



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CONCEPÇÃO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS
PIRIDIL-1,3-TIAZOL COMO AGENTES ANTICHAGÁSICOS.**

ELANY BARBOSA DA SILVA

**RECIFE, PE
2014**

ELANY BARBOSA DA SILVA

**CONCEPÇÃO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS
PIRIDIL-1,3-TIAZOL COMO AGENTES ANTICHAGÁSICOS.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profª. Drª. Ana Cristina Lima Leite

Co-orientador: Dr. Diogo Rodrigo de Magalhaes Moreira.

**RECIFE, PE
2014**

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586c Silva, Elany Barbosa da.
Concepção, síntese e caracterização de novos derivados piridil-1,3-
tiazol como agentes antichagásicos / Elany Barbosa da Silva. – Recife: O
autor, 2014.
104 f.: il.; tab.; fig.; 30 cm.

Orientadora: Ana Cristina Lima Leite.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.
Inclui referências e apêndices.

1. Citotoxicidade. 2. Doença de chagas. 3. Desenho de drogas. 4.
Fármacos. 5. Trypanosoma cruzi. I. Leite, Ana Cristina Lima (Orientadora).
II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-176)

ELANY BARBOSA DA SILVA

**CONCEPÇÃO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS
PIRIDIL-1,3-TIAZOL COMO AGENTES ANTICHAGÁSICOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 17/07/2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Lima Leite (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR:

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR:

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof.º Dr. Antonio Rodolfo de Faria

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Almir Goncalves Wanderley - DCFar/ UFPE

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof.^a. Dr.^a. Ana Cristina Lima Leite

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo, pois sem ele nada seria possível.

Aos meus pais, Evangelina Silva e Gregorio Silva, por todo amor, paciência, apoio e presença constante durante todos os momentos da minha vida, sempre acreditando em mim, fazendo dos meus sonhos seus próprios objetivos.

A meu querido irmão, Elesandro Silva, pelo carinho e confiança.

À Prof.^a Dr.^a Ana Cristina, pela orientação e por ter me concedido a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LpQM), desde a graduação. E ao meu co-orientador Diogo Rodrigo pela orientação, atenção e disponibilidade mesmo que a distancia.

A todos os meus familiares e padrinhos que vem acompanhando o meu progresso e sempre me motivaram a nunca desistir e batalhar pelos meus sonhos.

A minha família postiça pelo acolhimento, paciência e carinho, durante todo o trajeto na vida acadêmica. Em especial às minhas irmãs de coração, Júlia Carolina e Helena Cássia, por todos os colos e ouvidos emprestados. Com vocês eu sinto um conforto indescritível, sentindo-me segura, sem ser preciso pensar o que penso, nem medir o que digo.

Aos meus vizinhos que se tornaram minha família, sempre me apoiando e torcendo por mim, em especial a minha Dududa.

A toda equipe LpQM: Arsênio, Daura, Dayane, Edna, Laura, Marcos e Thays, em especial as fofas e companheiras Lucianna e Míria, e aos meus co-orientadores “*honoris causa*” Gevanio, Paulo André e Wanderlan. Sou grata a cada um, por todos os ensinamentos, momentos de alegria e amizade. Com vocês aprendi o verdadeiro sentido das palavras *cumplicidade* e *solidariedade*.

Aos meus velhos amigos de estrada: Alaine Souza, Bruna Carla, Joyce Reis, Luana Candice, Mara Almeida, Mayra Flávia, Tainã Aynoã, Tuyanne Ferreira e Vitoria Cavalcanti. E aos novos também: Aline Souza, Marcelo Montenegro, Micalyne Egito, Michele Barbosa, Pricila Brandão e Ulisses Oliveira.

Aos meus amigos de graduação: Asaph, Cecília, Danilo, Hellencleia, Hyalyne, Jessica, Larissa, Maria Clara, Marina, Mayara, Patrícia, Rebeka, Renata, Risoleta, com quem compartilhei momentos inesquecíveis.

Aos velhos e sempre bons Labsinfianos: Andrea, Dyego, Jannieres, Juliana, Lecílio, Lucas, Marcia, Milca e Victor, pela amizade e excelentes companhias.

A todos os funcionários do DCFAR, do DQF e do PPGCF, em especial Iguacy, tia Fátima, Eliete e Nerilin.

A todos que participaram na execução deste projeto, em especial Aline Caroline, Thiago Santos e a Professora Valéria Pereira.

Agradeço sinceramente aos mestres que, muito mais que mestres, foram meus amigos; e minha compreensão aos somente mestres e àqueles que, com seus problemas e dores humanas, não foram amigos nem mestres, mas passaram por mim, meu respeito e meu afeto.

A FACEPE pela bolsa concedida durante todo o mestrado.

RESUMO

Doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença protozoária causada por um parasita hemoflagelado, o *Trypanosoma cruzi*. É uma infecção parasitária crônica e debilitante que afeta milhões de pessoas no México, América Central e América do Sul. Aproximadamente 25% da população da América Latina está em risco de contrair a infecção. Embora o nifurtimox ainda seja utilizado em alguns países, o único fármaco atualmente disponível no Brasil é o nitro-heterocíclico benznidazol. Este medicamento é eficaz na fase aguda da doença, mas a sua eficácia durante a fase crônica é discutível, o que torna imprescindível a busca por novas drogas anti-*T. cruzi*. Neste trabalho, realizou-se a concepção, síntese e avaliação da atividade tripanocida de alguns derivados piridil-1,3-tiazol. Estes derivados heterocíclicos foram estruturalmente planejados, explorando o conceito de hibridização molecular entre os anéis piridina e tiazol, que tem revelado propriedades tripanocida. Neste contexto, foi planejada a síntese de uma série de 26 inéditos piridil-1,3-tiazol (LpQM 2a-m; 3a-m) por meio da modificação dos substituintes no nitrogênio do anel tiazol e variação dos substituintes ligados ao anel aromático. A elucidação estrutural foi realizada por meio da utilização de técnicas espectroscópicas de RMN ^1H , RMN ^{13}C e IV. A fim de avaliar o potencial antichagásico destes compostos, avaliou-se o efeito anti-proliferativo sobre a forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi* (cepa DM28c) e atividade citotóxica frente as formas tripomastigota da Cepa Y, assim como a citotoxicidade deles sobre esplenócitos de camundongos BALB/c, tendo como drogas de referência o benznidazol e nifurtimox. À exceção dos compostos LpQM 2h e 2k, todas as piridil-1,3-tiazol exibiram atividade citotóxica contra a forma evolutiva tripomastigota superior ao medicamento referência benznidazol. Os derivados LpQM 3d e 3k foram os compostos destaques, $\text{CC}_{50} = 1.2$ e $1.6 \mu\text{M}$, respectivamente. Estes compostos não apresentaram efeitos citotóxicos nas suas concentrações tripanocidas, sendo considerado um bom ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Doença de Chagas. Desenho de drogas. Fármacos. *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is a protozoan disease caused by the haemoflagellate parasite *Trypanosoma cruzi*. It is a chronic and debilitating parasitic infection that affects millions of people in Mexico, Central America, and South America. Approximately 25% of the population of Latin America is at risk for acquiring the infection. Although nifurtimox is still used in some countries, the available drug for the clinical treatment of Chagas disease in Brazil is the nitroheterocyclic drug benznidazole. This drug is effective against the circulating form of the parasite (trypomastigotes) in the acute phase of the disease, but its efficacy during the chronic stage is debatable, which necessitates the search for new anti-*T. cruzi*. Herein, the design, synthesis and evaluation of trypanocidal activity of some novel pyridyl-1,3-thiazole derivatives. These heterocyclic derivatives were structurally planned by exploring the concept of molecular hybridisation between pyridine and thiazole, which has potent trypanocidal activity. In this context, it was planned the synthesis of a series of novel 26 pyridyl-1,3-thiazole derivatives (**LpQM 2a-m; 3a-m**) by modifying the substituents on the nitrogen of the thiazole ring and variation of the substituents attached to the aromatic ring. The structural elucidation was performed by the use of spectroscopic techniques ^1H NMR, ^{13}C NMR and IR. In order to evaluate the potential anti-chagasic activity of these pyridyl-1,3-thiazole, we evaluated their anti-proliferative effect on *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms (DM28c strain strain) and cytotoxic activity against the trypomastigote forms of the Y strain, as well as their cytotoxicity on splenocytes from BALB/c mice, with the reference drugs benznidazole and nifurtimox. Except for compounds **LpQM 2h** e **2k**, all pyridyl-1,3-thiazole evaluated exhibited cytotoxic activity against the trypomastigote forms this evolutionary way higher than the reference medicament benznidazole. The 3d and 3k LpQM derived compounds were highlights, $\text{CC}_{50} = 1.2$ e $1.6 \mu\text{M}$, respectively. These compounds did not present cytotoxic effects at concentrations trypanocidal, being considered a good starting point for the development of new anti-Chagas drug candidates.

Keywords: Citotoxicidad. Chagas disease. Drug design. Drug. *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Estruturas químicas do Benznidazol (Rochagan®, Rodanil®) (1) e do Nifurtimox (Lampit®). 16
- Figura 2** Estimativa da população global afetada pelo *Trypanosoma cruzi*, 2009. 19
- Figura 3** Número estimado de imigrantes infectados com *Trypanosoma cruzi* vivendo em países não endêmicos. 20
- Figura 4** Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. **a.** Epimastigota, **b.** Tripomastigota e **c.** Amastigota. 22
- Figura 5** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. 23
- Figura 6** Principais vetores da doença de Chagas na América do Sul e América Central. 24
- Figura 7 A:** Sinal de Romana; **B:** Chagoma de inoculação. 24
- Figura 8** Anatomia de um coração Chagásico e megacólon. 25
- Figura 9** Características das fases clínicas da doença de Chagas 26
- Figura 10** Estruturas químicas do E1224 (3) e do ravuconazol (4). 29
- Figura 11** Demonstração da cruzaiña em diferentes compartimentos durante o ciclo evolutivo do *T. cruzi*. 31
- Figura 12** Estrutura cristalográfica da cruzaiña de *T. cruzi* (PDB ID 1ME4). Inibidores da enzima alvo de diferentes classes químicas 32
- Figura 13** Estrutura química do núcleo tiazol. 32
- Figura 14** Estruturas de moléculas contendo o núcleo tiazol e os seus valores de toxicidade para forma tripomastigota. 36

Figura 15 Concepção dos novos derivados piridil-1,3-tiazóis, (LpQM 2 a-m e 3 a-m)	38
Figura 16 Rota sintética para obtenção das piridil-1,3-tiazóis (LpQM 2 a-m e LpQM 3 am).	39
Figura 17 Obtenção das tiossemicarbazonas LpQM 1 a-b .	40
Figura 18 Procedimento sintético geral das piridil-1,3-tiazóis (LpQM 2 a-m e 3 a-m)	41
Figura 19 Espectro de infravermelho da molécula LpQM 2a .	42
Figura 20: Espectro do RMN ¹ H da molécula LpQM 2a .	43
Figura 21: Espectro do RMN ¹³ C da molécula LpQM 2a .	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Frequência dos efeitos colaterais em adultos associado ao uso do Nifurtimox e do Benznidazol.	28
Tabela 02. Atividade anti- <i>T. cruzi</i> das piridil-1,3-tiazol LpQM 2 a-m.	45
Tabela 03. Atividade anti- <i>T. cruzi</i> das piridil-1,3-tiazol LpQM 3 a-m.	47
Tabela 04. Análise das propriedades dos compostos mais promissores com base na regra de Lipinski.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt:	Acetato de etila
AcOH:	Acido acético
BDZ:	Benznidazol
CCD:	Cromatografia em Camada Delgada
CC₅₀:	Concentração citotóxica necessária para inibir 50% de um parâmetro
CHCl₃-d₆:	Clorofórmio deuterado
CI₅₀:	Concentração de inibidor necessária para inibir 50% de um parâmetro
ClogP:	Coefficiente de log de P
Cq:	Carbono quaternário
d:	Dubleto
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DMSO-d₆:	Dimetilsulfóxido deuterado
DNDi:	Drugs for Neglected Diseases initiative
ELISA:	Ensaio de imunoflorescência enzimático
EMAR:	Espectroscopia de Massas de Alta Resolução
ESI:	Técnica de ionização por electrospray
F.M:	Fórmula Molecular
Hex.:	Hexano
Hz:	Hertz
IFI:	Imunofluorescência indireta
IV:	Infravermelho
J:	Constante de acoplamento
LAFEPE:	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco

m:	Multiplato
NADP:	Nucleotídeo piridina protético
NFX :	Nifurtimox
OMS:	Organização Mundial de Saúde
PCR:	Reação em cadeia da polimerase
PF:	Ponto de fusão
Ph:	Fenil
PM:	Peso molecular
REA:	Relação Estrutura-atividade
Rend.:	Rendimento
R_f:	Fator de retenção
RMN ¹³C:	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H:	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
RPMI:	"Roswell Park Memorial Institute"
s:	Singleto
SBF	Soro bovino fetal
t:	Triplato
ta:	Temperatura ambiente
<i>T. cruzi:</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TOF:	Detecção no modo "time-of-flight"
UV:	Ultravioleta
WB:	Western blot

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. DOENÇA DE CHAGAS.....	18
2.1.1. HISTÓRICO.....	18
2.1.2. EPIDEMIOLOGIA.....	19
2.1.3. FORMAS EVOLUTIVAS E CICLO BIOLÓGICO DO <i>T. cruzi</i>	21
2.1.4. TRANSMISSÃO.....	23
2.1.5. SINTOMATOLOGIA.....	24
2.1.6. DIAGNÓSTICO.....	25
2.1.7. QUIMIOTERAPIA ANTICHAGÁSICA.....	27
2.1.8. ALVOS TERAPÊUTICOS.....	29
2.2. NÚCLEOS DE INTERESSE.....	34
2.2.1. PIRIDINA.....	34
2.2.1. TIAZÓIS.....	35
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. OBJETIVO GERAL.....	37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1. SEÇÃO QUÍMICA.....	39
5.2. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	42
5.2.1. ELUCIDAÇÃO DA MOLÉCULA LpQM 2a.....	42
5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI <i>T. cruzi</i>	44
6. CONCLUSÕES.....	51
7. SEÇÃO EXPERIMENTAL.....	52
7.1. EQUIPAMENTOS E REAGENTES.....	52

7.2. ANIMAIS	62
7.3. PARASITAS.....	62
7.4. TOXICIDADE EM ESPLÊNÓCITOS.....	62
7.5. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA PARA EPIMASTIGOTAS	62
7.6. TOXICIDADE PARA TRIPOMASTIGOTA CEPA Y.....	63
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICE A.....	76
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS TIOSSEMICARBAZONAS (LpQM 1a-b) E DAS PIRIDIL-1,3-TIAZOL (LpQM 2a-m; 3a-m) E RENDIMENTOS REACIONAIS. ...	77
APÊNDICE B.....	86
ESPECTROS DE IV E RMN DE ALGUNS PIRIDIL-1,3-TIAZOIS SINTETIZADOS. .	86

1. INTRODUÇÃO

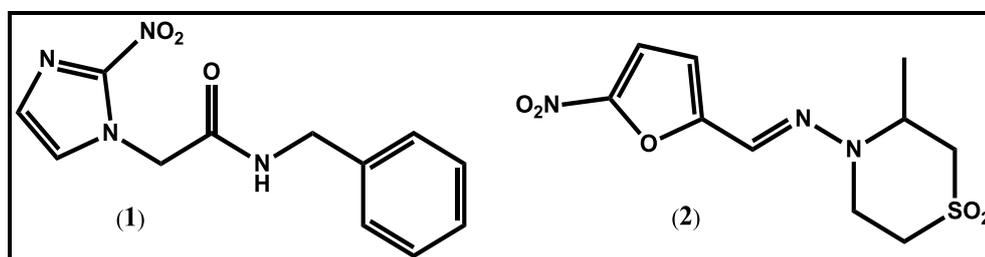
Doenças tropicais negligenciadas são um grupo diverso de infecções clinicamente causadas por uma variedade de agentes patogênicos, tais como vírus, bactérias, protozoários e helmintos. Elas afetam principalmente as populações pobres que vivem em climas tropicais e subtropicais. Dezesete doenças desse grupo são priorizadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em termos de ação combativa, afetam mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo, sendo endêmicas em cento e quarenta e nove países, e causam imenso sofrimento humano e morte [1].

Entre as 17 doenças negligenciadas priorizadas pela OMS, está a doença de Chagas ou também chamada tripanossomíase americana, uma infecção parasitária, sistêmica e crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Transmitida aos seres humanos, principalmente através das fezes de insetos triatomíneos, conhecidos como barbeiros, pelo hábito de picar o rosto de suas vítimas [2].

A doença de Chagas apresenta uma larga distribuição geográfica, sendo endêmica na América do Sul e América Central, afetando dezoito países [3], tornando-se um dos principais problemas de saúde pública nesta região, com elevados índices de morbidade e mortalidade. Estima-se que 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas no mundo, surgindo cerca de cinquenta mil novos casos a cada ano e que cerca de 7 a 8 milhões de pessoas estão sob o risco de infecção em todo o mundo, principalmente na América Latina onde a doença de Chagas é endêmica [1].

A quimioterapia específica atual restringe-se a apenas um fármaco nitro-heterociclo: o Benznidazol - (Lafepe®) (1) - descoberto no ano de 1970 - caracterizado por longo tempo de terapia, originando efeitos colaterais graves, que levam à descontinuidade do tratamento[4]. O Nifurtimox (NFX) – (Lampit®) (2) foi desenvolvido empiricamente em 1960, no entanto não é mais prescrito, pois apresenta eficácia inferior a do Benznidazol (BDZ) [5] (Figura 01).

Figura 01: Estruturas químicas do BDZ (Lafepe®) (1) e do NFX (Lampit®) (2).



Outra relevante questão a ser considerada é a falta de interesse das empresas farmacêuticas no desenvolvimento de novos medicamentos para certas doenças, entre elas o mal de Chagas [6]. Isso se estabelece devido aos fatores socioeconômicos dos países endêmicos com esta enfermidade, visto que são países subdesenvolvidos nos quais a maioria da população vive com menos de US\$ 2 por dia [7].

Na busca de novos fármacos para o tratamento da tripanossomíase americana, a catepsina L-cisteína protease, também conhecida como cruzipaina ou cruzaina, vem se destacando como um potente alvo tendo em vista que é a principal cisteinil protease do parasita *Trypanosoma cruzi*. Ela é expressa em todas as fases do ciclo de vida do parasita e desempenha um papel fundamental durante a infecção de células hospedeiras, replicação e metabolismo [8]. Por esse motivo é considerada um alvo importante para o desenvolvimento de novos agentes anti *T. cruzi* [9].

Compostos não peptídicos baseados em tiossemicarbazonas e seus bioisómeros cíclicos (4-tiazolinonas e 1,3-tiazóis) tem demonstrado atividade contra *T. cruzi* e cruzaina [10-16]. Por essa razão, muitas tentativas tem sido feitas para explorar as relações estrutura-atividade (REA), com intuito de conceber compostos menos tóxicos e com efeitos tripanocidas melhorados [16-22].

Do mesmo modo, derivados da 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas provaram ser excelentes inibidores do crescimento do *T. cruzi*, sendo 55 a 70 vezes mais ativos do que o NFX e BDZ, respectivamente[23]. Complexos de antimônio (III) de tiossemicarbazonas derivadas de piridina apresentaram atividade tripanocida contra epimastigota e tripomastigotas do *T. cruzi*, superior às drogas de referência NFX e BDZ [24].

Face à necessidade de identificar novos candidatos a fármacos, úteis no tratamento da doença de Chagas, e em virtude do potencial tripanocida dos 1,3-tiazóis, este trabalho descreve o planejamento estrutural, a síntese, a avaliação farmacológica das propriedades anti *T.cruzi* e as REAs de inéditos derivados piridil-tiazolil, planejados por estratégias de bioisosterismo e hibridação molecular.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A seguir será feita uma análise crítica, meticulosa e ampla sobre os assuntos relevantes para o desenvolvimento deste trabalho.

2.1. DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas ou também chamada tripanossomíase americana, uma infecção parasitária, sistêmica e crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Transmitida aos seres humanos, principalmente através das fezes de insetos triatomíneos, conhecidos como barbeiros, pelo hábito de picar o rosto de suas vítimas [2].

2.1.1. HISTÓRICO

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, foi descrita pela primeira vez em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, enviado à frente da construção da estrada de ferro Central do Brasil, em Lassance/MG, para estudar uma doença que acometia os trabalhadores, incapacitando-os. De maneira notável, ele descreveu detalhadamente o parasita causador da doença, o vetor, o ciclo de vida do parasita e da transmissão e vários aspectos epidemiológicos, clínicos e sociais da doença [25].

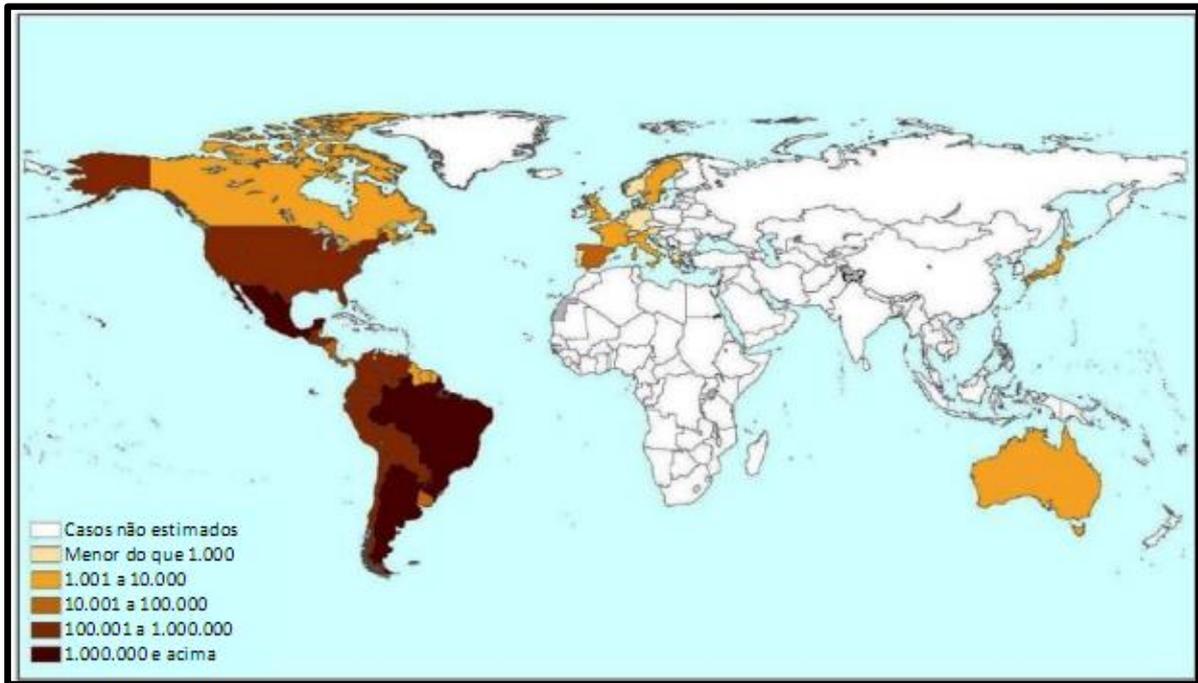
Antes mesmo da descoberta de Carlos Chagas, durante uma expedição pela América do Sul em 1835, Charles Darwin pode ter contraído a infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que ele descreveu o contato com insetos triatomíneos, além de conviver com determinados sintomas desta doença ao longo de sua vida [26]. Estudos paleoparasitológicos foram capazes de recuperar o DNA do *T. cruzi* em múmias humanas mostrando que esta enfermidade acomete os homens há mais de 900 anos [27].

Há milhares de anos, a doença de Chagas era uma doença enzoótica de animais silvestres, que se estabeleceu como uma zoonose quando o homem invadiu os ecótopos naturais destes animais, através do desmatamento provocado pela expansão da agricultura e agropecuária; promovendo desta forma, a adaptação dos insetos silvestres ao ambiente domiciliar na procura de novas fontes de alimentos [28]. O homem se fez incluir no ciclo epidemiológico da doença, oferecendo ao vetor hemíptero vivendas rurais de péssima qualidade, as chamadas “casas de pau-a-pique” [29].

Estima-se que aproximadamente 8 a 10 milhões de pessoas distribuídas entre México, América Central e América do Sul tenham a doença. A maioria dessas não sabe que estão

infectadas. Movimentos da população em grande escala de áreas rurais para áreas urbanas da América Latina e de outras regiões do mundo aumentaram a distribuição geográfica da doença de Chagas (**Figura 02**), e por isso foram identificados casos em muitos países, particularmente na Europa [30, 31].

Figura 02: Estimativa da população global afetada pelo *Trypanosoma cruzi*, 2009.



2.1.2. EPIDEMIOLOGIA

Um século após sua descoberta, a doença de Chagas permanece como uma doença tropical negligenciada na América Latina [32, 33]. A partir de 1970, alguns países endêmicos como Brasil, Argentina, Chile, Bolívia e México iniciaram programas nacionais de controle da doença, com políticas voltadas para o controle de vetores e melhorias em biossegurança nas transfusões de sangue e transplantes [33]. Como resultado, estes programas foram responsáveis pelo decréscimo na incidência da doença de 700 mil casos/ ano para 40 mil/ ano, e no número anual de mortos, de mais de 45 mil para 12.500 em 2006 [34].

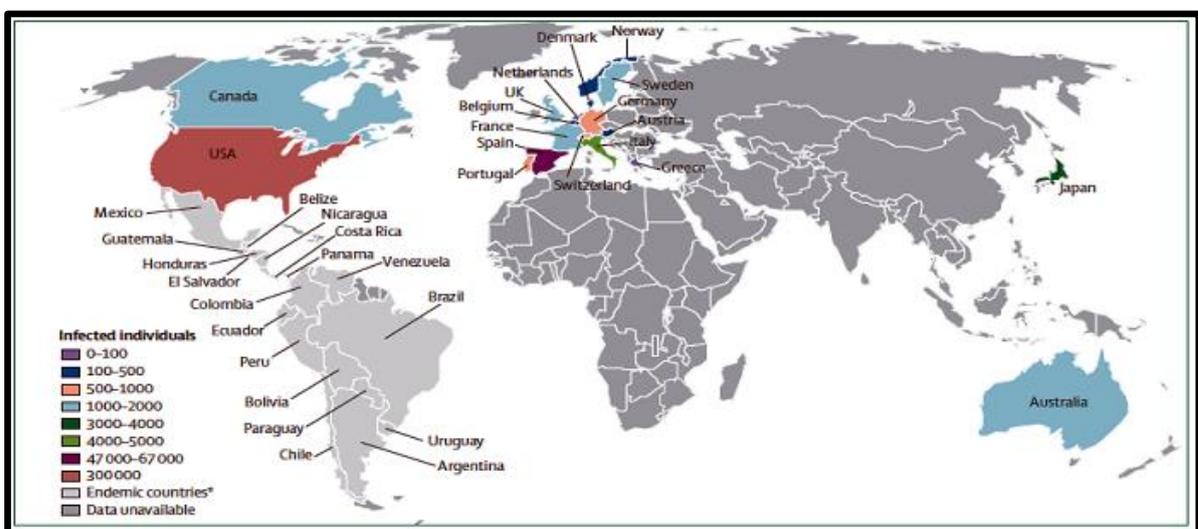
A incidência mundial da doença segundo a OMS vem caindo nos últimos anos de 7 para aproximadamente 4 milhões de pessoas [35, 01]. Estima-se que 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo, surgindo cerca de 50 mil novos casos a cada ano e estima-se que, entre 2015 a 2030, 7947 pessoas no mundo morrerão [01]. A doença de Chagas é a maior causa de mortalidade e morbidade na América Latina, um

peso para a economia e afeta drasticamente as condições sociais e de trabalho dos pacientes acometidos [36].

Por outro lado, a doença de Chagas não está confinada à América Latina, sendo detectados casos na Europa, Estados Unidos e Canadá, relacionados ao risco de transmissão por transfusão sanguínea e transplantes de órgãos, a partir de um grande número de imigrantes provenientes de países endêmicos nestes países [39, 40] (Figura 03) [30]. Devido ao crescimento da migração, turismo internacional, transfusão sanguínea, transplantes e transmissão vertical, a doença de Chagas é hoje um problema de saúde mundial [39].

No Brasil, a estimativa é de que aproximadamente 3 milhões de pessoas estejam infectadas e 5 milhões sob o risco de contrair a doença [40]. Minas Gerais é considerado um dos estados com maior prevalência da endemia chagásica, tendo sido coincidentemente o palco da descoberta desta doença [01]. A região Amazônica apresenta um crescente risco da enfermidade de Chagas se tornar endêmica, relacionado principalmente pela adaptação de vetores e animais silvestres - infectados com o *T. cruzi* - ao domicílio humano, em consequência do desflorestamento incontrolado na região [41]. A doença de Chagas é a quarta causa de morte no Brasil, entre as doenças infecto-parasitárias, sendo a faixa etária mais atingida acima dos 45 anos [42].

Figura 03: Número estimado de imigrantes infectados com *Trypanosoma cruzi* vivendo em países não endêmicos.



2.1.3. FORMAS EVOLUTIVAS E CICLO BIOLÓGICO DO *T. cruzi*

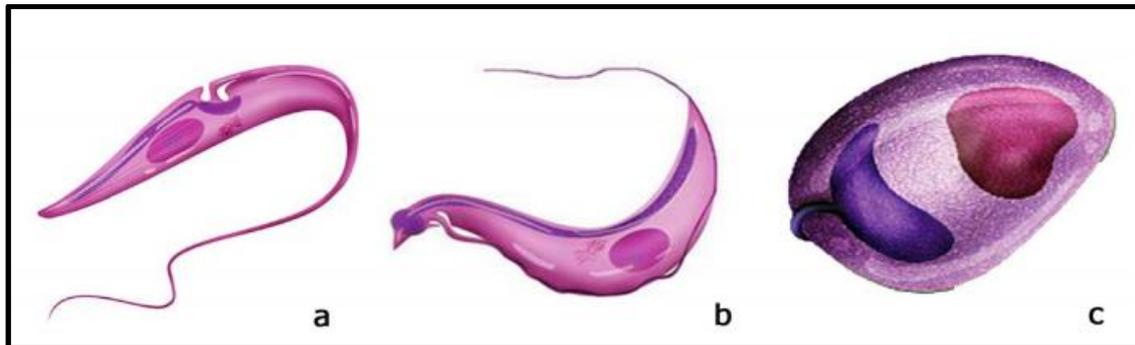
O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado pertencente à família Trypanosomatidae. Esse parasita desenvolve o seu ciclo de vida em hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (triatomíneos), assumindo diferentes estágios evolutivos. Como os ambientes apresentados ao *T. cruzi* são muito diferentes em suas características físico-químicas, este desenvolveu ao longo da sua evolução estratégias que o tornaram capaz de lidar com tais diferenças. Características do parasita como ciclos metabólicos, expressão diferenciada de moléculas internas e de superfície, capacidade de infecção, de multiplicação, entre outras, devem ser adequadas a cada novo ambiente. Além das mudanças fisiológicas, estas formas se diferenciam morfológicamente pelas posições do flagelo e do cinetoplasto em relação ao núcleo. Com base nestas características, o *T. cruzi* possui em seu ciclo de vida três estágios evolutivos: epimastigota, tripomastigota e amastigota [43] [44] (Figura 04).

As formas epimastigotas são alongadas e medem entre 20 e 40 μm , tem o cinetoplasto em forma de bastão, localizado próximo à bolsa flagelar e anterior ao núcleo, e possui o flagelo livre. São formas replicativas, não-infectantes, encontradas no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado.

As formas tripomastigota são fusiformes, levemente achatadas e medem aproximadamente 25 μm , apresentam o cinetoplasto arredondado e posterior ao núcleo, o flagelo emerge da região posterior aderindo-se à membrana plasmática, tornando-se livre na região anterior. Não apresentam capacidade de multiplicação e são as formas infectantes para ambos os hospedeiros. No hospedeiro vertebrado essas formas são encontradas no sangue (tripomastigotas sanguíneas) enquanto que no hospedeiro invertebrado são encontradas na porção final do intestino (tripomastigotas metacíclicas).

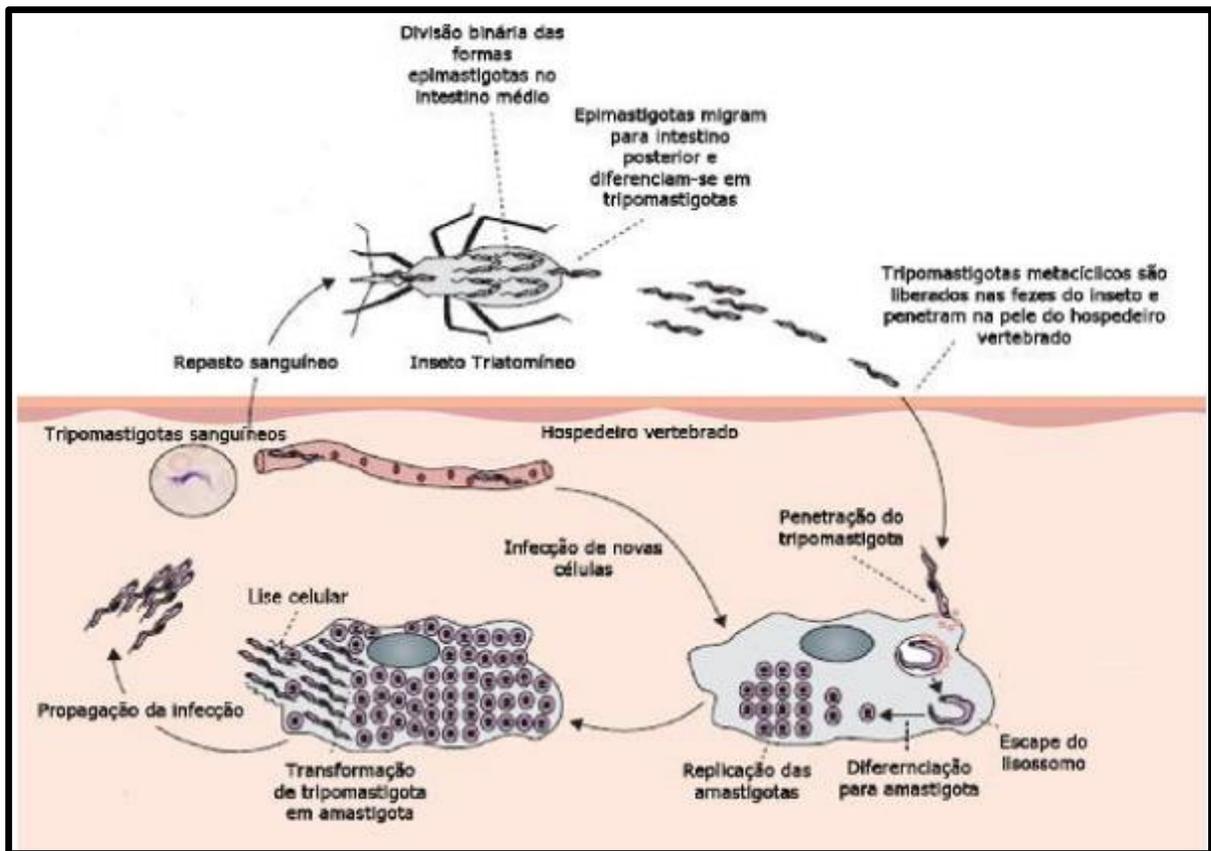
As formas amastigotas são arredondadas com aproximadamente 5 μm de diâmetro, seu cinetoplasto tem forma de bastão, situado entre o núcleo e o flagelo. Este último é muito curto, restrito ao interior da bolsa flagelar. O núcleo é relativamente grande, arredondado e excêntrico. Estas formas são intracelulares multiplicativas, encontradas no interior das células do hospedeiro vertebrado, preferencialmente em macrófagos, células musculares cardíacas e do tecido digestivo [45].

