



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

GLEYBSON CORREIA DE ALMEIDA

PLANEJAMENTO *IN SILICO*, SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE NOVOS ANÁLOGOS DA 4-AMINO-5-CIANO-PIRIMIDINAS DE INTERESSE FARMACOLÓGICO

Recife

2022

GLEYBSON CORREIA DE ALMEIDA

PLANEJAMENTO *IN SILICO*, SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE NOVOS ANÁLOGOS DA 4-AMINO-5-CIANO-PIRIMIDINAS DE INTERESSE FARMACOLÓGICO

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

Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião José de Melo

Coorientador: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

Recife

2022

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

A447p	Almeida, Gleybson Correia de Planejamento in silico, síntese, caracterização e avaliação <i>in vitro</i> de novos análogos da 4-amino-5-ciano-pirimidinas de interesse farmacológico/ Gleybson Correia de Almeida. – 2022. 131 p. Orientador: Sebastião José de Melo. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2022. Inclui referências e anexo. 1. Docking. 2. Pirimidinas. 3. Trypanosoma cruzi. 4. Cruzaína. I. Melo, Sebastião José de (orientador). II. Título. 617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2023 - 182)
-------	---

GLEYBSON CORREIA DE ALMEIDA

“PLANEJAMENTO IN SILICO, SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO IN VITRO DE NOVOS ANÁLOGOS DA 4-AMINO-5-CIANO-PIRIMIDINAS DE INTERESSE FARMACOLÓGICO”

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

Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Aprovada em: 29/07/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião José de Melo (Presidente e Orientador)
Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Zenaide Severina do Monte (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Antônio Rodolfo de Faria (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico este trabalho ao meu pai José Cupertino de Almeida que foi um exemplo de honestidade e hombridade. E a minha mãe Iracema Correia Lima de Almeida (*In memoriam*) que foi o maior exemplo de vida que conheci e me ensinou o maior valor de uma pessoa, o amor ao próximo.

AGRADECIMENTOS

Sou grato a permissão de Deus por este momento ser realizado.

Agradeço a meus pais, José C. de Almeida e Iracema C. L. de Almeida, em especial minha mãe, que dedicou toda a vida para realização dos sonhos dos filhos.

A meus irmãos, Dayvisson de Almeida, Jeyvisson de Almeida, Emília de Almeida, Amanda de Almeida e Dayana de Almeida, que vivenciaram todos os nossos desafios para que este momento fosse possível.

A minha companheira Marcleide França e nossa Júlia França que me compreendem e estão sempre me motivando a alcançar este sonho do doutoramento.

Aos meus orientadores que são exemplos de vida e comprometimento com a ciência, Prof. Dr Sebastião José de Melo e Prof. Dr Emerson Peter Falcão, os quais me permitiram essa oportunidade e me compreenderam, apoiando nos momentos mais difíceis dessa empreitada.

Aos colegas do grupo de pesquisa do SIM, em especial a Profa. Gerliny de Oliveira que foi uma grande parceira na bancada de trabalho. A Prof. Dr. Zenaide do Monte que por muitas vezes nos aconselhou e ensinou a encontrar atalhos para superar as dificuldades desse trabalho, e ao professor Erick Costa por suas grandes contribuições.

Aos outros colaboradores como Prof. Dra Valdênia Souza e seu doutorando Raul Penaforte, o grupo de pesquisa da Prof. Dra Valéria Pereira, Grupo de pesquisa da Prof. Dra Mariane Cajubá, Grupo de Pesquisa da Prof. Dra Glaucia Lima, ao grupo de pesquisa do Prof. Dr Marcus T. Scotti, Prof. Dr Ricardo Oliveira e a Central analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

Aos integrantes das bancas de defesa de tese e da qualificação que se disponibilizaram a participar e contribuir para a realização do trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para esta área da minha vida, em especial ao Professor Antônio Rodolfo de Faria, que me ensinou a amar a ciência através da Síntese Farmacêutica.

Aos integrantes do Programa de Pós graduação Farmacêuticas que através dos seus servidores Rilvan Guedes Pereira, e Nerilin Trajano da Silva Neto foram sempre solícitos e atenciosos.

Aos colegas do Centro Acadêmico da Vitória (UFPE), pelo auxílio e apoio.

Que o medo da solidão se afaste
e o convívio comigo mesmo se torne ao menos suportável
que o espelho reflita meu rosto num doce sorriso
que me lembro ter dado na infância
pois metade de mim é a lembrança do que fui
a outra metade não sei.
Que a minha loucura seja perdoada
pois metade de mim é amor
e a outra metade também (MONTENEGRO, 1988).

RESUMO

Doença de Chagas faz parte de um grupo de enfermidades conhecidas como Doenças Tropicais Negligenciadas que podem provocar incapacitação e morte. Para a Organização Mundial de Saúde é emergencial encontrar alternativas terapêuticas menos tóxicas e mais efetivas do que as disponíveis atualmente. Neste trabalho, promoveu-se um estudo *in silico* perfilado do protótipo 4-amino-5-carbonitrila-pirimidina para otimizar atividade antichagásica. Realizou-se a avaliação das interações com o sítio ativo da cruzaina a partir do **ZN3F**. Através deste estudo promoveu-se a síntese de derivados que oferecem uma ocupação específica dos fragmentos da proteína do parasito, e também se avaliou os parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos *in silico* por meio da Regra dos Cinco de Lipinski. Os compostos produzidos foram conduzidos a testes *in vitro* contra a forma tripomastigota da cepa Talahuen do *Trypanosoma cruzi*, e a avaliação da citotoxicidade *in vitro* sob as linhagens celulares de mamíferos L929. Dez compostos protótipos (**5a-h** e **7a-b**) foram ancorados *in silico* no sítio ativo de 3LXS, e todos os compostos apresentaram score superior ao ligante cocrystalizado, sendo os derivados **5b**, **5c**, **5f**, **5g** e **5h** com scores superiores ao composto *lead*, e o **5f** como melhor score, acima do composto **ZN3F**. Nenhum dos compostos violou a Regra dos Cinco de Lipinski e seus parâmetros ADMET indicaram boa absorção e solubilidade aquosa variando de boa a moderada, além de não demonstrarem mutagênese, tumorigênese, ou cause problemas de reprodutibilidade e irritação. Todos os derivados inibiram a cepa Talahuen de *T. cruzi*, e os compostos **5a**, **5b** e **5d** apresentaram CI_{50} muito baixa. Os derivados **5c** e **5h** inibiram os parasitas em valores próximos ao medicamento padrão, benznidazol, e o produto **5e** demonstrou a menor CI_{50} , $2,79 \pm 0 \mu M$. Nos testes de viabilidade celular, praticamente todos os compostos apresentaram valores de citotoxicidade (CC_{50}) superiores às concentrações de CI_{50} parasitárias, tendo os compostos **5e** e **5b**, respectivamente, 31,3 e 25, os melhores índices de seletividade. **Palavras-chave:** docking; pirimidinas; *Trypanosoma cruzi*; cruzaina.

ABSTRACT

Chagas disease is part of a group of illnesses known as Tropical Neglected Diseases that can cause disability and death. According to the World Health Organization, there is an urgent need to find less toxic and more effective therapeutic options than those currently available. In this work, a profiled *in silico* study was conducted of the 4-amino-5-carbonitrile-pyrimidine template to optimize anti-Chagas activity. Interactions with the active site of cruzain were investigated based on **ZN3F**. The synthesis was performed of derivatives that offer a specific occupation of fragments of the protein of the parasite. The pharmacokinetic and toxicological aspects were investigated *in silico* using Lipinski's rule of five. The compounds produced were submitted to *in vitro* tests against the trypomastigote form of the Talahuen strain of *Trypanosoma cruzi*. Cytotoxicity was investigated *in vitro* using mammalian L929 cell lines. Ten prototype compounds (**5a-h** and **7a-b**) were anchored *in silico* to the active site of 3LXS. All compounds had a better score than the co-crystallized ligand. The **5b**, **5c**, **5f**, **5g** and **5h** compounds had better scores compared to the lead compound and **5f** had a better score than the **ZN3F** compound. None of the compounds violated Lipinski's rule of five and the ADMET parameters indicated good absorption, with water solubility ranging from good to moderate. The compounds did not exhibit mutagenesis or tumorigenesis or cause reproductive problems or irritation. All derivatives inhibited the Talahuen strain of *T. cruzi* and the **5a**, **5b** and **5d** compounds had a very low IC₅₀. The **5c** and **5h** derivatives inhibited the parasite at values close to that of the standard medication (benznidazole) and the **5e** compound had the lowest IC₅₀ (2.79 ± 0 µM). In the cellular viability tests, practically all compounds had cytotoxicity values (CC₅₀) higher than the parasitic IC₅₀ concentrations, with **5e** and **5b** demonstrating the best selectivity indices (3.3 and 25, respectively).

Keywords: docking; pyrimidines; *Trypanosoma cruzi*; cruzain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metodologia reacional para obtenção dos derivados pirimidínicos 10	18
Figura 2 – Sequência reacional para obtenção dos derivados 11	19
Figura 3 – Metodologia sintética para obtenção dos derivados 12	20
Figura 4 – Metodologia sintética para obtenção das pirimidinas 13	20
Figura 5 – Abordagem sintética para síntese das pirimidinas 14	21
Figura 6 – Sequências reacionais para produzir as series de pirimidinas 14 e 15	22
Figura 7 – Via reacional para produzir as pirimidinas 17	22
Figura 8 – Via sintética para produzir a série de pirimidinas 18	23
Figura 9 – Metodologia reacional para desenvolver o protótipo 19	23
Figura 10 – Proposta reacional para obtenção da pirimidina 20	24
Figura 11 – Sequência reacional para produção das pirimidinas 21	25
Figura 12 – Via sintética para obtenção das pirimidinas 22	25
Figura 13 – Metodologia sintética para produção de pirimidinas 23	26
Figura 14 – Proposta reacional para a produção das pirimidinas 24	26
Figura 15 – Protótipo 25 com atividade inibitória contra <i>M. tuberculosis</i>	27
Figura 16 – Composto 26 inibidor do <i>P. falciparum</i> , e pirimetamina 27	28
Figura 17 – Medicamentos pirimidínicos utilizados no tratamento da AIDS.	29
Figura 18 – Compostos que apresentam atividade antitumoral.	30
Figura 19 – Derivados pirimidínicos inibidores da tirosina quinase de Bruton (BTK).31	
Figura 20 – Pirimidinas inibidoras da <i>Escherichia coli</i> PDHc E1.	32
Figura 21 – Protótipo pirimidínico inibidor da enzima cruzaina do <i>T. cruzi</i>	32
Figura 22 – Complexo Cruzaina entre o ligante WWR-483 cocrystalizado, o ligante ZN3F, com a enzima 3LXS <i>in silico</i>	34
Figura 23 – Síntese do aduto de Knoevenagel bisnitrílico.	38
Figura 24 – Amidinas utilizadas no trabalho.	38
Figura 25 – Síntese para obtenção dos derivados 4-amino-5-cianopirimidinas.	39
Figura 26 – Rota sintética das pirimidinas 5 e 7	47
Figura 27 – Espectro de RMN de ¹³ C do aduto Knoevenagel 3	49
Figura 28 – Espectro de RMN de ¹ H do aduto Knoevenagel 3	50
Figura 29 – Espectro de RMN-HMBC do aduto Knoevenagel 3	51
Figura 30 – Espectro de RMN de ¹³ C da pirimidina 7a	52

