



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

DANIEL LOPES ARAÚJO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA DE
NOVOS HETEROCÍCLICOS HÍBRIDOS PIRIDIL-4-TIAZOLIDINONAS**

Recife
2023

DANIEL LOPES ARAÚJO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA DE
NOVOS HETEROCÍCLICOS HÍBRIDOS PIRIDIL-4-TIAZOLIDINONAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite

Recife
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Araújo, Daniel Lopes

Síntese e avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida de novos heterocíclicos híbridos piridil-4-tiazolidinonas/ Daniel Lopes Araújo – 2023.

73 f. : il., fig., tab.

Orientador: Ana Cristina Lima Leite

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2023.

Inclui referências.

1. Thiazoles 2. Doença de Chagas 3. Leishmaniose I. Leite, Ana Cristina Lima (orient.) II. Título

547.594

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -059

DANIEL LOPES ARAÚJO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA DE
NOVOS HETEROCÍCLICOS HÍBRIDOS PIRIDIL-4-TIAZOLIDINONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovado em: 03/03/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Valéria Pereira Hernandez (Examinador Interno)
Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ

Prof. Dr. Luiz Aberto Barros Freitas (Examinador Externo)
Secretaria de Educação do Estado de Pernambuco - SEE

Dedico esse trabalho a minha prima Monaísa Cordão (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pelas graças alcançadas até aqui.

A minha família, em especial, aos meus pais, Maura e Damião e minha avó materna, Maria do Socorro, pelo esforço em não deixar nada faltar e por serem eles, a síntese de amor e cuidado.

A minha orientadora, professora Dra. Ana Cristina Lima Leite pela oportunidade que me foi dada, pela sua orientação e supervisão no projeto. Obrigado por me receber no LpQM e nunca nos deixar nada faltar para a realização dos nossos projetos.

Aos meus colegas do LpQM: Janine, Elineide, Vanessa, Juliana, Daiane e Anderson por compartilharem comigo saberes e tornarem a rotina do dia-a-dia mais fácil. Aos meus amigos que estão comigo desde algum tempo: Sara, Eduarda, Luciano, Maxsuel, Gabrielly, Vitória e Lucas, obrigado por confiarem a mim, suas amizades e me presentearem com tantos momentos. Minha história também é um pouco de vocês.

Ao estagiário do LpQM Lucas, por todo apoio e ajuda nas horas que precisei. Obrigado por ser sempre disposto a me ajudar com boa vontade.

A minha madrinha, Thauanny, pelo cuidado e carinho que tem por mim. Por ser ombro amigo e sempre me ouvir quando preciso.

Agradeço a grandes amigos que a vida acadêmica me presenteou ao longo do percurso. Bruno, Lucas, Elayne, vocês são sem dúvidas, grandes inspirações para mim.

Aos meus primos, Maíza e David, por serem inspiração dentro da família, de amor à ciência, profissionalismo e humanidade.

A toda equipe do PPGIT/UFPE, em especial aos professores por todo conhecimento dado e ao secretário Paulo pela atenção e compromisso.

Gostaria de agradecer a professora Valéria Pereira pela parceria para realização dos ensaios biológicos dessa pesquisa. Assim como aos colaboradores da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental pela realização da ressonância magnética nuclear desses compostos.

A CAPES, pelo apoio financeiro em forma de bolsa de estudos para o mestrado.

Gostaria de agradecer à todos que contribuíram diretamente ou indiretamente com a realização desta pesquisa e com aqueles que foram responsáveis por caminhar comigo até aqui.

A todos agradeço.

Na estrada a gente pena, a gente sofre, mas a gente ama
Não me arrependo de nada não
Porque foi tudo de coração,
Na vida a gente colhe o que planta
(FREIRE, 2021).

RESUMO

As doenças negligenciadas constituem um conjunto de doenças infecciosas que afetam regiões tropicais e subtropicais de países com economias em desenvolvimento. Dentre esse grupo de infecções, destacam-se a doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, e a Leishmaniose, causada por parasitas do gênero *Leishmania*. O fármaco atualmente utilizado na quimioterapia da doença de Chagas é o benzonidazol, que em estágios mais avançados da doença é ineficaz, já o tratamento para a *Leishmania* ainda é bastante limitado, com sérios inconvenientes em termos de segurança, resistência, estabilidade e custo. Logo, existe a necessidade do desenvolvimento de novas terapias contra essas doenças. Nesse sentido, a proposta do presente trabalho consistiu em desenvolver uma série de compostos bioativos a partir de duas estruturas privilegiadas, as piridinas e a 4-tiazolidinona. Inicialmente, foi planejado a obtenção de seis moléculas, as quais foram sintetizadas através de duas etapas e devidamente caracterizadas. Após a caracterização, os compostos foram avaliados quanto às atividades tripanocida e leishmanicida. Quanto à atividade anti-*T. cruzi*, foi utilizada a cepa Cepa Talahuen. Os testes anti-*Leishmania* foram realizados frente formas promastigotas e amastigotas da espécie *L. infantum* e a toxicidade avaliada em fibroblastos RAW 264.7. Dentre os compostos testados para verificação da atividade tripanocida, nenhum apresentou resultados significativos. Já em relação a sua toxicidade todos os compostos apresentaram valores de toxicidade em células normais maiores que 200 μM frente as células testadas. Com destaque para os compostos DA-1 com valor de 408,5 μM . Os compostos testados frente à forma promastigota e amastigota da *L. infantum*, nenhum se apresentou mais ativo que a Miltefosina, que foi utilizado como referencial neste experimento. Quanto à toxicidade frente a fibroblastos da linhagem RAW 264.7, é possível notar que todos os compostos se destacaram, evidenciando menor citotoxicidade frente às células testadas. Com destaque para DA-4 com valor de citotoxicidade 402,7 μM . Diante do exposto, é possível analisar que nenhum dos compostos apresentaram atividade tripanocida e leishmanicida significativa, entretanto, a maioria dos compostos desta série possuem níveis de citotoxicidade satisfatórios.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; Doença de Chagas; *Leishmania*; Hibridização molecular; Piridina.

ABSTRACT

Neglected diseases are a group of infectious diseases affecting tropical and subtropical regions of countries with developing economies. Among this group of infections are Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, and Leishmaniasis, caused by parasites of the genus *Leishmania*. The drug currently used in the chemotherapy of Chagas disease is benznidazole, which is ineffective in more advanced stages of the disease, while the treatment for Leishmania is still very limited, with serious drawbacks in terms of safety, resistance, stability and cost. Therefore, there is a need for the development of new therapies against these diseases. In this sense, the proposal of the present work consisted in developing a series of bioactive compounds from two privileged structures, the pyridines and the 4-thiazolidinone. Initially, it was planned to obtain six molecules, which were synthesized and characterized. After characterization, the compounds were evaluated for their anti-*T. cruzi* and leishmanicidal activities. For the anti-*T. cruzi* activity, the Talahuen strain was used. The anti-*Leishmania* tests were performed against promastigotes and amastigotes forms of *L. infantum* species and the toxicity was evaluated in RAW 264.7 fibroblasts. Among the compounds tested for trypanocidal activity, none showed significant results. Regarding toxicity, all compounds showed toxicity values in normal cells higher than 200 μ M against the tested cells. With prominence for the compounds DA-1 with a value of 408.5 μ M. The compounds tested against the promastigote and amastigote form of *L. infantum*, none was more active than miltefosine, which was used as reference in this experiment. As for the toxicity against fibroblasts of the RAW 264.7 lineage, it is possible to notice that all compounds stood out, showing less cytotoxicity against the tested cells. DA-4 stood out, with cytotoxicity value of 402.7 μ M. Given the above, it is possible to analyze that none of the compounds showed significant trypanocidal and leishmanicidal activity, however, most compounds in this series have satisfactory levels of cytotoxicity.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; *Leishmania*; Molecular hybridization; Pyridine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Carlos Chagas	19
Figura 2 -	<i>Triatoma infestans</i> (Barbeiro)	20
Figura 3 -	Países endêmicos de doença de Chagas	21
Figura 4 -	Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	22
Figura 5 -	Sinal de Romaña	26
Figura 6 -	Fármacos disponíveis no mercado para terapia de DC: Benzonidazol e o Nifurtimox	27
Figura 7 -	Enzima cruzaina	29
Figura 8 -	<i>Leishmania</i>	31
Figura 9 -	Flebotomíneo	32
Figura 10 -	Ciclo biológico do protozoário <i>Leishmania</i>	33
Figura 11 -	Estrutura dos principais fármacos usados no tratamento da leishmaniose	35
Figura 12 -	Estrutura molecular da piridina	38
Figura 13 -	Compostos destaques da série piridil-tiazóis de CARDOSO <i>et al.</i> , 2014	39
Figura 14 -	Estrutura molecular da 4-tiazolidinona	40
Figura 15 -	Moléculas tiazolidinonas com atividade tripanocida	41
Figura 16 -	Parâmetros de Lipinski e Veber	51
Figura 17 -	Espectro do RMN ^1H da molécula DA-7	54
Figura 18 -	Espectro do RMN ^{13}C da molécula DA-7	55

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Processo geral da síntese da série DA 1-6.

Esquema 2 - Reação do Intermediário 1.

Esquema 3 - Reação do Intermediário 2.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise dos critérios da regra de Lipinsk e Veber obtidos no SwissADME	52
Tabela 2 -	Propriedades ADME obtidos no SwissADME	52
Tabela 3 -	Características gerais dos compostos finais e rendimento das reações	53
Tabela 4 -	Resultados obtidos para atividade antichagásica da série piridil-4-tiazolidinona	60
Tabela 5 -	Resultados obtidos para atividade leishmanicida da série piridil-4-tiazolidinona	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Adenosina trifosfato;

BZN: Benznidazol;

^{13}C -RMN: Ressonância Magnética Nuclear de Prótons;

CCC: Cardiomiopatia Chagásica Crônica;

CCD: Cromatografia de camada delgada;

CNT: Células não tratadas;

CT: Células tratadas;

DC: Doença de Chagas;

^1H -RMN: Ressonância Magnética Nuclear de Prótons;

IV: Infravermelho;

L. infantum: *Leishmania infantum*;

LpQM: Laboratório de Planejamento em Química Medicinal;

MTF: Miltefosina;

NCEs: New chemical entities;

NFX: Nifurtimox;

OMS: Organização Mundial de Saúde;

PF: Ponto de fusão;

RF: Fator de retenção;

RMC: Ressonância magnética cardíaca;

RMN: Ressonância magnética nuclear;

SI: Índice de seletividade;

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*;

T. dimidiata: *Triatoma dimidiata*;

T. infestans: *Triatoma infestans*;

R. proxilus: *Rhodnius proxilus*;

LISTA DE SÍMBOLOS

s: Singleto

d: Dupleto

t: Tripleto

m: Multipleto

μ : Micro

®: Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	DOENÇA DE CHAGAS	19
2.1.1	Aspectos históricos	19
2.1.2	Aspectos epidemiológicos	20
3.1.2.1	COVID-19 e o impacto das doenças negligenciadas	21
2.1.3	Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	21
2.1.4	Transmissão do <i>T. cruzi</i>	23
2.1.4.1	Transmissão vetorial	23
2.1.4.2	Outros meios de transmissão	23
2.1.5	Manifestações clínicas	24
2.1.5.1	Fase aguda	24
2.1.5.2	Fase crônica	24
2.1.6	Diagnóstico	25
2.1.7	Tratamento clínico	26
2.1.8	Desenvolvimento de novos fármacos	27
2.1.9	Alvos biológicos	28
2.1.9.1	Enzima cruzaina	28
2.1.9.2	Biossíntese de esteróis	29
2.1.9.3	Via glicolítica	29
2.1.9.4	DNA topoisomerasas	30
2.2	LEISHMANIOSE	30
2.2.1	Aspectos históricos	30
2.2.2	Caracterização da doença	30
2.2.3	Aspectos epidemiológicos	33
2.3.4	Manifestações clínicas	34
2.2.5	Diagnóstico	34
2.2.6	Tratamento	35
2.3	ESTRUTURAS PRIVILEGIADAS	36

2.4	PLANEJAMENTO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS: INTEGRAÇÃO ENTRE QUÍMICA MEDICINAL E QUÍMICA ORGÂNICA SINTÉTICA	37
2.5	PIRIDINA	38
2.6	4-TIAZOLIDINONA	39
2.7	HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR	41
3	OBJETIVOS	42
3.1	OBJETIVO GERAL	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	OBTENÇÃO DA SÉRIE QUÍMICA	43
4.1.1	Materiais e reagentes	43
4.1.2	Processo reacional	43
4.1.3	Síntese do intermediário (DA-Int1)	44
4.1.4	Síntese do intermediário (DA-Int2)	45
4.1.5	Síntese da série piridil-4-tiazolidinona (DA 1-6)	46
4.1.6	Caracterização Estrutural	46
4.2	PARTE BIOLÓGICA	47
4.2.1	Ensaio de citotoxicidade anti-<i>T. cruzi</i>	47
4.2.2	Ensaio tripanocida	47
4.2.3	Índice de seletividade	48
4.2.4	Ensaio com promastigotas de <i>L. infantum</i>	48
4.2.5	Ensaio com amastigotas de <i>L. infantum</i>	49
4.2.6	Ensaio de citotoxicidade anti-<i>Leishmania</i>	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	SÉRIE QUÍMICA	51
5.1.1	Dados espectroscópicos	57
5.2	PARTE BIOLÓGICA	60
5.2.1	Ensaio <i>in vitro</i> para <i>T. cruzi</i>	60
5.2.2	Ensaio <i>in vitro</i> para <i>Leishmania</i>	62
6	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são consideradas um grupo variado de infecções ocasionadas por uma diversidade de agentes patogênicos, como exemplo protozoários, bactérias, vírus e helmintos. As populações que vivem em situação de pobreza, que não possuem um saneamento básico adequado, estão mais susceptíveis a contrair esse tipo de doença (LEITE *et al.*, 2019).

Dentre esse conjunto de doenças, destacamos a Doença de Chagas (DC), que também pode ser nomeada como tripanossomíase americana. Caracterizada como uma infecção parasitária, sistêmica e crônica, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Essa patologia pode ser transmitida principalmente entre os seres humanos através das fezes dos insetos triatomíneos infectados, conhecidos como barbeiros (CHAO, 2020; CHANDA *et al.*, 2021).

Outra doença negligenciada é a Leishmaniose, uma infecção causada por protozoários da família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania*. Para a Leishmaniose, os fármacos disponíveis para o tratamento da doença são anfotericina B, miltefosina e pentamidina. O tratamento não é eficaz em estágios mais avançados da doença, além da elevada toxicidade das drogas (FIOCRUZ, 2022; BRASIL, 2017).

A terapia medicamentosa para a doença de Chagas também é uma problemática ainda mal elucidada e a constante busca por novas alternativas farmacológicas continua (CHATELAIN, 2015). Atualmente existem somente duas drogas nitro heterocíclicas para a utilização clínica. A quimioterapia atual é baseada apenas ao Benznidazol (BZN), tido como um medicamento que apresenta um longo período de tratamento e ainda efeitos colaterais graves, levando a desistência de uma parcialidade de pacientes; e o Nifurtimox (NFX) que apresenta sérios efeitos adversos e possui uma menor acurácia em relação ao BZN, por este motivo teve sua venda proibida no Brasil e em outros países do mundo (TROUILLER *et al.*, 2002).

Visto essas limitações em relação ao tratamento farmacológico atual para a doença de Chagas e para leishmaniose, se faz necessário a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos que possam atuar no tratamento dessas doenças (SANTOS *et al.*, 2020).

Uma importante estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos é a hibridação molecular (HM). Ela consiste na conjugação de estruturas de compostos bioativos distintos em uma única molécula, sendo uma alternativa eficaz de arquitetar

racionalmente estruturas moleculares de novos compostos protótipos (VIEGAS-JUNIOR, 2007).

O anel piridina é um importante grupo farmacofórico com algumas atividades biológicas, seus derivados são amplamente descritos para as mais diversas atividades farmacológicas, sendo classificado como uma estrutura privilegiada por atuar em vários alvos. Apresenta atividades bactericida (BHATIA *et al.*, 2009), fungicida (OZDEMIR *et al.*, 2010), antitumoral (AL-SAID *et al.*, 2011) e tripanocida (DIAS *et al.*, 2007).

