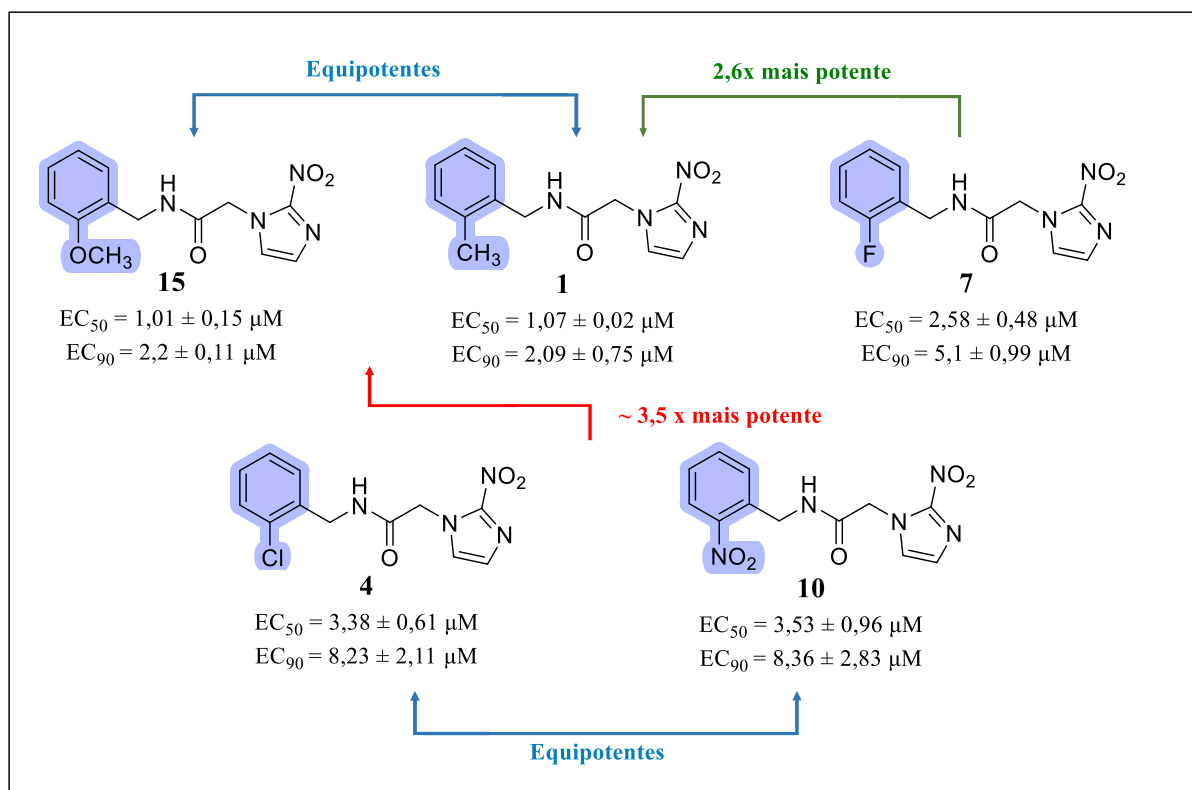


Figura 40. Avaliação preliminar da SAR dos derivados mono substituídos na posição *orto* **1**, **4**, **7**, **10** e **15**.

Na posição *meta* observamos que a inclusão do grupo cloro no derivado **5**, foi a mais importante, sendo esse derivado 1,2 vezes mais potente que o BZN (Figura 41). Esse composto apresentou uma potência cerca de 1,4 vezes maior que o derivado **8** com o flúor, 1,5 vezes maior que os derivados com o grupo nitro e grupo metoxi, **11** e **16**, respectivamente, que são equipotentes e 1,7 vezes maior que o derivado **2**, com a metila (Figura 42). Com exceção do derivado **5**, os demais compostos substituídos nessa posição não foram mais potentes que o BZN, apenas o derivado **8** que pode ser considerado como equipotente. A inclusão do grupo trifluorometila acarretou a perda da atividade contra o *T. cruzi*, como pode ser observado no derivado **13** (Figura 42).

Nesta posição, percebemos que a inclusão dos átomos mais eletronegativos como cloro, flúor e até mesmo o grupo nitro, não foram prejudiciais para a atividade dos compostos, tendendo que a redução da densidade eletrônica do anel deve ser importante para a ligação com o alvo. Observamos isso também com a inclusão do grupo metoxi que é um importante doador

de elétrons por ressonância e teve atividade equipotente ao composto com o grupo nitro **11**, de forma que esse efeito deve ser mais importante do que o indutivo nesta posição.

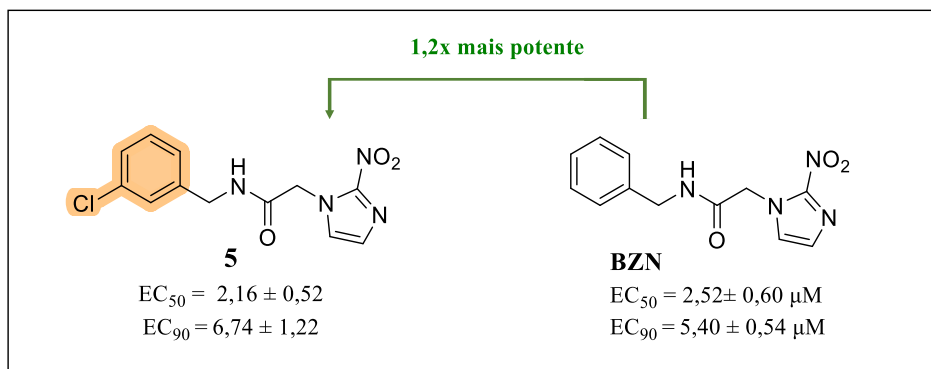


Figura 41. Avaliação preliminar da SAR do derivado **5**.

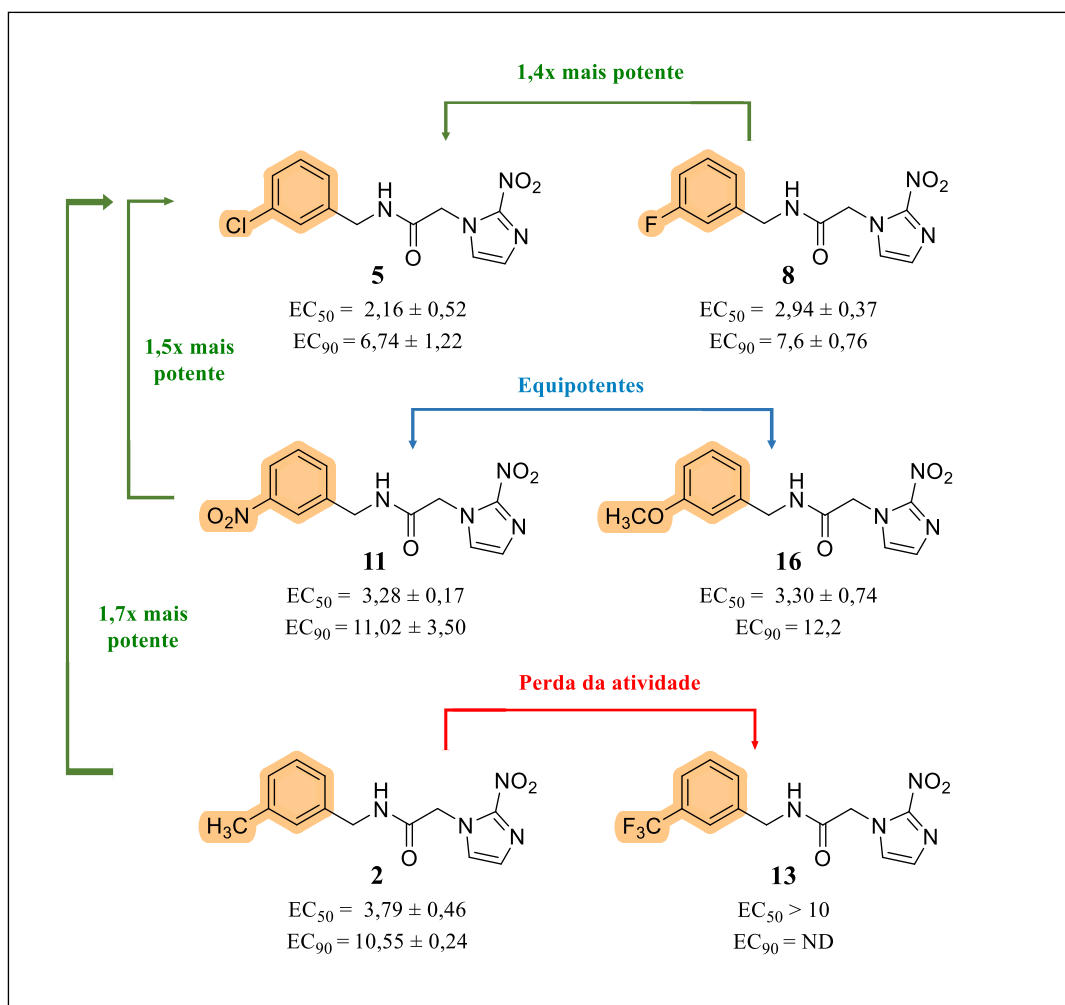


Figura 42. Avaliação preliminar da SAR dos derivados mono substituídos na posição *meta* **2**, **5**, **8**, **11**, **13** e **16**.

Como discutido anteriormente, os derivados substituídos em *para* não tiveram atividade importante contra o *T. cruzi*. O derivado clorado **6** foi o mais potente, sendo cerca de 1,4 vezes mais potente que o derivado fluorado **9**, 2,2 vezes mais potente que o derivado trifluorometila **14** e 2,5 vezes mais potente que os derivados **19** com a bifenila e o **12** com o grupo nitro que são equipotentes. Os derivados com os substituintes metoxi, metila e trifluorometoxi, **17**, **3** e **18**, respectivamente, não apresentaram atividade contra o parasito (Figura 43). Nenhum derivado foi mais potente que o BZN nessa posição, porém algo a se observar é que tanto na posição *meta*, quanto na posição *para*, os substituintes cloro e flúor foram os que promoveram maior atividade.

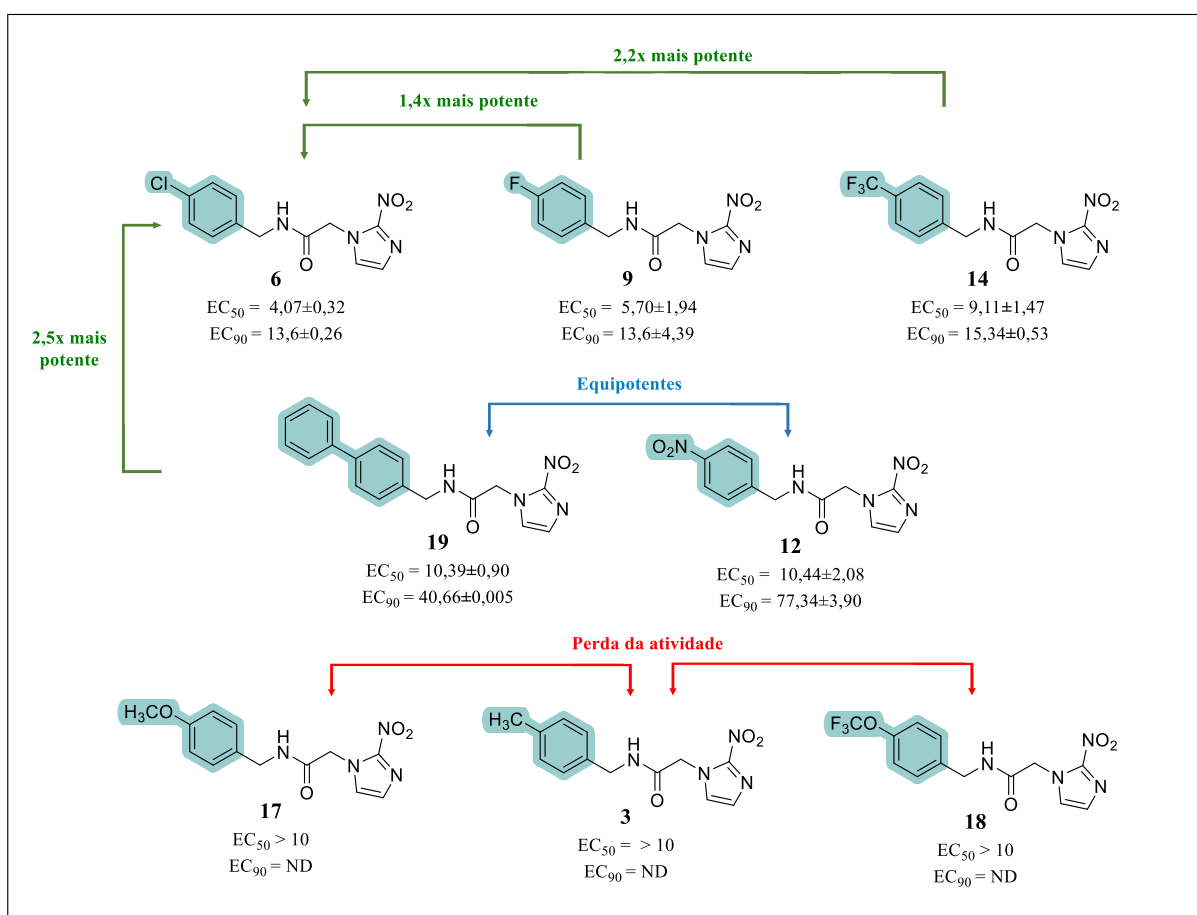


Figura 43. Avaliação preliminar da SAR dos derivados mono substituídos na posição *para* **3**, **6**, **9**, **12**, **14**, **17**, **18** e **19**.

Em relação aos derivados dessa série que foram substituídos em duas posições, o derivado 2,4-dicloro apresentou maior atividade, sendo mais potente que o BZN em 1,5 vezes

e que os derivados 2,4-dimetoxi (**24**) e 2,4-difluór (**21**) em 1,6 e 2,9 vezes, respectivamente. Esse foi o único derivado com a inclusão de dois substituintes que apresentou potência maior do que o fármaco de referência (Figura 44).

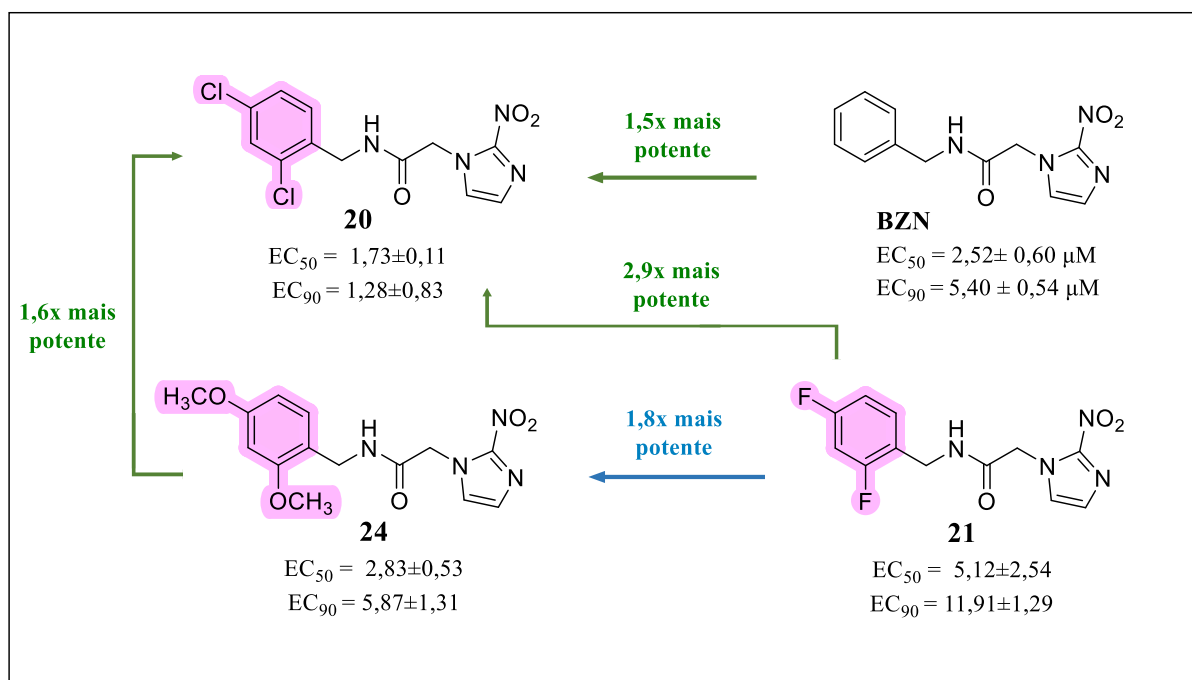


Figura 44. Avaliação preliminar da SAR dos derivados dissustituídos na posição *orto* e *para* **20**, **21** e **24**.

Os derivados dimetoxi **23** (3,4-dimetoxi) e **24** (2,4-dimetoxi), também foram comparados com relação a sua atividade. Através deles foi possível observar que a modificação de um dos grupos metoxi da posição *orto* para a *meta* no derivado **23**, fez com que o composto perdesse totalmente a atividade, que foi considerada alta no derivado **24**, similar à do BZN, reforçando mais uma vez a importância da posição *orto* para a atividade contra *T. cruzi* dessas substâncias (Figura 45) e também reduzindo a importância da posição *para* na redução/perda da atividade.

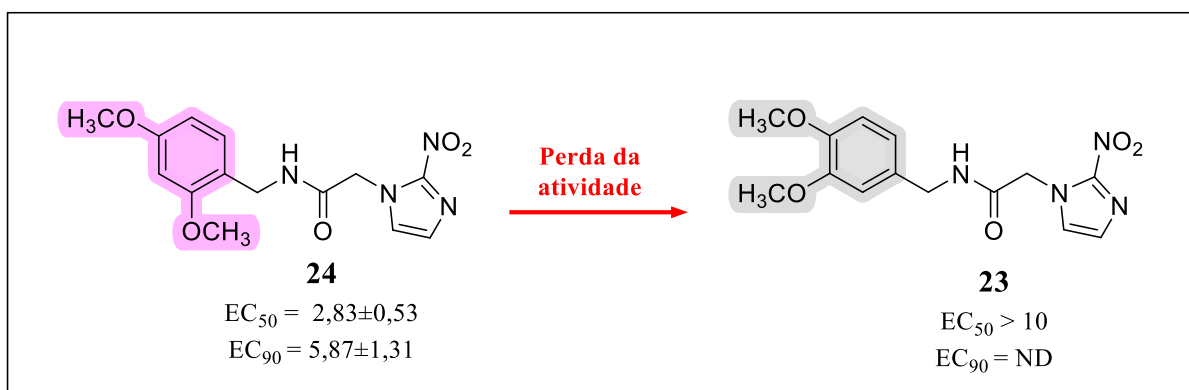


Figura 45. Avaliação preliminar da SAR dos derivados dimetoxi **23** e **24**.

O derivado **22** foi o único substituído nas duas posições *meta* do anel, e foi possível notar que a inclusão do grupo trifluorometila nessas posições levou a uma perda da atividade (Figura 46A). Por ser o único dissustituído em *meta*, não podemos afirmar que esse fator levou a perda de atividade, mas quando comparamos o derivado **22** com os derivados **13** e **14**, percebemos que no geral os derivados substituídos com o grupo trifluorometila apresentaram baixa atividade, ou ausência dela, indicando que esse não é um bom grupo para a atividade anti-*T. cruzi* nessa série de moléculas (Figura 46B).

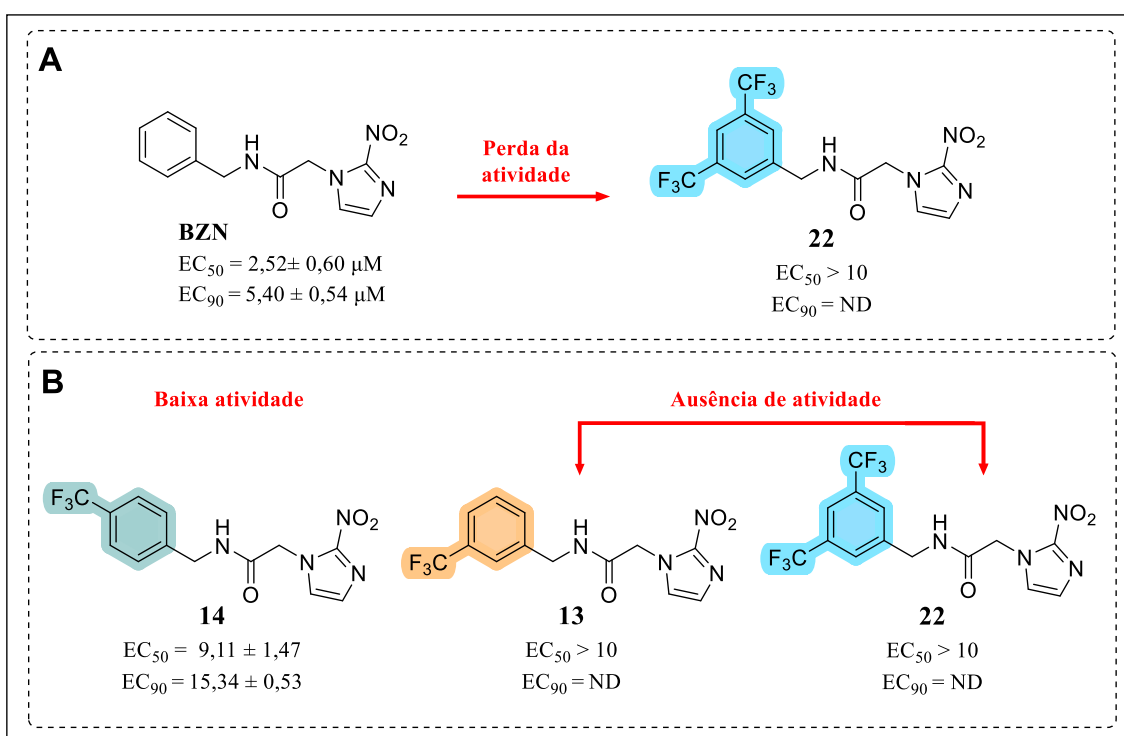


Figura 46. A) Avaliação preliminar da SAR do derivado **22**. B) Avaliação preliminar da SAR dos derivados **13**, **14** e **22**.

Na figura 47 estão identificadas a ordem de atividade do grupo de compostos substituídos com o mesmo grupo funcional em diferentes posições. Esses estão organizados de modo que da direita para a esquerda temos um aumento da potência. Dessa forma podemos observar que em sua maioria, a posição *para* foi a de menor atividade contra o *T. cruzi*, como discutido anteriormente, e que a posição *orto* mostrou ser aquela com maior atividade (Figura 47).

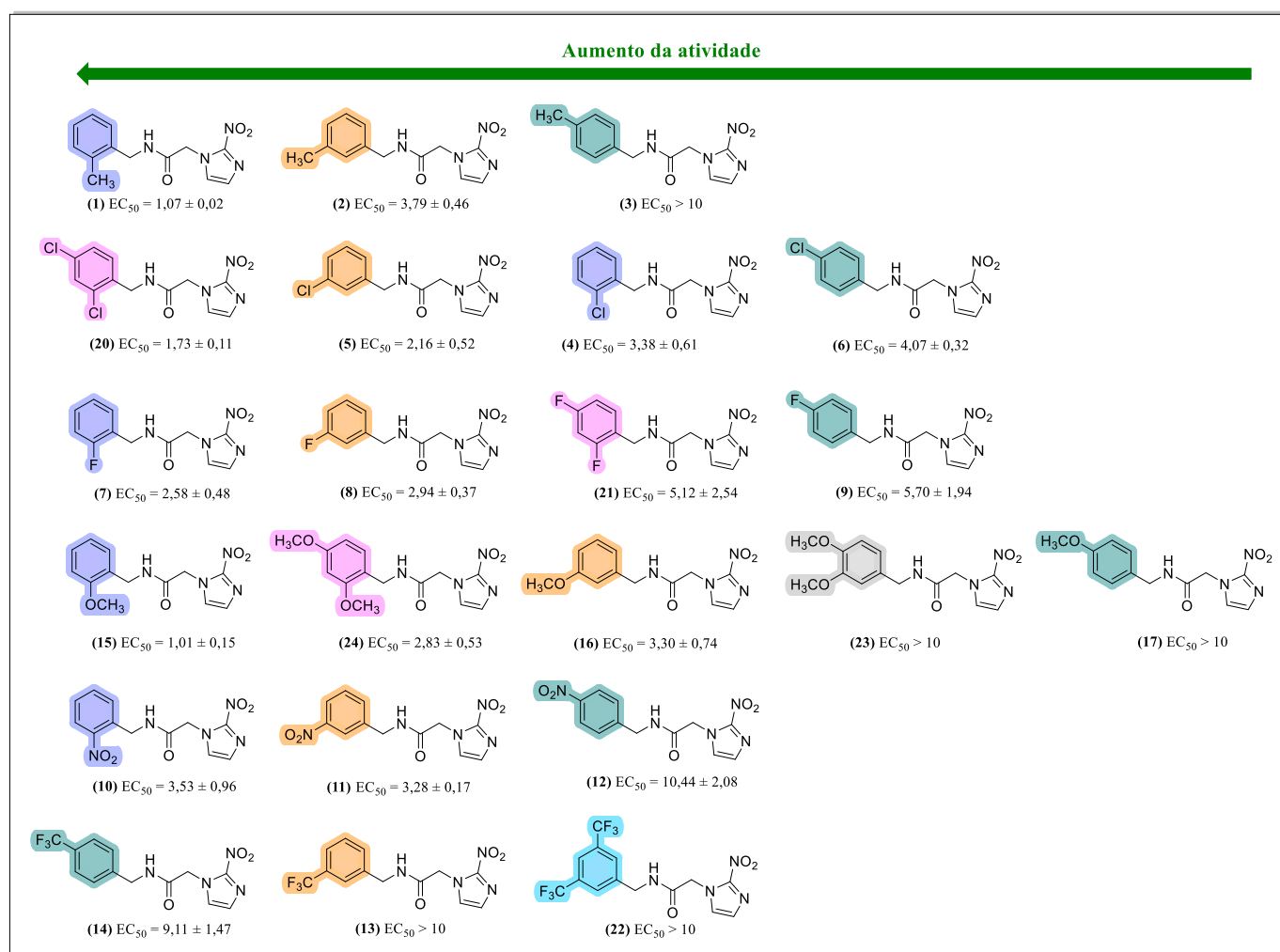


Figura 47. Comparação do aumento de potência dos derivados com relação a posição dos substituintes no anel aromático. Em lilás: substituintes em *orto*, em laranja: substituintes em *meta*, em

verde: substituintes em *para*, em rosa: substituintes em *orto-para*, em cinza: substituintes em *meta-para*, em azul: substituintes em *meta-meta*.

Finalizando os resultados de SAR da primeira série de compostos **1-24**, como discutido anteriormente, os derivados **1**, **15** e **20** foram os mais potentes da série, apresentando uma potência cerca de 2,5 vezes maior, no caso dos derivados **1** e **15** que são equipotentes, e 1,5 vezes maior (derivado **20**) do que o BZN, fármaco de referência (Figura 48).

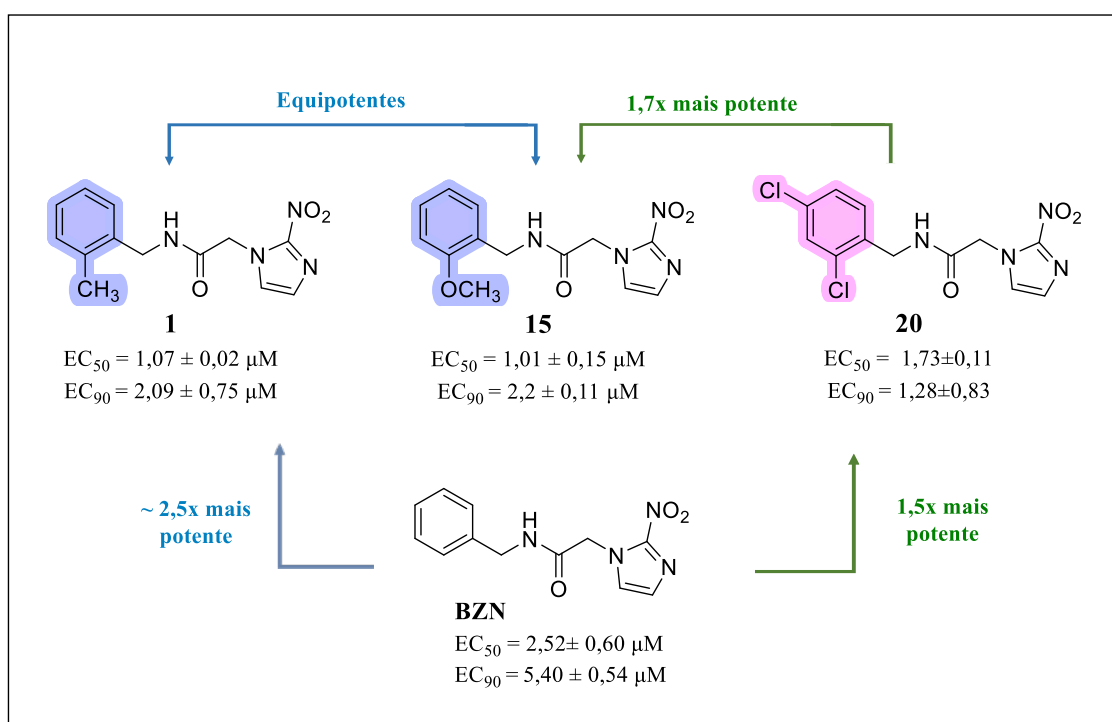


Figura 48. Avaliação preliminar da SAR dos derivados mais potentes da primeira série: **1**, **15** e **20**.

Para a segunda série de derivados **25-27**, observou-se que a modificação na cadeia não se mostrou vantajosa. Nas substâncias **25** e **26** (Figura 49) onde houve a inclusão de uma metila no carbono entre o anel aromático e a amida (**25**), e no nitrogênio da amida (**26**), houve uma perda da atividade. A alteração no composto **26**, mostra que apesar de não ser reconhecido como um grupamento farmacofórico, a presença da amida secundária é importante para a atividade da substância, visto que a inclusão da metila fez com que esse derivado perdesse totalmente a atividade anti-*T. cruzi*. Uma das possibilidades seria a de o hidrogênio ligado ao nitrogênio ser

responsável por uma ligação de hidrogênio com o alvo, que foi interrompida com a substituição desse pela metila. No derivado **25**, observamos que a inclusão desse substituinte entre o anel e a amida também foi prejudicial, levando a ausência de atividade. Uma possibilidade para isso seria de uma redução na flexibilidade da molécula, já que essa poderia introduzir um efeito estérico, limitando a rotação ao redor da ligação simples entre os grupos vizinhos e possivelmente dificultando o ajuste conformacional do composto à biomacromolécula.

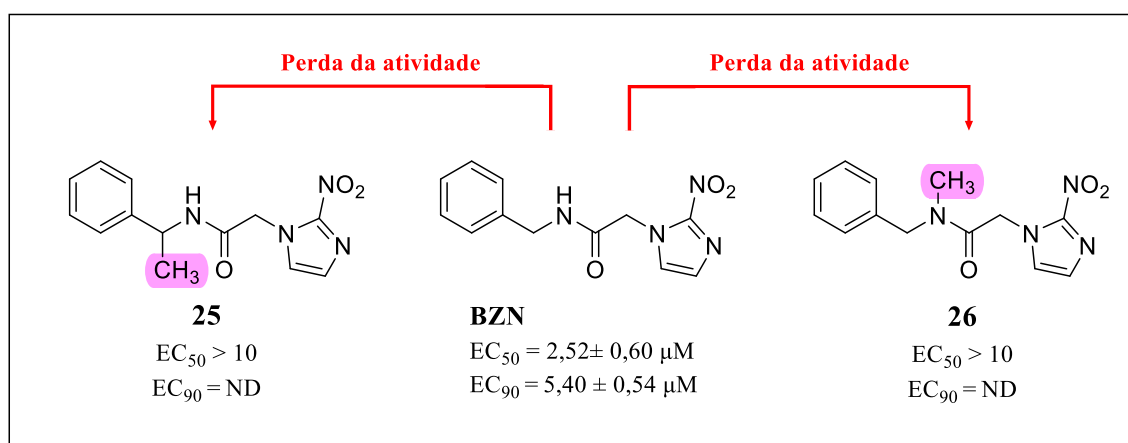


Figura 49. Avaliação preliminar da SAR dos derivados **25** e **26**.

Por fim, o derivado **27** foi o único da segunda série que apresentou atividade contra *T. cruzi*, mas moderada, sendo menos potente que o BZN e maior que 4 μM . Apesar de não levar a ausência de atividade, observamos que aumento da cadeia entre o anel aromático e a amida, possibilitando uma maior flexibilidade, não foi vantajoso, diminuindo a potência (Figura 50).

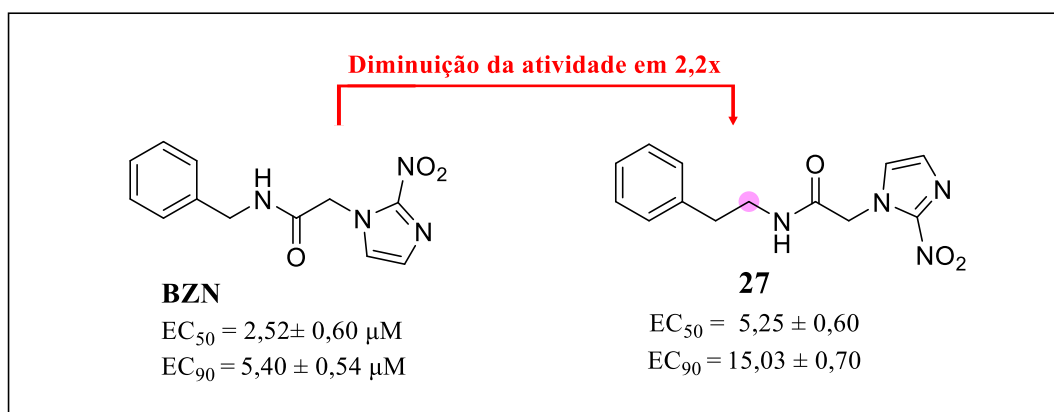


Figura 50. Avaliação preliminar da SAR do derivado 27.

A citotoxicidade dos derivados não será comparada, visto que nenhum deles apresentou toxicidade às células, mesmo nas maiores concentrações testadas (200 μM), assim como o BZN.

5.3.2. Avaliação contra tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* cepa Y

O ensaio contra tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* cepa Y, diferentemente dos ensaios intracelulares, permite testar a eficácia das substâncias diretamente sobre a forma tripomastigota, que é a presente na corrente sanguínea do hospedeiro. No ensaio anterior, por estarem presentes as formas amastigota e tripomastigota, não foi possível diferenciar a atividade das substâncias em função da forma parasitária. Dessa forma, a avaliação dos derivados contra a forma tripomastigota sanguínea isolada foi realizada com o objetivo de verificar a seletividade contra essa forma de *T. cruzi* (SALOMÃO *et al.*, 2013).

A cepa Y de *T. cruzi* é uma das mais utilizadas nesses ensaios devido a principalmente sua relevância clínica, mas também por sua alta virulência e resistência, sendo um modelo desafiador para a triagem de novas substâncias. Para esse teste foram selecionadas as substâncias que apresentaram atividade $< 10 \mu\text{M}$ no teste intracelular, dessa forma foram avaliadas as substâncias **1, 2, 4-11, 13, 15, 16, 20, 21, 24, 27**. Este ensaio também foi realizado em colaboração com a Dra. Maria de Nazaré Correia Soeiro do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz (LBC/IOC/FIOCRUZ).

Através desse ensaio foi possível observar que as substâncias foram ligeiramente menos ativas contra a cepa Y quando comparadas aos resultados obtidos no ensaio intracelular, como esperado. Apesar disso, das 17 substâncias avaliadas, 7 apresentaram potência maior do que o BZN ($\text{EC}_{50} = 5,8 \mu\text{M}$), que são os derivados **1** ($\text{EC}_{50} = 3,509 \mu\text{M}$), **2** ($\text{EC}_{50} = 5,368 \mu\text{M}$), **4** ($\text{EC}_{50} = 3,146 \mu\text{M}$), **7** ($\text{EC}_{50} = 4,065 \mu\text{M}$), **8** ($\text{EC}_{50} = 5,18 \mu\text{M}$), **15** ($\text{EC}_{50} = 2,365 \mu\text{M}$), **20** ($\text{EC}_{50} = 2,683 \mu\text{M}$) e **24** ($\text{EC}_{50} = 3,467 \mu\text{M}$) (Tabela 18).

Fazendo um breve estudo de relação estrutura-atividade dos compostos sobre tripomastigotas, observamos um padrão já comum no ensaio intracelular, de que os compostos monossustituídos em *orto* (**1, 4, 7, 10 e 15**) tiveram potência maior dos que os substituídos em

meta (**2**, **5**, **8**, **11**, **13** e **16**), e esses, potência maior do que o substituído em *para* (**6** e **9**). Podemos observar esse padrão no exemplo das substâncias **4**, **5** e **6** substituídas com o cloro e **7**, **8** e **9** substituídas com o flúor nas diferentes posições na Figura 51.

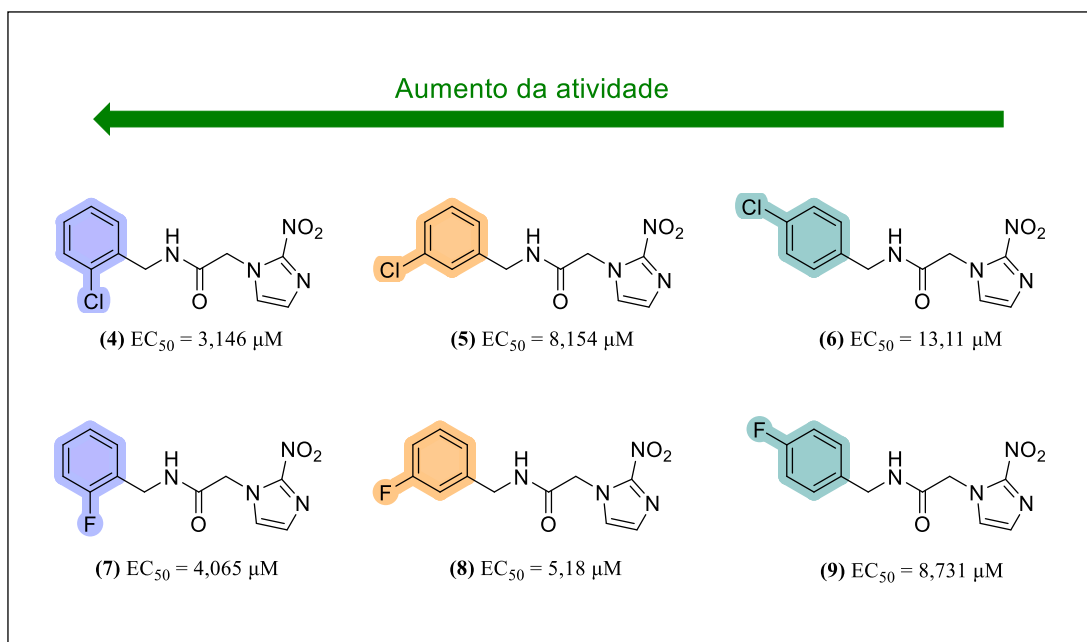


Figura 51. Avaliação preliminar da SAR dos derivados **4-9** em tripomastigotas.

Os derivados **1**, **4**, **15**, **20** e **24** foram mais potentes que o BZN, apresentando potência de 1,6, 1,8, 2,4, 2,2 e 1,7 vezes maior do que o fármaco, respectivamente (Figura 52). Esses derivados mais potentes possuem características em comum, como a inclusão de substituintes na posição *orto*, ou dissustituídos nas posições *orto-para*. Além disso, os grupos funcionais que acarretaram uma potência maior, foram a metila, o cloro e o metoxi, levando a percepção de que esses substituintes nessas posições são importantes para a atividade anti-*T. cruzi*.

É importante ressaltar que os derivados **1**, **15**, **20** e **24** que foram os mais potentes nesse ensaio, também foram os mais potentes no ensaio intracelular. Apesar de estar presente as duas formas do parasito, no ensaio intracelular temos a prevalência da forma amastigota, desse modo podemos concluir que esses compostos possuem atividade tanto contra a forma amastigota, como contra a forma tripomastigota, o que é o ideal para a cura efetiva da DC.

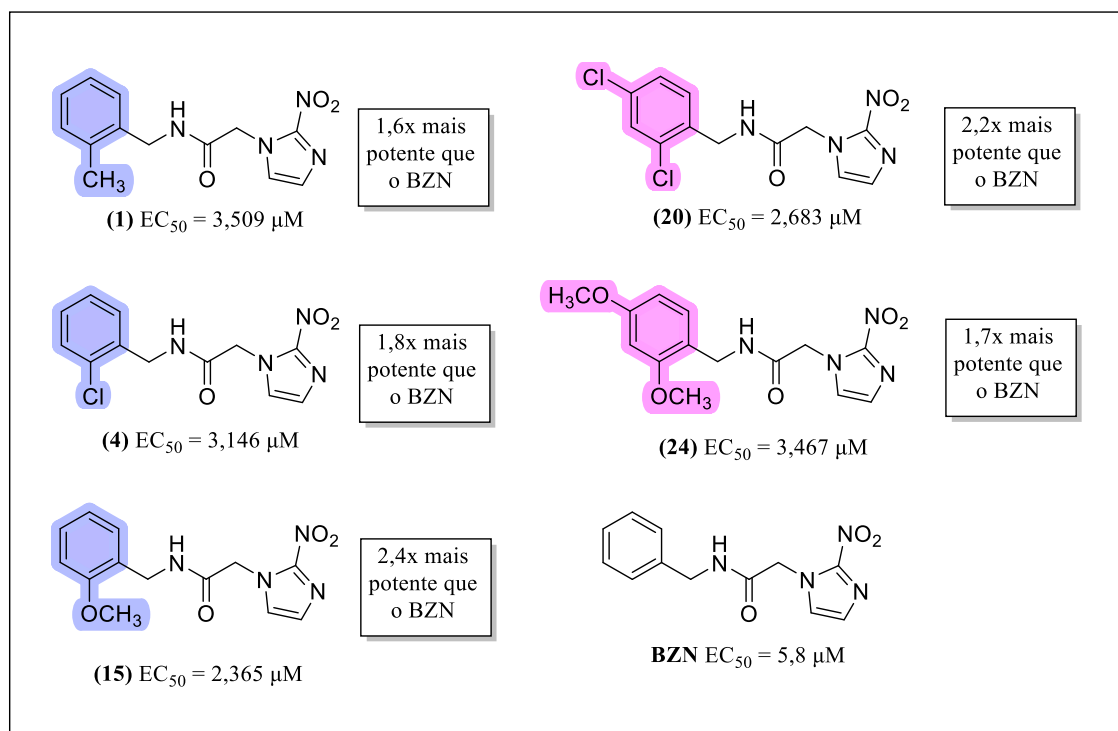
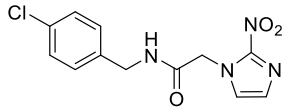
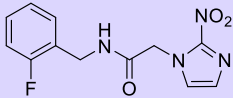
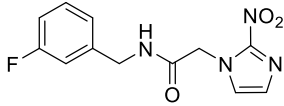
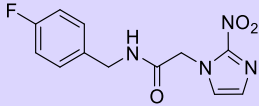
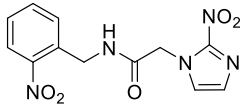
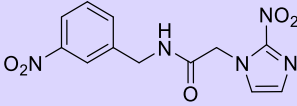
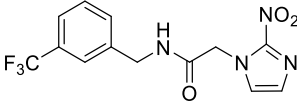
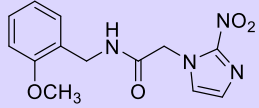
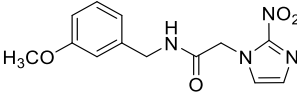
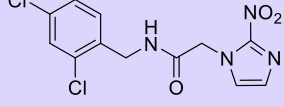
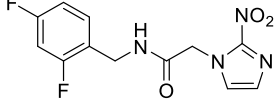
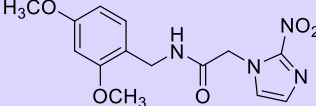
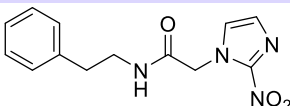


Figura 52. Avaliação preliminar da SAR dos derivados mais potentes **1**, **4**, **15**, **20** e **24** em tripomastigotas.

Tabela 18. Dados da avaliação anti-*T. cruzi* dos derivados selecionados sobre tripomastigotas

Derivado	Estrutura	EC ₅₀	Intervalo
BZN		5,8	4,113 - 8,180
1		3,509	1,697 - 7,256
2		5,368	3,296 - 8,744
4		3,146	1,581 - 6,261
5		8,154	5,796 - 11,47

6		13,11	7,935 – 21,64
7		4,065	2,573 – 6,423
8		5,18	3,248 – 8,259
9		8,731	6,778 – 11,25
10		6,795	4,489 – 10,29
11		13,38	10,07 – 17,79
13		14,16	8,077 – 24,82
15		2,365	1,674 – 3,341
16		5,916	3,389 – 10,33
20		2,683	1,544 – 4,661
21		6,303	4,204 – 9,449
24		3,467	1,633 – 7,360
27		6,462	3,275 – 12,75

5.3.3. Avaliação na enzima nitroredutase de *T. cruzi* (*TcNTR*)

Os ensaios para avaliar as substâncias como potenciais substratos da enzima nitroredutase de *T. cruzi* (*TcNTR*) foram conduzidos com o objetivo de determinar sua interação e conversão enzimática, sendo fundamentais para compreender o mecanismo de ação dos compostos. A *TcNTR* reduz compostos nitroheterocíclicos utilizando NADH como cofator (doador de elétrons). O ensaio mede a diminuição da absorbância do NADH a 340 nm (comprimento de onda no espectrofotômetro), pois quando o NADH é consumido, sua absorbância diminui. Se um composto acelera essa reação, podemos inferir seu efeito sobre a *TcNTR*.

Esse ensaio foi realizado utilizando uma mistura padrão, contendo o tampão Tris, Triton X-100, NADH e os compostos a serem avaliados. A reação foi iniciada com a adição da enzima *TcNTR* (10 µL), que foi previamente preparada com tampão Tris, NaCl e Triton X-100. Após sua adição ao meio, a absorbância do NADH foi monitorada continuamente por 2 minutos e os dados foram analisados no leitor de microplacas SpectraMax 384 Plus à 25 °C. Essa avaliação foi realizada em colaboração com a Dra. Maria Cristina Nonato do Laboratório de Cristalografia de Proteínas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP.

A atividade enzimática neste ensaio, é avaliada com o objetivo de investigar se os compostos testados são capazes de atuar como substratos artificiais da enzima *TcNTR*, e não como inibidores. É importante destacar que, mesmo que uma substância seja identificada como substrato artificial dessa enzima, não significa que essa irá promover o efeito de gerar espécies tóxicas ao parasito, mas sugere que essa pode ser bioativada por esse mecanismo, semelhantemente ao que ocorre com o BZN.

Os valores obtidos em Kobs, refletem a velocidade de consumo do NADH na reação de redução catalisada pela enzima. Quanto maior o valor de Kobs, mais rápida é a conversão do substrato pela enzima, indicando que a substância testada pode ser um bom substrato para a *TcNTR*. Por outro lado, valores baixos sugerem uma menor afinidade da enzima pelo composto ou uma baixa conversão enzimática. A concentração de NADH utilizada no experimento foi de 50 µM e os derivados foram avaliados na concentração de 50 µM. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 19 e foram comparados com os dados do BZN que foi utilizado como referência. Além dos valores obtidos de Kobs, foi calculado a porcentagem de atividade de

substâncias, considerando para isso, a atividade para o BZN como sendo 100, nas mesmas condições e concentrações dos compostos.

Tabela 19. Dados da avaliação *in vitro* na enzima NTR dos derivados 1-27

Derivado	K _{obs} (s ⁻¹)		Atividade (%)	
	Valor	Erro	Atividade	Erro
BZN	0,41	0,02	100	0
1	0,61	0,02	148	3
2	0,43	0,00	103	6
3	0,33	0,02	79	1
4	0,56	0,07	134	10
5	0,40	0,02	97	0
6	0,21	0,00	52	3
7	0,38	0,00	93	6
8	0,40	0,02	97	0
9	0,41	0,02	100	0
10	0,37	0,02	90	1
11	0,34	0,00	83	5
12	0,30	0,00	72	4
13	0,30	0,00	72	4
14	0,27	0,02	66	2
15	0,57	0,02	138	2
16	0,46	0,02	110	1
17	0,33	0,02	79	1
18	0,27	0,02	66	2
19	ND			
20	0,43	0,00	103	6
21	ND			
22	ND			
23	0,61	0,05	148	3
24	0,50	0,02	121	1

25	0,24	0,02	59	2
26	0,04	0,00	9	1
27	0,40	0,02	97	0

ND = Não determinado

Com exceção dos derivados **19**, **21** e **22**, todos os demais compostos tiveram sua atividade determinada, desses, 9 compostos foram caracterizados como substratos artificiais da enzima *TcNTR*, que são eles os derivados **1**, **2**, **4**, **9**, **15**, **16**, **20**, **23** e **24**. Esses apresentaram taxas de conversão maiores do que a do BZN, ou no caso do derivado **9**, apresentou a mesma taxa de conversão (Figura 53). Um ponto importante de se destacar, é o fato dos derivados que foram mais ativos contra *T. cruzi* nos ensaios intracelular e sob as formas tripomastigotas, **1**, **15**, **20** e **24**, também estarem entre os mais ativos no ensaio de *TcNTR*. Esse resultado somado com os anteriores traz um forte indício de que os derivados possivelmente estão exercendo sua atividade como substrato dessa enzima. No entanto, uma exceção deve ser analisada, que é o fato do derivado **23** ter apresentado atividade na *TcNTR*, enquanto não apresentou atividade contra *T. cruzi* no ensaio intracelular, sugerindo que mais estudos devem ser realizados para a confirmação da hipótese levantada.

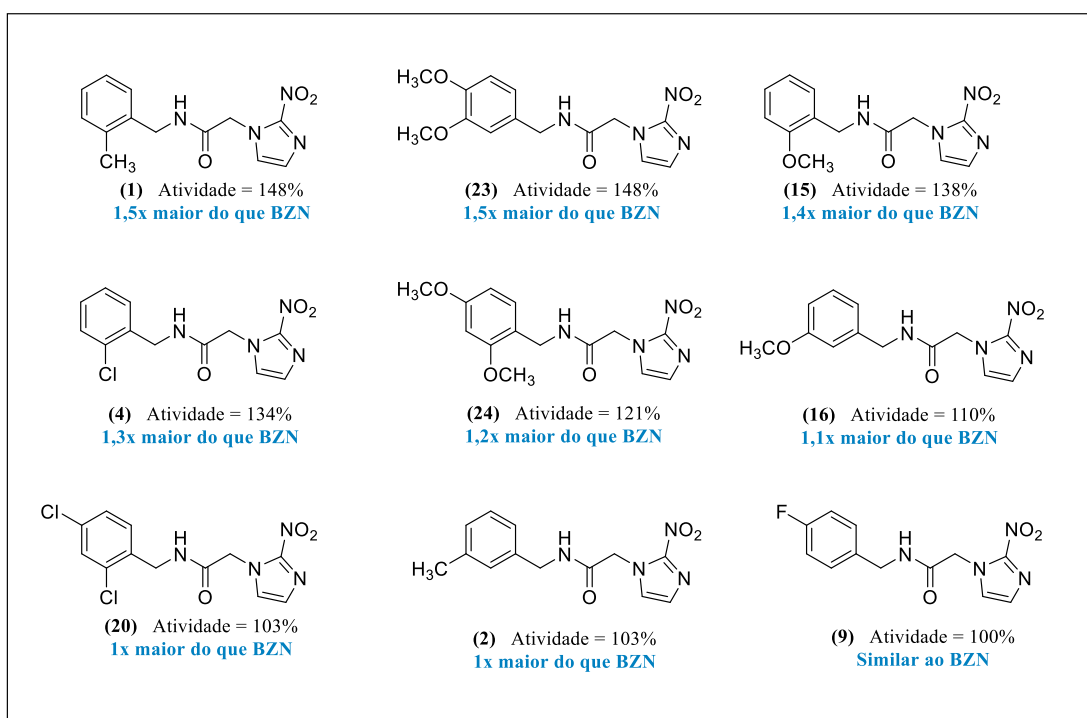


Figura 53. Derivados com atividade sob a enzima *TcNTR*.

Os compostos **14**, **18**, **25** e **26** foram os que apresentaram menor atividade, 66%, 66%, 59% e 9%, respectivamente (Figura 54). É importante ressaltar nesses resultados, o valor da atividade do derivado **26**, que foi muito menor do que os demais. Como discutido anteriormente, esse derivado não apresentou atividade no ensaio intracelular, o que levou a conclusão de que possivelmente a inclusão da metila no nitrogênio da amida atrapalharia o encaixe do composto no sítio ativo, ou até mesmo comprometeria uma possível ligação de hidrogênio com a biomacromolécula. Os resultados obtidos no ensaio *TcNTR* reforçam a importância da amida secundária na molécula e o quanto a inclusão da metila foi prejudicial, levando a praticamente ausência de atividade. Além disso, esse dado obtido enfatiza mais uma vez o discutido anteriormente sobre a possibilidade de as substâncias desenvolvidas estarem atuando através desse mecanismo de ação.

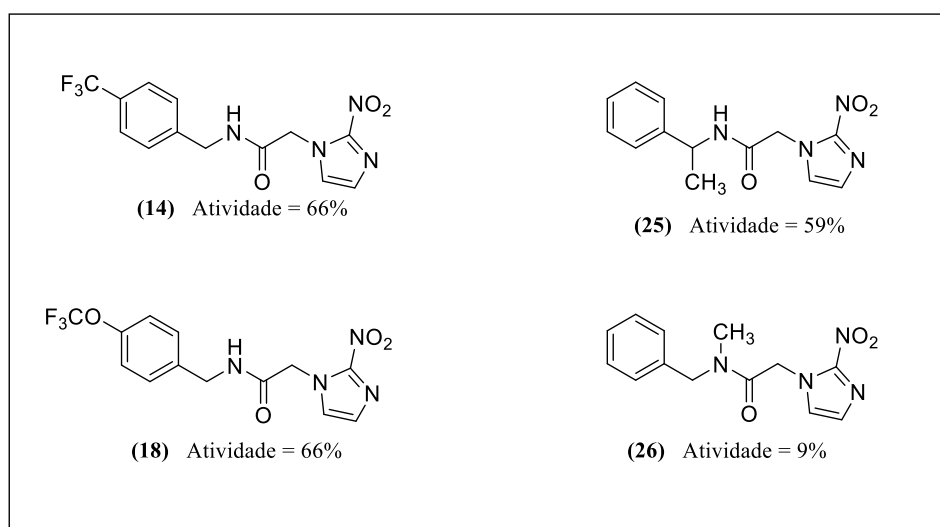


Figura 54. Derivados menos ativos na enzima.

5.3.4. Seleção preliminar dos derivados mais promissores

A seleção dos derivados mais promissores para seguir para os testes *in vivo*, foi realizada levando em consideração os resultados obtidos dos ensaios biológicos sob a forma intracelular, tripomastigota, o ensaio enzimático e os resultados *in silico*.

Dito isto, os derivados **1**, **4**, **15**, **20** e **24** foram os que se destacaram como mais promissores na análise preliminar. Os derivados **1** e **15** se destacam por terem sido os mais potentes entre todos os compostos das séries desenvolvidas. O derivado **15** apresentou $EC_{50} = 1,01 \pm 0,15$ e $IS > 198$ no ensaio intracelular, sendo cerca de 2,5 vezes mais potente e seletivo que o BZN ($EC_{50} = 2,52 \pm 0,60$; $IS > 79$). No ensaio contra a forma tripomastigota, esse também se destacou com $EC_{50} = 2,365$, sendo 2,4 vezes mais potente que o BZN ($EC_{50} = 5,8$). Na avaliação cinética na *TcNTR*, o derivado **15** apresentou atividade de 138% na enzima, sendo convertido 1,4 vezes mais rápido do que o BZN (atividade = 100%).

O derivado **1**, de forma semelhante, foi o segundo mais potente, apresentando $EC_{50} = 1,07 \pm 0,02$ e $IS > 185$ no ensaio intracelular, sendo cerca de 2,3 vezes mais potente e seletivo que o BZN. No ensaio contra a forma tripomastigota, apresentou $EC_{50} = 3,509$, sendo 1,6 vezes mais potente que o BZN. Na avaliação cinética na *TcNTR*, apresentou atividade de 148% na enzima, sendo convertido 1,5 vezes mais rápido do que o BZN e 1 vez mais rápido do que o derivado **15**, além de ter sido o composto que apresentou maior atividade nesta enzima, juntamente com o derivado **23**. Nos ensaios *in silico*, ambos os derivados **1** e **15** tiveram excelentes resultados, apresentando boa solubilidade, atendendo a todos os descritores de todas as regras de *drug-likeness* e *leadlikeness* previstas na plataforma utilizada. Além disso, eles não foram considerados possíveis substratos de P-gp, nem inibidores de nenhuma das CYP analisadas, sendo considerados os mais promissores.

O derivado **20** também foi escolhido devido a sua alta potência. No ensaio intracelular este apresentou potência ($EC_{50} = 1,73 \pm 0,11$) e seletividade ($IS > 115$) cerca de 1,5 vezes maior que o BZN. Além disso, nesse ensaio ele apresentou o menor valor de $EC_{90} = 1,28 \pm 0,83$, sendo este 4,2 vezes mais potente que o BZN ($EC_{90} = 5,40 \pm 0,54$) e que os derivados **1** ($EC_{90} = 2,09 \pm 0,75$) em 1,6 vezes e o derivado **15** ($EC_{90} = 2,2 \pm 0,11$) em 1,7 vezes. Lembrando que o EC_{90} é importante por ser capaz de indicar a eficácia do composto em uma concentração mais elevada, podendo refletir um cenário mais próximo das condições terapêuticas reais. No ensaio contra a forma tripomastigota, esse derivado apresentou $EC_{50} = 2,683$, sendo 2,2 vezes mais potente que o BZN, e até do que o derivado **1** em 1,3 vezes. Na avaliação cinética na *TcNTR*, esse composto também apresentou maior atividade (103%) na enzima que o BZN, sendo convertido 1 vez mais rápido. Vale ressaltar que no *in silico* esse composto cumpriu todos os descritores de todas as regras *drug-likeness* e *leadlikeness* analisadas na plataforma SwissADME.

Os derivados **4** ($EC_{50} = 3,38 \pm 0,61$; $EC_{90} = 8,23 \pm 2,11$) e **24** ($EC_{50} = 2,83 \pm 0,53$; $EC_{90} = 5,87 \pm 1,31$), apesar de não terem apresentado potência maior do que a do BZN no ensaio intracelular, foram escolhidos por terem apresentado uma boa atividade, $EC_{50} = 3,146$ e $EC_{50} = 3,467$, respectivamente, no ensaio sob as formas tripomastigotas, sendo o primeiro, 1,8 vezes e o segundo, 1,7 vezes mais potente que o BZN nesse ensaio. O derivado **4** nesse ensaio apresentou ainda potência de 1,1 vezes maior do que os derivados **1** e **24**. Essa avaliação é muito importante visto que como discutido anteriormente a cepa Y possui alta virulência e resistência, e é um modelo desafiador para a triagem de novas substâncias. Dessa forma, esse foi um dos motivos por esses derivados terem sido selecionados.

Além disso, na avaliação cinética na TcNTR, esses derivados apresentaram alta atividade, de 134% para o derivado **4** e 121% para o **24**, sendo o primeiro convertido 1,3 vezes mais rápido que o BZN e que o derivado **20**, e o segundo, 1,2 vezes mais rápido que o fármaco de referência e 1,1 vezes mais rápido do que **20**. Além disso, esses compostos apresentaram bons resultados na análise *in silico*, apresentando uma boa absorção gastrointestinal, não sendo capaz de inibir nenhuma forma das CYPs presente na predição (com exceção apenas da CYP2C19 pelo derivado **4**), e cumprindo assim como os demais, todos os descritores de todas as regras *drug-likeness* analisadas na plataforma.

Os derivados mais promissores se encontram na Figura 55.

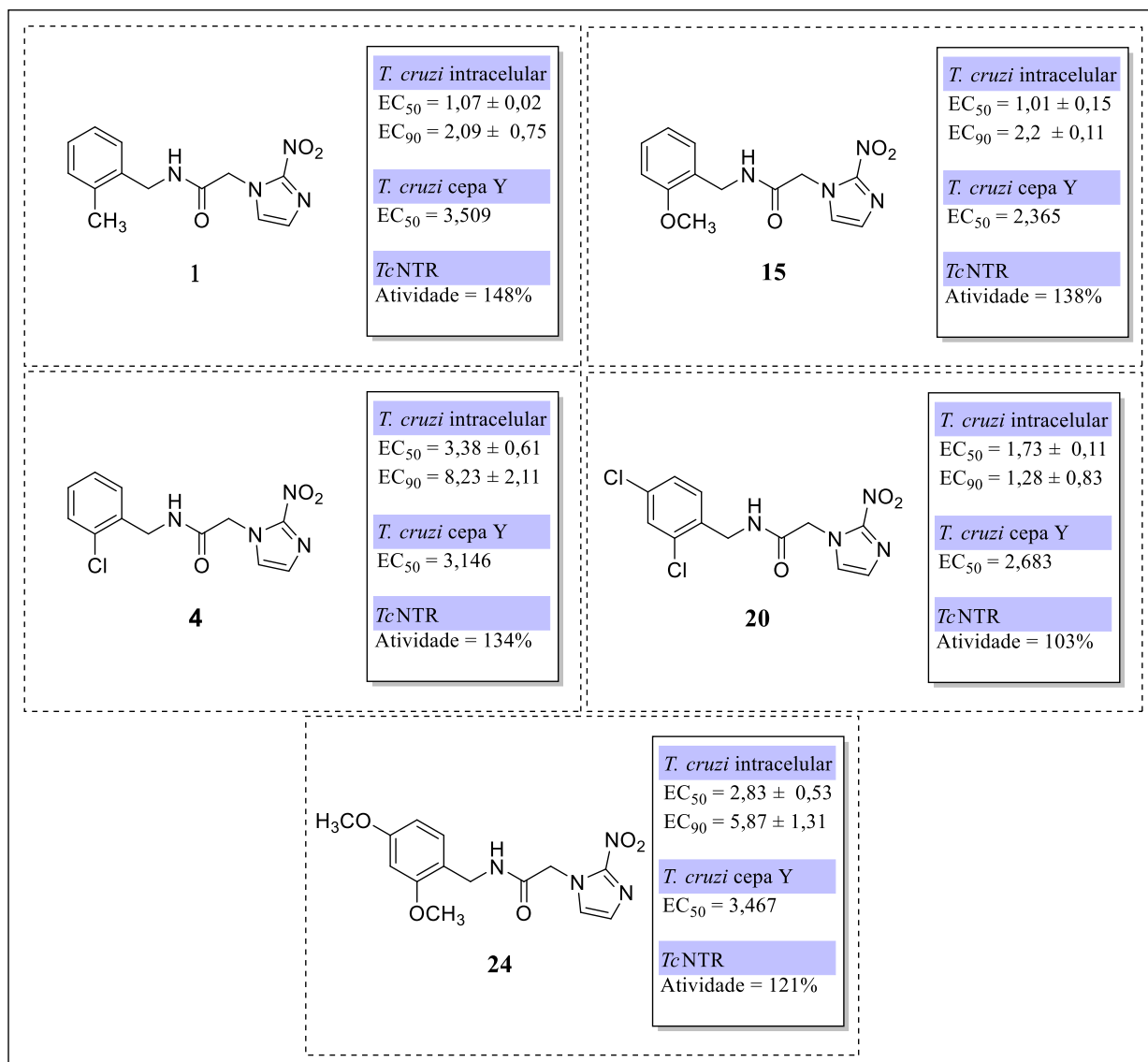


Figura 55. Substâncias **1**, **4**, **15**, **20** e **24**, selecionadas como as mais promissoras em análise preliminar para o estudo *in vivo*.

5.5. Avaliação *in vivo* dos derivados **1**, **4**, **15**, **20** e **24** contra *T. cruzi*

Devido a seus resultados promissores, os derivados **1**, **4**, **15**, **20** e **24** foram avaliados *in vivo* em um modelo murino de infecção por *T. cruzi*. Neste experimento, em cada grupo, cinco camundongos da linhagem Suíço foram infectados com *T. cruzi* e, a partir do quinto dia pós-infecção (5 dpi), receberam tratamento oral por gavagem durante cinco dias consecutivos. O benznidazol foi utilizado como controle positivo nas doses de 10 e 100 mg/kg/dia, enquanto os compostos testados foram administrados em doses equimolares ao fármaco de referência.

Os principais parâmetros analisados incluíram a redução da parasitemia, a taxa de sobrevivência dos animais e a comparação da resposta dos compostos testados em relação ao benznidazol. Este ensaio também foi realizado em colaboração com a Dra. Maria de Nazaré Correia Soeiro do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz (LBC/IOC/FIOCRUZ).

Com base nos dados obtidos, constatou-se que o grupo não tratado apresentou um pico de parasitemia no 8º dia, seguido de uma queda progressiva até o final do período monitorado. Como a avaliação da parasitemia é realizada por meio da detecção de parasitas na corrente sanguínea, essa redução ao longo dos dias era esperada, visto que o *T. cruzi* infecta os tecidos durante a progressão da infecção, migrando da corrente sanguínea para estes.

Entre os compostos avaliados, o derivado **1** apresentou os melhores resultados, promovendo uma redução de 100% na parasitemia na dose de 105,32 mg/kg (mpk) (figura 56) e garantindo 100% de sobrevivência dos animais testados até o fim do experimento (figura 57). Esse resultado reforça a eficácia deste composto, sendo comparável à do BZN na dose de 100 mpk tanto na redução da parasitemia, como na taxa de sobrevivência dos animais.

A menor dose administrada, tanto do composto **1** (10,53 mpk), como do BZN (10 mpk) não foi eficaz em controlar a parasitemia (figura 56), sugerindo uma relação dose-resposta. Estes também não foram capazes, nessa dose, de manter a sobrevivência dos camundongos (figura 57), visto que nenhum animal testado sobreviveu ao experimento.

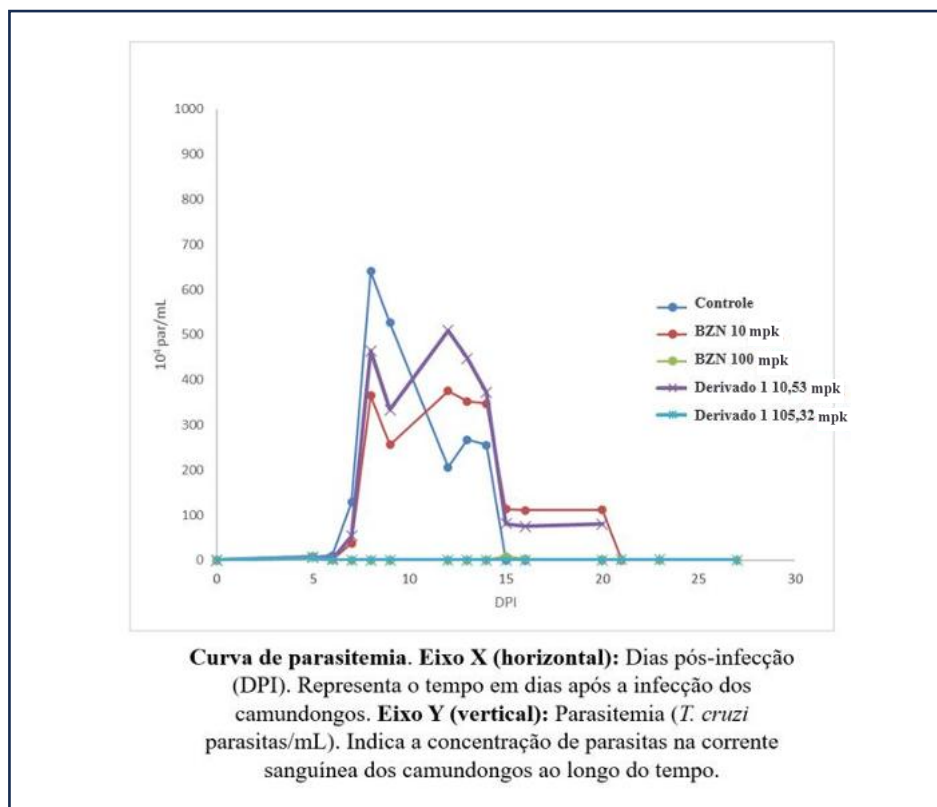


Figura 56. **Curva de Parasitemia**- Evolução da parasitemia nos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com diferentes doses de BZN e do composto 1. O tratamento com BZN 100 mg/kg e 1 a 105,32 mg/kg resultou em uma redução completa da parasitemia.

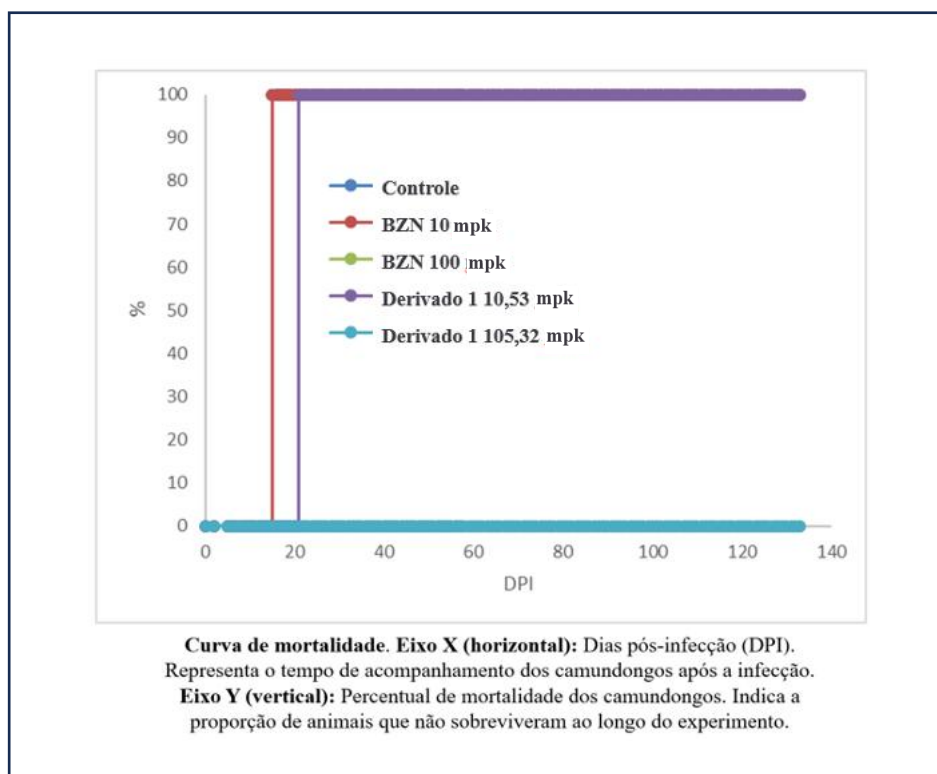


Figura 57. **Curva de Mortalidade** - Mortalidade dos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com BZN e derivado 1 em diferentes doses. BZN a 100 mg/kg e o derivado 1 a 105,32 mg/kg evitaram a morte dos camundongos, resultando em 0% de mortalidade.

Os derivados 4 e 20 também apresentaram reduções significativas na parasitemia (99% e 84% em 8 dpi, respectivamente, na figura 58 e figura 60). Porém, é possível observar, através dos gráficos das figuras 59 e 61, que esses compostos não foram capazes de garantir a sobrevivência de todos os animais, com morte de 60% dos camundongos avaliados.

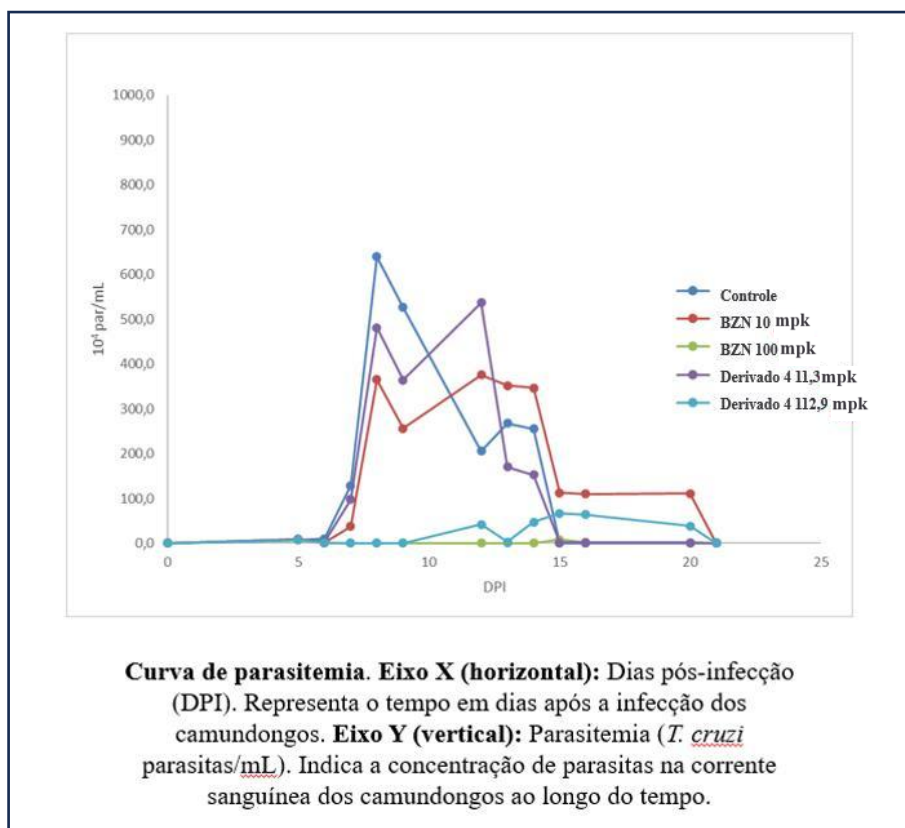


Figura 58. **Curva de Parasitemia**- Evolução da parasitemia ao longo do tempo nos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com o derivado 4 em dose equimolar (11,3 e 112,9 mpk), em comparação com o BZN (10 e 100 mpk) e grupo controle.

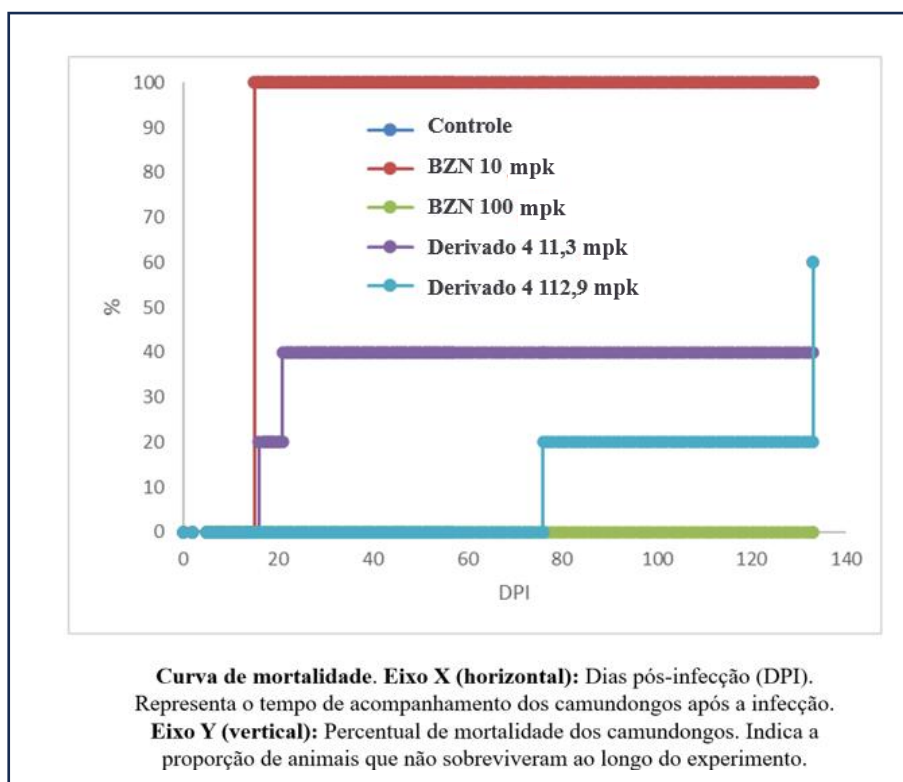


Figura 59. **Curva de Mortalidade** - Mortalidade dos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com o derivado 4 (11,3 e 112,9 mpk), comparada ao BZN (10 e 100 mpk) e grupo controle.

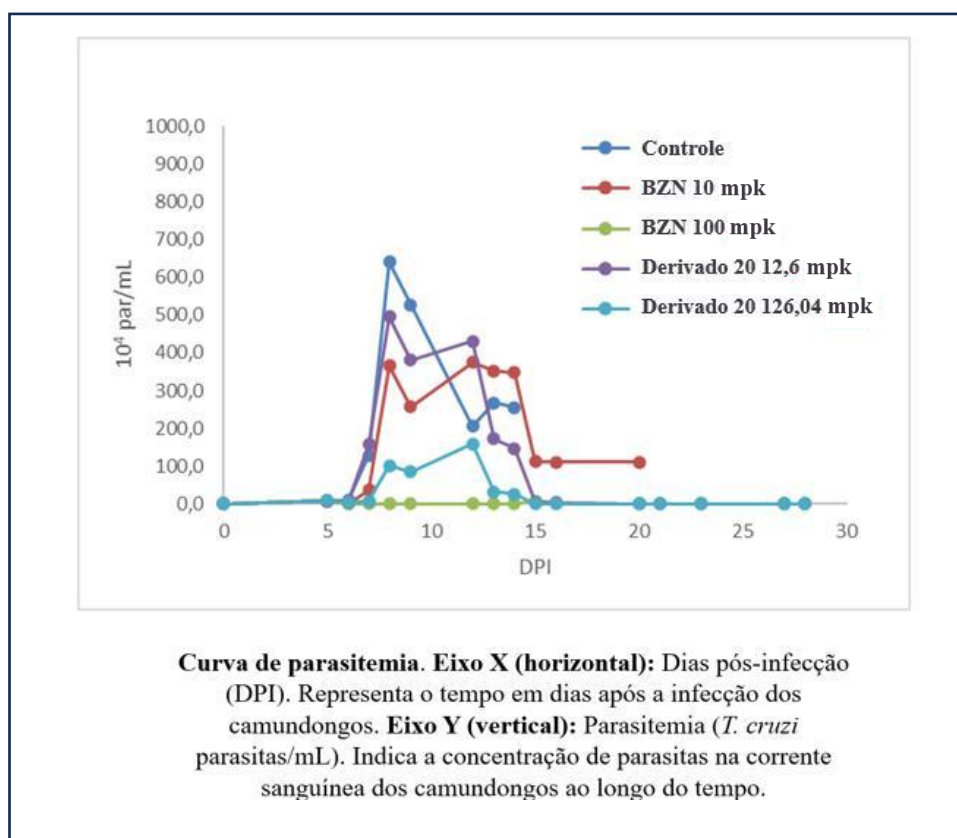


Figura 60. **Curva de Parasitemia**- Evolução da parasitemia ao longo do tempo nos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com o derivado **20** em dose equimolar (12,6 e 126,04 mpk), em comparação com o BZN (10 e 100 mpk) e grupo controle.

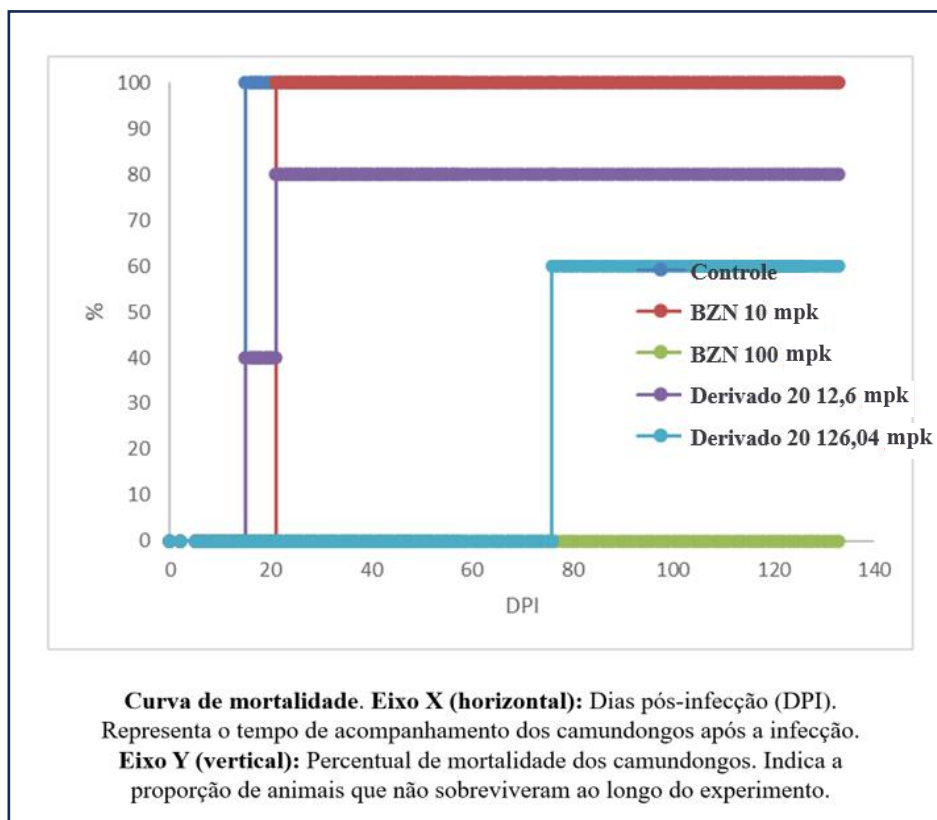


Figura 61. **Curva de Mortalidade** - Mortalidade dos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com o derivado **20** (12,6 e 126,04 mpk), comparada ao BZN (10 e 100 mpk) e grupo controle.

Os derivados **15** e **24**, por outro lado, apresentaram desempenho inferior, com reduções na parasitemia de apenas 24% e 28%, respectivamente. Nas figuras 62 e 64, podemos observar que, mesmo após o tratamento, os níveis de parasitemia permaneceram elevados nesses grupos, sugerindo uma eficácia limitada, apesar de suas altas potências *in vitro*. No gráfico de curva de sobrevivência do derivado **24** (figura 65), podemos observar que a taxa de sobrevivência foi de apenas 40% (em ambas as doses), enquanto o derivado **15** não foi capaz de evitar a mortalidade dos animais em nenhuma das doses avaliadas (figura 63).

Uma das possibilidades para essa diferença observada entre os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* para as substâncias **4**, **15**, **20** e **24**, pode estar relacionada às questões de farmacocinética. Apesar dos dados de ADME *in silico* terem sido promissores, eles não refletem na íntegra, nem substituem os dados experimentais. Alguns alertas foram observados para três desses derivados nos resultados *in silico*,

como o caso da inibição de CYP2C19 pelo derivado **4** e **20**, este último que também inibiu a isoforma CYP1A2 e o derivado **24** que foi considerado como substrato de P-gP. A inibição de CYPs no entanto está mais relacionada a toxicidade causada por interações de substâncias administradas concomitantemente, mas no caso de a substância atuar como substrato de P-gP, como no caso de **24**, ela pode ser transportada para fora das células, reduzindo sua absorção intestinal e a distribuição tecidual. Isso pode comprometer a eficácia terapêutica, já que uma menor quantidade atinge o alvo terapêutico.

É importante ressaltar também que testes *in vitro* muitas vezes não refletem os seus resultados em um ambiente de alta complexidade, como o de um modelo animal, uma vez que, neste último, inúmeros processos bioquímicos inerentes ocorrem simultaneamente, envolvendo questões de absorção, distribuição e metabolismo, as quais não são consideradas nos ensaios *in vitro*.

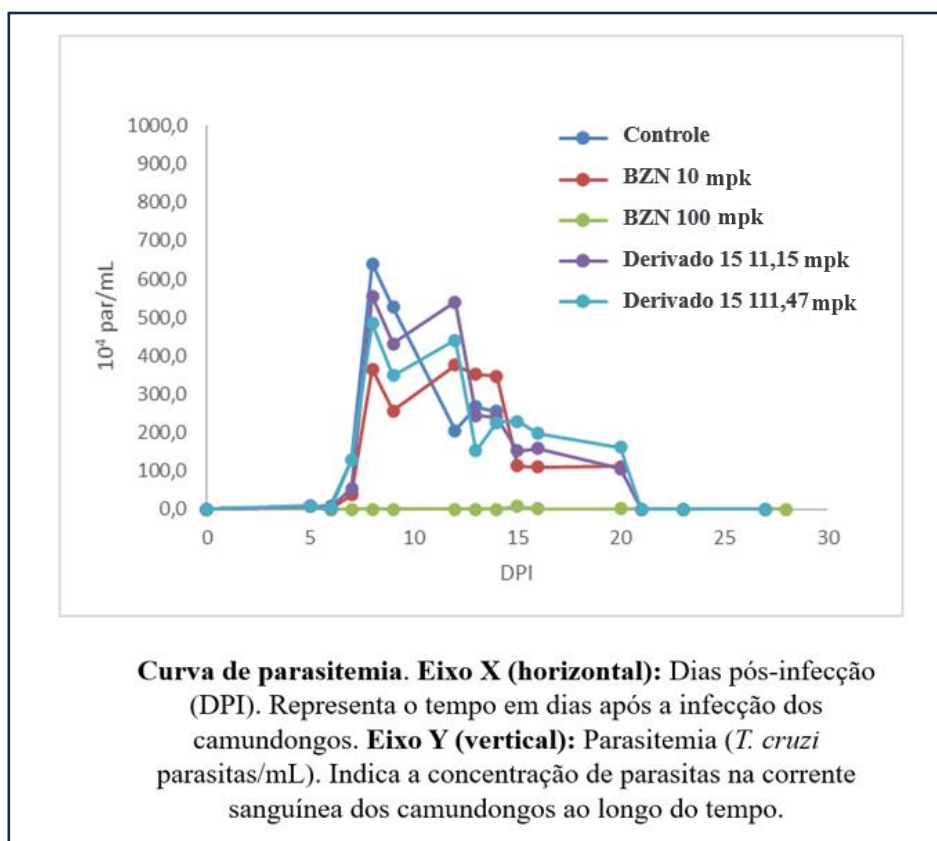


Figura 62. **Curva de Parasitemia**- Evolução da parasitemia ao longo do tempo nos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com o derivado **15** em dose equimolar (11,15 e 111,47 mpk), em comparação com o BZN (10 e 100 mpk) e grupo controle.

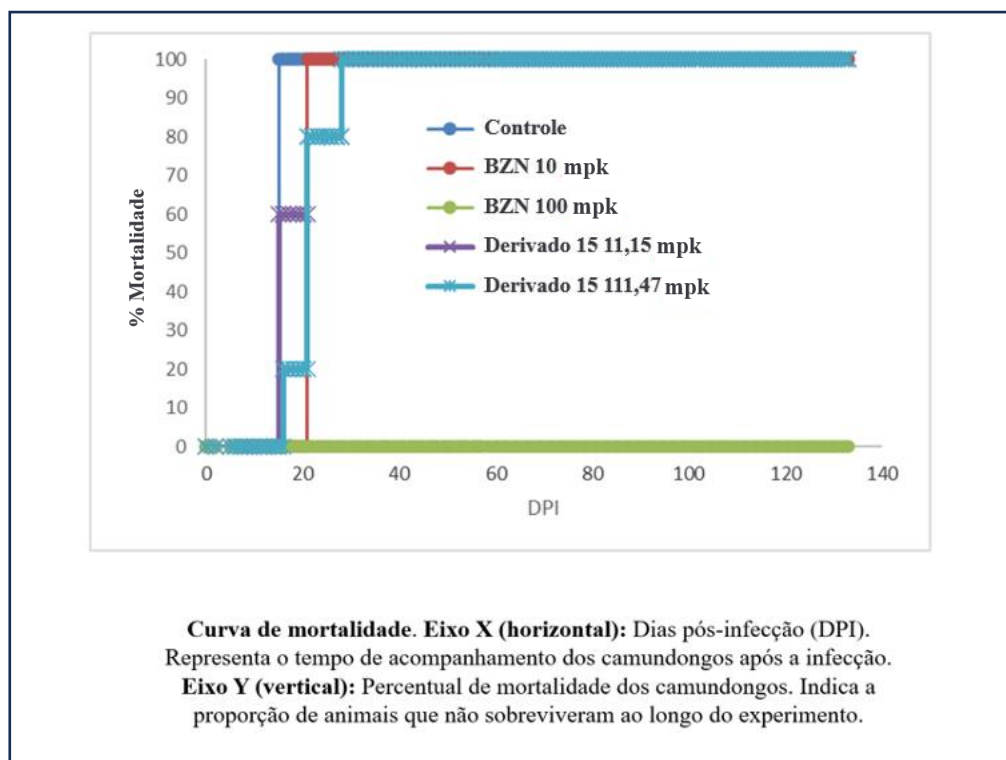


Figura 63. **Curva de Mortalidade** - Mortalidade dos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com o derivado 15 (11,15 e 111,47 mpk), comparada ao BZN (10 e 100 mpk) e grupo controle.

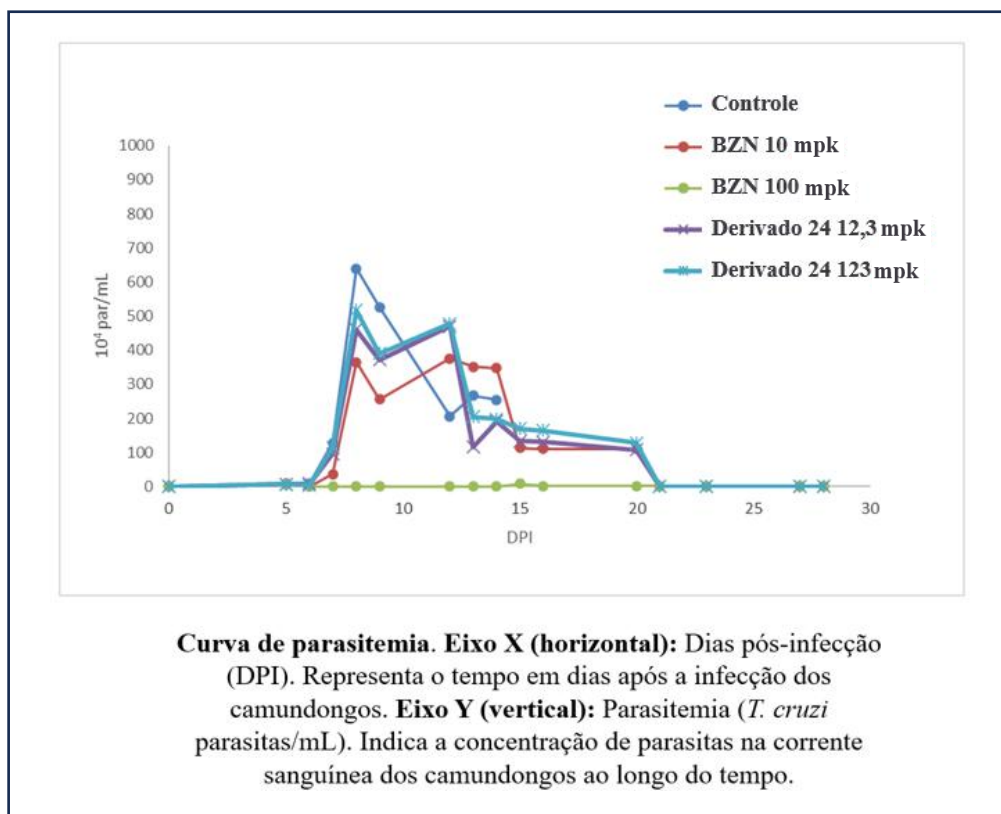


Figura 64. **Curva de Parasitemia**- Evolução da parasitemia ao longo do tempo nos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com o derivado **24** em dose equimolar (12,3 e 123 mpk), em comparação com o BZN (10 e 100 mpk) e grupo controle.

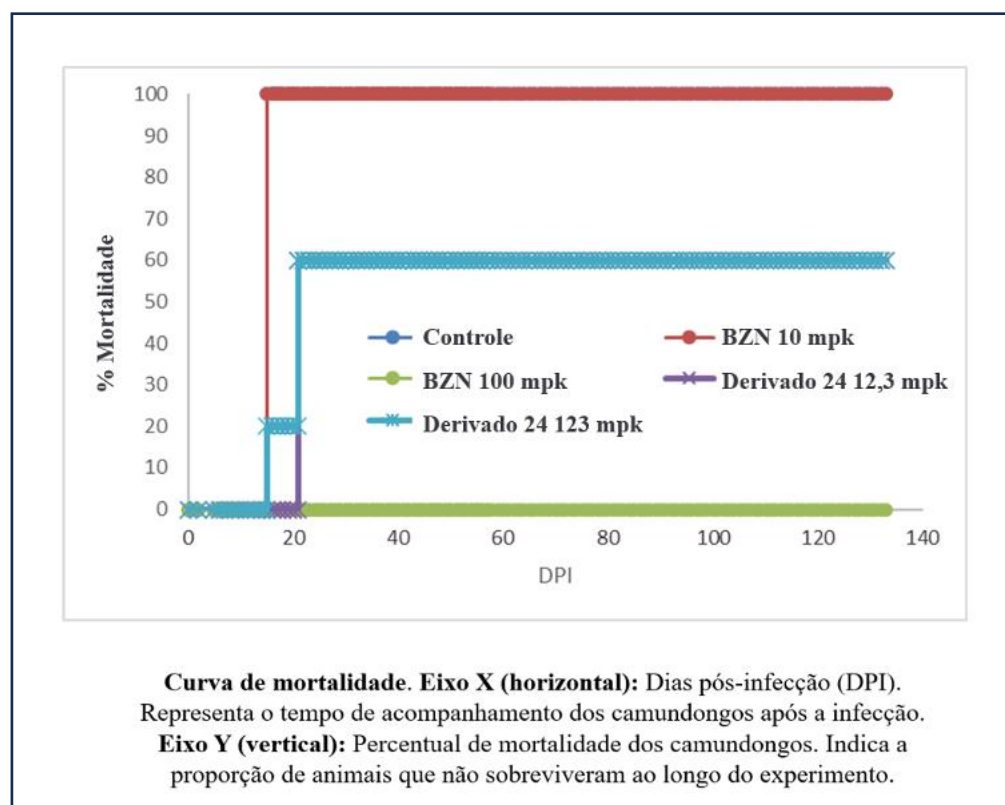


Figura 65. **Curva de Mortalidade** - Mortalidade dos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com o derivado **24** (12,3 e 123 mpk), comparada ao BZN (10 e 100 mpk) e grupo controle.

Assim, os resultados obtidos reforçam que o derivado **1** se destaca como o composto mais promissor da série, sendo o único a garantir a completa eliminação da parasitemia e a total sobrevivência dos animais. A partir dessas observações, futuros estudos podem se concentrar em compreender melhor a farmacologia deste derivado, avaliar sua farmacocinética por via oral e, caso seja necessário, explorar possíveis otimizações estruturais para aumentar ainda mais sua eficácia terapêutica.

Além disso, esses resultados deverão ser complementados com as avaliações de segurança, que envolvem ensaios de toxicidade oral aguda e em doses repetidas, potencial de mutagenicidade (teste de Ames) e de genotoxicidade (micronúcleos), conforme preconizado pela ANVISA (ANVISA, 2013). Para tal, o presente trabalho foi recentemente contemplado no

Edital Inova Doenças Determinadas Socialmente – DDS da Fundação Oswaldo Cruz, que fomentará a realização destes ensaios pré-clínicos (FIOCRUZ, 2024).

6. Conclusão

Neste estudo, foram sintetizados e avaliados 27 compostos análogos do BZN planejados racionalmente visando à atividade contra *Trypanosoma cruzi*. Essas substâncias foram obtidas satisfatoriamente através de uma rota sintética com duas etapas simplificadas realizadas *one-pot*. Os 27 compostos foram sintetizados, com rendimento global variando entre 27% e 84% e com pureza relativa acima de 95,5%. Todos os derivados foram avaliados contra *T. cruzi* através de um ensaio intracelular e os que apresentaram atividade $< 10 \mu\text{M}$, foram também avaliados contra a forma tripomastigota sanguínea de *T. cruzi* cepa Y. Além disso, os 27 derivados também foram avaliados como substratos da enzima nitroredutase e tiveram sua citotoxicidade verificada.

Na predição *in silico* realizada, os 27 compostos apresentaram bons resultados nos parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos. Todos apresentaram bons valores de lipofilicidade, com valores dentro dos filtros de *drug-likeness* analisados, boa solubilidade aquosa, sendo considerados solúveis ou moderadamente solúveis. Todos os derivados apresentaram um bom perfil de absorção no trato gastrointestinal e não foram capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. Apenas dois derivados se mostraram como substratos de Glicoproteína-P e apenas 8 foram considerados inibidores de CYP, nas isoformas CYP2C19, CYP1A2 e apenas 1 derivado inibiu as isoformas CYP2C9 e CYP3A4, sendo a última a isoforma mais importante no metabolismo de fármacos. Além disso, todos os derivados desenvolvidos atenderam a todos os descritores de todas as 5 principais regras de *drug-likeness*, reforçando a viabilidade como candidatos a fármacos.

Dos 27 derivados, 12 apresentaram boa atividade contra *T. cruzi* no ensaio intracelular ($< 4 \mu\text{M}$) e 9 foram mais potentes e seletivos que o BZN ($\text{EC}_{50} = 2,52 \pm 0,60 \mu\text{M}$, $\text{EC}_{90} = 5,40 \pm 0,54 \mu\text{M}$). Entre esses, os derivados **1** ($\text{EC}_{50} = 2,52 \pm 0,60 \mu\text{M}$), **15** ($\text{EC}_{50} = 1,01 \pm 0,15 \mu\text{M}$) e **20** ($\text{EC}_{50} = 1,73 \pm 0,11 \mu\text{M}$) foram os mais potentes, sendo 2,3, 2,5 e 1,5 vezes, respectivamente, mais potentes e mais seletivos do que o BZN e apresentaram valores de EC_{90} maiores do que o fármaco de referência em 2,6, 2,4 e 4,2 vezes, respectivamente. O ensaio de citotoxicidade foi realizado paralelamente ao intracelular e todos os derivados apresentaram

$LC_{50} > 200 \mu M$, indicando que nenhum deles foi citotóxico mesmo na maior concentração testada.

Com base nesses resultados foi realizado um estudo de SAR preliminar com os compostos das duas séries, onde foi observado que as modificações propostas na segunda série de derivados não são vantajosas e que os derivados planejados da primeira série que alcançaram maior potência foram aqueles substituídos na posição *orto* do anel, enquanto a posição *para* do anel se mostrou a mais prejudicial para a atividade. Além disso, nesse estudo foi possível concluir que os grupos metila, metoxi e cloro acrescentaram maior atividade quando comparado com os demais.

Dos 17 derivados que apresentaram $EC_{50} < 10 \mu M$ avaliados contra a forma tripomastigota sanguínea de *T. cruzi* cepa Y, 7 foram mais potentes que o BZN ($EC_{50} = 5,8 \mu M$). Dentre esses, os derivados **1** ($EC_{50} = 3,509 \mu M$), **4** ($EC_{50} = 3,146 \mu M$), **15** ($EC_{50} = 2,365 \mu M$), **20** ($EC_{50} = 2,683 \mu M$) e **24** ($EC_{50} = 3,467 \mu M$), foram os mais potentes, sendo 1,6, 1,8, 2,4, 2,2 e 1,7 vezes mais do que o BZN.

No ensaio de *TcNTR*, 9 dos 27 derivados foram considerados como substrato artificial dessa enzima, sendo biotransformados em até 1,5 vezes mais rápido do que o BZN, que é o caso dos derivados **1** e **23**. O estudo da interação com a enzima forneceu insights sobre possíveis mecanismos de ação para algumas das moléculas, visto que praticamente todas as que tiveram maior taxa de conversão, foram também as mais potentes nas avaliações anti-*T. cruzi*.

Devido a todos os dados adquiridos a respeito dos compostos desenvolvidos, os derivados **1**, **4**, **15**, **20** e **24** que se mostraram mais promissores devido a elevada potência, alta taxa de conversão pela *TcNTR* e excelentes dados preditos nos parâmetros *in silico*, foram avaliados *in vivo* contra *T. cruzi*. Dentre esses, o derivado **1** se destacou como o mais promissor, sendo capaz de promover uma redução de 100% na parasitemia e garantindo 100% de sobrevivência dos animais testados.

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que estes foram favoráveis de maneira geral e contribuem significativamente para a busca por novos candidatos à terapia da doença de Chagas, justificando estudos adicionais. Assim, o derivado **1** foi escolhido para o aumento de escala e para avançar em estudos pré-clínicos. Ele apresentou vantagens sobre o BZN, pois tem modificação estrutural em potencial sítio de metabolização, o qual pode estar associado à toxicidade e nos estudos *in silico* prevê-se maior grau de absorção intestinal (91% versus 67%),

dada a sua maior lipofilicidade, podendo reduzir doses e efeitos adversos. Além disso, o derivado **1** reduziu a parasitemia (cepa Y) dos camundongos tratados, mantendo a sobrevivência em 100%.

Considerando esses resultados promissores do derivado **1**, o presente trabalho foi recentemente contemplado no Edital Inova Doenças Determinadas Socialmente – DDS da Fundação Oswaldo Cruz, que fomentará a realização dos ensaios pré-clínicos necessários para a determinação da farmacocinética oral e a segurança desta nova substância, conforme preconizado pela ANVISA.

Finalmente, este trabalho foi realizado com a colaboração de três grupos de pesquisa, envolvendo profissionais de diferentes áreas do conhecimento, como Química, Farmácia e Biologia. Essa abordagem interdisciplinar foi essencial para a síntese, caracterização e avaliação biológica das moléculas, permitindo uma análise mais completa de seu potencial contra o *Trypanosoma cruzi*.

7. Perspectiva

Para que o derivado **1** possa avançar em seu desenvolvimento, são propostos o aumento de escala (*scale-up*); estudo da atividade anti-*T. cruzi* em sistema tridimensional de esferóides cardíacos em diferentes DTUs de *T. cruzi*; complementação da prova de conmento *in vivo* com a avaliação da eficácia anti-*T. cruzi* em camundongos infectados com a cepa colombiana (resistente); determinação *in vitro* do grau de ligação à proteína plasmática do derivado **1**; avaliação *in vitro* da estabilidade metabólica em enzimas microsossomais do fígado e frações S9; análise do perfil farmacocinético de via oral em camundongos; avaliação do potencial de genotoxicidade pelo teste de micronúcleos em eritrócitos de mamíferos em BPL (OECD 474); avaliação do potencial de mutagenicidade pelo teste de Ames em BPL (OECD 471); determinação do potencial de toxicidade oral aguda em ratos em BPL (OECD 423).

8. Parte experimental

8.1. Materiais e métodos

Os solventes e reagentes utilizados foram adquiridos pela Aldrich®, Vetec®, Merck® e Tedia® com elevado grau de pureza, de forma que foram utilizados sem purificação adicional. As cromatografias em camada fina (CCF) foram realizadas utilizando a cromatofolha Merck® Kieselgel 60 F254 em sistema de eluição acetato de etila (8) : hexano (2) e acetato de etila (7) : hexano (3) com revelação em luz ultravioleta de ondas curtas e longas (254 e 366 nm).

A espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* em modo positivo (EMIES (+)) foi realizada em equipamento Waters® Micromass. Os valores são expressos em relação massa/carga (m/z) e são equivalentes à massa molecular da substância mais um próton ou íon sódio.

As amostras analisadas por espectroscopia na região do infravermelho (IV) foram feitas por refletância, diluídas em brometo de potássio (KBr), utilizando o espectrofotômetro Shimadzu®, modelo IR Prestige-21. Os valores correspondentes são expressos em número de ondas em centímetro recíproco (cm^{-1}).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos através de aparelho Bruker® Avance com frequência de 400 MHz para ^1H , 100 MHz para ^{13}C e 377 MHz para ^{19}F . Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm), as constantes de acoplamento (J) em hertz (Hz) e as multiplicidades foram designadas do seguinte modo: s (simpleto), d (duplete), dd (duplete de dupletos), t (triplete), dt (duplete de tripletos), td (triplete de dupletos), ddd (duplete de dupletos de dupletos), tdd (triplete de dupletos de dupletos), q (quarteto), p (pentano), m (multiplete). Nos espectros de ^1H e ^{13}C foi utilizado o trimetilsilano como referência em 0 ppm. Os espectros foram editados utilizando o programa *MestReNova*® versão 14.0.0-23239 (© 2019 Mestrelab Research S. L.). Os solventes utilizados para diluição das amostras foram dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6), e água deuterada (HDO).

Os compostos obtidos que necessitaram de purificação, foram purificados através de cromatografia em camada delgada (C.C.D.) ou através de recristalização. Para a purificação dos produtos através de C.C.D. foi utilizado cromatoplaças com comprimento de 20 x 20 cm com sílica gel 60 F-254, marca Merck, em sistema de eluição acetato de etila (4) : hexano (6). A visualização das substâncias em C.C.D. foi realizada em lâmpada de UV (254-366 nm). Para a purificação através de recristalização foi utilizado como solvente etanol ou tetraidrofurano.

A pureza dos compostos finais foi determinada por HPLC utilizando um dispositivo Agilent 1100 Series com bomba binária LC-20ADXR, degaseificador DGU-20A5R, injetor automático CBM-20A, forno de colunas CTO-20AC e detector por arranjo de diodos SPD-M20A. Aquisição de dados e controle foi feita pelo software AgilentChemStation 1100 Series. A fase móvel selecionada é composta por água (A) e acetonitrila (B) na proporção de 1:1, tendo como eluente acetonitrila (B). Foi utilizado o seguinte gradiente: em 0 min - 50% de B e 100% de A, em 5min 50% de B. Como pré-coluna e coluna foi utilizado LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm). A temperatura do forno foi de 25 °C e a vazão foi de 1,0 mL/min⁻¹. A detecção por UV foi efetuada a $\lambda = 361$ nm e todos os compostos enviados para avaliação biológica apresentaram uma pureza $\geq 95\%$.

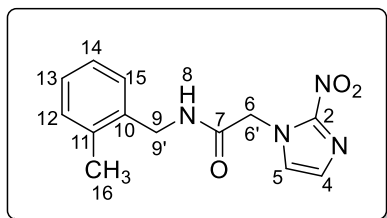
8.2. Síntese dos derivados finais 1-27

8.2.1. Procedimento Geral

A um balão foram adicionados 200 mg das aminas correspondentes (**28-54**), 3 equivalentes de carbonato de potássio, juntamente com 3 mL de água e 3mL de acetato de etila. Em seguida, foi adicionado gota a gota 1,1 equivalentes de cloreto de cloroacetila para as aminas de **28-53** e para a amina **54**, 1,1 equivalentes de cloreto de 3-cloropropanoila. A mistura se manteu em agitação à temperatura ambiente por 10 minutos, tempo necessário para ocorrer o consumo total das aminas. Após, sem nenhum tipo de isolamento, foi adicionado ao balão 1,1 equivalentes de 2-nitroimidazol e 0,2 equivalentes de brometo de tetrabutilamônio. A mistura foi mantida em agitação vigorosa na temperatura de 75 °C por 24 h. Em seguida, o balão foi resfriado à temperatura ambiente e levado ao *freezer* (-20 °C) por 1 hora. Os produtos **1-11**, **13-24** e **27** precipitaram no balão, e o sólido formado foi filtrado à vácuo, lavado com água destilada gelada e etanol gelado, com exceção de **10** que foi lavado com diclorometano gelado ao invés de etanol. Já os produtos **12**, **25** e **26** não precipitaram, então estes foram vertidos em acetato de etila e a fase orgânica foi extraída com água destilada três vezes, seca com sulfato de sódio anidro e concentrada à vácuo. Dezesseis dos derivados (**1-7**, **9-11**, **13**, **16-18**, **20-21** e **24**), foram obtidos sem a necessidade de posterior purificação, os demais foram purificados através de recristalização ou por cromatografia em camada delgada. Os produtos **8**, **12**, **14**, **15** e **22**, foram purificados através de uma recristalização utilizando como solvente entre 10-60 mL de etanol (**15** e **22** = 10 mL; **8** e **14** = 15 mL; **12** = 60 mL), enquanto para o derivado **19**, foi utilizado 15 mL de tetraidrofurano como solvente. O derivado **14** teve que ter o processo de recristalização repetido para alcançar a pureza necessária. Os demais produtos (**23**, **25-27**),

foram purificados por cromatografia em camada delgada utilizando como eluente acetato de etila (4:6) hexano.

N-(2-metilbenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (1)



Massa obtida 307 mg / **Rendimento** 68 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 2,59$

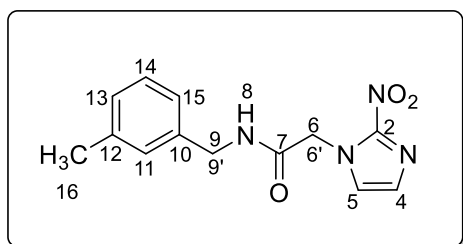
EMAR-IES(+) calc. $[M+23]^+$: m/z 297,1066 / exp. $[M+23]^+$: m/z 297,0957.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.238 (N-H), 1.658 (C=O), 1.530 e 1.357 (N-O).

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,69 (H-8; t; $J = 5,6$ Hz; 1H), 7,64 (H-5; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,27 – 7,23 (H-15; m; 1H), 7,19 (H-4; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,20 – 7,15 (H-12, H-13, H-14; m; 3H), 5,17 (H-6,6'; s; 2H), 4,30 (H-9,9'; d; $J = 5,5$ Hz; 2H), 2,27 (H-16; s; 3H).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165,49 (C-7), 144,98 (C-2), 136,39 (C-10), 135,86 (C-11), 130,01 (C-4), 128,85 (C-5), 127,89 (C-15), 127,49 (C-12), 127,17 (C-13), 125,80 (C-14), 51,56 (C-6), 40,67 (C-9), 18,59 (C-16).

N-(3-metilbenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (2)



Massa obtida 260 mg / **Rendimento** 57 %

Pureza por CLUE-UV 99,6% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,89$

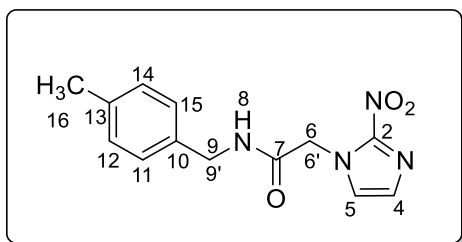
EMAR-IES(+) calc. $[M+23]^+$: m/z 297,1066 / exp. $[M+23]^+$: m/z 297,0943.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.266 (N-H), 1.657 (C=O), 1.536 e 1.357 (N-O).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,80 (H-8; t; *J* = 5,9 Hz; 1H), 7,64 (H-5; d; *J* = 1,1 Hz; 1H), 7,25 – 7,18 (H-4, H-14; m; 2H), 7,11 – 7,04 (H-11, H-13, H-15; m; 3H), 5,17 (H-6,6'; s; 2H), 4,29 (H-9,9'; d; *J* = 5,9 Hz; 2H), 2,29 (H-16; s; 3H).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,68 (C-7), 144,98 (C-2), 138,75 (C-10), 137,44 (C-12), 128,86 (C-5), 128,25 (C-4), 127,88 (C-14), 127,54 (C-11, C-13), 124,34 (C-15), 51,63 (C-6), 42,30 (C-9), 21,02 (C-16).

N-(4-metilbenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (3)



Massa obtida 267 mg / **Rendimento** 59 %

Pureza por CLUE-UV 100% (λ = 361 nm) *t*_R = 1,88

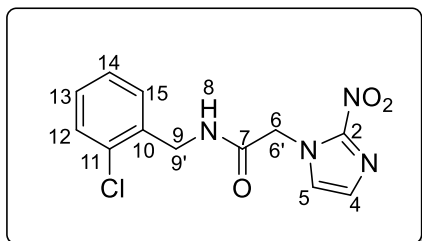
EMAR-IES(+) calc. [M+23]⁺: *m/z* 297,1066 / exp. [M+23]⁺: *m/z* 297,0961.

IV ν (cm⁻¹)/estiramento: 3.297 (N-H), 1.661 (C=O), 1.536 e 1.365 (N-O).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,77 (H-8; t; *J* = 5,9 Hz; 1H), 7,63 (H-5; d; *J* = 1,1 Hz; 1H), 7,19 (H-4; d; *J* = 1,1 Hz; 1H), 7,18 – 7,12 (H-11, H-12, H-14, H-15; m; 4H), 5,15 (H-6,6'; s; 2H), 4,28 (H-9,9'; d; *J* = 5,8 Hz; 2H), 2,28 (H-16; s; 3H).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,56 (C-7), 144,94 (C-2), 136,02 (C-10), 135,79 (C-13), 128,84 (C-12, C-14), 128,79 (C-5), 127,45 (C-4), 127,22 (C-11, C-15), 51,57 (C-6), 42,06 (C-9), 20,64 (C-16).

N-(2-clorobenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (4)



Massa obtida 300 mg / **Rendimento** 72 %

Pureza por CLUE-UV 100% (λ = 361 nm) *t*_R = 1,89

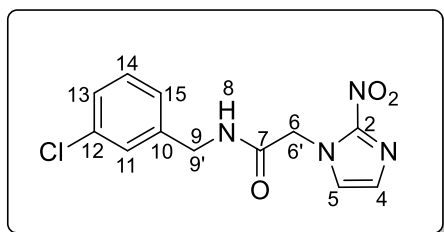
EMAR-IES(+) calc. $[M+1]^+$: m/z 295,0520 / exp. $[M+1]^+$: m/z 295,0592. Calc. $[M+23]^+$: m/z 317,0520 / exp. $[M+23]^+$: m/z 317,0412.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.236 (N-H), 1.657 (C=O), 1.529 e 1.356 (N-O), 784 (C-Cl).

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,87 (H-8; t; $J = 5,8$ Hz; 1H), 7,64 (H-5; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,45 (H-15; dd; $J = 7,5$; 1,7 Hz; 1H), 7,40 (H-12; dd; $J = 7,5$; 2,0 Hz; 1H), 7,37 – 7,28 (H-13, H-14; m; 2H), 7,20 (H-4; d; $J = 1,0$ Hz; 1H), 5,21 (H-6,6'; s; 2H), 4,40 (H-9,9'; d; $J = 5,7$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165,96 (C-7), 144,95 (C-2), 135,76 (C-10), 132,13 (C-11), 129,18 (C-12), 129,00 (C-13), 128,88 (C-15), 128,84 (C-5), 127,52 (C-4), 127,20 (C-14), 51,57 (C-6).

N-(3-clorobenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (5)



Massa obtida 188 mg / **Rendimento** 45 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,97$

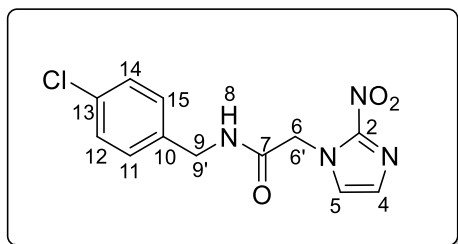
EMAR-IES(+) calc. $[M+23]^+$: m/z 317,0520 / exp. $[M+23]^+$: m/z 317,0418.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.230 (N-H), 1.655 (C=O), 1.530 e 1.358 (N-O), 773 (C-Cl).

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,88 (H-8; t; $J = 5,9$ Hz; 1H), 7,64 (H-5; d; $J = 1,0$ Hz; 1H), 7,41 – 7,28 (H-11, H-13, H-14; m; 3H), 7,24 (H-15; dt; $J = 7,3$, 1,5 Hz; 1H), 7,20 (H-4; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 5,19 (H-6,6'; s; 2H), 4,34 (H-9,9'; d; $J = 6,0$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165,53 (C-7), 144,55 (C-2), 141,16 (C-10), 132,67 (C-12), 129,80 (C-14), 128,44 (C-5), 127,12 (C-4), 126,58 (C-11), 126,49 (C-13), 125,45 (C-15), 51,20 (C-6), 41,33 (C-9).

N-(4-clorobenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (6)



Massa obtida 293 mg / **Rendimento** 70 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,99$

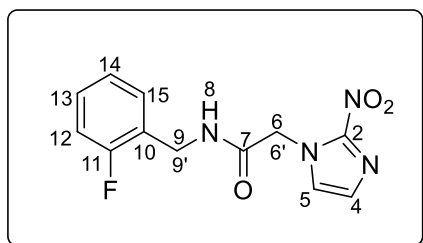
EMAR-IES(+) calc. $[M+23]^+$: m/z 317,0520 / exp. $[M+23]^+$: m/z 317,0398.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.293 (N-H), 1.659 (C=O), 1.529 e 1.357 (N-O), 780 (C-Cl).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,88 (H-8; t; $J = 5,9$ Hz; 1H), 7,63 (H-5; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,42 – 7,36 (H-12, H-14; m; 2H), 7,32 – 7,27 (H-11, H-15; m; 2H), 7,19 (H-4; d; $J = 1,0$ Hz; 1H), 5,17 (H-6,6'; s; 2H), 4,31 (H-9,9'; d; $J = 5,8$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 166,28 (C-7), 145,41 (C-2), 138,48 (C-13), 131,97 (C-10), 129,57 (C-11, C-15), 129,29 (C-5), 128,72 (C-12, C-14), 127,97 (C-4), 52,05 (C-6), 42,10 (C-9).

N-(2-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (7)



Massa obtida 216 mg / **Rendimento** 49 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,65$

EMAR-IES(+) calc. $[M+23]^+$: m/z 301,0815 / exp. $[M+23]^+$: m/z 301,0695.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.264 (N-H), 1.656 (C=O), 1.535 e 1.357 (N-O), 1.233 (C-F).

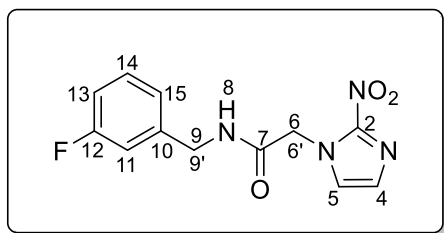
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,84 (H-8; t; $J = 5,8$ Hz; 1H), 7,63 (H-5; s; 1H), 7,39 – 7,29 (H-13, H-15; m; 2H), 7,23 – 7,15 (H-4, H-12, H-14; m; 3H), 5,17 (H-6,6'; s; 2H), 4,36 (H-9,9'; d; $J = 5,8$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 165,84 (C-7), 160,09 (C-11; d; $J = 244,6$ Hz), 144,96 (C-2), 129,66 (C-15; d; $J = 4,3$ Hz), 129,19 (C-13; d; $J = 8,1$ Hz), 128,84 (C-5), 127,51 (C-4),

125,46 (C-10; d; $J = 14,7$ Hz), 124,37 (C-14; d; $J = 3,5$ Hz), 115,15 (C-12; d; $J = 21,0$ Hz), 51,56 (C-6), 36,26 (C-9; d; $J = 4,5$ Hz).

RMN ^{19}F (377 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -118,84 (dt, $J = 11,8$; 6,5 Hz).

N-(3-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (8)



Massa obtida 164 mg / **Rendimento** 37 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,80$

EMAR-IES(+) calc. $[\text{M}+1]^+$: m/z 279,0815 / exp. $[\text{M}+1]^+$: m/z 279,0891. Calc. $[\text{M}+23]^+$: m/z 301,0815 / exp. $[\text{M}+23]^+$: m/z 301,0720.

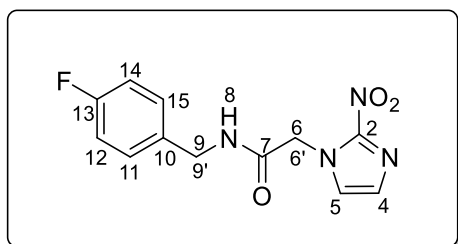
IV v (cm^{-1})/estiramento: 3.285 (N-H), 1.654 (C=O), 1.537 e 1.357 (N-O), 1.251 (C-F).

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,88 (H-8; t; $J = 6,0$ Hz; 1H), 7,64 (H-5; s; 1H), 7,39 – 7,35 (H-14; m; 1H), 7,20 (H-4; s; 1H), 7,13 – 7,05 (H-11, H-13, H-15; m; 3H), 5,19 (H-6,6'; s; 2H), 4,35 (H-9,9'; d; $J = 5,9$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165,96 (C-7), 162,29 (C-12; d; $J = 243,3$ Hz), 144,97 (C-2), 142,00 (C-10; d; $J = 7,1$ Hz), 130,29 (C-14; d; $J = 8,1$ Hz), 128,87 (C-5), 127,56 (C-4), 123,16 (C-15; d; $J = 2,8$ Hz), 113,85 (C-13; d; $J = 10,7$ Hz), 113,63 (C-11; d; $J = 10,0$ Hz), 51,63 (C-6), 41,78 (C-9; d; $J = 1,8$ Hz).

RMN ^{19}F (377 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -113,43 (td; $J = 9,6$, 6,1 Hz).

N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (9)



Massa obtida 292 mg / **Rendimento** 66 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,66$

EMAR-IES(+) calc. $[M+23]^+$: m/z 301,0815 / exp. $[M+23]^+$: m/z 301,0706.

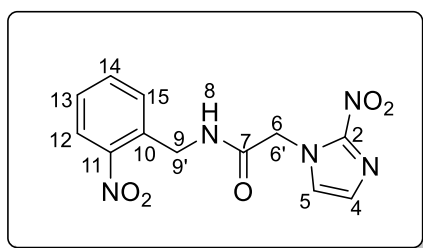
IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.290 (N-H), 1.661 (C=O), 1.536 e 1.365 (N-O), 1.243 (C-F).

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,84 (H-8; t; $J = 5,9$ Hz; 1H), 7,63 (H-5; s; 1H), 7,34 – 7,29 (H-11, H-15; m; 2H), 7,20 – 7,13 (H-4, H-12, H-14; m; 3H), 5,16 (H-6,6'; s; 2H), 4,31 (H-9,9'; d; $J = 5,8$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165,09 (C-7), 160,63 (C-13; d; $J = 242,4$ Hz), 144,32 (C-2), 134,48 (C-10; d; $J = 3,0$ Hz), 128,60 (C-11, C-15; d; $J = 8,1$ Hz), 128,18 (C-5), 126,86 (C-4), 114,42 (C-12, C-14; d; $J = 21,3$ Hz), 50,95 (C-6), 40,97 (C-9).

RMN ^{19}F (377 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -115,93 (tt; $J = 9,7, 5,5$ Hz).

2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-N-(2-nitrobenzil)acetamida (10)



Massa obtida 200 mg / **Rendimento** 62 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,61$

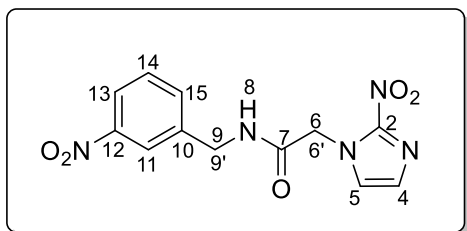
EMAR-IES(+) calc. $[M+1]^+$: m/z 306,0760 / exp. $[M+1]^+$: m/z 306,0846. Calc. $[M+23]^+$: m/z 328,0760 / exp. $[M+23]^+$: m/z 328,0665.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.265 (N-H), 1.659 (C=O), 1.539 e 1.357 (N-O).

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,94 (H-8; t; $J = 5,8$ Hz; 1H), 8,06 (H-12; dd; $J = 8,1, 1,3$ Hz; 1H), 7,75 (H-14; td; $J = 7,6, 1,3$ Hz; 1H), 7,64 (H-5; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,61 – 7,53 (H-13, H-15; m; 1H), 7,20 (H-4; d; $J = 1,0$ Hz; 1H), 5,22 (H-6,6'; s; 2H), 4,63 (H-9-9'; d; $J = 5,7$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166,81 (C-7), 148,33 (C-11), 145,39 (C-2), 134,27 (C-14), 134,14 (C-10), 130,04 (C-15), 129,32 (C-5), 128,98 (C-13), 128,01 (C-4), 125,16 (C-12), 52,03 (C-6).

2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-N-(3-nitrobenzil)acetamida (11)



Massa obtida 153 mg / **Rendimento** 47 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,61$

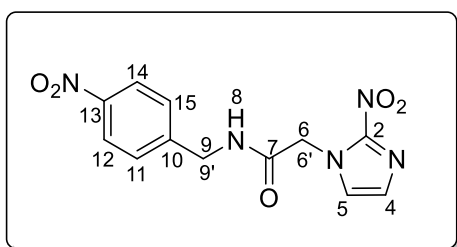
EMAR-IES(+) calc. $[M+23]^+$: m/z 328,0760 / exp. $[M+23]^+$: m/z 328,0642.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.289 (N-H), 1.661 (C=O), 1.529 e 1.345 (N-O).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,00 (H-8; t; $J = 6,0$ Hz; 1H), 8,18 – 8,10 (H-11, H-13; m; 2H), 7,74 (H-15; dt; $J = 7,7, 1,4$ Hz; 1H), 7,65 (H-14; t; $J = 7,9$ Hz; 1H), 7,64 (H-5; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,20 (H-4; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 5,20 (H-6,6'; s; 2H), 4,47 (H-9,9'; d; $J = 5,9$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 166,03 (C-7), 147,73 (C-12), 144,81 (C-2), 141,34 (C-10), 133,83 (C-15), 129,76 (C-14), 128,72 (C-5), 127,42 (C-4), 121,85 (C-13), 121,70 (C-11), 51,49 (C-6), 41,53 (C-9).

2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-N-(4-nitrobenzil)acetamida (12)



Massa obtida 195 mg / **Rendimento** 60 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,72$

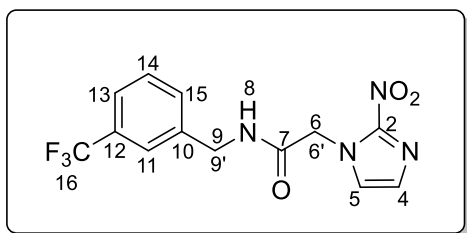
EMAR-IES(+) calc. $[M+23]^+$: m/z 328,0760 / exp. $[M+23]^+$: m/z 328,0667.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.264 (N-H), 1.679 (C=O), 1.515 e 1.346 (N-O).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,99 (H-8; t; $J = 6,0$ Hz; 1H), 8,24 – 8,18 (H-12, H-14; m; 2H), 7,64 (H-5; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,58 – 7,52 (H-11, H-15; m; 2H), 7,20 (H-4; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 5,21 (H-6,6'; s; 2H), 4,47 (H-9,9'; d; $J = 5,9$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166,02 (C-7), 146,95 (C-13), 146,45 (C-10), 144,83 (C-2), 128,73 (C-5), 128,10 (C-11, C-15), 127,44 (C-4), 123,37 (C-12, C-14), 51,47 (C-6), 41,75 (C-9).

2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-N-(3-(trifluorometil)benzil)acetamida (13)



Massa obtida 123 mg / **Rendimento** 33 %

Pureza por CLUE-UV 97,5% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 2,28$

EMAR-IES(+) calc. $[\text{M}+23]^+$: m/z 351,0783 / exp. $[\text{M}+23]^+$: m/z 351,0668.

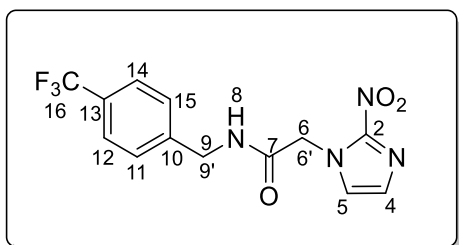
IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.234 (N-H), 1.659 (C=O), 1.534 e 1.328 (N-O), 1.120 (C-F).

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,94 (H-8; t; $J = 6,0$ Hz; 1H), 7,66 – 7,56 (H-5, H-11, H-13, H-14, H-15; m; 5H), 7,20 (H-4; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 5,20 (H-6,6'; s; 2H), 4,43 (H-9,9'; d; $J = 5,9$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166,53 (C-7), 145,39 (C-2), 140,96 (C-10), 131,77 (C-14), 129,83 (C-15), 129,61 (C-12; q; $J = 31,4$ Hz), 129,30 (C-5), 127,99 (C-4), 124,70 (C-16; q; $J = 272,4$ Hz), 124,39 – 123,76 (C-11, C-13; m), 52,08 (C-6), 42,28 (C-9).

RMN ^{19}F (377 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -61,06 (F-16).

2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-N-(4-(trifluorometil)benzil)acetamida (14)



Massa obtida 154 mg / **Rendimento** 41 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 2,31$

EMAR-IES(+) calc. $[\text{M}+23]^+$: m/z 351,0783 / exp. $[\text{M}+23]^+$: m/z 351,0690.

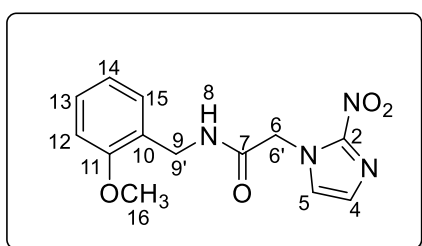
IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.283 (N-H), 1.679 (C=O), 1.528 e 1.327 (N-O), 1.110 (C-F).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,94 (H-8; t; $J = 6,0$ Hz; 1H), 7,69 (H-12, H-14; d; $J = 8,1$ Hz; 2H), 7,61 (H-5; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,49 (H-11, H-15; d; $J = 8,0$ Hz; 2H), 7,19 (H-4; d; $J = 1,0$ Hz; 1H), 5,18 (H-6,6'; s; 2H), 4,41 (H-9,9'; d; $J = 5,9$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 166,20 (C-7), 145,06 (C-2), 143,98 (C-10), 129,00 (C-5), 128,01 (C-11, C-15), 127,82 (C-13; q; $J = 31,7$ Hz), 127,72 (C-4), 125,35 (C-12, C-14; q; $J = 3,8$ Hz), 124,47 (C-16; q; $J = 271,9$ Hz), 51,74 (C-6), 42,11 (C-9).

RMN ^{19}F (377 MHz, DMSO- d_6) δ -60,82 (F-16).

N-(2-metoxibenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (15)



Massa obtida 263 mg / **Rendimento** 63 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,83$

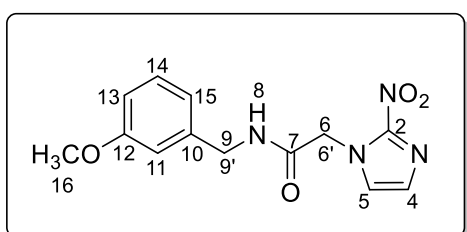
EMAR-IES(+) calc. $[\text{M}+1]^+$: m/z 291,1015 / exp. $[\text{M}+1]^+$: m/z 291,1092. Calc. $[\text{M}+23]^+$: m/z 313,1015 / exp. $[\text{M}+23]^+$: m/z 313,0910.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.219 (N-H), 1.650 (C=O), 1.536 e 1.359 (N-O), 1.159 (C-O).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,65 (H-8; t; $J = 5,8$ Hz; 1H), 7,63 (H-5; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,28 – 7,23 (H-13; m; 1H), 7,21 (H-15; dd; $J = 7,5, 1,7$ Hz; 1H), 7,19 (H-4; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 6,99 (H-12; dd; $J = 8,2, 1,1$ Hz; 1H), 6,92 (H-14; td; $J = 7,4, 1,1$ Hz; 1H), 5,18 (H-6,6'; s; 2H), 4,28 (H-9,9'; d; $J = 5,7$ Hz; 2H), 3,80 (H-16; s; 3H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 165,69 (C-7), 156,71 (C-11), 145,00 (C-2), 128,84 (C-5), 128,35 (C-15), 127,91 (C-13), 127,49 (C-4), 126,17 (C-10), 120,15 (C-14), 110,55 (C-12), 55,36 (C-16), 51,62 (C-6), 37,55 (C-9).

N-(3-metoxibenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (16)



Massa obtida 150 mg / **Rendimento** 35 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,61$

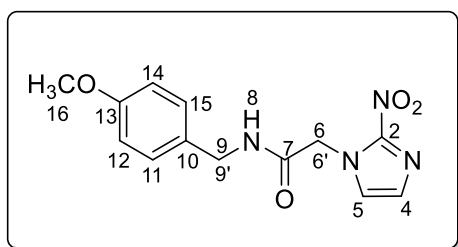
EMAR-IES(+) calc. $[M+23]^+$: m/z 313,1015 / exp. $[M+23]^+$: m/z 313,0904.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.283 (N-H), 1.656 (C=O), 1.543 e 1.359 (N-O), 1.157 (C-O).

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,82 (H-8; t; $J = 5,9$ Hz; 1H), 7,64 (H-5; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,24 (H-14; t; $J = 8,0$ Hz; 1H), 7,20 (H-4; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 6,87 – 6,80 (H-11, H-13, H-15; m; 3H), 5,18 (H-6,6'; s; 2H), 4,31 (H-9,9'; d; $J = 5,9$ Hz; 2H), 3,75 (H-16; s; 3H).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165,73 (C-7), 159,38 (C-12), 144,97 (C-2), 140,52 (C-10), 129,39 (C-14), 128,86 (C-5), 127,52 (C-4), 119,35 (C-15), 112,57 (C-11, C-13), 54,98 (C-16), 51,64 (C-6), 42,23 (C-9).

N-(4-metoxibenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (17)



Massa obtida 356 mg / **Rendimento** 84 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,58$

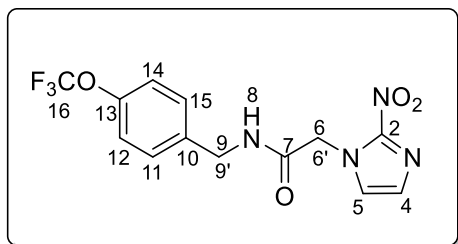
EMAR-IES(+) calc. $[M+23]^+$: m/z 313,1015 / exp. $[M+23]^+$: m/z 313,0902.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.258 (N-H), 1.653 (C=O), 1.530 e 1.353 (N-O), 1.157 (C-O).

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,75 (H-8; t; $J = 5,8$ Hz; 1H), 7,63 (H-5; s; 1H), 7,23 – 7,16 (H-4, H-11, H-15; m; 3H), 6,93 – 6,85 (H-12, H-14; m; 2H), 5,14 (H-6,6'; s; 2H), 4,25 (H-9,9'; d; $J = 5,8$ Hz; 2H), 3,73 (H-16; s; 3H).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165,49 (C-7), 158,34 (C-13), 144,97 (C-2), 130,78 (C-10), 128,81 (C-5), 128,63 (C-11, C-15), 127,47 (C-4), 113,73 (C-12, C-14), 55,09 (C-16), 51,59 (C-6), 41,80 (C-9).

2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-N-(4-(trifluorometoxi)benzil)acetamida (18)



Massa obtida 165 mg / **Rendimento** 46 %

Pureza por CLUE-UV 99,2 % ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 2,43$

EMAR-IES(+) calc. $[M+23]^+$: m/z 367,0732 / exp. $[M+23]^+$: m/z 367,0637.

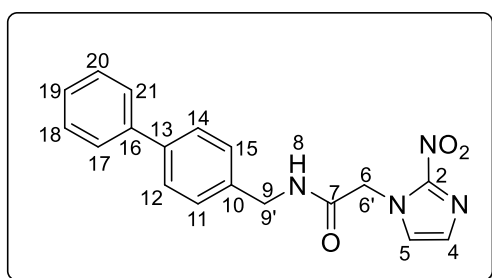
IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.289 (N-H), 1.660 (C=O), 1.536 e 1.367 (N-O), 1.219 (C-F), 1.156 (C-O).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,88 (H-8; t; $J = 5,9$ Hz; 1H), 7,63 (H-5; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,43 – 7,38 (H-11, H-15; m; 2H), 7,37 – 7,30 (H-12, H-14; m; 2H), 7,20 (H-4; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 5,18 (H-6,6'; s; 2H), 4,36 (H-9,9'; d; $J = 5,9$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 165,75 (C-7), 147,19 (C-13; q; $J = 1,8$ Hz), 144,85 (C-2), 138,40 (C-10), 129,00 (C-11, C-15), 128,73 (C-5), 127,42 (C-4), 120,91 (C-12, C-14), 120,00 (C-16; q; $J = 256,0$ Hz), 51,48 (C-6), 41,52 (C-9).

RMN ^{19}F (377 MHz, DMSO- d_6) δ -56,86 (F-16).

N-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (19)



Massa obtida 197 mg / **Rendimento** 54 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 3,16$

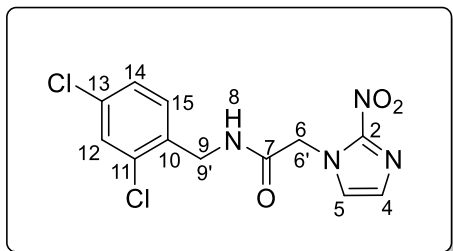
EMAR-IES(+) calc. $[M+23]^+$: m/z 359,1222 / exp. $[M+23]^+$: m/z 359,1104.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.291 (N-H), 1.661 (C=O), 1.531 e 1.359 (N-O).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,87 (H-8; t; $J = 5,9$ Hz; 1H), 7,69 – 7,61 (H-5, H-12, H-14, H-17, H-21; m; 5H), 7,46 (H-18, H-20; t; $J = 7,6$ Hz; 2H), 7,41 – 7,32 (H-11, H-15, H-19; m; 3H), 7,21 (H-4; s; 1H), 5,20 (H-6,6'; s; 2H), 4,38 (H-9,9'; d; $J = 5,8$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165,71 (C-7), 144,97 (C-2), 139,87 (C-16), 138,90 (C-10), 138,11 (C-13), 128,93 (C-18, C-20), 128,83 (C-5), 127,89 (C-11, C-15), 127,50 (C-4), 127,37 (C-19), 126,61 (C-12, C-14, C-17, C-21), 51,61 (C-6), 42,04 (C-9).

N-(2,4-diclorobenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (20)



Massa obtida 235 mg / **Rendimento** 62 %

Pureza por CLUE-UV 99,4% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,83$

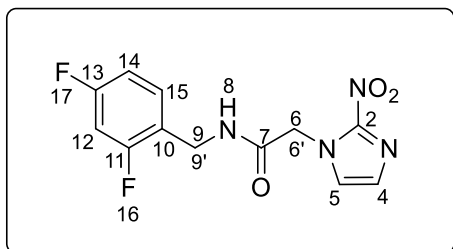
EMAR-IES(+) calc. $[\text{M}+23]^+$: m/z 351,0130 / exp. $[\text{M}+23]^+$: m/z 351,0016.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.255 (N-H), 1.663 (C=O), 1.531 e 1.359 (N-O), 775 (C-Cl).

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,89 (H-8; t; $J = 5,8$ Hz; 1H), 7,62 (H-5; d; $J = 1,2$ Hz; 1H), 7,61 (H-12; d; $J = 2,0$ Hz; 1H), 7,43 (H-14; dd; $J = 8,3, 2,0$ Hz; 1H), 7,39 (H-15; d; $J = 8,4$ Hz; 1H), 7,19 (H-4; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 5,19 (H-6,6'; s; 2H), 4,36 (H-9,9'; d; $J = 5,7$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166,52 (C-7), 145,37 (C-2), 135,50 (C-10), 133,56 (C-11), 132,96 (C-13), 130,85 (C-15), 129,29 (C-5), 129,11 (C-12), 128,00 (C-4), 127,76 (C-14), 79,61 (C-6), 52,00 (C-9).

N-(2,4-difluorobenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (21)



Massa obtida 165 mg / **Rendimento** 46 %

Pureza por CLUE-UV 100 % ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,78$

EMAR-IES(+) calc. $[\text{M}+23]^+$: m/z 319,0721 / exp. $[\text{M}+23]^+$: m/z 319,0601.

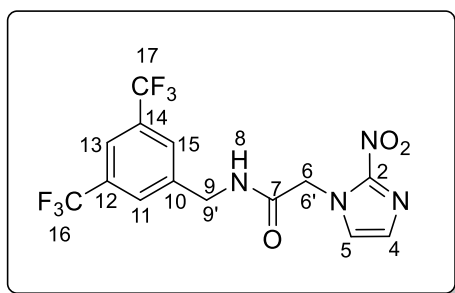
IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.243 (N-H), 1.656 (C=O), 1.530 e 1.359 (N-O), 1.262 (C-F).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,84 (H-8; t; $J = 5,8$ Hz; 1H), 7,62 (H-5; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,40 (H-15; td; $J = 8,7, 6,6$ Hz; 1H), 7,23 (H-12; ddd; $J = 10,4, 9,3, 2,5$ Hz; 1H), 7,19 (H-4; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,08 (H-14; tdd; $J = 8,6, 2,6, 1,1$ Hz; 1H), 5,15 (H-6,6'; s; 2H), 4,33 (H-9,9'; d; $J = 5,7$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 165,86 (C-7), 162,04 (C-11; dd; $J = 146,8, 12,3$ Hz), 159,59 (C-13; dd; $J = 148,9, 12,4$ Hz), 144,94 (C-2), 130,96 (C-15; dd; $J = 9,9, 5,9$ Hz), 128,83 (C-5), 127,52 (C-4), 121,90 (C-10; dd; $J = 15,1, 3,7$ Hz), 111,33 (C-14; dd; $J = 21,1, 3,7$ Hz), 103,74 (C-12; t; $J = 25,8$ Hz), 51,54 (C-6), 35,90 (C-9; d; $J = 3,8$ Hz).

RMN ^{19}F (377 MHz, DMSO- d_6) δ -111,65 – -111,78 (F-16; m), -114,21 – -114,34 (F-17; m).

N-(3,5-bis(trifluorometil)benzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (22)



Massa obtida 136 mg / **Rendimento** 42 %

Pureza por CLUE-UV 100 % ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 3,70$

EMAR-IES(+) calc. $[\text{M}+1]^+$: m/z 397,0657 / exp. $[\text{M}+1]^+$: m/z 397,0726. Calc. $[\text{M}+23]^+$: m/z 419,0657 / exp. $[\text{M}+23]^+$: m/z 419,0542.

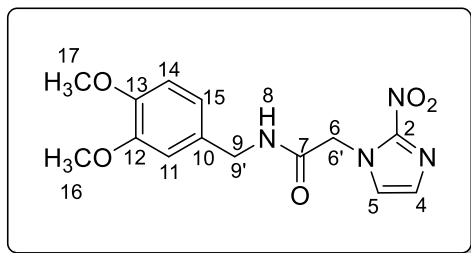
IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.342 (N-H), 1.676 (C=O), 1.544 e 1.376 (N-O), 1.287 (C-F).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,02 (H-8; t; $J = 6,0$ Hz; 1H), 7,98 (H-13; s; 1H), 7,95 (H-11, H-15; s; 2H), 7,62 (H-5; d; $J = 1,0$ Hz; 1H), 7,19 (H-4; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 5,20 (H-6,6'; s; 2H), 4,52 (H-9,9'; d; $J = 5,9$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 166,93 (C-7), 145,30 (C-2), 143,11 (C-10), 130,70 (C-12, C-14; q; $J = 32,8$ Hz), 129,32 (C-5), 128,29 (C-11, C-15; q; $J = 3,8$ Hz), 128,04 (C-4), 123,80 (C-16, C-17; q; $J = 272,8$ Hz), 121,12 (C-13; p; $J = 3,9$ Hz), 52,11 (C-6), 41,96 (C-9).

RMN ^{19}F (377 MHz, DMSO- d_6) δ -61,34 (F-16, F-17).

N-(3,4-dimetoxibenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (23)



Massa obtida 95 mg / Rendimento 27 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,49$

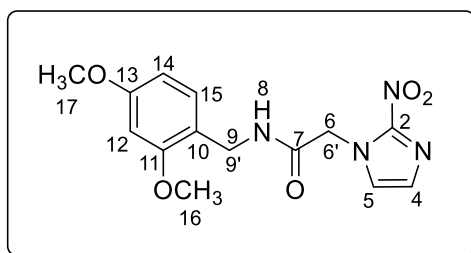
EMAR-IES(+) calc. $[M+1]^+$: m/z 321,1121 / exp. $[M+1]^+$: m/z 321,1199. Calc. $[M+23]^+$: m/z 343,1121 / exp. $[M+23]^+$: m/z 343,1016.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.272 (N-H), 1.655 (C=O), 1.550 e 1.351 (N-O), 1.145 (C-O).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,76 (H-8; t; $J = 5,8$ Hz; 1H), 7,63 (H-5; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,20 (H-4; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 6,90 (H-14; d; $J = 8,2$ Hz; 1H), 6,87 (H-11; d; $J = 2,0$ Hz; 1H), 6,79 (H-15; dd; $J = 8,2, 2,0$ Hz; 1H), 5,15 (H-6,6'; s; 2H), 4,26 (H-9,9'; d; $J = 5,8$ Hz; 2H), 3,75 (H-17; s; 3H), 3,73 (H-16; s; 3H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 165,44 (C-7), 148,59 (C-12), 147,74 (C-13), 144,84 (C-2), 131,20 (C-10), 128,72 (C-5), 127,38 (C-4), 119,21 (C-15), 111,54 (C-14), 111,03 (C-11), 55,46 (C-16), 55,22 (C-17), 51,53 (C-6), 41,93 (C-9).

N-(2,4-dimetoxibenzil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (24)



Massa obtida 187 mg / Rendimento 49 %

Pureza por CLUE-UV 97,8% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,81$

EMAR-IES(+) calc. $[M+1]^+$: m/z 321,1121 / exp. $[M+1]^+$: m/z 321,1199. Calc. $[M+23]^+$: m/z 343,1121 / exp. $[M+23]^+$: m/z 343,1017.

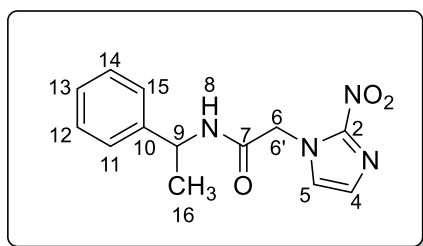
IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.264 (N-H), 1.647 (C=O), 1.536 e 1.361 (N-O), 1.156 (C-O).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,55 (H-8; t; $J = 5,7$ Hz; 1H), 7,62 (H-5; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,18 (H-4; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,11 (H-15; d; $J = 8,3$ Hz; 1H), 6,55 (H-12; d; $J = 2,4$ Hz; 1H),

6,48 (H-14; dd; $J = 8,3, 2,4$ Hz; 1H), 5,14 (H-6,6'; s; 2H), 4,19 (H-9,9'; d; $J = 5,6$ Hz; 2H), 3,79 (H-16; s; 3H), 3,75 (H-17; s; 3H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 165,33 (C-7), 159,78 (C-13), 157,64 (C-11), 144,87 (C-2), 128,91 (C-15), 128,67 (C-5), 127,32 (C-4), 118,24 (C-10), 104,18 (C-14), 98,13 (C-12), 55,31 (C-17), 55,12 (C-16), 51,46 (C-6), 37,12 (C-9).

2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-N-(1-feniletil)acetamida (25)



Massa obtida 177 mg / **Rendimento** 39 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,77$

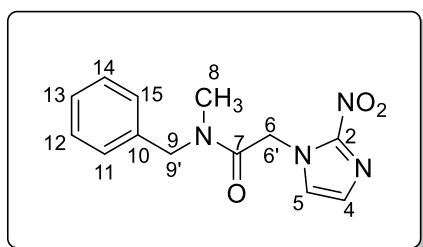
EMAR-IES(+) calc. $[M+23]^+$: m/z 297,1066 / exp. $[M+23]^+$: m/z 297,0973.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.224 (N-H), 1.672 (C=O), 1.544 e 1.360 (N-O).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,80 (H-8; d; $J = 7,9$ Hz; 1H), 7,61 (H-5; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,35 – 7,32 (H-11, H-12, H-14, H-15; m; 4H), 7,28 – 7,21 (H-13; m; 1H), 7,17 (H-4; d; $J = 1,0$ Hz; 1H), 5,14 (H-6,6'; s; 2H), 4,92 (H-9; p; $J = 7,1$ Hz; 1H), 1,39 (H-16; d; $J = 7,0$ Hz; 3H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 164,59 (C-7), 144,82 (C-2), 143,88 (C-10), 128,71 (C-5), 128,19 (C-12, C-14), 127,30 (C-4), 126,70 (C-13), 125,84 (C-11, C-15), 51,49 (C-6), 48,18 (C-9), 22,34 (C-16).

N-benzil-N-metil-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (26)



Massa obtida 255 mg / **Rendimento** 58 %

Pureza por CLUE-UV 95,5% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,95$

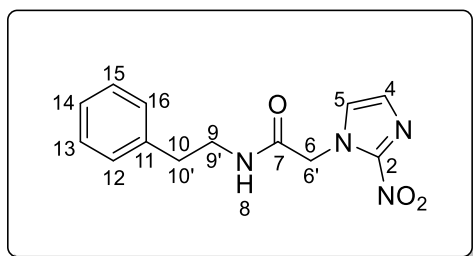
EMAR-IES(+) calc. $[M+23]^+$: m/z 297,1066 / exp. $[M+23]^+$: m/z 297,0957.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 1.655 (C=O), 1.537 e 1.359 (N-O), 1.292 (C-N).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,57 (H-5; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,46 – 7,40, 7,37 – 7,32 (H-11, H-13, H-15; m; 3H), 7,30 – 7,26, 7,26 – 7,21 (H-12, H-14; m; 2H), 7,19, 7,18 (H-4; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 5,50 (H-6,6'; s; 1H), 4,64, 4,54 (H-9,9'; s; 2H), 3,00, 2,82 (H-8; s; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 165,69, 165,42 (C-7), 145,10 (C-2), 136,84, 136,25 (C-10), 128,71, 128,50 (C-5); 128,41, 128,32 (C-11, C-15), 127,49, 127,43 (C-4), 127,40, 127,34 (C-12, C-14), 127,15, 126,84 (C-13), 51,37, 50,32 (C-9), 51,11, 50,96 (C-6), 33,64, 33,37 (C-8).

2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-N-fenetilacetamida (27)



Massa obtida 182 mg / **Rendimento** 40 %

Pureza por CLUE-UV 100% ($\lambda = 361$ nm) $t_R = 1,75$

EMAR-IES(+) calc. $[M+23]^+$: m/z 297,1066 / exp. $[M+23]^+$: m/z 297,0957.

IV ν (cm^{-1})/estiramento: 3.290 (N-H), 1.681 (C=O), 1.528 e 1.358 (N-O).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,41 (H-8; t; $J = 5,6$ Hz; 1H), 7,58 (H-5; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 7,32 – 7,26 (H-13, H-15; m; 2H), 7,23 – 7,19 (H-12, H-14, H-16; m; 3H), 7,18 (H-4; d; $J = 1,1$ Hz; 1H), 5,06 (H-6,6'; s; 2H), 3,31 (H-9,9'; td; $J = 7,3, 5,7$ Hz; 2H), 2,71 (H-10,10'; t; $J = 7,3$ Hz; 2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 165,70 (C-7), 145,07 (C-2), 139,36 (C-11), 128,95 (C-5), 128,81 (C-12, C-16), 128,54 (C-13, C-15), 127,62 (C-4), 126,35 (C-14), 51,72 (C-6), 40,68 (C-9), 35,15 (C-10).

8.3. Ensaios de atividade enzimática (*Tc*NTR)

Para os testes de atividade da *Tc*NTR, foi utilizado o ensaio espectrofotométrico contínuo, que monitorou a redução do NADH em 340 nm ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), por um período de 120 s a 25°C, no leitor de microplacas *SpectraMax 384 Plus*. A reação enzimática foi realizada em 190 μL do meio reacional (tampão Tris 50 mM, pH 7,5, 0,1% Triton X-100 e 50

μM NADH) contendo os compostos a $50 \mu\text{M}$. Iniciou-se o ensaio com a adição de $10 \mu\text{L}$ da solução de proteína, na concentração de $200 \mu\text{g/mL}$, preparada em 50 mM Tris, pH 8,5, 300 mM NaCl, e $0,1\%$ de Triton X-100, para chegar à concentração final de proteína no meio de $10 \mu\text{g/mL}$ ($\sim 376 \text{ nM}$). Os ensaios foram feitos em triplicata para cada um dos compostos testados e, em cada medida, somente o meio reacional, sem a adição de enzima, foi utilizado como branco. A % de atividade foi calculada considerando a atividade para o BZN como sendo 100, nas mesmas condições e concentrações.

8.4. Avaliação anti-*T. cruzi* in vitro em modelo intracelular contra a cepa Tulahuen

Para este bioensaio, foi utilizada a cepa Tulahuen do *Trypanosoma cruzi* que expressa o gene β -galactosidase de *Escherichia coli* (BUCKNER *et al.*, 1996). Para obter formas tripomastigotas infecciosas, o parasita foi cultivado em monocamadas de fibroblastos de camundongos L929, em meio RPMI-1640 (pH 7,2-7,4), livre de vermelho de fenol (Gibco BRL), com 10% de soro fetal bovino e 2 mM de glutamina. Para o bioensaio, foram adicionadas 4.000 células L929 em $80 \mu\text{L}$ de meio suplementado a cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços. Após uma incubação noturna, acrescentou-se 40.000 tripomastigotas em $20 \mu\text{L}$ às células que foram encubadas por 2 h . O meio contendo parasitas que não penetram nas células é substituído por $200 \mu\text{L}$ de meio fresco, e a placa foi incubada por mais 48 h para estabelecer a infecção. Em seguida, o meio foi substituído por soluções de compostos a $1,0 \mu\text{g/mL}$ em $200 \mu\text{L}$ de meio fresco, e a placa incubada por 96 h a 37°C . Após esse período, foi adicionado $50 \mu\text{L}$ de vermelho de clorofenol D-galactopiranósido ($500 \mu\text{M}$) em $0,5\%$ de Nonidet P40 a cada poço, e a placa foi incubada por 18 h a 37°C . Em seguida, a absorbância é medida a 570 nm . Controles com células não infectadas e células infectadas tratadas com benznidazol são realizados simultaneamente. Os resultados são expressos como a porcentagem de inibição do crescimento do *T. cruzi* nas células testadas com o composto em relação às células infectadas e não tratadas. Os ensaios são conduzidos em triplicata.

8.5. Avaliação de citotoxicidade in vitro em células L929

Neste bioensaio, 4.000 células de mamíferos em $200 \mu\text{L}$ de meio RPMI-1640 (pH 7,2-7,4) (Gibco BRL) mais 10% de soro fetal bovino e glutamina 2 mM foram adicionados a cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços que incubada durante três dias a 37°C . O

meio foi substituído por soluções dos compostos (diluídos em 200 µL de meio suplementado sem vermelho de fenol), em concentrações 50 vezes superiores ao EC₅₀ encontrado no ensaio de atividade anti-*T. cruzi*, e a placa foi incubada por mais quatro dias a 37 °C. Foi adicionado após esse período, 20 µL de AlamarBlue™ a cada poço, e a placa foi incubada por mais 4-6 h. A absorbância foi medida em seguida a 570 nm. Controles com células não tratadas e tratadas com BZN foram realizados simultaneamente, sendo as triplicatas executadas no mesmo prato. Os resultados são expressos como a diferença percentual na redução entre as células tratadas (CT) e as células não tratadas (UT).

8.6. Avaliação da atividade *in vitro* contra a forma tripomastigota sanguínea da cepa Y

Para este bioensaio, foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi*. Formas tripomastigotas foram obtidas de camundongos albinos Swiss infectados no pico da parasitemia (7º dias pós-infecção). Uma solução estoque de cada composto a ser testado foi preparada em DMSO, na concentração de 100 mM. Os ensaios com tripomastigotas foram realizados em placas de 96 poços, em concentrações dos compostos variando entre 500 a 3,9 µM e com uma concentração final de 5x10⁶ parasitos/mL em meio RPMI por 24 h a 4°C na presença de 5% de sangue e a 37 °C na ausência de sangue. A atividade foi expressa pelo parâmetro EC₅₀. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes e calculada a média e o desvio padrão (SALOMÃO *et al.*, 2013).

8.7. Ensaios *in vivo* em modelo de infecção aguda por *Tc* cepa Y

Os testes *in vivo* foram conduzidos em camundongos Swiss machos infectados com *Trypanosoma cruzi* cepa Y (10⁴ tripomastigotas, via intraperitoneal). Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o número de protocolo L-038/2017-A4. O sangue dos animais foi colhido no pico de parasitemia através do plexo venoso retro-orbital, com uso de microcapilares de vidro, em animais previamente submetidos à narcose induzida pela inalação de dióxido de carbono em câmara apropriada. O sangue coletado de animais infectados foi diluído em citrato de sódio 3,8% (1:3 v/v) e injetado intraperitonealmente nos camundongos na dose de 10.000 tripomastigotas sanguíneos por animal.

O tratamento foi iniciado no 5º dia pós-infecção (dpi), quando a parasitemia se tornou detectável. Foi utilizado como controle o benznidazol (fármaco padrão), numa dose de 100mg/kg/dia, e para os compostos avaliados, foram utilizadas doses equimolares. O tratamento foi realizado por via oral, através de gavagem durante cinco dias consecutivos.

O nível de parasitemia foi monitorado em diferentes dias pós-infecção de acordo com a metodologia descrita por Brener (1962). Esta técnica consiste na retirada de 5 µL de sangue da cauda do animal e a visualização do sangue entre lâmina (26 x 76 mm) e lamínula (22 x 22 mm). Foi realizada a leitura de 50 campos em microscópio óptico (Zeiss®), com objetiva de 40X, ocular de 10X e fator de correção 106. A parasitemia corresponde ao número de parasitos visualizados em 50 campos, multiplicado pelo fator de correção do microscópio.

A sobrevivência de animais tratados com as diferentes amostras-teste, bem como dos respectivos controles, foi acompanhada diariamente através da inspeção das gaiolas e será descrita cumulativamente num certo período de tempo. As mortes foram anotadas e, posteriormente, calculado o percentual de sobreviventes.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHEH, J. *et al.* Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas disease. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 33, p. 458–462, 2014.
- ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, D. A. *et al.* A systematic review of historical and current trends in Chagas disease. **Therapeutic Advances in Infectious Disease** SAGE Publications Ltd. 2021.
- ANDRADE, A. L. S. S. *et al.* Randomized trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 5, p. 594–597, 2004.
- ANVISA. **GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE TOXICOLOGIA E SEGURANÇA FARMACOLÓGICA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS**. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. Brasília, 31 de janeiro de 2013 – Versão 2. Disponível em: <file:///C:/Users/cheye/Downloads/Guia%20para%20a%20Condu%C3%A7%C3%A3o%20de%20Estudos%20N%C3%A3o%20Cl%C3%ADnicos%20de%20Toxicologia%20e%20Seguran%C3%A7a%20Farmacol%C3%B3gica%20Necess%C3%A1rios%20ao%20Desenvolvimento%20de%20Medicamentos%20-%20Vers%C3%A3o%202.pdf>.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 673–683, 2004.
- BAHIA, M. T. *et al.* Fexinidazole: a potential new drug candidate for chagas disease. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 11, p. e1870, 2012.
- BAHIA, M. T. *et al.* Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 8, p. 4362–4370, 2014.
- BARBOSA, J. M. C. *et al.* Benznidazole and amiodarone combined treatment attenuates cytoskeletal damage in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac cells. **Front. Cell. Infect. Microbiology**, v. 25, n. 12, p. 975931, 2022.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2015.
- BAUMANN, E.; SCHOTTEN, C. Ueber eine neue Bildungsweise der Säureamide. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 22, p. 864–870, 1889.
- BEAMAN, A. G.; TAUTZ, W.; DUSCHINSKY, R. Studies in the nitroimidazole series. III. 2-Nitroimidazole derivatives substituted in the 1-position. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 6, p. 593–596, 1962.

BENAIM, G. *et al.* Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 3, p. 892–899, 2006.

BOSCH-NICOLAU, P. *et al.* Efficacy of three benznidazole dosing strategies for adults living with chronic Chagas disease (MULTIBENZ): an international, randomised, doubleblind, phase 2b trial. **Lancet Infect. Dis.**, v. 24, n. 4, p. 386–394, 2024.

BRENER, Z. Terapêutica experimental da doença de Chagas. **Imprensa Oficial de Minas Gerais**, p. 510–516, 1968.

BRICEÑO-LEÓN, R.; GALVÁN, J. M. The social determinants of Chagas disease and the transformations of Latin America. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. [s.l: s.n.].

BRUNETO, E. G. *et al.* Case-fatality from Orally-transmitted Acute Chagas Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. 6, p. 1084–1092, 15 mar. 2021.

BUCKNER, F. S. *et al.* Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2592–2597, 1996.

BUGGEY, J. *et al.* Amiodarone-Induced Liver Injury and Cirrhosis. **ACG Case Reports Journal**, v. 2, n. 2, p. 116–118, 2015.

BUSCHINI, A. *et al.* Genotoxicity revaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole, and metronidazole. **J. Parasitol. Res.**, p. 463–575, 2009.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 1, p. 29–37, 2002.

CARLOS PINTO DIAS, J. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 1–10, jun. 2016.

CARVALHO, A. S. *et al.* Megazol and its bioisostere 4H-1,2,4-triazole: comparing the trypanocidal, cytotoxic and genotoxic activities and their *in vitro* and *in silico* interactions with the *Trypanosoma brucei* nitroreductase enzyme. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 315–323, 2014.