Figura 31 – Espectro de RMN de ^1H da pirimidina 7a	53
Figura 32 – Espectro de RMN HMBC da pirimidina 7a	54
Figura 33 – Espectro de RMN de ^{13}C da pirimidina 7b	56
Figura 34 – Espectro de RMN de ^1H da pirimidina 7b	57
Figura 35 – Espectro de gCOSY da pirimidina 7b	58
Figura 36 – Espectro de HSQC da pirimidina 7b	58
Figura 37 – Espectro de RMN de ^{13}C da pirimidina 5c	60
Figura 38 – Espectro de RMN de ^1H da pirimidina 5c	61
Figura 39 – Espectro de HSQC da pirimidina 5c	62
Figura 40 – Espectro de gCOSY da pirimidina 5c	64
Figura 41 – Análise do sítio de ligação da cruzapaína.	66
Figura 42 – Otimização do composto ZN3F baseado na estrutura do receptor.	67
Figura 43 – Estrutura 2D dos compostos 5a-h no sítio ativo da Cruzipaína (3LXS).	74
Figura 44 – Estrutura 2D do composto 7a-b no sítio ativo da Cruzipaína (3LXS).	76
Figura 45 – Espectro de massa MALDI-TOF da pirimidina 5c	129
Figura 46 – Espectro de massa MICROTOF da pirimidina 5d	129
Figura 47 – Espectros de massa MICROTOF da pirimidina 5e	130
Figura 48 – Espectro de massa MICROTOF da pirimidina 5f	130
Figura 49 – Espectros de massa MICROTOF da pirimidina 7a	131
Figura 50 – Espectros de massa MICROTOF da pirimidina 7b	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Derivados 4-amino-5-cianopirimidinas desenvolvidos no estudo.....	39
Tabela 2 – Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do aduto Knoevenagel 3	48
Tabela 3 – Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 7a	55
Tabela 4 – Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 7b	59
Tabela 5 – Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 5c	63
Tabela 6 – Ranking do consenso e resíduos de aminoácidos.....	68
Tabela 7 – Perfil ADMET dos análogos pirimidínicos 5a-h e 7a-b	69
Tabela 8 – Estrutura e atividade contra <i>T. cruzi</i> das pirimidinas 5a-h e 7a-b	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção.
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
BTK	Tirosina Quinase de Bruton
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
¹³ C-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
DMSO	Dimetilsulfoxido
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
FBS	Meio de Cultura - Soro Bovino Fetal
gCOSY	Espectroscopia Correlacionada de gradiente
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMBC	Coerência de Ligação Múltiplo Heteronuclear
¹ H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
HSQC	Correlação Quântica Simples Heteronuclear
IS	Índice de Seletividade
MALDI-TOF	Ionização/dessorção a Laser Assistida por Matriz Acoplada a Espectrometria de Massa por Tempo de Voo.
MTB	Mycobacterium tuberculosis
OMS	Organização Mundial de Saúde
RMPI	Meio de Cultura - Roswell Park Memorial Institute

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	REVISÃO – ABORDAGENS SINTÉTICAS.	18
2.2	REVISÃO – ATIVIDADES BIOLÓGICAS.	26
2.3	REVISÃO – MODELAGEM MOLECULAR E CRUZAÍNA	33
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVOS GERAIS.	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS PIRIMIDINAS	37
4.1.1	Síntese do aduto de Knoevenagel 3:	37
4.1.2	Obtenção das amidinas 4 e 6.	38
4.1.3	Preparações dos derivados pirimidínicos 5 e 7:	38
4.2	PREPARAÇÃO DE ALVOS E LIGANTES.	43
4.3	DOCKING MOLECULAR E OTIMIZAÇÃO DE LEAD.	43
4.4	PREVISÕES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS.	44
4.5	ILUSTRAÇÕES.	44
4.6	ENSAIO <i>IN VITRO</i> EM FRENTE A CEPA TALAHUEN DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	44
4.7	CITOTOXICIDADE.	45
4.8	ÍNDICE DE SELETIVIDADE	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	SÍNTESE DO ADUTO DE KNOEVENAGEL	47
5.2	SÍNTESE DOS DERIVADOS PIRIMIDÍNICOS	51
5.3	SELEÇÃO E REDOCKING DE CRUZAÍNA.	64
5.4	ANÁLISE DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR DO ZN3F.	65

5.5	OTIMIZAÇÃO DO ZN3F.	66
5.6	ANÁLISES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS DE DERIVADOS DE PIRIMIDINAS.	68
5.7	ATIVIDADE TRIPANOCIDA.	69
6	CONCLUSÃO	77
7	PERSPECTIVAS	78
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICES – ARTIGOS SUBMETIDOS	91
	ANEXOS – ESPECTROS DE MASSAS	129

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são um grupo de vinte doenças que acometem principalmente pessoas de baixa renda, politicamente marginalizadas e de pouco acesso aos cuidados de saúde. A Organização Mundial de Saúde (OMS) desenvolveu um roteiro de metas com o propósito de auxiliar na erradicação dessas doenças. Dentre estas metas estão a disponibilização de quimioterápicos ativos contra parasitas causadores de doenças. Algumas DNTs, como por exemplo Tripanossomíase Americana possui tratamentos com drogas que apresentam vários efeitos colaterais, o que causa a necessidade de obtenção de novas propostas medicamentosas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

A Tripanossomíase Americana é uma doença que atinge aproximadamente 8 milhões de indivíduos, principalmente nos 21 países da América Latina (MARTINS-MELO *et al.*, 2019). Causada pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), protozoário normalmente transmitido pela picada do *Triatoma infestans* (besouros sugadores de sangue) que após picada, a fêmea defeca liberando o *T. cruzi*, o qual na forma tripomastigota penetra a região lesionada e inicia o ciclo no homem. Após entrar na corrente sanguínea o parasita se converte na forma amastigota, predominante no corpo dos mamíferos. Depois da instalação no homem a manifestação da doença pode se dar na forma aguda, indeterminada ou crônica (PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2015). A forma Crônica acomete quase um terço dos pacientes infectados com o parasita e pode atingir vários órgãos, em especial o coração, desencadeando a versão mais letal desta doença (ORTIZ *et al.*, 2019).

Endêmica da América Latina, onde ficou conhecida por doença de Chagas, esta enfermidade tem sido preocupação em países desenvolvidos como os Estados Unidos, e em alguns países da Europa que identificaram imigrantes que apresentaram o parasita e provocaram a disseminação via transmissão sanguínea e placentária (ANTINORI *et al.*, 2017). Devido aos casos sem diagnóstico ou tratamento estima-se que 75 milhões de pessoas estejam em risco de infecção (MARTINS-MELO *et al.*, 2019).

O tratamento medicamentoso da doença de Chagas é baseado em nifurtimox e benznidazol (BERMUDEZ *et al.*, 2016), e a taxa de sucesso do tratamento varia de acordo com a idade do paciente e o estágio da doença. Os melhores resultados são

encontrados quando o paciente é tratado na fase aguda, obtendo uma taxa de cura parasitológica de 70 e 90% em pacientes jovens e congênitos, respectivamente. Há perda de eficácia dessas drogas com o passar do tempo de infecção, e o uso de benznidazol para pacientes na fase crônica pode obter taxa de cura acima de 60% para pacientes jovens, e 2-40% em pacientes adultos. Além disso, é orientado não usar o nifurtimox para pacientes com distúrbios psiquiátricos e neurológicos, e ambas as drogas não são indicadas para pessoas com problemas renais e hepáticos (CRESPILLO-ANDÚJAR *et al.*, 2018). Desta forma, quase 40% dos pacientes apresentam algum efeito colateral, o que dificulta a aceitação do tratamento que dura aproximadamente dois meses (FORSYTH *et al.*, 2016).

Há uma busca incessante para se desenvolver novas drogas antiparasitárias, grande parte destas propostas tem se baseado em compostos heterocíclicos como as pirimidinas (CARDONA-G; YEPES; HERRERA-R, 2018). Pirimidinas são heteroaromáticos de 6 membros com dois nitrogênios em sua estrutura, e são de grande importância para o desenvolvimento da vida dos seres vivos. Este componente é o núcleo base que fundamenta o DNA e RNA do genoma de toda vida no planeta. Sendo parte fundamental para o metabolismo dos protozoários (MARTINEZ-PEINADO *et al.*, 2021; DE MORAIS *et al.*, 2015).

Dentre as várias propostas que produzem pirimidinas como núcleo-base de novas drogas estão os estudos que se baseiam em modelagem molecular, pois é uma ferramenta que tem proporcionado um encurtamento de tempo e economia no processo de produção de novos fármacos (KOURBELI *et al.*, 2021). Desta forma, abordagens baseadas em estrutura têm sido fundamentais para se encontrar novas terapias medicamentosas contra os parasitas que provocam as doenças negligenciáveis (FERNANDES *et al.*, 2022). Deste modo, demonstrando ser indispensável a compreensão das interações proteína-ligante para obtenção de compostos com atividades inibidoras melhoradas.

Dentre as várias proteínas-alvo que são relatadas na literatura quando se deseja atacar o *T. cruzi* há uma que têm sido destaque por se tratar de uma estrutura fundamental para o ciclo de vida do protozoário, a cruzaina (DOS SANTOS NASCIMENTO; DE AQUINO; DA SILVA-JÚNIOR, 2021). O sítio ativo da cruzaina do *T. cruzi* possui uma subunidade S2 capaz de interagir com grupos básicos e

hidrofóbicos (BELTRAN-HORTELANO *et al.*, 2022), o que parece ser bem apropriado para esqueletos pirimidínicos.

Melo *et al.* (2002) desenvolveu o protótipo 4-amino-5-ciano-pirimidina que admite facilmente, por vias sintéticas, modificações estruturais nas posições 2 e 6, permitindo a produção de vários derivados. Já foram desenvolvidos vários compostos que propiciaram algumas avaliações químicas e biológicas, dentre eles, o estudo de atividade antiparasitária (DE MELO *et al.*, 2018b; MONTE *et al.*, 2020). Tais trabalhos nos direcionaram a uma nova proposta baseada na otimização da ação antichagásica a partir de um composto Lead desenvolvido pelo grupo.

Portanto, esta perspectiva nos apontou para a busca por compostos 4-amino-5-ciano-pirimidinas direcionados ao ataque mais efetivo sob a enzima cruzaina do *T. cruzi* através do método de docking molecular por meio de um composto *Lead*. Dentro deste estudo, foi oportuno uma avaliação *in silico* das características farmacocinéticas por meio da Regra dos Cinco de Lipinski.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

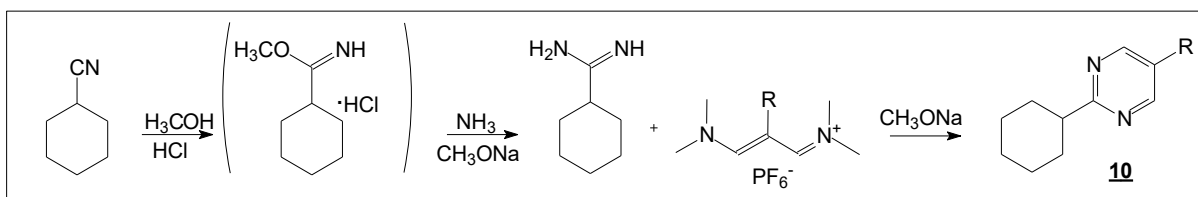
2.1 REVISÃO – ABORDAGENS SINTÉTICAS.