Figura 04: Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. **a.** Epimastigota, **b.** Tripomastigota e **c.** Amastigota [46].



O ciclo biológico do *T. cruzi* é bastante complexo e envolve a passagem obrigatória por hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (insetos triatomíneos hematófagos). No inseto, o ciclo tem início quando durante o seu repasto sanguíneo ele ingere formas tripomastigotas sanguíneas. No estômago, estas formas se diferenciam em epimastigotas e se proliferam por divisão binária no lúmen do intestino. Na porção terminal do intestino, essas formas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, as quais serão eliminadas nas fezes do inseto durante seu repasto sanguíneo no mamífero. No hospedeiro vertebrado, as formas metacíclicas penetram em macrófagos e em células do tecido cardíaco e digestivo, escapam do vacúolo fagolisossomal e se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária no citoplasma da célula hospedeira. Depois de alguns ciclos de multiplicação, as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas, que serão liberadas pela ruptura da célula hospedeira, podendo então invadir novas células, tecidos ou então serem ingeridas pelo inseto, completando assim o ciclo de vida do parasita (**Figura 05**) [30]

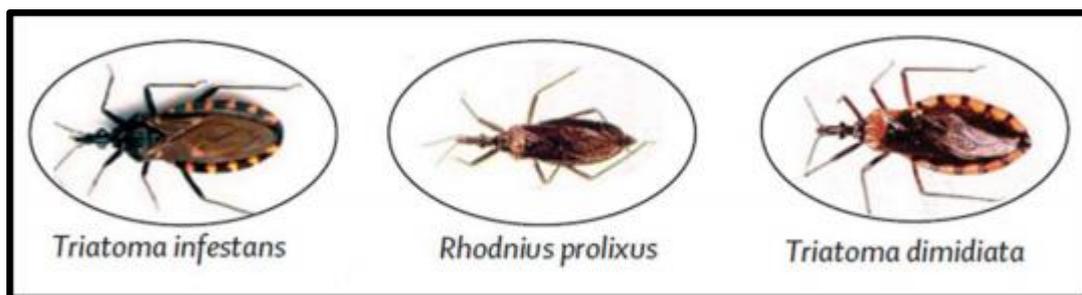
Figura 05: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



2.1.4. TRANSMISSÃO

A principal via de transmissão da doença de Chagas é a vetorial, através de insetos triatomíneos hematófagos. Embora mais de 130 espécies de triatomíneos sejam conhecidas, apenas alguns são vetores competentes para o *T. cruzi* [46]. Na América Central, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são as principais espécies implicadas na transmissão vetorial (Figura 06). Todos os estágios de desenvolvimento dos triatomíneos são capazes de transmitir o protozoário, porém sua capacidade de infecção aumenta de acordo com o número de repastos sanguíneos, sendo os insetos adultos os que apresentam as maiores taxas de infecção [30].

Figura 06: Principais vetores da doença de Chagas na América do Sul e América Central.

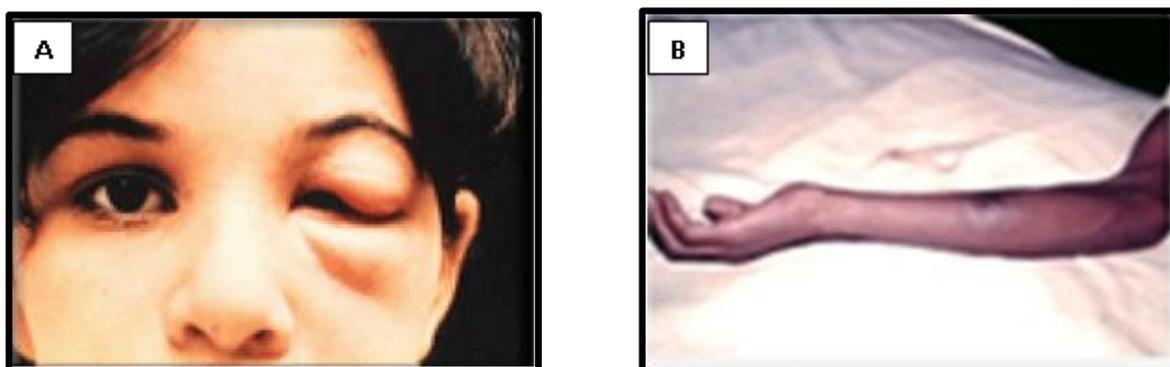


Outras formas não convencionais de infecção também podem ser encontradas tais como: transfusão sanguínea, transplacentária, transplante de órgãos, acidentes de laboratório. Recentemente, a transmissão oral, através da ingestão de alimentos contaminados com excretas dos triatomíneos, passou a ocupar um importante papel na disseminação da doença [27, 47], visto que foi responsável por surtos de infecção aguda em áreas desprovidas de insetos vetores domiciliados. Esta via de infecção resulta em um quadro clínico agudo grave associado a uma infecção parasitária maciça, com altas taxas de mortalidade [48].

2.1.5. SINTOMATOLOGIA

A doença de Chagas apresenta duas fases bem caracterizadas e distintas: uma fase aguda e uma crônica. A fase aguda se inicia logo após a infecção, podendo durar de 4 a 8 semanas, e é caracterizada por uma alta parasitemia e pela presença de infiltrados inflamatórios em diversos tecidos. Geralmente é assintomática ou pode apresentar sintomas menos específicos tais como febre e edema no local da inoculação - chagoma de inoculação ou sinal de Romaña- (**Figura 07**). A mortalidade nesta fase ocorre ocasionalmente (5-10% dos casos sintomáticos) como resultado de uma miocardite ou meningoencefalite grave [49, 50].

Figura 07: A: Sinal de Romaña; B: Chagoma de inoculação [51].



Estudos mostram que 60 a 70% dos pacientes não irão desenvolver clinicamente a doença, caracterizando a forma crônica indeterminada da doença de Chagas, que apresenta positividade para exames sorológicos com exames radiológicos e eletrocardiograma normais. Na ausência de um tratamento específico, 30 a 40% dos pacientes desenvolvem a fase crônica determinada, que é caracterizada por lesões irreversíveis em alguns órgãos, tais como o coração, o esôfago e o cólon [52].

Na fase crônica cardíaca, que é mais séria e mais frequente, ocorre uma miocardite lentamente progressiva com o comprometimento da função contrátil do músculo cardíaco, além de outras anomalias semelhantes àsquelas observadas em doenças coronarianas [53]. A fase crônica digestiva é causada pela destruição dos gânglios autonômicos intramural, que afeta o esôfago e o cólon causando a sua dilatação e caracterizando assim as síndromes dos “megas”: megacólon e megaesôfago. A associação da doença cardíaca com o megacólon e o megaesôfago define a forma cardiodigestiva da doença de Chagas, que é menos frequente (Figura 08) [54, 55].

Figura 08: Anatomia de um coração Chagásico e megacólon [55].

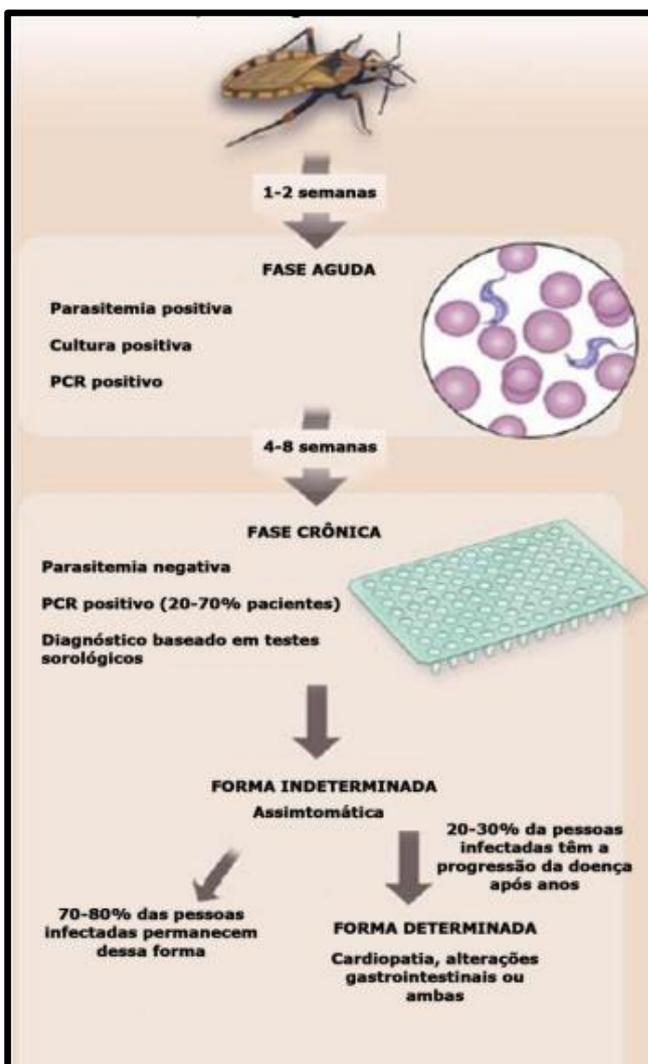


2.1.6. DIAGNÓSTICO

Na fase aguda e nas formas crônicas da doença de Chagas, o diagnóstico etiológico poderá ser realizado pela detecção do parasita por meio de métodos parasitológicos (diretos ou indiretos) e pela presença de anticorpos no soro através de testes sorológicos, sendo os mais utilizados imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação e ensaio imunoenzimático (ELISA). Testes de maiores complexidades como o teste molecular, utilizando reação em cadeia da polimerase (RCP) acoplado à hibridização com sondas moleculares, e o *Western blot* (WB) tem apresentado resultados promissores e poderão ser

utilizados como teste confirmatório tanto na fase aguda, como nas formas crônicas da doença [56]. Na **Figura 09**, estão descritas algumas características das fases clínicas e métodos para diagnóstico.

Figura 09: Características das fases clínicas da Doença de Chagas [57].



Fonte: Adaptado de Bern (2011).

Na fase aguda da doença de Chagas o diagnóstico laboratorial é baseado na observação do parasito presente no sangue dos indivíduos infectados, através de testes parasitológicos diretos como exame de sangue a fresco, esfregaço e gota espessa. O teste direto a fresco é mais sensível que o esfregaço corado e deve ser o método de escolha para a fase aguda. Caso estes testes sejam negativos, devem ser usados métodos de concentração. Os testes de concentração (micro-hematócrito) apresentam 80 a 90% de positividade e são recomendados no caso de forte suspeita de doença de Chagas aguda e negatividade do teste

direto a fresco. Em casos sintomáticos por mais de 30 dias, devem ser os testes de escolha, uma vez que a parasitemia começa a declinar [56].

Na fase crônica da doença, o diagnóstico parasitológico direto torna-se comprometido em virtude da ausência de parasitemia. Os métodos parasitológicos indiretos (xenodiagnóstico ou hemocultivo) que podem ser utilizados apresentam baixa sensibilidade (20-50%). Sendo assim, o diagnóstico na fase crônica é essencialmente sorológico e deve ser realizado utilizando-se dois testes de princípios metodológicos diferentes: um teste de elevada sensibilidade (ELISA com antígeno total ou frações semi-purificadas do parasito ou a IFI) e outro de alta especificidade (ELISA, utilizando antígenos recombinantes específicos do *T. cruzi*) [56].

2.1.7. QUIMIOTERAPIA ANTICHAGÁSICA

A terapêutica da doença de Chagas teve início em 1909, logo após a descoberta da doença e consistia no uso de medicamentos à base de arsênico e antimônio. Dentre os agentes quimioterápicos empregados entre os anos de 1936 a 1960, destacaram-se os derivados de quinoleínas, antimaláricos, arsenobenzóis e outros arsemicais [58].

No final da década de 1960 e início da década 1970, duas drogas, o Nifurtimox (NFX) e o Benznidazol (BDZ), surgiram com melhores perspectivas para o tratamento da Doença de Chagas, tanto pelo potencial curativo, particularmente na fase aguda, como pela tolerância. Ambas as drogas promovem um efeito supressivo da parasitemia em indivíduos infectados, durante a fase aguda. Porém, o BDZ demonstra ser mais eficiente que o NFX [58, 59].

A chance de cura durante o tratamento na fase aguda é de aproximadamente 70 a 80%, ao passo em que na fase crônica a probabilidade de cura fica em torno de 10 a 20% [60], mostrando a baixa eficácia dos medicamentos nesta fase [52, 61, 62].

Apesar de ter sido um grande avanço para o tratamento da doença de Chagas, o NFX e o BDZ não são considerados fármacos ideais, por provocarem toxicidade sistêmica e sérios efeitos colaterais (Tabela 01) [57, 63, 64], o que leva à descontinuidade do tratamento.

Tabela 01: Frequência dos efeitos colaterais em adultos associado ao uso do Nifurtimox e do Benznidazol [57].

Efeitos colaterias	% de pacientes	Efeitos colaterias	% de pacientes
NIFURTIMOX		BENZINIDAZOL	
Anorexia	50-75	Dermatite alérgica	29-50
Náusea	15-50	Parestesia	0-30
Vômitos	15-26	Neuropatia periférica	0-30
Desconforto abdominal	12-40	Anorexia	5-40
Dor de cabeça	13-70	Náusea e vômitos	0-5
Vertigem	12-33	Leucopenia	<1
Alterações de humor	10-49	Trombocitopenia	<1
Insônia	10-54		
Mialgia	13-30		
Neuropatia periférica	2-5		
Diminuição da memória	6-14		
Leucopenia	<1		

Fonte: Adaptado de Bern (2011).

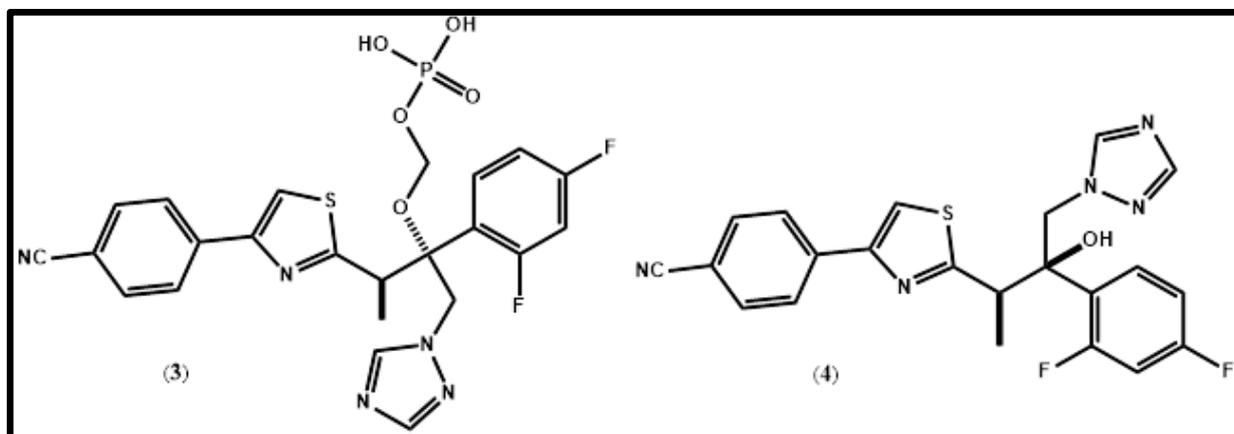
O esquema de tratamento do BDZ para adultos consiste em 5 a 7,5 mg/kg por dia, dividido em duas doses e administrado oralmente durante 60 dias. Para crianças com idade superior a 12 anos, a recomendação é uma dose não superior a 10 mg/kg ao dia. Para o NFX é recomendado 8 a 10 mg/kg ao dia, dividido em 3 ou 4 doses e administrado oralmente em um período de 90 dias. Para crianças menores de 15 anos, a dose é de 12,5 a 15 mg/kg ao dia. Em ambos os tratamentos, após 10 dias do início, os pacientes devem ser acompanhados semanalmente para o monitoramento dos efeitos colaterais [57].

No Brasil, o uso do NFX foi descontinuado, visto que os benefícios do tratamento não eram superiores aos riscos associados a ele [57], porém, pode ser utilizado como uma alternativa ao tratamento com BDZ através de programas de uso compassivo [65]. No ano de 2012, o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), em parceria com a DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative), deteve o direito de produzir o comprimido de BDZ para o tratamento da Doença de Chagas para paciente infantil com até dois anos de idade, tornando-se o único fabricante mundial [66].

Segundo o banco de dados norteamericano de estudos clínicos, um composto está sendo avaliado em humanos para a fase aguda e crônica indeterminada (**Figura 10**). O estudo de fase dois foi iniciado em 2011 e tem como objetivo avaliar a eficácia e a segurança do

composto E1224 (**3**), um pró-fármaco do ravuconazol (BMS-207147[®], **4**) [67]. Se sua eficácia for comprovada, o composto E1224 (**3**) será o primeiro medicamento introduzido na clínica nos últimos 40 anos.

Figura 10: Estruturas químicas do E1224 (**3**) e do ravuconazol (**4**).



Mesmo que o composto E1224 seja aprovado, as opções terapêuticas frente à doença de Chagas estarão longe de alcançar o ideal. Assim, torna-se imprescindível a busca por novos fármacos mais ativos e seguros, sobretudo para a fase crônica da doença. O desenvolvimento destes fármacos deve estar atrelado a alvos específicos, identificados em vias metabólicas essenciais para o *T. cruzi*.

2.1.8. ALVOS TERAPÊUTICOS

O desenvolvimento de novos fármacos para a doença de Chagas pode surgir através da prospecção de produtos naturais e sintéticos que tenham similaridade com compostos usados para outras doenças e/ou através da determinação de alvos específicos identificados em vias metabólicas essenciais para o *T. cruzi* [52, 68, 69].

A infecção pelo *T. cruzi* ocorre de maneira complexa e através de diversos mediadores patogênicos, neste contexto, intervenções terapêuticas devem ser feitas no intuito de inviabilizar esta infecção. Dentre os mecanismos mais explorados para esta finalidade estão o estresse oxidativo, a interação parasita-hospedeiro e o metabolismo [70, 71].

Vários alvos biológicos têm sido apontados como alvos terapêuticos potenciais para a doença de Chagas, dentre eles destacam-se: a enzima tripanotiona redutase, a transialidase, a

biossíntese de esteróis e a cruzaína do *T. cruzi*, possibilitando assim um desenvolvimento racional de fármacos menos tóxicos e mais potentes contra o parasita [72].

A intervenção mais clássica compreende o emprego de inibidores das nitroreduases e da tripanotona redutase. Estas enzimas, que são dependentes da nicotinamida adenina dinucleotídeo, neutralizam espécies reativas produzidas por toxinas e, portanto, conferem proteção ao parasita contra o estresse oxidativo celular [70, 71].

A relação parasita-hospedeiro constitui um ponto importante para intervenção terapêutica. A forma circulante do *T. cruzi* e invasiva para células de mamíferos, tripomastigota, é coberta por uma variedade de mucinas na superfície da membrana plasmática [73]. No entanto, estas mucinas de superfície não são capazes de mascarar o reconhecimento de tripomastigotas pelo sistema imune. Isso acontece, em parte, porque mucinas e demais glicoproteínas do *T. cruzi* não possuem ácido siálico, um monossacarídeo essencial na interação célula-célula. Como alternativa, tripomastigotas expressam a enzima *trans*-sialidase, que além de hidrolisar o ácido siálico também o transfere das células de mamíferos para as mucinas de superfície do parasito [74]. Logo, esta enzima confere ao parasita habilidade em escapar do sistema imune. Todavia, a *trans*-sialidase não é expressa em amastigotas, que é de grande relevância para a fase crônica sintomática da infecção. Tal fato constitui um fator limitante para o desenvolvimento de fármacos baseado em inibidores desta enzima [75].

O *T. cruzi* requer esteróis específicos para a proliferação e a viabilidade de células em todos os estágios de seu ciclo, sendo este parasita susceptível aos inibidores da biossíntese de esteróis. O principal esterol para o desenvolvimento do *T. cruzi* é o ergosterol, tornando a via de biossíntese desse lipídeo um alvo atrativo para o desenvolvimento de fármacos [76]. As enzimas mais estudadas desta cascata metabólica são a esterol 14-demetilase, lanosterol sintase, esqualeno epoxidase, esqualeno sintase, D-24(25) esterol metiltransferase, farnesilpirofosfato sintase e a farnesiltransferase [77].

Outros alvos promissores para intervenção terapêutica são as cisteíno proteases, as quais conferem ao parasita habilidade de invadir células do hospedeiro, inclusive células do sistema imune [78]. Elas são enzimas proteolíticas as quais dependem da nucleofilia do grupo tiol de um resíduo de cisteína para sua atividade enzimática e que são também funcionalmente diversas e amplamente distribuídas [79, 80]. Entre as principais cisteíno proteases do *T. cruzi* destacam-se a cruzaína (gp57/51) e a autofagina-4 (*TcAtg4*), as quais possuem funções

distintas, porém complementares. A *TcAtg4* regula as alterações morfológicas do parasita durante o ciclo evolutivo, reciclando proteínas localizadas no flagelo parasitário [8, 78].

A cruzaina é expressa durante todas as formas evolutivas do *T. cruzi*, porém localizada em diferentes compartimentos (**Figura 11**). O fato de esta enzima estar localizada na superfície de amastigotas, aliado ao potencial antigênico, são indícios do envolvimento da cruzaina na relação parasita-hospedeiro [81].

Figura 11: Demonstração da cruzaina em diferentes compartimentos durante o ciclo evolutivo do *T. cruzi* [82].



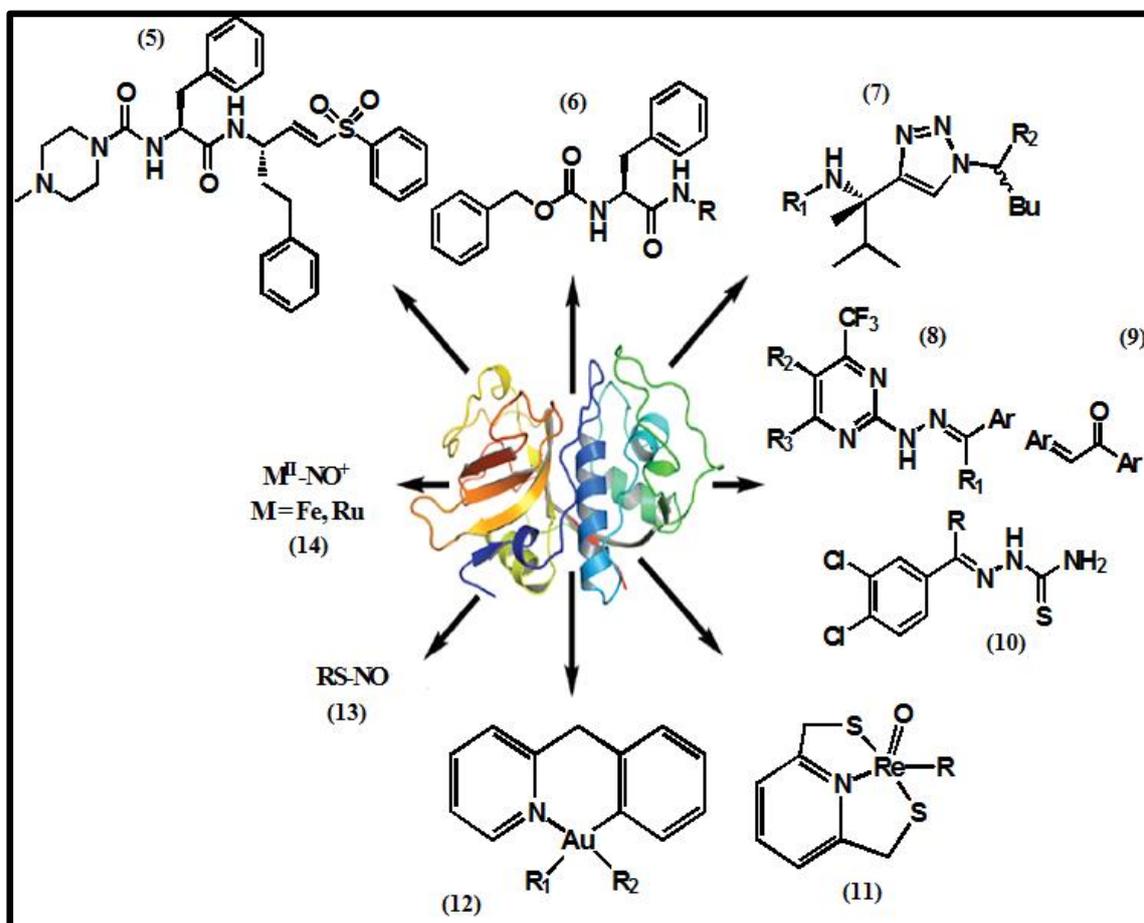
A cruzaina participa durante a adesão e invasão do parasita em células do sistema imune. Foi demonstrado que uma cepa do *T. cruzi* deficiente da cruzaina apresenta viabilidade celular, porém não estabelece infecção *in vitro* (em macrófagos) nem *in vivo* (com camundongos C3H). Além disso, observaram que macrófagos são ativados quando expostos com esta cepa deficiente, o que não acontece com uma cepa funcional ("wild-type") do *T. cruzi*. Logo, este experimento sugere que durante a invasão, a cruzaina degrada proteínas secretadas por macrófagos, prevenindo a ativação do sistema imune [83].

Tendo em vista o importante papel da cruzaina durante a infecção pelo *T. cruzi*, a identificação de inibidores desta enzima tem recebido uma atenção considerável. As principais classes de inibidores incluem (**Figura 12**): (i) derivados peptídicos (5 e 6) [84]; (ii) derivados não-peptídicos (triazóis 7, pirimidinas 8, chalconas 9 e tiossemicarbazonas 10) [85]; (iii) complexos de rênio e ouro (oxorênios 11 e ciclometalados de ouro 12) [86]; e (iv) doadores de óxido nítrico (nitrosotióis 13 e nitrosilo, complexos de ferro e rutênio 16) [87].

Dentre os inibidores da cruzaina, o composto K-777 merece destaque por ser capaz de inibi-la e encontra-se em estudos pré-clínicos avançados [88]. Este composto apresentou atividade tripanocida em ratos infectados com *T. cruzi* quando administrado intraperitonealmente, além de não apresentar toxicidade aparente [89]. Entretanto, o K777 é um composto peptídico, logo sua eficácia pode ser comprometida por via oral.

Neste âmbito, busca-se identificar inibidores não peptídicos. Baseado na relação bioisostérica conhecida entre ligações peptídicas e ureias, os primeiros inibidores não peptídicos da cruzaina identificados foram aril-ureias e tioureias, que exibiram uma afinidade moderada contra cruzaina e atividade antiproliferativa nas culturas das formas amastigotas [90].

Figura 12: Estrutura cristalográfica da cruzaina de *T. cruzi* (PDB ID 1ME4). Inibidores da enzima alvo de diferentes classes químicas [77].



Após estas constatações, tiossemicarbazonas e seus pirazolina-1-tiocarboxiamida bioisósteros foram explorados como inibidores potenciais da cruzaina, uma vez que tioureias e tiossemicarbazonas são classicamente consideradas como bioisósteros. Guiados pela potência das tiossemicarbazonas, outras classes de inibidores não peptídicos da cruzaina têm sido desenvolvidas, explorando amidas funcionalizadas, hidrazonas, 4-tiazolinonas, 1,3-tiazóis e triazóis/triazinas e N-acilhidrazonas como protótipos estruturais [10].

2.2. NÚCLEOS DE INTERESSE

Vários grupamentos químicos têm apresentado relevantes atividades biológicas, a seguir serão descritos núcleos com atividade anti- *T. cruzi* reconhecida.

2.2.1. PIRIDINA

A piridina é um composto orgânico heterocíclico usado como precursor para produtos agroquímicos e farmacêuticos, além de desempenhar um papel chave como catalisador nos sistemas biológicos e químicos [91]. O nucleotídeo piridina protético (NADP) está envolvido em vários processos de oxidação-redução de muitas enzimas de organismos vivos. Outra relevante atividade da piridina em sistemas biológicos é a sua presença nas vitaminas niacina e piridoxina (vitamina B6). Na indústria farmacêutica, a piridina forma um núcleo de mais de 7000 medicamentos existentes [92].

Derivados da piridina são um importante grupo de compostos orgânicos evidenciados como bactericidas [93], fungicidas [94], agentes anti-câncer [95-97] e tripanocida [98, 99].

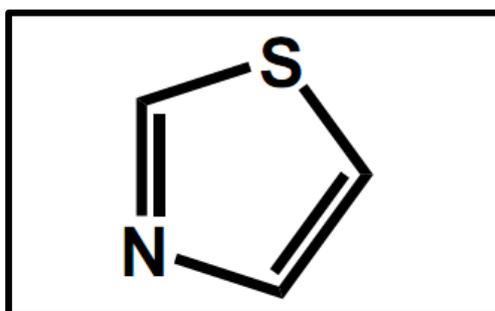
Derivados da 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas provaram ser excelentes inibidores do crescimento do *T. cruzi*, sendo 55 a 70 vezes mais ativos do que o NFX [24]. Complexos de antimônio (III) de tiossemicarbazonas derivadas de piridina apresentaram atividade tripanocida contra epimastigota e tripomastigotas do *T. cruzi*, superior às drogas de referência NFX e BDZ [25].

Estudos do nosso grupo de pesquisa revelaram que de uma série de 26 piridil-tiazóis 20 compostos apresentaram ser agentes tripanocidas mais potentes que o BDZ. E o melhor composto desta série apresentou uma concentração inibitória para 50% das cepas (CI_{50}) tripomastigotas de 1,24 μ M enquanto que o fármaco de referência apresenta uma CI_{50} cinco vezes menor. Estes resultados nos inspiram a investigar e avaliar o potencial tripanocida desses derivados [99].

2.2.1. TIAZÓIS

Os compostos tiazolínicos (**Figura 13**) são uma importante classe de compostos heterocíclicos que apresentam um amplo espectro de atividade biológica, tais como atividades anticâncer [100], antibacteriana [101, 102], antidepressiva [103], anti-inflamatória [102] dentre outras.

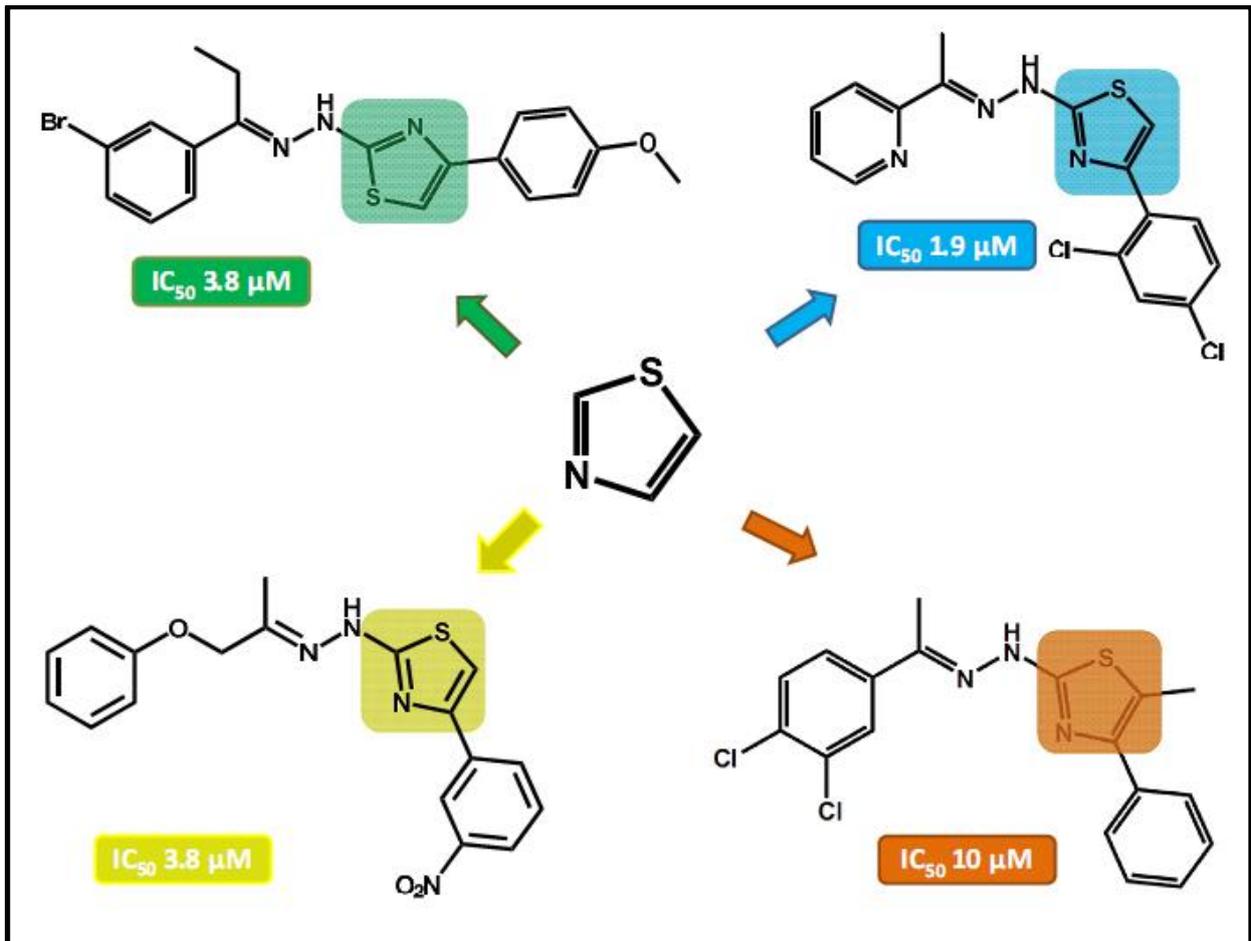
Figura 13: Estrutura química do núcleo tiazol.



O núcleo tiazolínico está presente como subunidade em diversas moléculas biologicamente ativas. Como exemplo, podemos mencionar o sulfatiazol, um importante fármaco antimicrobiano, o ritonavir (Norvir ®) medicamento utilizado no combate ao vírus HIV, as epotilonas A e B, produtos naturais que possuem uma potente atividade antitumoral e o pirofosfato de tiamina, presente em uma variedade de enzimas que catalisam reações de descarboxilação (descarboxilases) e de condensação do tipo aldólica (aldolases) [104].

Compostos com a função tiazol na sua estrutura, apresentaram excelente atividade “in vitro” contra cepas epimastigota, tripomastigota e amastigota do *T. cruzi*. [11, 12]. Resultados de trabalhos anteriores em nosso laboratório (LpQM), identificaram novos potentes inibidores da cruzaina e inibidores do crescimento do *T. cruzi*, como demonstrado na **Figura 14** [99, 105, 106, 107]. Esses estudos demonstram que o tiazol também é um núcleo promissor para protótipos a fármacos antichagásicos.