CARVALHO, S. A. *et al.* Synthesis and antitrypanosomal profile of new functionalized 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazones derivatives, designed as non-mutagenic megazol analogues. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 5967–5970, 2004.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471–479, 2006.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, ago. 1909.

CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? Computational and Structural Biotechnology. **Journal Elsevier B.V.**, 2017.

CHATELAIN, E.; IOSET, J. R. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 5, p. 175–181, 2011.

CHIPPAUX, J. P. *et al.* Epidemiological evaluation of Chagas disease in a rural area of southern Bolivia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 107(1), 1–7, 2013.

CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D. H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 239–247, 2010.

COURA, J. R. *et al.* Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole BZN, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas; em uma área de campo com transmissão interrompida. I. Avaliação preliminar [Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas' disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, n. 2, p. 139–144, 1997.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A review. **Acta Tropica**, v. 5, n. 13, p. 115(1–2), 2012.

COURA, J. R.; D. C. S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. V. Ecoepidemiology, Short history and control of chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 856–862, 1 nov. 2014.

CUNHA, E. L. A. *et al.* Benznidazole, itraconazole, and their combination for the treatment of chronic experimental Chagas disease in dogs. **Exp. Parasitol.**, v. 238, p. 108266, 2022.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, p. 42717, 2017.

DE ANDRADE, A. L. *et al.* Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet**, v. 348, n. 9039, p. 1407–141, 1996.

DEANE, L. M. Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 16, p. 27–48, 1964.

DI, L.; KERNS, E. H.; CARTER, G. T. Drug-like property concepts in pharmaceutical design. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 9, p. 1252–1265, 2012.

DIAS, J. C. P. *et al.* Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Único de Saúde do Brasil. **II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas**, v. 25, p. 7–86, 2016.

DNDI. **Paediatric formulation of benznidazole**. Disponível em: <https://dndi.org/research-development/portfolio/paediatric-benznidazole/> (Acesso em: 3 jan. 2025).

DNDI. **Doença de Chagas**. Disponível em: https://dndi.org/diseases/chagas/facts/?gad_source=1&gclid=CjwKCAiA2JG9BhAuEiwAH_zf3qqXASMQBilrbV8QC1Lydl0sGW4mXYMGzMnNzh_PksC_biVW6iaFeRoCgAgQAvD_BwE (Acesso em: 6 fev. 2025).

EGAN, W. J.; MERZ, K. M.; BALDWIN, J. J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 21, p. 3867–3877, 2000.

FABBRO, D. L.; MEIRELLES, M. N. L.; RASSI, A. Diagnóstico e tratamento da doença de Chagas: recomendações da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 1–10, 2007.

FERREIRA, H. DE O. Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benzonidazol [Treatment of the undetermined form of Chagas disease with nifurtimox and benzonidazole]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 23, n. 4, p. 209–211, 1990.

FERREIRA, H. O. Tratamento específico da fase aguda da doença de Chagas com benzonidazol em crianças. **Jornal de Pediatria**, v. 64, p. 126–128, 1988.

FIOCRUZ. **Portal da Doença de Chagas**. 2022. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/doenca/doenca-de-chagas> (Acesso em: 6 fev. 2025).

FIOCRUZ. **Fiocruz registra primeiro kit para diagnostico molecular de Chagas**. 2022 Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-registra-primeiro-kit-para-diagnostico-molecular-de-chagas#:~:text=Fiocruz%20registra%20primeiro%20kit%20para%20diagn%C3%B3stico%20molecular%20de%20Chagas,-176452&text=Compartilhar%3A,do%20parasito%20%E2%80%93%20aprovado%20no%20Brasil> (Acesso em: 6 fev. 2025).

FIOCRUZ. **Edital Inova Doenças Determinadas Socialmente - DDS**. 2024 Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/edital-inova-doencas-determinadas-socialmente-dds>. Acesso em: 19/03/2025.

FRAGATA-FILHO, A. A. *et al.* Evaluation of parasiticide treatment with benznidazol in the electrocardiographic, clinical, and serological evolution of chagas disease. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 3, p. e0004508, 2016.

GALLERANO, R. R.; SOSA, R. R. Características clínicas y diagnóstico de la enfermedad de Chagas en su fase crónica. **Revista de la Facultad de Ciencias Médicas**, v. 57, n. 2, p. 135–162, 2000.

GARCIA, S. B. DOENÇA DE CHAGAS: os 100 anos da descoberta e a atualidade do pensamento do seu descobridor. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, n. 4, p. 249–251, 2009.

GARG, P. K. *et al.* 4-Fluorobenzylamine and phenylalanine methyl ester conjugates of 2-nitroimidazole: evaluation as hypoxic cell radiosensitizers. **International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics**, v. 22, n. 3, p. 593–596, 1992.

GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 55–68, 1999.

HANSCH, C.; LEO, A.; HOEKMAN, D. Exploring QSAR: fundamentals and applications in chemistry and biology. **American Chemical Society**, 1995.

HARRISON, R. K. Phase II and phase III failures: 2013–2015. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 15, p. 817–818, 2016.

HASSLOCHER-MORENO, A. M. *et al.* Benznidazole decreases the risk of chronic Chagas disease progression and cardiovascular events: a long-term follow up study. **EClinicalMedicine**, v. 23, n. 31, p. 100694, 2020.

HOCHBERG, N. S.; MONTGOMERY, S. P. Chagas Disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 176, n. 2, p. ITC17–ITC32, 1 fev. 2023.

HOFFMANN-LA ROCHE. Biocidal (2-nitroimidazolyl) alkanolic acids and derivatives, 1966.

HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R.; ALEX, A. Ligand efficiency: a useful metric for *lead* selection. **Drug Discovery Today**, 9(10), 430–431., 2004.

HUANG, C. *et al.* Amiodarone and risk of liver cirrhosis: a nationwide, population-based study. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 15, p. 103–112, 2019.

ISHIKAWA, H.; SUZUKI, T.; HAYASHI, Y. High-yielding synthesis of the anti-influenza neuramidase inhibitor (-)-oseltamivir by three “*One-Pot*” operations. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 48, n. 7, p. 1304–1307, 2 fev. 2009.

KESSLER, R. L. *et al.* Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 5, p. 712–736, 1 jun. 2017.

KROPE, S. P. **Medicina Tropical e Ciência Nacional: Carlos Chagas e a descoberta de uma nova tripanossomíase humana**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2009.

LEE, B. Y. *et al.* Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **Lancet Infect. Dis.**, v. 13, n. 4, p. 342–348, 2013.

LEESON, P. D.; SPRINGTHORPE, B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 11, p. 881–890, 2007.

LIN, J. H.; LU, A. Y. H. The role of Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity in Drug Discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 10, p. 1125–1154, 2003.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 3–26, 2001.

LOMBARDO, F. *et al.* ElogP: A tool for lipophilicity calculations and database mining. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2867–2877, 2002.

LUQUETTI, A. O.; T. S. B.; S. L. R.; O. R. A.; C. D. E., DE M. C. A., DE O. E. C. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**, v. 110, n. (3), p. 369–376, 2015.

MARTINS, T. A. F. *et al.* Benznidazole/Itraconazole Combination Treatment Enhances Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity in Experimental Chagas Disease. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128707, 2015.

MAYA, J. D. *et al.* Drugs in current clinical use for Chagas disease: An overview of the mechanisms of action and current status of drug development. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 6, p. e180224, 2018.

MAZZETI, A. L. *et al.* Review on experimental treatment strategies against *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Pharmacol.**, v. 13, p. 409–432, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença de Chagas**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas> (Acesso em: 6 fev. 2025).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico Doença de Chagas. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, p. 1–44, 2020b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. Boletim Epidemiológico. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. Edição especial, 2020c.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Territorialização e vulnerabilidade para doença de Chagas crônica. **Boletim Epidemiológico**, p. 1–53, 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Análise descritiva: um ano de implementação da notificação de doença de Chagas crônica no Brasil Boletim Epidemiológico SECRETARIA DE VIGILÂNCIA

EM SAÚDE E AMBIENTE MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente**, v. 55, p. 1–23, 2024a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença de Chagas Situação Epidemiológica**. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas/situacao-epidemiologica> (Acesso em: 6 fev. 2025).

MOLINA, I. *et al.* Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 20, p. 1899–1908, 2014.

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A. Toxicity and efficacy of benznidazole and nifurtimox in the treatment of chronic Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71(2), p. 232–240, 2020.

MORAES, C. B. *et al.* Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. **Sci Rep.**, v. 4, n. 4703, 2014.

MOREIRA, O. C. *et al.* Validação do Kit NAT Chagas IVD para Detecção e Quantificação de *Trypanosoma cruzi* em Amostras de Sangue de Pacientes com Doença de Chagas. **Vida**, v. 13, p. 1233, 2023.

MORILLO, C. A. *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Eliminating *Trypanosoma cruzi* in Chronic Chagas Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.

MORILLO, C. A. *et al.* Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. Cruzi* carriers: the STOP-CHAGAS trial. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 69, n. 8, p. 939–947, 2017.

MUEGGE, I.; HEALD, S. L.; BRITTELLI, D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 1841–1846, 2001.

NWAKA, S.; ET AL. Advancing drug innovation for neglected diseases - Criteria for lead progression. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, p. 1–13, 2009. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, p. 1–13, 2009.

OLIVERA, M. J. *et al.* Risk factors for treatment interruption and severe adverse effects to benznidazole in adult patients with Chagas disease. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–13, 2017.

PAHO. **Chagas disease in the Americas: Control and Surveillance**. Washington, D.C. 2017. Disponível em: <https://www.paho.org> (Acesso em 09 jan. 2025).

PAHO/WHO. **Chagas Disease in the Americas: A Review of the Current Public Health Situation and a Vision for the Future. REPORT: CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS.** Washington, DC. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/Chagas-Disease-in-the-Americas-conclusions-recommendations-2018> (Acesso em 09 jan. 2025).

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Enfermedad de Chagas en las Américas: una revisión de la situación actual de salud pública y su visión para el futuro. Informe: Conclusiones y recomendaciones.** 2018. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/57882> (Acesso em 15 jan. 2025).

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Chagas Disease.** 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease> (Acesso em 12 nov. 2024).

PANTALEÃO, S. Q. *et al.* Recent Advances in the Prediction of Pharmacokinetics Properties in Drug Design Studies: A Review. **ChemMedChem**, v. 17, n. 6, p. e202100542, 2022.

PAPADOPOULOU, M. V. *et al.* Novel 3-Nitro-1H-1,2,4-triazole-based Aliphatic and Aromatic Amines as anti-Chagasic Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 8214–8223, 2011.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 289–298, 2014.

PAUL, S. M. *et al.* How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 3, p. 203–214, 2010.

PEREIRA, K. S. *et al.* Chagas' Disease as a Foodborne Illness. **Journal of Food Protection**, p. 441, 2009.

PÉREZ-MOLINA, J. A. *et al.* Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1139–1147, 2009.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. **Chagas disease. The Lancet.** Lancet Publishing Group, 6 jan. 2018.

PINAZO, M. J. *et al.* Efficacy and safety of fexinidazole for treatment of chronic indeterminate Chagas disease (FEXI-12): a multicentre, randomised, double-blind, phase 2 trial. **Lancet Infect. Dis**, 2024.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet**, v. 01, p. 92–100, 2001.

RAMOS, L. G. *et al.* Tackling the challenges of human Chagas disease: A comprehensive review of treatment strategies in the chronic phase and emerging therapeutic approaches. **Acta Tropica**, v. 256, p. 107264, 2024.

RASSI, A.; MARIN-NETO, A. **Seminar Chagas disease** *Lancet*, p. 1388-1402, 2010.

ROMANHA, A. J. *et al.* *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 233–238, 2010.

RUSSOMANDO, G. *et al.* Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 3, p. 487–491, 1998.

SALES JUNIOR, P. A. *et al.* Experimental and clinical treatment of Chagas disease: a review. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 2017.

SALES JUNIOR, P. A. *et al.* Experimental and clinical treatment of Chagas disease: a review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 2017.

SALOMÃO, K. *et al.* *Trypanosoma cruzi* mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action of naphthoquinone analogues. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 196, 2013.

SCHIJMAN, A. G. *et al.* Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 441–449, 2003.

SERRANO-MARTÍN, X. *et al.* Amiodarone destabilizes intracellular Ca²⁺ homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, n. 4, p. 1403–1410, 2009.

SHANE, R. W. *et al.* A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. v. 53, p. 5022–5027, 2010.

SINGH, B. N.; VAUGHAN WILLIAMS, E. M. The effect of amiodarone, a new anti-anginal drug, on cardiac muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 39, n. 4, p. 657–667, 1970.

SOEIRO, M. N. C. *et al.* Drug screening and development cascade for Chagas disease: an update of *in vitro* and *in vivo* experimental models. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 6, p. 570–579, 2007.

SOSA ESTANI, S. *et al.* Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, n. 4, p. 526–529, 1998.

SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E. L. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the undetermined phase: experience and current guidelines for congenital and adult infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 583–587, 2006a.

SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E. L. Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: Experiences in Argentina. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 583–587, 2006b.

STREIGER, M. L. *et al.* Estudo longitudinal e quimioterapia específica em crianças, com doença de Chagas crônica, residentes em área de baixa endemicidade da República Argentina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **37**, v. 37, p. 365–375, 2004.

SUN, D. *et al.* Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 12, n. 7, p. 3049–3062, 2022.

TALEVI, A.; CARRILLO, C.; COMINI, M. The Thiol-polyamine Metabolism of *Trypanosoma cruzi*: Molecular Targets and Drug Repurposing Strategies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 36, p. 6614–6635, 2018.

TORREELE, E. *et al.* The Role of DNDi in Drug Development for Neglected Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007606, 2019.

TORRICO, F. *et al.* New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, doubleblind, randomised trial. **Lancet Infect. Dis.**, v. 21, n. 8, p. 1129–1140, 2021.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 311–318, 2009.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 55–68, 2010.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. **Specific chemotherapy of Chagas disease: Controversies and advances.** **Trends in Parasitology** Elsevier Ltd., 2003.

VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 192–204, 2003.

VEBER, D. F. *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002.

VIOTTI, R. *et al.* Effectiveness of benznidazole in preventing cardiomyopathy in chronic Chagas disease. **American Journal of Cardiology**, v. 98, n. 5, p. 631–637, 2006.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B. Long-term outcomes of chronic Chagas disease after treatment with nifurtimox and benznidazole: a cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20(12), p. 1468–1476, 2020.

WARING, M. J. Lipophilicity in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 4, n. 8, p. 773–790, 2009.

WARING, M. J. *et al.* An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 7, p. 475–486, 2015.

WENDEL, S. Transfusion transmitted Chagas disease: Is it really under control? **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 28–34, jul. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. 2024. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (Acesso em: 20 out. 2024).

Article

Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity, Mutagenicity, Hepatocytotoxicity and Nitroreductase Enzyme Evaluation of 3-Nitrotriazole, 2-Nitroimidazole and Triazole Derivatives

Cheyene Almeida Celestino Menozzi ^{1,2}, Rodolfo Rodrigo Florido França ^{1,2}, Pedro Henrique Luccas ³, Mayara dos Santos Baptista ², Tácio Vinício Amorim Fernandes ², Lucas Villas Boas Hoelz ², Policarpo Ademar Sales Junior ⁴, Silvana Maria Fonseca Murta ⁴, Alvaro Romanha ^{4,†}, Bárbara Verena Dias Galvão ⁵, Marcela de Oliveira Macedo ⁶, Alana da Cunha Goldstein ⁵, Carlos Fernando Araujo-Lima ^{5,6}, Israel Felzenszwalb ⁵, Maria Cristina Nonato ^{3,*}, Frederico Silva Castelo-Branco ^{2,*} and Nubia Boechat ^{2,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal—PPGFQM-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Bloco J, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil; rodolfo.franca@fiocruz.br (R.R.F.F.)

² Laboratório de Síntese de Fármacos—LASIFAR, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz, Farmanguinhos—Fiocruz, Manguinhos, Rio de Janeiro 21041-250, Brazil

³ Laboratório de Cristalografia de Proteínas—LCP-RP, Departamento de Ciências BioMoleculares, Faculdade de Ciências Farmacológicas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo FCFRP-USP, Monte Alegre, Ribeirão Preto 14040-903, Brazil

⁴ Centro de Pesquisas René Rachou/CPqRR—Fiocruz, Belo Horizonte 30190-009, Brazil

⁵ Laboratório de Mutagenese Ambiental, Programa de Pós-Graduação em Biociências—PPGB—Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 20551-030, Brazil

⁶ Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular—PPGBMC—Instituto Bionédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 20211-010, Brazil

* Correspondence: cristy@fcfrp.usp.br (M.C.N.); frederico.castelo@fiocruz.br (F.S.C.-B.); nubia.boechat@fiocruz.br (N.B.)

† In memoriam.



Citation: Menozzi, C.A.C.; França, R.R.F.; Luccas, P.H.; Baptista, M.d.S.; Fernandes, T.V.A.; Hoelz, L.V.B.; Sales Junior, P.A.; Murta, S.M.F.; Romanha, A.; Galvão, B.V.D.; et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity, Mutagenicity, Hepatocytotoxicity and Nitroreductase Enzyme Evaluation of 3-Nitrotriazole, 2-Nitroimidazole and Triazole Derivatives. *Molecules* 2023, 28, 7461. <https://doi.org/10.3390/molecules28227461>

Academic Editors: Octavian Tudose, Oltaru and Stefania-Relicia Barboianu

Received: 22 September 2023

Revised: 26 October 2023

Accepted: 30 October 2023

Published: 7 November 2023

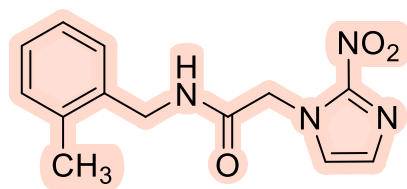


Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

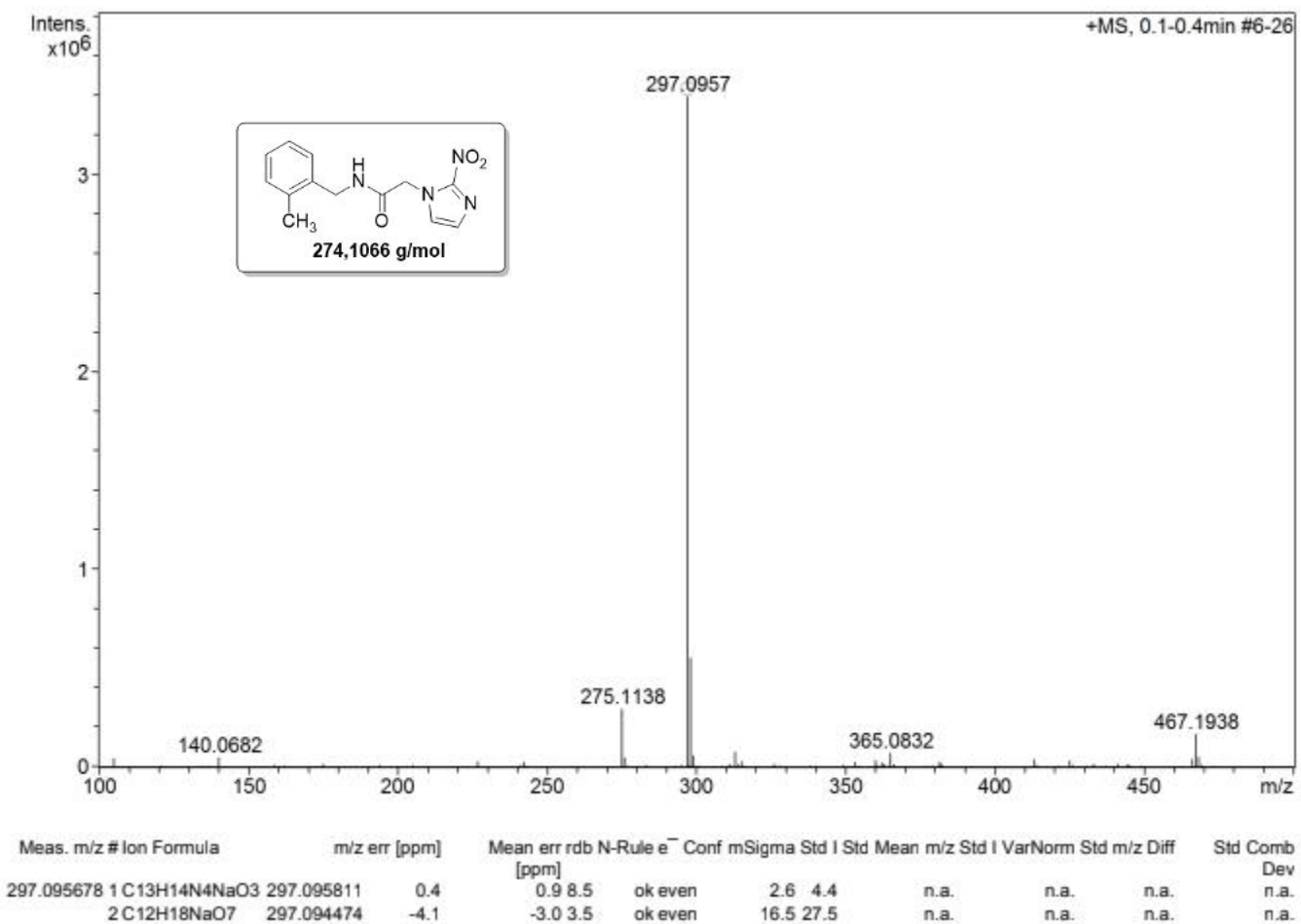
Abstract: Chagas disease (CD), which is caused by *Trypanosoma cruzi* and was discovered more than 100 years ago, remains the leading cause of death from parasitic diseases in the Americas. As a curative treatment is only available for the acute phase of CD, the search for new therapeutic options is urgent. In this study, nitroazole and azole compounds were synthesized and underwent molecular modeling, anti-*T. cruzi* evaluations and nitroreductase enzymatic assays. The compounds were designed as possible inhibitors of ergosterol biosynthesis and/or as substrates of nitroreductase enzymes. The in vitro evaluation against *T. cruzi* clearly showed that nitrotriazole compounds are significantly more potent than nitroimidazoles and triazoles. When their carbonyls were reduced to hydroxyl groups, the compounds showed a significant increase in activity. In addition, these substances showed potential for action via nitroreductase activation, as the substances were metabolized at higher rates than benznidazole (BZN), a reference drug against CD. Among the compounds, 1-(2,4-difluorophenyl)-2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1-yl)ethanol (**8**) is the most potent and selective of the series, with an IC₅₀ of 0.39 μ M and selectivity index of 3077; compared to BZN, **8** is 4-fold more potent and 2-fold more selective. Moreover, this compound was not mutagenic at any of the concentrations evaluated, exhibited a favorable in silico ADMET profile and showed a low potential for hepatotoxicity as evidenced by the high values of CC₅₀ in HepG2 cells. Furthermore, compared to BZN, derivative **8** showed a higher rate of conversion by nitroreductase and was metabolized three times more quickly when both compounds were tested at a concentration of 50 μ M. The results obtained by the enzymatic evaluation and molecular docking studies suggest that, as planned, nitrotriazole derivatives may utilize the nitroreductase metabolism pathway as their main mechanism of action against *Trypanosoma cruzi*. In summary, we have successfully identified and characterized new nitrotriazole analogs, demonstrating their potential as promising candidates for the development of Chagas disease drug candidates that function via nitroreductase activation, are considerably selective and show no mutagenic potential.

CADERNO DE ESPECTROS

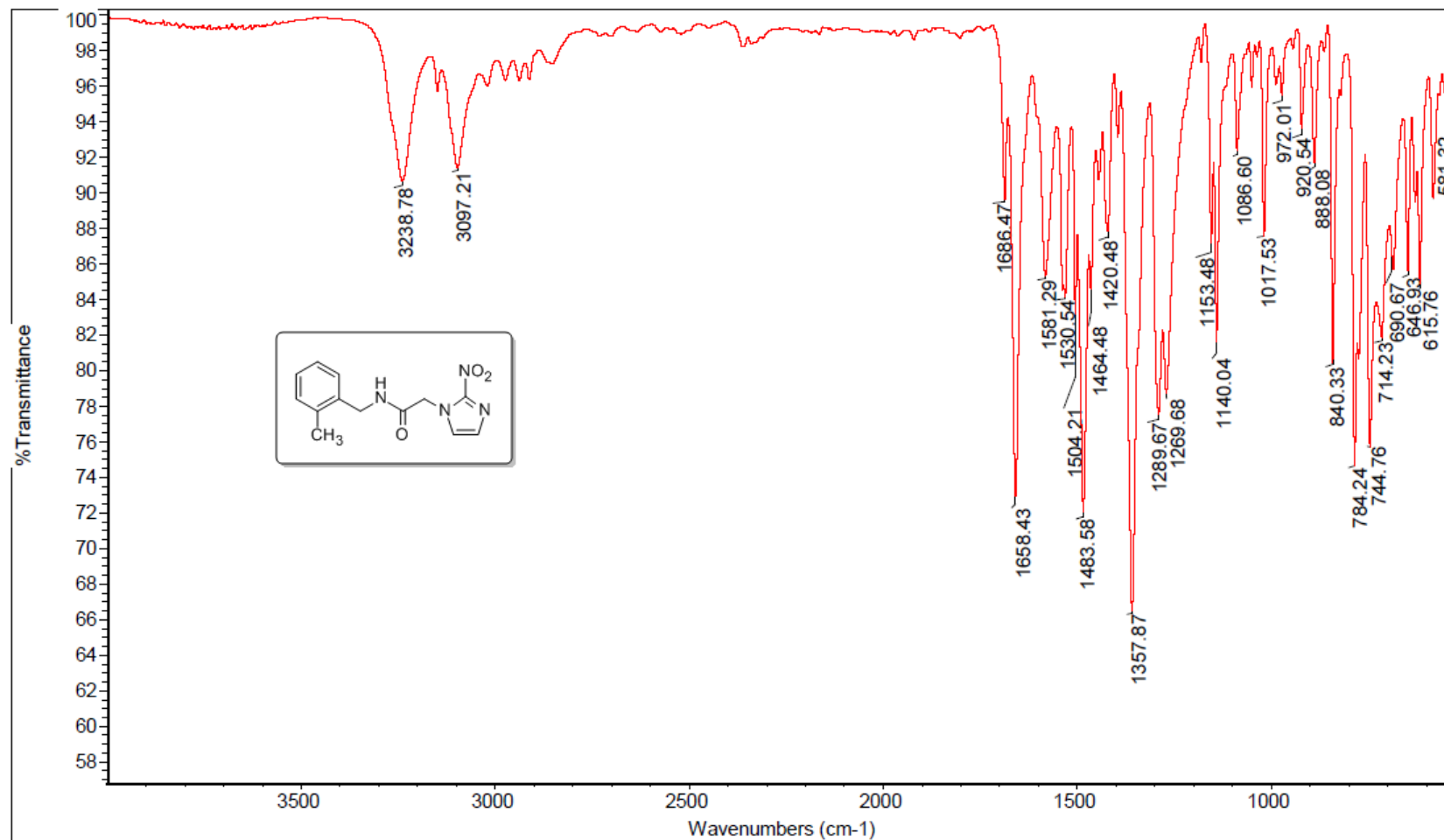
N-(2-metilbenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (1)



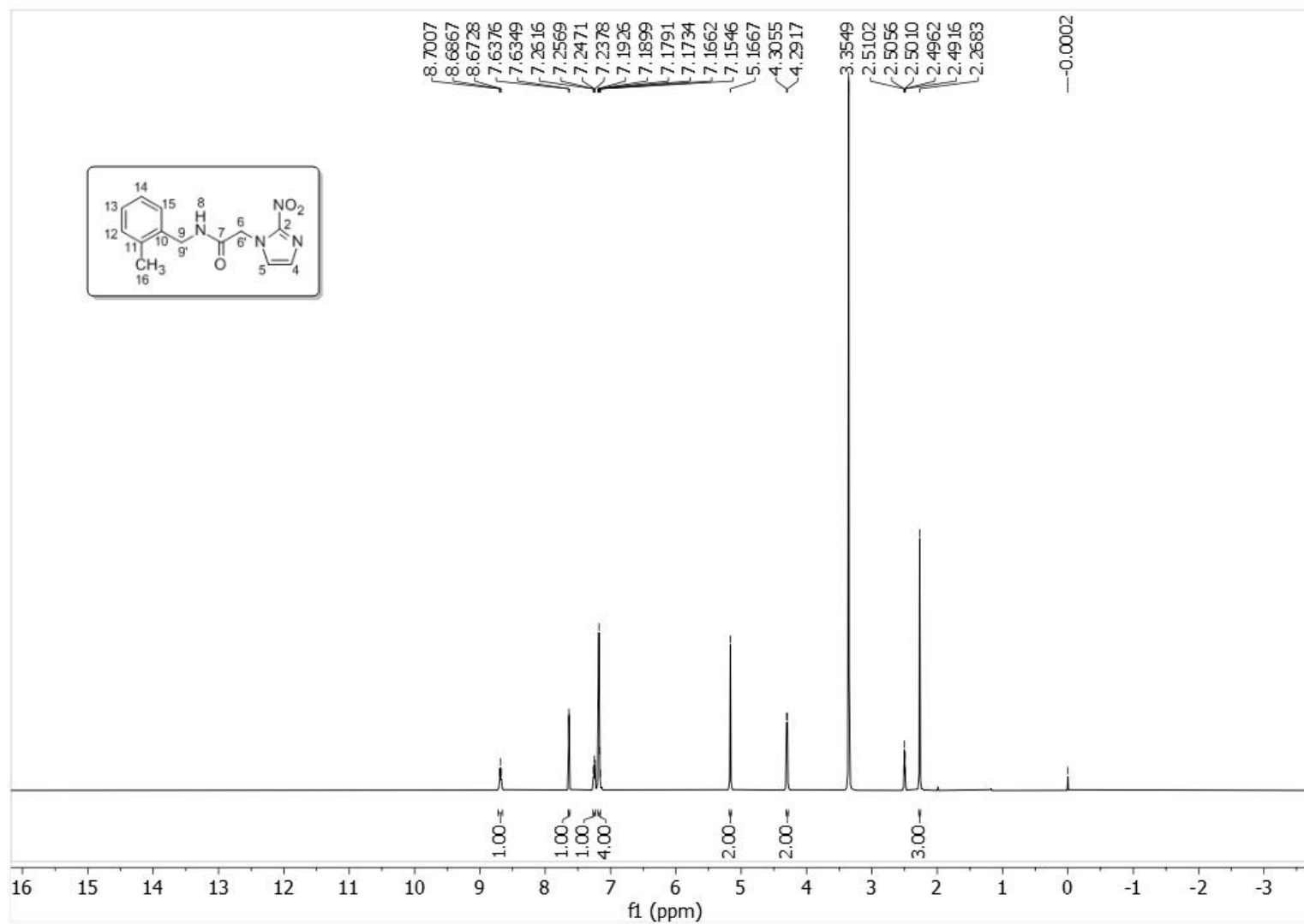
+MS, 0.1-0.4min #6-26



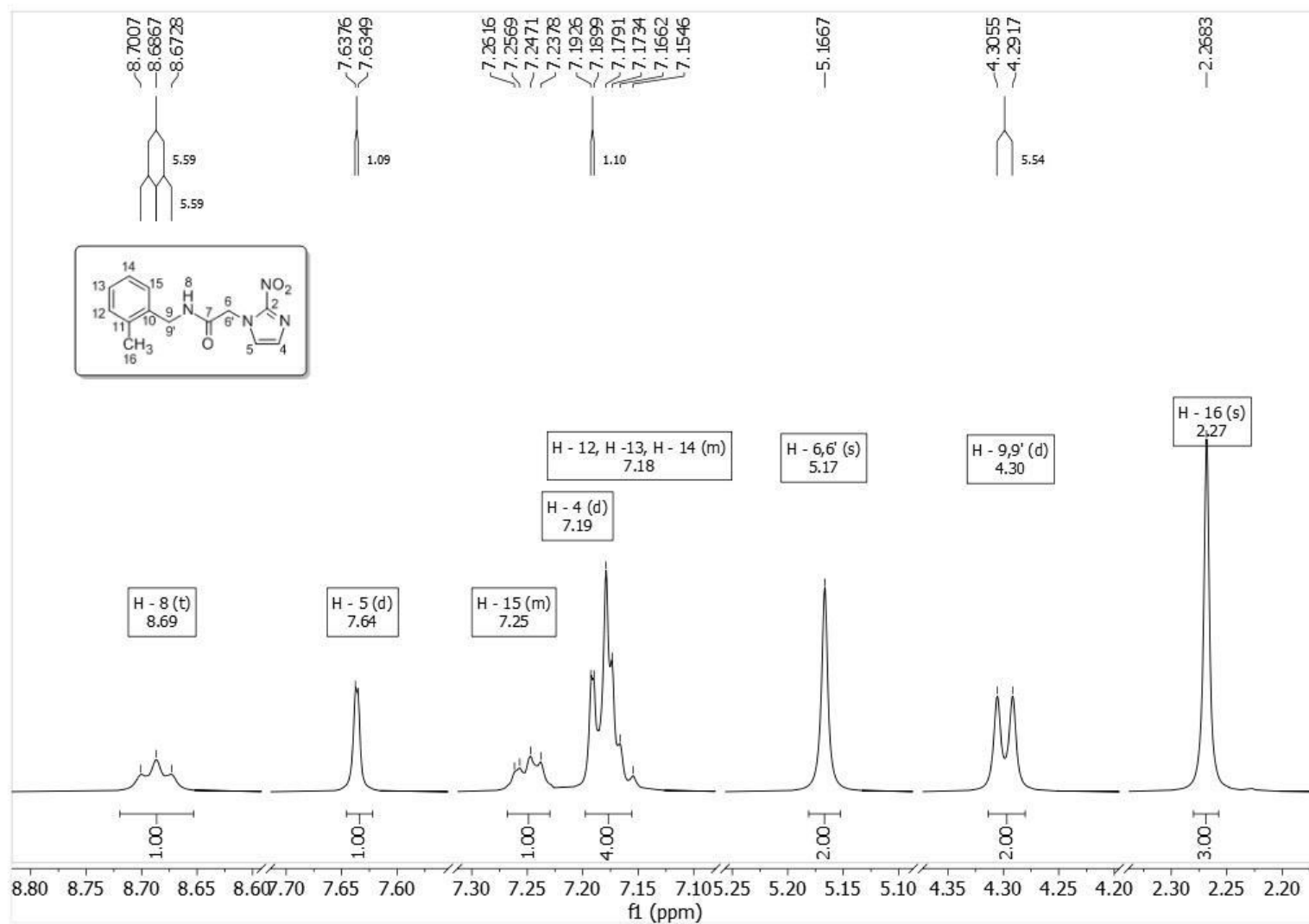
Espectro 1: Espectro de massas de alta resolução do derivado **1**.



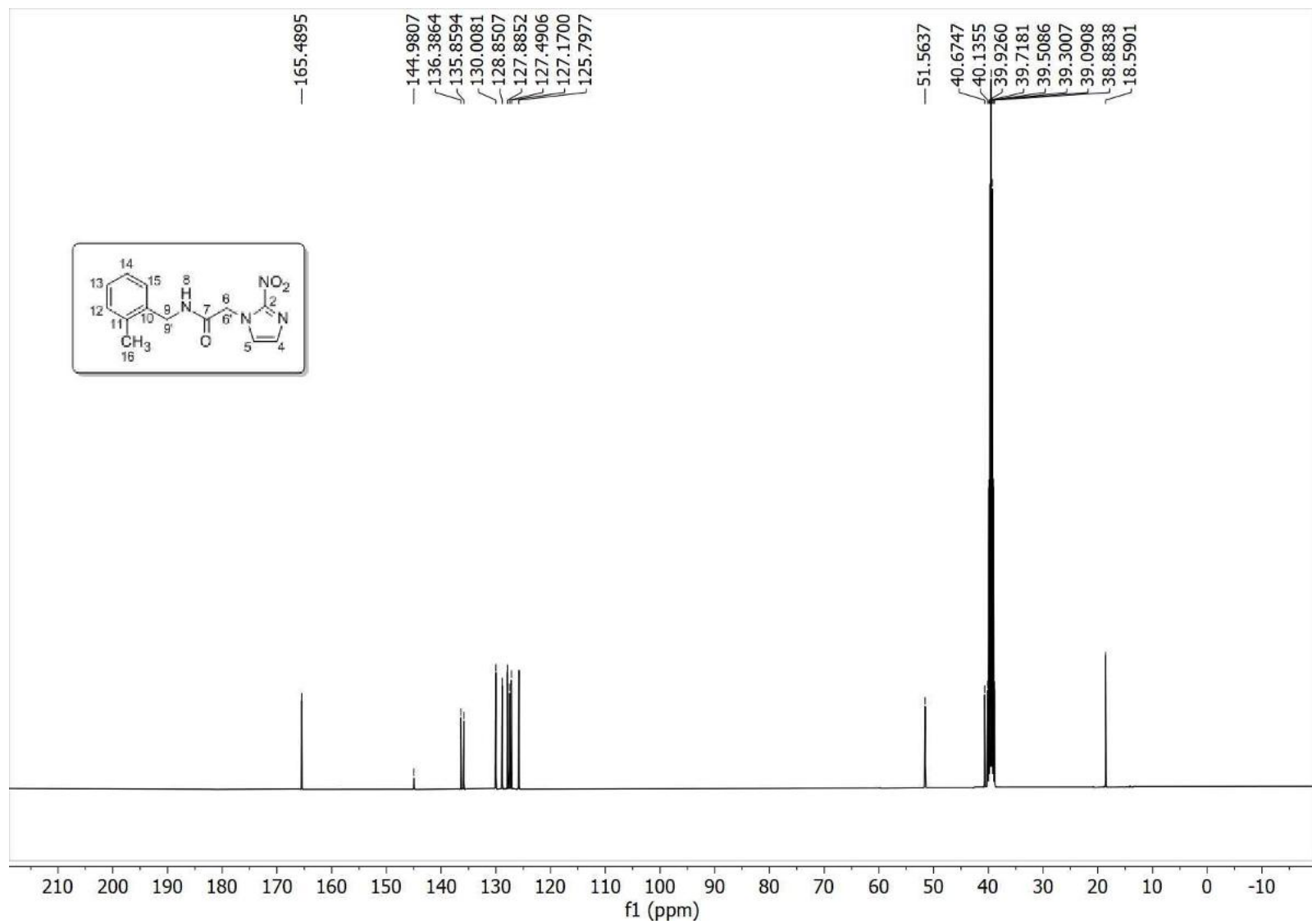
Espectro 2: Espectro de infravermelho do derivado 1.



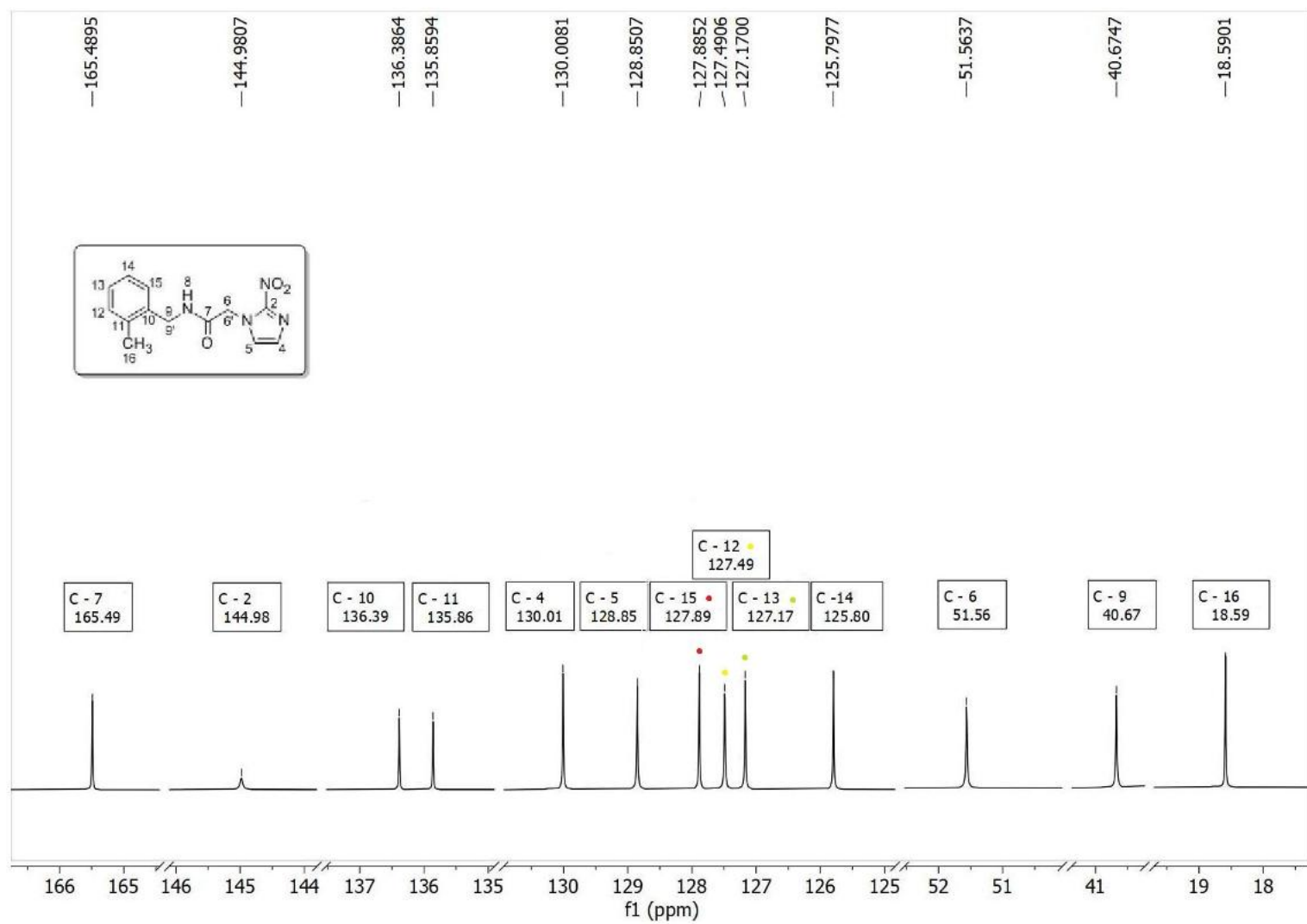
Espectro 3 Espectro de RMN ¹H (400 MHz; DMSO-d₆) do derivado **1**.



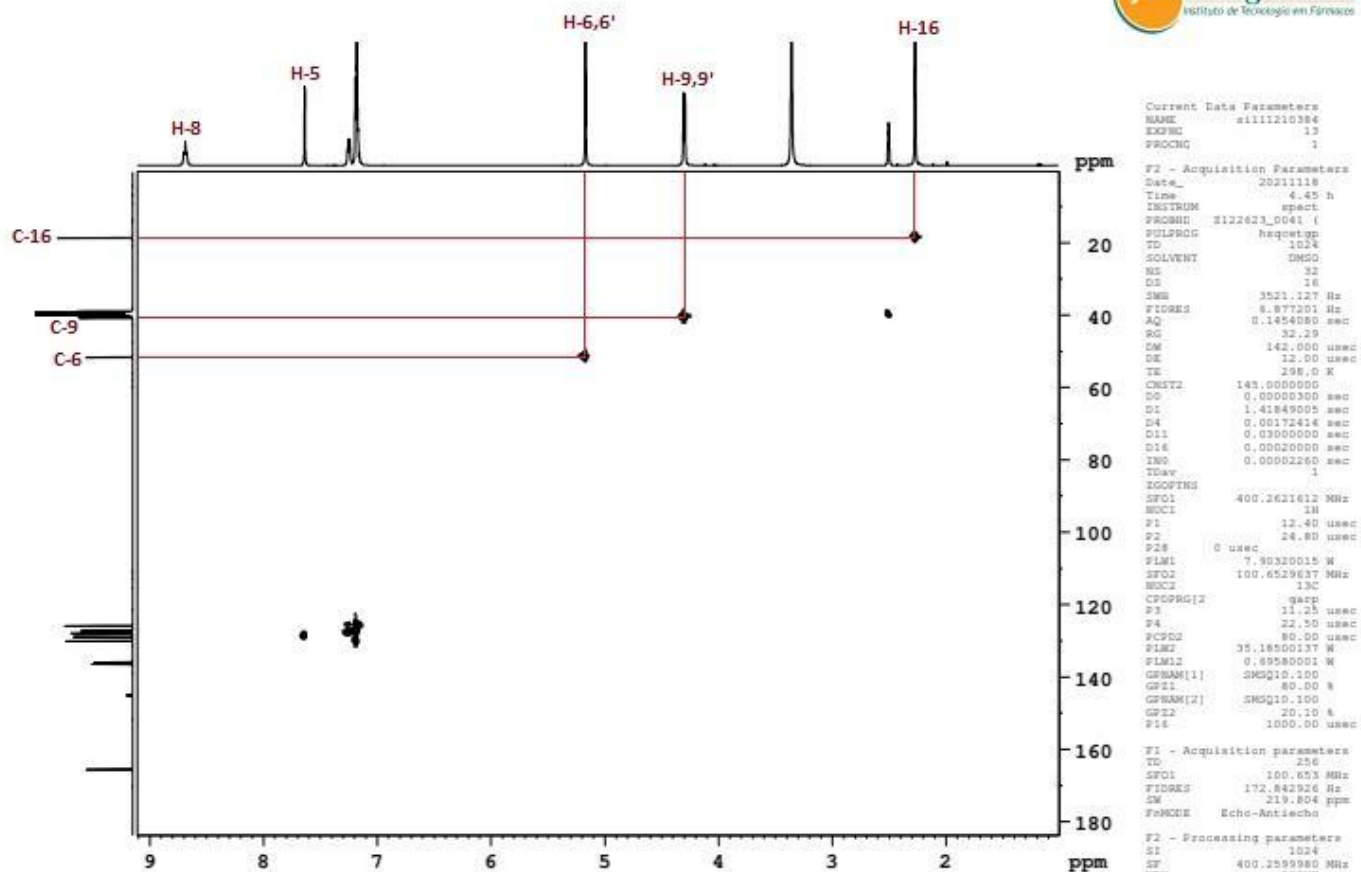
Espectro 4: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **1**.



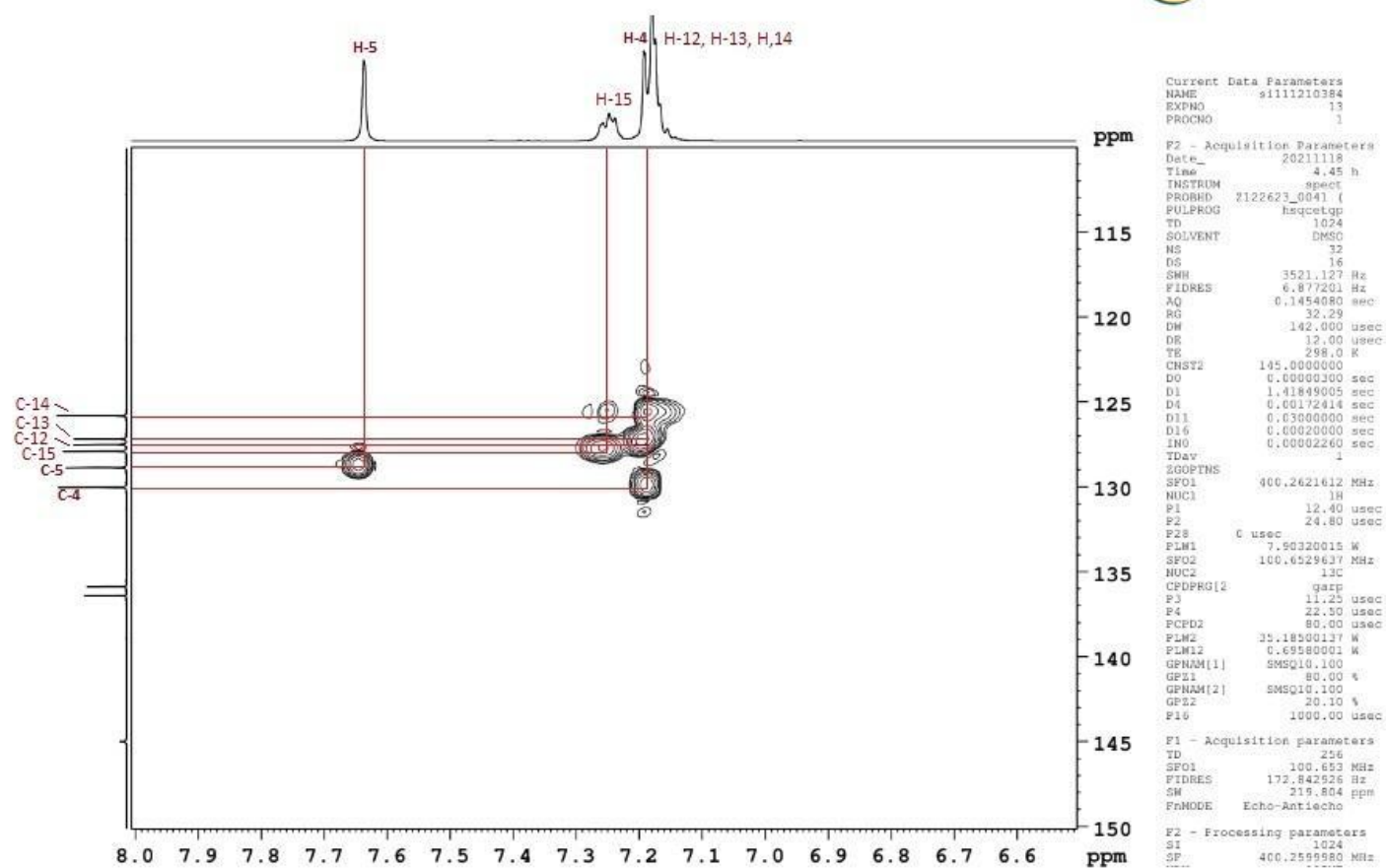
Espectro 5: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO-d_6) do derivado **1**.



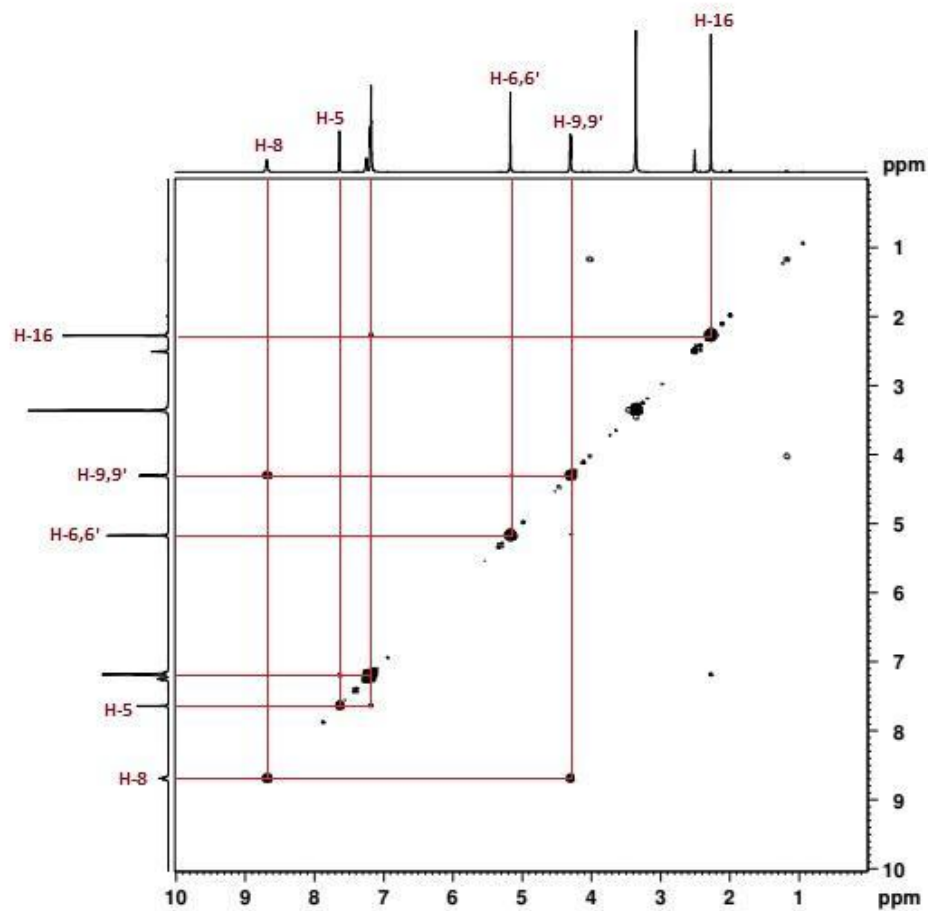
Espectro 6: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **1**.



Espectro 7: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado **1**.



Espectro 8: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado **1**.



Current Data Parameters
NAME a1111210384
EXPRO 12
PROCNO 1

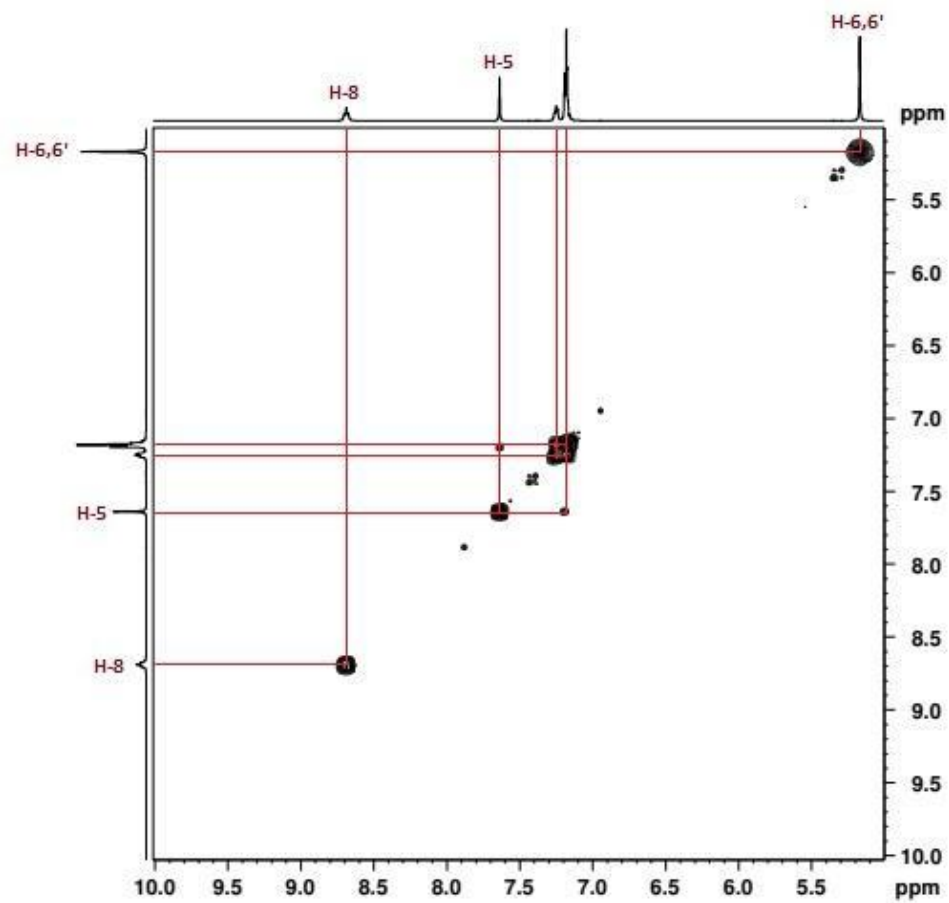
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20211118
Time 2:09 h
INSTRUM spect
PROBHD 5122623_0041 f
PULPROG cosygpgpgf
TD 1348
SOLVENT DMSO
NS 32
DS 8
SWH 4807.692 Hz
FIDRES 4.695012 Hz
AQ 0.2129920 sec
RG 35.41
DM 104.000 usec
DE 12.00 usec
TE 298.0 K
D0 0.00000000 sec
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00002000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
INO 0.00020000 sec
TDav 1
SF01 400.2622014 MHz
NUC1 1H
PD 12.40 usec
P1 12.40 usec
P17 2000.00 usec
PLM1 7.90320015 W
PLM2 1.35020006 W
GPAM[1] 3MSQ10.100
QPC1 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 128
SF01 400.2622 MHz
FIDRES 75.126193 Hz
SW 12.011 ppm
F2MODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.2600000 MHz
WDW QF
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 400.2600018 MHz
WDW QF
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Espectro 9: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 1.



```

Current Data Parameters
NAME      s1111310384
EXPNO     12
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20211118
Time      2.09 h
INSTRUM   spect
PROBHD    Z122623_0041
PULPROG   zgpg30pqr
TD        1548
SOLVENT   DMSO
NS         32
DS         8
SWH        4807.692 Hz
FIDRES     4.405012 Hz
AQ         0.1129920 sec
RG         35.61
DM         104.000 usec
DE         12.00 usec
TE         298.0 K
D0         0.00000000 sec
D1         2.00000000 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00002000 sec
D13        0.00000400 sec
D16        0.00020000 sec
IMS        0.00020000 sec
TDav       1
SFO1       400.2622014 MHz
NUC1       1H
PC         12.40 usec
P1         12.40 usec
P17        2500.00 usec
PLW1       7.90320015 W
PLW19      1.15020006 W
GPNAM[1]   SMSG10.100
GRP1       10.00 %
P16        1000.00 usec

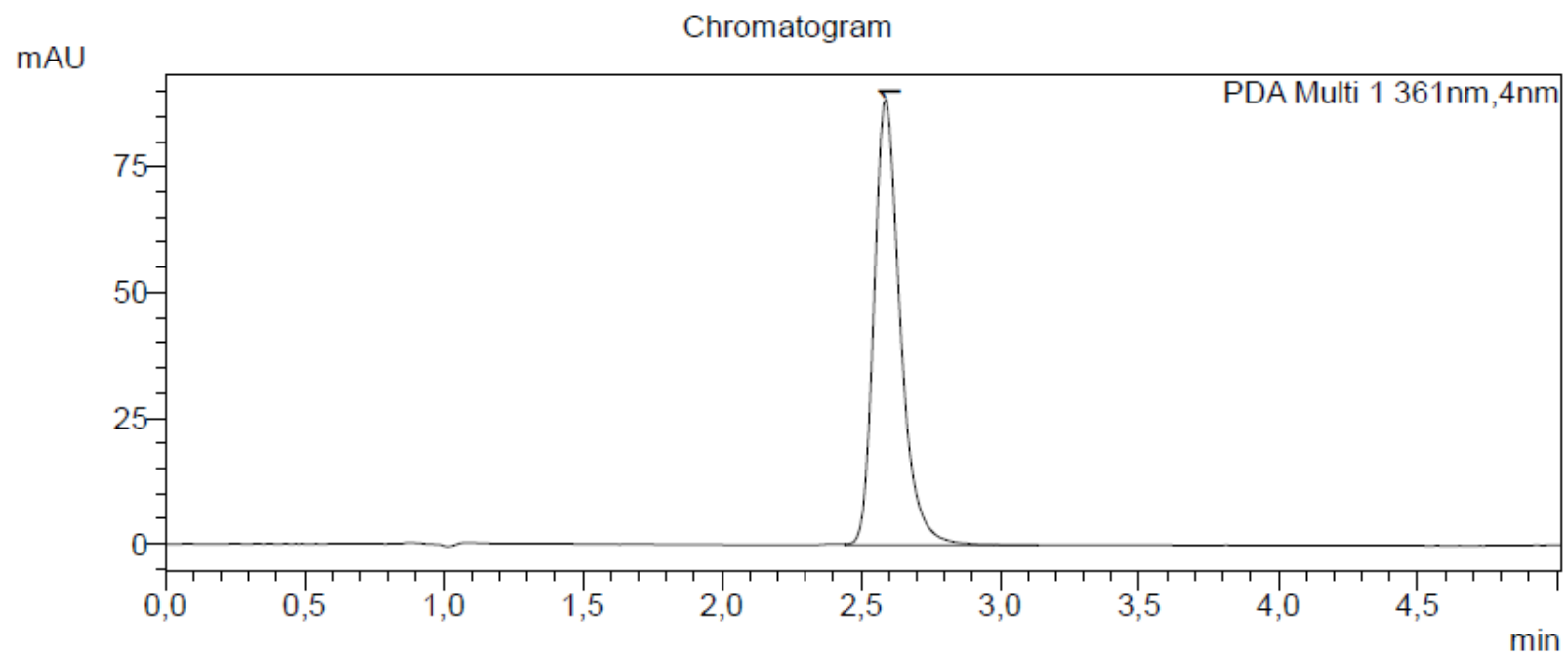
F1 - Acquisition parameters
TD         128
SFO1       400.2622 MHz
FIDRES     75.120193 Hz
SW         12.011 ppm
RG         0
PC         0

F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         400.2600000 MHz
WDW        COSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.40

F1 - Processing parameters
SI         1024
WDW        0
SF         400.2600000 MHz
WDW        COSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0

```

Espectro 10: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 1.

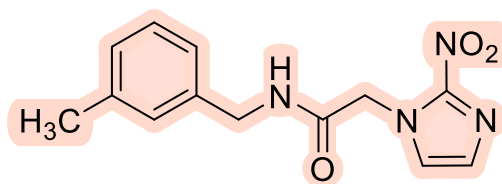


Peak Table

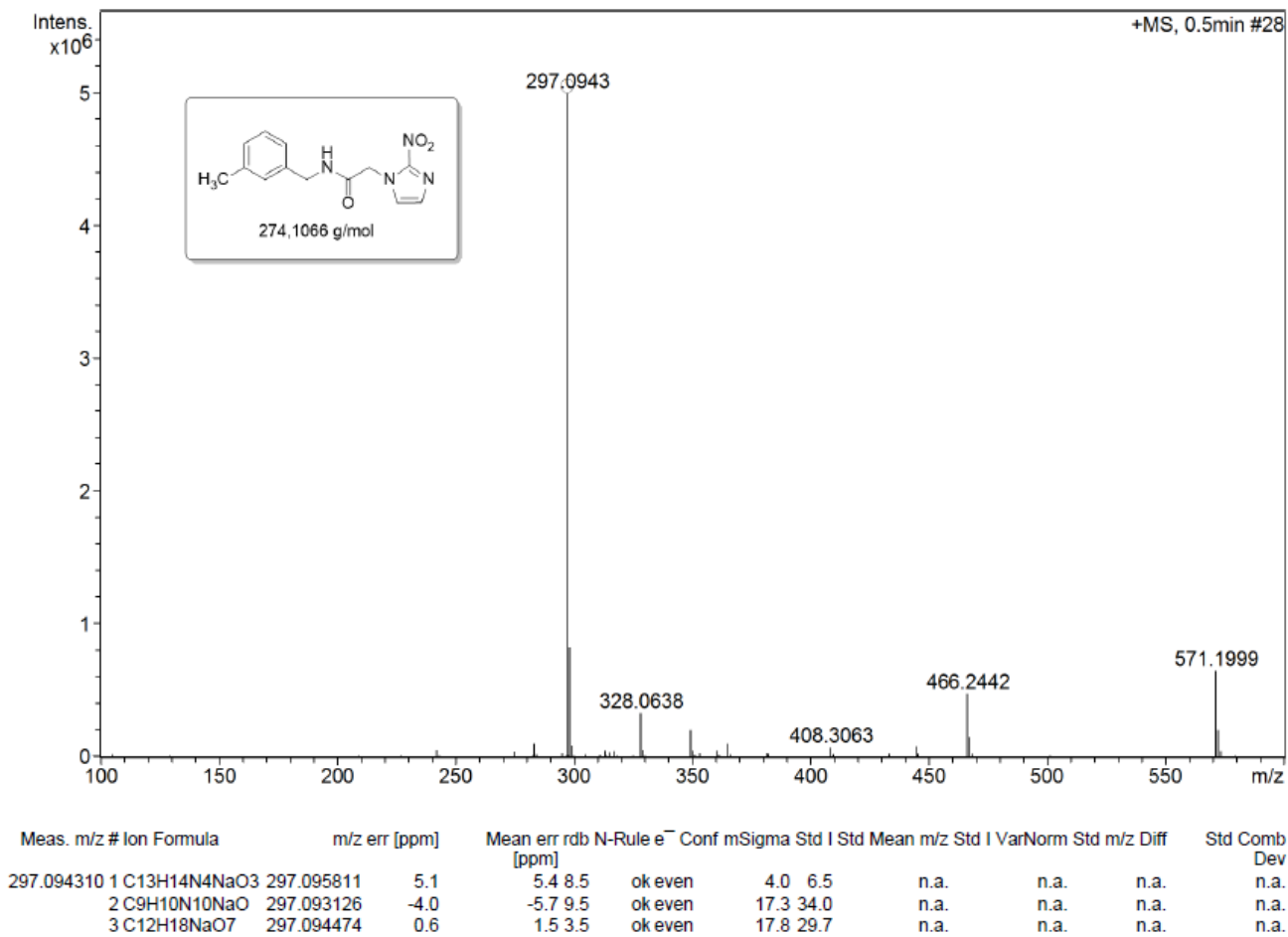
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	2,59		580166	100,0	20656	1,316	--	--
Total			580166	100,0				

Cromatograma 1: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **1**.

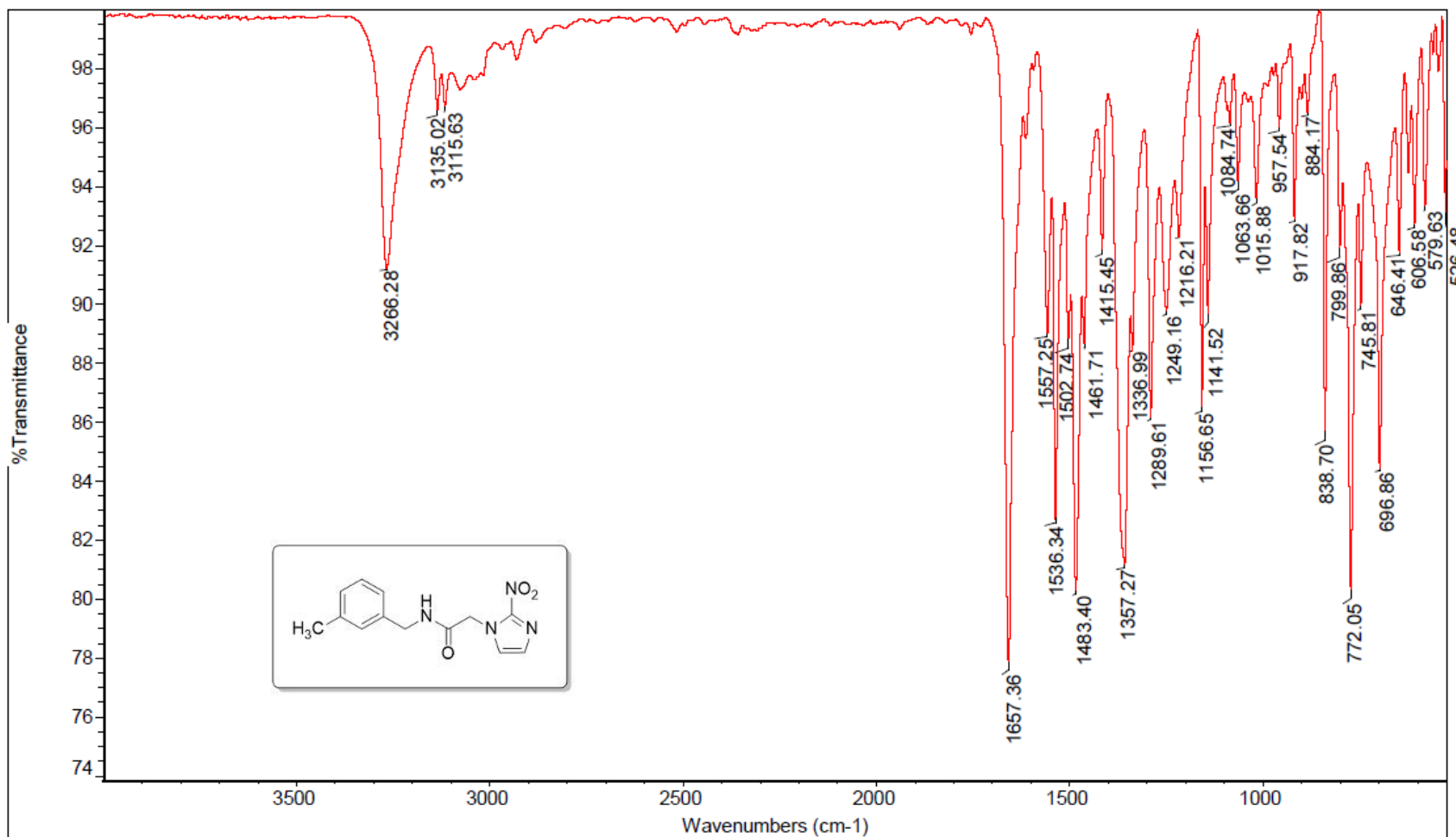
N-(3-metilbenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (2)



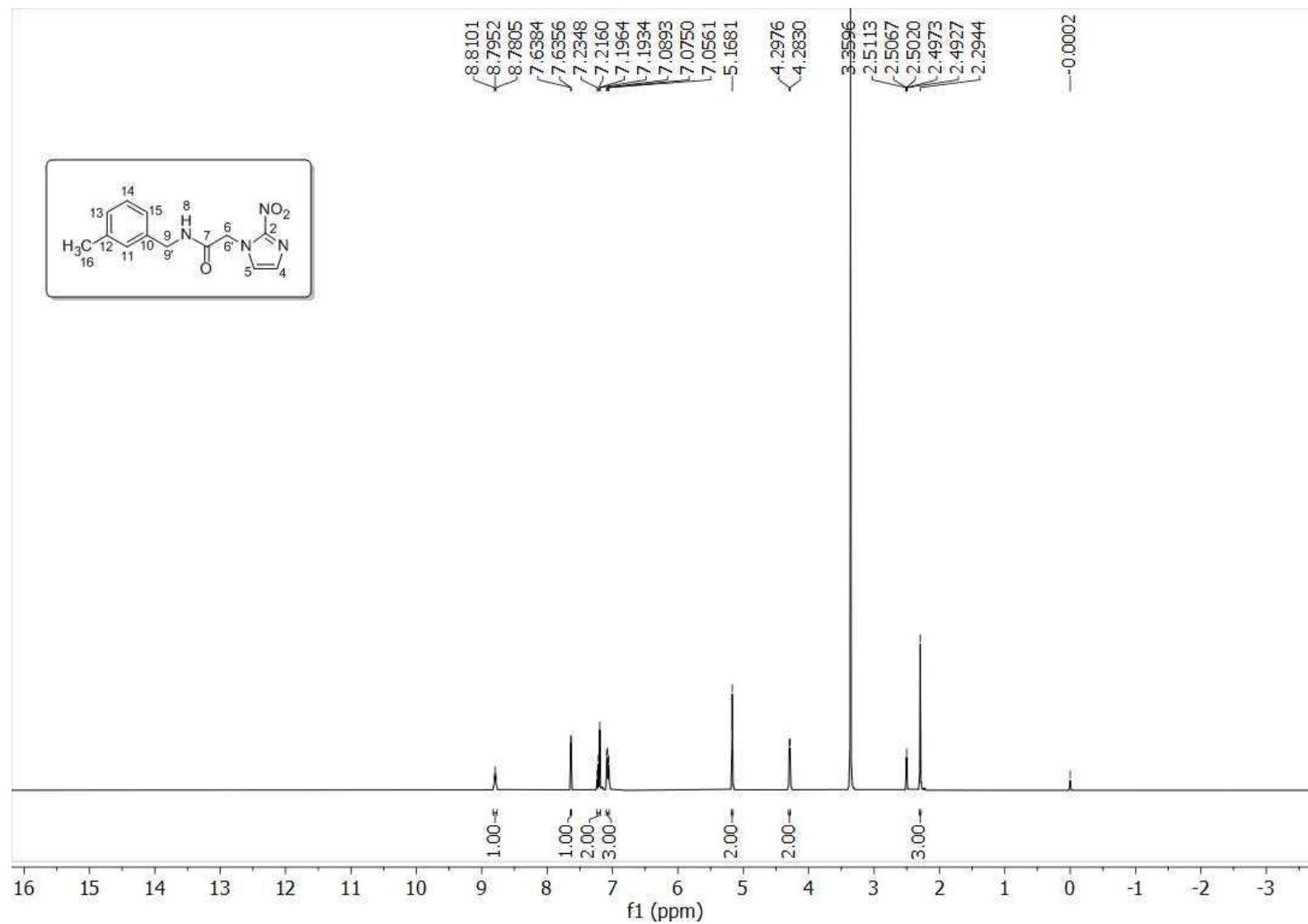
+MS, 0.5min #28



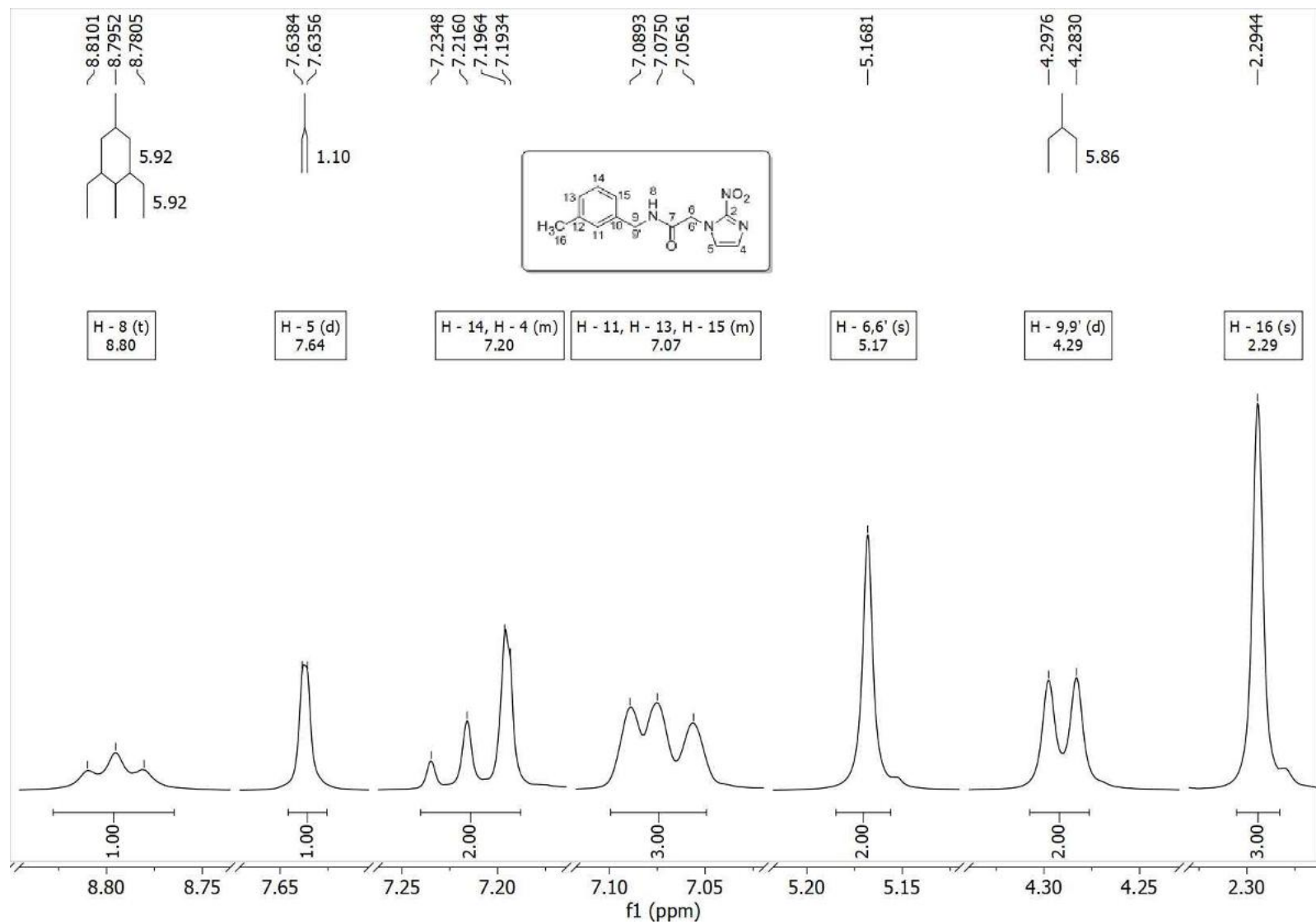
Espectro 11: Espectro de massas de alta resolução do derivado **2**.



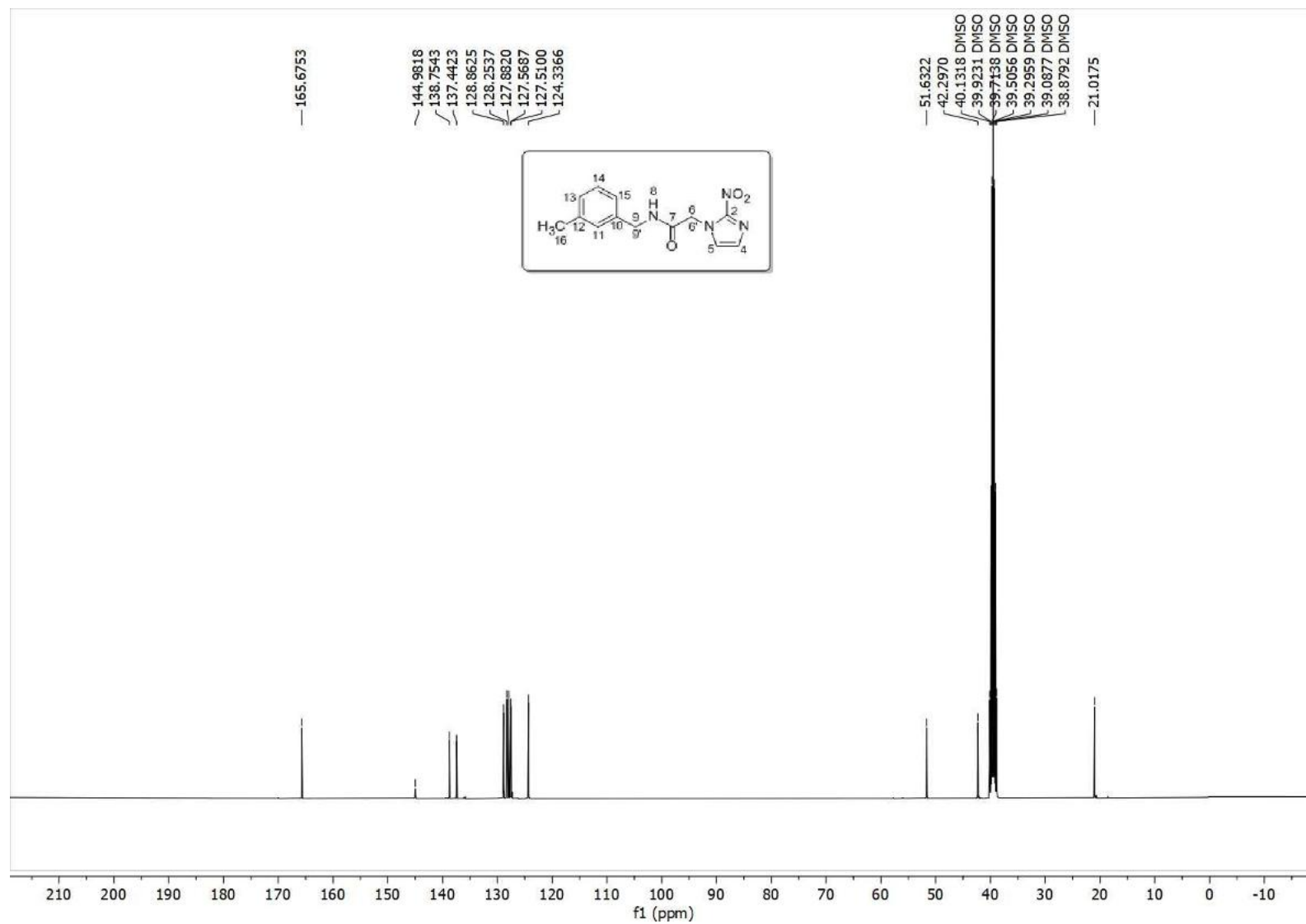
Espectro 12: Espectro de infravermelho do derivado 2.



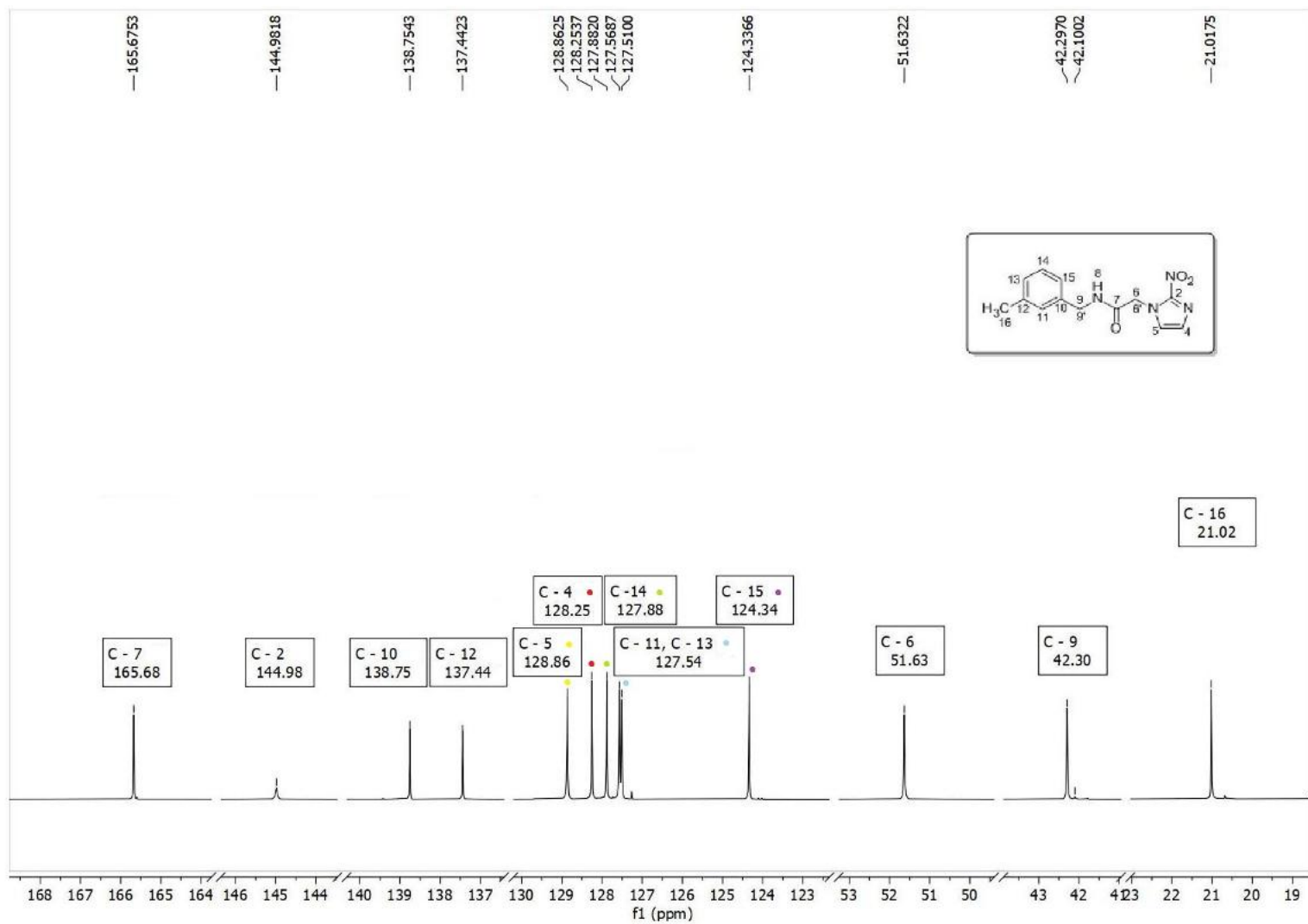
Espectro 13: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO-d_6) do derivado **2**.



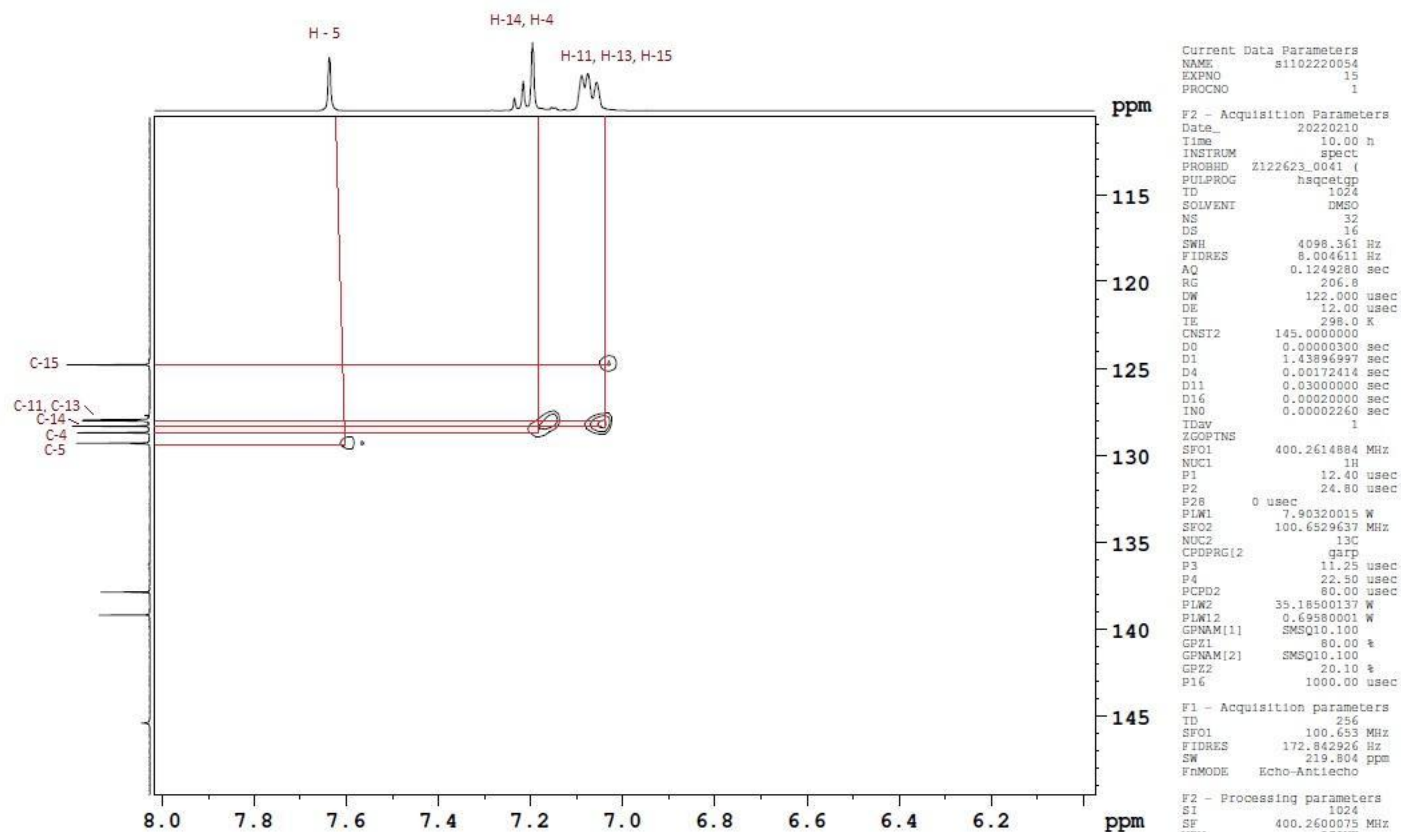
Espectro 14: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **2**.



Espectro 15: Espectro de RMN ¹³C (100 MHz; DMSO-d₆) do derivado **2**.

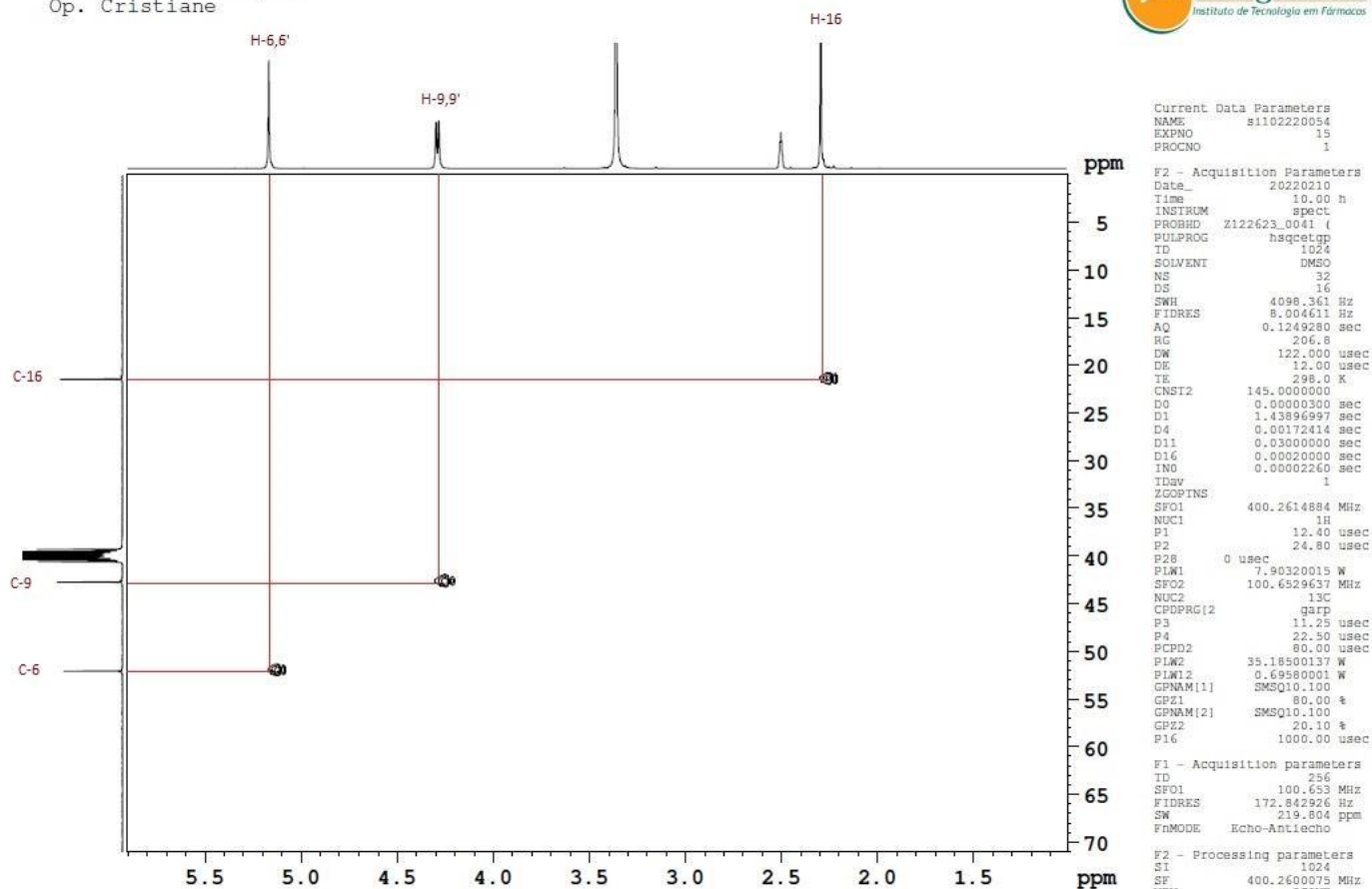


Espectro 16: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **2**.

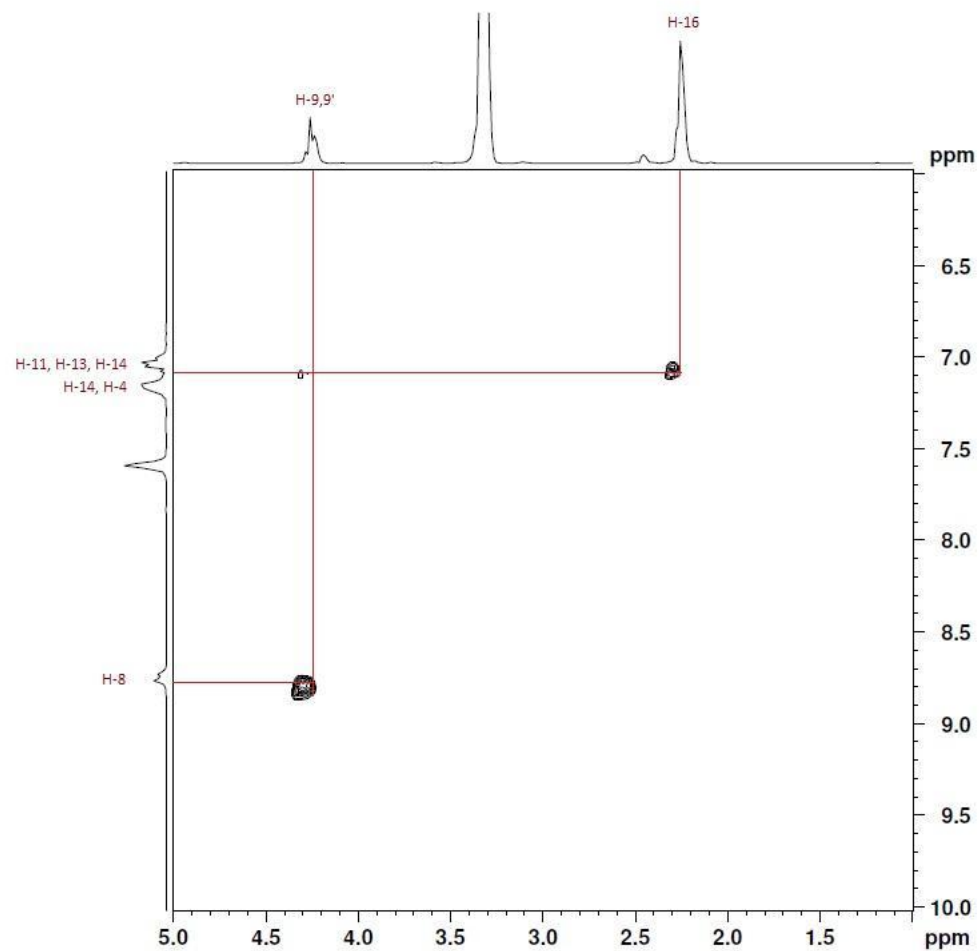


Espectro 17: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 2.

PCCN019-21 - Cheyene
Op. Cristiane



Espectro 18: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 2.



```

Current Data Parameters
NAME      si102220054
EXPNO     13
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20220204
Time      19.26 h
INSTRUM   spect
PROBHD    Z122623_0041 (
PULPROG   cosygpppqf
TD         2048
SOLVENT   DMSO
NS         32
DS         8
SWH        4807.692 Hz
FIDRES     4.695012 Hz
AQ         0.2129920 sec
RG         32.29
DW         104.000 usec
DE         12.00 usec
TE         298.0 K
D0         0.00000300 sec
D1         2.00000000 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00002000 sec
D13        0.00000400 sec
D16        0.00020000 sec
INO        0.00020800 sec
TD0ay     1
SFO1      400.2622014 MHz
NUC1       1H
P0         12.40 usec
P1         12.40 usec
P17        2500.00 usec
PLW1       7.90320015 W
PLW10      1.35020006 W
GPNAM[1]   SMSQ10.100
GPZ1       10.00 %
P16        1000.00 usec

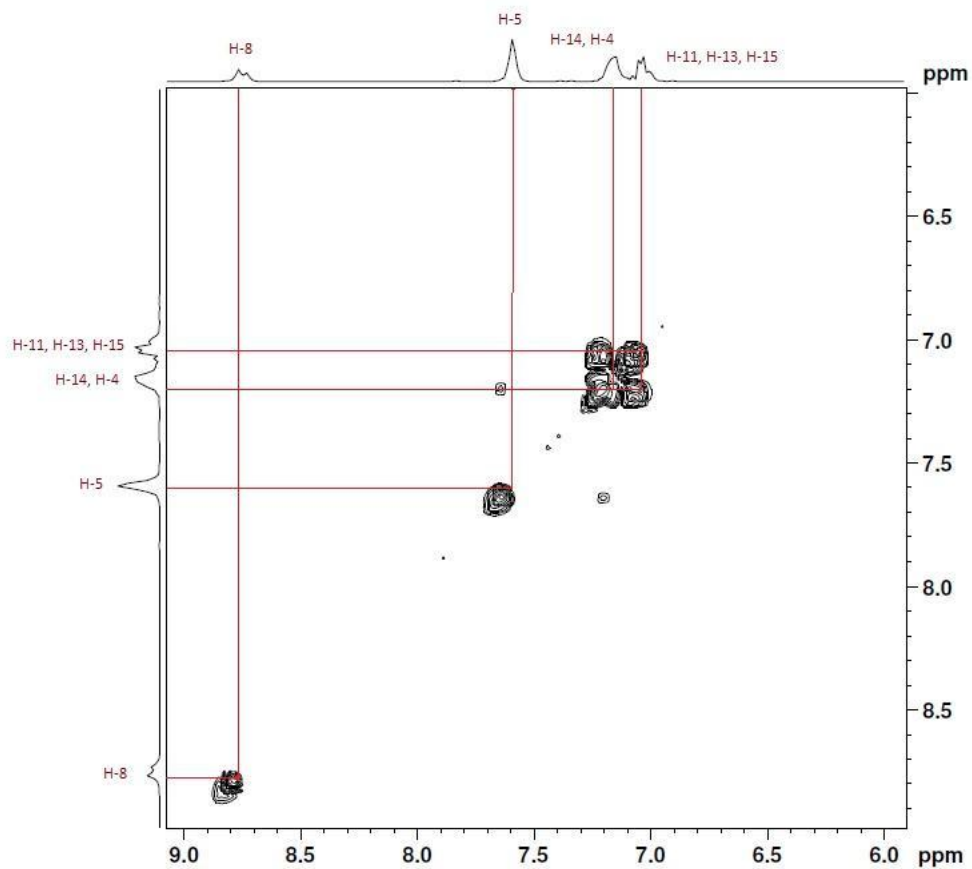
F1 - Acquisition parameters
TD         128
SFO1      400.2622 MHz
FIDRES     75.120193 Hz
SW         12.011 ppm
F0MODE     QF

F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         400.2599844 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.40

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        QF
SF         400.2599842 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0

```

Espectro 19: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado **2**.



Current Data Parameters
NAME si102220054
EXPNO 13
PROCNO 1

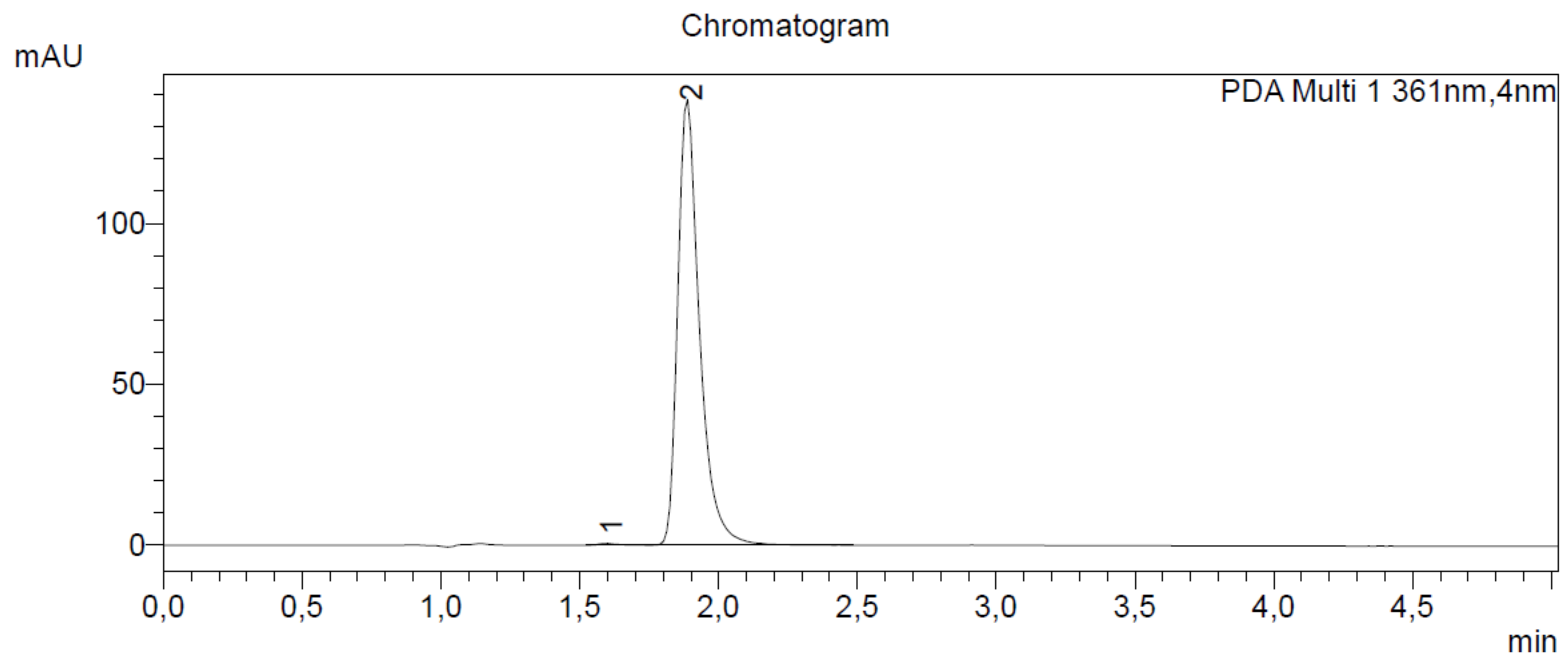
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20220206
Time 19.26 h
INSTRUM spect
PROBHD Z122623_0041 (cosyppppqf)
PULPROG cosyppppqf
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 32
DS 8
SWH 4807.692 Hz
FIDRES 4.695012 Hz
AQ 0.2129920 sec
RG 32.29
SW 104.000 usec
DE 12.00 usec
TE 298.0 K
D0 0.00000300 sec
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00020000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
INO 0.00020800 sec
TDev 1
SFO1 400.2622014 MHz
NUC1 1H
PQ 12.40 usec
P1 12.40 usec
P17 2500.00 usec
PLW1 7.90320015 W
PLW10 1.35020006 W
GPMAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 128
SFO1 400.2622 MHz
FIDRES 75.120193 Hz
SW 12.011 ppm
PrMODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.2599844 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 400.2599842 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Espectro 20: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 2.

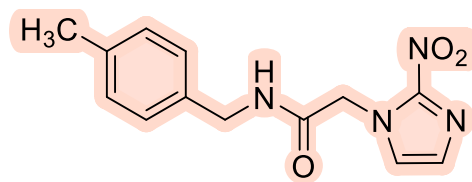


Peak Table

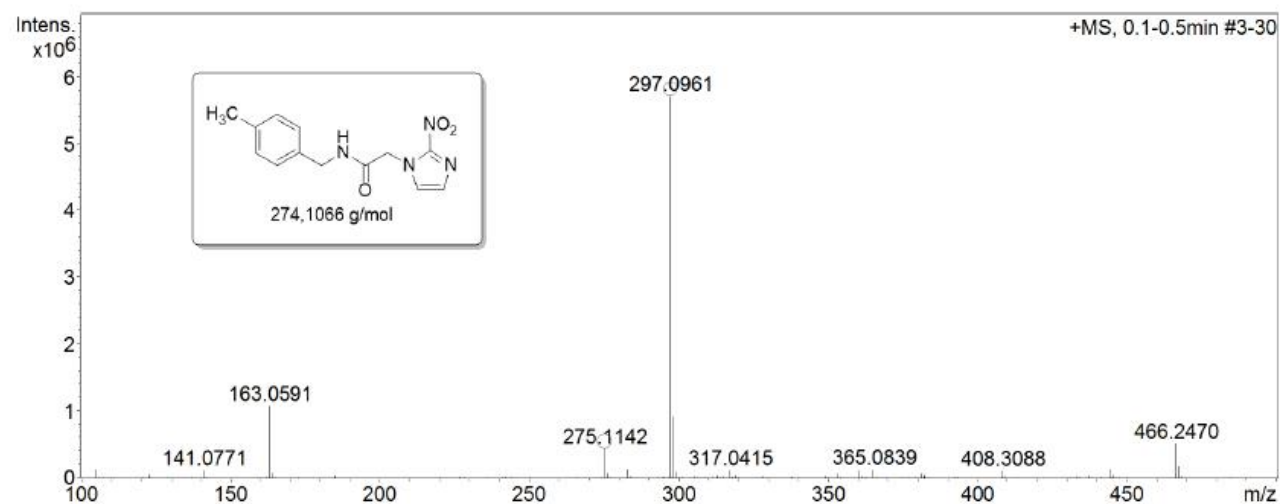
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,60		2798	0,4	12999	1,750	--	--
2	1,89		754654	99,6	14857	1,444	1,892	0,180
Total			757452	100,0				

Cromatograma 2: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado 2.

N-(4-metilbenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (3)

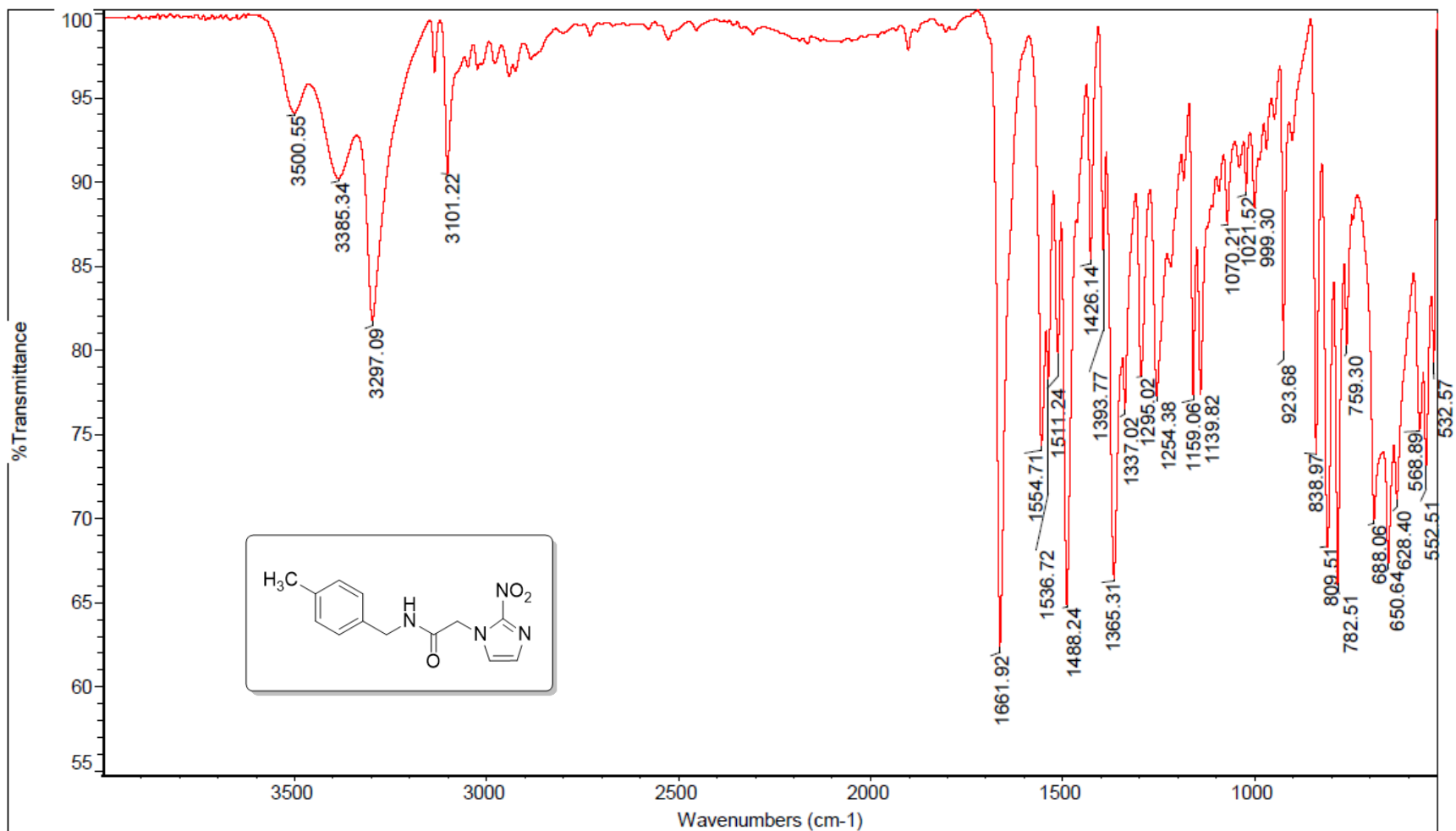


+MS, 0.1-0.5min #3-30

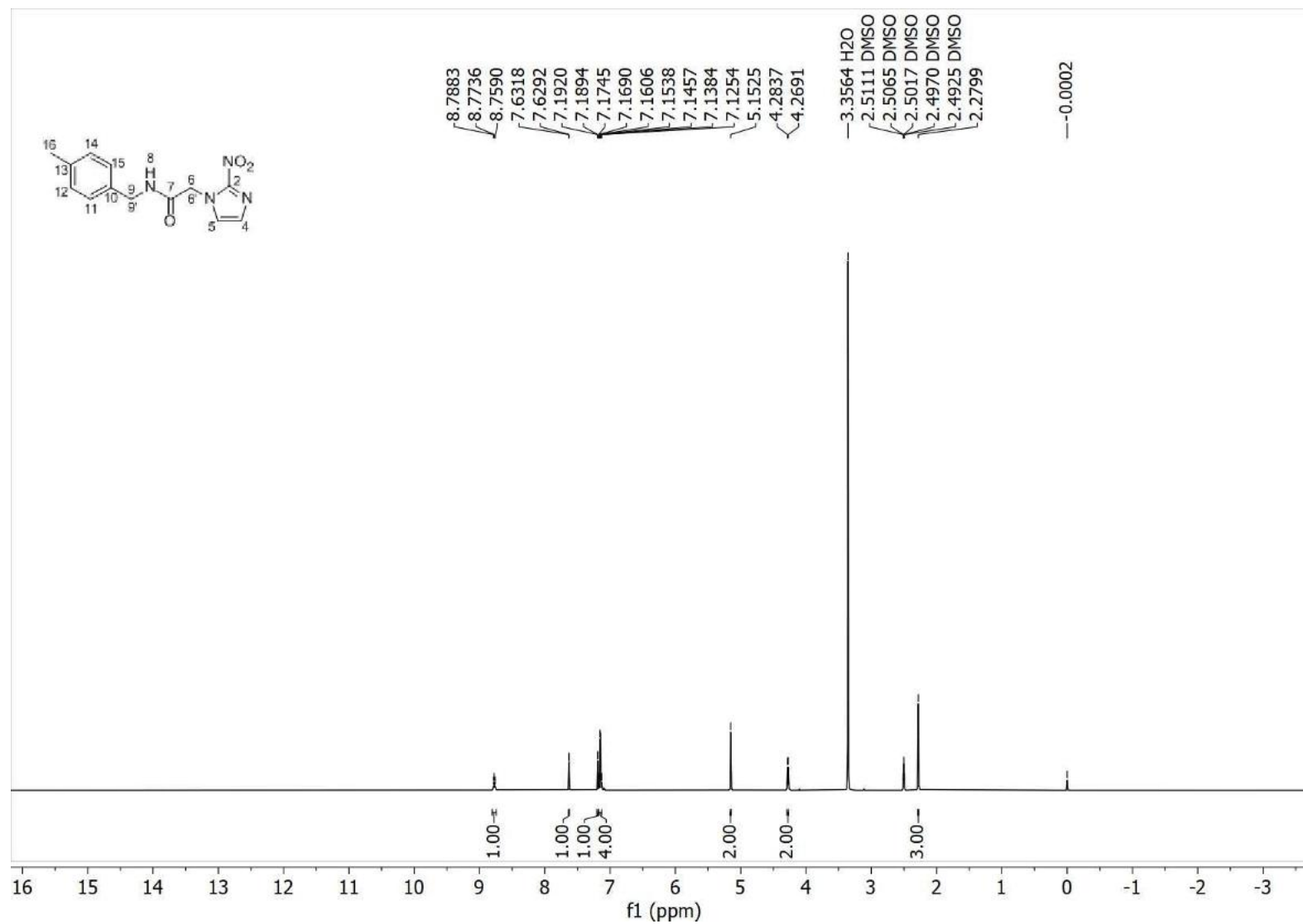


Meas. m/z # Ion Formula	m/z err [ppm]	Mean err rdb [ppm]	N-Rule e ⁻	Conf	mSigma	Std I	Std	Mean m/z	Std I	VarNorm	Std	m/z Diff	Std	Comb Dev
275.114235 1 C13H15N4O3	275.113867	-1.3	-1.2	8.5	ok even	0.8	1.8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
297.096077 1 C13H14N4NaO3	297.095811	-0.9	-0.3	8.5	ok even	2.4	3.7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

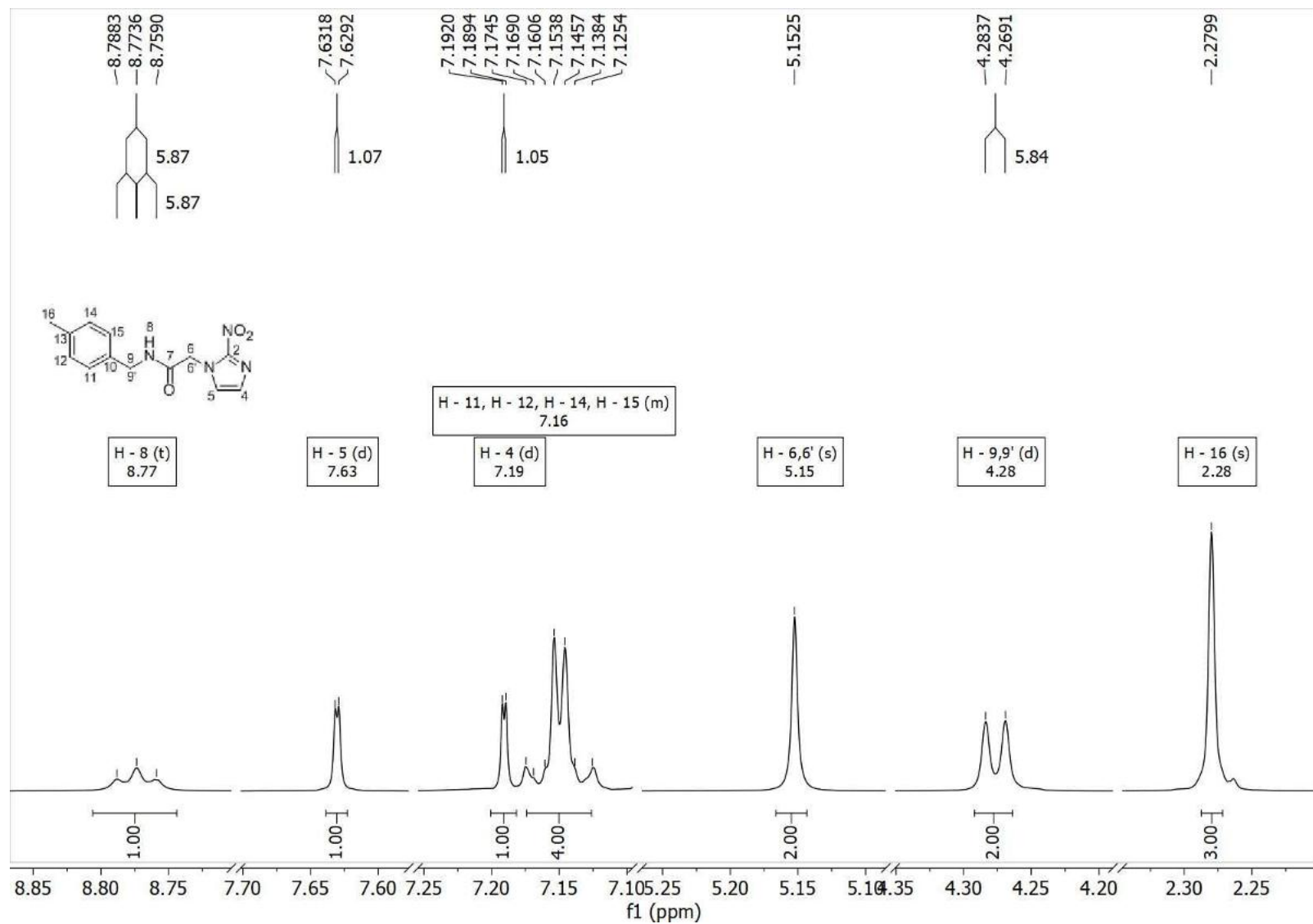
Espectro 21: Espectro de massas de alta resolução do derivado **3**.



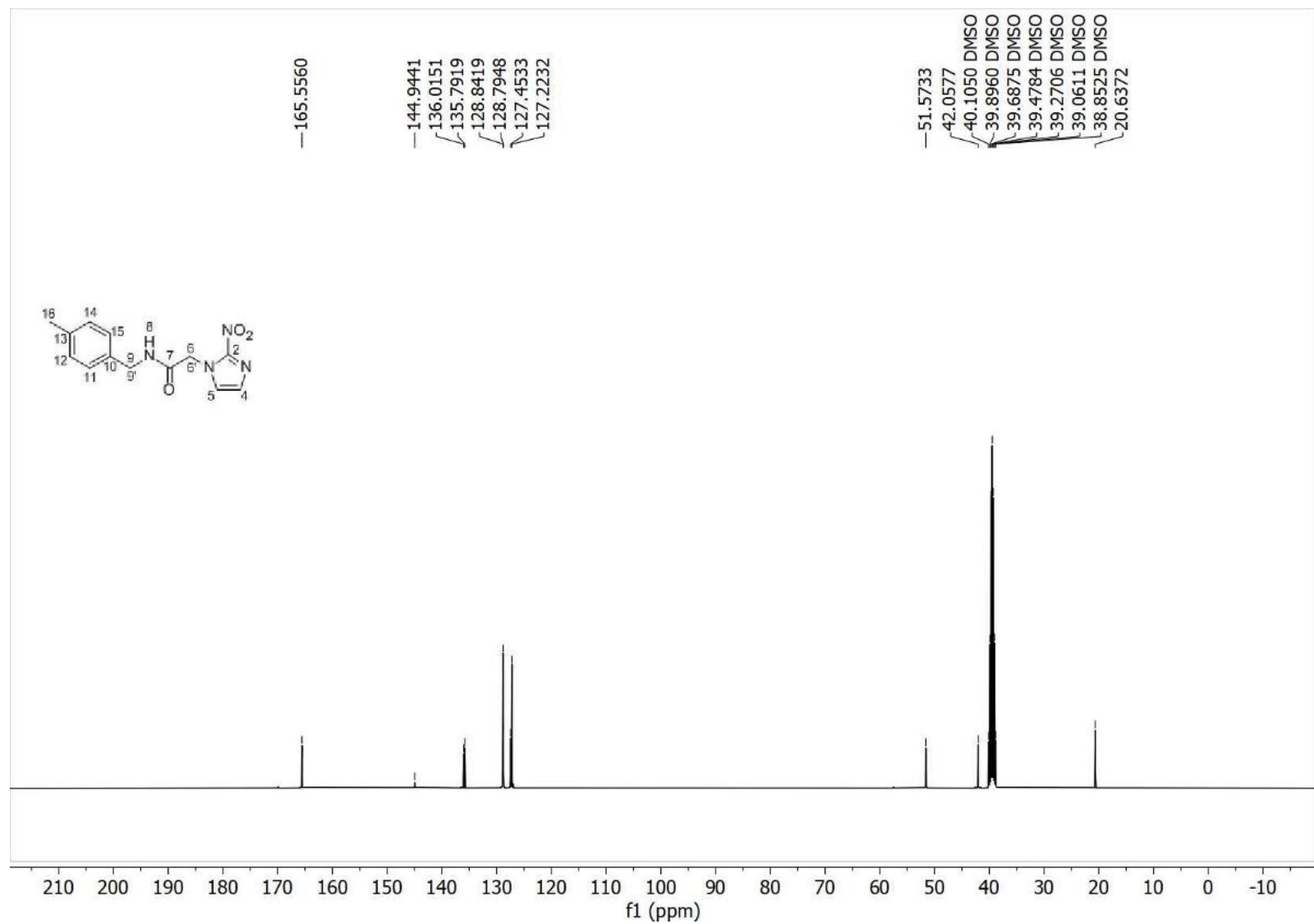
Espectro 22: Espectro de infravermelho do derivado **3**.



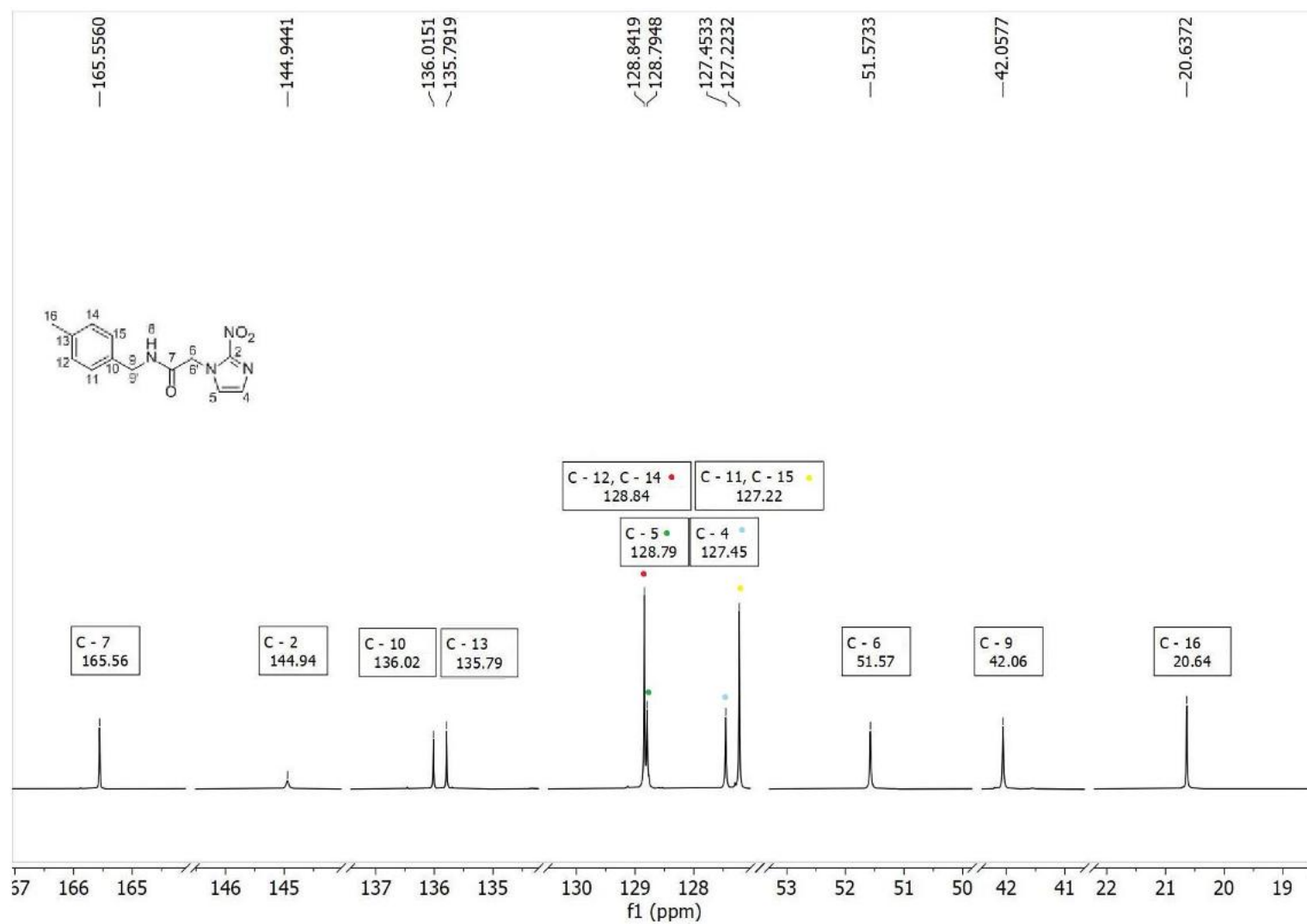
Espectro 23: Espectro de RMN ¹H (400 MHz; DMSO-d₆) do derivado **3**.



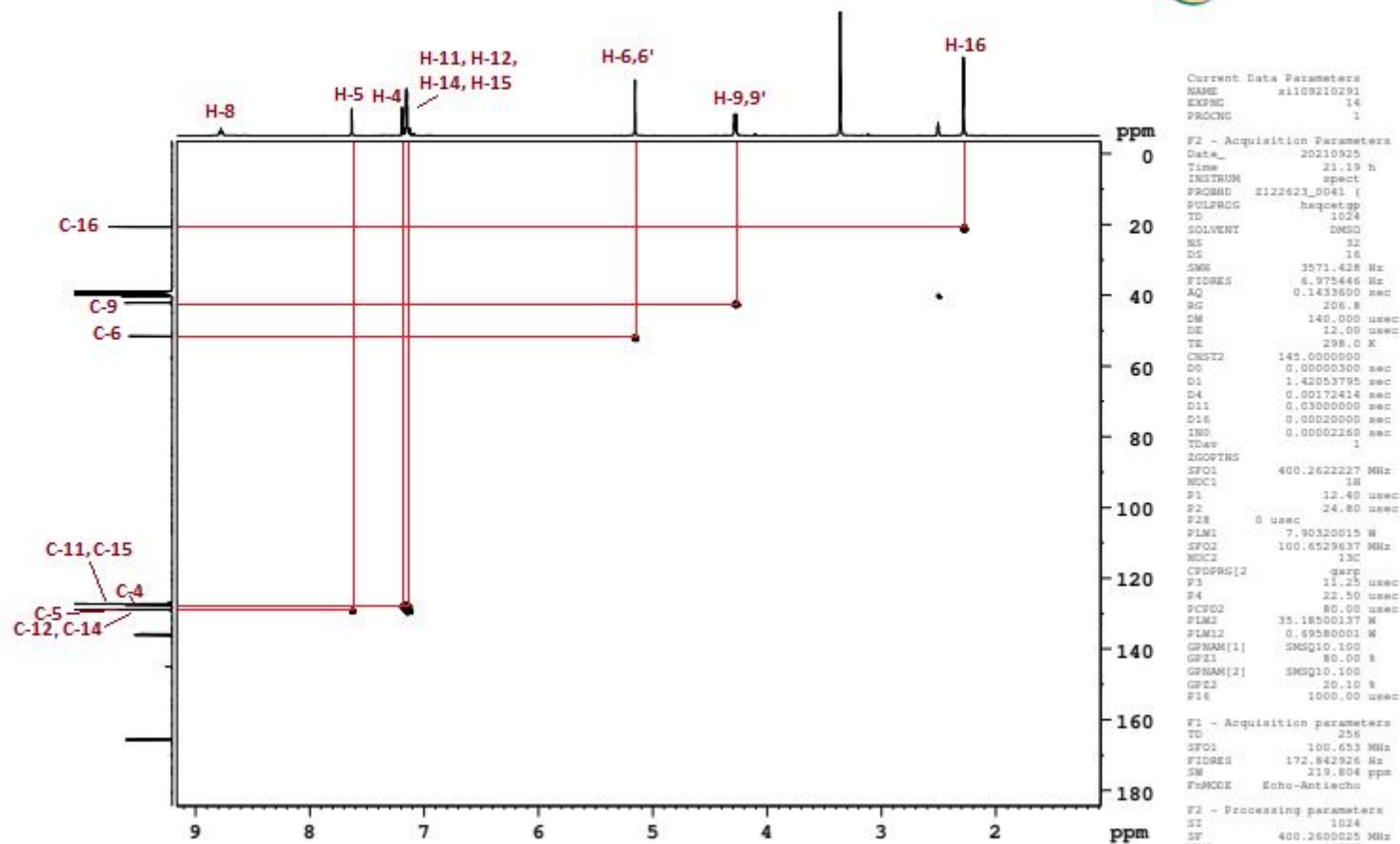
Espectro 24: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **3**.



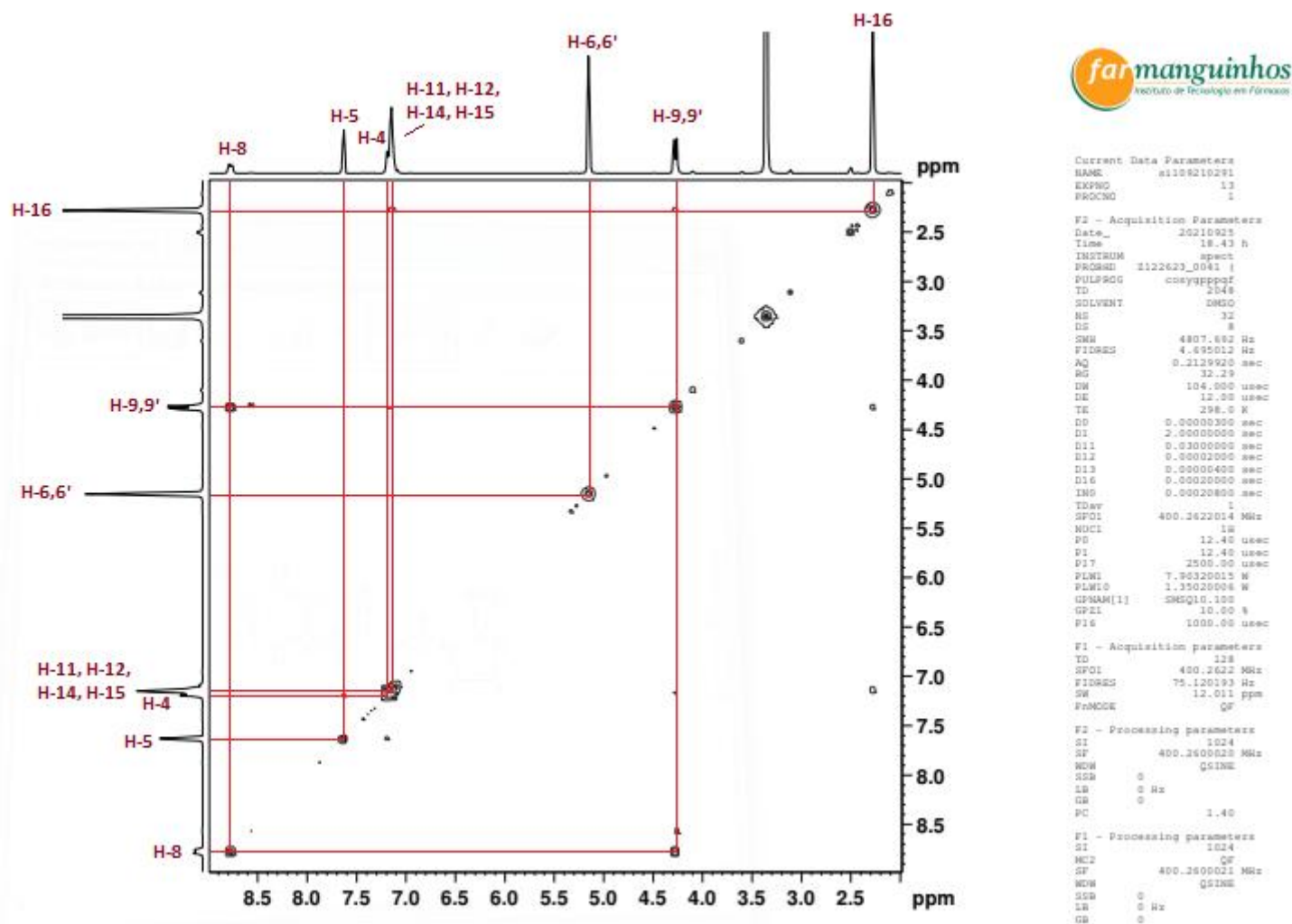
Espectro 25: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **3**.



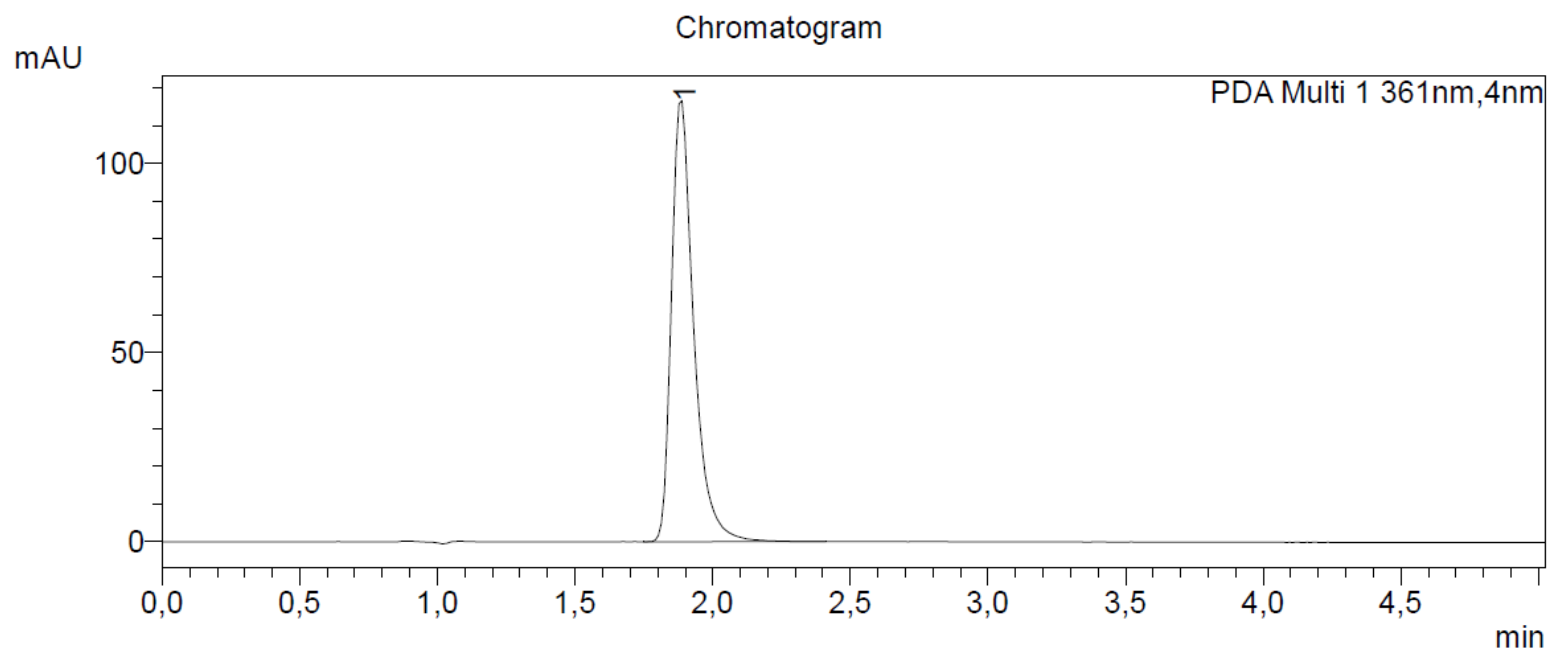
Espectro 26: Espectro de RMN ¹³C (100 MHz; DMSO-d₆) do derivado **3**.



Espectro 27: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 3.



Espectro 28: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 3.

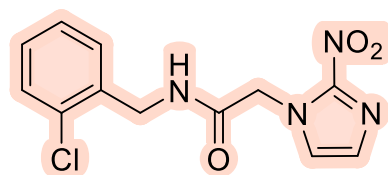


Peak Table

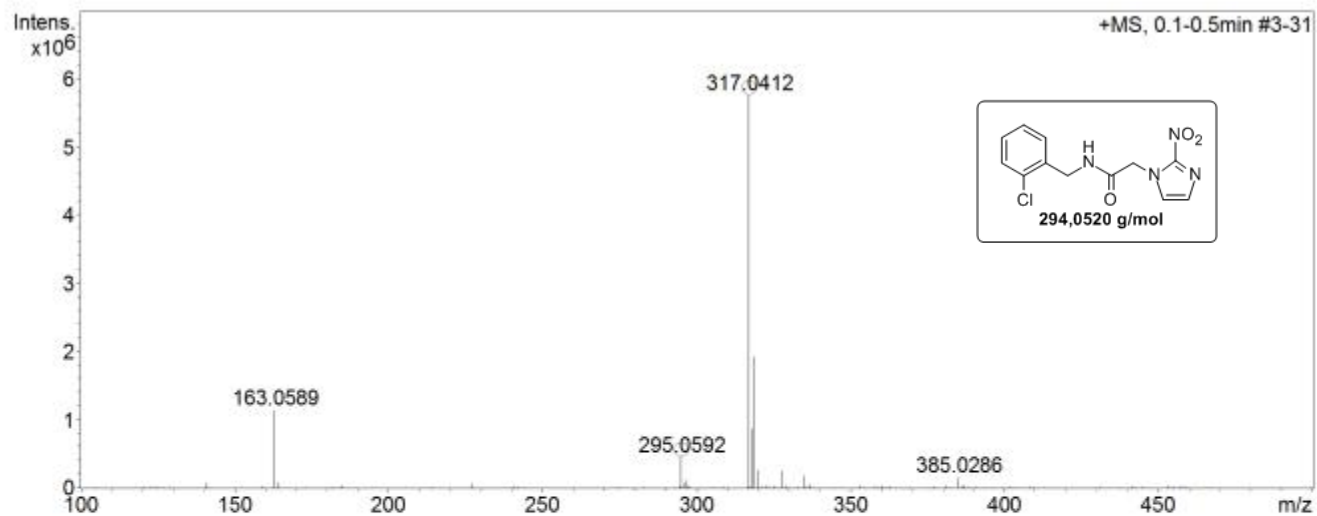
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,88		655380	100,0	14736	1,471	--	--
Total			655380	100,0				

Cromatograma 3: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **3**.

N-(2-clorobenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (4)

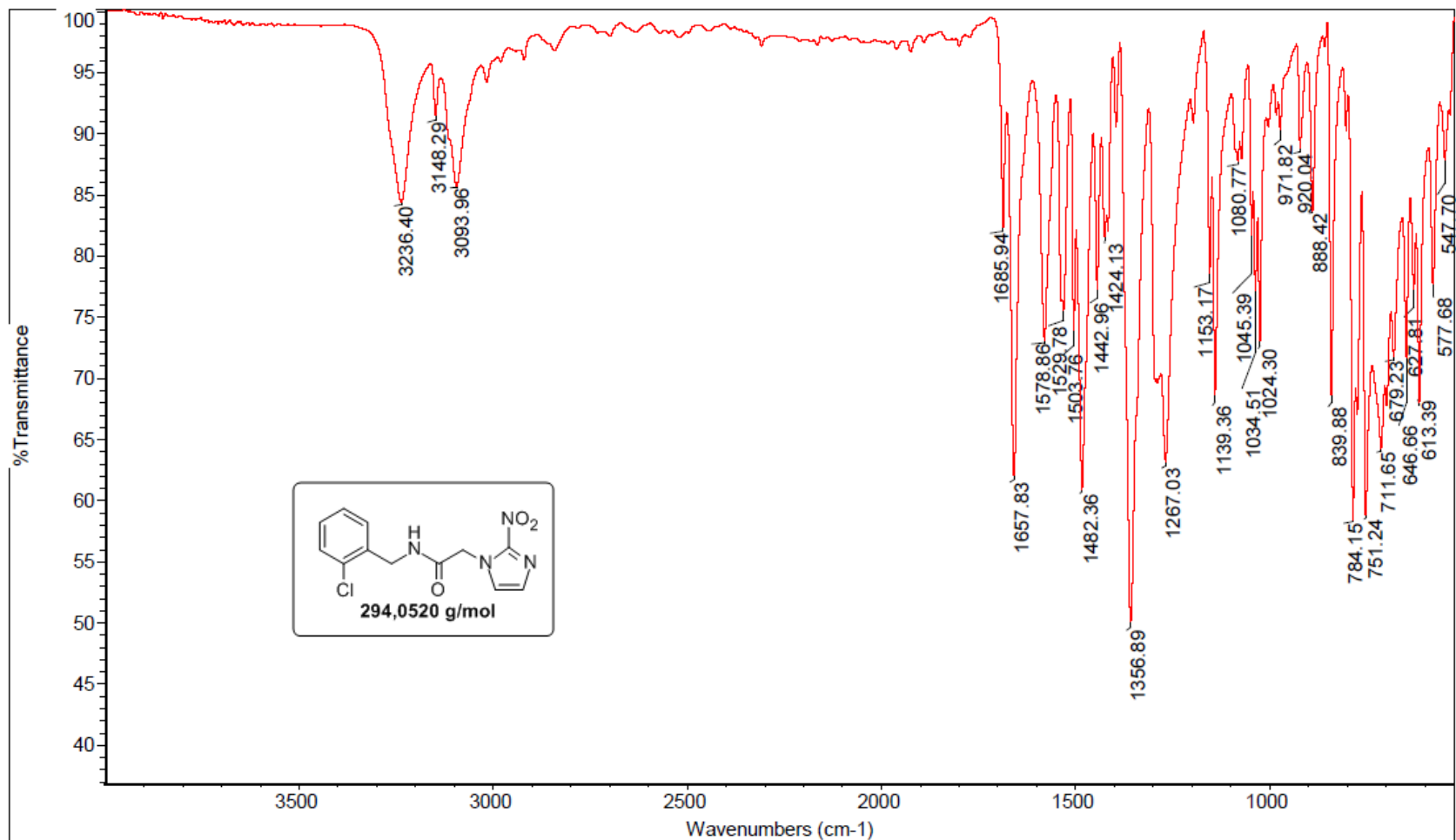


+MS, 0.1-0.5min #3-31

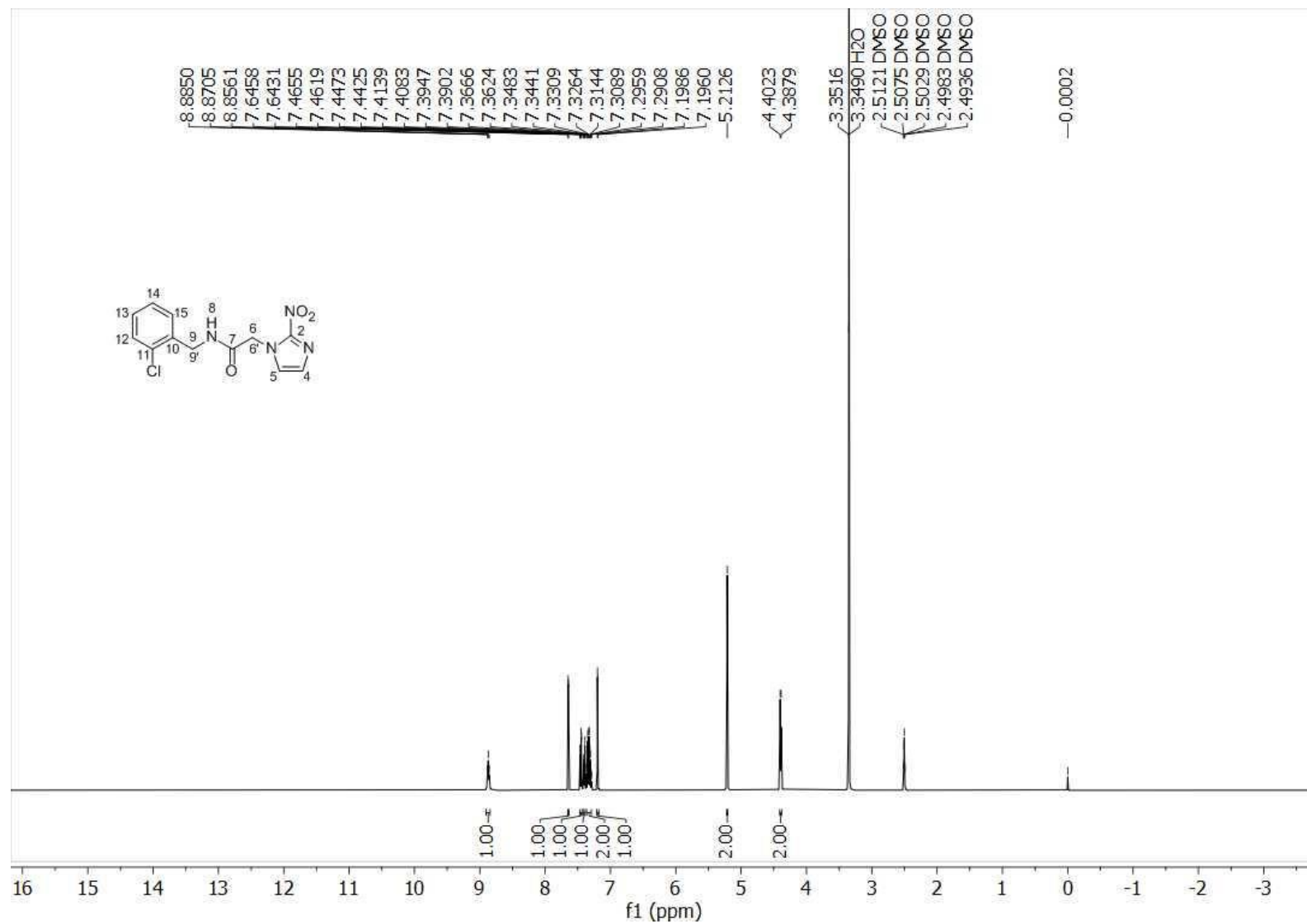


Meas. m/z	# Ion	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdB	N-Rule	e ⁻	Conf	mSigma	Std I	Std Mean m/z	Std I VarNorm	Std m/z Diff	Std Comb Dev
295.059229	1	C ₁₂ H ₁₂ ClN ₄ O ₃	295.059244	0.1	-4.4	8.5	ok	even		28.1	40.6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
317.041159	1	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₄ NaO ₃	317.041189	0.1	0.3	8.5	ok	even		3.1	4.3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

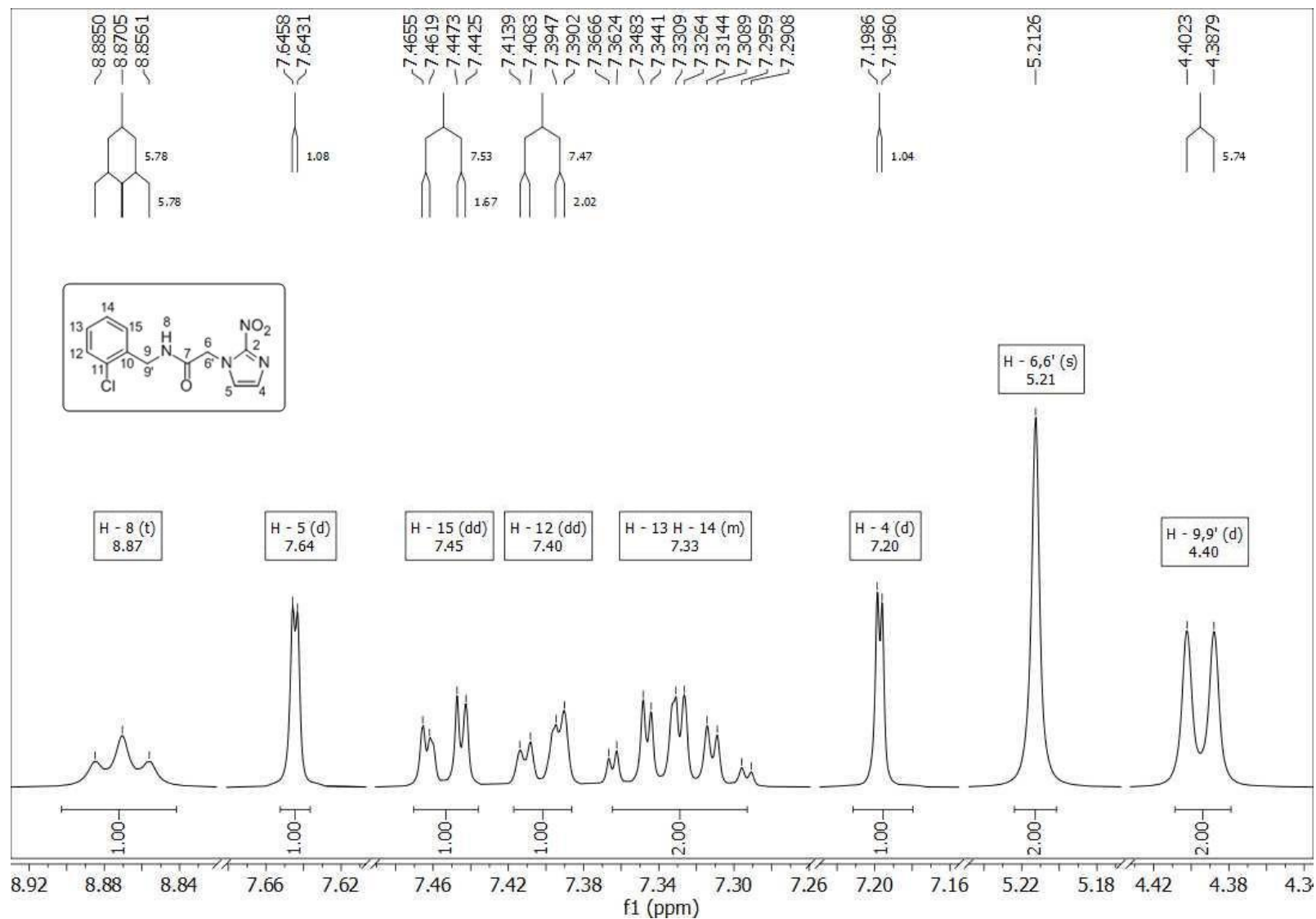
Espectro 29: Espectro de massas de alta resolução do derivado 4.



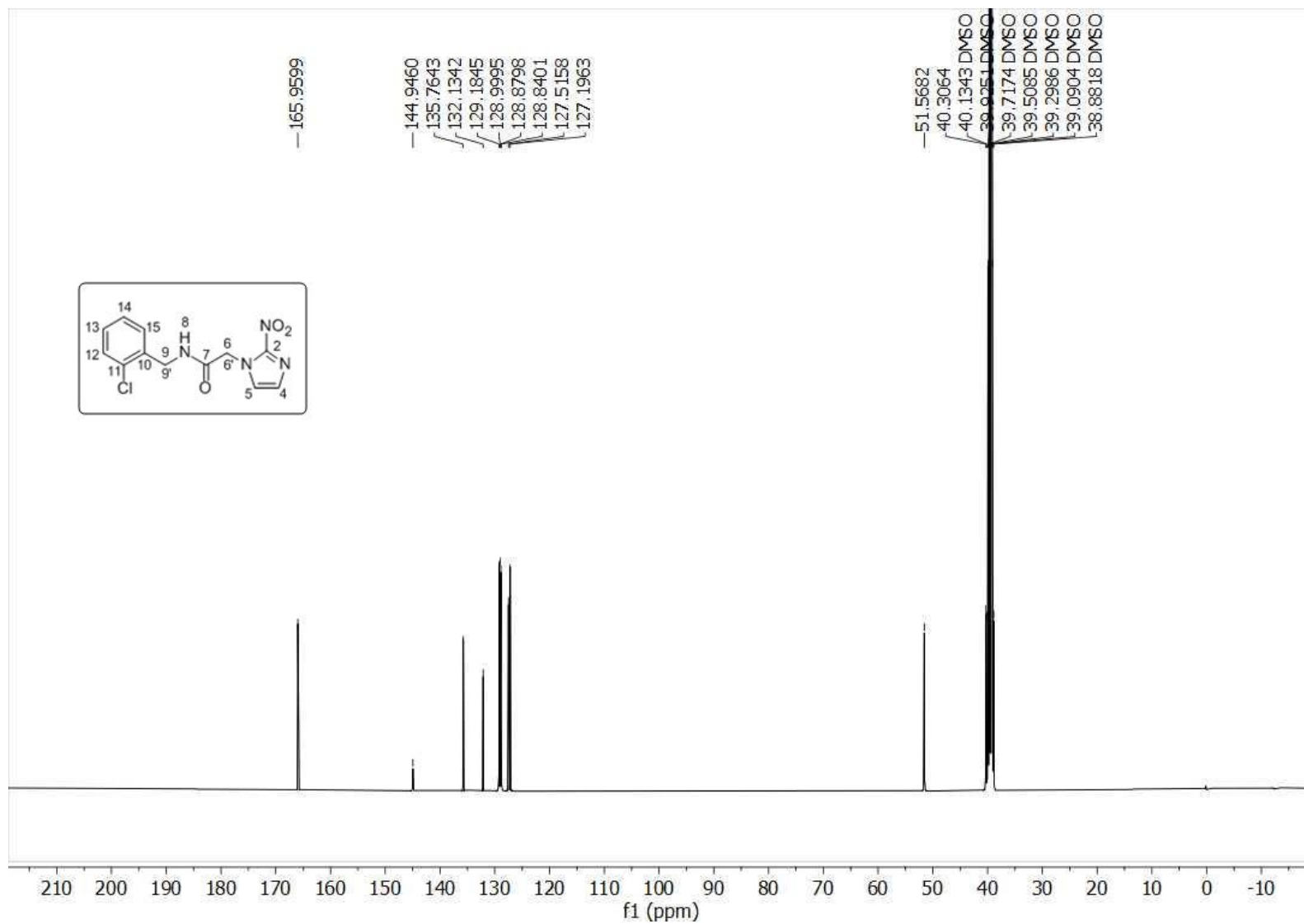
Espectro 30: Espectro de infravermelho do derivado 4.



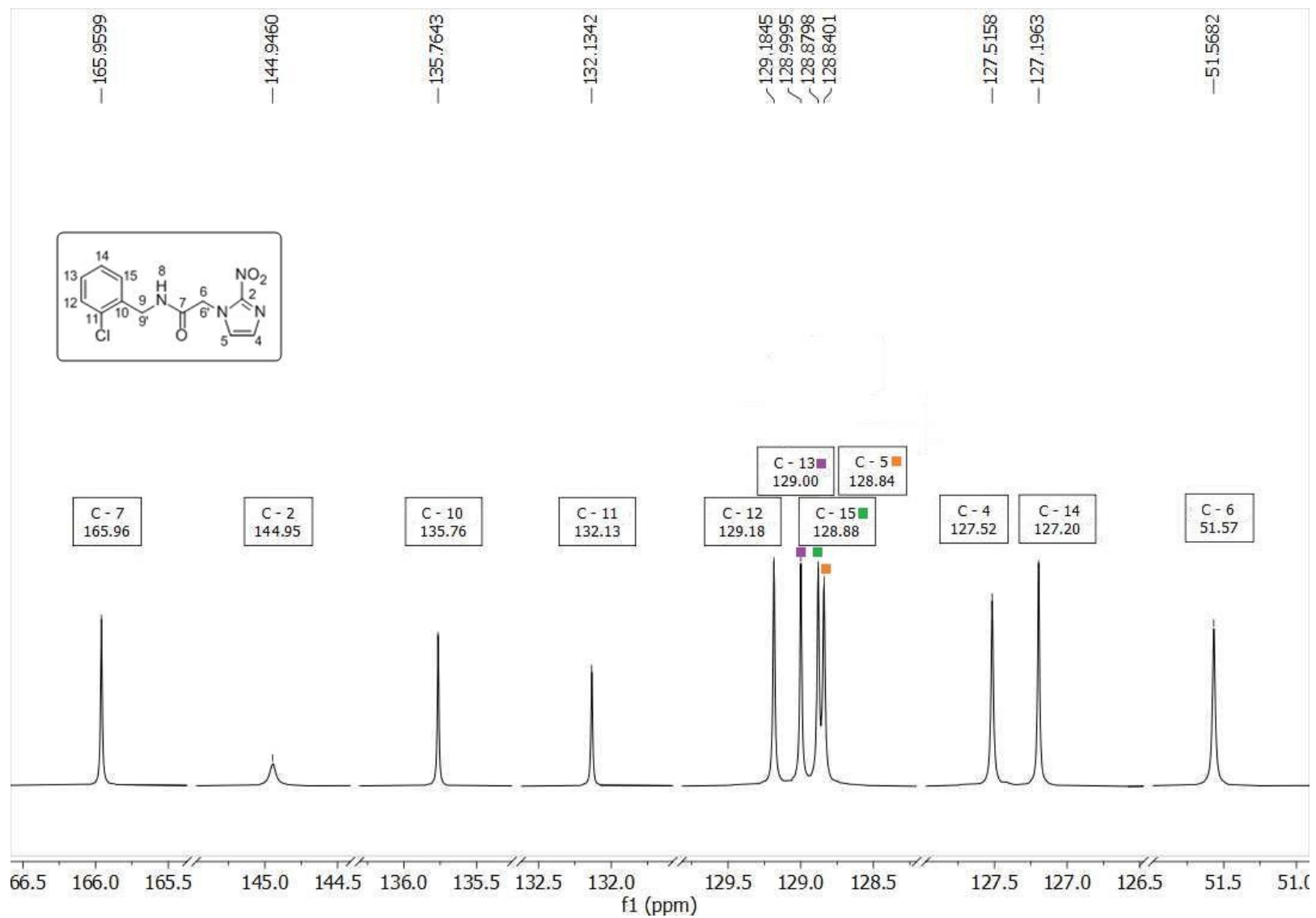
Espectro 31. Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO-d_6) do derivado **4**.



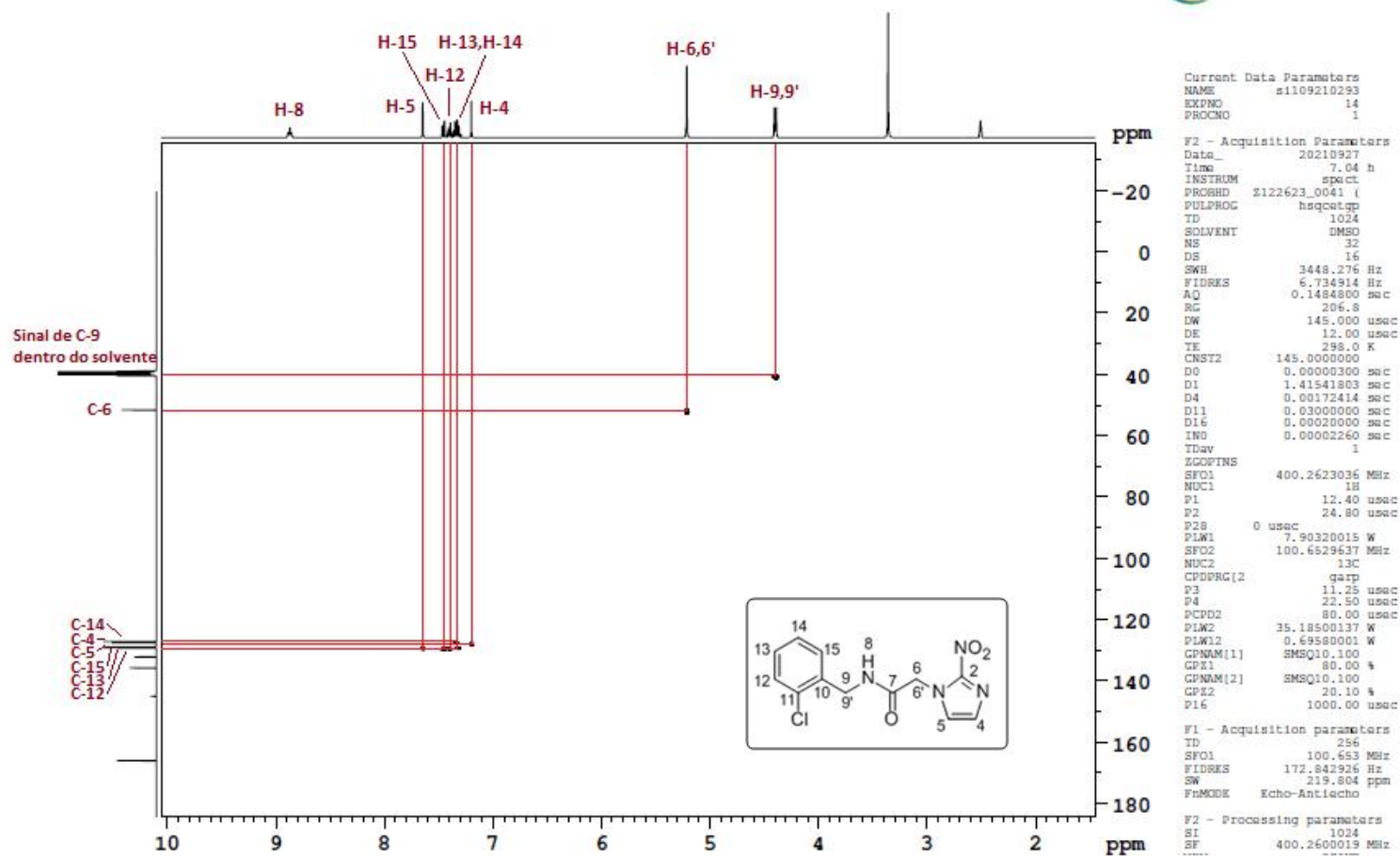
Espectro 32. Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **4**.