No estudo da química farmacêutica é bem evidente a presença de heterociclos constituindo o esqueleto de fármacos utilizados pelos homens (ZARENEZHAD; FARJAM; IRAJI, 2021). Dentre os heterociclos com mais relevância estão os que possuem nitrogênio em sua estrutura, com destaque para pirimidinas que são aromáticos heterocíclicos constituintes dos nucleosídeos, que são fundamentais na biossíntese de ácidos nucleicos e no metabolismo de carboidratos e lipídios (OKESLI; KHOSLA; BASSIK, 2017), e são essenciais para o crescimento e proliferação celular (MOLLICK; LAÍN, 2020).

A obtenção de pirimidinas e análogos sintéticos foi realizada a partir dos trabalhos de Pinner em 1889 e Bigneli em 1893, que desenvolveram metodologias sintéticas de poucas etapas e fácil execução (SANTOS; BERNARDINO; SOUZA, 2006; TEJERO; KÜMMERLE; BAUERFELDT, 2019). Desde então, há uma busca incessante por novos derivados pirimidínicos tanto por metodologias tradicionais, decorrentes das propostas pelos pesquisadores pioneiros, como por vias alternativas (MAHFOUDH *et al.*, 2017).

A obtenção de pirimidinas por metodologias que pretendem fazer uso de sínteses em uma etapa é objetivo de vários grupos de pesquisas. Uma das propostas foi a executada por Frutos *et al.* (2013), que desenvolveram a síntese *one-pot*, adaptando o método de Pinner, até alcançar as amidinas desejadas, e adicionaram ao recipiente reacional sais de vinamidínium, análogos de malonodialdeídos, e produziram as pirimidinas correspondentes **10** (Figura 1) (FRUTOS *et al.*, 2013).

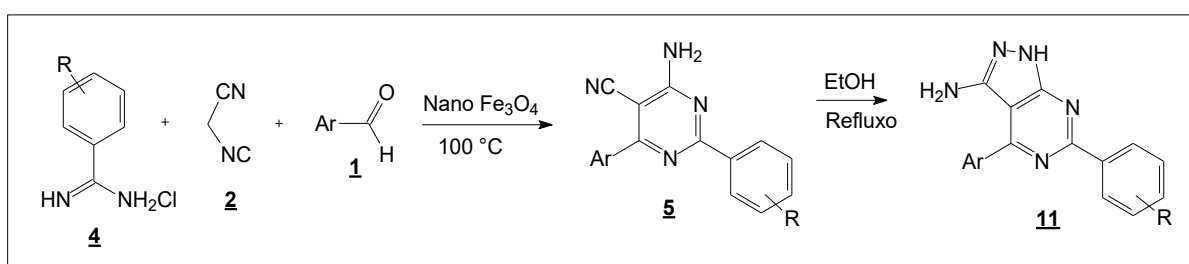
Figura 1 – Metodologia reacional para obtenção dos derivados pirimidínicos **10**.



Fonte: FRUTOS *et al.*(2013).

Rostamizadeh *et al.* (2013) também buscaram sintetizar um conjunto de derivados de 4-amino-6-aryl-2-fenilpirimidine-5-carbonitrilas por meio de uma reação multicomponente, desta vez catalisada por nanopartículas Fe_3O_4 , e livres de solventes. Foi desenvolvida uma série de derivados pirazolo[3,4-*d*]pirimidinas **11**, partindo das pirimidinas **5** (Figura 2), que apresentaram atividades antibacterianas (ROSTAMIZADEH *et al.*, 2013).

Figura 2 – Sequência reacional para obtenção dos derivados **11**.

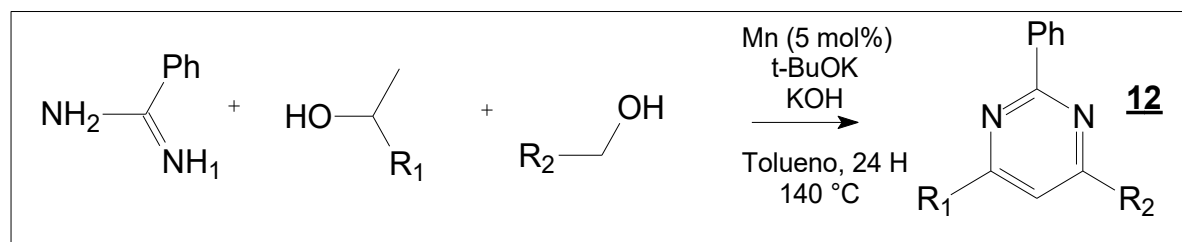


Fonte: Rostamizadeh *et al.* (2013).

Na verdade, o uso de catalisadores metálicos para a síntese de heterociclos nitrogenados é bem diversificado, e este foi o objetivo do trabalho de Mastalir *et al.* (2016) e Deibl & Kempe (2017) que propuseram o uso de manganês para catalisar as reações entre álcoois e compostos fornecedores de nitrogênio para os heterociclos (MASTALIR *et al.*, 2016; DEIBL; KEMPE, 2017).

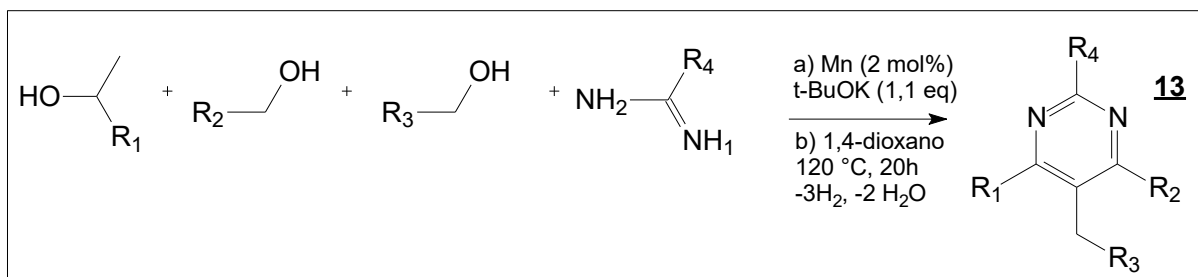
Em particular, para obter os derivados pirimidínicos, no estudo de Mastalir *et al.* (2016) reagiram amidinas com um álcool primário e o secundário na presença de Manganês, dando origem a pirimidinas trissubstituídas **12**, Figura 3 (MASTALIR *et al.*, 2016). Entretanto, Deibl & Kempe (2017) modificaram a metodologia utilizada por Mastalir *et al.* (2016) e desenvolveram, além de pirimidinas trissubstituídas, uma série de pirimidinas tetrasubstituídas **13**, as quais foram obtidas com a inserção uma terceira molécula de álcool (primário) em uma etapa seguinte a catalise com manganês (Figura 4) (DEIBL; KEMPE, 2017).

Figura 3 – Metodologia sintética proposta por Mastalir *et al.* (2016) para obtenção dos derivados **12**.



Fonte: Mastalir *et al.* (2016).

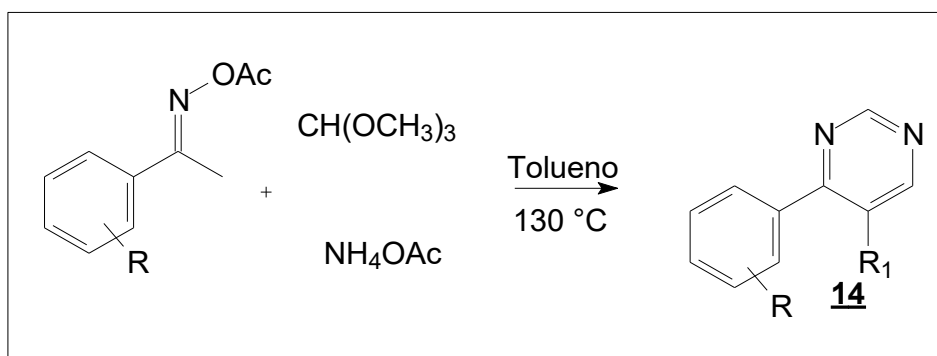
Figura 4 – Metodologia sintética realizada por Deibl & Kempe (2017) para obtenção das pirimidinas **13**.



Fonte: Deibl & Kempe (2017).

Upare *et al.* (2018) realizaram um estudo que buscava as condições ideais para síntese de pirimidinas mono e dissubstituídas **14** a partir de *O*-aciloximes, acetofenonas e NH₄OAc, este último como fonte de nitrogênio. Neste trabalho foram avaliadas a contribuição do sal CuI como catalizador, as variações de solventes e a importância das aciloximas. Sendo determinada como condições ideais, para se conseguir bons rendimentos, o quadro apresentado na Figura 5 (UPARE *et al.*, 2018).

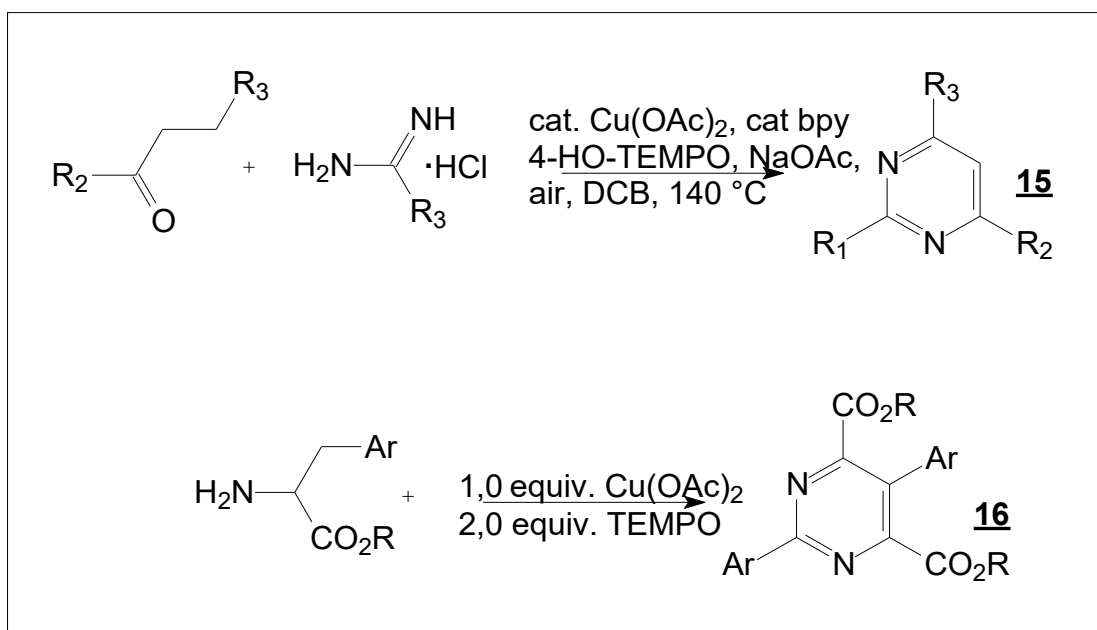
Figura 5 – Abordagem sintética para síntese das pirimidinas **14**.



Fonte: Upare *et al.* (2018).