Figura 14: Estruturas de moléculas contendo o núcleo tiazol e os valores de toxicidade para forma tripomastigota [99, 105, 106, 107].



3. OBJETIVOS

Diante da necessidade de identificar novos fármacos úteis para o tratamento da doença de Chagas, os objetivos deste trabalho englobam o planejamento estrutural e a síntese de inéditos piridil-1,3-tiazóis, bem como a avaliação farmacológica das propriedades tripanocidas e o estudo das relações estrutura-atividade.

3.1. OBJETIVO GERAL

Obter inéditos piridil-1,3-tiazóis bem como avaliar as propriedades tripanocidas e estudar a relação estrutura-atividade destes.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Planejar e sintetizar os derivados piridil-1,3-tiazóis (**LpQM 2 a-m** e **3 a-m**);
- Determinar as propriedades físico-químicas dos compostos obtidos, bem como elucidar as estruturas químicas através da Espectroscopia de Infravermelho (IV), de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN ^1H) e Carbono (RMN ^{13}C) e Espectroscopia de Massas de Alta Resolução (EMAR);
- Avaliar a atividade tripanocida e determinar a citotoxicidade em esplenócitos de camundongos.

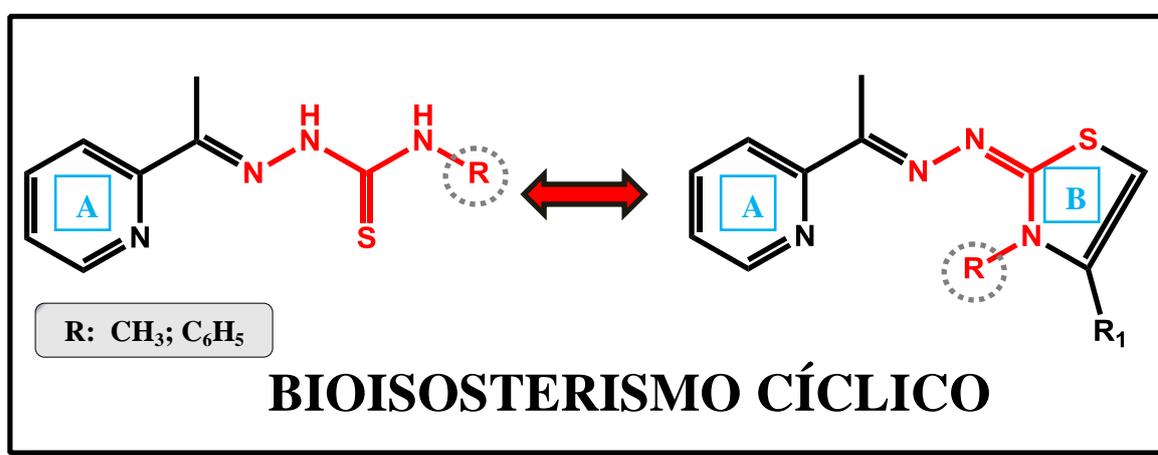
4. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

O anel piridina é encontrado em biomoléculas endógenas altamente significativas, incluindo o NADP e as vitaminas niacina e piridoxina (vitamina B6). Vários compostos bioativos com esta unidade heterocíclica têm valiosas propriedades farmacológicas, tais como bactericidas [93], fungicidas [94], agentes anti-câncer [95-97] e tripanocidas [24, 98, 99]. Neste contexto, os compostos piridínicos ganharam importância notável, devido à variedade de atividades biológicas e a sua aplicabilidade na química orgânica sintética.

Por outro lado, 1,3-tiazol e seus derivados são importantes heterociclos e estão relacionados com um grande número de aplicações biológicas. Dentre estas, podem-se citar atividades antimicrobiana, antifúngica e anti-inflamatória [102], além de demonstrar-se como potente inibidor da cruzáina e inibidores do crescimento do *T. cruzi* [10, 99, 105].

No nosso esforço contínuo para desenvolver compostos tripanocidas potentes, decidimos construir uma nova classe de derivados piridil-1,3-tiazóis (LpQM 2 a-m e 3 a-m) baseado na hibridização molecular do núcleo piridina **A** com o anel heterocíclico tiazol **B**, desenhados a partir do bioisosterismo cíclico não clássico das tiossemicarbazonas, importante classe com potencial tripanocida [99, 108] (Figura 15). Foram realizadas modificações estruturais, através da inserção de substituintes na posição N₃ (LpQM 1a-b), devido a resultados obtidos em trabalhos recentes, onde derivados com grupo fenila ou metila em N₃ apresentaram-se potentes agentes tripanocidas [105].

Figura 15: Concepção dos novos derivados piridil-1,3-tiazóis, (LpQM 2 a-m e 3 a-m).



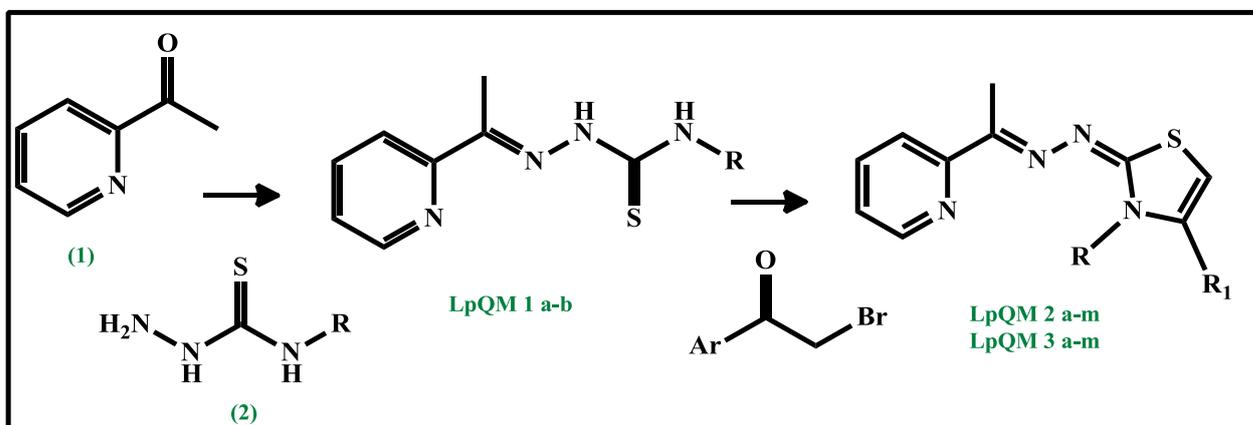
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O seguinte trabalho apresentou os seguintes resultados listados como tópicos abaixo.

5.1. SEÇÃO QUÍMICA

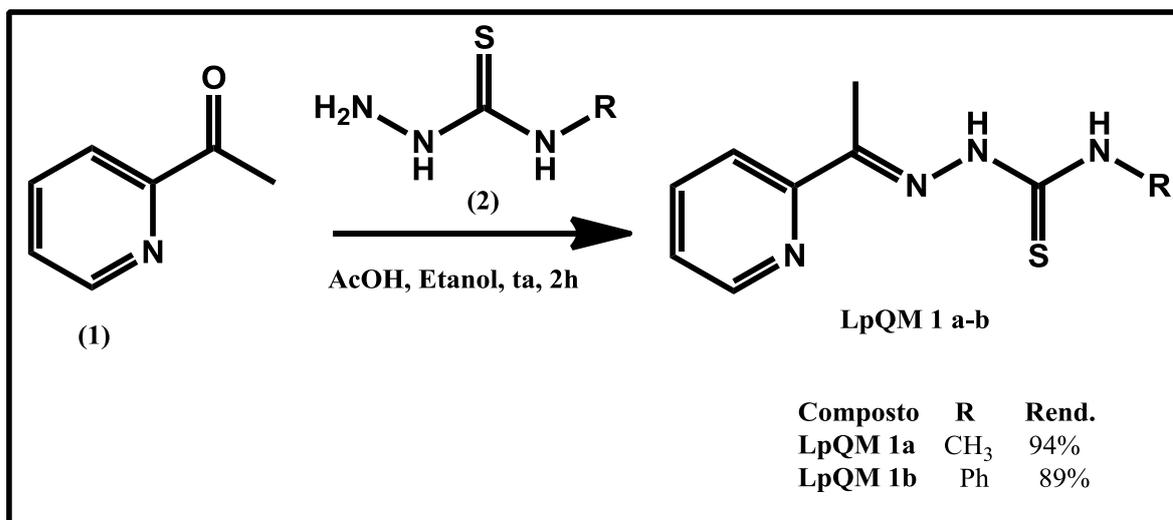
Uma vez que o planejamento estrutural foi realizado, realizou-se à síntese dos compostos. A **Figura 16** apresenta a sequência das reações envolvidas na síntese das piridil-1,3-tiazóis (**LpQM 2 a-m** e **LpQM 3 a-m**).

Figura 16: Rota sintética para obtenção das piridil-1,3-tiazóis (**LpQM 2 a-m** e **LpQM 3 a-m**).



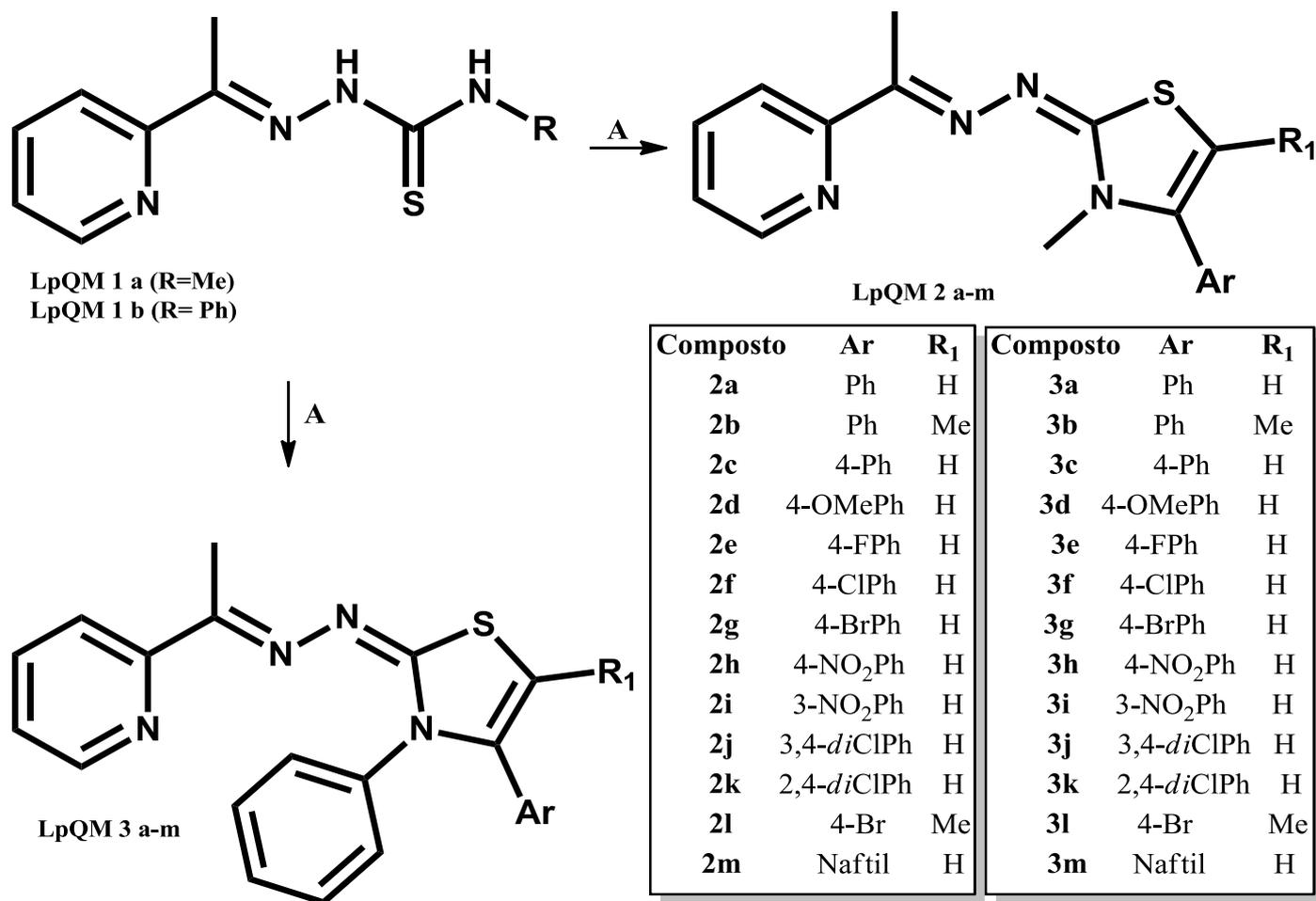
As tiossemicarbazonas **LpQM 1 a-b** foram preparadas com reagentes disponíveis comercialmente. Reagiu-se acetilpiridina (**1**) com as tiossemicarbazidas apropriadas (**2**) em temperatura ambiente, utilizando ácido acético (AcOH) como catalisador e etanol como solvente, como demonstrado na **Figura 17**.

Figura 17: Obtenção das tiossemicarbazonas **LpQM 1 a-b**.



Os compostos piridil-1,3-tiazol **LpQM 2 a-m** e **3 a-m** foram sintetizados conforme o protocolo de Hantzsch, através da reação entre as tiossemicarbazonas **LpQM 1 a-b** e as acetonas α -halogenadas (**Figura 19**). Essas reações desenvolvem-se mediante refluxo com etanol durante uma a três horas de reação, mas adaptou-se esta metodologia para banho em ultrassom (40 MHz, 30-120 min) [109] utilizando 2-propanol como solvente [105]. Desse modo, observaram-se rendimentos entre 30 e 100%. As acetonas α -halogenadas substituídas utilizadas foram adquiridas de fontes comerciais. Os novos piridil-1,3-tiazol e seus substituintes estão listados na **Figura 18**.

Figura 18: Procedimento sintético geral das piridil-1,3-tiazóis (LpQM 2 a-m e 3 a-m)^a.



^a Reagentes e condições: (A) acetonas α -halogenadas substituídas, 2-propanol, irradiação no ultrassom, t.a., 30-120 min, com rendimentos entre 30-100%.

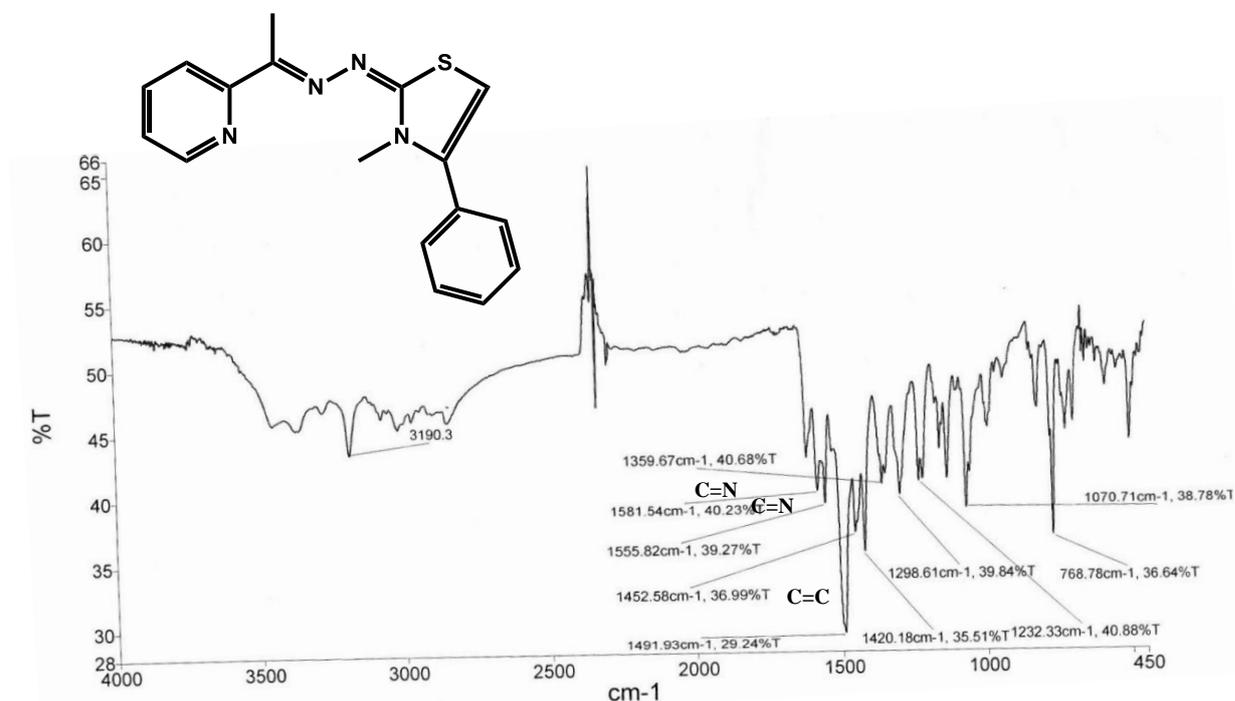
5.2. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

Todos os compostos tiveram suas estruturas elucidadas através técnicas de Espectroscopia de infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de Próton e Carbono e Espectroscopia de Massas de Alta Resolução, dados esses descritos no apêndice.

5.2.1. ELUCIDAÇÃO DA MOLÉCULA LpQM 2a

Através da análise espectroscópica na região do infravermelho foi possível constatar as principais bandas de absorção (**Figura 19**). As frequências em 1581 e 1555 cm^{-1} são estiramentos característicos de C=N, enquanto que em 1491 cm^{-1} destaca-se o estiramento para C=C.

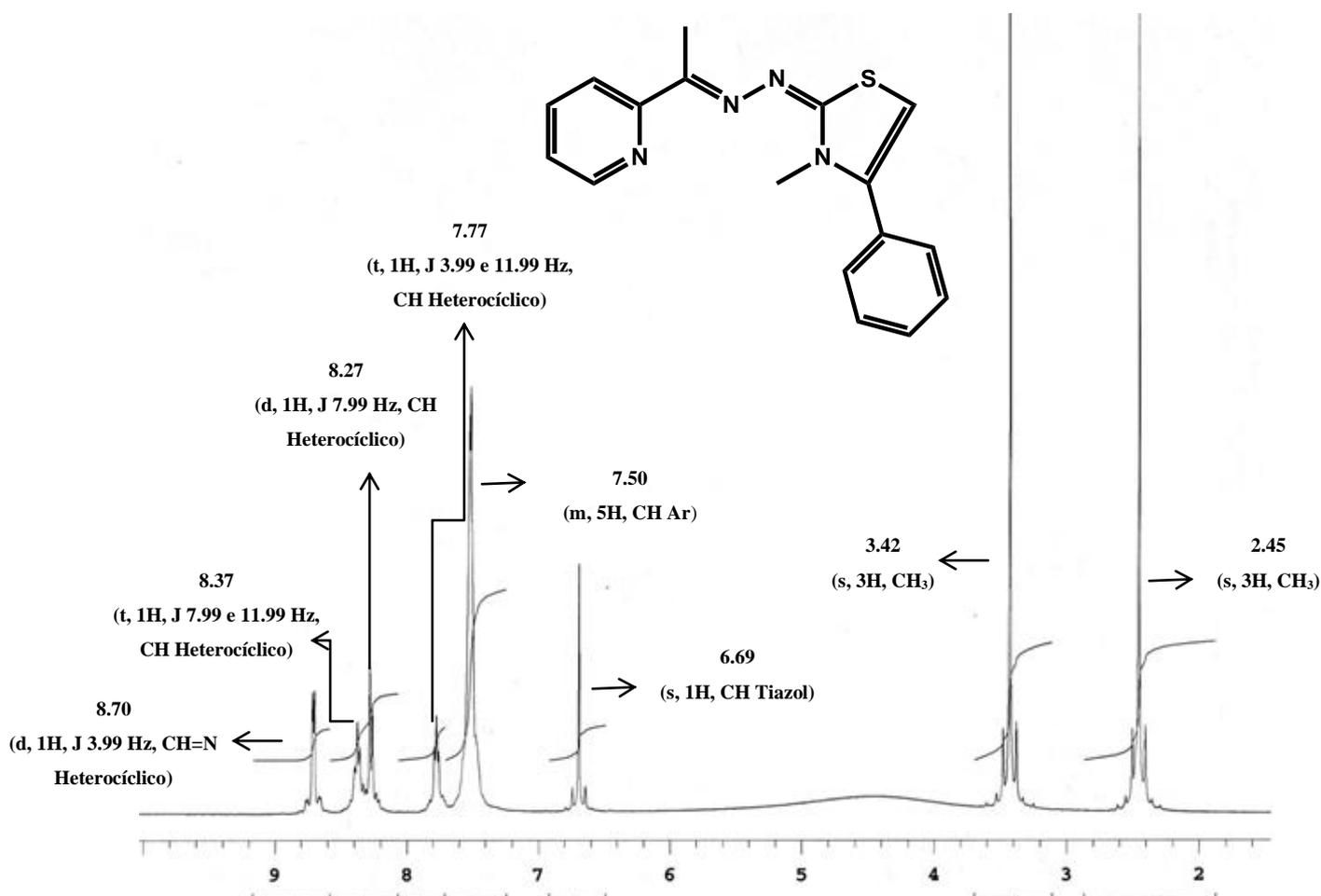
Figura 19: Espectro de infravermelho da molécula LpQM 2a.



A **Figura 20** apresenta um exemplo de espectro de RMN ^1H , o do composto LpQM 2a. Foi constatada a presença de dois singletos em 2.45 e 3.42 ppm, integrando para três hidrogênios cada um, referente aos grupos metilas (CH_3) existentes na molécula. O singlete em 6.69 ppm integrando para um hidrogênio, corresponde ao hidrogênio na posição C_5 do anel tiazol, este ratifica a ciclização e formação do anel tiazol. A presença do anel aromático ligado ao tiazol foi confirmada por um multipletto em torno de 7.50 ppm, integrando para cinco hidrogênios. Os quatro hidrogênios do anel heterocíclico piridina foram confirmados

pela presença de dois dubletos e dois tripletos. O primeiro tripleto apareceu em 7.77 ppm, integrando para um hidrogênio, este por sua vez, possui constantes de acoplamento (J) de 3.99 e 11.99 Hz, o que indica que este hidrogênio está acoplado com o hidrogênio da função azometílica (CH=N) que ressoou em 8.70 ppm como um dubleto, apresentando J de 3.99 Hz também. O tripleto do CH do anel piridínico presente em 7.77 ppm também está acoplado com o tripleto em 8.37 ppm, que está integrando para um hidrogênio, visto que ele possui valores de J igual a 11.99 e 7.99 Hz. Por fim, em 8.27 foi identificado um dupleto integrando para um hidrogênio, que está acoplado com o tripleto presente em 8.37 ppm, devido o J ser de 7.99 Hz.

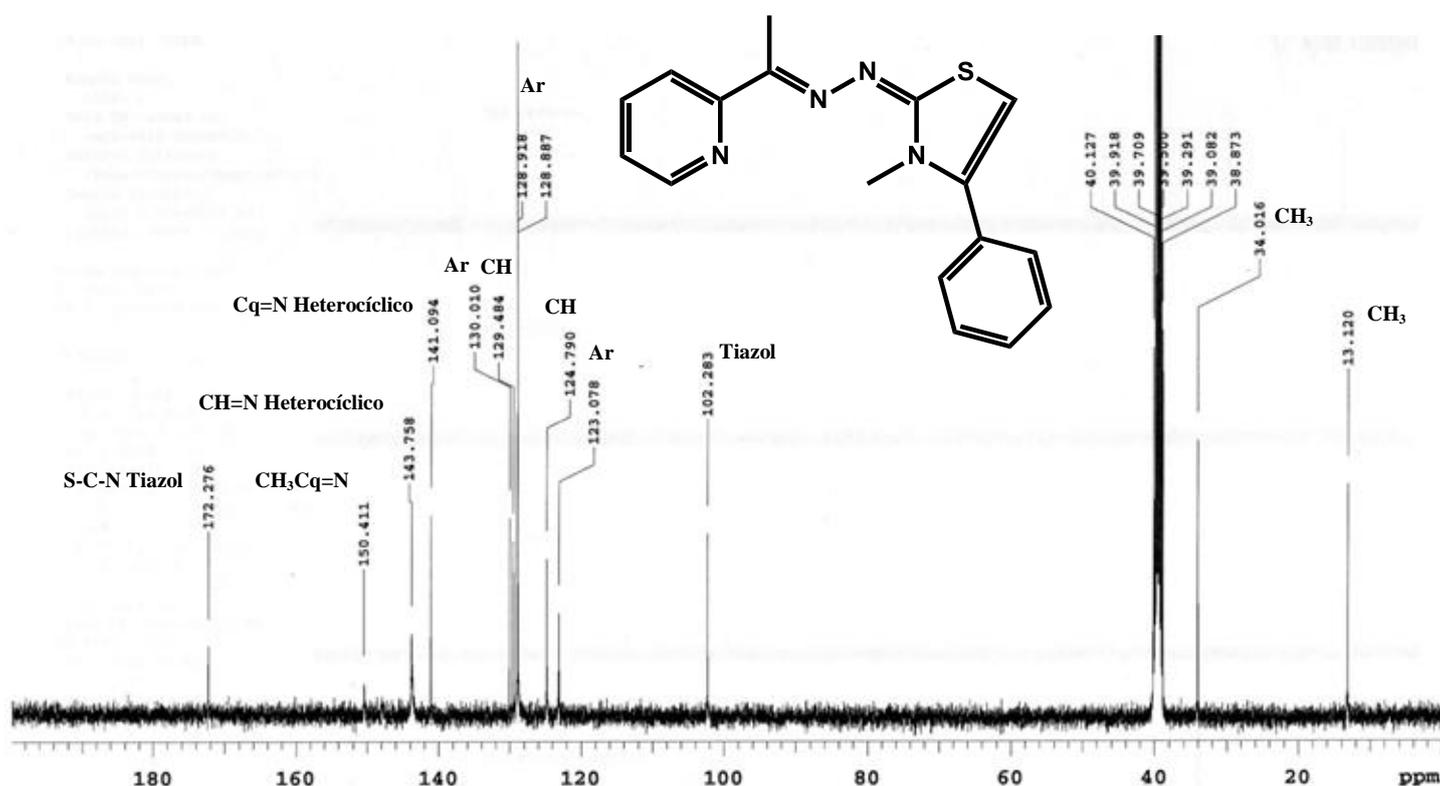
Figura 20: Espectro do RMN ^1H da molécula **LpQM 2a**.



A **Figura 21** demonstra a confirmação dos carbonos presentes na molécula **LpQM 2a**, através da utilização da ressonância magnética nuclear de carbono 13 e DEPT. Os picos em 13 e 34 ppm confirmam a presença das duas metilas (CH_3). O sinal de carbono diagnóstico

de tiazóis, o CH da posição 5 aparece em 102 ppm. Os carbonos aromáticos são confirmados por picos em 123 ppm, 128.88 ppm, 128.91 e 130 ppm. Em 124 e 129 ppm observou-se os picos referente aos metinos (CH) do anel piridínico, em 141 ppm o carbono quaternário deste mesmo anel, assim como um pico em 143 ppm referente ao carbono da função azometílica (HC=N). Por fim, em 150 ppm o pico relativo ao Cq=N ligado a metila. Em 172 ppm constata-se a presença do carbono quaternário do tiazol N-C-S.

Figura 21: Espectro do RMN ^{13}C da molécula **LpQM 2a**.



5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI *T. cruzi*

Analisou-se a toxicidade celular e a atividade antiparasitária das inéditas piridil-1,3-tiazol (**Tabela 02 e 03**). A priori, verificou-se a viabilidade dos esplenócitos da linhagem de camundongos BALB/c, após incubação com os compostos, os resultados foram expressos como a concentração mais elevada não tóxica em μM . Uma vez determinada a toxicidade para as células de mamíferos, realizou-se ensaios visando a determinação da atividade antiparasitária dos compostos. Foram realizados testes para avaliar a inibição da proliferação de epimastigotas DM28c, bem como a toxicidade contra tripomastigotas da

cepa Y do *T. cruzi* frente aos compostos. Os resultados foram expressos em termos de valores de CC₅₀ (concentração citotóxica a 50%) para tripomastigotas e CI₅₀ (concentração inibitória a 50%) para epimastigotas. O Benznidazol e o Nifurtimox foram utilizados como medicamentos de referência.

Tabela 02: Atividade anti- *T. cruzi* das piridil-1,3-tiazol LpQM 2 a-m.

Código	Ar	R	T. cruzi (µM)		Citotoxicidade (µM) ^c
			CC ₅₀	CI ₅₀	
			Tripomastigota (Cepa Y) ^a	Epimastigota (Cepa DM28c) ^b	
LpQM 1 ^a	-	-	8.8	ND	<4.8
LpQM 2 a	Ph	H	NT	NT	NT
LpQM 2b	Ph	Me	2.7	6.2	<3.1
LpQM 2c	4-PhPh	H	2.2	66.6	26
LpQM 2d	4-OMePh	H	4.6	4.5	2.9
LpQM 2e	4-FPh	H	5.6	8.5	<3
LpQM 2f	4-ClPh	H	4.5	ND	2.9
LpQM 2g	4-BrPh	H	2.2	3.2	<2.5
LpQM 2h	4-NO ₂ Ph	H	7.0	13.7	<2.8
LpQM 2i	3-NO ₂ Ph	H	2.4	7.8	<2.8
LpQM 2j	3,4-diClPh	H	2.3	6.9	<2.6
LpQM 2k	2,4-diClPh	H	13.0	31.6	26.5
LpQM 2l	4-BrPh	Me	3.4	2.9	2.4
LpQM 2m	Naftaleno	H	3.0	8.2	2.79
BDZ	-	-	6.2	48.8	96
NFX	-	-	2.7	5.7	3.4

[a] Determinado 24 h após a incubação das formas tripomastigotas com os compostos. [b] Determinado 11 dias após a incubação das formas epimastigotas com os compostos. CI₅₀ foi calculada a partir de cinco concentrações, o ensaio foi realizado em triplicata (DP ±10%). [c] Maior concentração não tóxica para esplenócitos de ratos após 24h de incubação na presença dos compostos. BDZ: benznidazol; NFX: nifurtimox.

A **Tabela 02** apresenta os resultados da atividade anti- *T. cruzi* dos compostos **LpQM 2 a-m**. Dentre os treze compostos desta série, dez apresentaram propriedades tripanocidas superiores ao BDZ. As piridil-1,3-tiazol **LpQM 2g e 2j** foram os compostos destaque desta série, com valores de CC_{50} de 2.2 e 2.3 μM respectivamente, para as formas tripomastigotas da Cepa Y.

Analisou-se o efeito das substituições no anel fenílico. A presença de grupamentos retiradores de elétrons, tais como os halogênios, na posição *para* do anel aromático, gerou compostos com atividade tripanocida pronunciada. Visto que os substituintes 4-BrPh **2g**, 4-ClPh **2f** e 4-FPh **2e** apresentaram valores de CC_{50} de 2.2, 4.5 e 5.6 μM , respectivamente. Quanto aos compostos dissustituídos observou-se uma divergência nas suas capacidades tripanocidas, uma vez que, dissustituições com átomos de cloro nas posições *meta* e *para* do anel fenílico favorecem de forma significativa a atividade inibitória na forma tripomastigota, ao passo em que nas posições *orto* e *para* resultaram em reduzida atividade, tendo em vista que os substituintes 3,4-*di*ClPh **2j** e 2,4-*di*ClPh **2k** possuem valores de CC_{50} 2.3 e 13 μM , respectivamente.

Contudo, a presença de um grupamento retirador de elétrons forte em *para*, promoveu uma diminuição do potencial tripanocida, visto que a inserção do grupamento 4- NO_2Ph **2h** apresentou CC_{50} igual a 7.0 μM . Entretanto, a inserção deste grupamento na posição *meta* do anel aromático é benéfica para atividade tripanocida, já que o substituinte 3- NO_2Ph **2i** apresentou valor de CC_{50} 2.4 μM , ratificando que substituições na posição *meta* do anel aromático potencializam a atividade tripanocida dos compostos.

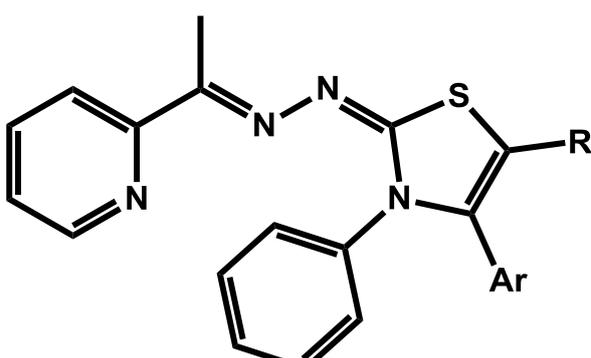
Quanto aos grupos doadores de elétrons na posição *para* no anel aromático, a presença dos substituintes 4-PhPh **2c** e naftaleno **2m** foram positivas para a propriedade tripanocida com CC_{50} de 2.2 e 3.0 μM . Todavia, esse efeito foi inferior para a substituição com o grupamento 4-OMePh **2d** que apresentou valor de CC_{50} 4.6 μM , respectivamente.

Outro efeito estudado foi a modificação no carbono 5 do anel tiazol. Esta modificação provocou uma redução da atividade tripanocida, já que o composto com substituinte 4-BrPh **2g** possui um valor de CC_{50} de 2.2 μM , ao passo em que a inserção de um radical metil em C_5 gera o composto **2l** que apresenta CC_{50} de 3.4 μM .

Tendo verificado a atividade antiparasitária para tripomastigotas, analisou-se a atividade contra epimastigotas. Excetuando-se o composto **2c**, todos os compostos testados

foram mais ativos que o BDZ, sendo capazes de reduzir a proliferação de epimastigotas. Os compostos **2g** e **2j**, os mais ativos contra as formas tripomastigota sanguíneas, foram 15 e 7 vezes mais potentes que o BDZ, respectivamente, quanto a inibição da proliferação de epimastigotas. No que diz respeito à citotoxicidade em esplenócitos de camundongos, a maioria dos compostos exibiram toxicidade pronunciada.

Tabela 03: Atividade anti- *T. cruzi* das piridil-1,3-tiazol **LpQM 3 a-m**.

Código	Ar	R	T. cruzi (μM)		Citotoxicidade (μM) ^c
			CC ₅₀	CI ₅₀	
			Tripomastigota (Cepa Y) ^a	Epimastigota (Cepa DM28c) ^b	
					
LpQM 1b	-	-	2.5	15.4	370
LpQM 3a	Ph	H	NT	NT	NT
LpQM 3b	Ph	Me	2.3	15.5	2.6
LpQM 3c	4-Ph	H	2.0	47.3	22.4
LpQM 3d	4-OMePh	H	1.2	5.0	2.4
LpQM 3e	4-FPh	H	3.9	3.1	12.8
LpQM 3f	4-ClPh	H	2.0	9.1	12.3
LpQM 3g	4-BrPh	H	1.8	6.3	22.3
LpQM 3h	4-NO ₂ Ph	H	3.1	87.4	<2.4
LpQM 3i	3-NO ₂ Ph	H	1.9	11.0	2.4
LpQM 3j	3,4-diClPh	H	1.9	13.9	2.2
LpQM 3k	2,4-diClPh	H	1.6	2.7	2.2
LpQM 3l	4-BrPh	Me	3.1	17.1	54.1
LpQM 3m	Naftaleno	H	6.1	1.9	2.3
BDZ	-	-	6.2	48.8	96
NFX	-	-	2.7	5.7	3.4

[a] Determinado 24 h após a incubação das formas tripomastigotas com os compostos. [b] Determinado 11 dias após a incubação das formas epimastigotas com os compostos. CI₅₀ foi calculada a partir de cinco concentrações, o ensaio foi realizado em triplicata (DP ±10%). [c] Maior concentração não tóxica para esplenócitos de ratos após 24h de incubação na presença dos compostos. BDZ: benznidazol; NFX: nifurtimox.