Outro núcleo de bastante interesse na química medicinal é a tiazolidinona. Os compostos tiazolínicos são uma classe de compostos heterocíclicos que também apresentam algumas de atividades biológicas (ÇIKLA-SÜZGÜN, 2021). Na literatura, é relatada uma gama de atividade farmacológica desse composto, tais como: anticâncer (MOORKOTH, 2015), antibacteriana (PALEKAR, 2009), antidepressiva (RAMACHANDRAN, 2021), e anti-inflamatória (HAROUN *et al.*, 2022).

Pesquisas do nosso grupo de pesquisa revelaram a importância dos núcleos piridina e tiazolidinona. Considerando os resultados promissores dos derivados piridil-4-tiazolidinona já sintetizados no LpQM, bem como as propriedades farmacológicas atribuídas às piridinas e as 4-tiazolidinonas, utilizaremos a estratégia da hibridação molecular para a obtenção de novos compostos protótipos com potencial atividade anti-*T. cruzi* e anti-*Leishmania*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

2.1.1 Aspectos históricos

A doença de Chagas foi descrita pela primeira vez no ano de 1909 pelo pesquisador Carlos Chagas (**figura 1**). A doença foi caracterizada como uma enfermidade parasitária causada pelo protozoário *T. cruzi* (LINDANI *et al.*, 2019; PÉREZ-MOLINA, 2018).

Figura 1. Carlos Chagas.



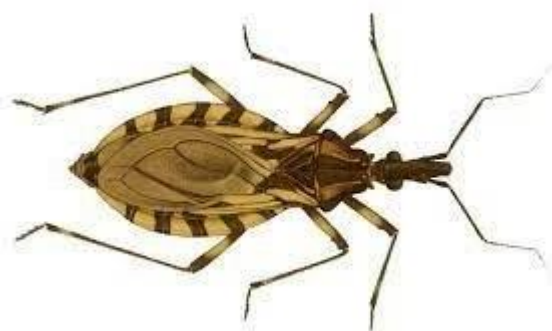
Fonte: Oswaldo Cruz House - Fiocruz.

O estudo desenvolvido por Carlos Chagas foi considerado importante dentro da história da medicina, isso porque foi o primeiro e único pesquisador, até o momento, a elucidar de forma completa a doença de Chagas, em seus mais diversos parâmetros: patógeno, vetor, hospedeiro, suas manifestações clínicas e incidência epidemiológica (MORETTI, 2020).

Apesar de ter sido descoberta há um pouco mais de um século, a literatura sugere que a doença de Chagas surgiu há milhões de anos como uma espécie de infecção enzoótica em animais selvagens. A transmissão humana começou a ocorrer quando o homem começou a explorar as áreas com animais infectados (LUQUETTI, 2010).

A doença de Chagas é causada na maioria das vezes pela picada de insetos triatomíneos, que nesse caso são os vetores do parasita, popularmente conhecidos como barbeiros (**Figura 2**). A contaminação no inseto ocorre quando o barbeiro, que é uma espécie sugadora de sangue, pica algum animal ou humano infectado. Já a contaminação humana ocorre quando as fezes do inseto infectado entram em contato com a corrente sanguínea da vítima, através da lesão que foi gerada por meio da picada. Existem casos em que há a infecção também em pele sem lesão (BERN, 2015; ECHEVERRIA, 2019).

Figura 2. *Triatoma infestans* (Barbeiro).



Fonte: FAFAr - UNESP

2.1.2 Aspectos epidemiológicos

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo são atingidas por essa doença. Além disso, é considerada endêmica em 21 países da América Latina (OMS). Ainda pode-se afirmar que, mais de 85% dos pacientes acometidos por Chagas, desconhecem o quadro pelo fato de haver escassez de diagnósticos (CHUIT, 2019).

Dados recentes no Brasil apontam que a doença de Chagas segue como um grave problema de saúde pública, em maiores escalas nas grandes cidades. A doença de Chagas é a quarta causa de morte mais comum no país dentre as doenças infecto-parasitárias, onde a faixa etária mais comprometida é aquela acima dos 45 anos (SANTOS *et al.*, 2020). A **figura 3** ilustra os países em que a doença de Chagas é considerada endêmica.

Figura 3. Países endêmicos de doença de Chagas.



Fonte: Adaptado de Iglesia (2015).

2.1.2.1 COVID-19 e o impacto das doenças negligenciadas

A pandemia de Covid-19 tem provocado diversos impactos tanto na sociedade quanto na área da saúde, em particular, evidenciando uma crise sanitária que envolve os processos ambientais, econômicos, sociais, culturais e políticos e suas inextricáveis interdependências. Ela vem gerando importantes transformações e questionamentos no âmbito da organização da vida das pessoas, das famílias e dos diferentes grupos sociais (DINIZ *et al.*, 2022).

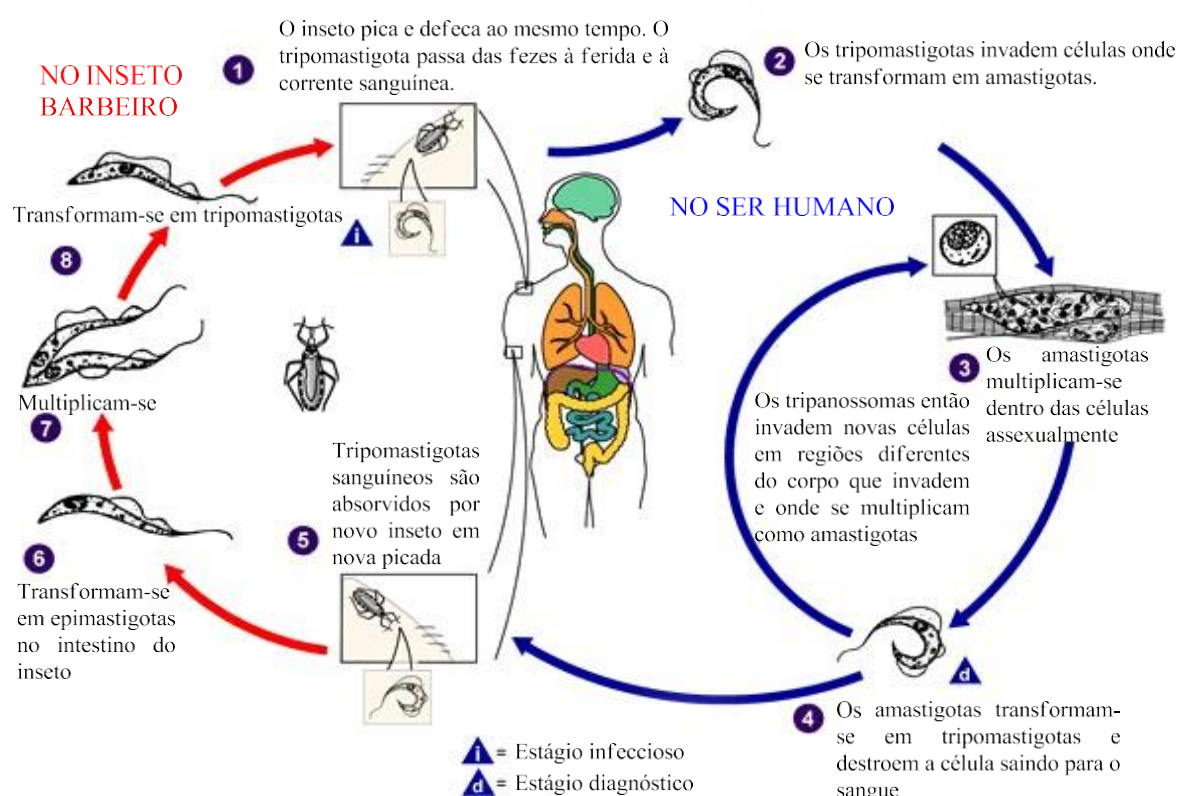
Com a atual pandemia, há grande preocupação de que mesmo as DNs que tiveram avanços nas últimas décadas, como a hanseníase, leishmaniose e doença de Chagas retrocedam com a perda de recursos financeiros e humanos deslocados para o combate à Covid19. Existe ainda a preocupação no que se diz respeito a manutenção e cuidado em relação a pacientes já acometidos por doenças que são consideradas negligenciadas com coinfeção por covid-19 (DIAS, 2020).

2.1.3 Ciclo de vida do *T. cruzi*

O ciclo de vida do parasita *T. cruzi* (**figura 4**) é considerado complexo, tendo variações no seu desenvolvimento em seres humanos e animais silvestres e domésticos, além dos seus hospedeiros invertebrados, os insetos vetores. Esse

parasita dispõe de uma biologia estrutural e funcional variada, com estágios que envolvem divisão binária e as formas não replicativas. Dessa forma, como formas replicativas estão os epimastigotas e amastigotas; já nas formas não replicativas, os tripomastigotas metacíclicos e os tripomastigotas circulantes (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Figura 4. Ciclo de vida do *T. cruzi*.



Fonte: <https://www.sanarmed.com/resumo-sobre-doenca-de-chagas>

**** 1.** Ao se alimentar de sangue, o inseto vetor *Triatominae* (ou barbeiro) infectado libera tripomastigotas nas fezes perto do local da picada; **2.** As tripomastigotas penetram no hospedeiro pela ferida ou pelas mucosas íntegras (p. ex., conjuntiva). No hospedeiro, as tripomastigotas invadem as células próximas ao local da inoculação, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares; **3.** Os amastigotas se multiplicam por fissão binária; **4.** A seguir, se diferenciam em tripomastigotas, e rompem a célula e entram na corrente sanguínea. Os tripomastigotas na corrente sanguínea podem infectar as células em vários tecidos nos quais se transformam em amastigotas intracelulares e causam infecção sintomática. A multiplicação só é retomada quando os parasitas entram em outra célula ou são ingeridos por outro vetor; **5.** O barbeiro é infectado ao se alimentar de sangue humano ou animal contendo parasitas na circulação; **6.** As tripomastigotas ingeridas se transformam em epimastigotas no intestino médio

do vetor; 7. Os parasitas se multiplicam no intestino médio; 8. No intestino distal, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infecciosos, que são eliminados nas fezes.

2.1.4 Transmissão do *T. cruzi*

2.1.4.1 Transmissão vetorial

A doença de Chagas é transmitida aos seres humanos e em mais de 150 espécies de animais, sejam eles domésticos ou mamíferos selvagens, como: roedores, tatus, gambás, especialmente pelos insetos triatomíneos da subfamília *Triatominae*, levando em consideração três ciclos sobrepostos: doméstico, peridoméstico e silvestre. Mesmo existindo mais de 100 espécies de triatomíneos, apenas alguns são vetores competentes para o *T. cruzi* (SHIKANAI-YASUDA, 2012; COURA, 2014; PENADOS *et al.*, 2022).

As espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius* e *Triatoma dimidiata* são os três vetores comumente encontrados na transmissão do *T. cruzi* para o ser humano. O *T. infestans* é o vetor mais importante e o principal nas regiões que são consideradas endêmicas da América do Sul. O *R. prolixus* normalmente é descrito no norte da América do Sul e Central; já o *T. dimidiata* parece ocupa uma área semelhante, mas se estendendo para o norte até o México (BRENER, 1973; ZUMA, 2021).

2.1.4.2 Outros meios de transmissão

A doença de Chagas também pode ser transmitida para o homem por meio de mecanismos não vetoriais, como é o caso de infecção por transfusão de sangue e até mesmo transmissão congênita (VELASCOHERNANDEZ, 1994). O risco de adquirir a doença de Chagas após uma transfusão de sangue é menos de 10-20%, e para isso depende-se de diversas condições, que incluem o nível de parasitos no sangue do doador e a composição do sangue transfundido. Existe também a possibilidade da aquisição da doença por meio da ingestão de alimentos contaminados (PEREIRA *et al.*, 2010; LÓPEZ-VÉLEZ, 2020). Outra forma de transmissão da doença de Chagas entre seres humanos é por meio de relação sexual (ARAÚJO *et al.*, 2017).

Estas divergências podem ser atribuídas à genealogia do parasito, o estado imunológico da mãe, fatores placentários, e as diferentes formas distinguidas para a detecção dos casos congênitos.

2.1.5 Manifestações clínicas

As infecções humanas por *T. cruzi* ocasionam variadas manifestações clínicas específicas ou não, e podem ser divididas nos estágios da doença: fase aguda e fase crônica. A fase aguda tem duração de 4 a 8 semanas, a fase crônica pode perdurar por décadas (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

3.1.5.1 Fase aguda

O estágio agudo é caracterizado pela parasitemia intensa e multiplicação de amastigotas em diversos tecidos do corpo humano (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; BERMUDEZ *et al.*, 2016). Em geral, as manifestações clínicas mais comuns são inchaço na região das pálpebras (sinal de Romaña) ou na região da picada (chagoma de inoculação); seguida de sintomas inespecíficos, como febre, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia e reações alérgicas (COURA; BORGES- 8 PEREIRA, 2010; BERMUDEZ *et al.*, 2016). Em casos mais graves da infecção aguda, pode haver miocardite ou meningoencefalite severas, o que leva a morte entre 5% e 10% dos pacientes (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). No entanto, na maior parte dos casos, a resposta imunológica do organismo contra o parasita é eficiente, sendo o início da fase indeterminada. Em geral, 70% dos pacientes nunca desenvolverão a forma crônica da doença, apesar de permanecem com sorologia positiva para o *T. cruzi*. (RASSI; RASSI; MARINNETO, 2010).

2.1.5.2 Fase crônica

A fase crônica acomete cerca de 30% dos pacientes infectados com o parasita após décadas da infecção inicial (BERMUDEZ *et al.*, 2016). A manifestação clínica mais comum da fase crônica é a Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC), caracterizada pela hipertrofia do músculo cardíaco, arritmia cardíaca severa e progressiva disfunção sistólica (MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015; BERMUDEZ *et al.*, 2016). Normalmente esses sintomas aparecem entre 5 e 15 anos após a infecção

inicial, e estão fortemente associados a persistência do parasita no tecido cardíaco, o que leva a fibrose do mesmo e remodelamento cardíaco, e aos danos causados ao sistema nervoso periférico decorrentes da resposta imunológica ao parasita (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015; BERMUDEZ *et al.*, 2016). As complicações decorrentes do desenvolvimento estão entre as principais causas de mortalidade associadas à doença de chagas, sendo que 55% a 65% das mortes estão associadas a morte súbita cardíaca, seguida por insuficiência cardíaca congestiva (25% a 30% das mortes) e Isquemia pulmonar ou cerebral (10% a 15% das mortes) (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; GUEDES *et al.*, 2016).

2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção causada pelo *T. cruzi*, agente causador da doença de Chagas, assim como em outras diversas enfermidades infecciosas e parasitárias, tem como base três fatores característicos: a sintomatologia clínica, que, se presente, permite que o médico suspeite da infecção; os antecedentes epidemiológicos, que também induzem o clínico à suspeita; e os métodos de diagnóstico, em geral laboratoriais, que permitem confirmar ou excluir a suspeita diagnóstica na maioria das situações (AFONSO, 2012; BALOUZ, 2017).

De acordo com a literatura, os métodos diagnósticos são importantes para pacientes acometidos com a doença de Chagas. Como dito, esta infecção se apresenta apenas em três fases, cada uma de forma própria com o seu tempo de infecção, às manifestações clínicas e aos métodos de diagnóstico. A fase aguda, inicial, com febre e sintomas inespecíficos, às vezes com sinal de Romaña ou chagoma de inoculação (**figura 5**), são diagnosticados através de métodos parasitológicos, em decorrência da elevada parasitemia, que define esta fase. Já na fase crônica, que tem o seu início após a fase aguda e que, é assintomática em mais da metade dos casos, o diagnóstico laboratorial baseia-se na pesquisa indireta de sinais da infecção, ou seja, a presença de anticorpos anti-*T. cruzi* (CHIARI *et al.*, 1989; ABRAS *et al.*, 2016).

Figura 5. Sinal de Romaña.



Fonte: <http://relampa.org.br/details/666/es-ES/carlos-chagas--o-imortal> (Adaptado).