Continuando com as propostas que utilizam sais de cobre como catalisadores estão os trabalhos de Zhou *et al.* (2014) e Zhan *et al.* (2016) que realizaram síntese [3+3] de pirimidinas com o auxílio de 2,2,6,6-tetrametil-piperidinoxí (TEMPO), Figura 6 (ZHOU *et al.*, 2014; ZHAN *et al.*, 2016). No estudo de Zhou *et al.* (2014), o material de partida foi uma série de aminoácidos que sofrem uma desidrogenação oxidativa pelo $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ e formam um imina, que na presença do TEMPO e $\text{NH}_3\text{-SiO}_2$ produzem as pirimidinas **15** com bons rendimentos (ZHOU *et al.*, 2014). E na síntese realizada por Zhan *et al.* (2016), o $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ participa da reação como um ácido de Lewis coordenando como o ligante entre a biperidina e cetona, iniciando o mecanismo reacional e recorrendo as amidinas como fonte de nitrogênio, a reação produz as pirimidinas **16** com rendimentos variados (ZHAN *et al.*, 2016).

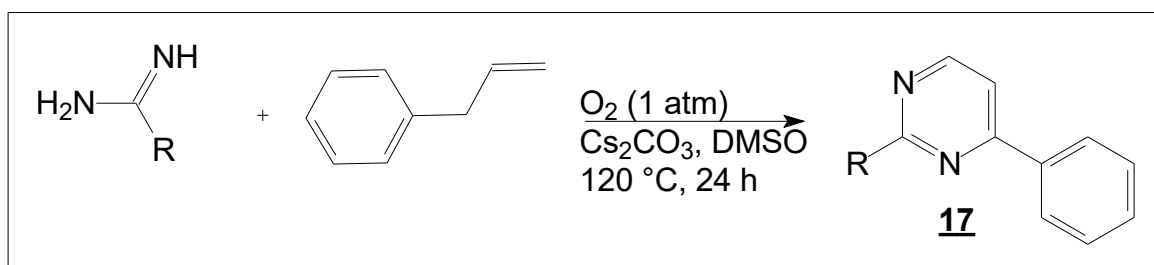
Figura 6 – Sequências reacionais para produzir as series de pirimidinas **14** e **15**.



Fonte: ZHOU *et al* (2014) e ZHAN *et al.* (2016)

Uma abordagem semelhante foi a utilizado por Guo *et al.* (2016) que utilizaram como catalizador Cs_2CO_3 , na presença de oxigênio atmosférico, promovendo a reação entre arilamidinas e alquenos, produzindo diversas pirimidinas (Figura 7) (GUO *et al.*, 2016).

Figura 7 – Via reacional para produzir as pirimidinas **17**.

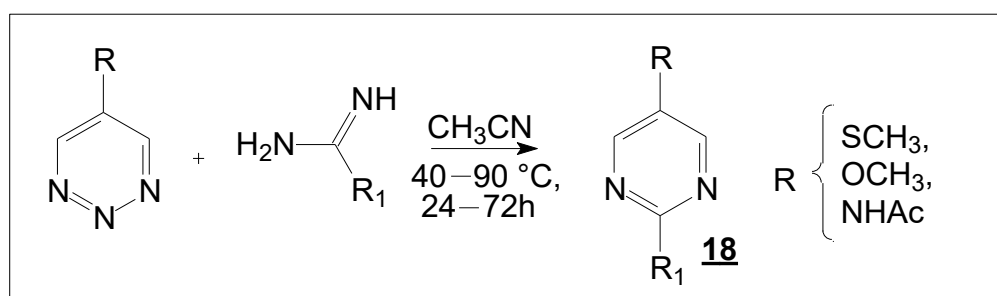


Fonte: Guo *et al.* (2016)

Trabalhos com autoria de Borger *et al.* (2011, 2015) têm apresentado estudos com a metodologia de Diels Alder de demanda inversa de elétrons com 1,2,3-triazidinas, que na presença de amidinas propiciam a obtenção de pirimidinas **18** por cicloadições [4+2], Figura 8 (ANDERSON; BOGER, 2011; GLINKERMAN; BOGER, 2015). No trabalho realizado por Anderson & Boger (2011), as 1,2,3-triazidinas não

substituídas foram postas em reação com amidinas, dissolvidos em dioxano ou CH_3CN , em condições brandas, produzindo amidinas de forma rápida e em bons rendimentos (ANDERSON; BOGER, 2011). Contudo no estudo realizado por Glinkerman & Boger (2015), as 1,2,3-triazidinas continham substituintes eletrodoadores “R”, as quais favoreciam a reação com amidinas substituídas sob as condições observadas na figura 8, produzindo séries de pirimidinas em bons rendimentos (GLINKERMAN; BOGER, 2015).

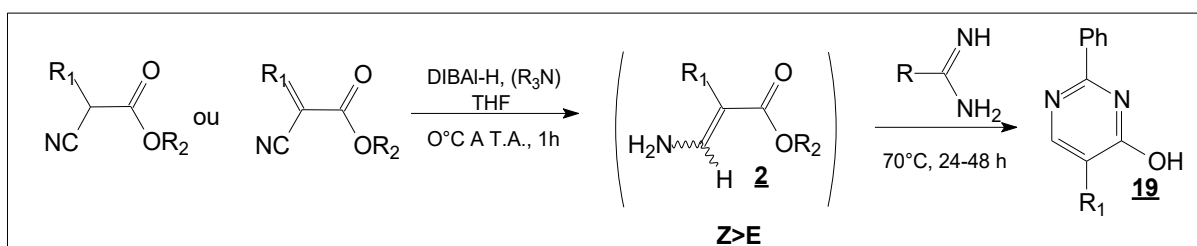
Figura 8 – Via sintética para produzir a série de pirimidinas **18**.



Fonte: Anderson & Boger (2011); Glinkerman & Boger (2015).

Uma outra forma de obter substratos capazes de reagir com amidinas e produzir pirimidinas foi proposta por Pollack & Kuethe (2016), que desenvolveram intermediários β -aminoacrilatos a partir da redução de α -cianocetonas e de α -cianoésteres com Dibal-H. Com os intermediários em mãos, são adicionadas as amidinas para obtenção das pirimidinas **19**, Figura 9 (POLLACK; KUETHE, 2016).

Figura 9 – Metodologia reacional para desenvolver o protótipo **19**.

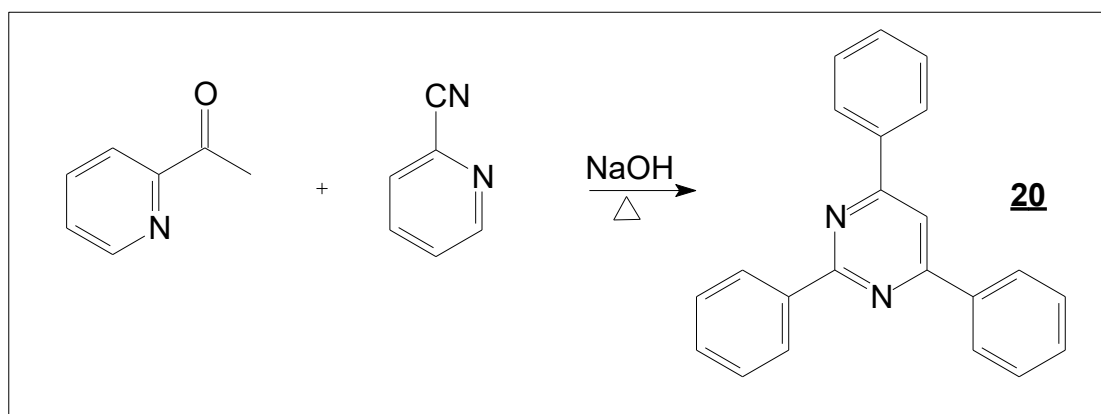


Fonte: Pollack & Kuethe (2016).

Vários são os grupos de pesquisas que não usam as amidinas como fonte de nitrogênio para compor o heterociclo pirimínico. Este tipo de caminho pode ser

observado na proposta de síntese de ligantes pirimidínicos a partir de uma reação entre 2-acetilpiridina e 2-cianopiridina, na presença de hidróxido de sódio, realizada por Bori *et al.* (2020). E após a obtenção da série 2,4,6-tris(2-piridil)pirimidina **20**, Figura 10, foram seguidas reações para obtenção de complexos de Ni^{2+} e Co^{2+} dos derivados pirimidínicos desenvolvidos (BORI; MAHATA; MANIVANNAN, 2020).

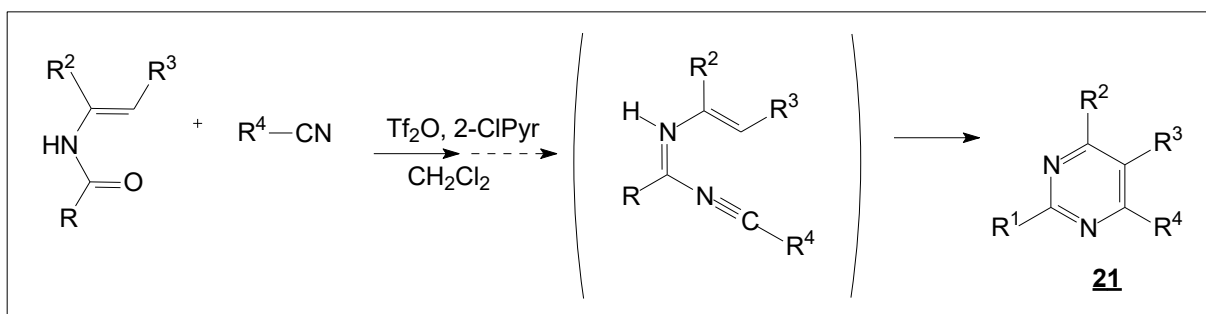
Figura 10 – Proposta reacional para obtenção da pirimidina **20**.



Fonte: Bori *et al.* (2020)

Alguns trabalhos conseguem desenvolver reações que produzem como produto intermediária compostos análogos a amidinas, e esta proposta pode ser observada nos trabalhos de Movassaghi *et al.* (2006, 2009). Neste caso, foram fontes de nitrogênio para o núcleo diazoarômático, nitrilas, e, aril e vinil amidas, que quando colocados, em meio reacional de diclorometano, na presença de anidrido trifluorometanosulfônico (Tf_2O), e 2-chloropiridina (2-ClPir), produziram intermediários que sofreram uma ciclização intramolecular, dando origem as séries de pirimidinas **21** (Figura 11), em condições brandas e com bons rendimentos (AHMAD; HILL; MOVASSAGHI, 2009; MOVASSAGHI; HILL, 2006).

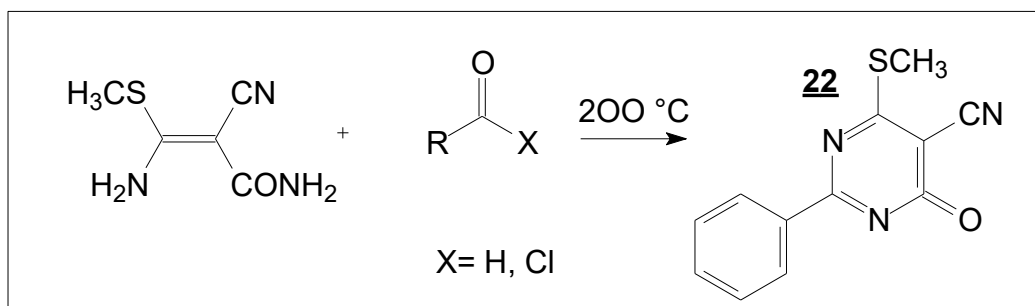
Figura 11 – Sequência reacional para produção das pirimidinas **21**.