Da série **LpQM 3 a-m**, todos os compostos sintetizados apresentaram propriedades tripanocidas para as formas tripomastigotas da Cepa Y superiores ao BDZ (**Tabela 03**).

Entre todos os compostos testados, as piridil-1,3-tiazol **LpQM 3d e 3k** possuíam a mais elevada potência tripanocida, com valores de CC_{50} de 1.2 e 1.6 μM para as formas tripomastigotas da Cepa Y, sendo 5 e 4 vezes mais potentes, respectivamente, que o fármaco de referência, o BDZ.

Analisou-se o efeito das substituições no anel fenílico. Assim como na série **LpQM 2 a-m**, a presença de halogênios, na posição *para* do anel aromático, deu origem a compostos com elevado potencial tripanocida. Visto que os substituintes 4-BrPh **3g**, 4-ClPh **3f** e 4-FPh **3e** apresentaram os seguintes valores de CC_{50} 1.8, 2.0 e 3.9 μM , respectivamente. As diss substituições com átomos de cloro proporcionou compostos ainda mais promissores com valores de CC_{50} de 1.6 e 1.9 μM para os substituintes 2,4-*di*ClPh **3k** e 3,4-*di*ClPh **3j**, respectivamente. Esses resultados corroboram com dados da literatura, que sugere que átomos de halogênio provocam mudanças volumétricas e conformacionais, fazendo com que grupos volumosos ocupem todo o sítio ativo dos alvos moleculares, incluindo os bolsos mais profundos. E que a força da interação tipicamente diminui em função do tamanho do raio atômico, de acordo com a seguinte ordem $\text{I} > \text{Br} > \text{Cl}$ [110].

Nesta série a posição do substituinte halogênio não influenciou negativamente a atividade biológica como observado para os compostos 3,4-*di*ClPh **2j** e 2,4-*di*ClPh **2k** que possuem valores de CC_{50} 2.3 e 13 μM , respectivamente.

A presença de um grupamento retirador de elétrons forte na posição *para*, também proporcionou moléculas com boa atividade tripanocida, visto que a inserção do grupamento 4- NO_2Ph **2h** apresentou CC_{50} igual a 3.1 μM . Do mesmo modo, a inserção desse grupamento na posição *meta* do anel aromático foi benéfica para atividade citotóxica contra a forma tripomastigota, tendo em vista que o substituinte 3- NO_2Ph **3i** possui valor de CC_{50} 1.9 μM .

Em contraste com a série **LpQM 2 a-m**, ambos os grupamentos doadores de elétrons 4-Ph **3c** e 4-OMePh **3d** foram positivos para a propriedade tripanocida com CC_{50} de 2.0 e 1.2 μM , respectivamente. Ao passo em que, a presença do naftaleno **2m** provocou um déficit à propriedade tripanocida, quando comparado aos demais compostos desta série, apresentando valor de CC_{50} 6.1 μM , ainda assim uma atividade equivalente ao BDZ.

Assim como na série **LpQM 2 a-m** a modificação no carbono 5 do anel tiazol provocou uma discreta redução da atividade tripanocida, já que o composto com substituinte 4-BrPh **3g** possui um valor de CC_{50} de 1.8 μ M, na medida em que a inserção de um radical metil em C_5 gerou o composto **3l** que apresentou CC_{50} de 3.1 μ M.

Verificou-se o potencial frente às cepas epimastigotas. Excetuando-se o composto **3h**, todos os compostos foram mais ativos que o BDZ, sendo capazes de reduzir a proliferação de epimastigotas. Os compostos **3d** e **3k**, os mais ativos contra as formas tripomastigotas, foram 10 e 18 vezes, respectivamente, mais potentes que o BDZ quanto a inibição da proliferação de epimastigotas. No que diz respeito à citotoxicidade em esplenócitos de ratos, a maioria dos compostos exibiram uma toxicidade acentuada.

Em suma, constatou-se que a presença do grupamento fenila ligado a N_3 no anel tiazólico potencializa significativamente a atividade tripanocida, tendo em vista que essa modificação proporcionou compostos, **LpQM 3 a-m**, com menor toxicidade - quando comparado à série **LpQM 2 a-m** - e elevado potencial tripanocida.

Finalmente, constatou-se que a estratégia de bioisosterismo conduziu a compostos bioativos com propriedades tripanocidas superiores as tiossemicarbazonas de origem. Curiosamente a tiossemicarbazona **LpQM 1b** demonstrou-se atóxica em esplenócitos de ratos quando se sabe que essa classe promove efeito contrário nestas células [99, 111].

Lipinski descreveu intervalos desejados para determinadas propriedades, que são importantes para a farmacocinética e desenvolvimento de medicamentos. Eles são Coeficiente de log de P ($C \log P$) <5, o número de doadores de ligação de hidrogênio <5, o número de receptores de ligação a hidrogênio <10, e peso molecular (PM) < 500. Um composto que satisfaz, ao menos, três dos quatro critérios adere à regra de Lipinski [112].

As propriedades moleculares descritas na regra de Lipinski foram calculadas utilizando o chemicalize.org [113]. O chemicalize.org é uma ferramenta disponível na Web desenvolvida pela ChemAxon, capaz de fornecer informações a respeito das propriedades de uma molécula. O programa é capaz de calcular e prever diversas propriedades químicas como análise elementar, geometria, polarizabilidade, log de P e pKa, além das propriedades relacionadas com a regra de Lipinski [114].

Todos os compostos sintetizados, inclusive os mais potentes agentes antiparasitários, são compatíveis com a regra de Lipinski. A **Tabela 04** lista as propriedades dos sete piridil-1,3-tiazol que apresentaram melhor potencial tripanocida [113].

Tabela 04: Análise das propriedades dos compostos mais promissores com base na regra de Lipinski [113].

Código	Peso molecular	C log P	N ° de doadores de ligação de hidrogênio	N ° de aceptores de ligação de hidrogênio	N° de critérios atendidos
Regra	<500	<5	<5	<10	No mínimo 3
LpQM 2g	386.02	3.57	0	4	Todos
LpQM 2j	376.03	4.01	0	4	Todos
LpQM 3d	400.13	4.31	0	5	Todos
LpQM 3g	448.03	5.24	0	4	3
LpQM 3i	415.11	4.41	0	6	Todos
LpQM 3k	438.04	5.68	0	4	3

6. CONCLUSÕES

Duas séries inéditas de piridil-1,3-tiazol foram estruturalmente concebidas empregando as estratégias de bioisosterismo e hibridação molecular. Estas modificações moleculares produziram os compostos **LpQM 2 a-m** e **LpQM 3 a-m**.

Essas séries foram obtidas empregando-se uma metodologia simples com rendimentos satisfatórios, entre 30-100%. Sendo avaliada quanto à atividade anti-*T. cruzi* frente às formas epimastigota e tripomastigota.

Exceto os compostos **LpQM 2c**, **2k**, **2h**, **3c** e **3h**, todos os compostos apresentaram atividade tripanocida para as duas formas evolutivas. No estudo de relação estrutura-atividade pôde-se observar que a presença de grupos retiradores de elétrons ligados ao anel aromático, principalmente halogênios, potencializa a atividade anti-*T. cruzi* dessa série, assim como a inserção do anel fenil em N₃ no anel tiazolico. No entanto, os compostos apresentaram toxicidade acentuada frente as células de esplenócitos de camundongo.

Os piridil-1,3-tiazol **LpQM 3d** e **3k** foram identificados como potentes agentes anti-*T. cruzi*, sendo 5 e 4 vezes, respectivamente, mais potentes que o Benznidazol.

7. SEÇÃO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento deste trabalho foram necessários os seguintes equipamentos, reagentes e metodologias.

7.1. EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos a partir de fontes comerciais (Acros Organics, Fluka, Vetec ou Sigma-Aldrich), enquanto que os solventes foram provenientes da Vetec ou Dinâmica.

O progresso das reações foi acompanhado por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando sílica-gel 60 contendo indicador fluorescente F254 em folha de alumínio. As placas cromatográficas foram visualizadas em uma lâmpada ultravioleta (com duplo comprimento de onda 365 ou 254nm). As reações foram realizadas em banho de ultrassom modelo Unique EM-804 TGR usando frequência de 40 KHz (180 W).

A identidade química dos compostos foi confirmada por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , infravermelho (IV) e espectros de massas de alta-resolução (EMAR). O IV foi determinado em pastilhas de KBr. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram realizados nos instrumentos Varian modelo Unity Plus (400 MHz para ^1H ; 100 MHz para ^{13}C) ou Bruker AMX (300 MHz para ^1H e 75.5 MHz para o ^{13}C). Os solventes deuterados, DMSO- d_6 e CHCl_3 - d_6 , foram adquiridos pela CIL (Tédia Brazil) ou Sigma-Aldrich. A multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN ^1H foram designadas da seguinte forma: s / singleto; d / dubleto; t / tripleto; dd / duplo dupleto; q / quarteto; m / multipeto. Atribuições estruturais foram corroboradas por DEPT. À espectrometria de massas de alta-resolução (EMAR) usou-se a técnica de ionização por electrospray (ESI) nos modos positivos (ESI+) ou negativo (ESI-) com detecção no modo "time-of-flight" (TOF), medidos nos aparelhos LC-IT-TOF da Shimadzu.

Procedimento geral para a síntese das tiossemicarbazonas LpQM 1 a-b. Exemplo o composto LpQM 1 a: Em um balão de 100mL, adicionou-se a tiossemicarbazida (0.84g, 7.98 mmol) e etanol (15 mL) que foram submetidos a agitação em temperatura ambiente. Na sequência, a acetilpiridina (0.9g, 8 mmol) foi adicionada à mistura e continuou até o consumo dos materiais de partida (30-120 minutos). O precipitado branco foi separado em um funil de Buchner com um filtro de disco sinterizado e lavou-se com etanol frio, por fim secou-se em dessecador de vidro contendo SiO_2 sob vácuo.

(E)-N-metil-2-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazinacarbotoamida (LpQM 1a). Obteve-se um sólido branco, rendimento de 1.5g, 94%. Faixa de fusão (°C): 172-174. **IV (v cm⁻¹KBr)** **Principais sinais:** 3287.83 e 3238.19 (NH); 1537.07 (C=N). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2.383 (s, 3H, CH₃); 3.05 (d, 3H, J 4.49 Hz, CH₃); 7.37 (t, 1H, J 4.79 e 11.09Hz, CH Heterocíclico); 7.81 (t, 1H, J 7.49 e 17.09Hz, CH Heterocíclico); 8.42 (d, 1H, J 8.39 Hz, CH Heterocíclico); 8.60 (m, 2H, NH, CH Heterocíclico); 10.36 (s, 1H, NH). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):** 12 (CH₃); 31 (CH₃); 120 (CH Heterocíclico); 123 (CH Ar); 136 (CH Heterocíclico); 147 (Cq=N); 148 (Cq-N Heterocíclico); 154 (Cq-N Heterocíclico); 178.6 (Cq).

(E)-N-Fenil-2-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazinacarbotoamida (LpQM 1b). Obteve-se um sólido branco, rendimento de 3,9g, 89%. Faixa de fusão (°C): 182-184. **IV (v cm⁻¹KBr)** **Principais sinais:** 3299.32 e 3240.82 (NH); 1522.00 (C=N). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2.87 (s, 3H, CH₃); 7.63 (t, 1H, J 7.79 e 14.69Hz, CH Ar); 7.78 (m, 3H, CH Ar, CH Ar, CH Heterocíclico); 7.95 (d, 2H, J 7.79 Hz, CH Ar, CH Ar); 8.21 (t, 1H, J 7.79 e 14.69 Hz, CH Heterocíclico); 8.95 (d, 1H, J 7.79 Hz, CH Heterocíclico); 9.00 (d, 1H, J 4.19 Hz, CH-N Heterocíclico); 10.60 (s, 1H, NH); 11.10 (s, 1H, NH). **RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆):** 12 (CH₃); 121 (CH Ar); 124 (CH Ar); 125 (CH Ar); 126 (CH Ar); 128 (CH Ar); 136 (CH Ar); 139 (CH Ar); 148 (Cq=N); 149 (Cq-N Ar); 154 (Cq-N Ar); 177 (Cq=S).

Procedimento geral para a síntese das piridil-1,3-tiazol LpQM 2 a-l e LpQM 3 a-l.

Exemplo o composto LpQM 2 a: Em um balão de 100 mL, adicionou 2-bromoacetofenona (0.47g, 2.4 mmol) e 2-propanol (15 mL) que foram colocados num banho de ultrassom (40 MHz, 180 V). Em seguida, a tiossemicarbazona **LpQM 1a** (0.5 g, 2.3 mmol) foi adicionada à mistura e continuou até o consumo dos materiais de partida (30-120 minutos). A reação foi arrefecida e o precipitado colorido foi separado em um funil de Buchner com um filtro de disco sinterizado e lavou-se com 2-propanol frio, por fim secou-se em dessecador de vidro contendo SiO₂ sob vácuo. Alguns produtos necessitaram ser purificados por cromatografia em coluna ou por recristalização utilizando um sistema de solvente descrito abaixo para cada composto.

(E)-3-metil-4-fenil-2-((E)-1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 2 a). Obteve-se um sólido avermelhado, rendimento de 0.4g, 85%. Faixa de fusão (°C): 204-206. **IV (v cm⁻¹KBr)** **Principais sinais:** 1581 e 1555 (C=N); 1491.03 (C=C). **RMN ¹H (400**

MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.45 (s, 3H, CH₃); 3.42 (s, 3H, CH₃); 6.69 (s, 1H, CH Tiazol); 7.50 (m, 5H, CH Ar); 7.77 (t, 1H, J 3.99 e 11.99 Hz, CH Heterocíclico); 8.27 (d, 1H, J 7.99 Hz, CH Heterocíclico); 8.37 (t, 1H, J 7.99 e 11.99 Hz, CH Heterocíclico); 8.70 (d, 1H, J 3.99 Hz, CH=N Heterocíclico). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)**: 13 (CH₃); 34 (CH₃); 102 (CH Tiazol); 123 (CH); 124 (CH); 128.88 (2CH Ar); 128.91 (2CH Ar); 129 (CH); 130 (Cq); 141 (Cq); 143 (CH=N Heterocíclico); 150 (Cq); 172 (Cq).

(E)-3,5-dimetil-4-fenil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol

(LpQM 2b). Cromatografia em coluna proporcionou um sólido avermelhado, rendimento de 0.25g, 40%. Faixa de fusão (°C): 234-236. **IV (v cm⁻¹KBr) Principais sinais**: 1523.11 e 1493.59 (C=N); 1463.77 (C=C). **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 2.06, 2.45 e 2.49 (s, 3H, CH₃); 7.46 (m, 2H, CH Ar); 7.56 (m, 3H, CH Ar); 7.75 (t, 1H, J 5.99 e 12.59 Hz, CH Heterocíclico); 8.27 (d, 1H, J 8.09 Hz, CH Heterocíclico); 8.35 (t, 1H, J 8.09 e 14.99 Hz, CH Heterocíclico); 8.70 (d, 1H, J 5.09 Hz, CH=N Heterocíclico). **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆)**: 12 (CH₃); 13 (CH₃); 34 (CH₃); 112 (CH Ar); 123 (CH Ar); 125 (CH Ar); 129.31 (CH Ar); 129.40 (CH Ar); 129.87 (Cq); 130 (CH Ar); 136 (Cq); 144 (CH Ar); 170 (CH Ar).

(E)-4-(bifenil-4-il)-3-metil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol

(LpQM 2c). Obteve-se um sólido avermelhado, rendimento de 0.4g, 53%. Faixa de fusão (°C): 111-114. **IV (v cm⁻¹KBr) Principais sinais**: 1598.90 (C=N); 1481.03 (C=C). **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 2.22 e 2.48 (s, 3H, CH₃); 6.91 (s, 1H, CH Tiazol); 7.39 (m, 5H, CH Ar); 7.59 (m, 4H, CH Ar); 7.69 (t, 1H, CH Heterocíclico); 8.24 (m, 2H, CH Heterocíclico); 8.68 (d, 1H, J 4.49 Hz, CH=N Heterocíclico). **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆)**: 13 (CH₃); 21 (CH₃); 103 (CH Ar); 107 (CH Ar); 124 (CH Ar); 125 (CH Ar); 126 (CH Ar); 127 (CH Ar); 128 (CH Ar); 129.28 (CH Ar); 129.41 (CH Ar); 137 (CH Ar); 139 (Cq); 140 (Cq); 145 (Cq).

(E)-4-(4-metoxifenil)-3-metil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-

dihidrotiazol (LpQM 2d). A recristalização em solução etanólica a 30% proporcionou um sólido avermelhado, rendimento de 0.24g, 38%. Faixa de fusão (°C): 153-156. **IV (v cm⁻¹KBr) Principais sinais**: 1588.06 e 1521.23 (C=N); 1420.49 (C=C); 1250.52 (C-O-C). **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 2.43 (s, 3H, CH₃); 3.34 (s, 3H, CH₃-N); 3.81 (s, 3H, CH₃-O); 6.35 (s, 1H, CH Tiazol); 7.05 (d, 2H, CH Ar); 7.39 (m, 3H, CH Ar); 7.80 (d, 1H, CH Heterocíclico); 8.09 (t, 1H, CH Heterocíclico); 8.57 (d, 1H, CH Heterocíclico). **RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆)**: 12 (CH₃); 33 (CH₃-N₃); 55. (CH₃-OAr); 99 (CH-S); 114 (2CH Ar);

119 (CH Ar); 122 (Cq Ar); 123 (CH Ar); 130 (CH Ar); 135 (CH Ar); 140 (CH-N Ar); 148 (CH=N Ar); 154 (Cq-N Ar); 156 (Cq-O Ar); 159 (Cq=N); 169 (Cq).

(E)-4-(4-fluorofenil)-3-metil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 2e). A recristalização em solução etanólica a 30% proporcionou um sólido amarelado, rendimento de 0.24g, 38%. Faixa de fusão (°C): 174-177. **IV (v cm⁻¹KBr) Principais sinais:** 1582.61 e 1520.23 (C=N); 1418.89 (C=C). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2.42 (s, 3H, CH₃); 3.35 (s, 3H, CH₃); 6.46 (s, 1H, CH Tiazol); 7.33 (m, 4H, CH Ar); 7.58 (t, 1H, J 2.99 e 11.99 Hz, CH Heterocíclico); 7.80 (t, 1H, J 5.99 e 11.99 Hz, CH Heterocíclico); 8.09 (d, 1H, J 5.99 Hz, CH Heterocíclico); 8.56 (d, 1H, J 2.99 Hz, CH=N Heterocíclico). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):** 13 (CH₃); 33 (CH₃-N₃); 100 (CH-S Ar); 115.68 (CH Ar); 115.89 (CH Ar); 119 (CH Ar); 123 (CH Ar); 126 (Cq Ar); 131.07 (CH Ar); 131.16 (CH Ar); 136 (CH Ar); 139.57 (Cq-N Ar); 148 (Cq=N Ar); 155 (Cq-N Ar); 156 (Cq=N); 161 (Cq-F Ar); 169 (Cq Ar). **EMAR (ESI)** Calculado para C₁₇H₁₅FN₄S [M-H]⁺: 325.10; encontrado 325.19.

(E)-4-(4-clorofenil)-3-metil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 2f). A recristalização em solução etanólica a 30% proporcionou um sólido amarelado, rendimento de 0.25g, 39%. Faixa de fusão (°C): 154-157. **IV (v cm⁻¹KBr) Principais sinais:** 1583.92 e 1558.38 (C=N); 1463.07 (C=C). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2.44(s, 3H,CH₃); 3.36 (s, 3H, CH₃); 6.49 (s, 1H, CH Ar); 7.36 (t, 1H, J 5.99 e 11.99 Hz, CH Ar); 7.55 (m, 4H, CH Ar); 7.83 (t, 1H, J 7.59 e 11.99 Hz, CH Ar); 8.11 (d, 1H, J 7.99 Hz, CH Ar); 8.58 (d, 1H, J 6.79 Hz, CH=N Ar). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):** 12 (CH₃); 33 (CH₃-N₃); 100 (CH-S); 119 (2CH Ar); 123 (2CH Ar); 128 (CH Ar); 129 (CH Ar); 130 (Cq Ar); 133 (CH Ar); 136 (Cq-Cl); 139 (Cq); 148 (Cq=N Ar); 154 (Cq); 155 (Cq=N); 169 (Cq).

(E)-4-(4-bromofenil)-3-metil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 2g). A recristalização em solução etanólica a 30% proporcionou um sólido amarelado, rendimento de 0.49g, 54%. Faixa de fusão (°C): 160-162. **IV (v cm⁻¹KBr) Principais sinais:** 1583.10 e 1524.78 (C=N); 1419.91 (C=C). **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2.44 (s, 3H, CH₃); 3.37 (s, 3H, CH₃); 6.54 (s, 1H, CH Ar); 7.46 (m, 3H, CH Ar); 7.70 (d, 2H, CH Ar); 7.89 (d, 1H, CH Ar); 8.12 (d, 1H, CH); 8.42 (t, 1H, CH Ar); 8.59 (d, 1H, CH Ar). **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆):** 13 (CH₃); 33 (CH₃); 101 (CH-S Tz); 120 (CH Ar); 122 (C-Br); 123 (CH Ar); 124 (CH Ar); 129 (Cq-N Tz); 130 (CH Ar); 131 (CH Ar); 137 (CH Ar); 139 (Cq Ar); 147 (Cq); 155 (Cq).

(E)-3-metil-4-(4-nitrofenil)-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 2h). Após lavagem com água obteve-se um sólido amarelado, rendimento de 0.29g, 44%. Faixa de fusão (°C): 200-203. **IV (v cm⁻¹KBr) Principais sinais:** 1597.71 e 1563.87 (C=N); 1462.23 (C=C); 1343.67 (NO₂). **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2.44 (s, 3H, CH₃); 3.42 (s, 3H, CH₃); 6.74 (s, 1H, CH Ar); 7.375 (t, 1H, CH Ar); 7.83 (m, 3H, CH Ar); 8.11 (d, 1H, CH Ar); 8.33 (d, 2H, CH Ar); 8.59 (d, 1H, CH=N Ar). **RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆):** 18 (CH₃); 39 (CH₃); 108 (CH-S); 125 (CH Ar); 128 (CH Ar); 129 (CH Ar); 134 (C Ar); 141 (C-N Tz); 144 (C-NO₂); 152 (Cq); 153 (Cq); 160 (Cq); 175 (Cq). **EMAR (ESI)** Calculado para C₁₇H₁₅N₅O₂S [M+H]⁺: 354.09; encontrado 354.10.

(E)-3-metil-4-(3-nitrofenil)-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 2i). A recristalização em solução etanólica a 70% proporcionou um sólido alaranjado, rendimento de 0.78g, 93%. Faixa de fusão (°C): 242-244. **IV (v cm⁻¹KBr) Principais sinais:** 1588.21 e 1532.80 (C=N); 1486.48 (C=C); 1351.88 (NO₂). **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2.23 e 2.48 (s, 3H, CH₃); 7.16 (s, 1H, CH Tiazol); 7.57 (m, 3H, CH Ar); 7.79 (s, 1H, CH Ar); 8.06 (d, 1H, J 23.99Hz, CH Ar); 8.32 (m, 2H, CH Ar); 8.72 (d, 1H, CH Ar). **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆):** 13 (CH₃); 106 (CH Tiazol); 123.51 (CH Ar); 123.62 (CH Ar); 123.80 (CH Ar); 125 (CH Ar); 128.95 (CH Ar); 129 (CH Ar); 130 (CH Ar); 132 (CH Ar); 135 (CH Ar); 137 (CH Ar); 138 (CH Ar); 143 (CH=N Heterocíclico); 144 (CH Ar); 147 (Cq); 150 (Cq); 172 (Cq). **EMAR (ESI)** Calculado para C₁₇H₁₅N₅O₂S [M-H]⁺: 352.40; encontrado 352.85.

(E)-4-(3,4-diclorofenil)-3-metil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 2j). Após lavagem com água obteve-se um sólido alaranjado, rendimento de 0.33g, 83%. Faixa de fusão (°C): 195-198. **IV (v cm⁻¹KBr) Principais sinais:** 1594.89 e 1525.82 (C=N); 1492.10 (C=C). **RMN ¹H (300 MHz, CHCl₃-*d*₆):** δ 2.40 (s, 3H, CH₃); 6.36 (s, 1H, CH Tiazol); 6.85 (d, 1H, J 8.09 Hz, CH Ar); 7.33 (m, 6H, CH Ar); 7.94 (t, 1H, CH Ar); 8.22 (d, 1H, J 6.89 Hz, CH Ar); 8.84 (d, 1H, CH Ar). **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆):** 13 (CH₃); 104 (CH Tiazol); 121 (CH Ar); 123 (CH Ar); 127 (CH Ar); 128.05 (CH Ar); 128.19 (CH Ar); 128.99 (CH Ar); 129 (CH Ar); 130.23 (CH Ar); 130.55 (Cq); 132.63 (CH Ar); 132.75 (Cq Ar); 136 (Cq); 138 (Cq); 139 (CH Ar); 145 (CH Ar); 153 (Cq).

(E)-4-(2,4-diclorofenil)-3-metil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 2k). Cromatografia em coluna proporcionou um sólido amarelado, rendimento de 0.22g, 50%. Faixa de fusão (°C): 130-133. **IV (v cm⁻¹KBr) Principais sinais:** 1601.24 (C=N); 1494.62 (C=C). **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2.59 (s, 3H, CH₃); 3.29

(s, 3H, CH₃); 6.06 (s, 1H, CH Ar); 7.30 (m, 3H, CH Ar); 7.54 (d, 1H, J 17.99Hz, CH Ar); 7.72 (t, 1H, J 17.09 e 8.99 Hz, CH Ar); 8.27 (t, 1H, J 8.39 Hz, CH Ar); 8.63 (d, 1H, J 7.19Hz, CH=N Ar). **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆):** 13 (CH₃); 32 (CH₃); 101 (CH Tiazol); 120 (CH Ar); 122 (CH Ar); 127 (CH Ar); 128 (Cq Ar); 129 (CH Ar); 132 (CH Ar); 135 (Cq Ar); 136.21 (CH Ar); 136.46 (Cq Ar); 136.56 (Cq Ar); 147.97 (CH Ar); 156.27 (Cq); 156.51 (Cq); 169 (Cq);

(E)-4-(4-bromofenil)-3,5-dimetil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-

dihidrotiazol (LpQM 2l). A recristalização em solução etanólica a 70% proporcionou um sólido amarelado, rendimento de 0.16g, 31%. Faixa de fusão (°C): 150-152. **IV (v cm⁻¹KBr)** **Principais sinais:** 1554.61 e 1526.67 (C=N); 1494.37 (C=C). **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 3.43 (s, 3H, CH₃); 3.84 (s, 3H, CH₃); 4.65 (s, 3H, CH₃); 8.76 (t, 1H, J 5.99 e 11.69, CH Heterocíclico); 8.84 (d, 1H, J 7.79Hz, CH Ar); 9.20 (m, 2H, CH Heterocíclico); 9.40 (d, 2H, J 8.09Hz, CH Ar); 9.53 (d, 1H, J 8.09Hz, CH Ar); 10.00 (d, 1H, J 3.89Hz, CH=N Heterocíclico). **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆):** 20 (CH₃); 33 (CH₃); 43 (CH₃); 120 (Cq Tiazol); 123 (CH Heterocíclico); 129 (CH Heterocíclico); 131 (Cq Ar); 132.37 (2 CH Ar); 132.73 (2 CH Ar); 134 (Cq Ar); 136 (CH Heterocíclico); 149 (CH=N Heterocíclico); 155 (Cq Heterocíclico); 156 (Cq); 193 (Cq).

(E)-3-metil-4-(naftalen-1-il)-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol

(LpQM 2m). Obteve-se um sólido alaranjado, rendimento de 0.26, 53%. Faixa de fusão (°C): 122-125. **IV (v cm⁻¹KBr)** **Principais sinais:** 1584.73 e 1523.75 (C=N); 1416.76 (C=C). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2.46 (s, 3H, CH₃); 3.29 (s, 3H, CH₃-N); 6.80 (s, 1H, CH Tiazol); 7.62 (m, 2H, CH Ar); 7.78 (t, 1H, CH Ar); 8.02 (m, 4H, CH Ar); 8.13 (d, 1H, CH Heterocíclico); 8.30 (t, 1H, CH Heterocíclico); 8.38 (t, 1H, CH Heterocíclico); 8.71 (d, 1H, CH Heterocíclico). **RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆):** 12 (CH₃); 33 (CH₃-N₃); 100 (CH-S); 119 (2 CH Ar); 123 (2CH Ar); 125(Cq Ar); 126.71 (CH Ar); 126.92(CH Ar); 127.56 (CH Ar); 127.96 (CH Ar); 128 (Cq Ar); 132 (CH Ar); 136 (Cq Ar); 140 (Cq); 148 (Cq Ar); 155 (Cq=N); 156.07(Cq).

(E)-3,4-difenil)-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 3 a).

Obteve-se um sólido alaranjado, rendimento de 0.6g, 99%. Faixa de fusão (°C): 232-234. **IV (v cm⁻¹KBr)** **Principais sinais:** 1598.90 (C=N); 1481.03 (C=C). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2.23 (s, 3H, CH₃); 6.90 (s, 1H, CH Tiazol); 7.3 (m, 10H, CH Ar); 7.81 (t, 1H, J 3.99 e 11.99 Hz, CH Heterocíclico); 8.26 (d, 1H, J 7.99 Hz, CH Heterocíclico); 8.39 (t, 1H, J

7.99 e 11.99 Hz, CH Heterocíclico); 8.73 (d, 1H, J 3.99 Hz, CH=N Heterocíclico). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):** 13 (CH₃); 103 (CH Tiazol); 123 (CH Ar); 125 (CH Ar); 128.21(CH Ar); 128.27 (CH Ar); 128.38 (2CH Ar); 128.41 (CH Ar); 128.64 (CH Ar); 128.84 (CH Ar); 130 (Cq); 137 (Cq); 140 (Cq); 143 (CH=N Heterociclo); 149 (Cq); 150 (Cq); 172 (Cq).

(E)-5-metil-3,4-difenil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol

(LpQM 3b). A recristalização em solução etanólica a 70% proporcionou um sólido amarelado, rendimento de 0.37g, 52%. Faixa de fusão (°C): 267-269. **IV (ν cm⁻¹KBr) Principais sinais:** 1523.11 e 1493.59 (C=N); 1463.77 (C=C). **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2.09 (s, 3H, CH₃); 2.19 (s, 3H, CH₃); 7.27 (m, 11H, CH Ar); 7.80 (t, 1H, J 7.79 e 17.09Hz, CH Heterocíclico); 8.10 (d, 1H, J 7.79Hz, CH Heterocíclico); 8.54 (d, 1H, J 4.79Hz, CH=N Heterocíclico). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):** 13 (CH₃); 13 (CH₃); 111 (C Ar); 120 (CH Ar); 123 (CH Ar); 127 (CH Ar); 128.68 (2CH Ar); 128.79 (2CH Ar); 128.94 (2 CH Ar); 128.98 (2 CH Ar); 130.20 (CH Ar); 130.49 (C Ar); 135 (CH Ar); 136 (Cq Ar); 138 (Cq Ar); 149 (CH Ar); 156.34 (Cq Ar); 156.59 (Cq); 168 (Cq Ar).

(E)-4-(bifenil-4-il)-3-fetil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol

(LpQM 3c). Obteve-se um sólido alaranjado, rendimento de 0.8g, 100%. Faixa de fusão (°C): 202-204. **IV (ν cm⁻¹KBr) Principais sinais:** 1616.19 (C=N); 1438.23 e 1478.00 (C=C). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2.24 (s, 3H, CH₃); 6.98 (s, 1H, CH Ar); 7.27 (m, 8H, CH Ar); 7.39 (m, 8H, CH Ar); 7.57 (d, 2H, CH Ar); 7.62 (d, 2H, CH Ar); 7.82 (t, 1H, CH Ar); 8.27 (d, 1H, CH Ar); 8.40 (t, 1H, CH Ar); 8.74 (d, 1H, CH=N Ar). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):** 13 (CH₃); 103 (CH-S Tz); 123 (CH Ar); 125 (CH Ar); 126 (3 CH Ar); 127 (C Ar); 128.32 (3 CH Ar); 128.44 (2 CH Ar); 128.84 (2 CH Ar); 128.96 (2 CH Ar); 129 (CH=N Ar); 137 (C Ar); 138 (C Ar); 139 (Cq); 140 (C-N Ar); 143 (C=N); 172 (N-C-S).

(E)-4-(4-metoxifenil)-3-fenil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol

(LpQM 3d). Obteve-se um sólido avermelhado, rendimento de 0.42g, 60%. Faixa de fusão (°C): 217-219. **IV (ν cm⁻¹KBr) Principais sinais:** 1600.79 (C=N); 1477.24 e 1438.17 (C=C); 1251.93 (C-O-C). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2.22 (s, 3H, CH₃); 3.69 (s, 3H, CH₃-O); 6.80 (d, 3H, CH Ar); 7.11 (d, 2H, CH Ar); 7.35 (m, 5H, CH Ar); 7.81 (t, 1H, CH Ar); 8.25 (d, 1H, CH Ar); 8.40 (t, 1H, CH Ar); 8.72 (t, 1H, CH Ar). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):** 13 (CH₃); 55 (CH₃); 102 (CH Ar); 113 (CH Ar); 122 (CH Ar); 123 (Cq Ar); 125 (CH Ar); 126 (CH Ar); 128.24 (CH Ar); 128.34 (CH Ar); 128.50 (CH Ar); 128.88 (CH Ar); 129

(CH Ar); 137 (Cq Ar); 140 (CH Ar); 143 (CH Ar); 159 (Cq Ar); 172 (CH Ar). **EMAR (ESI)** Calculado para $C_{23}H_{20}N_4OS$ $[M+H]^+$: 401.14; encontrado 401.14.