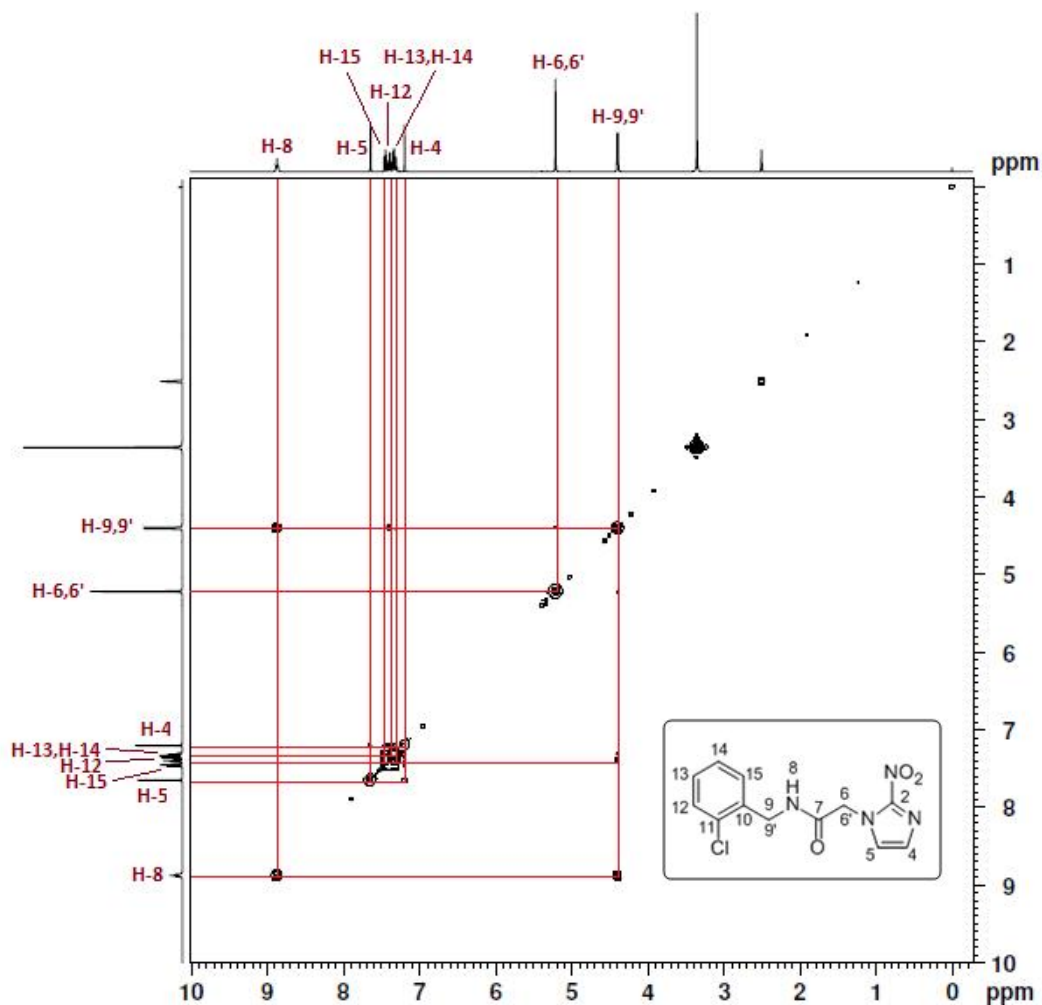
Espectro 33: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado 4.



Espectro 34: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **4**.



Espectro 35: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 4.



Current Data Parameters
NAME: si109210293
EXPNO: 13
PROCNO: 1

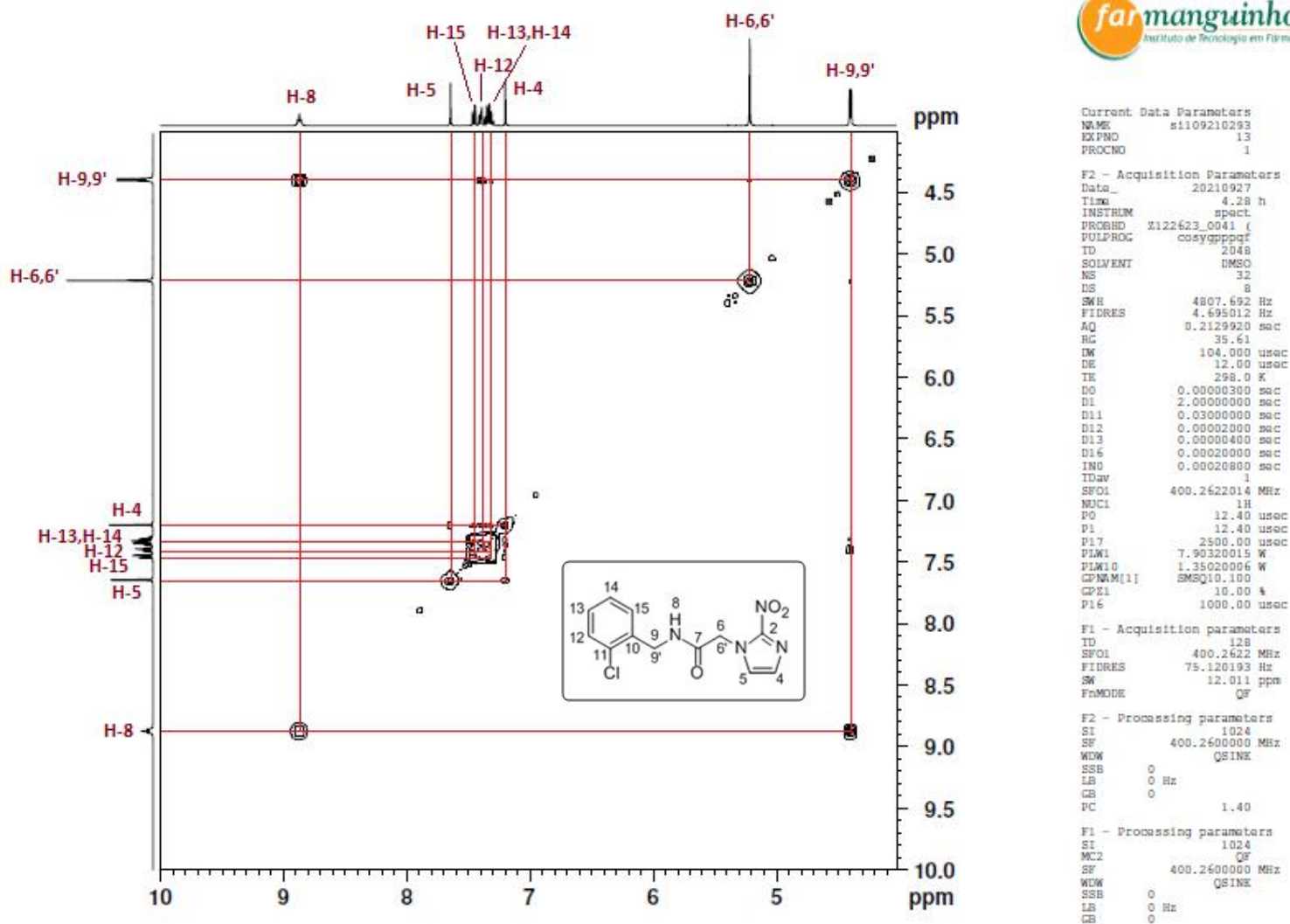
F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20210927
Time: 4.28 h
INSTRUM: spect
PROCNO: 1122621_0041 (1)
PULPROG: cosygpppgf
TD: 2048
SOLVENT: DMSO
NS: 32
DS: 8
SWH: 4807.692 Hz
FIDRES: 4.595012 Hz
AQ: 0.2129920 sec
RG: 35.61
RW: 104.000 usec
DE: 12.00 usec
TE: 298.0 K
DQ: 0.00000000 sec
D1: 2.00000000 sec
D11: 0.03000000 sec
D12: 0.00002000 sec
D13: 0.00000400 sec
D16: 0.00020000 sec
TMO: 0.00020000 sec
TDAV: 1
SF01: 400.2622014 MHz
NUC1: 1H
P0: 12.40 usec
P1: 12.40 usec
P17: 2500.00 usec
PLW1: 7.90320015 W
PLW10: 1.35020006 W
GENAM(1): SMSQ10.100
CP21: 10.00 %
P16: 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD: 128
SF01: 400.2622 MHz
FIDRES: 75.120193 Hz
SM: 12.011 ppm
FAMODE: QF

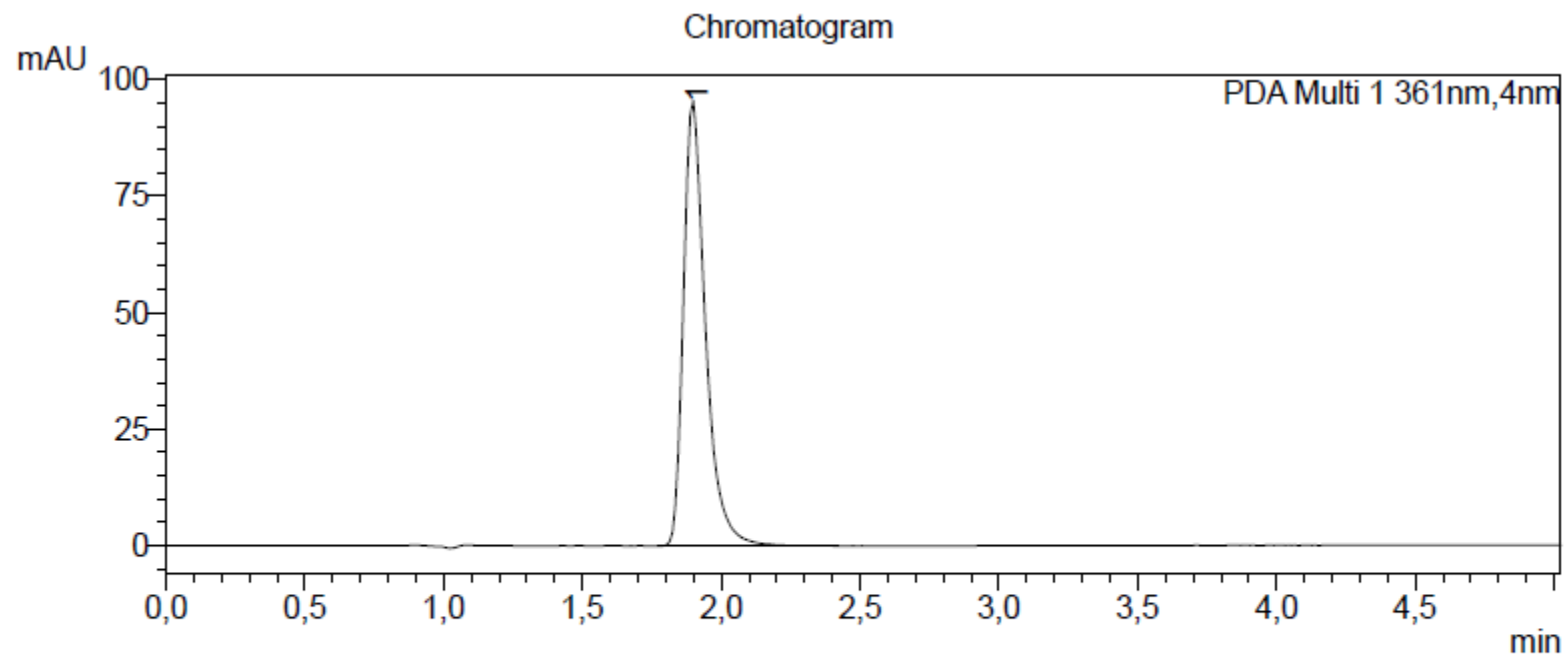
F2 - Processing parameters
SI: 1024
SF: 400.2600000 MHz
WDW: QSINE
SSB: 0 Hz
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.40

F1 - Processing parameters
SI: 1024
MC2: QF
SF: 400.2600000 MHz
WDW: QSINE
SSB: 0 Hz
LB: 0 Hz
GB: 0

Espectro 36: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 4.



Espectro 37: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 4.

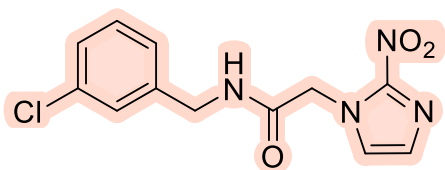


Peak Table

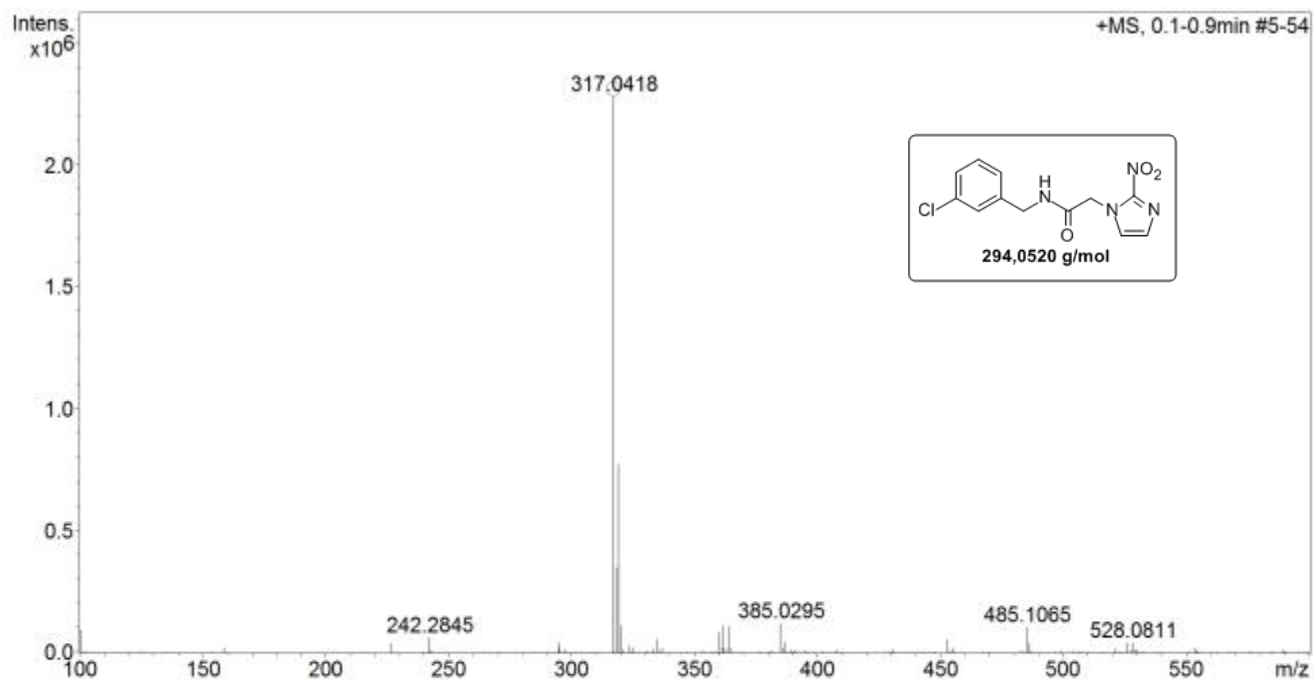
PDA Ch1 361nm							
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)
1	1,90		528966	100,0	14653	1,459	--
Total			528966	100,0			

Cromatograma 4: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **4**.

N-(3-clorobenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (5)

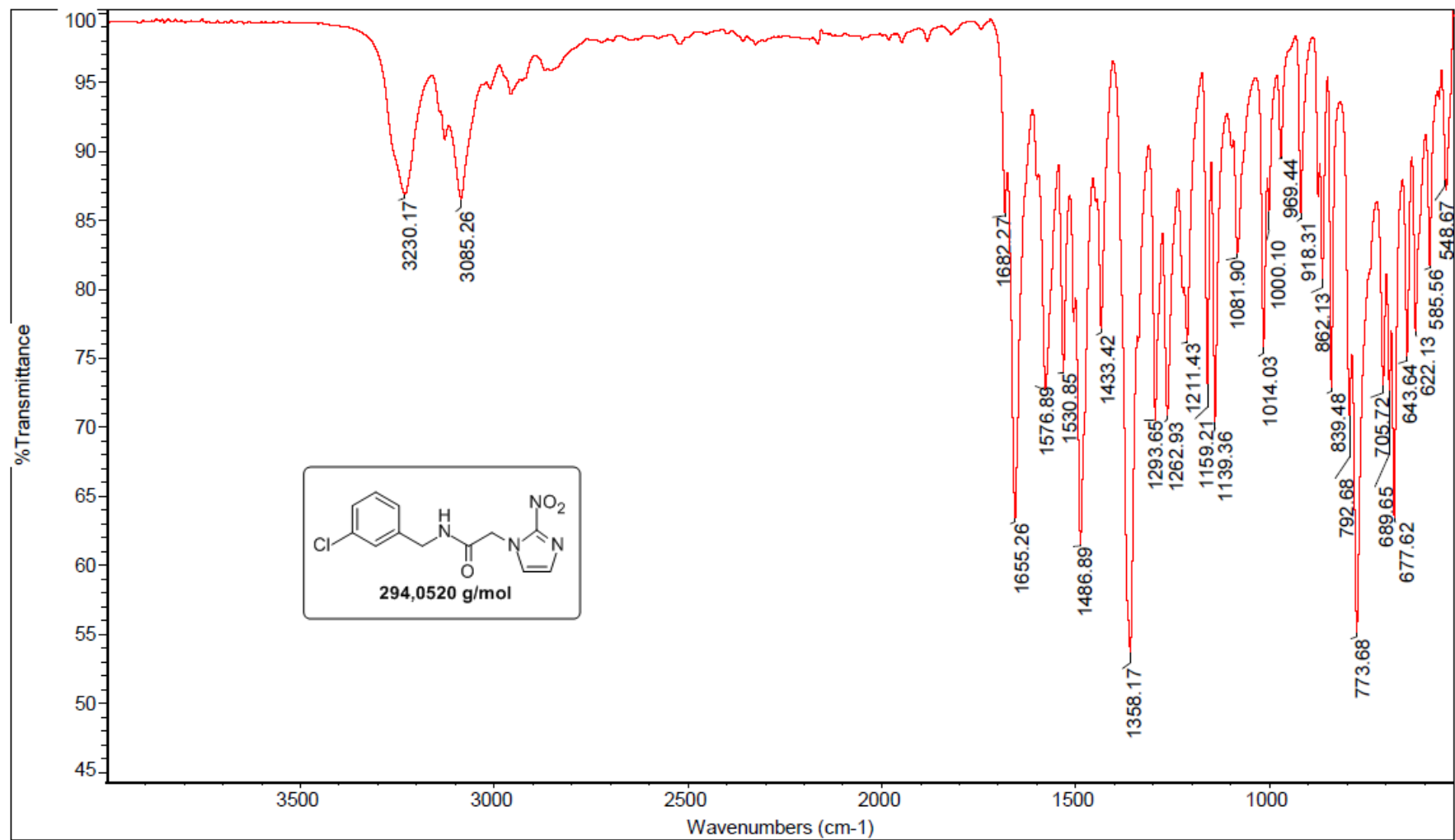


+MS, 0.1-0.9min #5-54

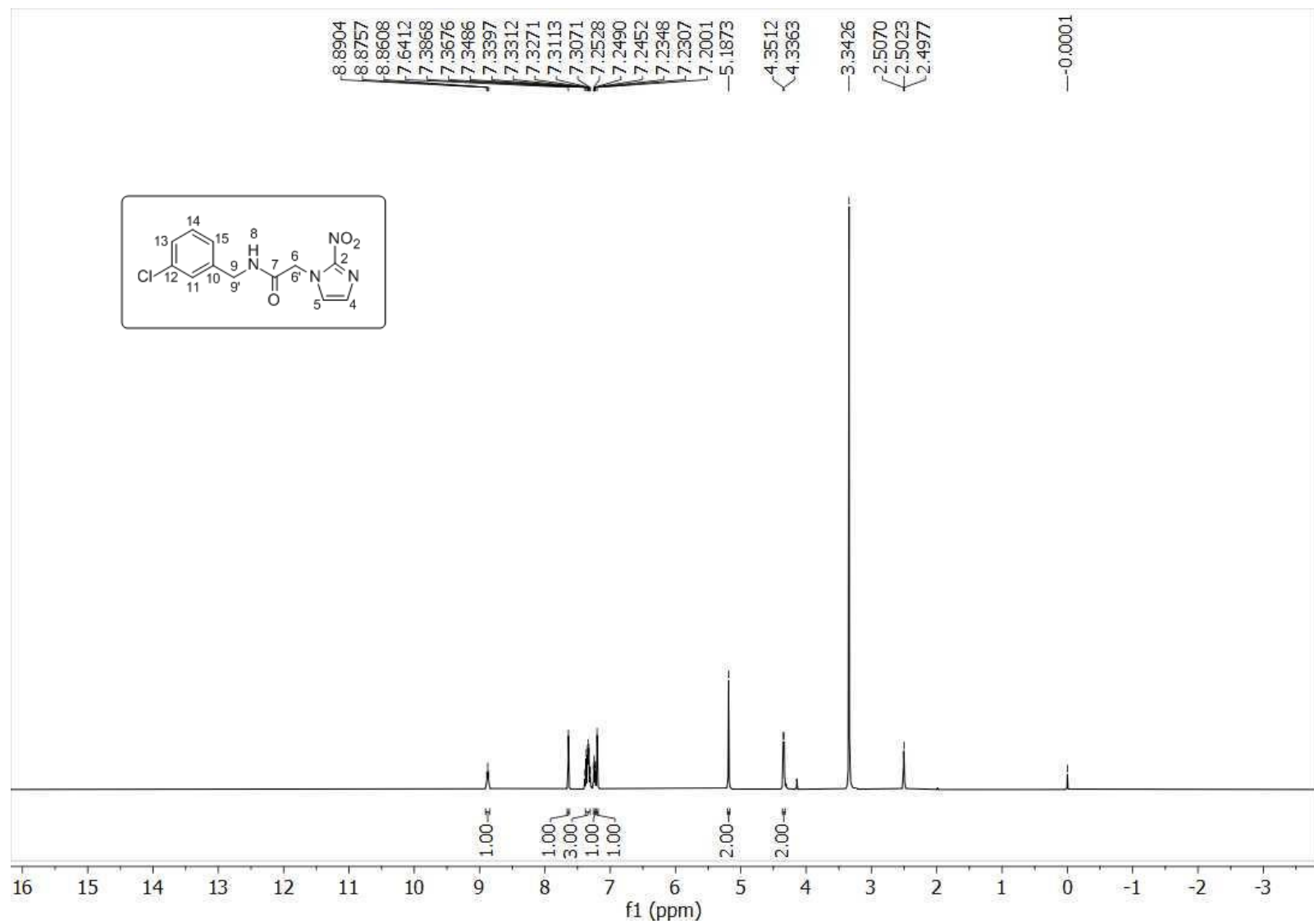


Meas. m/z # Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err rdb [ppm]	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I	Std Mean m/z	Std I VarNorm	Std m/z Diff	Std Comb Dev
317.041823 1 C ₁₂ H ₁₁ ClN ₄ NaO ₃	317.041189	-2.0	-1.9	8.5	ok even	3.6	5.5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

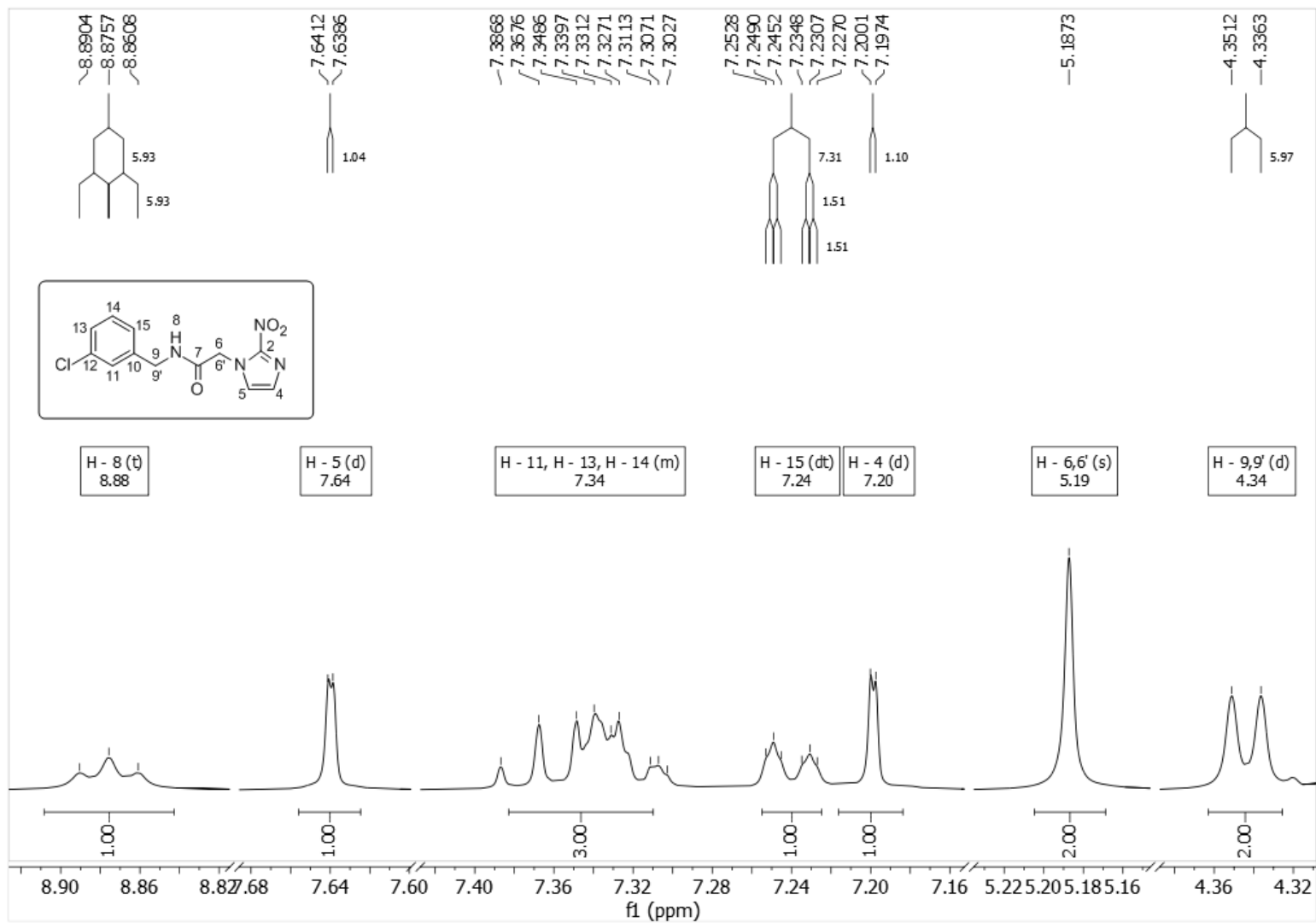
Espectro 38: Espectro de massas de alta resolução do derivado 5.



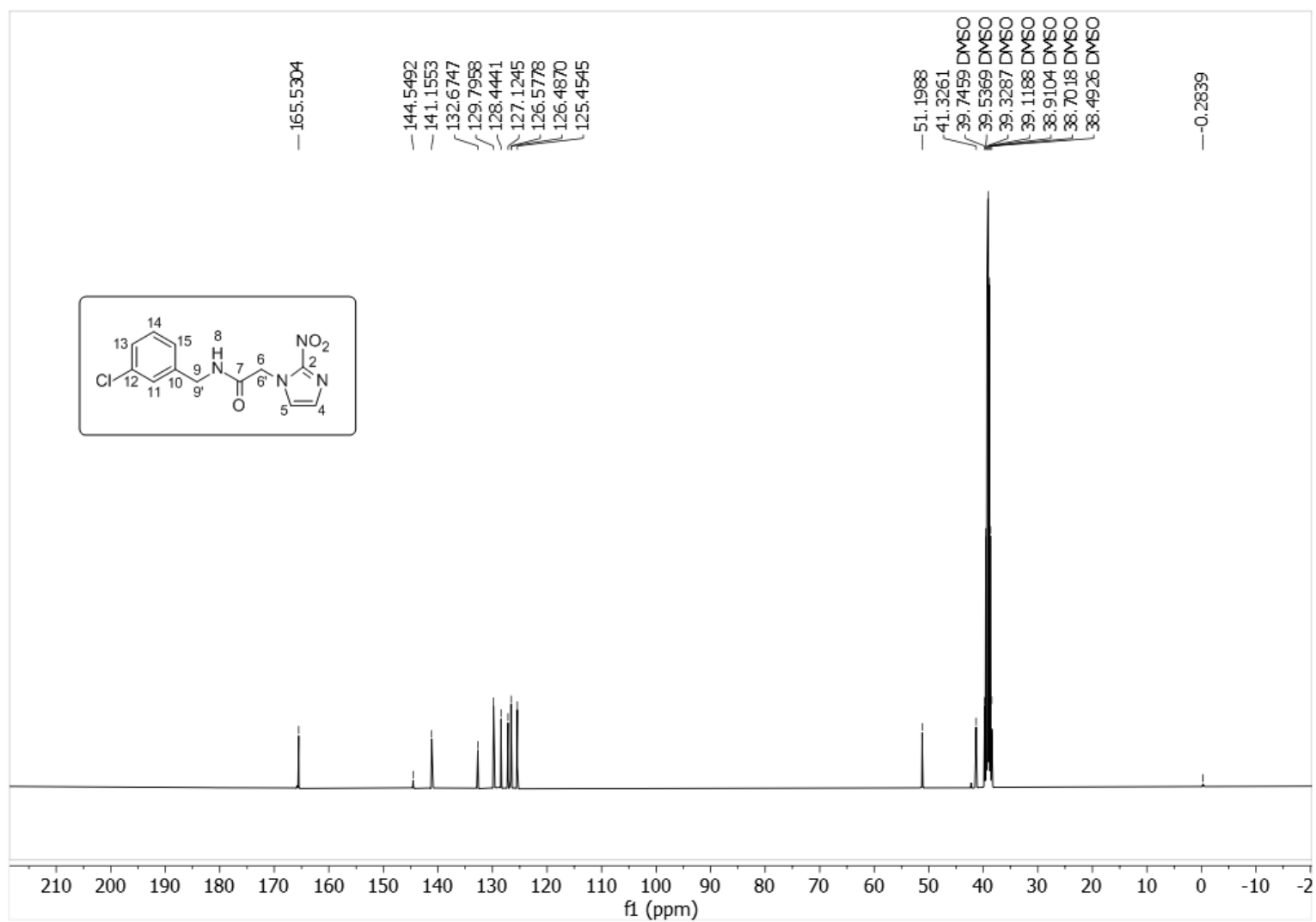
Espectro 39: Espectro de infravermelho do derivado **5**.



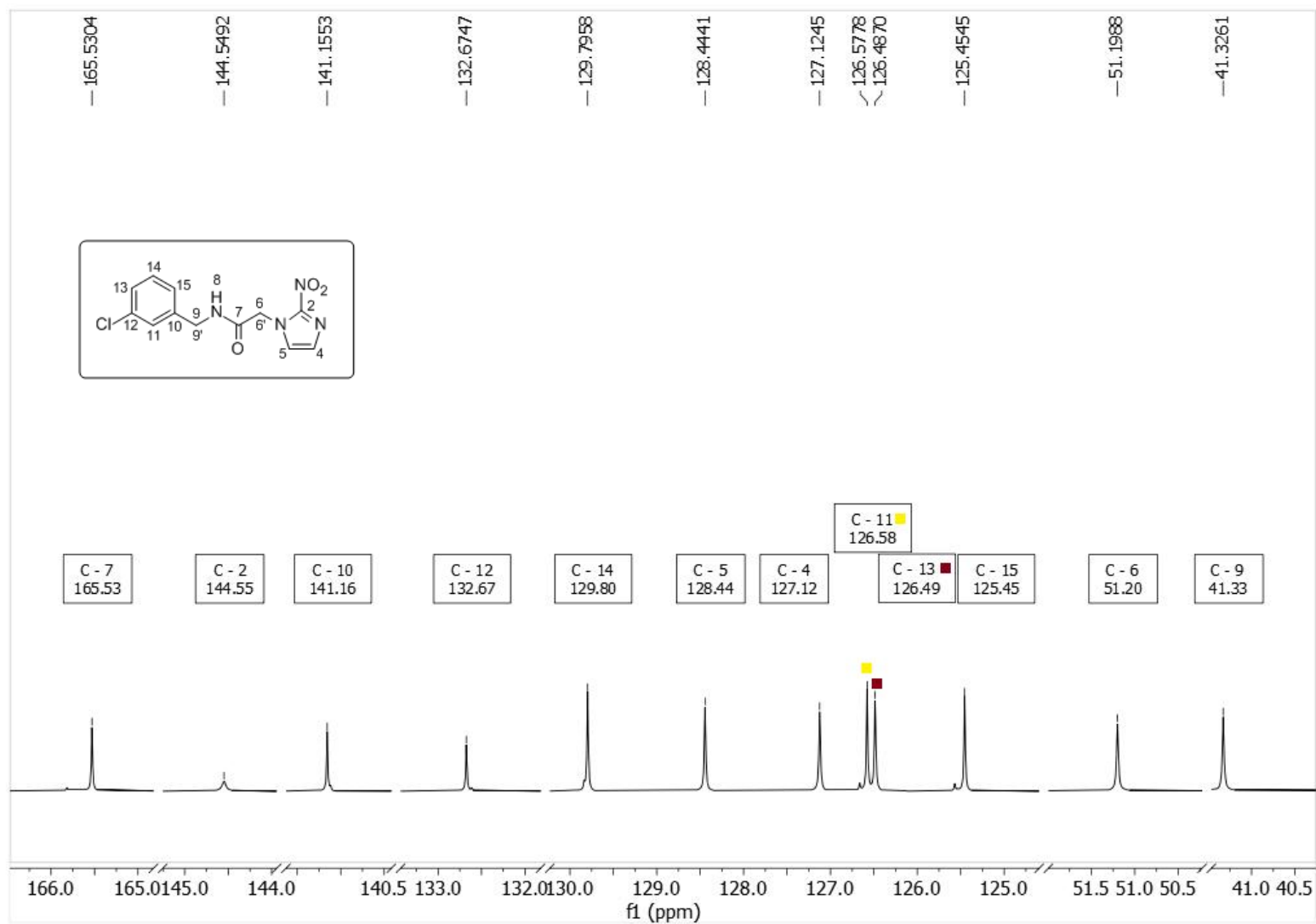
Espectro 40: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO-d_6) do derivado **5**.



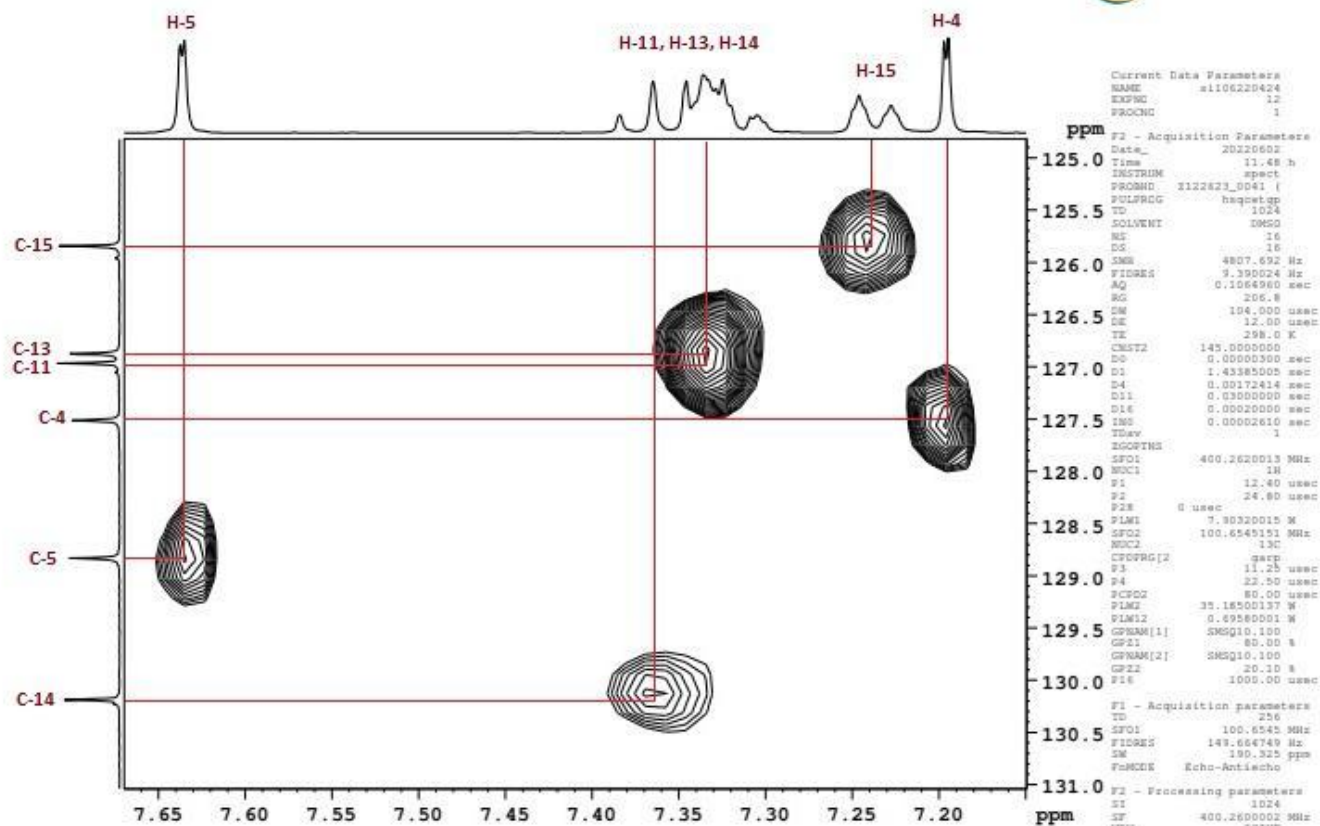
Espectro 41: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **5**.



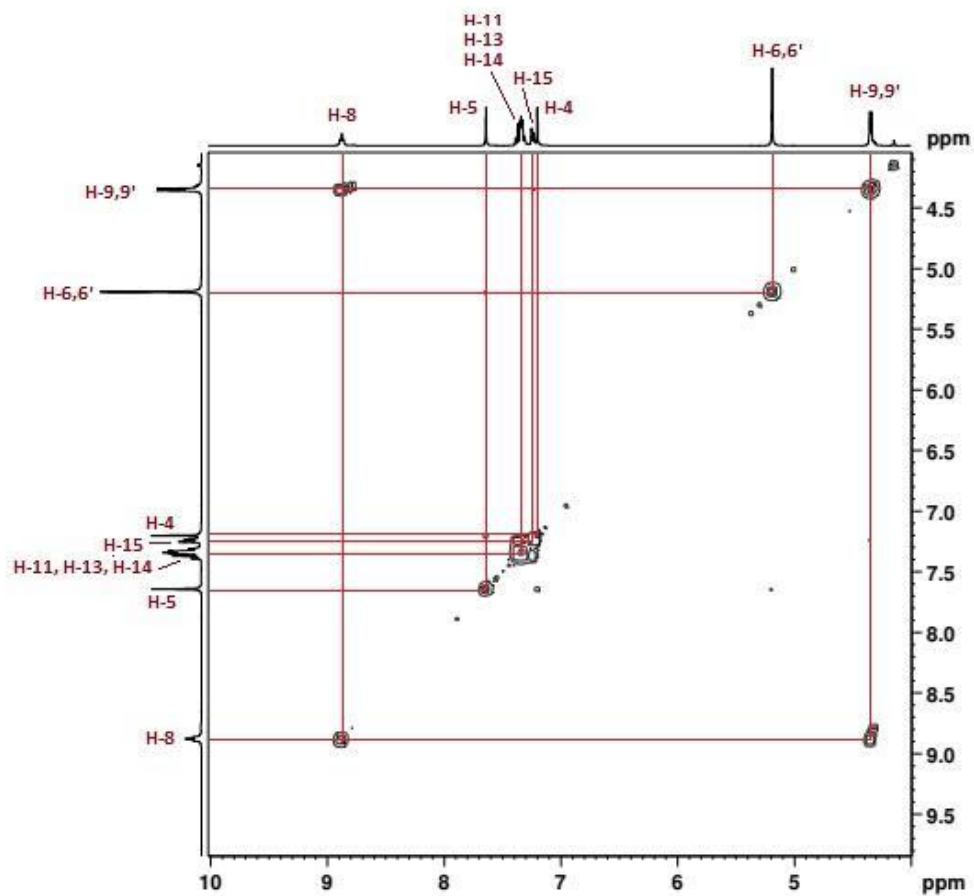
Espectro 42: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **5**.



Espectro 43: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **5**.



Espectro 44: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado **5**.



Current Data Parameters
NAME: a1105210379
EXPNO: 12
PROCNO: 1

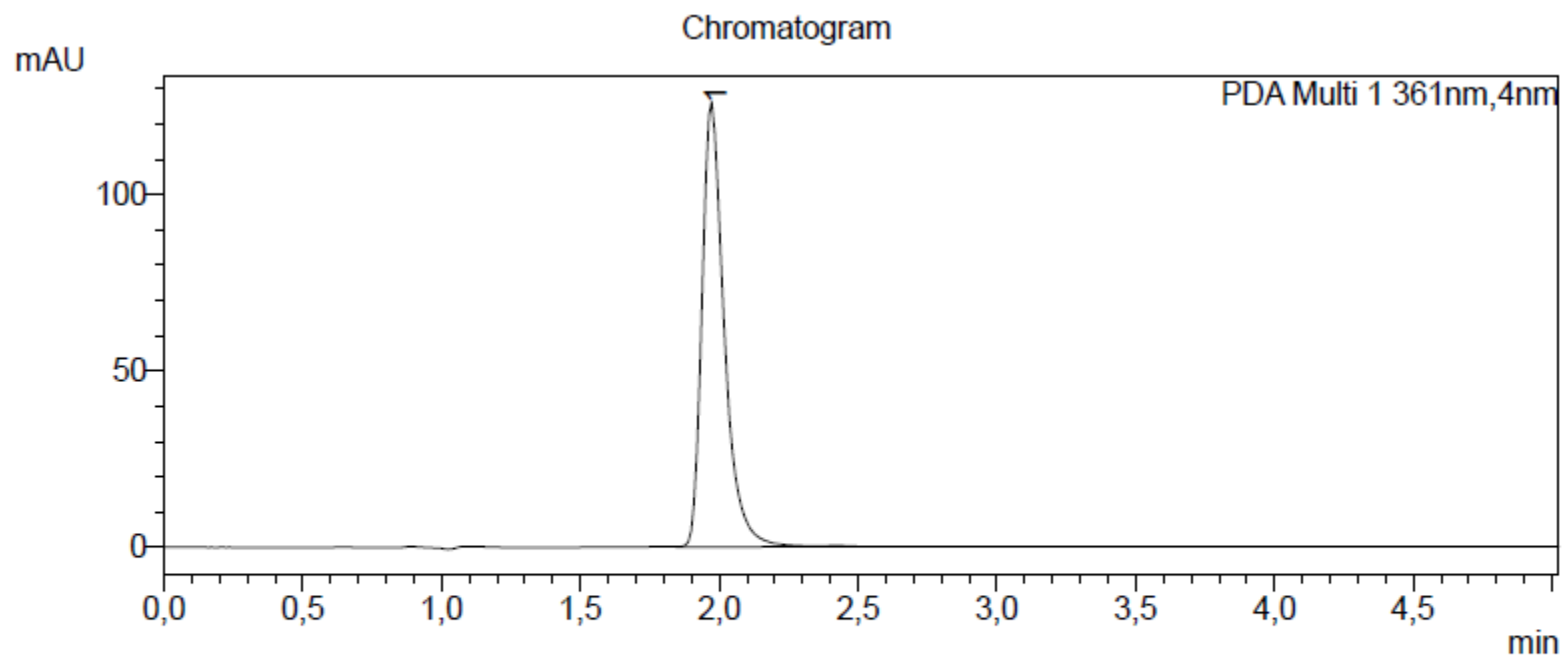
F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20210513
Time: 11:14 h
INSTRUM: spect
PROBHD: E122633_0041
PULPROG: cosyqpppgf
TD: 2648
SOLVENT: DMSO
NS: 32
DS: 8
SWH: 4807.632 Hz
FIDRES: 4.695012 Hz
AQ: 0.2129025 sec
RG: 66.74
DM: 104.000 usec
DE: 12.00 usec
TE: 298.2 K
D0: 0.0000300 sec
D1: 2.0000000 sec
D11: 0.03000000 sec
D12: 0.00002000 sec
D13: 0.00004000 sec
D16: 0.00020000 sec
END: 0.00020000 sec
TD0V: 1
SFO1: 400.2622014 MHz
NUC1: 1H
P0: 12.40 usec
P1: 12.40 usec
P17: 2500.00 usec
PLM1: 7.90320815 W
PLM10: 1.35020006 W
GPHAM[1]: SMSG10.100
GP11: 10.00 s
P16: 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD: 128
SFO1: 400.2622 MHz
FIDRES: 75.120193 Hz
SW: 12.611 ppm
PRMODE: QF

F2 - Processing parameters
SI: 3274
SF: 400.2600000 MHz
WDW: Q613KE
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.40

F1 - Processing parameters
SI: 3274
MC2: QF
SF: 400.2600000 MHz
WDW: Q613KE
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0

Espectro 45: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 5.

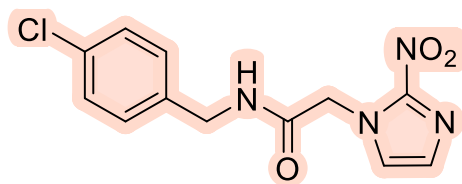


Peak Table

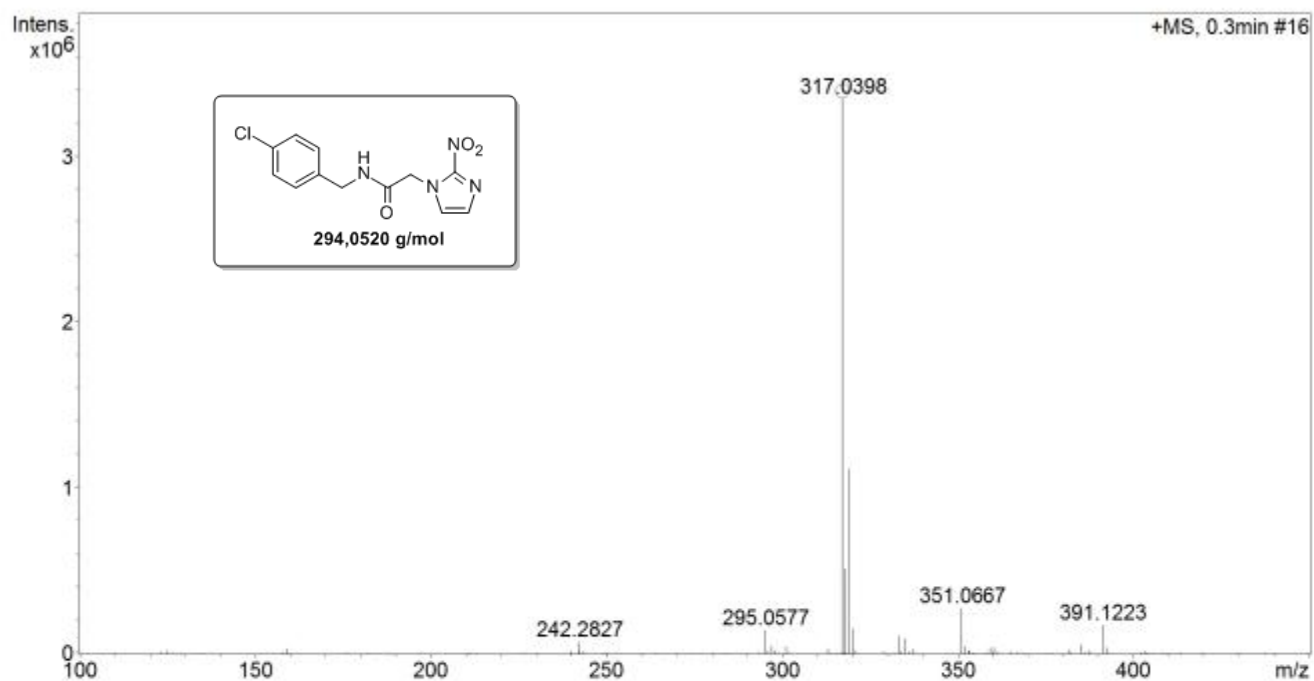
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,97		705253	100,0	15588	1,442	—	—
Total			705253	100,0				

Cromatograma 5: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **5**.

N-(4-clorobenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (6)

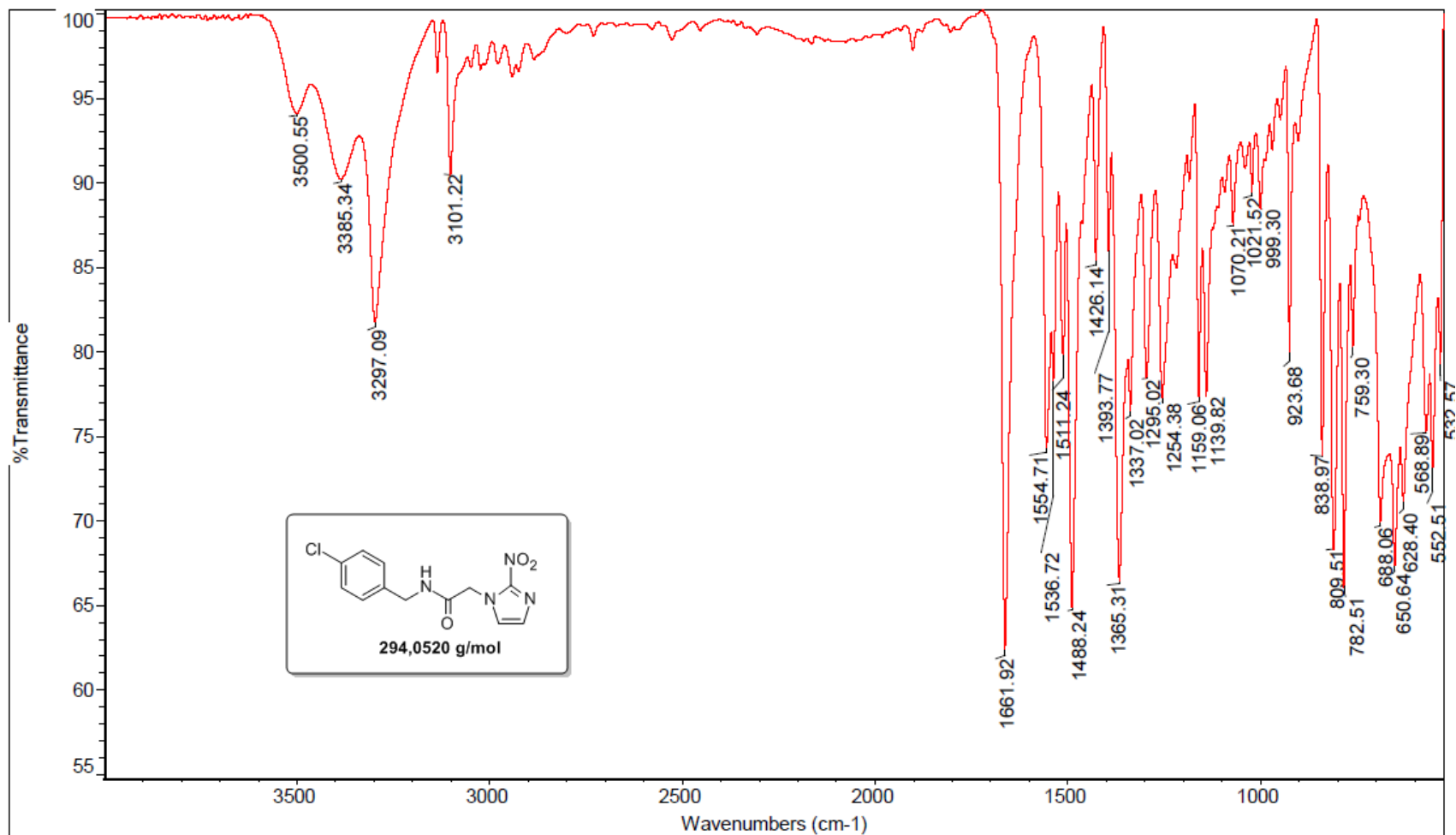


+MS, 0.3min #16

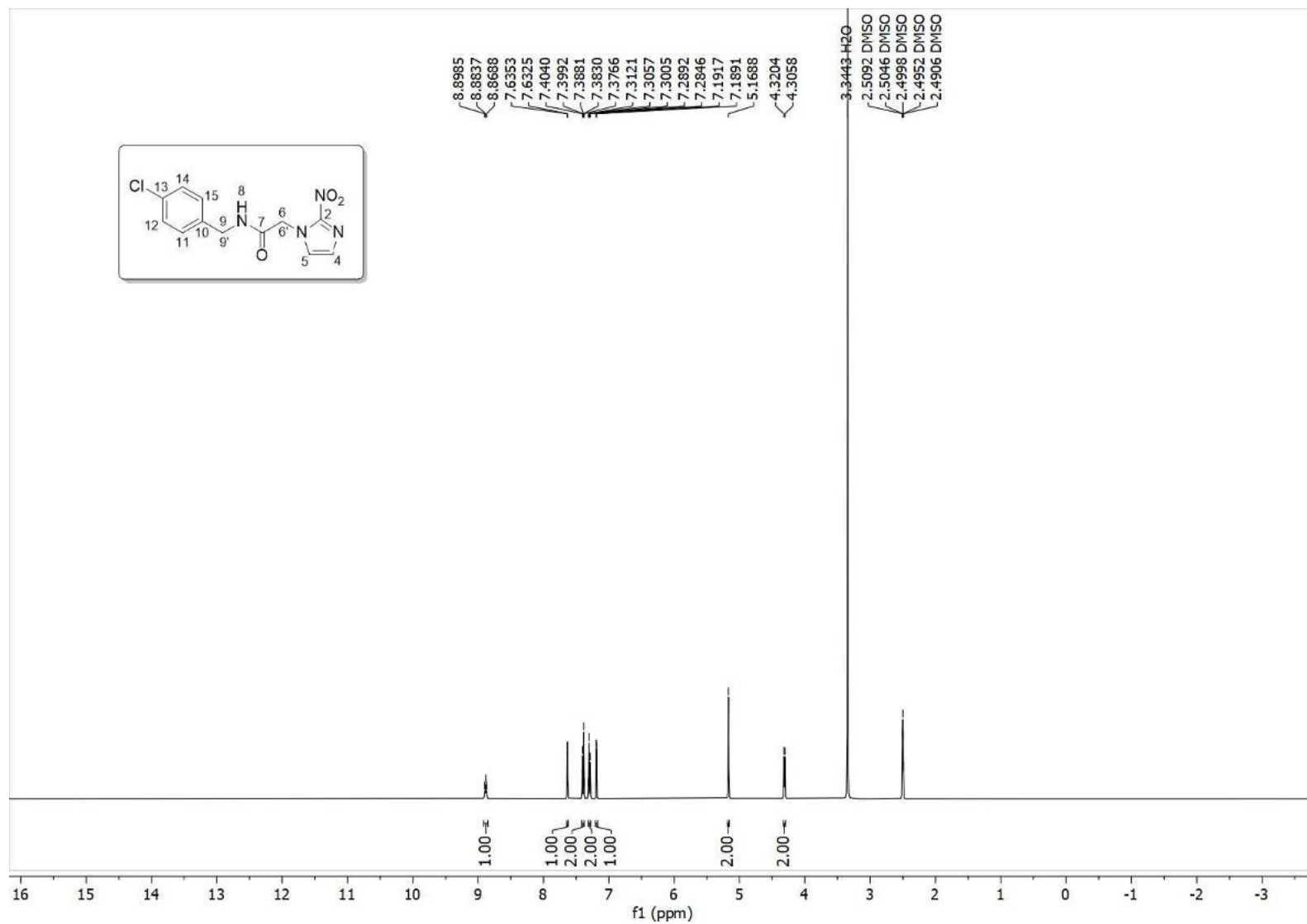


Meas. m/z	# Ion	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdB	N-Rule	e ⁻	Conf	mSigma	Std I	Std Mean m/z	Std I VarNorm	Std m/z Diff	Std Comb Dev
317.039763	1	C12H11ClN4NaO3	317.041189	4.5	4.7	8.5	ok	even		3.3	4.3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	2	C8H7ClN10NaO	317.038503	-4.0	-5.3	9.5	ok	even		14.3	23.3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	3	C11H15ClNaO7	317.039851	0.3	1.4	3.5	ok	even		15.1	22.6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

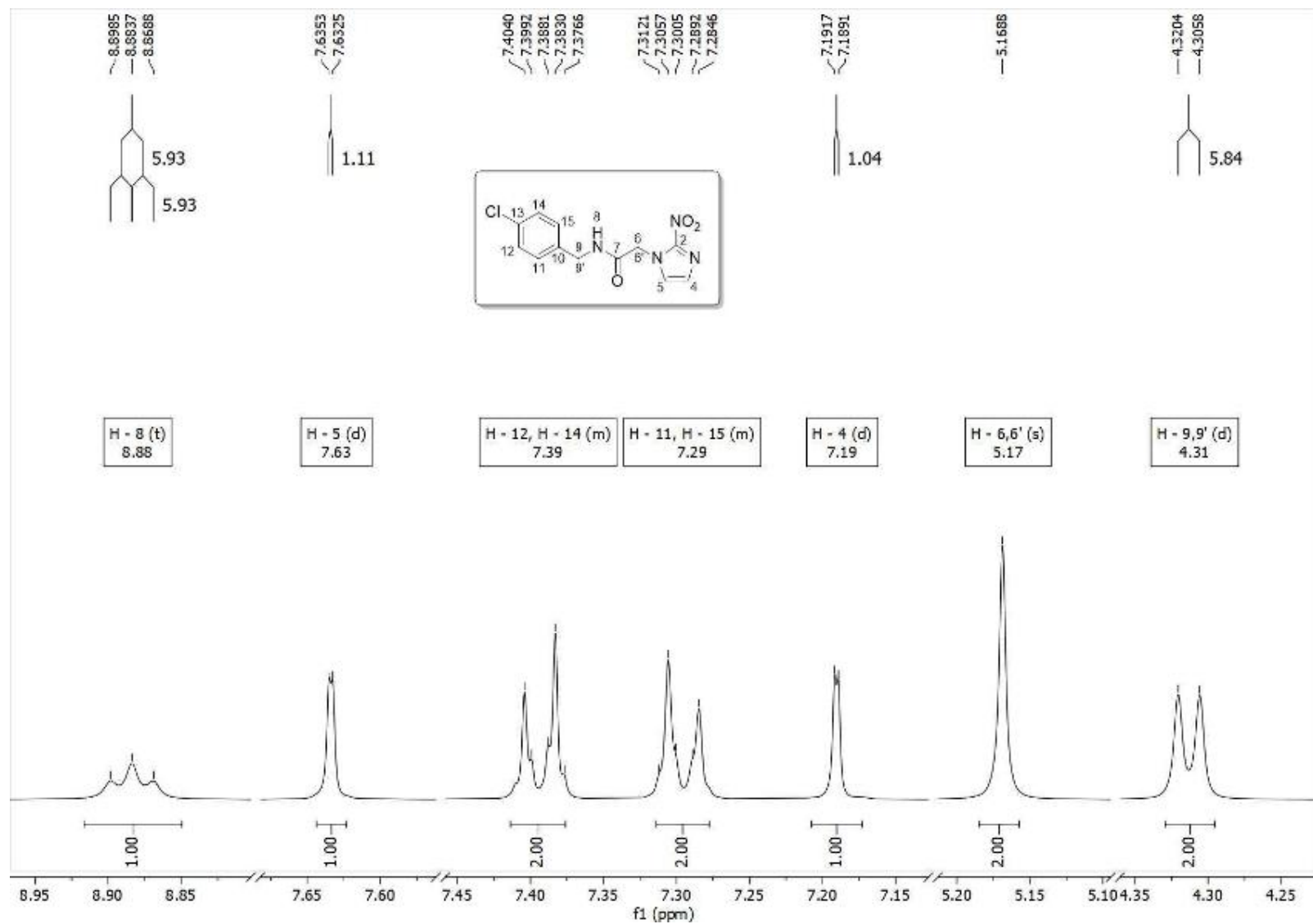
Espectro 46: Espectro de massas de alta resolução do derivado 6.



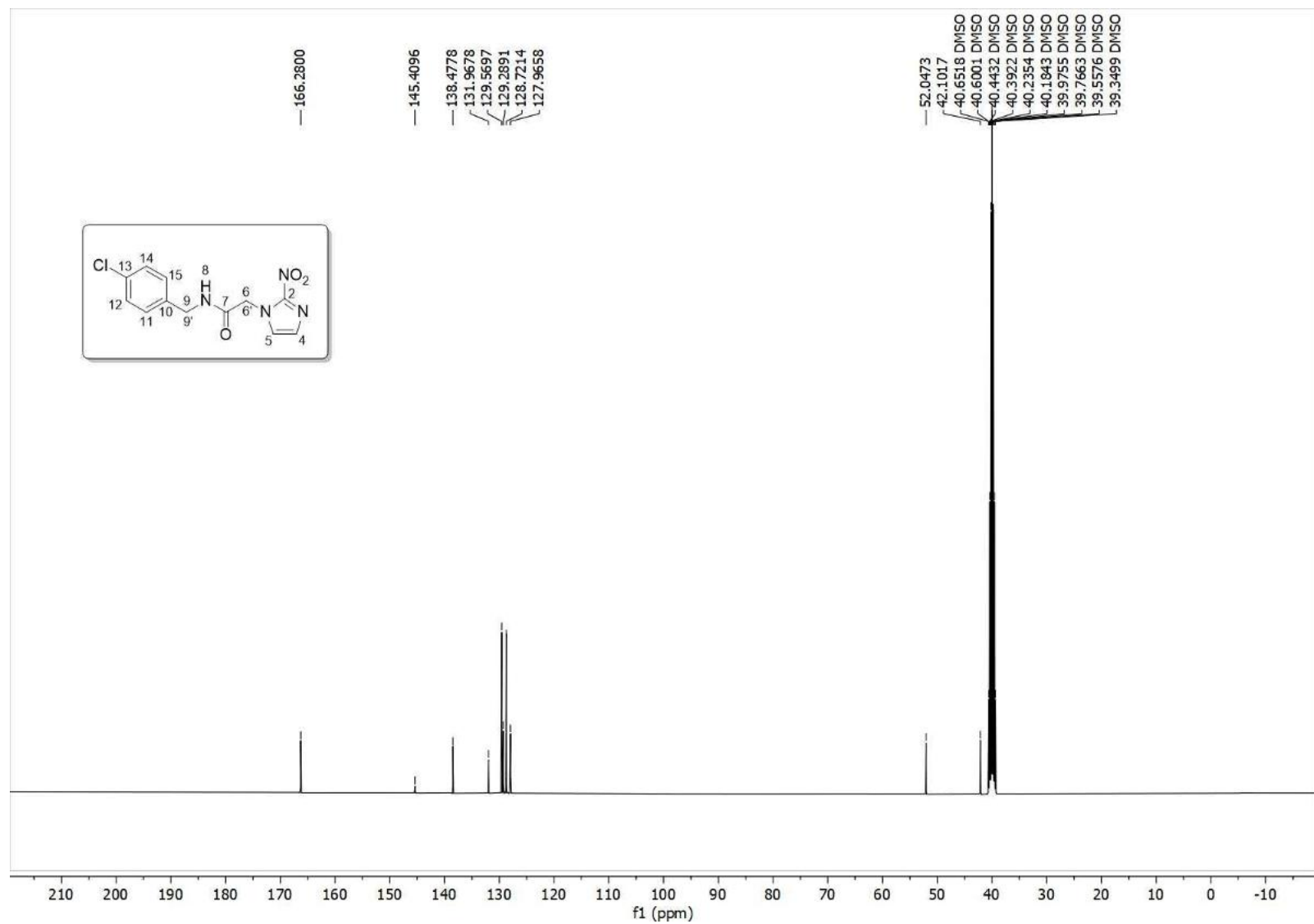
Espectro 47: Espectro de infravermelho do derivado 6.



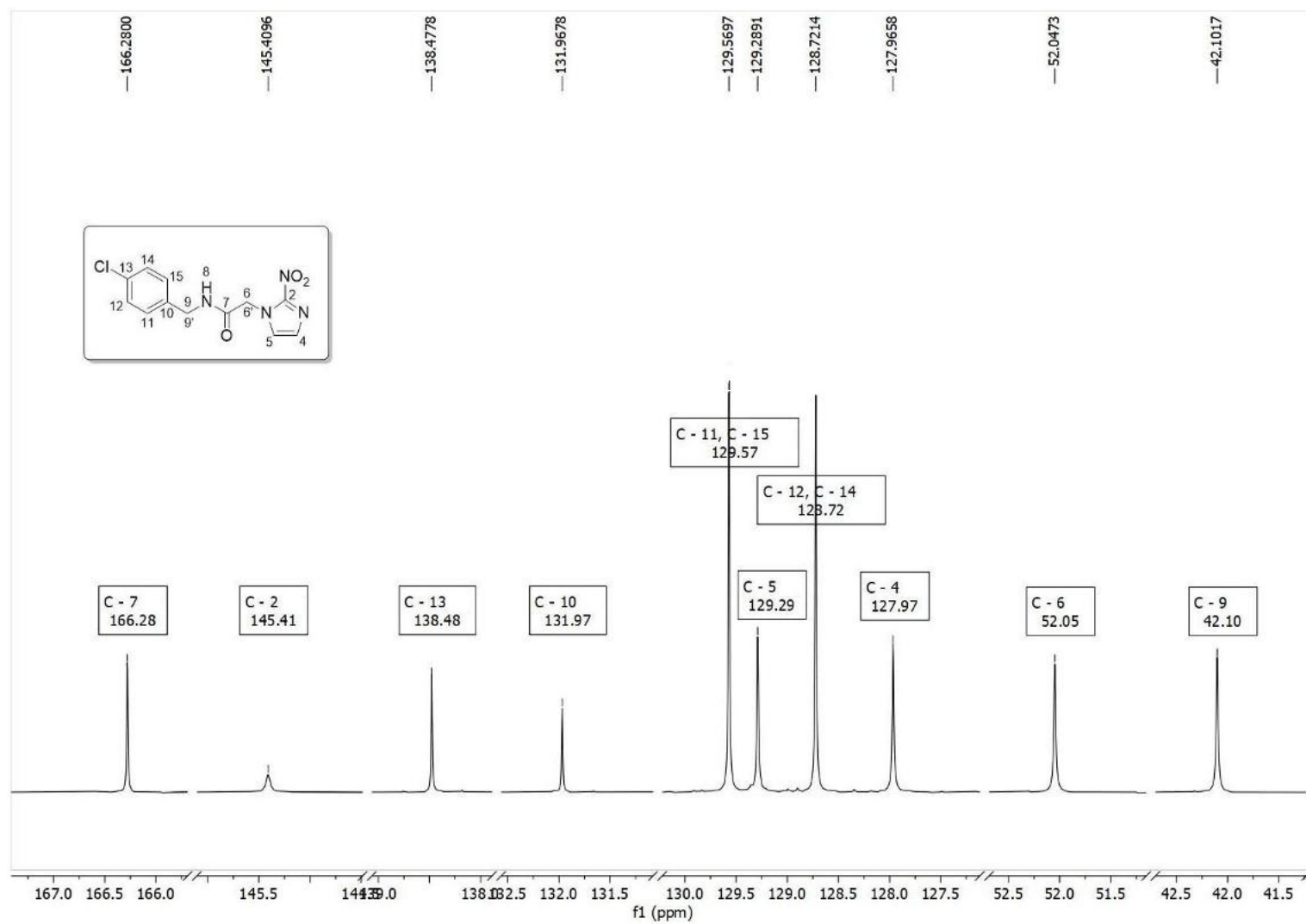
Espectro 48: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **6**.



Espectro 49: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado 6.

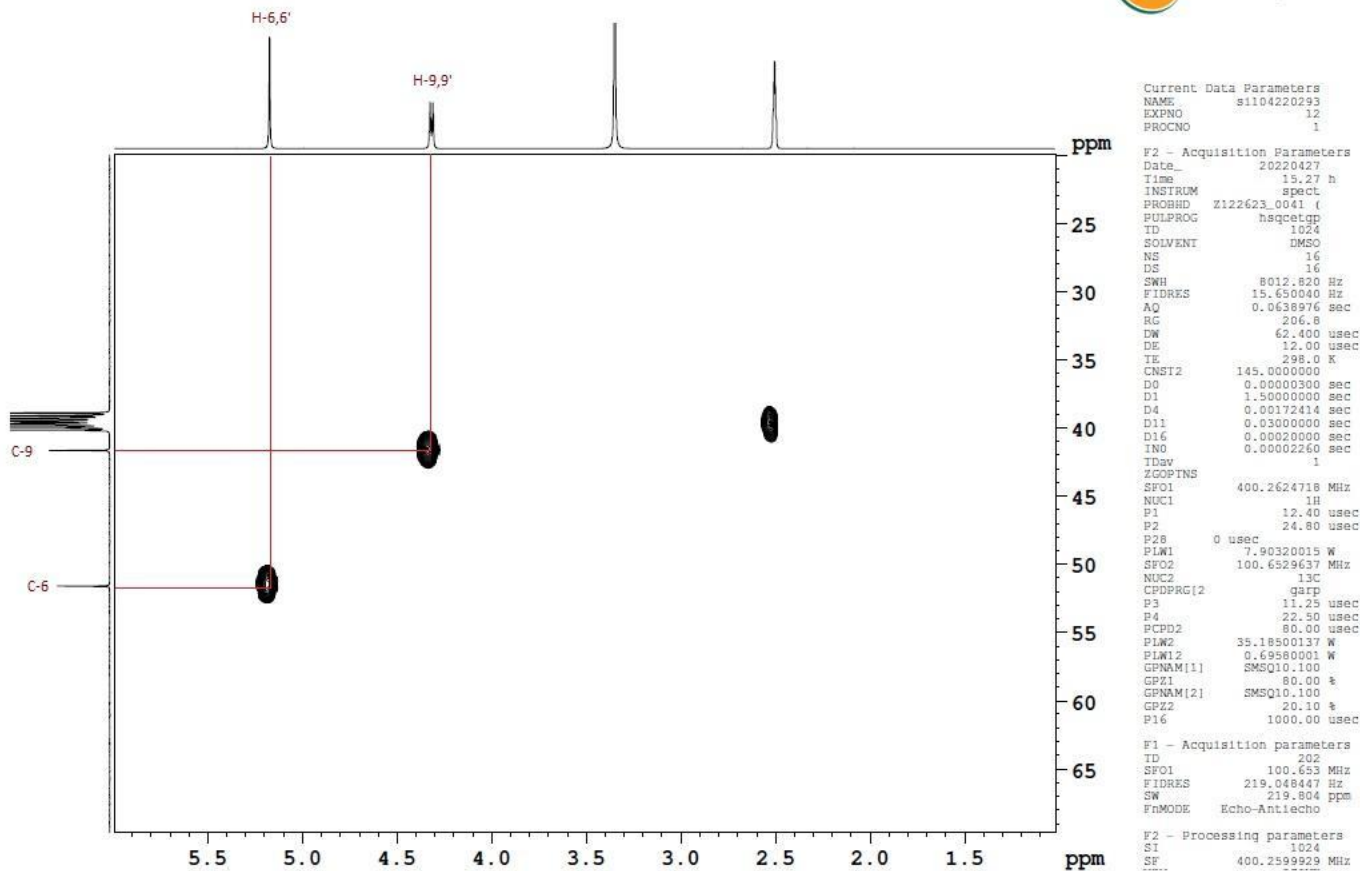


Espectro 50: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado 6.

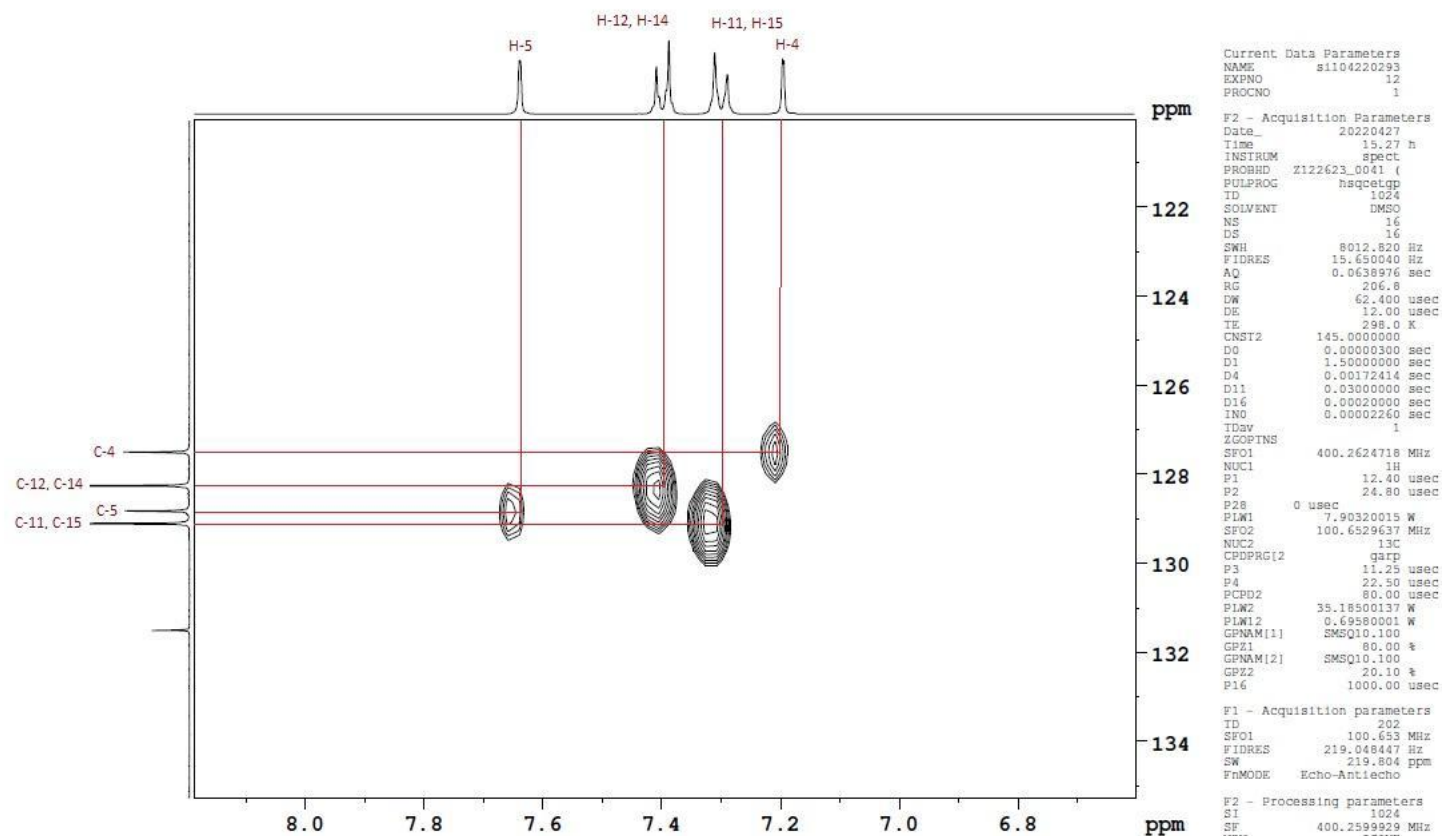


Espectro 51: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado 6.

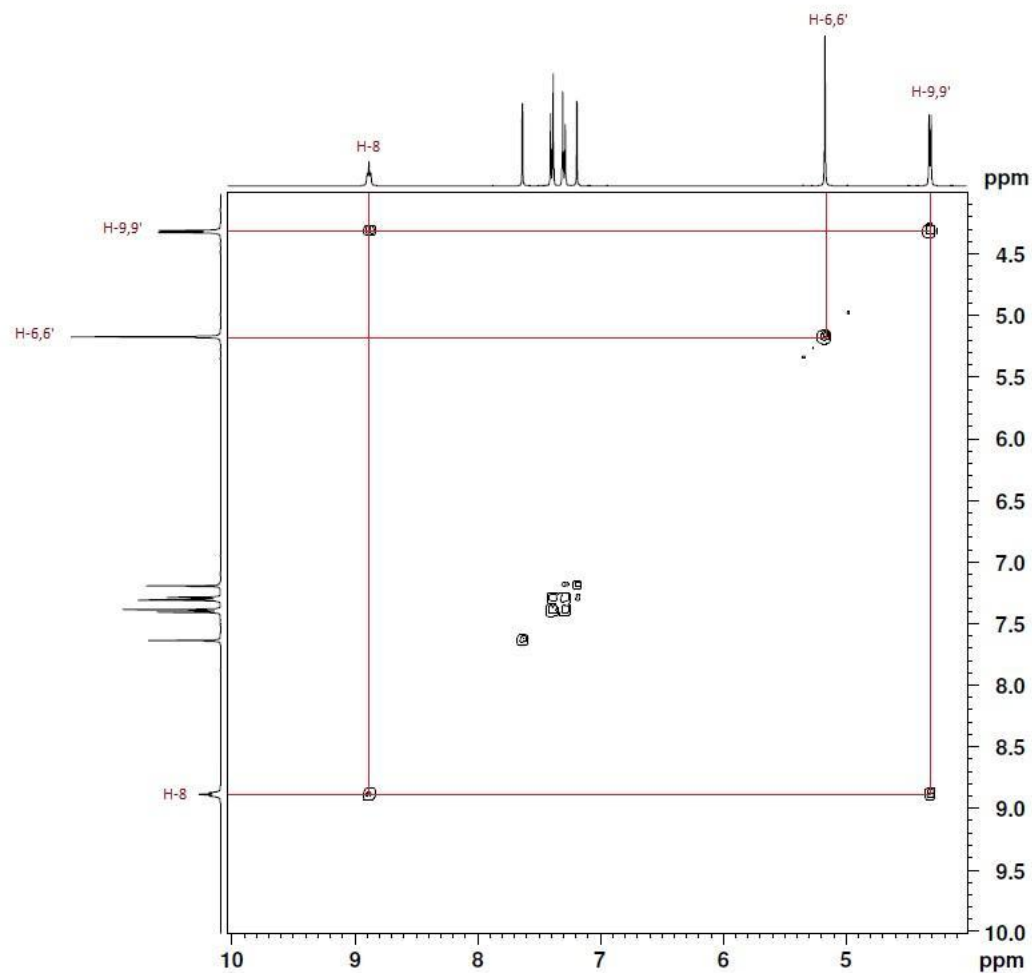
PCCN 007-22 - Cheyene
Op. Criseli



Espectro 52: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 6.



Espectro 53: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 6.



Current Data Parameters
NAME s1104220293
EXPNO 13
PROCNO 1

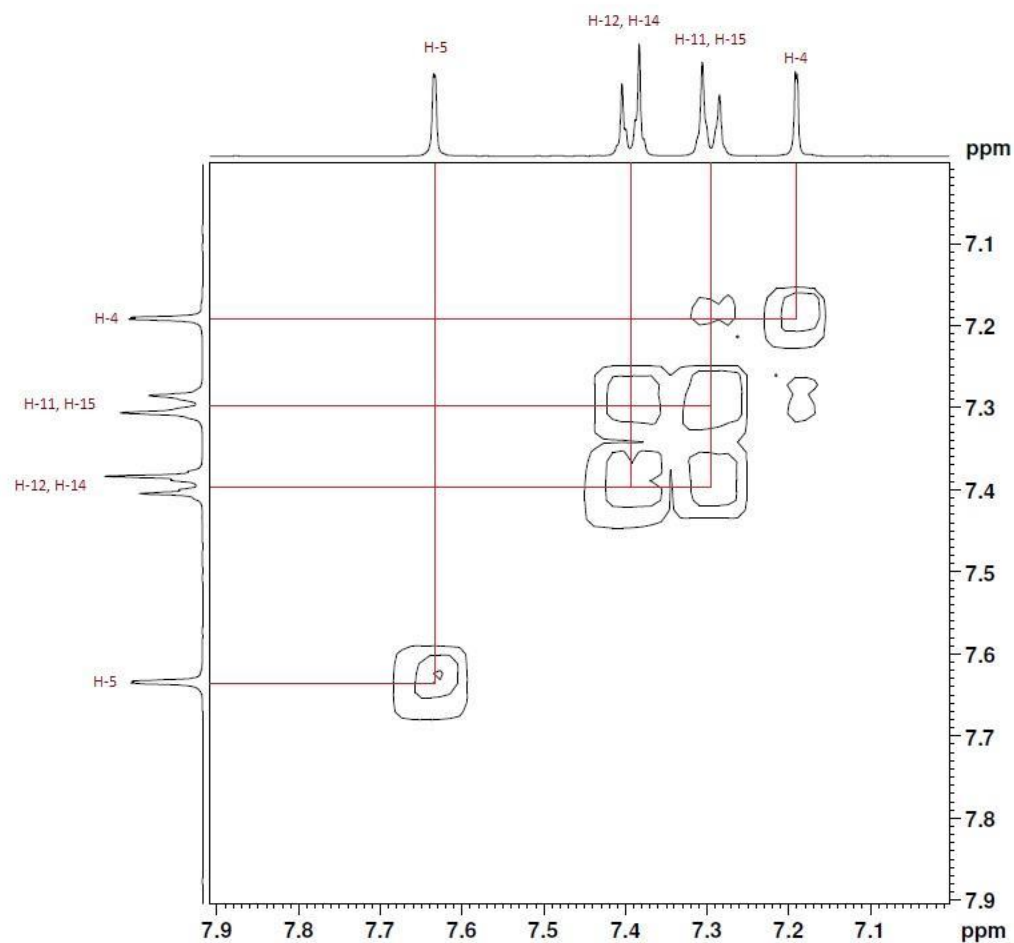
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20220428
Time 1.16 h
INSTRUM spect
PROBHD Z122623_0041 (
PULPROG cosygpppqf
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 64
DS 8
SWH 4807.692 Hz
FIDRES 4.695012 Hz
AQ 0.2129920 sec
RG 66.74
DW 104.000 usec
DE 12.00 usec
TE 298.0 K
DO 0.00000300 sec
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00002000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
INO 0.00020800 sec
TDev 1
SFO1 400.2622014 MHz
NUC1 1H
PD 12.40 usec
P1 12.40 usec
P17 2500.00 usec
PLW1 7.90320019 W
PLW10 1.35020006 W
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 128
SFO1 400.2622 MHz
FIDRES 75.120193 Hz
SW 12.011 ppm
F2MODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.2600000 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 400.2600000 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Espectro 54: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 6.



Current Data Parameters
NAME si104220293
EXPNO 13
PROCNO 1

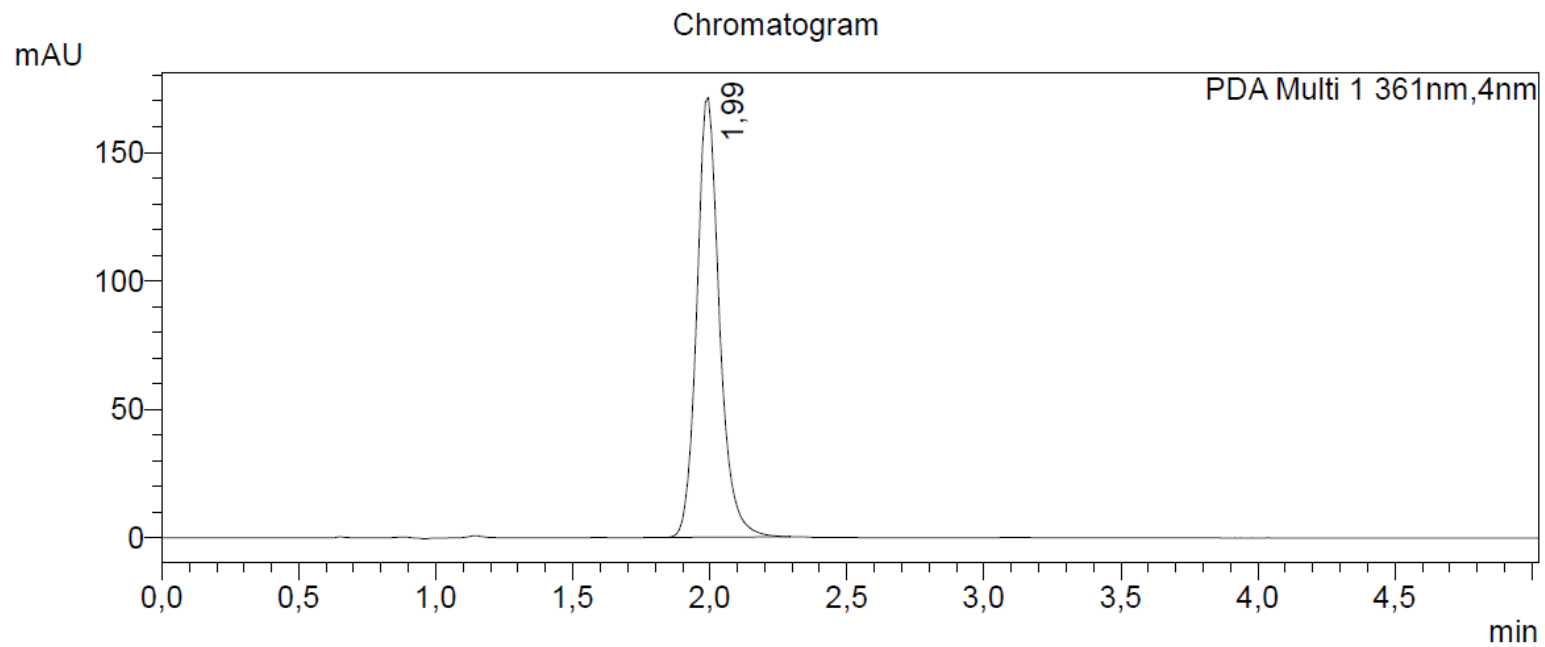
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20220428
Time 1.16 h
INSTRUM spect
PROBHD Z122623_0041 (
PULPROG cosygpgpgf
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 64
DS 8
SWH 4807.692 Hz
FIDRES 4.695012 Hz
AQ 0.2129920 sec
RG 66.74
DW 104.000 usec
DE 12.00 usec
TE 298.0 K
DO 0.00000300 sec
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00002000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
INO 0.00020800 sec
TDev
SFO1 400.2622014 MHz
NUC1 1H
PO 12.40 usec
P1 12.40 usec
P17 2500.00 usec
PLW1 7.90320015 W
PLW10 1.35020006 W
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 128
SFO1 400.2622 MHz
FIDRES 75.120193 Hz
SW 12.011 ppm
F2MODE QS

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.2600000 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QS
SF 400.2600000 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Espectro 55: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 6.

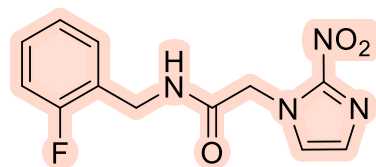


Peak Table

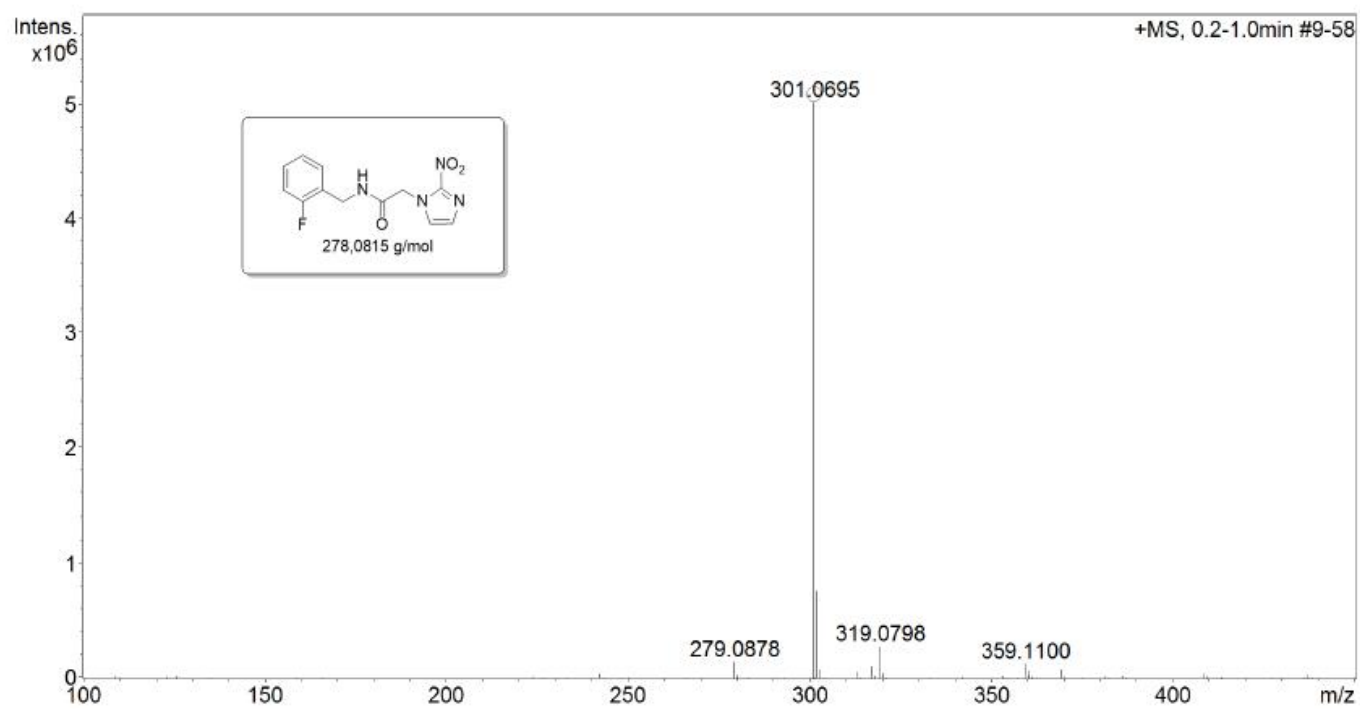
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,99		985367	100,0	14683	1,173	--	--
Total			985367	100,0				

Cromatograma 6: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **6**.

N-(2-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (7)

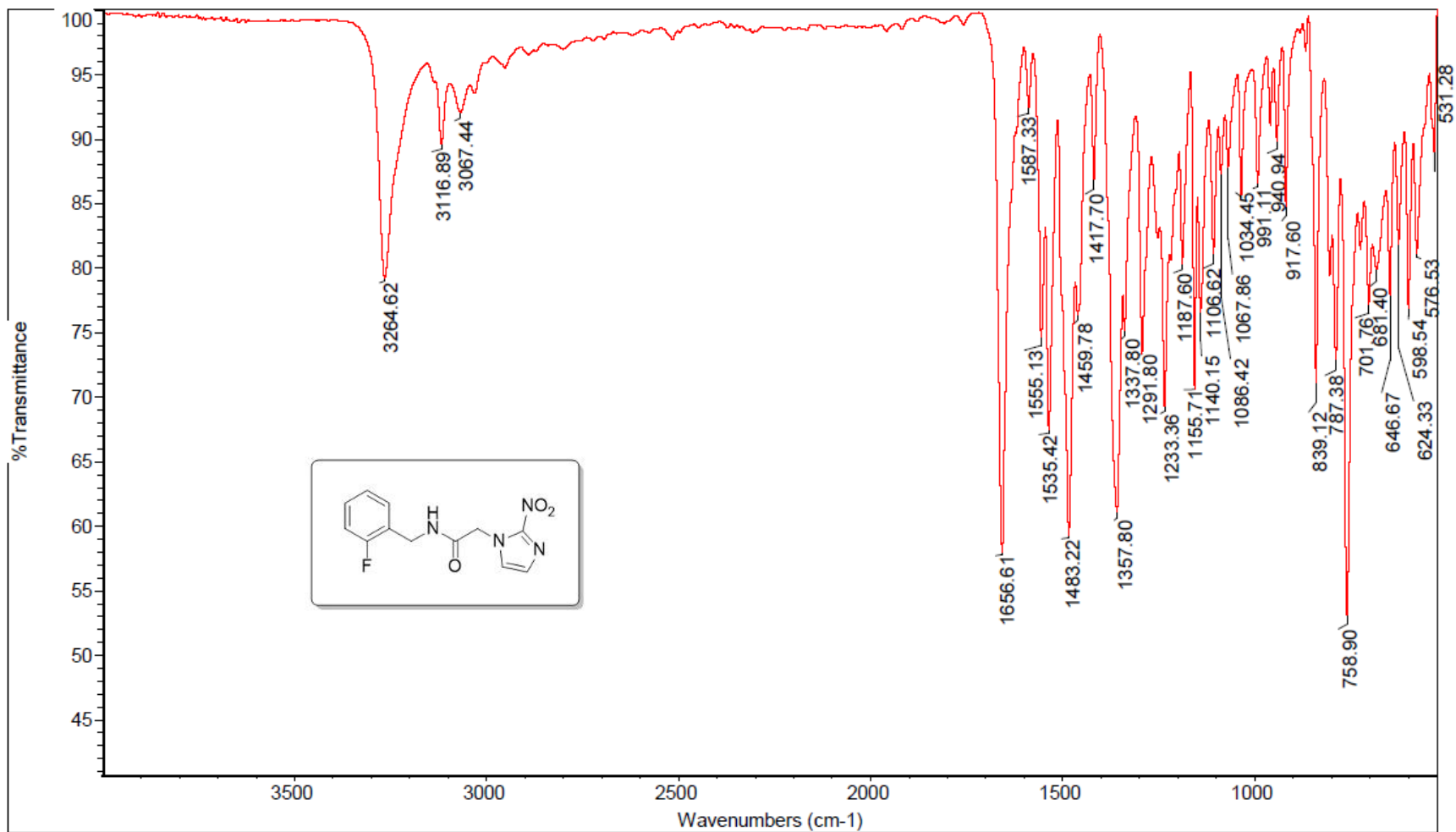


+MS, 0.2-1.0min #9-58

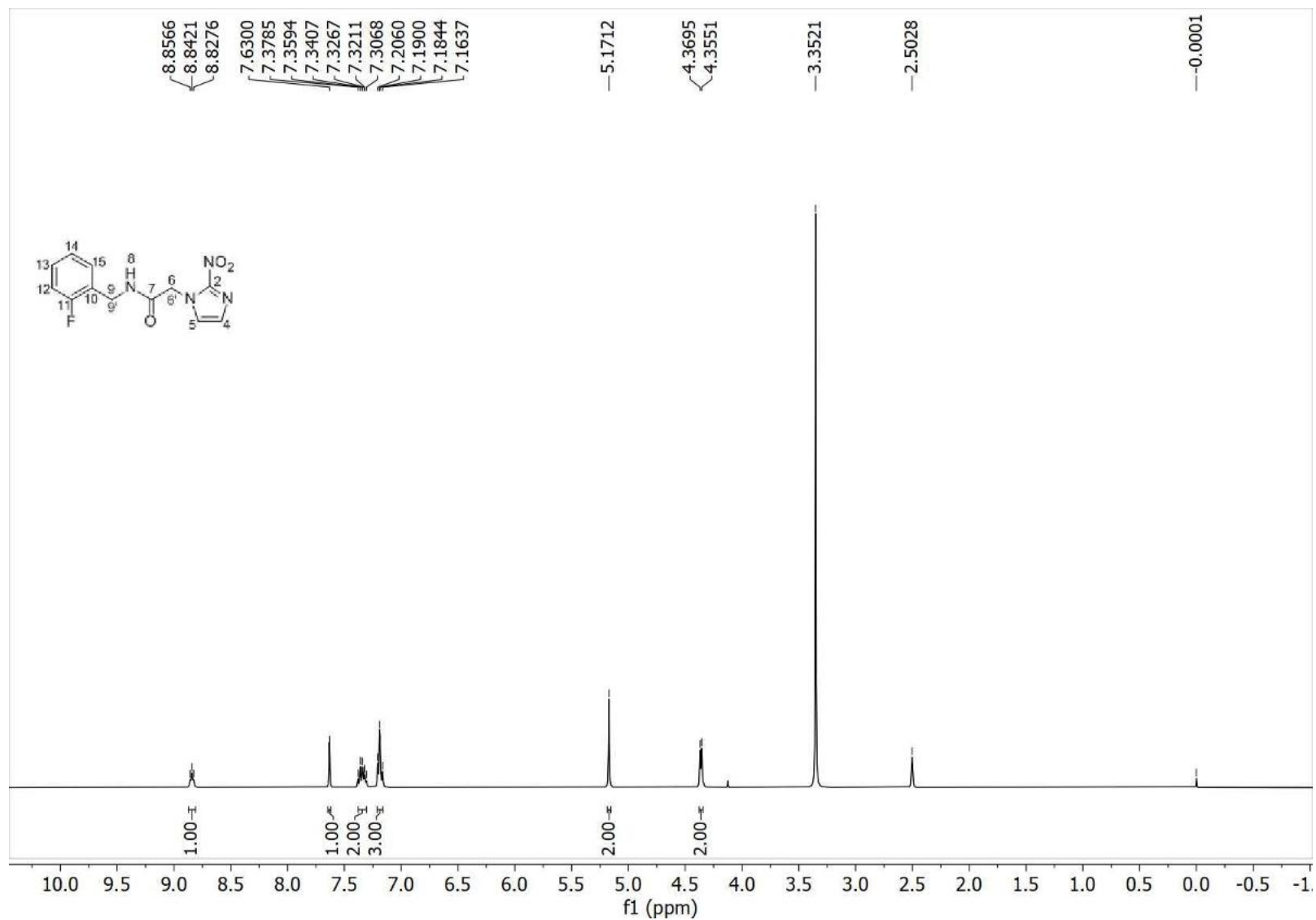


Meas. m/z # Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err rdb [ppm]	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I	Std	Mean m/z	Std I	Std m/z	Diff	Std Comb Dev
301.069519 1 C ₁₂ H ₁₁ FN ₄ NaO ₃	301.070739	4.1	4.8	8.5	ok even	2.6	4.2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2 C ₁₁ H ₁₅ FN ₄ O ₇	301.069402	-0.4	0.9	3.5	ok even	16.5	27.7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

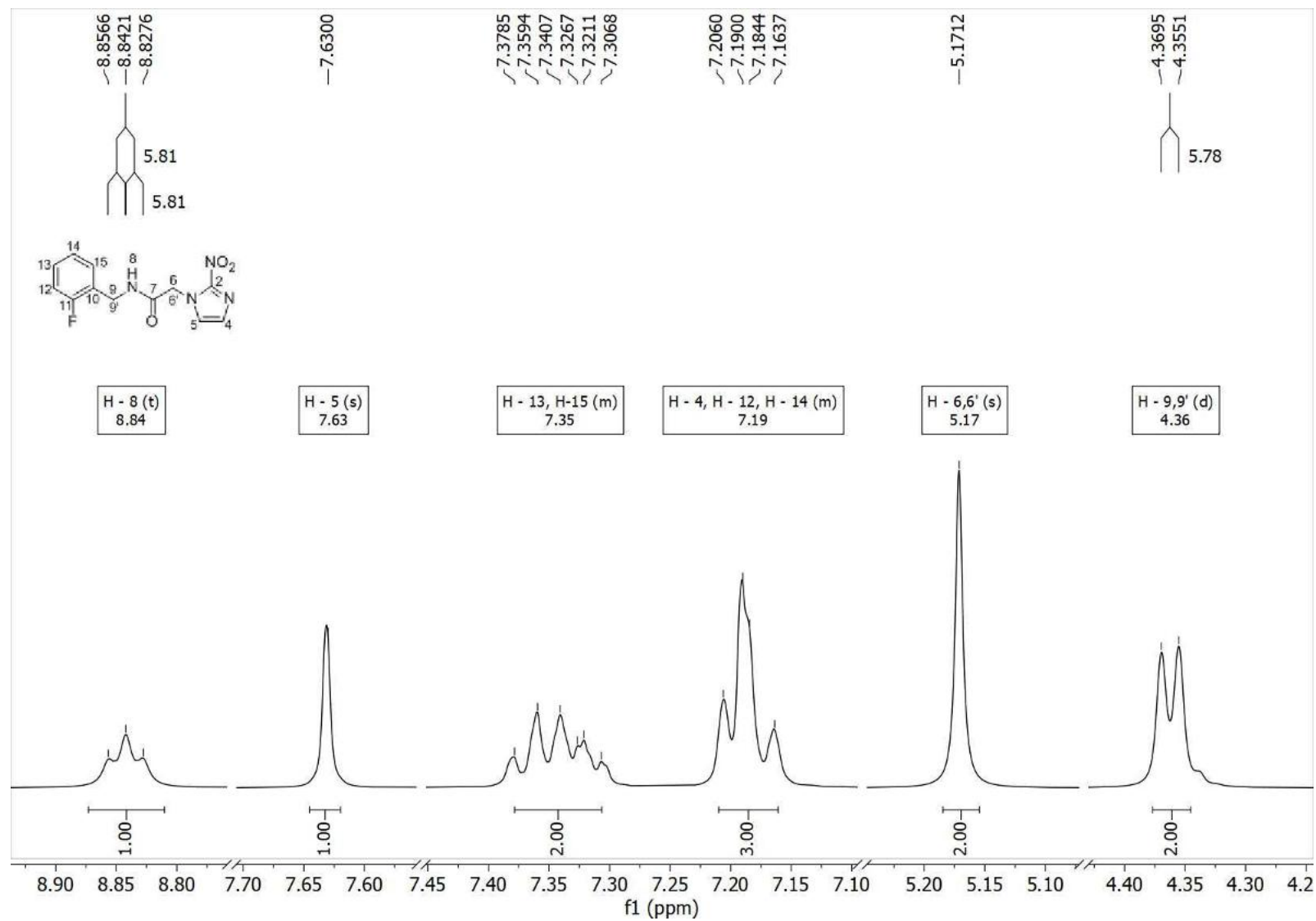
Espectro 56: Espectro de massas de alta resolução do derivado 7.



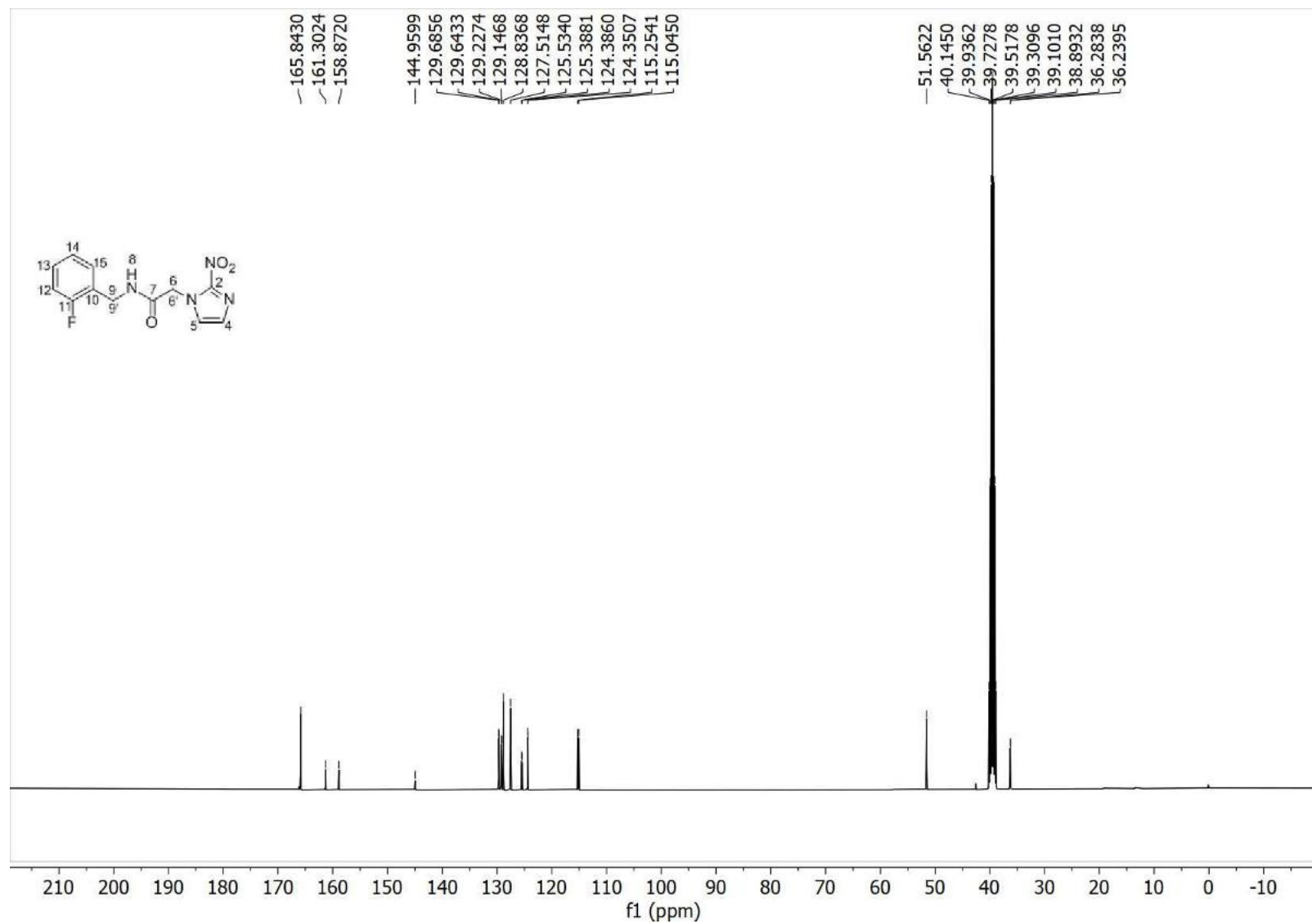
Espectro 57: Espectro de infravermelho do derivado 7.



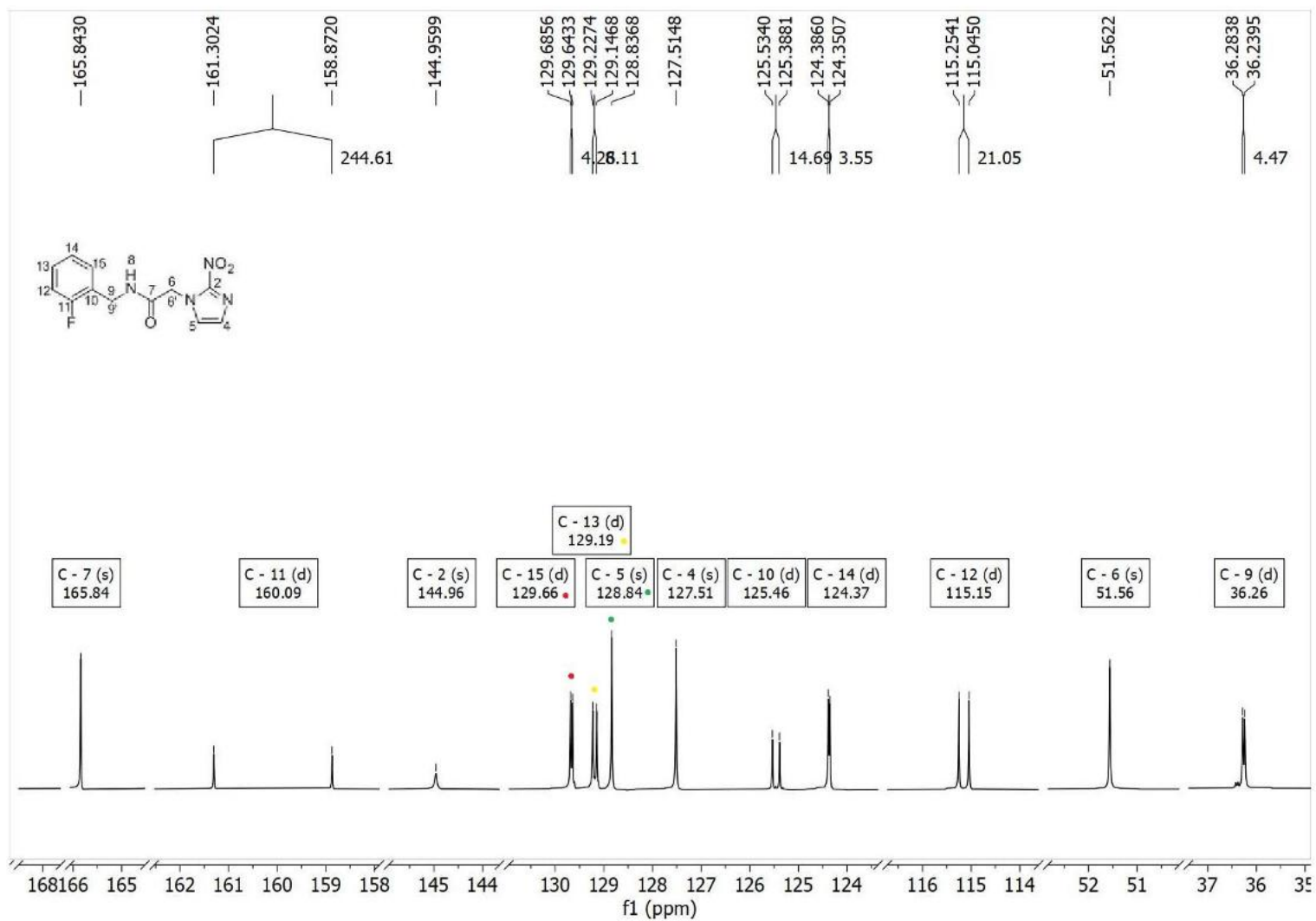
Espectro 57: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado 7.



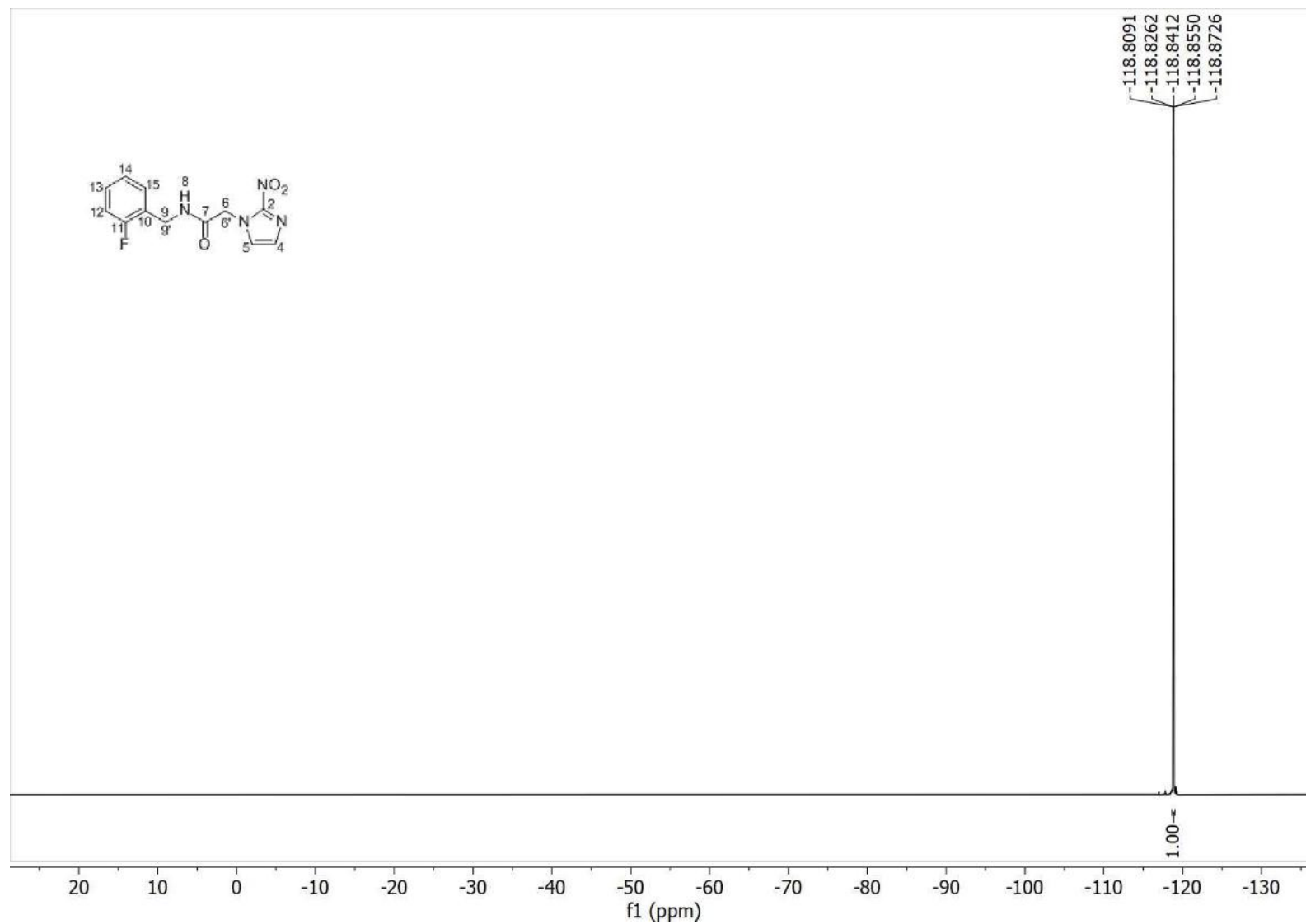
Espectro 58: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado 7.



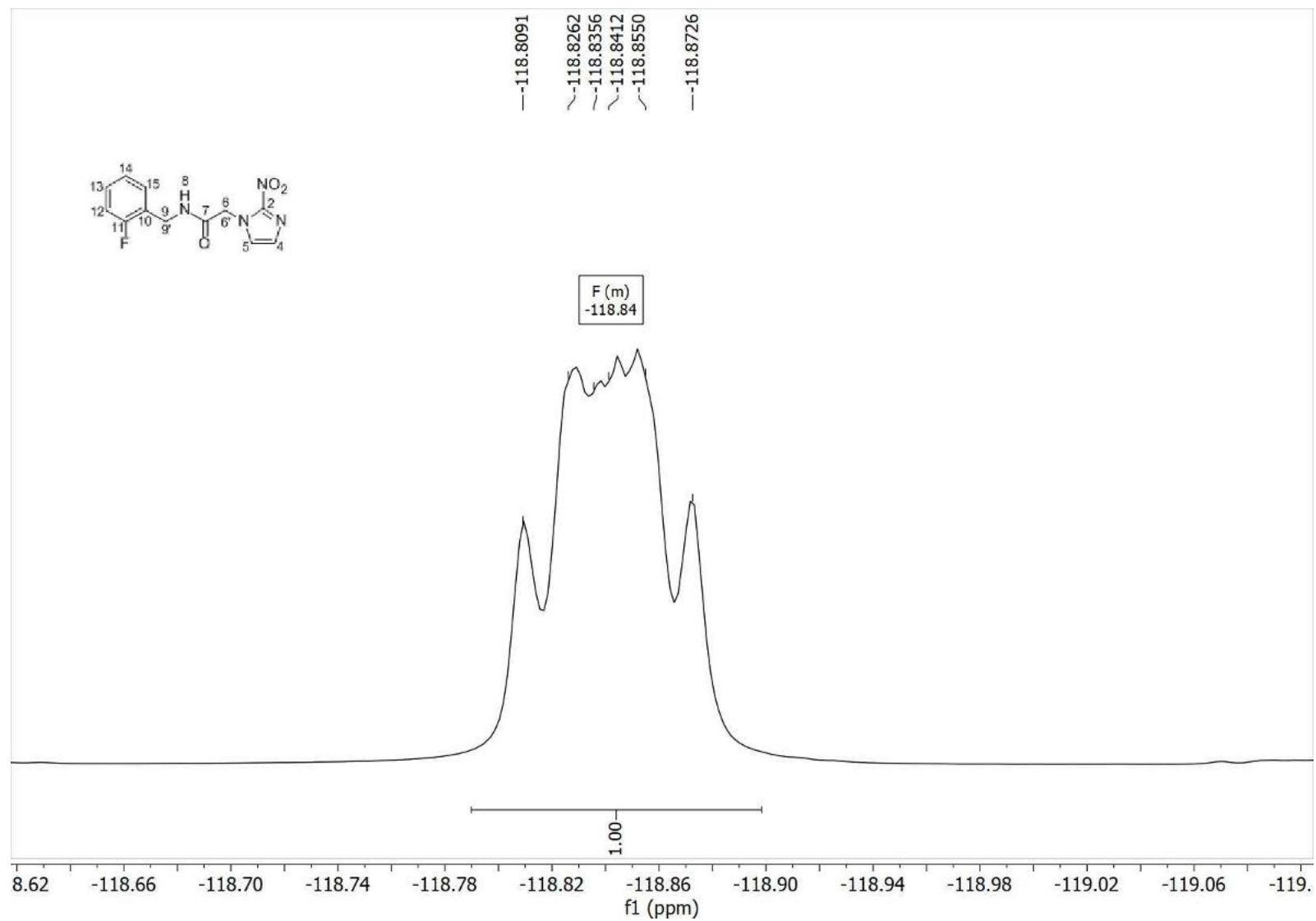
Espectro 59: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado 7.



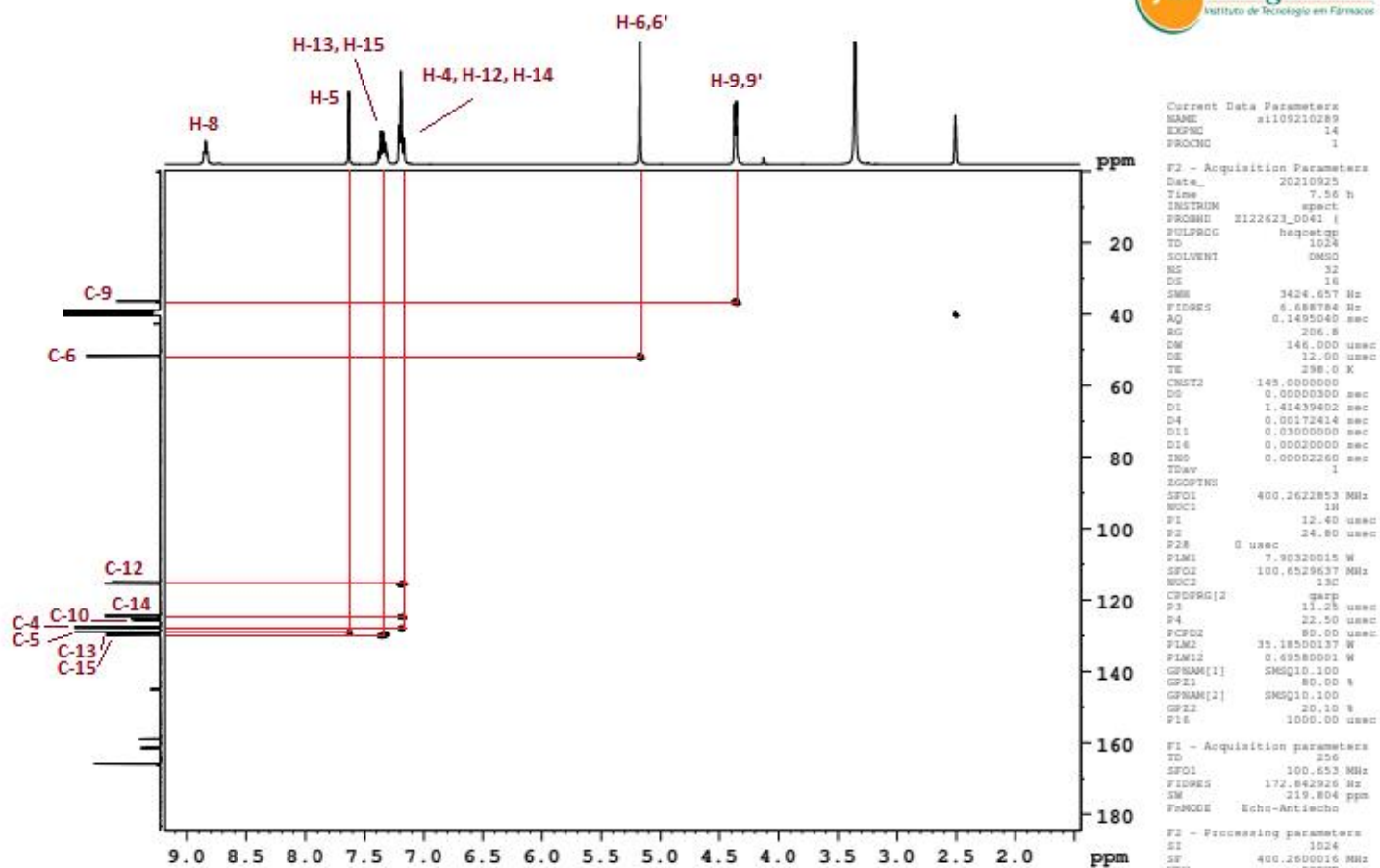
Espectro 60: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado 7.



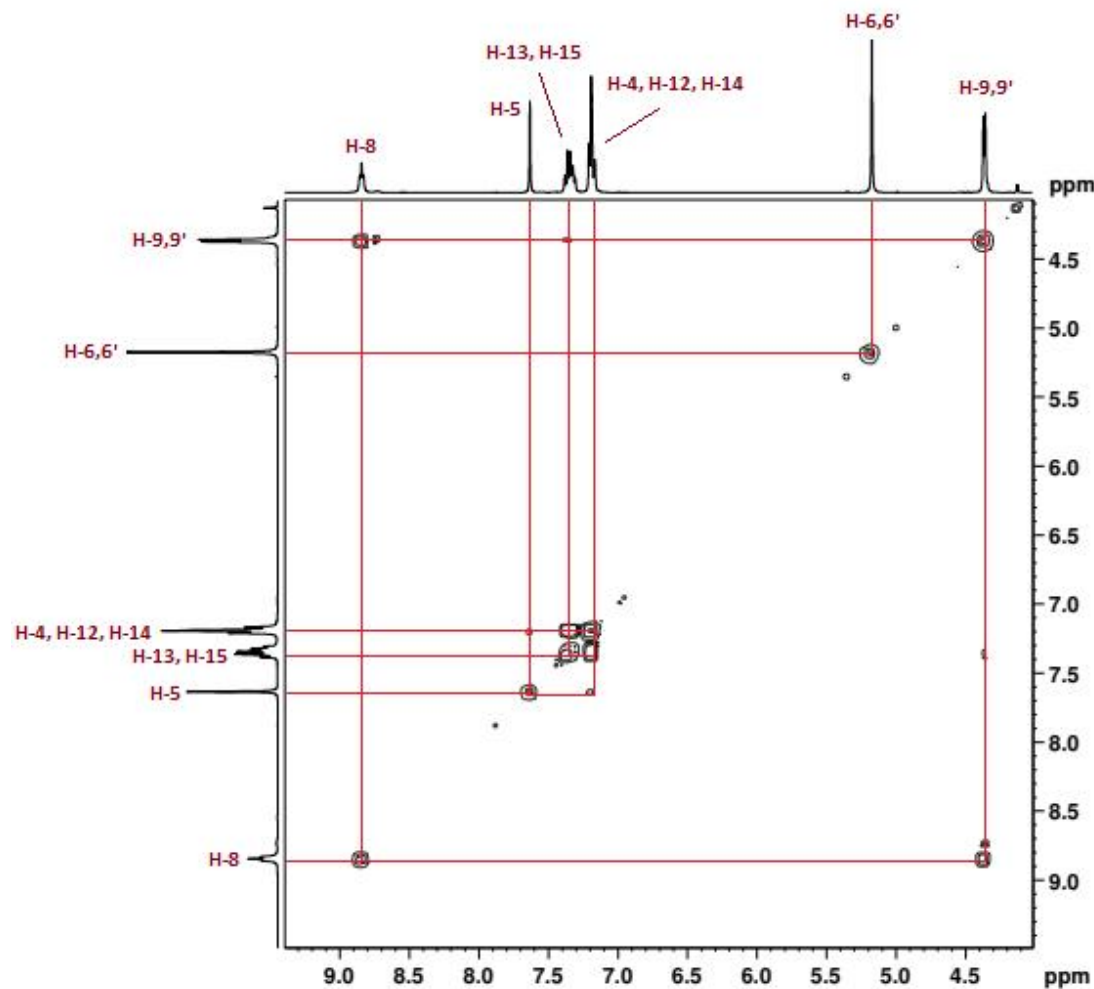
Espectro 61: Espectro de RMN ^{19}F (377 MHz; DMSO-d_6) do derivado 7.



Espectro 62: Espectro de RMN ^{19}F (377 MHz; DMSO- d_6) do derivado 7.



Espectro 63: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 7.



Current Data Parameters
NAME: a109210289
EXPNO: 12
PROCNO: 1

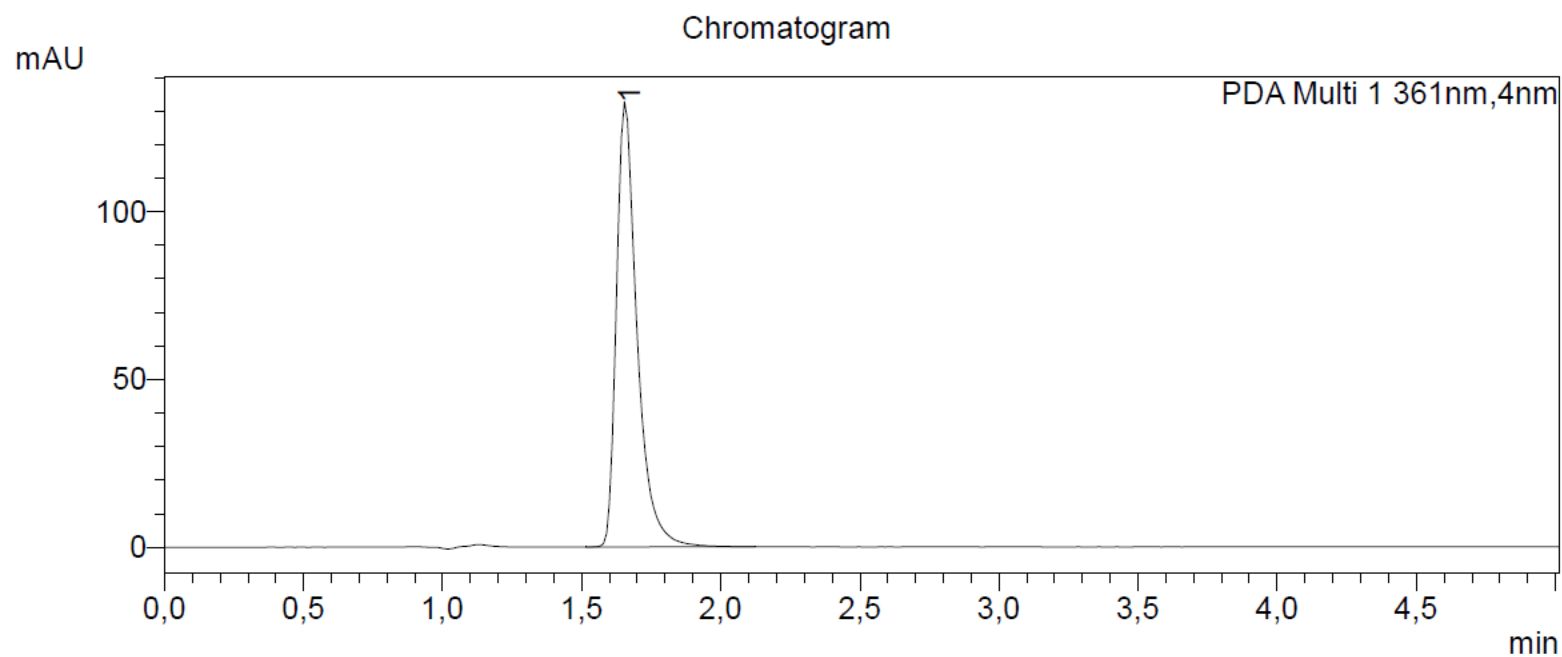
F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20210925
Time: 5.09 h
INSTRUM: spect
PROBHD: 5122623_0041 1
PULPROG: cosygpppgf
TD: 2648
SOLVENT: DMCO
NS: 32
DS: 8
SWH: 4807.692 Hz
FIDRES: 4.695012 Hz
AQ: 0.2129920 sec
RG: 59.25
DM: 104.000 usec
DE: 12.00 usec
TE: 298.0 K
D0: 0.0000300 sec
D1: 2.00000000 sec
D11: 0.03000000 sec
D12: 0.0002000 sec
D13: 0.0000400 sec
D16: 0.0002000 sec
IND: 0.0002000 sec
TD0: 1
SF01: 400.2622014 MHz
NUC1: 1H
P0: 12.40 usec
P1: 12.40 usec
P17: 2300.00 usec
PLW1: 7.90320015 W
PLW0: 1.35020006 W
CPHASE1: SMSQ10.100
CP21: 10.00 A
P16: 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD: 128
SF01: 400.2622 MHz
FIDRES: 75.120193 Hz
SW: 12.011 ppm
F0MODE: QF

F2 - Processing parameters
SI: 1024
SF: 400.2600000 MHz
WDW: QSINE
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.40

F1 - Processing parameters
SI: 1024
SF: 400.2600000 MHz
WDW: QSINE
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0

Espectro 64: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 7.

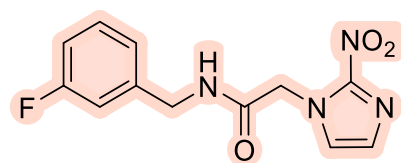


Peak Table

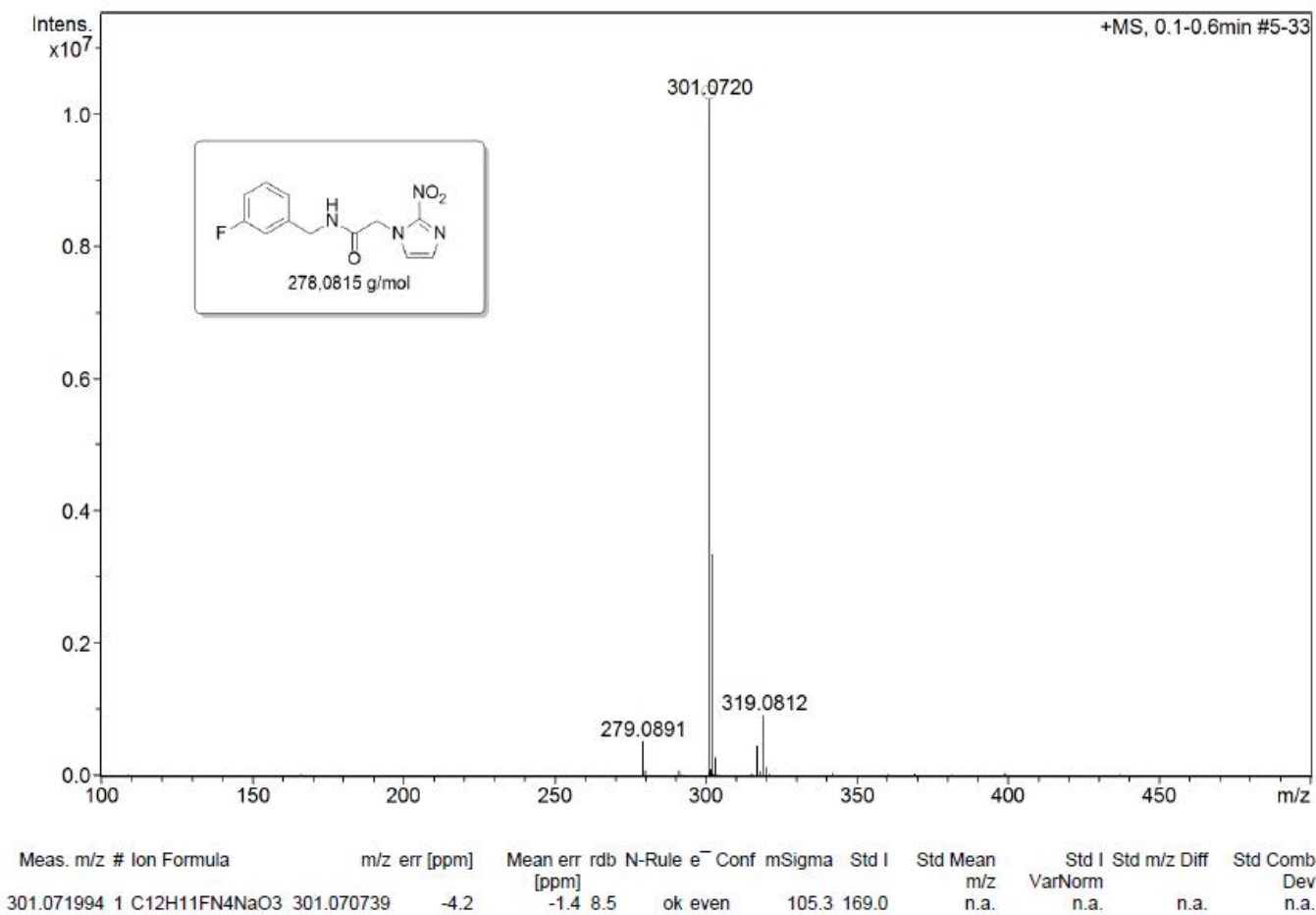
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,65		684542	100,0	12927	1,514	--	--
Total			684542	100,0				

Cromatograma 7: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado 7.

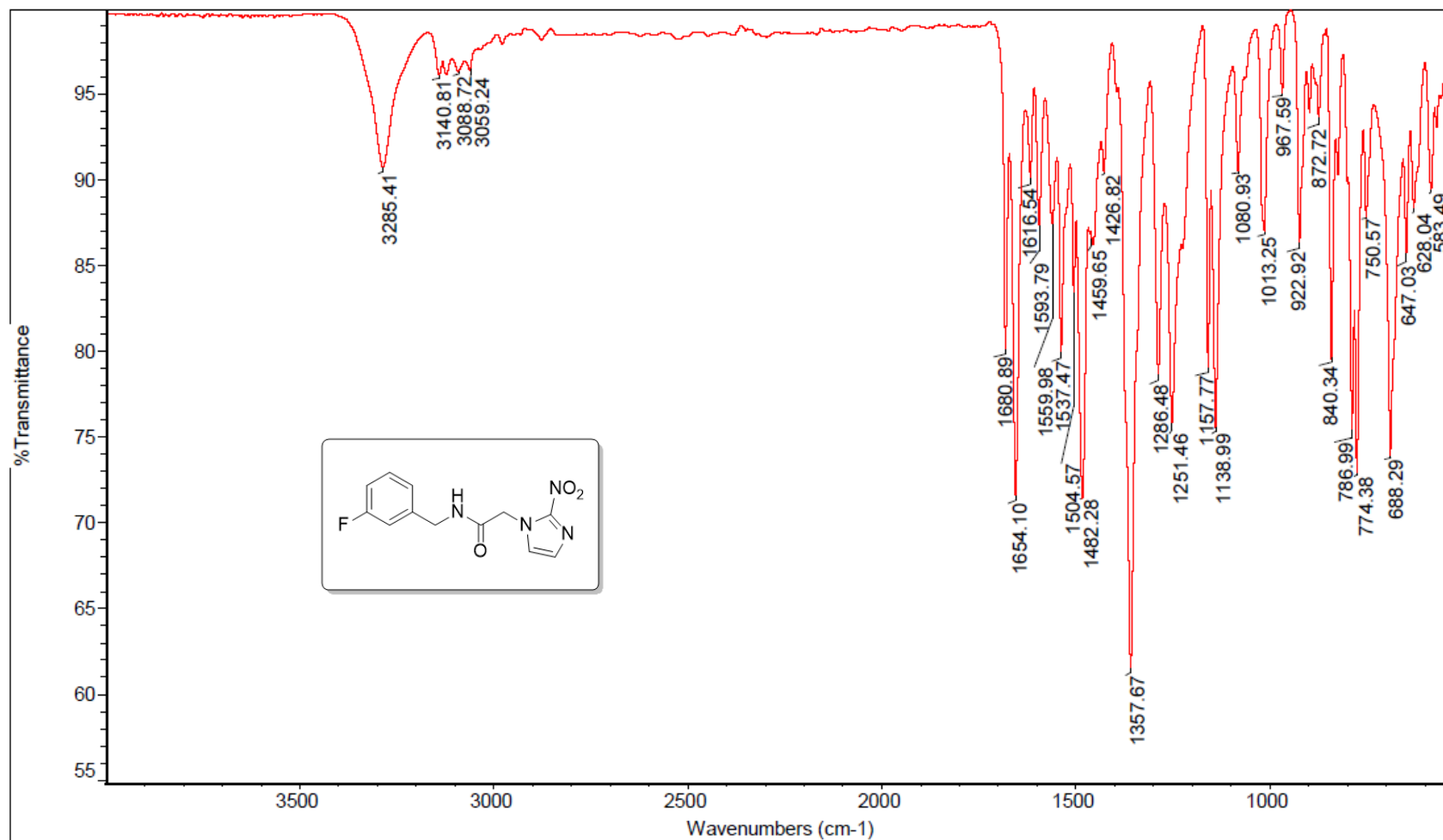
N-(3-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)acetamida (8)



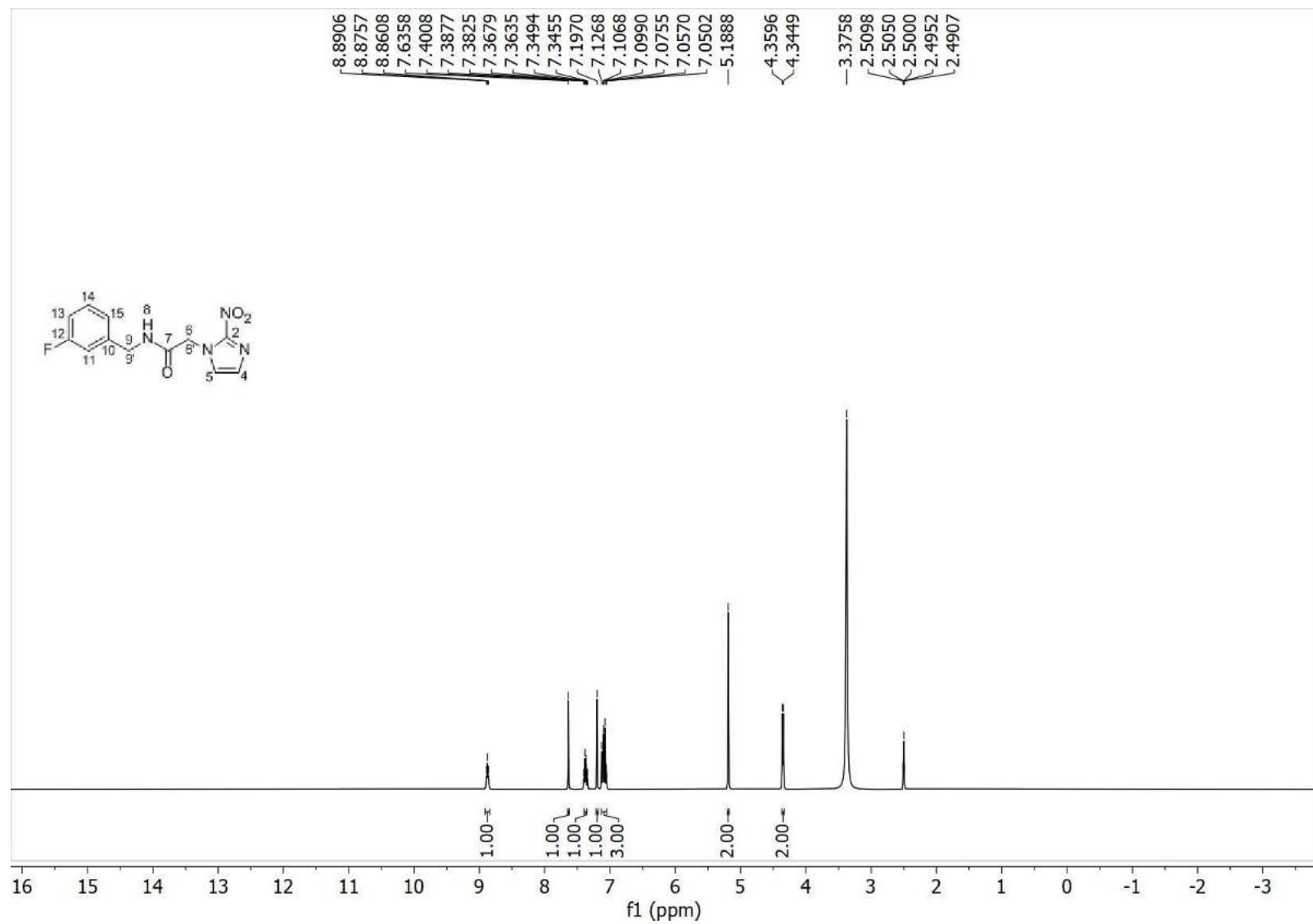
+MS, 0.1-0.6min #5-33



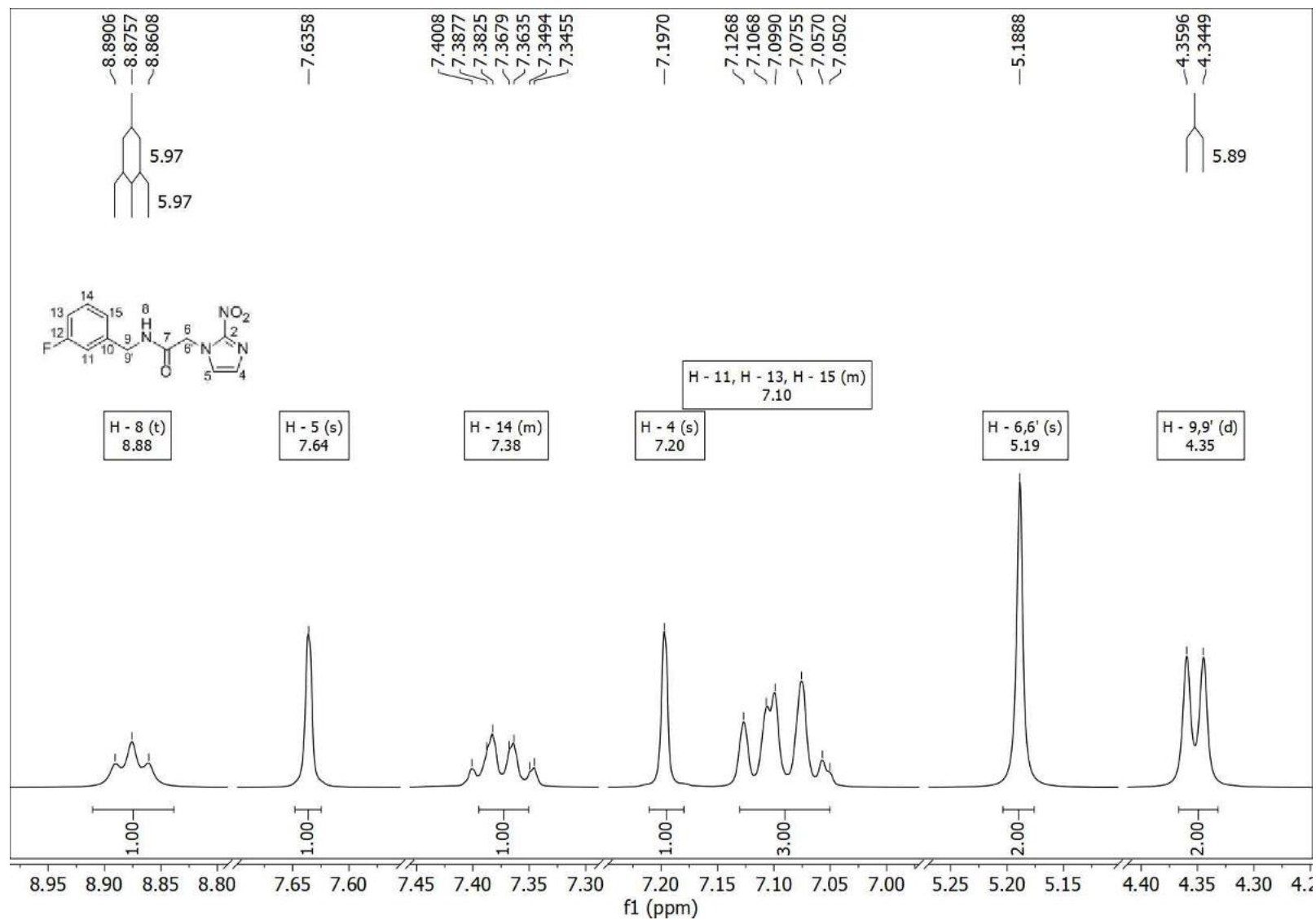
Espectro 65: Espectro de massas de alta resolução do derivado **8**.



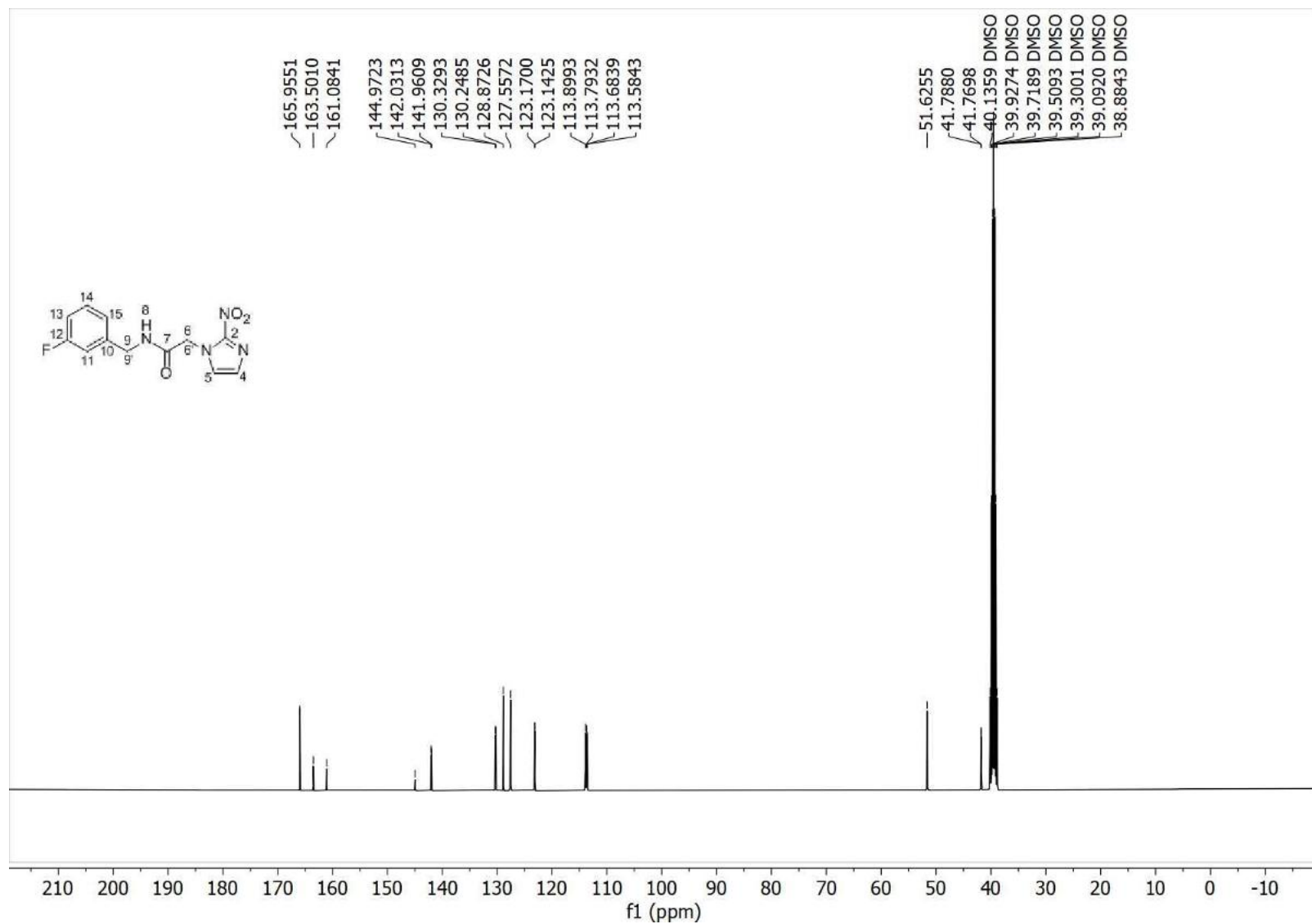
Espectro 65: Espectro de infravermelho do derivado **8**.



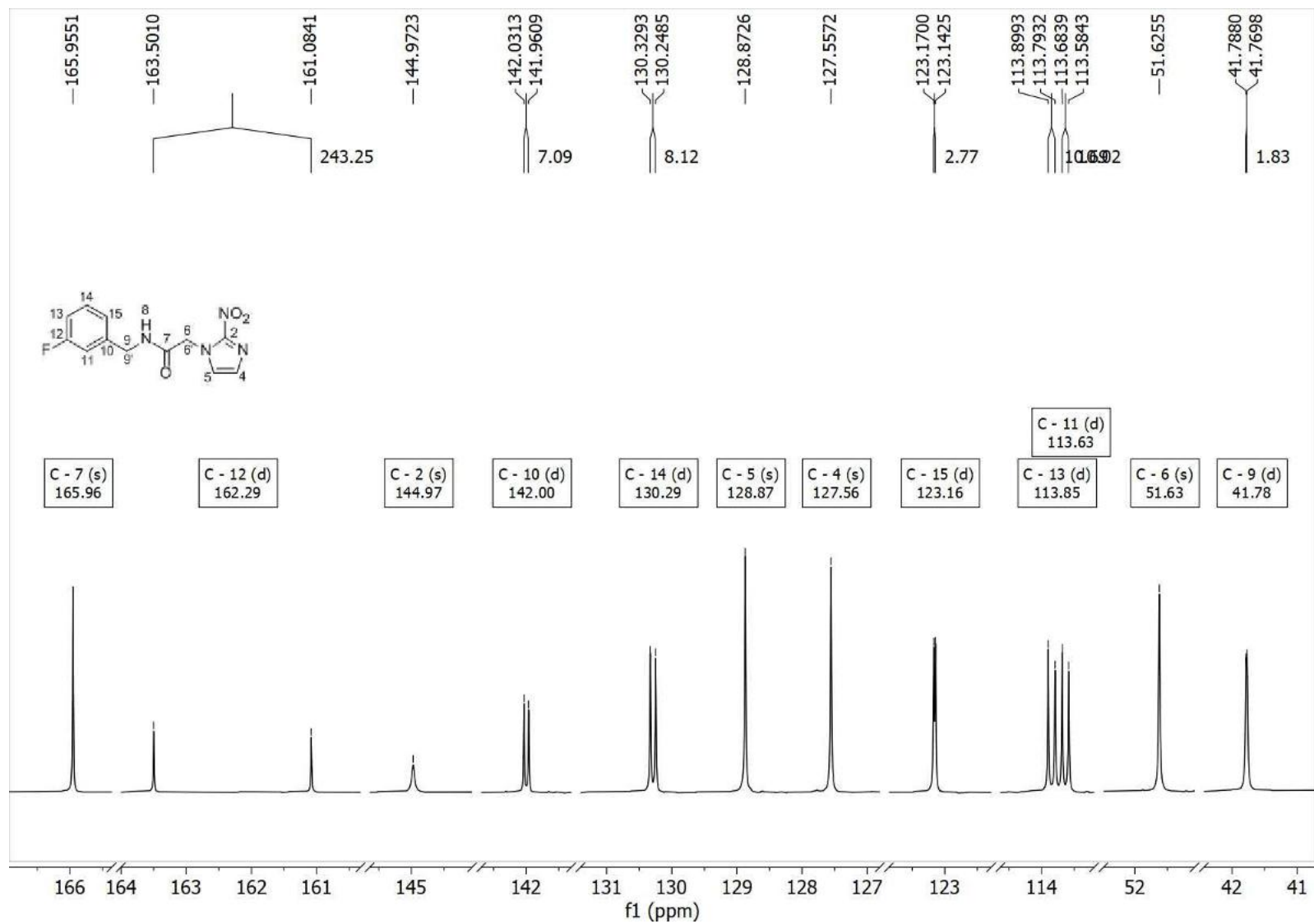
Espectro 66: Espectro de RMN ¹H (400 MHz; DMSO-d₆) do derivado **8**.



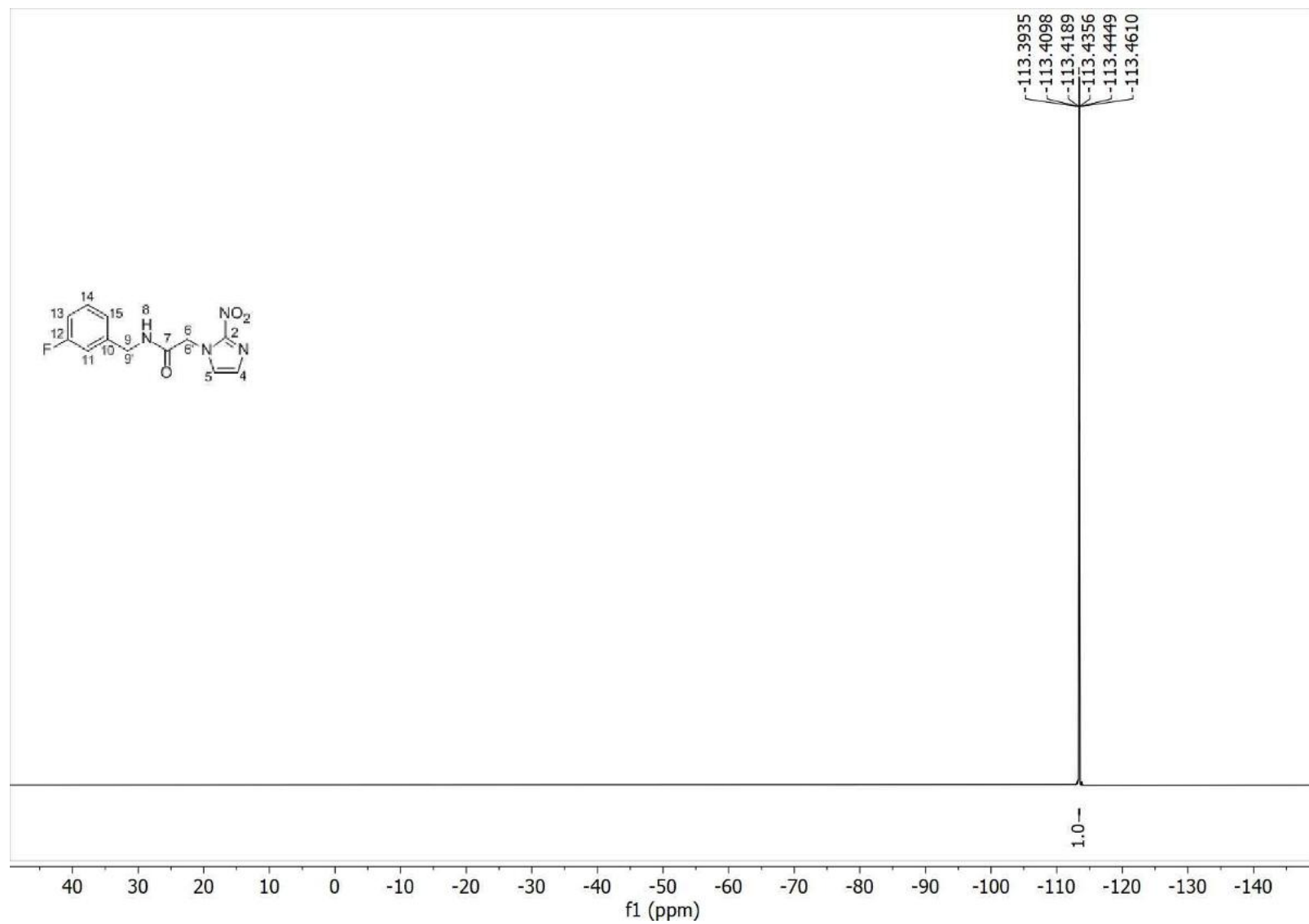
Espectro 67: Espectro de RMN ¹H (400 MHz; DMSO-d₆) do derivado **8**.



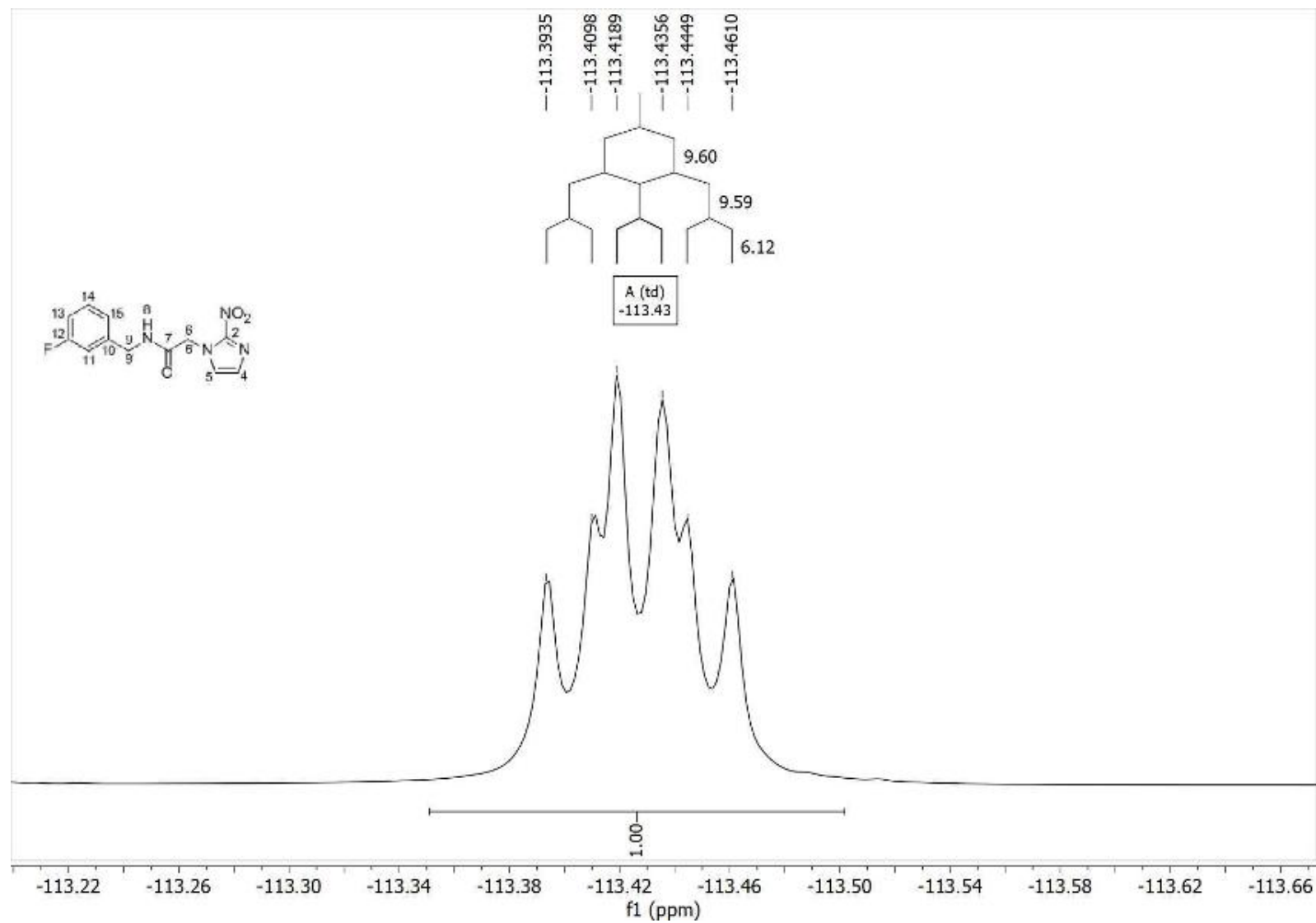
Espectro 68: Espectro de RMN ¹³C (100 MHz; DMSO-d₆) do derivado **8**.



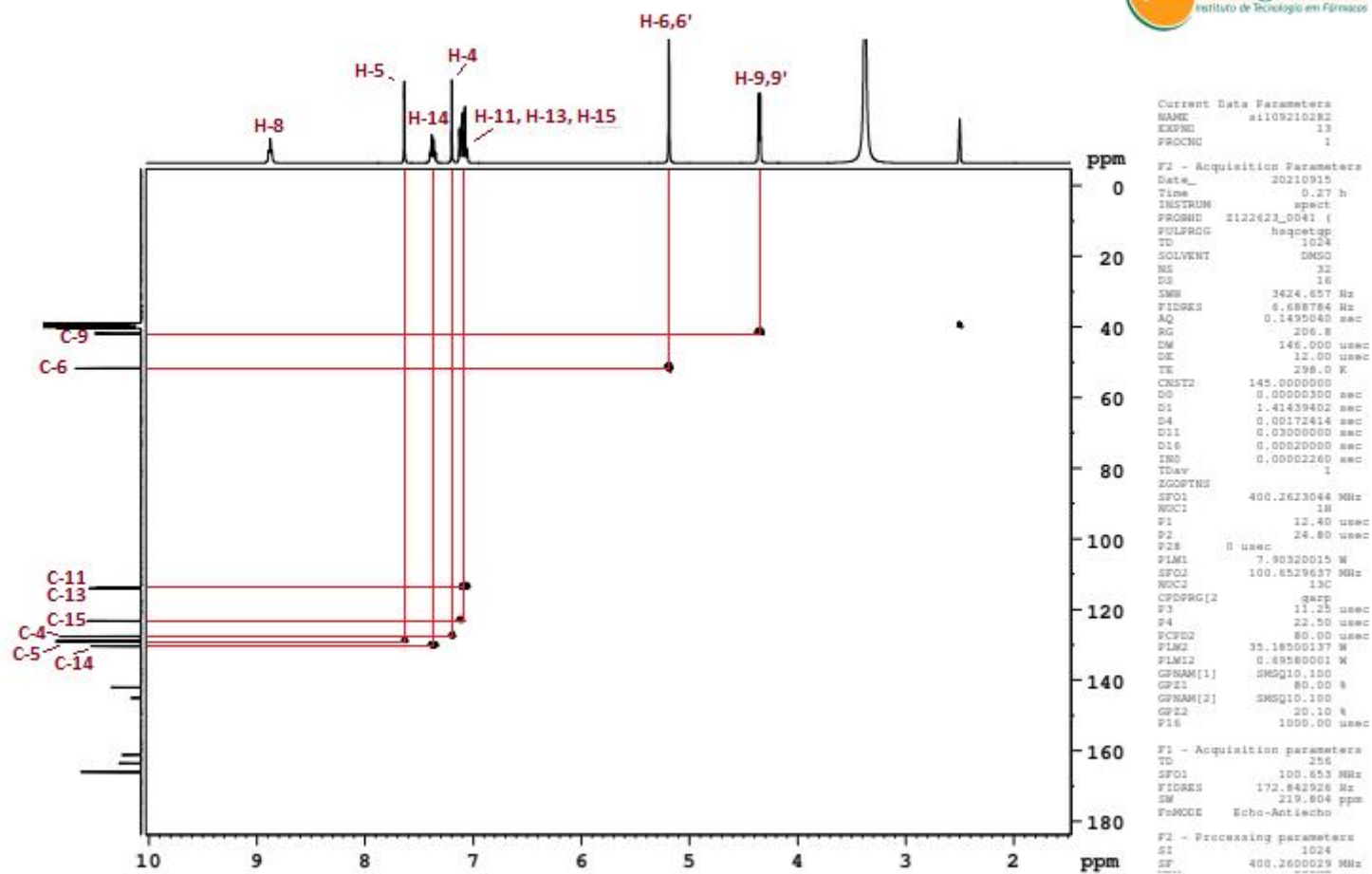
Espectro 69: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **8**.