Fonte: Ahmad; Hill; Movassaghi (2009); Movassaghi & Hill (2006).

As amidas produzidas por KLENC *et al.* (2009) foi um recurso reacional para a obtenção de pirimidinas, que partiu de Cetonas *N*, *S*-acetais, aldeídos ou cloretos de acila, livres de solventes (Figura 12). As pirimidinas **22** produzidas foram avaliadas com relação a sua capacidade de fluorescência, apresentando relativa fluorescência em estado sólido (KLENC *et al.*, 2009).

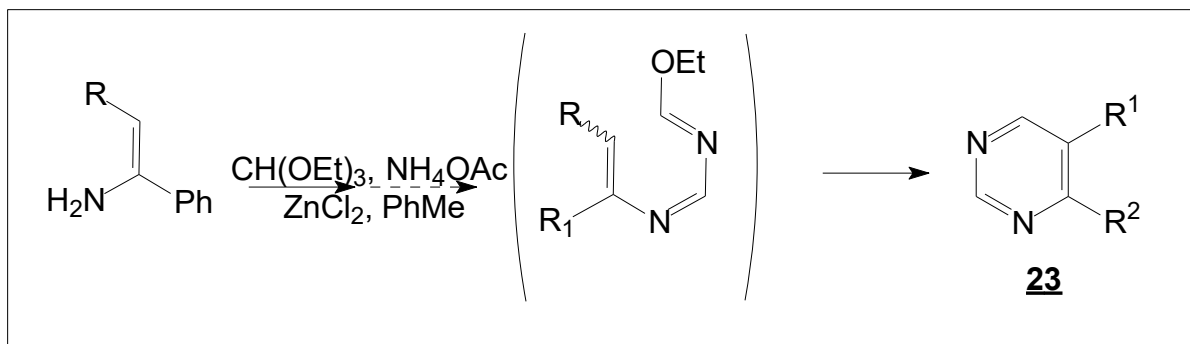
Figura 12 – Via sintética para obtenção das pirimidinas **22**.



Fonte: KLENC *et al.* (2009)

Uma abordagem em uma etapa para síntese de novas pirimidinas foi utilizada por Sasada *et al.* (2009) que recorreram a enaminas e NH_4OAc como precursores de um análogo amidínico intermediário na reação, Figura 13. Neste estudo, também foram conduzidas reações com cetonas como material de partida, as quais sobre as mesmas condições das enaminas, cicloadição do tipo $[3+1+1+1]$, catalisada por ZnCl_2 como ácido de Lewis, na presença $\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_3$, alcançaram as pirimidinas **23** (SASADA *et al.*, 2009).

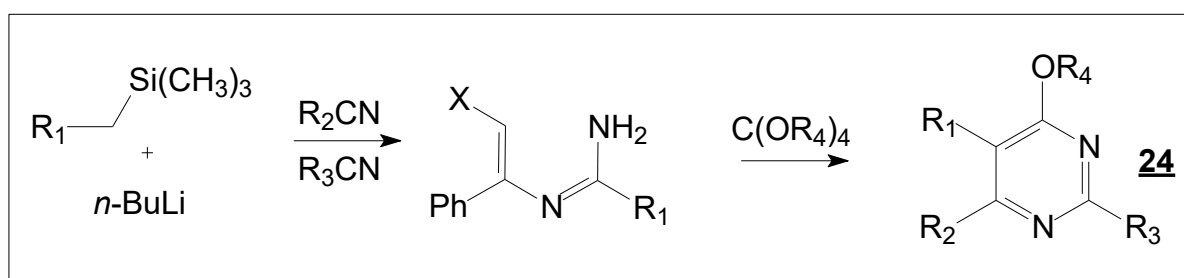
Figura 13 – Metodologia sintética para produção de pirimidinas **23**.



Fonte: Sasada *et al.* (2009)

Já Sakai *et al.* (2005) conseguiram obter amidinas a partir de uma reação *one-pot* entre um derivado silano funcionalizado com duas nitrilas, gerando a amidina. Com as amidinas em mãos pode-se otimizar as condições reacionais, que a depender da escolha do derivado acetal necessitaria ou não de tolueno como solvente reacional, utilizando como catalizador o ZnBr_2 para alcançar as pirimidinas tri e tetrasubstituídas **24**, figura 14 (SAKAI *et al.*, 2005).

Figura 14 – Proposta reacional de Sakai *et al.* (2005) para a produção das pirimidinas **24**.



Fonte: Sakai *et al.* (2005)

2.2 REVISÃO – ATIVIDADES BIOLÓGICAS.

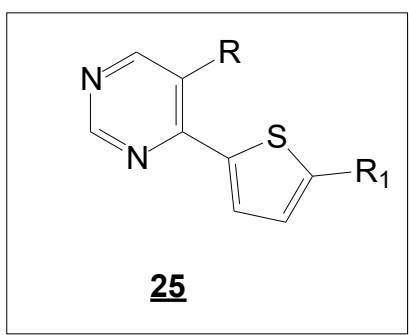
As propriedades farmacológicas das pirimidínicas há décadas vêm estimulando vários pesquisadores a compilar os estudos que abordam sobre a diversidade das atividades biológicas das pirimidinas (KUMAR; NARASIMHAN, 2018).

Um desses trabalhos é o desenvolvido por Rashid *et al.* (2021) que realizou um estudo recente apresentando as várias abordagens sintéticas para produção de pirimidinas, direcionando sua proposta para verificar a contribuição das pirimidinas para os avanços na produção de novos anti-inflamatórios. Identificando, desta maneira, a importância da presença do esqueleto pirimidínico para suprimir as expressões e atividades dos mediadores inflamatórios. Também foi realizado um estudo de relação estrutura atividade, o qual foi verificado que o potencial uso de vários derivados de pirimidina como agentes anti-inflamatórios é esperado devido à sua alta potência e toxicidade mínima (RASHID *et al.*, 2021)

Outra proposta de revisão foi a elaborada Chitre *et al.* (2016), produzindo um trabalho que reunia estudos que objetivava avaliar as relações de estrutura atividade (SARs) de derivados pirimidínicos como inibidores da enzima MTB timidina monofosfato quinase (TMPKmt) - alvo atraente e seletivo para o desenvolvimento de novas entidades químicas contra a Tuberculose. Além disso, foi verificado que há uma variedade de modificações estruturais que podem contribuir com valores de potência inibitória, e que há uma interação de empilhamento entre o núcleo-base de pirimidina e Phe70, fundamental para promover a inibição sobre a enzima bacteriana (CHITRE *et al.*, 2016).

Um estudo mais específico viabilizando a ação sobre cepas de *Mycobacterium tuberculosis* foi proposto por Verbitskiy *et al.* (2015). Obtendo pirimidinas **25** (Figura 15), mono(tienil) e di(tienil) substituídas a partir de 5-bromopirimidina comercialmente disponível, ativas em concentrações micromolares *in vitro* contra cepas de *M. tuberculosis H₃₇Rv* resistentes a rifampicina e isoniazida (VERBITSKIY *et al.*, 2015).

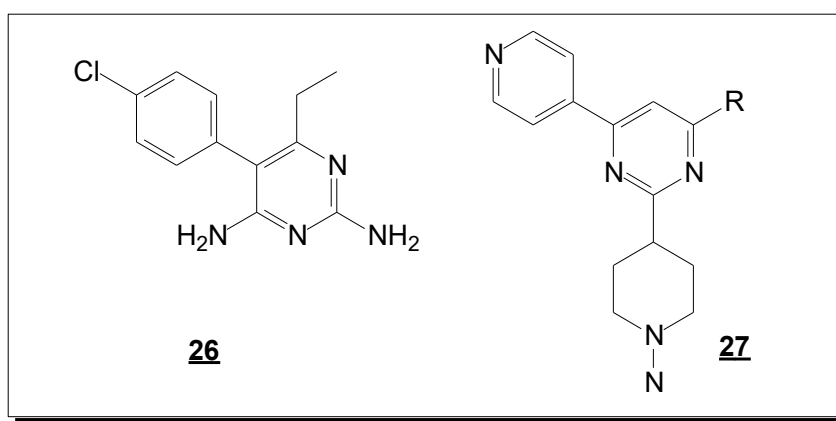
Figura 15 – Protótipo pirimídico **25** com atividade inibitória contra *M. tuberculosis* desenvolvido por Verbitskiy *et al.* (2015)



Fonte: Verbitskiy *et al.* (2015)

Já Agarwal *et al.* (2005) desenvolveu uma série de derivados pirimidínicos **26** com objetivo de obter novos agentes antimaláricos. Os compostos foram performados sobre cepas de *Plasmodium falciparum* NF-54 em testes *in vitro* e apresentaram atividades de moderadas a altas no comparativo com a droga de referência Pirimetamina **27**, Figura 16 (AGARWAL *et al.*, 2005).

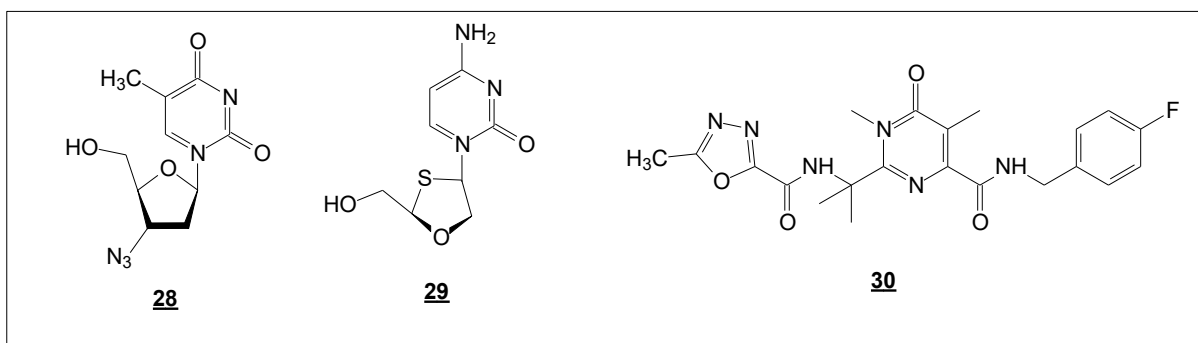
Figura 16 – Composto **26** produzido por Agarwal *et al.* (2005) com objetivo de inibir o *P. falciparum*. A pirimetamina **27** – droga utilizada no tratamento da malária.



Fonte: Agarwal *et al.* (2005).

Na clínica a Zidovudina **28** e Lamivudina **29** (Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa), e Raltegravir **30** (Inibidores da Integrase) têm em comum não só um papel relevante no tratamento da AIDS mas fazem parte de um grupo de substâncias bioativas que possuem núcleos de pirimidina em sua estrutura, Figura 17 (DE CLERCQ, 2010). Estudos como o de PATEL; KEUM; PARK (2015) – “Esboçando o desenvolvimento histórico das pirimidinas como inibidores da integrase do HIV” – explanando sobre potencial das pirimidinas como núcleo-base de novos análogos do Raltegravir, ratificam a importância das pirimidinas para a obtenção novas drogas anti-HIV (PATEL; KEUM; PARK, 2015).

Figura 17 – Medicamentos utilizados na clínica para o tratamento da AIDS.