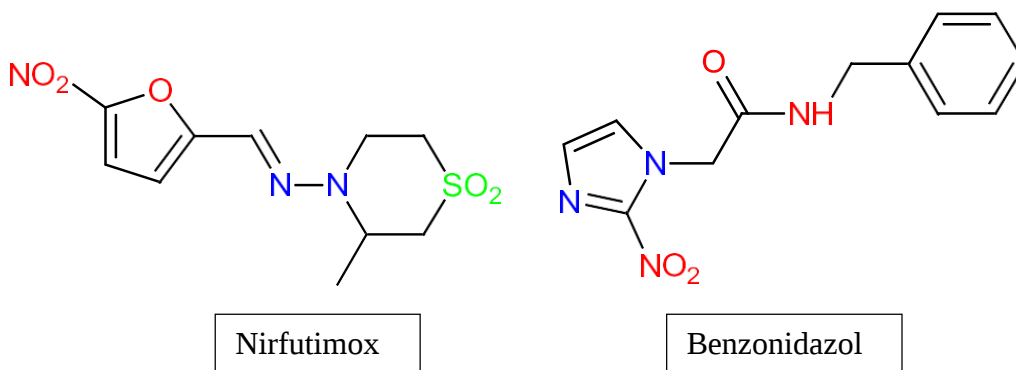
Exames radiológicos também podem auxiliar no processo de diagnóstico da doença de Chagas, pois o comprometimento cardíaco é o principal determinante para o prognóstico da enfermidade (ABUD *et al.*, 2016). A ressonância magnética cardíaca (RMC) tem sido o exame de escolha para avaliação do coração de pacientes chagásicos. É um método não invasivo, que não usa radiação ionizante, com imagens de alta resolução, permitindo avaliação da anatomia, da função e caracterização tissular. Novas técnicas estão sendo rotineiramente usadas para avaliação detalhada da função cardíaca na DC, como marcação miocárdica, cine-RM de alta resolução, realce tardio miocárdico para detecção de fibrose miocárdica, perfusão miocárdica, técnicas de detecção de inflamação e edema, e monitoramento de injeções intramiocárdicas de células-tronco para o tratamento da miocardiopatia chagásica (ROCHITTE *et al.*, 2007).

2.1.7 Tratamento

A abordagem atual para o tratamento da doença de Chagas baseia-se em duas estratégias principais: o tratamento etiológico da infecção e o sintomático da forma crônica da doença. O tratamento sintomático da forma crônica da doença visa principalmente diminuir a mortalidade associada às complicações cardíacas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes que desenvolvem esta forma da doença. O tratamento etiológico da infecção consiste na administração de fármacos tripanocidas para facilitar a eliminação do parasita, no entanto, ainda possui diversas limitações, visto que existem apenas dois fármacos disponíveis no mercado

atualmente indicados para esta finalidade: o Benzonidazol e o Nifurtimox (**Figura 6**) (CANÇADO, 2002; CALDAS, 2019).

Figura 6. Fármacos disponíveis no mercado para terapia de DC: Benzonidazol e o Nifurtimox.



Fonte: O autor.

Novas estratégias são desenvolvidas todos os dias no intuito de contribuir com o tratamento da doença de Chagas no mundo. Torrico et al., (2021), estudam um novo regime monoterápico com benznidazol e em combinação com fosravuconazol para o tratamento da doença de Chagas (BENDITA). O padrão dos acontecimentos adversos observados foi como esperado com base na literatura para o benznidazol. Reações adversas conhecidas, tais como distúrbios hematológicas e aumentos de enzimas hepáticas foram relatados, um pouco mais frequentemente com tratamentos ativos do que com placebo (TORRICO *et al.*, 2021).

2.1.8 Desenvolvimento de novos fármacos

Uma grande problemática para o desenvolvimento de novos fármacos para doenças negligenciadas é justamente pelo baixo interesse das indústrias farmacêuticas, isso se deve ao fato de que os investimentos para a realização de testes são extremamente altos e a ausência de um mercado potencial que possa suprir essa demanda, havendo um baixo retorno financeiro. A literatura evidencia que entre várias drogas que são desenvolvidas nos últimos anos, poucas são destinadas as doenças tropicais (KRATZ, 2019; VILLALTA, 2019).

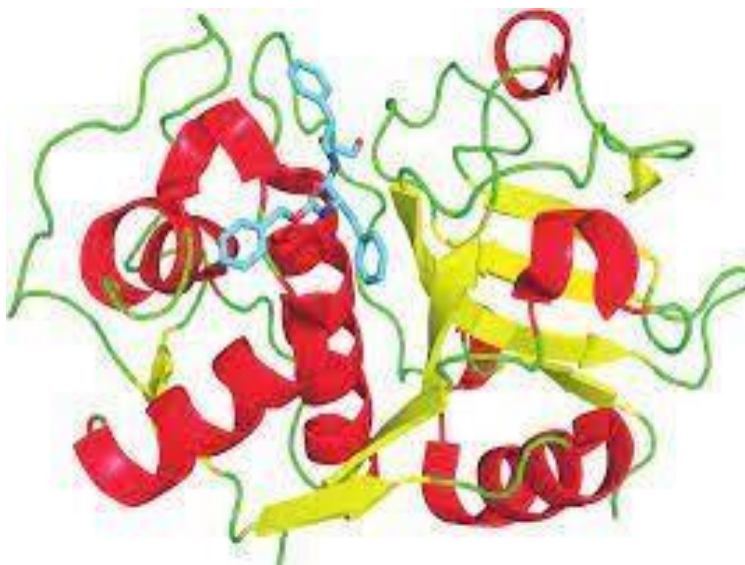
O desenvolvimento de uma nova alternativa para tratamento farmacológico antiparasitário ocorre principalmente pela combinação de princípios ativos de plantas utilizadas na medicina popular (produtos naturais), pela investigação de drogas já aprovadas para a terapia de outras doenças (reposicionamento de fármacos), ou através da regulação de alvos específicos em vias metabólicas que são essenciais para a vida do parasito (VERMELHO, 2020). Alguns estudos têm comprovado a identificação de alvos biológicos potenciais em *T. cruzi*, que incluem o metabolismo de esteróis, DNA e diferentes enzimas como a enzima cruzaina (SCARIM *et al.*, 2018; CHATELAIN, 2020).

2.1.9 Alvos biológicos

2.1.9.1 Enzima cruzaina

A enzima cruzaina (**figura 7**), principal cisteíno-protease do parasito *T. cruzi*, está entre os alvos mais importantes para o desenvolvimento de candidatos a novos fármacos para a doença de Chagas (DA SILVA-JUNIOR *et al.*, 2018). Essencial durante todo o ciclo de vida do parasita, a cruzaina é importante para o desenvolvimento, sobrevivência e diferenciação do protozoário, sendo a principal responsável pela nutrição, evasão do sistema imune e invasão de novos tecidos. A enzima é formada por dois domínios. Um desses domínios é constituído por hélices- α , enquanto o outro forma-se através de extensas interações de folhas- β antiparalelas. O sítio catalítico da enzima encontra-se na interface dos dois domínios (COSTA *et al.*, 2019).

Figura 7. Enzima cruzaina.



Fonte: Universidade de São Paulo

2.1.9.2 Biossíntese de esteróis

Os esteróis são componentes essenciais às membranas das células e podem ser produzidos por animais e plantas. Além disso, são precursores da biossíntese de diversos hormônios e da vitamina D. No caso dos organismos unicelulares, os esteróis são essenciais ao crescimento celular. O principal esterol para o crescimento do *T. cruzi* é o ergosterol, o que torna, portanto, a via de biossíntese desse lipídeo um alvo atrativo para o desenvolvimento de fármacos (BENVENISTE, 1986; MILLERIOUX *et al.*, 2018).

2.1.9.3 Via glicolítica

Formas tripomastigotas do *T. cruzi* são desprovidas do ciclo do ácido tricarboxílico. Levando-se em consideração que estas formas infectivas são altamente dependentes da via glicolítica como fonte de energia através da produção de adenosina trifosfato (ATP), esta se torna, portanto, um alvo atrativo para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos para a doença de Chagas. Podem-se destacar ao menos três enzimas que têm sido bastante exploradas como alvos biológicos: a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, EC 1.2.1.12), a hexoquinase (EC 2.7.1.1), e a fosfofrutoquinase (EC 2.7.1.11).

2.1.9.4 DNA topoisomerasas

As enzimas DNA topoisomerasas I (EC 5.99.1.2) e II (EC 5.99.1.3) têm atraído grande atenção da comunidade científica, pois desempenham papel essencial na replicação do DNA do *T. cruzi* e, em particular, no processo de replicação da cadeia de minicírculos e maxicírculos do DNA do kinetoplasto (kDNA). O planejamento de inibidores destas isomerasas representou grande sucesso no desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos citotóxicos (SOREN *et al.*, 2020).

2.2 LEISHMANIOSE

2.2.1 Aspectos históricos

Trabalhando independentemente, Willian Boog Leishman e Charles Donovan identificaram em 1903 um protozoário como o agente etiológico do calazar. Um novo gênero – *Leishmania* – foi então criado para acomodar o parasito classificado como *Leishmania-Donovani*. E em 1906, um médico alemão mostrou que havia grande semelhança morfológica entre este protozoário e o *Helcosoma tropicum*, do Botão do Oriente, sendo este reclassificado como *Leishmania tropica* (DEVENS, 2022; RIOS *et al.*, 2019).

No Brasil, em 1909, Antonio Carini e Ulisses Paranhos, do Instituto Pasteur de São Paulo, e Adolpho Lindenberg, do Instituto Bacteriológico de São Paulo, relataram a descoberta de *Leishmania* nas chamadas “úlceras de Bauru”. Vinham elas acometendo muitos operários que trabalhavam na construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, que ligaria Bauru ao Mato Grosso e à Bolívia (BENCHIMOL *et al.*, 2019).

2.2.2 Caracterização da doença

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (**Figura 8**). No Brasil, existem dois tipos, a tegumentar e a visceral, transmitidas por protozoários diferentes. A leishmaniose tegumentar tem maior circulação em áreas rurais, e está relacionada ao aparecimento de lesões na pele ou

mucosa. A visceral, por sua vez, ataca órgãos internos, como fígado, baço e medula óssea (BRASIL, 2022).

As *Leishmanias* estão distribuídas por todo mundo, existindo 30 espécies conhecidas, das quais 10 estão presentes no Velho Mundo e as outras 20 no Novo mundo. Dentre elas, cerca 16 de 20 espécies estão envolvidas no desenvolvimento de doenças no homem. Sistemáticamente estão organizados na ordem *Kinetoplastida*, Família *Trypanosomatidae*, Gênero *Leishmania*, divididos nos Subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (SHAW, 1994; NEVES, 2005).

Figura 8. *Leishmania*.



Fonte: Fiocruz.

Os hospedeiros vertebrados incluem uma diversidade de mamíferos. Apesar das infecções por esses parasitos serem mais comuns nos roedores e canídeos, são conhecidas também entre primatas e, entre estes, o homem. Como hospedeiro invertebrado são identificados, unicamente, fêmeas de insetos hematófagos classificados como flebotomíneos (**figura 9**). A transmissão acontece através da picada do inseto infectado no momento da hematofagia. A forma promastigota do parasita é alongada, com um flagelo, livre e longo, diferenciando – a da forma amastigota, que não exterioriza seu flagelo para além do corpo (NEVES, 2004).

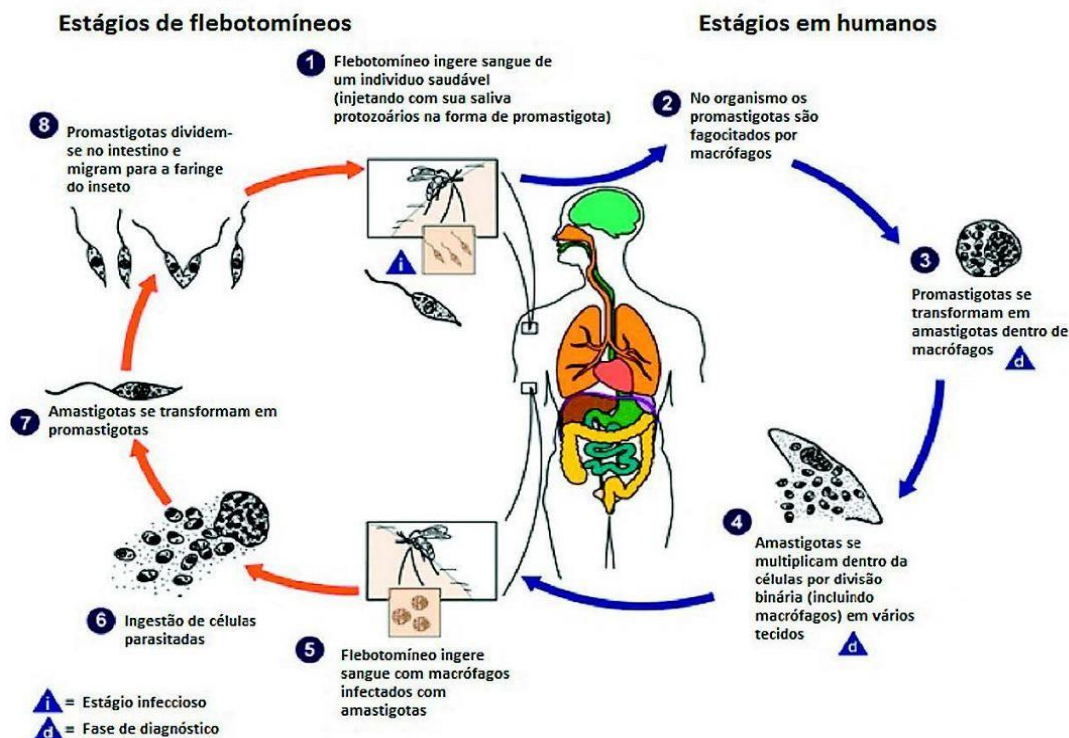
Figura 9. Flebotomíneo.



Fonte: FIOCRUZ.

A infecção ocorre quando o flebotomíneo passa o protozoário a uma vítima sem a infecção, enquanto se alimenta de seu sangue. As amastigotas, ao atingirem o intestino do inseto, transformam-se em promastigotas. Do intestino são expelidas ou introduzidas na pele do próximo hospedeiro quando o inseto se alimenta novamente de sangue (KAYE; SCOTT, 2011). O ciclo de transmissão está completo assim que fagócitos infectados são absorvidos por outro flebotomíneo ao realizar o repasto sanguíneo (**Figura 10**). Os flebotomíneos são contaminados a partir de animais infectados, que são essenciais para o estabelecimento da doença em humanos (BATES, 2004).

Figura 10. Ciclo biológico do protozoário *Leishmania*.



Fonte: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> (Adaptado).

2.2.3 Aspectos epidemiológicos

As leishmanioses se destacam como uma das doenças tropicais negligenciadas mais importantes pela sua elevada incidência e também pela capacidade de produzir deformidades. As Leishmanioses são antroponoses, doenças comuns em animais e que podem ser transmitidas aos homens, e são consideradas um grande problema de saúde pública. Representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica, e está dividida em: visceral, cutânea e mucosa (OPAS/OMS, 2022).

A leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) são endêmicas em 18 países das Américas. No período de 2001-2019 foram notificados 1.028.054 novos casos de LC e LM, distribuídos em 17 dos países endêmicos. Em 2019, o Brasil registrou 15.484 casos, sendo o país com maior incidência. Junto com Colômbia (5.907), Peru (5.349), Nicarágua (3.321) e Bolívia (2.052) representaram 77% do total de casos na região (OPAS/OMS, 2020). No Brasil, tem sido associada a sete espécies: *L. braziliensis*, *L.*

guyanensis, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. lindenberg* e *L. amasonensis* (BRASIL, 2022).

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica potencialmente fatal. É endêmica em 13 países das Américas, onde 65.934 casos novos foram registrados de 2001 a 2019, com média de 3.470 ocorrências por ano. Em 2019, cerca de 97% (2.529) dos casos, foram concentrados no Brasil, e os demais casos na Argentina, Bolívia, Colômbia, Guatemala, Honduras, México, Paraguai, Venezuela e Uruguai. Em 2019, dados do OPAS/OMS indicaram que a LV registrou menor número de casos desde 2003, com destaque para o Brasil que obteve 27% de redução (937). Por outro lado, Argentina, Paraguai e Uruguai tiveram aumento (OPAS/OMS, 2022).

2.2.4 Manifestações clínicas

A LC é uma doença infecciosa que normalmente produz úlceras nas partes expostas do corpo, como face, braços e pernas. As lesões podem ser únicas ou múltiplas, podendo deixar cicatrizes permanentes, o que pode levar à estigmatização, especialmente para mulheres e meninas (OMS, 2022).