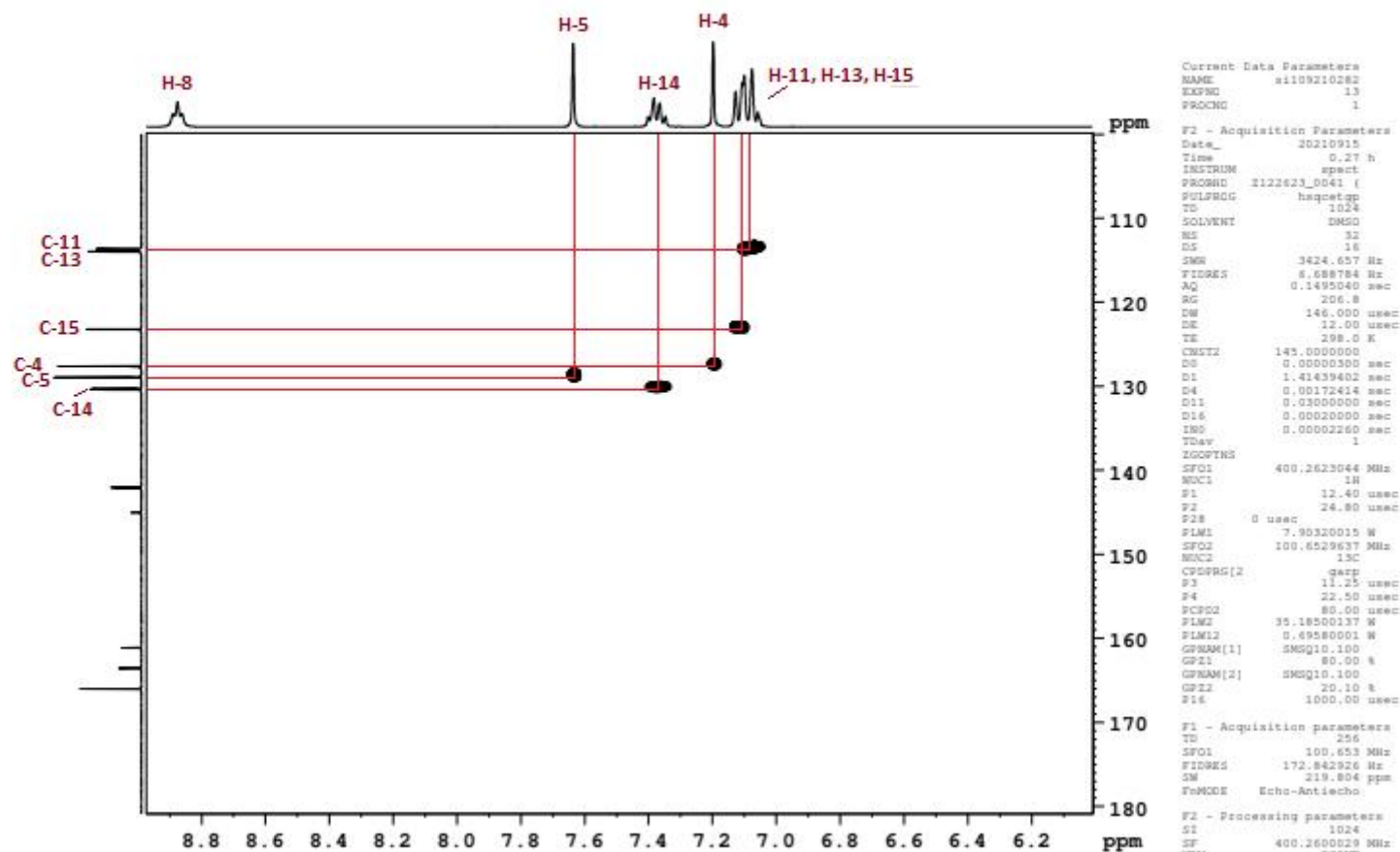
Espectro 70: Espectro de RMN ^{19}F (377 MHz; DMSO- d_6)) do derivado **8**.



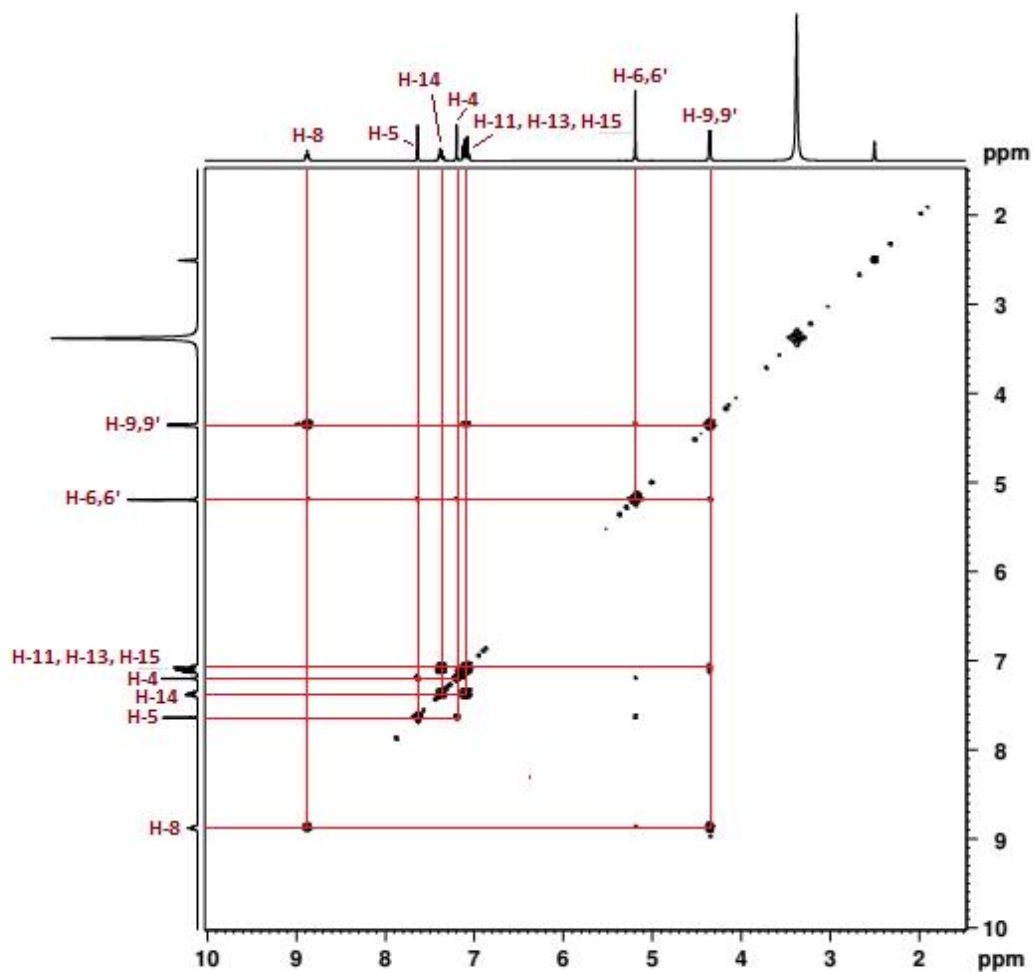
Espectro 71: Espectro de RMN ^{19}F (377 MHz; DMSO- d_6) do derivado **8**.



Espectro 72: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 8.



Espectro 73: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 8.



```

Current Data Parameters
NAME      s1109210282
EXPNO     12
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20210914
Time      20.30 h
INSTRUM   spect
PROBHD    E122623_0041
PULPROG   cosygpgp
TD        2048
SOLVENT   DMSO
NS         32
DS         8
SWH        3424.157 Hz
FIDRES     3.344392 Hz
AQ         0.2990080 sec
RG         59.25
DW         148.000 usec
DE         12.00 usec
TE         298.0 K
DQ         0.0000000 sec
DI         1.38394701 sec
D13        0.00000400 sec
U16        0.00020000 sec
INQ        0.00023200 sec
TEAV       1
SFO1       400.2623044 MHz
NUC1       13
P0         12.40 usec
P1         12.40 usec
PLW1       7.90320015 M
GPHAM[1]   SINEQ10.100
CPS1       10.00 Hz
P16        1000.00 usec

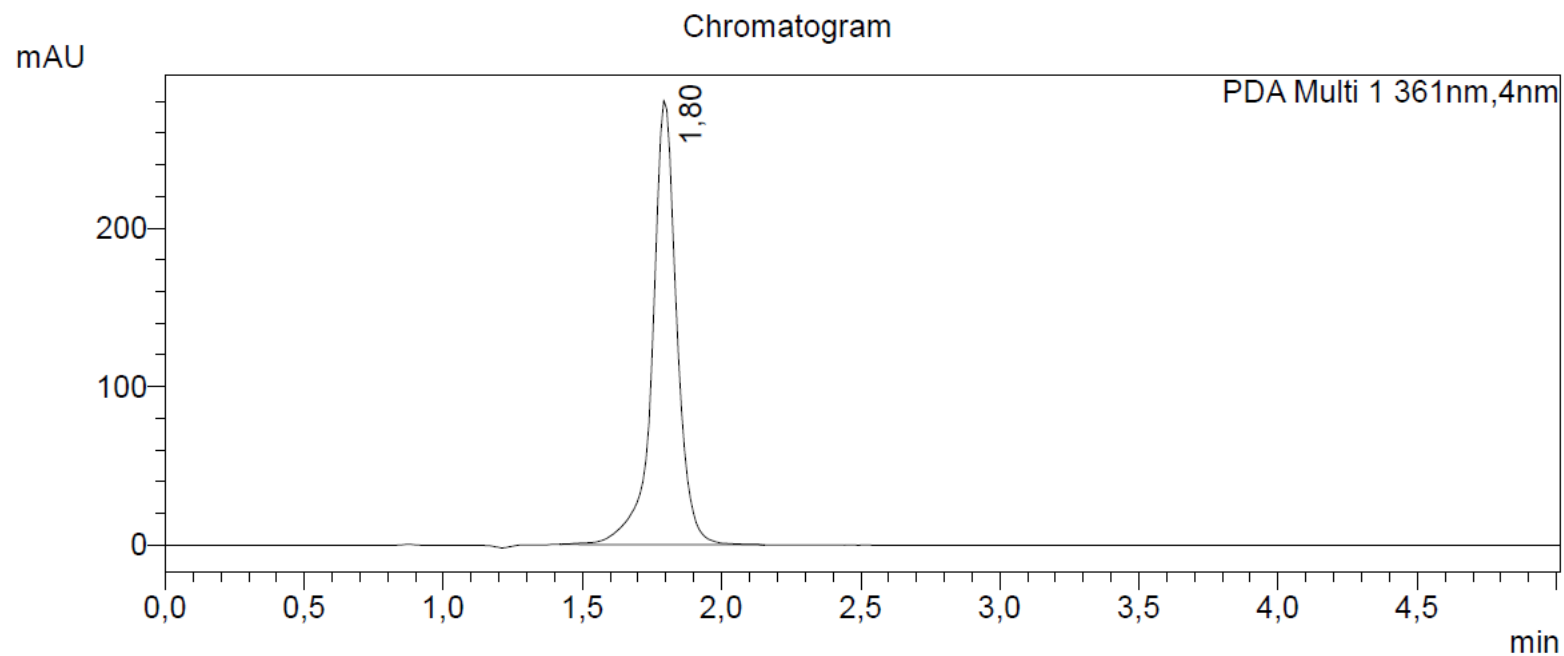
F1 - Acquisition parameters
TD         256
SFO1       400.2623 MHz
FIDRES     26.755136 Hz
SW         8.556 ppm
F2MODE     QF

F2 - Processing parameters
SI         2048
SF         400.2600026 MHz
WDW        QSINE
SSB         0
LB         0 Hz
GB         0
PC         0.40

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        QF
SF         400.2600040 MHz
WDW        QSINE
SSB         0
LB         0 Hz
GB         0

```

Espectro 74: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 8.

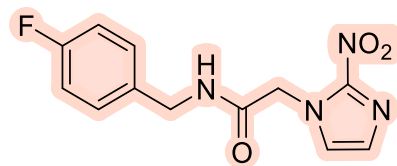


Peak Table

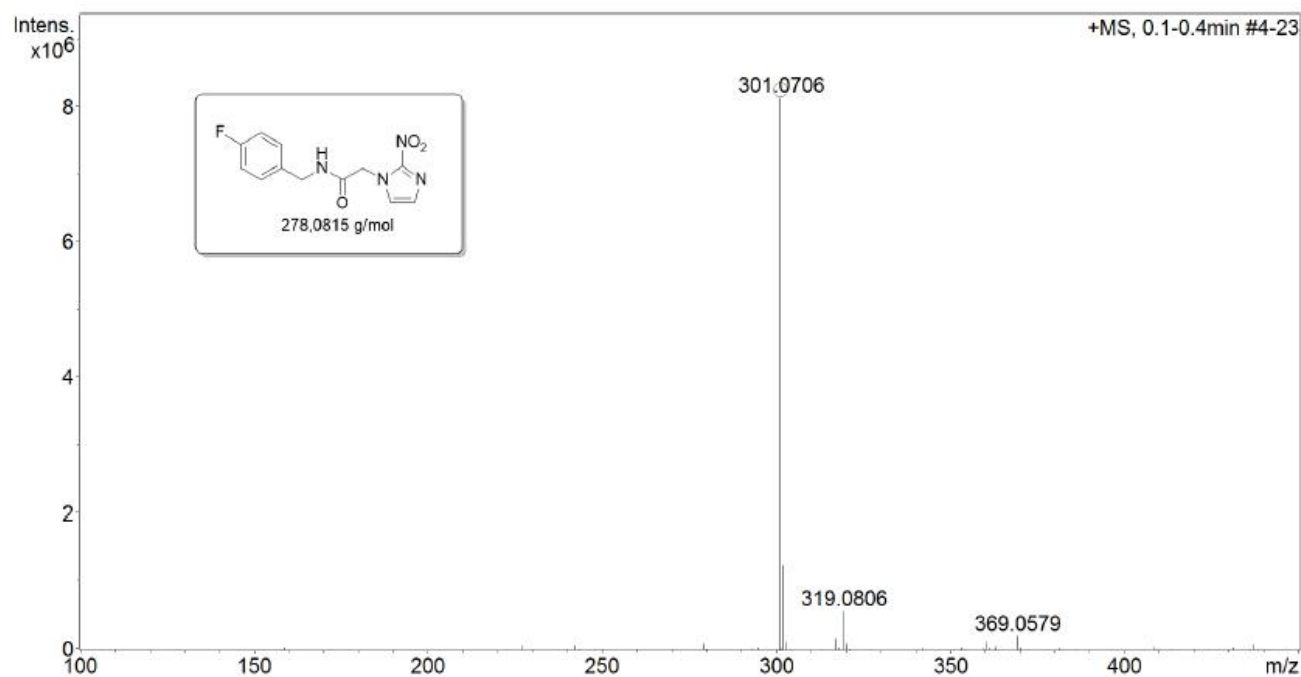
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,80		1713939	100,0	12234	0,897	--	--
Total			1713939	100,0				

Cromatograma 8: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **8**.

N-(4-fluorobenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (9)

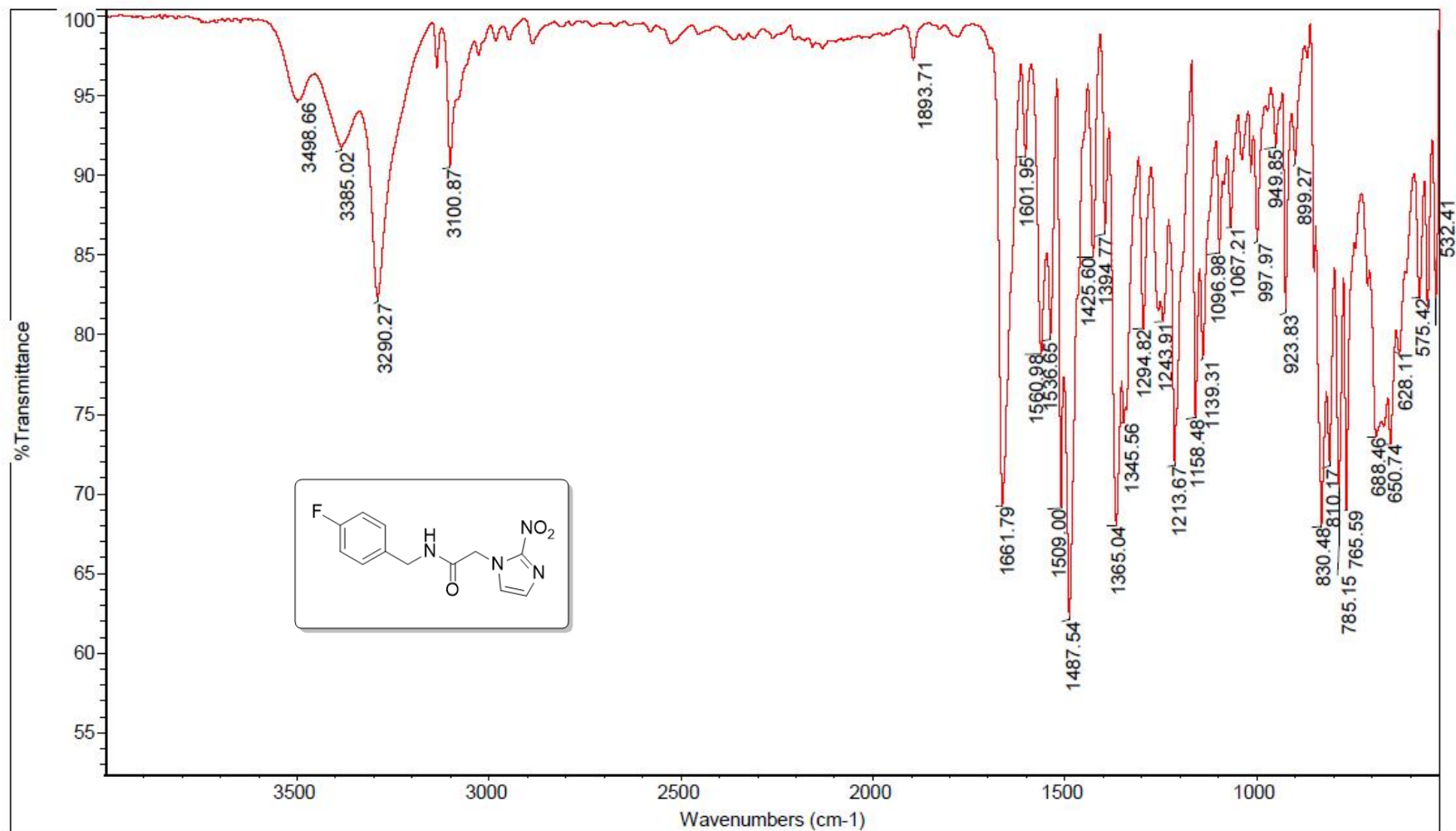


+MS, 0.1-0.4min #4-23

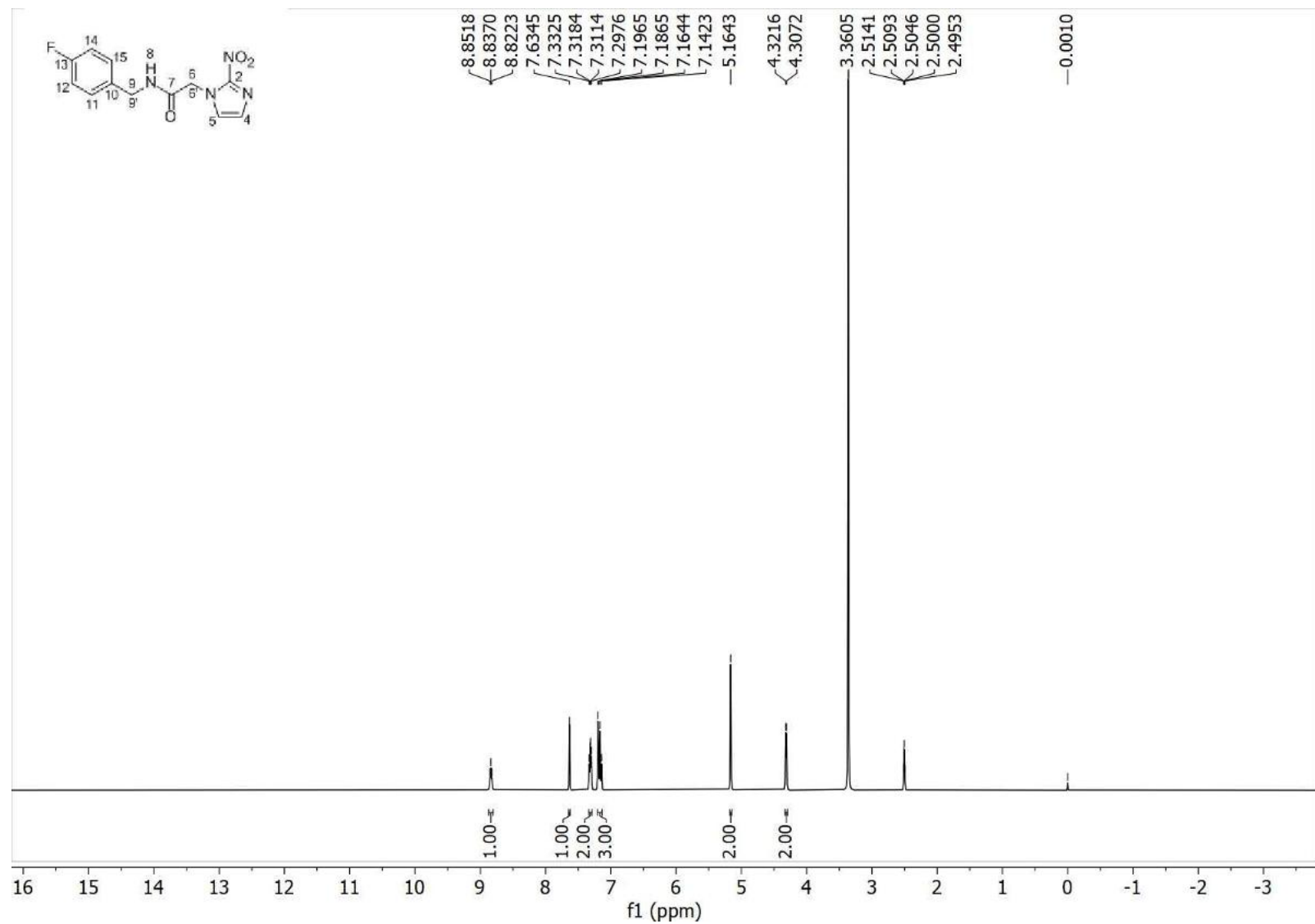


Meas. m/z # Ion Formula	m/z err [ppm]	Mean err rdb [ppm]	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I	Std Mean m/z	Std I VarNorm	Std m/z Diff	Std Comb Dev
301.070560 1 C ₁₂ H ₁₁ FN ₄ NaO ₃	301.070739	0.6	1.6	8.5	ok even	3.1	4.8	n.a.	n.a.	n.a.
2 C ₁₁ H ₁₅ FN ₄ O ₇	301.069402	-3.8	-2.2	3.5	ok even	16.9	28.2	n.a.	n.a.	n.a.

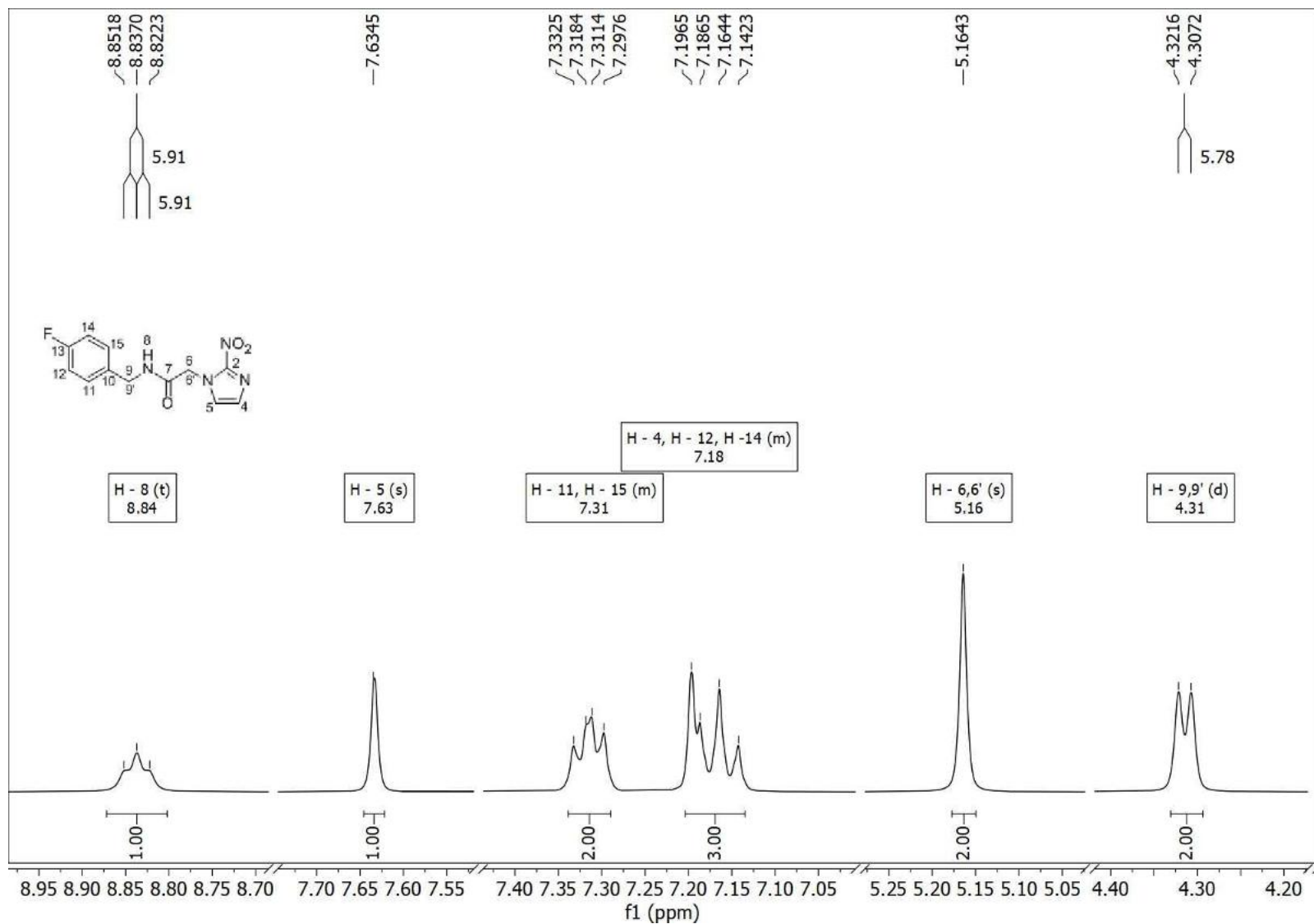
Espectro 75: Espectro de massas de alta resolução do derivado **9**.



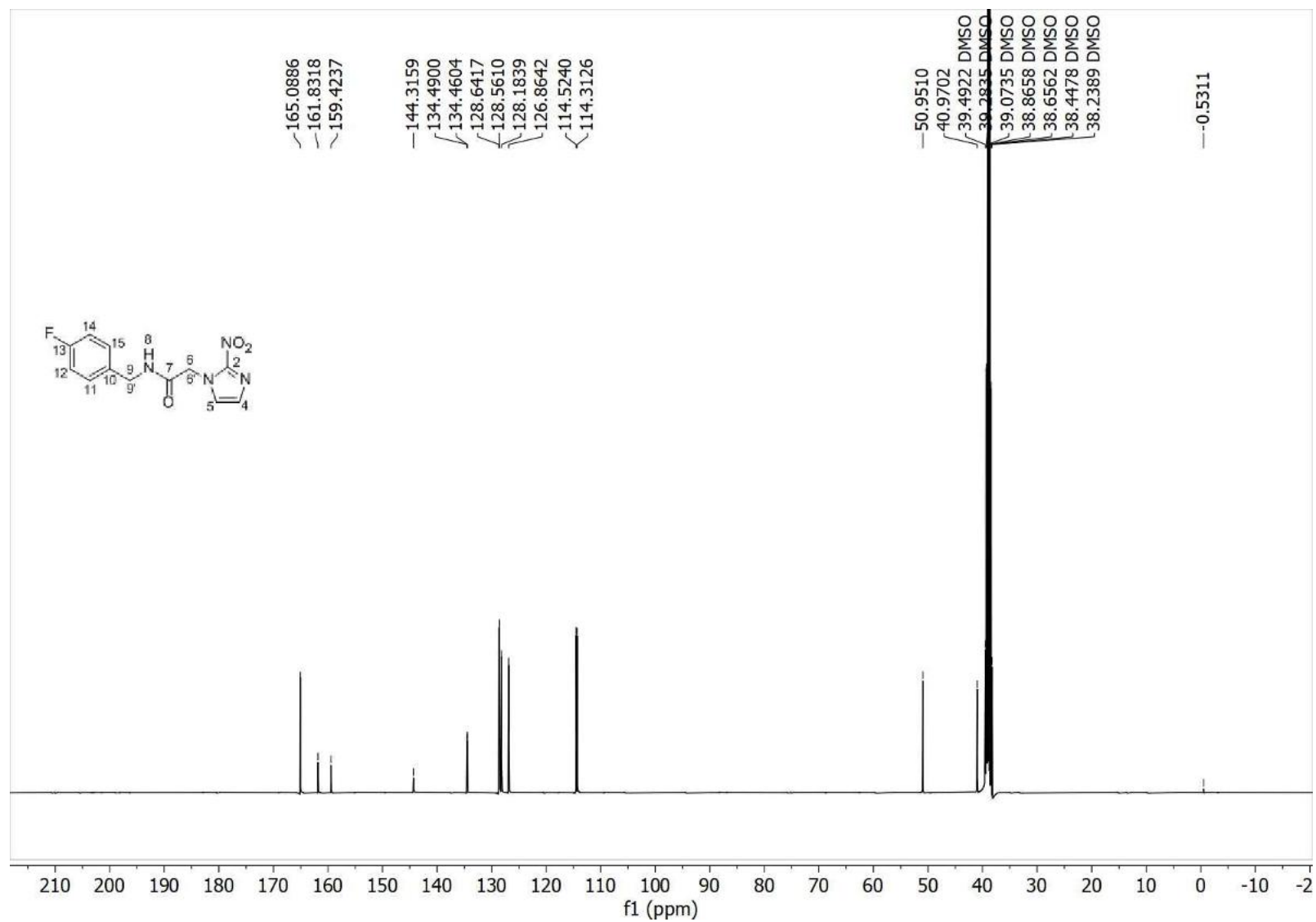
Espectro 76: Espectro de infravermelho do derivado **9**.



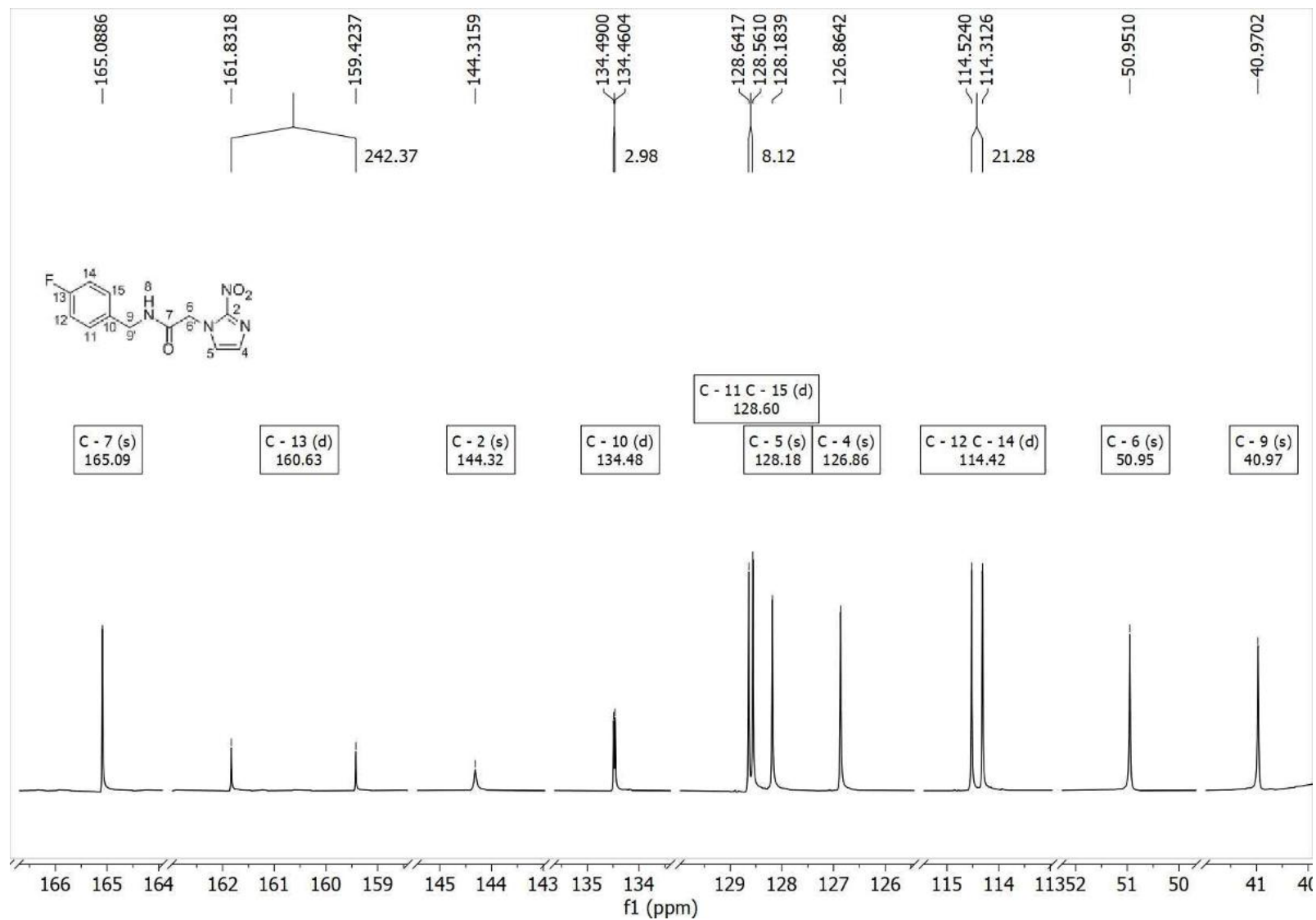
Espectro 77: Espectro de RMN ¹H (400 MHz; DMSO-d₆) do derivado **9**.



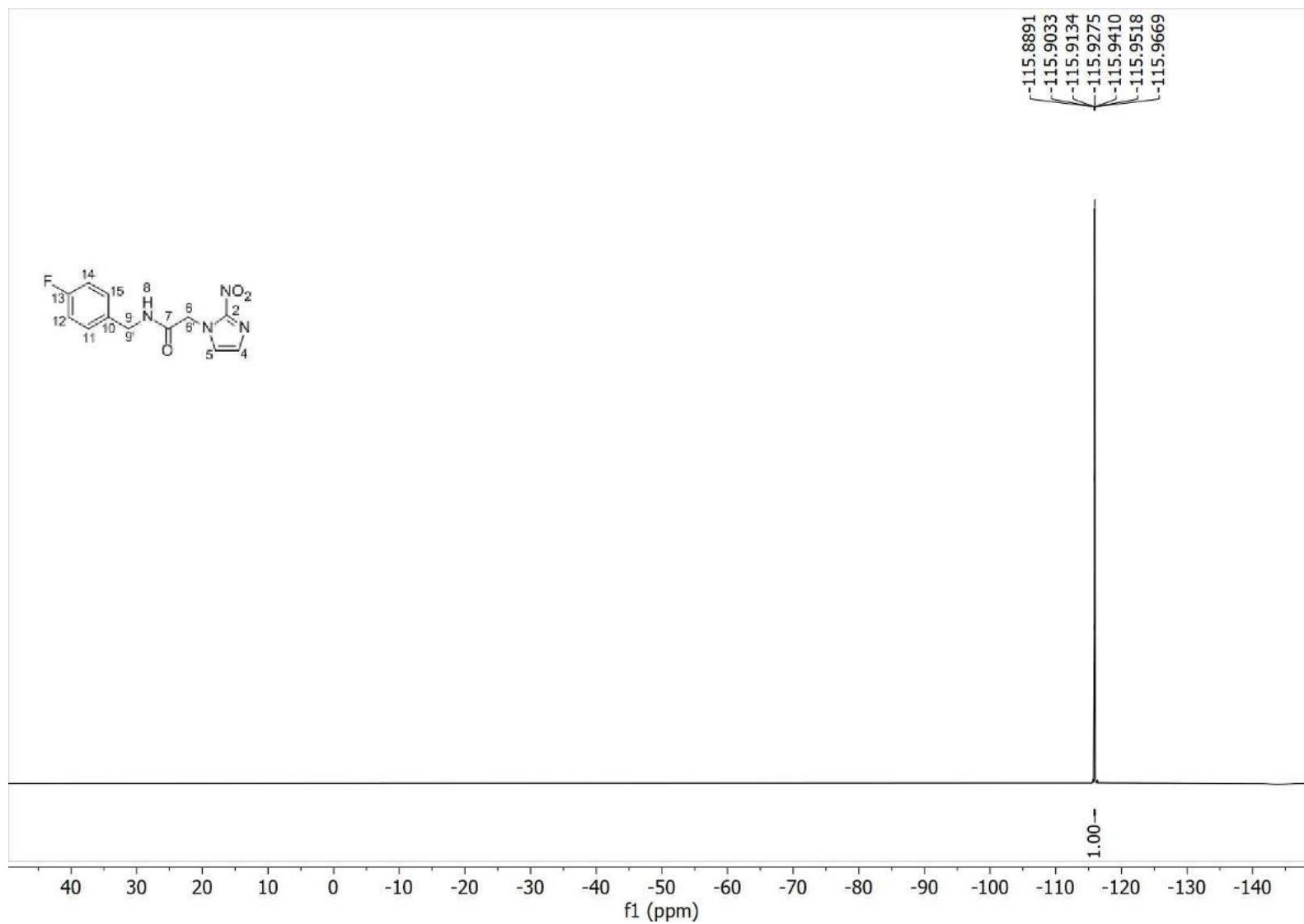
Espectro 78: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **9**.



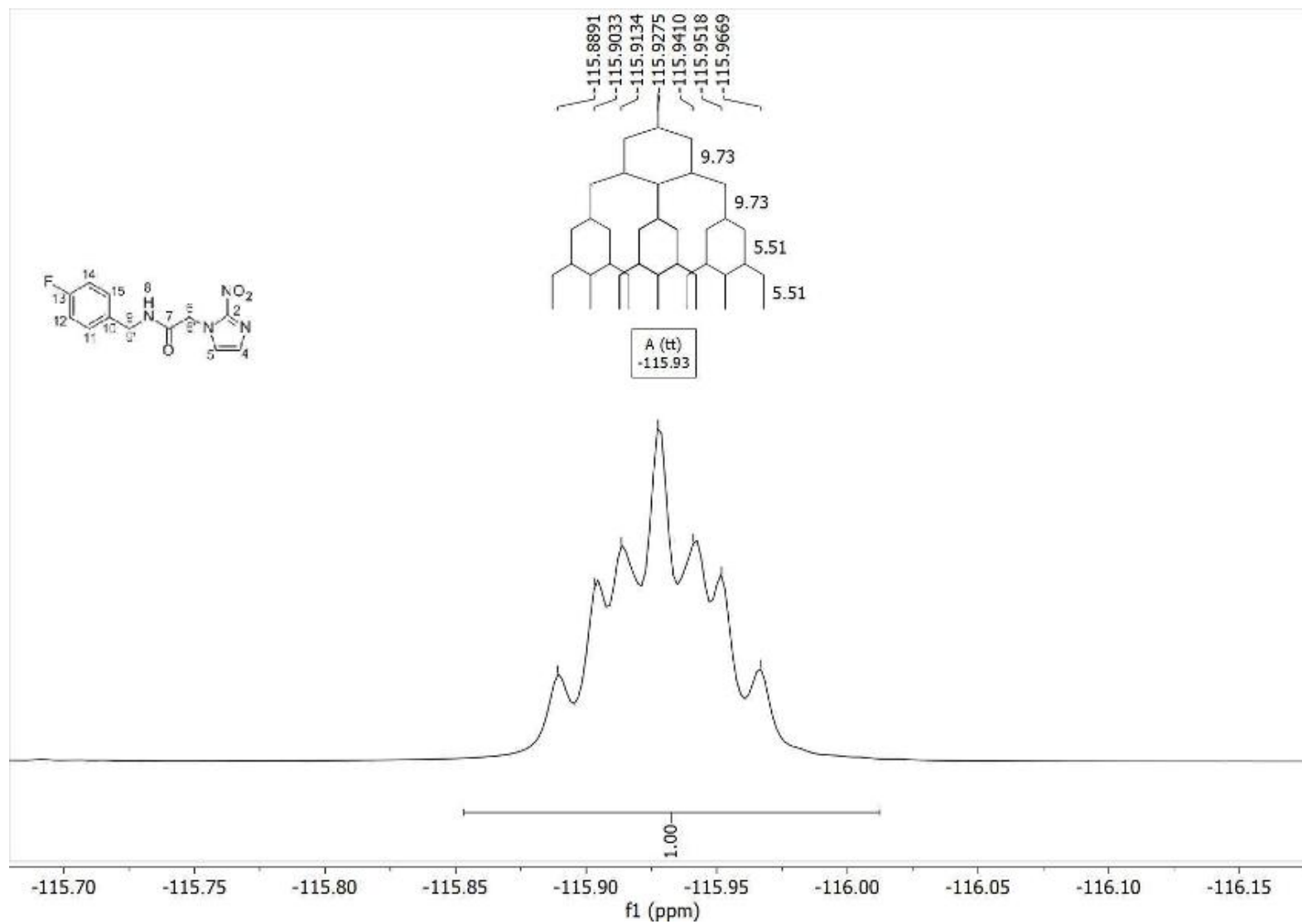
Espectro 79: Espectro de RMN ¹³C (100 MHz; DMSO-d₆) do derivado 9.



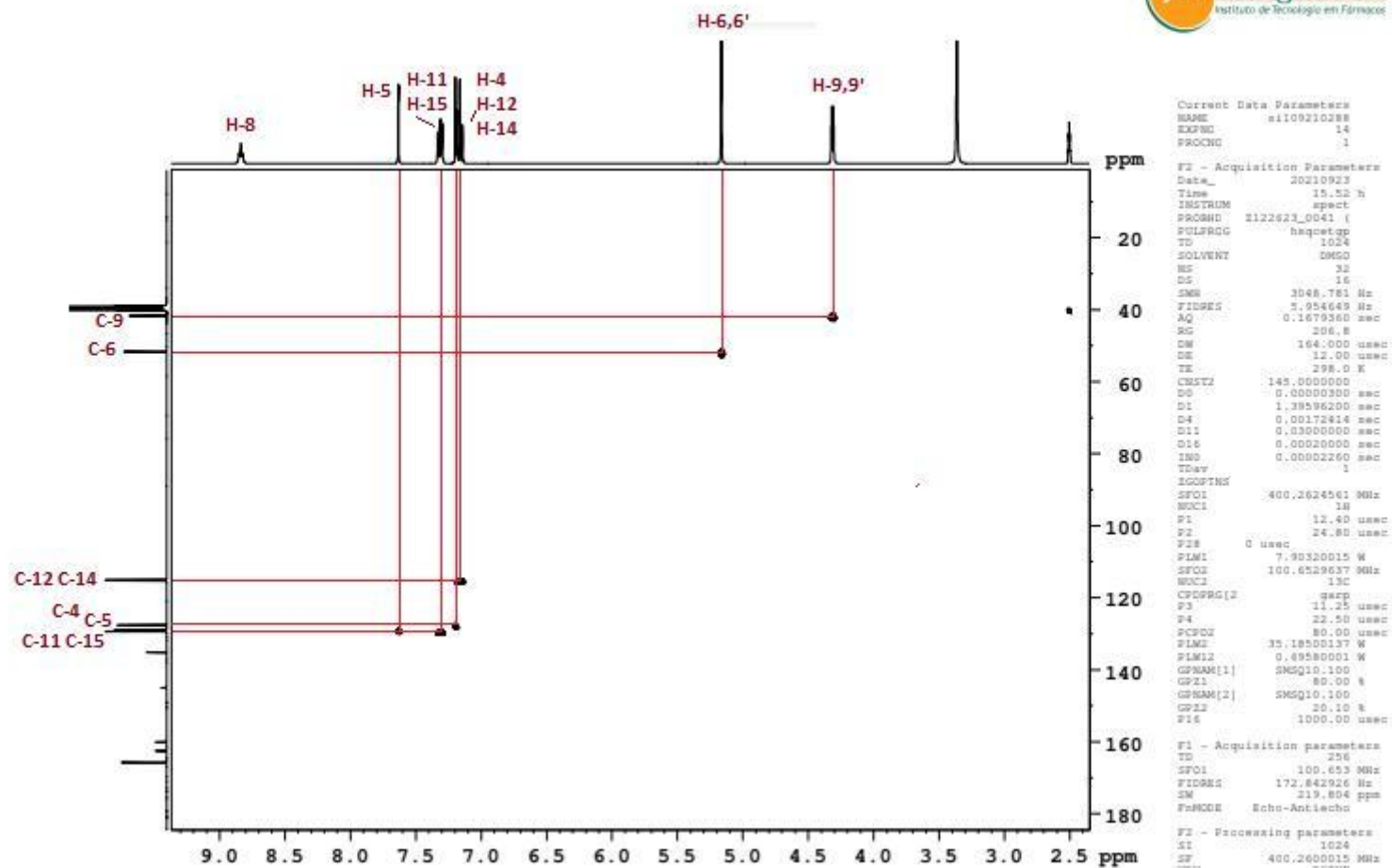
Espectro 80: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **9**.



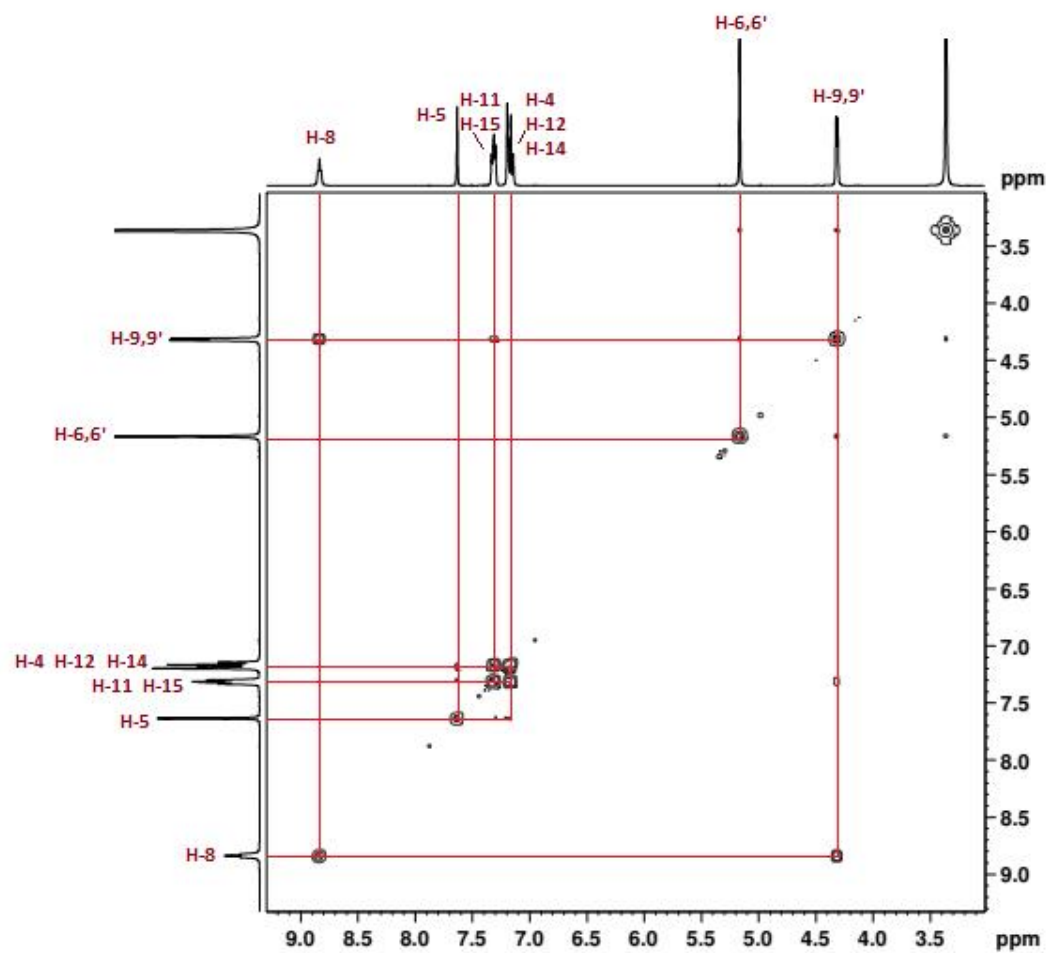
Espectro 81: Espectro de RMN ^{19}F (377 MHz; DMSO- d_6) do derivado **9**.



Espectro 82: Espectro de RMN ^{19}F (377 MHz; DMSO- d_6) do derivado **9**.



Espectro 83: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 9.



Current Data Parameters
NAME s1109210288
EXPNO 12
PROCNO 1

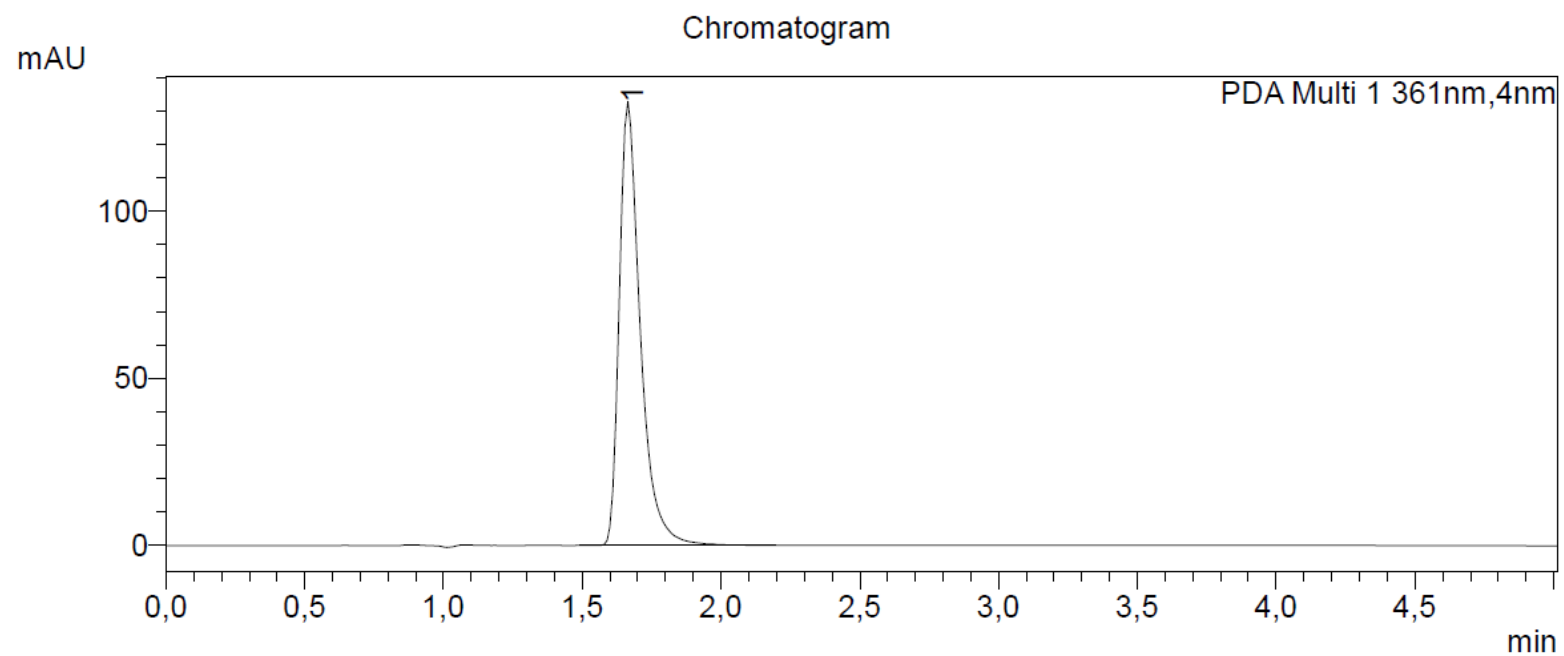
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20210922
Time 9.23 h
INSTRUM spect
PROBHD Z122623_0041 (4
PULPROG cosygpppaf
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 32
DS 8
SWH 4807.692 Hz
FIDRES 4.815012 Hz
AQ 0.3129935 sec
RG 39.25
DM 104.000 usec
DE 12.00 usec
TE 298.2 K
D0 0.00000300 sec
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00000000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00000000 sec
IND 0.00020800 sec
TDav 1
SFO1 400.2622014 MHz
NUC1 1H
P0 12.40 usec
P1 12.40 usec
P17 2500.00 usec
PLM1 7.90320015 W
PLM10 1.35020006 W
GPMAN[1] SMOQ10.100
GP11 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 128
SFO1 400.2622 MHz
FIDRES 75.120193 Hz
SR 12.011 ppm
PRNOCOE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.2600003 MHz
WDW Q2IME
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 400.2600000 MHz
WDW Q2IME
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Espectro 84: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 9.

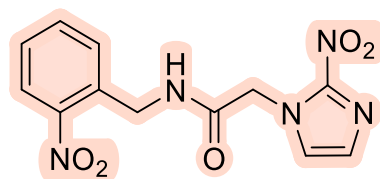


Peak Table

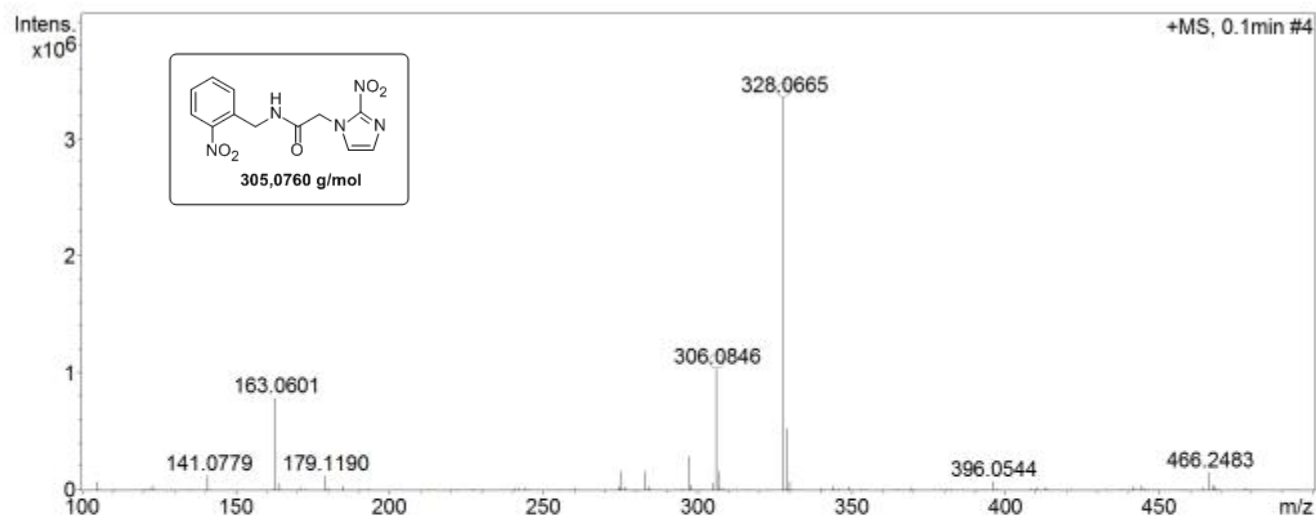
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,66		699608	100,0	12408	1,526	--	--
Total			699608	100,0				

Cromatograma 9: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado 9.

2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)-N-(2-nitrobenzil)acetamida (10)

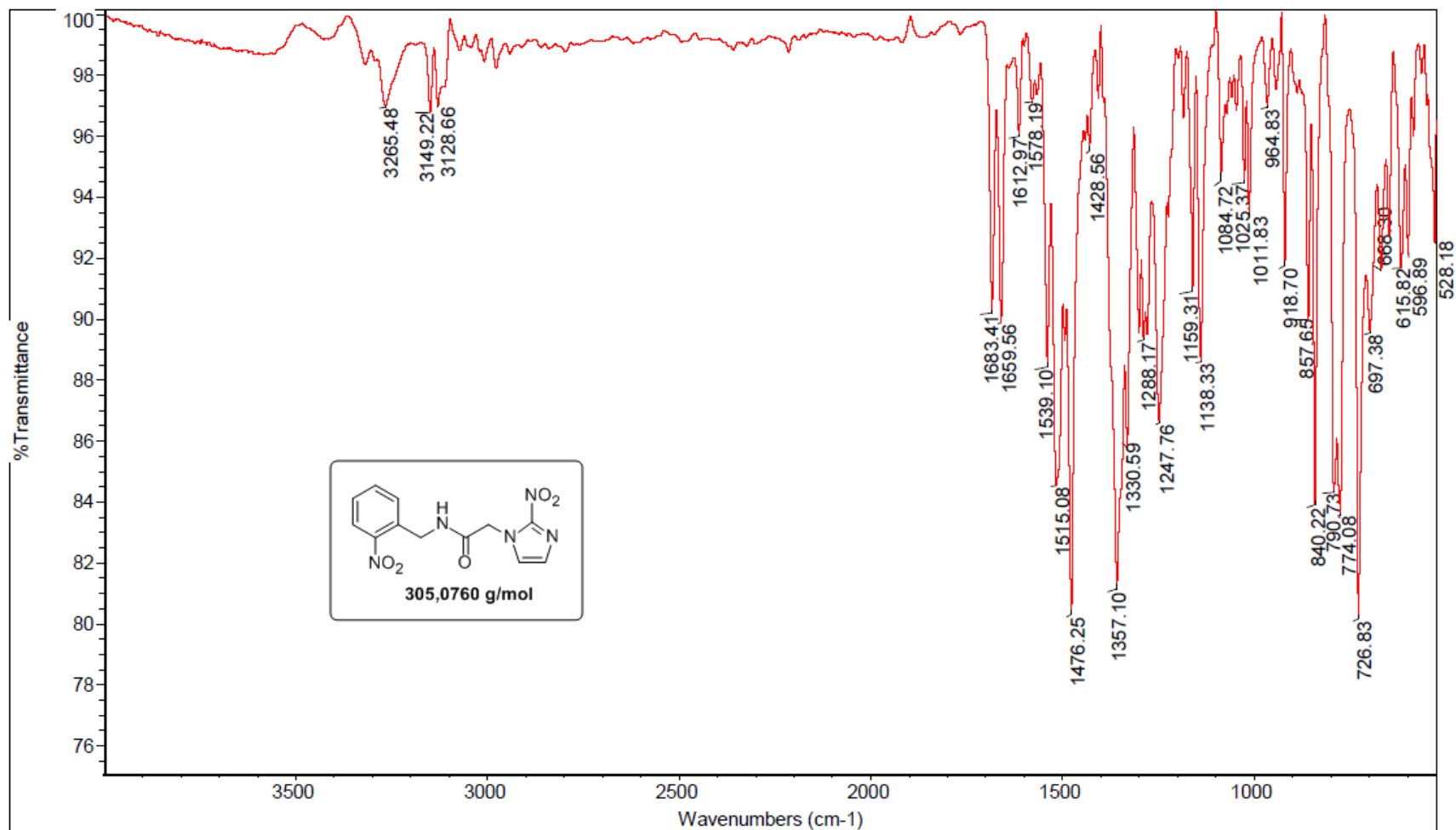


+MS, 0.1min #4

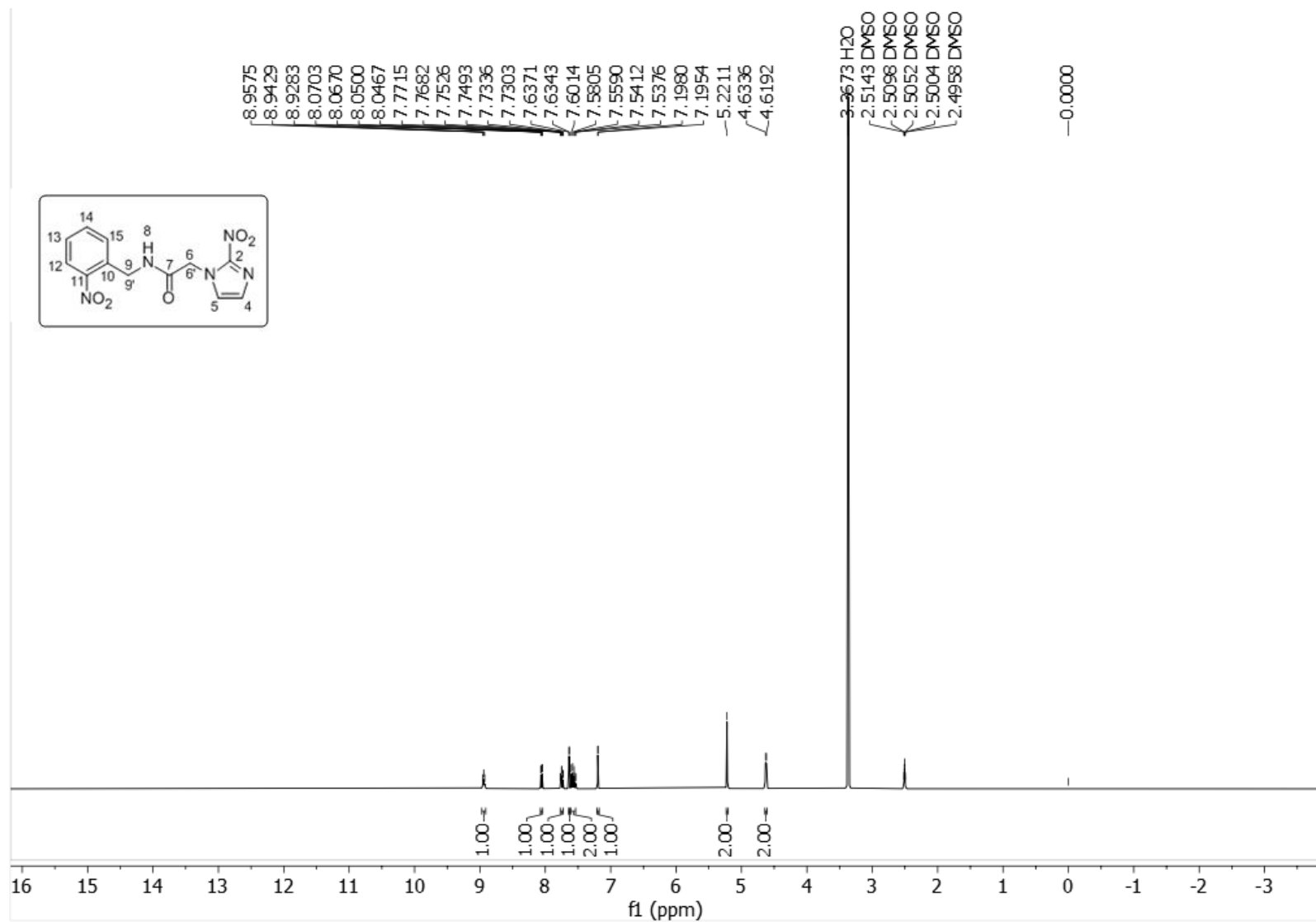


Meas. m/z # Ion Formula	m/z err [ppm]	Mean err [ppm]	rdB	N-Rule	e ⁻	Conf	mSigma	Std I	Std	Mean m/z	Std I	Std	m/z Diff	Std Comb Dev
306.084644 1 C ₁₂ H ₁₂ N ₅ O ₅	306.083295 -4.4	-4.0	9.5	ok	even		1.8	2.9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2 C ₁₃ H ₈ N ₉ O	306.084632 -0.0	-0.3	14.5	ok	even		12.0	19.7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
328.066538 1 C ₁₂ H ₁₁ N ₅ NaO ₅	328.065239 -4.0	-4.0	9.5	ok	even		4.0	7.3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2 C ₁₃ H ₇ N ₉ NaO	328.066577 0.1	-0.6	14.5	ok	even		9.9	15.6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

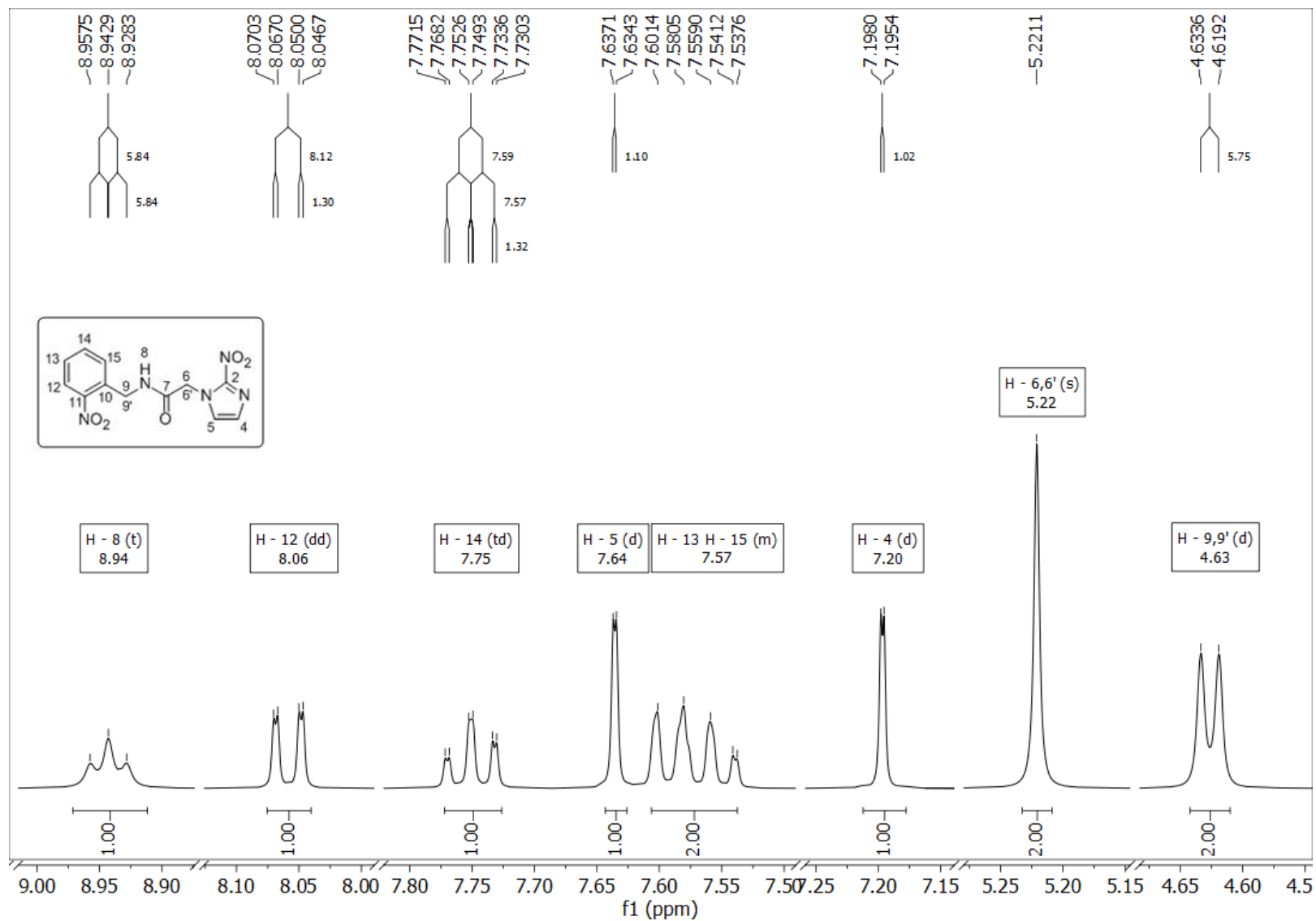
Espectro 85: Espectro de massas de alta resolução do derivado **10**.



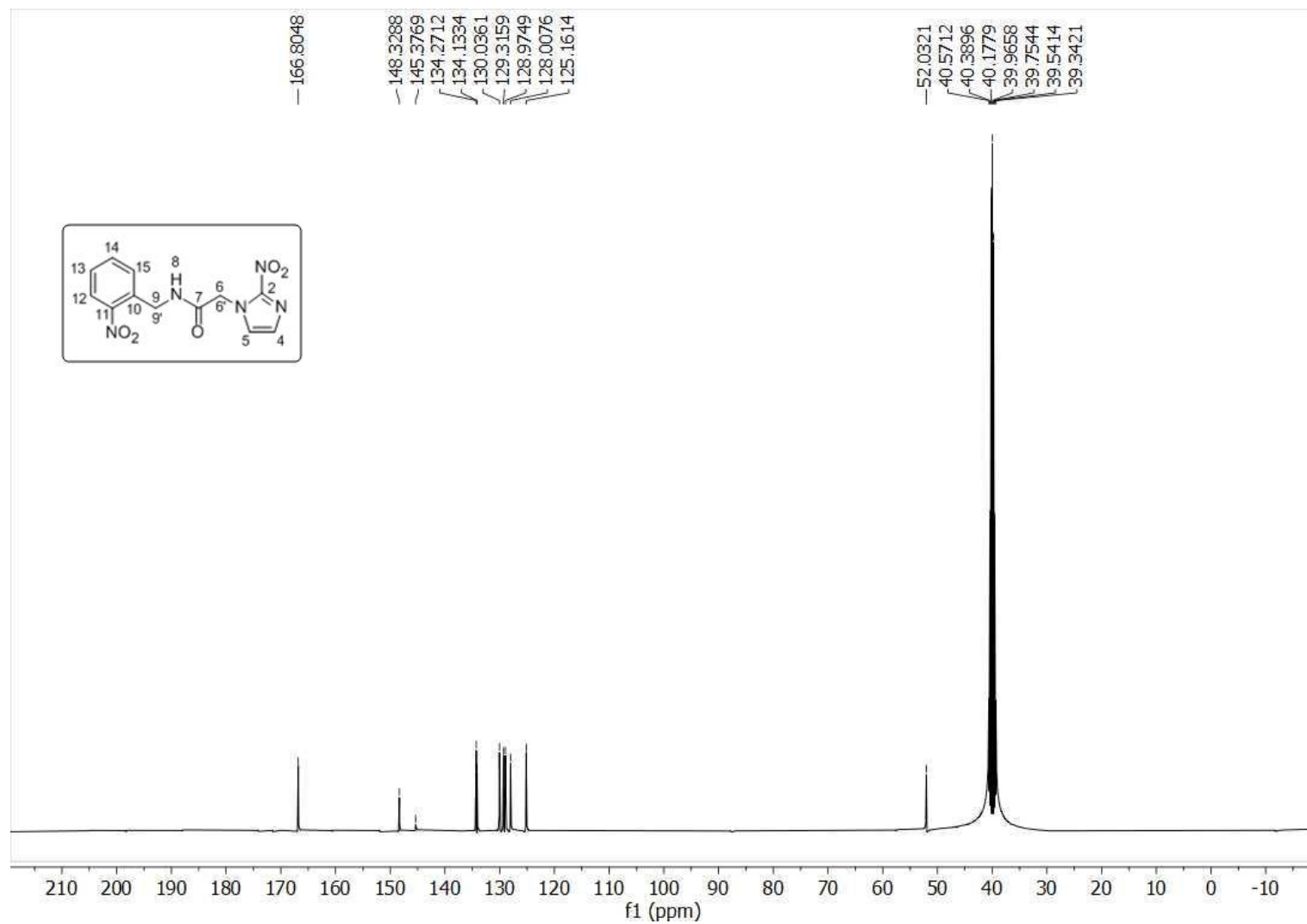
Espectro 86: Espectro de infravermelho do derivado 10.



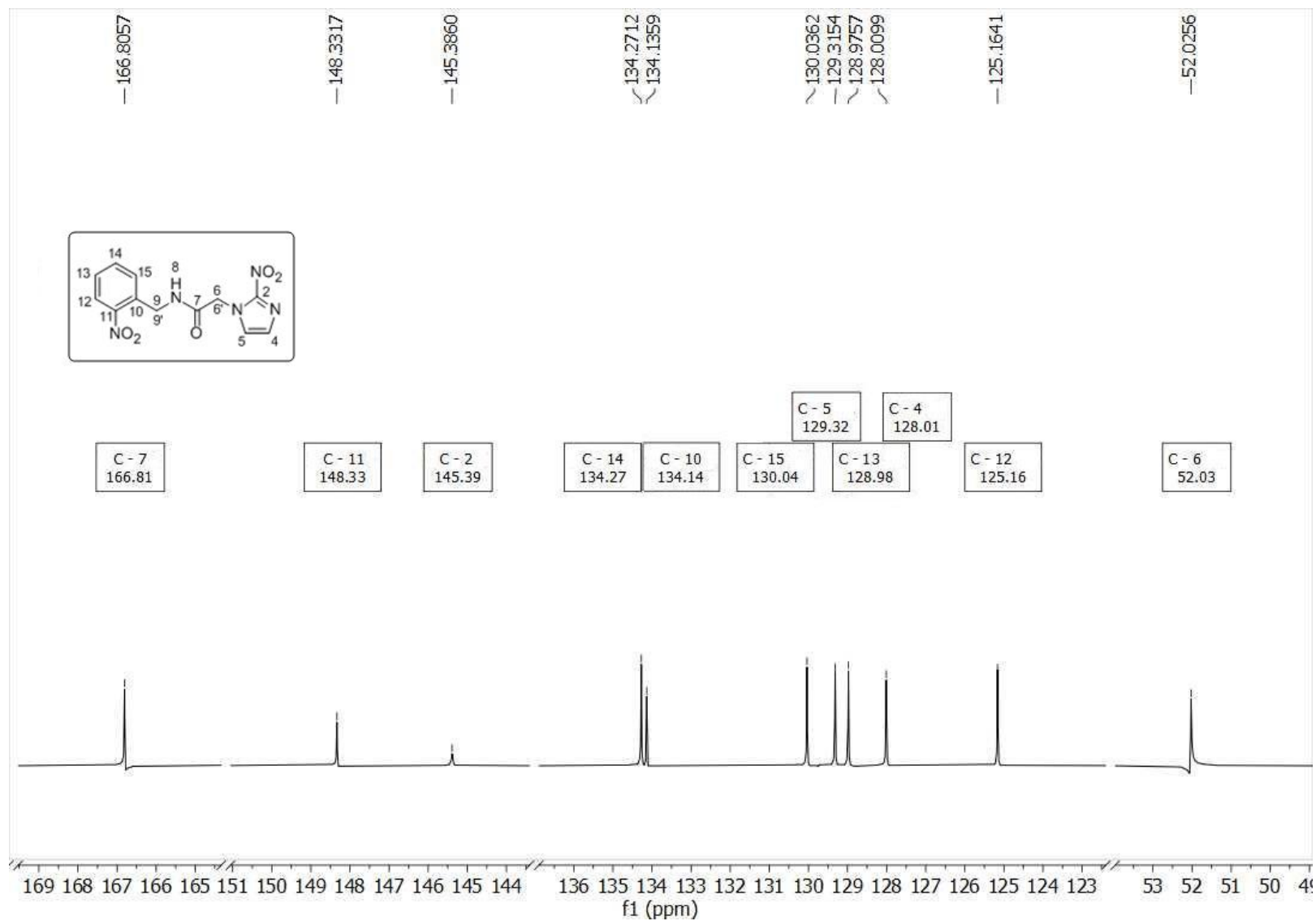
Espectro 87: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO-d_6) do derivado **10**.



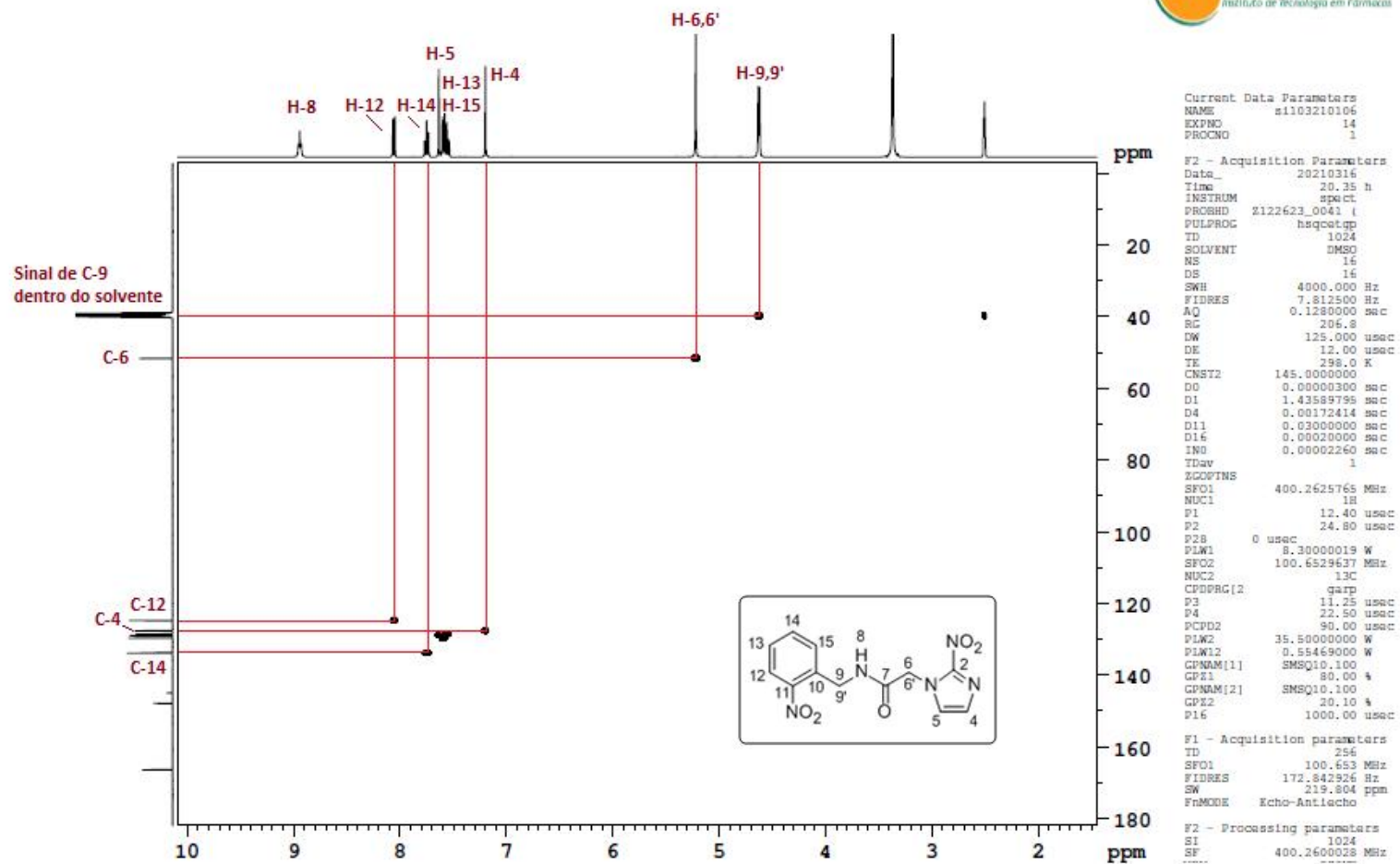
Espectro 88: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **10**.



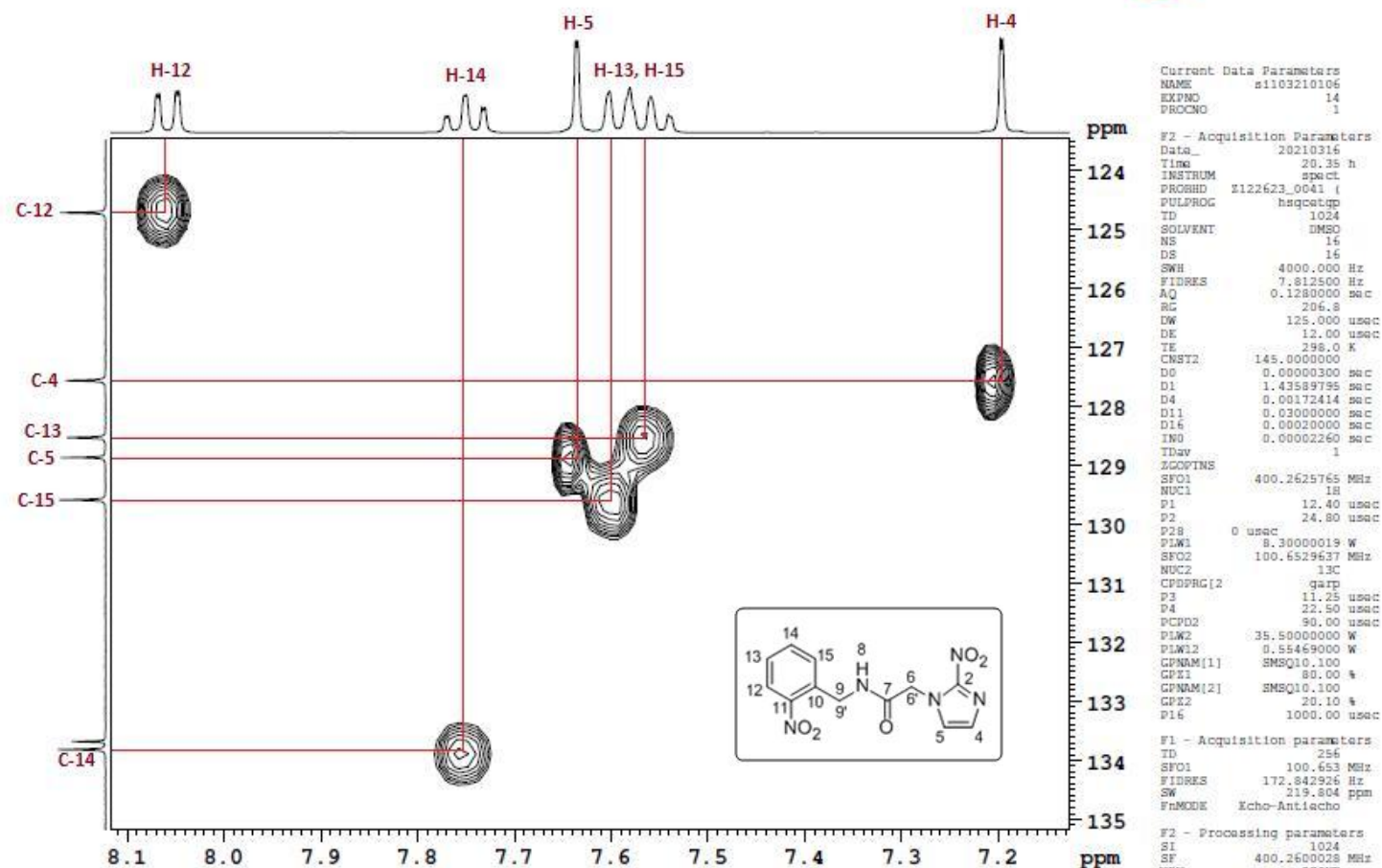
Espectro 89: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **10**.



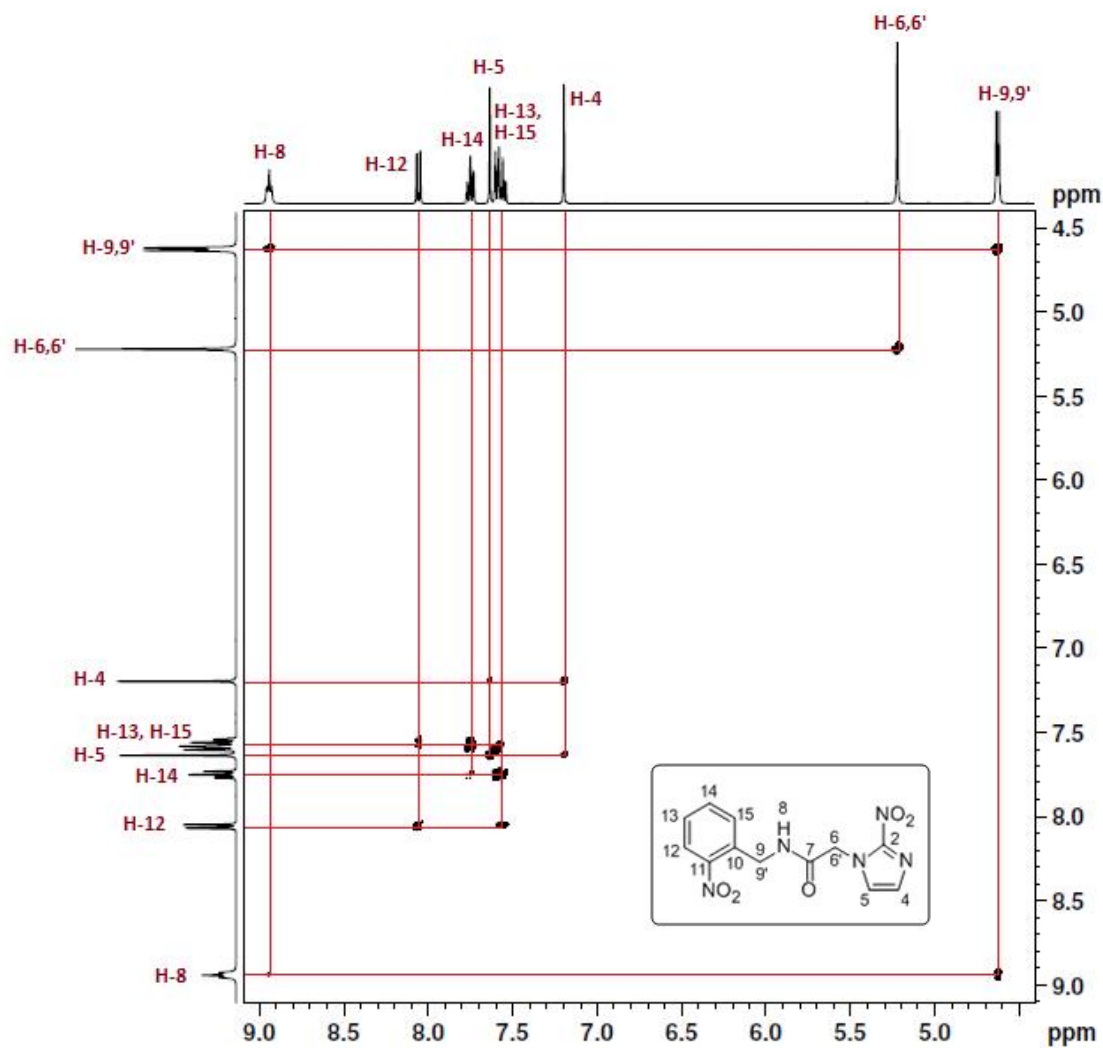
Espectro 90: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **10**.



Espectro 91: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 10.



Espectro 92: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 10.



Current Data Parameters
 NAME s1103210106
 EXPNO 13
 PROCNO 1

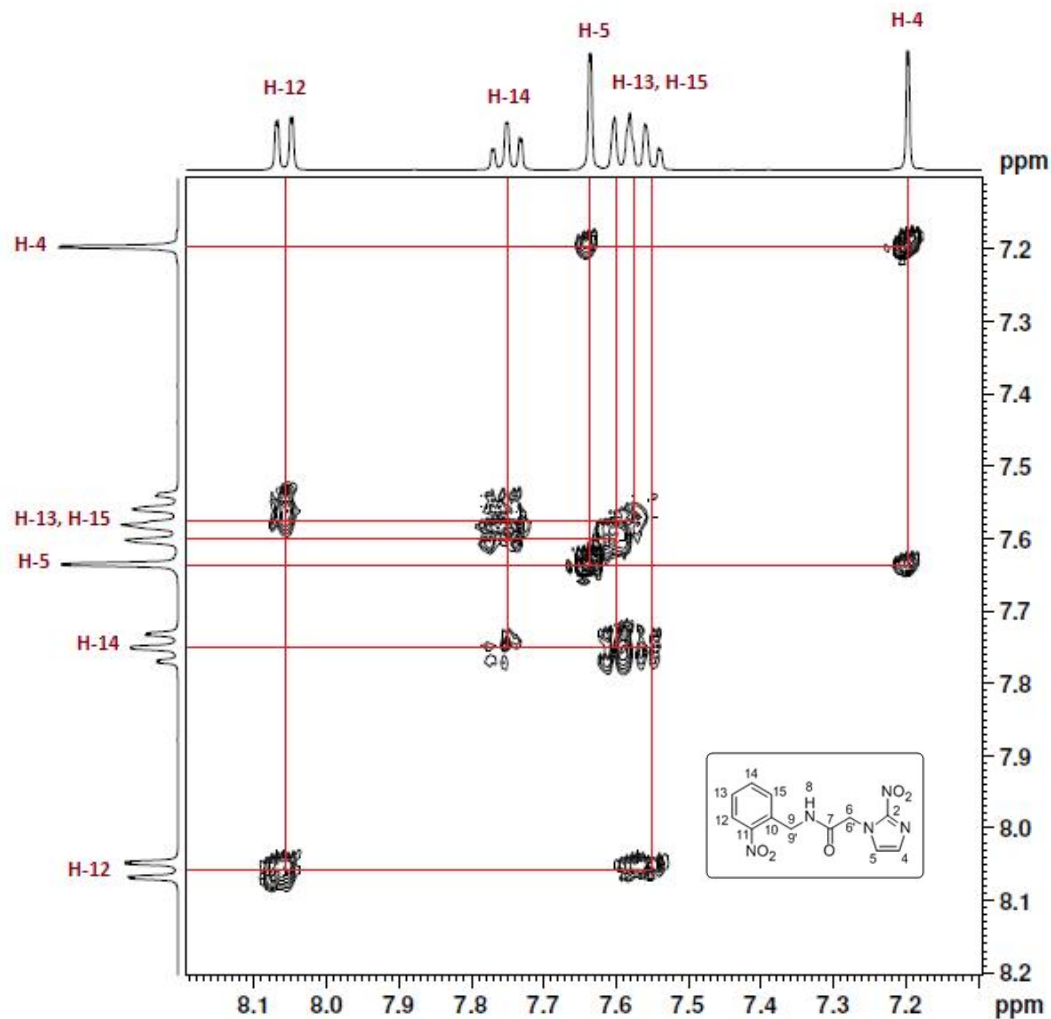
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20210316
 Time 18.35 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z122623_0041 (4
 PULPROG cosygpqf
 TD 2048
 SOLVENT DMSO
 NS 16
 DS 8
 SWH 3048.781 Hz
 FIDRES 2.977325 Hz
 AQ 0.3358720 sec
 RG 53.19
 DW 164.000 usec
 DE 12.00 usec
 TE 298.0 K
 D0 0.00000300 sec
 D1 1.34708297 sec
 D13 0.00000400 sec
 D16 0.00020000 sec
 IN0 0.00032800 sec
 TDay 1
 SFO1 400.2624793 MHz
 NUC1 1H
 P0 12.40 usec
 P1 12.40 usec
 PLW1 8.39000019 W
 GPMAM[1] SMSQ10.100
 GPX1 10.00 %
 P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
 TD 256
 SFO1 400.2625 MHz
 FIDRES 23.818598 Hz
 SW 7.617 ppm
 FmMODE QF

F2 - Processing parameters
 SI 2048
 SF 400.260062 MHz
 WDW QSINE
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 0.60

F1 - Processing parameters
 SI 1024
 MC2 QF
 SF 400.260077 MHz
 WDW QSINE
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0

Espectro 93: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 10.



Current Data Parameters
NAME s1103210106
EXPNO 13
PROCNO 1

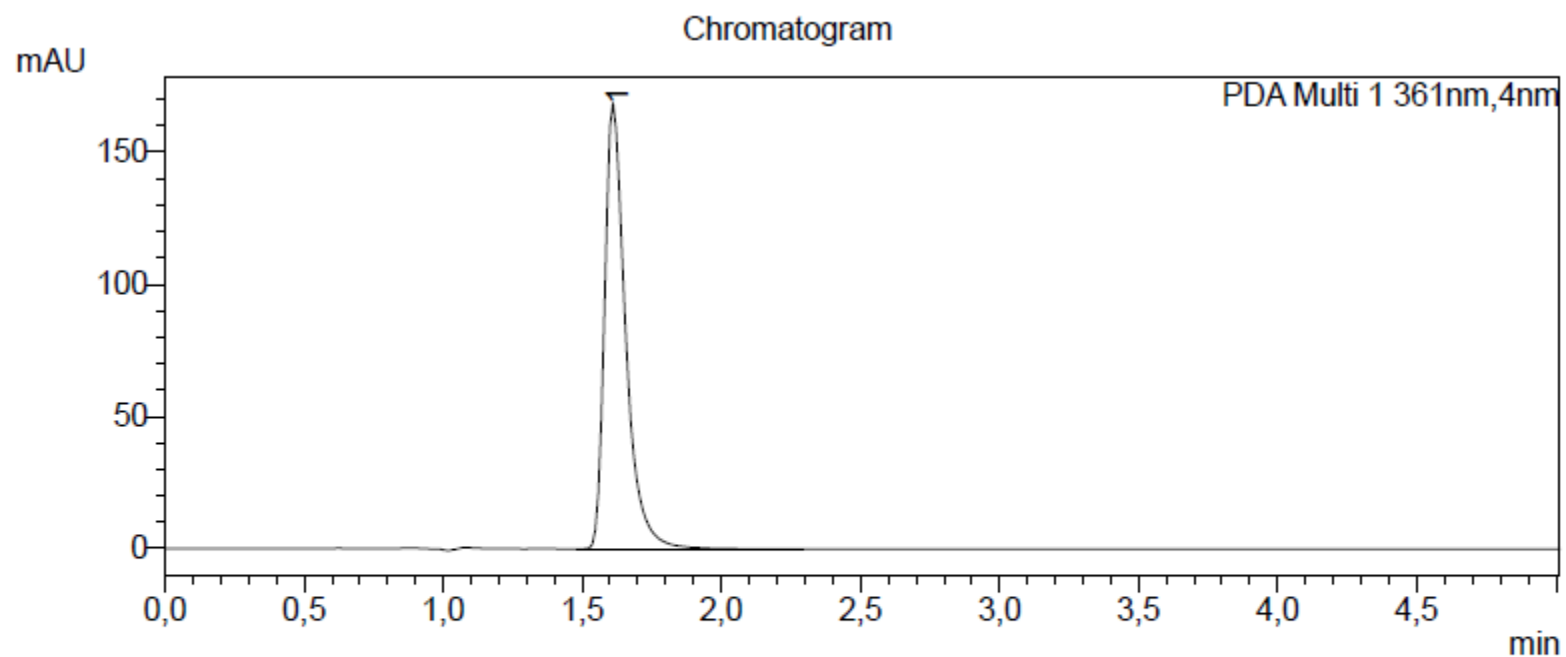
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20210316
Time 18.35 h
INSTRUM spect
PROBHD Z122623_0041 (PULPROG cosygpgz)
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 8
SWH 3048.781 Hz
FIDRES 2.977325 Hz
AQ 0.3358720 sec
RG 53.19
DW 164.000 usec
DE 12.00 usec
TE 298.0 K
D0 0.00000300 sec
D1 1.34708297 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
IN0 0.00032800 sec
TD0V 1
SFO1 400.2624793 MHz
NUC1 1H
P0 12.40 usec
P1 12.40 usec
PLW1 8.30000019 W
GPNAM[1] SMSQ10.100
CPE1 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 256
SFO1 400.2625 MHz
FIDRES 23.818598 Hz
SW 7.617 ppm
FnmODE QF

F2 - Processing parameters
SI 2048
SF 400.2600062 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 0.60

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 400.2600077 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Espectro 94: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 10.

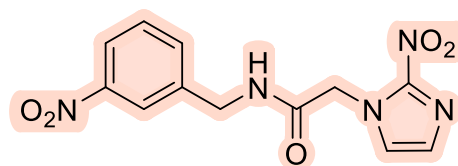


Peak Table

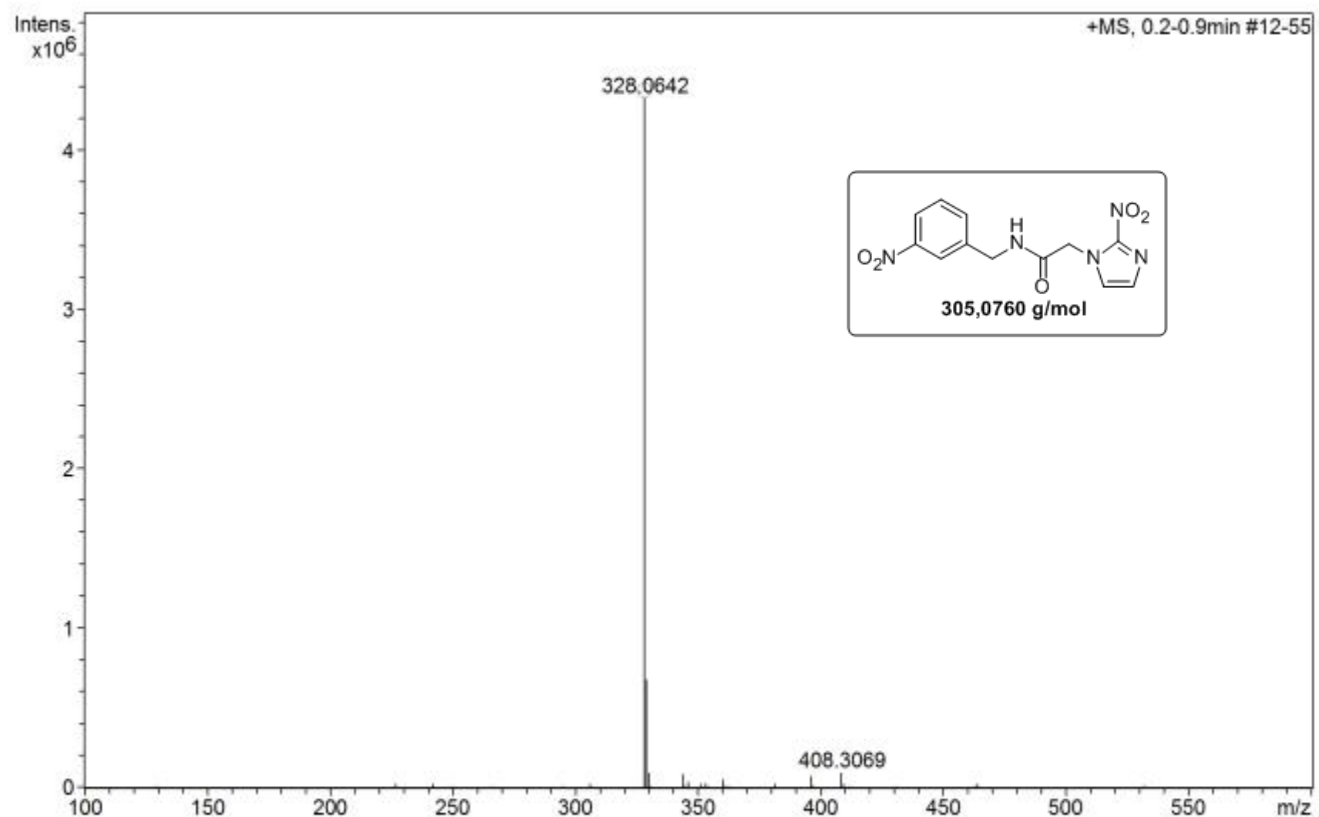
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,61		888230	100,0	11643	1,535	–	–
Total			888230	100,0				

Cromatograma 10: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **10**.

2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)-N-(3-nitrobenzil)acetamida (11)

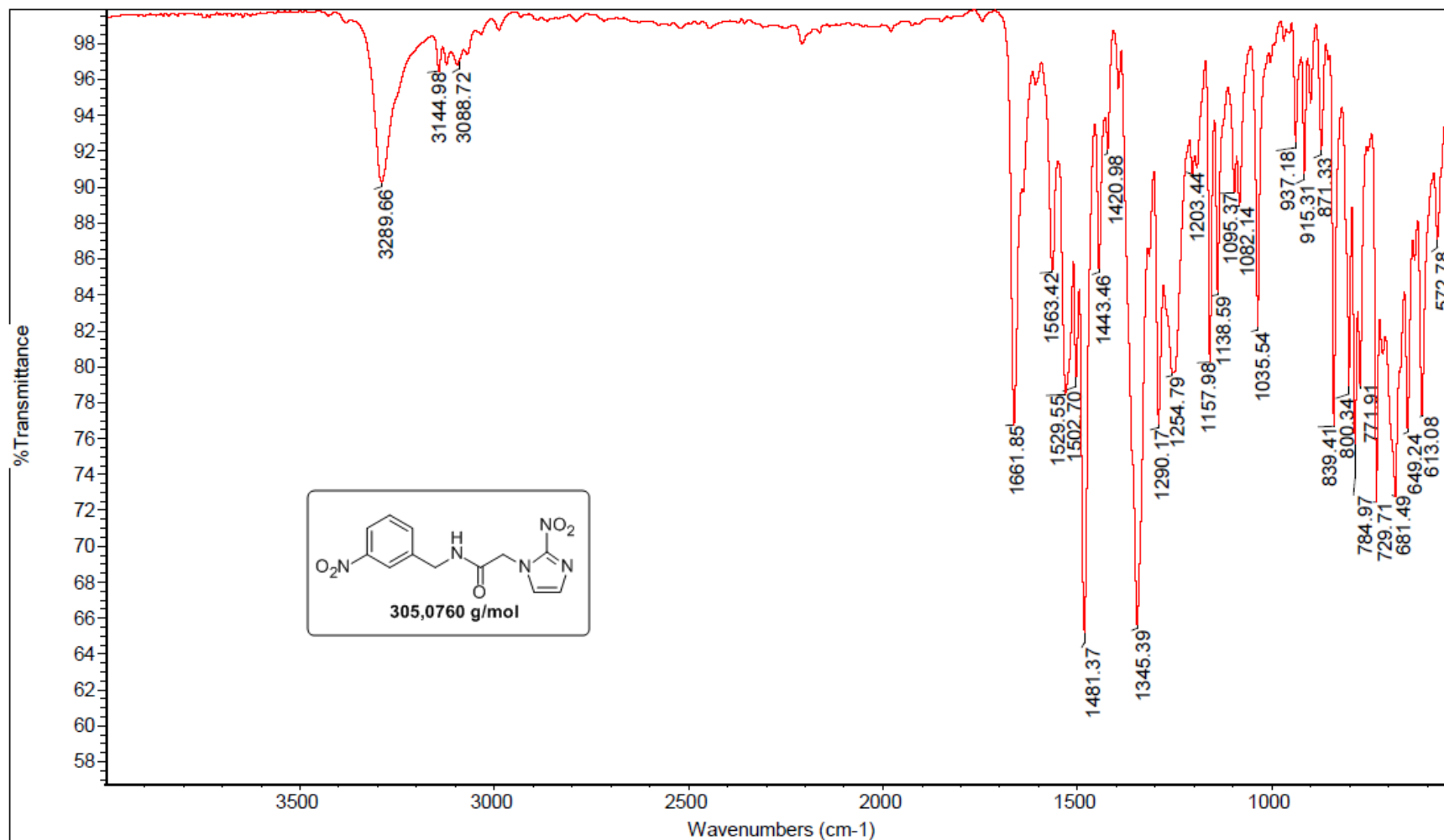


+MS, 0.2-0.9min #12-55

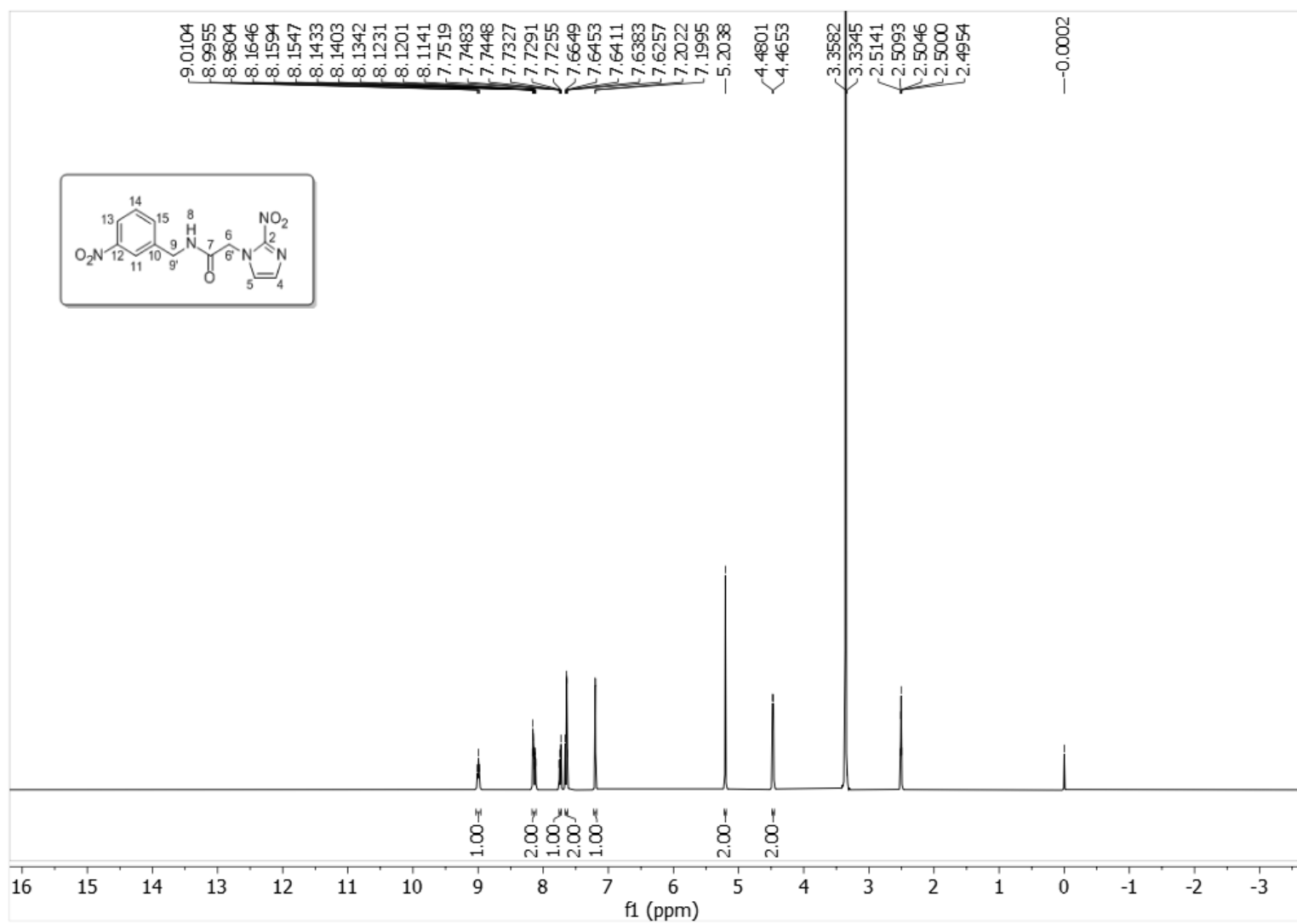


Meas. m/z # Ion Formula	m/z err [ppm]	Mean err rdb N-Rule e ⁻ Conf mSigma Std I Std	Mean m/z Std I VarNorm Std m/z Diff	Std Comb Dev
328.064187 1 C12H11N5NaO5	328.065239 3.2	3.5 9.5 ok even 2.9 5.4	n.a. n.a. n.a.	n.a.
2 C11H15NNaO9	328.063902 -0.9	-0.0 4.5 ok even 16.7 28.5	n.a. n.a. n.a.	n.a.

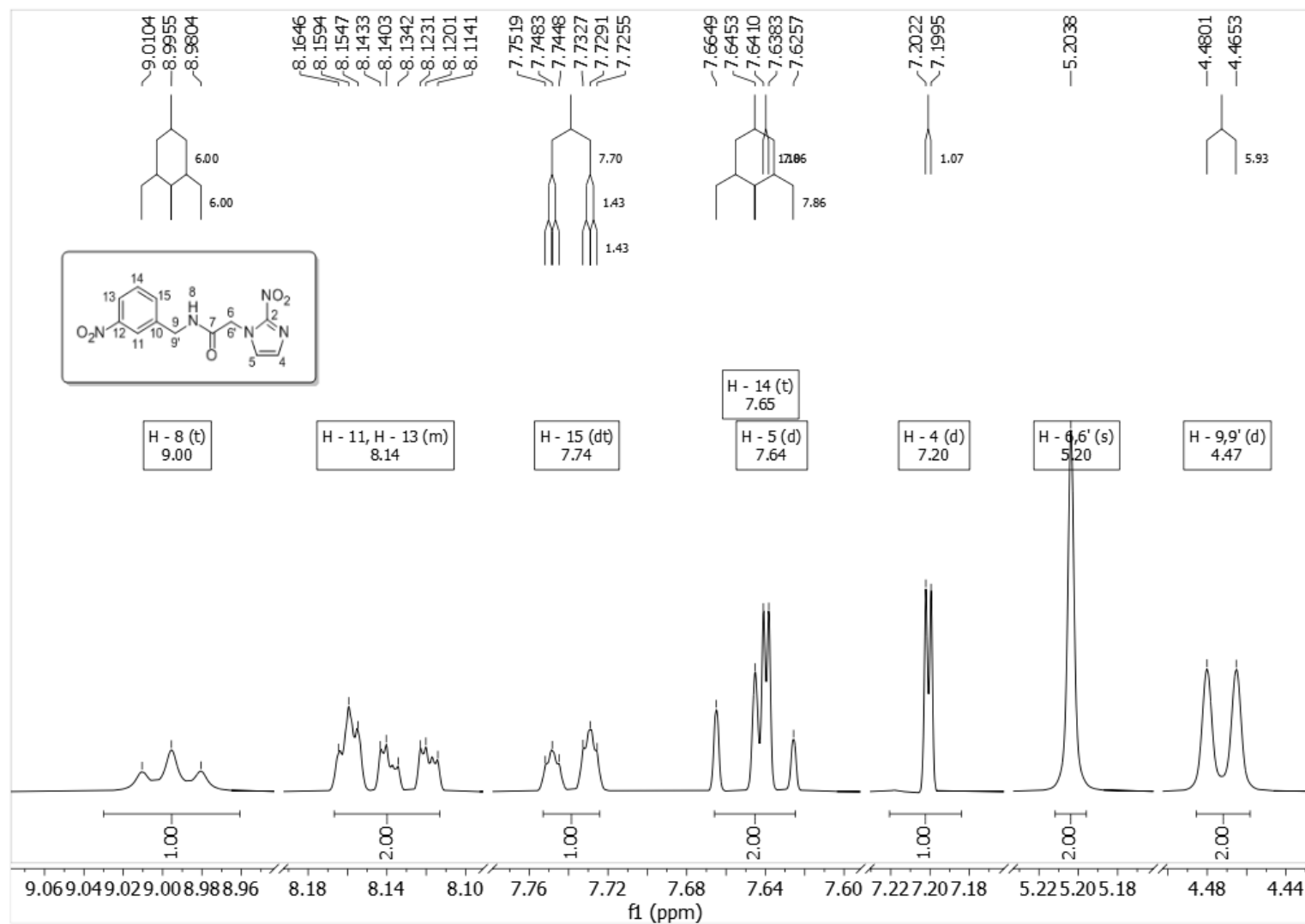
Espectro 95: Espectro de massas de alta resolução do derivado **11**.



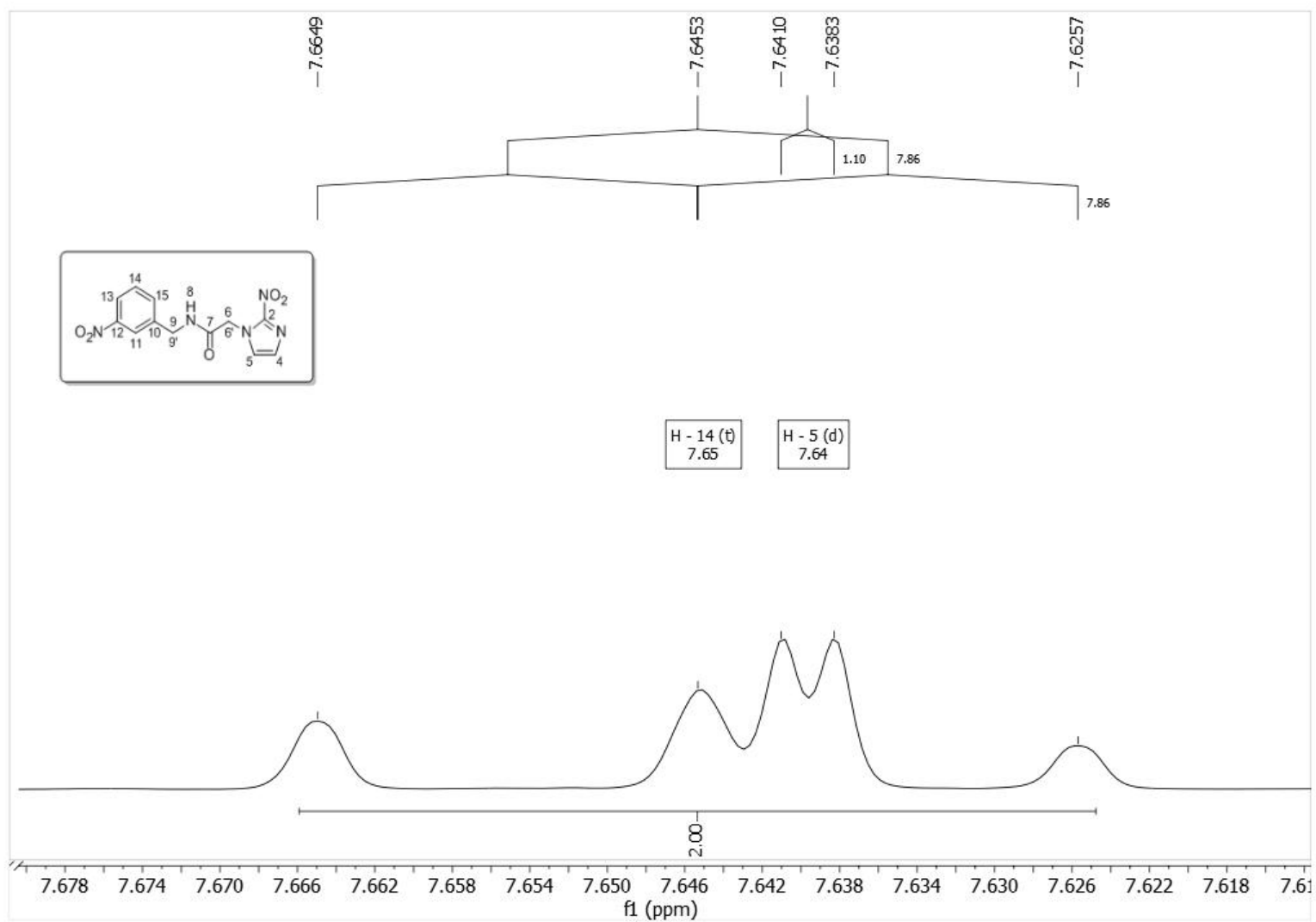
Espectro 96: Espectro de infravermelho do derivado **11**.



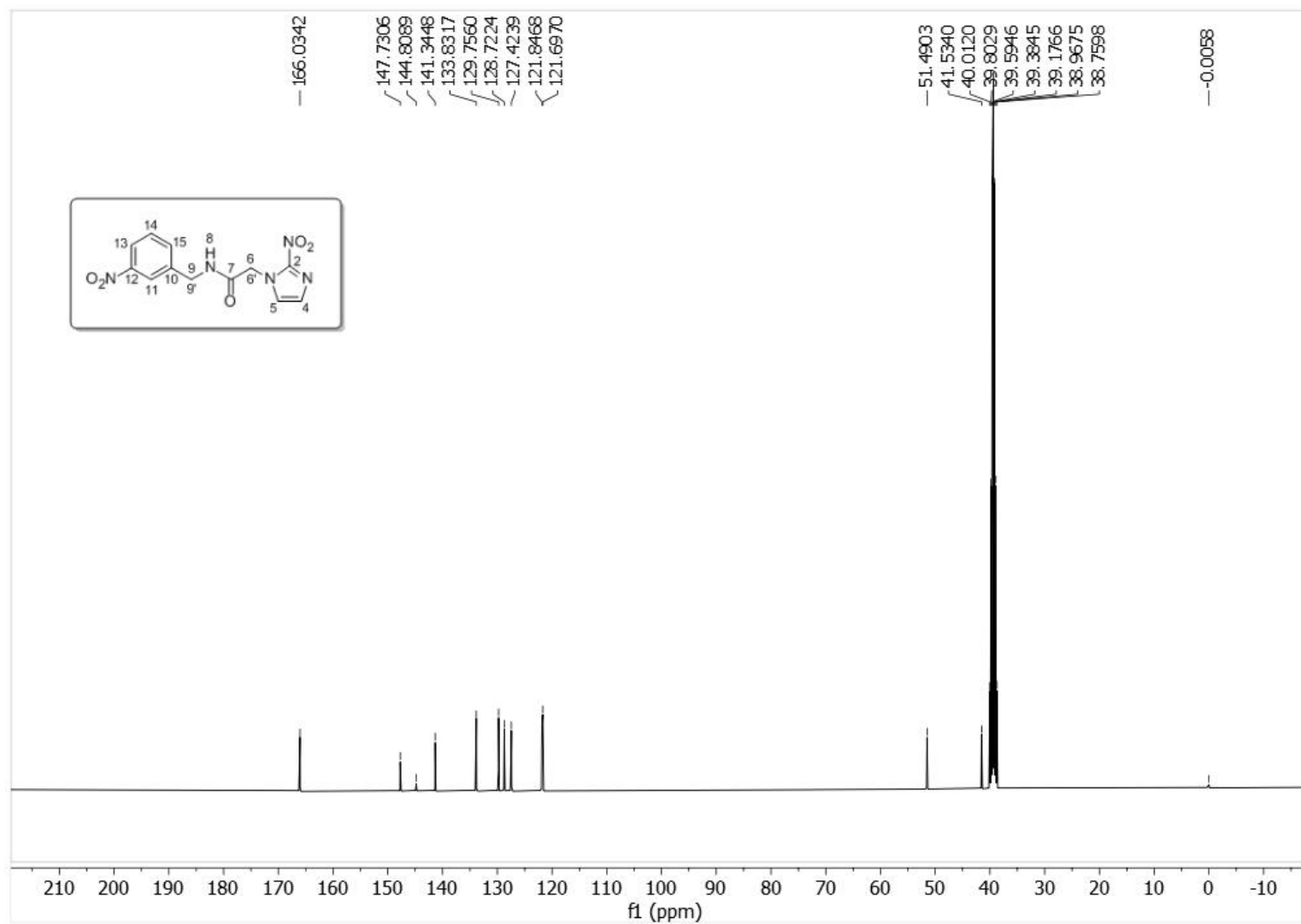
Espectro 97: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO-d_6) do derivado **11**.



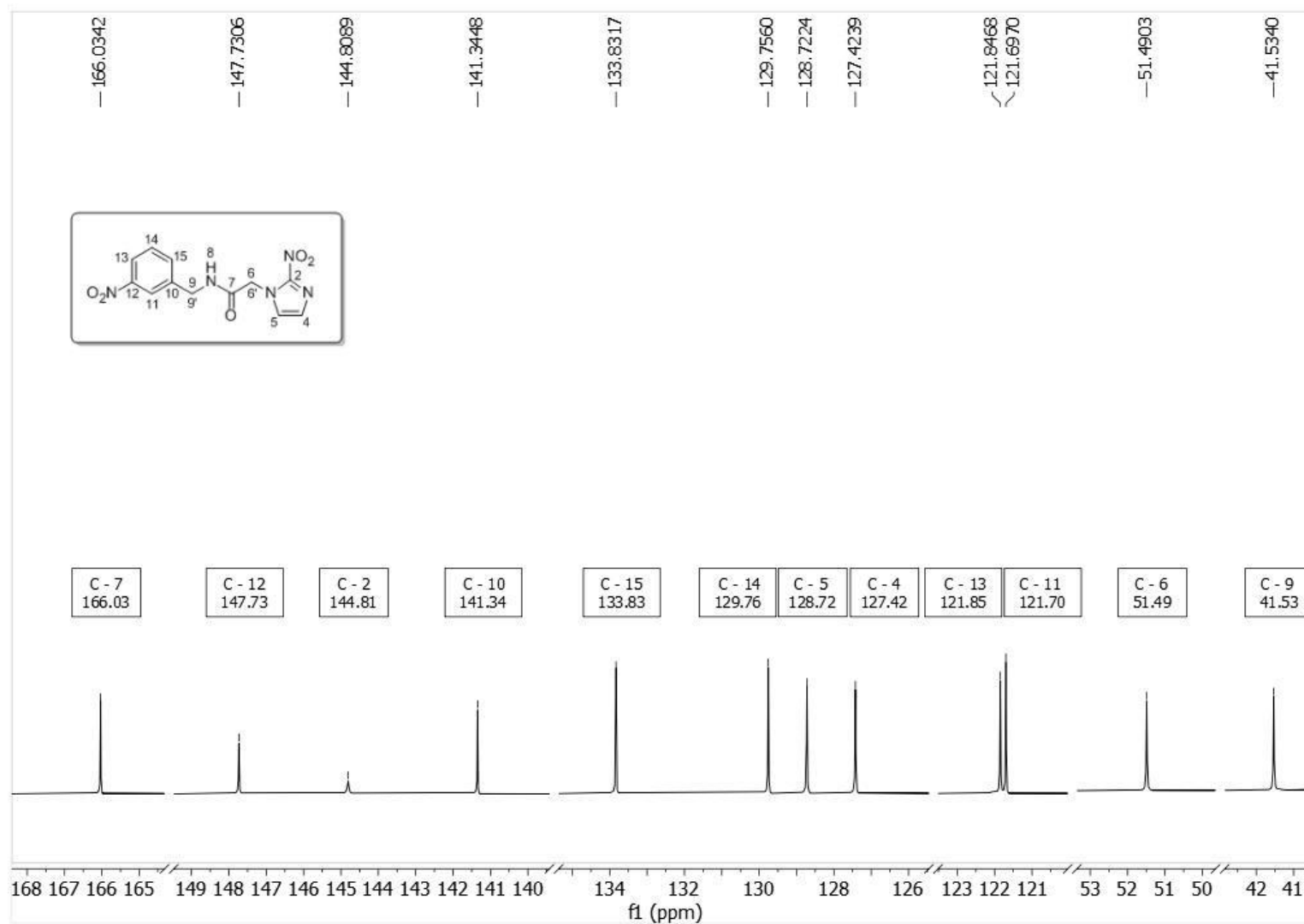
Espectro 98: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **11**.



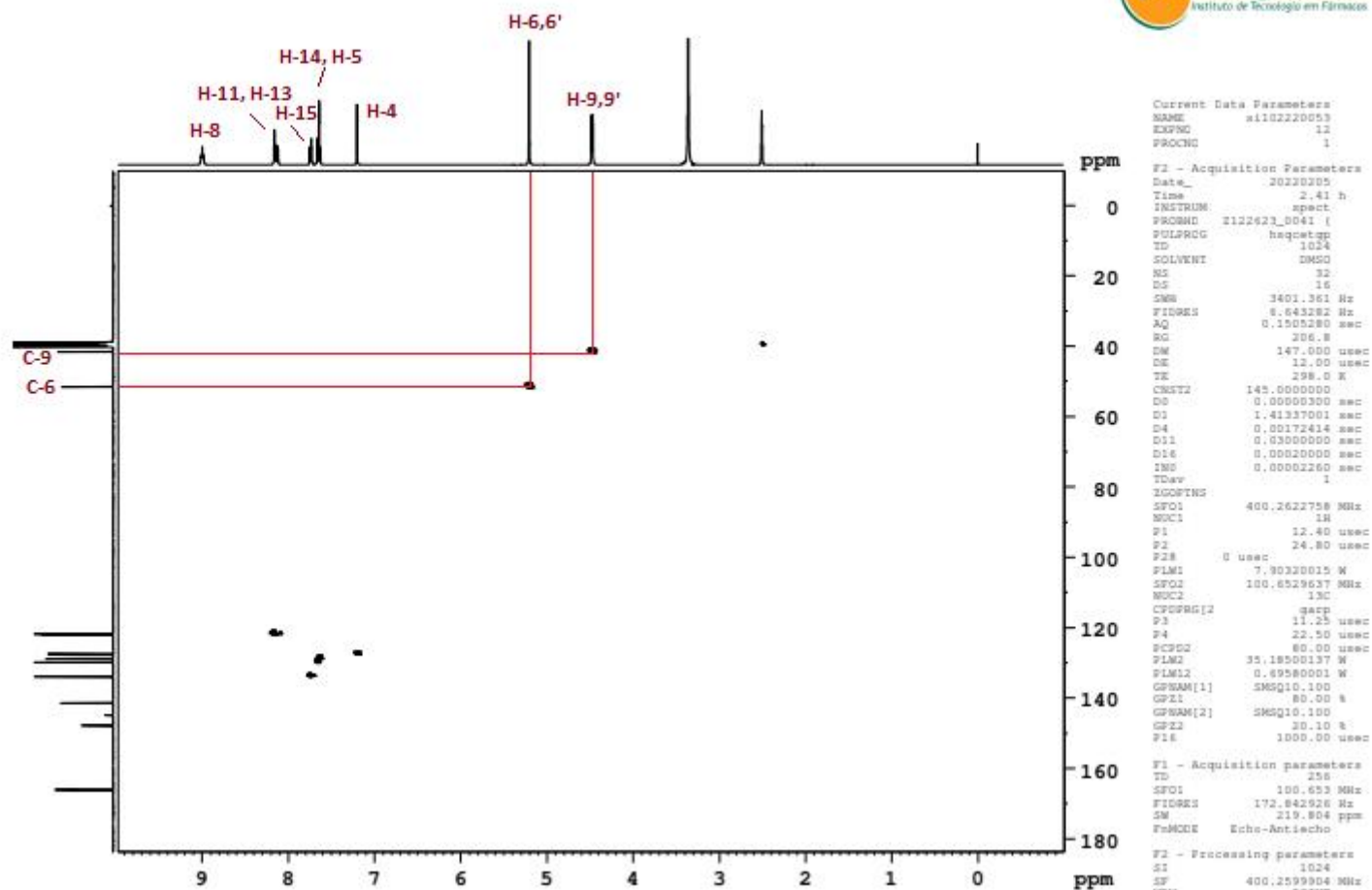
Espectro 99: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO-d_6) do derivado **11**.



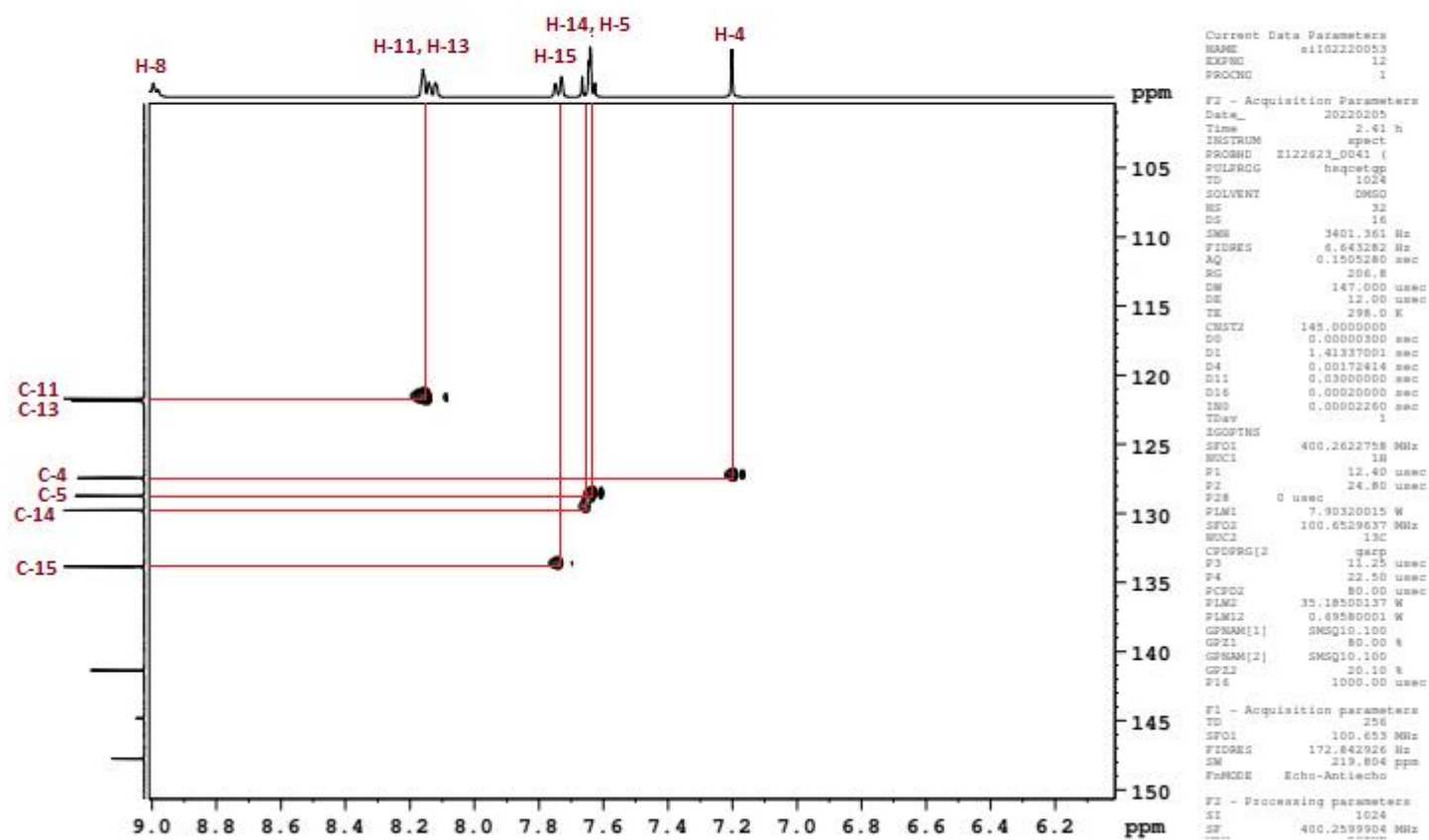
Espectro 100: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **11**.



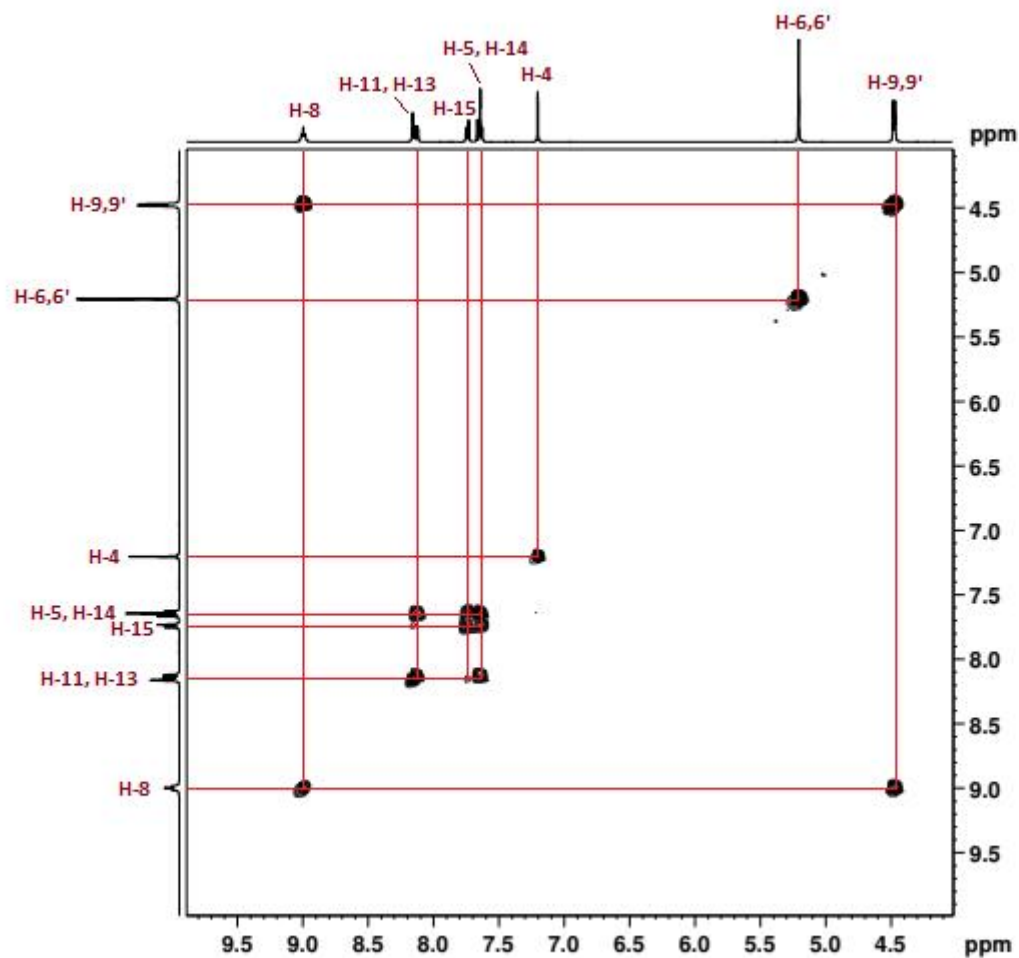
Espectro 101: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **11**.



Espectro 102: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 11.



Espectro 103: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 11.



```

Current Data Parameters
NAME      e1102220053
EXPNO     13
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20220207
Time      6.18 h
INSTRUM   spect
PROBHD    5122633_0041 (1)
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   DMSO
NS         32
DS         4
SWH        4807.692 Hz
FIDRES     4.695012 Hz
AQ         0.2129920 sec
RG         66.74
DM         104.000 usec
DE         12.00 usec
TE         298.2 K
D0         0.00000000 sec
D1         2.00000000 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00000000 sec
D13        0.00000000 sec
D16        0.00000000 sec
IND        0.00020800 sec
TDav       1
SFO1       400.2622014 MHz
NUC1       1H
PC         12.40 usec
P1         12.40 usec
P17        2500.00 usec
PLM1       7.90320015 W
PLM18      1.35020006 W
CPDPRG1    SMCQ10.100
GPR1       10.00 %
P16        1000.00 usec

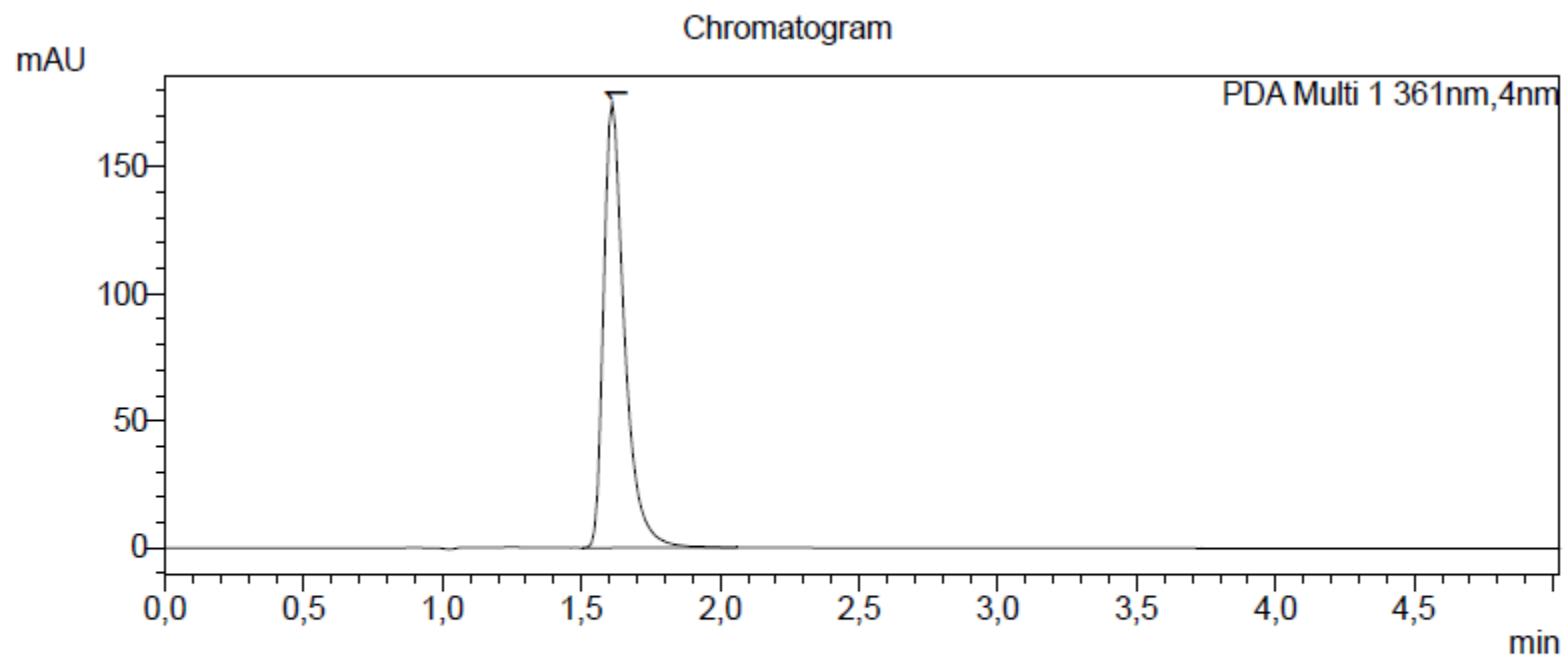
F1 - Acquisition parameters
TD         128
SFO1       400.2622 MHz
FIDRES     75.120193 Hz
SW         12.011 ppm
PRNAME     QF

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         400.2599862 MHz
WDW        QSHINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.40

F1 - Processing parameters
SI         32768
SF         400.2599862 MHz
WDW        QSHINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0

```

Espectro 104: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 11.

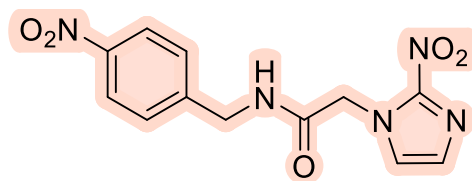


Peak Table

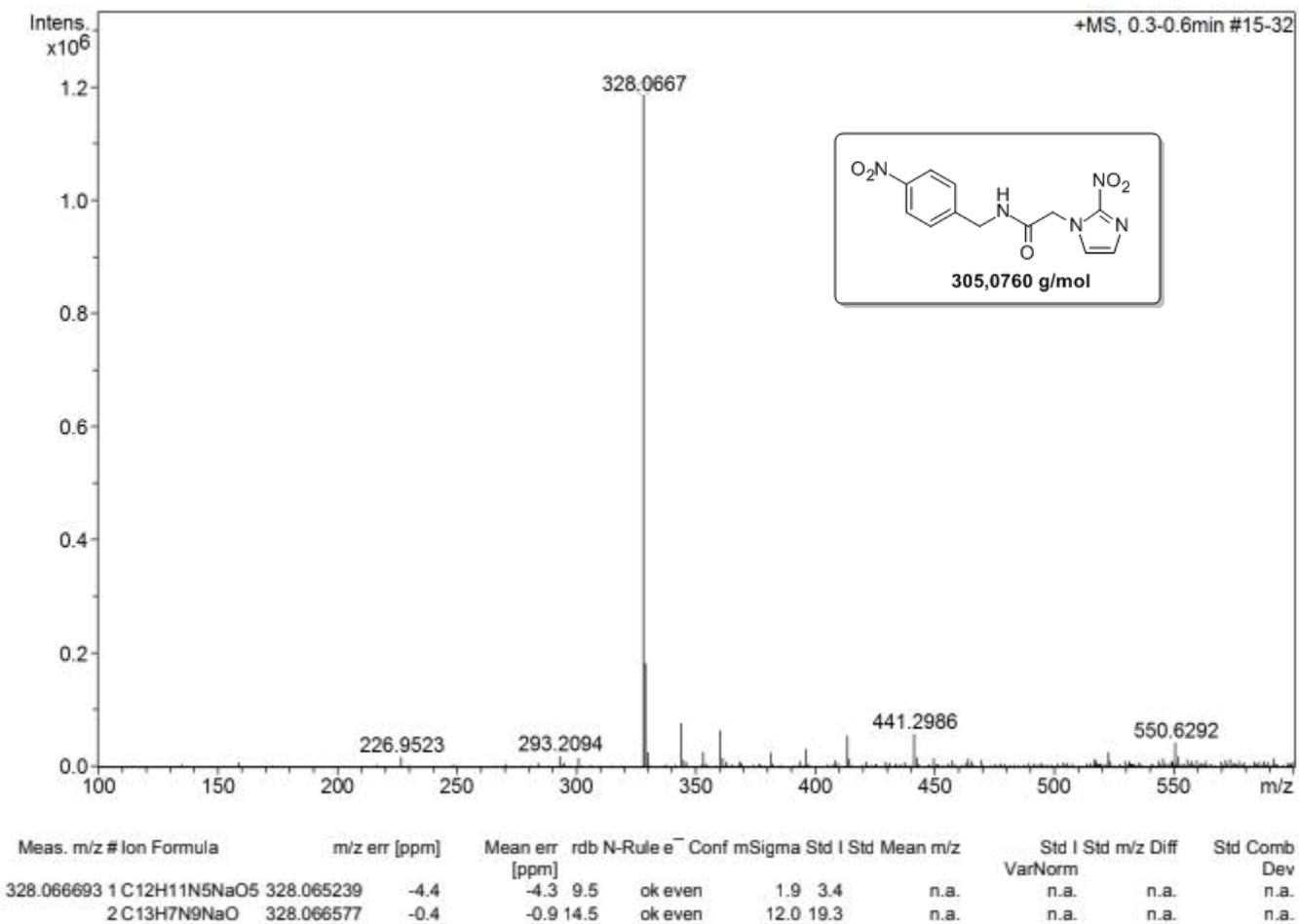
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,61		916348	100,0	11772	1,529	—	—
Total			916348	100,0				

Cromatograma 11: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **11**.

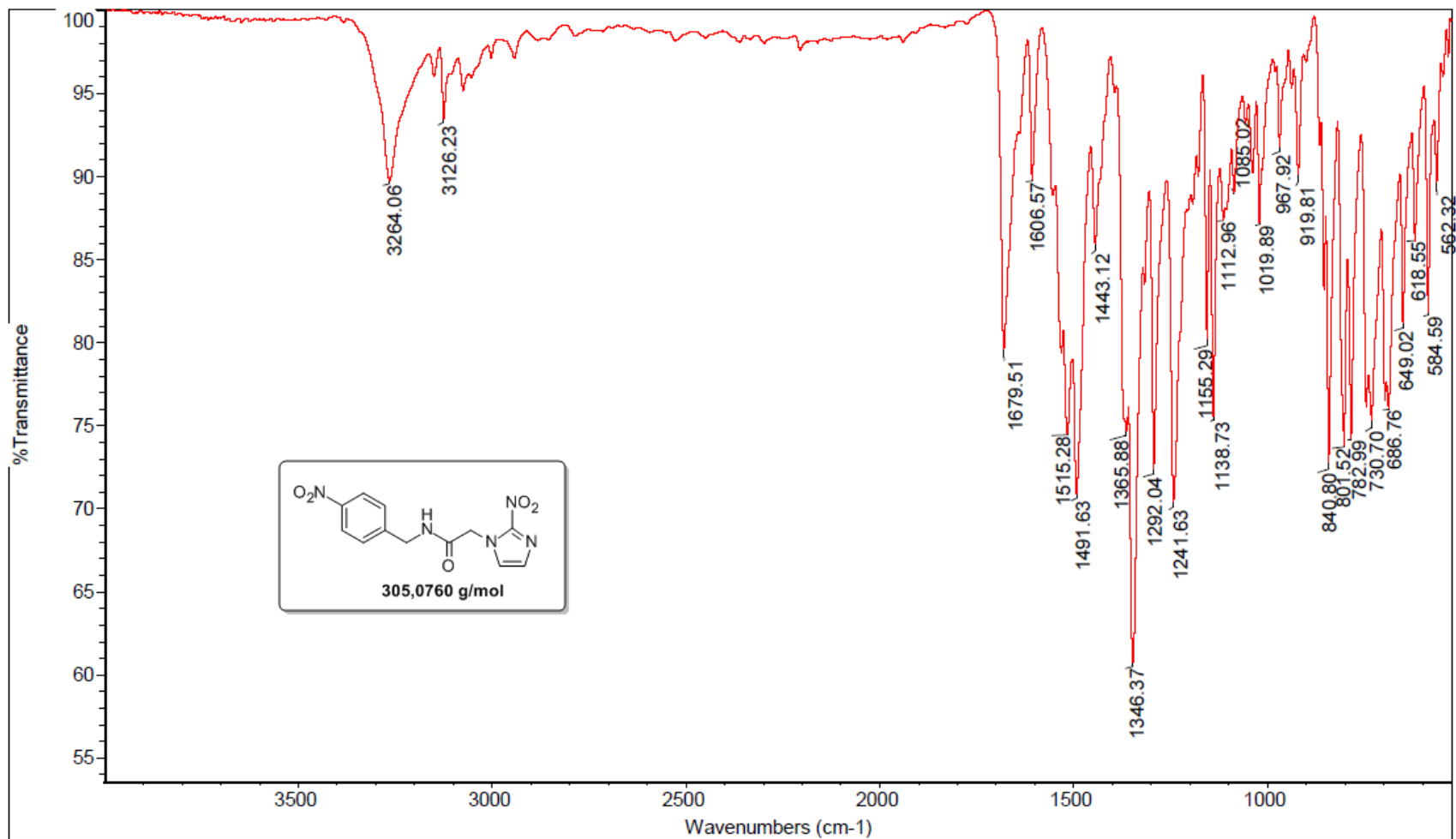
2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)-N-(4-nitrobenzil)acetamida (12)



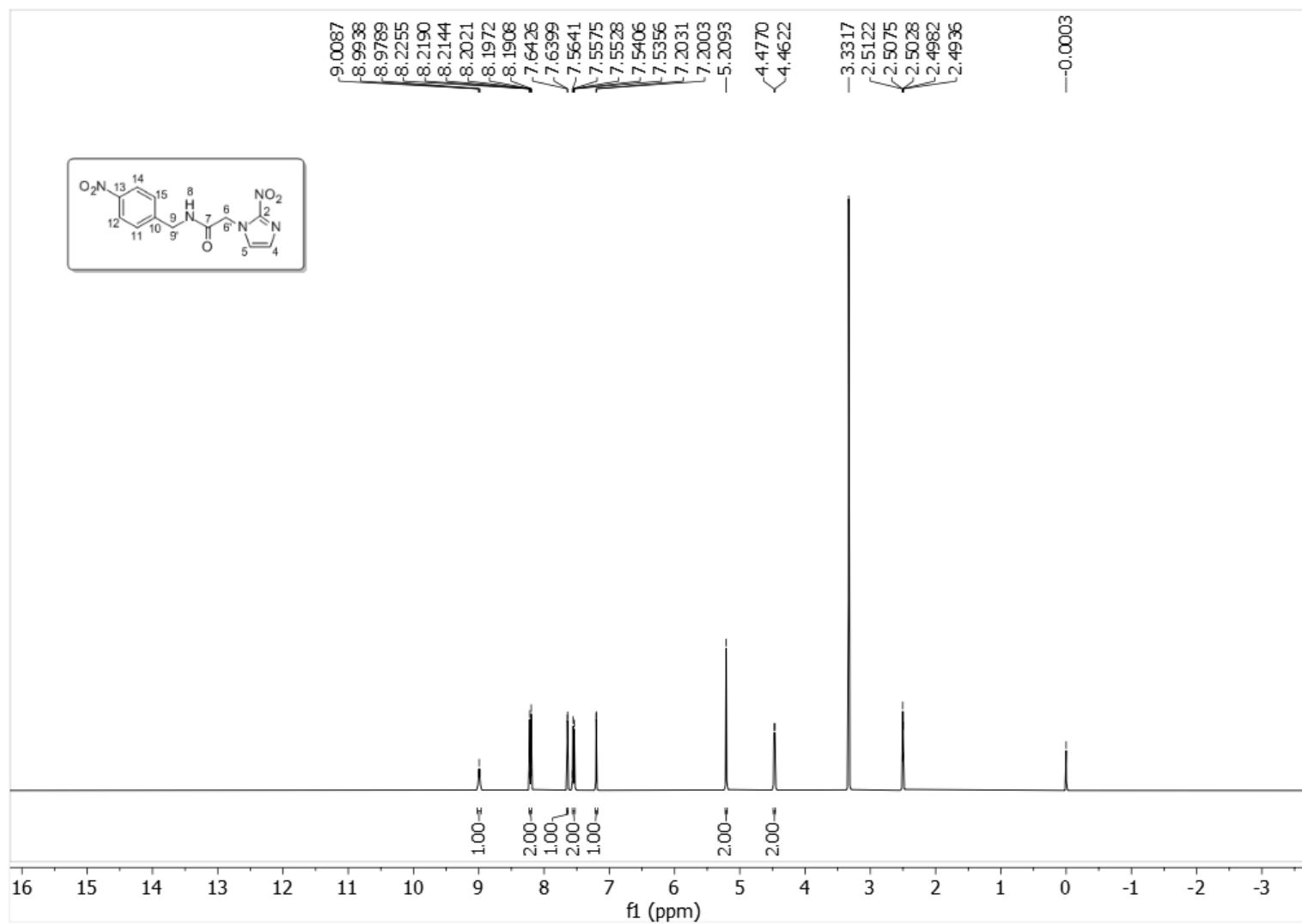
+MS, 0.3-0.6min #15-32



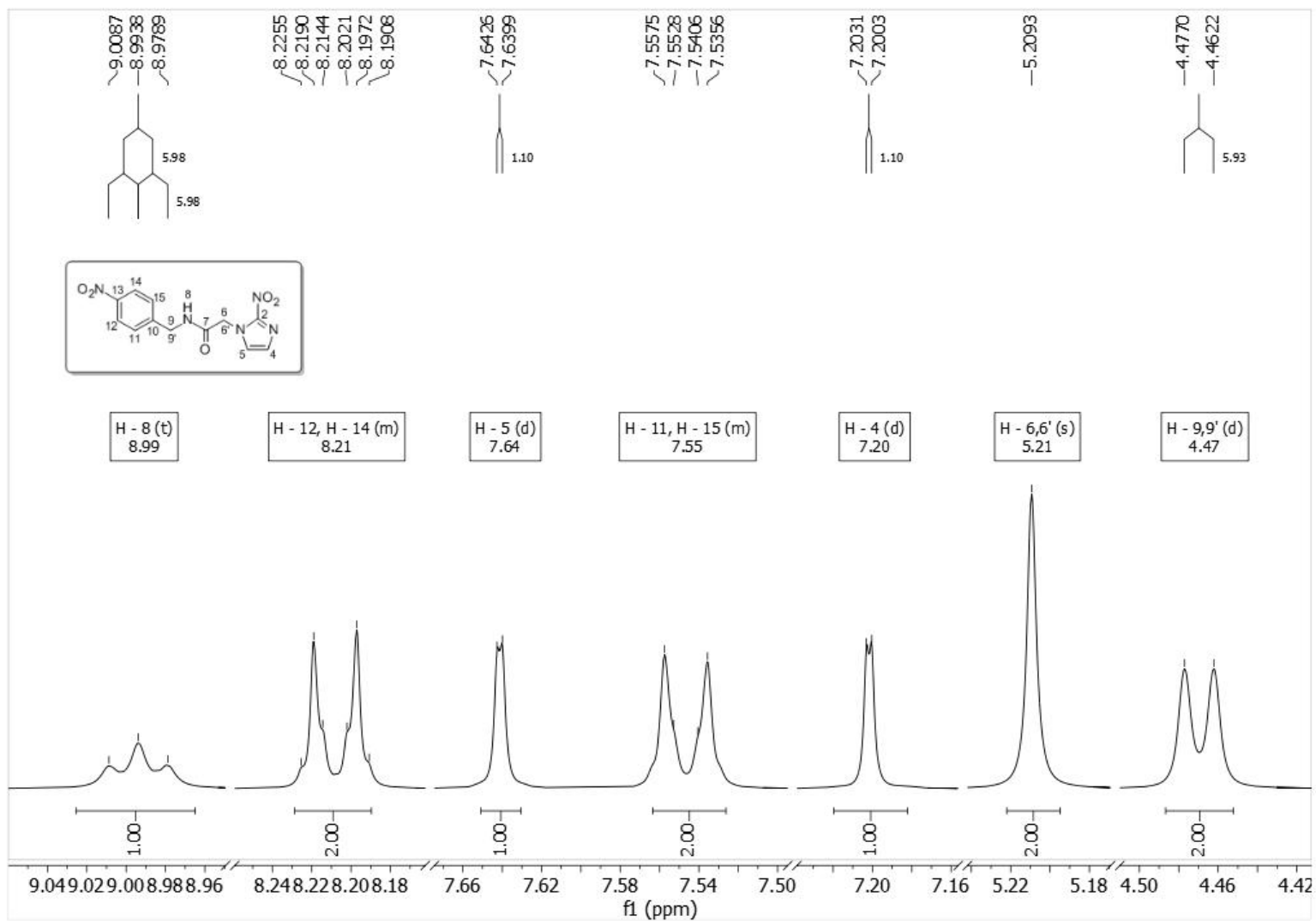
Espectro 105: Espectro de massas de alta resolução do derivado 12.



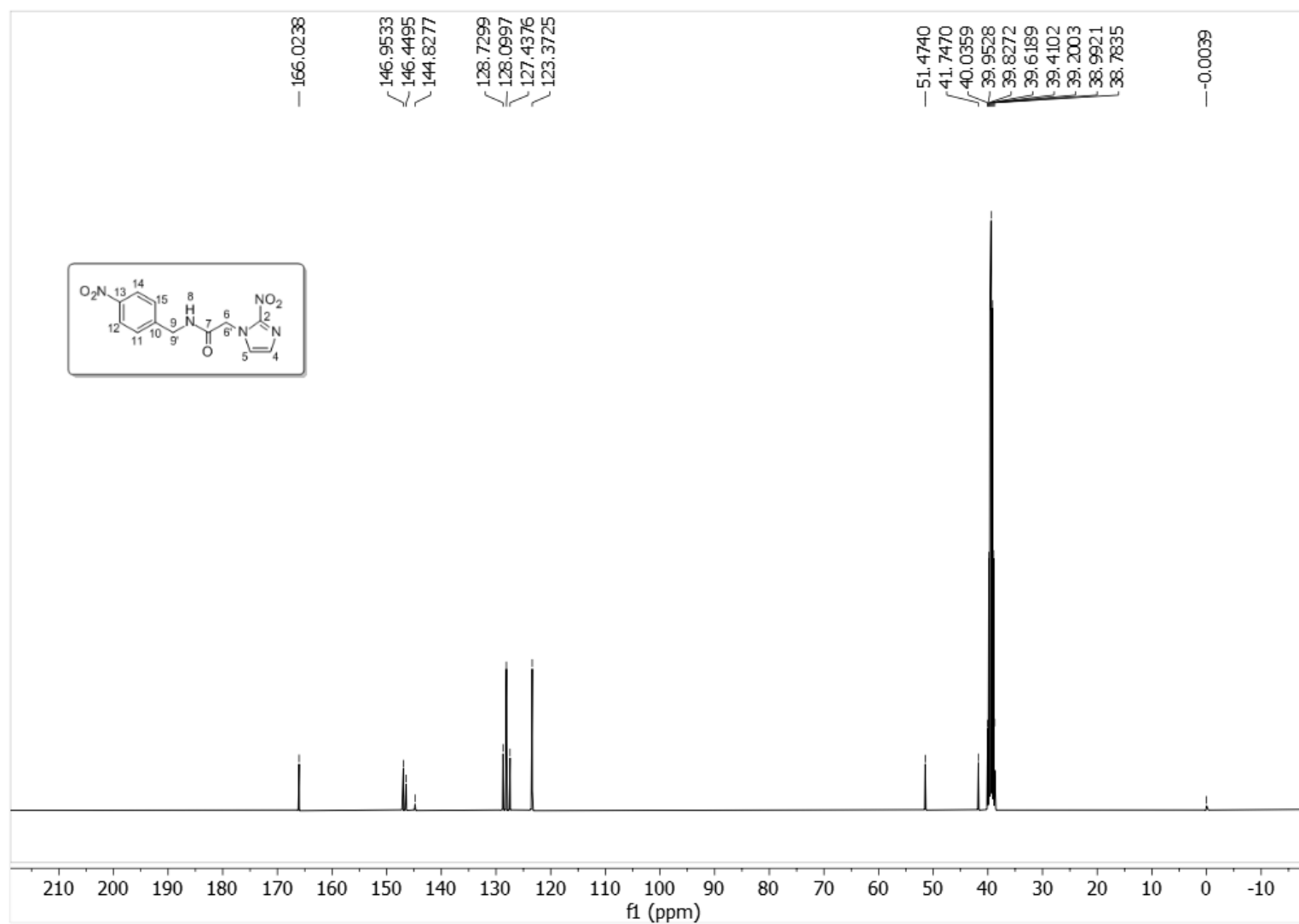
Espectro 106: Espectro de infravermelho do derivado **12**.



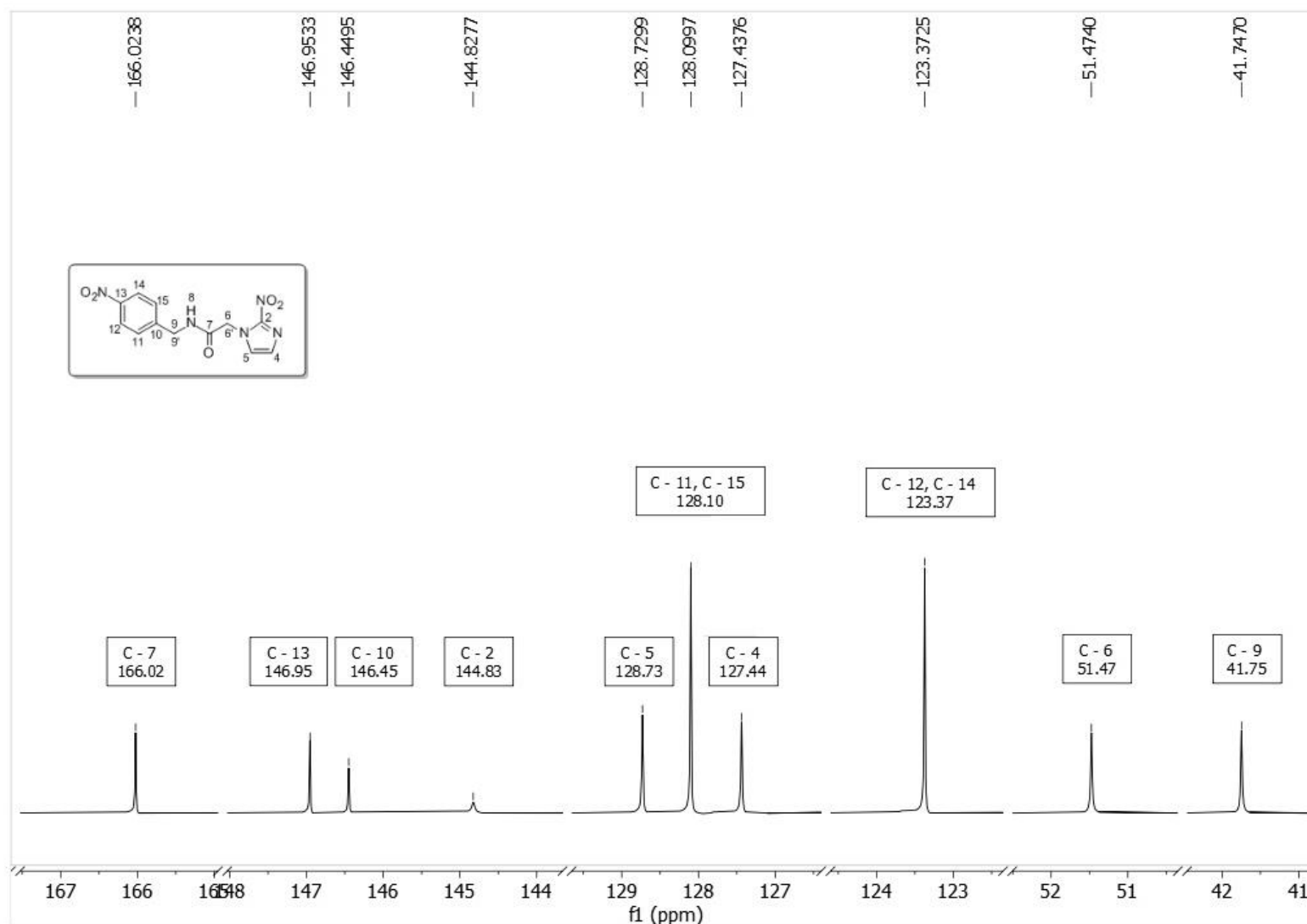
Espectro 107: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO-d_6) do derivado **12**.