(E)-4-(4-fluorofenil)-3-fenil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 3e). A recristalização em solução etanólica a 70% proporcionou um sólido amarelado, rendimento de 0.2g, 31%. Faixa de fusão (°C): 171-173. **IV (v cm^{-1} KBr)** **Principais sinais:** 1596.90 (C=N); 1524.36 e 1501.76 (C=C). **RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6):** δ 2.21 (s, 3H, CH₃); 6.69 (s, 1H, CH Tz); 7.24 (m, 7H, CH Ar); 7.55 (d, 2H, CH Ar); 7.82 (t, 2H, CH Ar); 8.09 (d, 1H, CH Ar); 8.55 (d, 1H, CH=N Ar). **RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6):** 13 (CH₃); 102 (CH-S); 115.12 (CH Ar); 115.41 (CH Ar); 119 (CH Ar); 123 (CH Ar); 125 (CH Ar); 126 (Cq Ar); 127.18 (CH Ar); 127.82 (CH Ar); 128.08 (CH Ar); 128.48 (CH Ar); 130.48 (CH Ar); 130.58 (CH Ar); 136 (CH Het.); 137 (Cq); 138 (Cq-N Tz); 148 (C=N Het.); 155 (Cq-N Het.); 156 (Cq=N); 169 (N-C-S); 177 (Cq-F). **EMAR (ESI)** Calculado para $C_{22}H_{17}FN_4S$ $[M+H]^+$: 389.12; encontrado 389.15.

(E)-4-(4-clorofenil)-3-fenil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 3f). Obteve-se um sólido alaranjado, rendimento de 0.7g, 99%. Faixa de fusão (°C): 246-248. **IV (v cm^{-1} KBr)** **Principais sinais:** 1615.65 (C=N); 1480.15 e 1443.99 (C=C). **RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6):** δ 2.23 (s, 3H, CH₃); 6.95 (s, 1H, CH Ar); 7.21 (d, 2H, CH Ar); 7.37 (m, 7H, CH Ar); 7.79 (t, 1H, CH Ar); 8.25 (d, 1H, CH Ar); 8.37 (t, 1H, CH Ar); 8.73 (d, 1H, CH Ar). **RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6):** 13 (CH₃); 104 (CH Ar); 123 (CH Ar); 125 (CH Ar); 128.38 (CH Ar); 128.43 (CH Ar); 128.96 (CH Ar); 129 (Cq Ar); 130 (CH Ar); 133 (Cq Ar); 137 (Cq Ar); 138 (Cq Ar); 143 (CH Ar); 144 (CH Ar); 150 (Cq); 172 (Cq Ar). **EMAR (ESI)** Calculado para $C_{22}H_{17}ClN_4S$ $[M+H]^+$: 405.09; encontrado 405.09.

(E)-4-(4-bromofenil)-3-fenil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 3g). Obteve-se um sólido alaranjado, rendimento de 0.7g, 94%. Faixa de fusão (°C): 243-246. **IV (v cm^{-1} KBr)** **Principais sinais:** 1615.49 (C=N); 1479.18 e 1443.64 (C=C). **RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6):** δ 2.23 (s, 3H, CH₃); 6.96 (s, 1H, CH Ar); 7.13 (d, 2H, CH Ar); 7.40 (m, 7H, CH Ar); 7.80 (t, 1H, CH Ar); 8.25 (d, 1H, CH Ar); 8.38 (t, 1H, CH Ar); 8.73 (d, 1H, CH Ar). **RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6):** 13 (CH₃); 104 (CH Ar); 122 (Cq Ar); 123 (CH Ar); 125 (CH Ar); 128.82 (CH Ar); 128.88 (CH Ar); 129.44 (CH Ar); 129.95 (Cq Ar); 130 (CH Ar); 131 (CH Ar); 137 (Cq Ar); 139 (Cq Ar); 143 (CH Ar); 144 (CH Ar); 150

(Cq Ar); 172 (Cq Ar). **EMAR (ESI)** Calculado para $C_{22}H_{17}BrN_4S$ $[M+H]^+$: 449.04; encontrado 449.04.

(E)-4-(4-nitrofenil)-3-fenil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 3h). A recristalização em solução etanólica a 30% proporcionou um sólido avermelhado, rendimento de 0.49g, 68%. Faixa de fusão (°C): 243-246. **IV (v cm^{-1} KBr)** Principais sinais: 1605.67 (C=N); 1532.39 e 1514,95 (C=C); 1341.28 (NO₂). **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 2.23 (s, 3H, CH₃); 7.01 (s, 1H, CH Tiazol); 7.40 (m, 8H, CH Ar); 7.82 (t, 1H, J 7.04 e 14.09, CH Heterocíclico); 8.09 (d, 3H, J 8.39Hz, CH Ar); 8.56 (d, 1H, J 4.49Hz, CH=N Heterocíclico). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)**: 13 (CH₃); 106 (CH-S Tiazol); 119 (CH Ar); 123.48 (CH Ar); 123.72 (CH Ar); 128.05 (2 CH Ar); 128.29 (2 CH Ar); 128.98 (CH Het.); 129 (2 CH Ar); 136.35 (2 CH Ar); 136.89 (CH Het.); 137.31 (C-N Ar); 137.72 (C-NO₂); 146 (C-N Tiazol); 148 (C=N Heterocíclico); 155 (C-N Heterocíclico); 157 (C=N); 169 (N-C-S). **EMAR (ESI)** Calculado para $C_{22}H_{17}N_5O_2S$ $[M+H]^+$: 416.11; encontrado 416.11.

(E)-4-(3-nitrofenil)-3-fenil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 3i). A recristalização em solução etanólica a 30% proporcionou um sólido alaranjado, rendimento de 0.9g, 100%. Faixa de fusão (°C): 150-152. **IV (v cm^{-1} KBr)** Principais sinais: 1601.37 (C=N); 1523.79 (C=C); 1347.45 (NO₂). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 2.23 (s, 3H, CH₃); 7.00 (s, 1H, CH Tiazol); 7.38 (m, 5H, CH Ar); 7.59 (m, 3H, CH Ar); 7.86 (s, 1H, CH Ar); 8.06 (m, 3H, CH Ar); 8.57 (d, 1H, CH=N Heterocíclico). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)**: 13 (CH₃); 104 (CH Ar); 119 (CH Ar); 122 (CH Ar); 123.08 (CH Ar); 123.65 (CH Ar); 128.08 (CH Ar); 128.47 (CH Ar); 128.96 (CH Ar); 129(CH Ar); 132 (CH Ar); 134 (Cq Ar); 136 (CH Ar); 137.15 (CH Ar); 137.35 (CH Ar); 147 (Cq); 148 (CH Ar); 155 (C Ar); 157 (Cq); 169 (Cq).

(E)-4-(3,4-diclorofenil)-3-fenil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 3j). Obteve-se um sólido alaranjado, rendimento de 0.8g, 100%. Faixa de fusão (°C): 227-229. **IV (v cm^{-1} KBr)** Principais sinais: 1615.58 e 1586.69 (C=N); 1482.18 e 1442.42 (C=C). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 2.23 (s, 3H, CH₃); 7.05 (s, 1H, CH Ar); 7.12 (d, 1H, CH Ar); 7.45 (m, 7H, CH Ar); 7.74 (t, 1H, CH Ar); 8.23 (d, 1H, CH Ar); 8.30 (t, 1H, CH Ar); 8.70 (d, 1H, CH Ar). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)**: 13 (CH₃); 105 (CH Ar); 122 (CH Ar); 124 (CH Ar); 128 (CH Ar); 129 (CH Ar); 130.25 (CH Ar); 130.39 (CH Ar); 130.79 (Cq Ar); 131.03 (Cq Ar); 131.30 (Cq Ar); 136 (Cq Ar); 137 (Cq); 142 (CH Ar); 144 (CH Ar); 150 (CH Ar); 171 (CH Ar).

(E)-4-(2,4-diclorofenil)-3-fenil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 3k). Obteve-se um sólido amarronzado, rendimento de 0.2g, 30%. Faixa de fusão (°C): 177-180. **IV (v cm⁻¹KBr) Principais sinais:** 1603.71 (C=N); 1582.56 e 1522.06 (C=C). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2.21 (s, 3H, CH₃); 6.72 (s, 1H, CH); 7.31 (m, 6H, CH Ar); 7.42 (d, 1H, CH Ar); 7.57 (d, 2H, CH Ar); 7.83 (t, 1H, CH Ar); 8.10 (d, 1H, CH Ar); 8.56 (d, 1H, CH Ar). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):** 13 (CH₃); 104 (CH Ar); 119 (CH Ar); 123 (CH Ar); 127.34 (CH Ar); 127.98 (CH Ar); 128.16 (CH Ar); 128.53 (CH Ar); 128.87 (CH Ar); 129 (Cq Ar); 134.16 (CH Ar); 134.23 (C Ar); 134.85 (Cq Ar); 135 (Cq Ar); 136.35 (Cq Ar); 136.56 (CH Ar); 148 (CH Ar); 155 (Cq Ar); 156 (Cq); 169 (Cq Ar). **EMAR (ESI)** Calculado para C₂₂H₁₆Cl₂N₄S [M+H]⁺: 439.05; encontrado 439.05.

(E)-4-(4-bromofenil)-5-metil-3-fenil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 3l). A recristalização em solução etanólica a 70% proporcionou um sólido amarelado, rendimento de 0.2g, 30%. Faixa de fusão (°C): 174-176. **IV (v cm⁻¹KBr) Principais sinais:** 1599.15 e 1524.51 (C=N); 1463.64 (C=C). **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2.09 (s, 3H, CH₃); 2.19 (s, 3H, CH₃); 7.15 (d, 2H, CH Ar); 7.30 (m, 6H, CH Ar); 7.48 (d, 2H, CH Ar); 7.81 (t, 1H, CH Ar); 8.09 (d, 1H, CH Ar); 8.55 (d, 1H, CH=N Ar). **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆):** 12 (CH₃); 13 (CH₃); 95 (CH Tiazol); 119 (CH Ar); 121 (CH Ar); 123 (CH Ar); 127 (CH Ar); 128.41 (CH Ar); 128.59 (CH Ar); 131 (CH Ar); 132 (CH Ar); 136 (Cq); 148 (Cq).

(E)-4-(naftalen-1-il)-3-fenil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol (LpQM 3m). A recristalização em solução etanólica a 70% proporcionou um sólido alaranjado, rendimento de 0.7g, 98%. Faixa de fusão (°C): 166-169. **IV (v cm⁻¹KBr) Principais sinais:** 1618,51 (C=N); 1483.89 e 1442.40 (C=C). **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2.23 (s, 3H, CH₃); 6.80 (s, 1H, CH Tiazol); 7.17 (d, 1H, J 8.09Hz, CH Ar); 7.32 (m, 5H, CH Ar); 7.51 (m, 2H, CH Ar); 7.77 (m, 6H, CH Ar); 8.10 (d, 1H, J 8.09Hz, CH Heterocíclico); 8.55 (d, 1H, J 4.19Hz, CH=N Heterocíclico). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):** 13 (CH₃); 103 (CH-S Ar); 123 (CH Ar); 125.10 (CH Ar); 125.51 (CH Ar); 126.73 (CH Ar); 126.96 (CH Ar); 127.52 (CH Ar); 127.59 (CH Ar); 127.78 (CH Ar); 127.93 (Cq Ar); 127.99 (C Ar); 128.24 (CH Ar); 128.44 (CH Ar); 128.91 (CH Ar); 132 (Cq Ar); 137 (Cq Ar); 140 (Cq Ar); 143.55 (CH Ar); 143.94 (CH=N Ar); 150 (Cq=N); 172 (Cq). **EMAR (ESI)** Calculado para C₂₆H₂₀N₄S [M+H]⁺: 421.14; encontrado 421.14.

7.2. ANIMAIS

Para a determinação da citotoxicidade em esplenócitos, camundongos albinos da linhagem BALB/c (fêmeas entre 6-8 semanas) foram fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM, Recife, Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas esterilizadas, e receberam alimentação e água à vontade. Os experimentos foram aprovados pelos comitês de ética da FIOCRUZ.

7.3. PARASITAS

Epimastigotas foram coletadas e mantidas em meio axênico usando o meio de cultura "liver infusion triptose" contendo 10% de soro bovino fetal (SBF), 1% de hemina, 1% de meio R9 e 50 µg/mL de gentamicina e mantidas sob 26° C. Tripomastigotas circulantes da cepa Y foram coletadas do sobrenadante de células LLC-MK₂ infectadas. Os parasitas foram então mantidos em ambiente axênico usando o meio RPMI-1640 contendo 10% de SBF, 1 % de hemina, 1 % de meio R9 e 50 µg/mL de gentamicina em estufa sob 37 °C e 5 % de CO₂.

7.4. TOXICIDADE EM ESPLENÓCITOS

Células esplênicas (6×10^5 células/poço) obtidas anteriormente foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo plano, contendo meio de cultura RPMI com 10% de soro bovino fetal. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram incubadas com os compostos em sete diferentes concentrações (faixa de 200 a 0,1 µg/mL) e com 1 µM de timidina/poço durante 24 h em estufa de CO₂ a 37°C. Em paralelo, foram feitos controles com células tratadas com saponina (0,05%), com células tratadas com DMSO (0,05%), substâncias com reconhecida atividade tóxica e um controle sem tratamento. Após 24 h de incubação, as células foram coletadas em papel de fibra de vidro e, posteriormente, a captação de timidina foi determinada através do contador beta de cintilação. O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se a percentagem de incorporação de timidina nos poços com as drogas em relação aos poços não tratados.

7.5. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA PARA EPIMASTIGOTAS

Epimastigotas (Dm28c) foram contadas em um hemocitômetro e depois vertidas em placas de 96 poços, a um número de células de 10^6 células/poço. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO e depois diluídos em meio LIT em cinco concentrações diferentes (1.56, 3.1, 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 µg / mL) e adicionado às respectivas cavidades, em

duplicata. A placa foi incubada durante 5 dias a 26°C, foram recolhidas alíquotas de cada poço, e o número de parasitas viáveis foram contadas numa câmara de Neubauer e comparados com cultura parasitária não tratada. CI_{50} foram calculados por meio de regressão não-linear no software GraphPad Prism 4.0. Benznidazol e Nifurtimox foram utilizados como fármacos de referência.

7.6. TOXICIDADE PARA TRIPOMASTIGOTA CEPA Y

Tripomastigotas metacíclicas foram recolhidas a partir do sobrenadante de células LLC-MK2 infectadas e, em seguida, distribuídas em placas de 96 poços a uma série de células de 4.10^5 células/poço em meio RPMI-1640. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO e depois diluídos em meio RPMI-1640 em cinco concentrações diferentes (1.56, 3.1, 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e adicionado às respectivas cavidades, em duplicata. A placa foi incubada durante 24h a 37°C e 5% de CO_2 . Alíquotas de cada poço foram recolhidas, e o número de parasitas viáveis foi contado numa câmara de Neubauer. A percentagem de inibição foi calculada em relação às culturas não tratadas. O cálculo das CC_{50} também foi realizada por meio de regressão não-linear com o software GraphPad Prism 4.0. Benznidazol e Nifurtimox foram utilizados como os fármacos de referência.

REFERÊNCIAS

- [1] Organização Mundial de Saúde; Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/about/en/>. Acessado em: 31 de Março de 2014.
- [2] Fundação Oswaldo Cruz; Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas>>. Acessado em: 02 de Abril de 2014.
- [3] ROCHA, M.O.; TEIXEIRA, M.M.; RIBEIRO, A.L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 5, 727–743, 2007.
- [4] KIRCHHOFF, L. V. American trypanosomiasis (Chagas' disease). Ed. R. E. RAKEL, *Conn's Current Therapy*. W.B. Saunders, New York, 101-102, 2000.
- [5] DOS SANTOS, F. L. A.; LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; SILVA, K. E. R.; ROLIM, L. A.; GOMES, T. C. B. L.; FERRAZ, L. R. M.; LIMA, Á. A. N.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; ROLIM-NETO, P. J. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* v.33, n.1, p. 37-47, 2012.
- [6] LIESE, B. H.; SCHUBERT, L. Official development assistance for health—how neglected are neglected tropical diseases? An analysis of health financing. *International Health.* 1, 141—147, 2009.
- [7] PÉCOUL, B.; ORBINSKI, J.; TORREELE, E. Fatal imbalance: the crisis in research and development for neglected diseases, Geneva: Médecins Sans Frontières/Drug for Neglected Diseases Working Group, 2001. Disponível em: <<http://www.msf.org/source/access/2001/fatal/fatal.pdf>>. Acessado em: 06 de Abril de 2014.
- [8] McKERROW, J. H.; CAFFREY, C.; KELLY, B.; LOKE, P.; SAJID, M. Proteases in parasitic diseases. *Annual Review Pathology*, 1 (497), 497-536, 2006.
- [9] BRAK, K.; DOYLE, P. S.; McKERROW, J. H.; ELLMAN, J. A. Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. *Journal of the Americal Society*, 130 (20), 6404-6410, 2008.
- [10] HERNANDES, M. Z.; RABELLO, M. M.; LEITE, A. C.; CARDOSO, M. V.; MOREIRA, D. R.; BRONDANI, D. J.; SIMONE, C. A.; REIS, L. C.; SOUZA, M. A.;

PEREIRA, V. R.; FERREIRA, R. S.; McKERROW, J. H. Studies toward the structural optimization of novel thiazolyldrazone-based potent antitrypanosomal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, V.18, N.22, Pg. 7826-7835, 2010.

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

[12] CAPUTTO, M. E.; CICCARELLI, A.; FRANK, F.; MOGLIONI, A. G.; MOLTRASIO, G. Y.; VEGA, D.; LOMBARDO, E.; FINKIELSZTEIN, L. M. Synthesis and biological evaluation of some novel 1-indanone thiazolyldrazone derivatives as anti-Trypanosoma cruzi agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Volume 55, Pag. 155-163, 2012.

[13] DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; McKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosome Cysteine Protease Cruzain. **Journal of Medical Chemistry**, 45 (13), 2695-2707, 2002.

[14] CHIYANZU, I.; HANSELL, E.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; McKERROW, J. H.; CHIBALE, K. Synthesis and Evaluation of Isatins and Thiosemicarbazone Derivatives Against Cruzain, Falcipain-2 and Rhodesain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 13 (2), 3527-3530, 2003.

[15] GREENBAUM, D. C.; MACKEY, Z.; HANSELL, E.; DOYLE, P.; GUT, J.; CAFFREY, C. R.; LEHRMAN, J.; ROSENTHAL, P. J.; McKERROW, J. H.; CHIBALE, K. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Parasiticidal Thiosemicarbazone Cysteine Protease Inhibitors Against Plasmodium falciparum, Trypanosoma brucei, and Trypanosoma cruzi. **Journal of Medical Chemistry**, 47 (12), 3212-3219, 2004.

[16] FUJII, N.; MALLARI, J. P.; HANSELL, E. J.; MACKEY, Z.; DOYLE, P.; ZHOU, Y. M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; McKERROW, J. H.; GUY, R. K. Discovery of Potent Thiosemicarbazone Inhibitors of Rhodesain and Cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 15 (1), 121-123, 2005.

[17] LEITE, A. C. L.; LIMA, R. S.; MOREIRA, D. R. M.; CARDOSO, M. V. O.; BRITO, A. C. G.; SANTOS, L. M. F.; HERNANDES, M. Z.; KIPERSTOK, A. C.; LIMA, R. S.; SOARES, M. B. P. Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against Trypanosoma cruzi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 14 (11), 3749-3757, 2006.

[18] LEITE, A. C. L.; MOREIRA, D. R. M.; CARDOSO, M. V. O.; HERNANDES, M. Z.; PEREIRA, V. R. A.; SILVA, R. O.; KIPERSTOK, A. C.; LIMA, M. S.; SOARES, M. B. P. Synthesis, Cruzain Docking, and in vitro Studies of Aryl-4-Oxothiazolyhydrazones Against *Trypanosoma cruzi*. **ChemMedChem**, 2 (9), 1339-1345, 2007.

[19] GUIDO, R. V.; TROSSINI, G. H.; CASTILHO, M. S.; OLIVA, G.; FERREIRA, E. I.; ANDRICOPULO, A. D. Structure-Activity Relationships for a Class of Selective Inhibitors of the Major Cysteine Protease from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 23 (6), 964-973, 2008.

[20] TROSSINI, G. H. G.; GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; FERREIRA, E. I.; ANDRICOPULO, A. D. Quantitative structure-activity relationships for a series of inhibitors of cruzaina from *Trypanosoma cruzi*: Molecular modeling, CoMFA and CoMSIA studies. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 28, 3-11, 2009. c

[21] PIZZO, C.; FARAL-TELLO, P.; SALINAS, G.; FLO, M.; ROBELLO, C.; WIPF, P.; MAHLER, S. G. Selenosemicarbazones as Potent Cruzipain Inhibitors and Their Antiparasitic Properties Against *Trypanosoma cruzi*. **Medicinal Chemistry Communications**, 3, 362-368, 2012.

[22] MERLINO, A.; BENITEZ, M.; CAMPILLO, N. E.; PAEZ, J. A.; TINOCO, L.W.; GONZALEZ, M.; CERECETTO, H. Amidines Bearing Benzofuroxan or Benzimidazole 1,3-Dioxide Core Scaffolds as *Trypanosoma cruzi*-Inhibitors: Structural Basis for Their Interactions with Cruzipain. **Medicinal Chemistry Communications**. V. 3, Pg. 90-101, 2012.

[23] PARRILHA, G. L.; DIAS, R. P.; ROCHA, W. R.; MENDES, I. C.; BENITEZ, D.; VARELA, J.; CERECETTO, H.; GONZALEZ, M.; MELO, C. M. L.; NEVES, J. K. A. L.; PEREIRA, V. R. A. e BERALDO, H. 2-Acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their antimony(III) complexes exhibit high anti-trypanosomal activity. **Polyhedron**. V. 31, n. 01, p. 614-621, Janeiro 2012.

[24] LESSA, J. A.; REIS, D. C.; MENDES, I. C.; SPEZIALI, N. L.; ROCHA, L. F.; PEREIRA, V. R. A.; MELO, C. M. L. e BERALDO, H. Antimony(III) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones: Structural studies and investigation on the antitrypanosomal activity. **Polyhedron**, V.30, n. 02, p. 372-380, Fevereiro 2011.

[25] CHAGAS C. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 1, p. 159–218, 1909.

[26] BERNSTEIN, R. E. Darwin's illness: Chagas disease resurgens. **Journal of the Royal Society of Medicine**. London. V. 77, Pg. 608–609, 1984.

[27] AUFDERHEIDE, A. C. et al. A 9000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington. V.101, Pg. 2034–2039, 2004.

[28] ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**. Washington, v.12, n. 2, p. 240-253, 2011.

c

[29] DIAS, J.C.P.; COURA, J. R. Epidemiologia. Em: DIAS, J.C.P., COURA, J. R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: **FIOCRUZ** editora, 1997, Pg.33-66.

[30] RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas Disease. **Lancet**. V. 375, Pg. 1388–402, 2010.

[31] MÉDICOS SEM FRONTEIRAS. Estimated global population infected by *Trypanosoma cruzi*. New York, 2009. Disponível em: < http://www.treatchagas.org/imagens/MapChagasJun09_large.jpg>. Acesso em: 11 abril 2014.

[32] COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its Discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V. 104, Pg. 31-40, 2009.

[33] MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p.17-30, jul. 2009.

[34] LESCURE, F. X. et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. **The Lancet Infectious Disease**, Londres, V. 10, n. 8, Pg.. 556 – 570, ago. 2010.

[35] COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, Londres, v. 465, n. 730, p. 6 - 7, jun. 2010.

[36] MUÑOZ-SARAIVA, S. G. et al. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart Failure Review**, Norwell, v. 17, n. 1, p. 45 – 64, jan. 2010.

[37] FLORES-CHAVEZ, M. et al. Transfusional Chagas disease: parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, V. 46, Pg. 44-47, 2008.

[38] FORÉS, R. et al. Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation. **Bone marrow transplantation**. V. 39, Pg. 127-128, 2007.

[39] SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica, Basel**, V.115, n. 1-2, Pg. 14-21, jul-ago, 2010.

[40] PETHERICK, A. After years of neglect, Brazil takes aim at Chagas disease, **Nature Medicine**, Nova Iorque, v. 17, n. 10, p. 1174, out. 2011.

c

[41] AGUILAR, M. M. et al. Chagas disease in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 47-55, 2007.

[42] ARAÚJO, A. J. G.; SABROZA, P. C.; SILVA, L. F. R. F. Epidemiologia: situação atual. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=131>>. Acesso em 11 de abril de 2014.

[43] BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogar, 2000. p. 431.

[44] ESCHENAZI, B. Trypanosoma cruzi forms - Job for a association Medecins Sans Frontieres. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.coroflot.com/eschenazi/scientific-and-medical>>. Acesso em: 15 maio de 2014.

[45] DE SOUZA, W. Basic cell biology of Trypanosoma cruzi. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 8, p. 269-285, 2002.

[46] GALVÃO, C. e et al. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) and their geographical distribution with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**. V. 202. Pg. 1-36, 2003.

[47] DIAS, J. C. P. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and tours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical**, Brasília, v. 39, p.370-375, 2006.

[48] PEREIRA, K.S. et al. Chagas disease as a foodborne illness. **Journal of Food Protection**. V.72, p. 441–446, 2009.

[49] BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.114, n. 2, p. 103-10, 1997.

[50] PINTO, A.Y. et al. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. **Revista Panamericana de Salud Pública**. México, v. 25, p. 77–83, 2009.

c

[51] CHUNG, M. C.; GÜIDO, R. V.; MARTINELLI, T. F.; GONÇALVES, M. F.; POLLI, M. C.; BOTELHO, K. C.; VARANDA, E. A.; COLLI, W.; MIRANDA, M. T.; FERREIRA, E. I. Synthesis and in Vitro Evaluation of Potential Antichagasic Hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): A New Nitrofurazone Prodrug. **Bioorg. Med. Chem.** v. 11, n. 22, p. 4779–4783, 2003.

[52] COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 3-24, jan. 2002.

[53] ACQUATELLA, H. Echocardiography in Chagas heart disease. **Circulation**, Dallas, v.115, p. 1124–1131, 2007.

[54] MARIN-NETO, J.A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, Dallas, v.115, p. 1109–23, 2007.

[55] UMESH, S. P.; MRUNAL, K.; SHIRSAT, I. J.; SINGHVI, M. V.; NIKHIL, S.; Review: Chagas Disease; **American Journal of Pharmtech Research**; Volume 1, Issue 3, 2011.

[56] FIOCRUZ – Chagas. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/reactivos>, acessado em 18 de abril de 2014.

[57] BERN C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. Review. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 364, n. 26, p. 2527-34, 2011.

[58] ANDRADE, S. G. et al. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 86, p. 624-626, 1992.

[59] KIRCHHOFF, L. V. American trypanosomiasis (Chagas' disease). In: R.E. Rakel, Editor, **Conn's Current Therapy**, New York. p. 101–102, 1999.

[60] COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 31-40, 2009.

[61] JANNIN, J.; VILLA, L., 2007. An overview of Chagas disease treatment. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 102 (Suppl. 1), p. 95–97, 2007.

c

[62] URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitology**. Amsterdam, v. 19, n. 11, p.495-501, 2003.

[63] CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human and Experimental Toxicology**, Basingstoke, v. 25, p. 471-9, 2006.

[64] 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**. London, v.64, p.1139-47, 2009.

[65] CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. A Pesquisa de Novas Drogas para o Tratamento da Doença de Chagas. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=125>>, acessado em 18 de Abril de 2014.

[66] LAFEPE. LAFEPE produzirá remédio para crianças portadoras do Mal de Chagas. Disponível em: < <http://www.lafepe.pe.gov.br/LAFEPE/noticias/noticiario/17072008.html>>, acessado em 18 de Abril de 2014.

[67] MITCH, L. Drug developers finally take aim at a neglected disease. **Science**. v. 333, n. 6045, p. 933–935, 2011.

[68] GERPE, A. e et al. Indazole N-oxide derivatives as antiprotozoal agents: synthesis, biological evaluation and mechanism of action studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 3467-80, 2006.

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

[70] KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COMINI, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1780, n. 11, p. 1236–1248, 2008.

c

[71] HALL, B. S.; WU, X.; HU, L.; WILKINSON, S. R. Exploiting the drug activating properties of a novel trypanosomal nitroreductase. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 54, n.3, p. 1193–1199, 2011.

[72] LAMARTINE, J. S.; MEDEIROS, F.P.M.; LA ROCA.; SILVA, K.E.R.; LIMA, L.N.A.; ROLIM, P.J.N. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas, **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n.2, p.103-118, 2007.

[73] CAVALLI, A.; LIZZI, F.; BONGARZONE, S.; BRUN, R.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; BOLOGNESI, M. L. Privileged structure-guided synthesis of quinazoline derivatives as inhibitors of trypanothione reductase. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 19, n. 11. p. 3031–3035, 2009.

[74] SCHENKMAN, S.; FERGUSON, M. A.; HEISE, N.; DE ALMEIDA, M. L.; MORTARA, R. A.; YOSHIDA, N. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by *trans*-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 59, n. 2, p.293–303, 1993.

[75] NERES, J.; BRYCE, R. A.; DOUGLAS, K. T. Rational drug design in parasitology: *trans*-sialidase as a case study for Chagas disease. **Drug Discov. Today.** v. 13, n. 3-4, p. 110–117, 2008.

[76] URBINA, J.A. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. **Curr Opin Infect Dis.** 14, 733–741, 2001.

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

[78] ALVAREZ, V. E.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. **Biochimica Biophysica Acta.**, v.1824, n.1, p. 195–206, 2012.

[79] OTTO, H. H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. **Chem. Rev.** v. 97, n. 1, p. 133–171, 1997.

c

[80] SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 120, n. 1, p. 1–21, 2002.

[81] SOUTO-PADRON, T.; CAMPETELLA, O. E.; CAZZULO, J. J.; SOUZA, W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. **J. Cell Sci.** V. 96, pg.485–490, 1990.

[82] MOREIRA, D. R. M. M. Planejamento estrutural, síntese e avaliação das propriedades tripanocidas de 2-iminotiazolidina-4-onas e seus análogos estruturais do tipo 2-imino-1,3-tiazóis. Tese de doutorado. Recife-PE, 2012.

[83] DOYLE, P. S.; ZHOU, Y. M.; HSIEH, I.; GREENBAUM, D. C.; MCKERROW, J. H.; ENGEL, J. C. The *Trypanosoma cruzi* protease cruzain mediates immune evasion. **Plos Pathog.** v. 7, n. 9, e1002139, 2011.

[84] MCKERROW, J. H.; ROSENTHAL, P. J.; SWENERTON, R.; DOYLE, P.; Development of protease inhibitors for protozoan infections. **Current Opinion in Infectious Diseases.** v. 21, n. 6, p. 668-672, 2008.

[85] MOREIRA, D. R. M.; LEITE, A. C. L.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Current Drug Targets**, v. 10, n. 3, p. 212-231, 2009.

[86] FRICKER, S. P.; MOSI, R. M.; CAMERON, B. R.; BAIRD, I.; ZHU, Y.; ANASTASSOV, V.; COX, J.; DOYLE, P. S.; HANSELL, E.; LAU, G.; LANGILLE, J.; OLSEN, O.; QIN, L.; SKERLJ, R.; WONG, R. S. Y.; SANTUCCI, Z.; MCKERROW, J. H.; **Journal of Inorganic Biochemistry.**, 102, 1839, 2008.

[87] SILVA, J. J. N.; OSAKABE, A. L.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W.; *In vitro* and *in vivo* antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors, **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n.1, p. 112-121, 2007.

[88] MCKERROW, J.H. et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 104 (1 Suppl), p.263–269, 2009.

[89] BRAK K. et al. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 53, p. 1763–1773, 2010.

c

[90] DU, X.; HANSELL, E.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R.; COHEN, F. E.; MCKERROW, J. H. Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents, **Chemistry & Biology**, 7, 733–742; 2000.

[91] CHAUBEY, A. e PANDEYA, S. N. Pyridine a versatile nucleuse in pharmaceutical field. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. Vol. 04, N. 04, 2011.

[92] Henry Gavin D., De Novo synthesis of substituted pyridines. **Tetrahedron**. Vol.60, Pg. 6043-606, 2004.

[93] BHATIA, M.S, “Synthesis and QSAR analysis of 5-substituted (arylmethylene)pyridin-2-amine derivatives as potential antibacterials”, **International Journal of Drug Discovery**, ISSN: 0975–4423, Volume 1, N. 1, 2009, pp-1-9.

[94] OZDEMIR, A.; DEMIRCI, F. Synthesis and the selective antifungal activity of 5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyridine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Volume 45 ,Pg. 2080-2084, 2010.

[95] AL-SAID, M. S.; BASHANDY, M. S.; AL-QASOUMI, S. I. e GHORAB, M.M. Anti-breast cancer activity of some novel 1,2-dihydropyridine, thiophene and thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Volume 46, N. 01, Pag. 137-141, 2011.

[96] ALI, K. A.; ABD-ELZAHER, M. M. e MAHMOUD, K. Synthesis and Anticancer Properties of Silver (I) Complexes Containing 2,6-Bis (substituted) pyridine Derivatives. **International Journal of Medicinal Chemistry**. Volume 2013. Artigo ID 256836, 7 páginas, 2013. doi:10.1155/2013/256836.

[97] RODRIGUES JR, M. T.; GOMES, J. C.; SMITH, J. e COELHO, F. Simple and highly diastereoselective access to 3,4-substituted tetrahydro-1,8-naphthyridines from Morita–Baylis–Hillman adducts. **Tetrahedron Letters**. Volume 51, N.38, 2010.

[98] DIAS, L. R. S. Synthesis, in vitro evaluation, and SAR studies of a potential antichagasic 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine series. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. Volume 15 , Pag. 211–219, 2007.

[99] CARDOSO, M. V. O. Síntese e avaliação da atividade antichagásica de novas hidrazonas. Tese de doutorado. Recife-PE, 2012.

[100] OLIVEIRA, A. R. Obtenção de novos ftalil-tiazóis e avaliação das atividades antitumoral e imunomodulatória in vitro. Dissertação de mestrado. Recife-PE, 2014.

[101] BONDOCK, S.; KHALIFA, W.; FADDA, A. A. Synthesis and antimicrobial evaluation of some new thiazole, thiazolidinone and thiazoline derivatives starting from 1-chloro-3,4-dihydronaphthalene-2-carboxaldehyde. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Volume 42, N.7, Pag. 948-954, 2007.

[102] HOLLA, B. S.; MALINI, K. V.; RAO, B. S.; SAROJINI, B. K.; KUMARI, N. S. Synthesis of some new 2,4-disubstituted thiazoles as possible antibacterial and anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Volume 38, N.3, Pag. 313-318, 2003.

[103] HARNETT, J. J. e et al. Phenolic thiazoles as novel orally-active neuroprotective agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. Volume 14, N. 01. Pag. 157-160, 2004.

[104] SOUZA, M. V. N. e et al. Métodos de obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos. **Química nova**. Volume 28, N.01, Pag. 77-84, 2005.

[105] MOREIRA, D. R. M. M.; COSTA, S. P. M.; HERNANDES; M. Z.; RABELLO, M. M.; OLIVEIRA FILHO, G. B.; MELO, C. M. L.; ROCHA, L. F.; SIMONE, C. A.; FERREIRA, R.; FRADICO, J. R. B.; MEIRA, C. S.; GUIMARÃES, E. T.; SRIVASTAVA, R. M.; PEREIRA, V.; SOARES, M. B. P. S.; LEITE, A. C. L. L. Structural Investigation of Anti-Trypanosomacruzi 2-Iminothiazolidin-4-ones Allows 142 the Identification of Agents with Efficacy in Infected Mice. **Journal of Medical Chemistry**, v. 55, n. 24, p. 10918-10936, 2012.