A LV afeta os órgãos internos. É caracterizada por febre irregular, indisposição, emagrecimento, inchaço do baço e fígado e anemia grave. Se não tratados, a maioria dos pacientes sintomáticos podem morrer em 2 anos. LM causa lesões que podem destruir parcial ou totalmente as mucosas do nariz, cavidades da boca e garganta e tecidos circundantes (OMS, 2022) (DNDi, 2022).

O diagnóstico é realizado através de métodos parasitológico e imunológicos. O teste parasitológico é feito por exame direto ou cultivo de material obtido dos tecidos infectados, por aspiração, biópsia ou raspado das lesões. O imunológico é baseado na avaliação da resposta de células do sistema imune e a presença de anticorpos anti-*Leishmania*. Nesta categoria se incluem: teste cutâneo de Montenegro e testes sorológicos (FIOCRUZ, 2022).

2.2.5 Diagnóstico

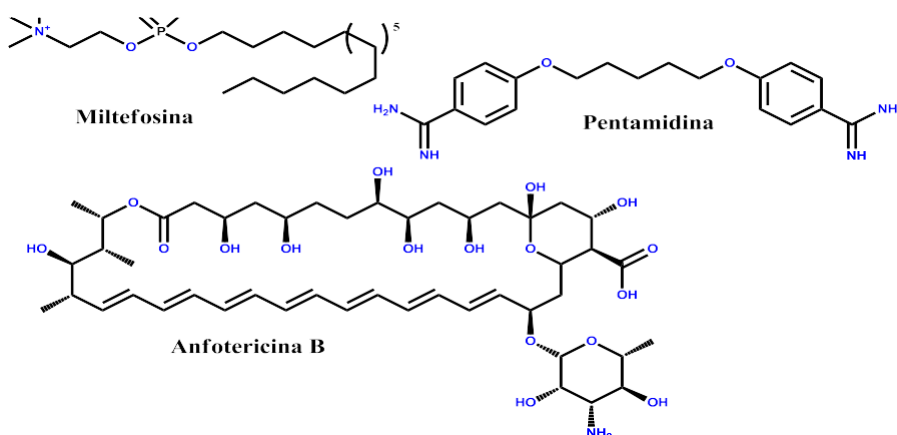
O exame sorológico, pela reação da fixação do complemento (RFC), foi utilizado pela primeira vez para diagnosticar a leishmaniose humana em 1938. A partir da década de 50 começou a ser utilizado em medicina veterinária, em 1957,

pesquisadores brasileiros, descreveram a RFC para inquéritos caninos. Em 1975, a aglutinação direta (DAT) foi descrita e adaptada para o diagnóstico de leishmaniose humana e canina no final da década de 80. O ELISA ou “enzyme linked immunosorbent assay” obteve a primeira descrição em 1971 por Engvall e colaboradores. O diagnóstico das leishmanioses baseia-se, principalmente, nos achados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos indivíduos suspeitos

2.2.6 Tratamento

O tratamento para a *Leishmania* ainda é bastante limitado, e apresenta sérios inconvenientes em termos de segurança, resistência, estabilidade e custo, além de baixa tolerabilidade, longa duração de tratamento e difícil administração. A terapia é complexa e deve ser administrada por profissionais experientes, a dose e o tempo do tratamento dependem da forma clínica e em alguns casos, os pacientes só evoluem para cura após a tentativa de diversos esquemas terapêuticos. Os principais fármacos utilizados são: anfotericina B, miltefosina e pentamidina (**Figura 11**). A miltefosina está sendo administrada oralmente principalmente no tratamento de crianças, embora a maioria dos antileishmaniais sejam injetáveis (DNDi, 2022).

Figura 11. Estrutura dos principais fármacos usados no tratamento da leishmaniose.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Pentamidina age interferindo na síntese de DNA, alterando morfológicamente o cinetoplasto e fragmentando a membrana mitocondrial (KAUR e RAJPUT, 2014). Classicamente a dosagem utilizada é de 4mg/Kg/dia, por via intramuscular a cada dois

dias. A toxicidade está relacionada a dose acumulada, por isso não é recomendado que a dose total utilizada não ultrapasse 2g, e os efeitos colaterais incluem dor, induração (rigidez em resposta à inflamação) e abscessos no local de aplicação, além de náuseas, vômitos, tontura, cefaleia hipoglicemia e hiperglicemia, devido a ação do medicamento no metabolismo da glicose (BRASIL, 2017)

Outro medicamento utilizado como segunda escolha para as leishmanioses é o desoxicolato de Anfotericina B, um antibiótico poliênico com excelente atividade in vitro na destruição de *Leishmania* intra e extracelular, é administrado por via endovenosa. Os primeiros relatos da eficácia da Anfotericina B foram publicados em 1960, dez anos depois um estudo avaliou o fármaco em 49 pessoas com leishmaniose muco-cutânea obtendo resultados excelentes. O mecanismo de ação se dá pela sua interação específica com o ergosterol causando mudança de sua permeabilidade seletiva para K^+ e Mg^{2+} e consequentemente a morte do parasito. A droga tem eficácia contra as espécies de *Leishmania*, mas é tóxica para as células de mamíferos (KAUR e RAJPUT, 2014; MENDONÇA, 2018)

A miltefosina é um composto anticancerígeno que sofreu avaliações experimentais que comprovaram sua eficácia para o tratamento de leishmanioses visceral, sendo a primeira droga de uso oral usada no tratamento do kalazar por *L. donovani*. A atividade leishmanicida da miltefosina está relacionada à indução de morte celular semelhante a apoptose, com degradação do DNA, e com alterações na biossíntese de fosfolípidios e no metabolismo de lipídeos (PARIS, 2004; KAUR e RAJPUT, 2014). Estudo recente demonstrou o potencial da miltefosina na inibição do crescimento *Leishmania major* in vitro após 48 hrs de incubação (NAZARIVANANI, 2018).

2.3 ESTRUTURAS PRIVILEGIADAS

As estruturas privilegiadas tem por definição esqueletos moleculares que possuem propriedades versáteis de interações intermoleculares. Essas estruturas surgiram como um método eficiente para a síntese e descoberta de novos fármacos. Dessa forma, um único grupamento é capaz de fornecer ligantes ativos e seletivos para variados alvos biológicos por meio da modificação de grupos funcionais (YET, 2018).

Estruturas privilegiadas exibem excelentes características de fármaco (fármaco-similar) que resultam em coleções de substâncias químicas bioativas com propriedades fármaco-similares (DESIMONE *et al.*, 2004). O entendimento das relações estrutura-alvo é fundamental no processo de identificação das estruturas privilegiadas e seus respectivos alvos biomacromoleculares. O correto entendimento dessas relações conduz à identificação de famílias de alvos distintos. Tanto a química medicinal clássica como o planejamento de coleções dirigidas a um determinado alvo beneficiam-se do conceito de estruturas privilegiadas (CONSTANTINO, 2006).

2.4 PLANEJAMENTO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS: INTEGRAÇÃO ENTRE QUÍMICA MEDICINAL E QUÍMICA ORGÂNICA SINTÉTICA

Entre as estratégias mais utilizadas no planejamento de agentes antiparasitários está a investigação de vias bioquímicas e a seleção de proteínas alvo dos patógenos, que possam, por sua vez, ser moduladas específica ou seletivamente por pequenas moléculas, considerando-se a presença ou ausência do alvo no hospedeiro. Neste contexto, as várias enzimas que vêm sendo estudadas para o desenvolvimento de novos fármacos fornecem exemplos muito interessantes de estratégias multidisciplinares, com diversos níveis de complexidade e de incorporação de métodos e tecnologias de planejamento (RIBEIRO *et al.*, 2020).

Os avanços significativos da biologia molecular e estrutural têm possibilitado a seleção e validação de vários alvos biológicos importantes, especialmente na era pós-genômica (OLIVEIRA *et al.*, 2019). O aprimoramento das técnicas de determinação estrutural de macromoléculas como a cristalografia de raios X e a ressonância magnética nuclear (RMN), tem contribuído fundamentalmente na compreensão das interações intermoleculares predominantes entre moléculas bioativas e seus receptores biológicos, bem como nos estudos de caracterização de mecanismos de ação (ZHANG *et al.*, 2020). Vale salientar que há vários outros casos de moléculas que possuem interessante atividade anti-*T. cruzi in vitro*, contudo, a via bioquímica e o alvo molecular não são conhecidos.

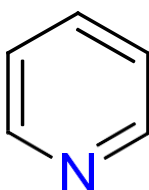
A rápida identificação de moléculas bioativas e a otimização de compostos líderes têm se tornado questões prioritárias na área de doenças negligenciadas. Os pró-fármacos também merecem destaque especial, pois a biotransformação da forma inativa do fármaco, liberando a porção ativa no local de ação ou próximo a este, é uma

estratégia muito útil no planejamento de quimioterápicos com alta especificidade de ação. A grande disponibilidade de compostos sintéticos e de ensaios biológicos em média e larga escala tem contribuído para a seleção de várias moléculas com diferentes tipos de atividades biológicas e farmacológicas. Uma questão fundamental que se coloca à frente nesse processo é a otimização de moléculas promissoras em relação a propriedades como potência e afinidade. A execução dessa tarefa desafiadora requer a integração entre as estratégias de química medicinal moderna e o planejamento em química orgânica sintética, para que novas moléculas, capazes de representar novas entidades químicas (NCEs - new chemical entities) possam ser geradas (BARREIRO, 2014).

2.5 PIRIDINA

A piridina (**figura 12**) é um heterocíclico importante para a química medicinal e para a indústria farmacêutica no tocante ao desenvolvimento de novos fármacos, isso porque ela apresenta um amplo espectro de atividades biológicas, além de agir como um potente catalisador químico. Pesquisas têm mostrado a notável atividade que derivados desses compostos podem desempenhar: bactericida, fungicida, anticâncer e tripanocida (CHAUBEY, 2011; ALTAF *et al.*, 2015).

Figura 12. Estrutura molecular da piridina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

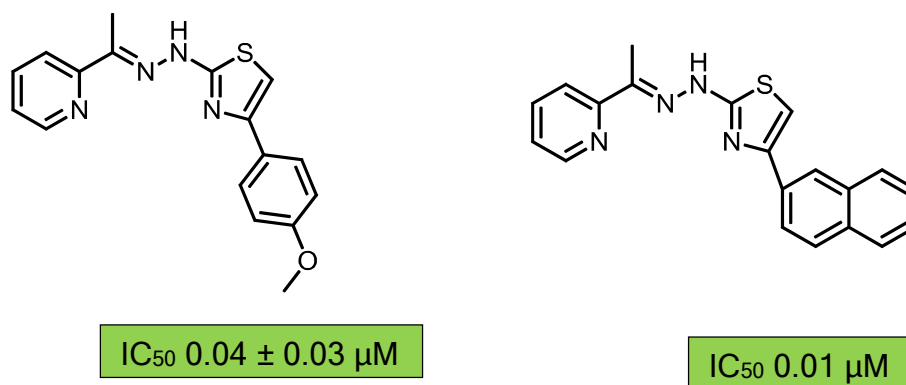
Estudos do LpQM, revelaram que 20 compostos de uma série de 26 piridiltiazóis apresentaram ser agentes tripanocidas mais potentes que o Benzonidazol (BDZ) (CARDOSO *et al.*, 2014) (**Figura 13**).

Em trabalho realizado por Lessa *et al.*, (2011), derivados da 2-acetilpiridina-tiossemicarbazona provaram ser excelentes inibidores do *T. cruzi*, sendo 55 a 70 vezes mais ativos do que o Nifurtimox (NFX).

Ribeiro *et al.*, (2021) realizaram a síntese e atividade biológica de uma série de compostos 1,6-difenil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina derivados da piridina que apresentaram um potencial anti-*T. cruzi*. Nesse estudo, a série de compostos demonstrou atividade promissora in vitro, com destaque para dois compostos que passaram para testes in vivo. Os autores sugerem por meio de seus resultados que a substituição na posição C-2 do grupo fenil ligado à carboidrazida desempenha um papel importante na atividade tripanocida desta classe de compostos.

Da Silva Lima *et al.*, (2020) realizaram testes acerca de uma série 1H-pirazolo[3, 4-b]piridina derivados de piridina. Seus resultados mostraram que os compostos com grupo fenil na posição C-6 exibiam atividade e o derivado N'-4-hidroxifenilmetileno apresentava o melhor perfil tanto contra as formas tripomastigotas como amastigotas do *T. cruzi*. Os estudos de docking molecular também evidenciaram que esta série de compostos tem afinidade de ligação com o CYP51 e a cruzaina do *T. cruzi*, alvos biológicos do parasito.

Figura 13. Compostos destaques da série piridil-tiazóis de CARDOSO *et al.*, 2014

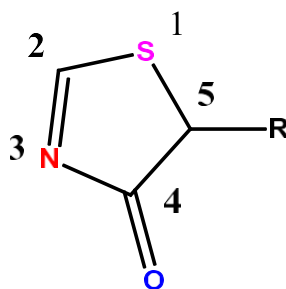


Fonte: Adaptado de CARDOSO *et al.*, 2014.

2.6 4-TIAZOLIDINONA

As 4-tiazolidinonas são um dos anéis heterocíclicos que vêm sendo explorados ao longo dos anos devido às suas conhecidas atividades biológicas (GILANI *et al.*, 2016). O grupamento tiazolidínico é um anel de cinco membros, composto por um átomo de enxofre na posição 1, um nitrogênio na posição 3 e uma carbonila na posição 4 do anel (**Figura 14**).

Figura 14. Estrutura molecular de 4-tiazolidinonas.

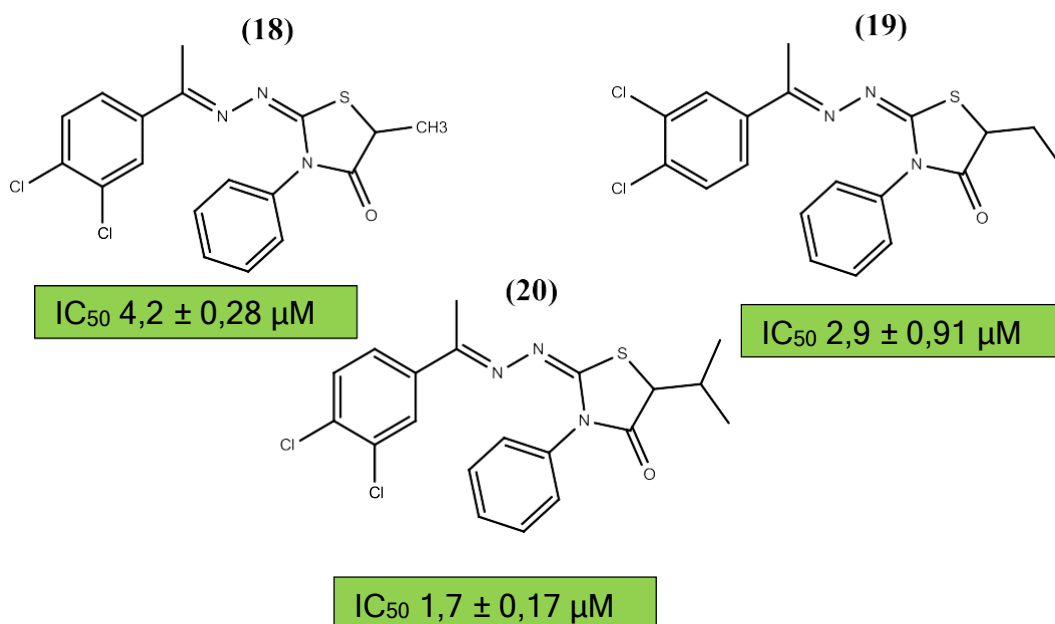


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os compostos derivados de tiazolidinonas apresentam registros de bioatividade na literatura. Esta estrutura privilegiada vem sendo utilizada como bloco de construção para o desenvolvimento de moléculas com potenciais atividades biológicas antibacterianas (ANDRES et al., 2000), antifúngicas (KZÂZKGZZEL et al., 2006) e antiprotozoários (ALVES et al., 1993).