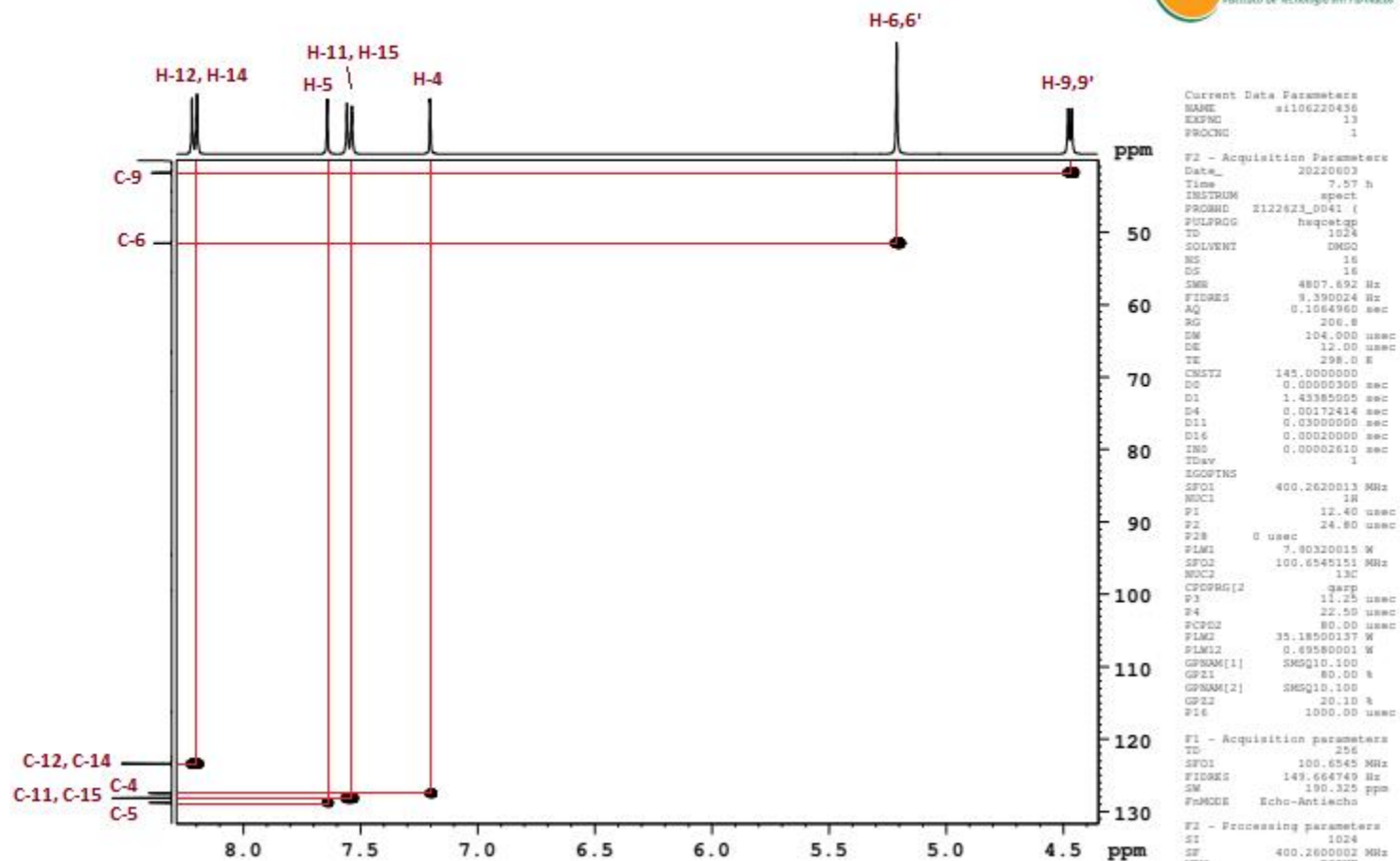
Espectro 108: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **12**.



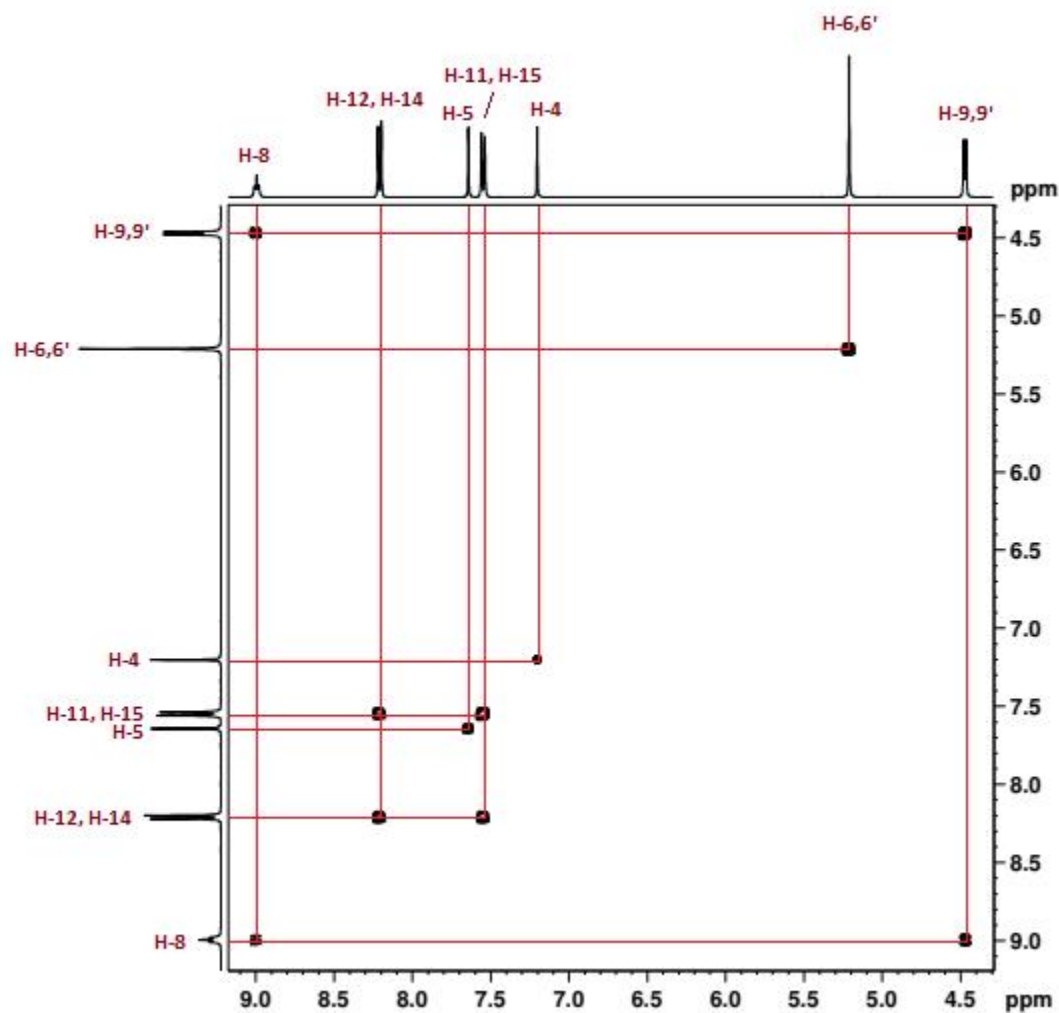
Espectro 109: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado 12.



Espectro 110: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **12**.



Espectro 111: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 12.



Current Data Parameters
NAME: n1106220438
EXPNO: 12
PROCNO: 1

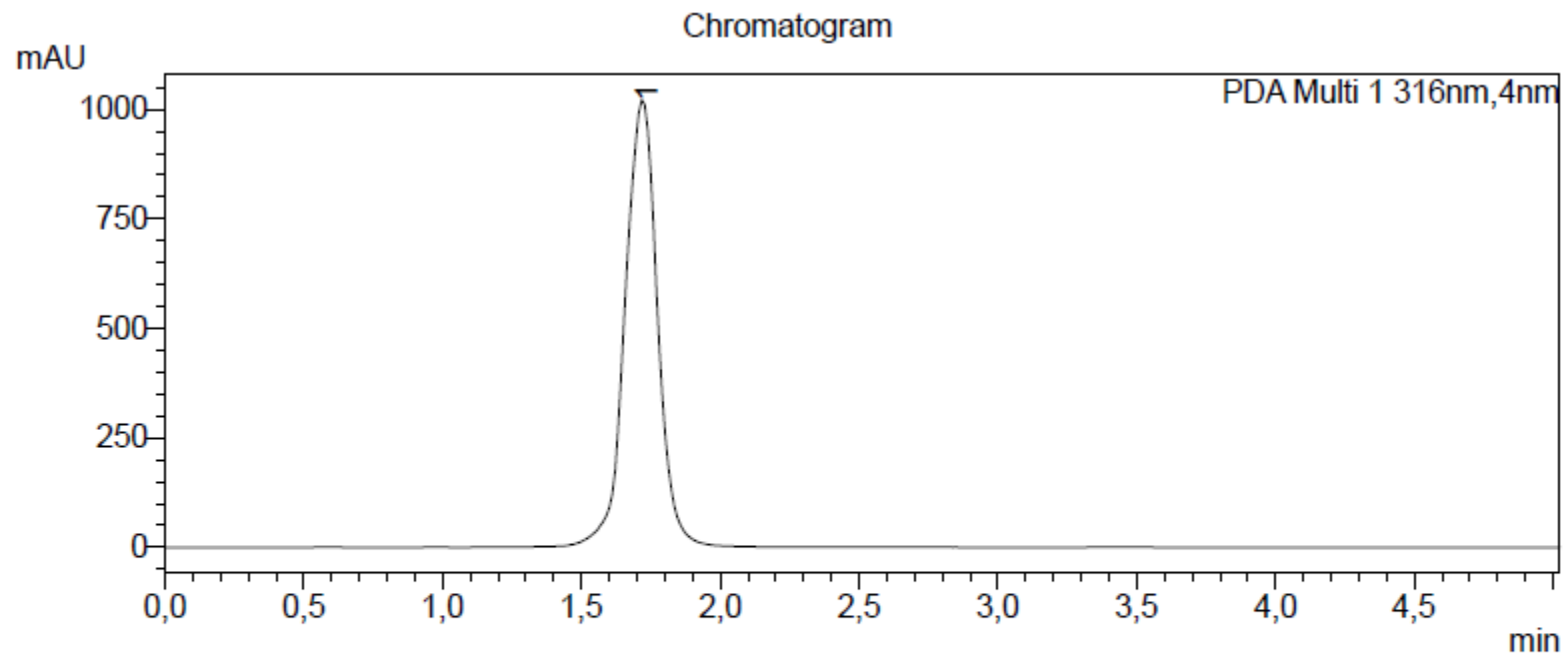
F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20220605
Time: 11:58 h
INSTRUM: spect
PROBHD: z122623_0041 (1
PULPROG: cosygpppgaf
TD: 2648
SOLVENT: DMSO
NS: 16
DS: 8
SWH: 4807.692 Hz
FIDRES: 4.695012 Hz
AQ: 0.2129920 sec
RG: 66.74
SFO: 104.000 usec
DE: 12.00 usec
TE: 298.0 K
D0: 0.0000000 sec
D1: 2.00000000 sec
D11: 0.00000000 sec
D12: 0.00002000 sec
D13: 0.00004000 sec
D16: 0.00020000 sec
IN0: 0.00020800 sec
TDav: 1
SFO1: 400.2622014 MHz
NUC1: 1H
P0: 12.40 usec
P1: 12.40 usec
P17: 2500.00 usec
PLM1: 7.90320015 W
PLM10: 1.35020004 W
GPMAM[1]: RMSQ10.100
GP11: 10.00 %
P16: 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD: 328
SFO1: 400.2622 MHz
FIDRES: 75.120193 Hz
SW: 12.011 ppm
F0M00E: QF

F2 - Processing parameters
SI: 1024
SF: 400.2599952 MHz
WDW: GSINE
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.40

F1 - Processing parameters
SI: 1024
MC2: QF
SF: 400.2599957 MHz
WDW: GSINE
SSB: 0 Hz
LB: 0
GB: 0

Espectro 112: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 12.



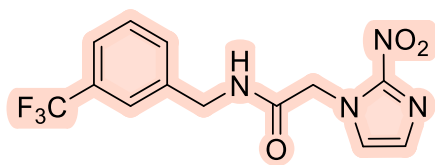
Peak Table

PDA Ch1 316nm

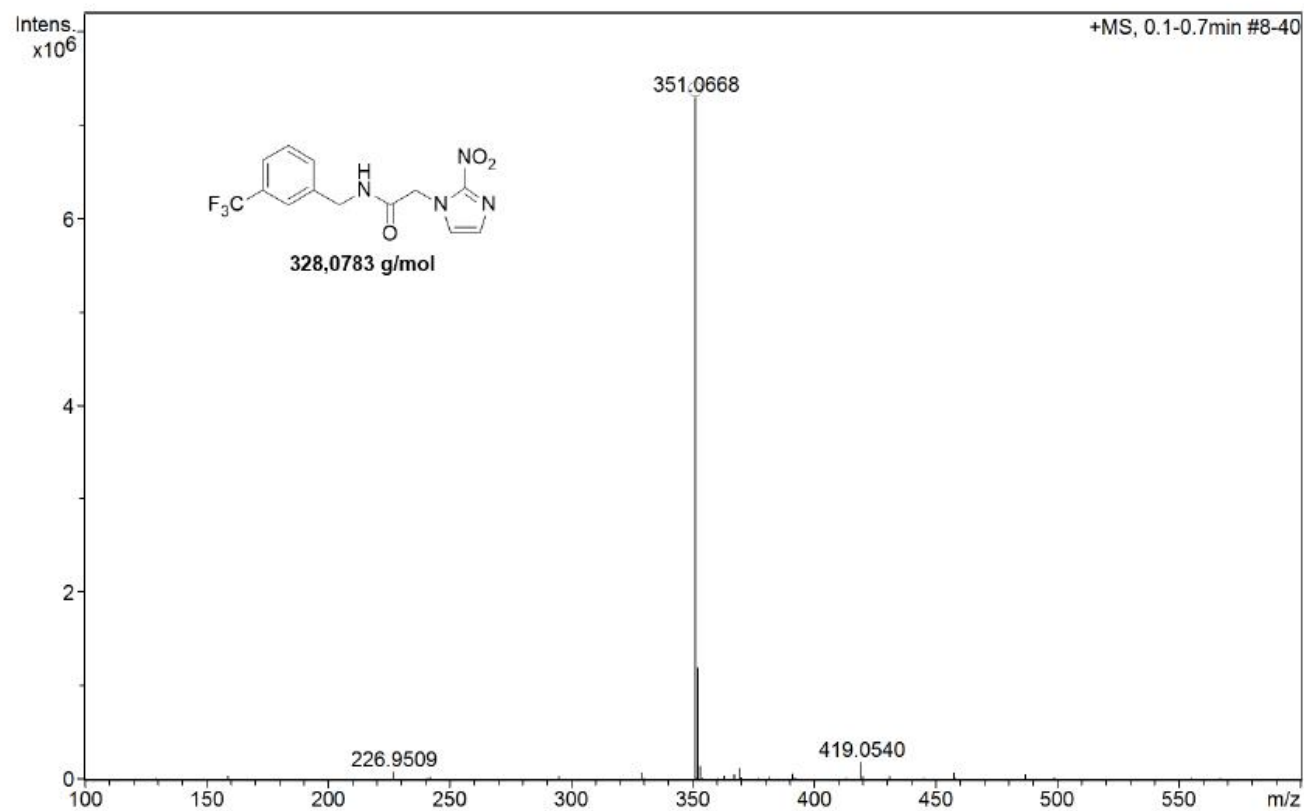
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,72		8276034	100,0	6308	0,959	–	–
Total			8276034	100,0				

Cromatograma 12: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **12**.

2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-N-(3-(trifluorometil)benzil)acetamida (13)

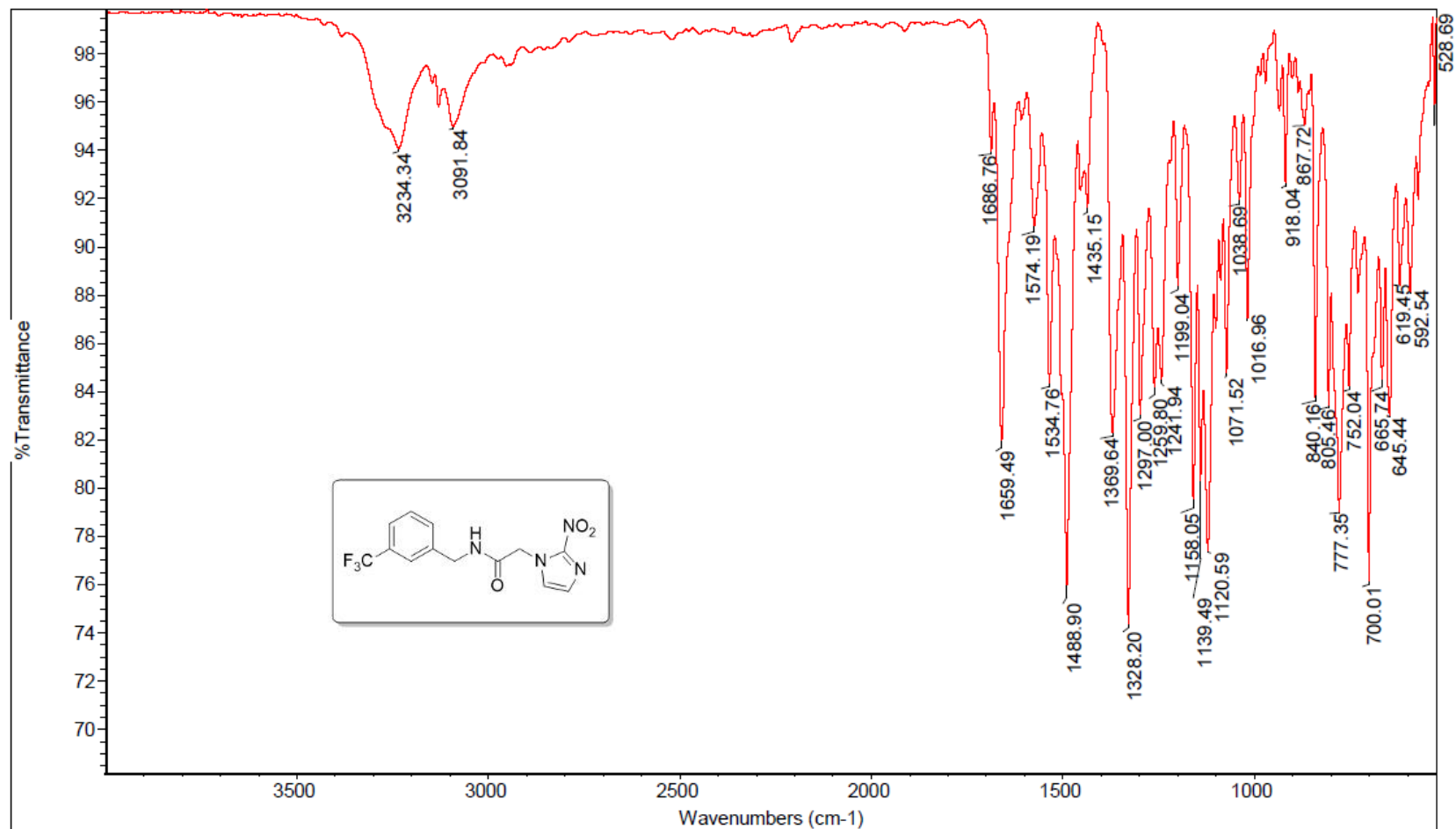


+MS, 0.1-0.7min #8-40

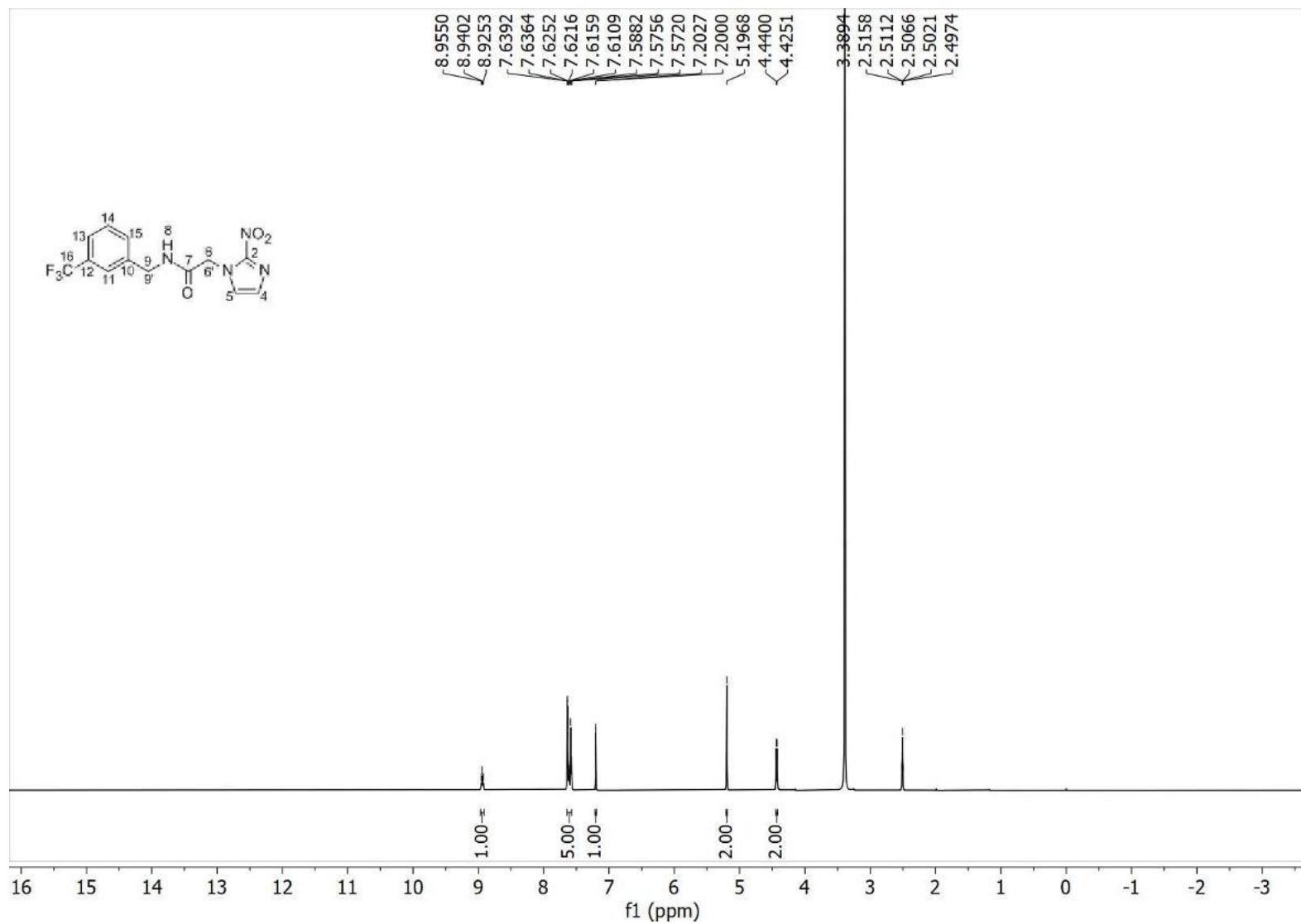


Meas. m/z	# Ion	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdB	N-Rule	e ⁻	Conf	mSigma	Std I	Std Mean m/z	Std I VarNorm	Std m/z Diff	Std Comb Dev
351.066765	1	C ₁₃ H ₁₁ F ₃ N ₄ NaO ₃	351.067546	2.2	1.9	8.5	ok	even		3.9	7.8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	2	C ₁₂ H ₁₅ F ₃ NaO ₇	351.066208	-1.6	-1.4	3.5	ok	even		17.3	30.1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

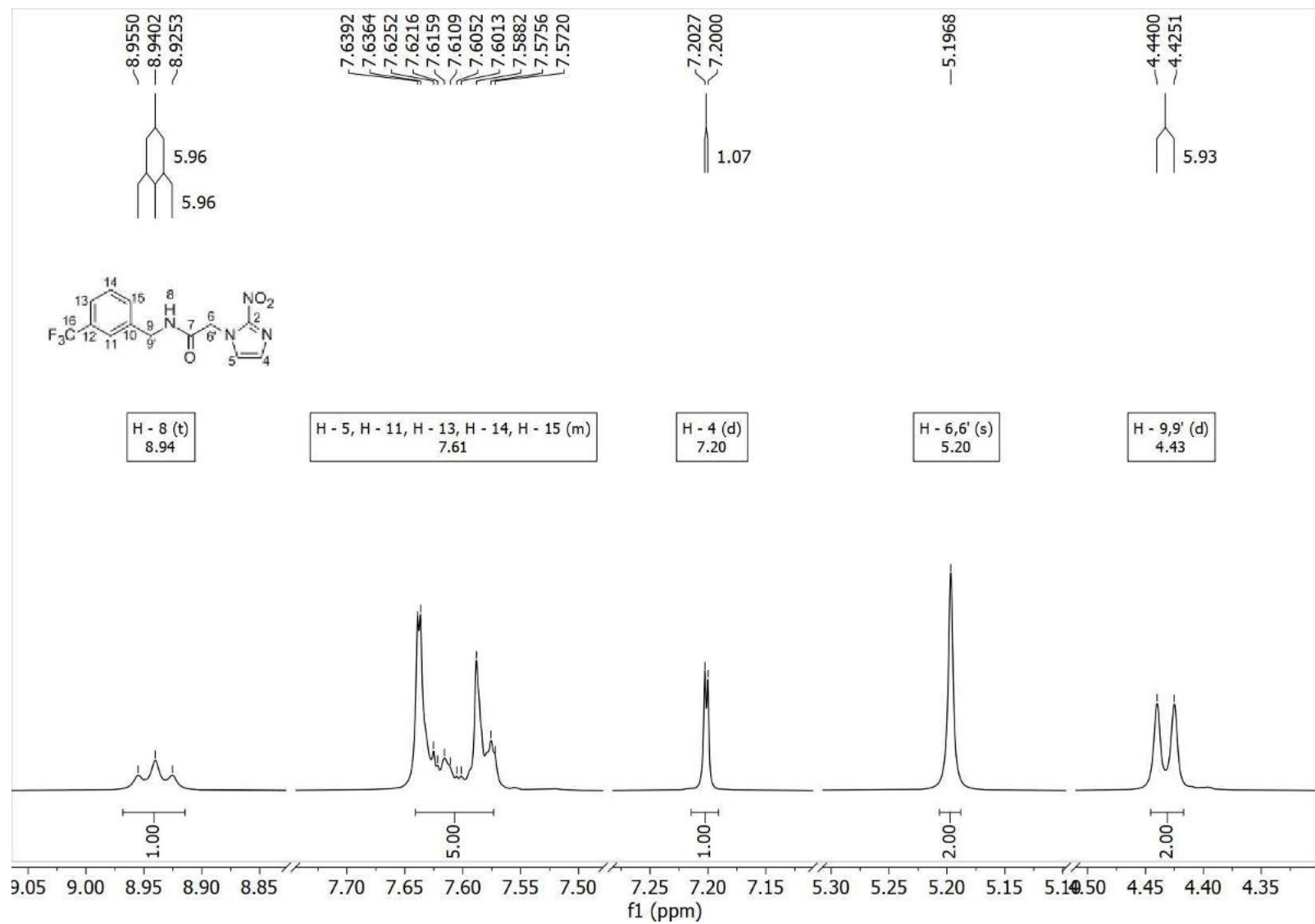
Espectro 113: Espectro de massas de alta resolução do derivado **13**.



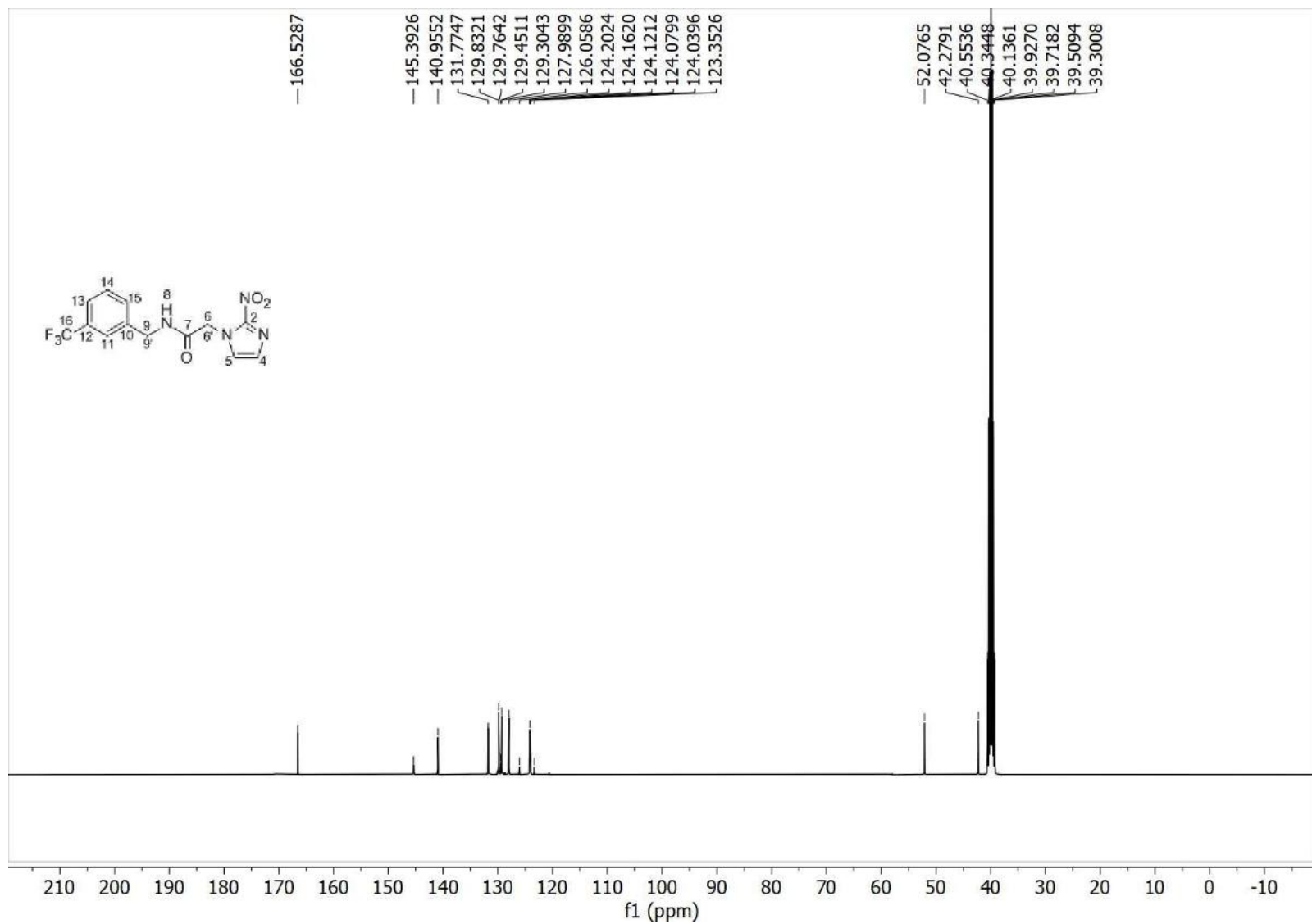
Espectro 114: Espectro de infravermelho do derivado **13**.



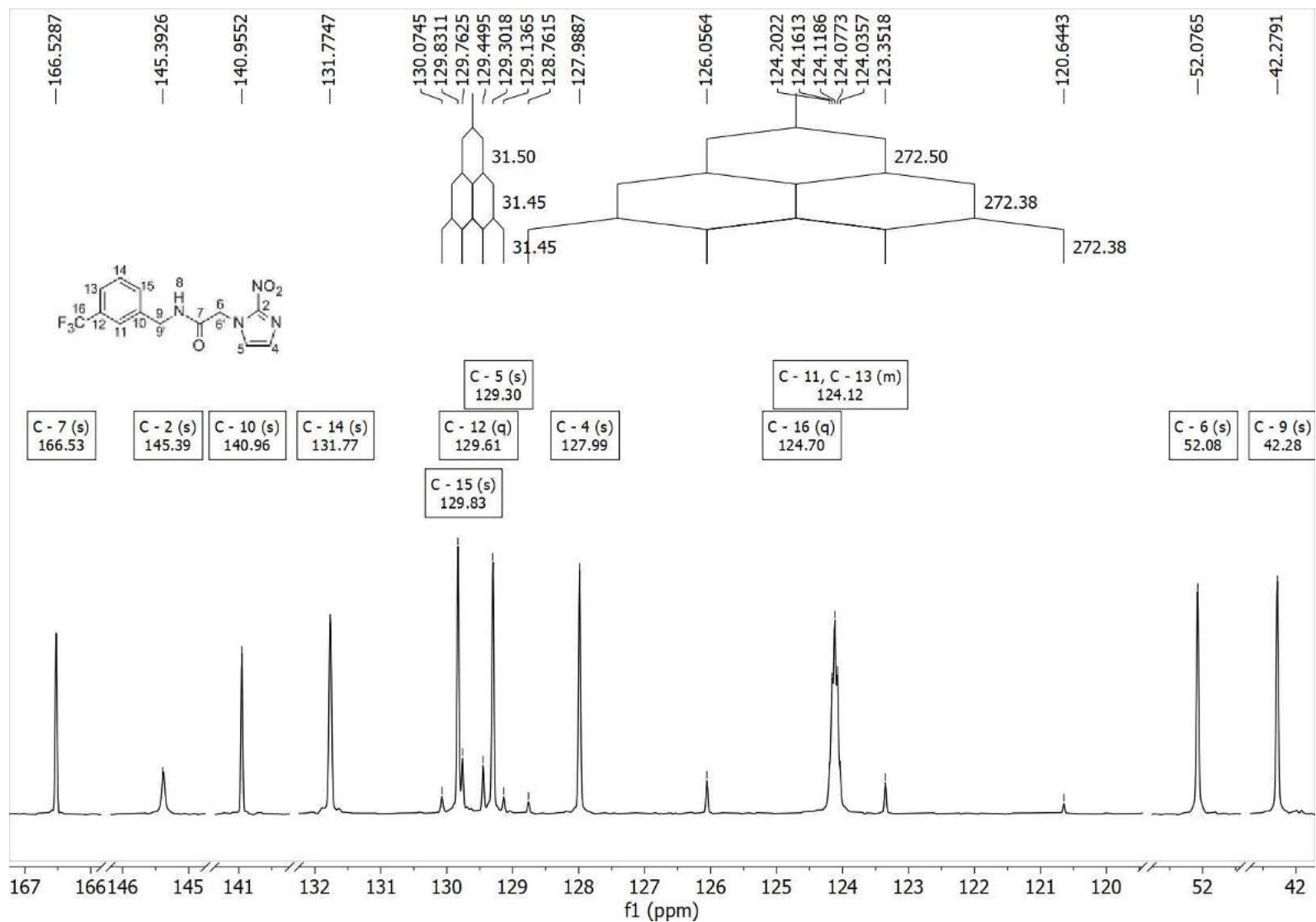
Espectro 115: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO-d_6) do derivado **13**.



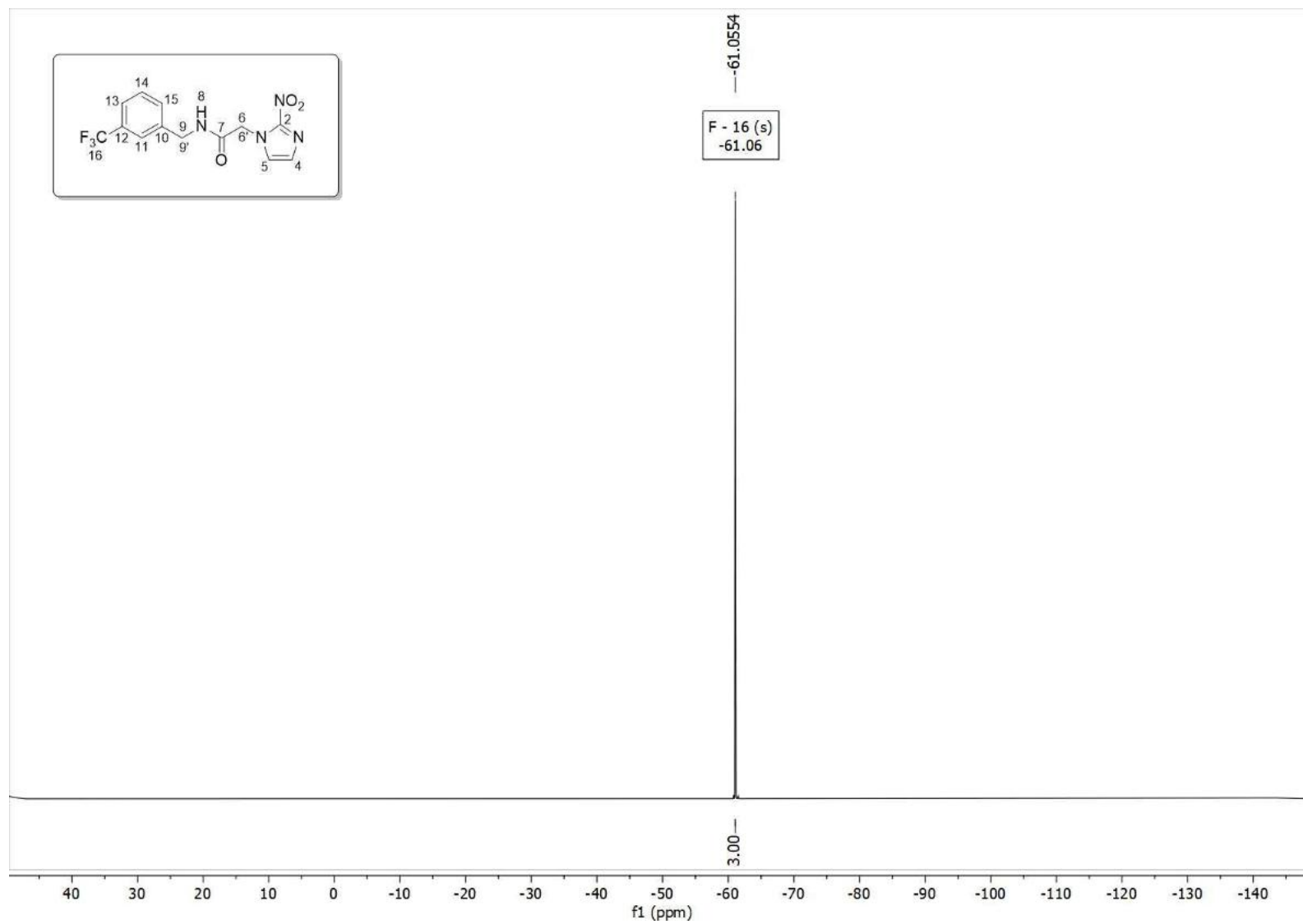
Espectro 116: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **13**.



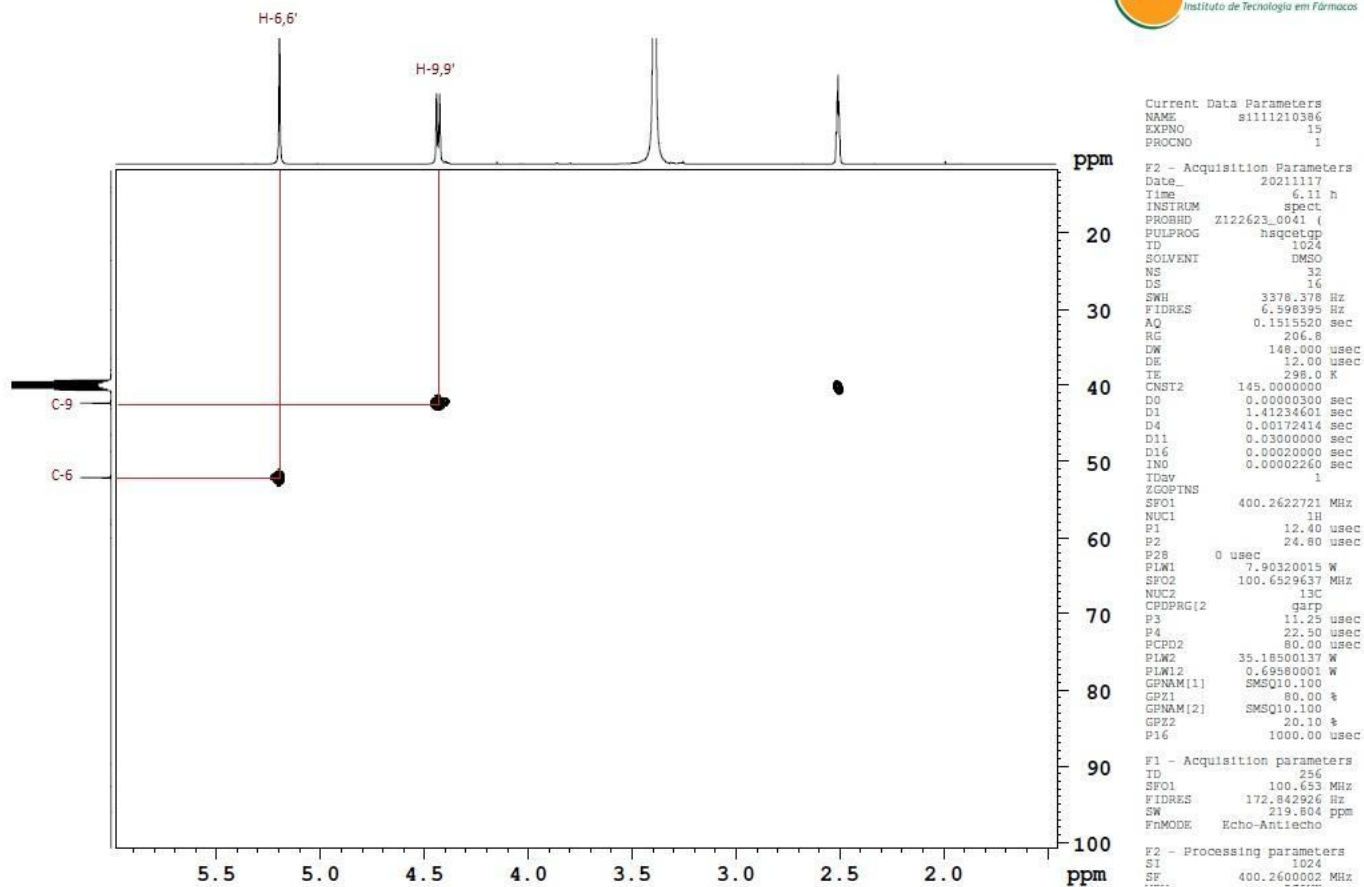
Espectro 117: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado 13.



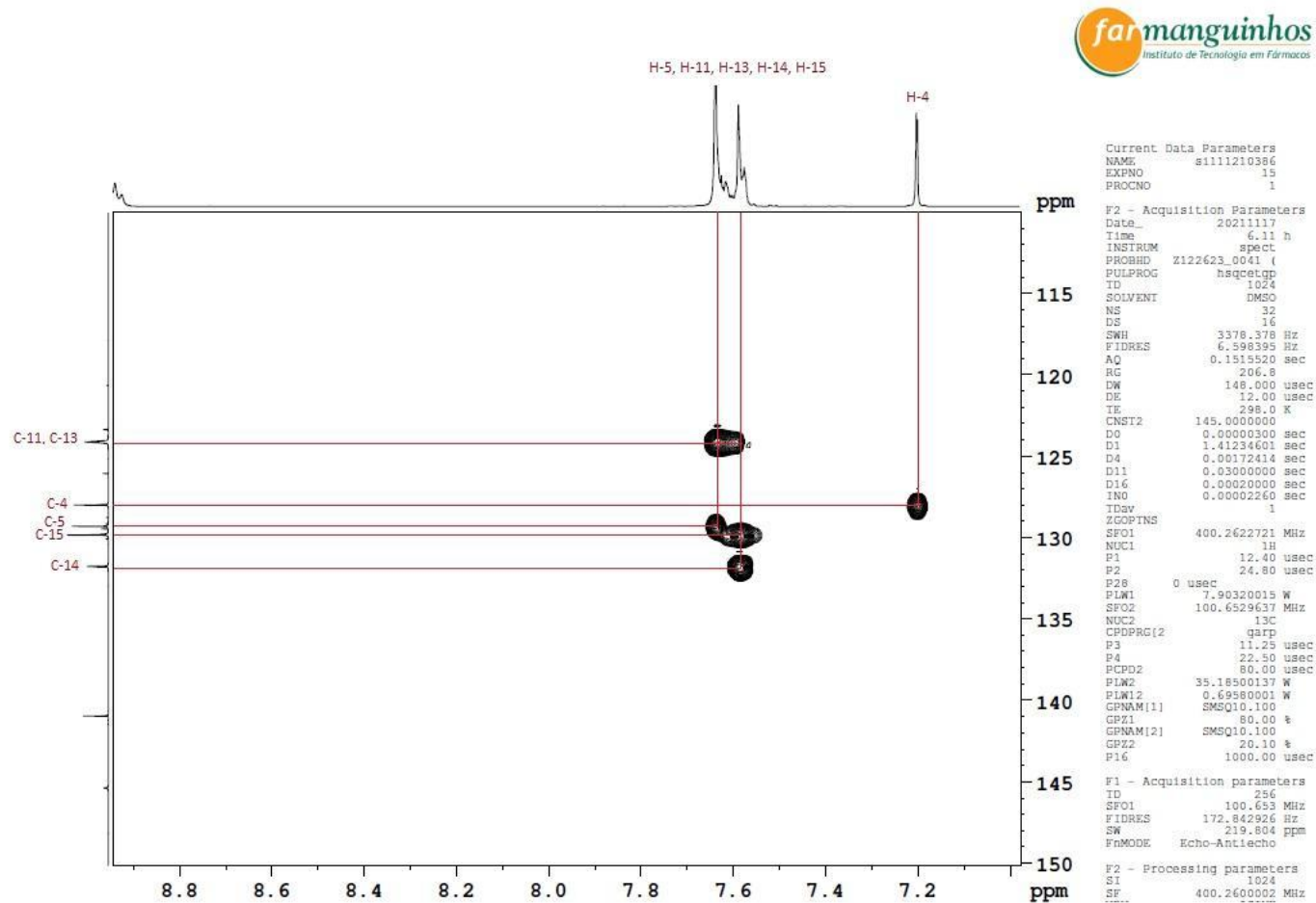
Espectro 118: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado 13.



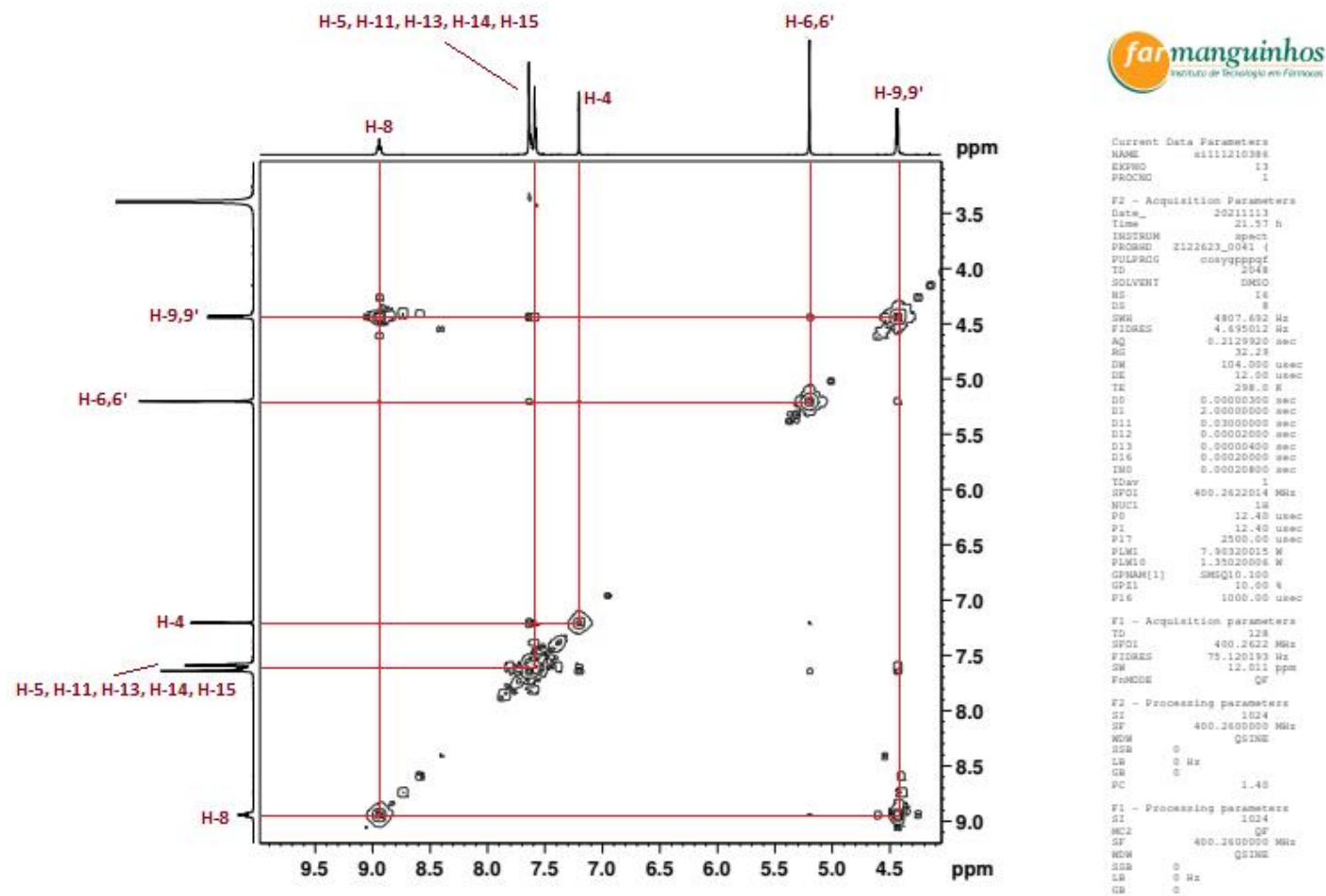
Espectro 119: Espectro de RMN ^{19}F (377 MHz; DMSO- d_6) do derivado **13**.



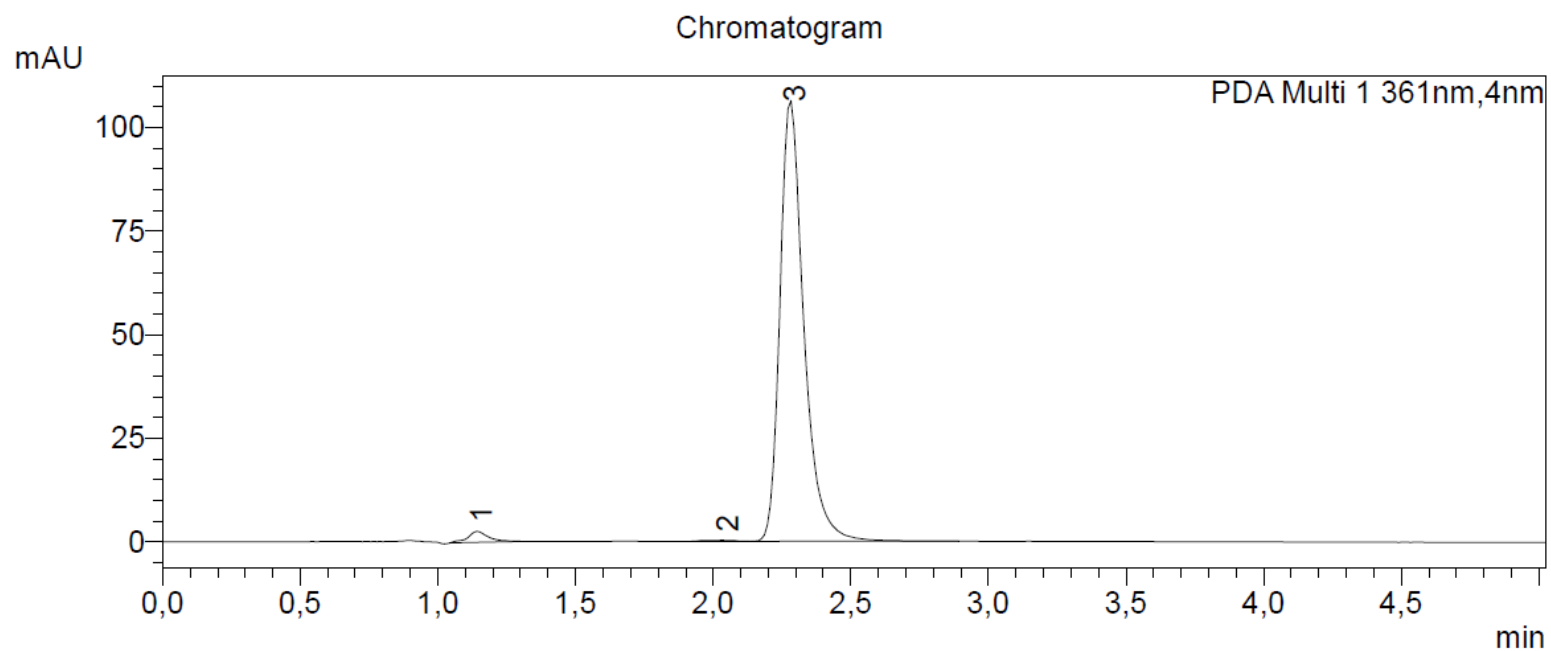
Espectro 120: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 13.



Espectro 121: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 13.



Espectro 122: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 13.

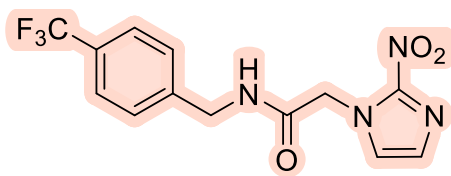


Peak Table

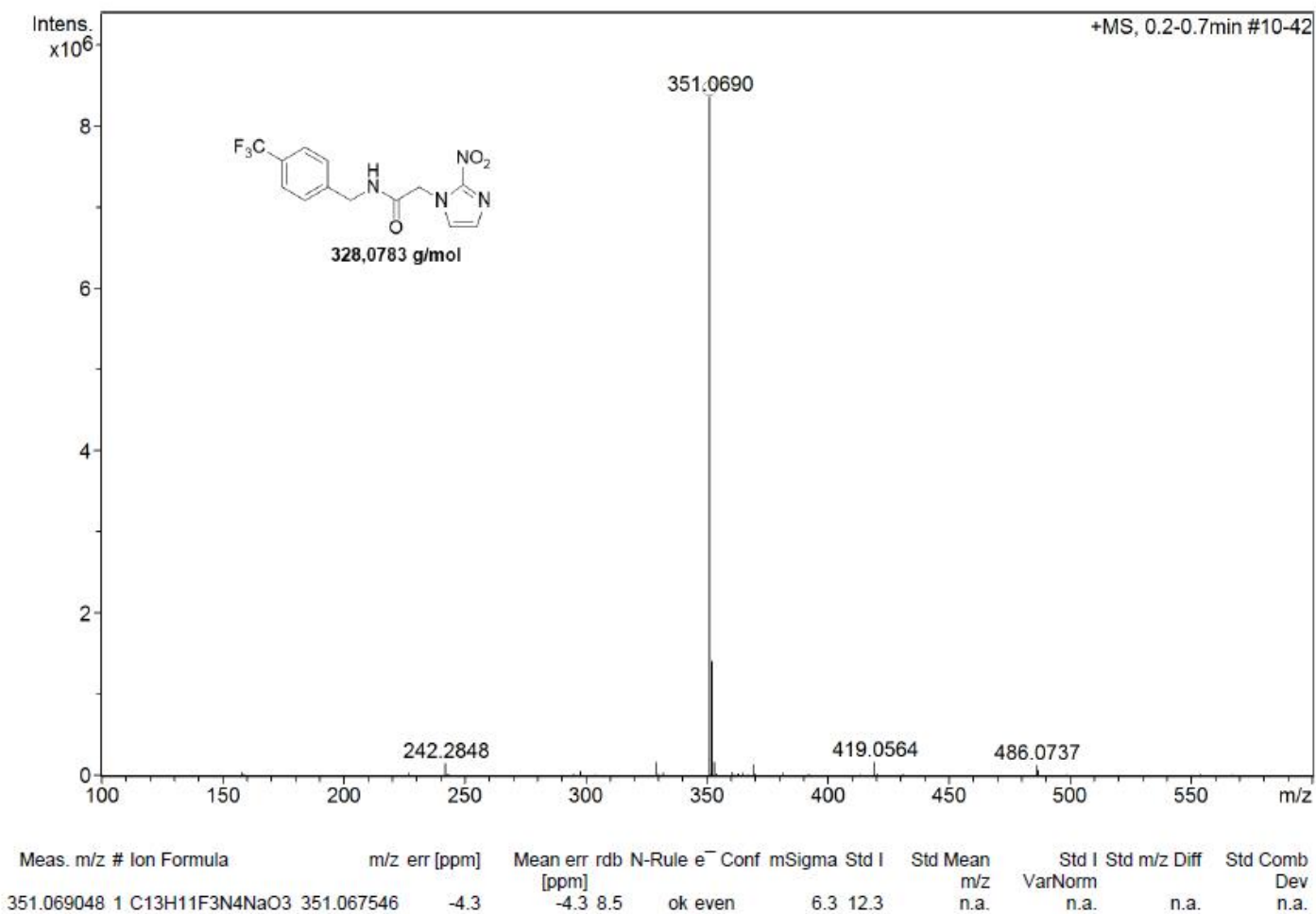
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,14		14386	2,2	6554	1,228	--	--
2	2,04		1897	0,3	8100	--	4,716	0,783
3	2,28		643121	97,5	17945	1,371	1,185	0,996
Total			659404	100,0				

Cromatograma 13: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **13**.

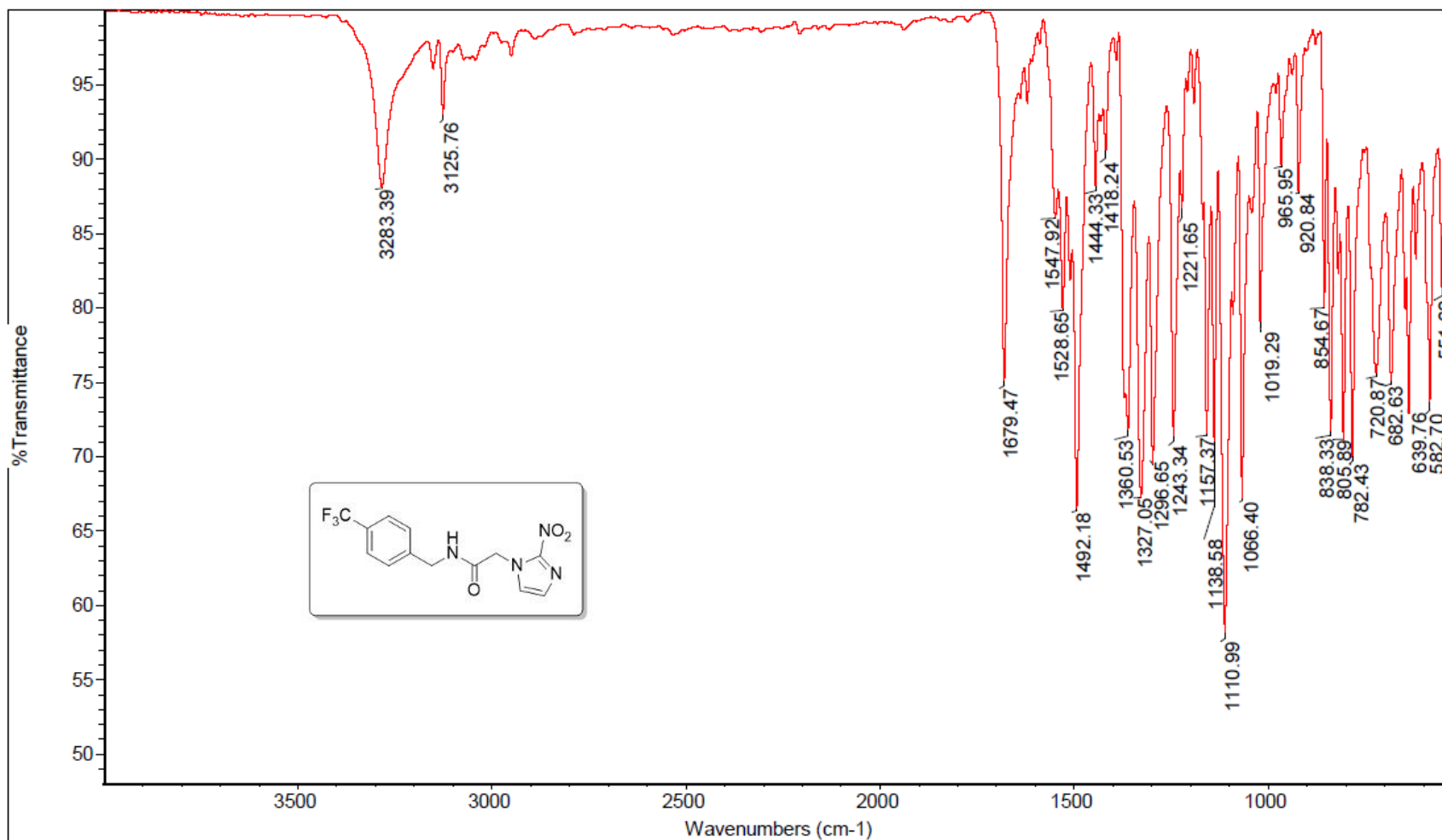
2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-N-(4-(trifluorometil)benzil)acetamida (14)



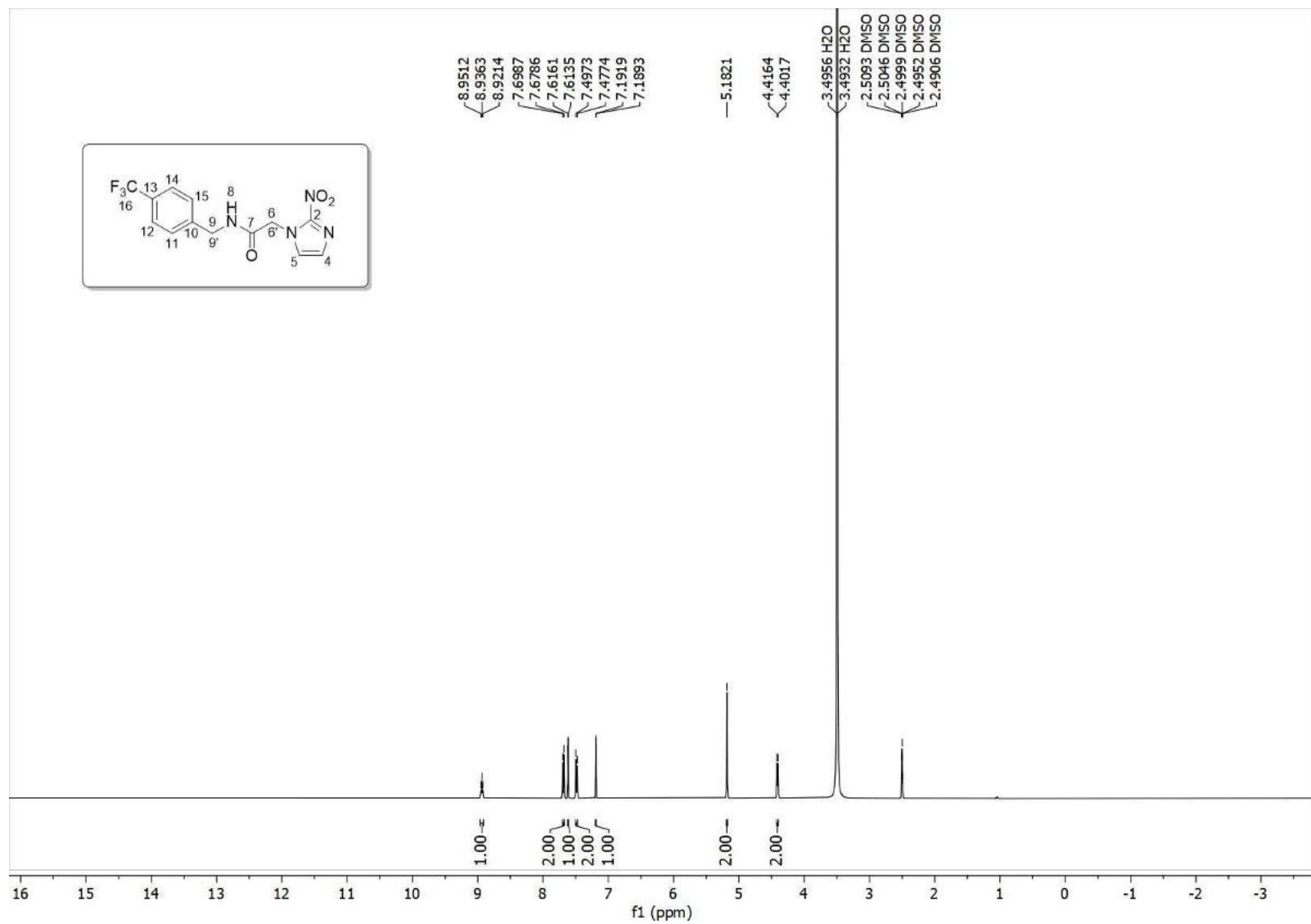
+MS, 0.2-0.7min #10-42



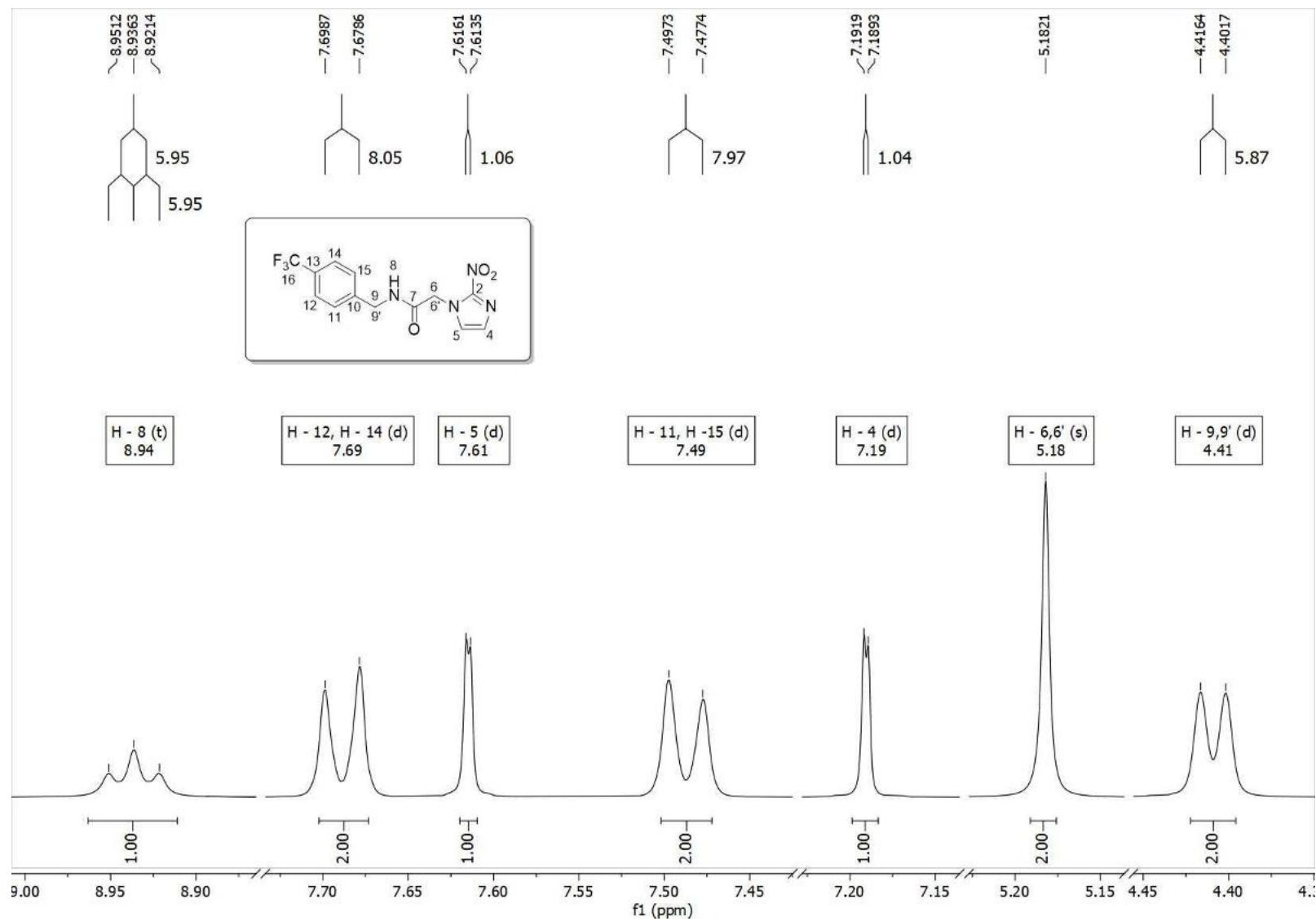
Espectro 123: Espectro de massas de alta resolução do derivado **14**.



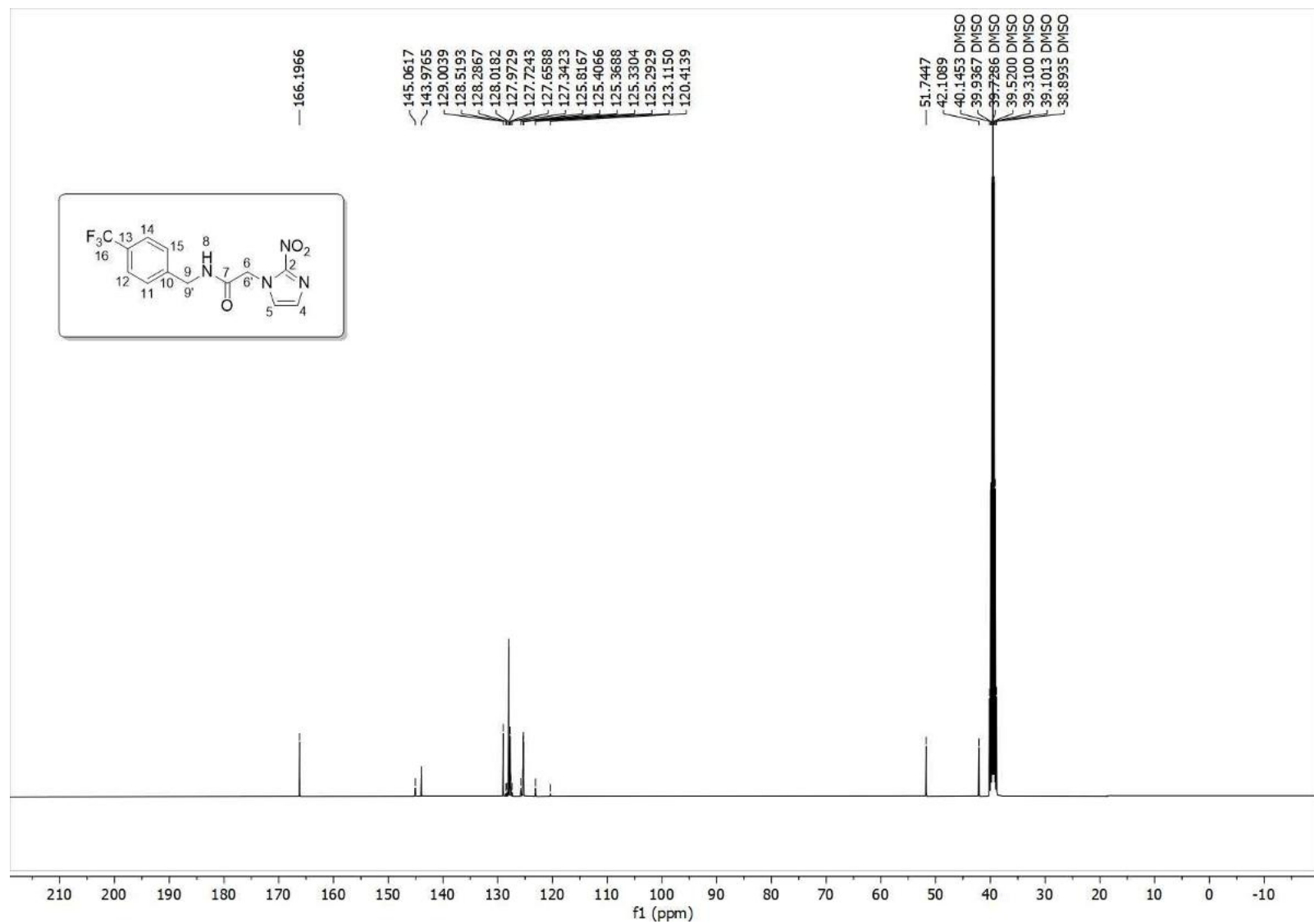
Espectro 124: Espectro de infravermelho do derivado 14.



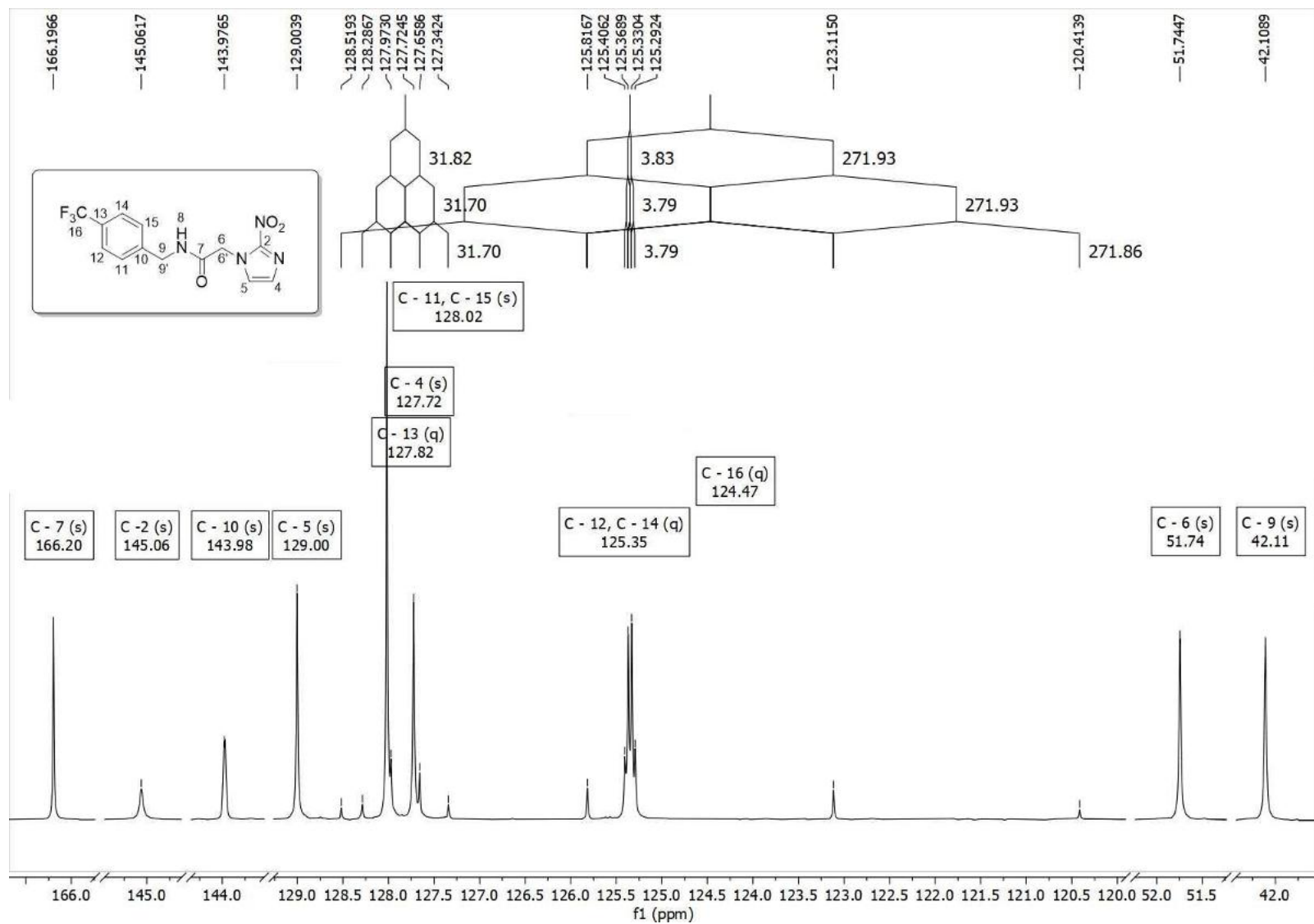
Espectro 125: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO-d_6) do derivado **14**.



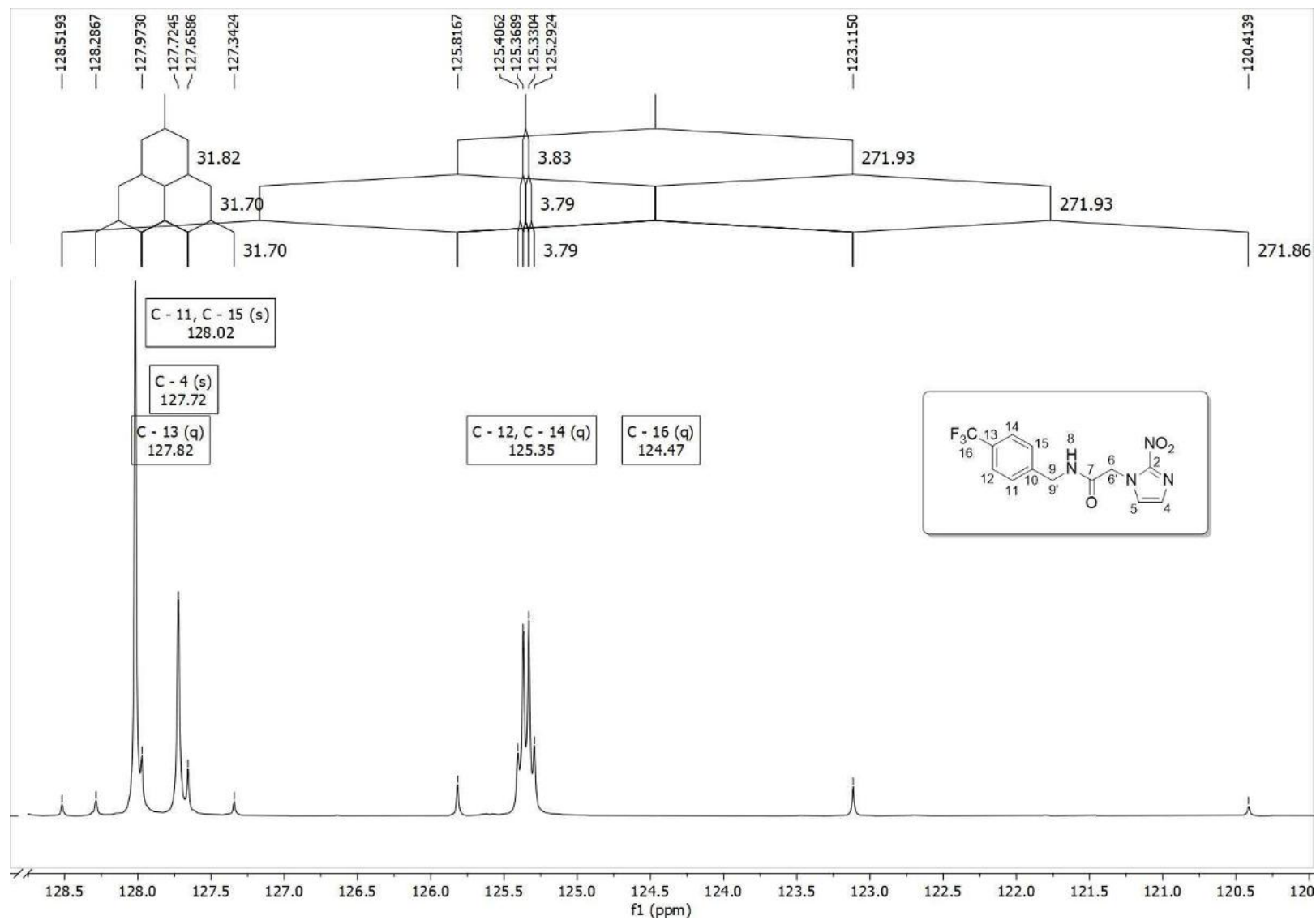
Espectro 126: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **14**.



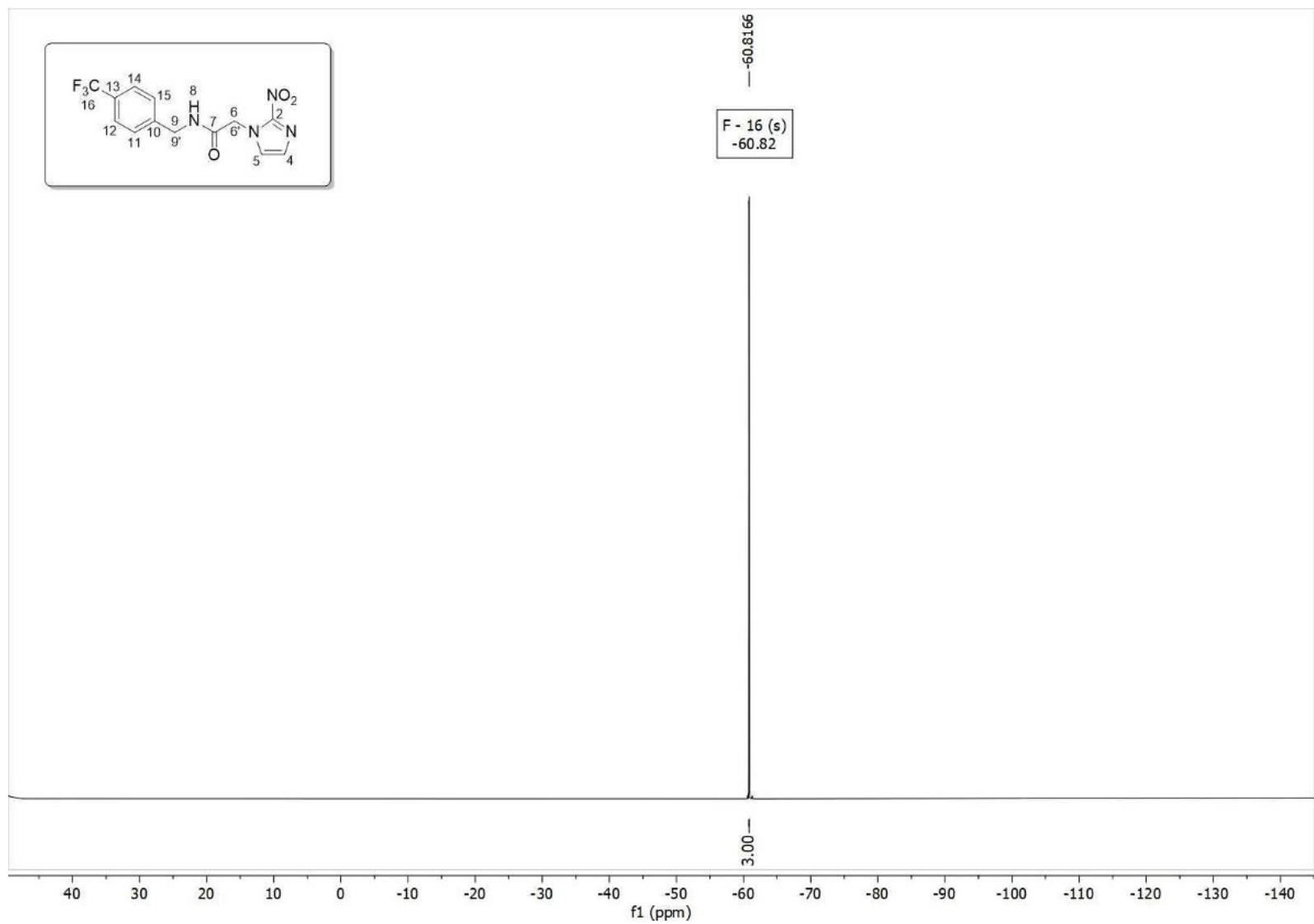
Espectro 127: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado 14.



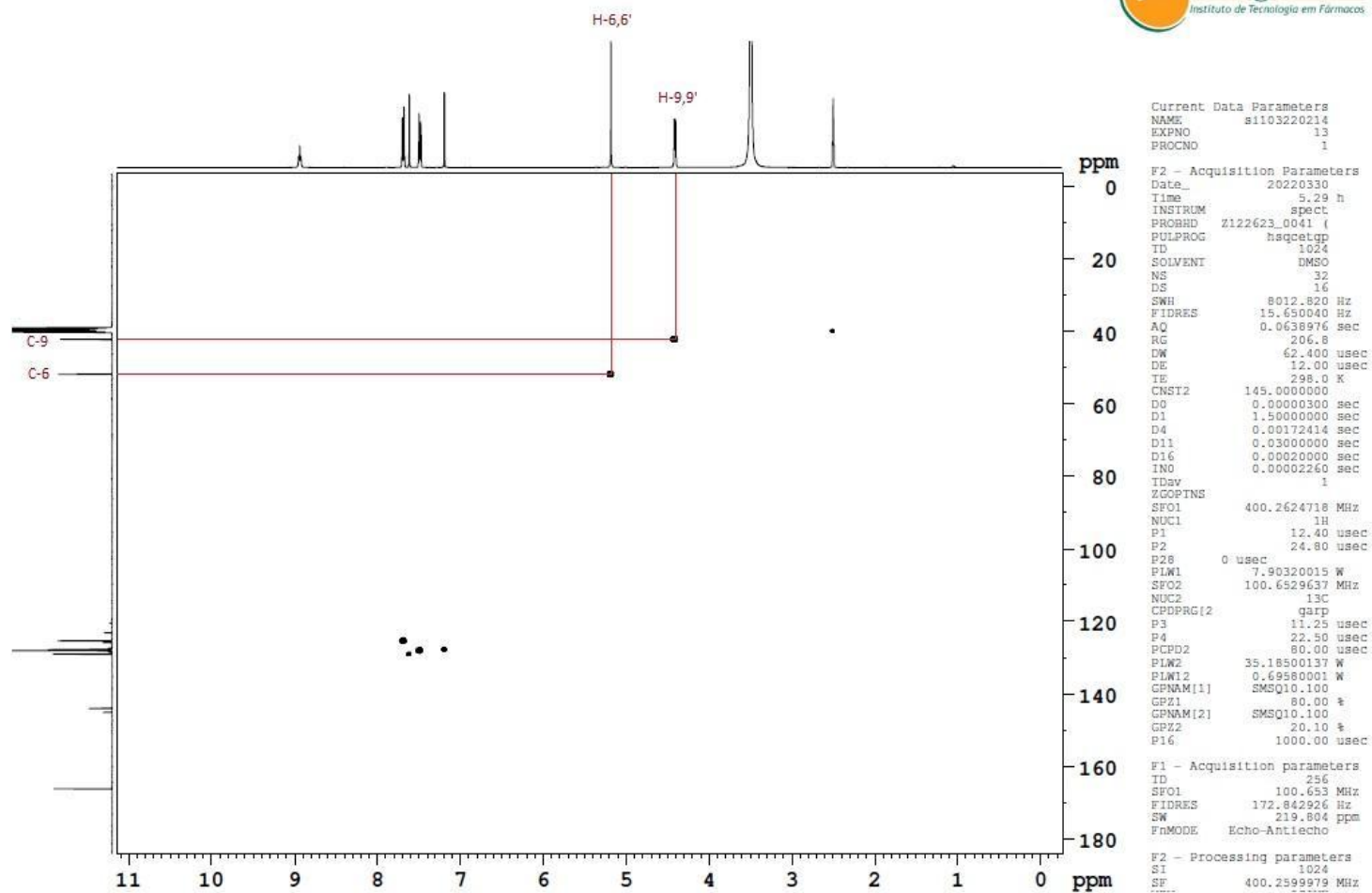
Espectro 128: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado 14.



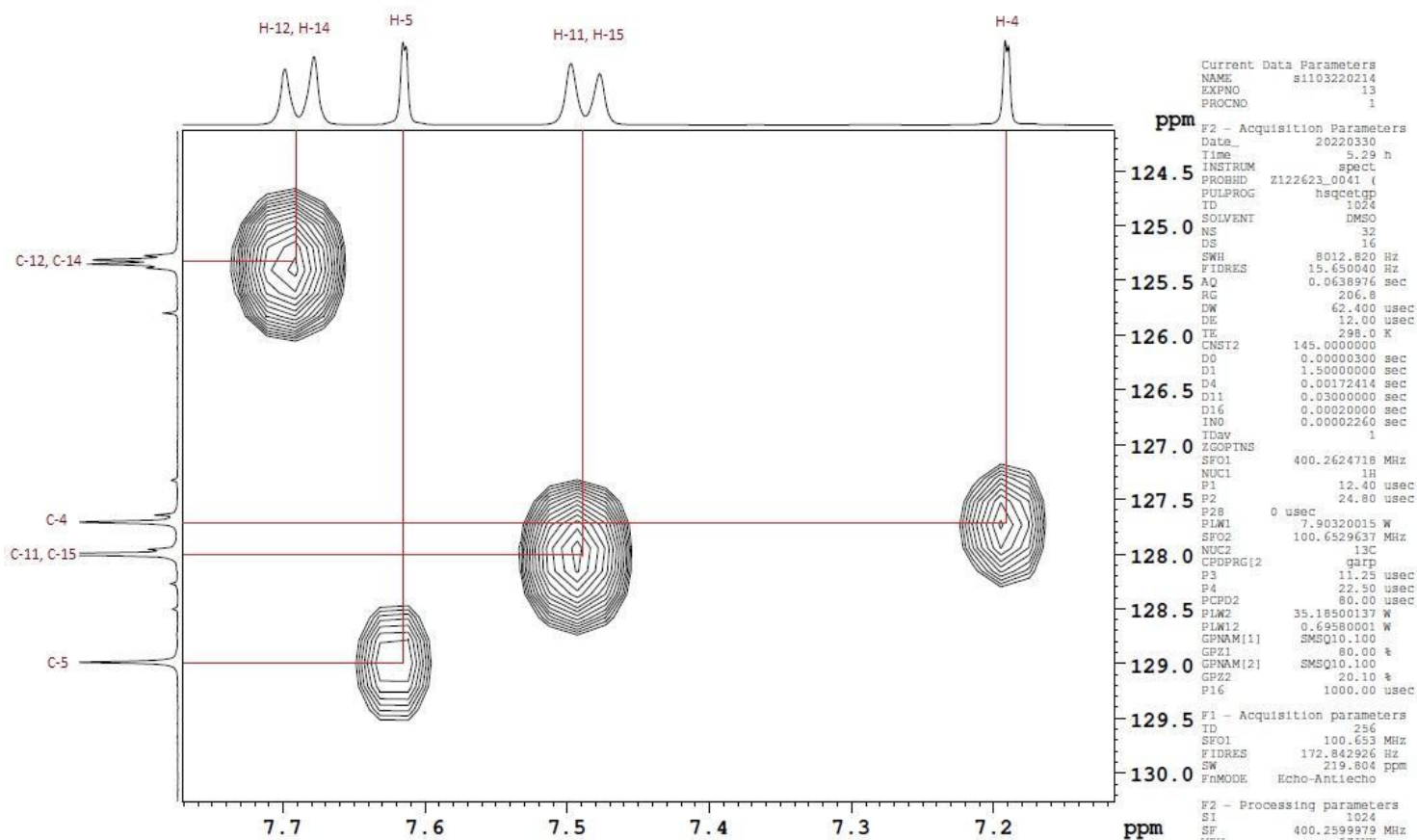
Espectro 129: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **14**.



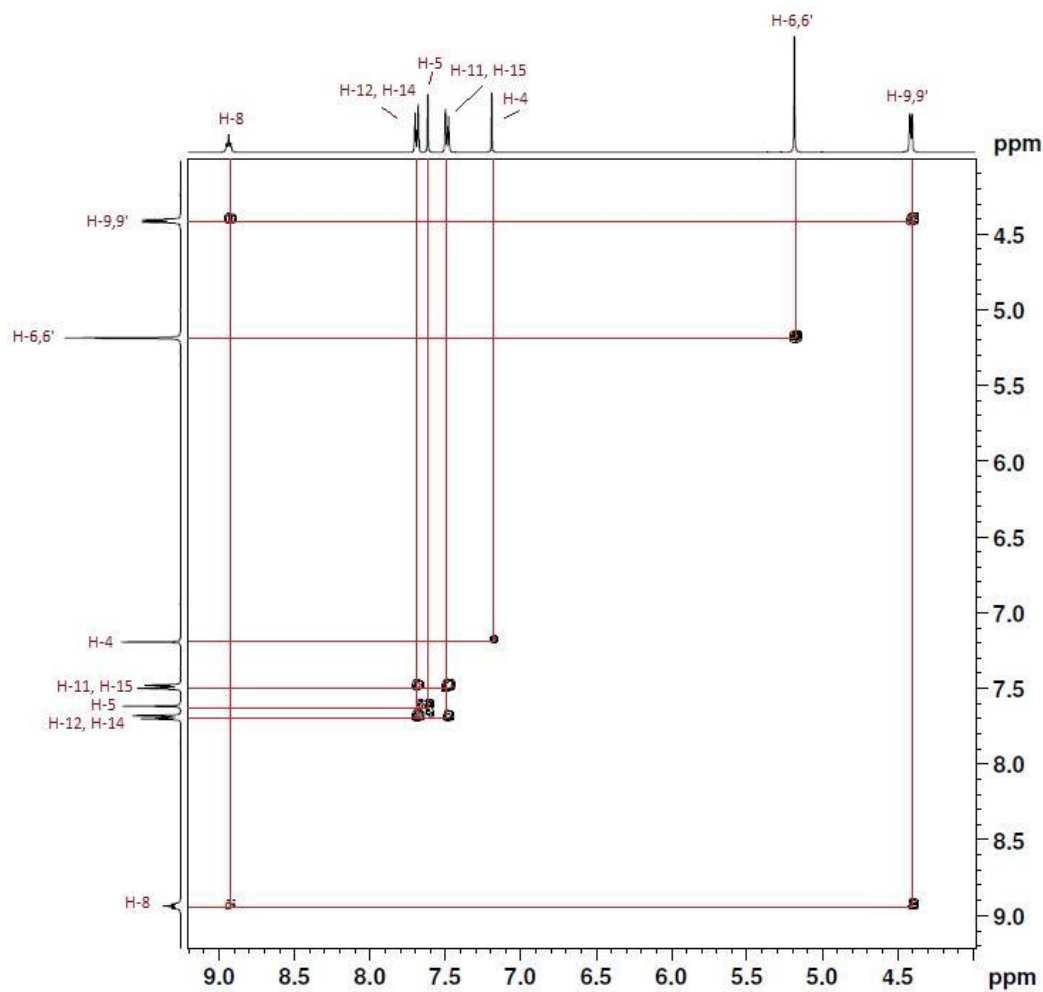
Espectro 130: Espectro de RMN ¹⁹F (377 MHz; DMSO-d₆) do derivado **14**.



Espectro 131: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 14.



Espectro 132: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 14.



Current Data Parameters
 NAME sil03220214
 EXPNO 12
 PROCNO 1

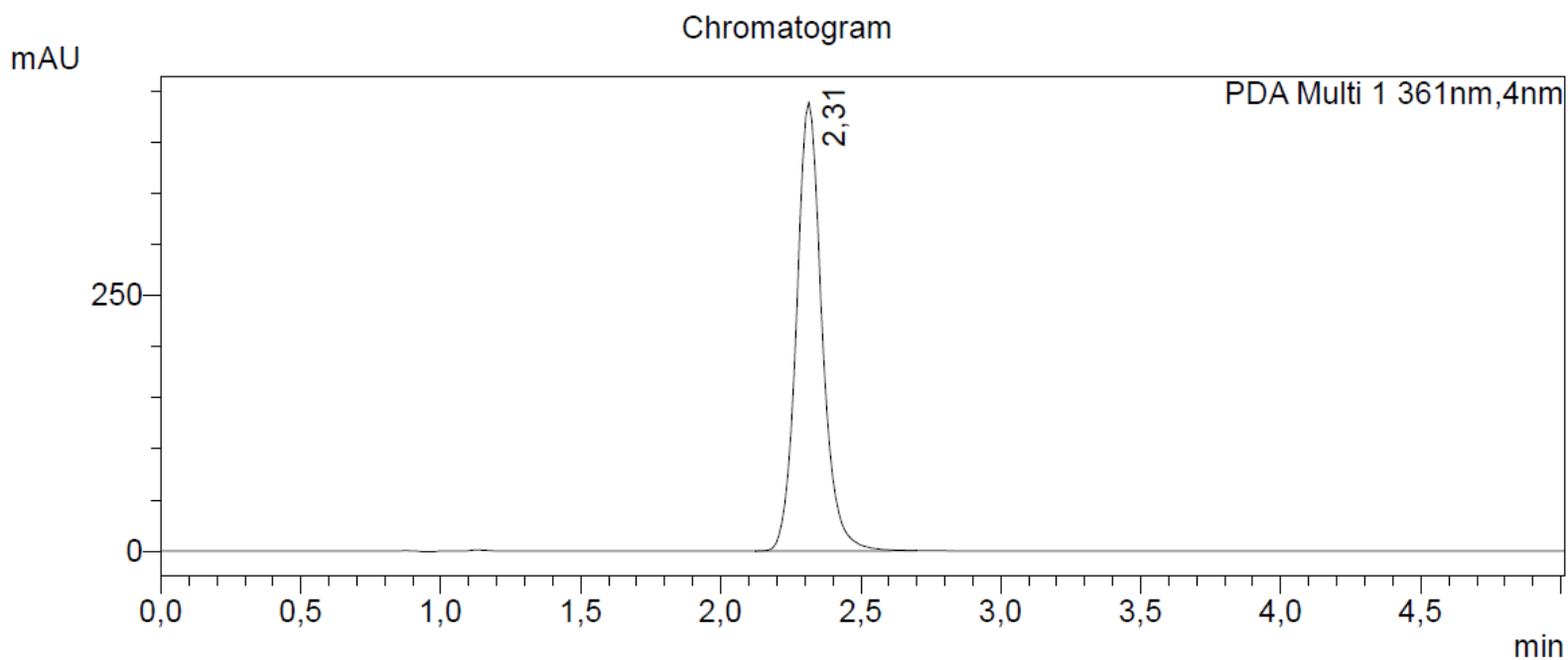
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20220329
 Time 10.56 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z122623_0041 ()
 PULPROG cosygpppqf
 TD 2048
 SOLVENT DMSO
 NS 32
 DS 8
 SWH 4807.692 Hz
 FIDRES 4.695012 Hz
 AQ 0.2129920 sec
 RG 16.07
 DW 104.000 usec
 DE 12.00 usec
 TE 296.0 K
 D0 0.00000300 sec
 D1 2.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 D12 0.00002000 sec
 D13 0.00000400 sec
 D16 0.00020000 sec
 IN0 0.00020800 sec
 TDav
 SFO1 400.2622014 MHz
 NUC1 1H
 P0 12.40 usec
 P1 12.40 usec
 P17 2500.00 usec
 PLW1 7.90320015 W
 PLM10 1.35020006 W
 CPDPRM[1] SMSQ10.100
 GPZ1 10.00 %
 P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
 TD 128
 SFO1 400.2622 MHz
 FIDRES 75.120193 Hz
 SW 12.011 ppm
 F2MODE QF

F2 - Processing parameters
 SI 1024
 SF 400.2600000 MHz
 WDW QSINE
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.40

F1 - Processing parameters
 SI 1024
 MC2 QF
 SF 400.2600000 MHz
 WDW QSINE
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0

Espectro 133: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 14.

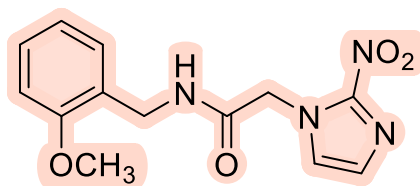


Peak Table

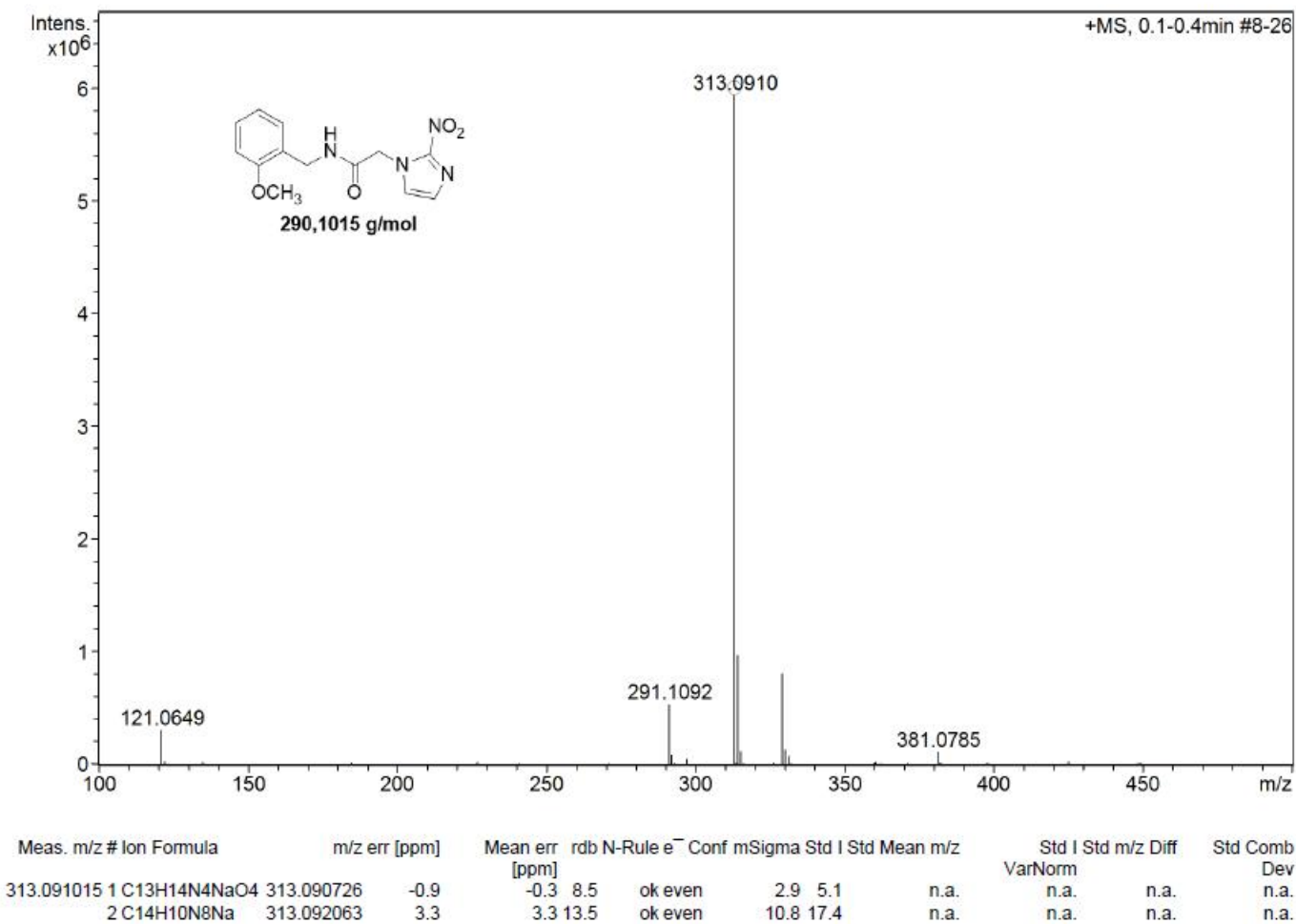
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	2,31		2777886	100,0	16739	1,136	--	--
Total			2777886	100,0				

Cromatograma 14: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **14**.

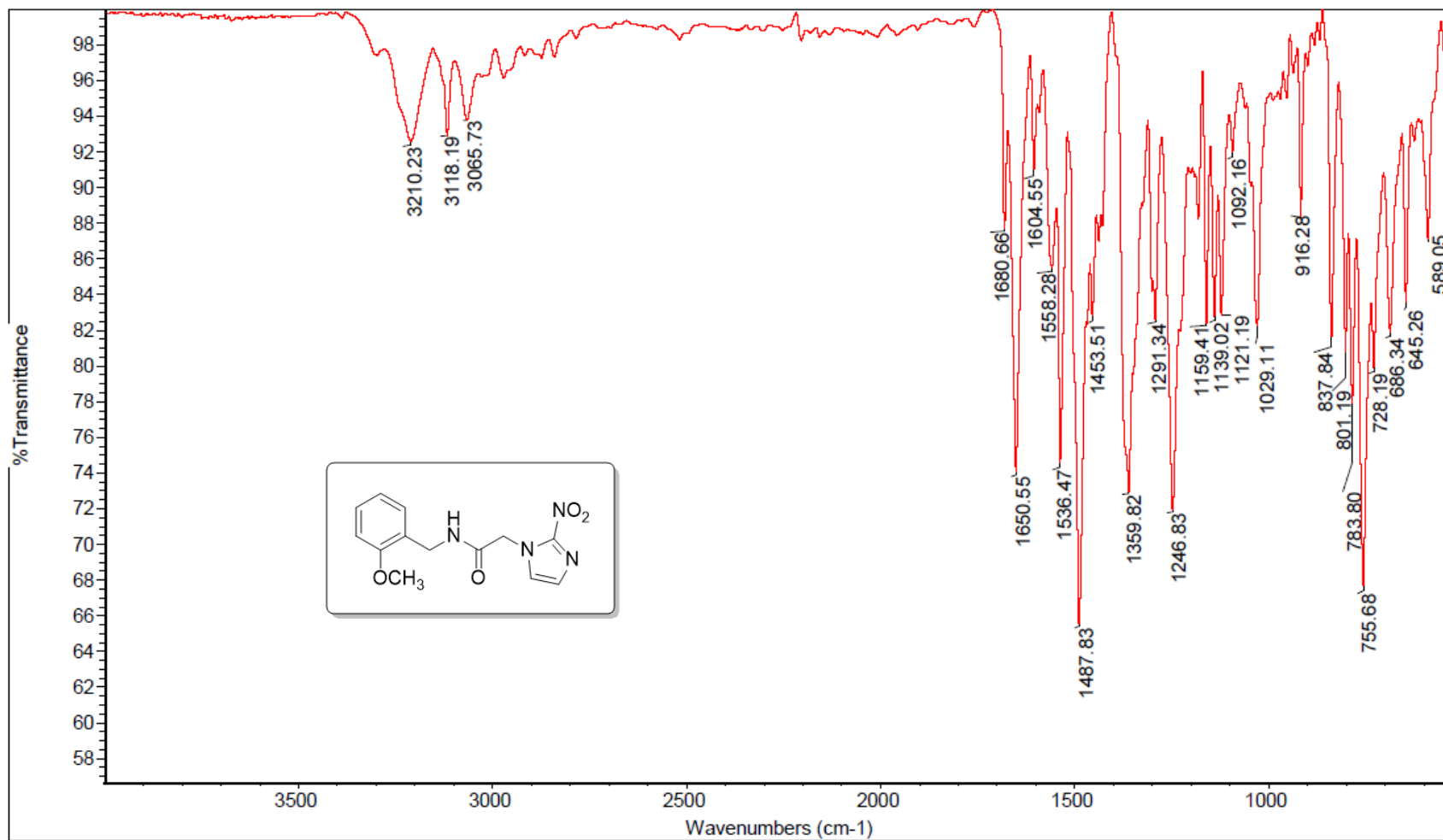
N-(2-metoxibenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (15)



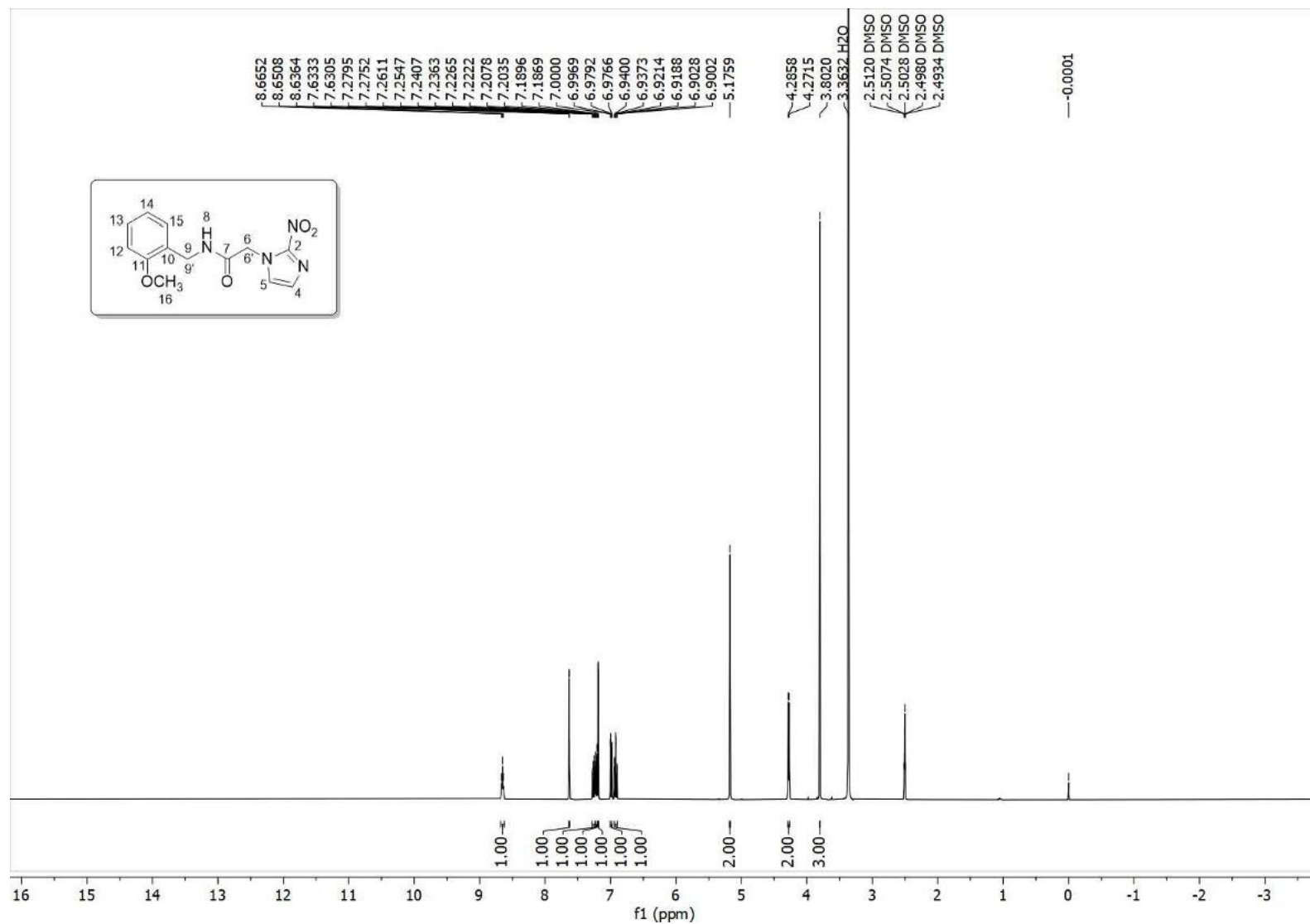
+MS, 0.1-0.4min #8-26



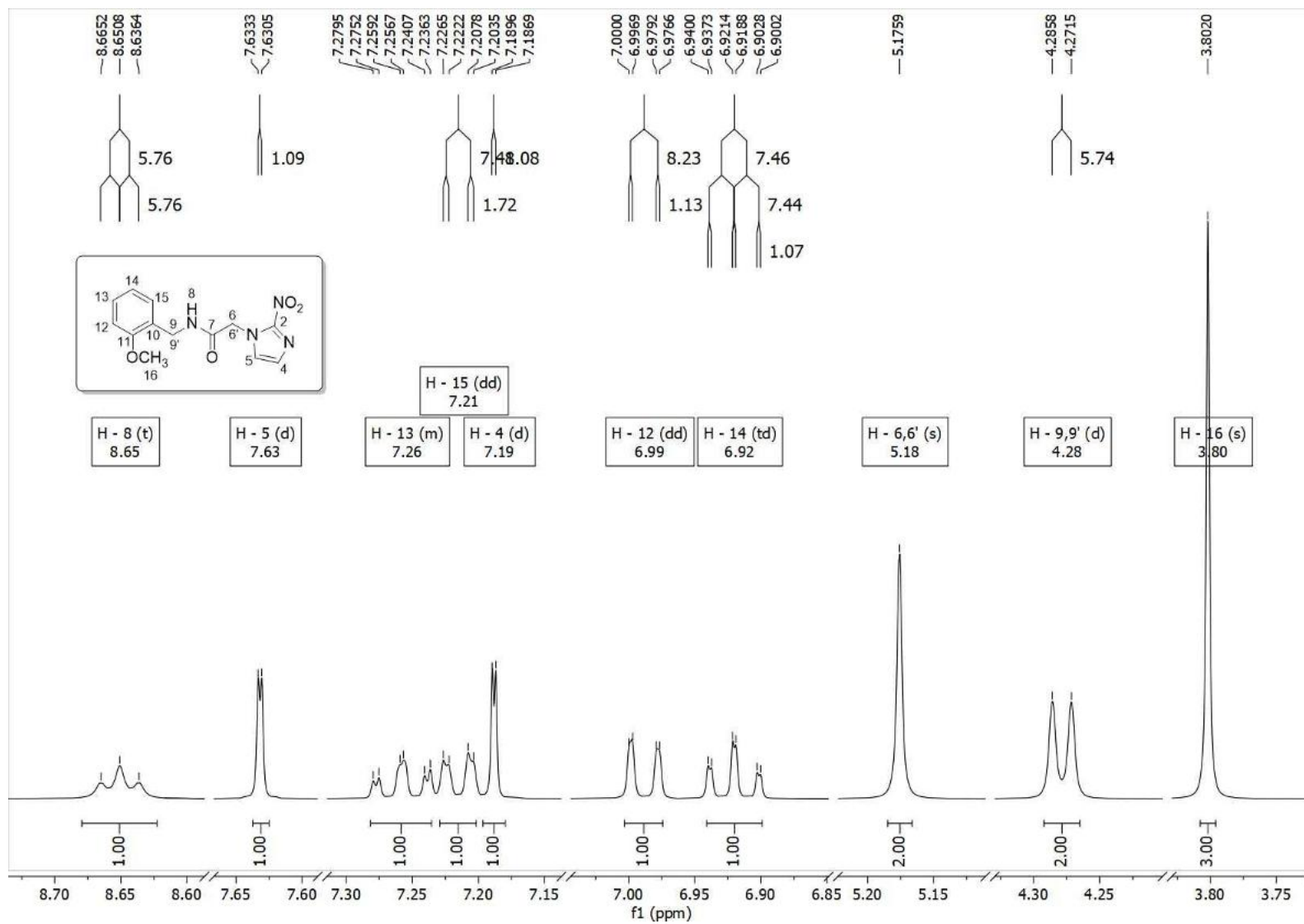
Espectro 134: Espectro de massas de alta resolução do derivado 15.



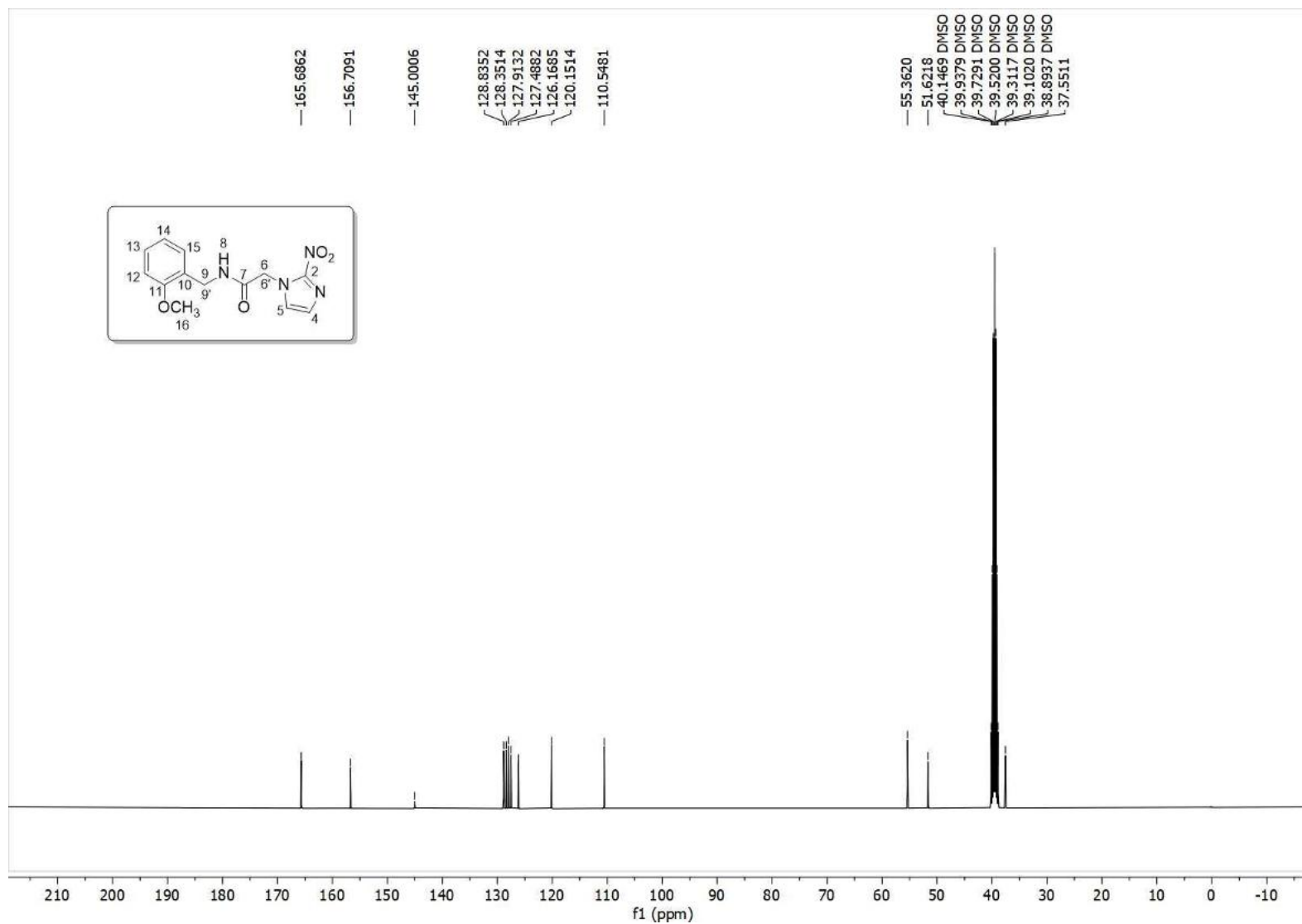
Espectro 135: Espectro de infravermelho do derivado **15**.



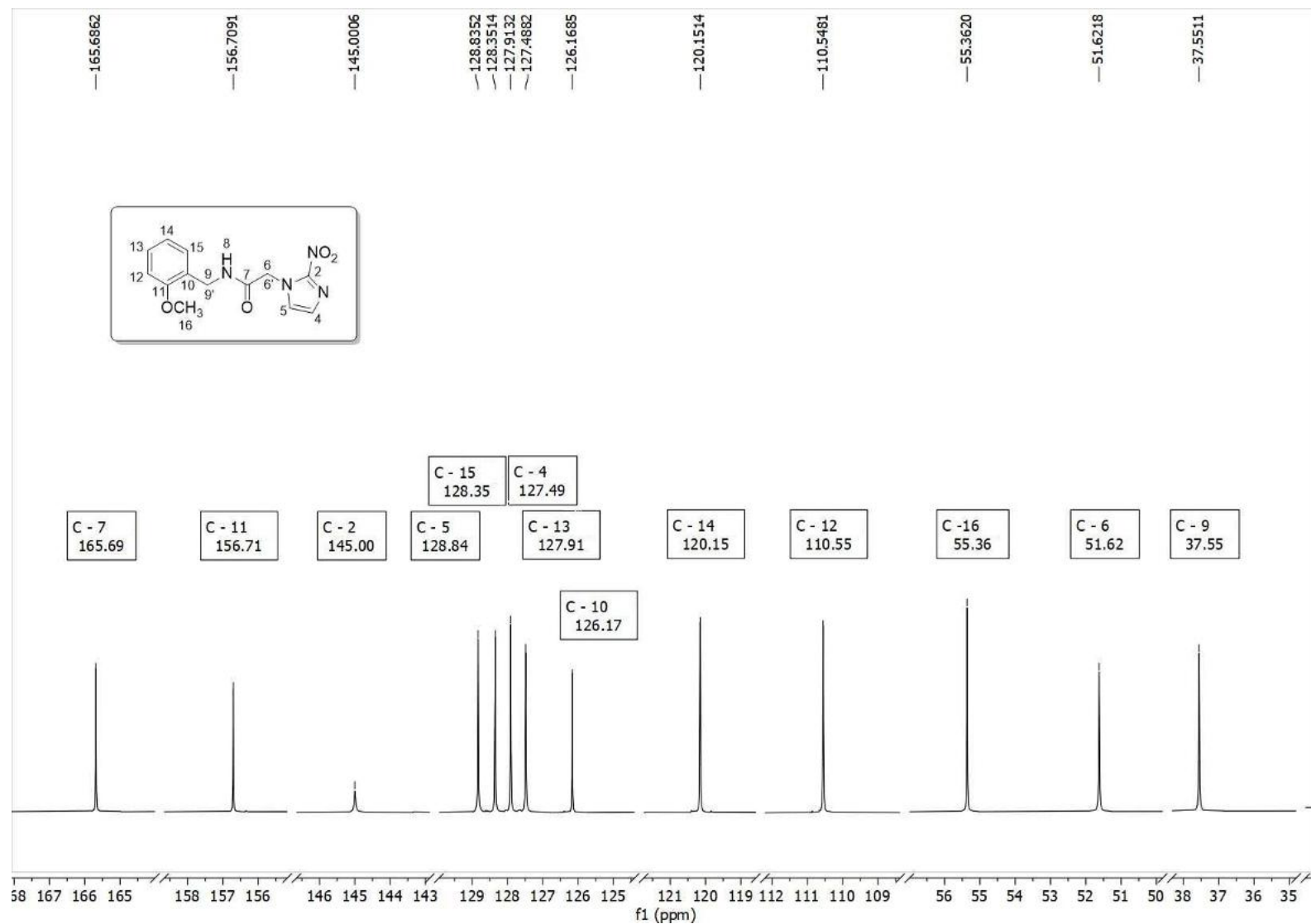
Espectro 136: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **15**.



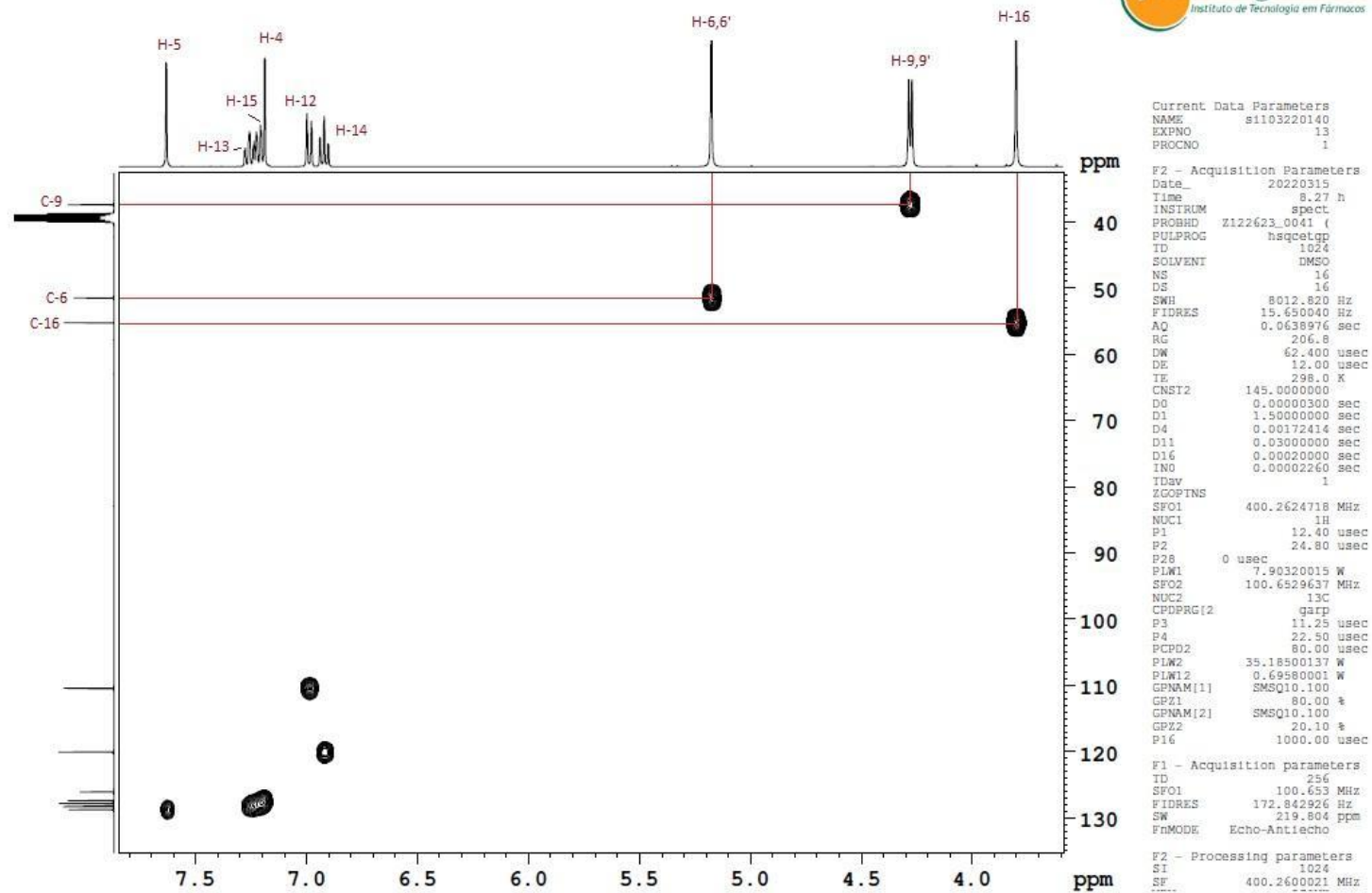
Espectro 137: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **15**.



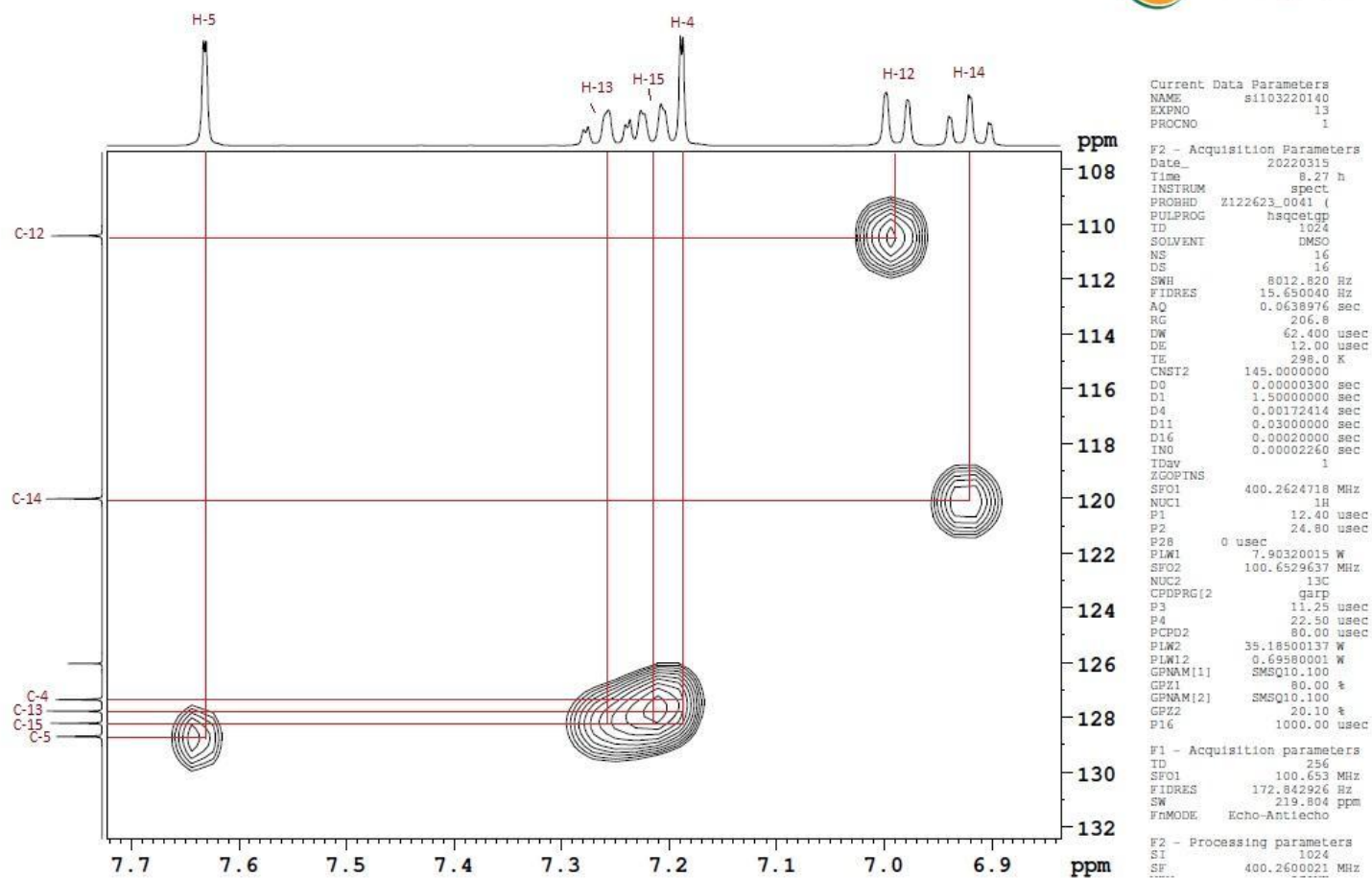
Espectro 138: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **15**.



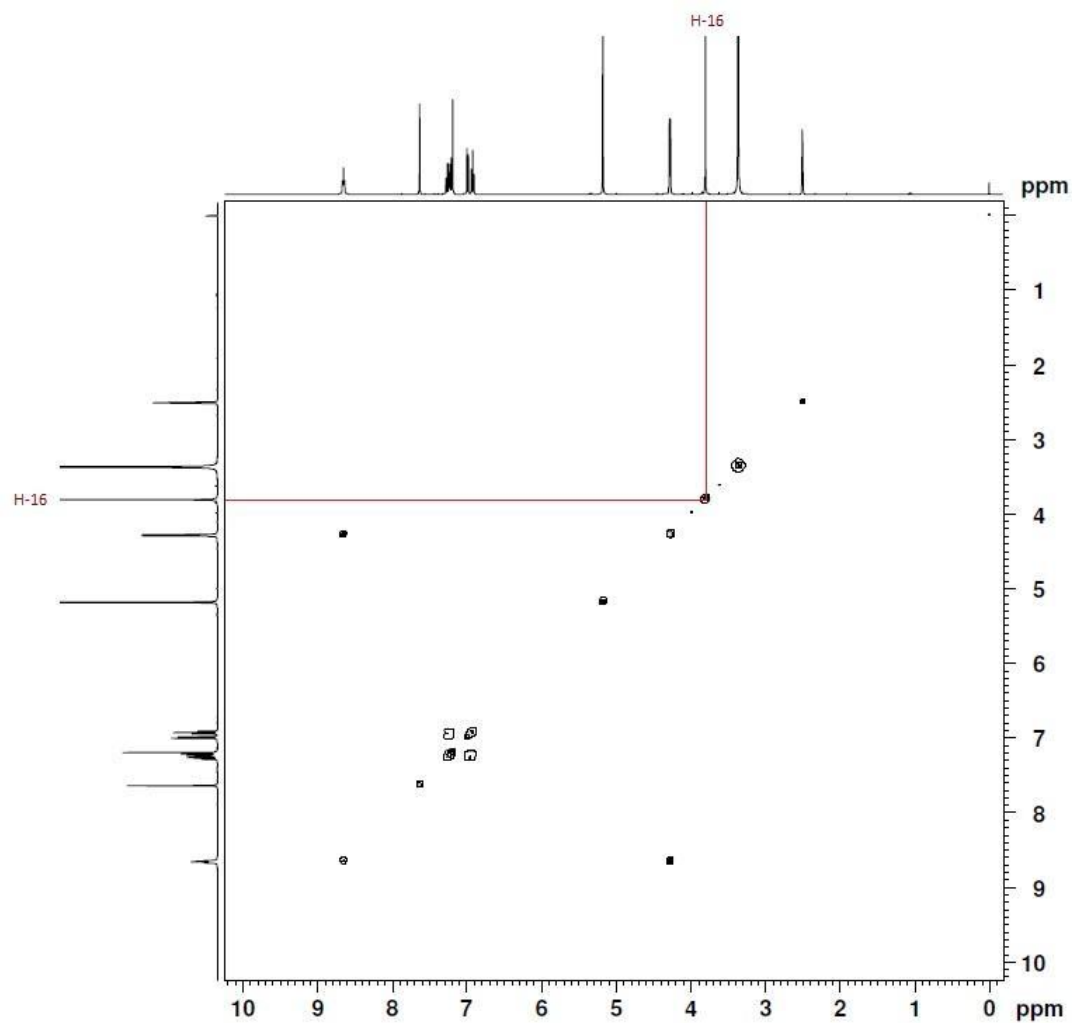
Espectro 139: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **15**.



Espectro 140: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 15.



Espectro 141: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 15.



Current Data Parameters
 NAME si103220140
 EXPNO 12
 PROCNO 1

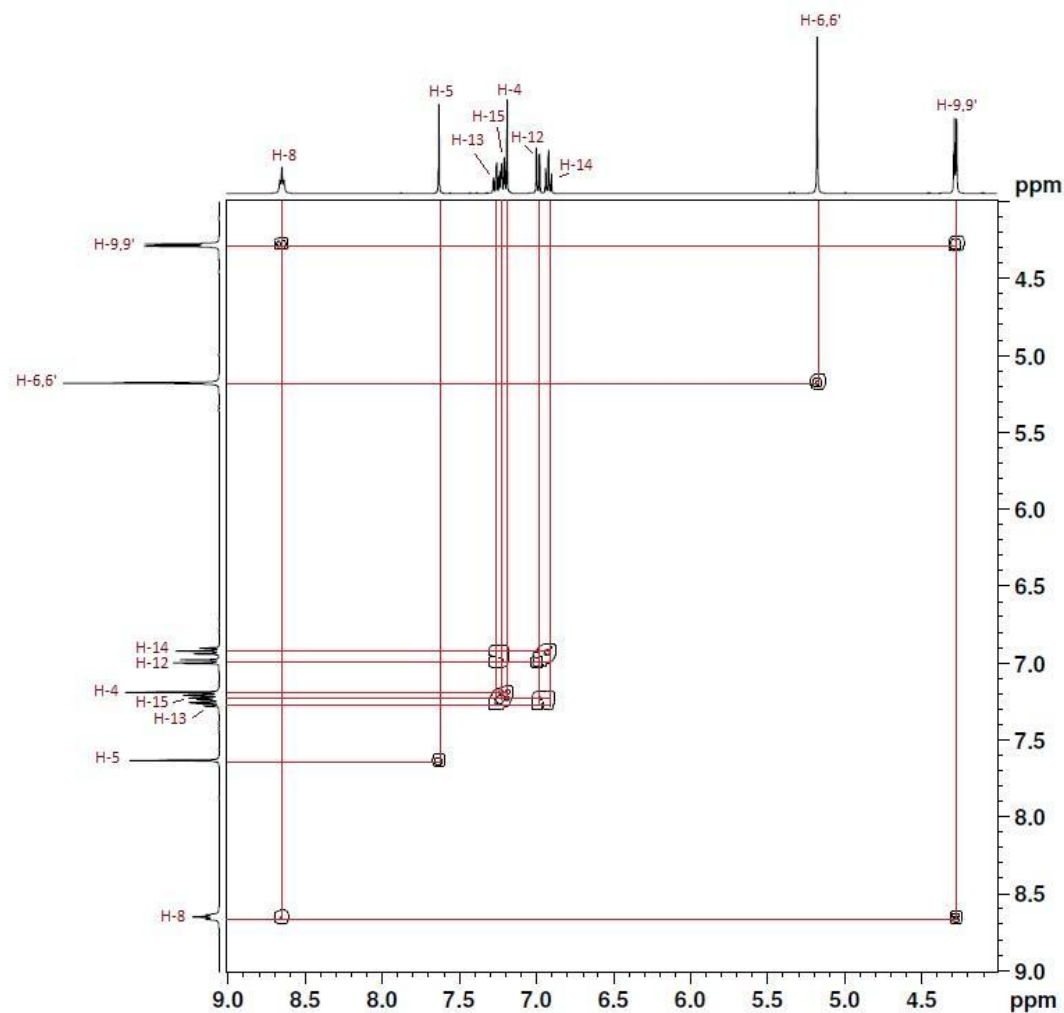
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20220315
 Time 3.51 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z122623_0041 (i
 PULPROG cosygpppqf
 TD 2048
 SOLVENT DMSO
 NS 32
 DS 8
 SWH 4807.692 Hz
 FIDRES 4.695012 Hz
 AQ 0.2129920 sec
 RG 59.25
 DW 104.000 usec
 DE 12.00 usec
 TE 298.0 K
 D0 0.0000300 sec
 D1 2.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 D12 0.00002000 sec
 D13 0.00004000 sec
 D16 0.00020000 sec
 INO 0.00020800 sec
 TDev 1
 SFO1 400.2622014 MHz
 NUC1 1H
 P0 12.40 usec
 P1 12.40 usec
 P17 2500.00 usec
 PLW1 7.90320015 W
 PLW10 1.35020006 W
 GPNAM[1] SMSQ10.100
 GPZ1 10.00 %
 P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
 TD 128
 SFO1 400.2622 MHz
 FIDRES 75.120193 Hz
 SW 12.011 ppm
 FMODE QF

F2 - Processing parameters
 SI 1024
 SF 400.2600047 MHz
 WDW QSINE
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.40

F1 - Processing parameters
 SI 1024
 MC2 QF
 SF 400.2600044 MHz
 WDW QSINE
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0

Espectro 142: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 15.



Current Data Parameters
NAME si103220140
EXPNO 12
PROCNO 1

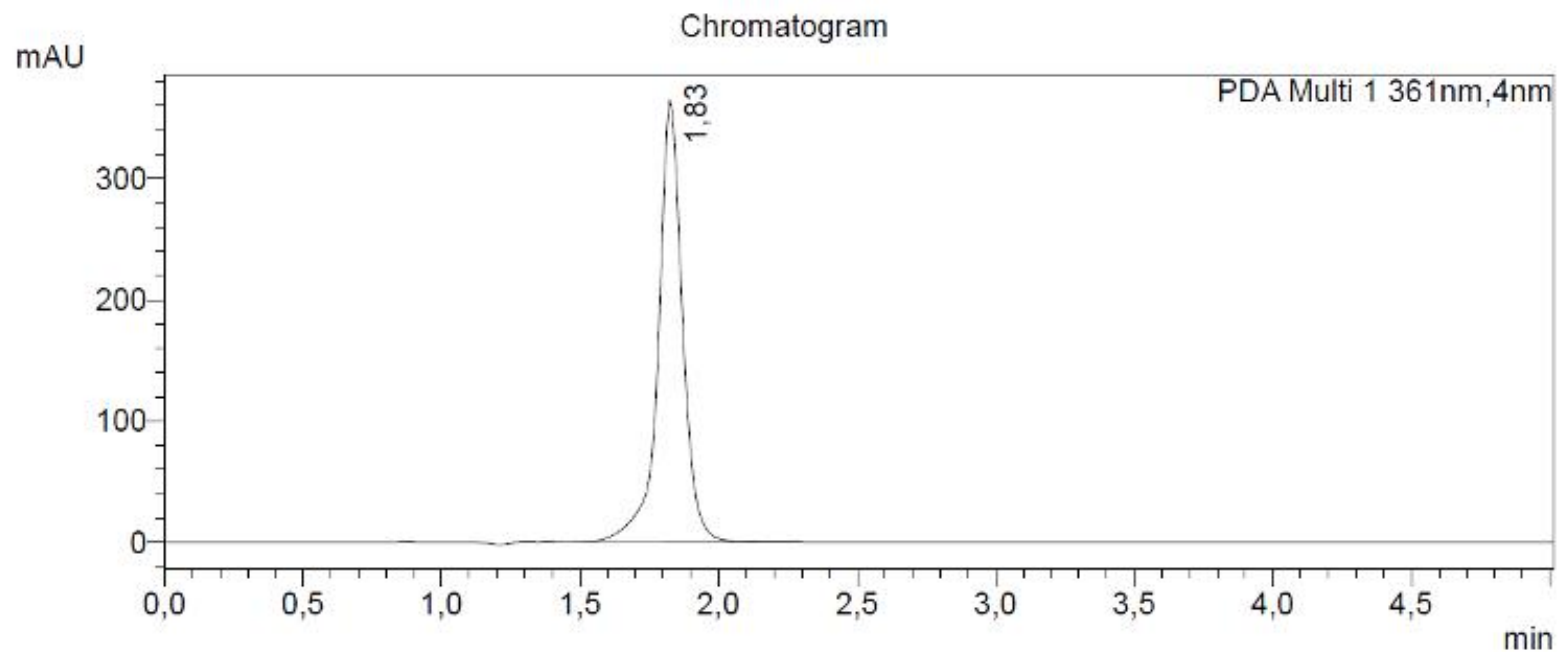
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20220315
Time 3.51 h
INSTRUM spect
PROBHD Z122623_0041 ()
PULPROG cosygpppqf
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 32
DS 8
SWH 4807.692 Hz
FIDRES 4.695012 Hz
AQ 0.2129920 sec
RG 59.25
DQ 104.000 usec
DE 12.00 usec
TE 298.0 K
D0 0.00000300 sec
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00002000 sec
D13 0.00004000 sec
D16 0.00020000 sec
INO 0.00020800 sec
TDev 1
SFO1 400.2622014 MHz
NUC1 1H
P0 12.40 usec
P1 12.40 usec
P17 2500.00 usec
PLW1 7.90320015 W
PLW10 1.35020006 W
CPDAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 128
SFO1 400.2622 MHz
FIDRES 75.120193 Hz
SW 12.011 ppm
F2MODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.2600047 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 400.2600044 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Espectro 143: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 15.

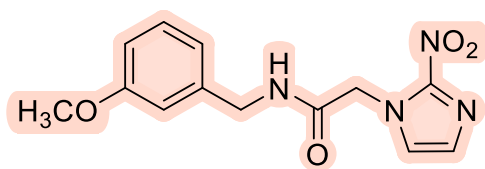


Peak Table

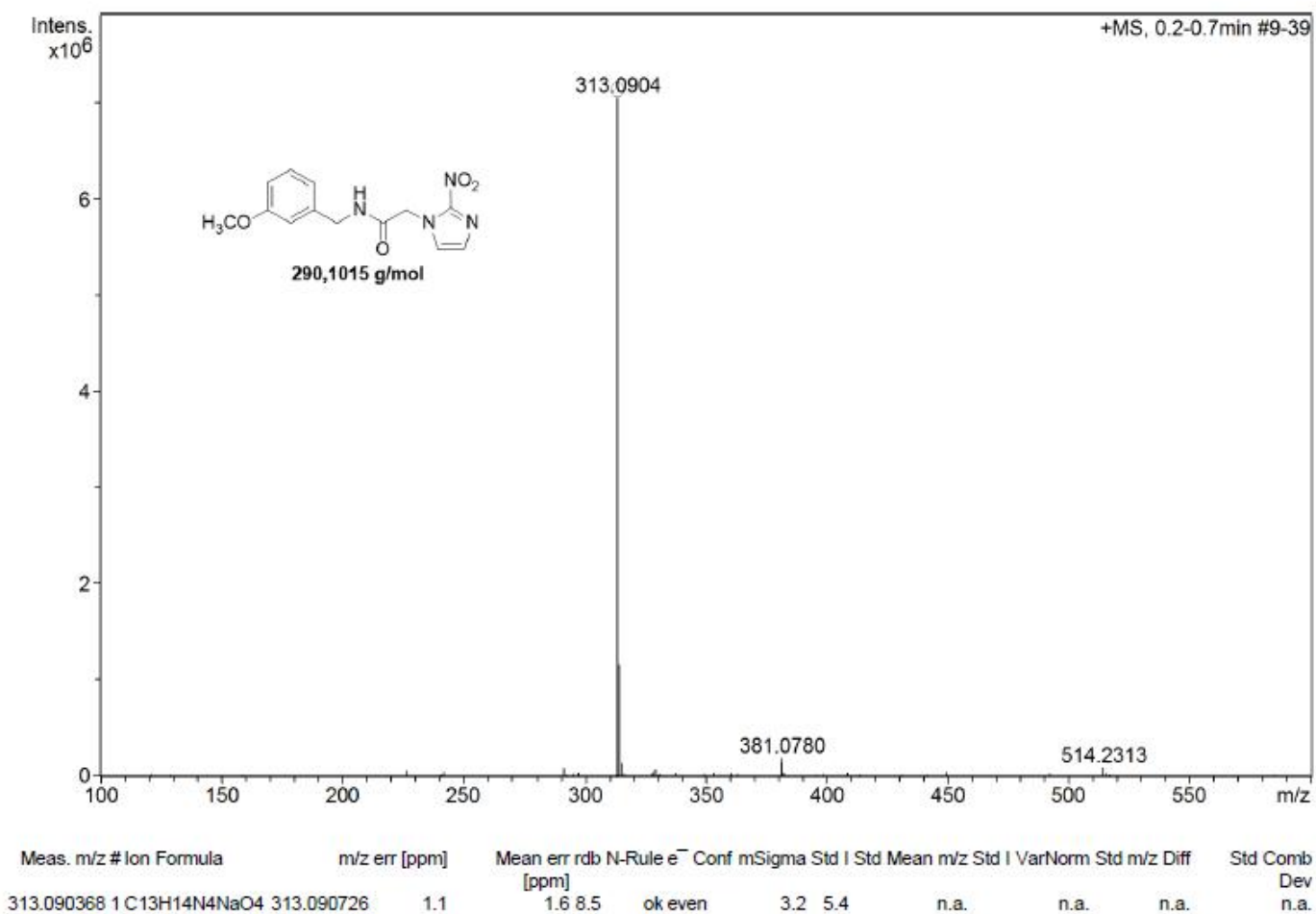
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,83		2205834	100,0	12251	0,908	--	--
Total			2205834	100,0				

Cromatograma 15: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **15**.

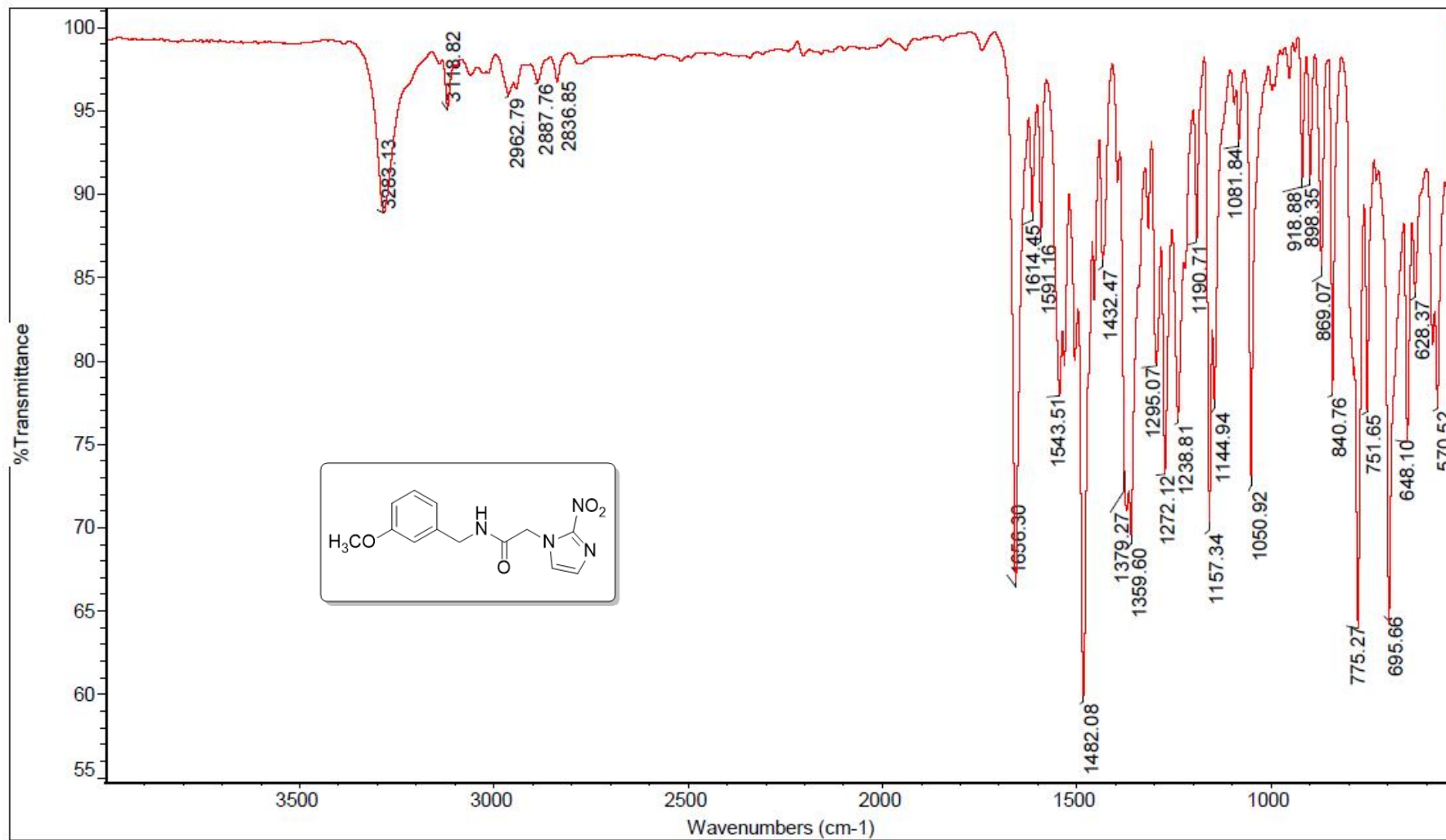
N-(3-metoxibenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (16)



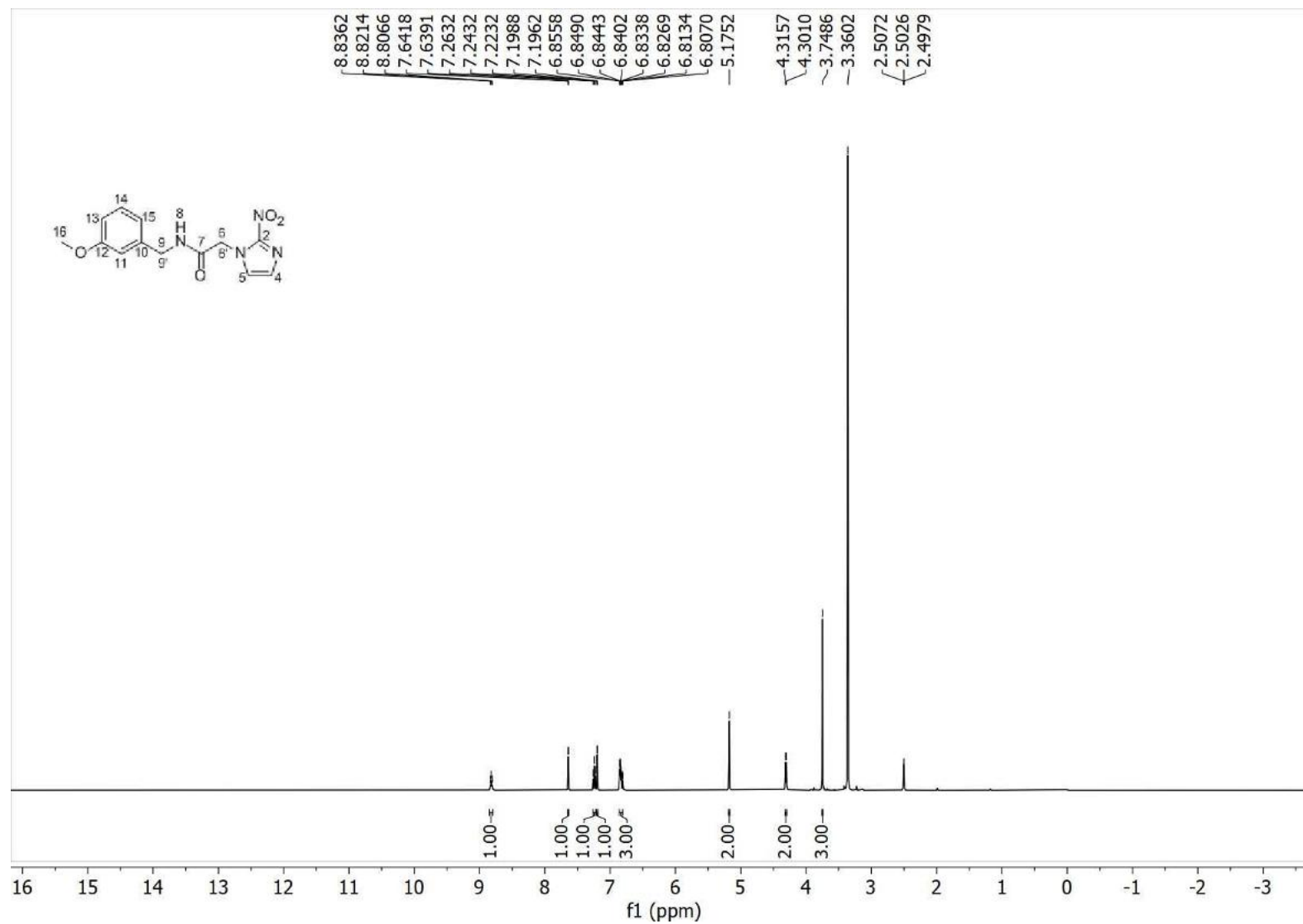
+MS, 0.2-0.7min #9-39



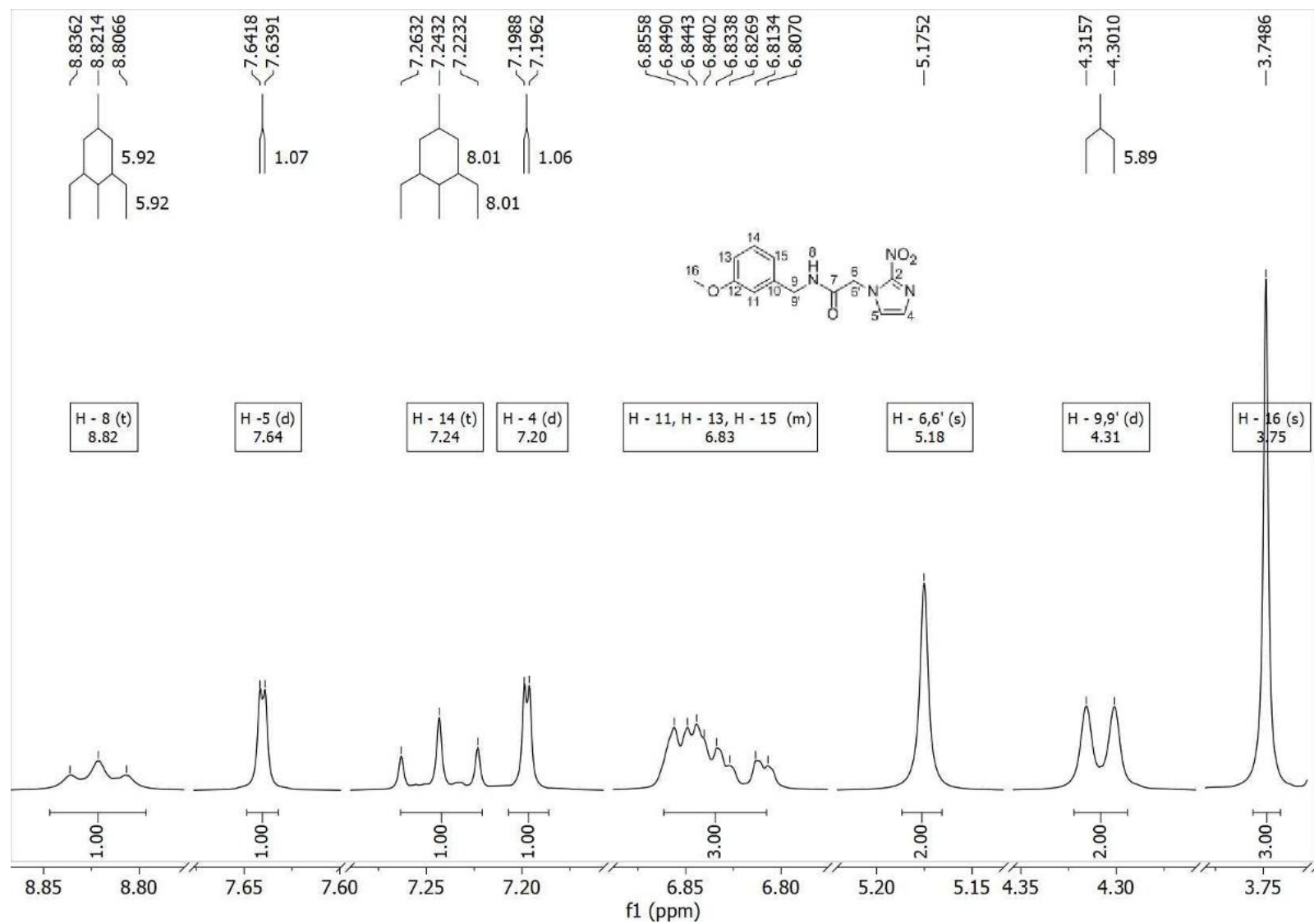
Espectro 144: Espectro de massas de alta resolução do derivado **16**.



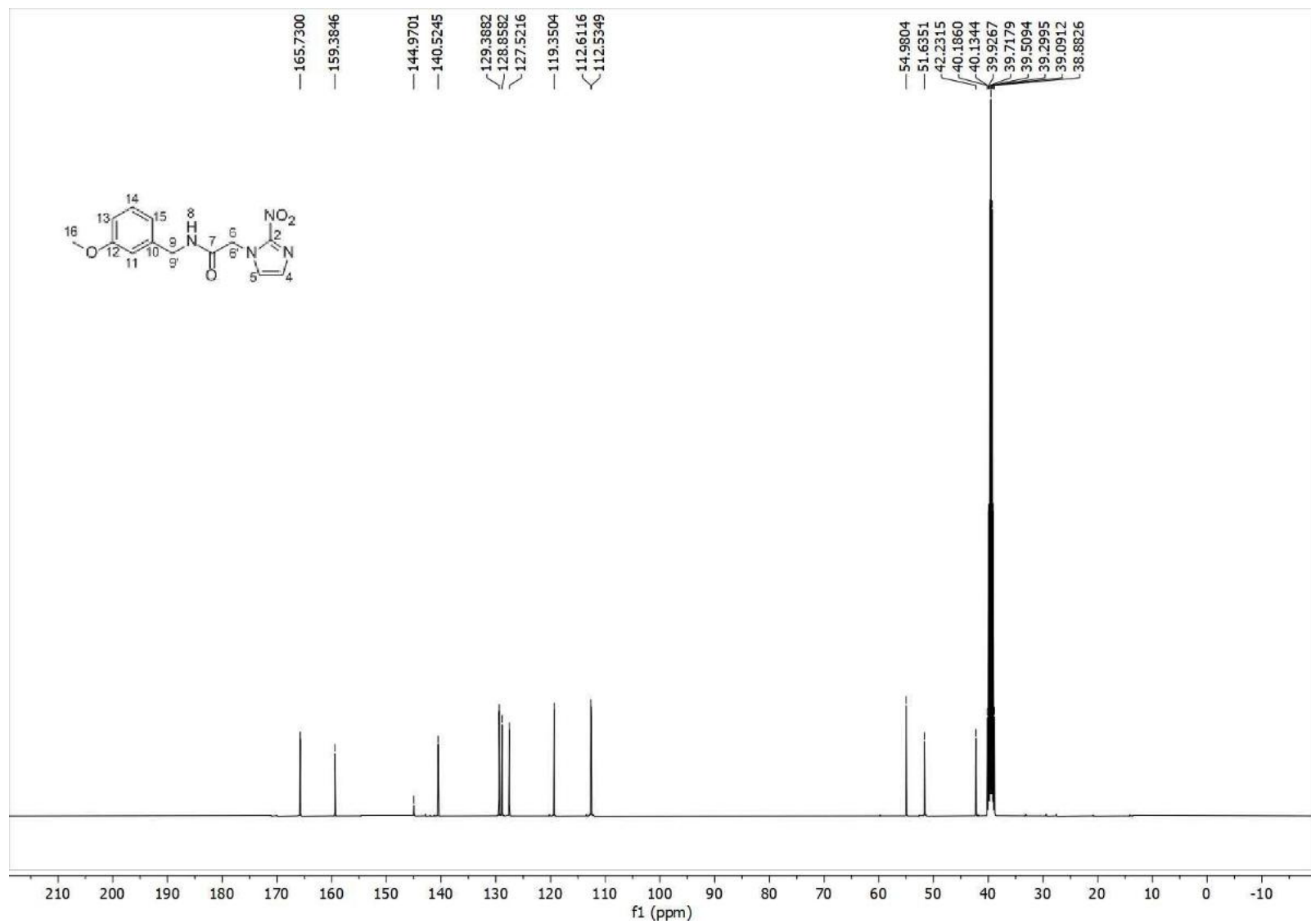
Espectro 145: Espectro de infravermelho do derivado 16.