Fonte: PATEL; KEUM; PARK (2015).

As propriedades terapêuticas das pirimidinas não se restringem aos anti-HIV mas a outros tipos de vírus como foi retratado por De Clercq (2013), que destaca a presença de compostos pirimidínicos com propriedades antivirais comprovadas. Nem tão pouco se limitam ao tratamento de doenças virais como observado no estudo de revisão realizado por Zarenezhad *et al.* (2021). Desta forma podemos listar resumidamente o 5-fluorouracil (anticâncer), Piribedil (antiparkissoniano), Flucytosina (antifúngico), Trimethoprim (antibacteriano), Metrotexato (antimetabólico), Idoxuridina (antiviral contra herpes tipo-1), como drogas pirimidínicas utilizadas na clínica (ZARENEZHAD; FARJAM; IRAJI, 2021).

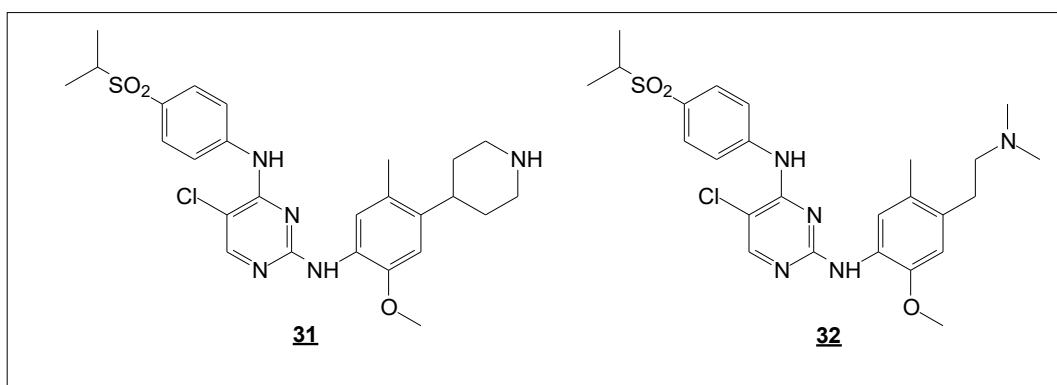
Portanto, podemos ver uma diversidade de moléculas que hoje são dispostos para uso clínico, num espectro amplo de ação, estimulando o interesse da comunidade científica na busca por novos compostos bioativos pirimidínicos.

Com esta ideia em mente, Prachayasittikul *et al.* (2016) narra diversas abordagens para desenvolvimento de agentes anticancerígenos à base de pirimidina, como: (1) desenvolver análogos que imitassem a substância natural promovendo a competição com os receptores ou enzimas alvo, (2) substituição com vários tipos de porções e anéis na estrutura de pirimidina e pirimidinas fundidas, (3) conjugação das estruturas centrais de pirimidina com os compostos bioativos existentes para desenvolver novas moléculas com múltiplas aplicações medicinais, (4) produção de compostos de coordenação de pirimidina. Desse modo, apresentando as diversas formas de explorar as promissoras atividades biológicas contra inúmeros alvos (PRACHAYASITTIKUL *et al.*, 2016).

Considerando os avanços no uso de novos antitumorais como o Ceretinib **31**, Figura 18, que tem apresentado grande progresso para o tratamento de Câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) – tendo papel como droga de segunda geração como inibidor do receptor da Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) (SHAW *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2016) – Mathi *et al.* (2017) obteve uma série de derivados do ceritinibe com substituições do fragmento piperidina por aminas alifáticas.

Estes compostos se apresentaram como Inibidores de ALK consideravelmente potentes contra mutantes do tipo selvagem, bem como resistentes a crizotinib, e com atividades inibitórias de ALK significativamente melhores em enzimas e ensaios celulares, em comparação com os de ceritinib. Tendo um dos compostos (**32**) se destacado e levado ao estudo de *docking*, demonstrando grande potencial para estudos posteriores (MATHI *et al.*, 2017).

Figura 18 – Compostos que apresentam atividade antitumoral e possuem o anel pirimidínico em sua estrutura.

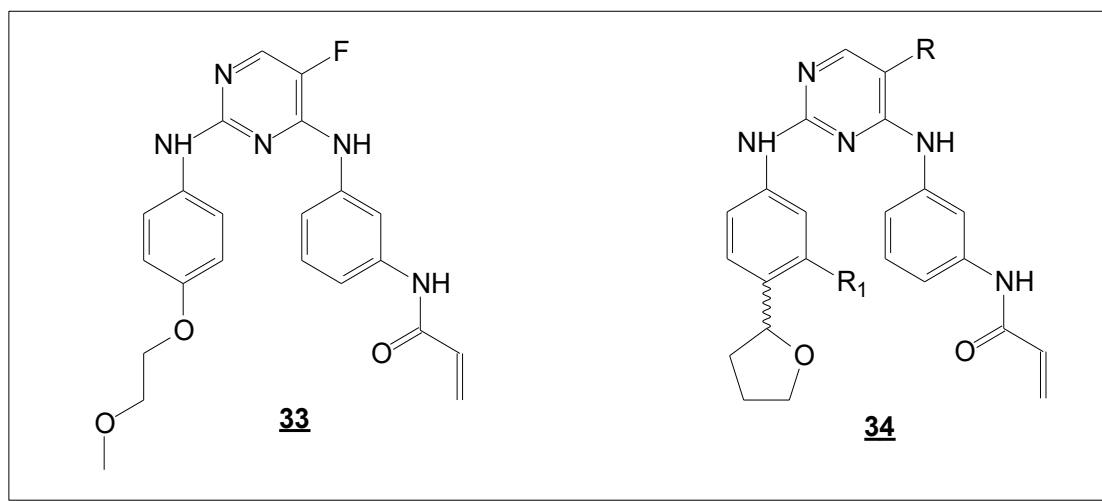


Fonte: Mathi *et al.* (2017).

Assim como a ALK, outro alvo interessante no combate ao câncer é a tirosina quinase de Bruton (BTK), que possui um papel importante na via de sinalização das células B, e sua desregulação tem sido encontrada relacionada às malignidades derivadas de células B. A maioria dos novos inibidores de BTK possuem um núcleo de pirimidina na estrutura, o que estimulou a obtenção de uma série de novos derivados de difenilpirimidina por Zhao *et al.* (2017). A maioria dos compostos produzidos apresentou atividade melhorada contra linhagens de células de leucemia B em comparação com o composto principal espebrutinibe **33** (Figura 19). Além disso, uma das moléculas (**34**) demonstrou baixa citotoxicidade celular e induziu

significativamente a apoptose das células de Ramos, detendo a ciclo celular na fase G0/G1 (ZHAO *et al.*, 2017).

Figura 19 – Derivados pirimidínicos com atividade inibitória contra tirosina quinase de Bruton (BTK).

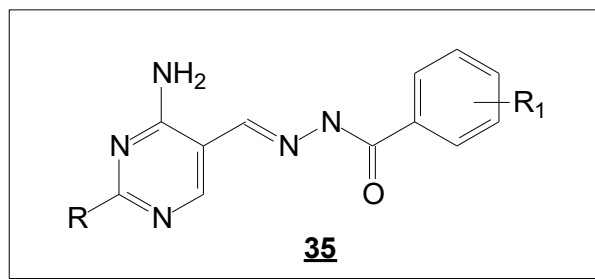


Fonte: Zhao *et al.* (2017).

A tiamina difosfato do complexo enzimático piruvato desidrogenase é um alvo que pode contribuir para obtenção de novas drogas contra *Escherichia coli*. Com esta ideia He *et al.* (2017) desenvolveram um trabalho que avaliou a otimização da potência inibitória contra *E. coli PDHc E1* a partir de um composto *Lead*, pelo qual puderam ser projetados e sintetizados uma série de derivados pirimidínicos **35** (Figura 20) capazes de ocupar o bolsão de ligação ThDP por uma conformação 'V' (HE *et al.*, 2017).

No estudo de *docking* molecular observou-se que o lado direito da conformação 'V' do anel 4-aminopirimidina exibe um empilhamento *p-p* com anel de cadeia lateral de Phe602, e os átomos de nitrogênio do anel de pirimidina estabelecem duas interações chave de ligação de hidrogênio com a cadeia lateral de Glu571 e Met194. Além disso, o grupo amino ligado ao anel pirimidina forma uma forte ligação de hidrogênio com Glu522, que é um resíduo importante na estabilização da LThDP ligada à enzima. Também foram observados que os resultados *in silico* foram confirmados pelos testes *in vitro* pois a maioria dos compostos apresentou atividade inibitória moderada a potente (HE *et al.*, 2017).

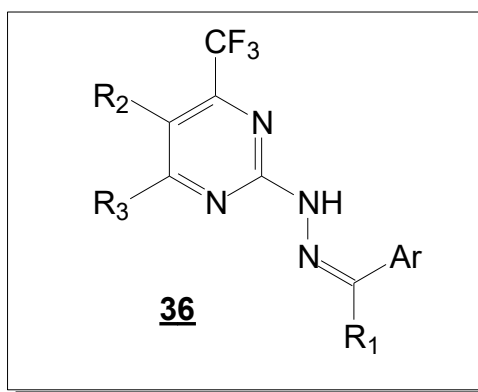
Figura 20 – Derivado pirimidínico com ação inibitória sob a enzima tiamina difosfato piruvato desidrogenase da *Escherichia coli* PDHc E1.



Fonte: He *et al.* (2017).

Dentro destas perspectivas, Zanatta *et al.* (2008) buscou novos inibidores da cruzaina do *T. cruzi*, um importante alvo para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos contra a doença de Chagas. Neste estudo, a série de novas 2-(N'-benzilidenohidrazino)-4-trifluorometil-pirimidinas **36** (Figura 21) se apresentou ativo contra a cruzaina do *T. cruzi* com inibição próximas de 80%, sendo postos seguidamente a uma avaliação *in docking* sob a cruzaina. Nos estudos de modelagem molecular observou-se que a ocupação do bolsão S2 acontecia como uma inativação irreversível da enzima (formação de ligação covalente com Cys25), este é o modo ideal para haver uma interação desejável de novos inibidores para medicina clínica. Além disso, houve um favorecimento das interações de ligação de hidrogênio entre o nitrogênio da pirimidina e o resíduo de aminoácido Met68 (ZANATTA *et al.*, 2008).

Figura 21 – Protótipo pirimidínico com atividade inibidora da enzima cruzaina do *T. cruzi*.



Fonte: Zanatta *et al.* (2008).

2.3 REVISÃO – MODELAGEM MOLECULAR E CRUZAÍNA

A produção de novas drogas é um processo de alto custo, e uma forma de superar este desafio é o uso de ferramentas baseadas em estrutura ligante, que consiste na busca de potenciais fármacos a partir do conhecimento estrutural dos alvos proteicos. Para tal, a modelagem computacional é um recurso que emprega modelos relacionados e bem descritos que pode fornecer uma estrutura de modelo inicial. E na medida que uma estrutura tridimensional do alvo esteja disponível, técnicas como *docking* molecular podem ser utilizadas para identificação e otimização de acertos – *hit* – por triagem virtual numa operação conhecida como otimização “*hit-to-lead*” (VIEIRA; SANTOS; FERREIRA, 2017).