A partir de modificações moleculares nas posições N₃ e C₅ do anel tiazolidínico, Oliveira Filho *et al.*, (2015) desenvolveu uma nova série de tiazolinonas. A triagem *in vitro* revelou que a presença de um grupo fenil na posição N₃ melhora a atividade antiparasitária, o que conduziu à identificação dos compostos potentes substituídos por N-fenil, o **(18)** ($4,2 \pm 0,28 \mu\text{M}$), o **(19)** ($2,9 \pm 0,91 \mu\text{M}$) e **(20)** e o ($1,7 \pm 0,17 \mu\text{M}$), que foram, respectivamente, 2, 3 e 6 vezes mais ativos que o fármaco de referência, o benznidazol ($10,6 \pm 0,87 \mu\text{M}$), para a forma tripomastigota do parasita. O composto **(20)** diminuiu a parasitemia no modelo de camundongos *in vitro* e no de infecção aguda, comprovando assim a noção geral de que essa classe de compostos heterocíclicos são fortes agentes antiparasitários (**Figura 15**).

Figura 15. Moléculas tiazolidinonas com atividade tripanocida.



Fonte: Adaptado de Oliveira Filho *et al.*, (2015).

2.7 HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR

A hibridação molecular (HM) é uma estratégia clássica de conjugação de estruturas de compostos bioativos distintos em uma única molécula, sendo uma alternativa eficaz de arquitetar racionalmente estruturas moleculares de novos compostos protótipos (VIEGAS-JUNIOR *et al.*, 2007). Segundo Nepali e Colaboradores, a HM pode estar baseada na junção de fármacos distintos (HM do tipo droga-droga) ou de grupos farmacofóricos de fármacos distintos (HM do tipo farmacofórica). Em ambos os casos, a nova molécula produzida por HM passa a se chamar de híbrido, o qual frequentemente apresenta maior afinidade e eficácia que os compostos que lhe deram origem (NEPALI *et al.*, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Chagas e Leishmaniose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar a série de compostos piridil-4-tiazolidinonas;
- Caracterizar todos os compostos por técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H -RMN) e Carbono (^{13}C -RMN).
- Avaliar a citotoxicidade frente a células L929 em ensaios *in vitro*;
- Avaliar a atividade tripanocida dos compostos através de ensaios *in vitro*;
- Avaliar a atividade leishmanicida dos compostos através de ensaios *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA SÉRIE QUÍMICA

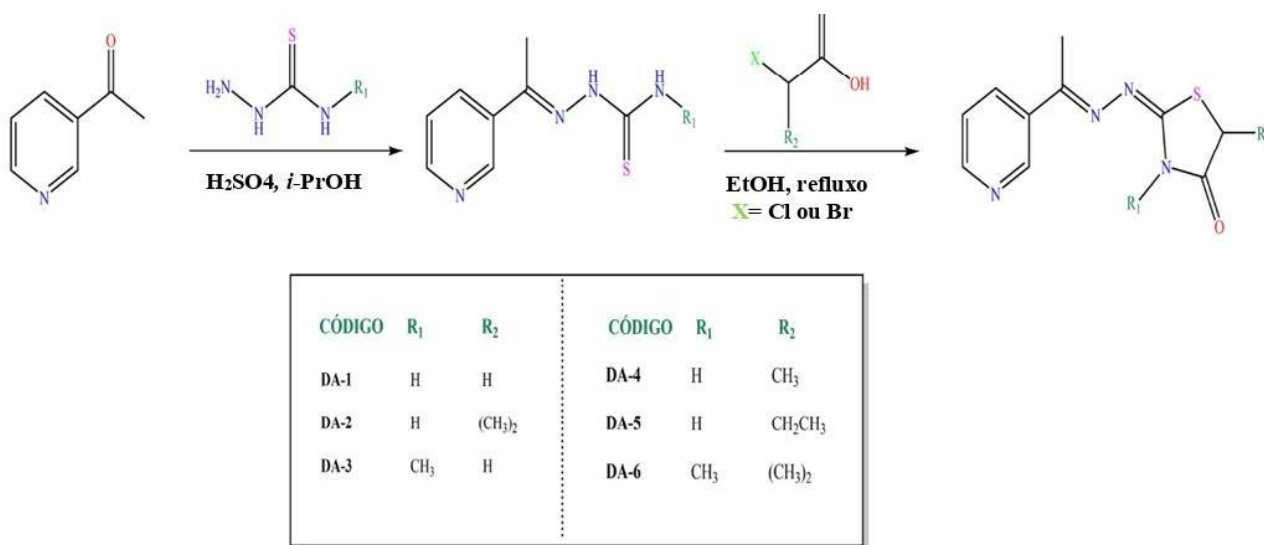
4.1.1 Materiais e reagentes

Para as reações foram utilizados os seguintes solventes: isopropanol, hexano, acetato e DMF, provenientes das marcas Dinâmica, Cinética e Química moderna. Os reagentes utilizados foram: 3-acetilpiridina, tiossemicarbazida, 4-metil-3-tiossemicarbazida, ácido sulfúrico, bromo acético, 2-bromo-2-metilpropiónico, 2-cloropropionico, que foram obtidos através das marcas Sigma Aldrich, Química Moderna, Cinética Química Ltda.

O processo reacional de síntese foi acompanhada por meio de cromatografia de camada delgada (CCD) em todas as reações. Utilizou-se como fase estacionária sílica-gel 60 da marca Alugram® com o indicador fluorescente F₂₅₄. Para a visualização das placas de cromatografia foi utilizada uma câmara de radiação ultravioleta (duplo comprimento de onda 365nm ou 254nm) da marca Vilber Lourmat. Os pontos de fusão foram feitos através do equipamento fusiômetro da marca Fisatom, modelo 430D.

4.1.2 Processo reacional

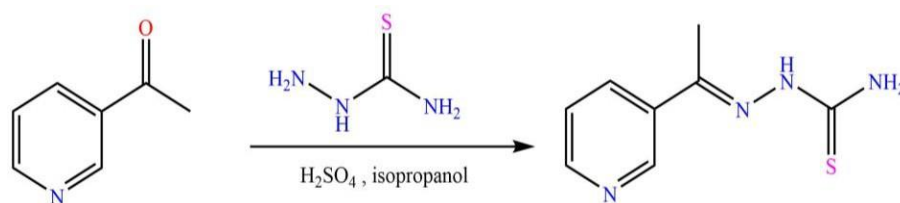
A síntese dos compostos foi realizada em duas etapas, a condensação, que deu origem as tiossemicarbazonas (DA-Int1 e DA-Int2) e a outra etapa, a ciclização, que deu origem aos compostos finais. O projeto geral de obtenção desta série vinde no esquema 1.

Esquema 1. Processo geral da síntese da série DA 1-6.

Fonte: O autor.

4.1.3 Síntese do intermediário (DA-Int1)

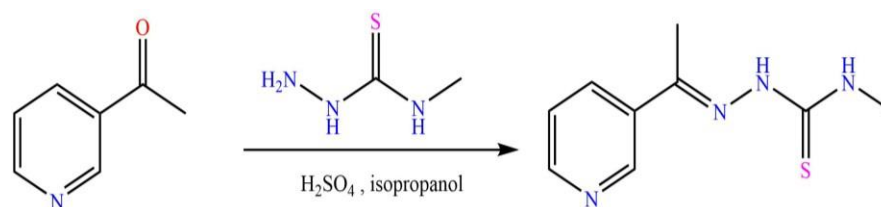
Em um balão de fundo redondo adicionou-se 1,247g de 3-acetilpiridina (líquida) com 0,938g de tiossemicarbazida, como solvente, foi utilizado 25 mL de isopropanol. Em seguida, foi adicionado 2 gotas de ácido sulfúrico, utilizado como agente catalisador nesta reação, que foi submetida a agitação por meio de refluxo à 100°C durante 2 horas. Este procedimento experimental foi acompanhado por cromatografia de camada delgada utilizando como fase móvel a mistura de Hexano/Acetato na proporção 7/3. Após o término da reação, verificado por placa de CCD, a reação foi filtrada utilizando-se funil sinterizado e o precipitado branco foi colocado no dessecador por 24 horas e então pesado para a obtenção dos dados de rendimento. O sobrenadante branco foi descartado. O processo reacional para esta reação é exemplificado no esquema 2.

Esquema 2. Reação do Intermediário 1.

Fonte: O autor.

4.1.4 Síntese do intermediário 2 (DA-Int2)

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 1,163g de 3-acetilpiridina (líquida) com 1,009g de 4-metil-3-tiossemicarbazida, como solvente, foi utilizado 25 mL de isopropanol. Em seguida, foi adicionado 2 gotas de ácido sulfúrico, utilizado como agente catalisador nesta reação, que foi submetida a agitação por meio de refluxo à 100°C durante 2 horas. Este procedimento experimental foi acompanhado por método de cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando como fase móvel a mistura de Hexano/Acetato na proporção 1/1. Após o término da reação, verificado por placa de CCD, a reação foi filtrada utilizando-se funil sinterizado e o precipitado amarelo claro foi posto no dessecador por 24 horas e então pesado para a obtenção dos dados de rendimento. O sobrenadante amarelo foi descartado.

Esquema 2. Reação do Intermediário 2.

Fonte: O autor.

4.1.5 Síntese da série piridil-4-tiazolidinona (DA1-6)

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se o intermediário 1 ou 2, um dos ácidos (bromo acético, 2-bromo-2-metilpropiónico, 2-cloropropionico) utilizando-se 15 mL de etanol como solvente. Foi utilizado agitação magnética em refluxo para a reação. As reações duravam em torno de 24 horas e eram acompanhadas por procedimento de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como fase móvel a mistura de hexano/acetato na proporção 7:3. As reações formavam precipitados que eram filtrados em funil sinterizado e guardados em dessecador.

As reações deram origem aos seguintes compostos:

- DA 1 - (Z)-2-(((E)-1-(piridin-3-il)etilideno)hidrazinoilideno)tiazolidin-4-ona
- DA 2 - (Z)-5,5-dimetil-2-(((E)-1-(piridin-3-il)etilideno)hidrazinoilideno)tiazolidin-4-ona
- DA 3 - (Z)-3-metil-2-(((E)-1-(piridin-3-il)etilideno)hidrazinoilideno)tiazolidin-4-ona
- DA 4 - (Z)-5-metil-2-(((E)-1-(piridin-3-il)etilideno)hidrazinoilideno)tiazolidin-4-ona
- DA 5 - (Z)-5-etil-2-(((E)-1-(piridin-3-il)etilideno)hidrazinoilideno)tiazolidin-4-ona
- DA 6 - (Z)-3,5,5-trimetil-2-(((E)-1-(piridin-3-il)etilidene)hidrazinoilidene)tiazolidin-4-ona

4.1.6 Caracterização Estrutural

A verificação da estrutura química das moléculas foi realizada por meio de análises espectroscópicas dos compostos finais (RMN ^{13}C e ^1H). Além disso, foram vistos o fator de retenção (RF) em CCD e o ponto de fusão (PF) destas moléculas (Tabela 3).

4.2 PARTE BIOLÓGICA

Os ensaios biológicos afim de verificar a atividade tripanocida e leishmanicida dos compostos DA1-6 foram realizados no Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, no laboratório da professora Dra. Valéria Pereira.

4.2.1 Ensaio de citotoxicidade anti-*T. cruzi*

Os compostos com atividade tripanocida foram testados contra as células L929 para determinação da citotoxicidade (Romanha *et al.*, 2010). A viabilidade das células submetidas aos tratamentos foi determinada utilizando-se o indicador de viabilidade celular alamarBlue™. As amostras foram testadas em concentrações crescentes a partir da IC₅₀ encontrada sobre o parasita, utilizando o mesmo número de células, tempo de desenvolvimento celular e tempo de exposição aos compostos usados no ensaio da beta-galactosidase. Após a adição do alamarBlue™, a placa foi incubada por 6 h e a leitura realizada a 570 e 600 nm. Os resultados foram expressos como a diferença na porcentagem de redução entre células tratadas (CT) e células não tratadas (CNT), através da seguinte equação:

$$\frac{(117,216) (Abs_{570} CT) - (80,586) (Abs_{600} CT)}{(117,216) (Abs_{570} CNT) - (80,586) (Abs_{600} CNT)} \times 100$$

4.2.2 Ensaio tripanocida

Foi utilizado o ensaio da beta-galactosidase desenvolvido por Buckner e colaboradores (1996), com modificações (Romanha *et al.*, 2010). Este ensaio utiliza a cepa Tulahuen de *T. cruzi* que expressa o gene da beta-galactosidase de *Escherichia coli*. Esta cepa foi construída e gentilmente cedida pelo Prof. Frederick Buckner, da Universidade de Washington. Resumidamente, para a realização dos ensaios, fibroblastos de camundongos da linhagem L929 foram semeados em placas de 96 poços e incubados por 24 horas a 37° C para a adesão e, infecção com 10 parasitas/célula. Após 2 h, o meio contendo os parasitas extracelulares foi substituído por meio novo e a placa novamente incubada a 37° C por 48 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio novo, além de compostos em

concentrações decrescentes, a partir de 100 µg/mL, até se chegar ao IC₅₀. Após 96 horas de incubação, foi adicionado o substrato CPRG, a placa incubada a 37°C, e a leitura realizada após 16-20 h em espectrofotômetro utilizando um filtro de 570 nm. O benzonidazol no seu IC₅₀ (1 µg/mL = 3,81 µM) foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição do crescimento parasitário.

4.1.3 Índice de seletividade

O Índice de Seletividade (IS) foi calculado dividindo-se a CC₅₀ dos compostos sobre as células L929 pela IC₅₀ encontrado sobre o *T. cruzi*. Somente compostos que apresentam IS ≥ 50 são recomendados a ensaios *in vivo* (Romanha *et al.*, 2010).

4.1.4 Ensaios com promastigotas de *L.infantum*

Formas promastigotas de *Linfantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263) foram mantidas a 26° C em meio Schneider's (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (meio completo). Parasitas na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos. Para o ensaio de atividade leishmanicida, os parasitas foram contados e diluídas em meio Schneider's (Sigma) completo a 1 x 10⁶ células/mL. Os parasitas foram incubados a 26°C na presença de diferentes concentrações dos compostos (1,5 a 200µg/mL) por 72h. Parasitas incubados apenas com meio de cultura e com o veículo foram utilizados como controle negativo. Após a incubação, os poços foram lavados e foi adicionada solução de CPRG (500 µM, 0,5% de Nonidet P-40, em PBS), seguida de nova incubação por 10 minutos, a 22°C. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A atividade leishmanicida dos compostos foi verificada pela diminuição no número de promastigotas nas culturas tratadas em comparação com a cultura controle sem tratamento. A Miltefosina foi utilizada como controle positivo. Os valores de IC₅₀ foram calculados por análise de regressão utilizando o software GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

4.1.5 Ensaios com amastigotas de *L. infantum*

Para esta avaliação, macrófagos RAW 264.7 (3×10^5 células/mL) foram incubados para aderência por 1h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Após essa incubação inicial foram acrescentadas promastigotas de *L. infantum* na proporção de 15 parasitas/ macrófago, por um período de 6h, a 37°C e 5% de CO₂. Os parasitas não internalizados foram removidos por lavagem e a cultura foi incubada novamente na presença de diferentes concentrações dos compostos (3,125 a 100 µg/mL) por 24h, a 37°C e 5% de CO₂. Amastigotas incubadas apenas com meio de cultura e com Miltefosina foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Após a incubação, os poços foram lavados e foi adicionada solução de CPRG (500µM, 0,5% de Nonidet P-40, em PBS), seguida de nova incubação por 18h, a 22°C. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A atividade leishmanicida dos compostos foi verificada pela diminuição no número de amastigotas intracelulares nas culturas tratadas em comparação com a cultura controle sem tratamento. Os valores de IC₅₀ foram calculados por análise de regressão utilizando o software GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

4.1.6 Ensaio de Citotoxicidade anti-*Leishmania*

A citotoxicidade em células de mamíferos foi avaliada através de ensaios com MTT. Esse ensaio baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Cristais de formazan são formados no interior dessas células, que deve ser lisadas para a solubilização e posterior análise por espectrofotometria. Uma vez que a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis, quanto maior for a viabilidade celular, maior será a proporção de redução do MTT e maior será a absorbância. Os fibroblastos da linhagem L929 foram soltos das garrafas de cultura e foram plaqueados em placas de 96 poços, fundo reto e incubadas por 24h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂, para aderência. Após esse tempo, os compostos foram adicionados nas concentrações de 6,25 a 200 µg/mL e incubados novamente por um período de 48h. Foram utilizados poços apenas com meio de cultura como controle negativo. Após a incubação foi acrescentado 25µL de MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il)