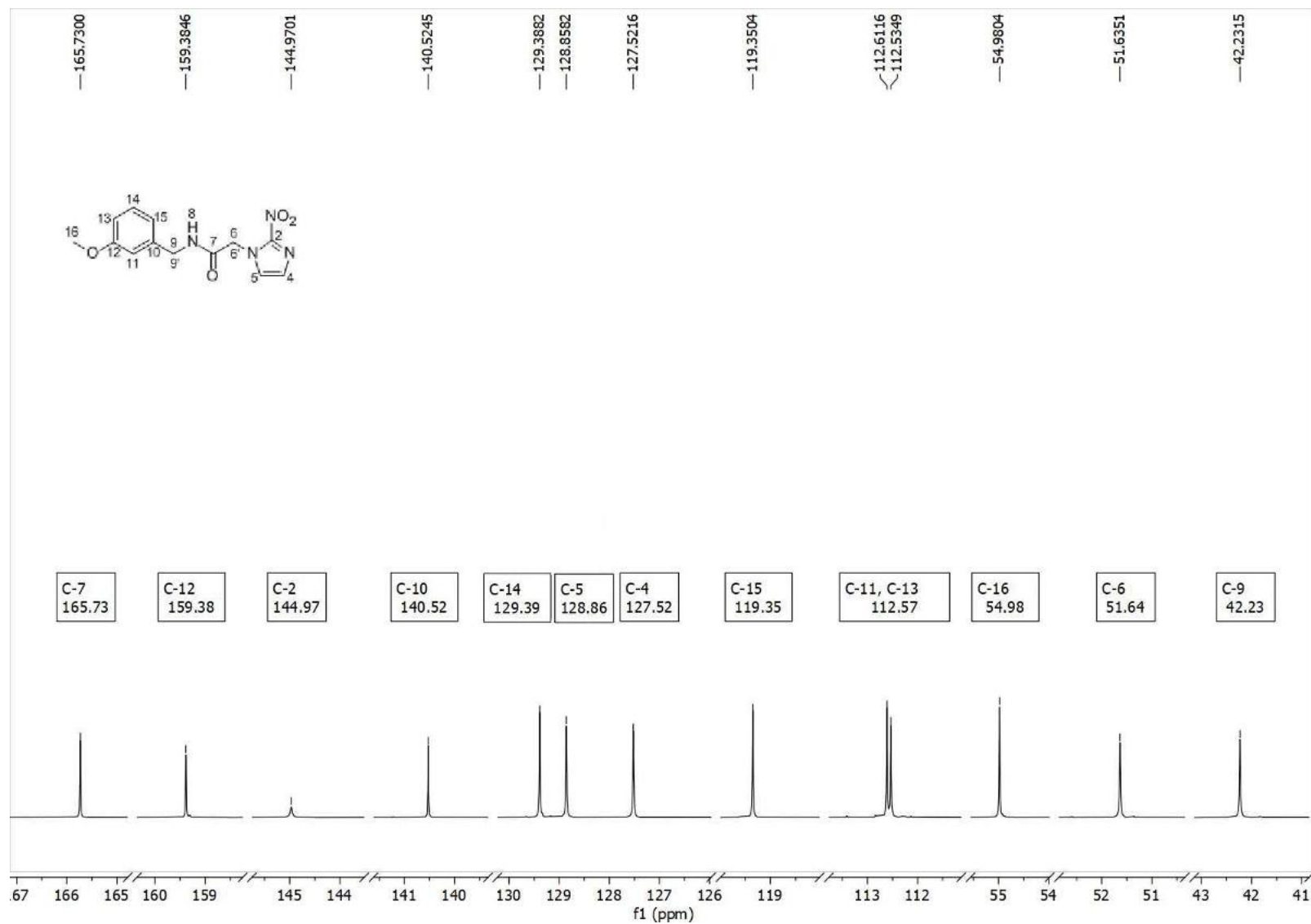
Espectro 146: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO-d_6) do derivado 16.



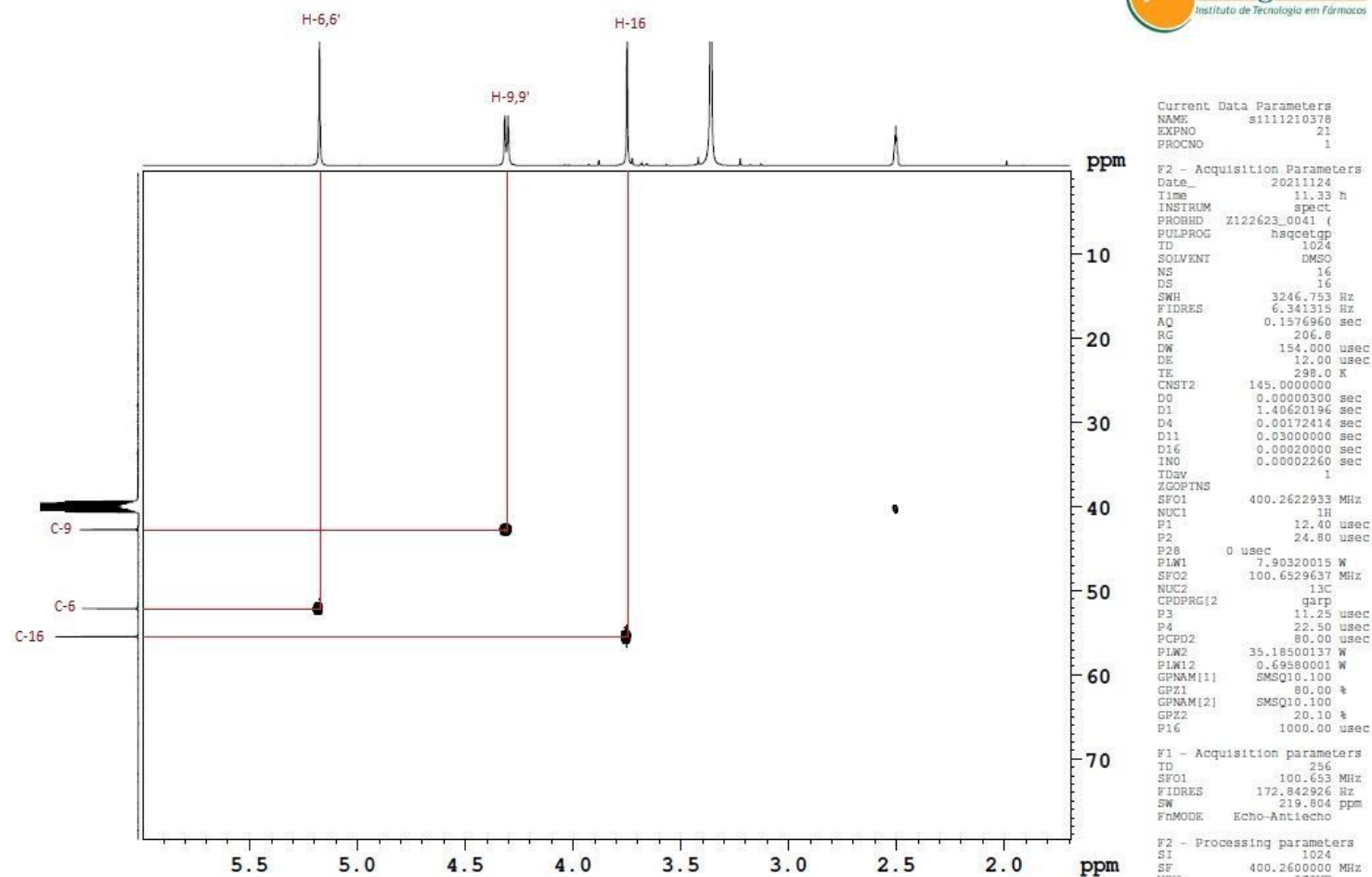
Espectro 147: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **16**.



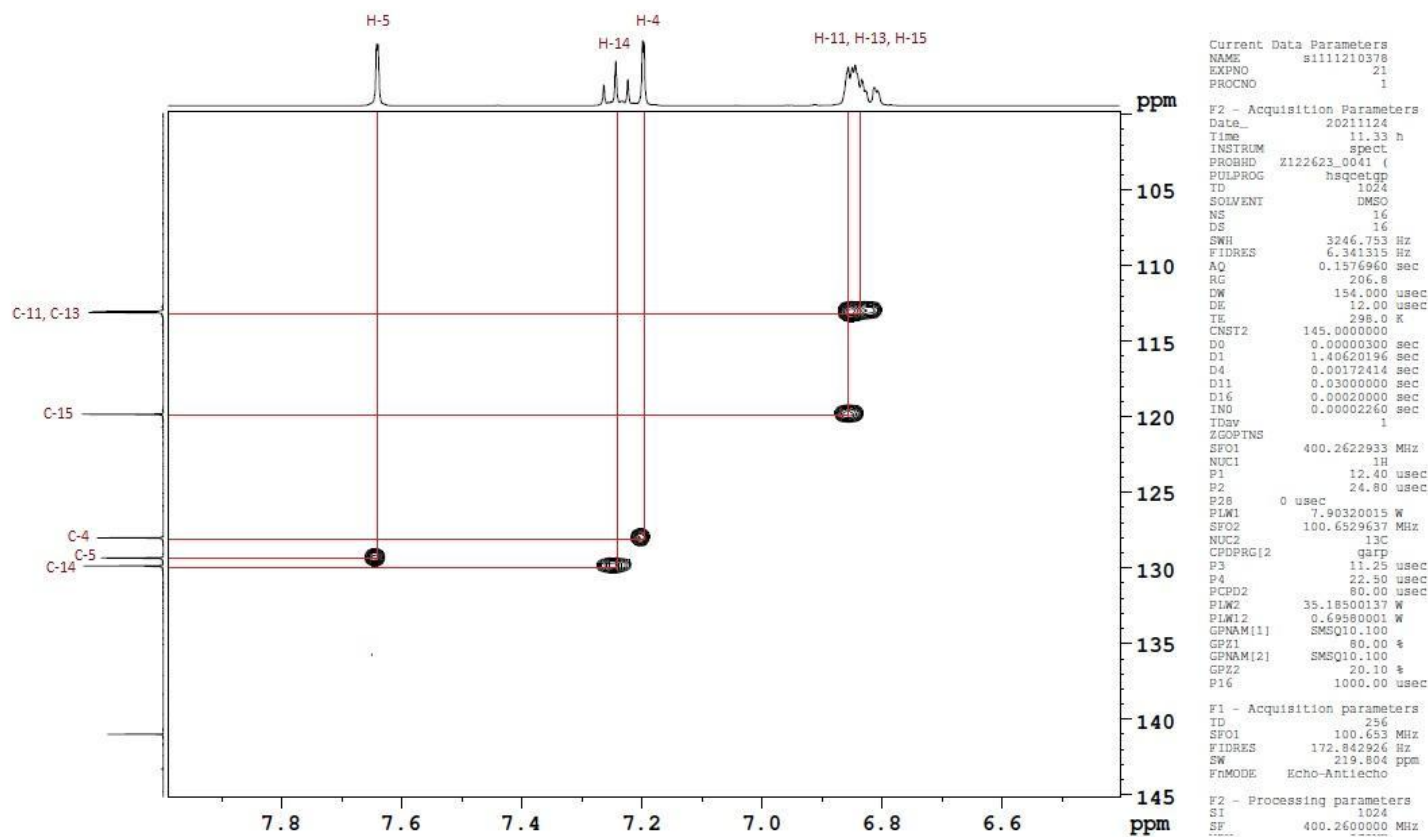
Espectro 148: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **16**.



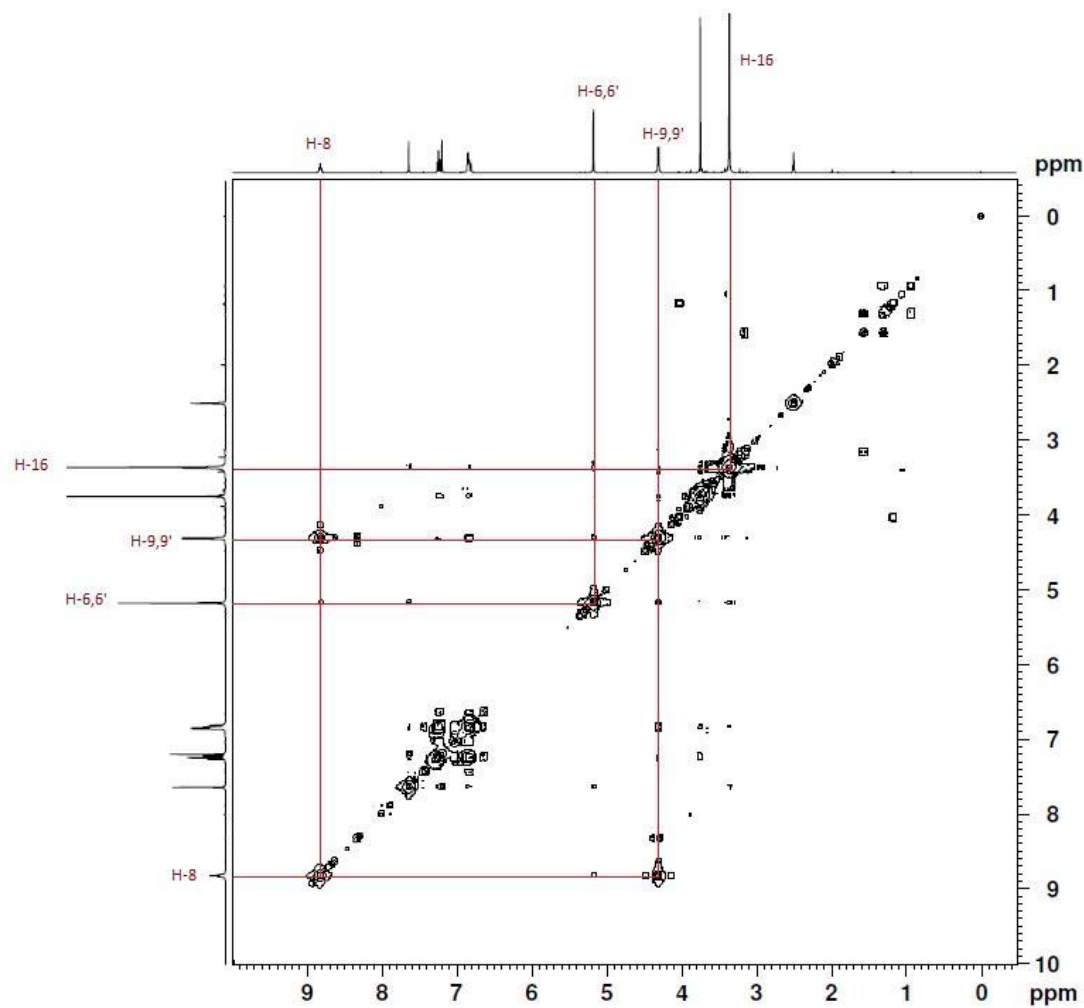
Espectro 149: Espectro de RMN ¹³C (100 MHz; DMSO-d₆) do derivado **16**.



Espectro 150: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 16.



Espectro 151: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 16.



```

Current Data Parameters
NAME      sil11210378
EXPNO     12
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20211114
Time      7.37 h
INSTRUM   spect
PROBHD    Z122623_0041 (
PULPROG   cosygpppqf
TD         2048
SOLVENT   DMSO
NS         32
DS         8
SWH        4807.692 Hz
FIDRES     4.695012 Hz
AQ         0.2129920 sec
RG         59.25
DW         104.000 usec
DE         12.00 usec
TE         298.0 K
D0         0.00000300 sec
D1         2.00000000 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00002000 sec
D13        0.00000400 sec
D16        0.00020000 sec
IN0        0.00020800 sec
TD0av      1
SFO1       400.2622014 MHz
NUC1       1H
P0         12.40 usec
P1         12.40 usec
P17        2500.00 usec
PLM1       7.90320015 W
PLM10      1.35020006 W
GPNAM[1]   SMSQ10.100
GPZ1       10.00 %
P16        1000.00 usec

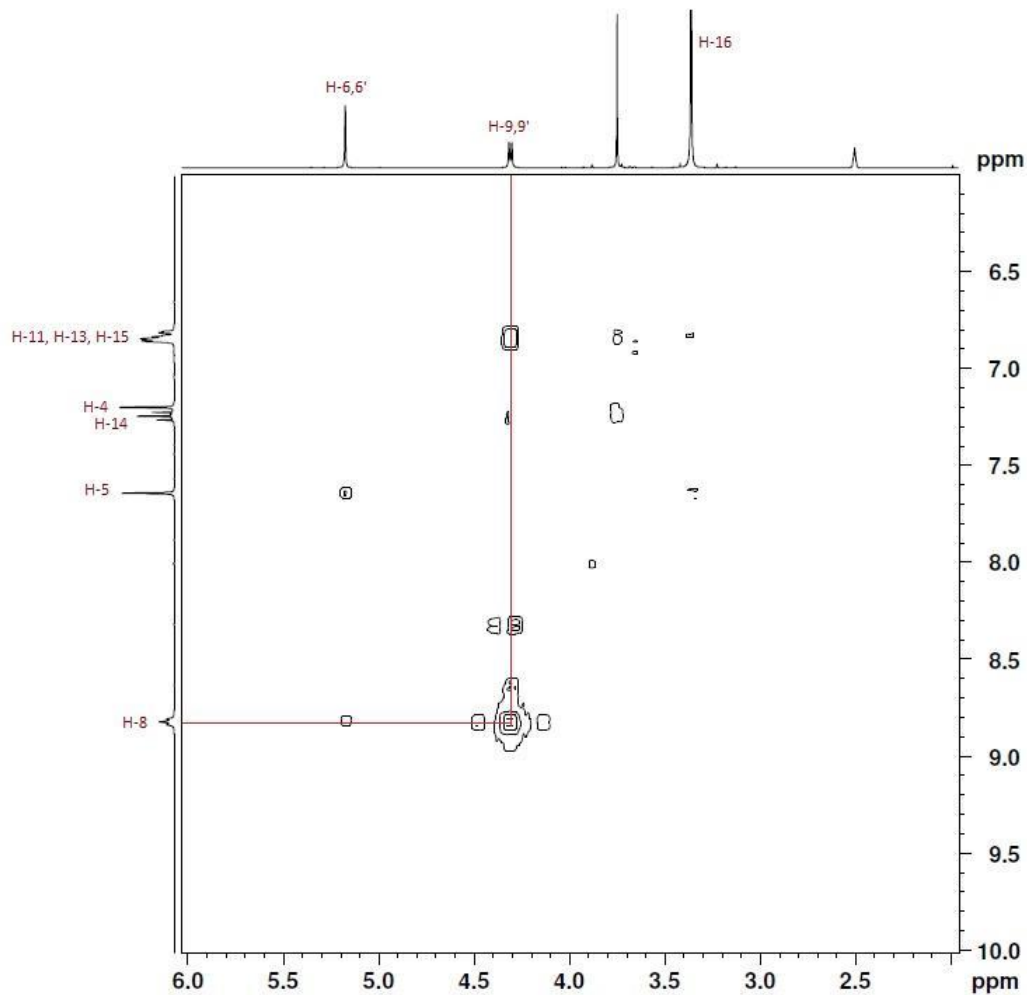
F1 - Acquisition parameters
TD         128
SFO1       400.2622 MHz
FIDRES     75.120193 Hz
SW         12.011 ppm
F2MODE     QF

F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         400.2600007 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.40

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        QF
SF         400.2600012 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0

```

Espectro 152: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 16.



Current Data Parameters
NAME: sil11210378
EXPNO: 12
PROCNO: 1

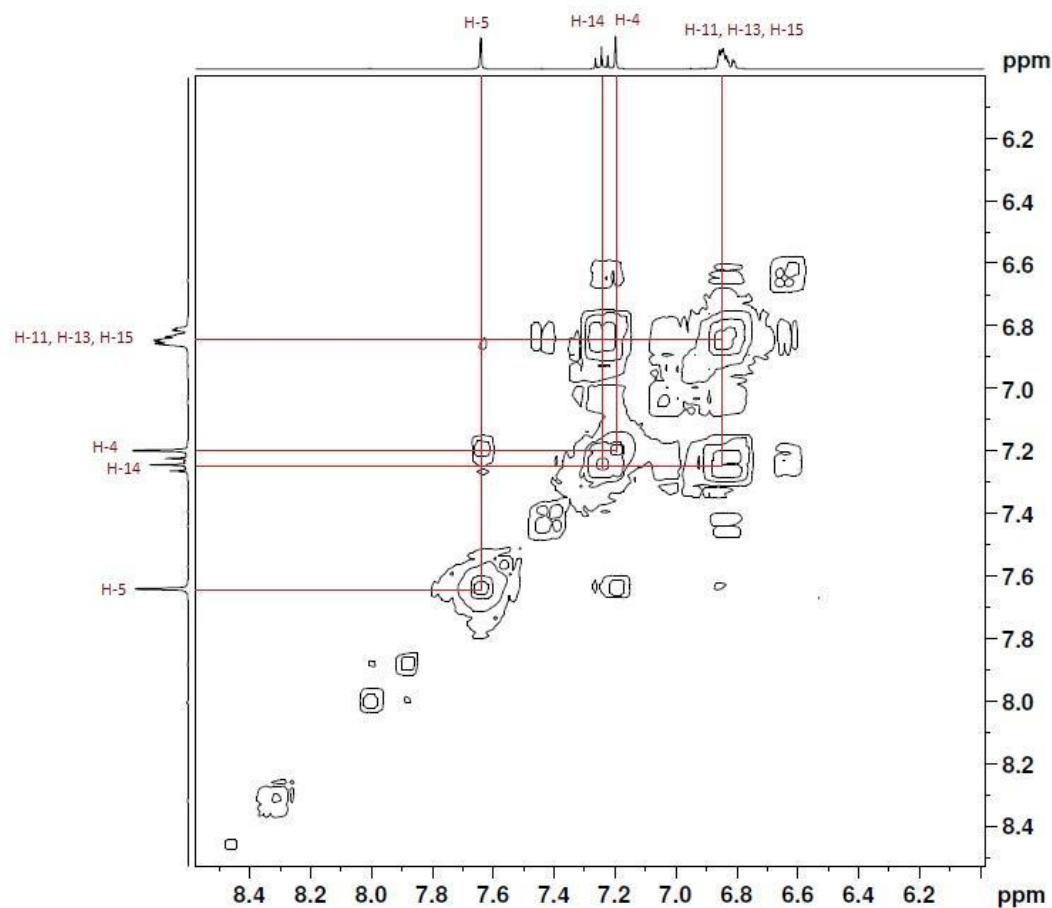
F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20211114
Time: 7.37 h
INSTRUM: spect
PROBHD: Z122623_0041
PULPROG: cosygpppqf
TD: 2048
SOLVENT: DMSO
DS: 8
NS: 32
SWH: 4807.692 Hz
FIDRES: 4.695012 Hz
AQ: 0.2129920 sec
RG: 59.25
DW: 104.000 usec
DE: 12.00 usec
TE: 298.0 K
DQ: 0.00000300 sec
D1: 2.00000000 sec
D11: 0.03000000 sec
D12: 0.00002000 sec
D13: 0.00000400 sec
D16: 0.00020000 sec
IN0: 0.00020800 sec
TDav: 1
SFO1: 400.2622014 MHz
NUC1: 1H
PQ: 12.40 usec
P1: 12.40 usec
P17: 2500.00 usec
PLW1: 7.90320015 W
PLW10: 1.35020006 W
CPNAM[1]: SMSQ10.100
CPZ1: 10.00 %
P16: 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD: 128
SFO1: 400.2622 MHz
FIDRES: 75.120193 Hz
SW: 12.011 ppm
F2MODE: QF

F2 - Processing parameters
SI: 1024
SF: 400.2600007 MHz
WDW: QF
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.40

F1 - Processing parameters
SI: 1024
MC2: QF
SF: 400.2600012 MHz
WDW: QF
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0

Espectro 153: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 16.



```

Current Data Parameters
NAME      s1111210378
EXPNO     12
PROCNO    1

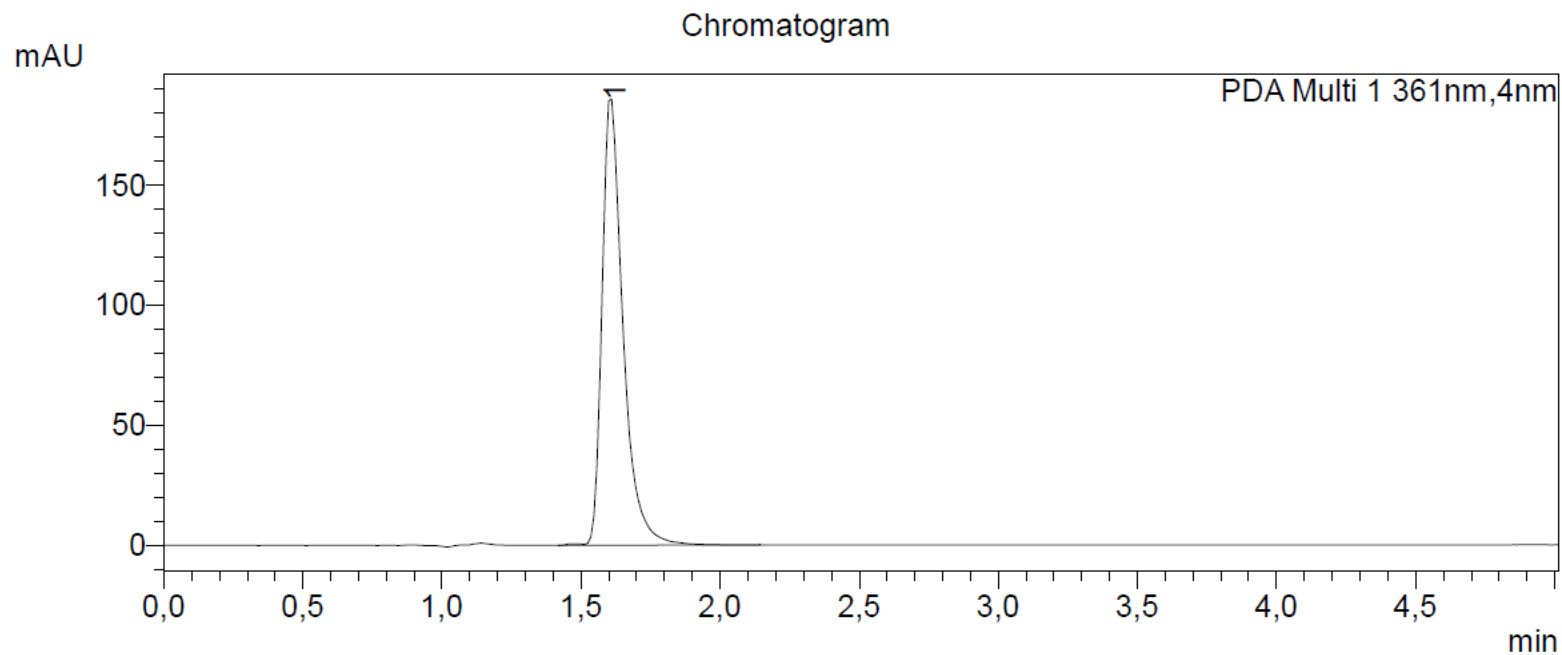
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20211114
Time      7.37 h
INSTRUM   spect
PROBHD    Z122623_0041 (
PULPROG   cosygpppqf
TD         2048
SOLVENT   DMSO
NS         32
DS         8
SWH        4807.692 Hz
FIDRES     4.695012 Hz
AQ         0.2129920 sec
RG         59.25
DE         104.000 usec
TE         298.0 K
D0         0.00000300 sec
D1         2.00000000 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00020000 sec
D13        0.00000400 sec
D16        0.00020000 sec
IN0        0.00020800 sec
TDav       1
SFO1       400.2622014 MHz
NUC1       1H
PC         12.40 usec
P1         12.40 usec
P17        2500.00 usec
PLW1       7.90320015 W
PLW10      1.35020006 W
GPNAM(1)   SMSQ10.100
GPZ1       10.00 %
P16        1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD         128
SFO1       400.2622 MHz
FIDRES     75.120193 Hz
SW         12.011 ppm
F2MODE     QF

F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         400.2600007 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.40

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        QF
SF         400.2600012 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
  
```

Espectro 154: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 16.

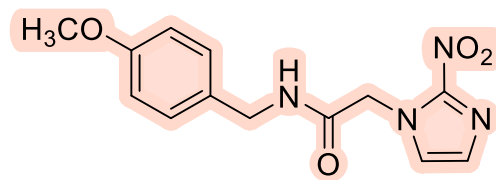


Peak Table

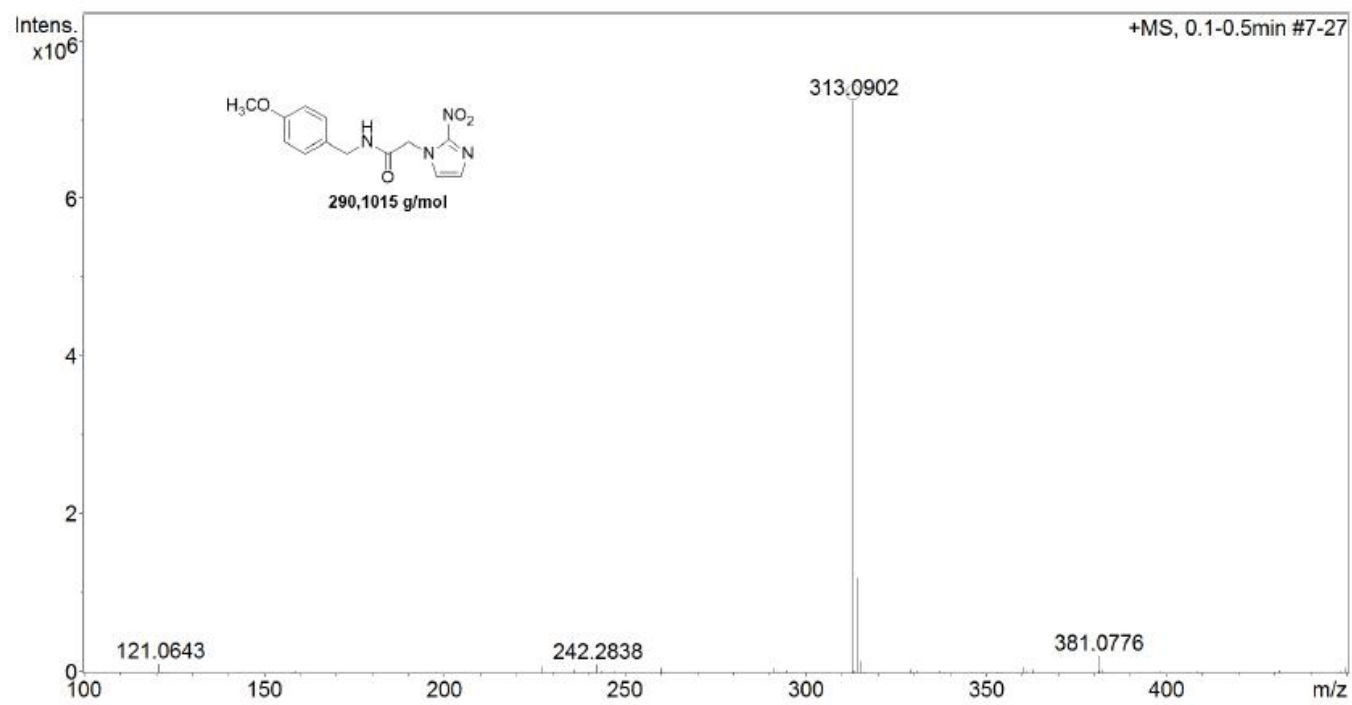
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,61		982802	100,0	12207	1,524	--	--
Total			982802	100,0				

Cromatograma 16: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **16**.

N-(4-metoxibenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (17)

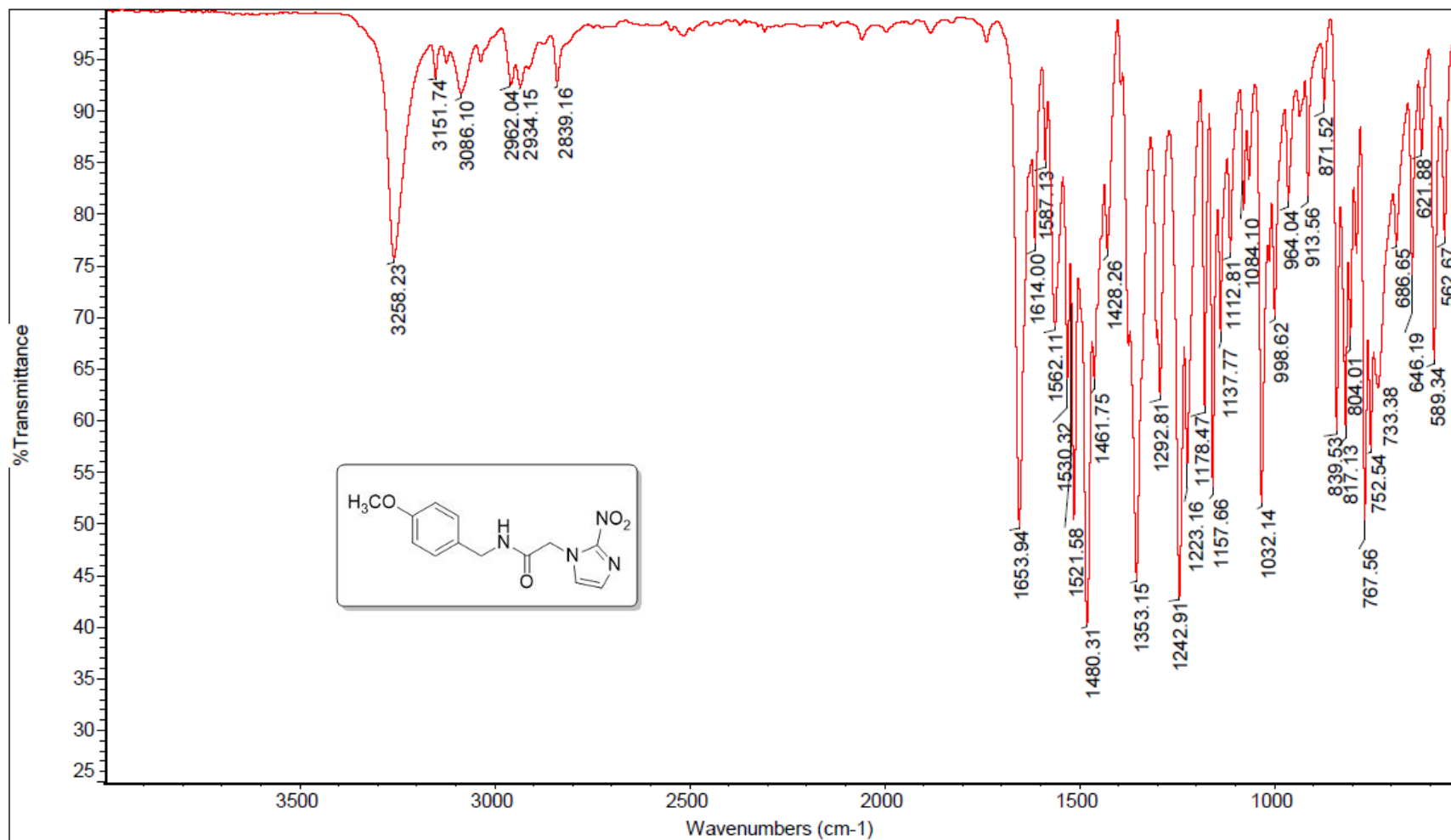


+MS, 0.1-0.5min #7-27

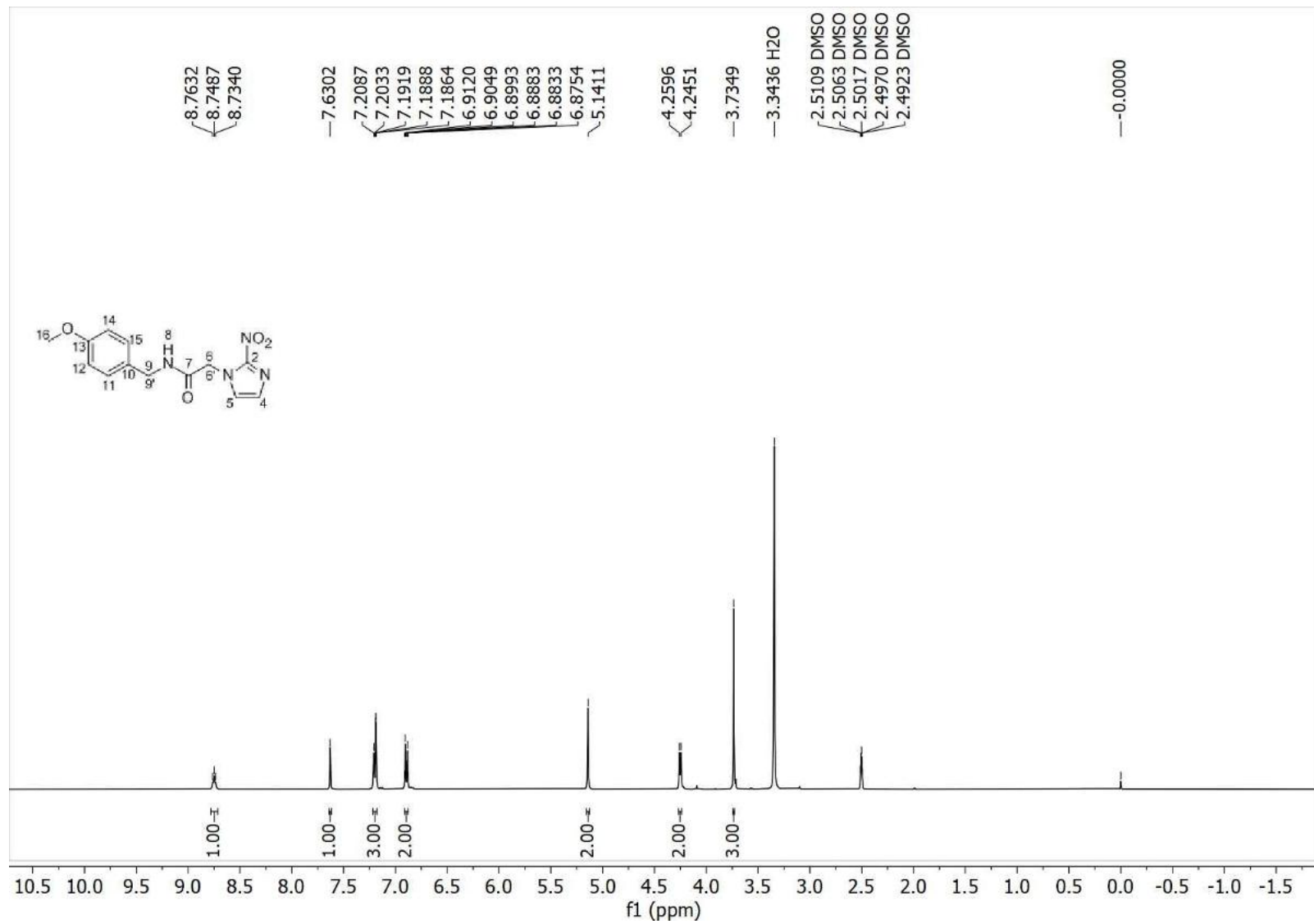


Meas. m/z # Ion Formula	m/z err [ppm]	Mean err rdb N-Rule e ⁻ Conf mSigma Std I Std Mean m/z Std I VarNorm Std m/z Diff	Std Comb Dev
313.090188 1 C13H14N4NaO4	313.090726 1.7	2.4 8.5 ok even 3.9 6.7 n.a. n.a. n.a. n.a.	
2 C12H18NaO8	313.089388 -2.6	-1.4 3.5 ok even 17.7 29.7 n.a. n.a. n.a. n.a.	

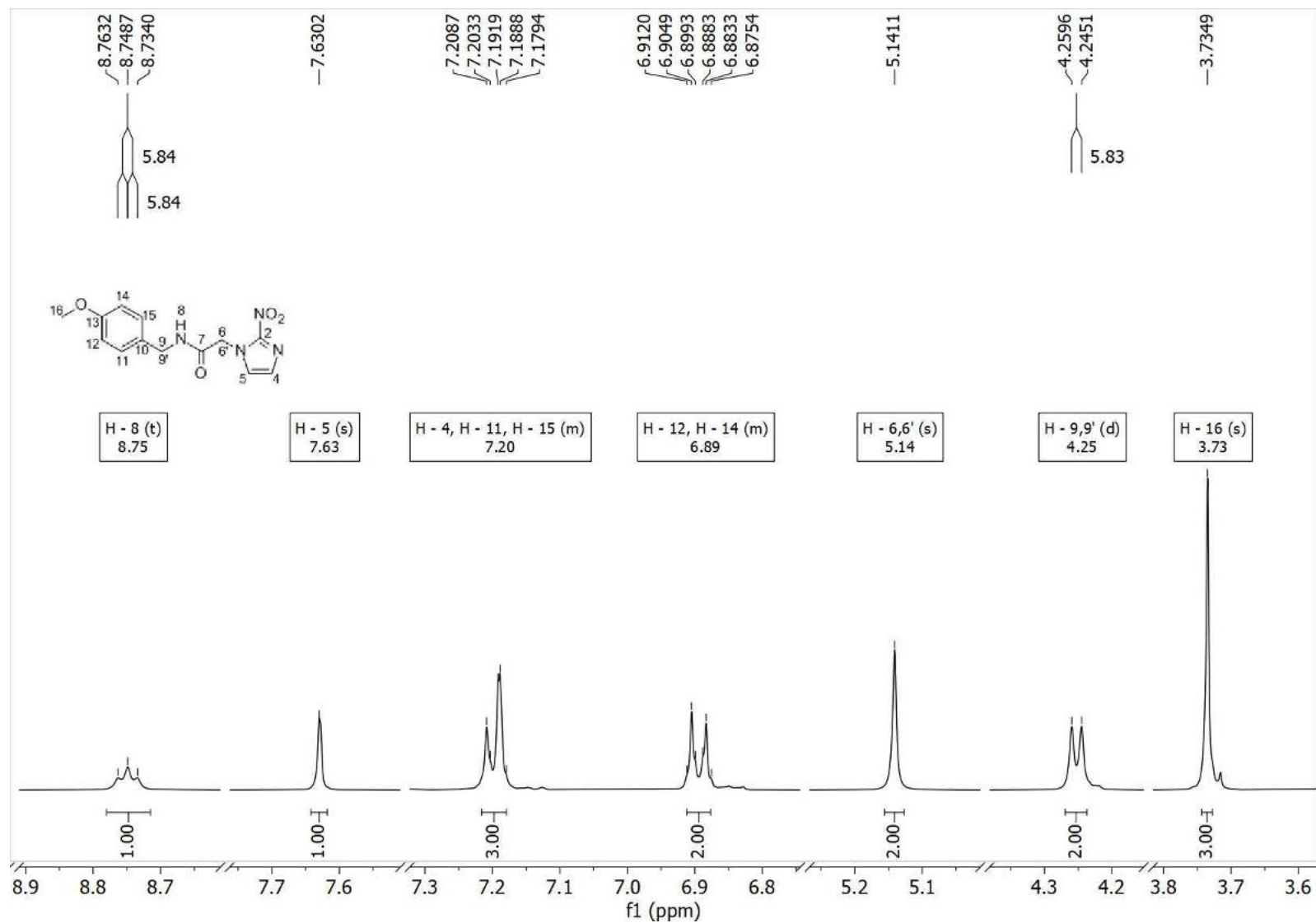
Espectro 155: Espectro de massas de alta resolução do derivado 17.



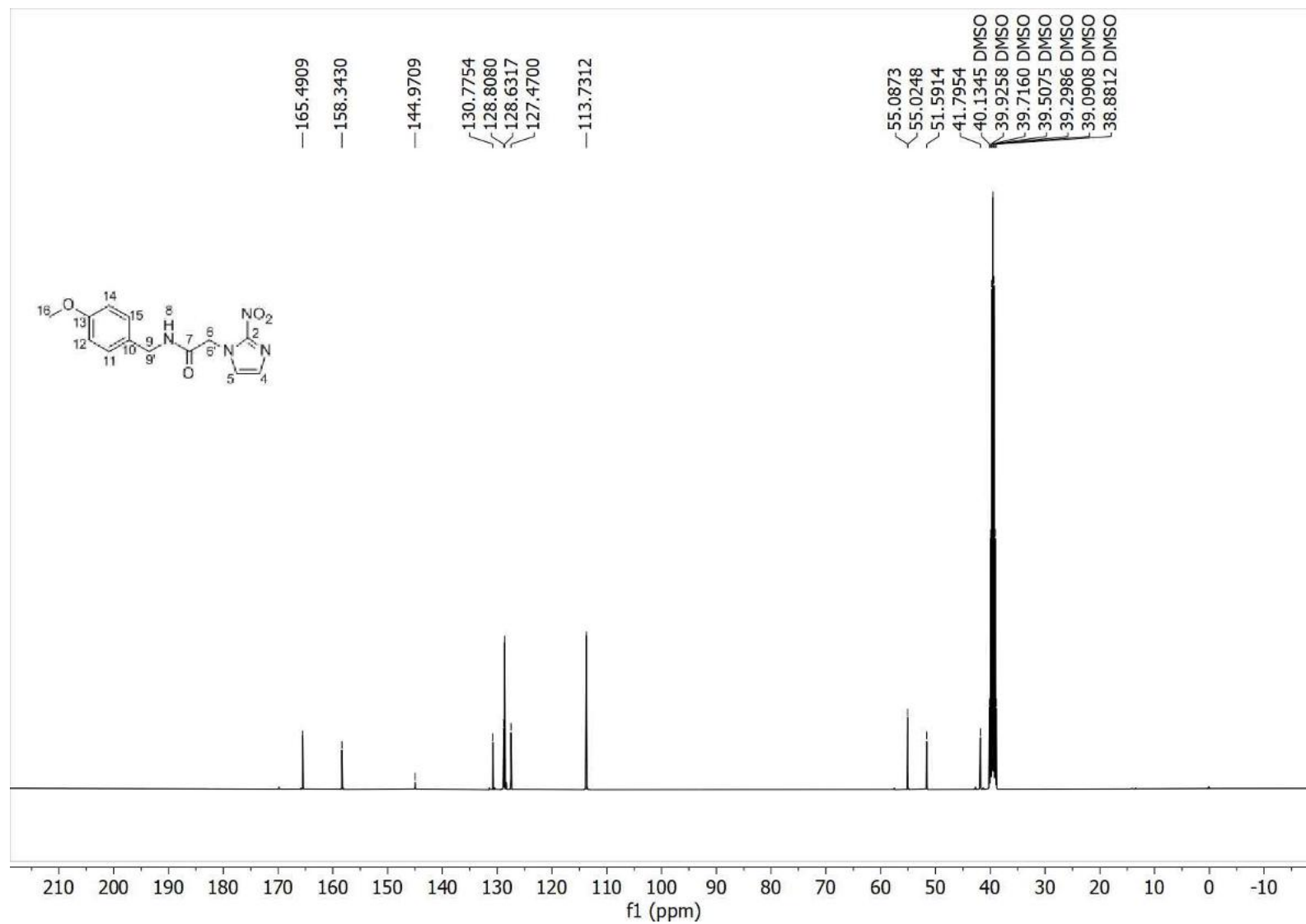
Espectro 156: Espectro de infravermelho do derivado 17.



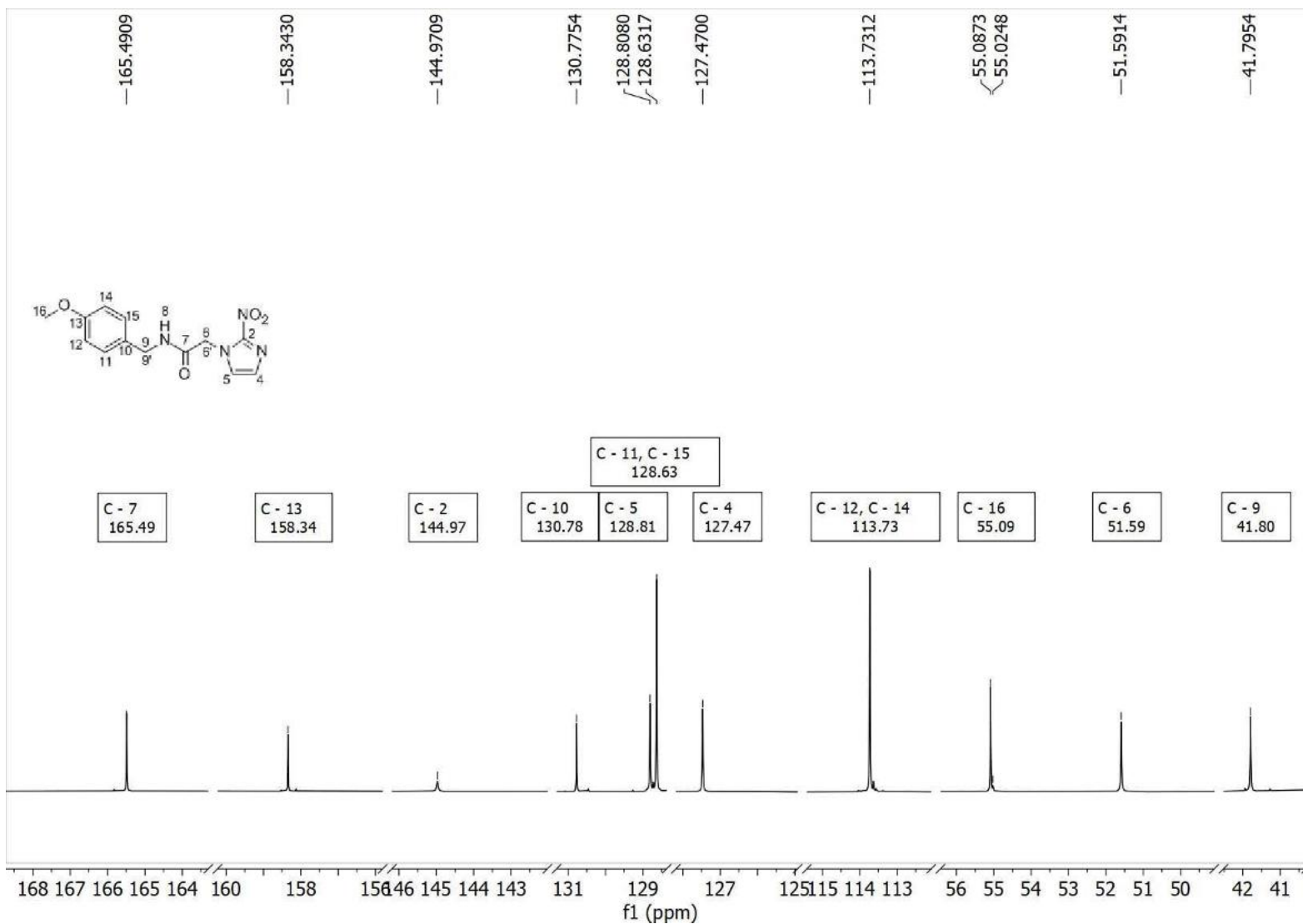
Espectro 157: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **17**.



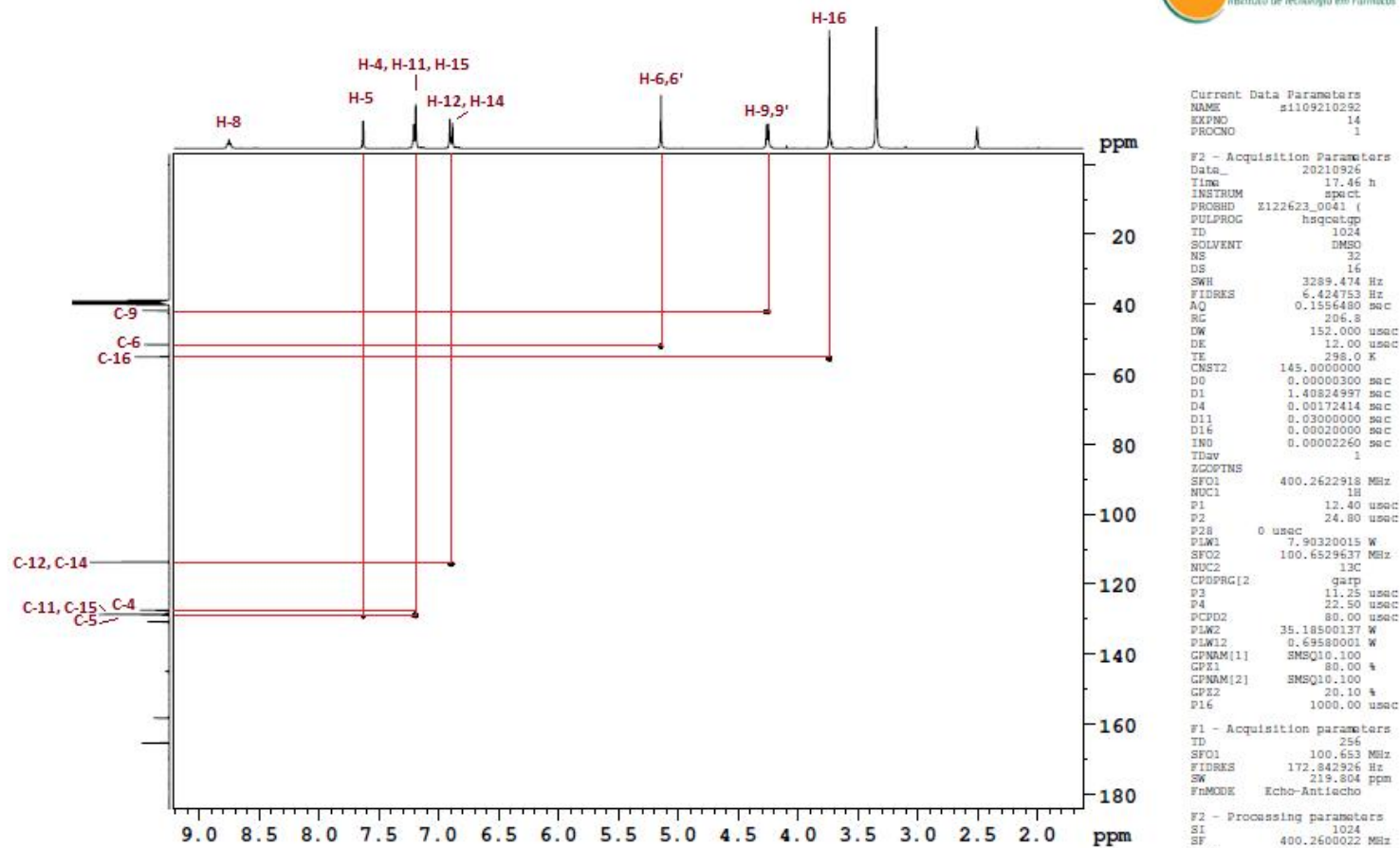
Espectro 158: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado 17.



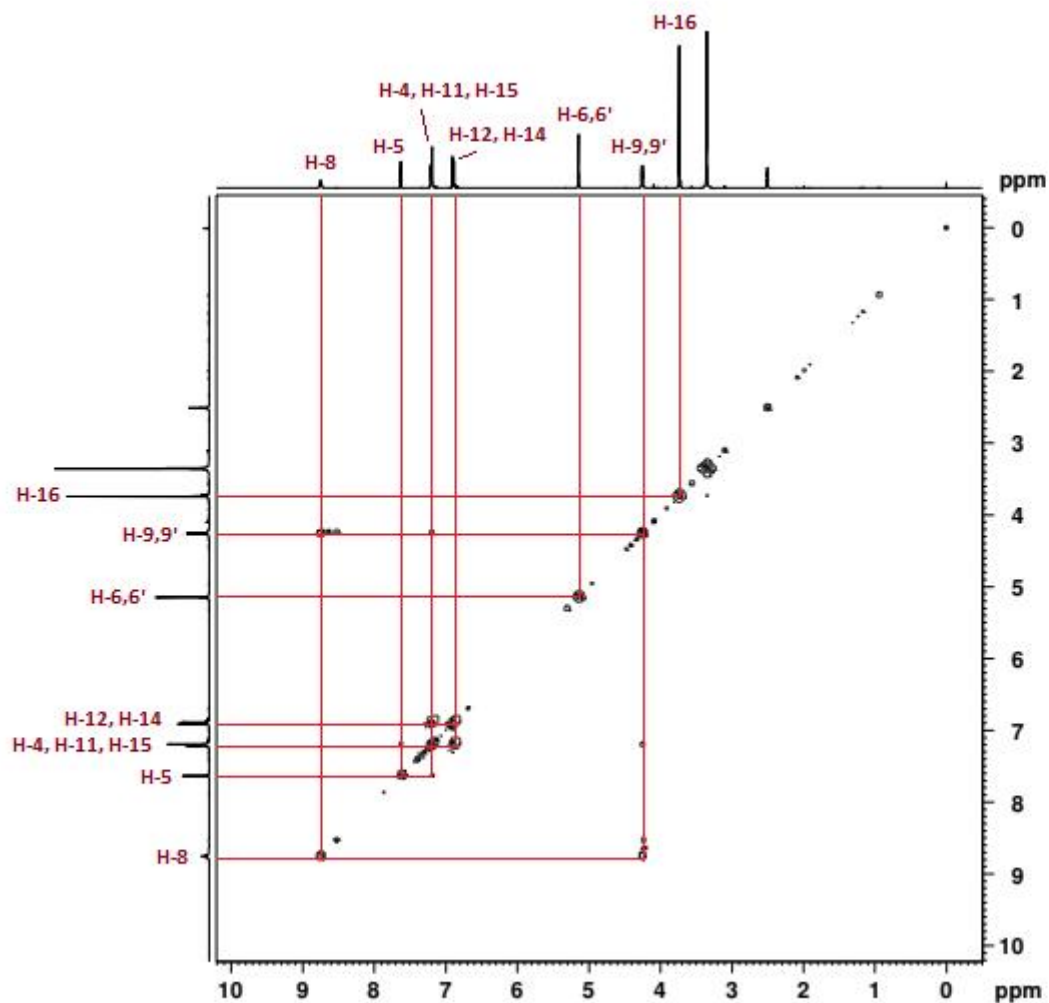
Espectro 159: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado 17.



Espectro 160: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado 17.



Espectro 161: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 17.



```

Current Data Parameters
NAME      s1109210292
EXPNO     13
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20210526
Time      15:10 h
INSTRUM   spect
PROBHD    5122623_0041 (
PULPROG   zgpg30
TD         1048
SOLVENT   DMSO
NS         32
DS         8
SWH        4807.692 Hz
FIDRES     4.495012 Hz
AQ         0.2129620 sec
RG         35.61
OW         104.000 usec
DE         12.00 usec
TE         298.0 K
D0         0.00000000 sec
D1         2.00000000 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00002000 sec
D13        0.00004000 sec
D16        0.00020000 sec
IN0        0.00020000 sec
TD0        1
SF01       400.2622014 MHz
NUC1        1H
PC         12.40 usec
P1         12.40 usec
P17        2500.00 usec
PLM0       7.98320015 W
PLM10      1.35020006 W
GPMAM[1]   DMGQ10.100
GP1        10.00 s
P16        1000.00 usec

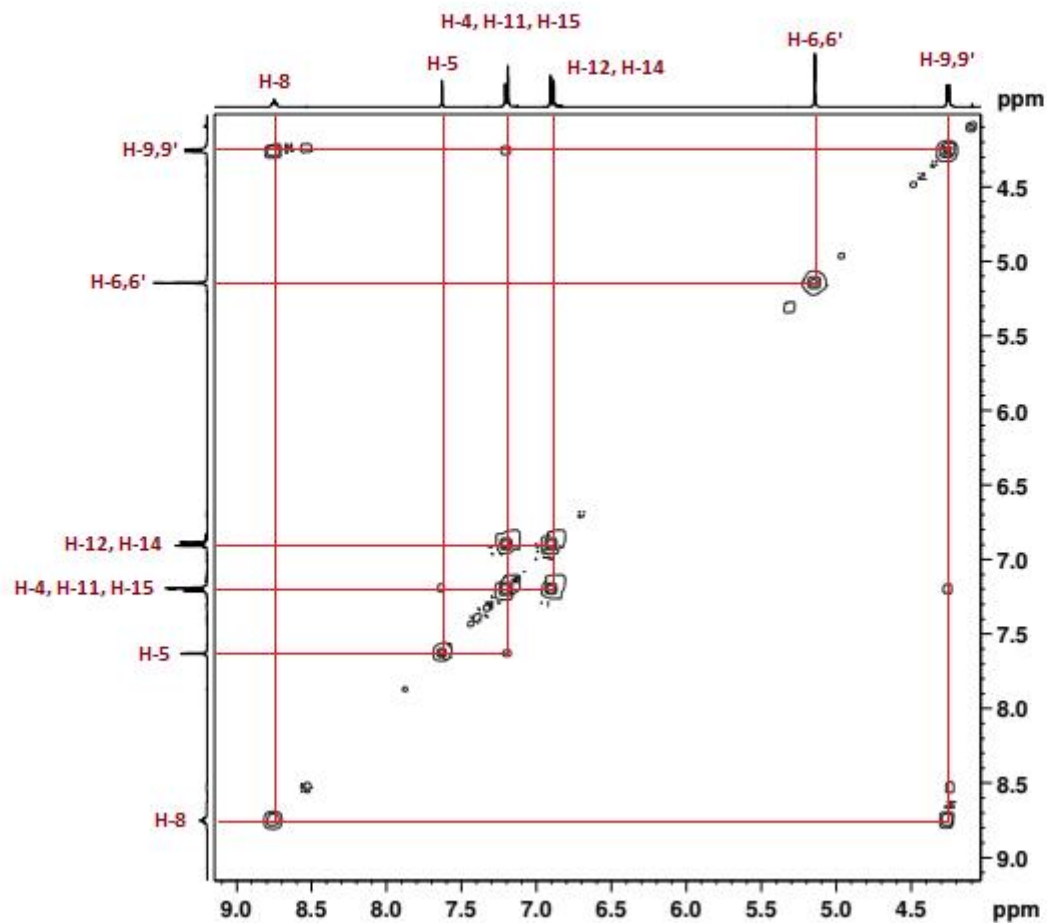
F1 - Acquisition parameters
TD         128
SF01       400.2622 MHz
FIDRES     73.120193 Hz
SW         12.011 ppm
F0F0C0E    QF

F2 - Processing parameters
SI         1624
SF         400.2600010 MHz
WDW        G2
SSB         0
LB          0 Hz
GB          0
PC          1.40

F1 - Processing parameters
SI         1624
MC2        QF
SF         400.2600010 MHz
WDW        G2
SSB         0
LB          0 Hz
GB          0

```

Espectro 162: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 17.



Current Data Parameters
NAME: s102010293
EXPNO: 13
PROCNO: 1

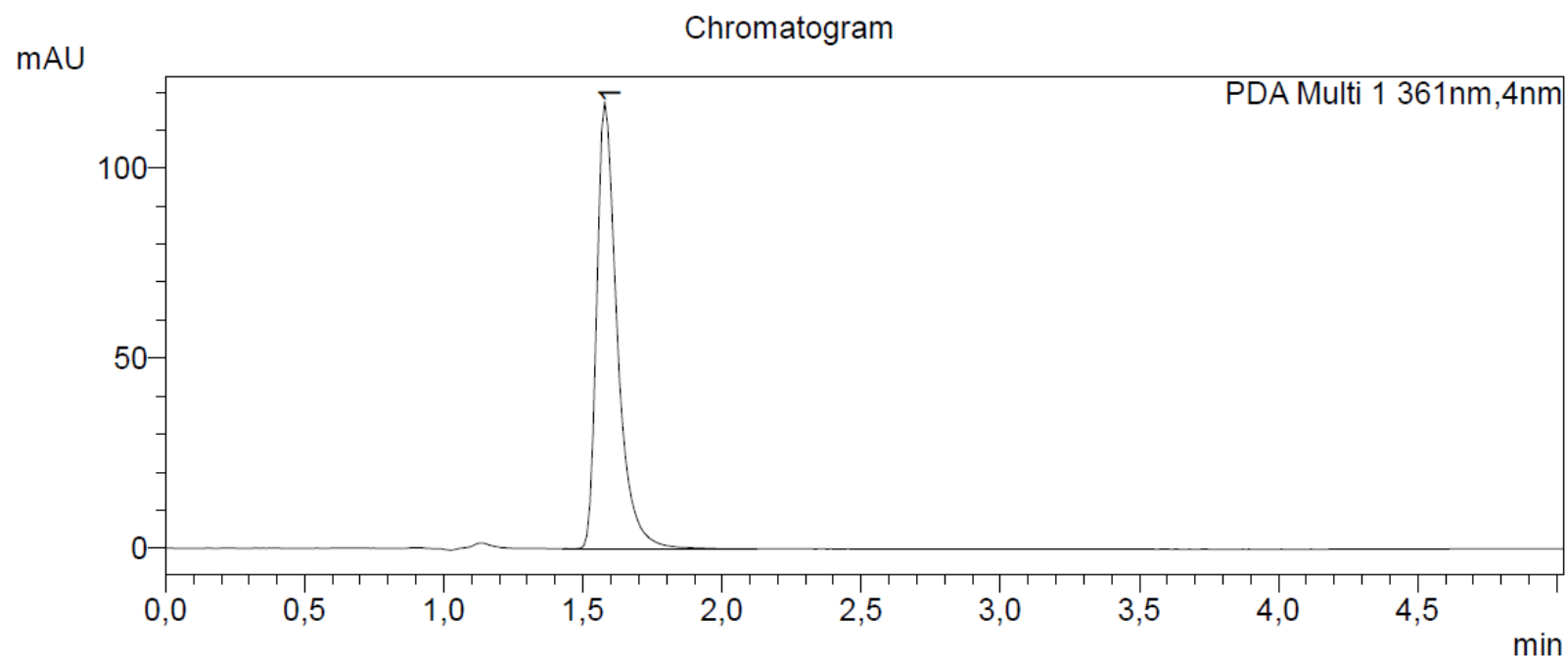
F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20210926
Time: 15:10 h
INSTRUM: spect
PROBHD: 2122673_0041 f
PULPROG: cosygpgpgf
TD: 32768
SOLVENT: DMSO
NS: 32
DS: 8
SWH: 4807.682 Hz
FIDRES: 4.895012 Hz
AQ: 0.2129920 sec
RG: 35.61
DM: 104.000 usec
DE: 12.00 usec
TE: 298.0 K
D0: 0.0000000 sec
D1: 2.0000000 sec
D11: 0.0300000 sec
D12: 0.0002000 sec
D13: 0.0000400 sec
D16: 0.0002000 sec
IND: 0.0002000 sec
TDav: 1
SFOL: 400.2622014 MHz
NUC1: 1H
P0: 12.40 usec
P1: 12.40 usec
P17: 2500.00 usec
PLM1: 7.90320013 W
PLM2: 1.35020006 W
GPMAN[1]: SINGQ10.100
GPR1: 10.00 V
P16: 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD: 128
SFOL: 400.2622 MHz
FIDRES: 75.120193 Hz
SW: 12.011 ppm
F2MODE: QF

F2 - Processing parameters
SI: 1024
SF: 400.2600010 MHz
WDW: QSTINE
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.40

F1 - Processing parameters
SI: 1024
MC2: QF
SF: 400.2600009 MHz
WDW: QSTINE
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0

Espectro 163: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 17.

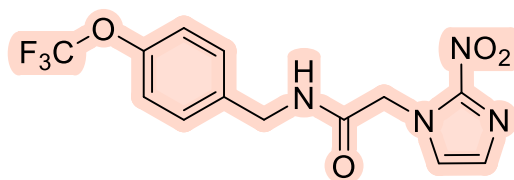


Peak Table

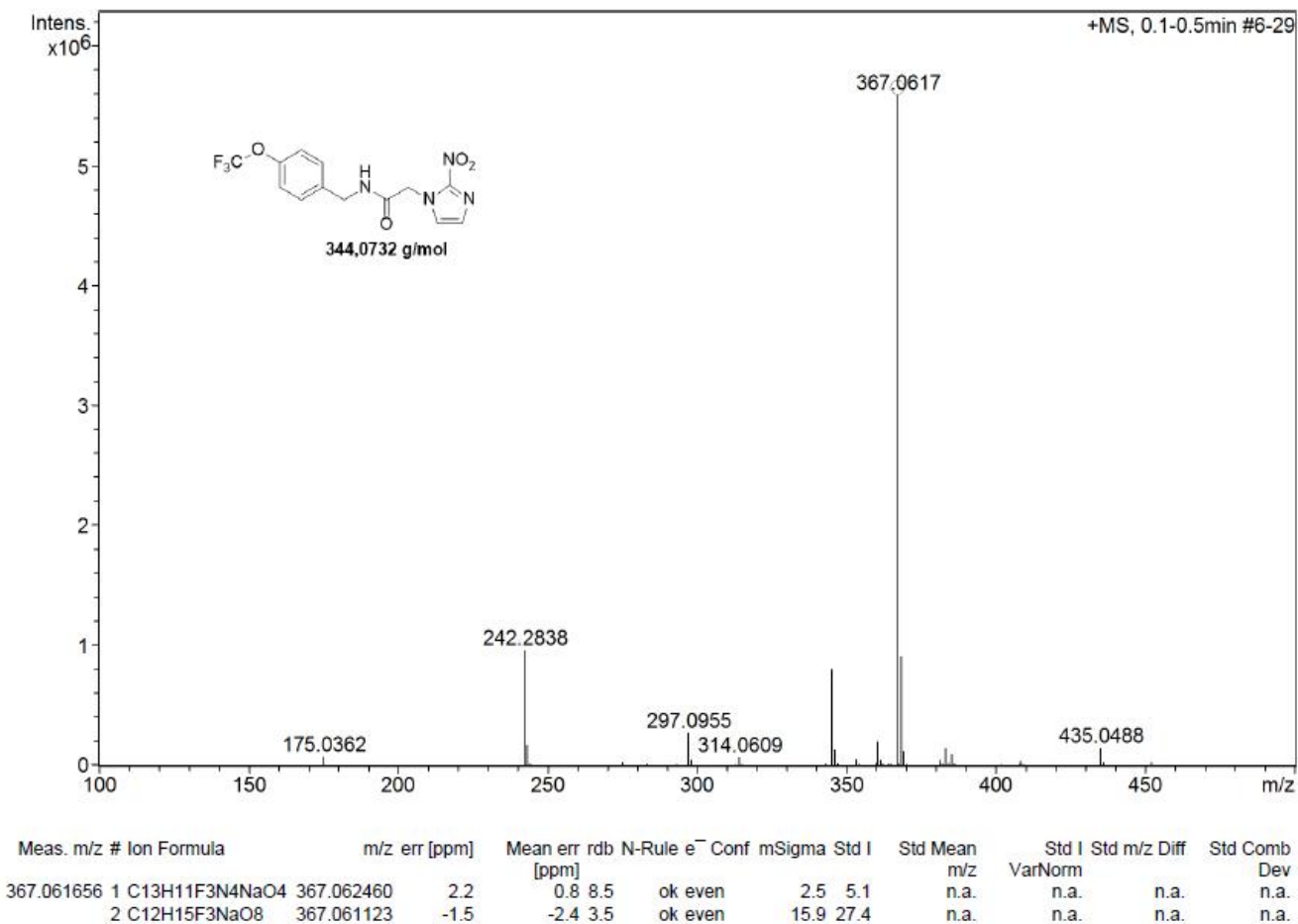
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,58		602964	100,0	11847	1,532	--	--
Total			602964	100,0				

Cromatograma 17: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **17**.

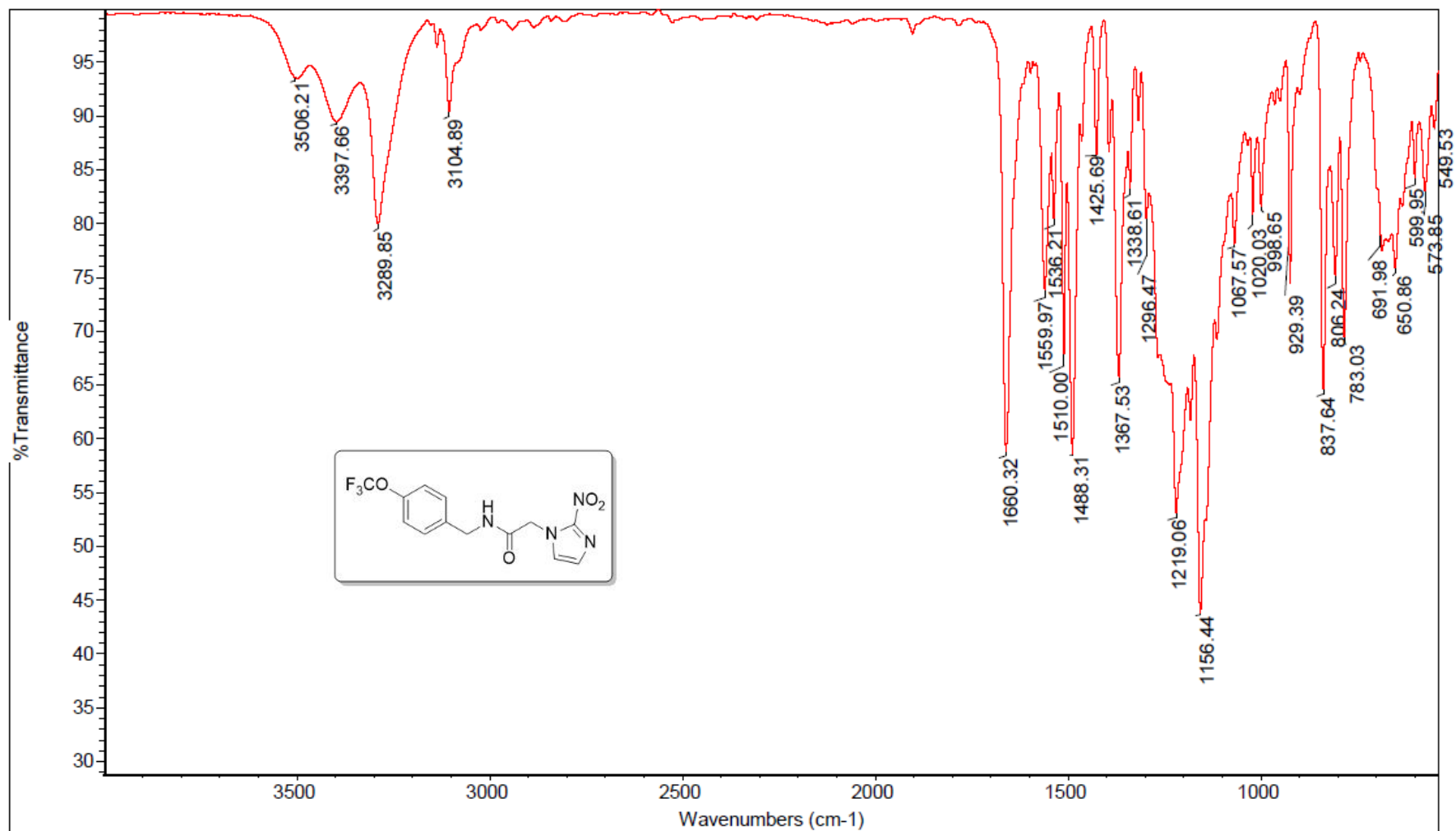
2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)-N-(4-(trifluoromethoxy)benzyl)acetamida (18)



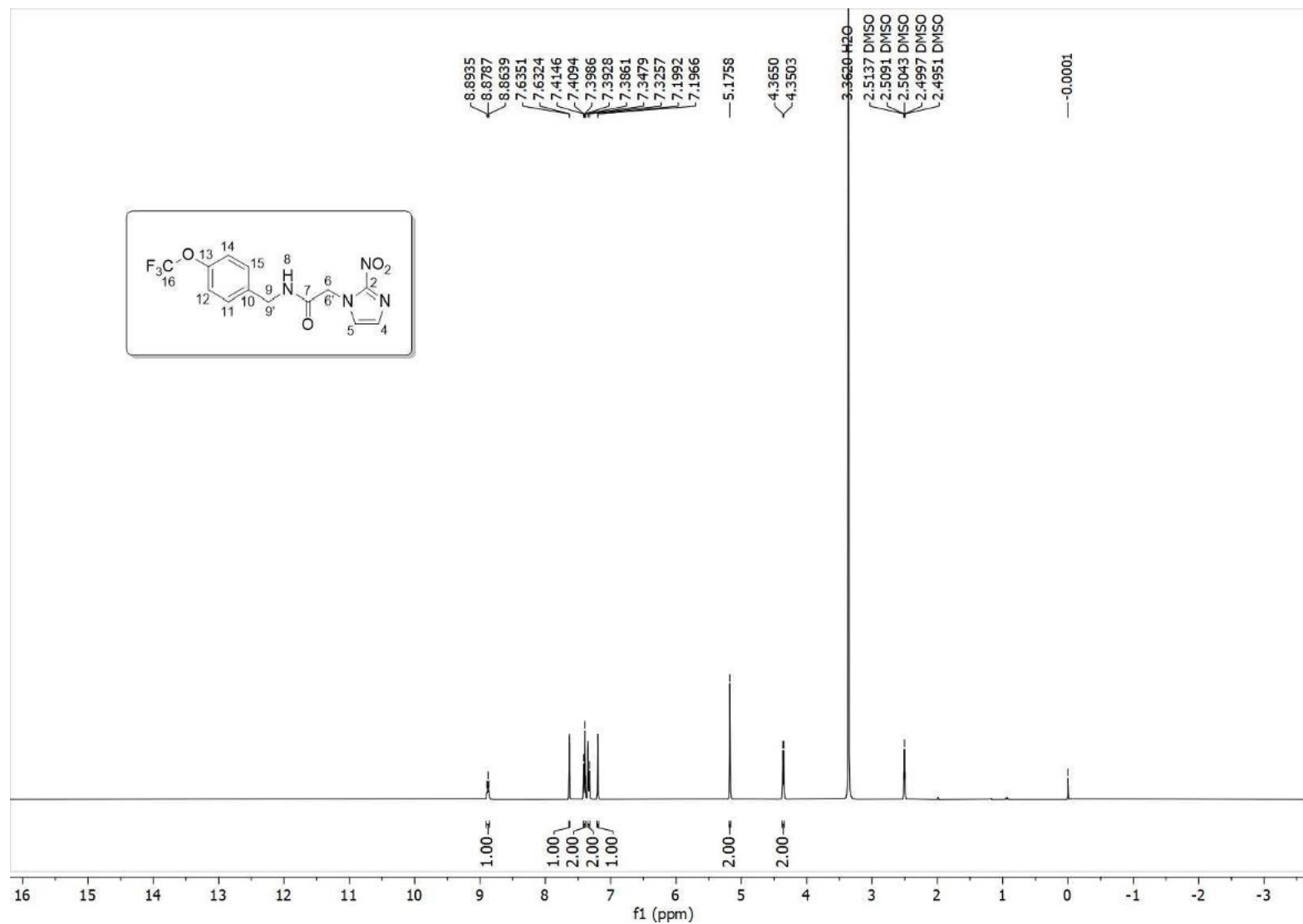
+MS, 0.1-0.5min #6-29



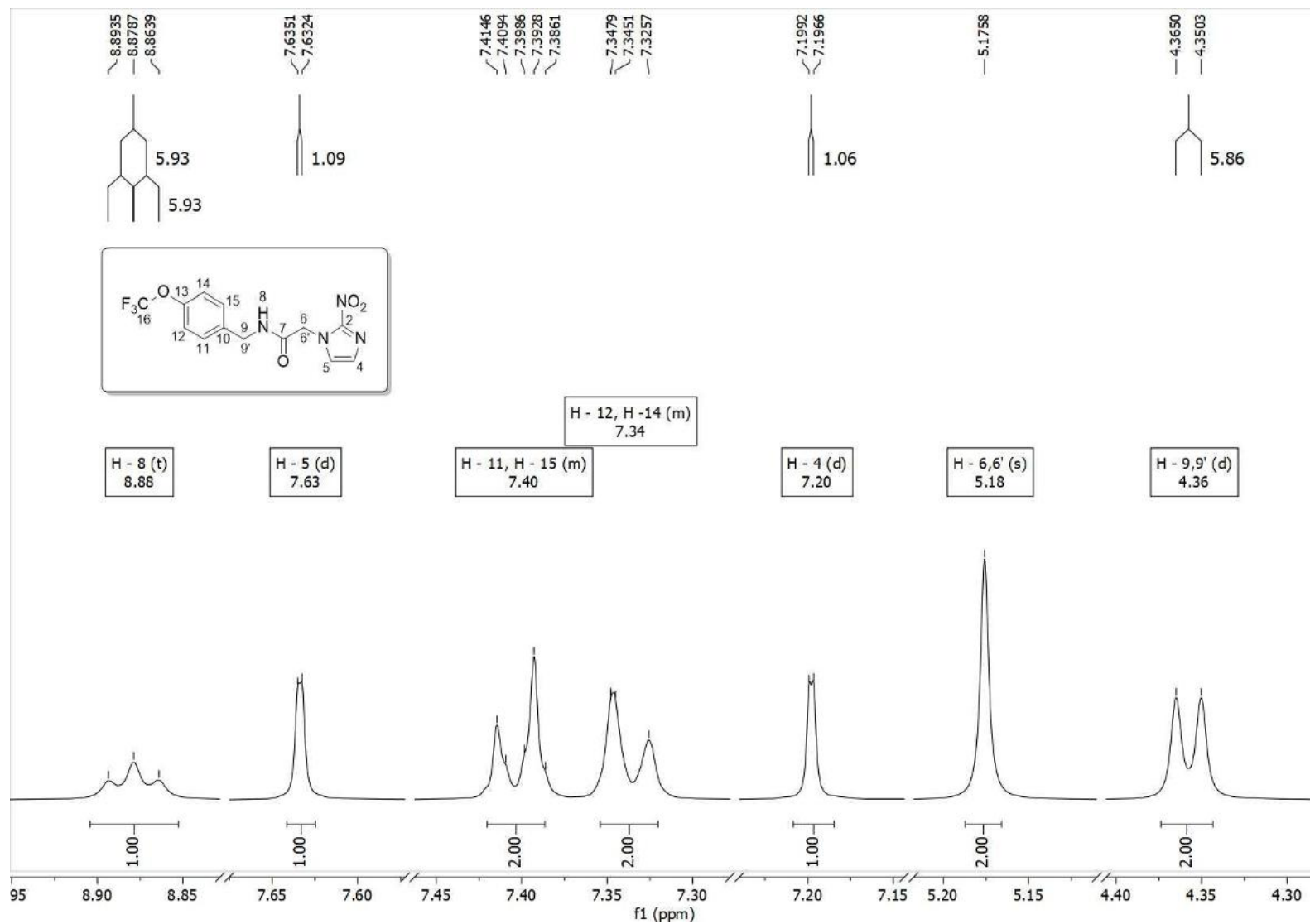
Espectro 164: Espectro de massas de alta resolução do derivado **18**.



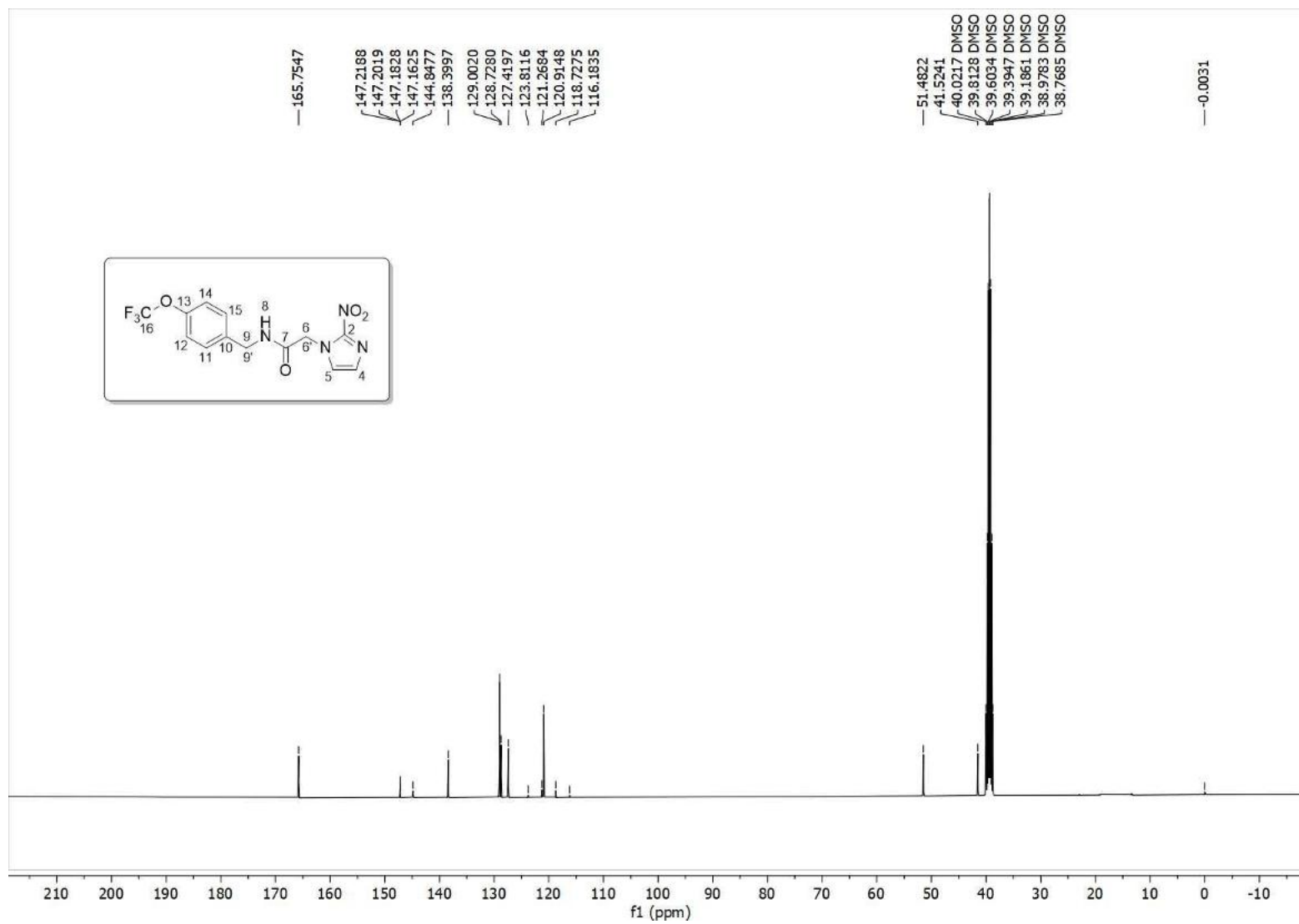
Espectro 165: Espectro de infravermelho do derivado **18**.



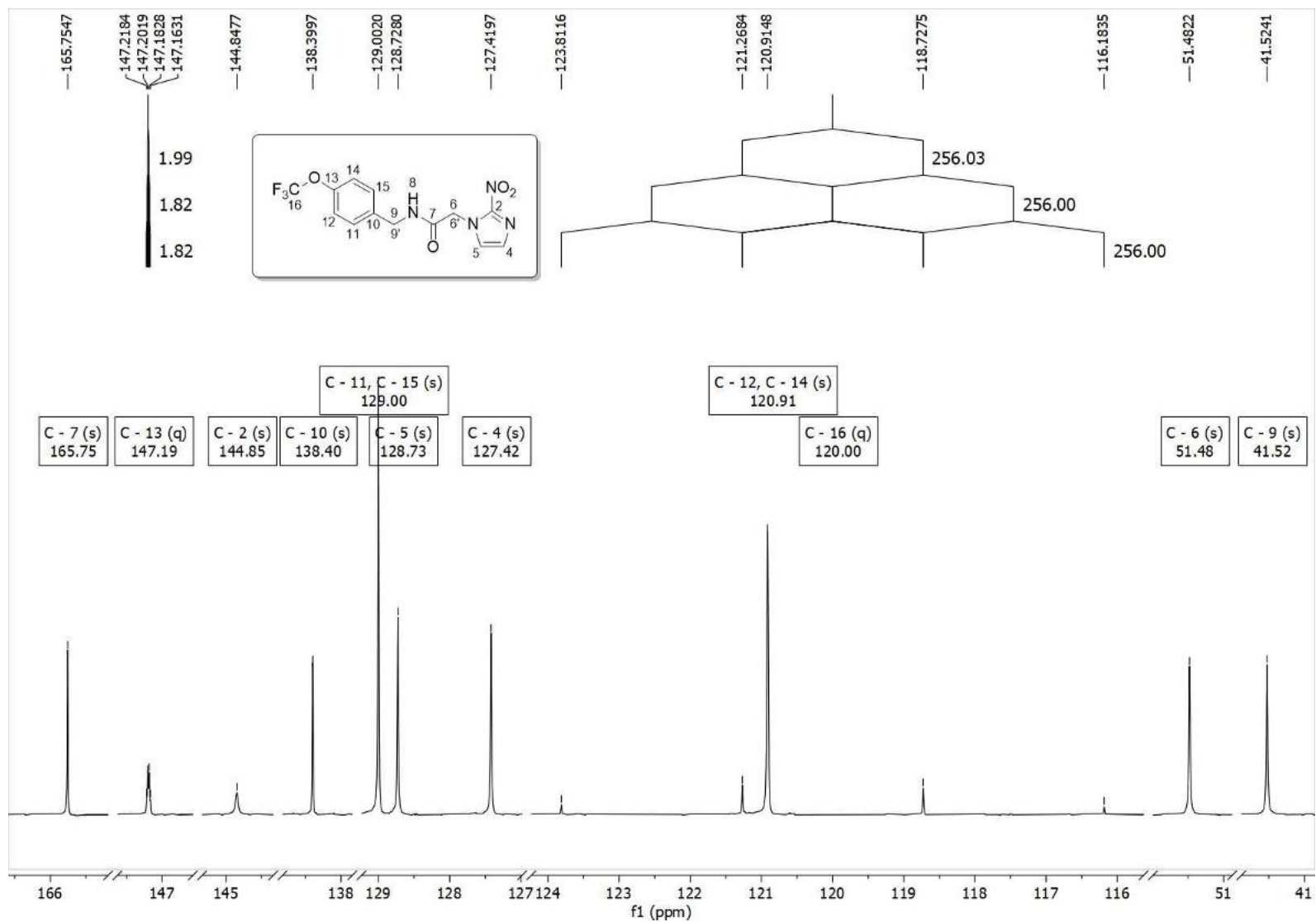
Espectro 166: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **18**.



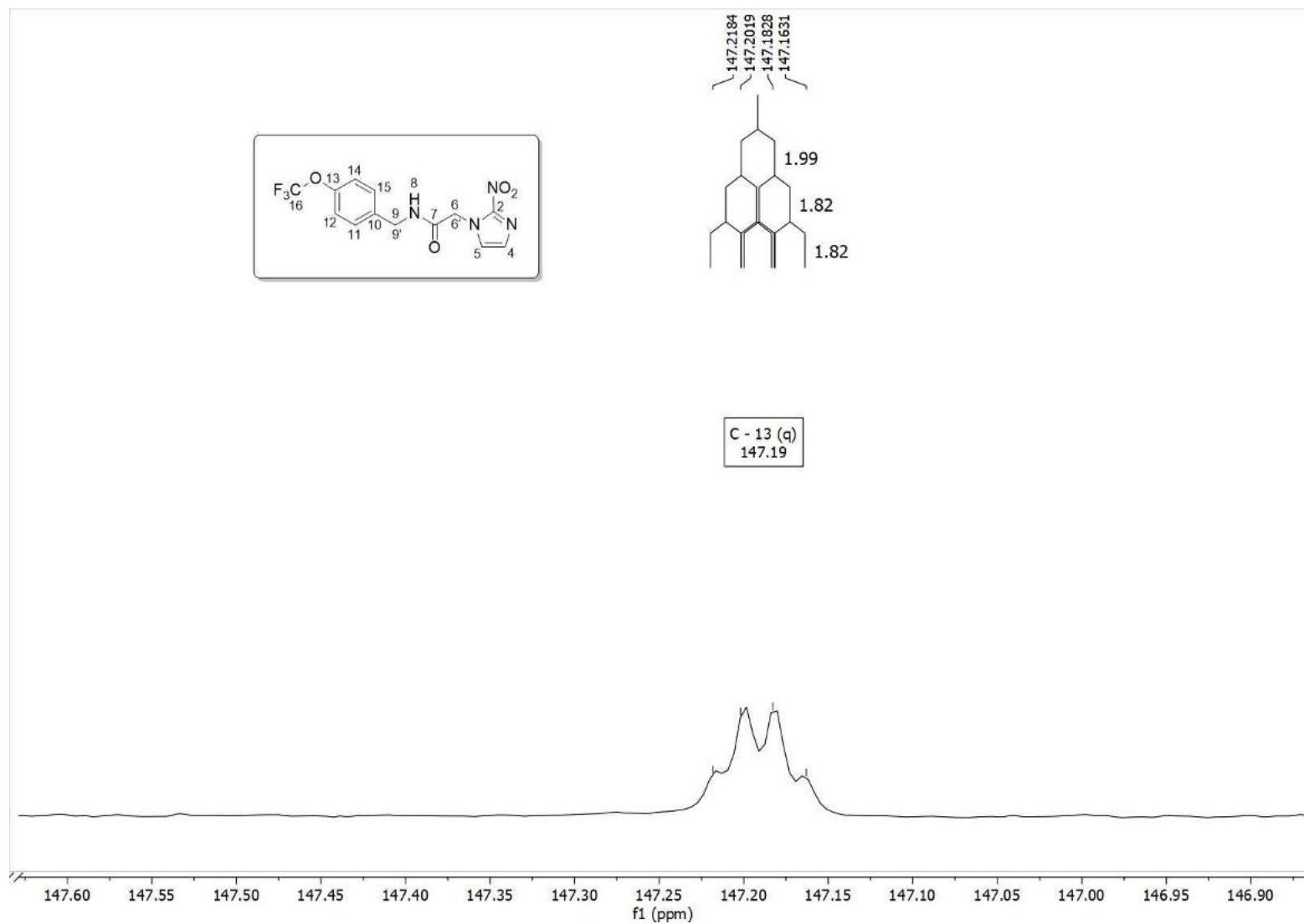
Espectro 167: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **18**.



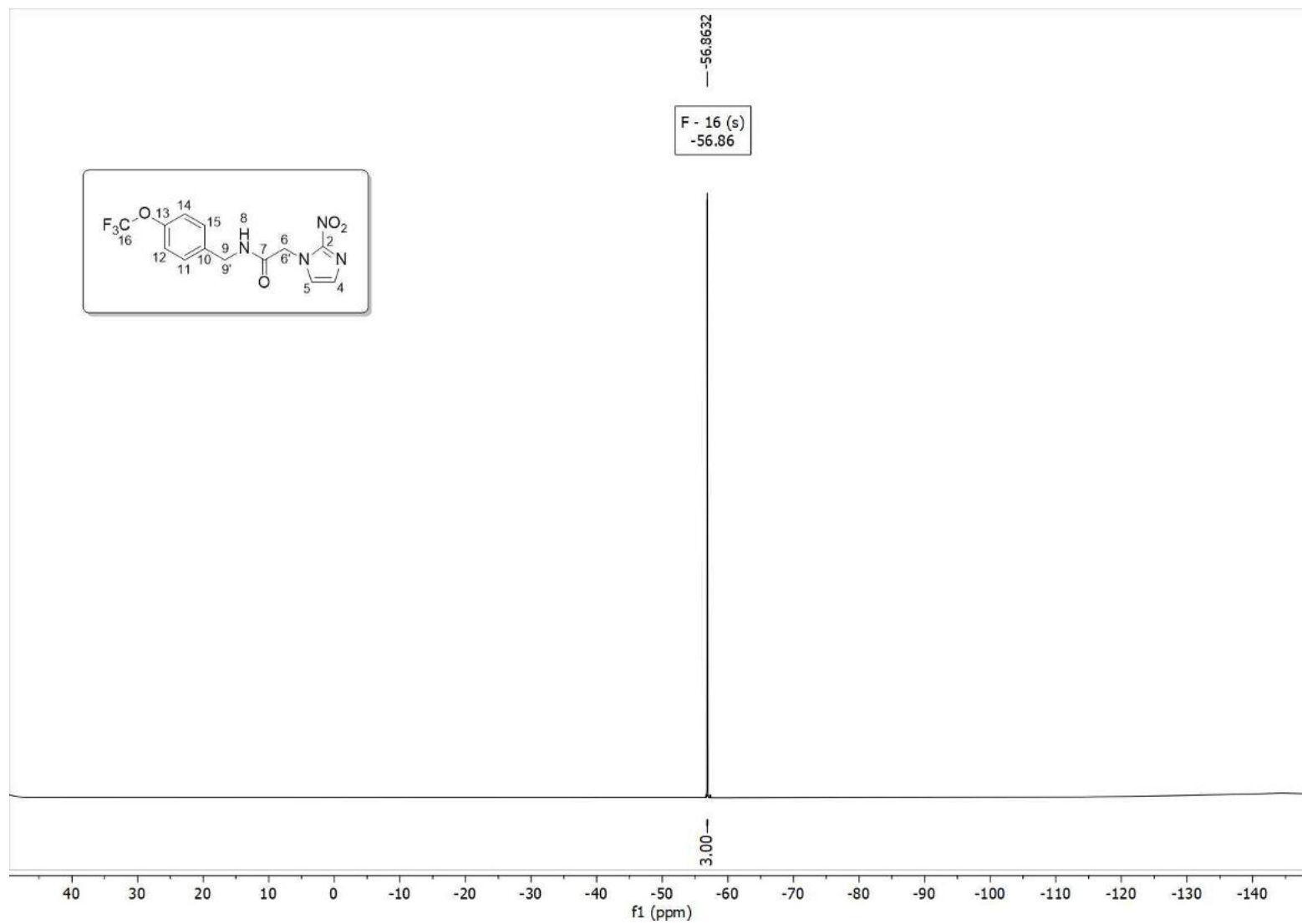
Espectro 168: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado 18.



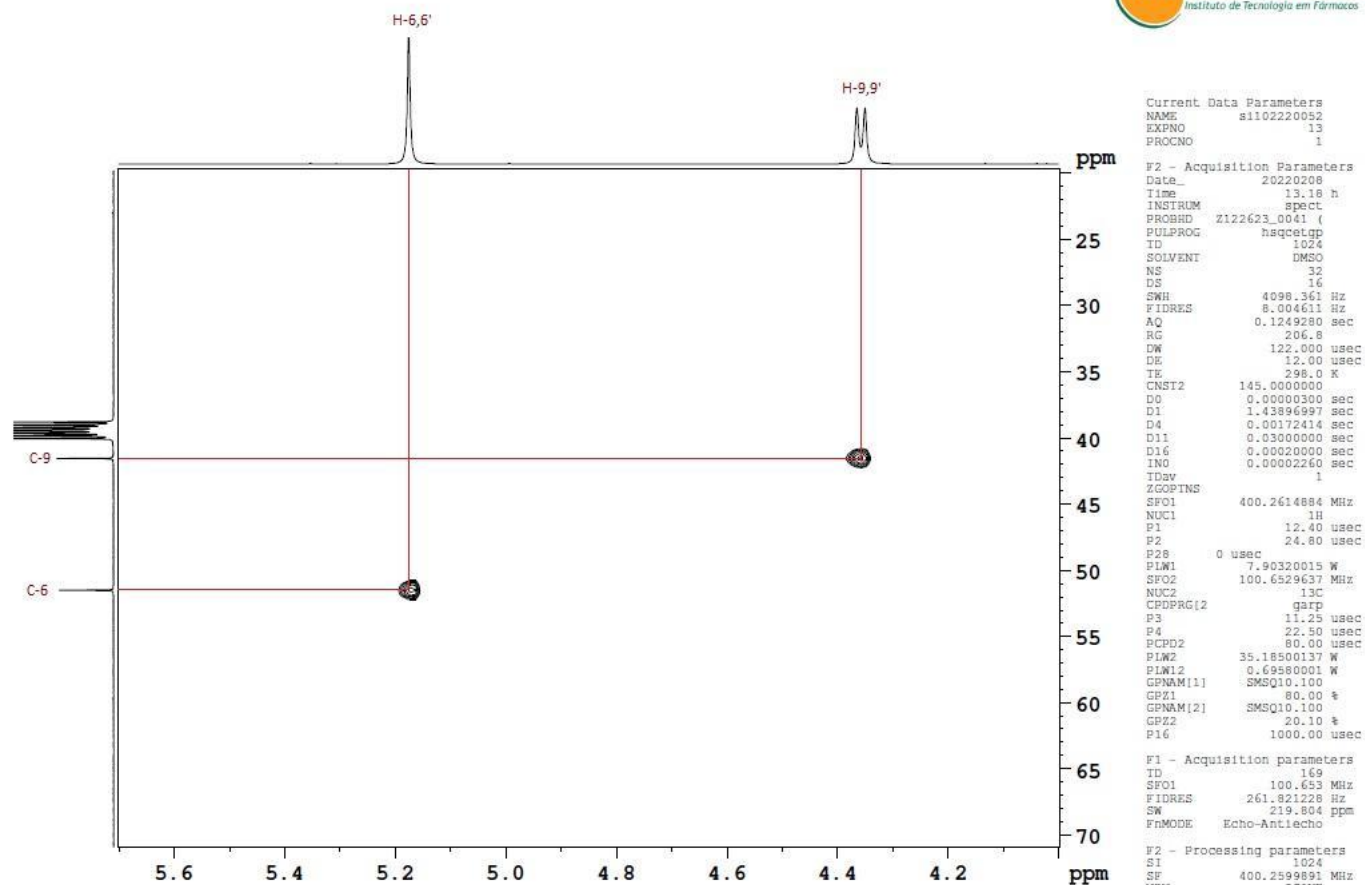
Espectro 169: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **18**.



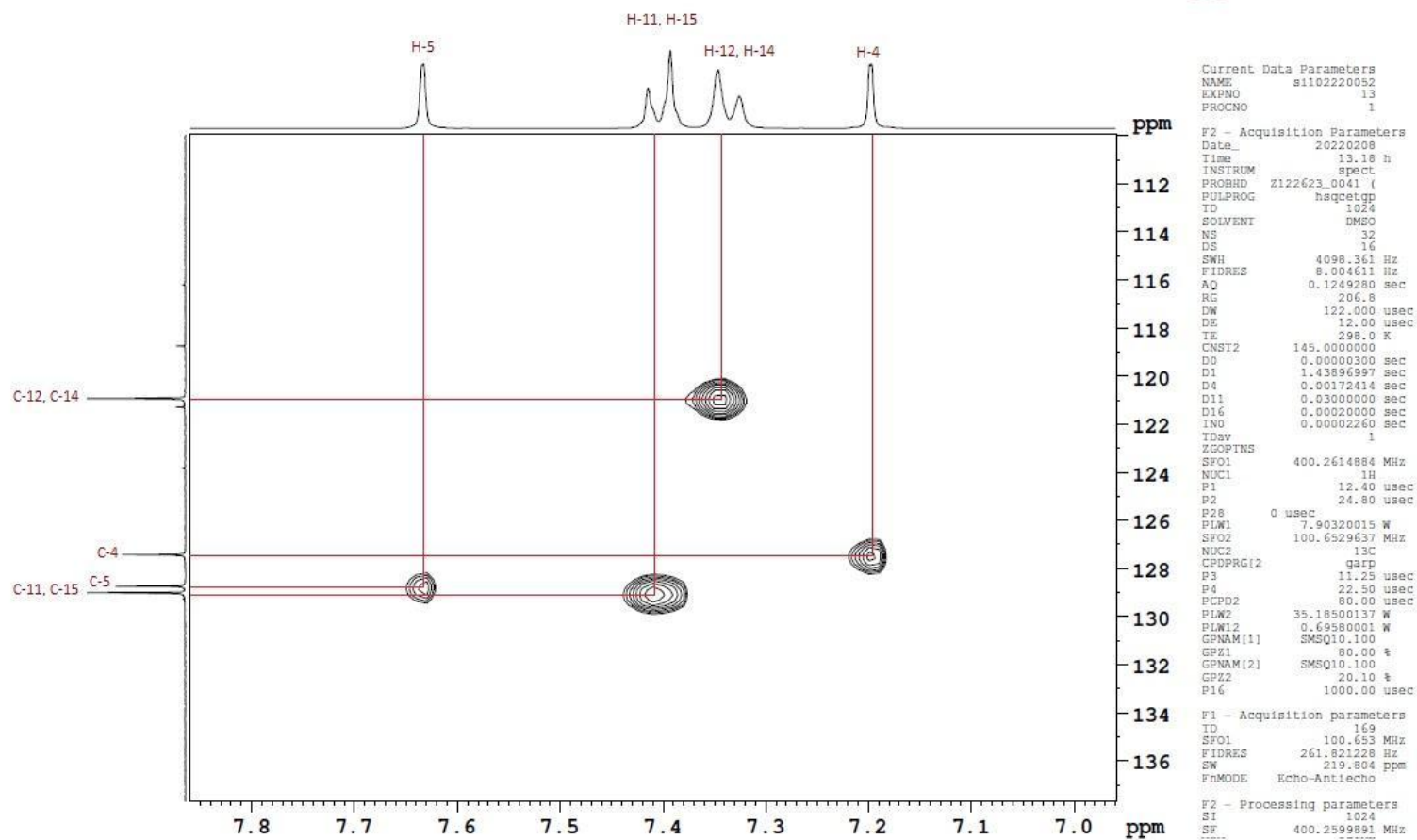
Espectro 170: Espectro de RMN ¹³C (100 MHz; DMSO-d₆) do derivado **18**.



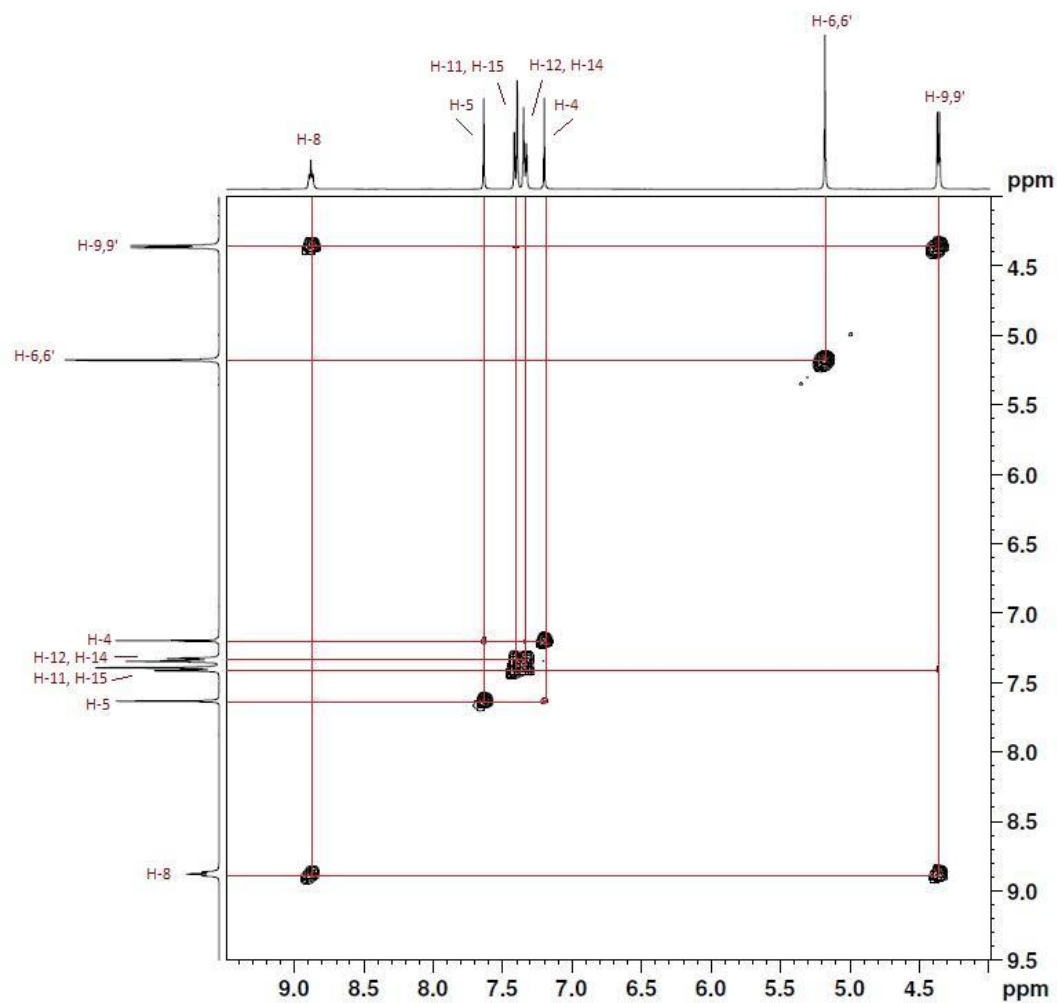
Espectro 171: Espectro de RMN ^{19}F (377 MHz; DMSO- d_6) do derivado **18**.



Espectro 172: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 18.



Espectro 173: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 18.



```

Current Data Parameters
NAME      sil02220052
EXPNO     12
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20220204
Time      4.35 h
INSTRUM   spect
PROBHD    Z122623_0041 (
PULPROG   cosygpppqf
TD         2048
SOLVENT   DMSO
NS         32
DS         8
SWH        4807.492 Hz
FIDRES     4.695012 Hz
AQ         0.2129920 sec
RG         66.74
BW         104.000 usec
DE         12.00 usec
TE         298.0 K
DO         0.00000300 sec
D1         2.00000000 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00002000 sec
D13        0.00000400 sec
D16        0.00020000 sec
INO        0.00020800 sec
TD01       1
SFO1       400.2622014 MHz
NUC1       1H
P0         12.40 usec
P1         12.40 usec
P17        2500.00 usec
PLW1       7.90320015 W
PLW10      1.35020006 W
GPNAM[1]   SMSQ10.100
GPZ1       10.00 %
P16        1000.00 usec

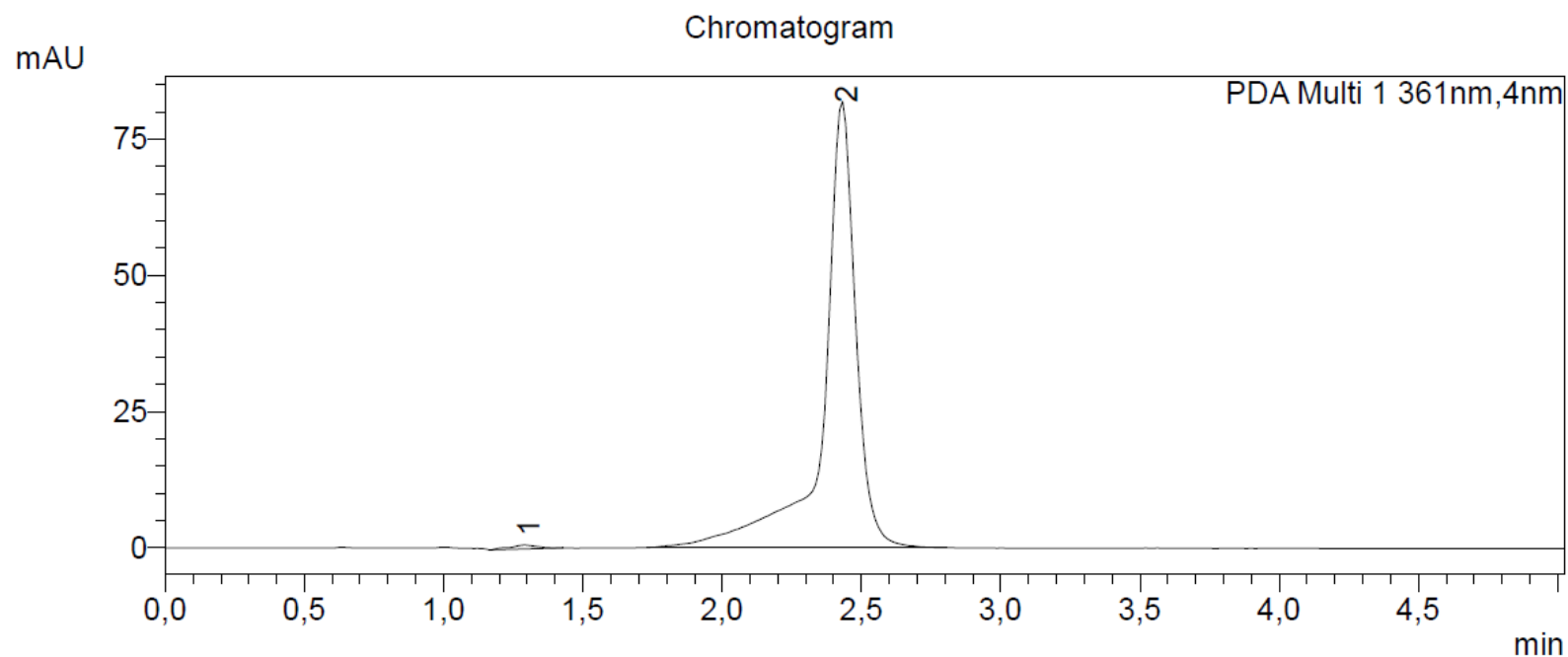
F1 - Acquisition parameters
TD         128
SFO1       400.2622 MHz
FIDRES     75.120193 Hz
SW         12.011 ppm
F1MODE     QF

F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         400.2599836 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.40

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        QF
SF         400.2599838 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0

```

Espectro 174: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 18.

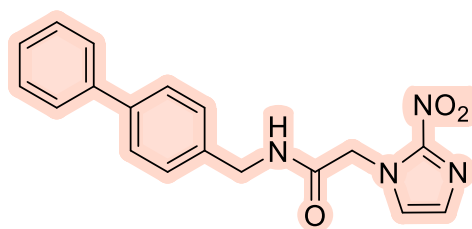


Peak Table

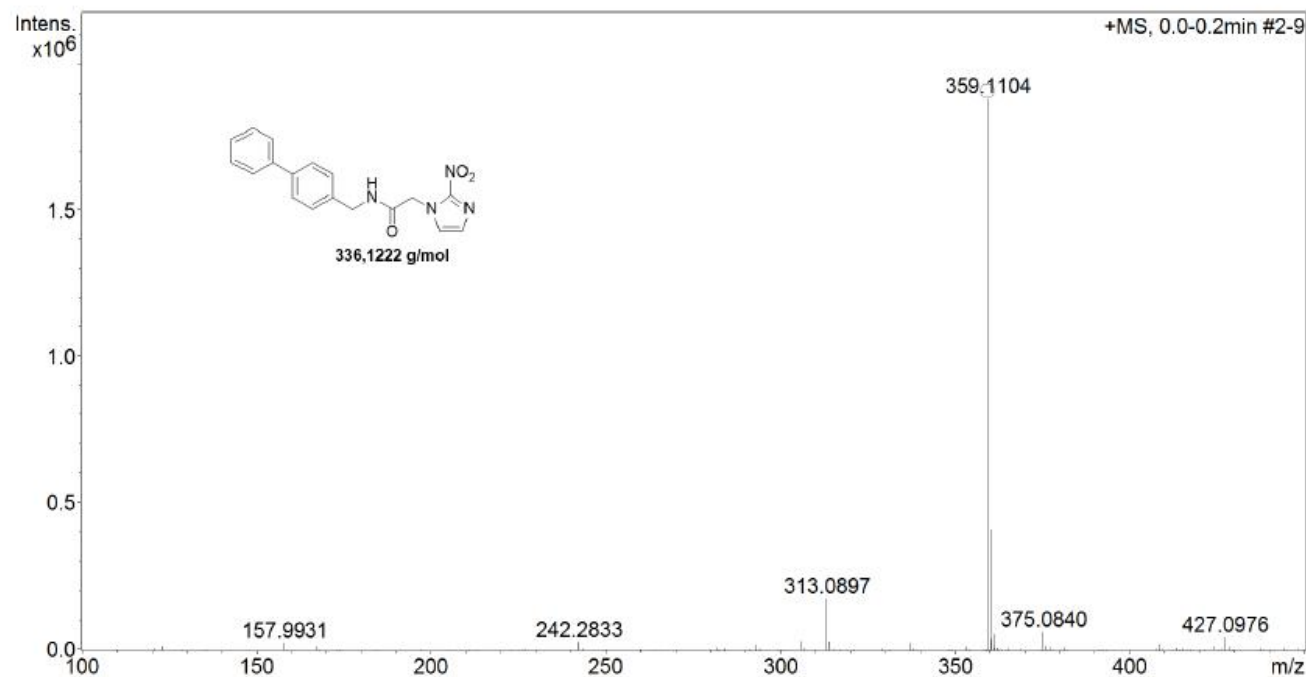
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,29		5104	0,8	4244	1,035	--	--
2	2,43		668280	99,2	17430	0,689	5,787	0,885
Total			673383	100,0				

Cromatograma 18: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **18**.

N-([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (19)

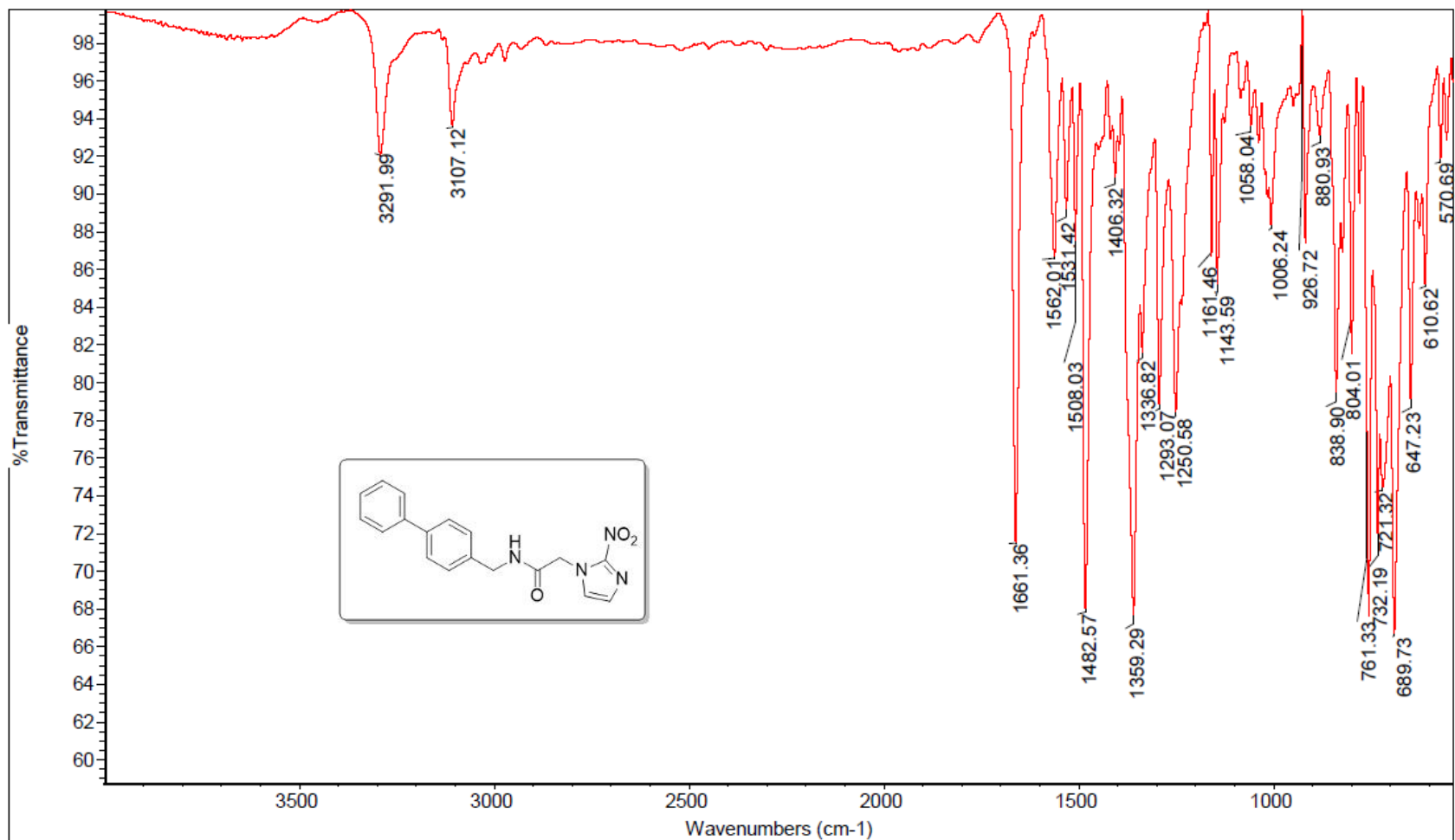


+MS, 0.0-0.2min #2-9

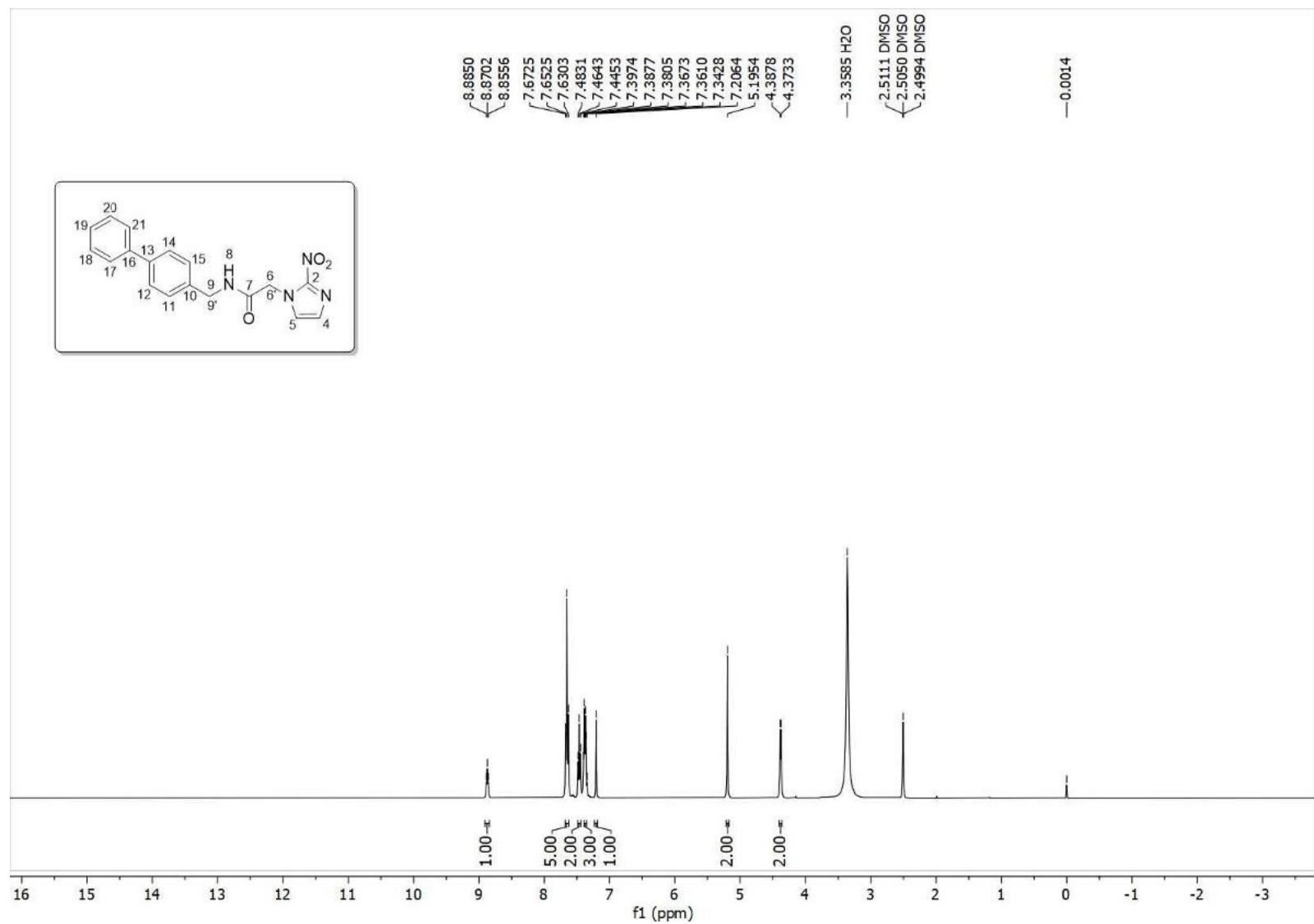


Meas. m/z # Ion Formula	m/z err [ppm]	Mean err [ppm]	rdB	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I	Std Mean m/z	Std I VarNorm	Std m/z Diff	Std Comb Dev
359.110371 1 C ₁₈ H ₁₆ N ₄ NaO ₃	359.111461 3.0	2.4	12.5	ok	even	4.4	7.7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2 C ₁₇ H ₂₀ NaO ₇	359.110124 -0.7	-1.0	7.5	ok	even	17.9	28.6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

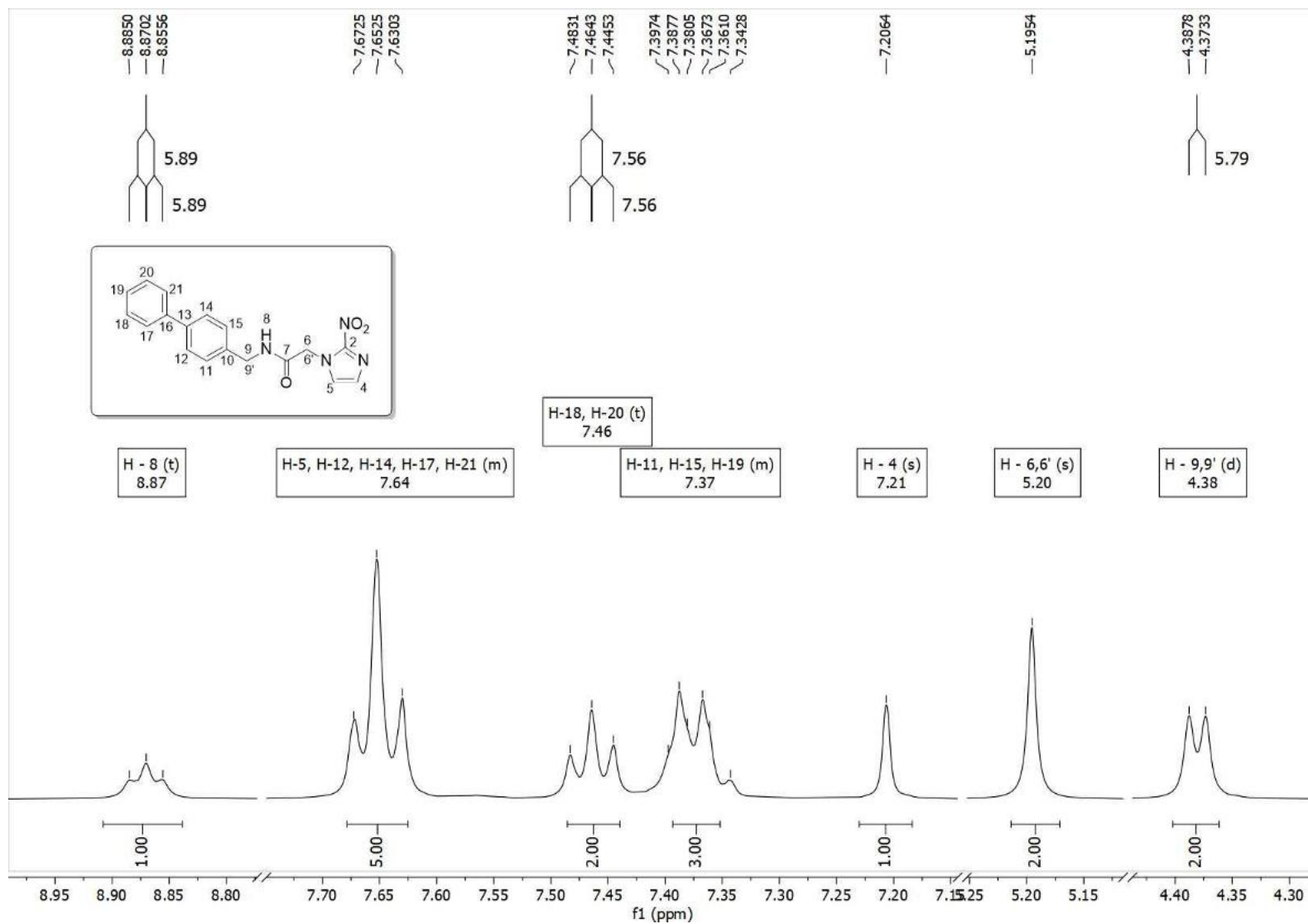
Espectro 175: Espectro de massas de alta resolução do derivado 19.



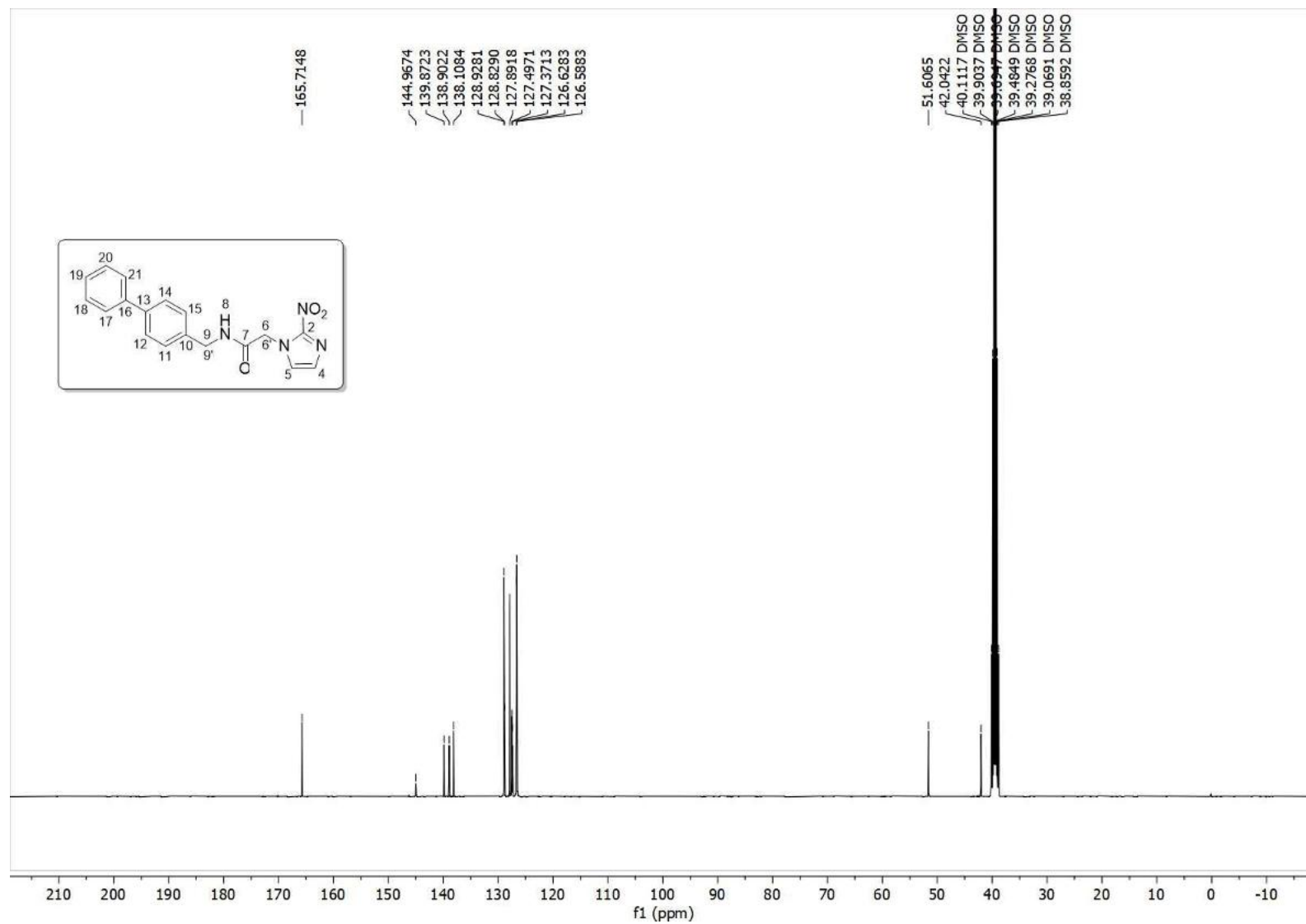
Espectro 176: Espectro de infravermelho do derivado **19**.



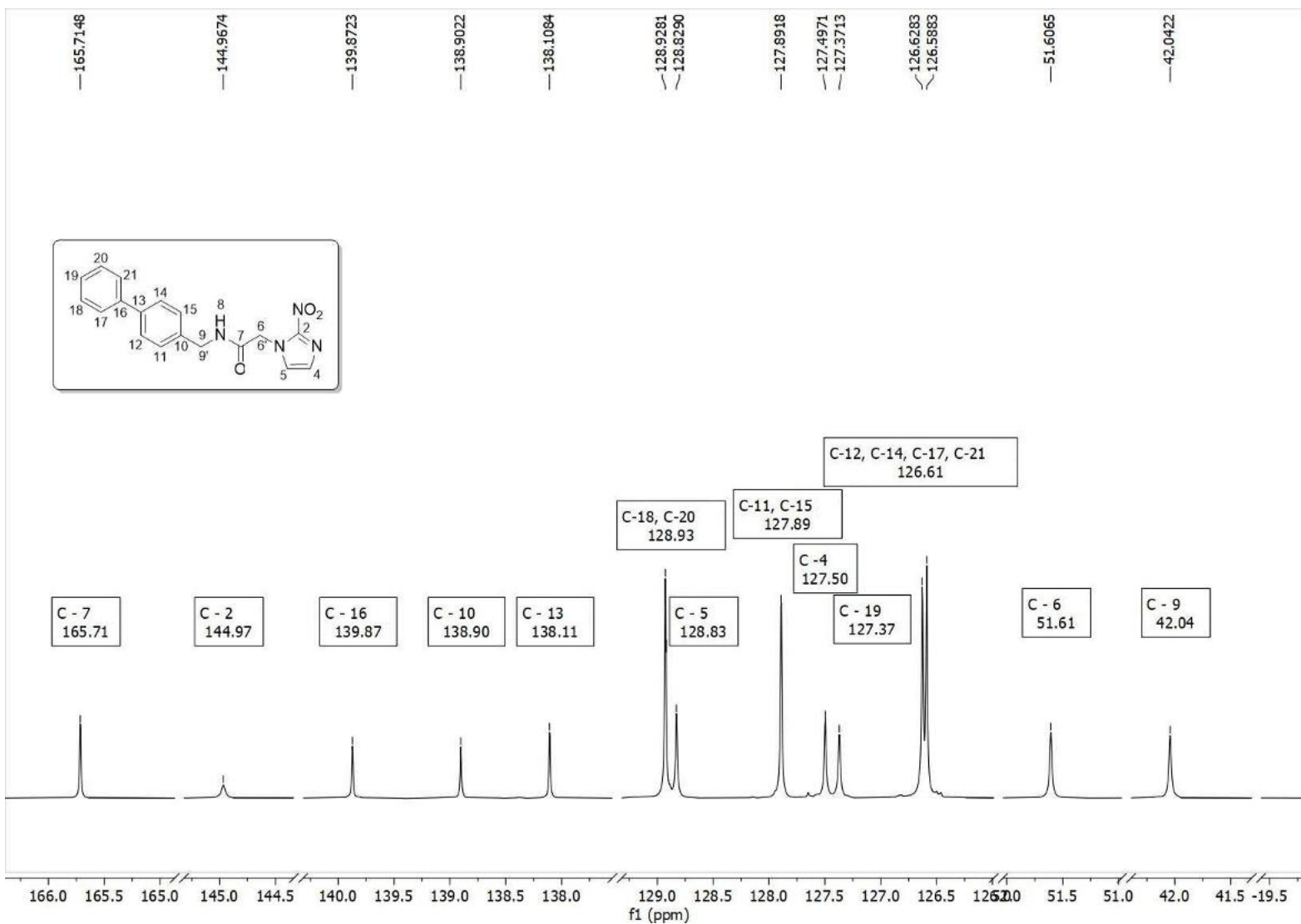
Espectro 177: Espectro de RMN ¹H (400 MHz; DMSO-d₆) do derivado **19**.



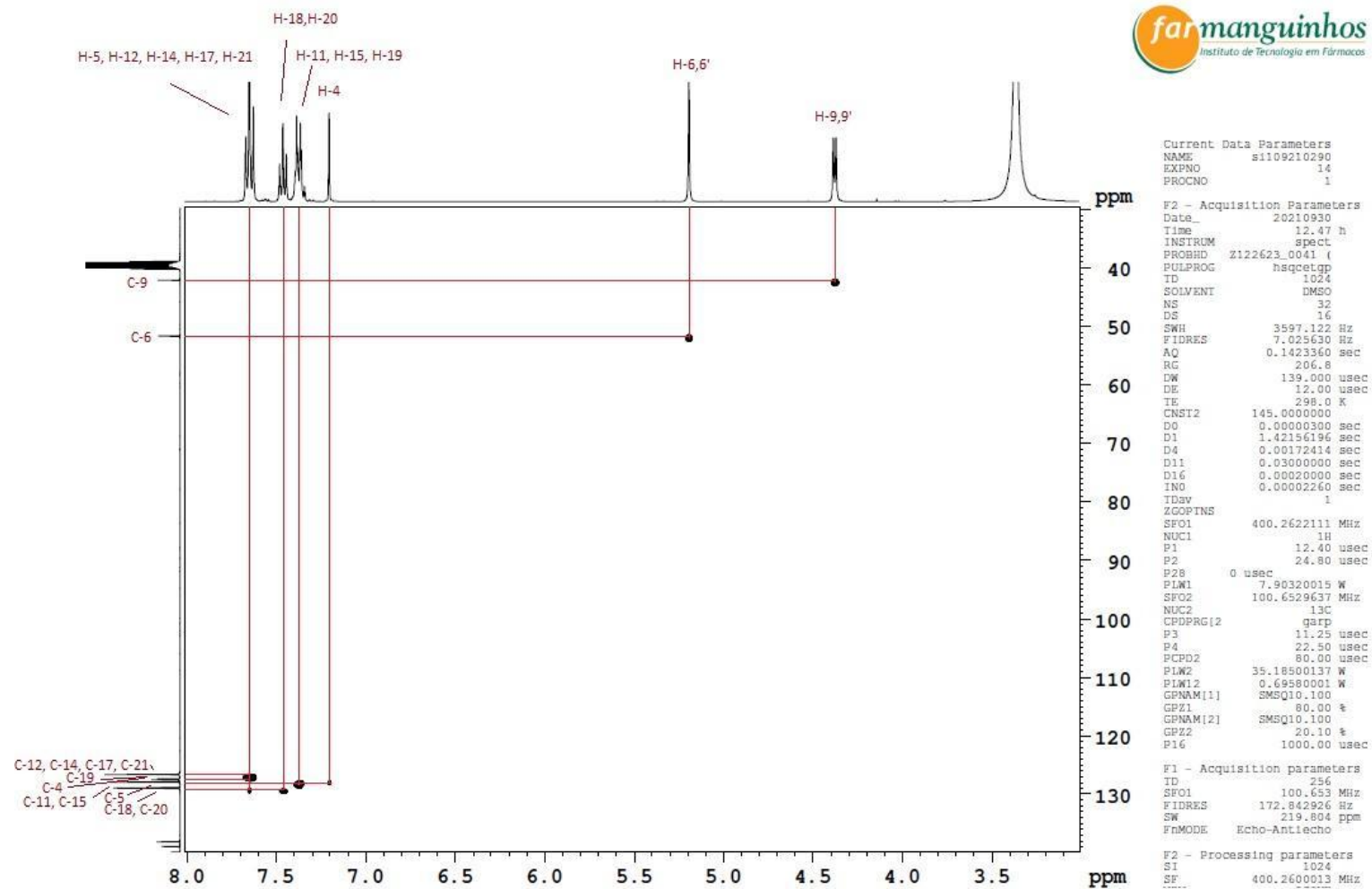
Espectro 178: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **19**.



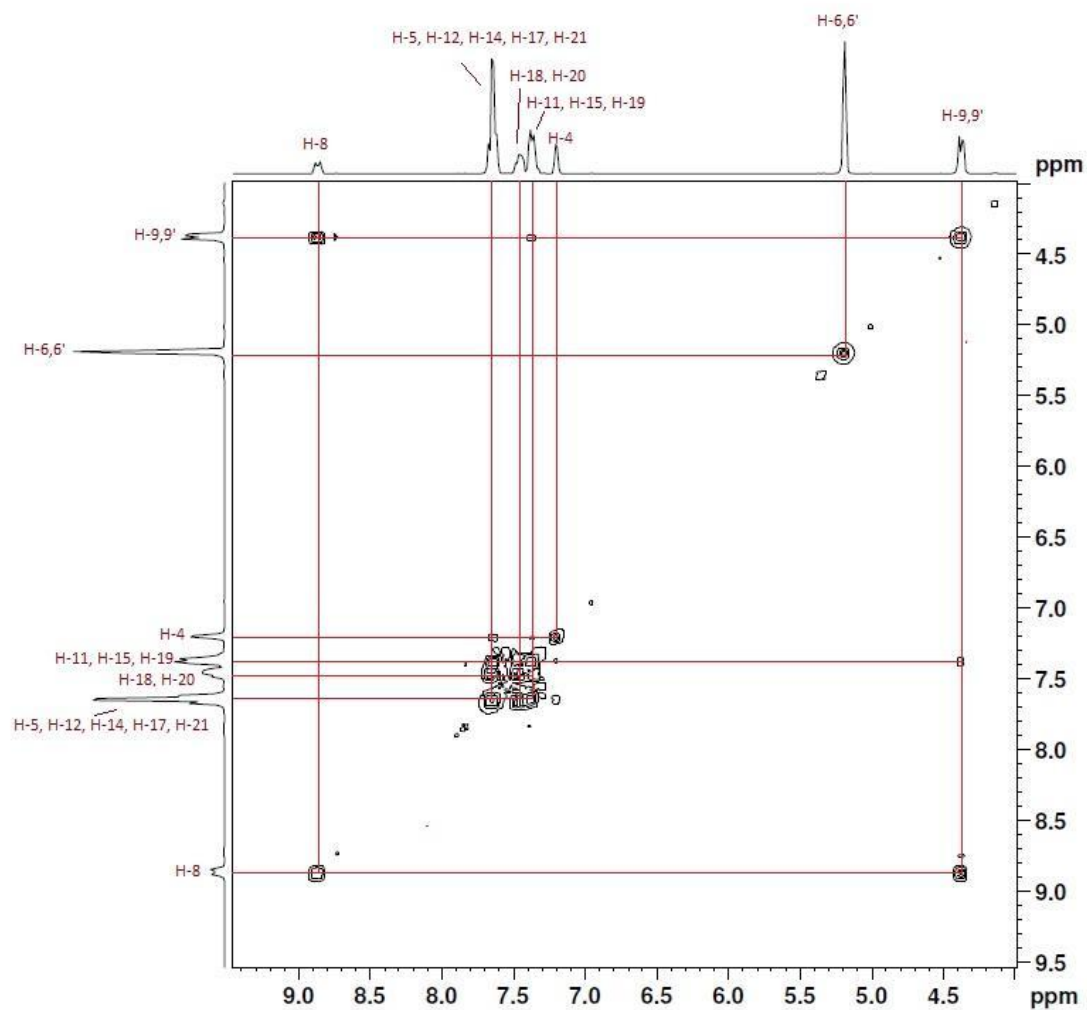
Espectro 179: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado 19.



Espectro 180: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **19**.



Espectro 181: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 19.



Current Data Parameters
NAME s1109210290
EXPNO 12
PROCNO 1

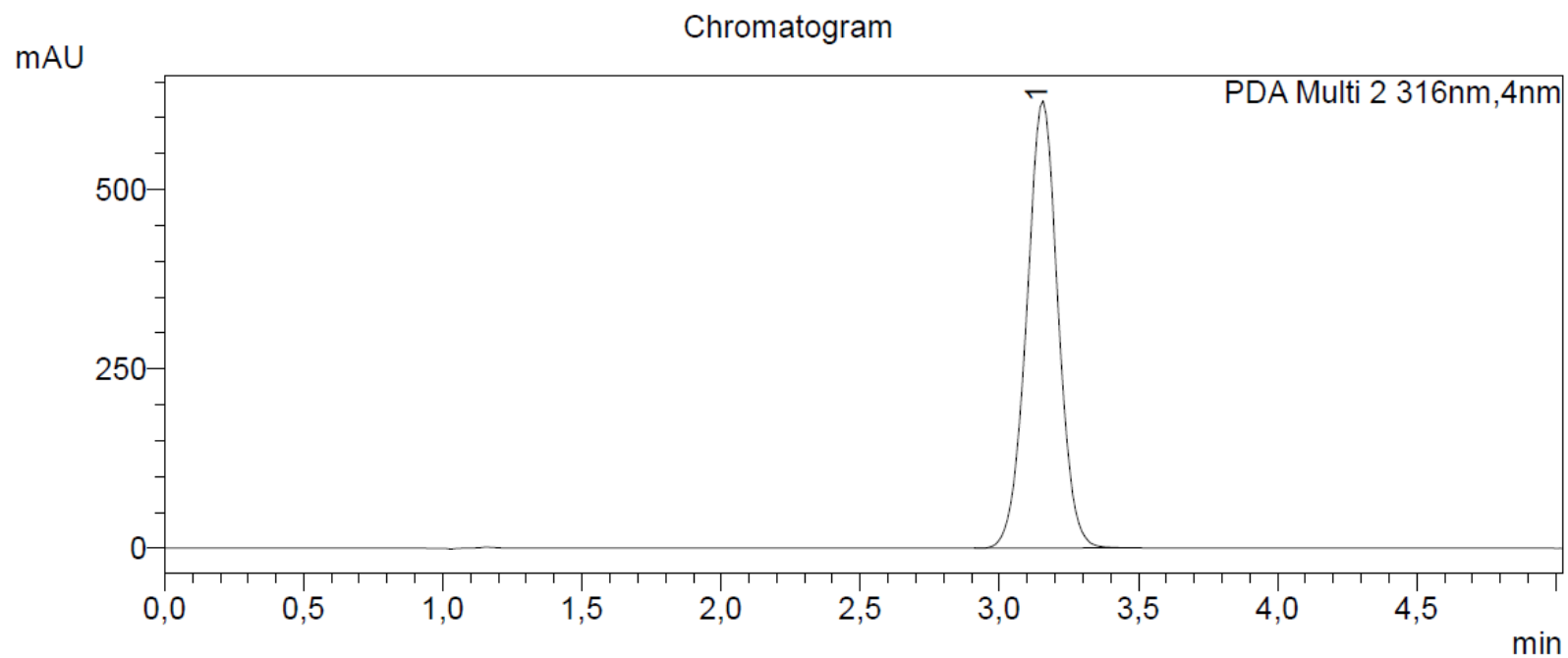
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20210930
Time 9.59 h
INSTRUM spect
PROBHD Z122623_0041 (cosygpppqf)
PULPROG
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 32
DS 8
SWH 4807.692 Hz
FIDRES 4.695012 Hz
AQ 0.2129920 sec
RG 66.74
DW 104.000 usec
DE 12.00 usec
TE 298.0 K
D0 0.00000300 sec
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00002000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
IN0 0.00020800 sec
TDav 1
SFO1 400.2622014 MHz
NUC1 1H
P0 12.40 usec
P1 12.40 usec
P17 2500.00 usec
PLW1 7.90320015 W
PLW10 1.35020006 W
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPX1 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 128
SFO1 400.2622 MHz
FIDRES 75.120193 Hz
SW 12.011 ppm
F2MODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.2600002 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 400.2599994 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Espectro 182: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 19.

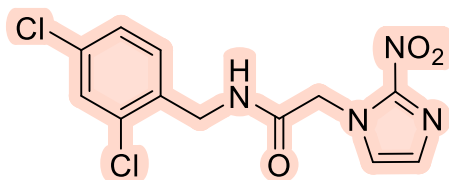


Peak Table

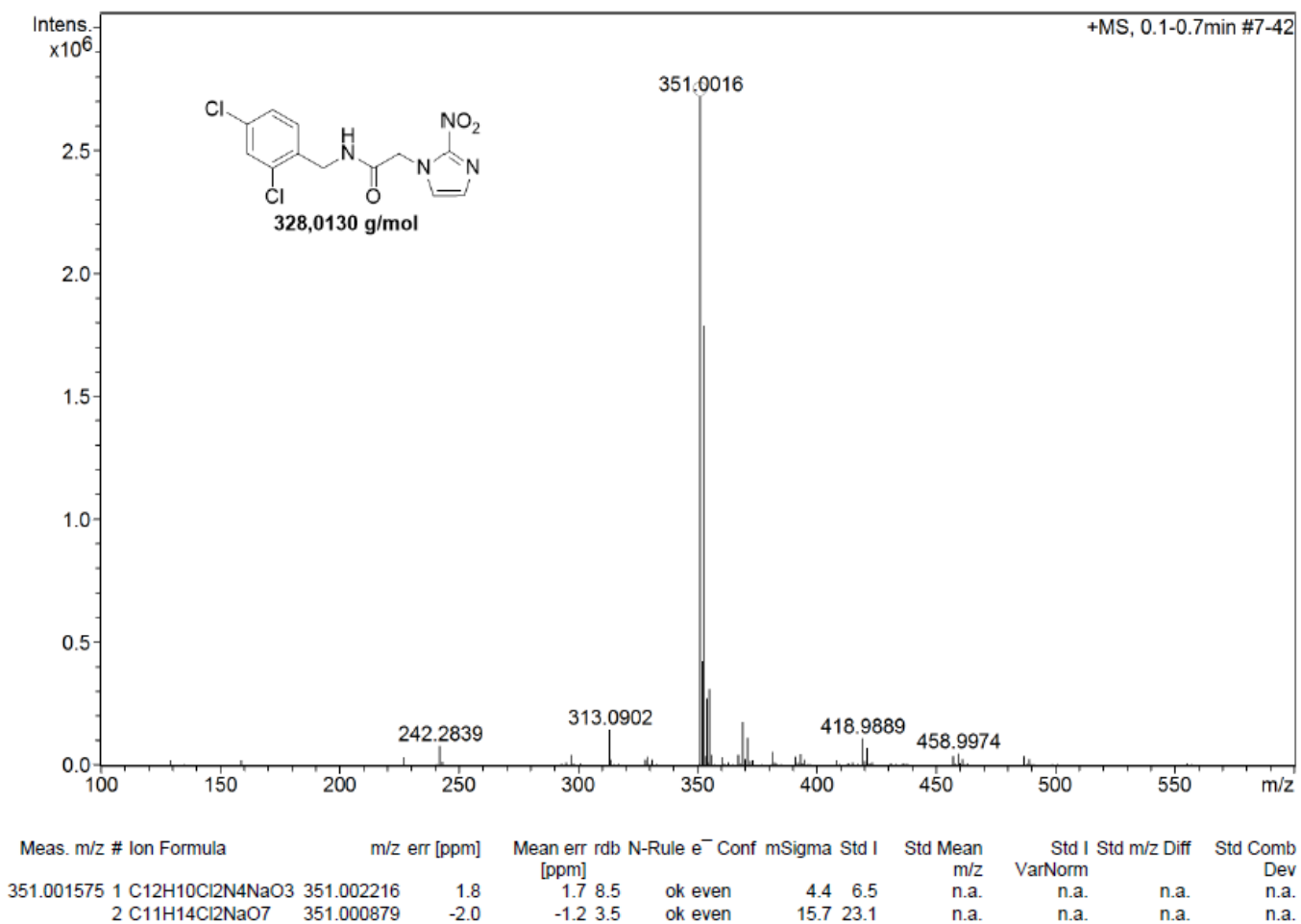
PDA Ch2 316nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	3,16		4871863	100,0	21545	1,002	--	--
Total			4871863	100,0				

Cromatograma 19: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **19**.

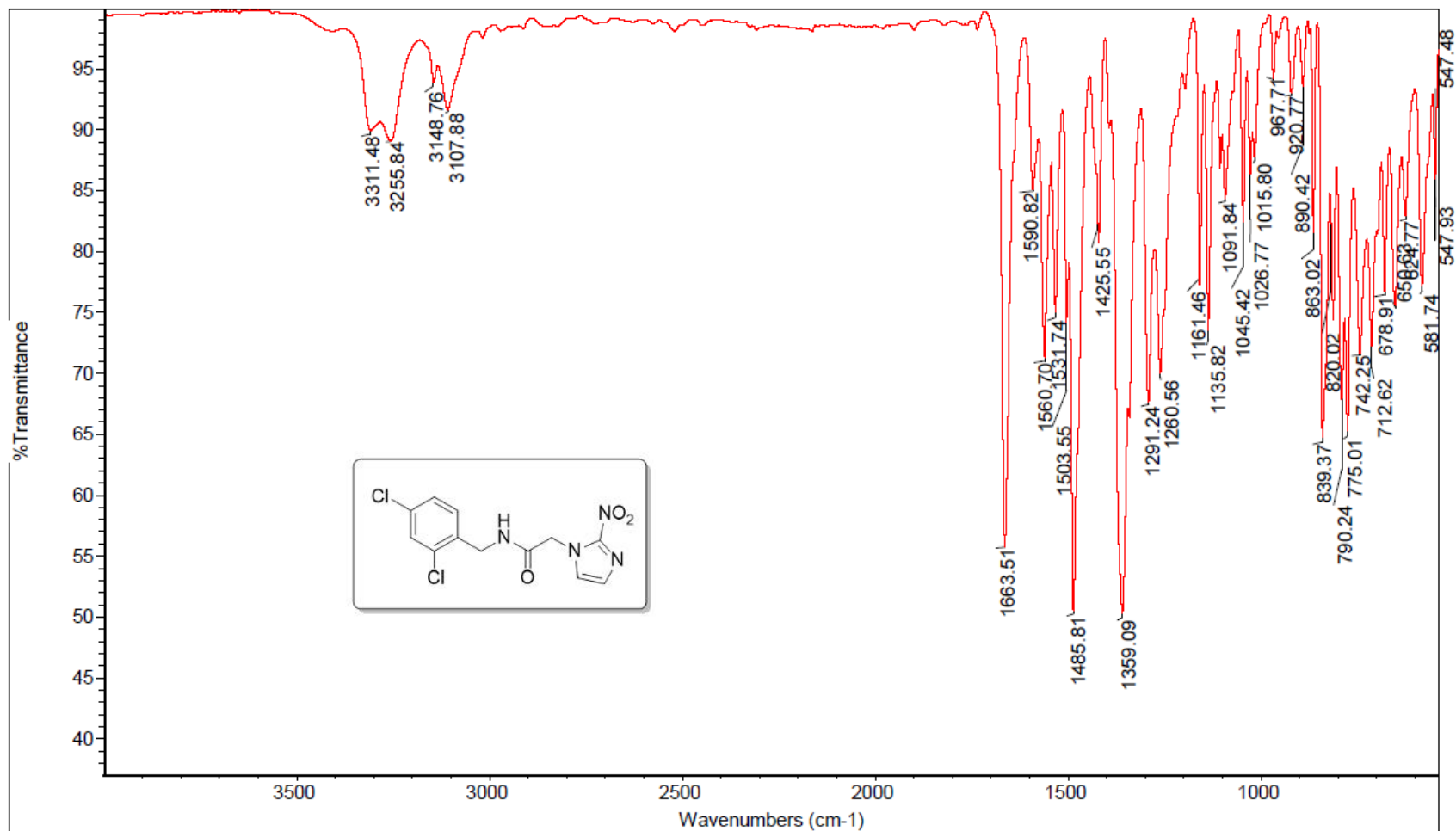
N-(2,4-diclorobenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (20)



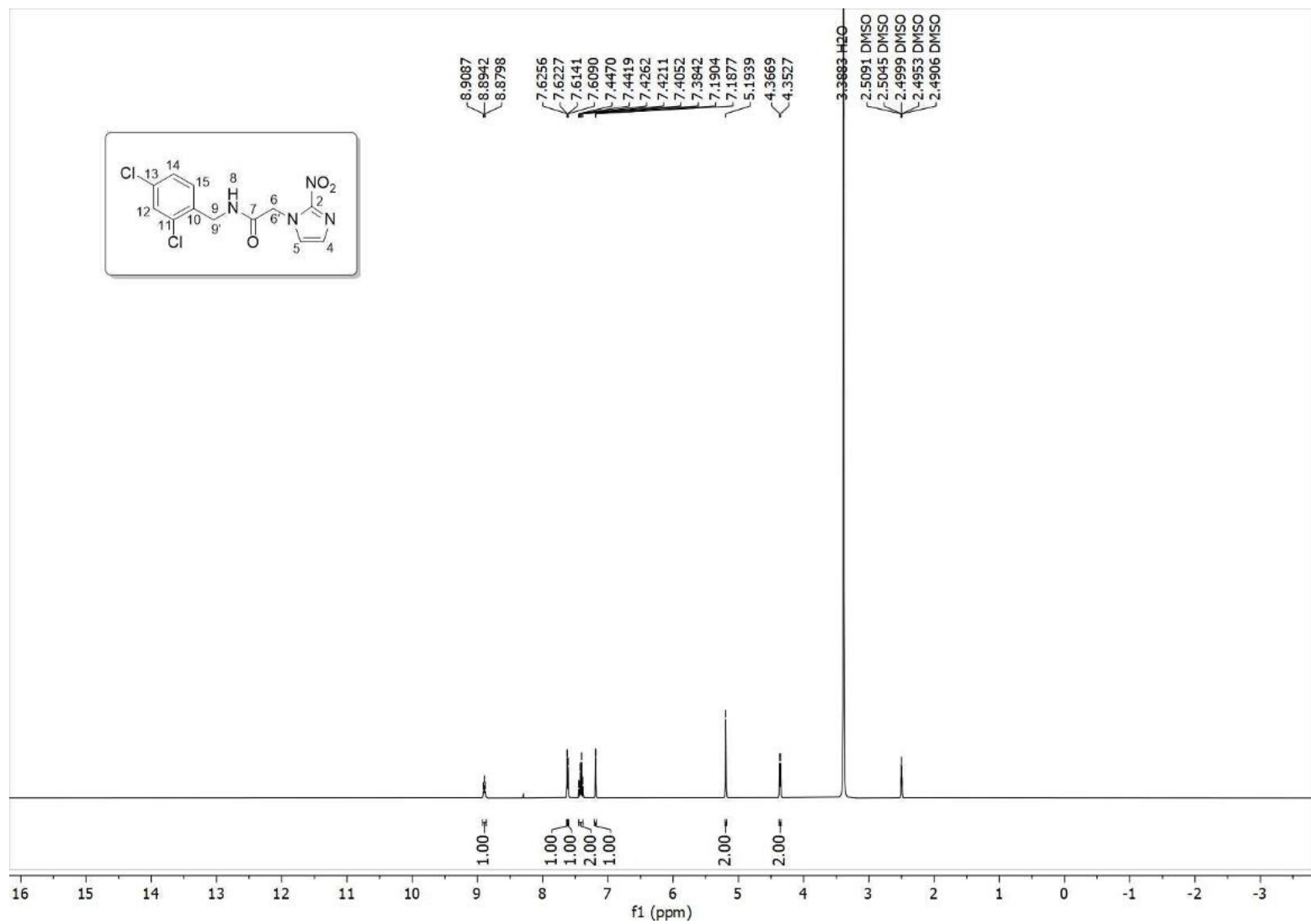
+MS, 0.1-0.7min #7-42



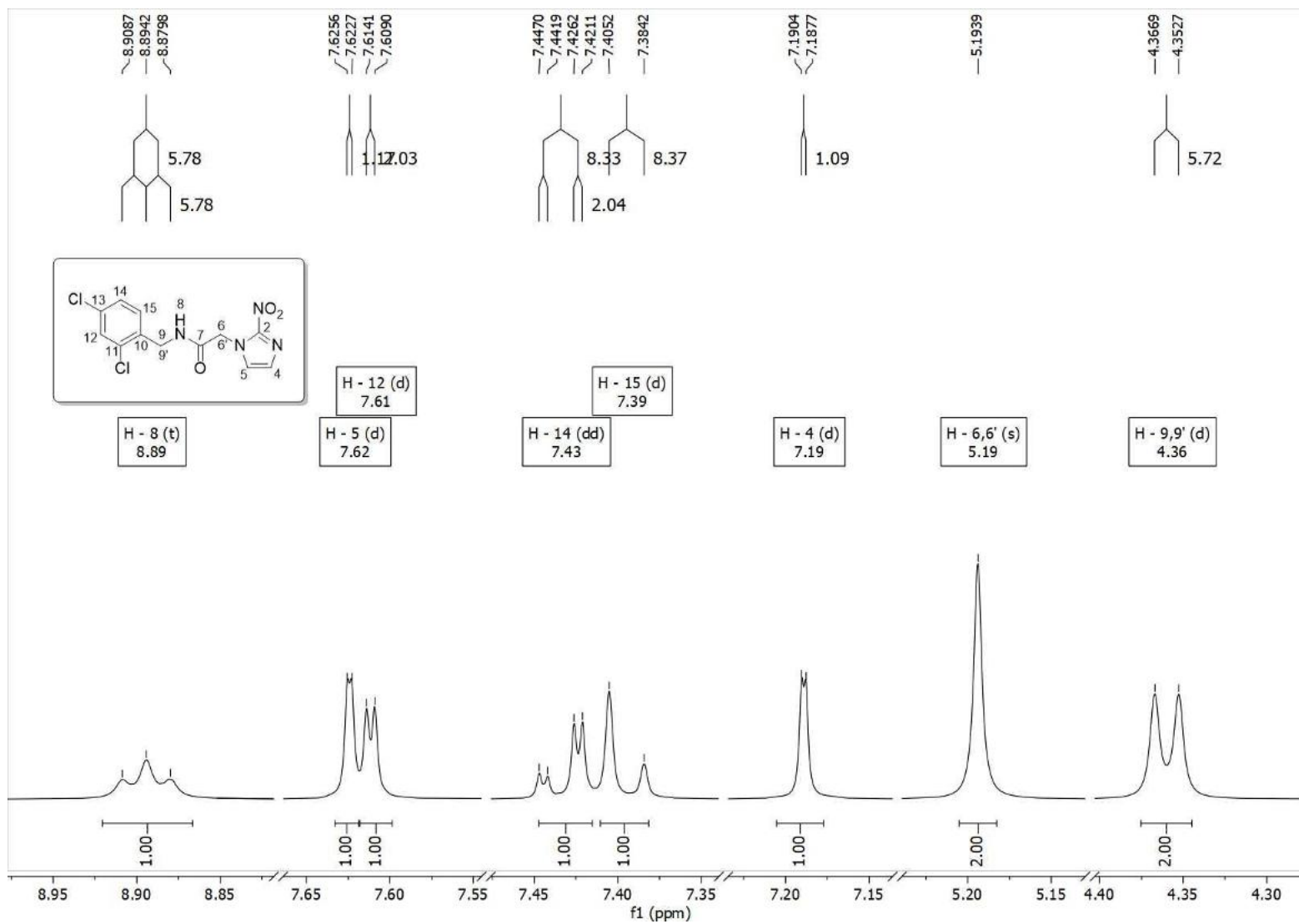
Espectro 183: Espectro de massas de alta resolução do derivado **20**.