[106] FILHO, G. B. O. Planejamento estrutural, síntese e avaliação das propriedades tripanocidas de 4-tiazolinonas e seus análogos estruturais do tipo 1,3-tiazóis. Dissertação de mestrado. Recife-PE, 2013.

[107] GOMES, P. A. T. M. Síntese e Avaliação da Atividade Anti-Trypanosoma cruz Inéditas Tiazolil-Hidrazonas. Recife-PE, 2013.

[108] MOREIRA, D. R. M.; OLIVEIRA, A. D. T.; GOMES, P. A. T. M.; SIMONE, C. A.; VILLELA, F. S.; FERREIRA, R. S.; SILVA, A. C.; SANTOS, T. A. R.; CASTRO, M. C. A. B.; PEREIRA, V. R. A. e LEITE, A. C. L. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-Trypanosoma cruzi compounds which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**. V. 75, Pg. 467-478, 2014.

[109] ZHANG, D. N.; LI, J. T.; SONG, Y. L.; LIU, H. M.; Li, H. Y. Efficient One-Pot Three-Component Synthesis of N-(4-arylthiazol-2-yl)hydrazones in Water Under Ultrasound Irradiation. **Ultrason. Sonochem**. V. 19, Pg. 475–478, 2012.

[110] HERNANDES, M. Z.; CAVALCANTI, S. M. T.; MOREIRA, D. R. M.; AZEVEDO JUNIOR, W. F. de; LEITE, A. C. L. Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 03. Bentham Science Publishers Ltd. 2010.

[111] Oliveira, A. D. T. e et al. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-Trypanosoma cruzi compounds which induce apoptotic parasite death. **European Journal of medicinal Chemistry**. V. 75, Pg. 467-478. 2014.

[112] LIPINSKI, C.A; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V.23 (1-3), Pg. 3-25. 1997.

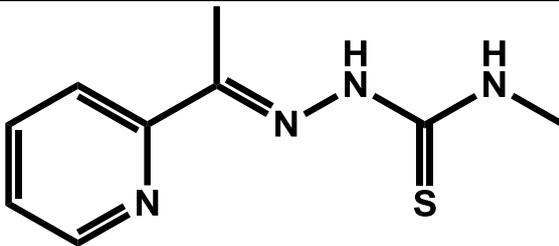
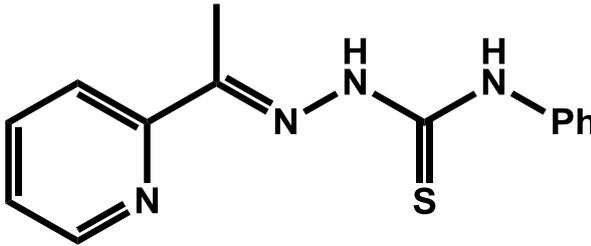
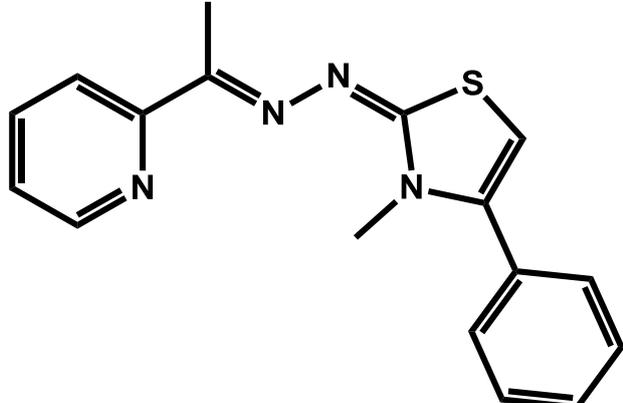
[113] Chemicalize.org. ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>). Disponível em: <http://www.chemicalize.org>. Acesso em: 7 de junho de 2014.

[114] SWAIN, M. Chemicalize.org. **Journal of Chemical Information and Modeling**. V. 52, Pg. 613-615. 2012.

APÊNDICE A

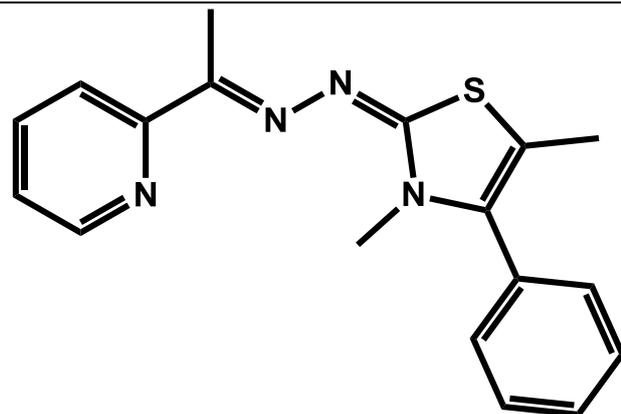
Abaixo são descritos algumas propriedades dos novos derivados piridil-1,3-tiazol sintetizados.

Propriedades físico-químicas das tiossemicarbazonas (LpQM 1a-b) e das piridil-1,3-tiazol (LpQM 2a-m; 3a-m) e rendimentos reacionais.

Código LpQM	Formula molecular	PM	Rendimento	R _f	Estrutura
1 a	C ₉ H ₁₂ N ₄ S	208.08	94%	0.6 (1:1-Hex:AcOEt)	
1b	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ S	270.09	89%	0.5 (9:1-Hex:AcOEt)	
2 a	C ₁₇ H ₁₆ N ₄ S	308.11	85%	0.6 (7:3-Hex:AcOEt)	

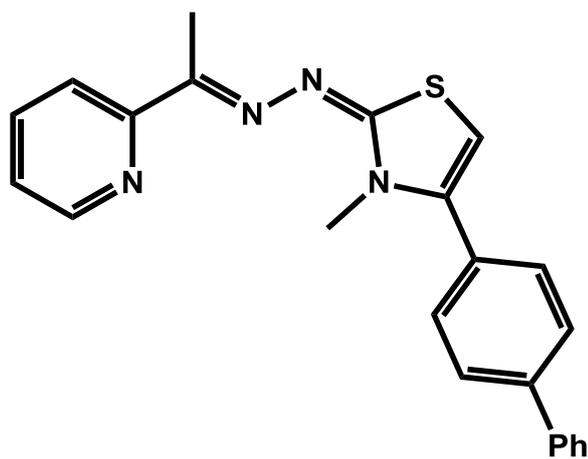
2b C₁₈H₁₈N₄S 322.13 90%

0.5 (7:3-
Hex:AcOEt)



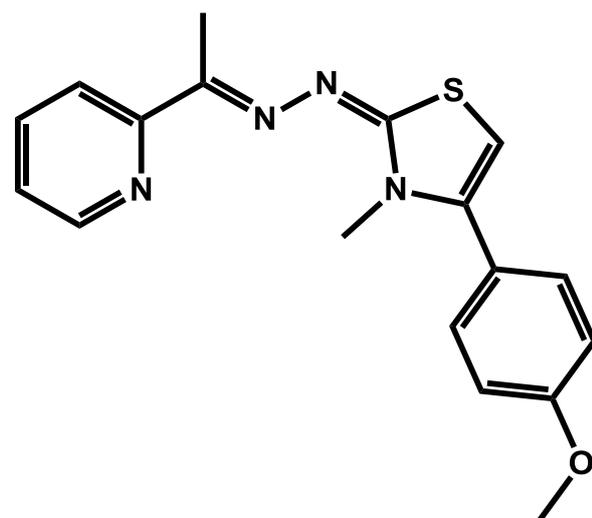
2c C₂₃H₂₀N₄S 384.14 53%

0.6 (7:3-
Hex:AcOEt)



2d C₁₈H₁₈N₄OS 338.12 38%

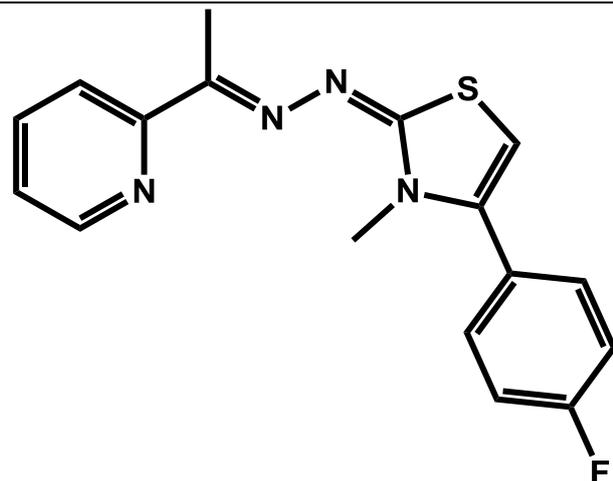
0.5 (7:3-
Hex:AcOEt)



2e $C_{17}H_{15}FN_4S$

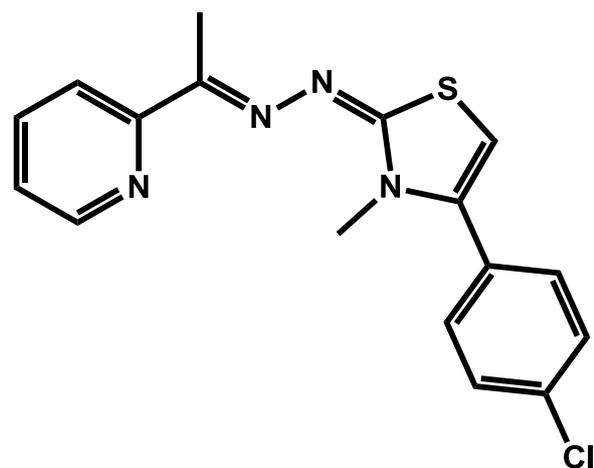
326.10

32%

0.5 (7:3-
Hex:AcOEt)**2f** $C_{17}H_{15}ClN_4S$

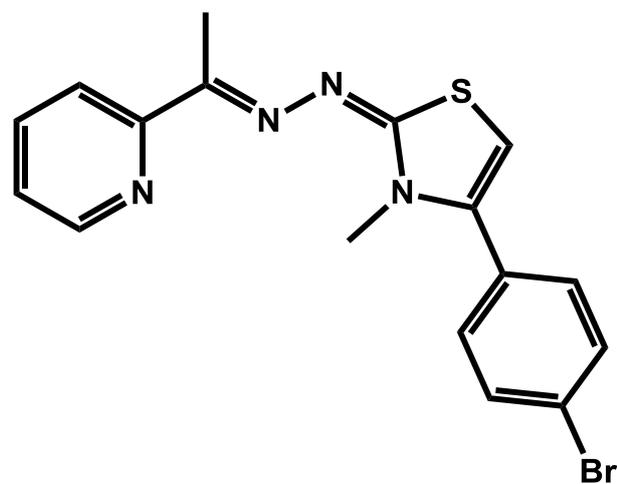
342.07

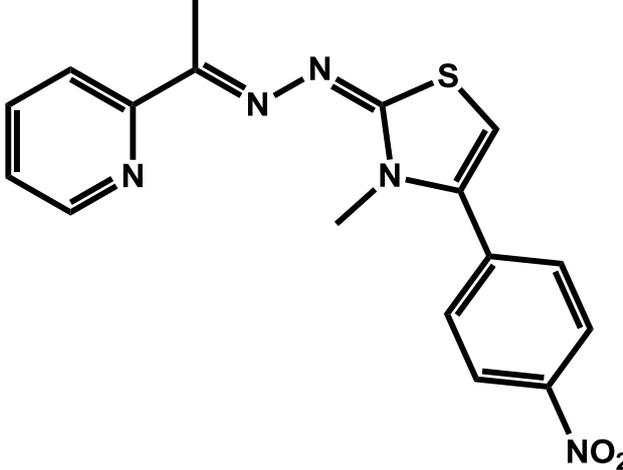
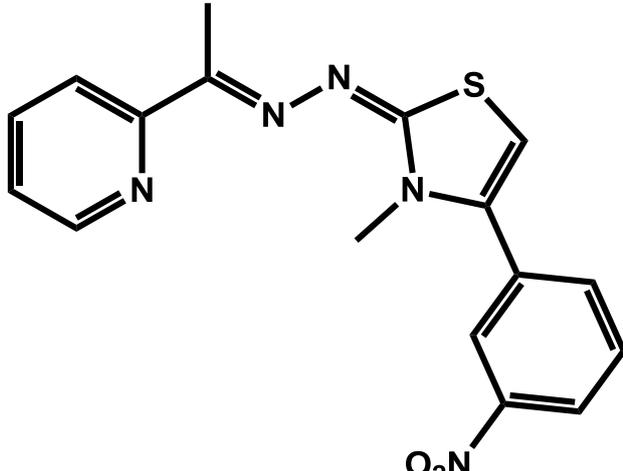
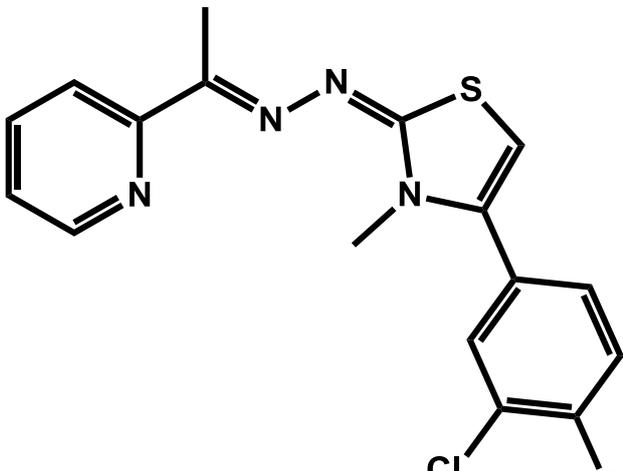
39%

0.6 (7:3-
Hex:AcOEt)**2g** $C_{17}H_{15}BrN_4S$

386.02

56%

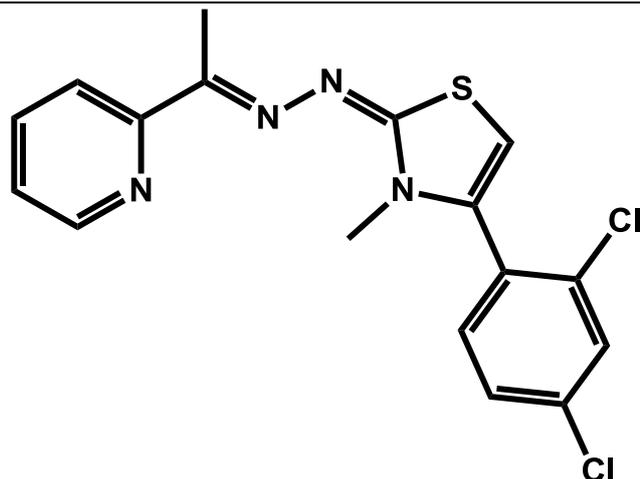
0.6 (7:3-
Hex:AcOEt)

2h	$C_{17}H_{15}N_5O_2S$	353.09	43%	0.5 (7:3- Hex:AcOEt)	
2i	$C_{17}H_{15}N_5O_2S$	353.09	93%	0.5 (7:3- Hex:AcOEt)	
2j	$C_{17}H_{14}Cl_2N_4S$	376.03	83%	0.6 (7:3- Hex:AcOEt)	

2k $C_{17}H_{14}Cl_2N_4S$

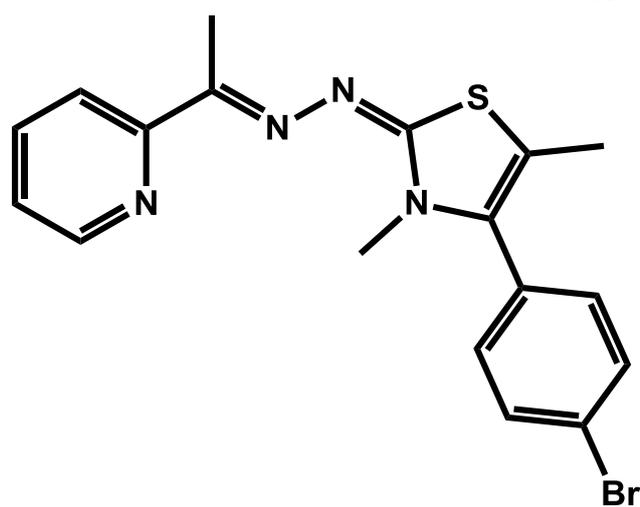
376.03

50%

0.5 (7:3-
Hex:AcOEt)**2l** $C_{18}H_{17}BrN_4S$

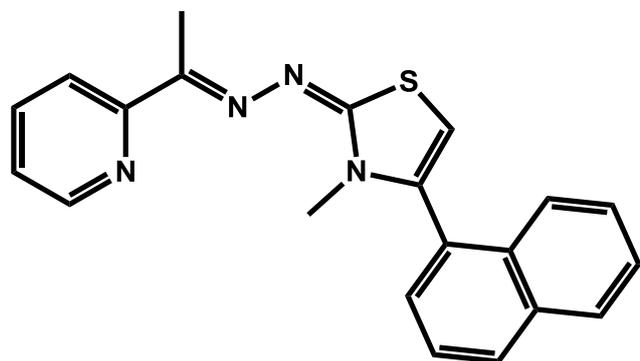
400.04

31%

0.6 (7:3-
Hex:AcOEt)**2m** $C_{21}H_{18}N_4S$

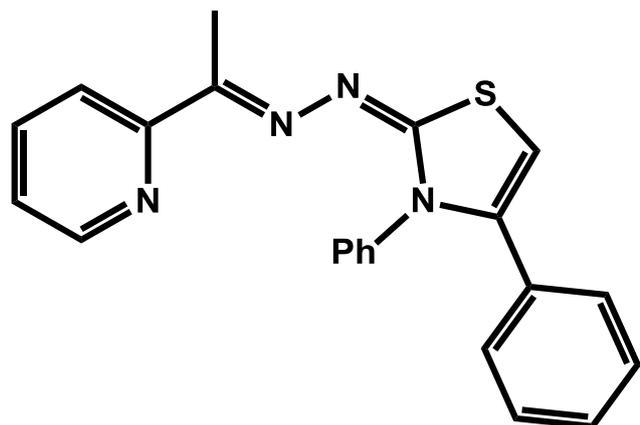
358.13

52%

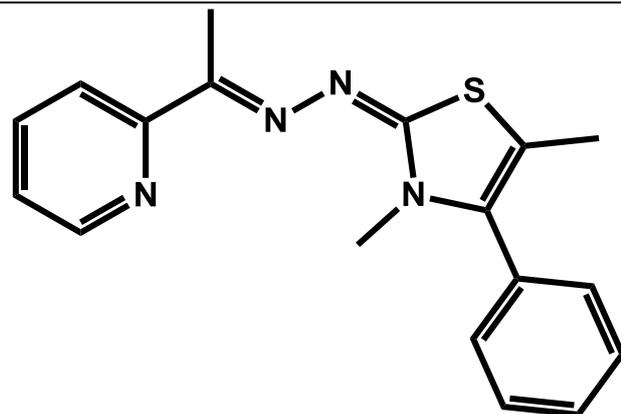
0.5 (7:3-
Hex:AcOEt)**3a** $C_{22}H_{18}N_4S$

370.13

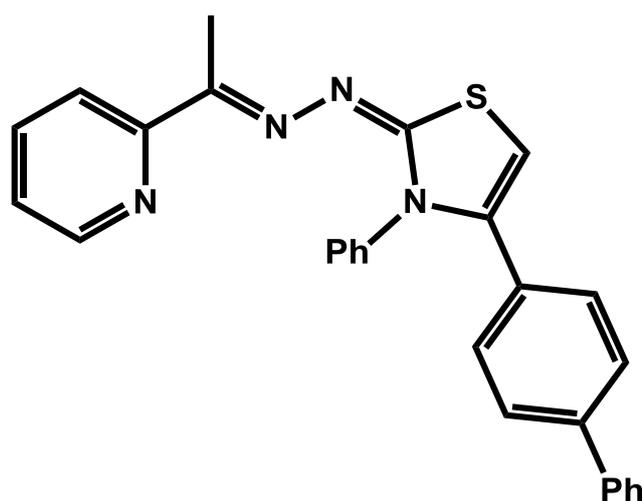
99%

0.4 (9:1-
Hex:AcOEt)

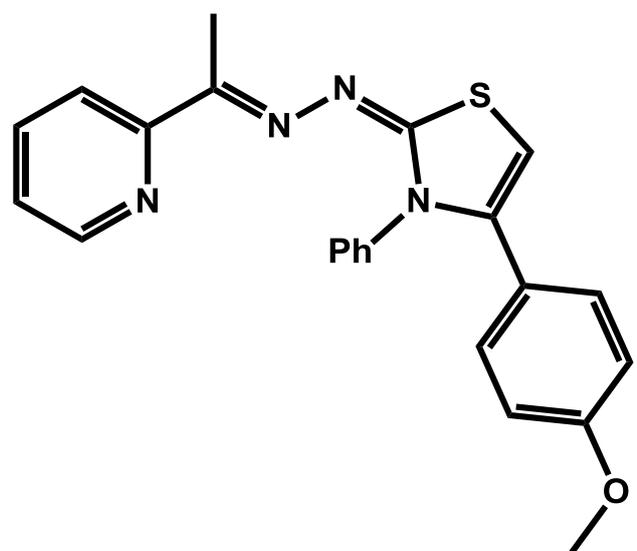
3b $C_{23}H_{20}N_4S$ 384.14 52% 0.4 (9:1-
Hex:AcOEt)



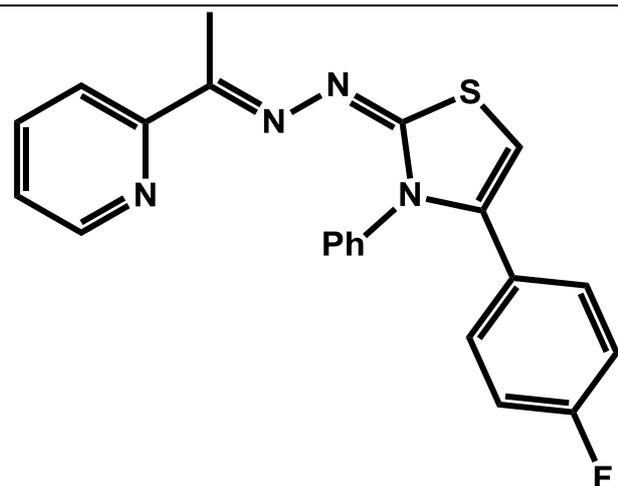
3c $C_{28}H_{22}N_4S$ 446.16 99% 0.4 (7:3-
Hex:AcOEt)



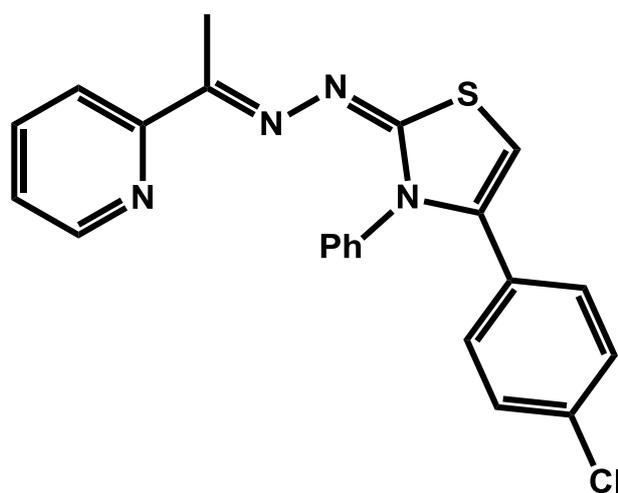
3d $C_{23}H_{20}N_4OS$ 400.14 60% 0.6 (7:3-
Hex:AcOEt)



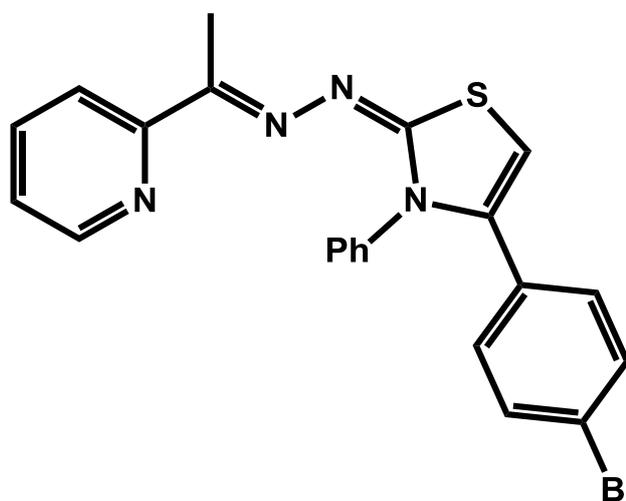
3e $C_{22}H_{17}FN_4S$ 388.18 31% 0.4 (9:1-
Hex:AcOEt)



3f $C_{22}H_{17}ClN_4S$ 404.09 99% 0.4 (9:1-
Hex:AcOEt)



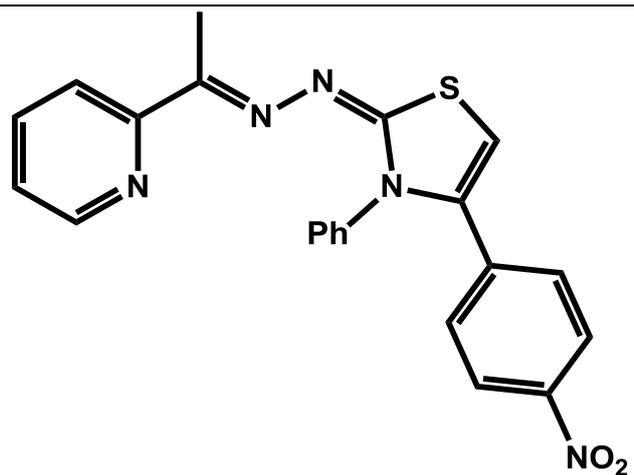
3g $C_{22}H_{17}BrN_4S$ 448.04 94% 0.4 (9:1-
Hex:AcOEt)



3h $C_{22}H_{17}N_5O_2S$

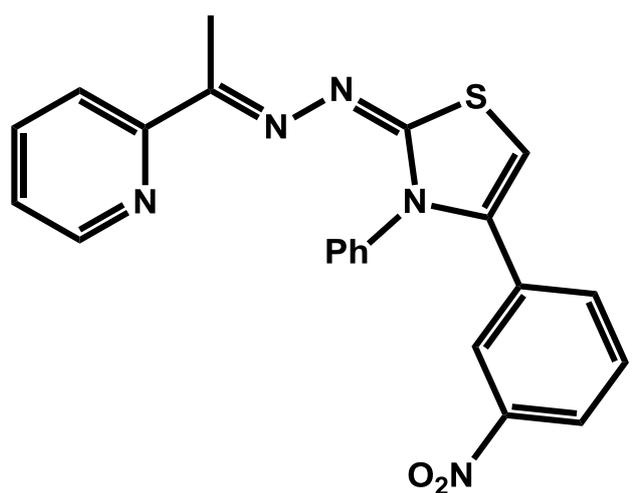
415.11

68%

0.6 (7:3-
Hex:AcOEt)**3i** $C_{22}H_{17}N_5O_2S$

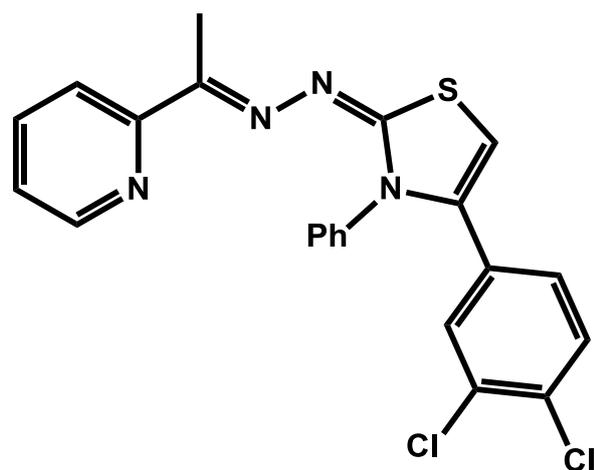
415.11

99%

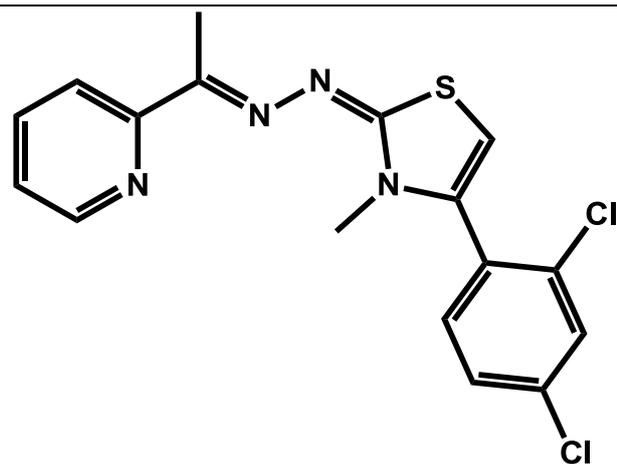
0.5 (7:3-
Hex:AcOEt)**3j** $C_{22}H_{16}Cl_2N_4S$

438.05

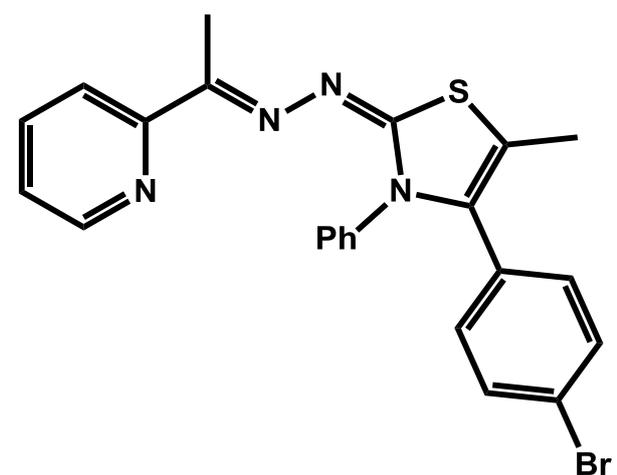
100%

0.4 (9:1-
Hex:AcOEt)

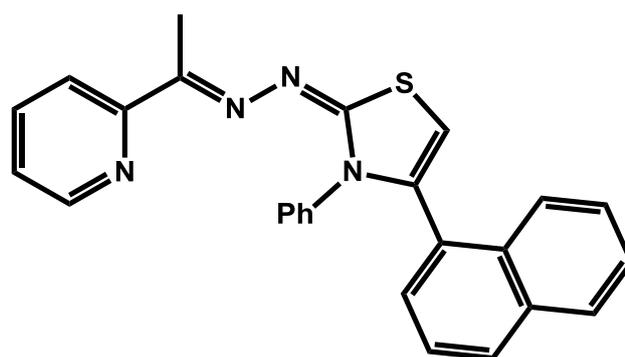
3k C₂₂H₁₆Cl₂N₄S 438.05 30% 0.4 (9:1-
Hex:AcOEt)



3l C₂₃H₁₉BrN₄S 462.05 30% 0.4 (9:1-
Hex:AcOEt)



3m C₂₆H₂₀N₄S 420.14 98% 0.7 (7:3-
Hex:AcOEt)



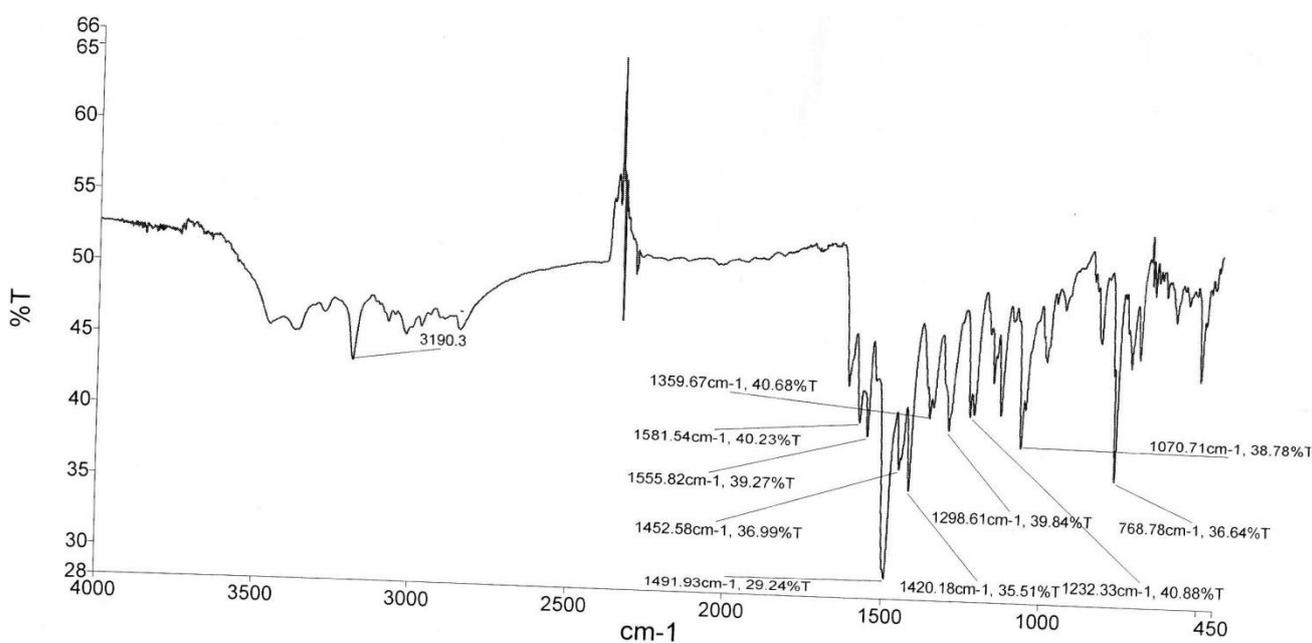
APÊNDICE B

Abaixo estão mostrados alguns espectros dos novos derivados piridil-1,3-tiazol sintetizados.

ESPECTROS DE IV E RMN DE ALGUNS PIRIDIL-1,3-TIAZOIS SINTETIZADOS.

Composto LpQM 2a: (E)-3-metil-4-fenil)-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol.