-2,5-brometo difenil tetrazólio) a 5mg/mL em PBS, seguida de uma nova incubação por 2h, a 37°C e ao abrigo da luz. Parte do meio de cultura juntamente com o restante de MTT foi aspirado e 100µL de DMSO foi adicionado por poço para solubilização dos cristais de formazan resultantes da redução do MTT. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A concentração citotóxica para 50% da cultura (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão pelo software GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

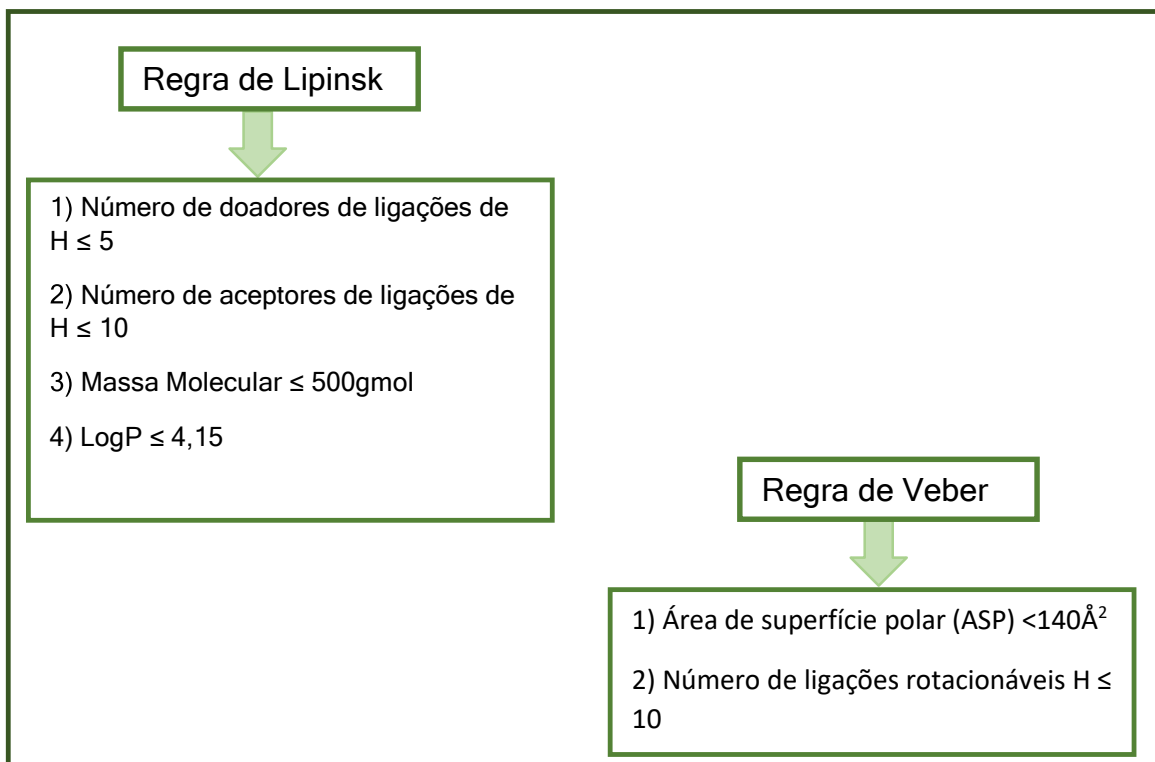
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÉRIE QUÍMICA

As estruturas dos 6 compostos planejados e sintetizados foram analisadas através da “Regra dos 5” de Lipinsk *et al.*, (1997), que aborda sobre técnicas experimentais e computacionais para realizar a estimativa da solubilidade e a permeabilidade das configurações de fármacos em processo de desenvolvimento. A “Regra dos 5” (Rule of 5) menciona que candidatos bioativos devem apresentar quatro aspectos físico-químicos que são observados em fármacos ativos por via oral já existentes. Outras especificações observadas nos compostos foram os parâmetros de Veber *et al.*, (2002), que usou como referência complementar a Área de Superfície Polar (ASP) e o número de Ligações Rotáveis, para estudar a absorção oral desses mesmos fármacos.

A **Figura 16** mostra os parâmetros propostos por Lipinsk e Veber para os fármacos, e a **Tabela 1** revela os dados dos compostos planejados aplicados a esses parâmetros.

Figura 16. Parâmetros propostos por Lipinski *et al.*, (1997) e Veber *et al.*, (2002).



Fonte: O autor.

Tabela 1. Análise dos critérios da regra de Lipinsk e Veber obtidos no SwissADME (<http://swissadme.ch/>).

Composto	H _A ≤10	H _D ≤5	MLogP ≤4,15	Massa ≤500 g/mol	Ligações Rotáveis ≤10	ASP ≤140Å ²
DA-1	4	1	0.64	234.28	2	92.01
DA-2	4	1	0.96	262.33	2	78,41
DA-3	4	0	0.27	248.30	2	83.22
DA-4	4	1	0.27	248.30	2	65,82
DA-5	4	1	1.42	262.33	3	92.01
DA-6	4	0	1.49	276.36	2	83.22

Legenda: HA (aceptores de ligação de hidrogênio), HD (doadores de ligação de hidrogênio) e ASP (área de superfície polar).

Como visto na tabela acima, é possível verificar que nenhum dos seis compostos infringiram as leis propostas por Lipinsk e Veber, Já que, todos os seis compostos apresentam valores dentro dos parâmetros propostos dentro da normalidade.

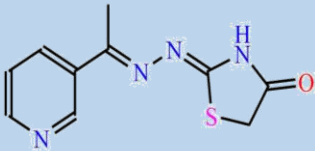
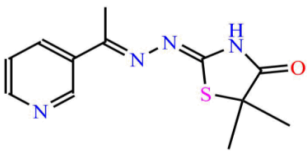
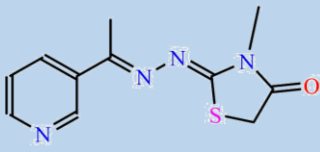
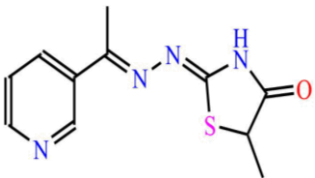
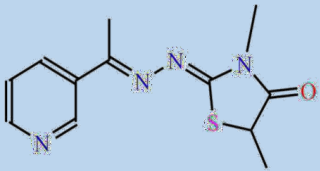
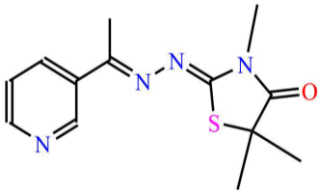
A **tabela 2** demonstra informações sobre a absorção gastrointestinal, que é a capacidade do fármaco ser absorvido pelo trato gastrointestinal. Além disso é possível analisar a barreira hematoencefálica (BHE), que é uma membrana permeável seletiva que regula a passagem de grandes e pequenas moléculas para o microambiente dos neurônios. Neste sentido, é possível analisar através da tabela se o composto passa ou não pela BHE.

Tabela 2. Propriedades ADME obtidos no SwissADME (<http://swissadme.ch/>)

Composto	Absorção gastrointestinal	Barreira hematoencefálica	Biodisponibilidade
DA-1	Alta	Não passa	0,55
DA-2	Alta	Não passa	0,55
DA-3	Alta	Passa	0,55
DA-4	Alta	Passa	0,55
DA-5	Alta	Não passa	0,55
DA-6	Alta	Não passa	0,55

Na **tabela 3**, estão as características gerais dos compostos sintetizados da série DA 3-7,9, estrutura molecular, código, rendimento, massa molar, ponto de fusão e fator de retenção podem ser observados.

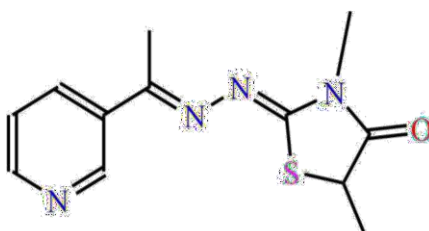
Tabela 3. Características gerais dos compostos finais e rendimento das reações.

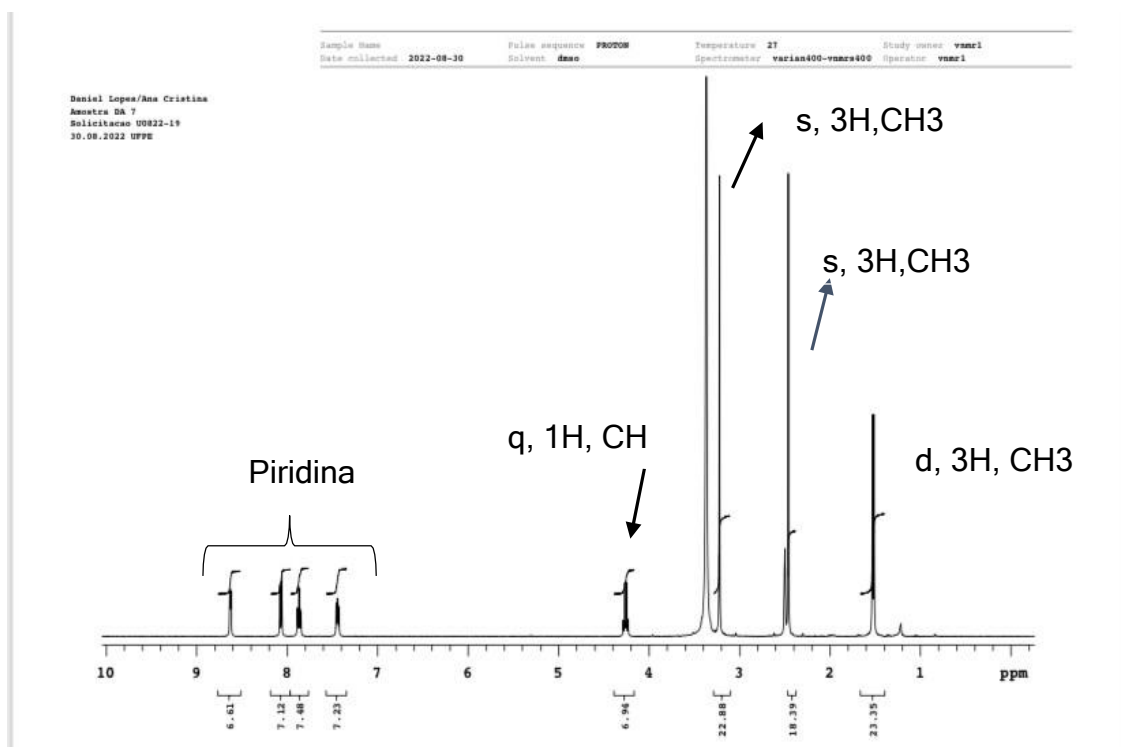
Estrutura Molecular	Referência	Rendimento	Massa	Ponto de Fusão	RF
	DA-1	58%	234.28	222°C	0,68
	DA-2	65%	262.33	218°C	0,75
	DA-3	71%	248.30	219°C	0,70
	DA-4	75%	248.30	217°C	0,73
	DA-5	61%	262.33	223°C	0,72
	DA-6	58%	276.36	218°C	0,69

A estrutura química das moléculas foi confirmada por dados espectroscópicos obtidos. A caracterização estrutural de todos os compostos foi realizada na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE. Esses comprovam a formação dos produtos planejados, de acordo com os espectros demonstrados abaixo, que mostra o processo de caracterização por RMN ^1H e RMN ^{13}C .

A **Figura 17** exemplifica o espectro de RMN ^1H do composto DA-5. É possível analisar a presença de um quadrupletto em 4.25 ppm integrando para um hidrogênio correspondente ao hidrogênio do anel 4-tiazolidinona este ratifica a ciclização e formação do anel tiazolidinona (S-CH_2). Os quatro hidrogênios do anel heterocíclico piridina foram confirmados pela presença de um singletto, dois dubletos e um triplete entre 7.4 e 8.8 ppm. Em 2.45, observa-se um singletto que integra para três hidrogênios, correspondendo aos 3 hidrogênios do grupo metila exocíclico ($\text{C}(\text{CH}_3)=\text{N}$). Em 3.20ppm, observa-se os 3 hidrogênios do grupo metila conectado ao N do anel heterocíclico. Já os três hidrogênios metila do C-5 do anel tiazolidinona, aparecem em 1.45pp na forma de dupletto.

Figura 17. Espectro de RMN ^1H para o composto **DA-5**.

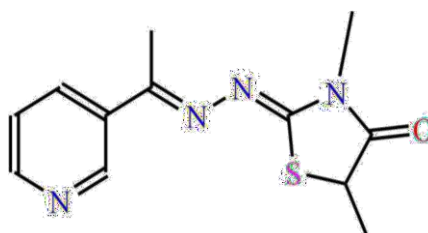


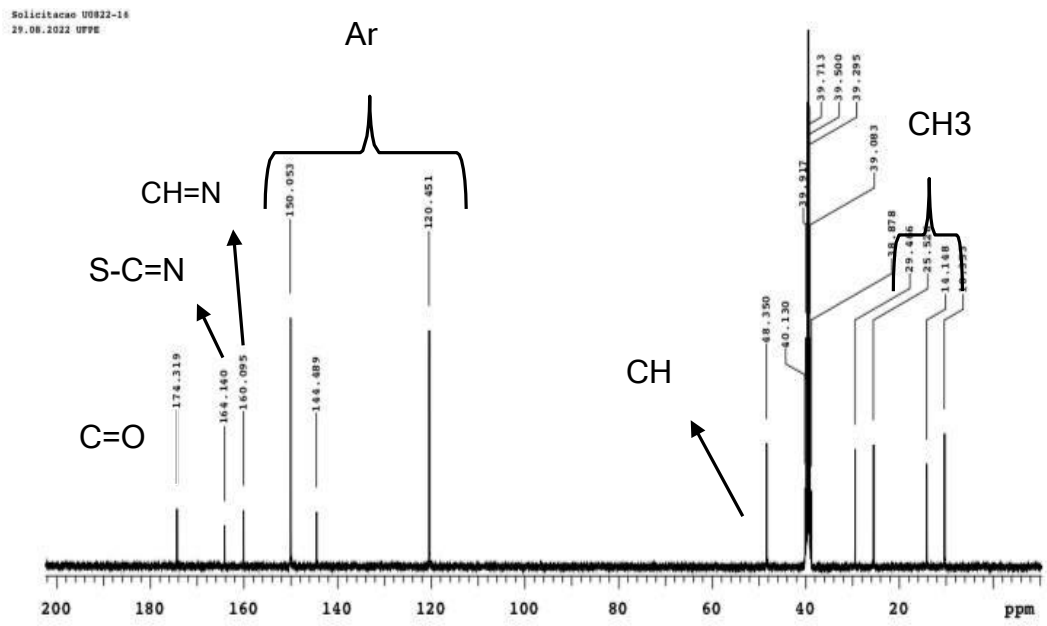


Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura **Figura 18** exemplifica o espectro de C^{13} do composto DA-5. A partir desta figura podemos identificar em 14.148, 25.526 e 29.466 ppm é possível identificar as metilas (CH₃) da estrutura. O sinal em 48.350 ppm, corresponde ao carbono C5 do anel 4-tiazolinona. Os sinais entre 120.451 ppm a 150.053 ppm correspondem aos carbonos (CH) do anel piridina. Observa-se em 160.095 ppm corresponde ao carbono do (CH=N exocíclico). O sinal em 164.140 ppm, corresponde ao carbono da ligação S-C=N do anel tiazolinona. O sinal em 174.319 ppm corresponde ao carbono da carbonila (C=O).

Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C para o composto DA-5.

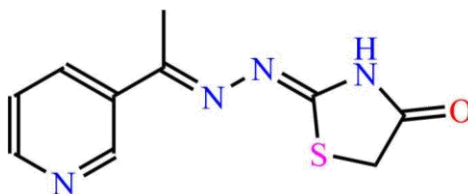




Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.1 Dados Espectroscópicos

(Z)-2-(((E)-1-(piridin-3-il)etilideno)hidrazinoilideno)tiazolidin-4-ona (DA-1)



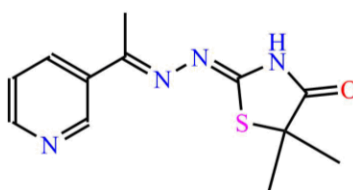
Fórmula molecular: C₁₀H₁₀N₄OS

Massa molar: 234,28

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ ppm: 3.435 (s, 3H, CH₃), 4.578 (s, 2H, CH₂), 7.279- (t, 1H, Ar), 7.733 (d, 1H, Ar), 8.051 (s, 1H, Ar), 8.518 (d, 1H, Ar).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ ppm: 13.936 (CH₃), 31.272 (CH₂), 75.144 (CH-Ar), 119.684 (CH-Ar), 122.826 (CH-Ar), 135.867 (CH-Ar), 148.391 (CH=N), 156.801 (S-C=N), 173.765 (C=O).