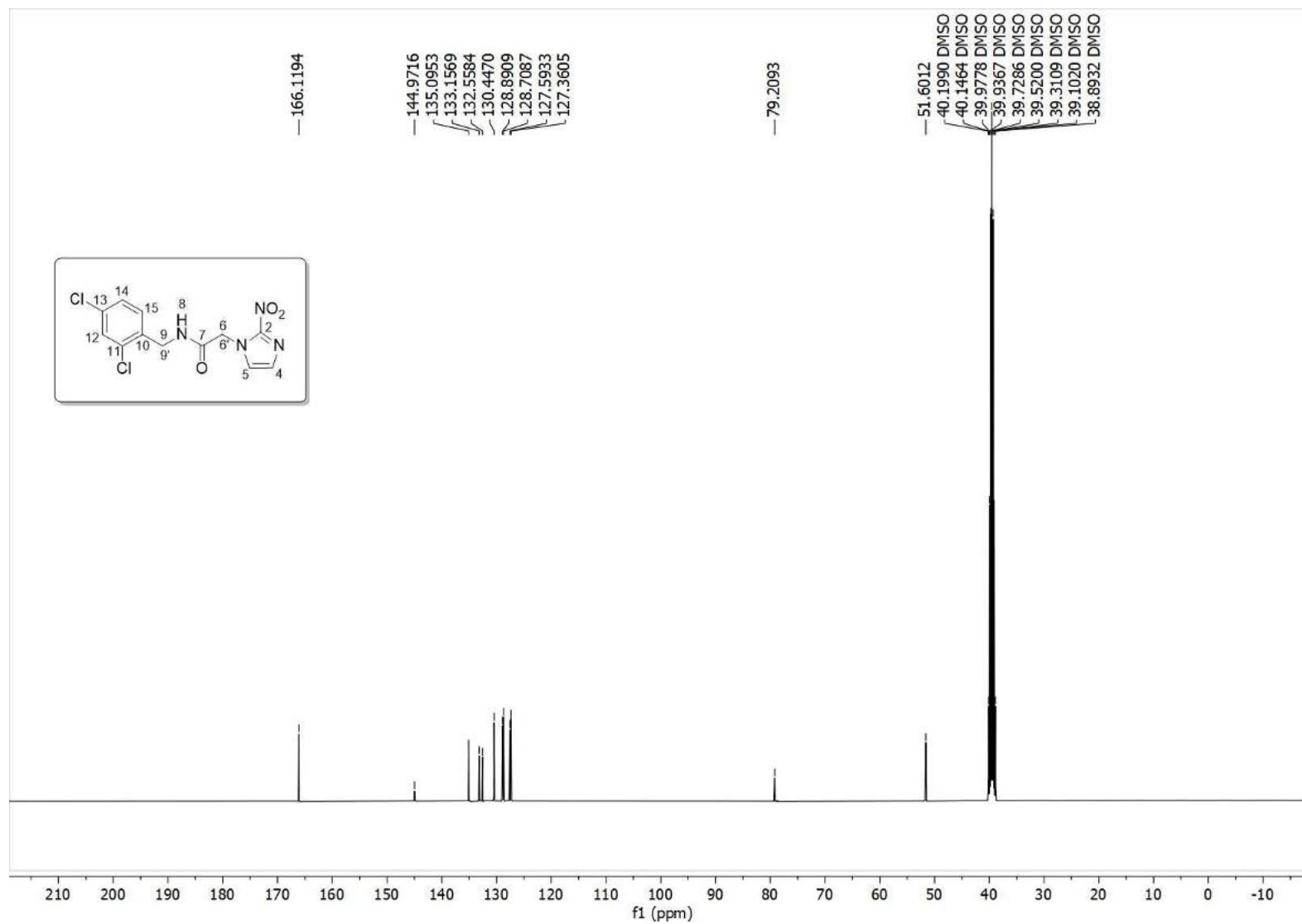
Espectro 184: Espectro de infravermelho do derivado **20**.



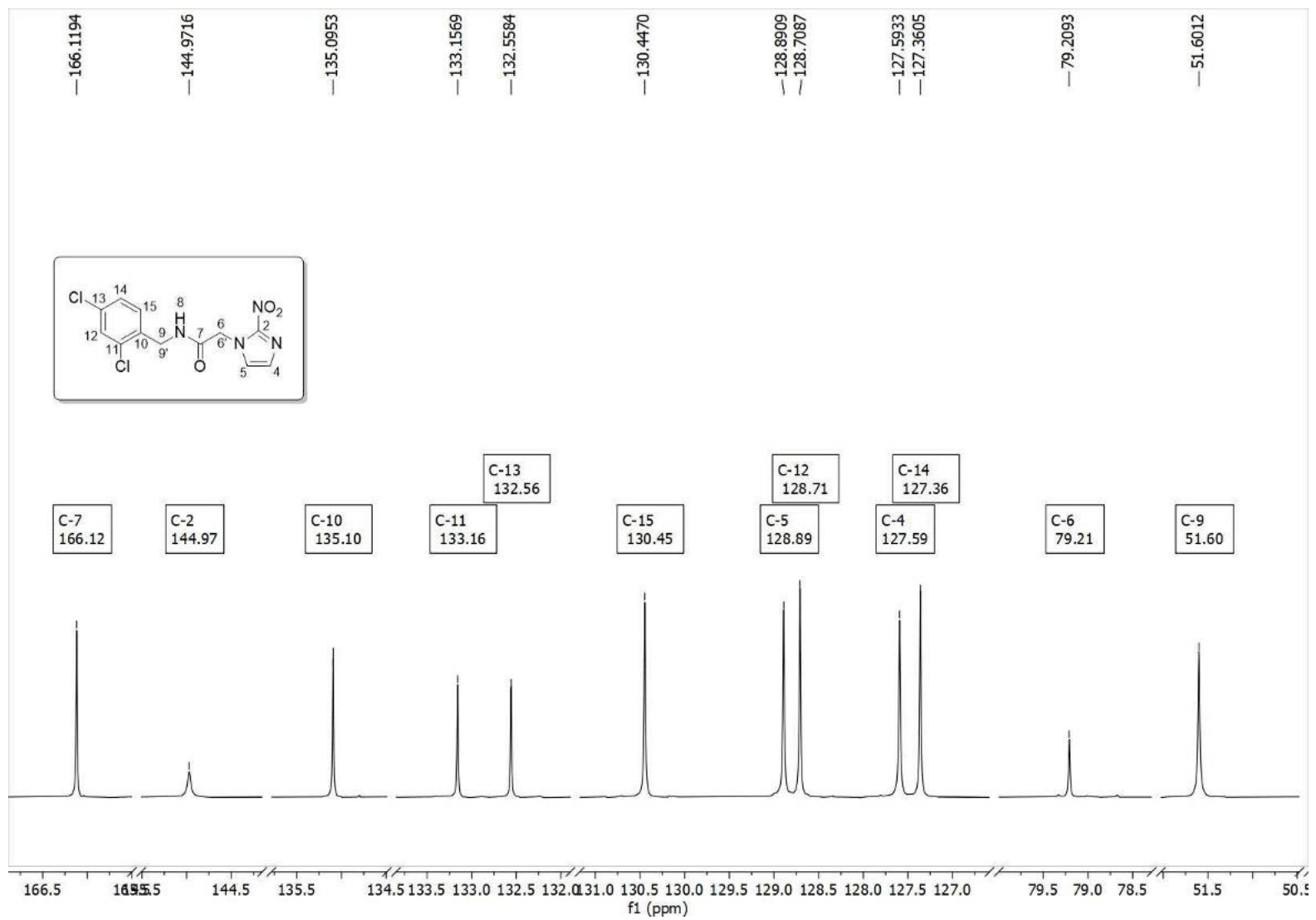
Espectro 185: Espectro de RMN ¹H (400 MHz; DMSO-d₆) do derivado **20**.



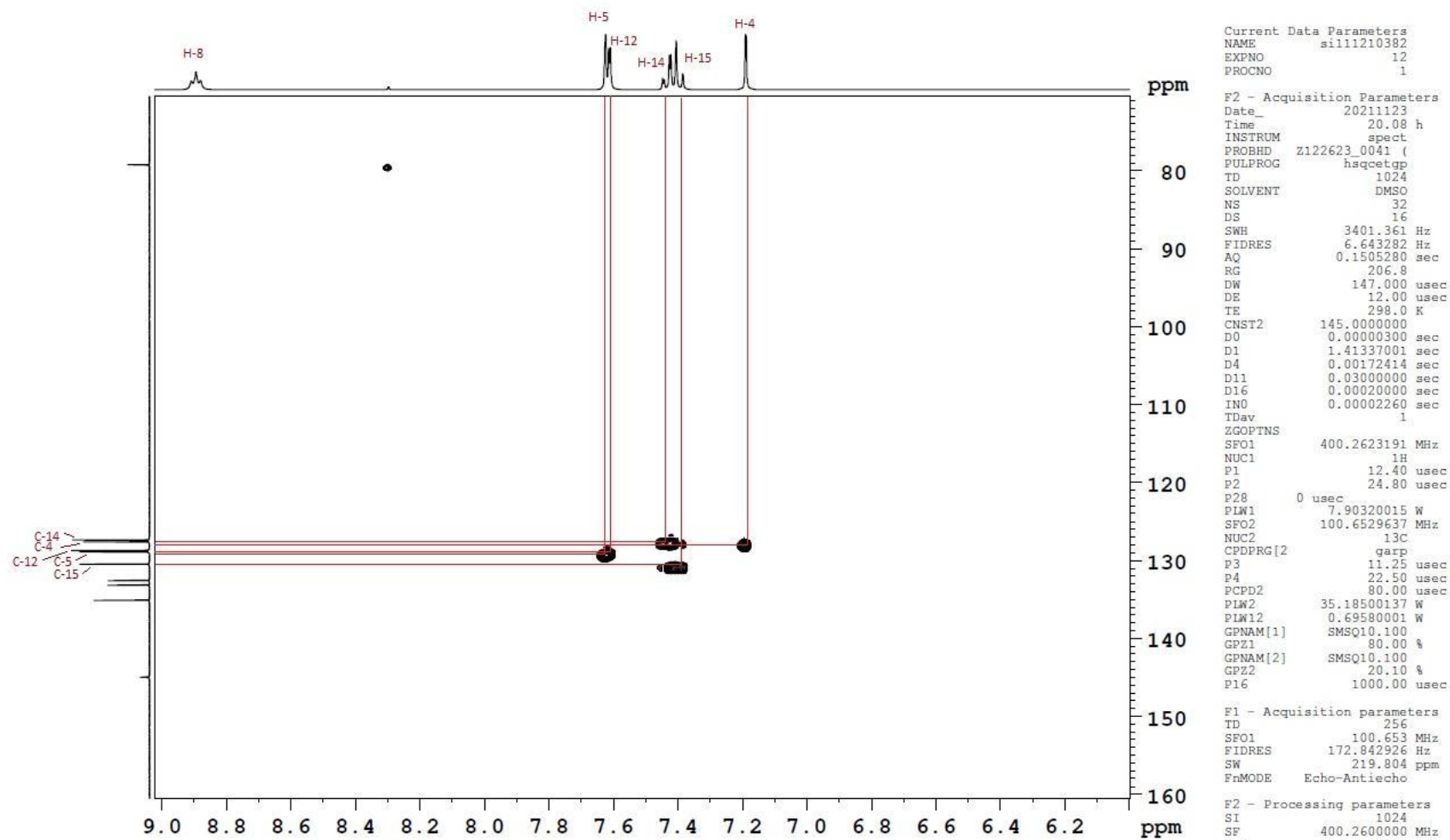
Espectro 186: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **20**.



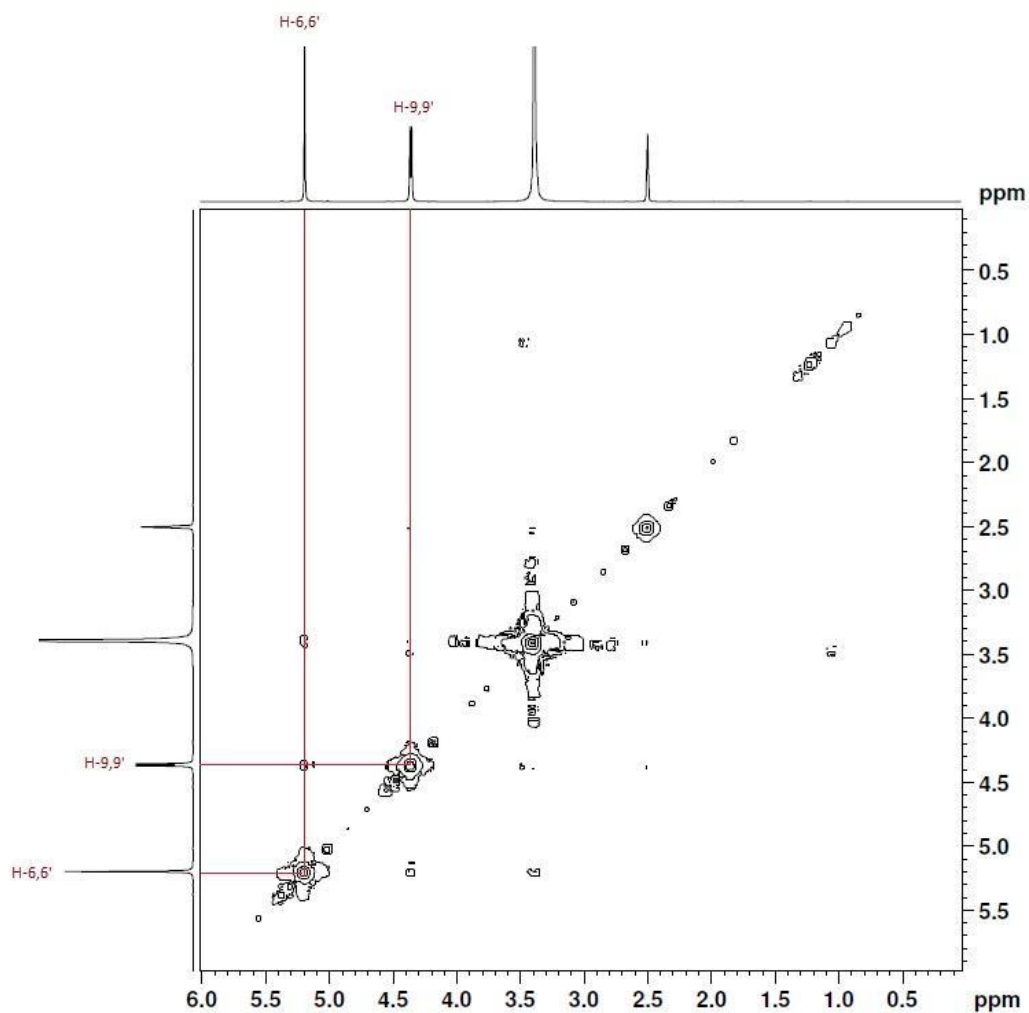
Espectro 187: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **20**.



Espectro 188: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **20**.



Espectro 189: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado **20**.



```

Current Data Parameters
NAME      sil11210382
EXPNO     15
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20211125
Time      12.18 h
INSTRUM   spect
PROBHD    Z122623_0041 (
PULPROG   cosygpppuf
TD         2048
SOLVENT   DMSO
NS         16
DS         8
SWH        4807.692 Hz
FIDRES     4.695012 Hz
AQ         0.2129920 sec
RG         28.45
TW         104.000 usec
DE         12.00 usec
TE         298.0 K
DO         0.00000300 sec
D1         2.00000000 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00002000 sec
D13        0.00000400 sec
D16        0.00020000 sec
INO        0.00020800 sec
TD0v       1
SFO1       400.2622014 MHz
NUC1       1H
P0         12.40 usec
P1         12.40 usec
P17        2500.00 usec
PLW1       7.90320015 W
PLW10      1.35020006 W
GPNAM[1]   SMSQ10.100
GPZ1       10.00 %
P16        1000.00 usec

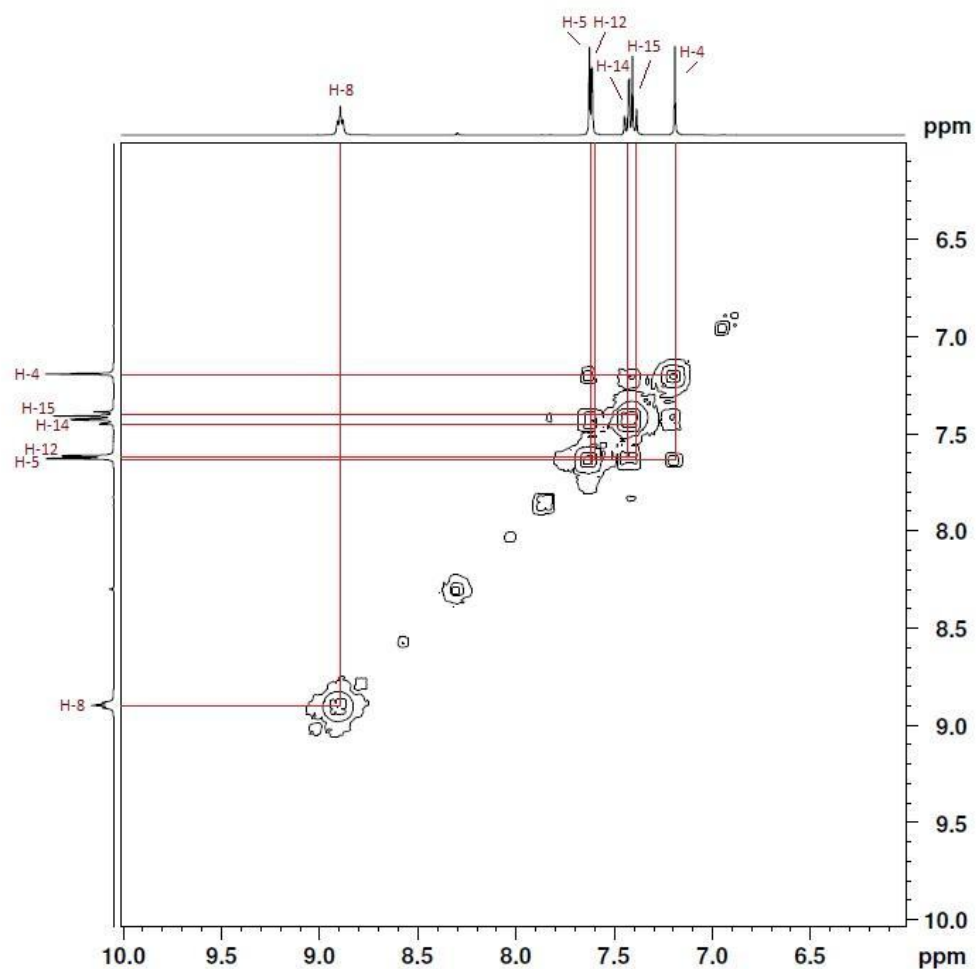
F1 - Acquisition parameters
TD         128
SFO1       400.2622 MHz
FIDRES     75.120193 Hz
SW         12.011 ppm
F2MODE     QF

F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         400.2599991 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.40

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        QF
SF         400.2599986 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0

```

Espectro 190: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado **20**.



Current Data Parameters
NAME sil111210382
EXPNO 15
PROCNO 1

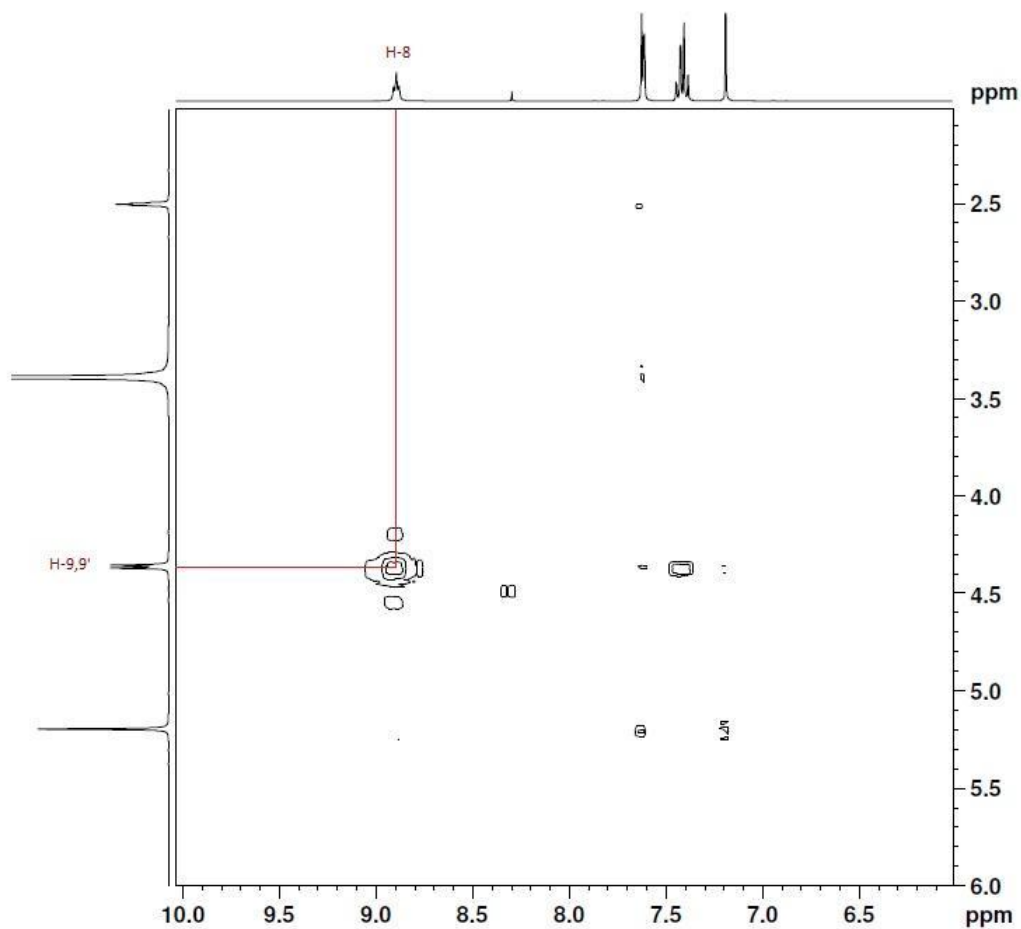
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20211125
Time 12.18 H
INSTRUM spect
PROBHD Z122623_0041 (
PULPROG cosygpppqf
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 8
SWH 4807.692 Hz
FIDRES 4.695012 Hz
AQ 0.2129920 sec
RG 28.45
DW 104.000 usec
DE 12.00 usec
TE 296.0 K
D0 0.00000300 sec
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00002000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
IN0 0.00020800 sec
TDav 1
SFO1 400.2622014 MHz
NUC1 1H
PC 12.40 usec
P1 12.40 usec
P17 2500.00 usec
PLW1 7.90320015 W
PLW10 1.35020006 W
GPNAM[1] SMS910.100
GPZ1 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 128
SFO1 400.2622 MHz
FIDRES 75.120193 Hz
SW 12.011 ppm
FMODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.2599991 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 400.2599986 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Espectro 191: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado **20**.



Current Data Parameters
NAME: s1111210382
EXPNO: 15
PROCNO: 1

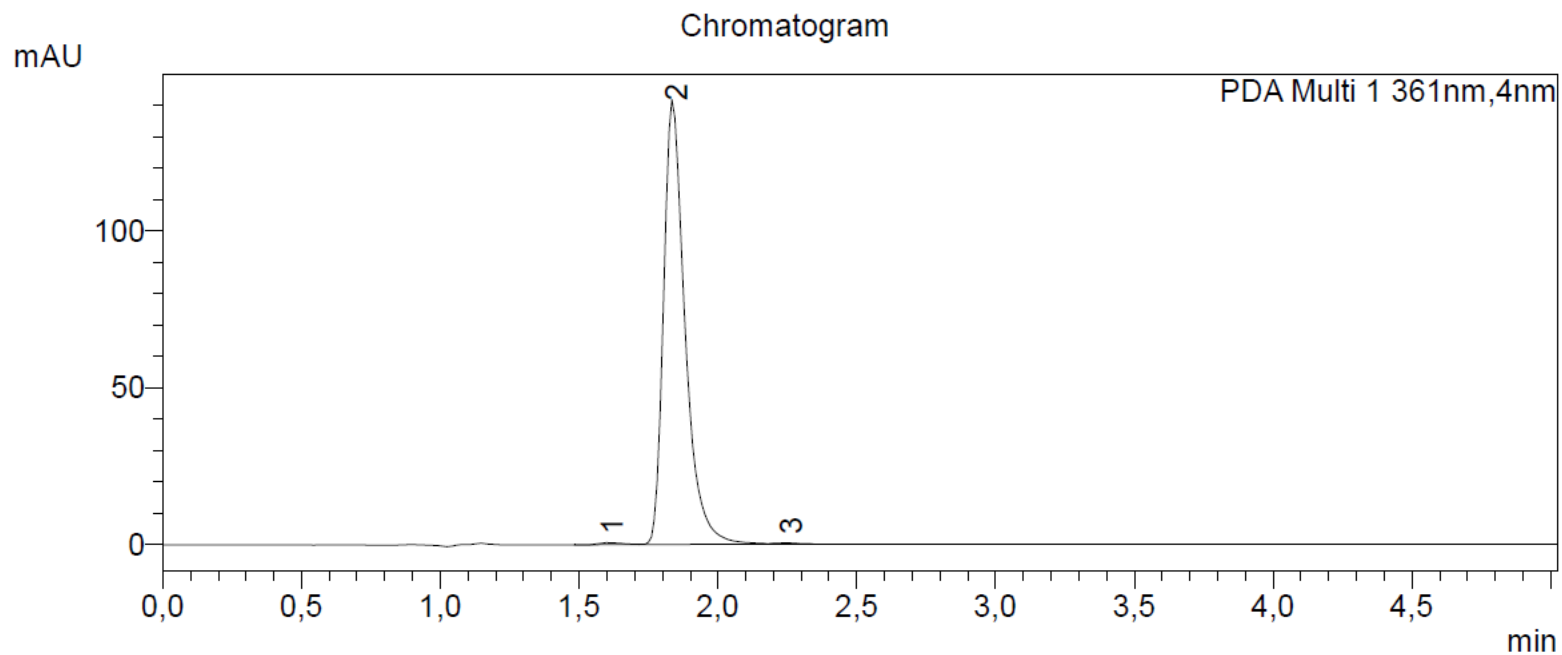
F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20211125
Time: 12.18 h
INSTRUM: spect
PROBHD: Z122623_0041 ()
PULPROG: cosygpppqf
TD: 2048
SOLVENT: DMSO
NS: 16
DS: 8
SWH: 4807.692 Hz
FIDRES: 4.695012 Hz
AQ: 0.2129920 sec
RG: 28.45
DW: 104.000 usec
DE: 12.00 usec
TE: 298.0 K
D0: 0.00000300 sec
D1: 2.00000000 sec
D11: 0.03000000 sec
D12: 0.00002000 sec
D13: 0.00000400 sec
D16: 0.00020000 sec
IN0: 0.00020800 sec
TDev: 1
SFO1: 400.2622014 MHz
NUC1: 1H
P0: 12.40 usec
P1: 12.40 usec
P17: 2500.00 usec
PLW1: 7.90320015 W
PLW10: 1.35020006 W
GPNAM[1]: SMSQ10.100
GPZ1: 10.00 %
P16: 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD: 128
SFO1: 400.2622 MHz
FIDRES: 75.120193 Hz
SW: 12.011 ppm
F1MODE: QF

F2 - Processing parameters
SI: 1024
SF: 400.2599991 MHz
WDW: QSINE
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0
PC: 1.40

F1 - Processing parameters
SI: 1024
MC2: QF
SF: 400.2599986 MHz
WDW: QSINE
SSB: 0
LB: 0 Hz
GB: 0

Espectro 192: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado **20**.

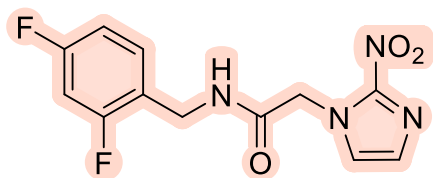


Peak Table

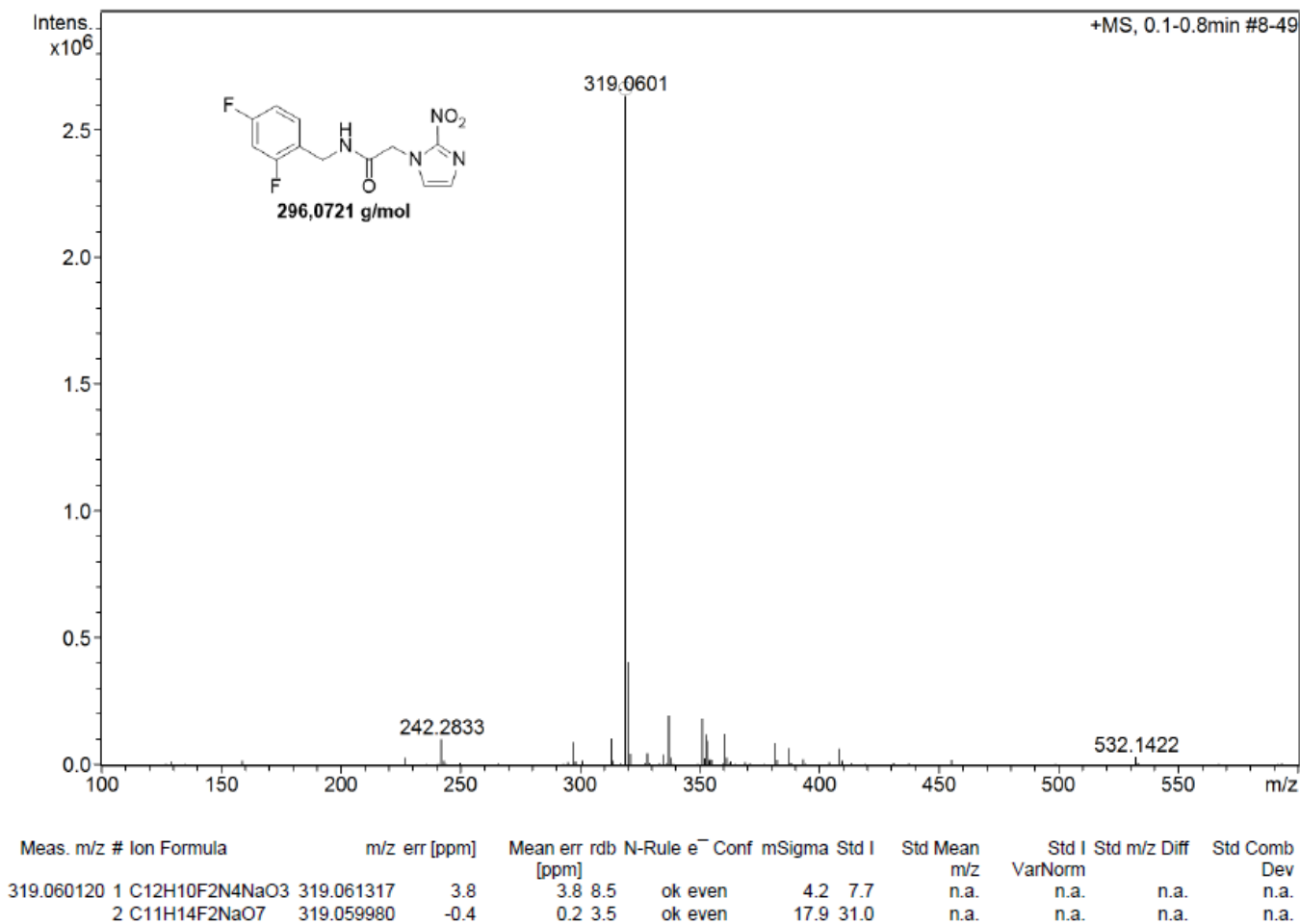
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,60		3879	0,5	8012	--	--	--
2	1,84		764585	99,4	14684	1,471	1,366	0,146
3	2,25		1033	0,1	29182	1,345	2,819	0,403
Total			769498	100,0				

Cromatograma 20: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **20**.

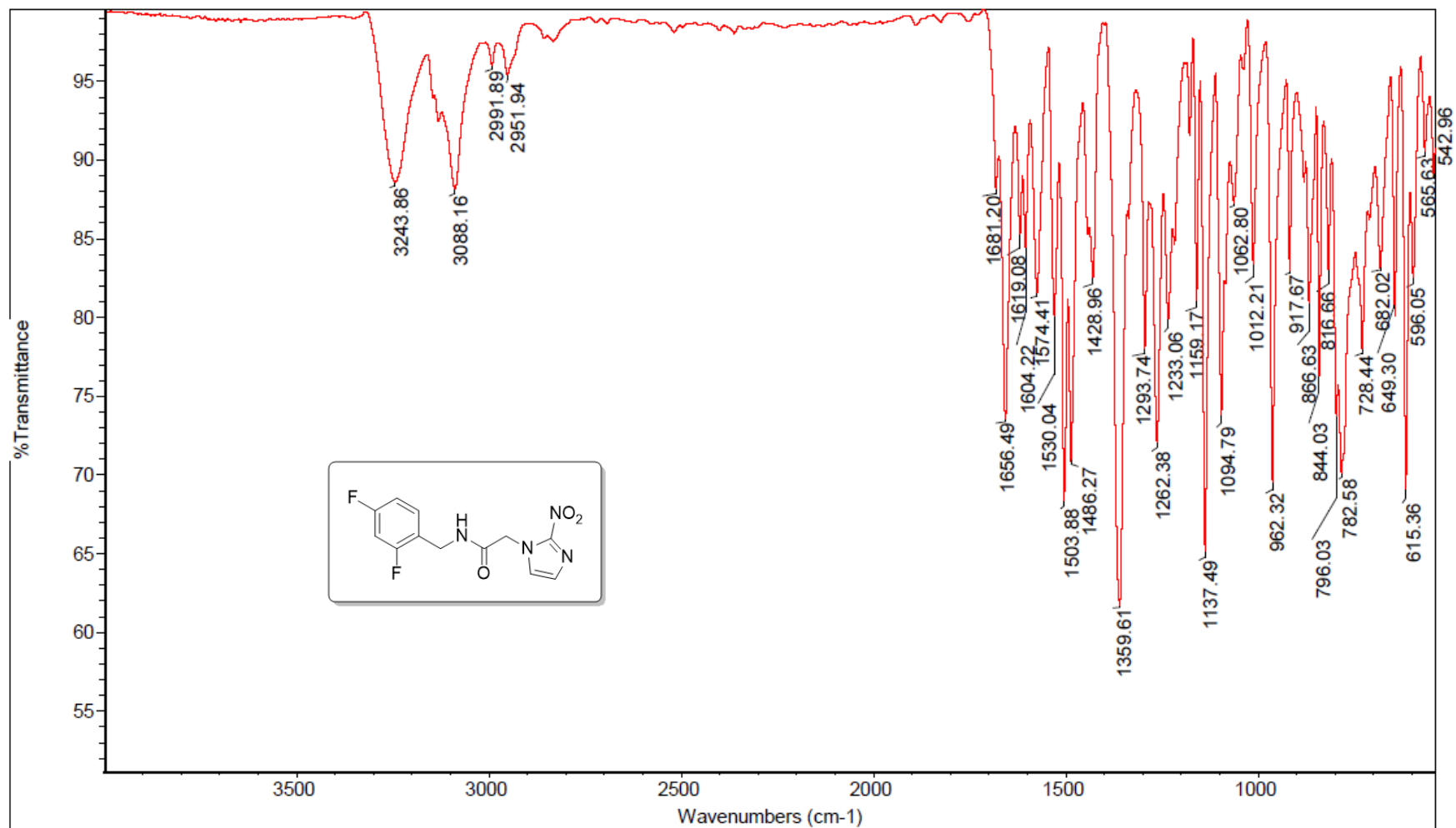
N-(2,4-difluorobenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)acetamida (21)



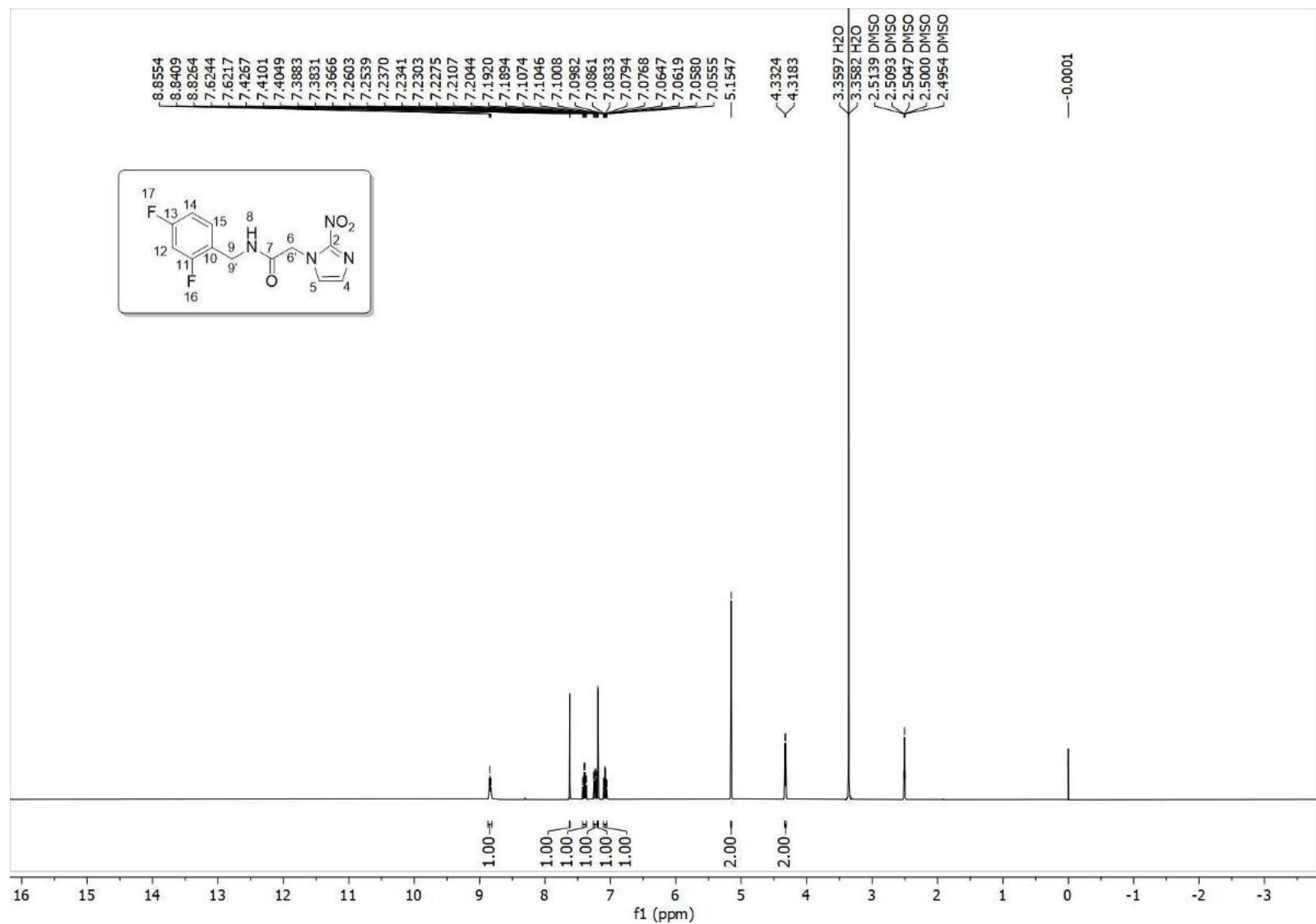
+MS, 0.1-0.8min #8-49



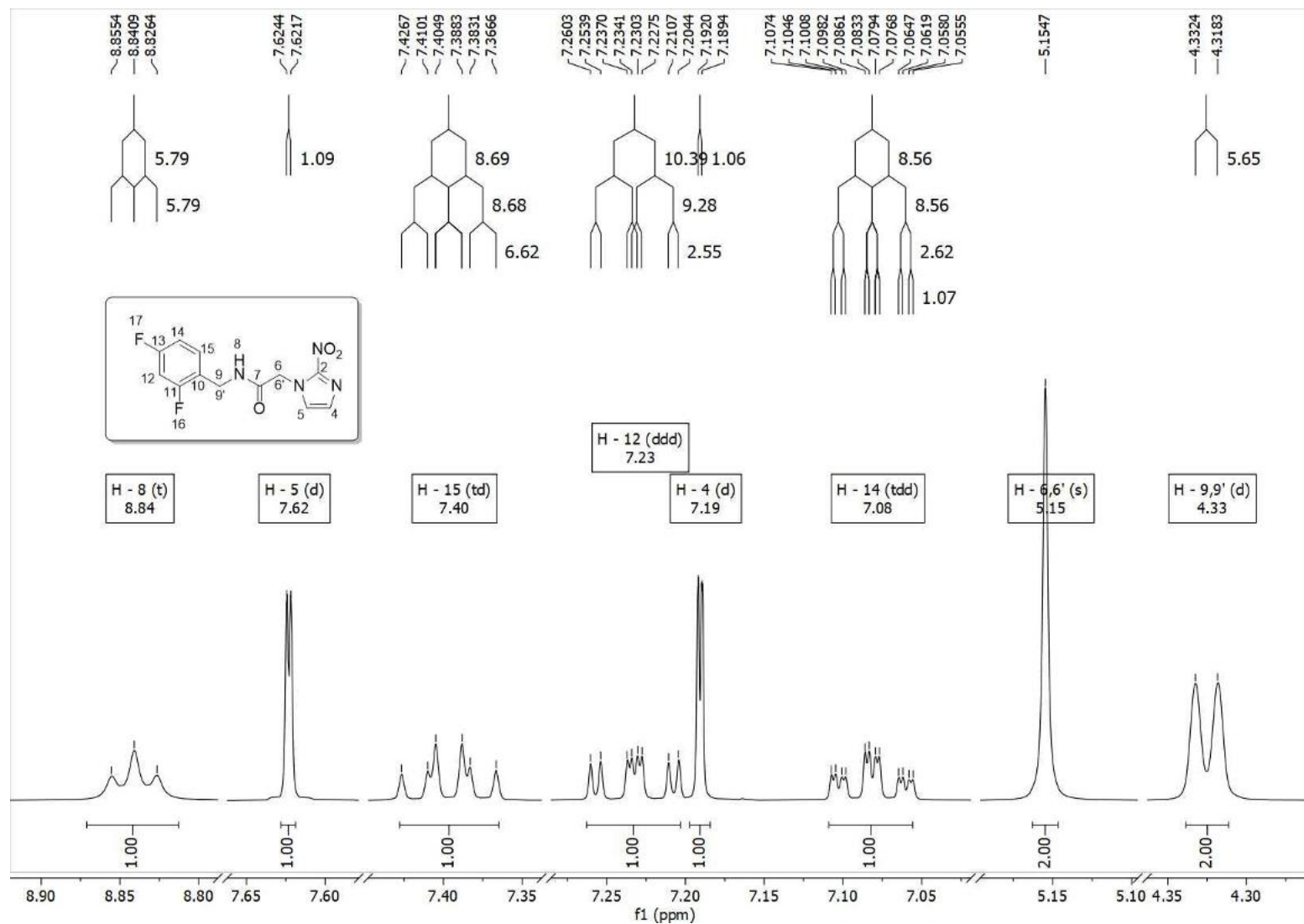
Espectro 193: Espectro de massas de alta resolução do derivado **21**.



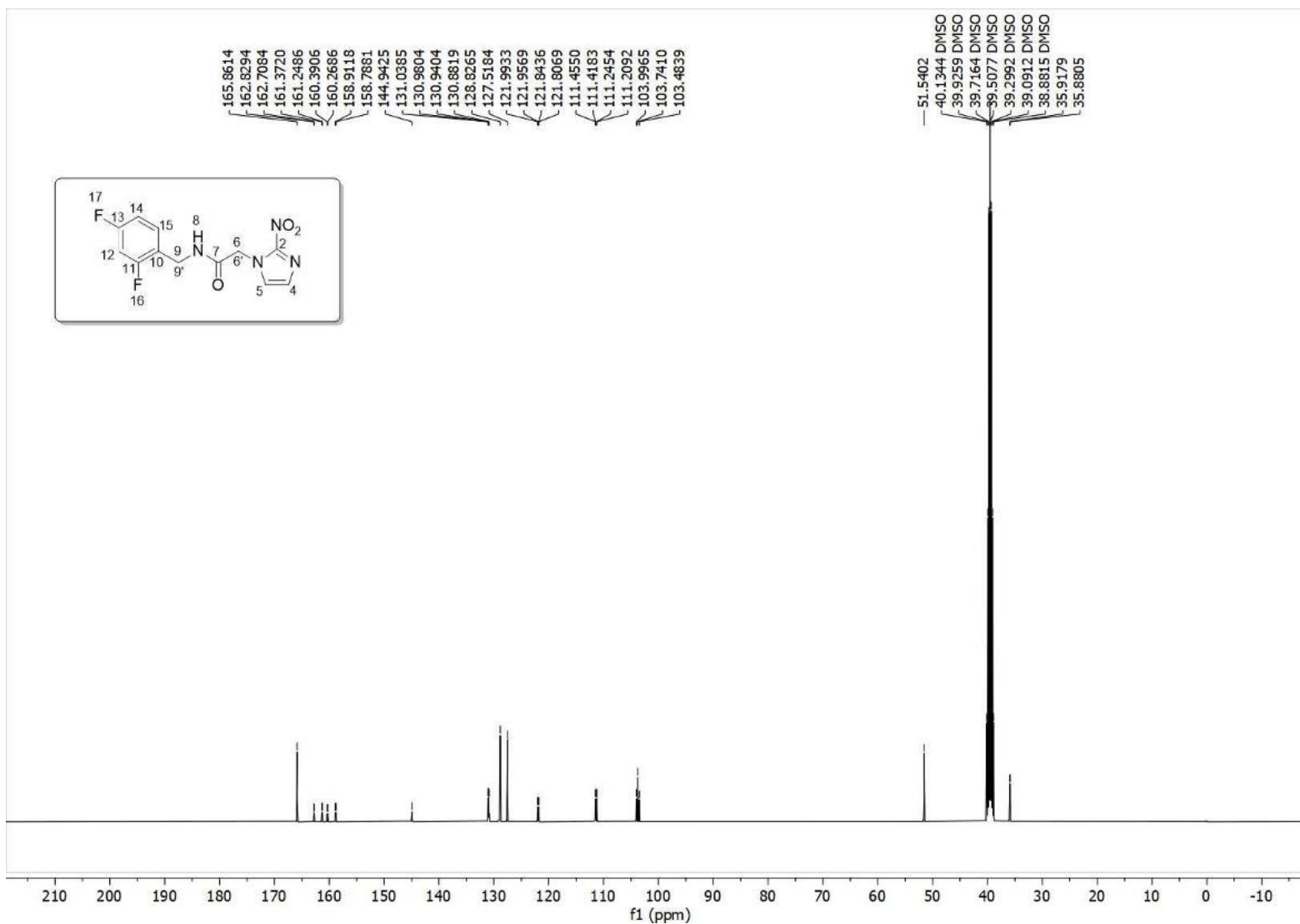
Espectro 194: Espectro de infravermelho do derivado **21**.



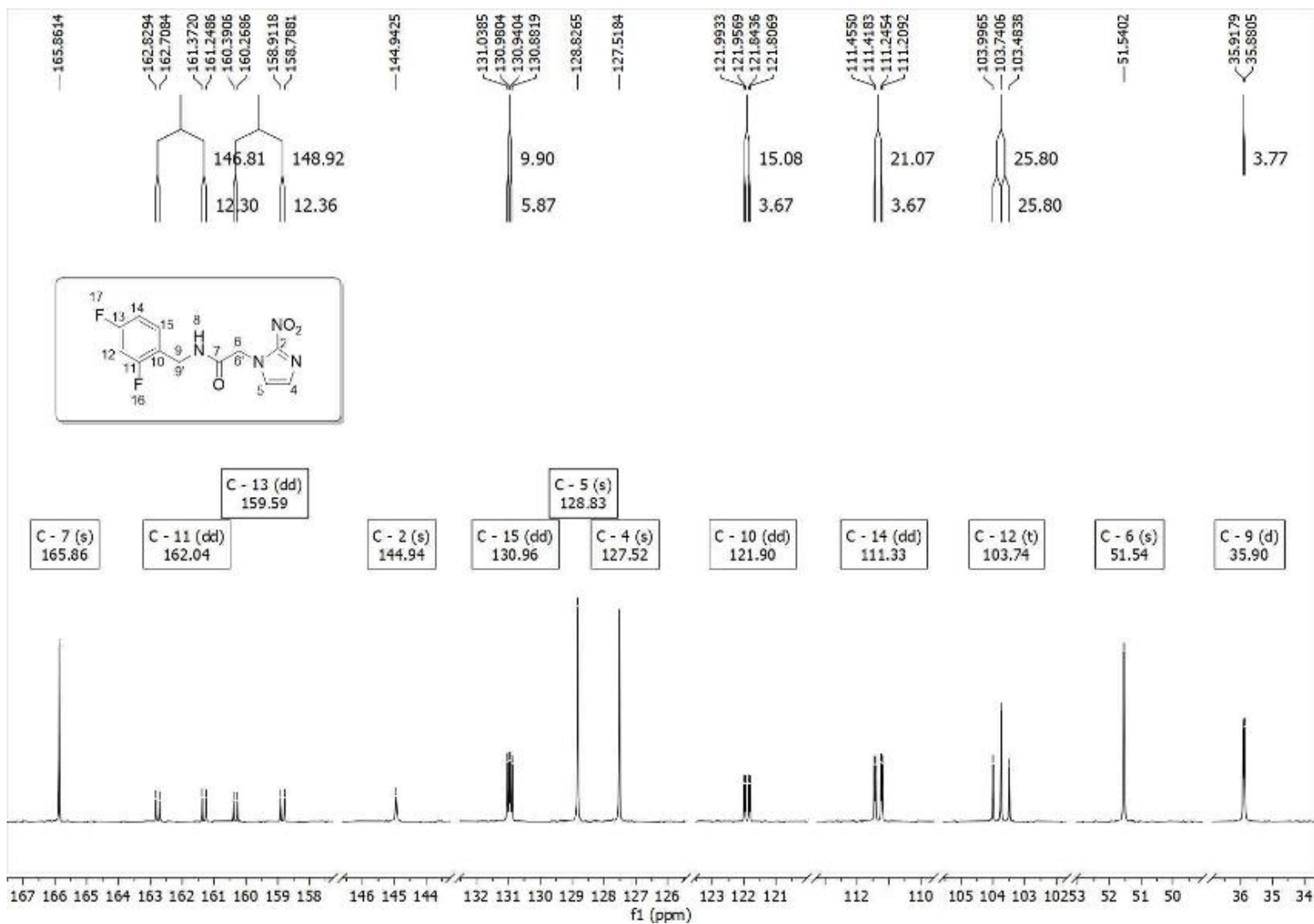
Espectro 195: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **21**.



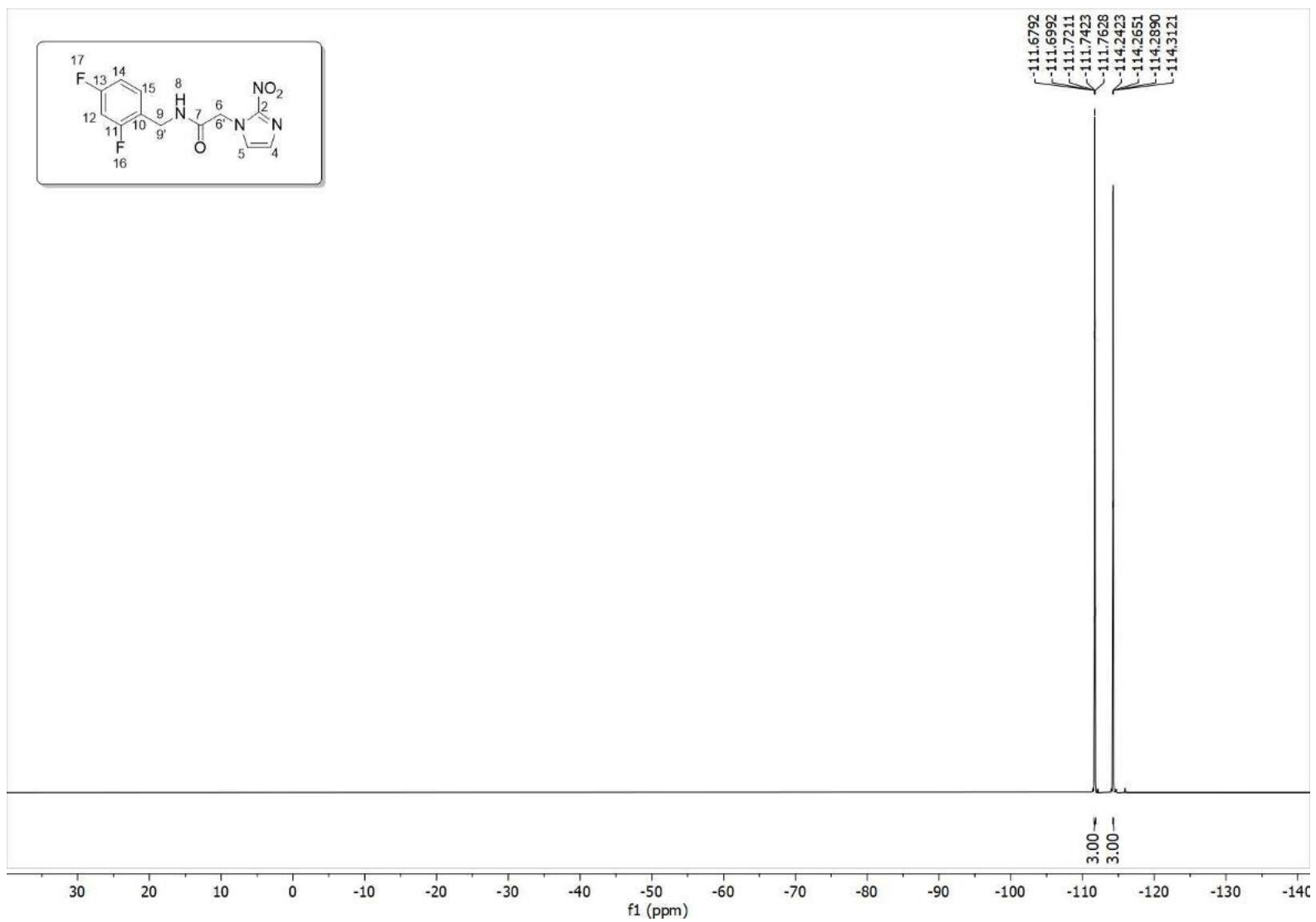
Espectro 196: Espectro de RMN ¹H (400 MHz; DMSO-d₆) do derivado **21**.



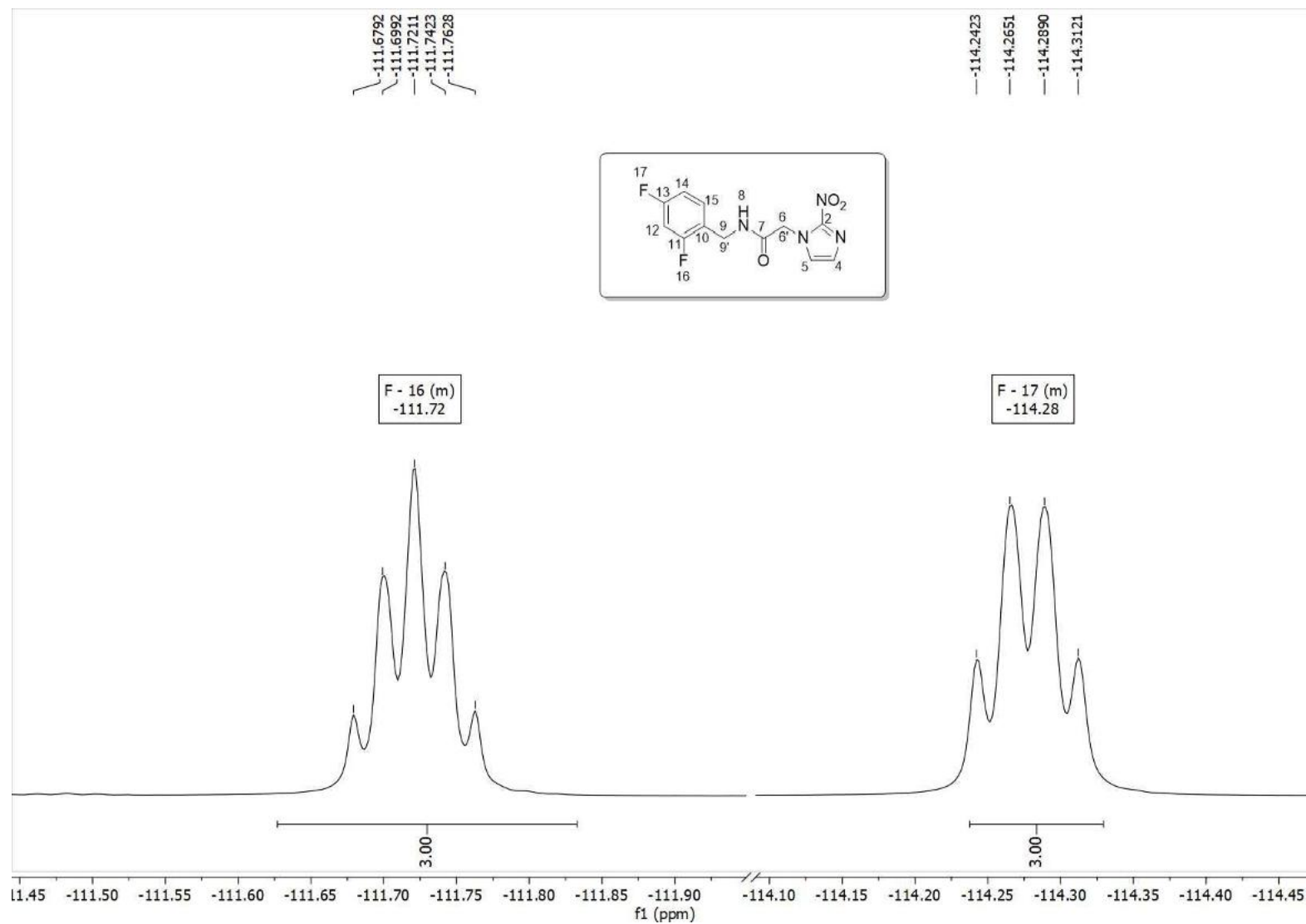
Espectro 197: Espectro de RMN ¹³C (100 MHz; DMSO-d₆) do derivado **21**.



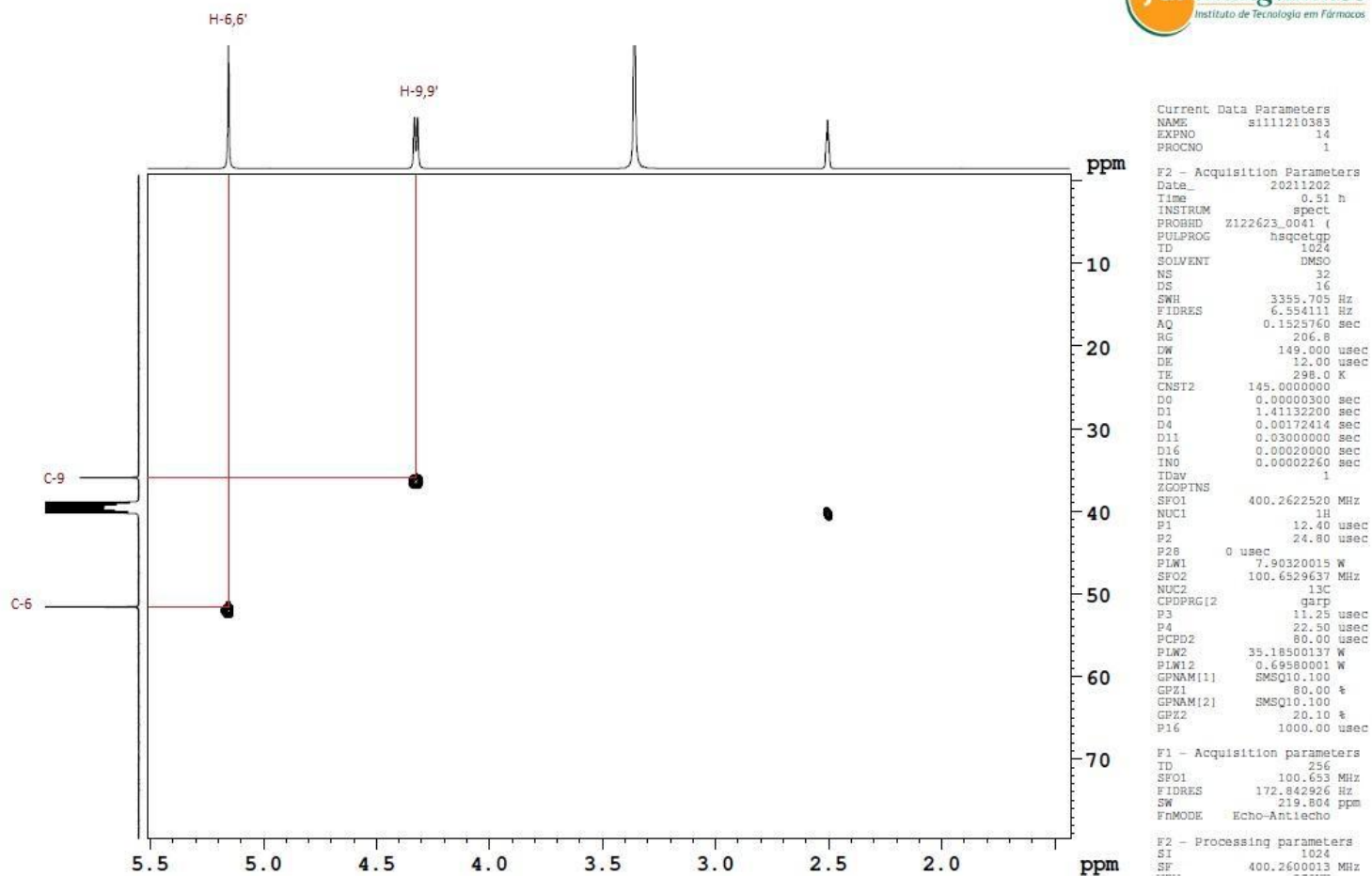
Espectro 198: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **21**.



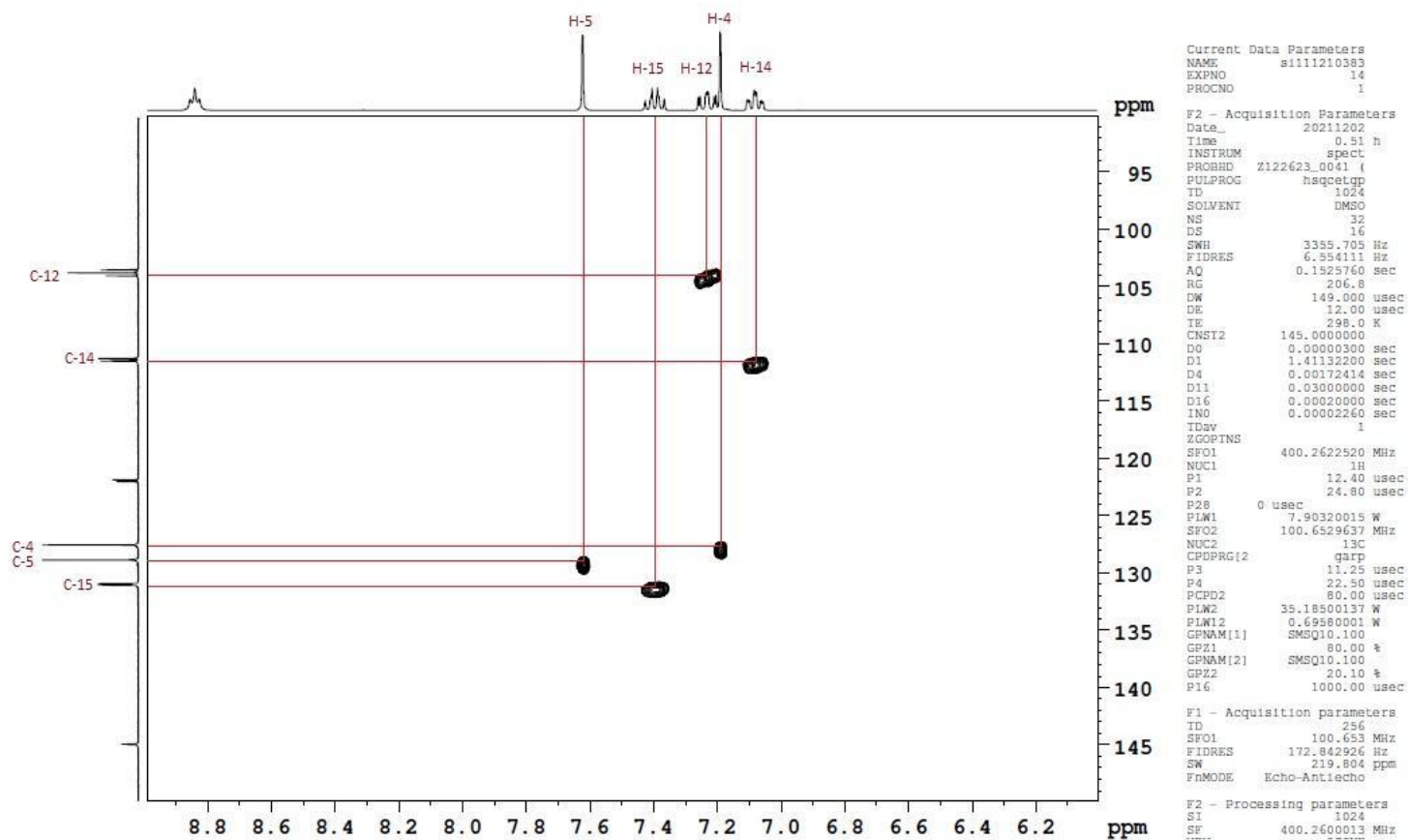
Espectro 199: Espectro de RMN ^{19}F (377 MHz; DMSO- d_6) do derivado **21**.



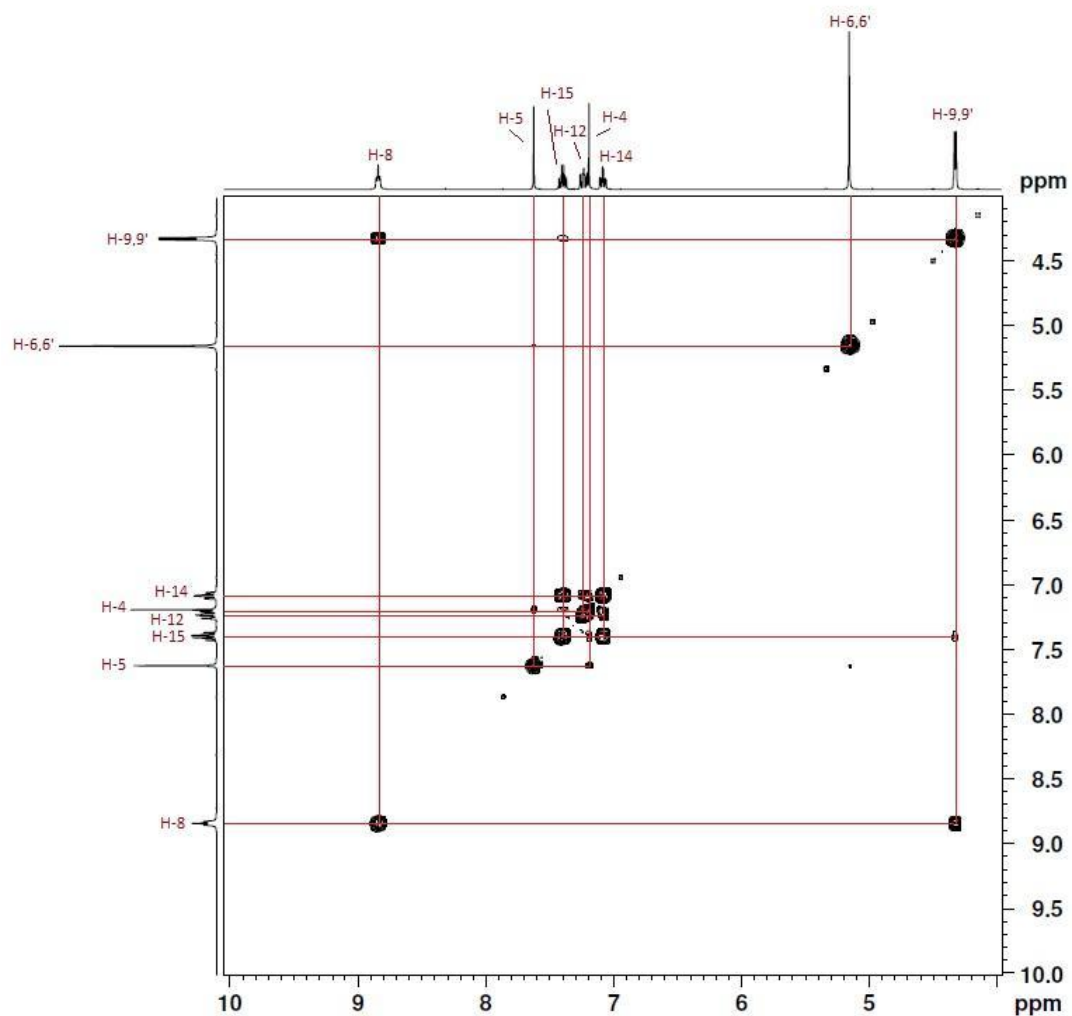
Espectro 200: Espectro de RMN ^{19}F (377 MHz; DMSO- d_6) do derivado **21**.



Espectro 201: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado **21**.



Espectro 202: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado **21**.



```

Current Data Parameters
NAME      sil11210383
EXPNO     12
PROCNO    1

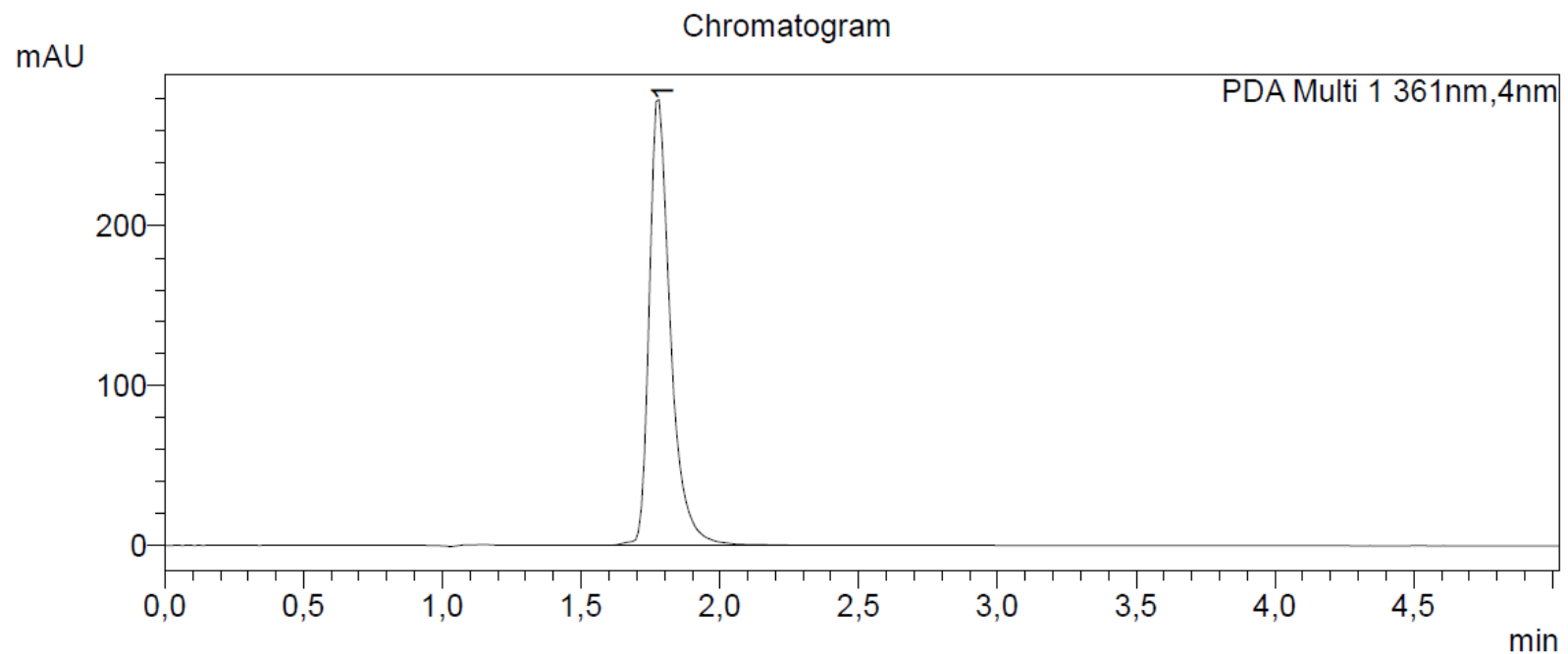
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20211130
Time      11.20 h
INSTRUM   spect
PROBHD    Z122623_0041 (
PULPROG   cosygpppqf
TD         2048
SOLVENT   DMSO
NS         16
DS         8
SWH        4807.692 Hz
FIDRES     4.695012 Hz
AQ         0.2129920 sec
RG         35.61
DW         104.000 usec
DE         12.00 usec
TE         298.0 K
D0         0.00000300 sec
D1         2.00000000 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00002000 sec
D13        0.00000400 sec
D16        0.00020000 sec
IN0        0.00020800 sec
TDav       1
SFO1       400.2622014 MHz
NUC1       1H
P0         12.40 usec
P1         12.40 usec
P17        2500.00 usec
PLW1       7.90320015 W
PLW10      1.35020006 W
GPNAM[1]   SMSQ10.100
GPZ1       10.00 %
P16        1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD         128
SFO1       400.2622 MHz
FIDRES     75.120193 Hz
SW         12.011 ppm
F2MODE     QF

F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         400.2599993 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.40

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        QF
SF         400.2599998 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
  
```

Espectro 203: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 21.



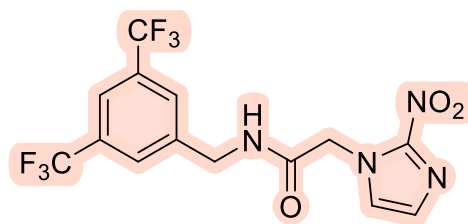
Peak Table

PDA Ch1 361nm

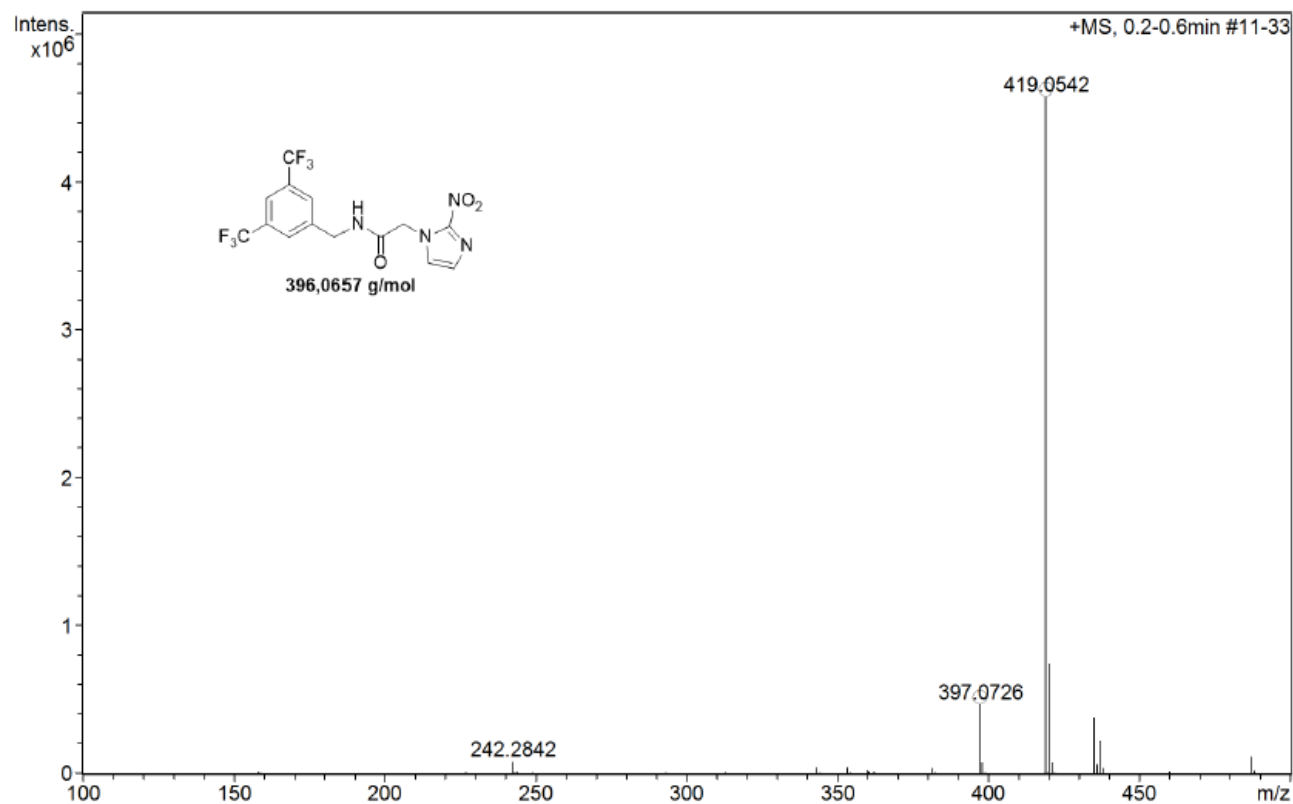
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,78		1490909	100,0	14651	1,469	--	--
Total			1490909	100,0				

Cromatograma 21: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **21**.

N-(3,5-bis(trifluorometil)benzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (22)

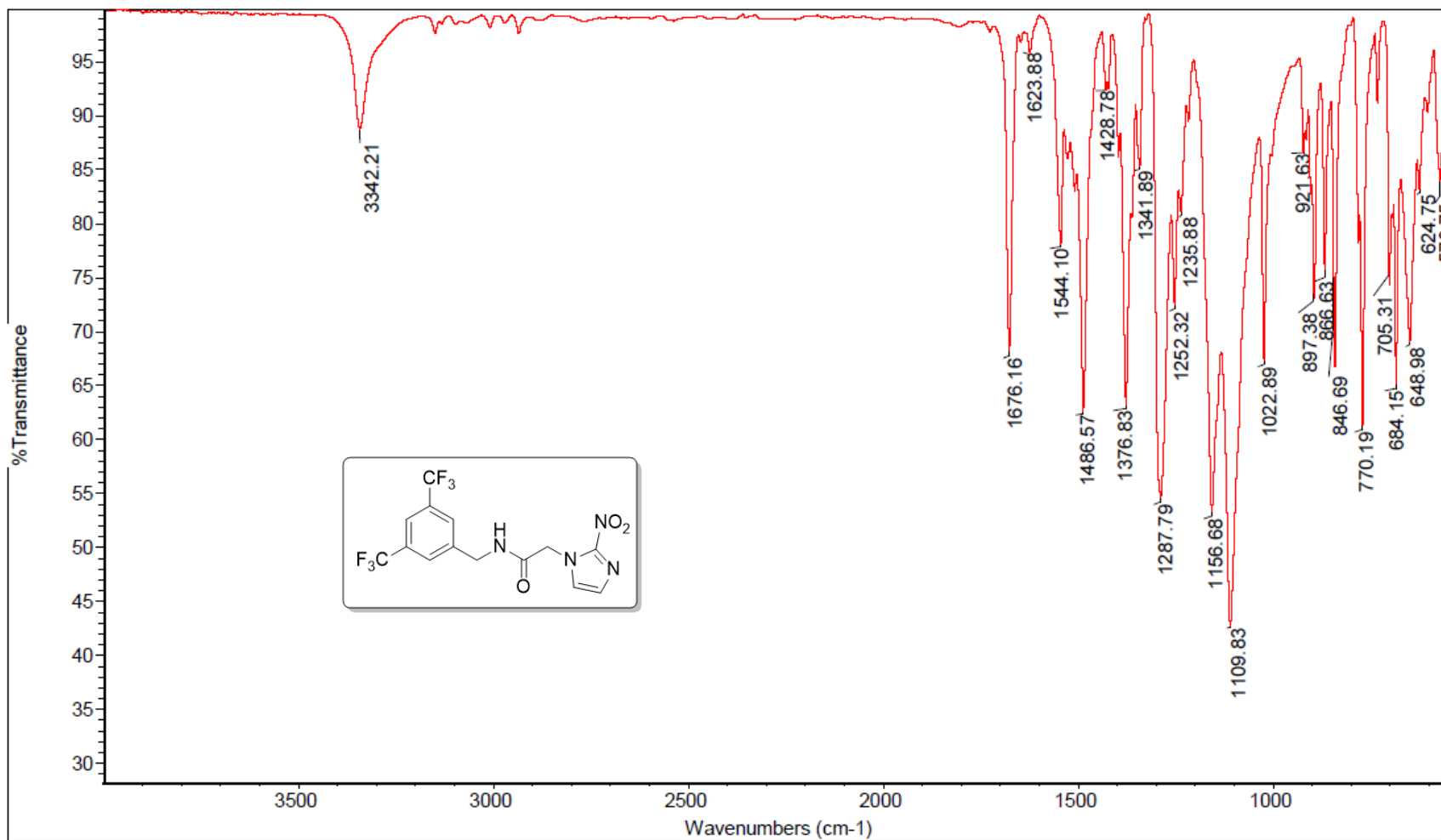


+MS, 0.2-0.6min #11-33

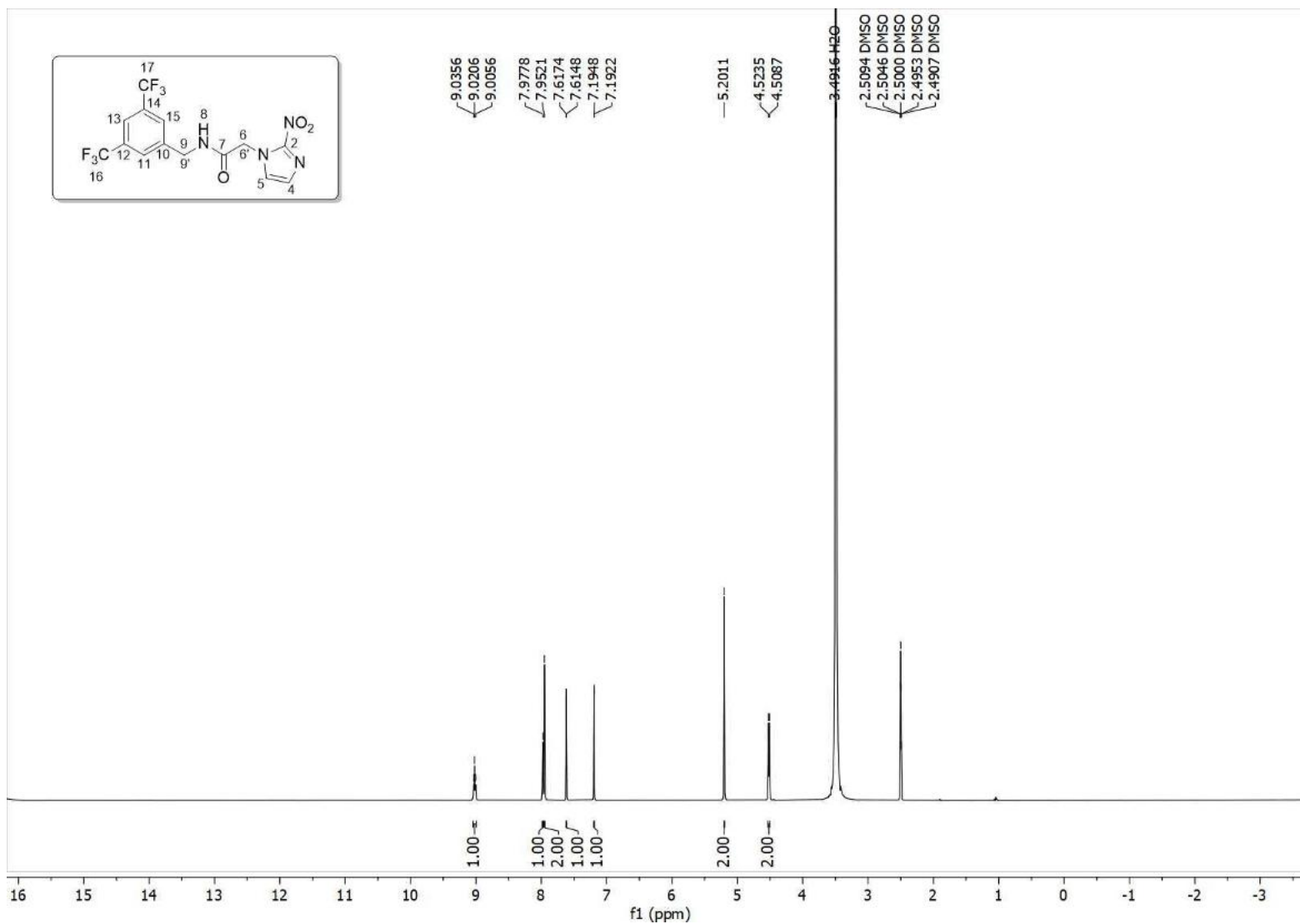


Meas. m/z	# Ion	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err	rdB	N-Rule	e ⁻	Conf	mSigma	Std I	Std Mean	Std I	Std m/z	Diff	Std Comb
397.072578	1	C ₁₄ H ₁₁ F ₆ N ₄ O ₃	397.072986	1.0	1.1	8.5	ok	even		0.4	0.8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	2	C ₁₃ H ₁₅ F ₆ O ₇	397.071649	-2.3	-1.9	3.5	ok	even		14.1	23.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
419.054193	1	C ₁₄ H ₁₀ F ₆ N ₄ NaO ₃	419.054930	1.8	1.4	8.5	ok	even		3.2	6.6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	2	C ₁₃ H ₁₄ F ₆ NaO ₇	419.053593	-1.4	-1.4	3.5	ok	even		11.4	17.7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

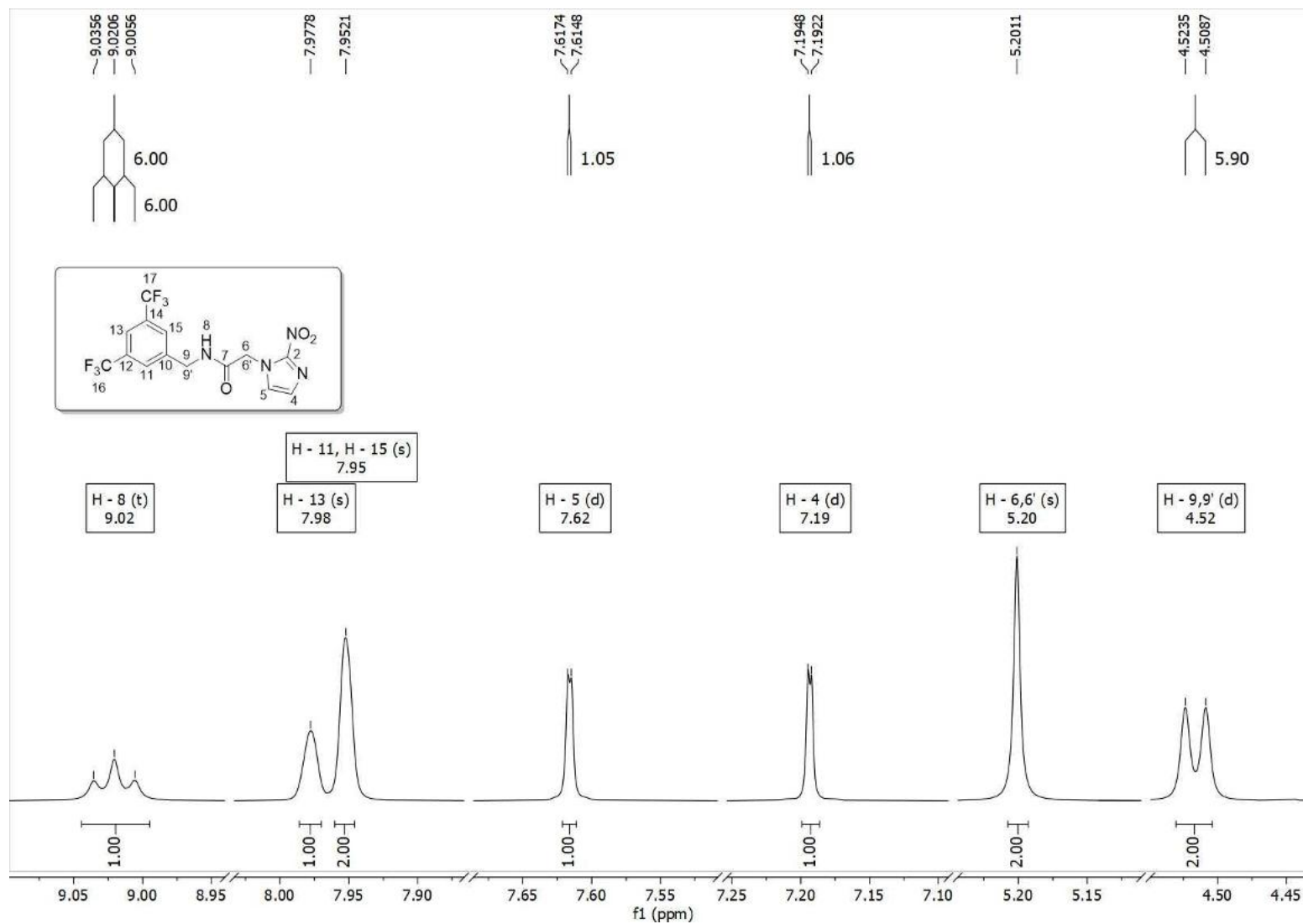
Espectro 204: Espectro de massas de alta resolução do derivado **22**.



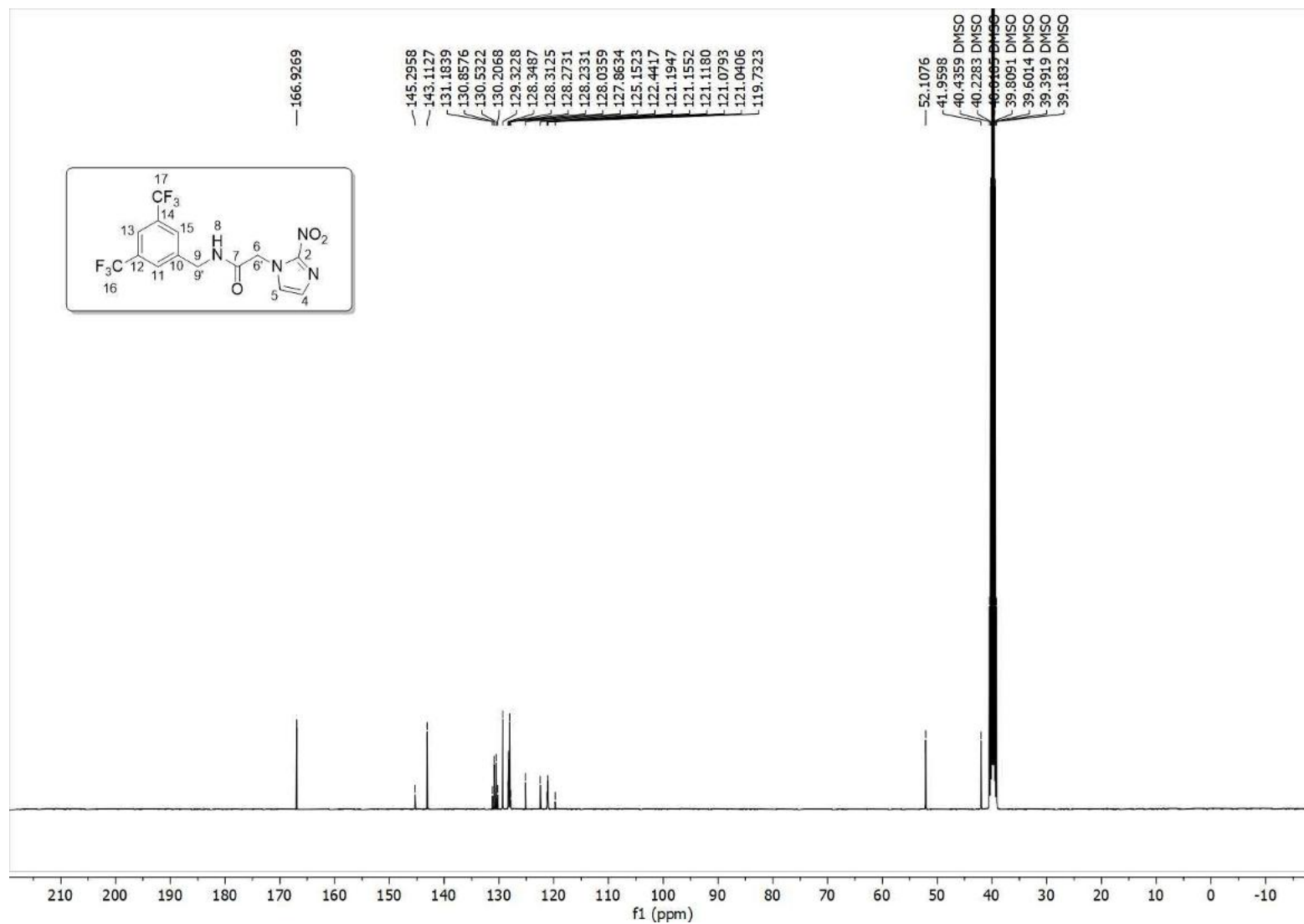
Espectro 205: Espectro de infravermelho do derivado 22.



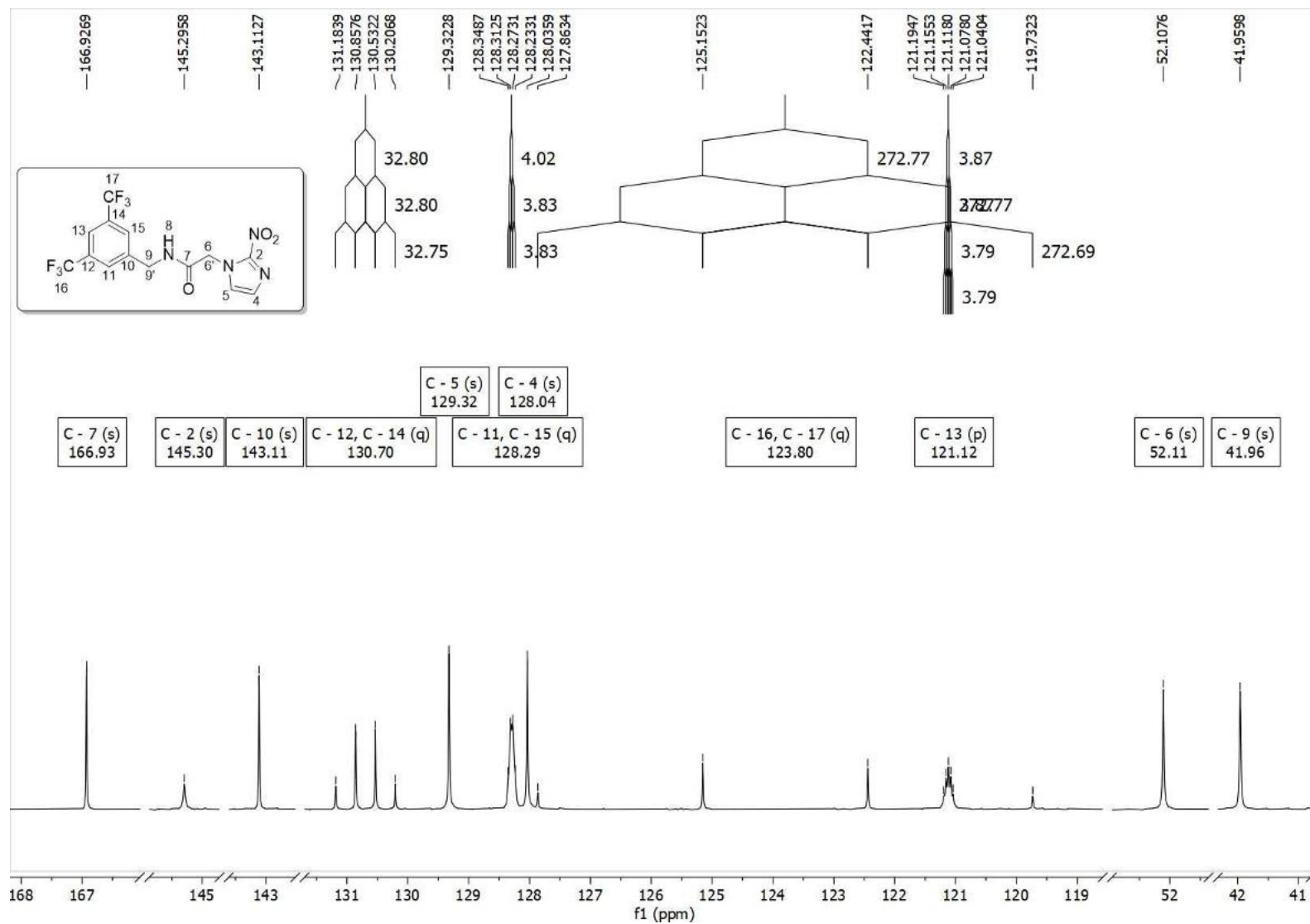
Espectro 206: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO-d_6) do derivado **22**.



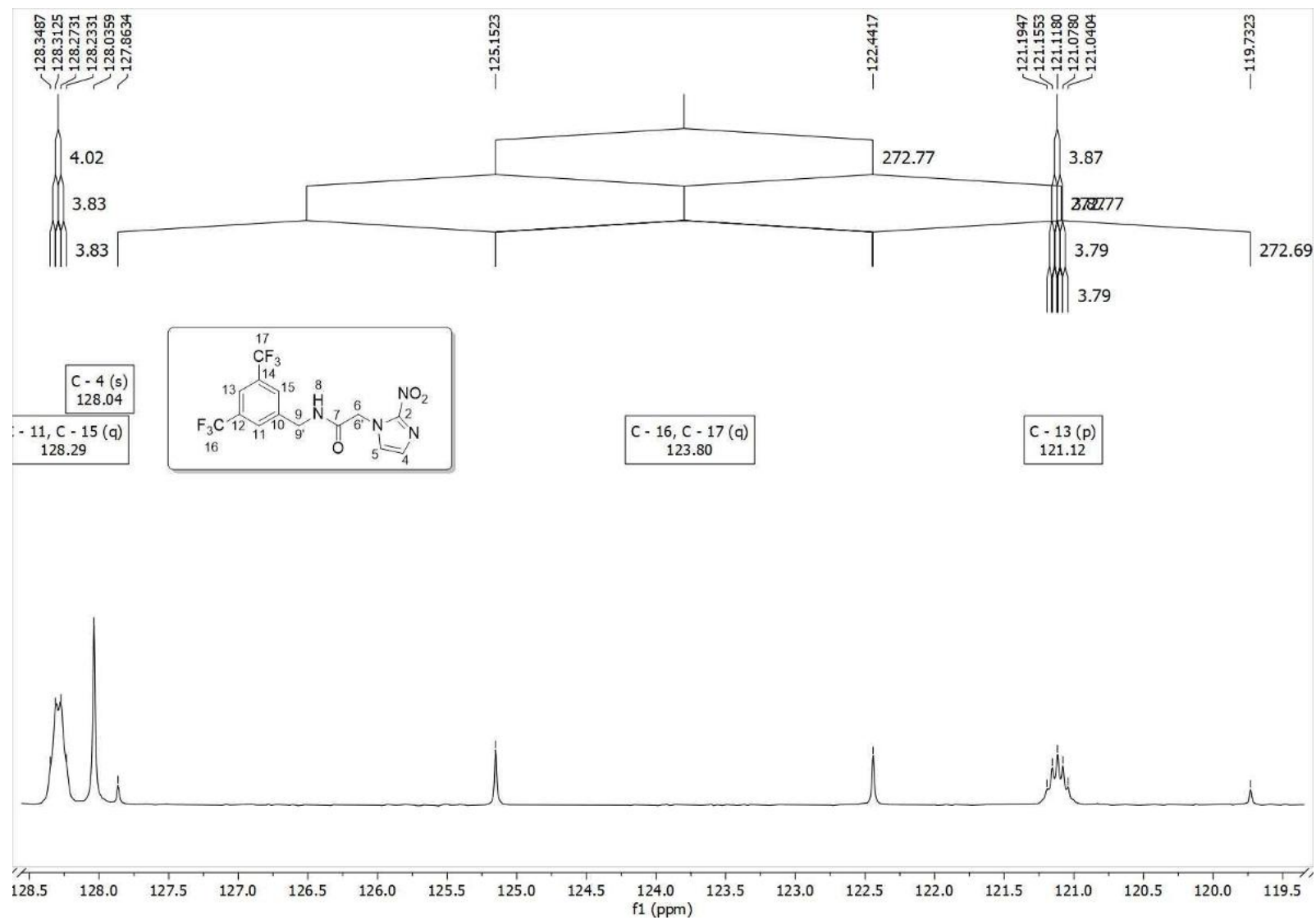
Espectro 207: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **22**.



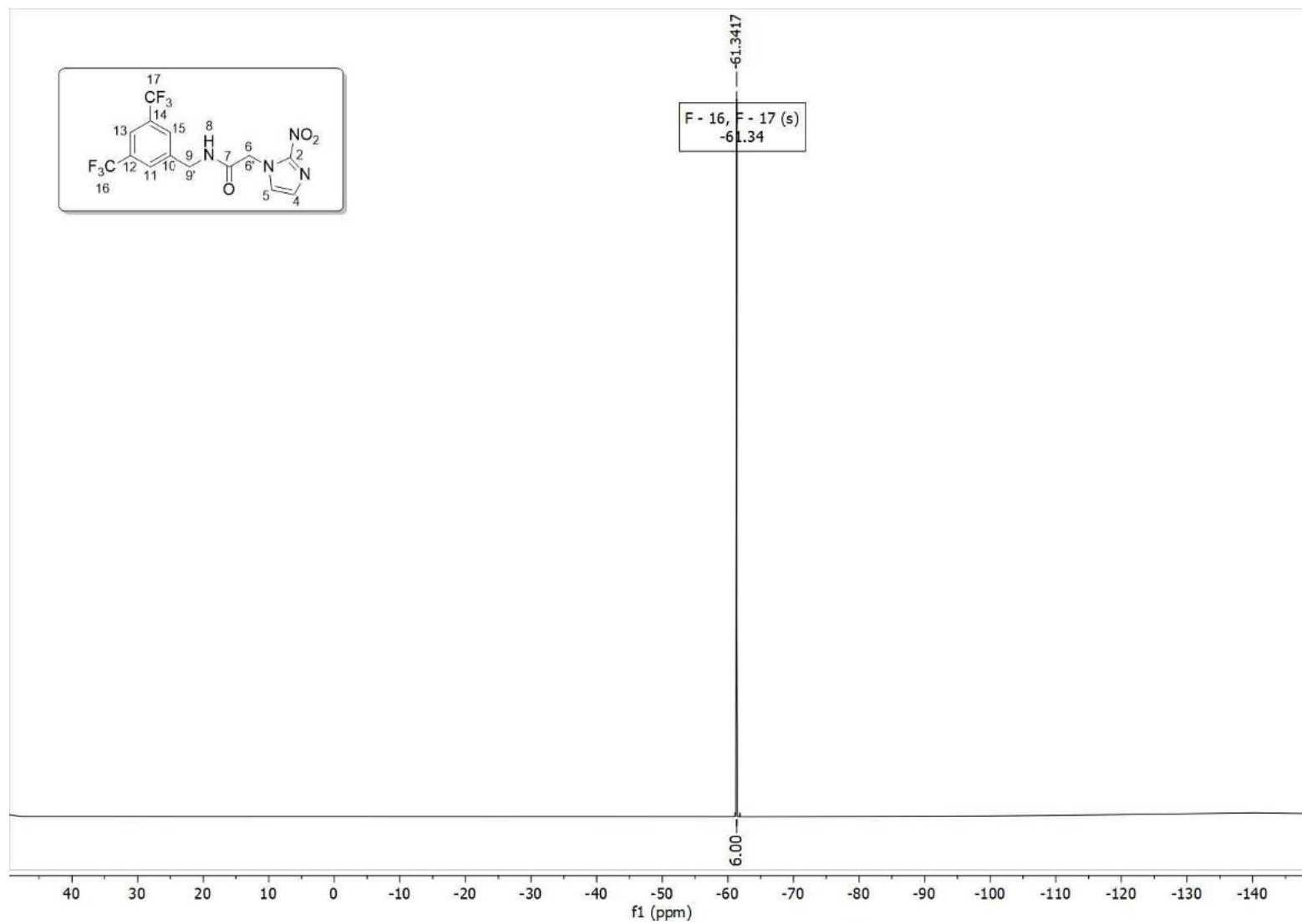
Espectro 208: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **22**.



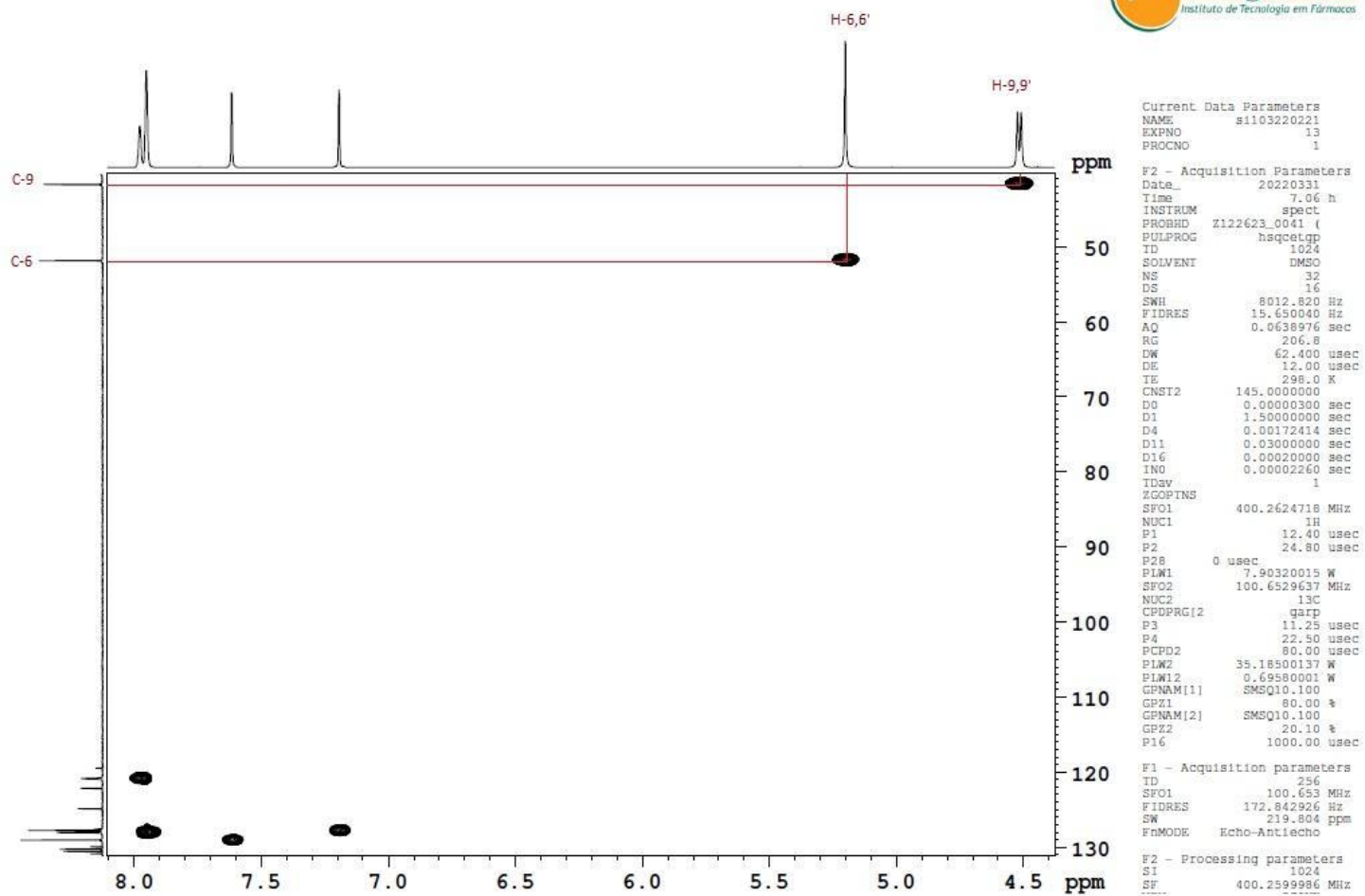
Espectro 209: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **22**.



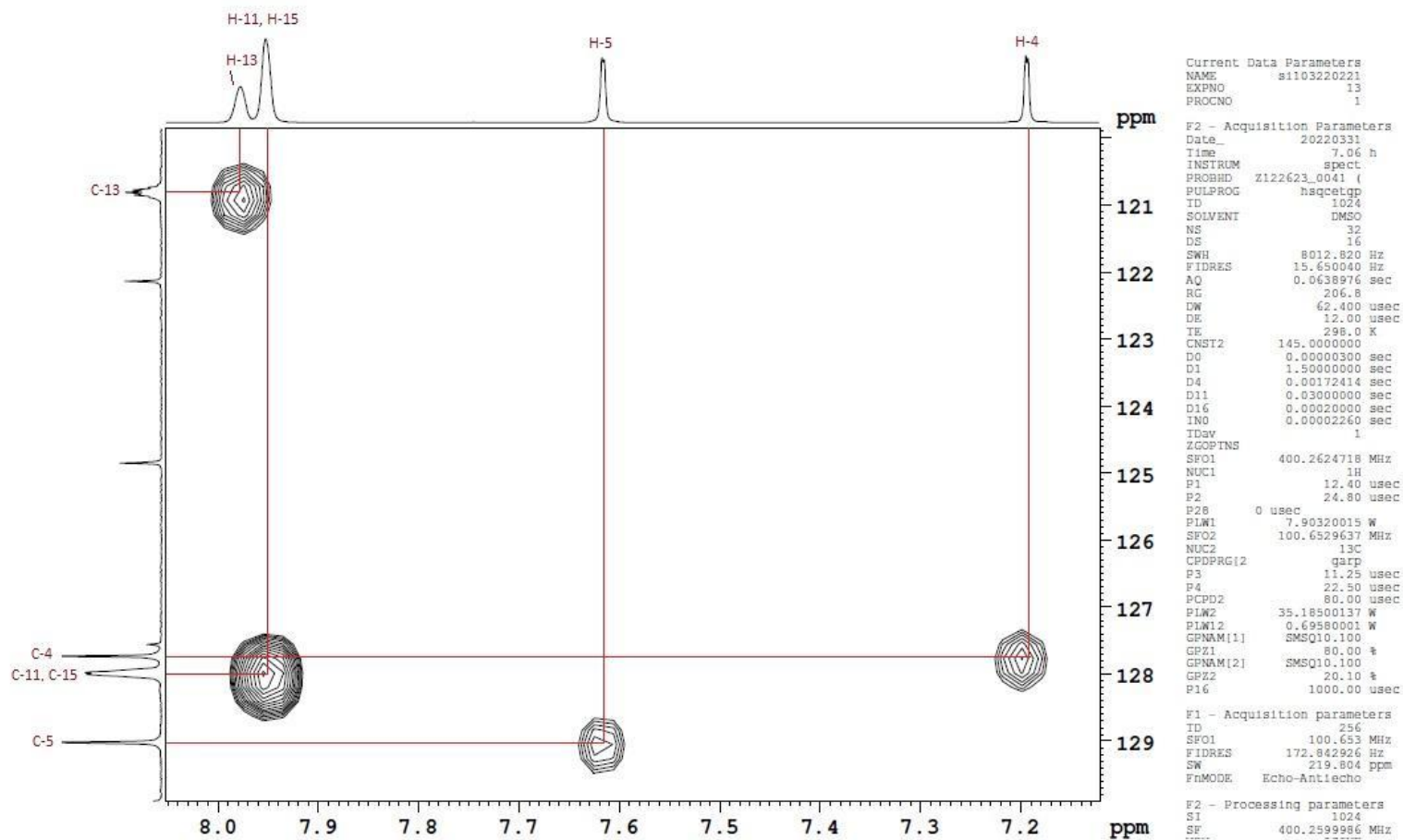
Espectro 210: Espectro de RMN ¹³C (100 MHz; DMSO-d₆) do derivado **22**.



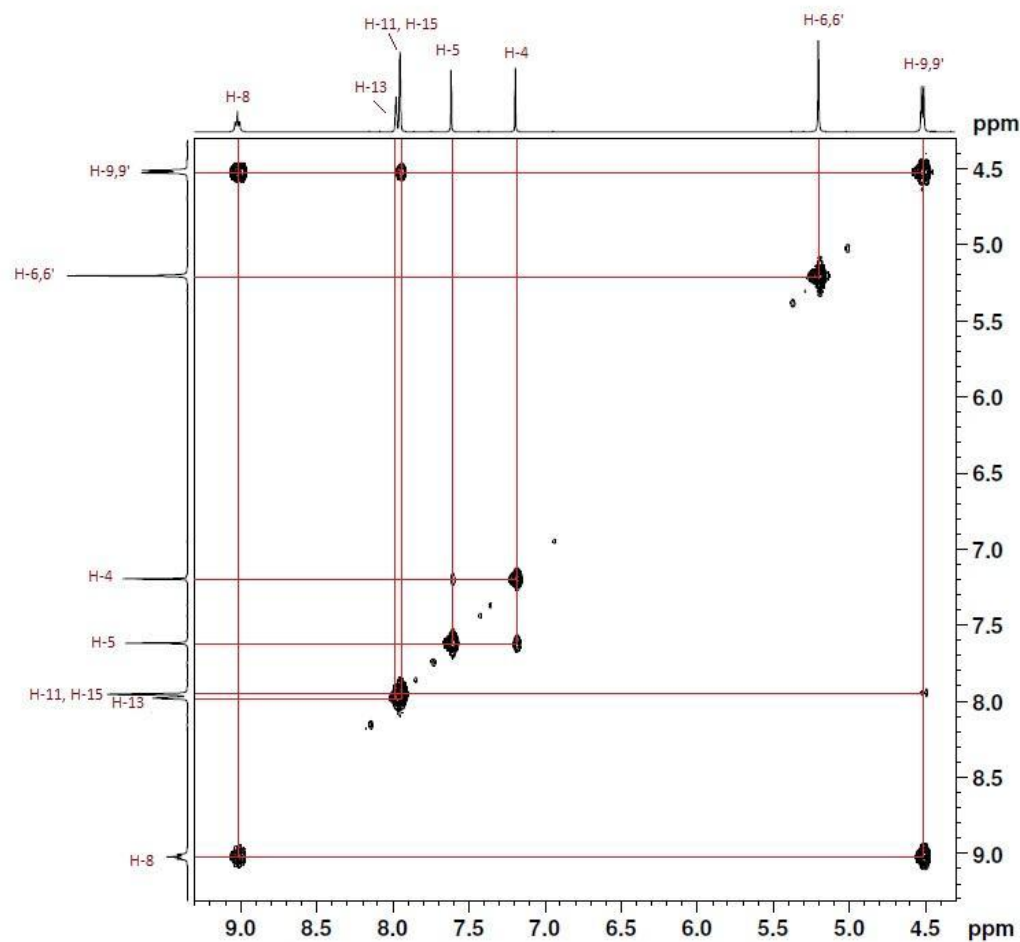
Espectro 211: Espectro de RMN ^{19}F (377 MHz; DMSO- d_6) do derivado **22**.



Espectro 212: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 22.



Espectro 213: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 22.



```

Current Data Parameters
NAME      sil03220221
EXPNO     12
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20220401
Time      3.30 h
INSTRUM   spect
PROBHD    z122623_0041 (
PULPROG   cosygpgpf
ID         2048
SOLVENT    DMSO
NS         32
DS         8
SWH        5597.015 Hz
FIDRES     5.465835 Hz
AQ         0.1829547 sec
RG         66.74
DW         89.333 usec
DE         12.00 usec
TE         298.0 K
D0         0.00000300 sec
D1         1.50000000 sec
D13        0.00000400 sec
D16        0.00020000 sec
IN0        0.00017860 sec
IDAV       1
SFO1       400.2624016 MHz
NUC1       1H
P0         12.40 usec
P1         12.40 usec
PLW1       7.90320015 W
GPNAM[1]   SMSQ10.100
GPZ1       10.00 %
P16        1000.00 usec

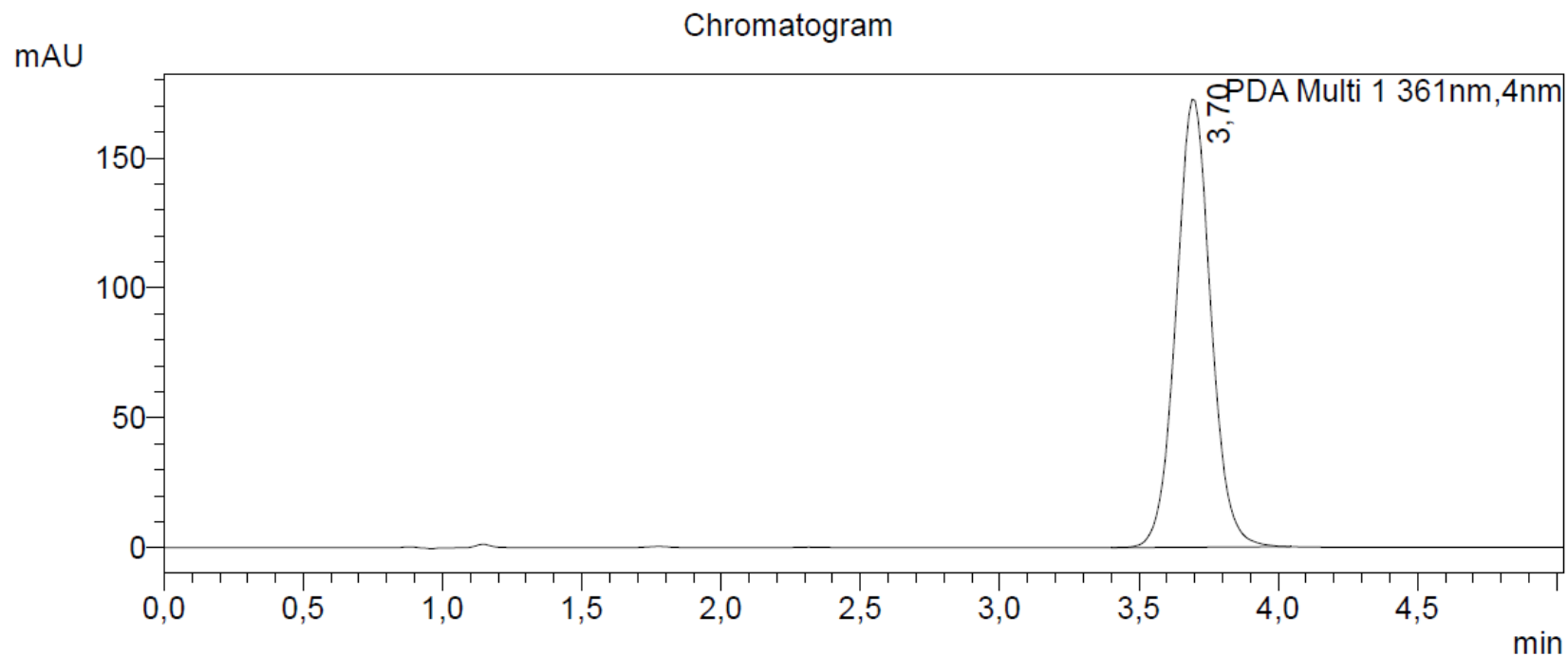
F1 - Acquisition parameters
ID         256
SFO1       400.2624 MHz
FIDRES     43.743000 Hz
SW         13.989 ppm
FnMODE     QF

F2 - Processing parameters
SI         2048
SF         400.2600000 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         0.60

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        QF
SF         400.2600000 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0

```

Espectro 214: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 22.



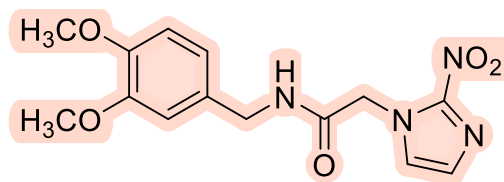
Peak Table

PDA Ch1 361nm

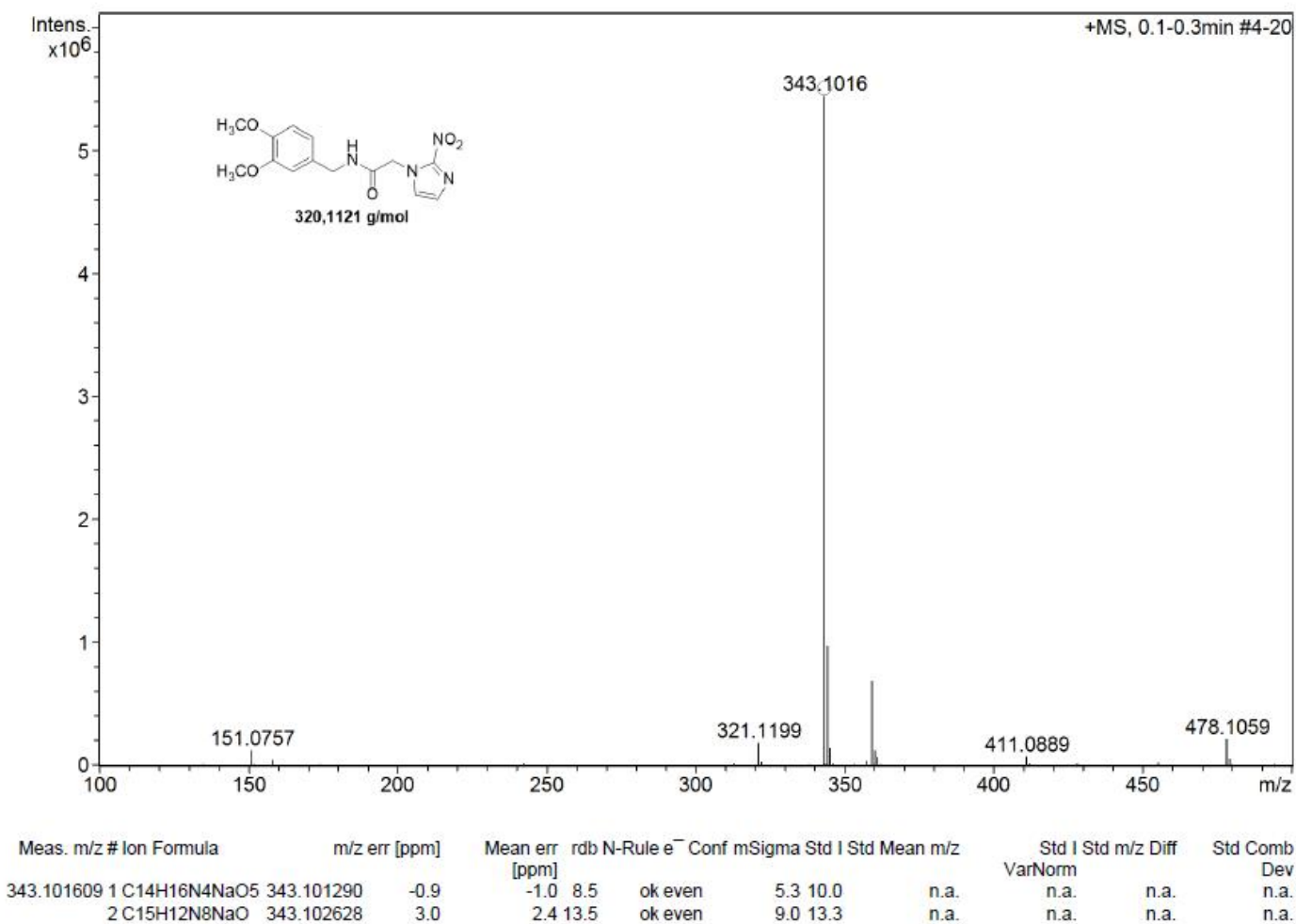
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	3,70		1495720	100,0	25090	1,048	--	--
Total			1495720	100,0				

Cromatograma 22: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **22**.

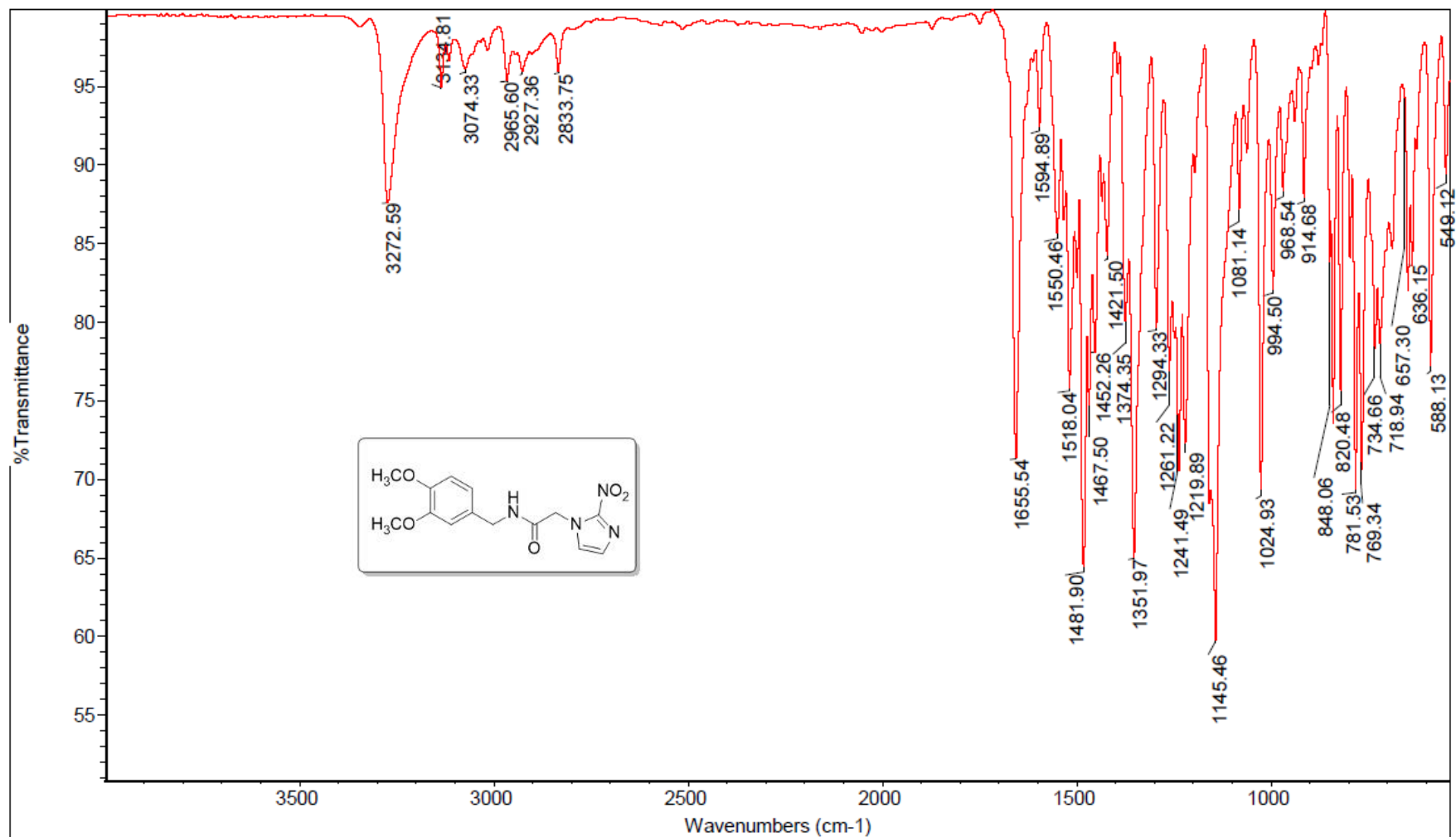
N-(3,4-dimetoxibenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (23)



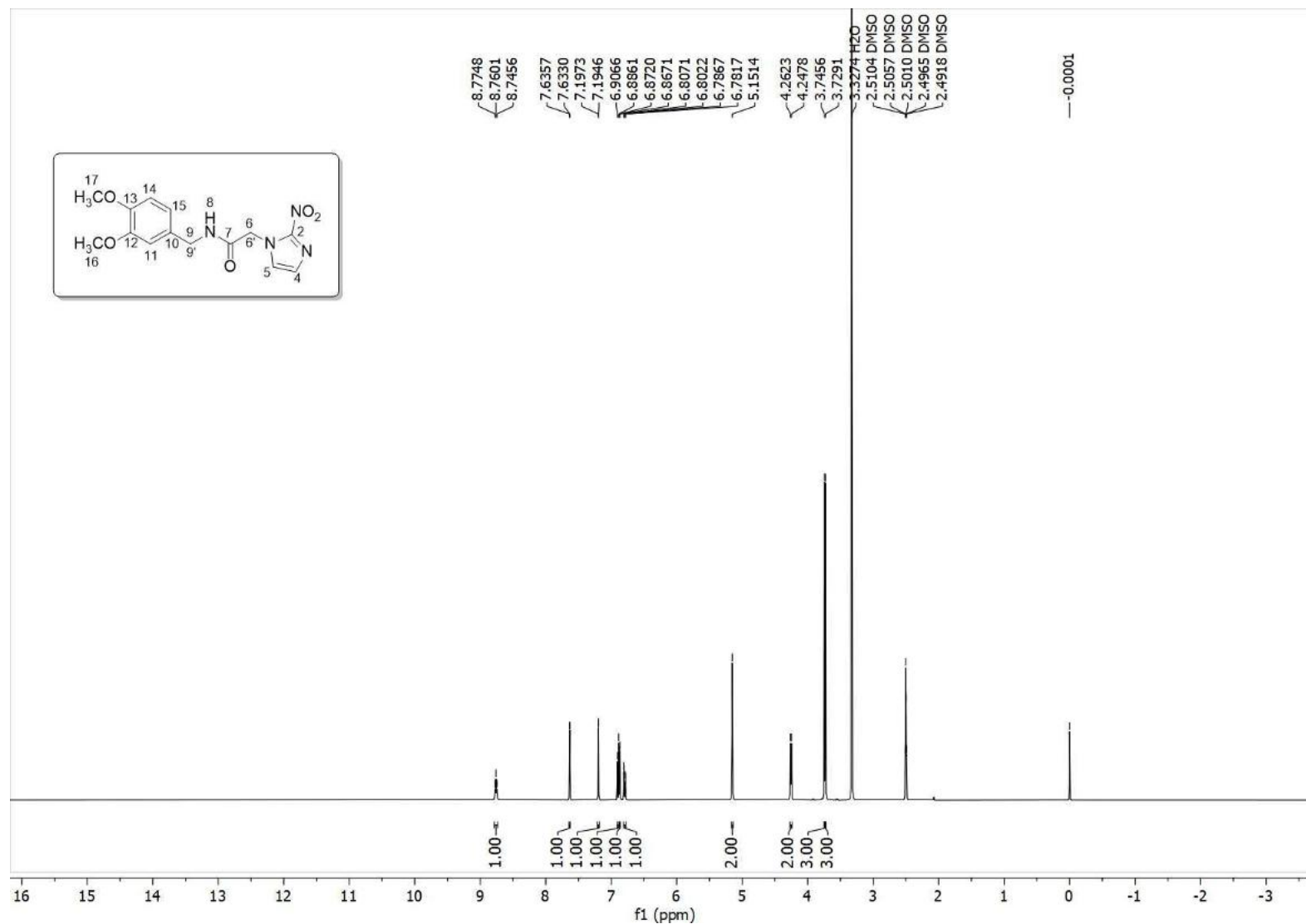
+MS, 0.1-0.3min #4-20



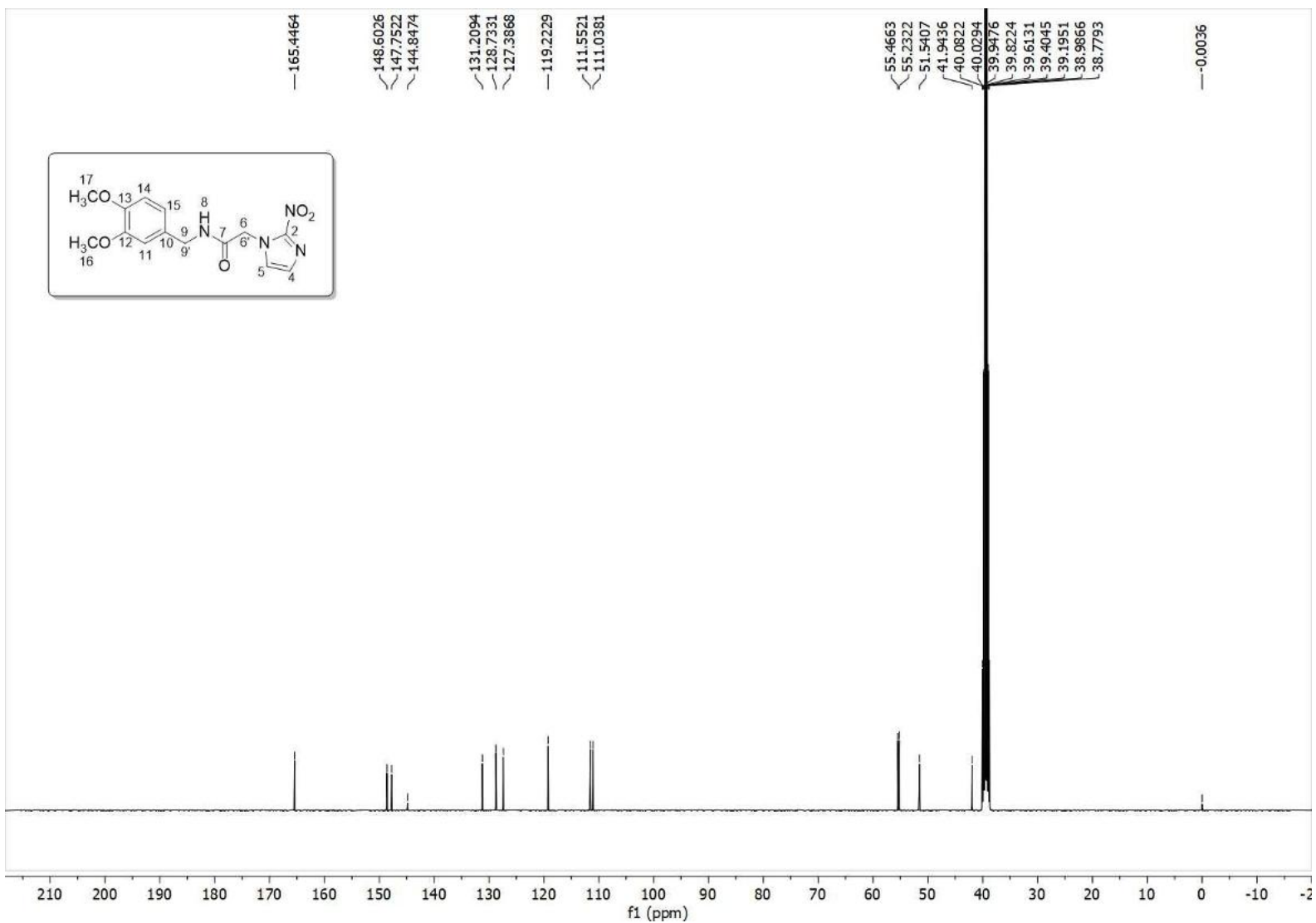
Espectro 215: Espectro de massas de alta resolução do derivado **23**.



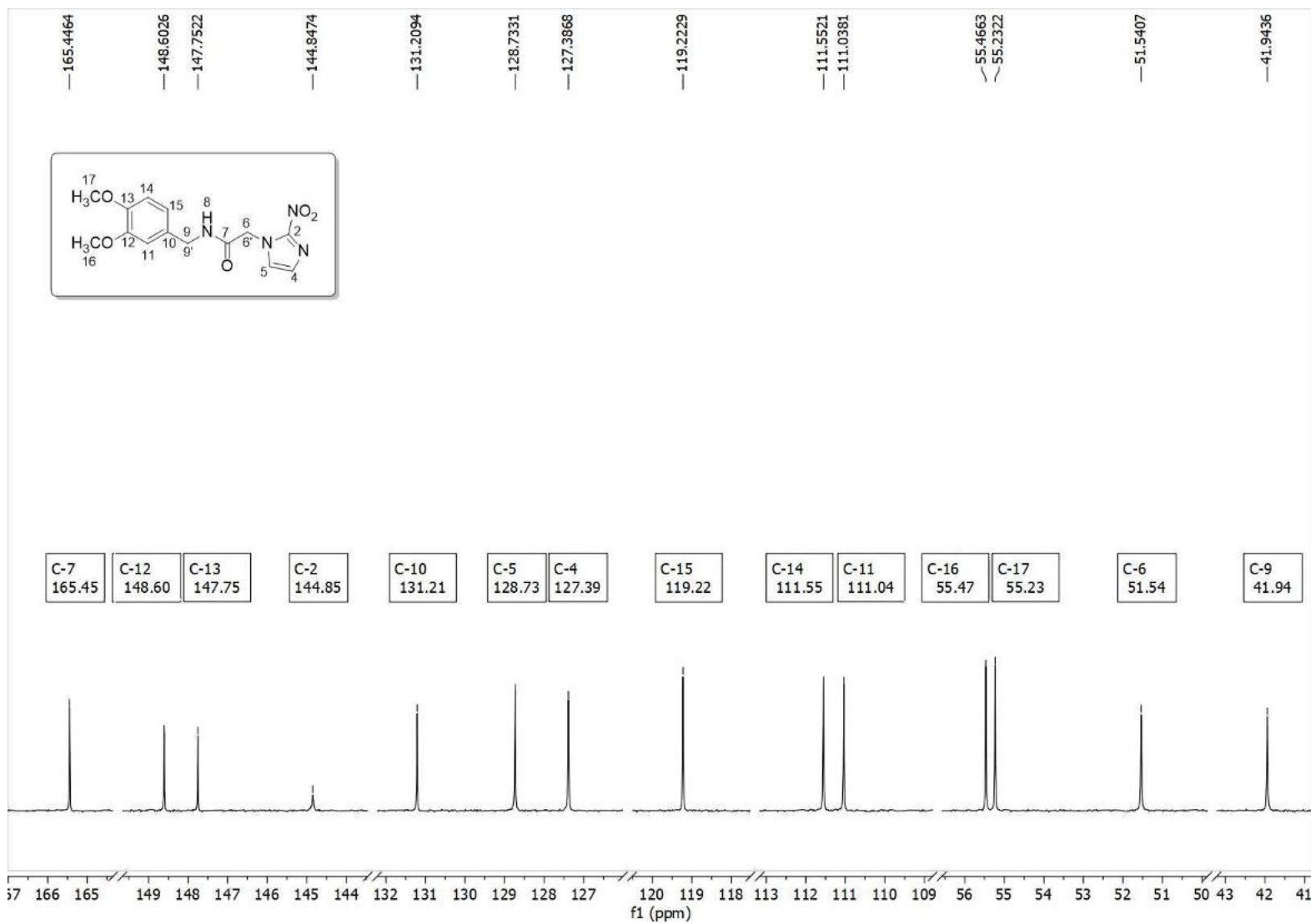
Espectro 216: Espectro de infravermelho do derivado **23**.



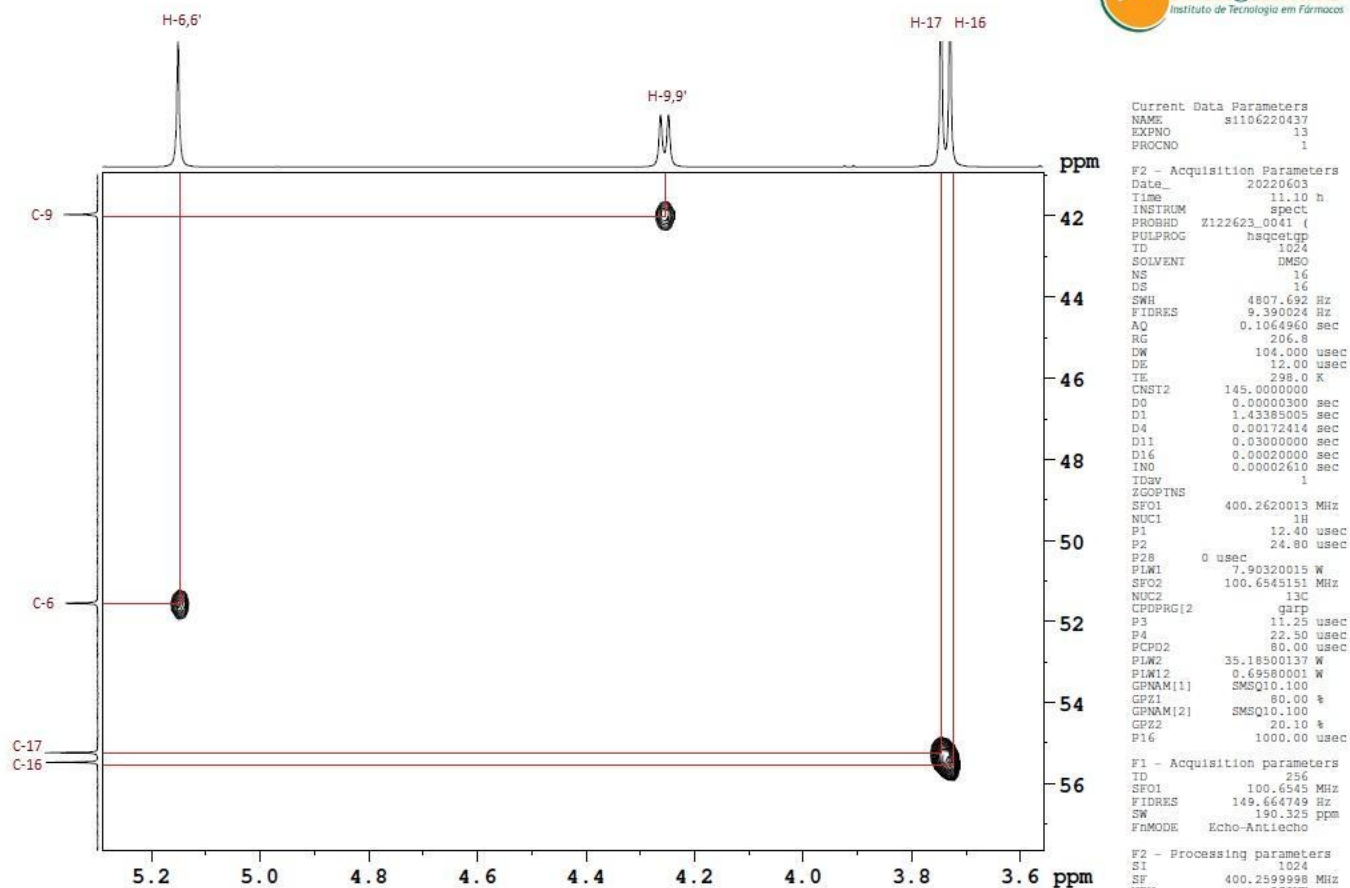
Espectro 217: Espectro de RMN ¹H (400 MHz; DMSO-d₆) do derivado **23**.



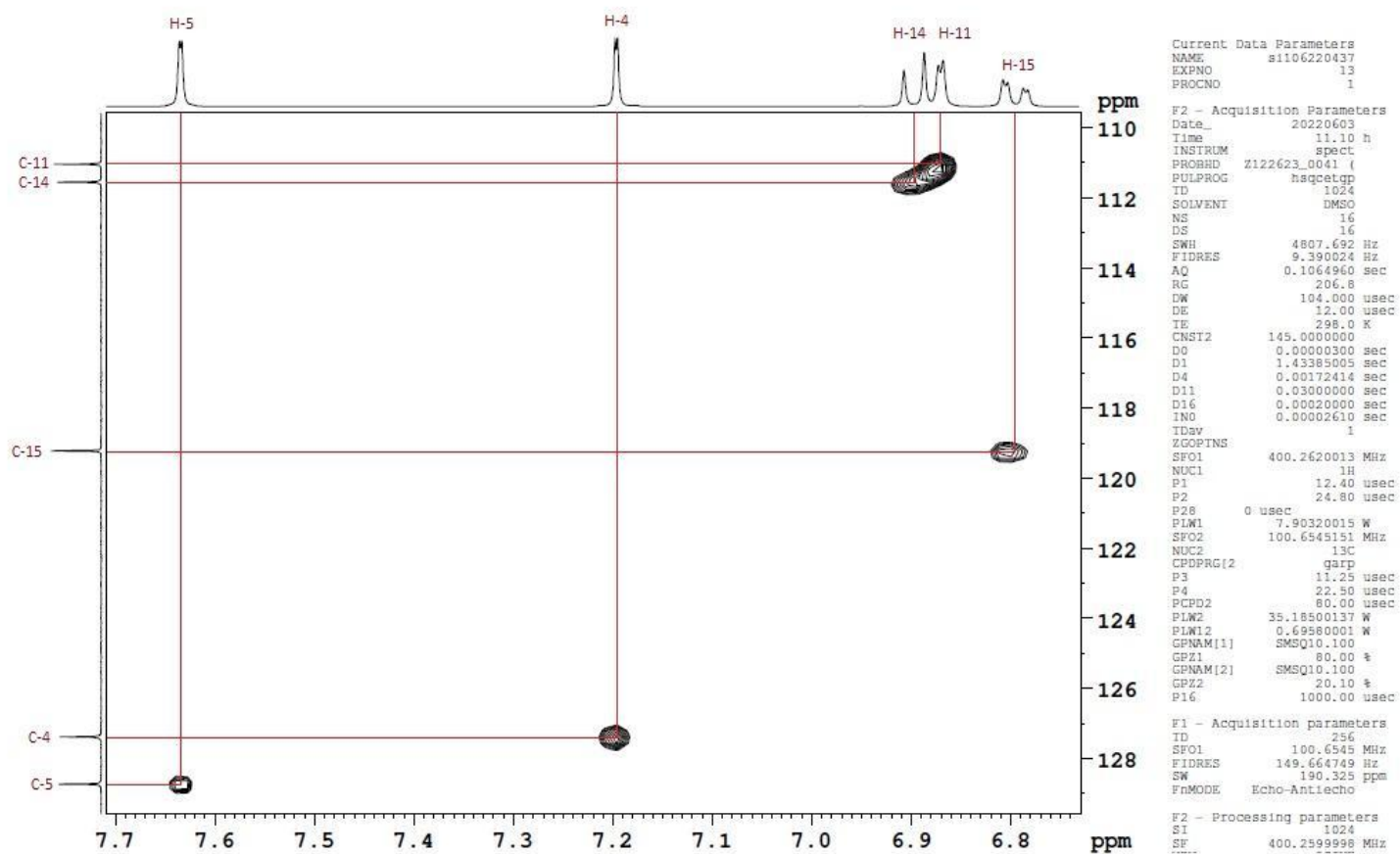
Espectro 219: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **23**.



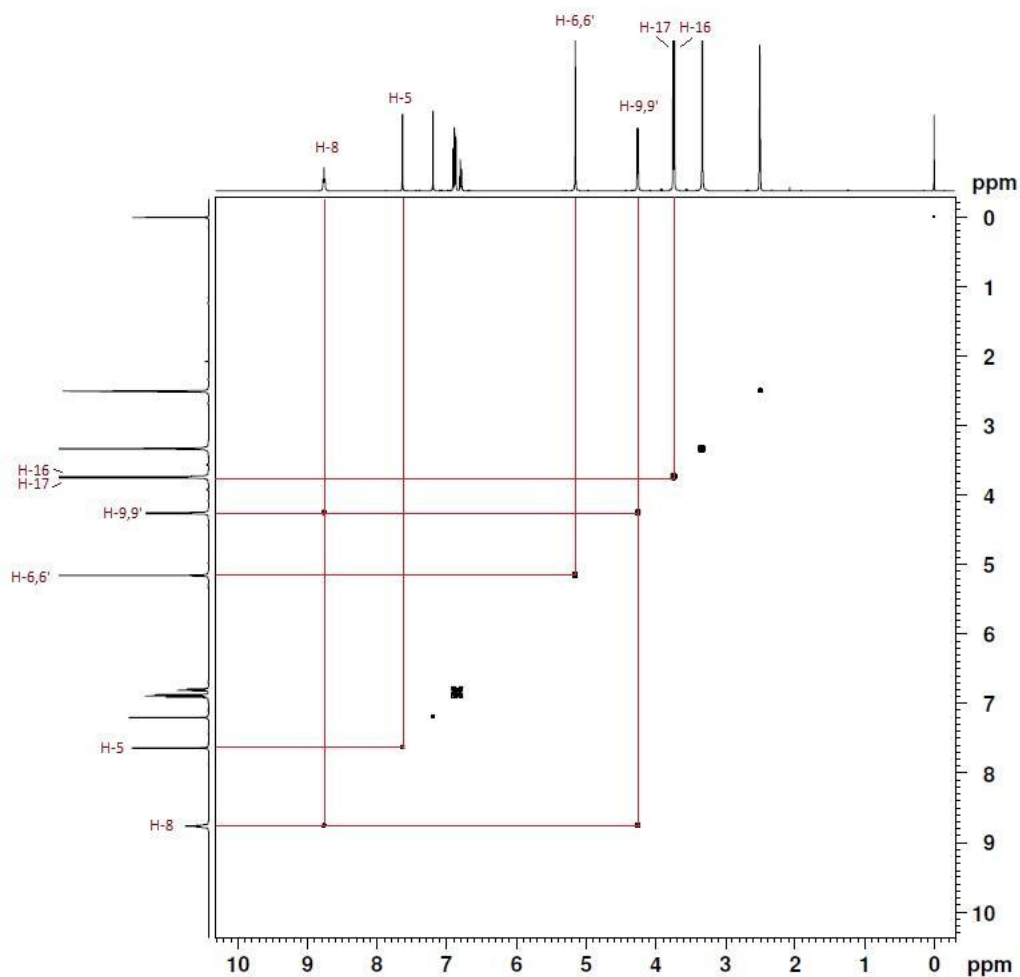
Espectro 220: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **23**.



Espectro 221: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado **23**.



Espectro 222: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado **23**.



Current Data Parameters
NAME sil06220437
EXPNO 12
PROCNO 1

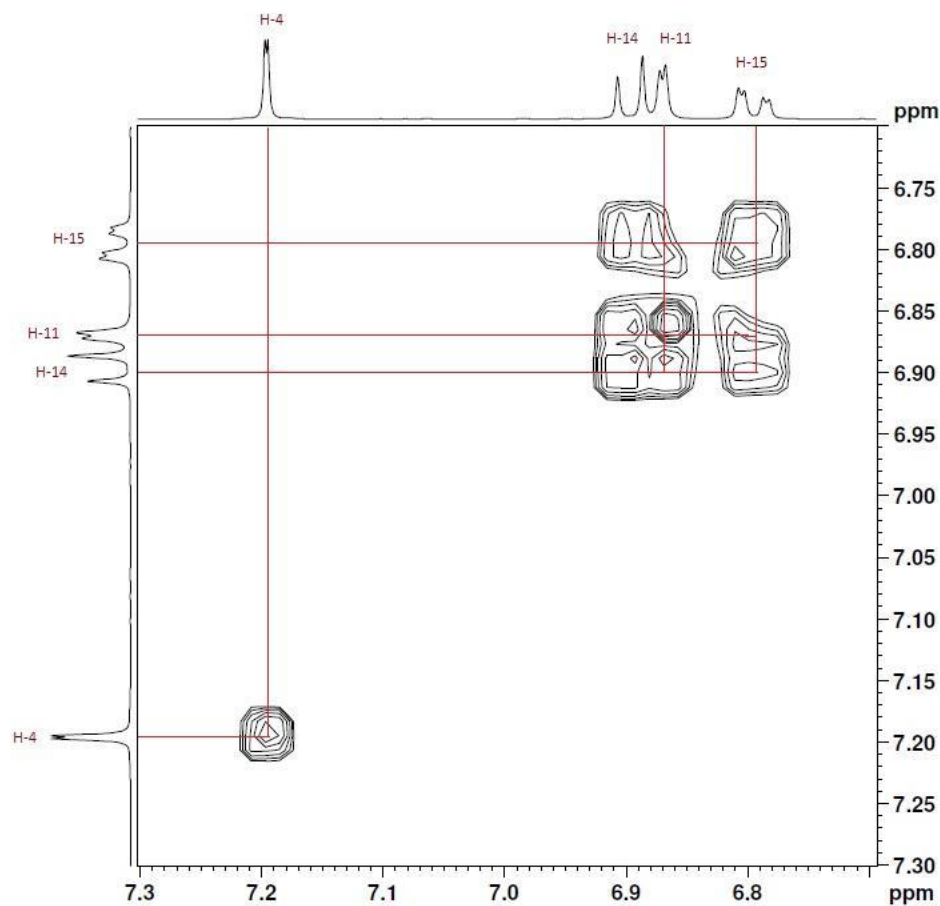
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20220605
Time 17.44 h
INSTRUM spect
PROBHD Z122623_0041 (4
PULPROG cosygpppqf
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 8
SWH 4807.692 Hz
FIDRES 4.695012 Hz
AQ 0.2129920 sec
RG 66.74
DM 104.000 usec
DE 12.00 usec
TE 298.0 K
D0 0.0000300 sec
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00002000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
IM0 0.00020800 sec
TDAV 1
SFO1 400.2622014 MHz
NUC1 1H
P0 12.40 usec
P1 12.40 usec
P17 2500.00 usec
PLW1 7.90320015 W
PLW10 1.35020006 W
CPHAM[1] SMSQ10.100
GPA1 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 128
SFO1 400.2622 MHz
FIDRES 75.120193 Hz
SW 12.011 ppm
PRMODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.2599965 MHz
WDW 0
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 400.2599963 MHz
WDW 0
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Espectro 223: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado **23**.



Current Data Parameters
NAME si106220437
EXPNO 12
PROCNO 1

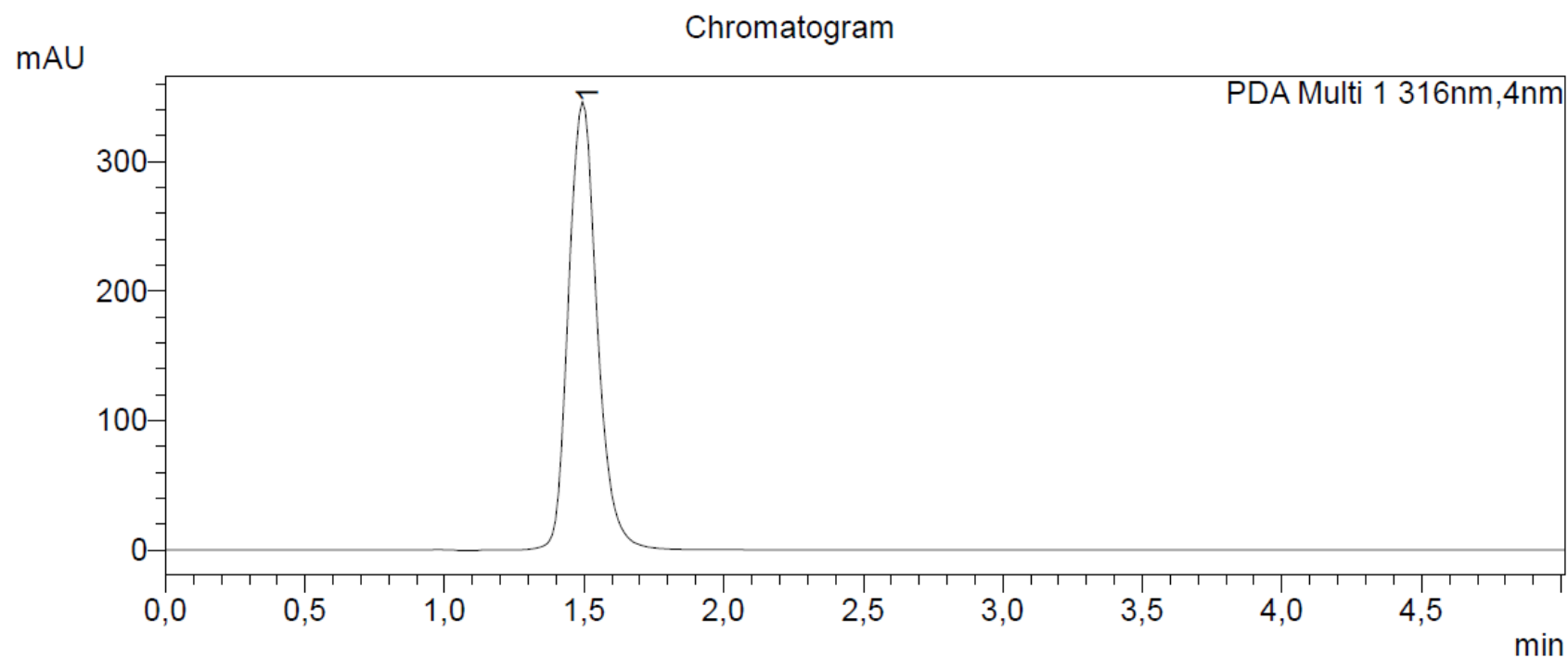
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20220605
Time 17.44 h
INSTRUM spect
PROBHD Z122623_0041 (cosypppqf)
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 8
SWH 4807.692 Hz
FIDRES 4.695012 Hz
AQ 0.2129920 sec
RG 66.74
DW 104.000 usec
DE 12.00 usec
TE 298.0 K
D0 0.00000300 sec
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00002000 sec
D13 0.00004000 sec
D16 0.00020000 sec
INO 0.00020800 sec
TDav 1
SFO1 400.2622014 MHz
NUC1 1H
P0 12.40 usec
P1 12.40 usec
P17 2500.00 usec
PLM1 7.90320015 W
PLM10 1.35020006 W
CPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 128
SFO1 400.2622 MHz
FIDRES 75.120193 Hz
SW 12.011 ppm
PRMODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.2599965 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 400.2599963 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Espectro 224: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado **23**.