IV



RMN 1H

Elany
Amostra AT-13
Solicitacao N M0409-13
22.04.2014 UFPE

Sample Name:

Data Collected on:

varian400-vnmrs400

Archive directory:

Sample directory:

FidFile: M0409_13.1h

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)

Solvent: dmso

Data collected on: Apr 22 2014

Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 2.556 sec

Width 6410.3 Hz

16 repetitions

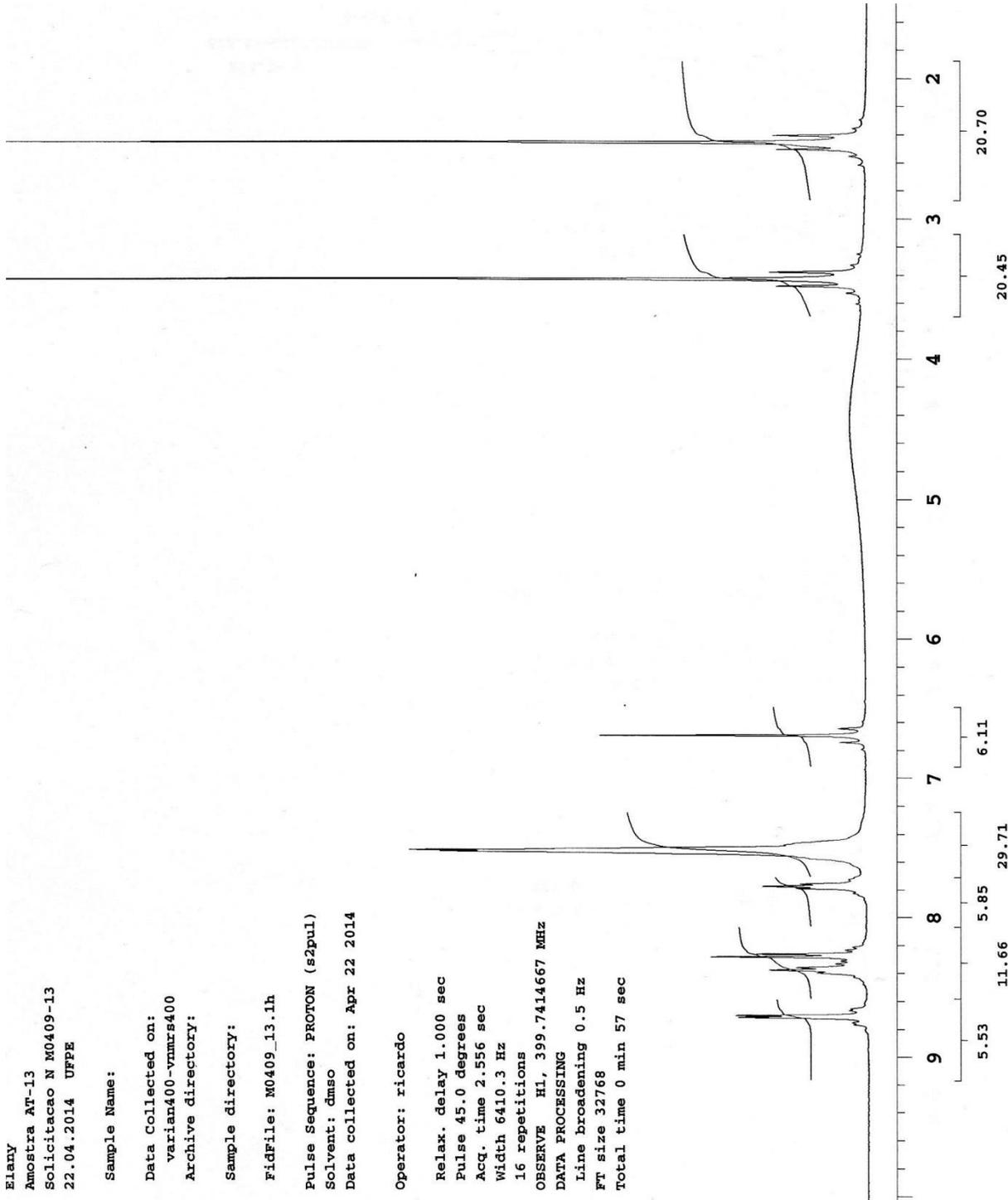
OBSERVE H1, 399.7414667 MHZ

DATA PROCESSING

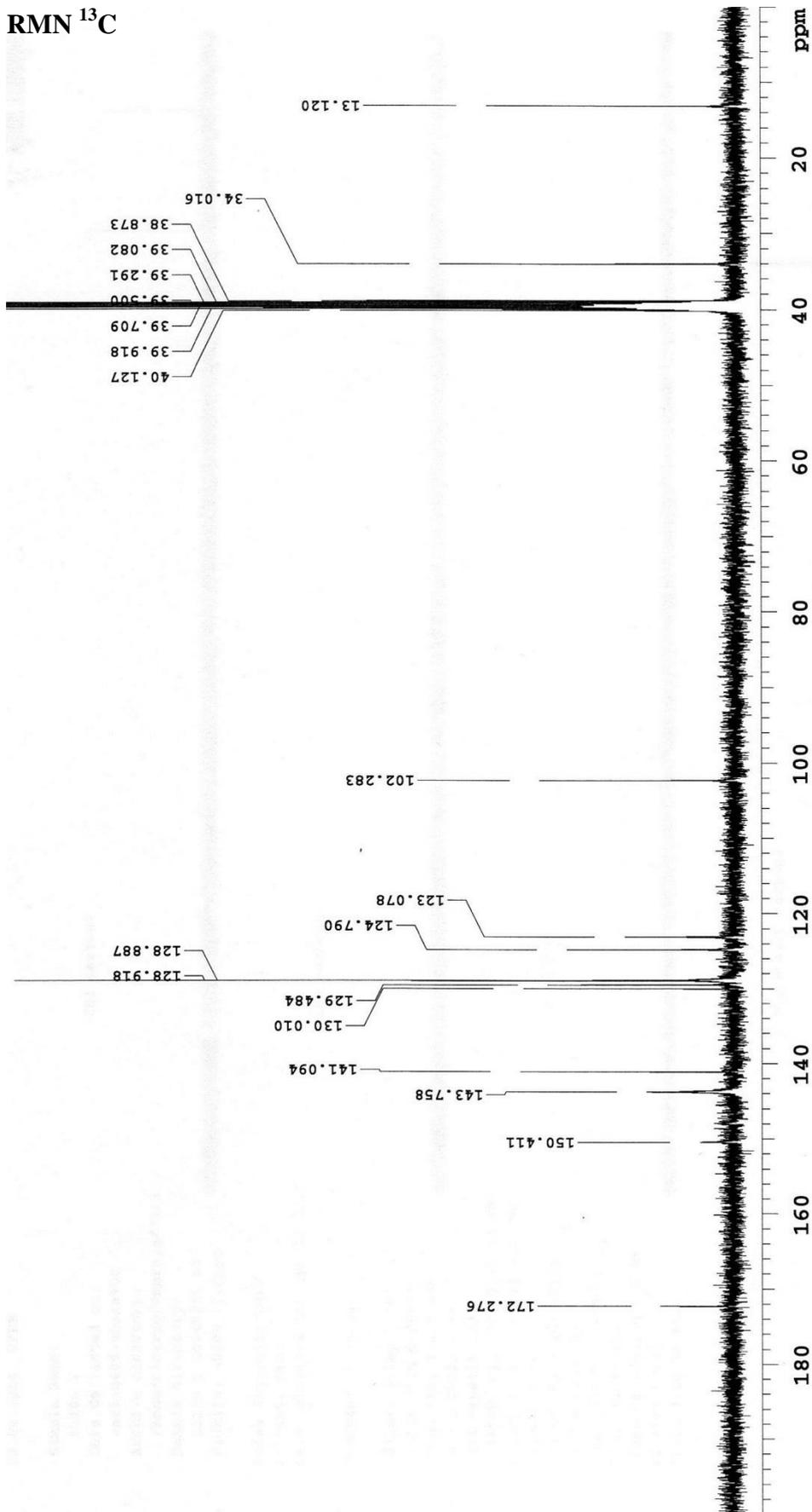
Line broadening 0.5 Hz

FT size 32768

Total time 0 min 57 sec



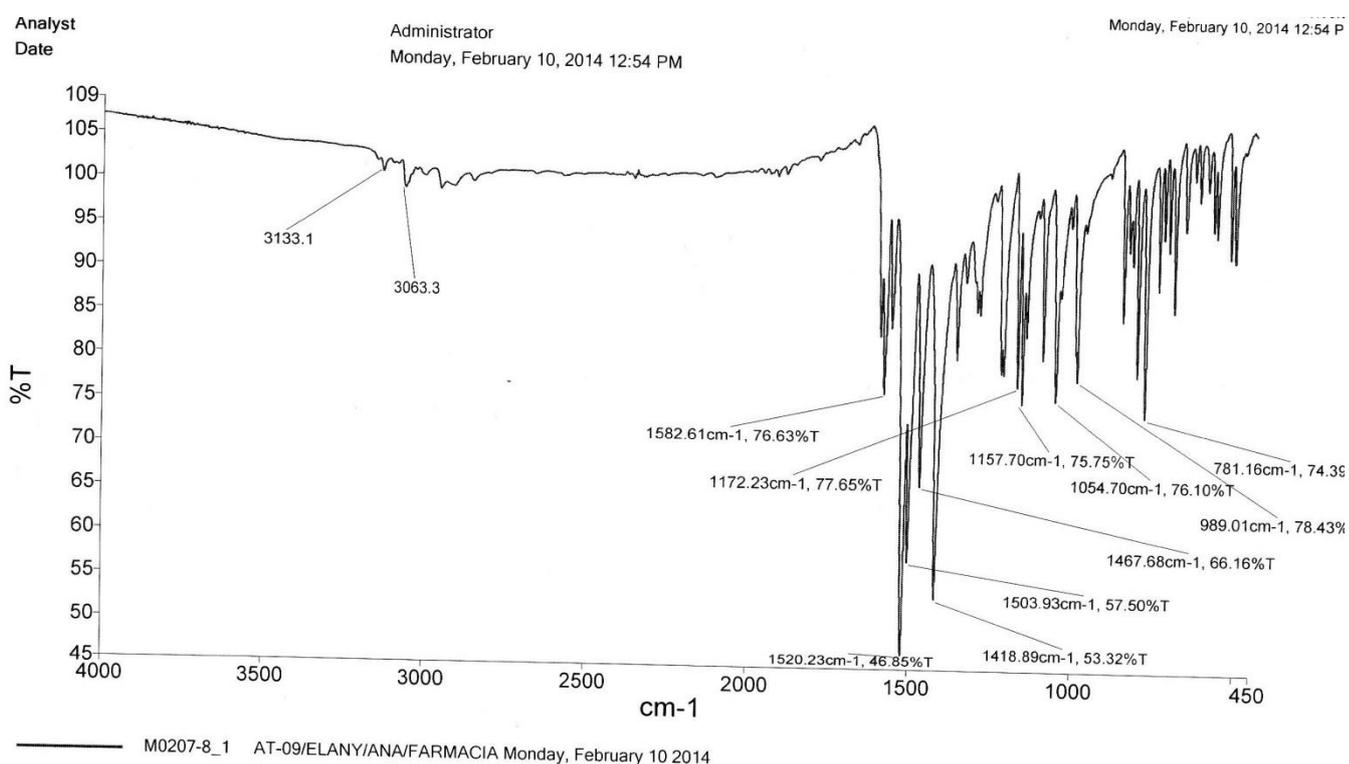
RMN ¹³C



<p>PULSE SEQUENCE Relax. delay 1.000 sec Pulse 45.0 degrees Acq. time 1.285 sec Width 25510.2 Hz 2048 repetitions</p>	<p>OBSERVE C13, 100.5151157 DECOUPLE H1, 399.7434654 Power 33 dB continuously on WALTZ-16 modulated</p>	<p>DATA PROCESSING Line broadening 0.5 Hz Ft size 65536 Total time 77 minutes</p>	<p>Elany Amostra AT-13 Solicitacao N M0409-13 22.04.2014 UFPE Solvent: dmso Ambient temperature</p>
---	---	---	--

Compostos LpQM 2e: (E)-4-(4-fluorofenil)-3-metil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrothiazol.

IV

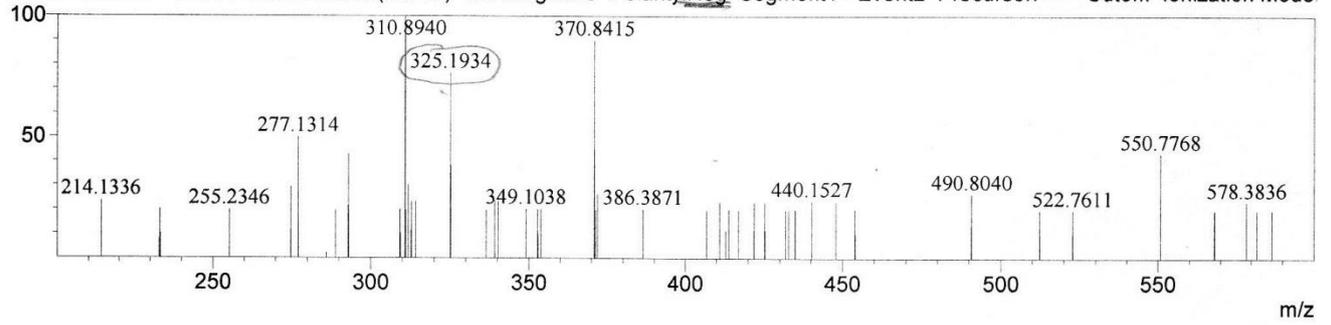


EMAR

Peak#:1 Ret.Time:Averaged 11.52-11.55(Scan#:1730-1734)

BG Mode:Calc 11.36<->11.65(1706<->1750)

Mass Peaks:57 Base Peak:310.8940(35707) MS Stage:MS Polarity:Neg Segment1 - Event2 Precursor:----- Cutoff: Ionization Mode



RMN 1H

Elary
Amostra AT-09
Solicitacao N. L1209-21
28.02.2014 UFPE

Sample Name:
AL15-1
Data Collected on:
Agilent300-vnmrs300
Archive directory:

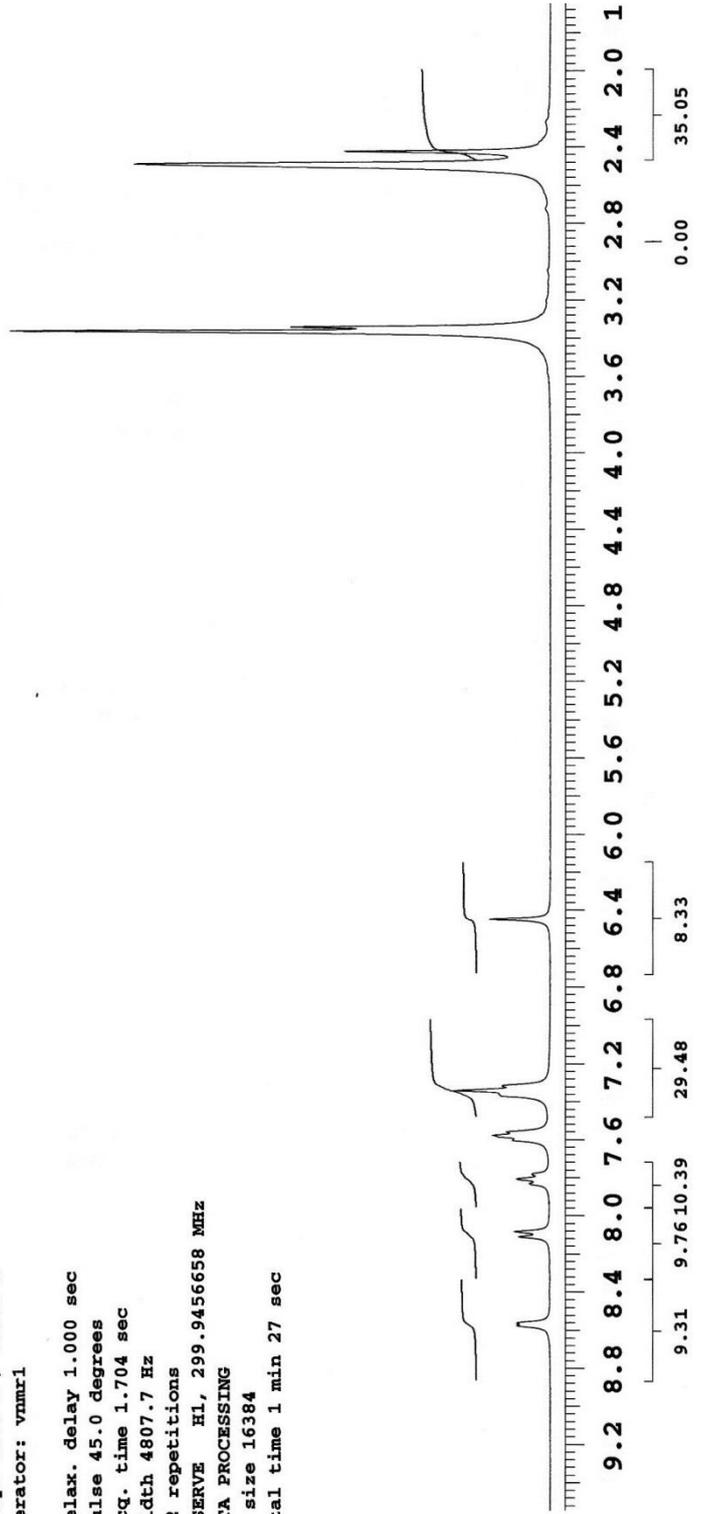
Sample directory:

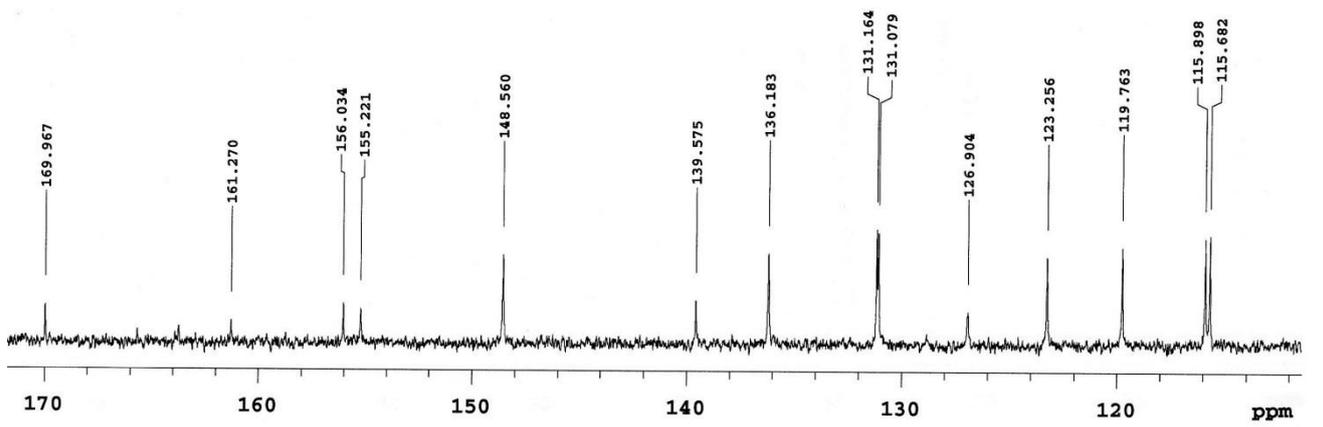
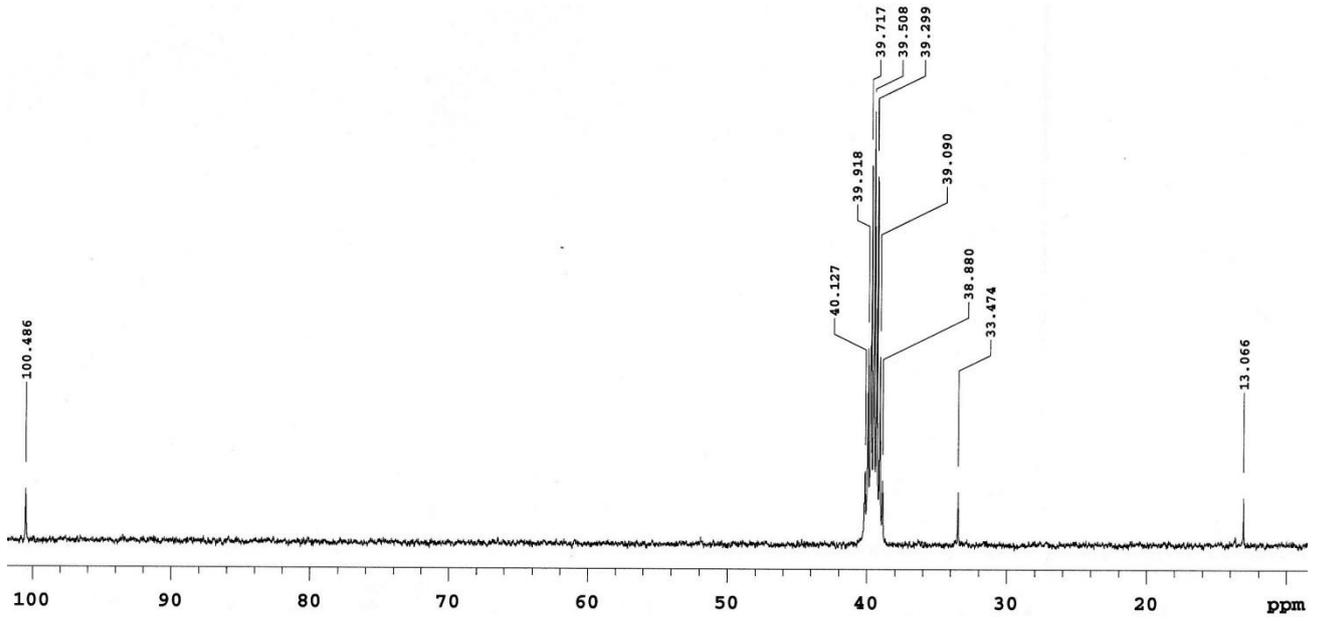
FidFile: L1209_21.1h

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Feb 28 2014

Temp. 26.0 C / 299.1 K
Operator: vnmr1

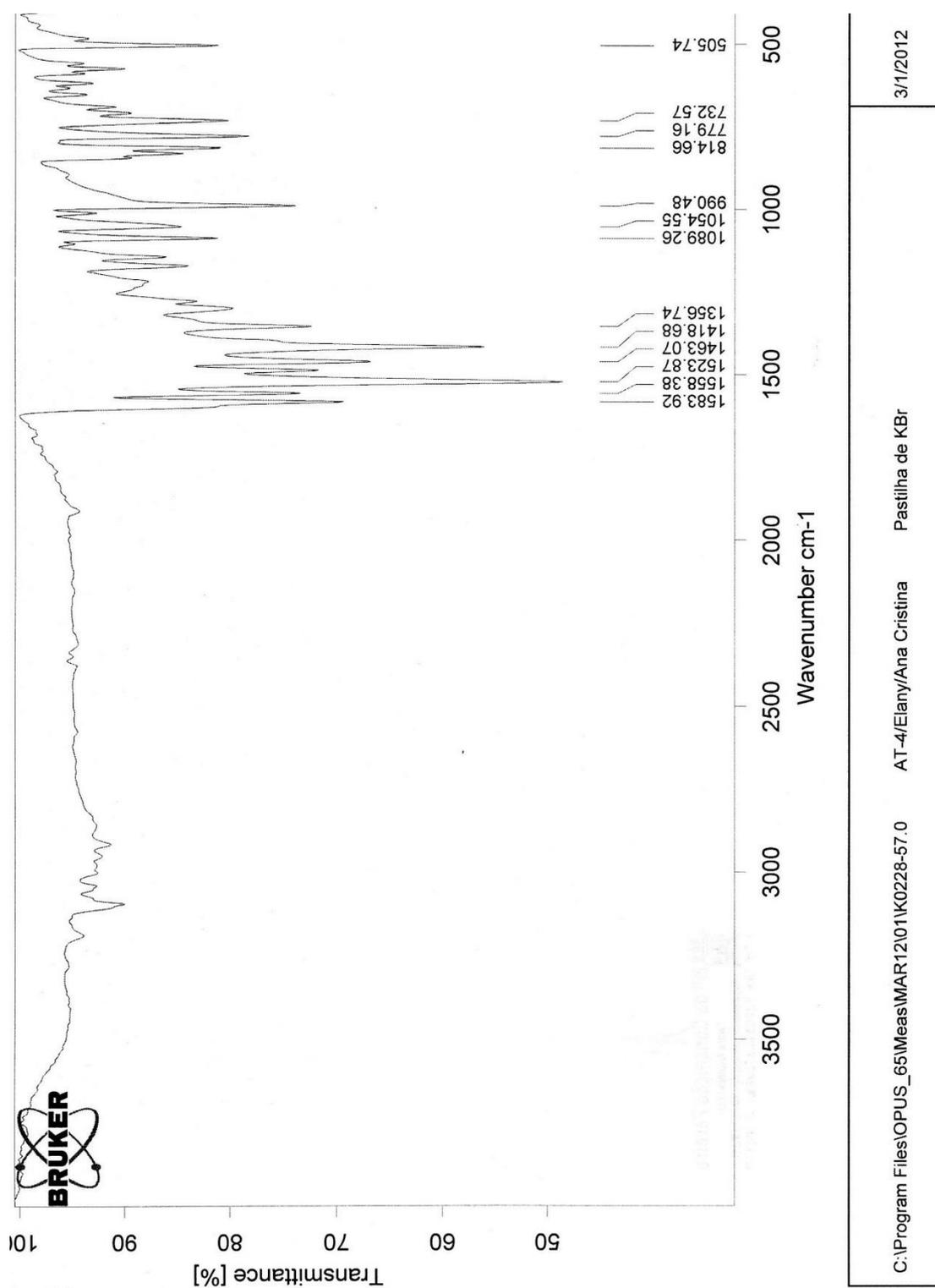
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.704 sec
Width 4807.7 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1, 299.9456658 MHz
DATA PROCESSING
Ft size 16384
Total time 1 min 27 sec



RMN ^{13}C 

Composto **LpQM** **2f:** (E)-4-(4-clorofenil)-3-metil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol.

IV



RMN ¹H

Elany Barbosa
Amostra AT-4
Solicitacao N. K0228-57
05.03.2012 UFPE

Sample Name:

Data Collected on:
varian400-vnmrs400
Archive directory:

Sample directory:

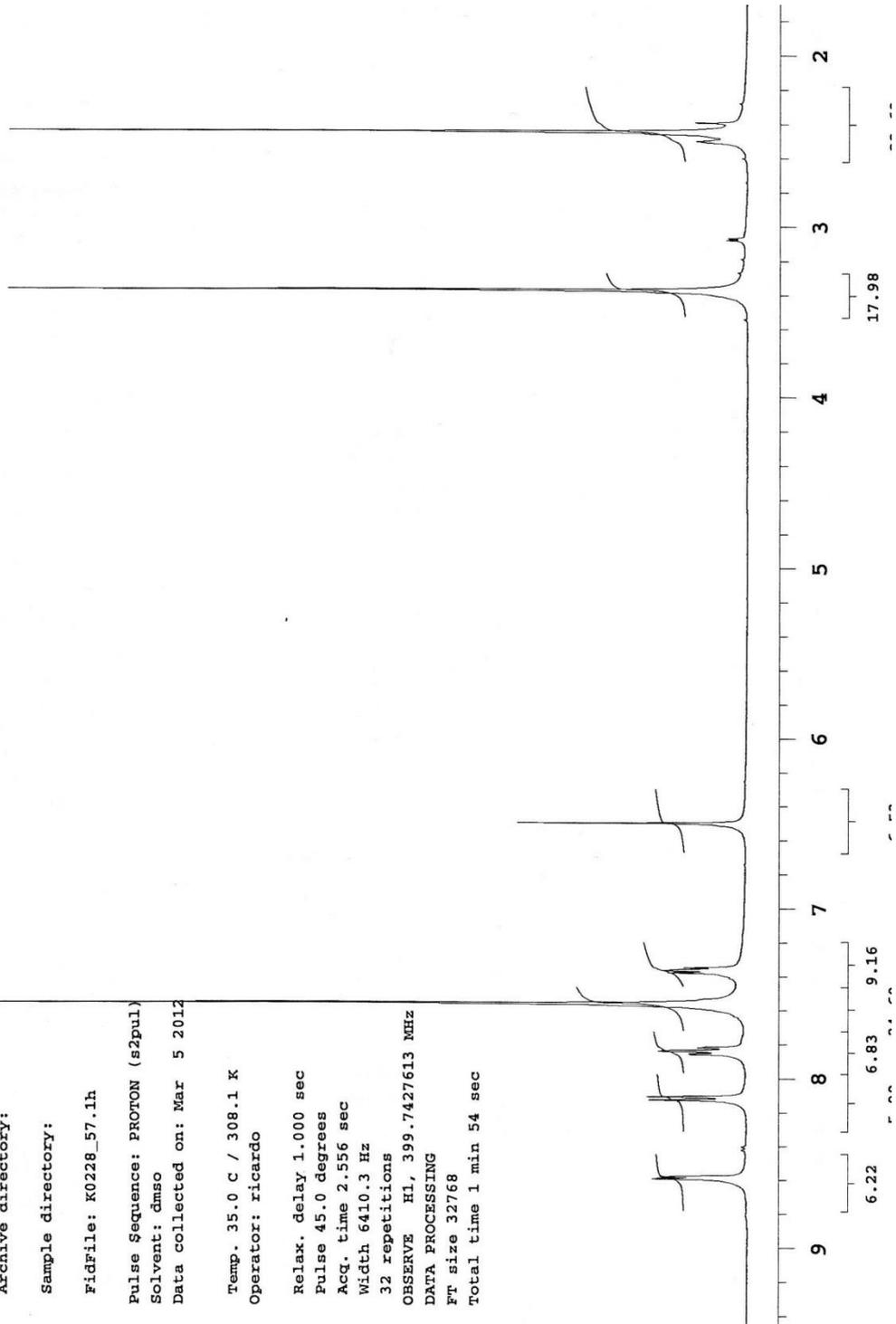
Fidfile: K0228_57.1h

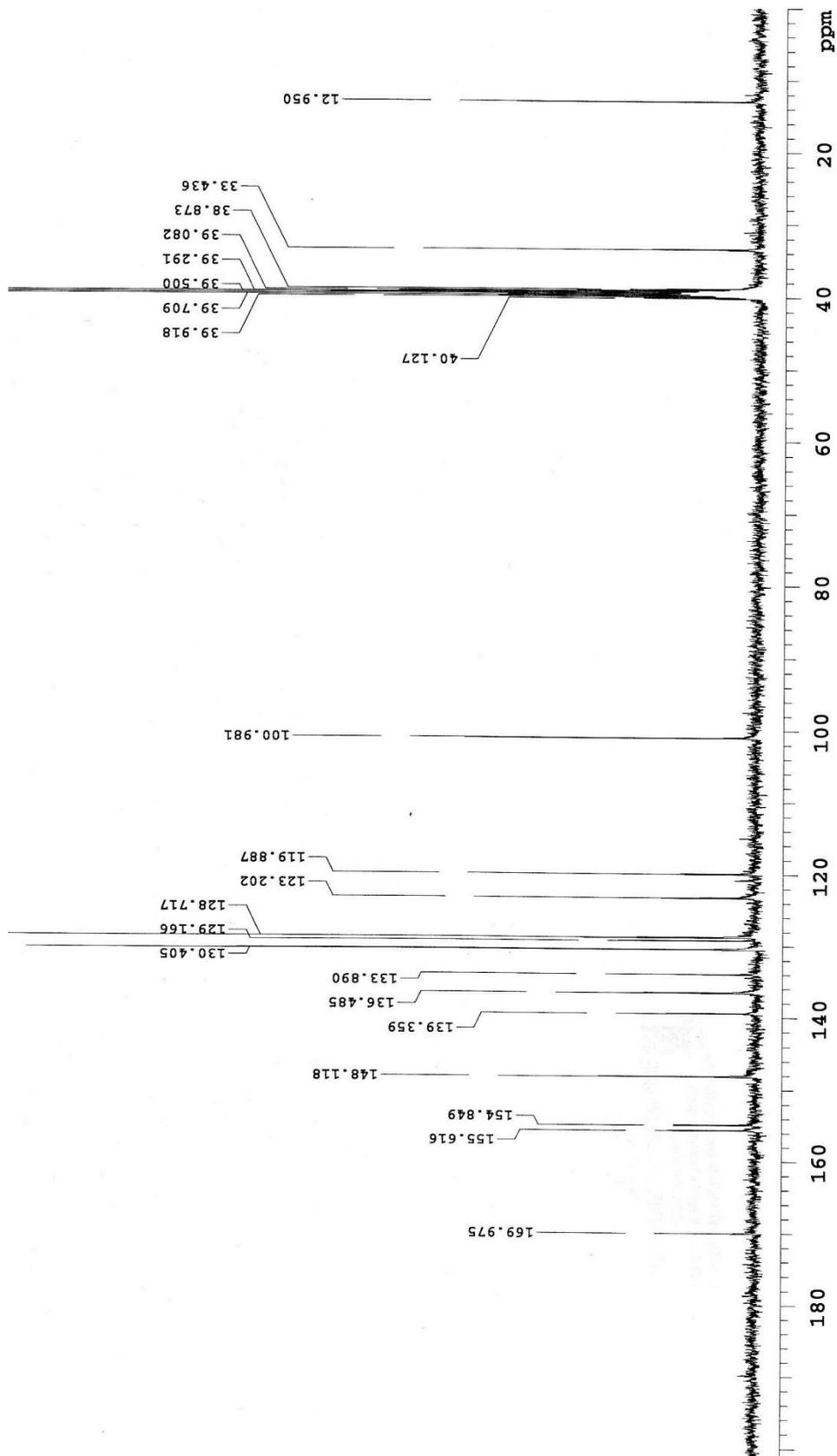
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dms0
Data collected on: Mar 5 2012

Temp. 35.0 C / 308.1 K
Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.556 sec
Width 6410.3 Hz
32 repetitions

OBSERVE H1, 399.7427613 MHz
DATA PROCESSING
Ft size 32768
Total time 1 min 54 sec

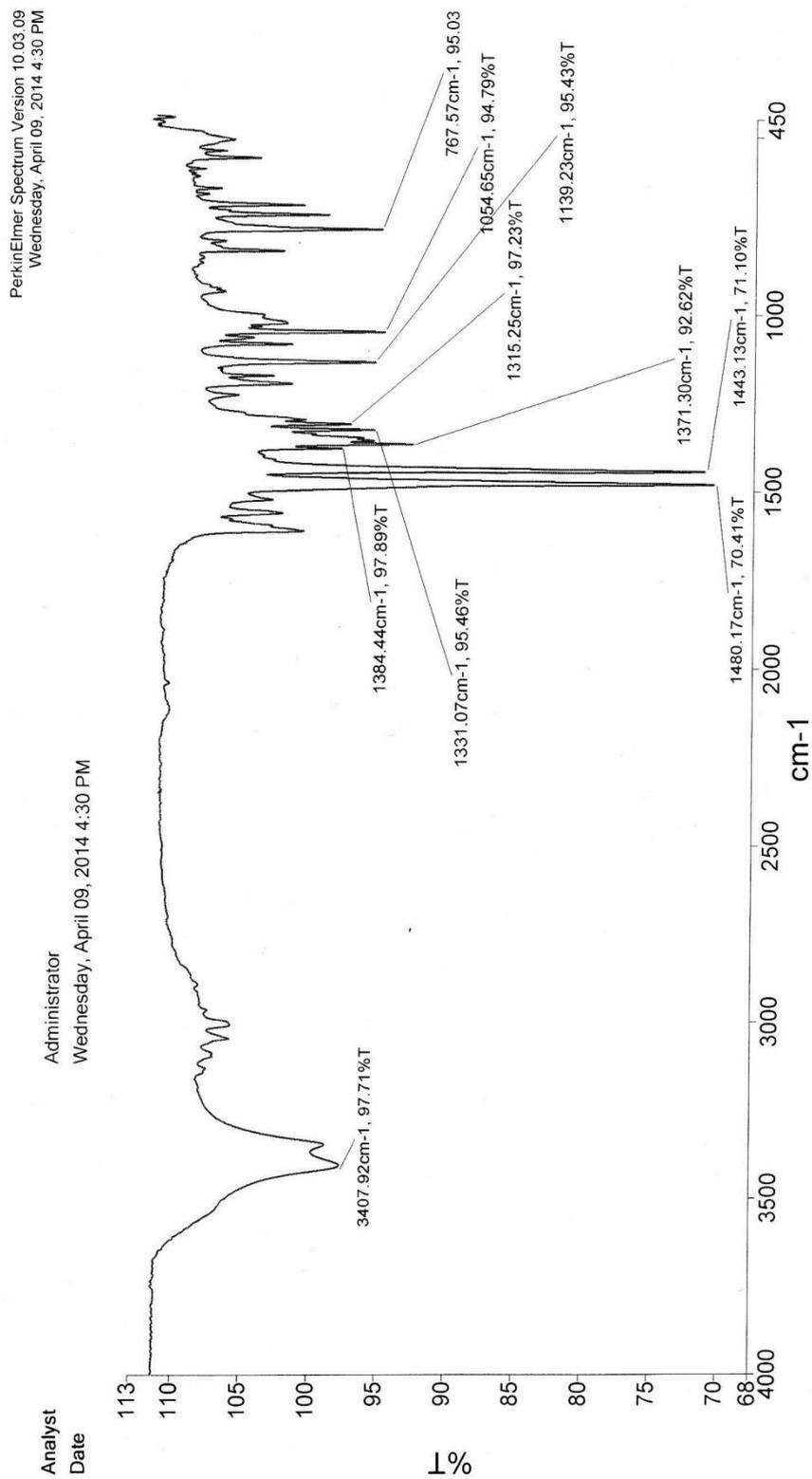




<p>PULSE SEQUENCE Relax. delay 1.000 sec Pulse 45.0 degrees Acq. time 1.285 sec Width 25510.2 Hz</p>	<p>OBSERVE C13, 100.5154566 DECOUPLE H1, 399.7447683 Power 41 dB continuously on WALTZ-16 modulated</p>	<p>DATA PROCESSING Line broadening 2.0 Hz FT size 65536 Total time 30 minutes</p>	<p>Elany Barbosa Amostra AT-4 Solicitacao N. K0228-57 05.03.2012 UFPE</p>
--	---	--	--

Composto LpQM 3 a: (E)-3,4-difenil)-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol.