A fim de combater a doença de Chagas vários alvos extraídos da análise de dados do genoma do *T. cruzi* foram investigados para o desenvolvimento de ensaios de triagem de drogas baseados em alvos de alto rendimento, como as Nitroredutases, Cruzaína, ferro superóxido dismutase, Tripanotiona redutase, esqualeno sintase, Farnesil difosfato sintase (VIEIRA; SANTOS; FERREIRA, 2017).

A cruzaína é a principal cisteína protease do *T. cruzi*, pois é uma peptidase do tipo cathepsina L que se expressa em todos os estágios de desenvolvimento do ciclo de vida do *protozoário*, e desempenha um papel importante no processamento degradativo de peptídeos e proteínas. Por ser fundamental para sobrevivência do parasita a cruzaína foi confirmada como um alvo importante para desenvolver novos inibidores seletivos, pois sua inibição provoca o bloqueio da proliferação nas avaliações *in vivo* e *in vitro* (DOS SANTOS NASCIMENTO; DE AQUINO; DA SILVA-JÚNIOR, 2021).

especificidade, é uma exceção importante porque é menos exposta a solventes e é capaz de interagir com grupos básicos e hidrofóbicos (BELTRAN-HORTELANO *et al.*, 2022).

A cruzaina possui bolsões de ligação que podem ser ocupados por inibidores não covalentes, diminuindo sua atividade (Figura 22 C). Como o bolsão S2 é notavelmente grande, substituintes hidrofóbicos e eletronegativos, como amino, seriam preferidos. Os estudos de docking molecular indicam que os inibidores ocupam o bolsão S2 através de interações hidrofóbicas com as cadeias laterais de Leu67, Ala133, Leu157 e Glu205 (Figura 22 A) (ZANATTA *et al.*, 2008).

Melo *et al.* (2002) desenvolveu um protótipo pirimidínico de fácil obtenção que permitiu a elaboração de vários derivados com atividades biológicas como antiinflamatória, larvicida, antitumoral, etc. Contudo, mais especificamente no estudo de De Melo *et al.* (2018) foi realizada uma avaliação da atividade antichagásica, onde foi observado o potencial anti-*T.cruzi* dos derivados pirimidínicos **5** (Figura 22 D), sendo o composto **ZN3F** (Figura 22 B) considerado o mais ativo. A partir das interações de modelagem molecular foram vistos que modificações poderiam otimizar o potencial antichagásico do núcleo pirimidínico **5**, Figura 22 C (DE MELO *et al.*, 2018b).

Diante destas informações ampliamos a abordagem da avaliação antiparasitária partindo de um composto *Lead* desenvolvido por De Melo *et al.* (2018b), que motivou a obtenção de derivados pirimidínicos que oferecem uma melhor ação sobre a cruzaina, enzima alvo da avaliação principal deste trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS.

Realizar um estudo *in silico* através do *docking* de Cruzaína, propondo a síntese direcionada de derivados 4-amino-5-carbonitrila-pirimidina seguido da avaliação *in vitro* sob o *T. Cruzi*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Realizar estudo de docking da cruzaína;

Avaliar os parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos através da Regra dos Cinco de Lipinski.

Obter e caracterizar, por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C e espectroscopia de massas, os novos derivados pirimidínicos que possuem os grupos amida e éster na estrutura;

Determinar a atividade inibitória dos compostos sintetizados através de testes *in vitro* da forma tripomastigota metacíclica da cepa Tulahuen do *Trypanosoma cruzi*;

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os materiais de partida, reagentes e solventes foram adquiridos (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis) e usados sem purificação adicional. O monitoramento das reações químicas foi realizado por cromatografia analítica em camada delgada (CCD), em sílica gel 60 F254 embalada em folhas de alumínio, adquiridas na (Merck, New Jersey) e foram visualizadas em lâmpada de Ultra-Violeta (UV) pelo VL-6.MC nas lâmpadas de 6W/ 312nm e 6W/ 254 nm, potência de 12 W. A cromatografia em coluna foi conduzida em sílica 60 (35–70 microns) gradiente de eluente hexano/acetato de etila, 8:2). Os pontos de fusão foram obtidos através do aparelho *Melting Point* M-550 da BUCHI *Switzerland* (Tombo UFPE 15165/2013). Os espectros de RMN foram registrados em um espectrômetro VARIAN VNMRS400 operando a 400 MHz e 100 MHz para núcleos ^1H e ^{13}C , usando DMSO- d_6 como solvente. Os deslocamentos químicos para esse trabalho foram obtidos em partes por milhão (ppm), tendo como padrão interno tetrametilsilano (TSM) como referência para ^1H -RMN ($\delta=0,00$ ppm). As constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz) e as multiplicidades expressas em singleto (s), duplete (d), tripleto (t), duplo dubleto (dd) e mutiplete (m). As análises de Massas foram realizadas pelo Maldi–TOF *Analysis of Small Molecules* (Bruker Daltonics); o Espectrômetro de Massa Deisi–Nermag acoplado ao Cromatógrafo Gasoso (HP 5890) em um potencial de ionização de 70 eV; e o Cromatógrafo Líquido acoplado à Espectrometria de Massa (LC–MS) com *Esquire 3000 Plus*, *Amazon speed* ETD, Micro-TOF e Maxis 3G.

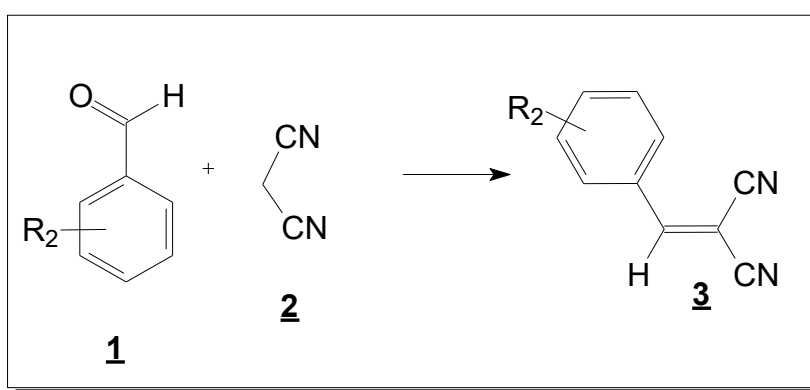
4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS PIRIMIDINAS

4.1.1 Síntese do aduto de Knoevenagel 3:

Em um balão de fundo redondo, foram adicionadas quantidades equimolares do aldeído aromático (1,587mmol) com substituintes retiradores ou doadores de elétrons, e da malonitrila (1,587mmol). Os reagentes são mantidos sob agitação, utilizando metanol como solvente (20 mL) e em refluxo, sendo a reação acompanhada

por CCD até o seu término. Ao final da reação é observado a formação dos cristais do produto, que são filtrados, e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O sólido resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel, utilizando-se como solvente de eluição a mistura de hexano e acetato de etila (8:2 ou 7:3). Por fim, o produto **3** obtido é recristalizado em metanol e armazenado em um dessecador, Figura 23 (MELO; SANTOS; FALCÃO; SRIVASTAVAC; *et al.*, 2002).

Figura 23 – Síntese do aduto de Knoevenagel bisnitrílico.

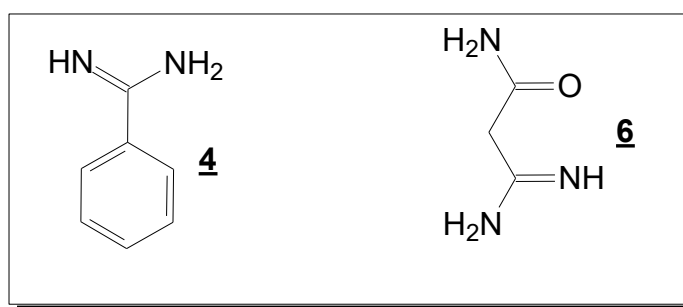


Fonte: Melo *et al.*, 2022.

4.1.2 Obtenção das amidinas **4** e **6**.

As amidinas **4** e **6** foram adquiridas comercialmente, Figura 24 (Sigma aldrich).

Figura 24 – Amidinas utilizadas no trabalho

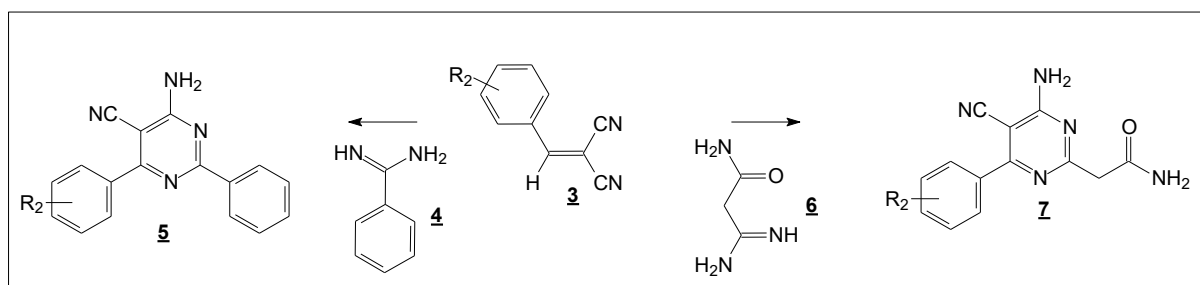


Fonte: Produzida pelo autor.

4.1.3 Preparações dos derivados pirimidínicos **5** e **7**:

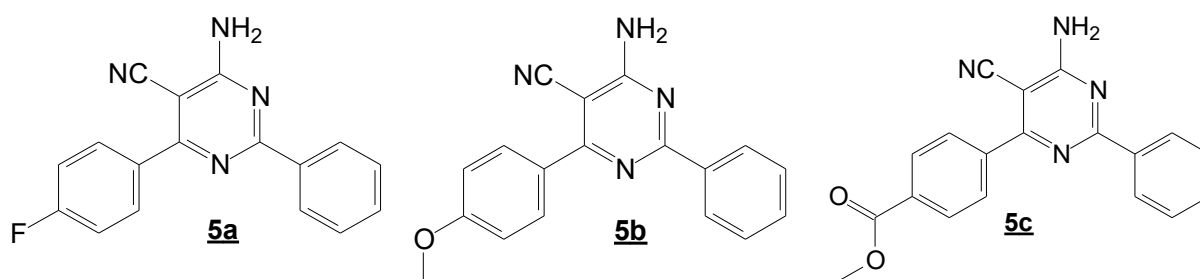
Os derivados pirimidínicos **5** e **7** foram preparados através da reação entre quantidades equimolares do intermediário bisnitrílico **3** (1,24 mmol) e da amidina **4** ou **6** (1,24 mmol), catalisadas por trietilamina (4–12 gotas) em meio metanólico (20 mL) num balão de fundo redondo, Figura 25. A reação foi mantida sob agitação e em refluxo, por um período de 3–7 horas. Após a confirmação do término da reação por CCD, o meio reacional foi resfriado à temperatura ambiente, e houve a formação de cristais, que foram separados por filtração à vácuo em filtro sinterizado. O líquido reacional foi evaporado sob pressão reduzida, e o sólido resultante foi purificado por recristalização com metanol à frio. Os produtos obtidos foram recristalizados em solvente adequado (MELO *et al.*, 2002), e suas estruturas podem ser visualizadas na tabela 1.