(Z)-5,5-dimetil-2-(((E)-1-(piridin-3-il)etilideno)hidrazinoilideno)tiazolidin-4-ona (DA-2)

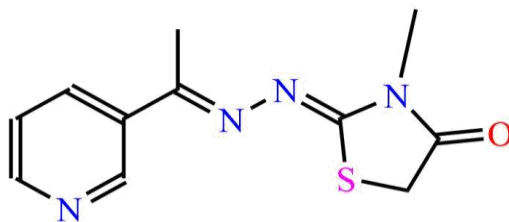


Fórmula molecular: C₁₂H₁₄N₄OS

Massa molar: 262,33

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ ppm: 1.76 (s, 6H, CH₃), 2.26 (s, 3H, CH₃), 3. 4.61 (m, 1H, CH₂), 7.27 (d, 1H, Ar), 7.773 (t, 1H, Ar), 8.09 (d, 1H, Ar), 8.564 (s, 1H, Ar).

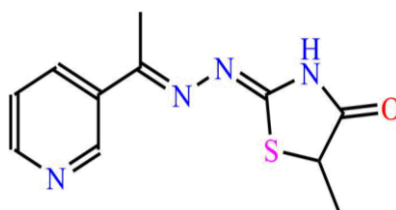
RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ ppm: 12.949 (CH₃), 14.148 (CH₃), 148.350 (C, Ar), 120.451 (CH, Ar), 144.489 (CH, Ar), 160.095 (CH=N), 174.319 (S-C=N), 178.923 (C=O).

(Z)-3-metil-2-(((E)-1-(piridin-3-il)etilideno)hidrazinoilideno)tiazolidin-4-ona (DA-3)Fórmula molecular: C₁₁H₁₂N₄OS

Massa molar: 248,30

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ ppm: 2.472 (s, 3H, CH₃), 3.231 (s, 3H, CH₃), 4.25 (s, 2H, CH₂), 7.434 (d, 1H, Ar), 7.873 (t, 1H, Ar), 8.28 (d, 1H, Ar), 8.88(s, 1H, Ar).

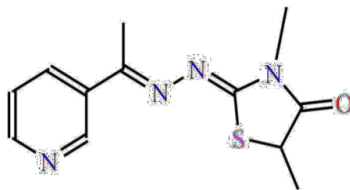
RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ ppm: 13.511 (CH₃), 32.077 (CH₃), 40.130 (CH₂), 47.052 (S-C=N) 120.458 (C=N), 124.580 (CH=N), 136.572 (CH, Ar), 148.831 (CH, Ar), 154.994 (CH, Ar), 163.260 (C, Ar), 174.471(C=O).

(Z)-5-metil-2-(((E)-1-(piridin-3-il)etilideno)hidrazinoilideno)tiazolidin-4-ona (DA-4)Fórmula molecular: C₁₁H₁₂N₄OS

Massa molar: 248,30

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ ppm: 2.65 (s, 3H, CH₃), 3.26 (s, 3H, CH₃), 4.289 (q, 1H, CH₂), 7.866 (t, 1H, Ar), 7.86 (t, 1H, Ar), 8.028 (d, 1H, Ar), 8.88 (s, 1H, Ar).

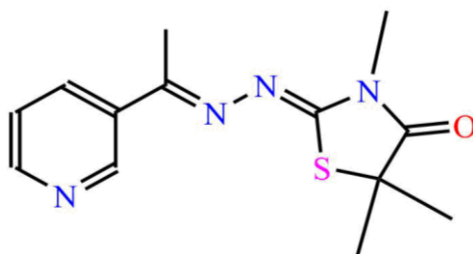
RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ ppm: 14.490 (CH₃), 29.800 (CH₃), 51.136 (S-C=N), 125.832 (C=N), 135.176 (CH, Ar), 139.343 (CH, Ar), 142.705 (CH, Ar), 158.357 (CH=N), 163.268 (S-C=N), 177.628(C=O).

(Z)-5-etil-2-(((E)-1-(piridin-3-il)etilideno)hidrazinoilideno)tiazolidin-4-ona (DA-5)Fórmula molecular: C₁₂H₁₄N₄OS

Massa molar: 232,33

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ ppm: 1.514 (d, 3H, CH₃), 2.462 (s, 3H, CH₃), 3.222 (s, 3H, CH₃), 4.25 (S-CH₂), 7.429 (d, 1H, CH), 7.89 (t, 1H, Ar), 8.060 (d, 1H, Ar), 8.61 (s, 1H, Ar).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ ppm: 14.148 (CH₃), 25.526 (CH₃), 129.466 (CH₃). 48.350 (C5), 120.451 (CH, Ar), 136.588 (CH, Ar), 150.053 (CH, Ar), 160.095 (CH=N), 164.140 (S-C=N), 174.319 (C=O).

(Z)-3,5,5-trimetil-2-(((E)-1-(piridin-3-il)etilidene)hidrazinoilidene)tiazolidin-4-ona (DA-6)Fórmula molecular: C₁₃H₁₆N₄OS

Massa molar: 276,33

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ ppm: RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz), δ ppm: 1.514 (s, 6H, CH₃), 2.462 (s, 3H, CH₃), 3.222 (s, 3H, CH₃), 7.829 (t, 1H, CH), 8.61 (d, 1H, Ar), 8.60 (d, 1H, Ar), 9.01 (s, 1H, Ar).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75MHz) δ ppm: 13.511 (CH₃), 18.703 (CH₃), 120.405 (C=N), 124.595 (CH, Ar), 136.588 (CH, Ar), 148.854 (CH, Ar), 162.691 (CH=N), 163.313 (S-C=N), 175.268 (C=O).

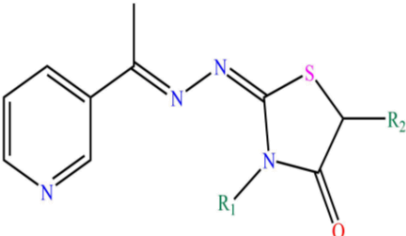
5.2 PARTE BIOLÓGICA

5.2.1 Ensaio *in vitro* para *T. cruzi*

Os compostos da série DA1-6 foram avaliados quanto à atividade de inibição frente ao *T. cruzi*, contra as formas amastigotas e tripomastigotas do parasita. O método que foi empregado é recomendado pelas diretrizes da Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi) que sugere o uso simultâneo de formas amastigotas tripomastigotas intracelulares que estão presentes tanto na fase aguda quanto na crônica da doença (ANDRADE et al., 2022).

Estão dispostos na tabela 4, os resultados dos testes da série DA, com atividade anti-*T. cruzi*, como a citotoxicidade, IC₅₀ e índice de seletividade.

Tabela 4. Resultados obtidos para atividade anti-*T. cruzi* da série piridil-4-tiazolidinonas.

Código	R ₁	R ₂	Citotoxicidade (CC ₅₀) µM	IC ₅₀ µM	IS
					
DA-1	H	H	408,5	294,9	4,3
DA-2	H	(CH ₃) ₂	373,2	201,3	1,9
DA-3	CH ₃	H	393,5	INATIVO	ND
DA-4	H	CH ₃	356,0	302,1	1,2
DA-5	H	CH ₂ CH ₃	294,8	278,9	1,1
DA-6	CH ₃	(CH ₃) ₂	259,5	42,7	6,1
BZD	-	-	2.381	3,81	624,9

CC₅₀= Concentração citotóxica para 50% das células.

IC₅₀= Concentração inibitória para 50% da população.

IS= Índice de seletividade.

BZD = Benznidazol.

ND= Não determinado.

A partir da **Tabela 4**, podemos observar que a atividade anti-*T. cruzi* de todos as 4-tiazolidinonas apresentaram uma IC₅₀ maior que o Benznidazol, o fármaco de referência utilizado no teste.

Os compostos da série piridil-4-tiazolidinona foram avaliados quanto à toxicidade frente a macrófagos da linhagem L929. Como pode ser observado, todos os compostos apresentaram valores de toxicidade em células normais maiores que 200 μM frente as células testadas. Com destaque para os compostos DA-1 com valor de 408,5 μM .

Em relação ao índice de seletividade, nenhum composto apresentou valores próximos do que foi observado no BZN.

A possibilidade de incremento na atividade tripanocida do compostos DA-6 (42,7 μM) pode ser realizada através da melhora na lipofilia, e principalmente, através de modificações estruturais conforme Oliveira Filho *et al.*, (2015).

A literatura evidencia que pesquisas relacionadas a síntese e investigação tripanocida de compostos tiazolidinonas são frequentes (HAVRYLYUK *et al.*, 2014; HOLOTA *et al.*, 2019; DE OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2021). Esses achados contribuem coma ideia de que pesquisas que envolvem desenvolvimento de novos protótipos a fármacos são importantes, já que atualmente o arsenal quimioterápico para doença de Chagas é considerado limitado (THAKARE, 2021).

Shepeta e colaboradores (2020) sintetizaram nova série de derivados [2-(2,6-diclorofenilamino)-fenil]-ácido acético N`-3-(substituído)-4-tiazolidina-5-ilidenemetil-hidrazida. Quantos seus resultados para o *T. cruzi*, os compostos 3.2 e 3.4 apresentavam resultados significativos quanto a seu índice de inibição parasitário, com concentrações em valores de IC_{50} de 4.8 e 7.06 μM , respectivamente.

Em um recente estudo, Da Conceição e seus colaboradores (2023) investigaram o potencial tripanocida de 18 inéditos compostos derivados piridil-4-tiazolidinonas. É perceptível analisar que semelhanças estruturais podem ser identificadas entre os compostos da série mencionada com os compostos DA 1-6. Em resumo, das 18 piridina-tiazolidinonas, 5 foram capazes de inibir as tripomastigotas, além disso, para a forma amastigota, todos os compostos tiveram potencial deinibição, com destaque para os compostos 15 (0,60 μM), 17 (0,81 μM), 18 (0,64 μM). Os compostos 15 e 18 foram capazes de induzir a morte de células parasitárias através da indução de necrose.

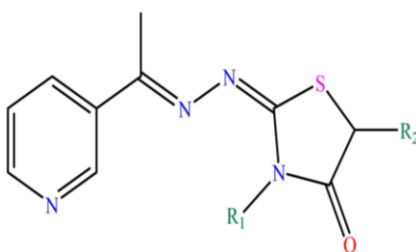
5.2.2 Ensaio *in vitro* para *Leishmania*

A capacidade de inibição do parasita *L. infantum* foi realizada através de testes *in vitro*. As formas evolutivas promastigotas e amastigotas foram utilizadas no experimento. Além disso, foi feito a determinação dos valores da concentração citotóxica (CC₅₀) em macrófagos RAW e o índice de seletividade (IS).

Os valores obtidos em teste de atividade para as formas promastigotas e amastigotas da *Leishmania*, como a citotoxicidade, IC₅₀ e índice de seletividade, dos compostos sintetizados, estão dispostos na **Tabela 5**.

Tabela 5. Resultados obtidos para atividade leishmanicida da série piridil-4-tiazolidinona.

Código	Citotoxicidade (CC ₅₀) µM	IC ₅₀ sobre Promastigotas µM	IC ₅₀ sobre Amastigotas µM	IS Promastigotas	IS Amastigotas
--------	---------------------------------------	---	---------------------------------------	------------------	----------------



DA-1	206,2	INATIVO	91,3	ND	4,3
DA-2	156,7	INATIVO	45,4	ND	3,5
DA-3	202,6	402,7	102,3	0,5	2,0
DA-4	402,7	INATIVO	25,8	ND	15,6
DA-5	190,2	INATIVO	21,7	ND	8,8
DA-6	187,1	361,8	16,6	0,5	11,2
MTF	60,9	17,2	1,7	3,5	39,3

CC₅₀= Concentração citotóxica para 50% das células.

IC₅₀= Concentração inibitória para 50% da população.

IS= Índice de seletividade.

MTF= Miltefosina.

ND= Não determinado.

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 5**, é possível verificar que entre os compostos testados frente à forma promastigota e amastigota da *L. infantum*, nenhum se apresentou mais ativo que a Miltefosina, que foi utilizado como referência neste experimento.

Quanto à toxicidade frente a fibroblastos da linhagem RAW 264.7, é possível notar que todos os compostos se destacaram, evidenciando menor citotoxicidade frente às células testadas. Com destaque para DA-4 com valor de citotoxicidade 402,7 μ M.

Em relação ao índice de seletividade, o composto DA-4 (15,6 μ M), foi o que apresentou o seu valor mais próximo do IS do fármaco usado como referência, a miltefosina (39,3 μ M).

Ainda sobre o estudo de investigação de Da Conceição e colaboradores (2023), além dos testes tripanocidas para as 18 inéditas piridil-tiazolidinonas, o potencial leishmanicida foi igualmente proposto. A avaliação antiparasitária realizada contra *L. amazonensis*, apenas o composto 27 tinha uma maior seletividade em comparação com miltefosina, que foi utilizada como referência no experimento, contra a forma de amastigota (IC₅₀ = 5,70 μ M).

6. CONCLUSÕES

Seis compostos inéditos derivados da série piridil-4-tiazolidinonas foram obtidos, com a comprovação estrutural feita através de ressonância magnética nuclear. Os compostos submetidos à investigação do seu potencial anti-proliferativa *in vitro* frente as formas promastigota e amastigota de *L. infantum* e a forma tripomastigota do *T. cruzi*, com determinação da concentração inibitória para 50% (IC₅₀). Também foi determinada a citotoxicidade celular frente à linhagens de células de mamíferos no intuito de determinar o índice de seletividade (SI) em comparação com o fármaco de referência, o Benzonidazol.

Em relação ao teste tripanocida, foi possível observar que nenhum composto apresentou IC₅₀ superior ao do fármaco usado como referência no teste. Quanto a sua citotoxicidade, todos os compostos apresentaram um valor superior a 200 µM frente as células testadas, com destaque para o composto DA-1 com valor de 408,5 µM.

O teste leishmanicida evidenciou que nenhum composto foi mais ativo que a miltefosina. Para os melhores resultados da citotoxicidade, quando comparados a Miltefosina, o mais eficaz foi o composto DA-4 com valor de citotoxicidade igual a 402,7µM. Sobre o IS, o composto DA-4 apresentou um valor de 15,6 µM para forma amastigota do parasita.

REFERÊNCIAS

- ABUD, Thiago Giansante et al. Radiological findings in megaesophagus secondary to Chagas disease: chest X-ray and esophagogram. **Radiologia Brasileira**, v. 49, p. 358-362, 2016.
- ABRAS, Alba et al. Serological diagnosis of chronic Chagas disease: is it time for a change?. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1566-1572, 2016.
- ANDRADE, J. S. et al. Trypanocidal activity of chromenepyrazole derivatives. **Chemical Papers**, p. 1-11, 2022.
- AFONSO, Anna M.; EBELL, Mark H.; TARLETON, Rick L. A systematic review of high quality diagnostic tests for Chagas disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 11, p. e1881, 2012.
- AL-SAID, Mansour S. et al. Anti-breast cancer activity of some novel 1, 2-dihydropyridine, thiophene and thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 137-141, 2011.
- ALTAF, Ataf Ali et al. A review on the medicinal importance of pyridine derivatives. **J. Drug Des. Med. Chem**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2015.
- ARAUJO, Perla F. et al. Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, p. 437-446, 2017.
- BALOUZ, Virginia; AGÜERO, Fernán; BUSCAGLIA, Carlos A. Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. **Advances in parasitology**, v. 97, p. 1-45, 2017.
- BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. **Química Medicinal:- As bases moleculares da ação dos fármacos**. Artmed Editora, 2014.
- BATES, P. A. et al. New insights into the development biology and transmission mechanisms of Leishmania. **Curr Mol Med.**, v. 4, p. 601-609, 2004.
- BENÇA. Intérprete: Juliette Freire. Compositor: Dann Costara, Juzé. In: EP Juliette. São Paulo: Universal Music, 2021. 1 CD, faixa 1.
- BERN, Caryn. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456-466, 2015.
- BHATIA, M. S. et al. Synthesis and QSAR analysis of 5-substituted (arylmethylene) pyridin-2-amine derivatives as potential antibacterials. **International journal of drug discovery**, v. 1, n. 1, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância e Saúde. **Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013**; Boletim Epidemiológico, vol 46, nº 21, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância e Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. [s.l.: s.n.]. 2.^a ed. Atualizada, 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle de Chagas. **DOENÇA DE CHAGAS AGUDA. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Guia de consulta rápida para profissionais de saúde**. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/iptsp/article/download>. Acessado em: 29 jul. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde; **Doença de Chagas: o que é, causas, sintomas, tratamento e prevenção**. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas#situacao>. Acessado em: 05 ago. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Recomendações sobre o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da doença de Chagas aguda e crônica. **Rev Patol Trop**. 2013 out-dez;42(4):475-8.