IV



RMN ¹H

Elany
Amostra PF-13
Solicitacao N M0409-12
16.04.2014 UFPE

Sample Name:

Data Collected on:
varian400-vnmrs400
Archive directory:

Sample directory:

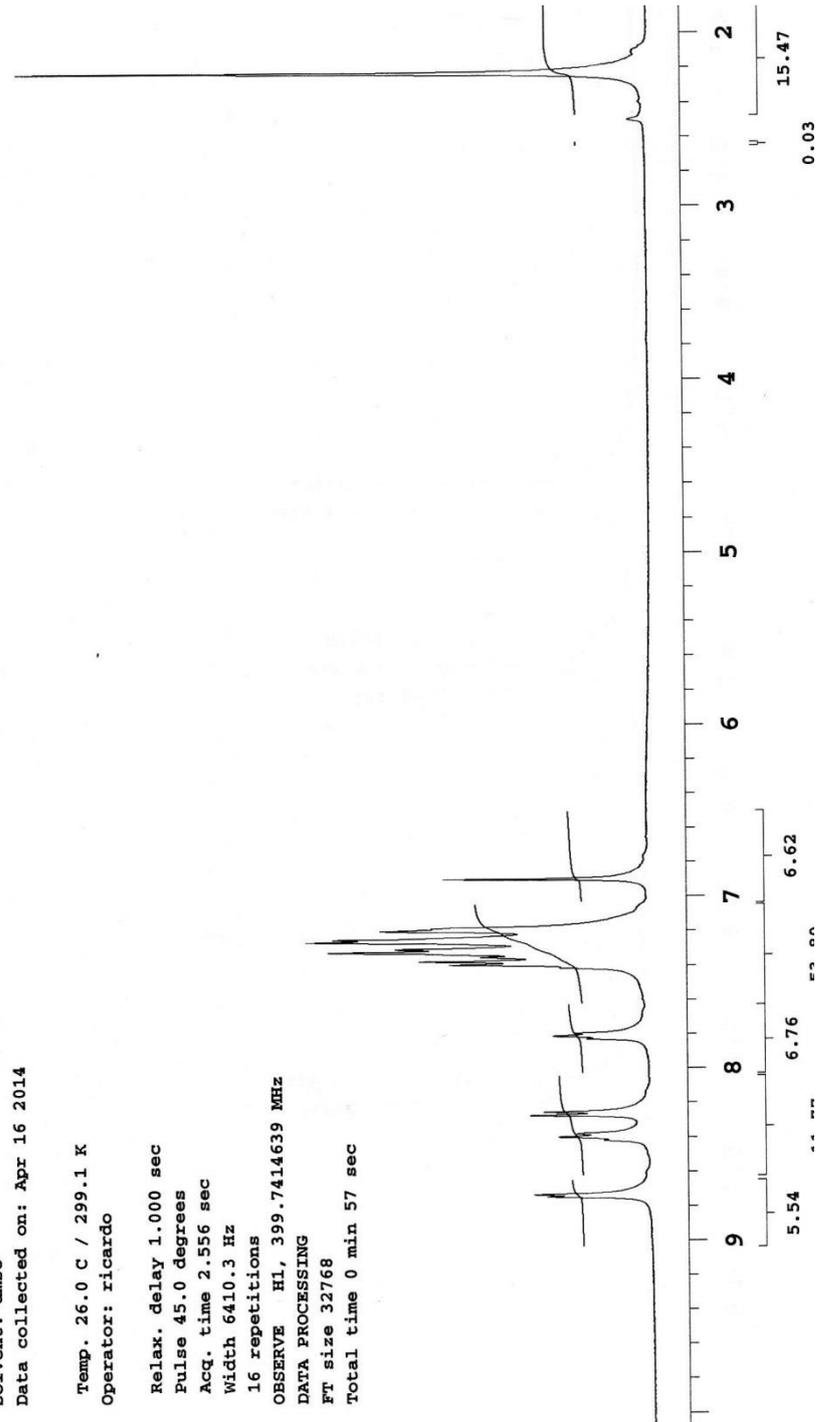
FidFile: M0409_12.1h

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dms0
Data collected on: Apr 16 2014

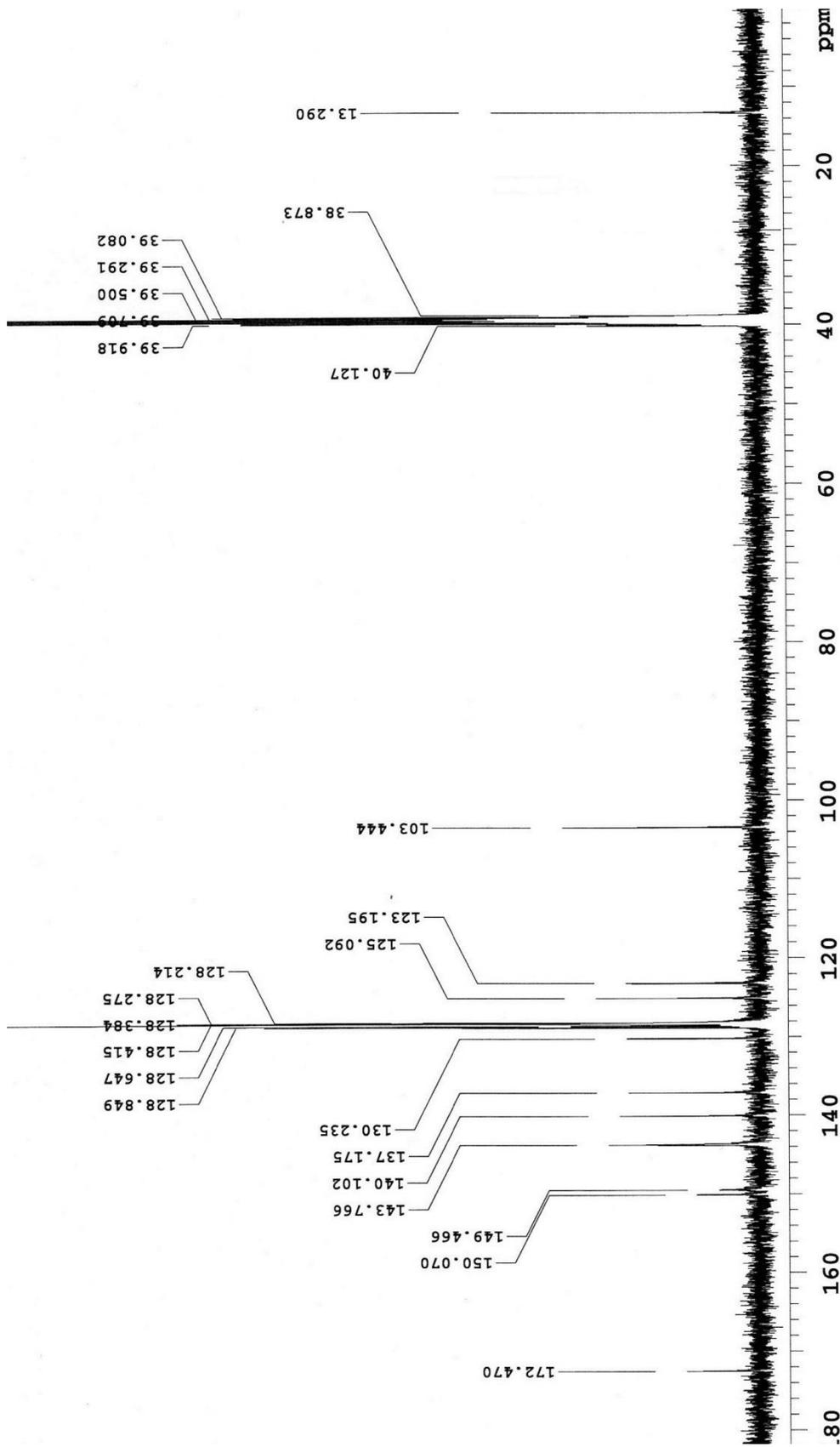
Temp. 26.0 C / 299.1 K
Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.556 sec
Width 6410.3 Hz
16 repetitions

OBSERVE H1, 399.7414639 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 57 sec



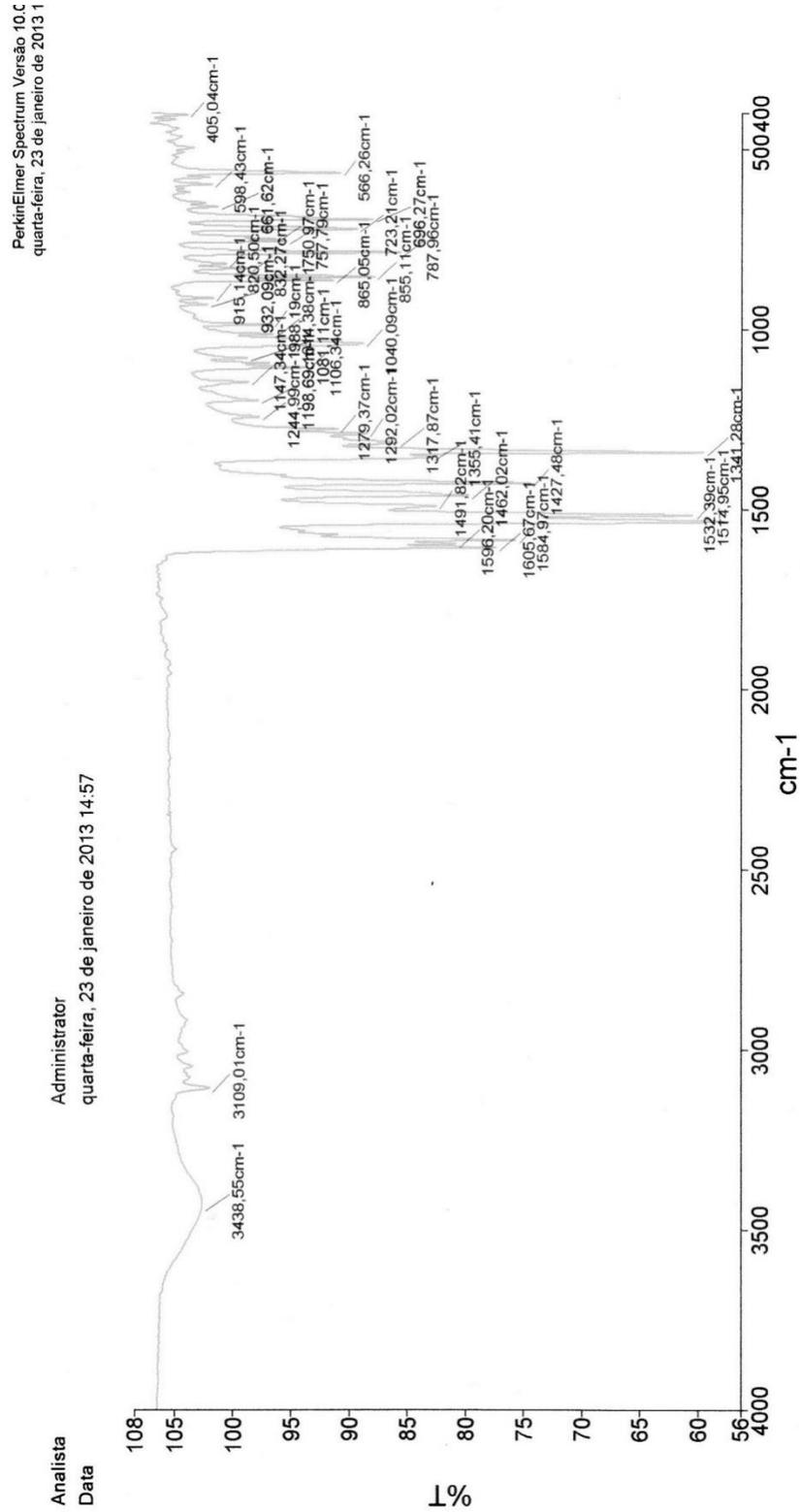
RMN ¹³C



1.000 sec grees 85 sec	OBSERVE C13, 100.5151211 DECOUPLE H1, 399.7434654 Power 33 dB continuously on MAR02-16 modulated	DATA PROCESSING Line broadening 0.5 Hz FT size 65536 Total time 42 minutes	Elany Amostra PF-13 Solicitacao N M0409-12 16.04.2014 UFPE
------------------------------	--	---	---

Composto LpQM **3h:** (E)-4-(4-nitrofenil)-3-fenil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidroiazol

IV



RMN ¹H

Elany
Amostra FF-02
Solicitacao N. L1209-23
26.03.2014 UFPE

Sample Name:

V10

Data Collected on:

Agilent300-vnmr300

Archive directory:

Sample directory:

FidFile: L1209_23.prsat

Pulse Sequence: PRESAT

Solvent: dmsc

Data collected on: Mar 26 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Operator: vnmr1

Relax. delay 2.000 sec

Pulse 90.0 degrees

Acq. time 1.704 sec

Width 4807.7 Hz

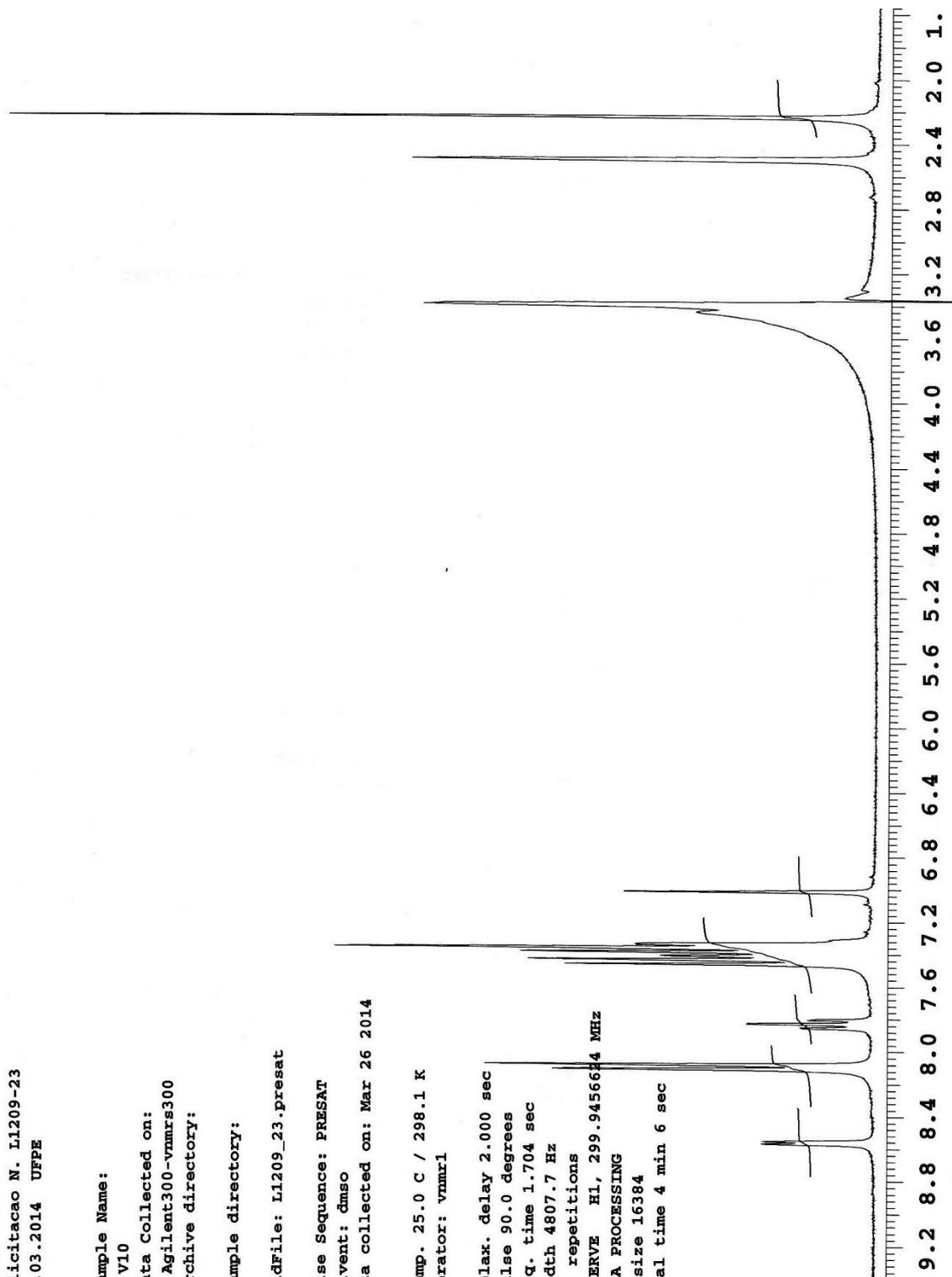
64 repetitions

RESERVE HL, 299.945664 MHz

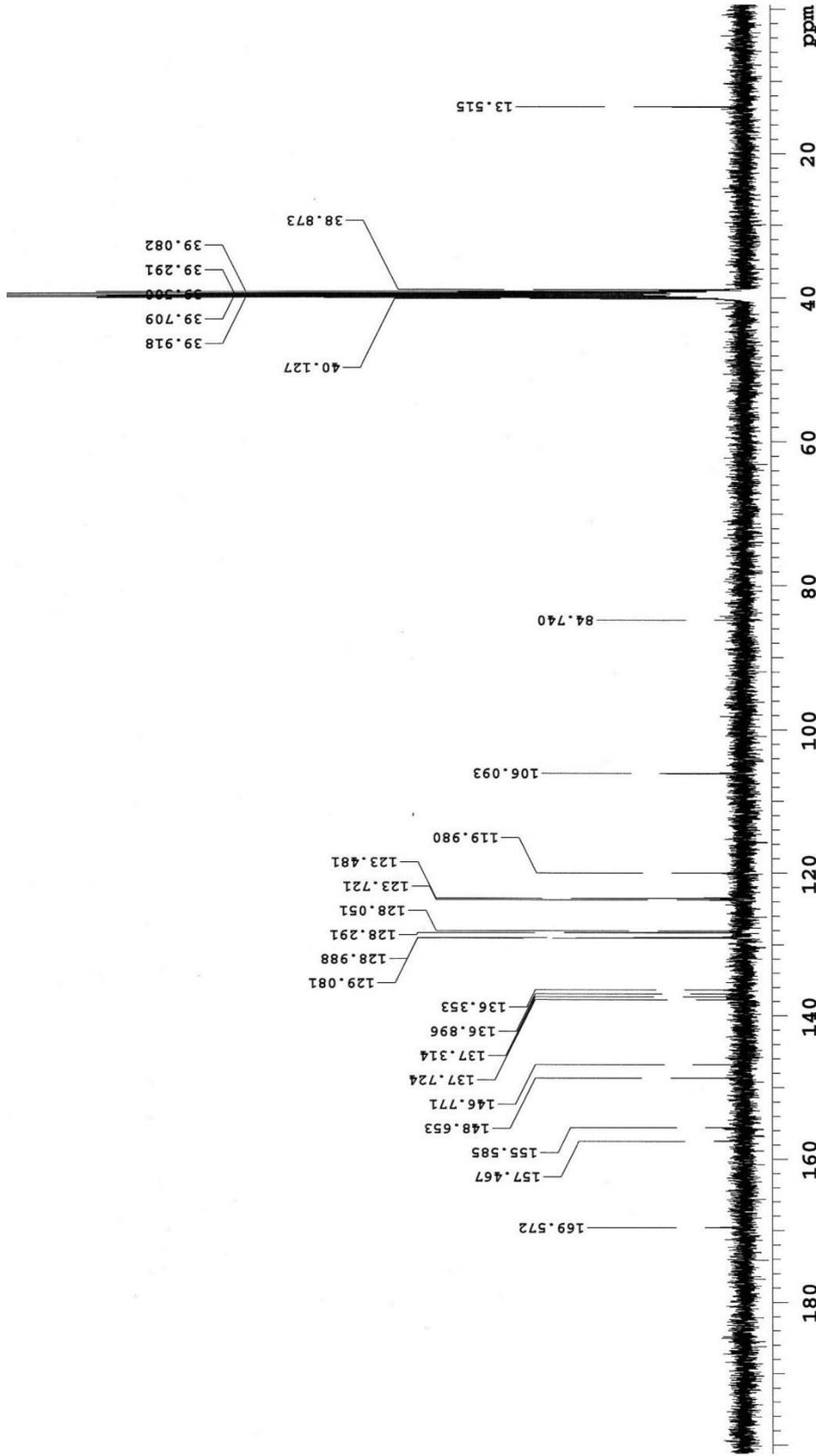
DATA PROCESSING

FT size 16384

Total time 4 min 6 sec



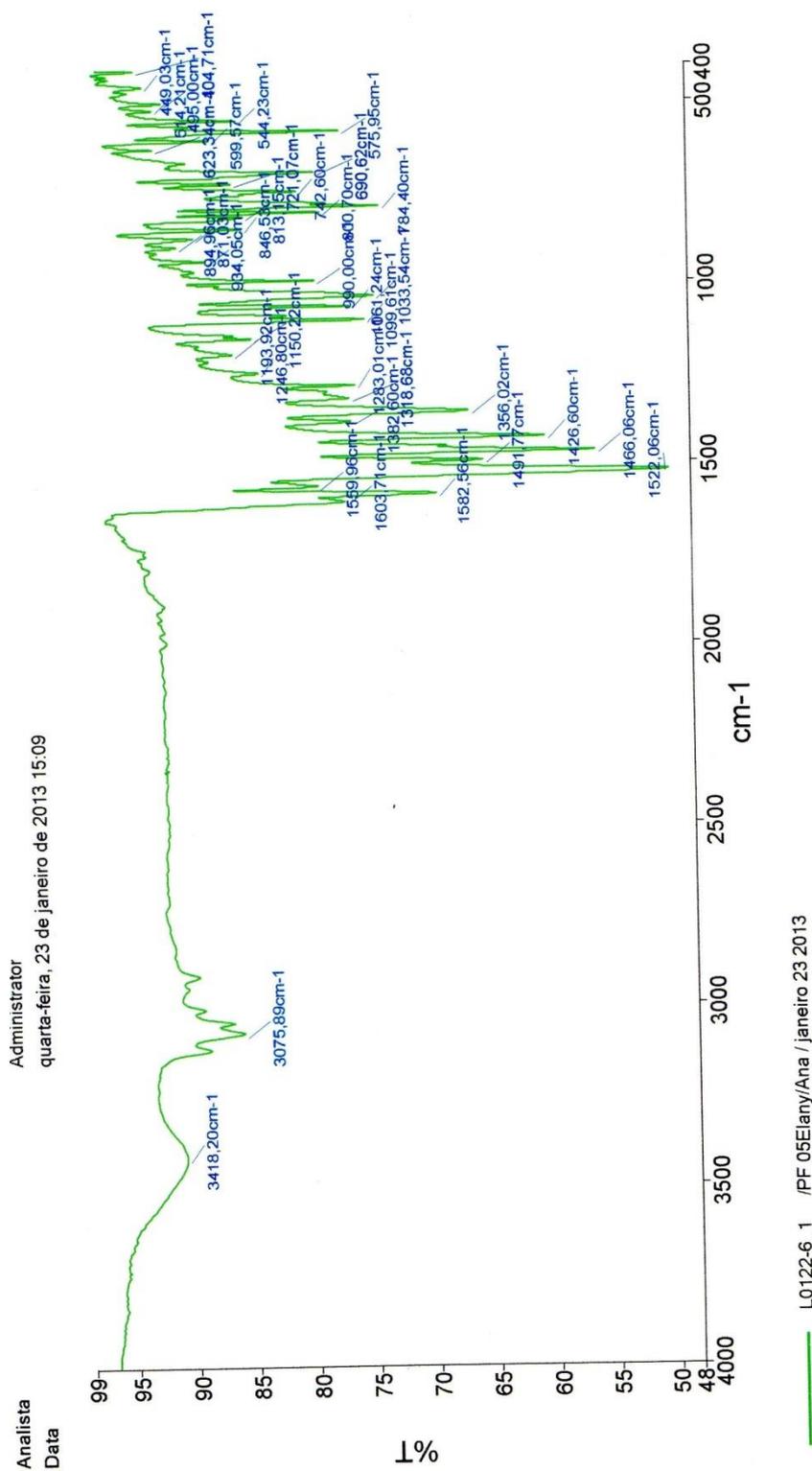
RMN ¹³C



<p>PULSE SEQUENCE Relax. delay 1.000 sec Pulse 45.0 degrees Acq. time 1.285 sec Width 25510.2 Hz</p>	<p>OBSERVE C13, 100.5154426 DECOUPLE H1, 399.7447683 Power 41 dB continuously on WALTZ-16 modulated</p>	<p>DATA PROCESSING Line broadening 0.5 Hz FT size 65536 Total time 38 minutes</p>	<p>Elany Amostra PF-02 Solicitacao N. L0122-4 23.01.2013 UFPE</p>
---	---	--	---

LpQM 3k: (E)-4-(2,4-diclorofenil)-3-fenil-2-((E)-(1-(piridin-2-il)etilideno)hidrazona)-2,3-dihidrotiazol

IV



RMN ¹H

Elany
Amostra pf-05
Solicitacao N. L0122_6
14.02.2013 UFPE

Sample Name:

Data Collected on:
varian400-vnmrs400
Archive directory:

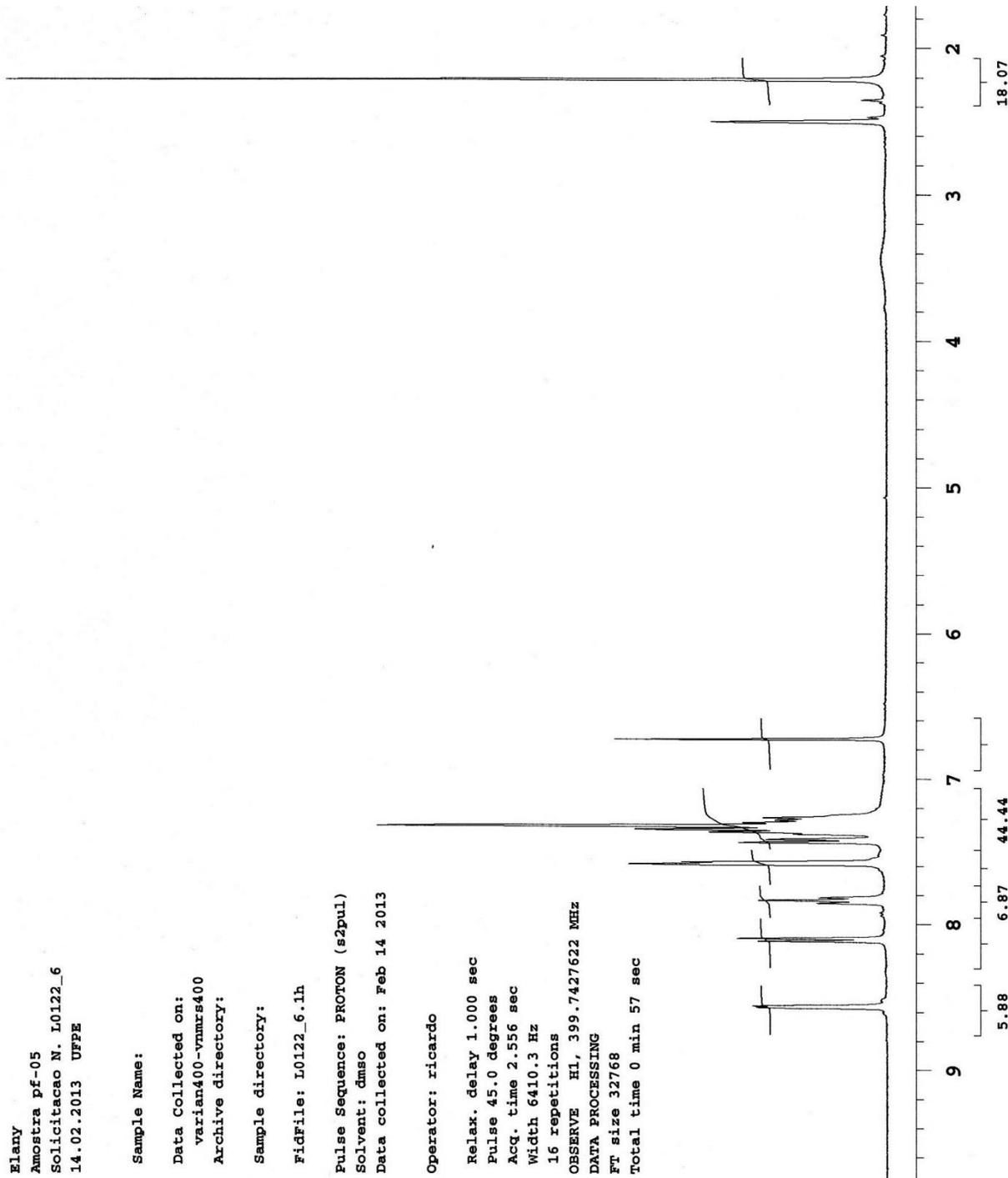
Sample directory:

FidFile: L0122_6.1h

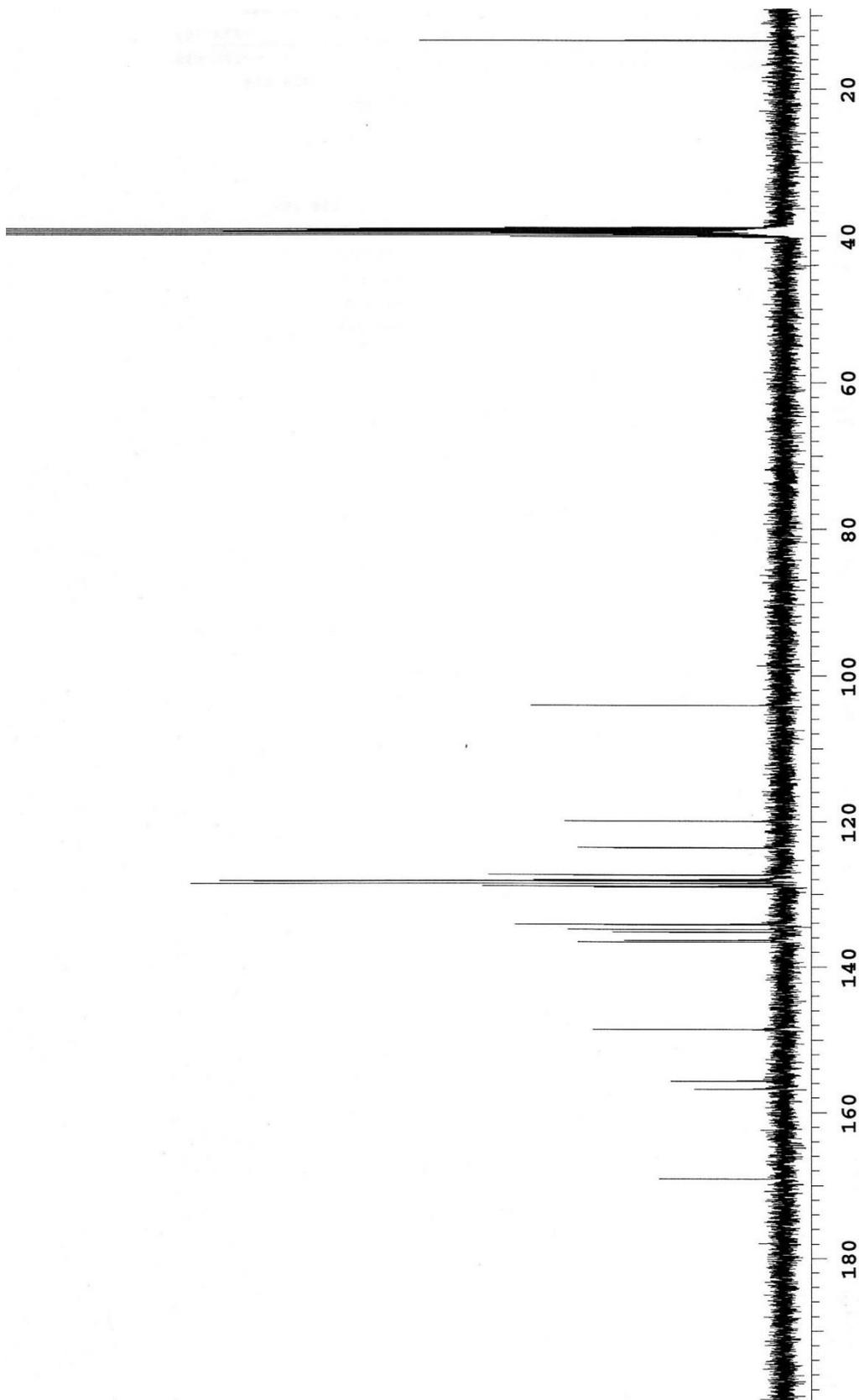
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dms0
Data collected on: Feb 14 2013

Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.556 sec
Width 6410.3 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 399.7427622 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 57 sec



RMN 13C



<p>PULSE SEQUENCE Relax. delay 1.000 sec Pulse 45.0 degrees Acq. time 1.285 sec Width 25510.2 Hz 1024 resolutions</p>	<p>OBSERVE C13, 100.5154457 DECOUPLE H1, 399.7447683 Power 41 dB continuously on WALTZ-16 modulated</p>	<p>DATA PROCESSING Line broadening 0.5 Hz FT size 65536 Total time 38 minutes</p>	<p>Elany Amostra pf-05 Solucao N. L0122-1 14.02.2013 UFPE</p>
---	---	--	--