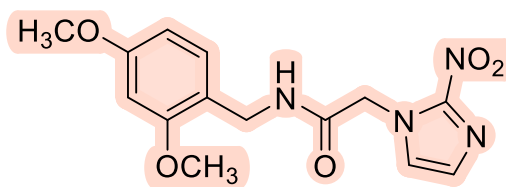
Peak Table

PDA Ch1 316nm

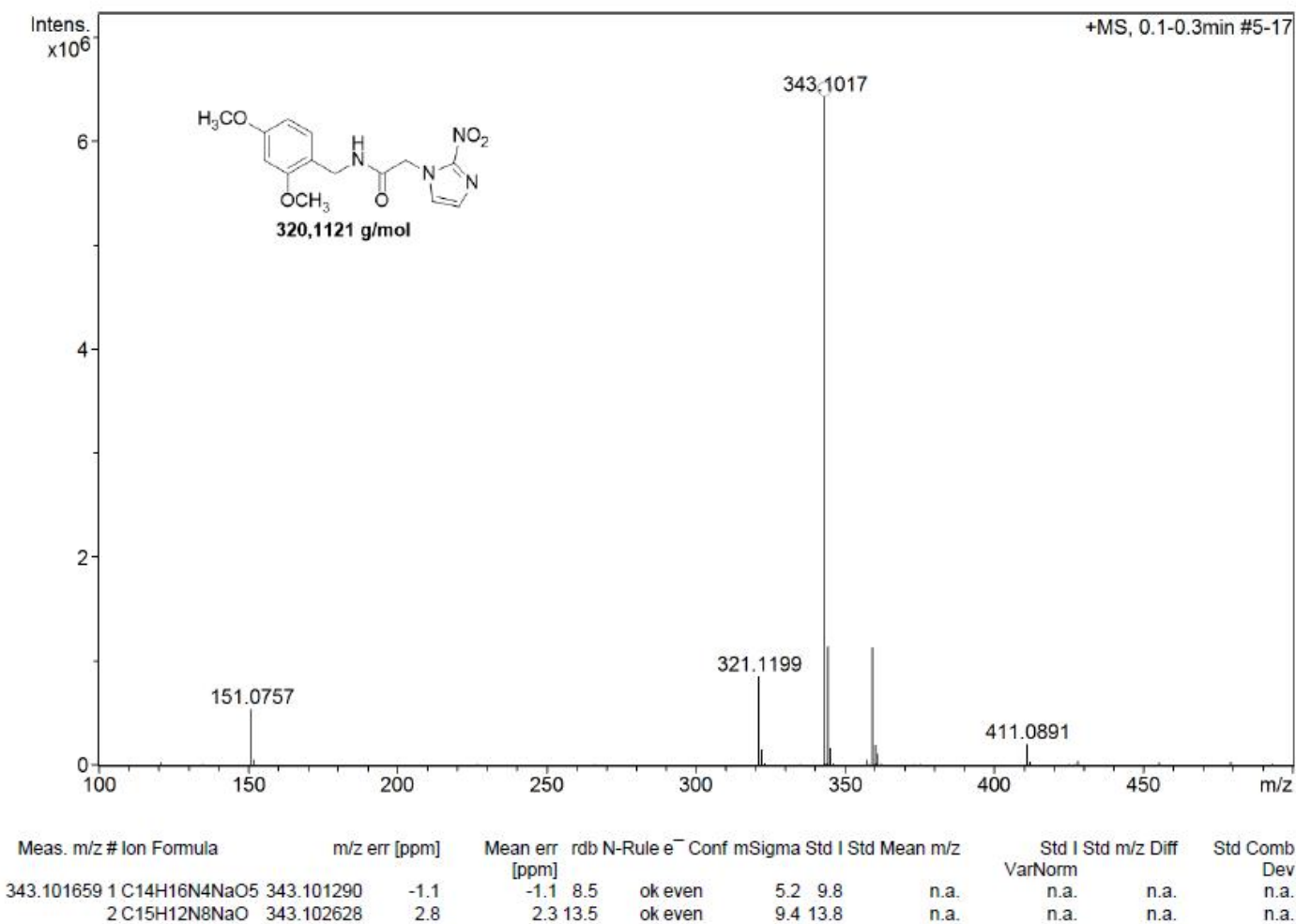
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,49		2460174	100,0	5832	1,178	--	--
Total			2460174	100,0				

Cromatograma 23: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **23**.

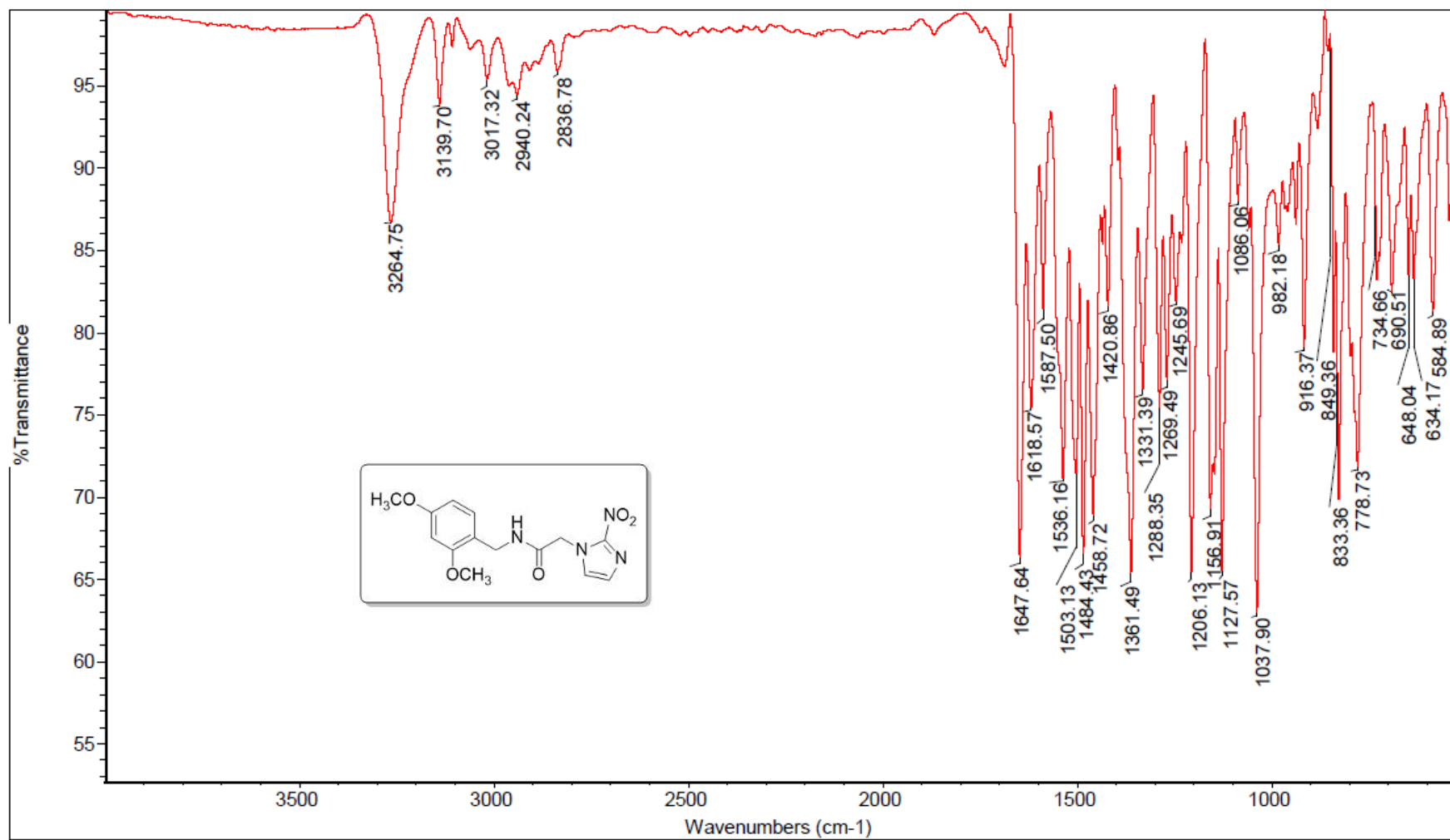
N-(2,4-dimetoxibenzil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (24)



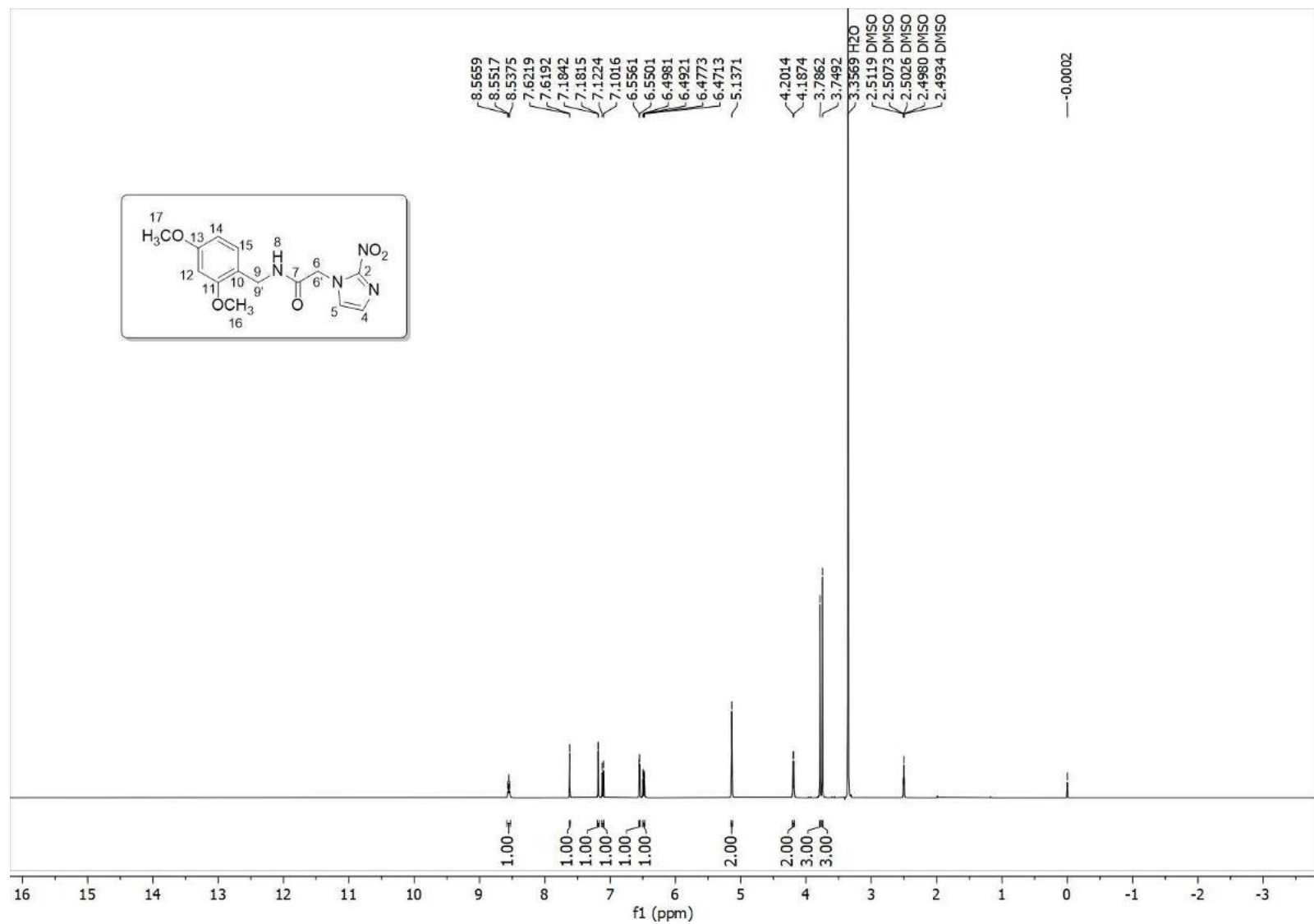
+MS, 0.1-0.3min #5-17



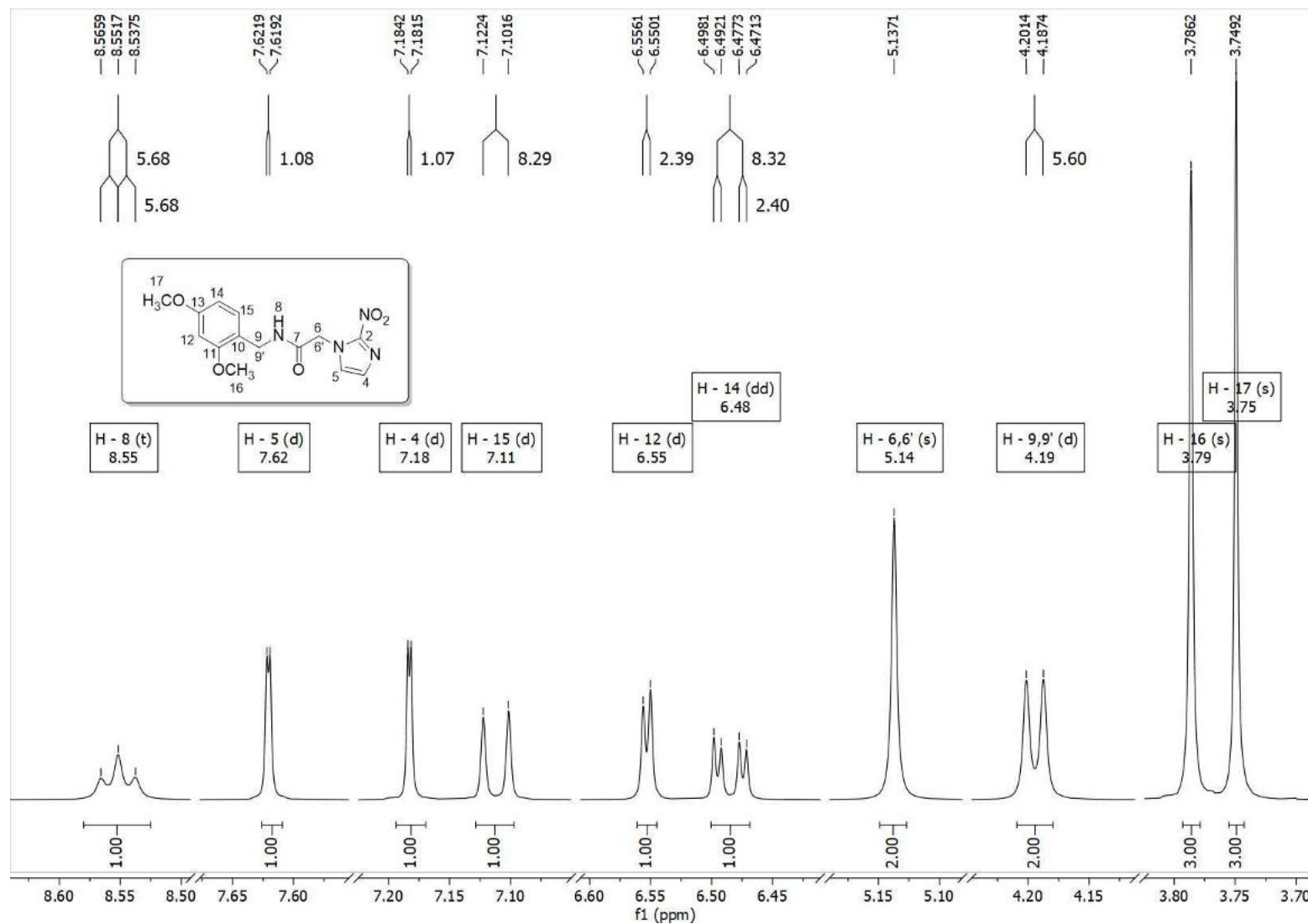
Espectro 225: Espectro de massas de alta resolução do derivado 24.



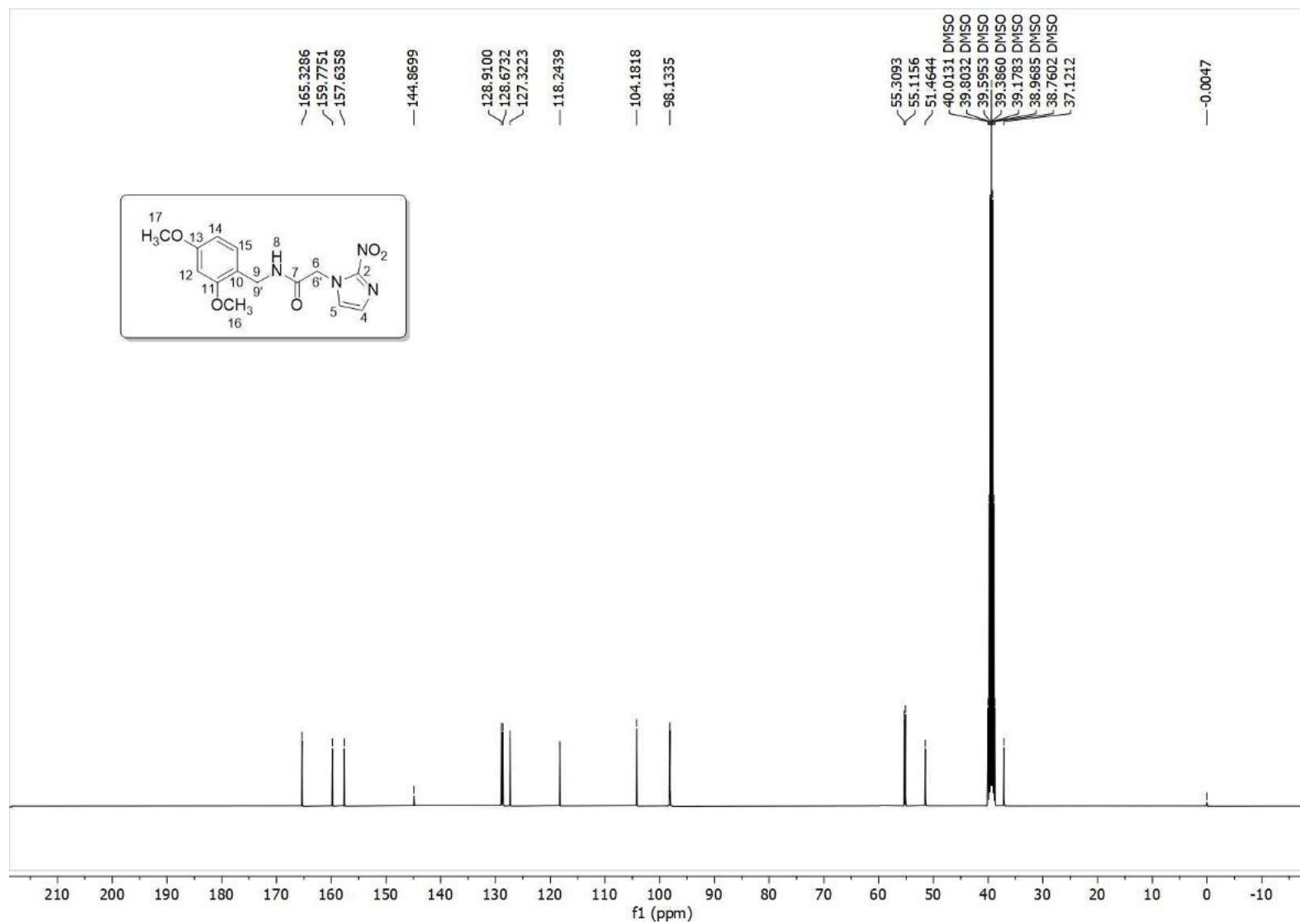
Espectro 226: Espectro de infravermelho do derivado **24**.



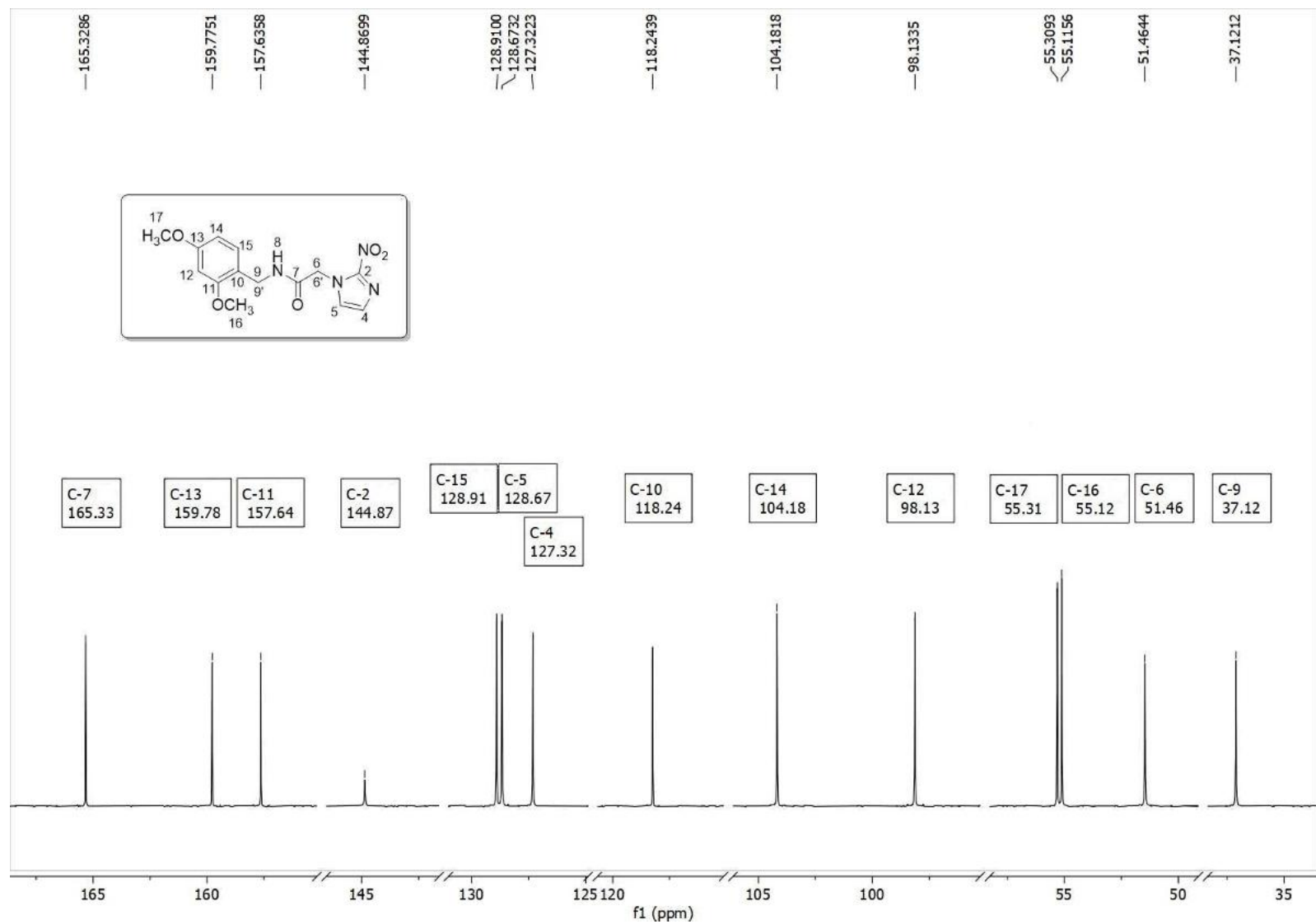
Espectro 227: Espectro de RMN ¹H (400 MHz; DMSO-d₆) do derivado **24**.



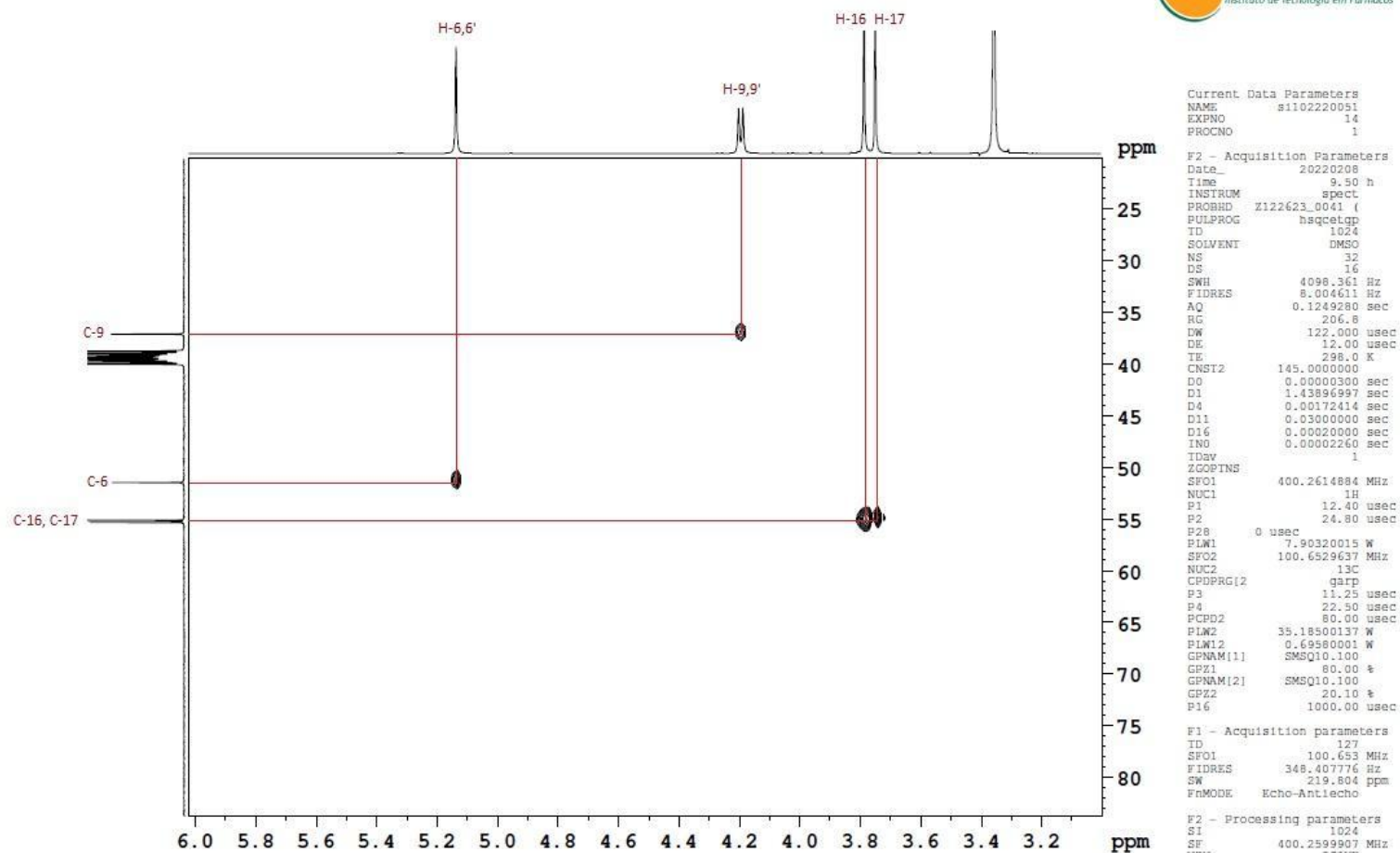
Espectro 228: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **24**.



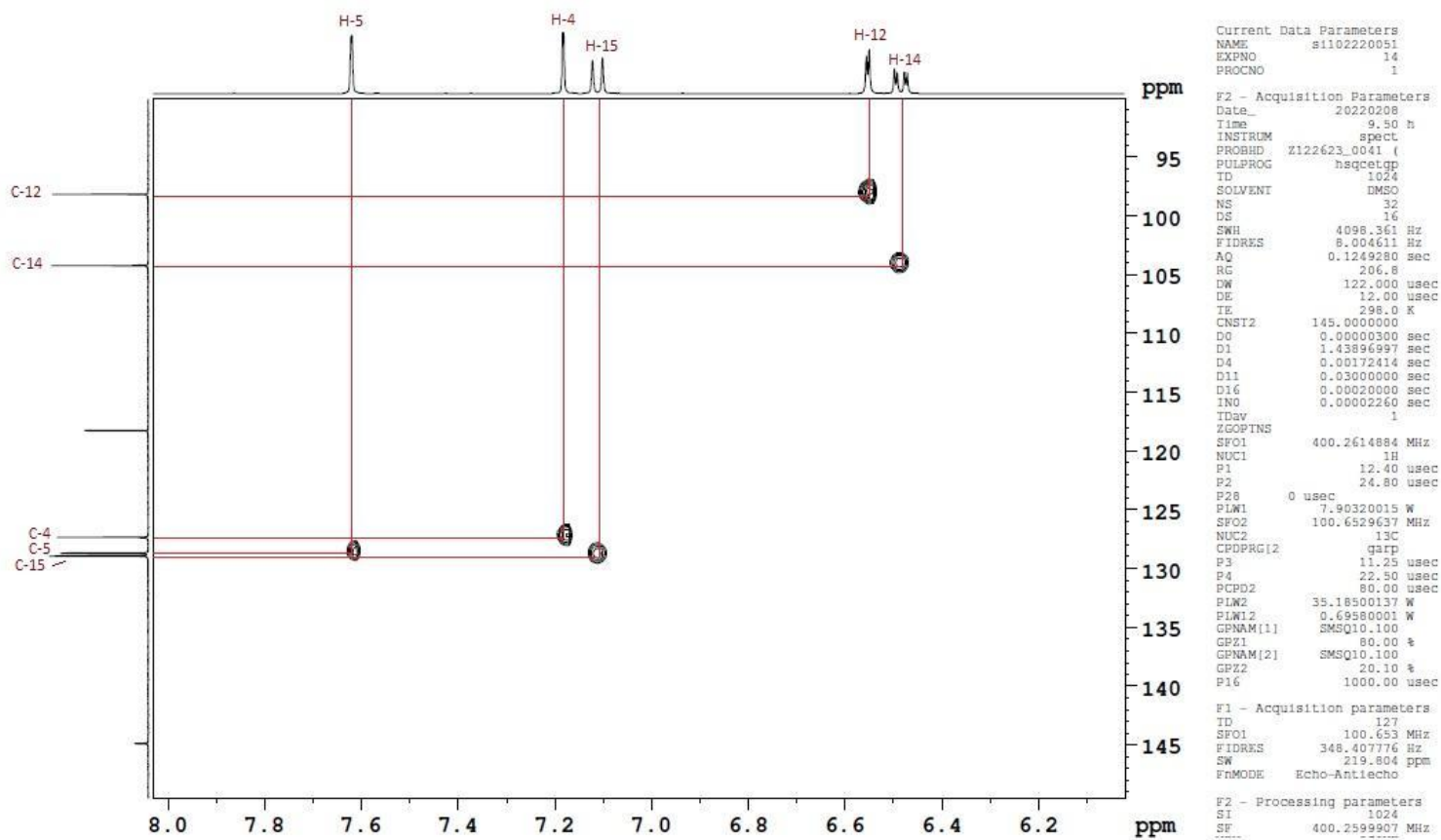
Espectro 229: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **24**.



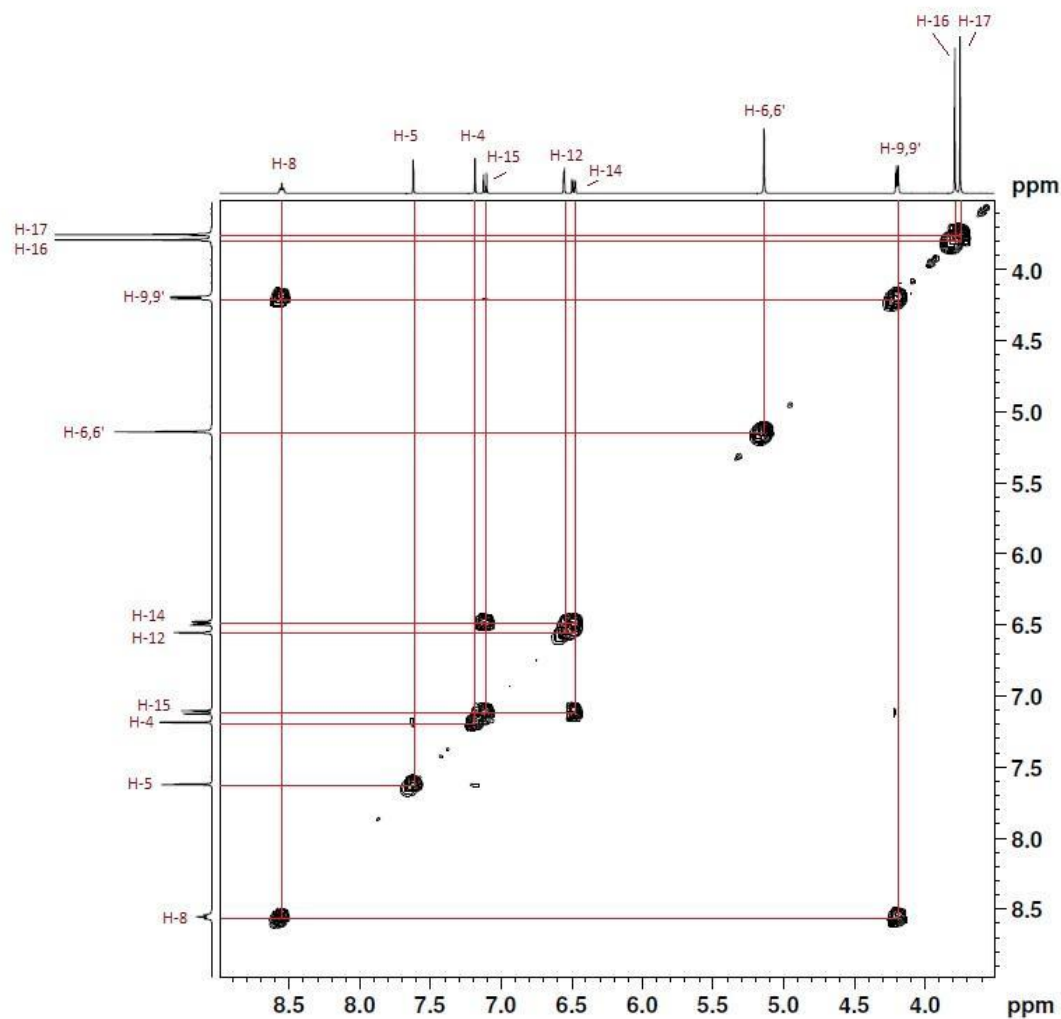
Espectro 230: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **24**.



Espectro 231: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado **24**.



Espectro 232: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 24.



Current Data Parameters
NAME sil02220051
EXPNO 12
PROCNO 1

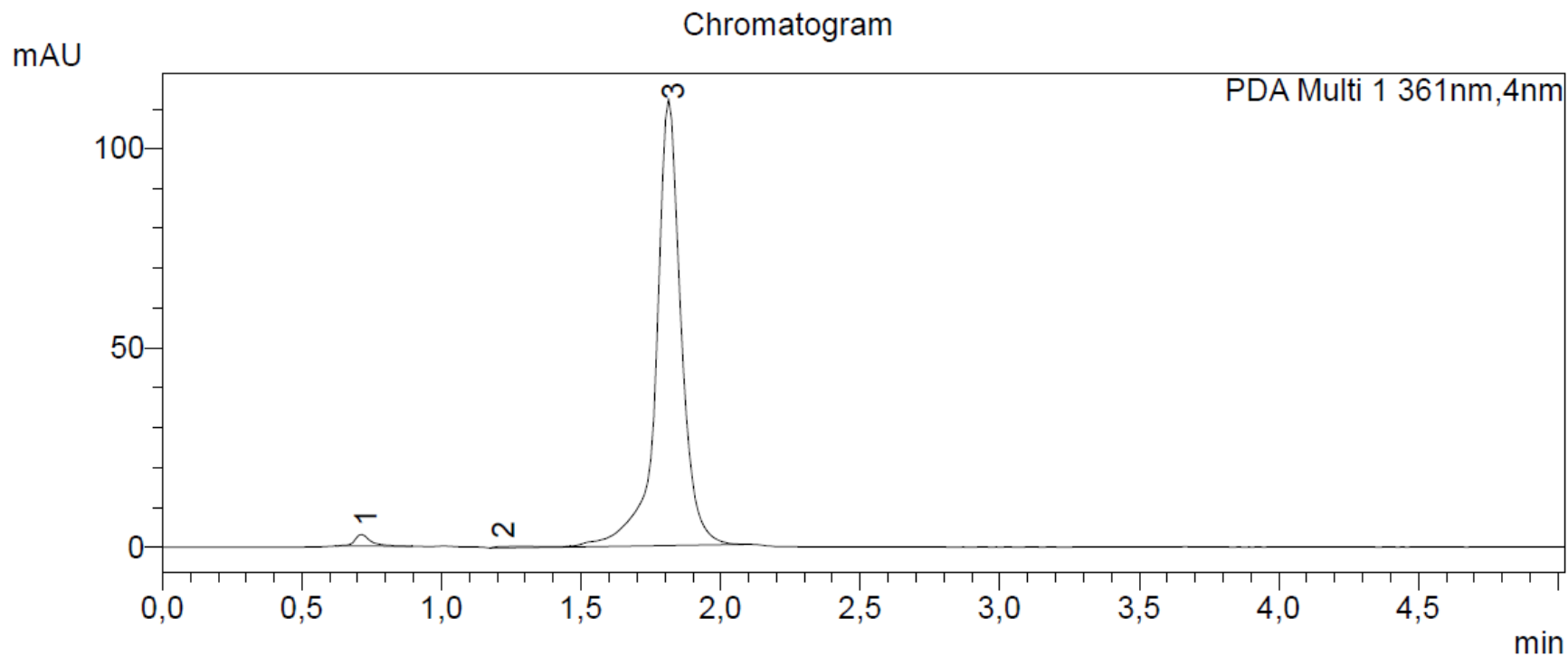
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20220203
Time 22.20 h
INSTRUM spect
PROBHD Z122623_0041 (f
PULPROG cosygpppqf
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 32
DS 8
SWH 4807.692 Hz
FIDRES 4.695012 Hz
AQ 0.2129920 sec
RG 66.74
DW 104.000 usec
DE 12.00 usec
TE 298.0 K
D0 0.00000300 sec
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00002000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
TNO 0.00020800 sec
TDAV 1
SFO1 400.2622014 MHz
NUC1 1H
P0 12.40 usec
P1 12.40 usec
P17 2500.00 usec
PLW1 7.90320015 W
PLW10 1.35020006 W
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 128
SFO1 400.2622 MHz
FIDRES 75.120193 Hz
SW 12.011 ppm
F2MODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.2599838 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 400.2599836 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Espectro 233: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 24.

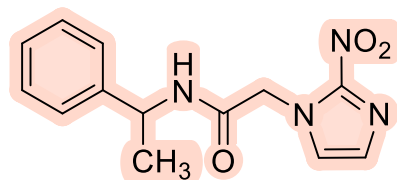


Peak Table

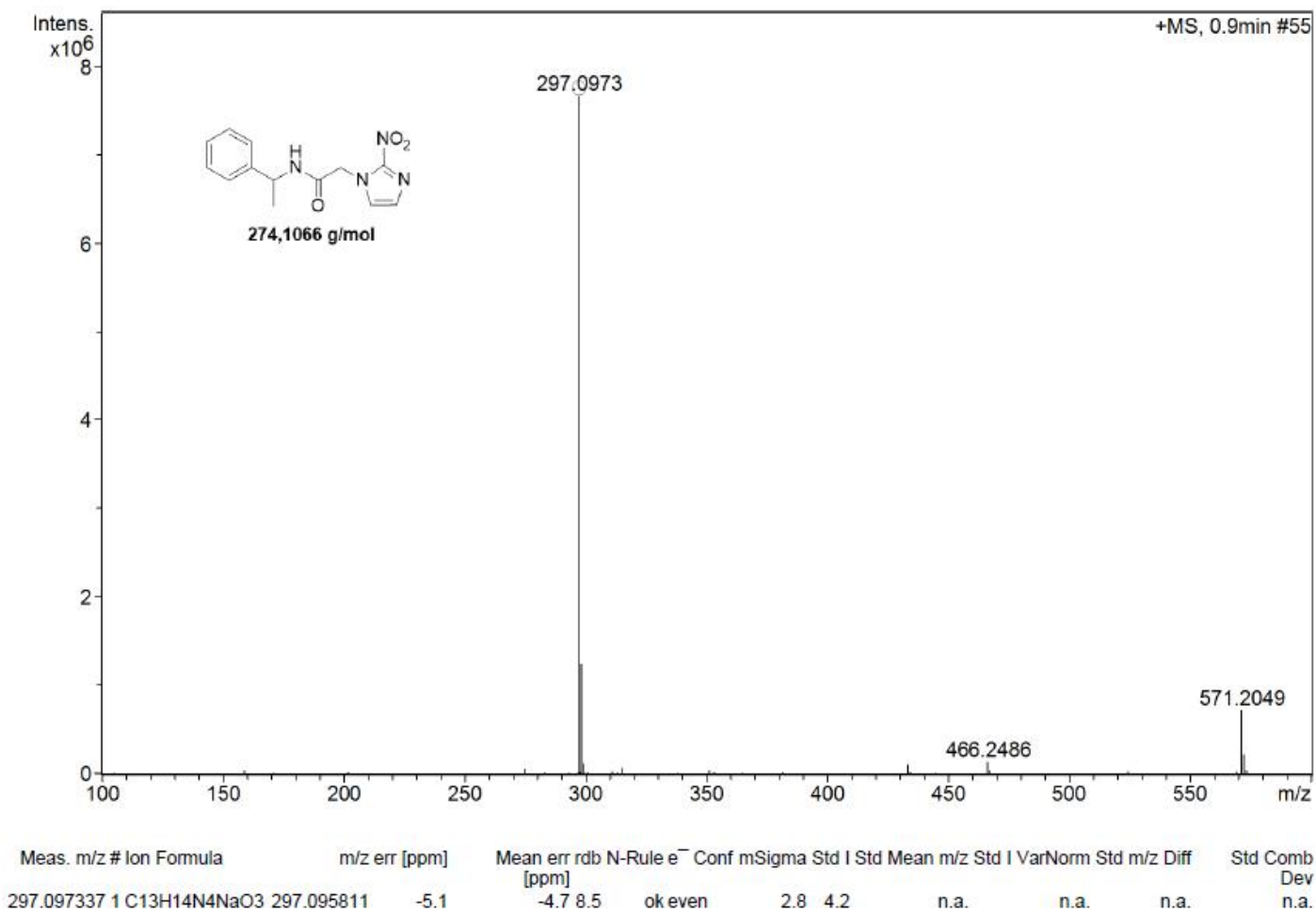
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	0,71		11571	1,6	4986	1,321	--	--
2	1,21		4033	0,6	2711	--	2,869	0,691
3	1,81		697855	97,8	12142	0,895	2,972	1,544
Total			713459	100,0				

Cromatograma 24: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **24**.

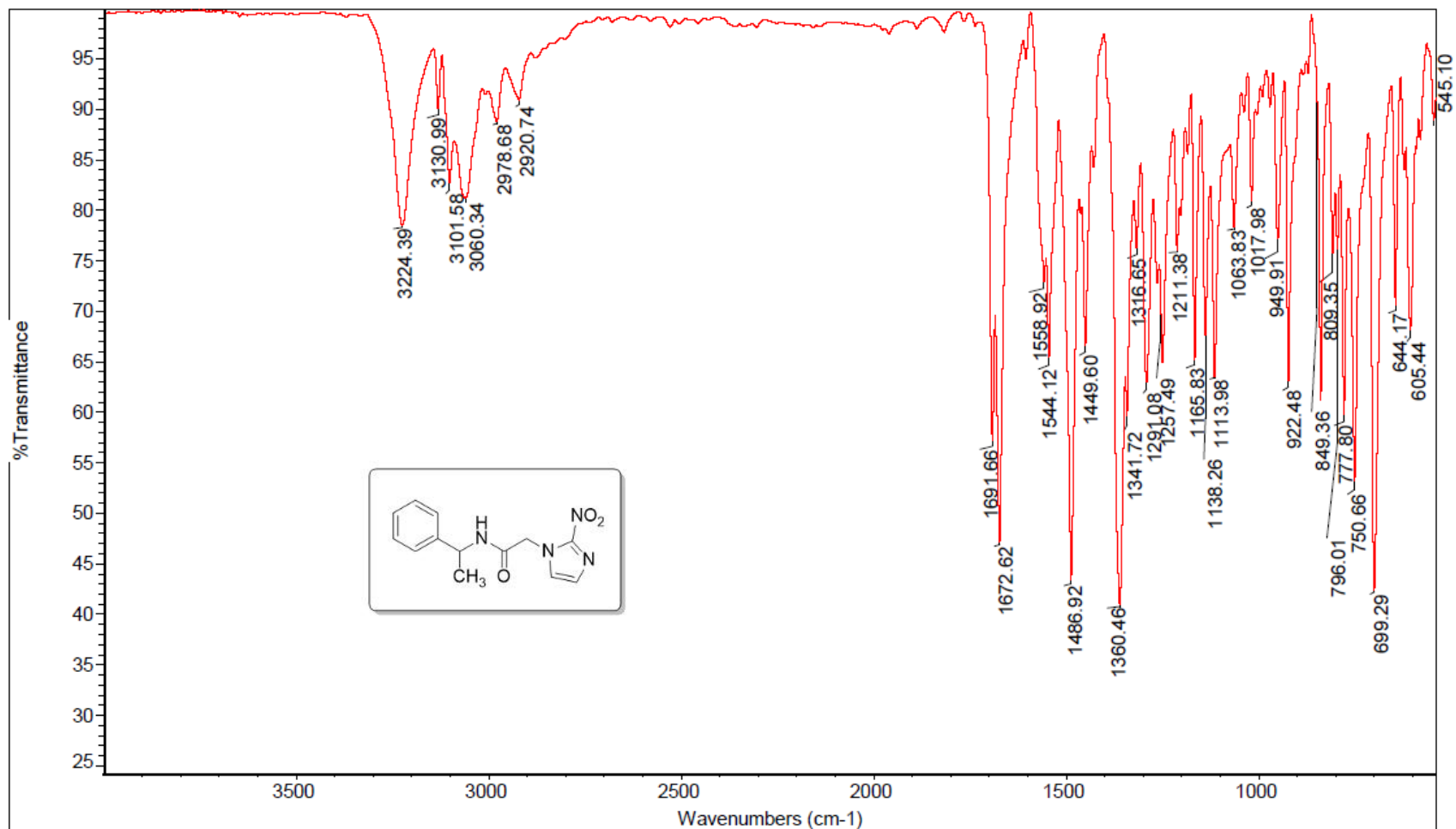
2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-N-(1-feniletil)acetamida (25)



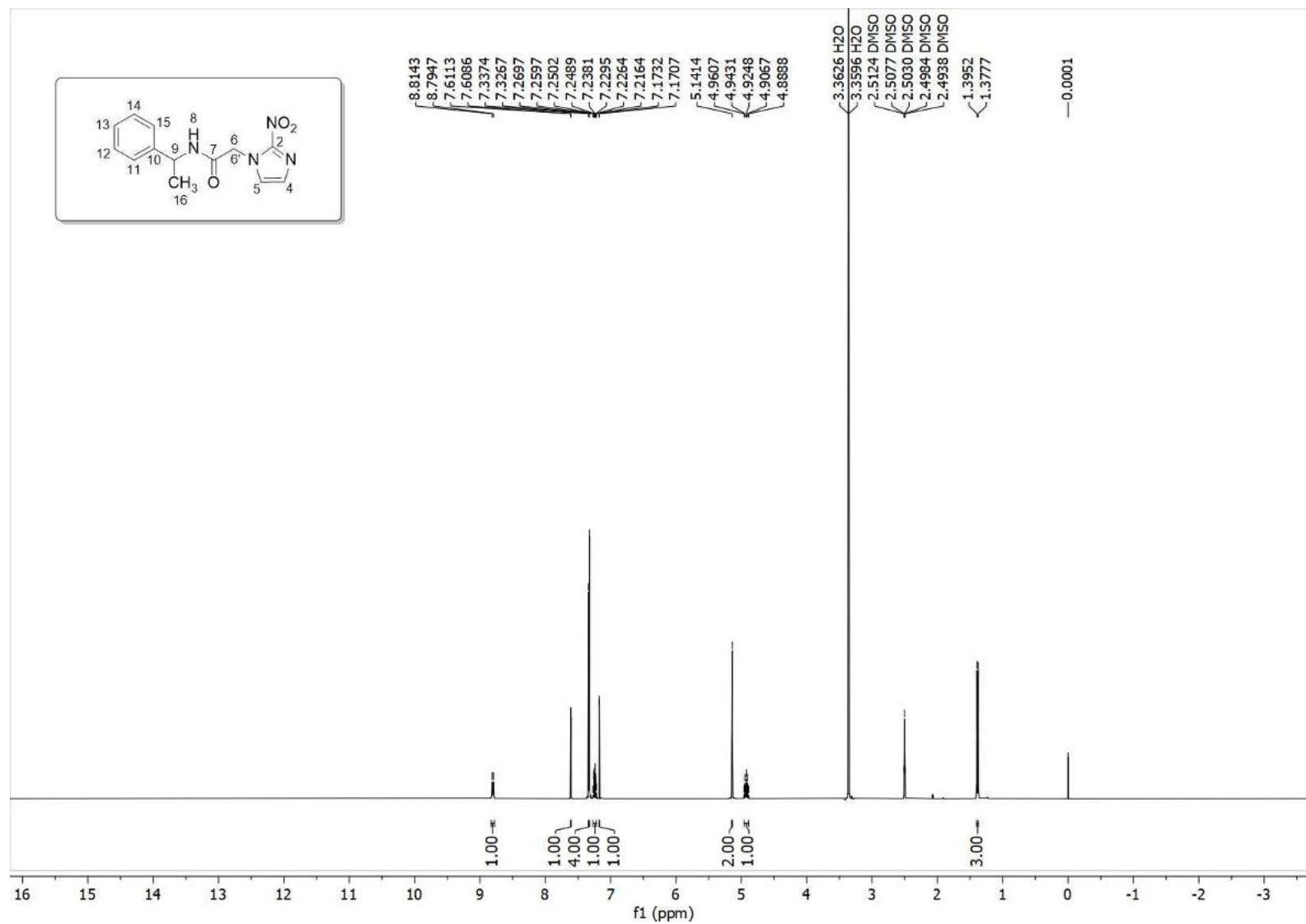
+MS, 0.9min #55



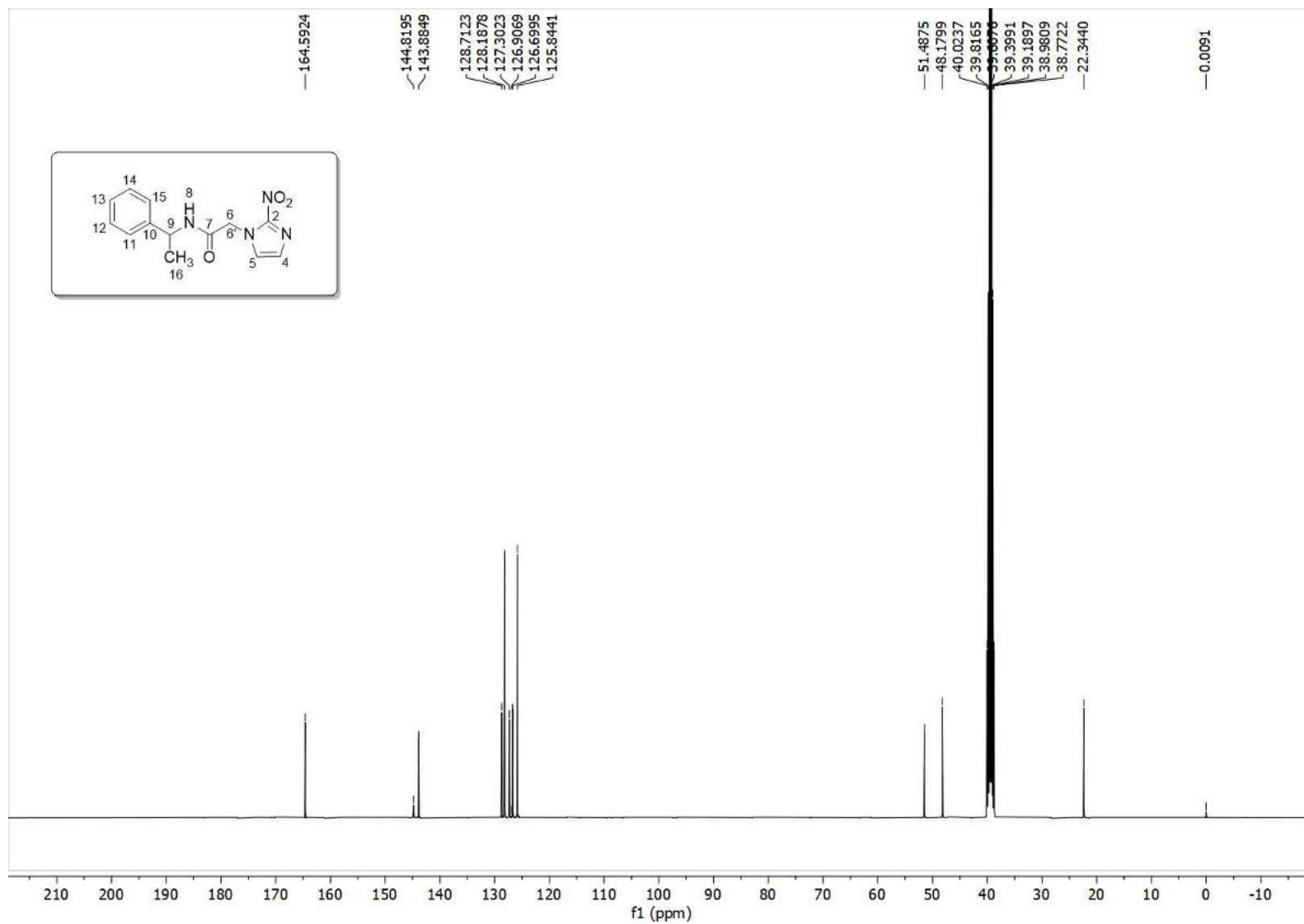
Espectro 234: Espectro de massas de alta resolução do derivado **25**.



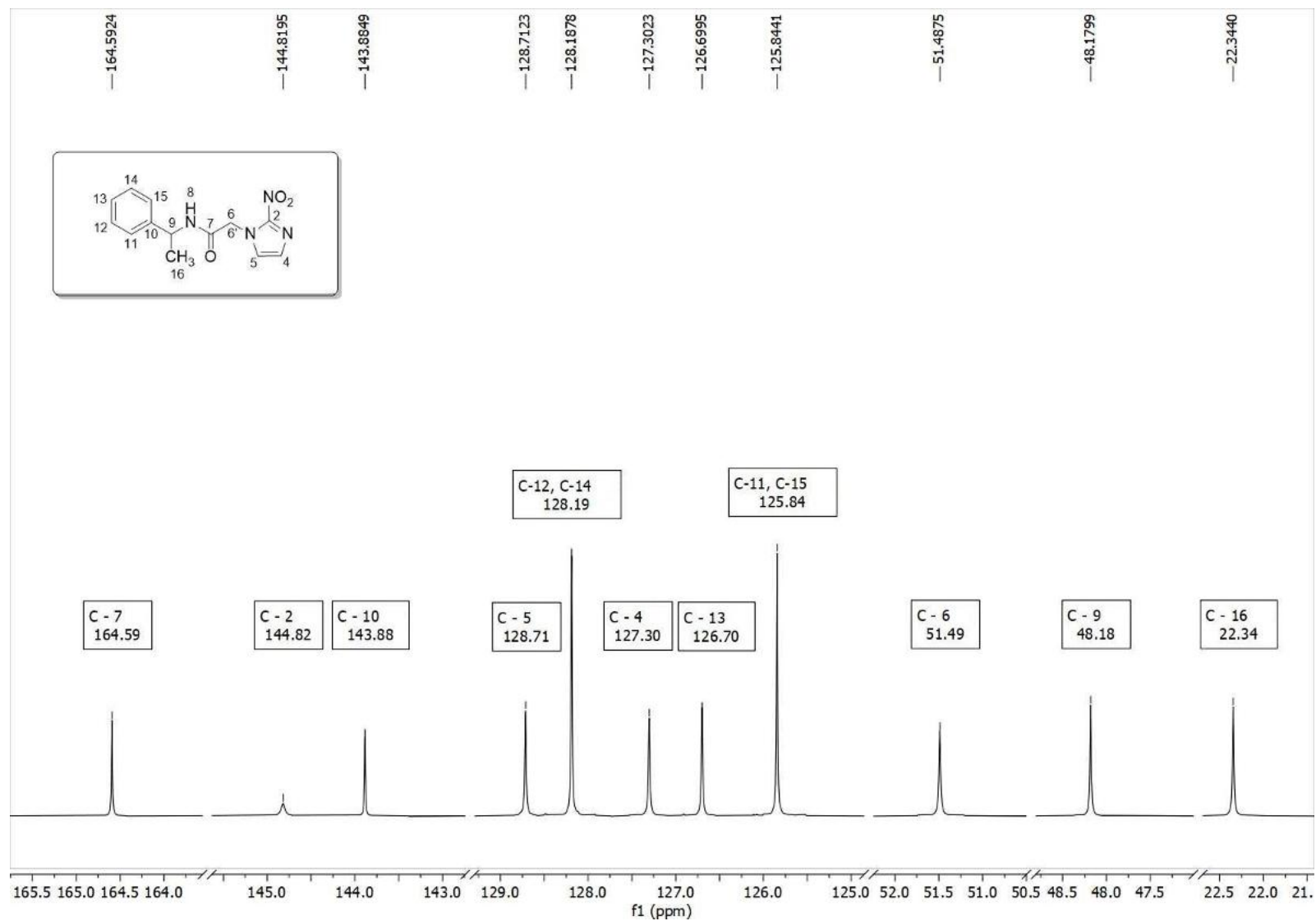
Espectro 235: Espectro de infravermelho do derivado **25**.



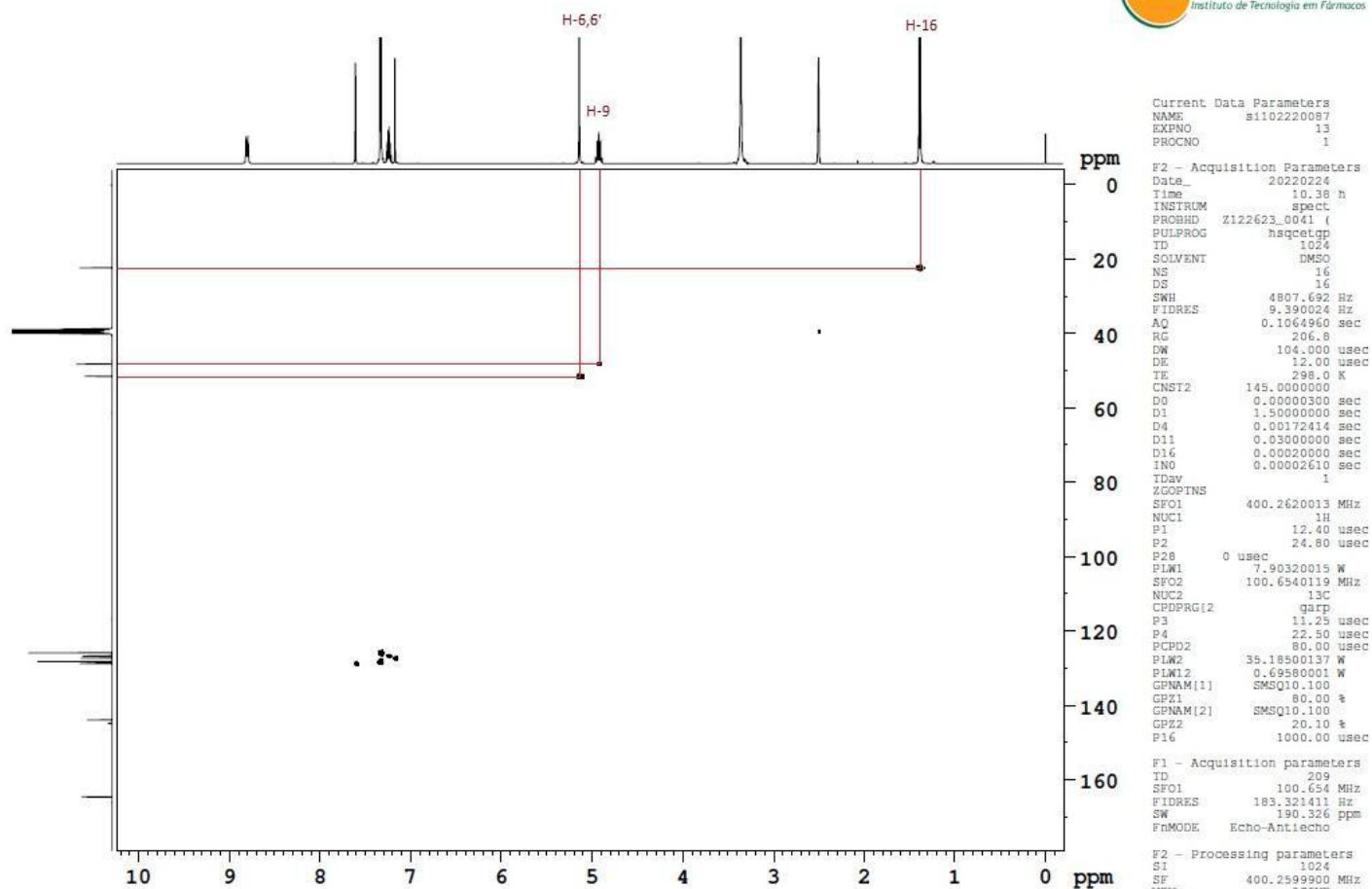
Espectro 236: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO-d_6) do derivado **25**.



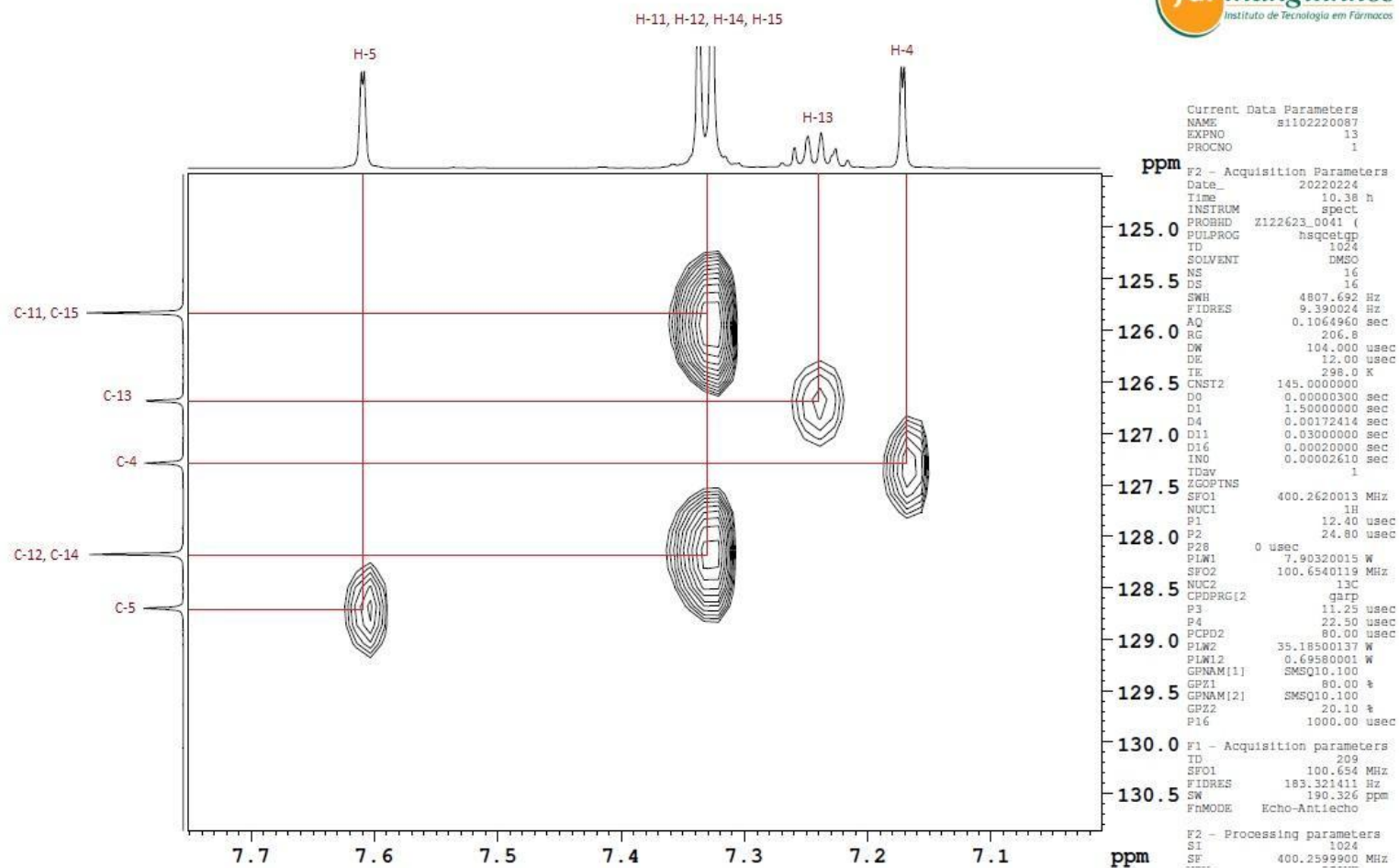
Espectro 238: Espectro de RMN ¹³C (100 MHz; DMSO-d₆) do derivado **25**.



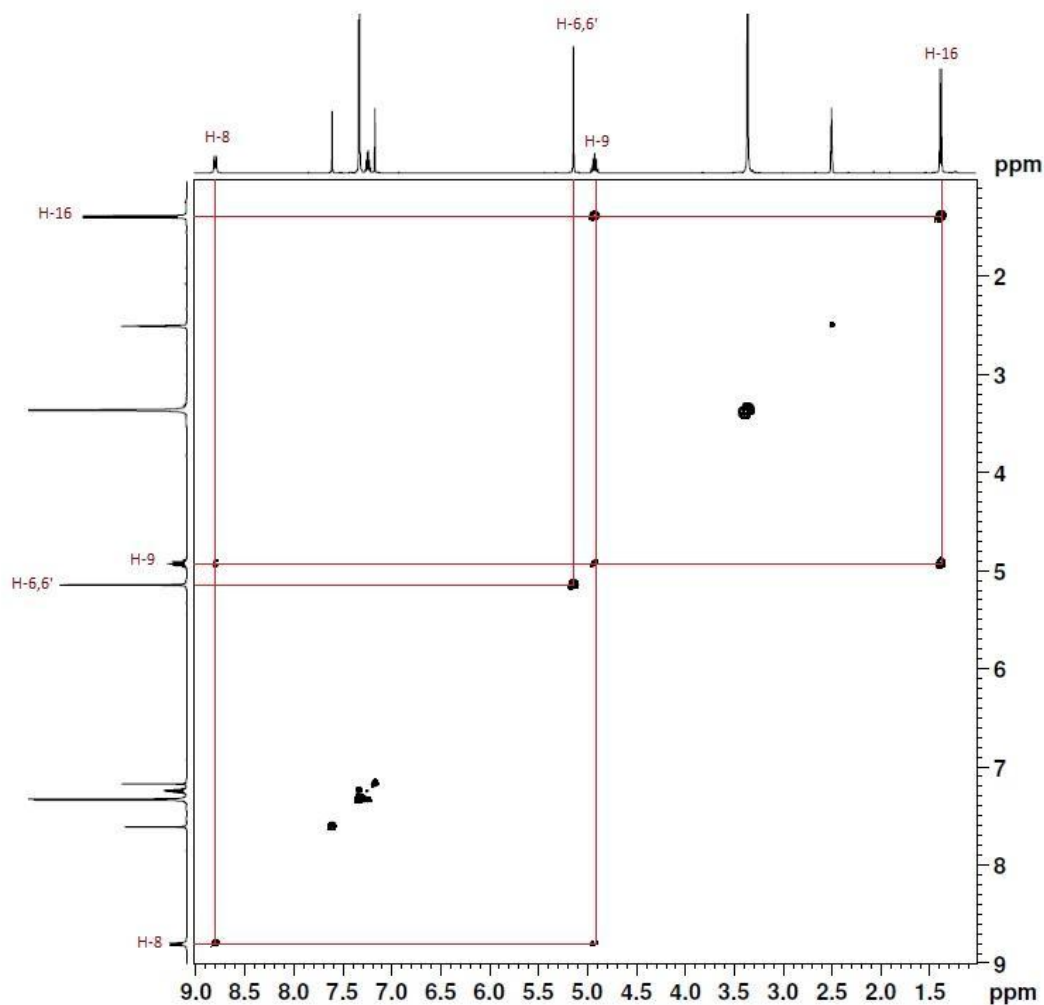
Espectro 239: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **25**.



Espectro 240: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 25.



Espectro 241: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado **25**.



Current Data Parameters
NAME si102220087
EXPNO 12
PROCNO 1

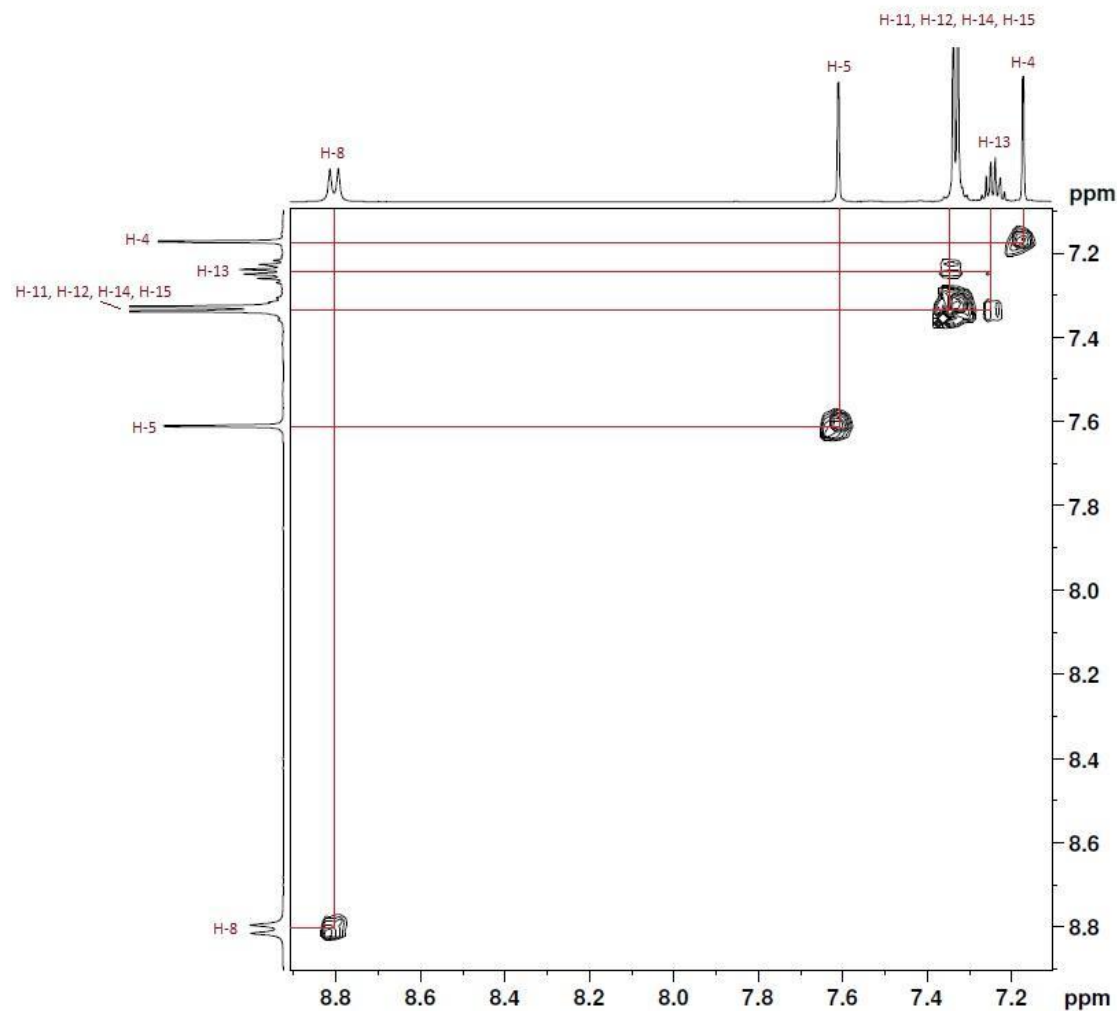
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20220221
Time 8.04 h
INSTRUM spect
PROBHD Z122623_0041 (
PULPROG cosygpppqf
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 8
SWH 4807.692 Hz
FIDRES 4.695012 Hz
AQ 0.2129920 sec
RG 59.25
DW 104.000 usec
DE 12.00 usec
TE 298.0 K
D0 0.00000300 sec
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00020000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
IND 0.00020800 sec
TDav 1
SFO1 400.2622014 MHz
NUC1 1H
P0 12.40 usec
P1 12.40 usec
P17 2500.00 usec
PLW1 7.90320015 W
PLW10 1.35020006 W
CPDAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 128
SFO1 400.2622 MHz
FIDRES 75.120193 Hz
SW 12.011 ppm
FMODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.2599840 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 400.2599845 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Espectro 242: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 25.



Current Data Parameters
NAME sil02220087
EXPNO 12
PROCNO 1

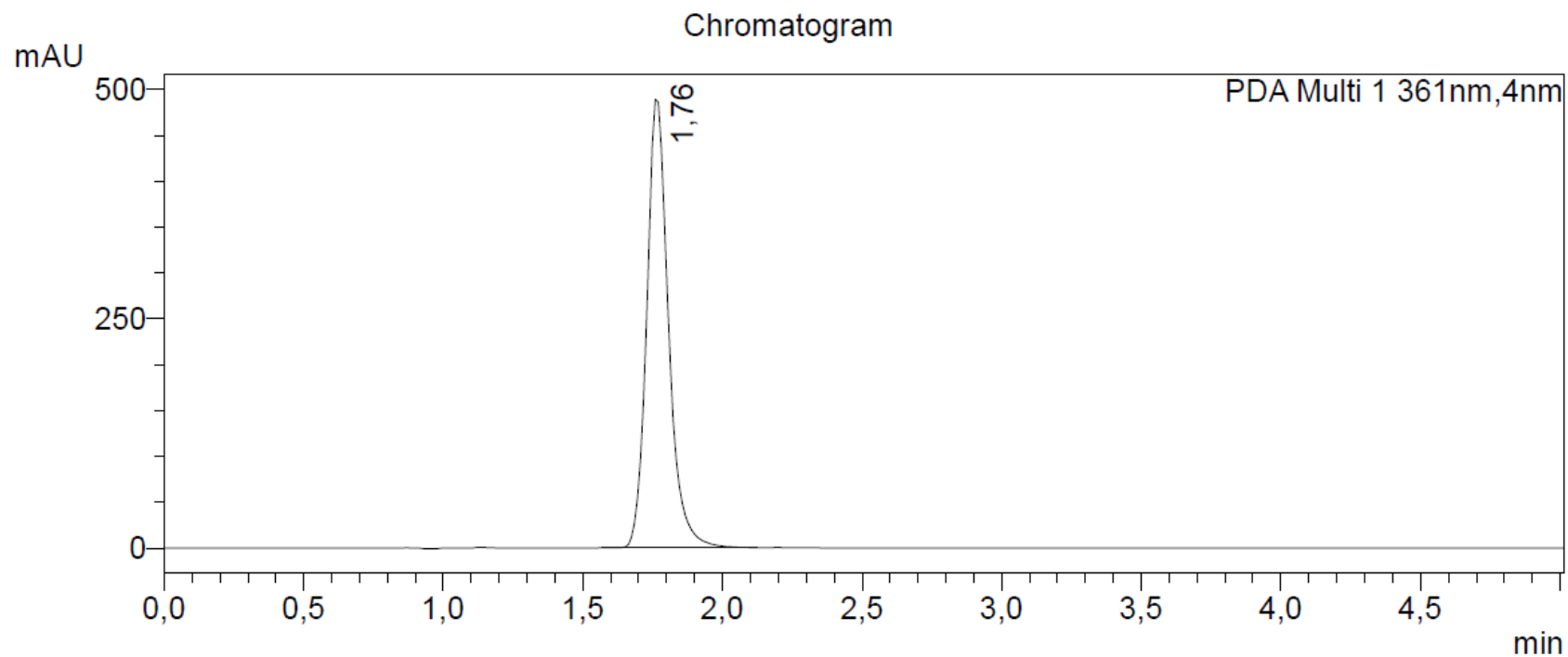
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20220221
Time 8.04 h
INSTRUM spect
PROBHD Z122623_0041 (
PULPROG cosygpppqf
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 8
SWH 4807.692 Hz
FIDRES 4.695012 Hz
AQ 0.2129920 sec
RG 59.25
DW 104.000 usec
DE 12.00 usec
TE 298.0 K
D0 0.00000350 sec
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00002000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
INO 0.00020800 sec
TDev 1
SFO1 400.2622014 MHz
NUC1 1H
P0 12.40 usec
P1 12.40 usec
P17 2500.00 usec
PLW1 7.90320015 W
PLW10 1.35020006 W
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 128
SFO1 400.2622 MHz
FIDRES 75.120193 Hz
SW 12.011 ppm
F-MODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.2599840 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 400.2599845 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Espectro 243: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado **25**.

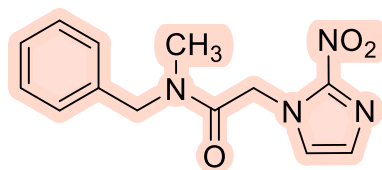


Peak Table

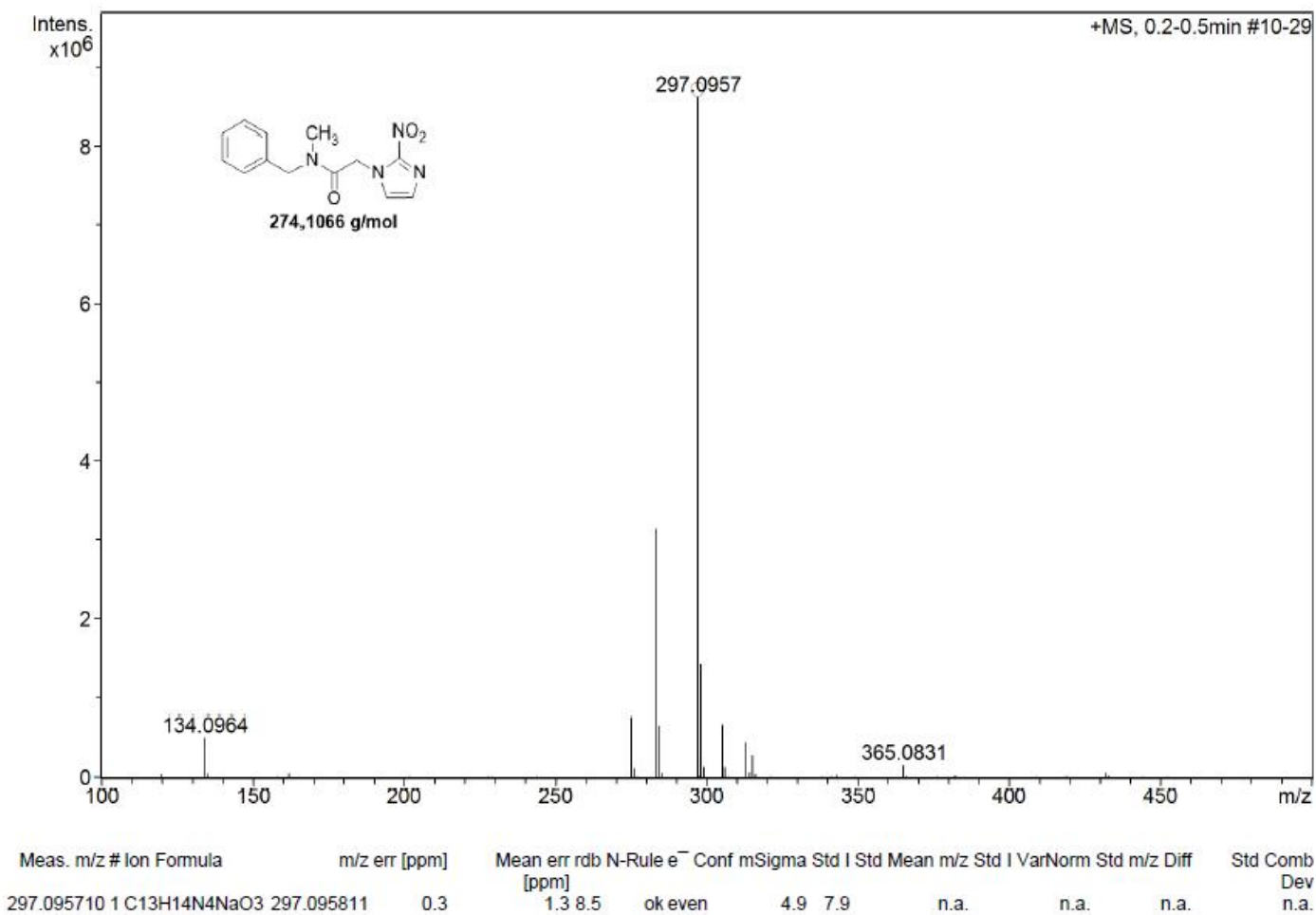
PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,76		2650028	100,0	13390	1,216	--	--
Total			2650028	100,0				

Cromatograma 25: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **25**.

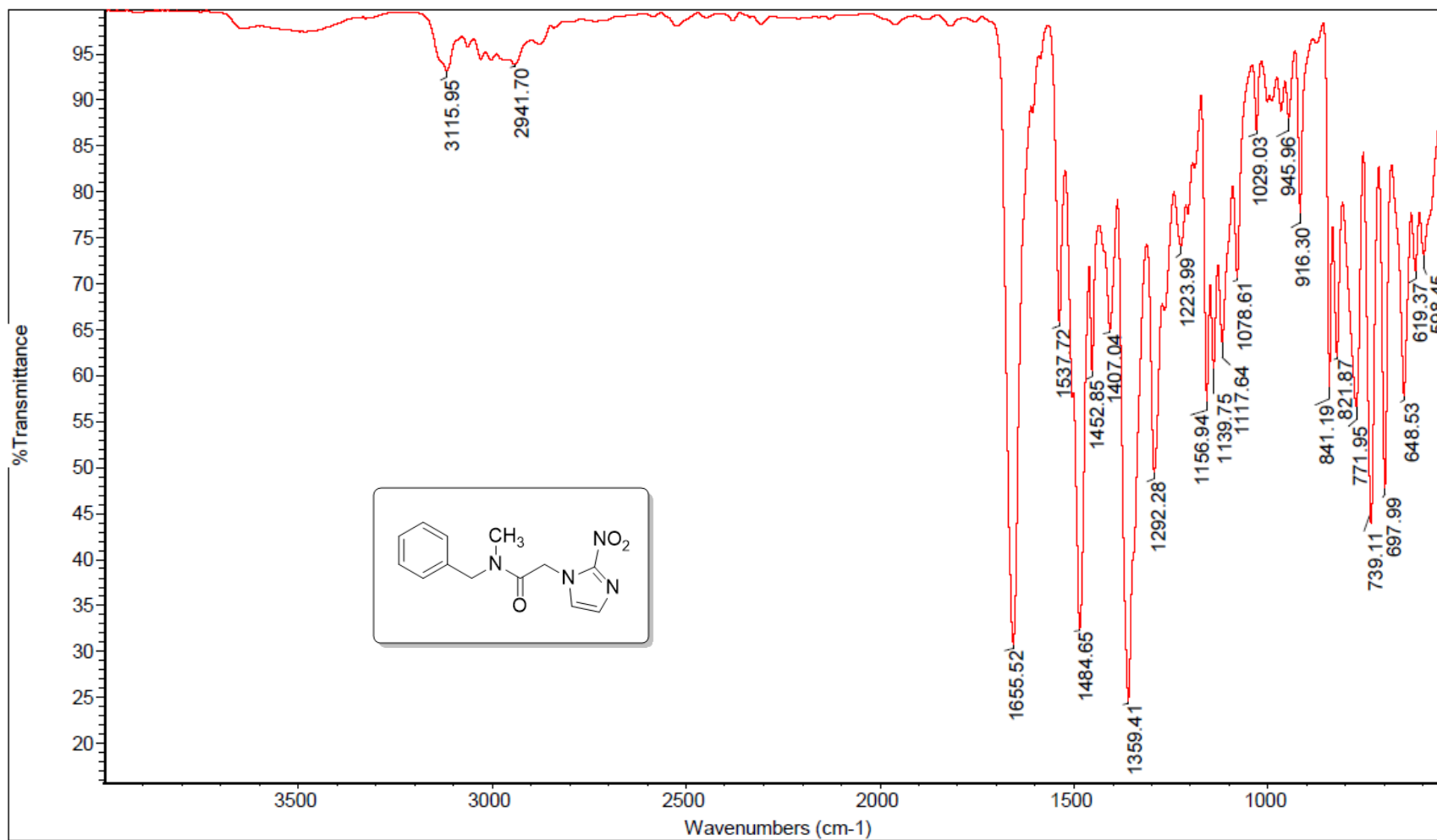
N-benzil-*N*-metil-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (26)



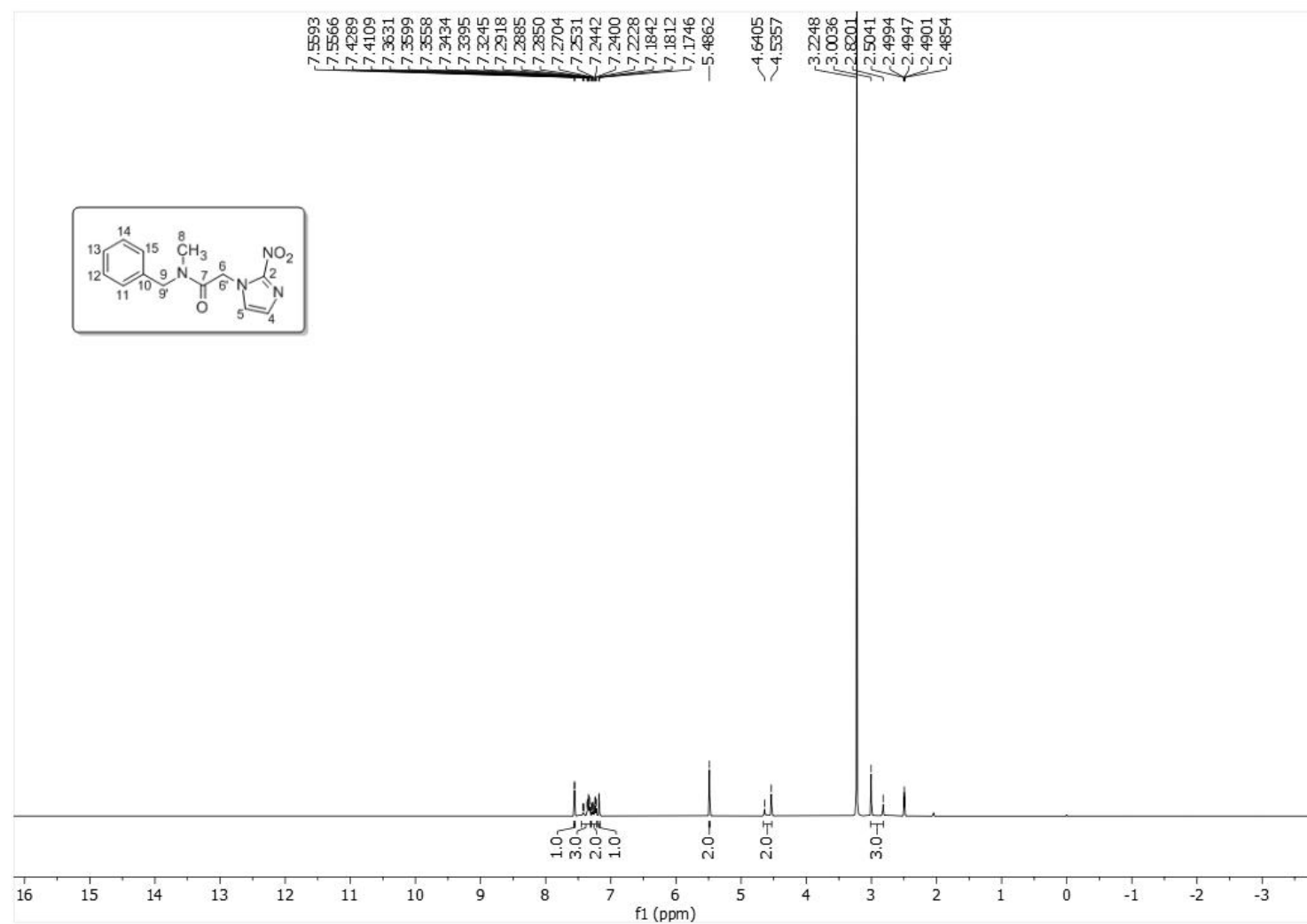
+MS, 0.2-0.5min #10-29



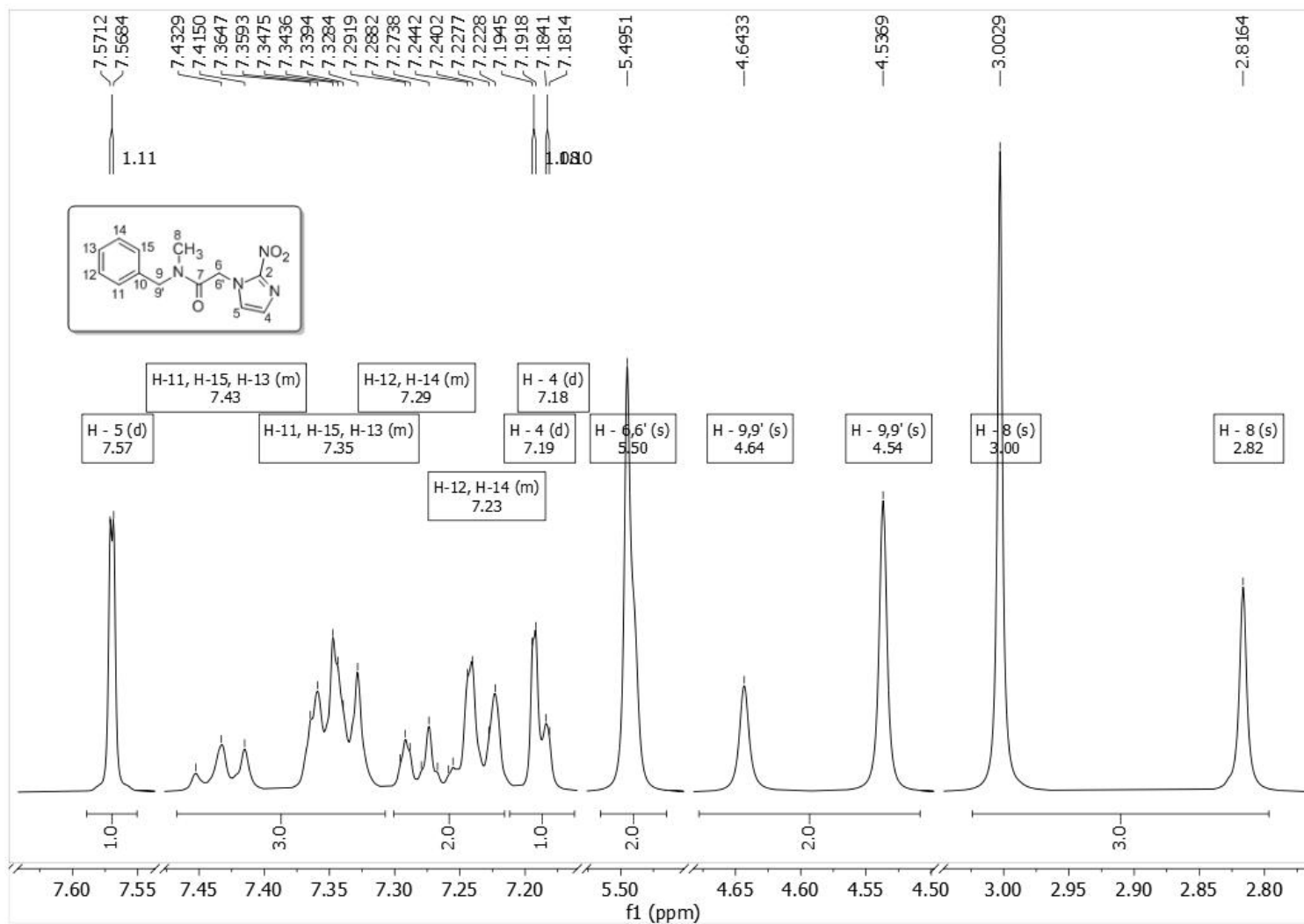
Espectro 244: Espectro de massas de alta resolução do derivado **26**.



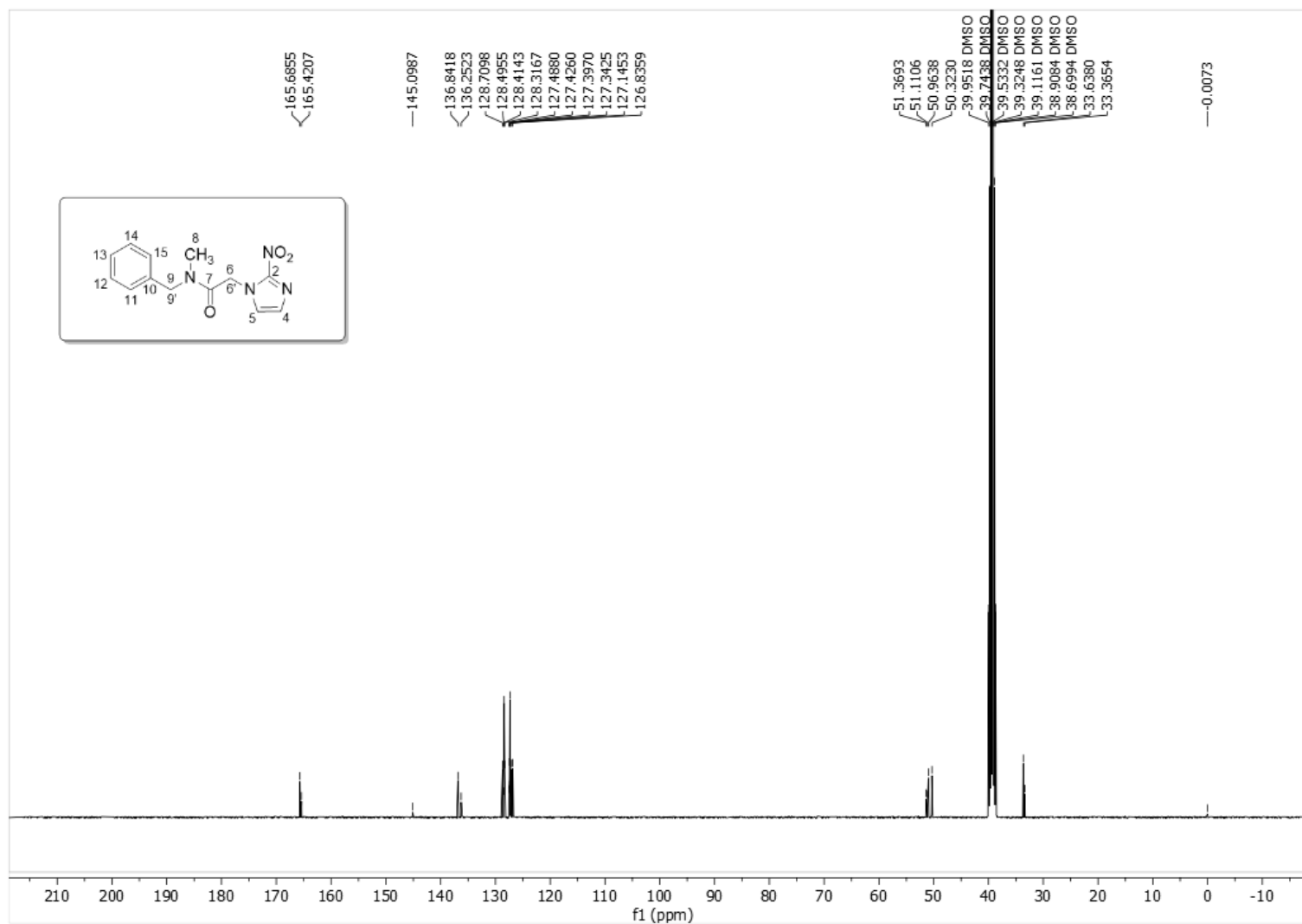
Espectro 245: Espectro de infravermelho do derivado **26**.



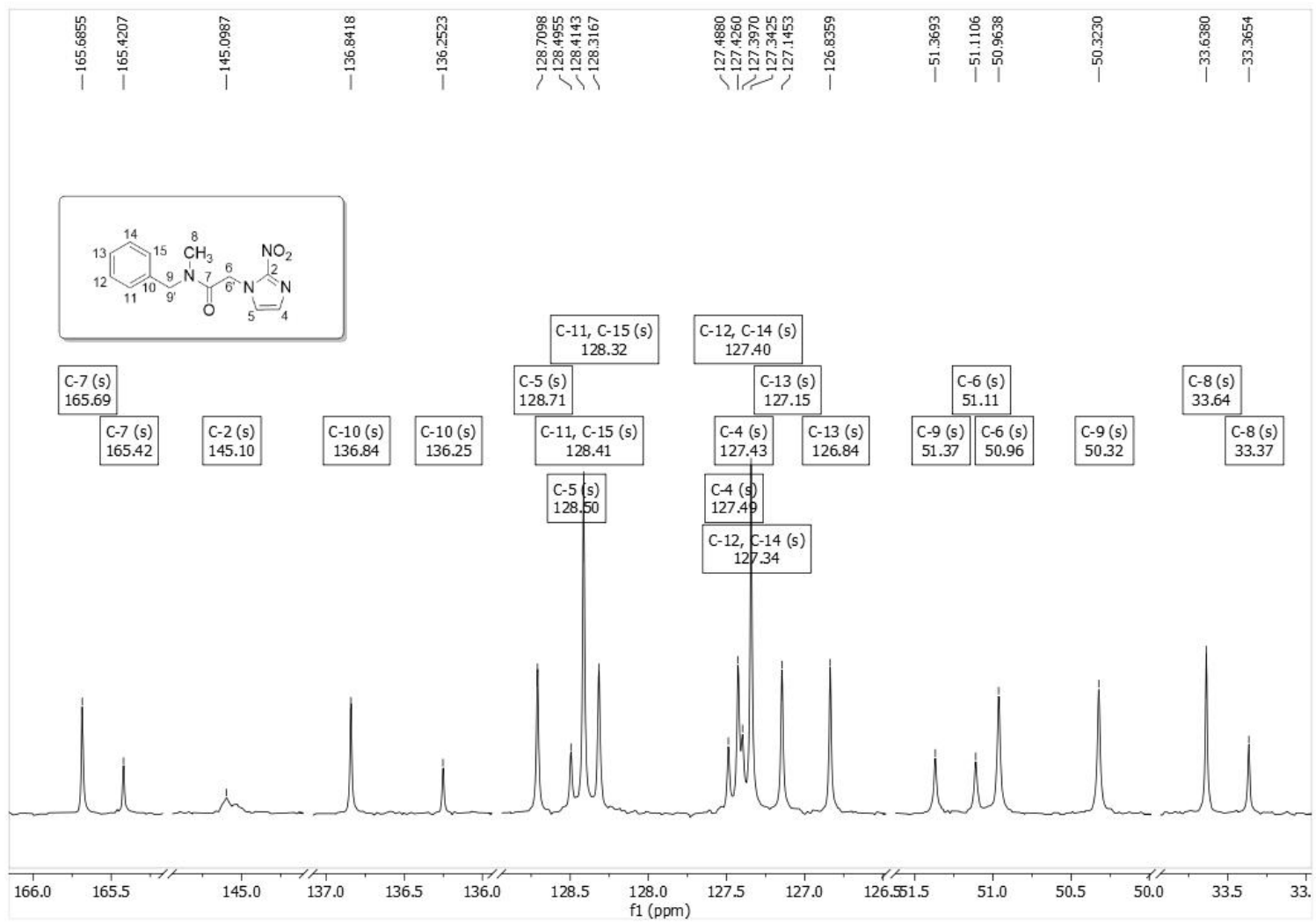
Espectro 246: Espectro de RMN ¹H (400 MHz; DMSO-d₆) do derivado **26**. Temperatura: 328 K.



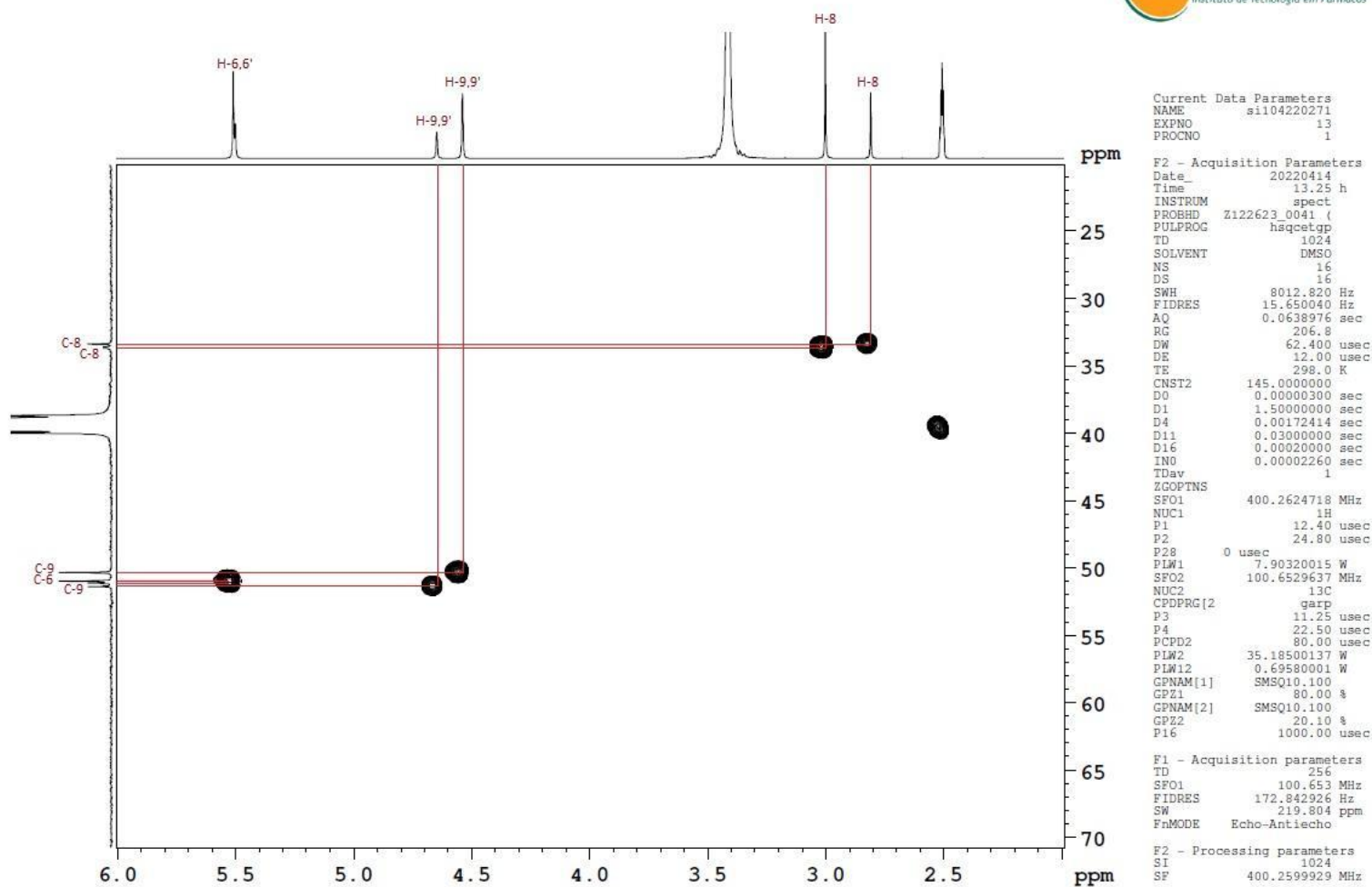
Espectro 247: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **26**. Temperatura: 328 K.



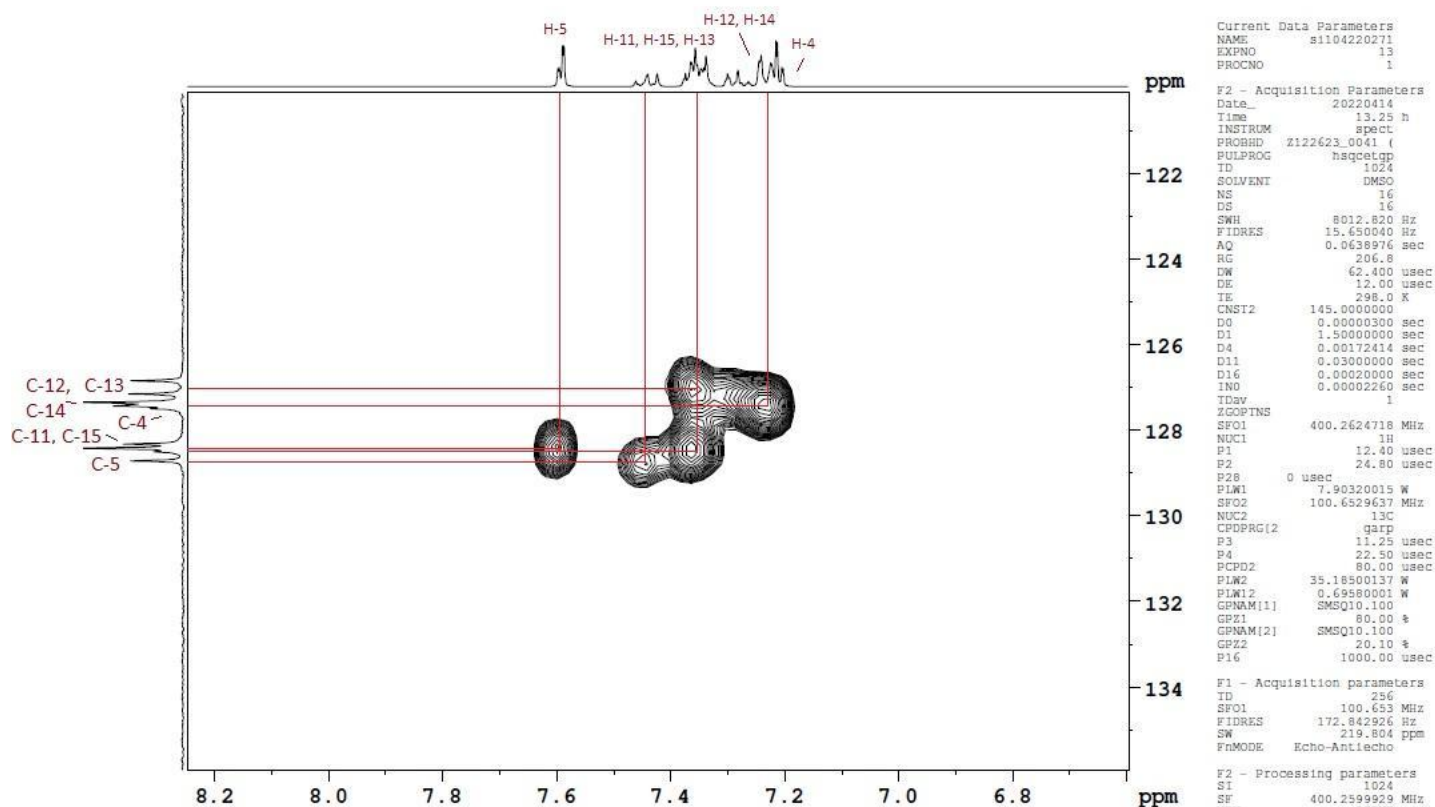
Espectro 248: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **26**.



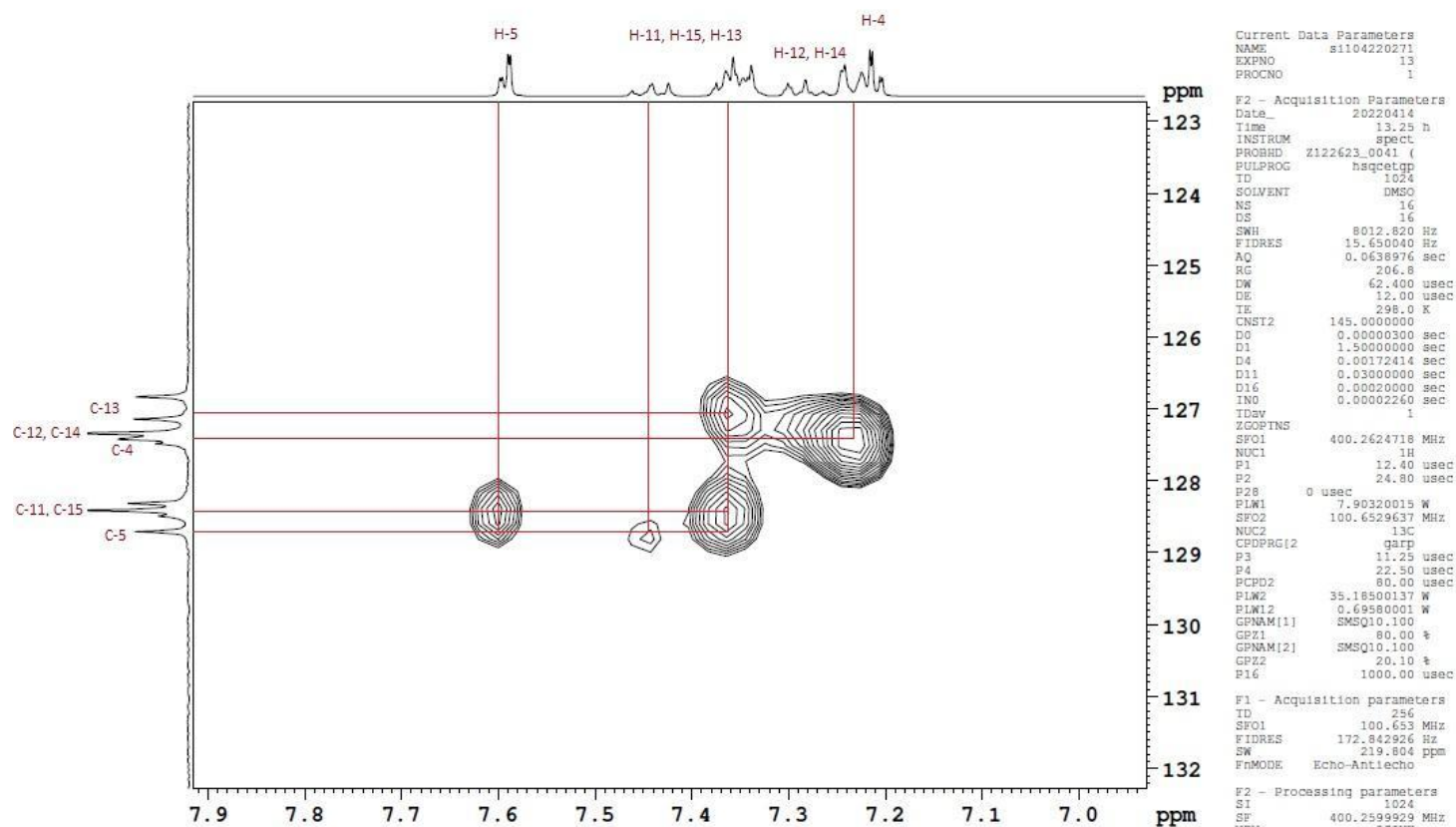
Espectro 249: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado **26**.



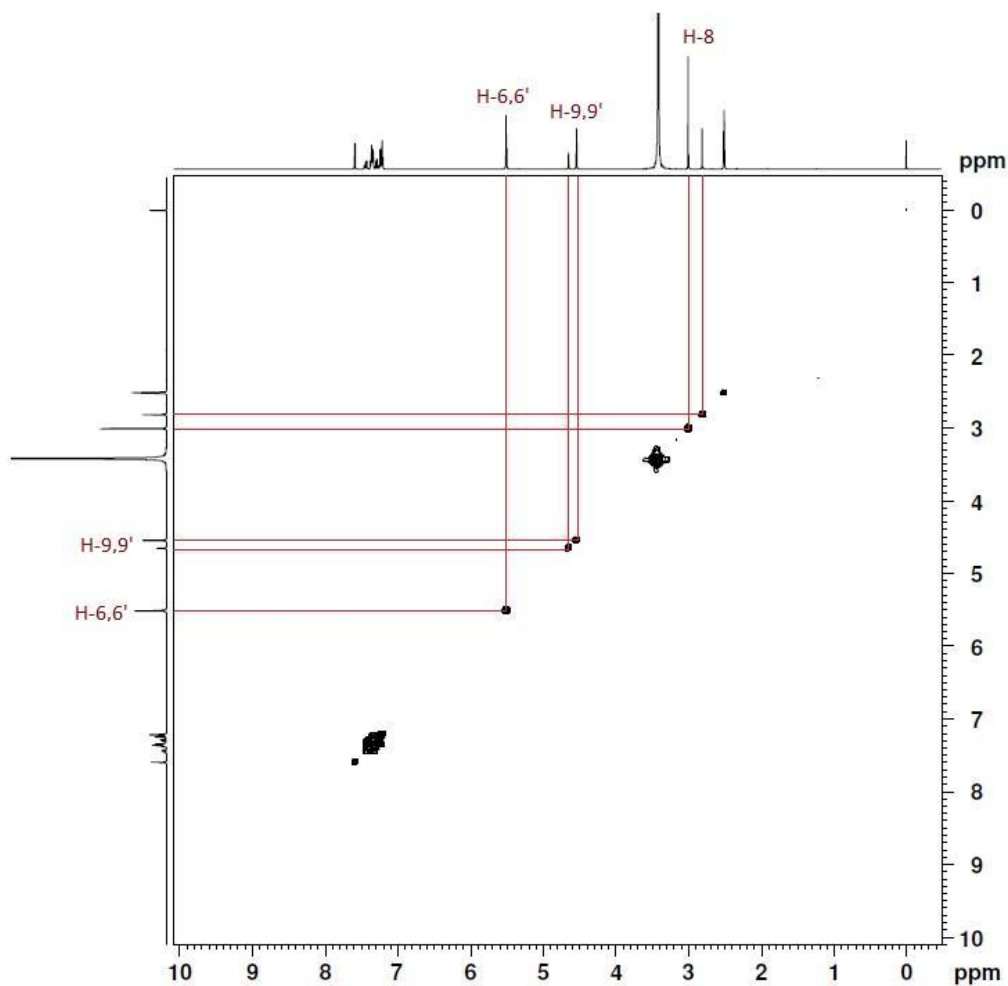
Espectro 250: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 26.



Espectro 251: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 26.



Espectro 252: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 26.



```

Current Data Parameters
NAME      sil04220271
EXPNO     23
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20220426
Time      15.34 h
INSTRUM   spect
PROBHD    Z122623_0041 (
PULPROG   cosygpppqf
TD         2048
SOLVENT   DMSO
NS         128
DS         8
SWH        4807.692 Hz
FIDRES     4.695012 Hz
AQ         0.2129920 sec
RG         20.9
DW         104.000 usec
DE         12.00 usec
TE         298.0 K
D0         0.00000300 sec
D1         2.00000000 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00002000 sec
D13        0.00000400 sec
D16        0.00020000 sec
INO        0.00020800 sec
TD0av      1
SFO1       400.2622014 MHz
NUC1       1H
P0         12.40 usec
P1         12.40 usec
P17        2500.00 usec
PLW1       7.90320015 W
PLW10      1.35020006 W
GPNAM[1]   SMSQ10.100
GPZ1       10.00 %
P16        1000.00 usec

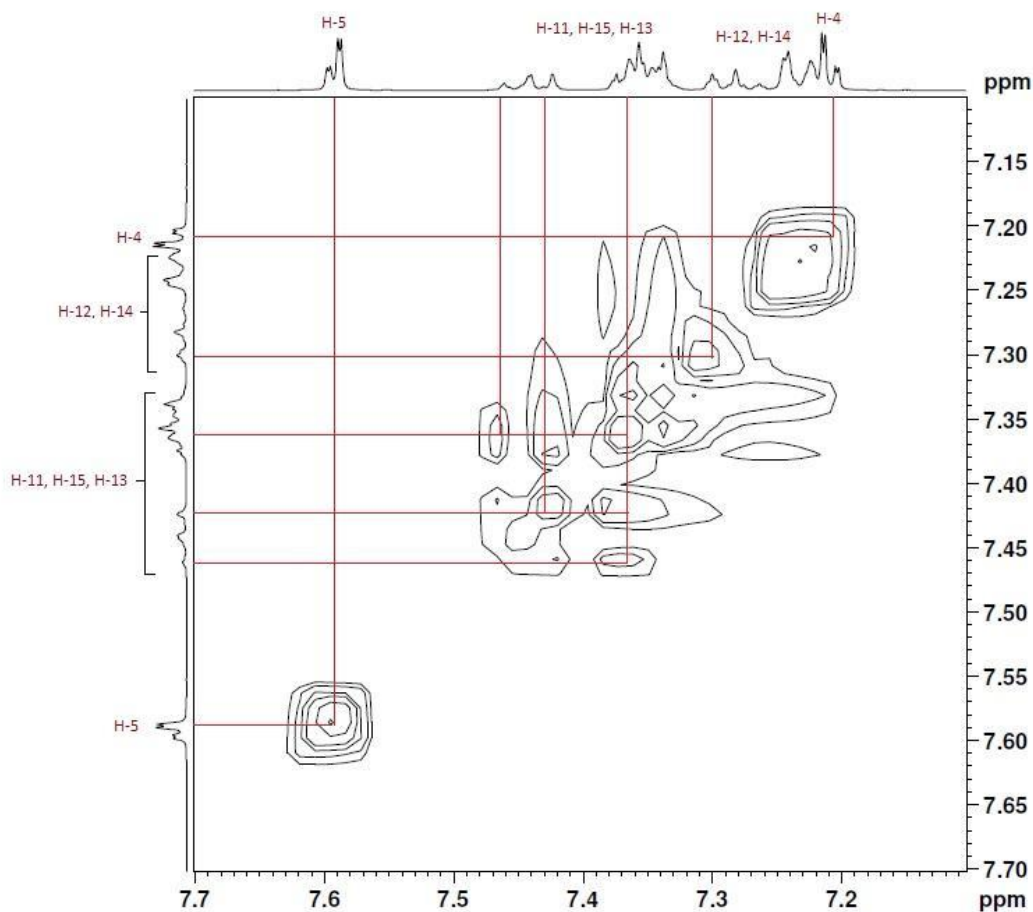
F1 - Acquisition parameters
TD         128
SFO1       400.2622 MHz
FIDRES     75.120193 Hz
SW         12.011 ppm
F2MODE     QF

F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         400.2599938 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.40

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        QF
SF         400.2599947 MHz
WDW        QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0

```

Espectro 253: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 26.



Current Data Parameters
NAME si104220271
EXPNO 23
PROCNO 1

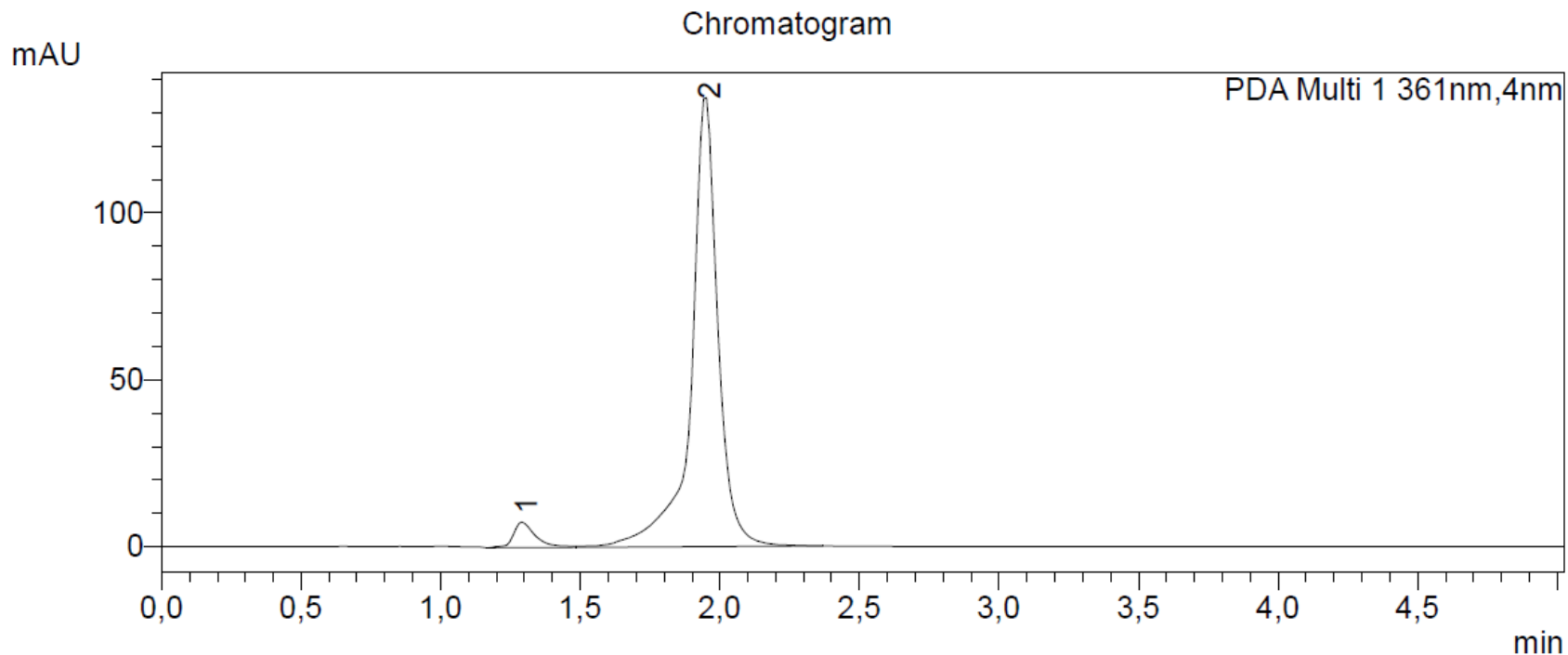
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20220426
Time 15.34 h
INSTRUM spect
PROBHD Z122623_0041 (cosypppqf)
PULPROG cosypppqf
TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 128
DS 8
SWH 4807.692 Hz
FIDRES 4.695012 Hz
AQ 0.2129920 sec
RG 20.9
DW 104.000 usec
DE 12.00 usec
TE 298.0 K
D0 0.0000300 sec
D1 2.0000000 sec
D11 0.0300000 sec
D12 0.0002000 sec
D13 0.0000400 sec
D16 0.0002000 sec
INO 0.0002080 sec
TDev 1
SFO1 400.2622014 MHz
NUC1 1H
PC 12.40 usec
P1 12.40 usec
P17 2500.00 usec
PLW1 7.90320015 W
PLW10 1.35020006 W
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1 10.00 %
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 128
SFO1 400.2622 MHz
FIDRES 75.120193 Hz
SW 12.011 ppm
F2MODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 400.2599938 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 400.2599947 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

Espectro 254: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 26.



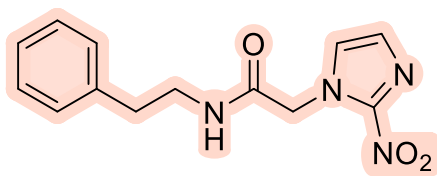
Peak Table

PDA Ch1 361nm

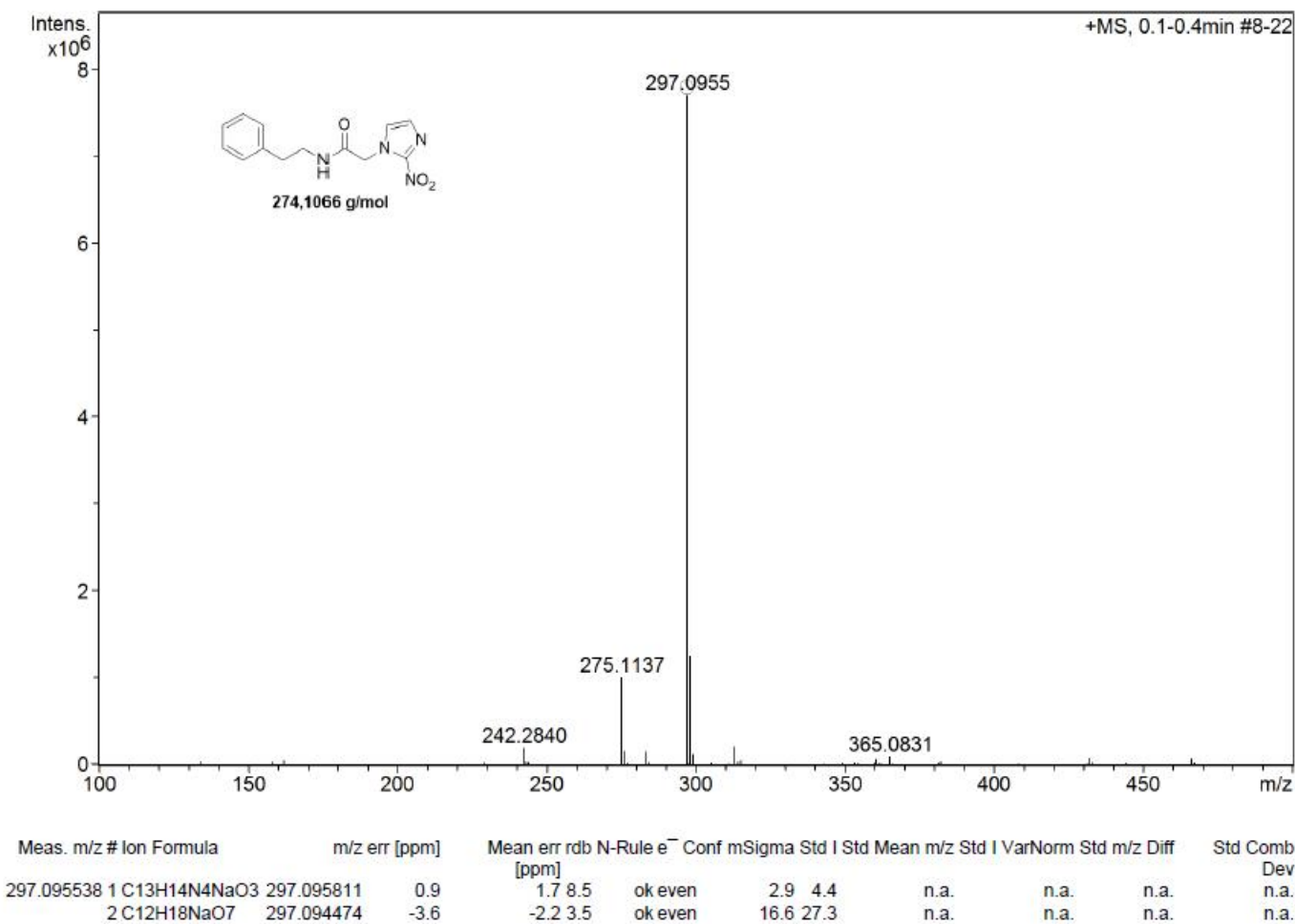
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,29		41512	4,4	7574	1,523	--	--
2	1,95		898931	95,6	13983	0,817	4,059	0,508
Total			940443	100,0				

Cromatograma 26: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado **26**.

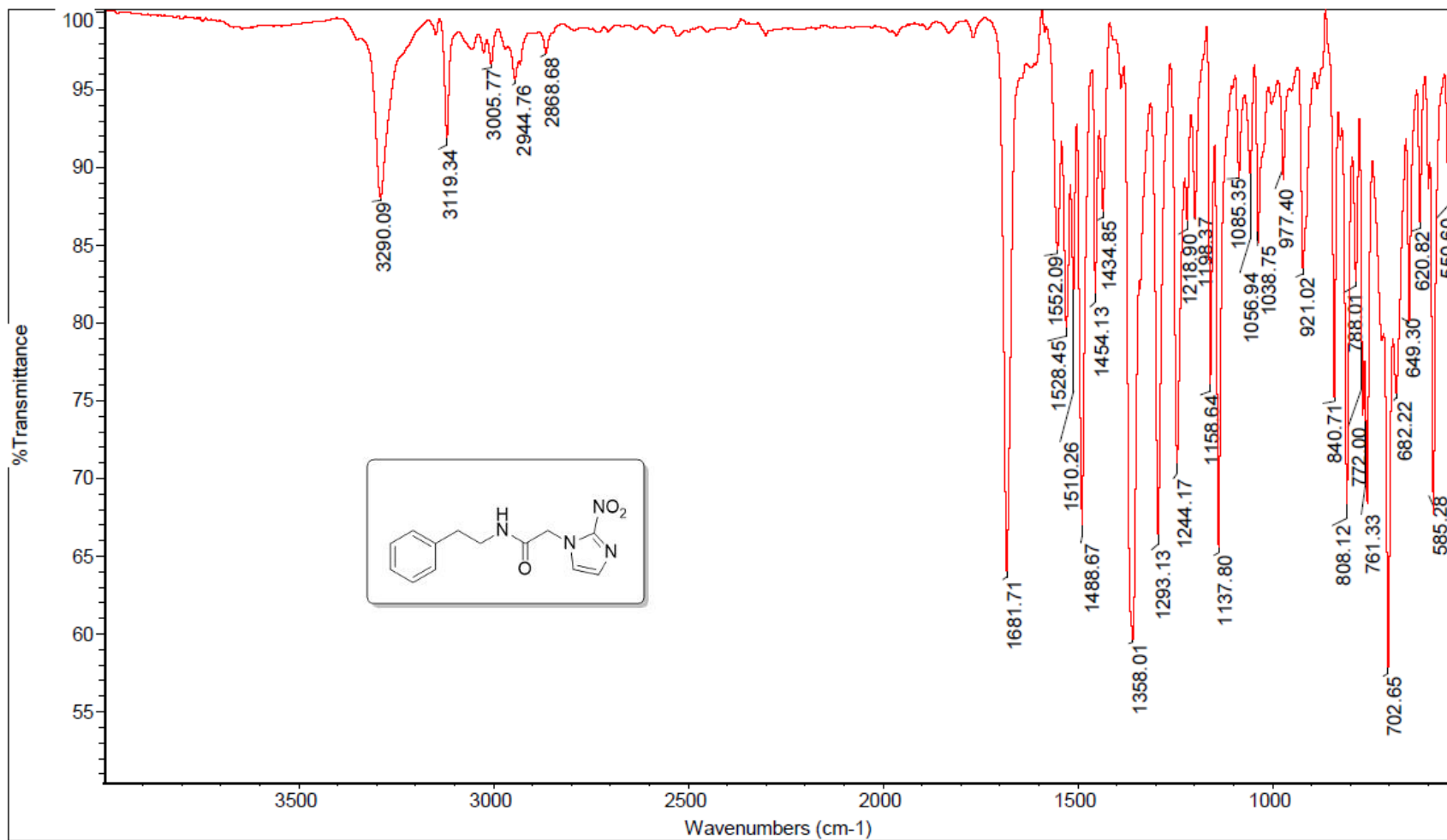
2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-N-fenetilacetamida (27)



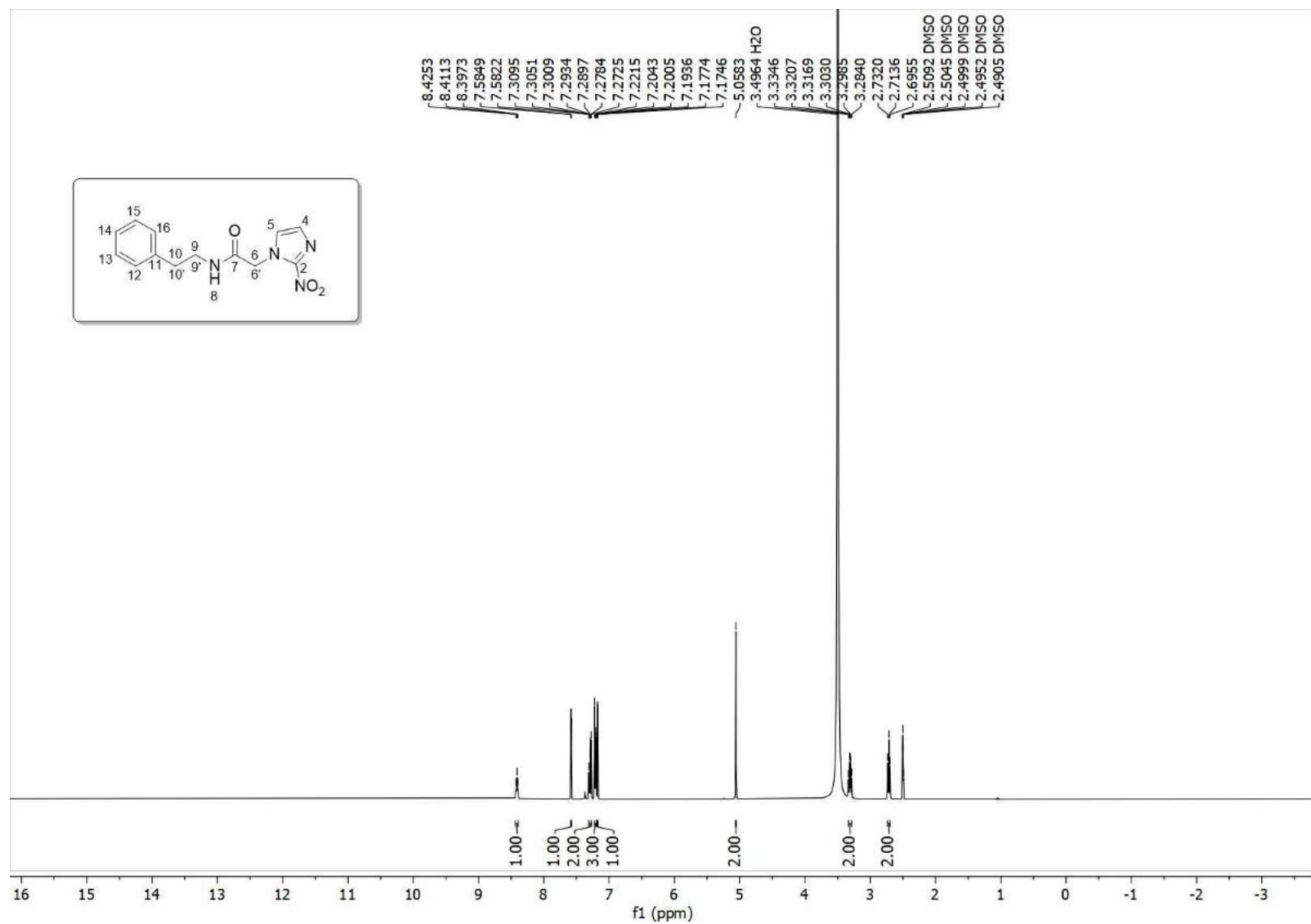
+MS, 0.1-0.4min #8-22



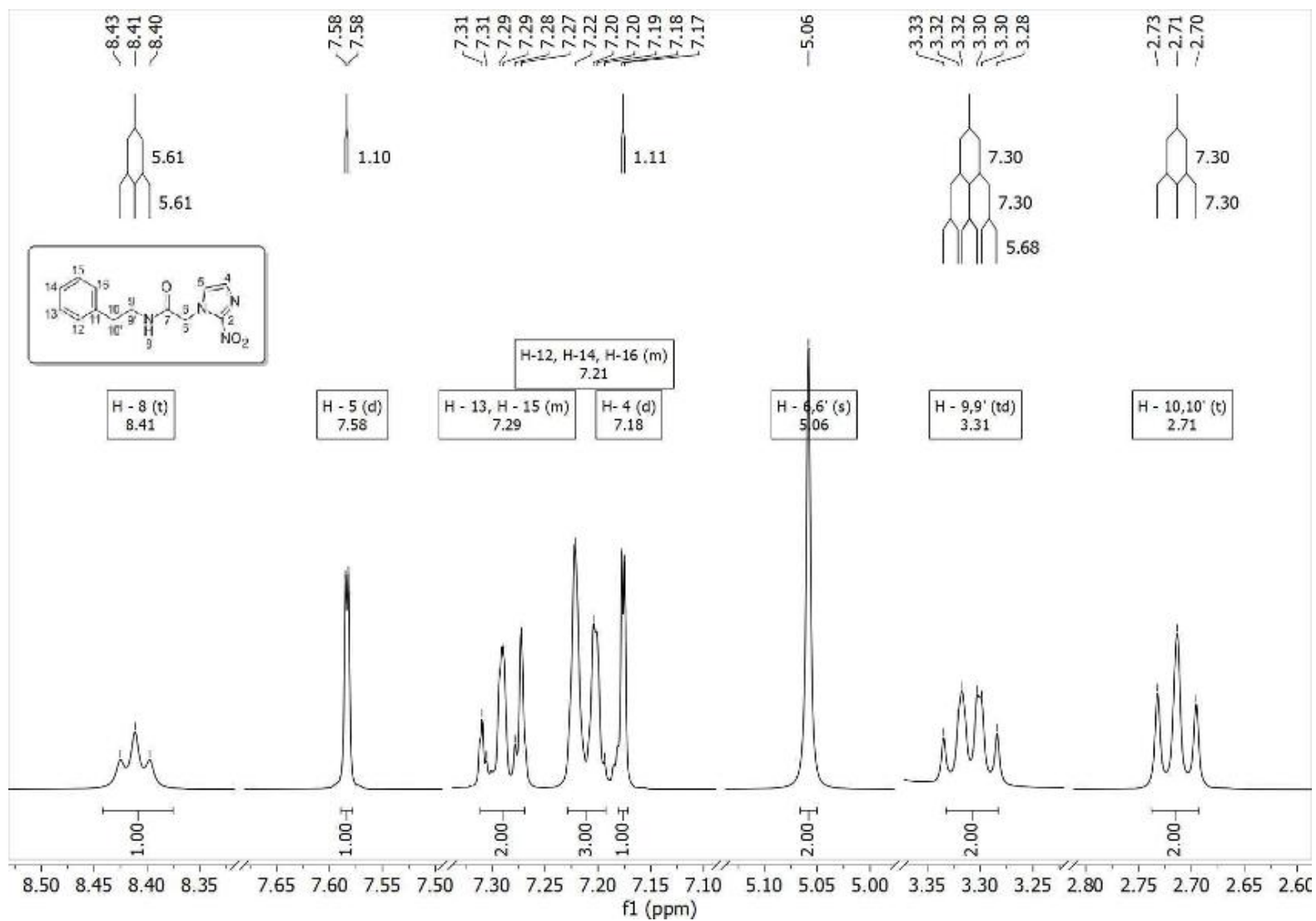
Espectro 255: Espectro de massas de alta resolução do derivado **27**.



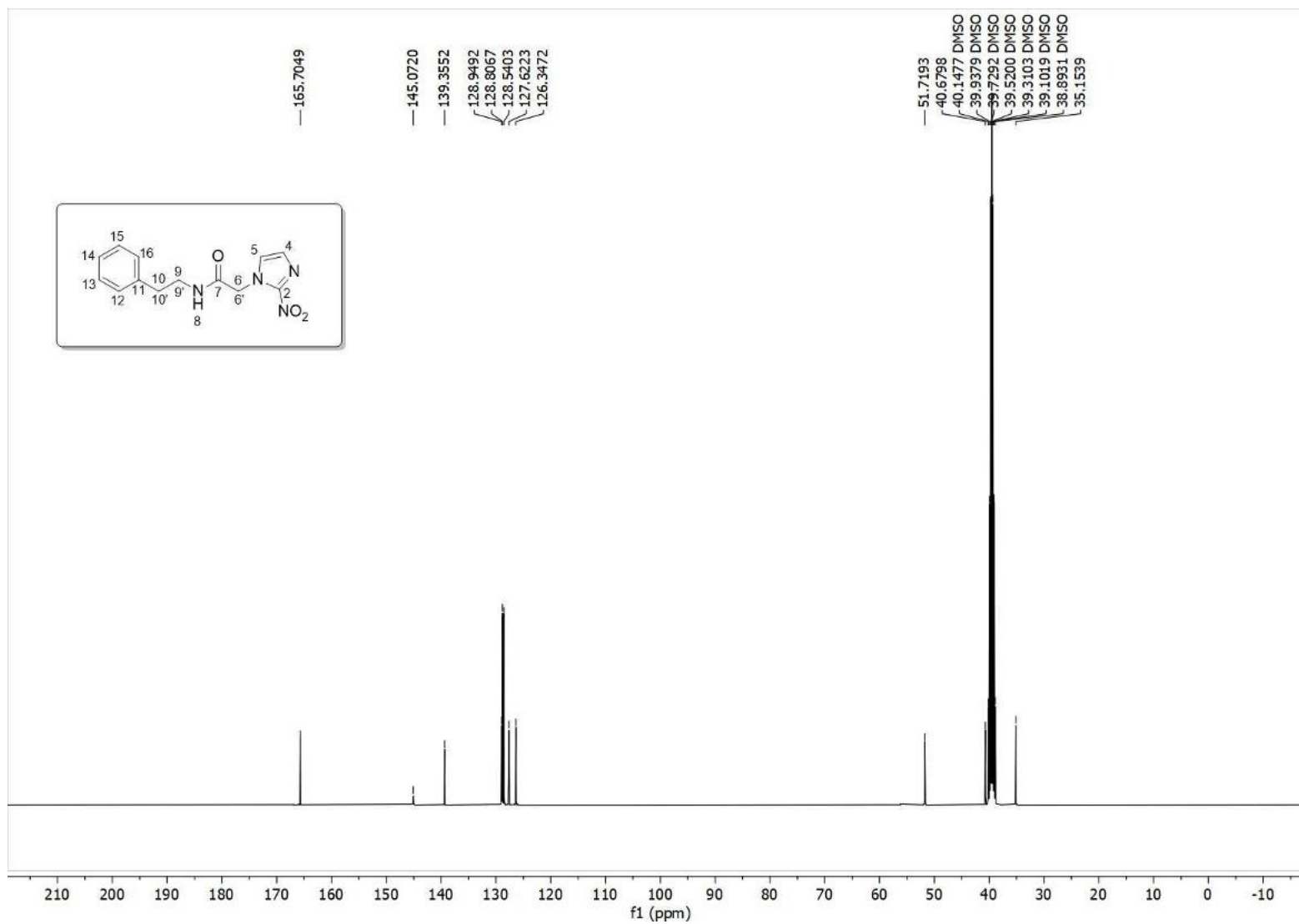
Espectro 256: Espectro de infravermelho do derivado 27.



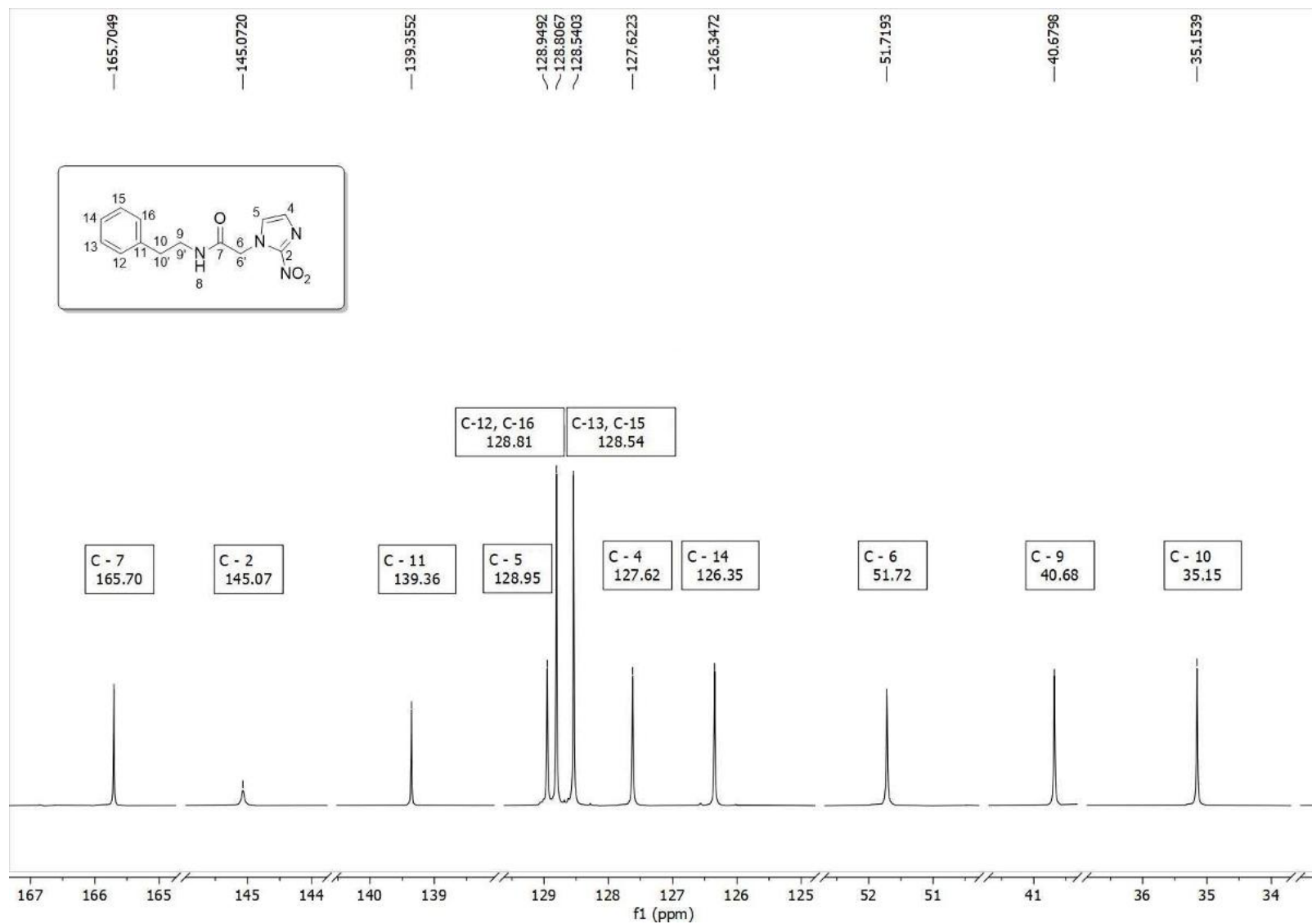
Espectro 257: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **27**.



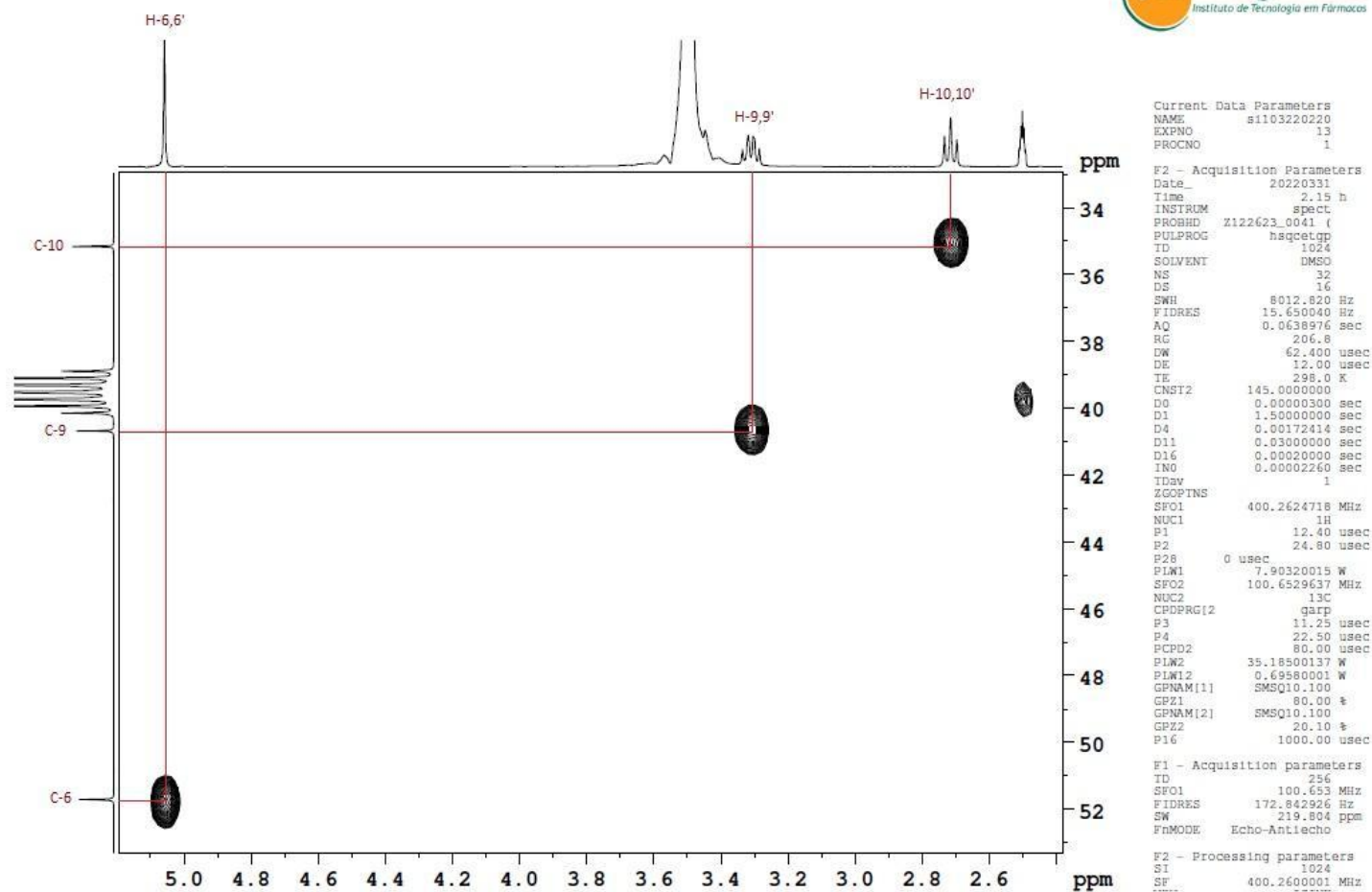
Espectro 258: Espectro de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) do derivado **27**.



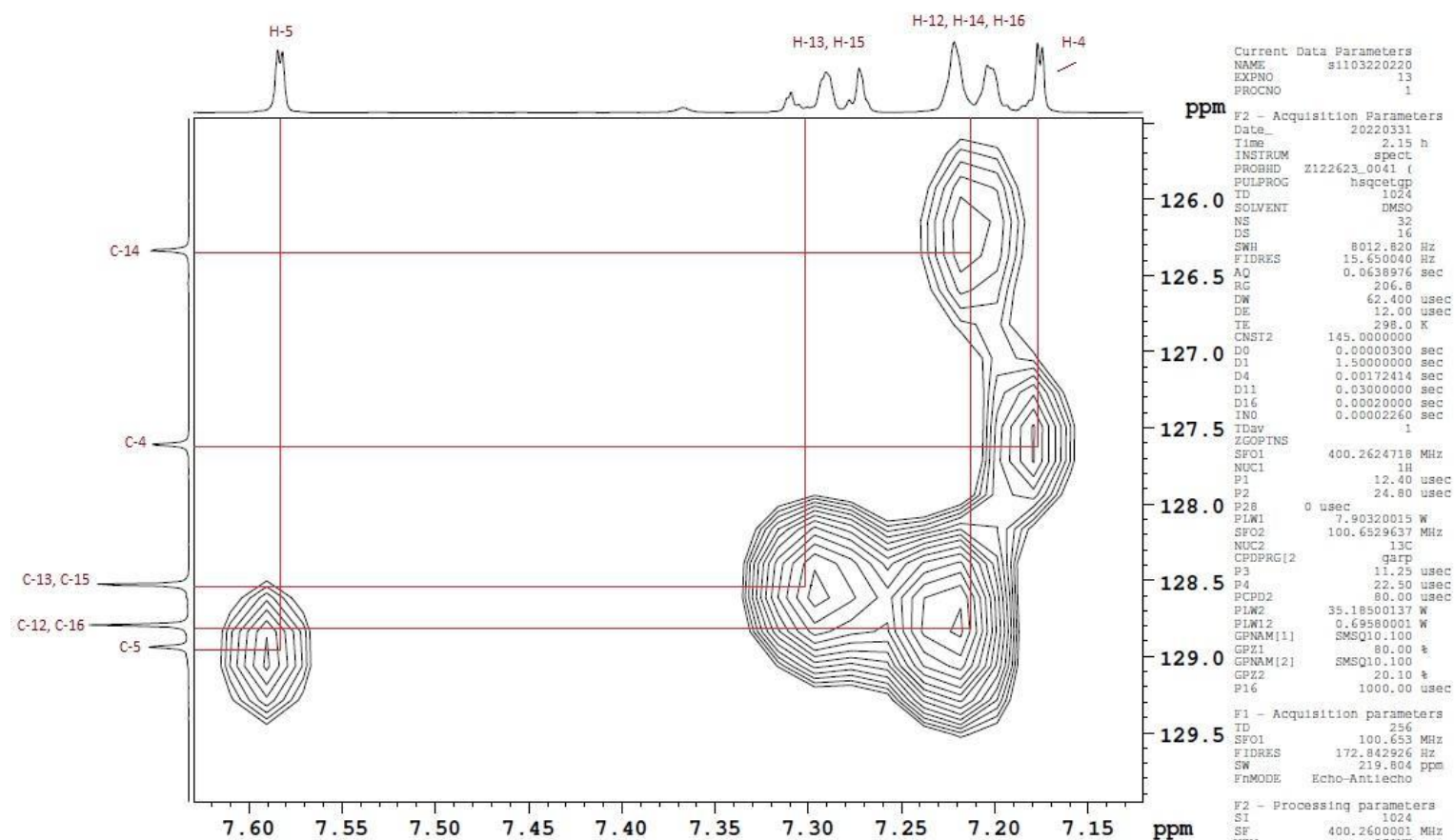
Espectro 259: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6) do derivado 27.



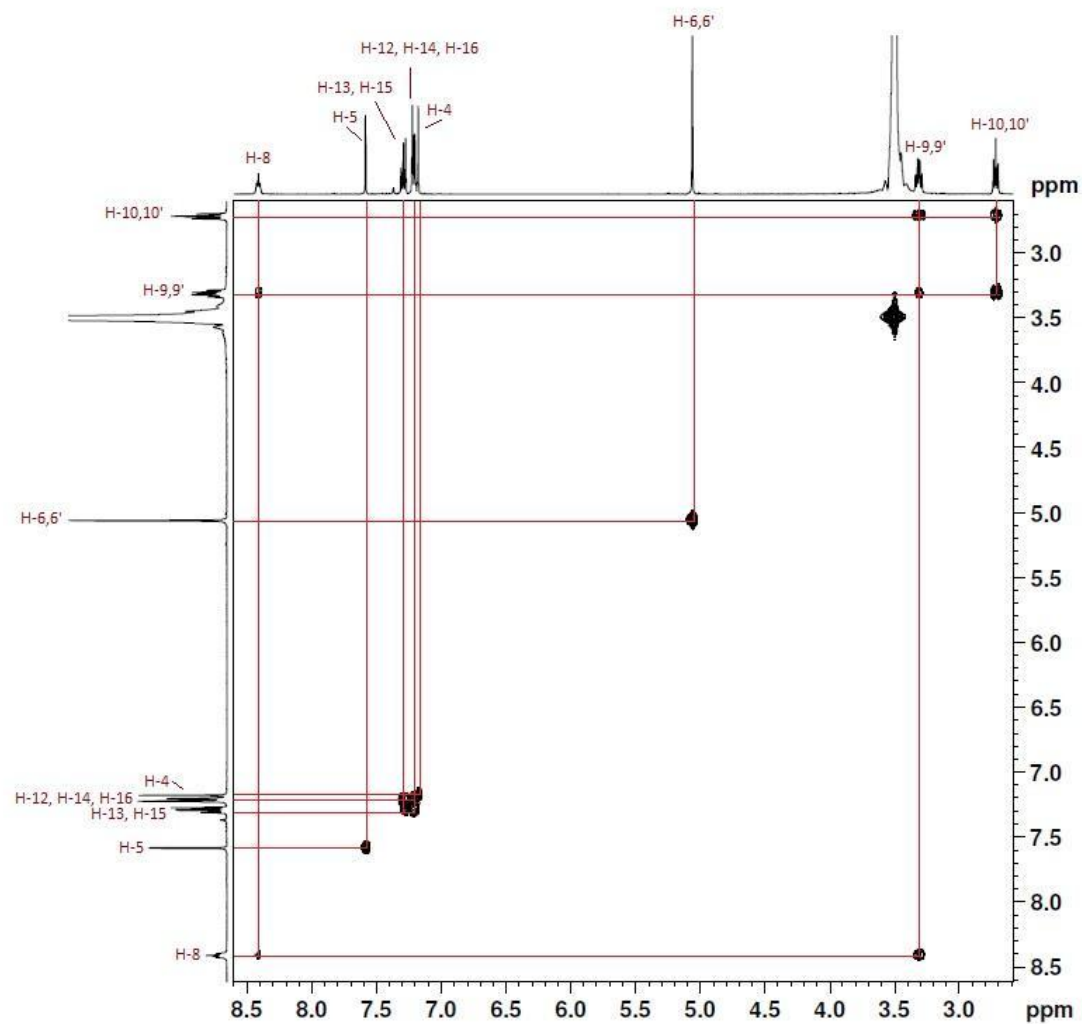
Espectro 260: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; DMSO- d_6)) do derivado **27**.



Espectro 261: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 27.



Espectro 262: Espectro de RMN bidimensional HSQC do derivado 27.



Current Data Parameters
 NAME si103220220
 EXPNO 12
 PROCNO 1

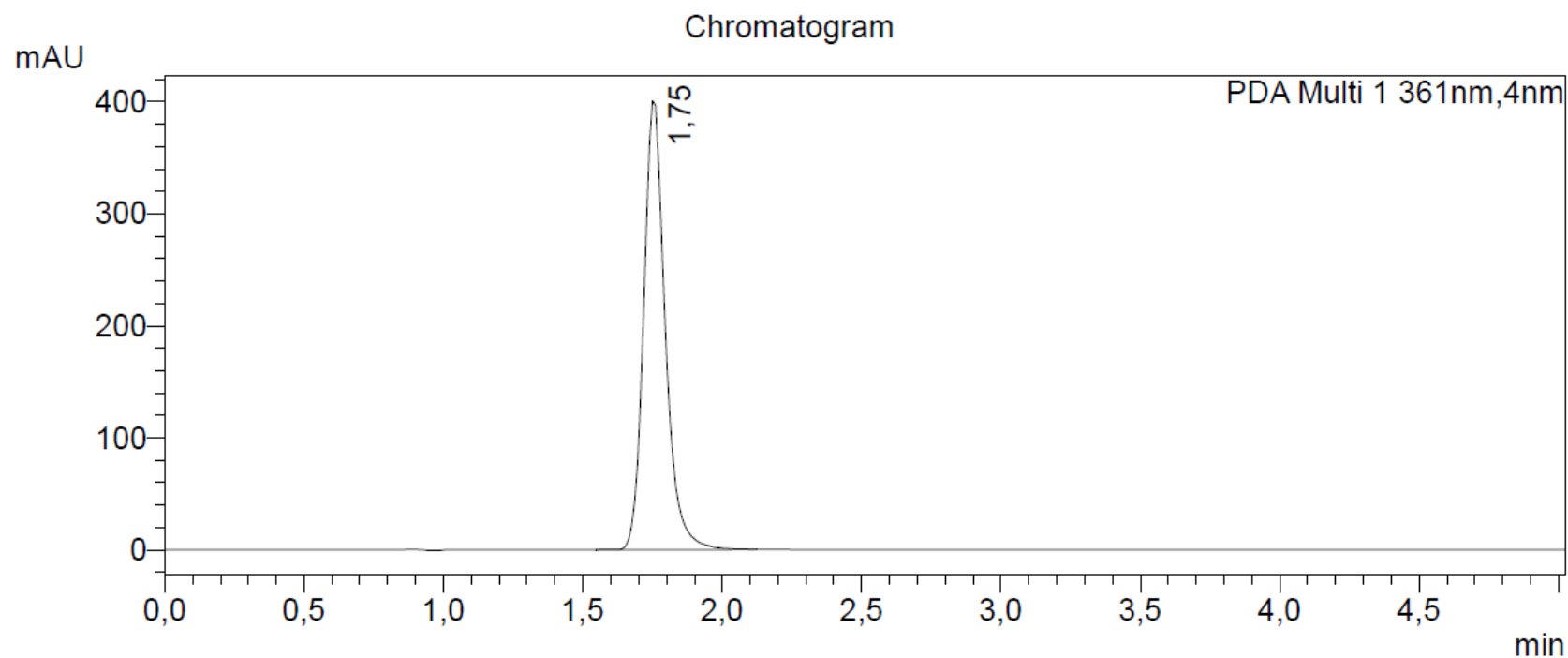
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20220330
 Time 22.21 h
 INSTRUM spect
 PROBHD z122623_0041
 PULPROG cosygpgf
 TD 2048
 SOLVENT DMSO
 NS 32
 DS 8
 SWH 5597.015 Hz
 FIDRES 5.465835 Hz
 AQ 0.1829547 sec
 RG 59.25
 DW 89.333 usec
 DE 12.00 usec
 TE 298.0 K
 D0 0.00000300 sec
 D1 1.50000000 sec
 D13 0.00000400 sec
 D16 0.00020000 sec
 IN0 0.00017860 sec
 TDav 1
 SFO1 400.2624016 MHz
 NUC1 1H
 P0 12.40 usec
 P1 12.40 usec
 PLW1 7.90320015 W
 GPAM[1] SMSQ10.100
 GPE1 10.00 %
 P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
 TD 256
 SFO1 400.2624 MHz
 FIDRES 43.743000 Hz
 SW 13.989 ppm
 FMODE QF

F2 - Processing parameters
 SI 2048
 SF 400.2599960 MHz
 WDW QSINE
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 0.60

F1 - Processing parameters
 SI 1024
 MC2 QF
 SF 400.2600033 MHz
 WDW QSINE
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0

Espectro 263: Espectro de RMN bidimensional COSY do derivado 27.



Peak Table

PDA Ch1 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	1,75		2159716	100,0	13398	1,209	--	--
Total			2159716	100,0				

Cromatograma 27: Cromatografia líquida de ultra eficiência – CLUE-UV do derivado 27.

FIM DO CADERNO DE ESPECTROS