BRASIL, Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico – Doença de Chagas**. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_chagas_14abr21_b.pdf. Acesso em: 08 jul. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde; **Leishmaniose**. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2021/10/saiba-quais-sao-os-tipos-os-sintomas-e-a-transmissao-das-leishmanioses-em-humanos>. Acesso em: 25 fev. 2022.

BENCHIMOL, Jaime Larry et al. Leishmanioses: sua configuração histórica no Brasil com ênfase na doença visceral nos anos 1930 a 1960. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 14, p. 611-626, 2019.

BRENER, Zigman. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 347-382, 1973.

BUCKNER, Frederick S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592-2597, 1996.

CALDAS, Ivo S.; SANTOS, Elda G.; NOVAES, Rômulo D. An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 20, n. 15, p. 1797-1807, 2019.

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

CARDOSO, Marcos Veríssimo de Oliveira. Síntese e avaliação da atividade antichagásica de novas hidrazonas. 2012.

CHANDA, Kaushik et al. An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases–Leishmaniasis and Chagas Diseases. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 37, 2021.

CAPUTTO, María E. et al. Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-Trypanosoma cruzi agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 22, p. 6818-6826, 2011.

CHAUBEY, Ajit; PANDEYA, S. N. Pyridine a versatile nucleuse in pharmaceutical field. **Asian J. Pharm. Clin. Res**, v. 4, n. 4, p. 5-8, 2011.

CHATELAIN, Eric. Chagas disease drug discovery: toward a new era. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 22-35, 2015.

CHATELAIN, Eric; SCANDALE, Ivan. Animal models of Chagas disease and their translational value to drug development. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 15, n. 12, p. 1381-1402, 2020.

CHAO, Chen; LEONE, José L.; VIGLIANO, Carlos A. Chagas disease: Historic perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 5, p. 165689, 2020.

CHIARI, Egler et al. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, n. 1, p. 19-23, 1989.

CHUIT, Roberto; MEISS, Roberto; SALVATELLA, Roberto. Epidemiology of Chagas disease. In: **Chagas Disease**. Springer, Cham, 2019. p. 91-109.

ÇIKLA-SÜZGÜN, P.; KÜÇÜKGÜZEL, Ş. G. Recent Progress on Apoptotic Activity of Triazoles. **Current Drug Targets**, v. 22, n. 16, p. 1844-1900, 2021.

COSTA, Renato A. et al. Studies of NMR, molecular docking, and molecular dynamics simulation of new promising inhibitors of cruzaine from the parasite Trypanosoma cruzi. **Medicinal Chemistry Research**, v. 28, n. 3, p. 246-259, 2019.

COSTANTINO, Luca; BARLOCCO, Daniela. Privileged structures as leads in medicinal chemistry. **Current medicinal chemistry**, v. 13, n. 1, p. 65-85, 2006.

COURA, José Rodrigues. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 277-282, 2014.

DA CONCEIÇÃO, Juliana Maria et al. Structural design, synthesis, and anti-Trypanosomatidae profile of new Pyridyl-thiazolidinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 115310, 2023.

DA SILVA, Elany Barbosa et al. Design and synthesis of potent anti-Trypanosoma cruzi agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. **European journal of medicinal chemistry**, v. 130, p. 39-50, 2017.

DA SILVA-JUNIOR, Edeildo F. et al. Molecular docking studies applied to a dataset of cruzain inhibitors. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 14, n. 1, p. 68-78, 2018.

DA SILVA LIMA, Camilo H. et al. Anti-Trypanosoma cruzi activity and molecular docking studies of 1H-pyrazolo [3, 4-b] pyridine derivatives. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 17, n. 2, p. 184-191, 2020.

DE OLIVEIRA, Jamerson Ferreira et al. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. **European journal of medicinal chemistry**, v. 104, p. 148-156, 2015.

DE OLIVEIRA, Ana Beatriz Bortolozo et al. Parasite-vector interaction of chagas disease: a mini-review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 653, 2018.

DE OLIVEIRA FILHO, Gevanio Bezerra et al. Structural design, synthesis and anti-Trypanosoma cruzi profile of the second generation of 4-thiazolidinones chlorine derivatives. **Chemico-Biological Interactions**, v. 345, p. 109514, 2021.

DESIMONE, R. W. et al. Privileged structures: applications in drug discovery. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 7, n. 5, p. 473-493, 2004.

DEVENS, Bruna Alves. Leishmaniose: histórico, etiologia, epidemiologia, sinais clínicos, diagnóstico e controle. **PUBVET**, v. 2, p. Art. 159-186, 2022.

DIAS, Luiza RS et al. Synthesis, in vitro evaluation, and SAR studies of a potential antichagasic 1H-pyrazolo [3, 4-b] pyridine series. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 1, p. 211-219, 2007.

DIAS, Nikolas Lisboa Coda; FACCINI-MARTÍNEZ, Álvaro A.; OLIVEIRA, Stefan Vilges de. Analysis of hospitalizations and mortality from febrile, infectious, and parasitic diseases during the COVID-19 pandemic in Brazil. In: **Analysis of hospitalizations and mortality from febrile, infectious, and parasitic diseases during the COVID-19 pandemic in Brazil**. 2020.

DNDi – Drugs for Neglected Diseases Initiative. **Sintomas, transmissão e tratamentos atuais para a doença de Chagas**. Disponível em: <https://dndi.org/diseases/chagas/facts/>; Acesso em: 25 jul. 2022.

DNDi – Drugs for Neglected Diseases Initiative. Disponível em: <https://www.dndi.org/doencas/leishmanioses/tratamentos-atuais-leish/>. Acesso em: 25 jul. 2022.

DINIZ, Denise Scofano et al. COVID-19 and Neglected Diseases in the face of inequalities in Brazil: a matter of sustainable development. **Saúde em Debate**, v. 45, p. 43-55, 2022.

ECHEVERRIA, Luis E.; MORILLO, Carlos A. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 1, p. 119-134, 2019.

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.

FIOCRUZ - **Doenças Negligenciadas**. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>. Acesso em: 27 ago. 2022.

FIOCRUZ - **Doença de Chagas**. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>. Acesso em: 10 ago. 2022.

FIOCRUZ - **Ciclo evolutivo**. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/ciclo-evolutivo/>. Acesso em: 25 jul. 2022.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz; **Leishmaniose**; Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/taxonomia-geral-7-doencas-relacionadas/leishmaniose-0#:~:text=As%20leishmanioses%20s%C3%A3o%20um%20conjunto,%2C%20que%20ataca%20%C3%B3rg%C3%A3os%20internos>. Acesso em: 25 dez. 2022.

GOMES, Paulo André Teixeira de Moraes. Síntese e Avaliação da Atividade Anti-Trypanosoma cruzi de Inéditas Tiazolil-Hidrazonas. 2012. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco.

HARNETT, Jeremiah J. et al. Phenolic thiazoles as novel orally-active neuroprotective agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 14, n. 1, p. 157-160, 2004.

HAROUN, M. et al. Discovery of benzothiazole-based thiazolidinones as potential anti-inflammatory agents: Anti-inflammatory activity, soybean lipoxygenase inhibition effect and molecular docking studies. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 33, n. 6, p. 485-497, 2022.

HAVRYLYUK, Dmytro et al. Synthesis of pyrazoline-thiazolidinone hybrids with trypanocidal activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 245-254, 2014.

HELAL, M. H. M. et al. Synthesis and biological evaluation of some novel thiazole compounds as potential anti-inflammatory agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 65, p. 517-526, 2013.

HOLOTA, Serhii et al. Synthesis of 5-enamine-4-thiazolidinone derivatives with trypanocidal and anticancer activity. **Bioorganic chemistry**, v. 86, p. 126-136, 2019.

KAYE, P. *et al.* Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 9, p. 604-615, 2011.

KRATZ, Jadel Müller. Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. **Acta tropica**, v. 198, p. 105107, 2019.

LAAMARI, Yassine *et al.* Design, hemisynthesis, crystal structure and anticancer activity of 1, 2, 3-triazoles derivatives of totarol. **Bioorganic Chemistry**, v. 115, p. 105165, 2021.

LEITE, Ana Cristina Lima *et al.* Privileged structures in the design of potential drug candidates for neglected diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 23, p. 4323-4354, 2019.

LESSA, Josane A. *et al.* Antimony (III) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones: structural studies and investigation on the antitrypanosomal activity. **Polyhedron**, v. 30, n. 2, p. 372-380, 2011.

LIDANI, Kárita Cláudia Freitas *et al.* Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. **Frontiers in public health**, v. 7, p. 166, 2019.

LIPINSKI, C. A. *et al.*; Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.23, p.3-25, 1997.

LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio; NORMAN, Francesca F.; BERN, Caryn. American trypanosomiasis (Chagas disease). In: Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases. **Elsevier**, 2020. p. 762-775.

LUQUETTI, Alejandro O.; SCHMUÑIS, Gabriel A. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. In: **American Trypanosomiasis**. Elsevier, 2010. p. 743-792.

MARCHAND, Pascal *et al.* Synthesis, antileishmanial activity and cytotoxicity of 2, 3-diaryl-and 2, 3, 8-trisubstituted imidazo [1, 2-a] pyrazines. **European journal of medicinal chemistry**, v. 103, p. 381-395, 2015.

MILLERIOUX, Yoann *et al.* De novo biosynthesis of sterols and fatty acids in the *Trypanosoma brucei* procyclic form: Carbon source preferences and metabolic flux redistributions. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 5, p. e1007116, 2018.

MISHRA, Chandra Bhushan; KUMARI, Shikha; TIWARI, Manisha. Thiazole: A promising heterocycle for the development of potent CNS active agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 92, p. 1-34, 2015.

MOORKOTH, Sudheer. Synthesis and anti-cancer activity of novel thiazolidinone analogs of 6-aminoflavone. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, p. c15-00454, 2015.

MORETTI, Nilmar Silvio; MORTARA, Renato Arruda; SCHENKMAN, Sergio. *Trypanosoma cruzi*. **Trends Parasitol**, v. 36, n. 4, p. 404-5, 2020.

MÜLLER KRATZ, Jadel et al. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943-957, 2018.

NEPALI, Kunal et al. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. **European journal of medicinal chemistry**, v. 77, p. 422-487, 2014.

OLIVEIRA, Johny Wysllyas de Freitas et al. Application of dithiocarbamates as potential new antitrypanosomatids-drugs: Approach chemistry, functional and biological. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2806, 2019.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde; **Doença de Chagas**. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>; Acesso em: 15 jul. 2022.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde; **Informe Epidemiológico das Américas**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/documentos/leishmanioses-informe-epidemiologico-das-americas-dezembro-2020>; Acesso em: 10 ago. 2022.

OMS – Organização Mundial da Saúde; **Leishmaniose**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_2; Acesso em: 25 dez. 2022.

ÖZDEMİR, Ahmet et al. Synthesis and the selective antifungal activity of 5, 6, 7, 8-tetrahydroimidazo [1, 2-a] pyridine derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 5, p. 2080-2084, 2010.

PALEKAR, Vikrant S.; DAMLE, Amey J.; SHUKLA, S. R. Synthesis and antibacterial activity of some novel bis-1, 2, 4-triazolo [3, 4-b]-1, 3, 4-thiadiazoles and bis-4-thiazolidinone derivatives from terephthalic dihydrazide. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 12, p. 5112-5116, 2009.

PENADOS, Daniel et al. Assessing risk of vector transmission of Chagas disease through blood source analysis using LC-MS/MS for hemoglobin sequence identification. **PloS one**, v. 17, n. 1, p. e0262552, 2022.

PEREIRA, Karen Signori et al. Transmission of Chagas disease (American trypanosomiasis) by food. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 59, p. 63-85, 2010.

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

RAMACHANDRAN, S.; CHERIYAN, Binoy Varghese; AANANDHI, M. Vijey. Activities of thiazolidine-4-one and azetidine-2-one derivatives-a review. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 14, n. 8, p. 4513-4516, 2021.

RIBEIRO, Vanessa et al. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 12, p. 7-17, 2020.

RIBEIRO, Joana LS et al. Trypanocidal activity of new 1, 6-diphenyl-1H-pyrazolo [3, 4-b] pyridine derivatives: Synthesis, in vitro and in vivo studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 29, p. 115855, 2021.

ROCHITTE, Carlos Eduardo et al. Cardiac magnetic resonance in Chagas'disease. **Artificial organs**, v. 31, n. 4, p. 259-267, 2007.

ROMANHA, Alvaro José et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 233-238, 2010.

SANAD, Sherif MH; AHMED, Ahmed AM; MEKKY, Ahmed EM. Synthesis, in-vitro and in-silico study of novel thiazoles as potent antibacterial agents and MurB inhibitors. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 4, p. 1900309, 2020.

SANTIAGO, Edna de Farias et al. Evaluation of the anti-Schistosoma mansoni activity of thiosemicarbazones and thiazoles. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 352-363, 2014.

SANTOS, Emily F. et al. Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008445, 2020.

SANTOS, Soraya Silva et al. Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. **International journal of antimicrobial agents**, v. 55, n. 4, p. 105906, 2020.

SCARIM, Caue Benito et al. Current advances in drug discovery for Chagas disease. **European journal of medicinal chemistry**, v. 155, p. 824-838, 2018.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida; CARVALHO, Noemia Barbosa. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845-852, 2012.

SILVA, Elany Barbosa da. Concepção, síntese e caracterização de novos derivados piridil-1, 3-tiazol como agentes antichagásicos. 2014. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco.

SOREN, Bini Chhetri et al. Topoisomerase IB: A relaxing enzyme for stressed DNA. **Cancer Drug Resistance**, v. 3, n. 1, p. 18-25, 2020.

THAKARE, R.; DASGUPTA, Arunava; CHOPRA, Sidharth. Update on nifurtimox for treatment of Chagas disease. **Drugs of today (Barcelona, Spain: 1998)**, v. 57, n. 4, p. 251-263, 2021.

TORRICO, Faustino et al. New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 8, p. 1129-1140, 2021.

TROUILLER, Patrice et al. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **The Lancet**, v. 359, n. 9324, p. 2188-2194, 2002.

VEBER, D.F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **J. Med. Chem.**, 45, 2615-2623, 2002.

VELASCOHERNANDEZ, Jorge X. A model for Chagas disease involving transmission by vectors and blood transfusion. **Theoretical population biology**, v. 46, n. 1, p. 1-31, 1994.

VERMELHO, Alane Beatriz; RODRIGUES, Giseli Capaci; SUPURAN, Claudiu T. Why hasn't there been more progress in new Chagas disease drug discovery?. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 15, n. 2, p. 145-158, 2020.

VIEGAS-JUNIOR, Claudio et al. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 17, p. 1829-1852, 2007.

VILLALTA, Fernando; RACHAKONDA, Girish. Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 14, n. 11, p. 1161-1174, 2019.

YET, Larry. **Privileged structures in drug discovery: medicinal chemistry and synthesis**. John Wiley & Sons, 2018.

ZHANG, Haitao et al. Applications of nuclear magnetic resonance (NMR) logging in tight sandstone reservoir pore structure characterization. **Arabian Journal of Geosciences**, v. 13, n. 13, p. 1-8, 2020.

ZUMA, Aline A.; DOS SANTOS BARRIAS, Emile; DE SOUZA, Wanderley. Basic biology of Trypanosoma cruzi. **Current Pharmaceutical Design**, v. 27, n. 14, p. 1671-1732, 2021.