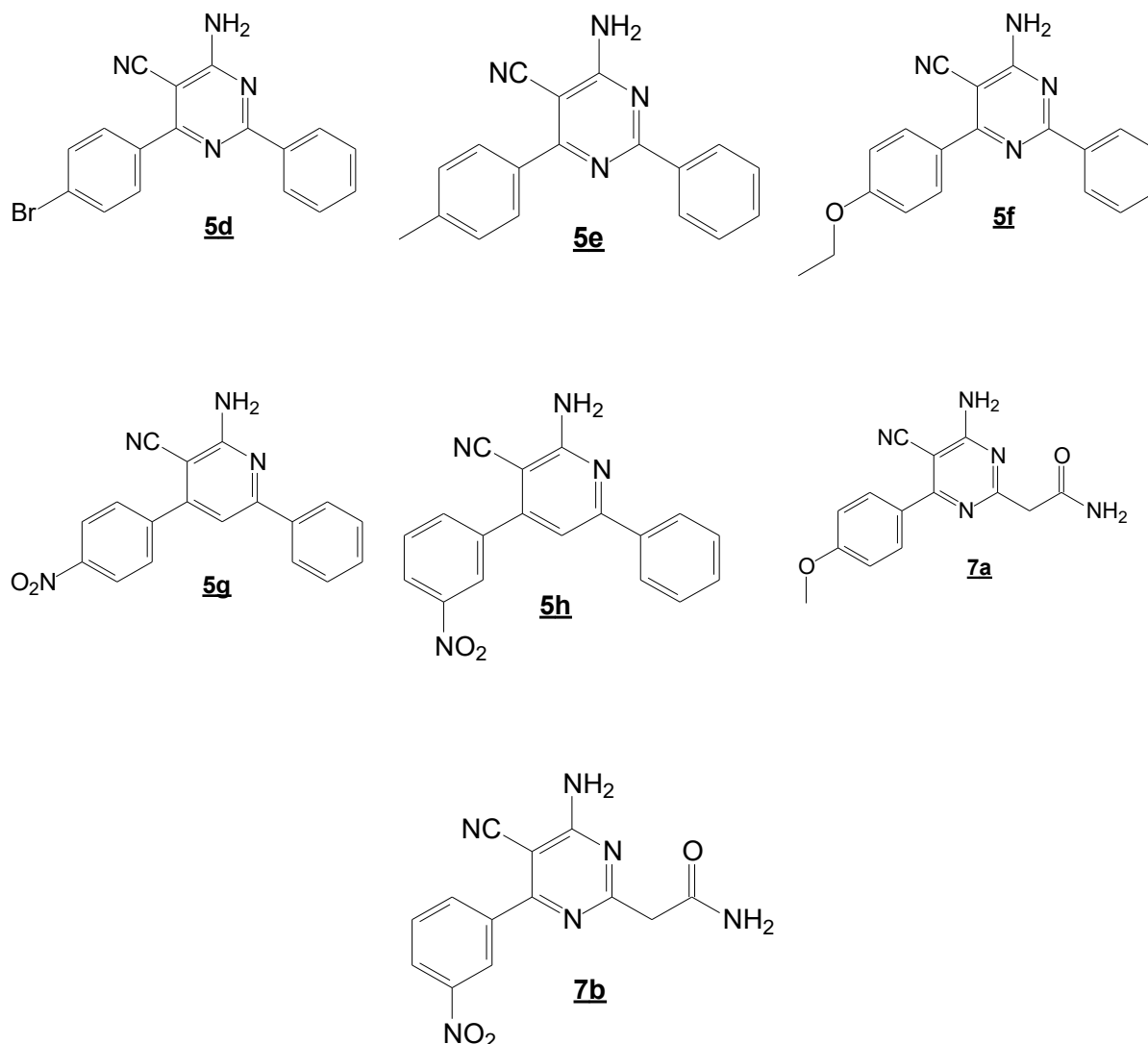
Figura 25 – Síntese para obtenção dos derivados 4-amino-5-cianopirimidinas.



Fonte: Produzida pelo autor.

Tabela 1 – Derivados 4-amino-5-cianopirimidinas desenvolvidos neste estudo.





Fonte – Produzida pelo autor.

Os dados espectrométricos dos compostos mostrados na tabela 1 estão dispostos a seguir:

4-amino-2-(p-fluorfenil)-6-fenilpirimidina-5-carbonitrila (5a): Este composto foi obtido como cristais brancos em 77% de rendimento; P.F.= 225 – 227°C; R_f = 0,52 (hexano/ acetato de etila 8:2); $\gamma_{max.}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3474, 3350, 2217, 1640; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 8,40 (2H, *dd*, J = 7,00 Hz); 8,07 (2H, *dd*, J = 8,08 Hz, J = 5,60 Hz); 8,00 (2H, *d*, NH_2); 7,43 – 7,58 (3H, *m*); 7,43 (2H, *t*, J = 8,80Hz). m/z (rel. int) 290 (M^+ , 100), 187 (78): [Encontrado com: C= 68,29; H= 3,82; N= 18,50; Calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{FN}_4 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$: C= 68,25; H= 4,04; N= 18,71%].

4-amino-6-(p-metoxifenil)-2-fenilpirimidina-5-carbonitrila (5b): Este composto foi obtido como cristais brancos em 54,6% de rendimento, PF 214 – 215°C; $R_f = 0,39$ (hexano/ acetato de etila, 8:2); (KBr, $\lambda_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3475 (NH_2 asymm), 3343 (NH_2 symm), 2217 (CN), 1638 (C=N); ^1H -RMN: (DMSO- d_6 , 300 MHz), δ 8,38 ppm (*m*, 2H), 7,12 ppm (*d*, 2H), 7,72 ppm (*s*, 2H, NH_2), 8,0 ppm (*d*, 2H), 7,52 ppm (*m*, 3H), 3,84 ppm (*s*, 3H, CH_3O), MS: m/z (rel. int.) 317 (M^+ , 100), 318 (49,66). Massa Molecular Calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O} \cdot 1/4\text{H}_2\text{O}$: C 61,44%; H 3,86%; N 19,90%. Massa Molecular Encontrada: C, 61,40%; H 3,75%; N 19,96%.

4-Amino-5-ciano-2-fenil-6-(p-formilbenzoato)-pirimidina (5c): Este composto foi obtido como cristais brancos em 37% de rendimento. P.F. 264,5 °C; $R_f = 0,38$ (hexano/ acetato etila, 7:3). ^1H e ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6): 8,4 ppm (2H, *d*, ArH); 7,57 e 7,53 ppm (3H, *t*, Ar-H, $J = 1,6$ Hz); 8,16 e 8,08 ppm (6H, *m*, ArH); 3,91 ppm (3H, *s*, CH_3); 164,09 ppm (1C, CN); 128,42 ppm (2C, Ar); 131,64 ppm (3C, Ar); 167,22 ppm (1C, C=O); 165,69 ppm (1C, Pir); 164,42 ppm (1C, Pir); 164,09 ppm (1C, CN); 140,79 ppm (1C, Ar); 136,37 ppm (1C, Ar); 131,43 ppm (1C, Ar); 130,3 ppm (2C, Ar); 129,02 ppm (1C, Ar); 129,21 ppm (2C, Ar); 128,51 ppm (2C, Ar); 116,02 ppm (1C, Pir); 84,9 ppm (1C, Pir); 52,4 ppm (1C, OCH_3). MALDI-TOF $[\text{M}+\text{H}]^+$ Massa Molecular Calculada $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ 331,1150 e Massa Molecular Encontrada 331.1226.

4-amino-6-(p-bromofenil)-2-fenilpirimidina-5-carbonitrila (5d): Este composto foi obtido como cristais brancos em 47% de rendimento, P.F. = 228 – 230°C, (KBr, $\lambda_{\max}/\text{cm}^{-1}$) 3447 cm^{-1} , 3358 cm^{-1} (NH_2), 2234 cm^{-1} (CN), 1627 cm^{-1} , 1613 cm^{-1} (C=N), 1557 cm^{-1} (Ar) cm^{-1} ; ^1H -RMN (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 3,85 ppm (3H, Br); 7,52 – 8,41 ppm (*m*, Ar e NH_2). HRMS (Micro-TOF) $[\text{M}+\text{H}]^+$ Massa Molecular Calculada $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{BrN}_4^+$ 353,0219 e Massa Molecular Encontrada 353,0255.

4-amino-6-(p-Toluilfenil)-2-fenilpirimidina-5-carbonitrila (5e): Este composto foi obtido como cristais brancos em 47% de rendimento F.P. = 208- 210 °C; IR (KBr, $\lambda_{\max}/\text{cm}^{-1}$) 3456 cm^{-1} , 3321 cm^{-1} (NH_2), 2208 cm^{-1} (CN), 1651 cm^{-1} , 1623 cm^{-1} (C=N), 1557 cm^{-1} (Ar); ^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 2,38 ppm (3H, *s*, CH_3), 7,42 – 8,20 ppm (*m*, Ar e NH_2); HRMS (Micro-TOF) $[\text{M}+\text{K}]^+$ Massa Molecular Calculada $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4$ 325,0849 e Massa Molecular Encontrada 325,1047.

4-amino-6-(p-etoxifenil)-2-fenilpirimidina-5-carbonitrila (5f): Este composto foi obtido como cristais brancos com 52% de rendimento, PF= 206 – 208 °C; IR, (KBr, $\lambda_{\max}/\text{cm}^{-1}$) 3433 cm^{-1} , 3368 cm^{-1} (NH_2), 2234 cm^{-1} (CN), 1634 cm^{-1} , 1616 cm^{-1} (C=N),

1559 cm^{-1} (Ar); ^1H -NMR, (300 MHz, DMSO-d_6) 3,81 ppm (3H, OC_2H_5), 7,47 – 8,22 ppm (*m*, Ar e NH_2). HRMS (Micro-TOF) $[\text{M}+2\text{Na-H}]^+$ Massa Molecular Calculada $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}^+$ 362,1108 e Massa Molecular Encontrada 362,9787.

4-amino-6-(*p*-nitrofenil)-2-fenilpirimidina-5-carbonitrila (5g): Este composto foi obtido como cristais brancos com 98 % de rendimento, P.F. 220 – 221, $R_f = 0,42$; (hexano/ acetato de etila 7:3); IR, KBr, $\gamma_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3436 ($\text{NH}_2\text{asymm.}$), 3326 ($\text{NH}_2\text{symm.}$), 2227 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1647 ($\text{C}=\text{N}$); ^1H – RMN δ : (DMSO-d_6 400 MHz), δ : 8,47 (*d*, 2H, $J = 1.8$ e 11.2 Hz); 8,59 (*s*, 2H); 8,05 (*d*, $J = 11.2$ Hz); 7,58 (*d*, 2H, $J = 11.2$ Hz) e 7,50 – 7,40 (*m*, 3H); ^{13}C –RMN (DMSO-d_6 400 MHz), δ : 166,3 (1C) e 164,2 (1C); 163,9 (1C); 162,3 (1C); 148,5 (1C); 135,9 (2C); 131,2 (2C); 127, (2C); 124,9 (1C); 112,6 (2C); 113,6 (1C); 84,9 (1C). HRMS MALDI–TOF (*m/z*) Massa molecular encontrada 318,1087 para $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ e Massa Molecular Encontrada 318,0984.

4-amino-6-(*m*-nitrofenil)-2-fenilpirimidina-5-carbonitrila (5h): Este composto foi obtido como cristais brancos com 98 % de rendimento, P.F. 221 – 222, $R_f = 0,41$; (hexano/ acetato de etila 7:3); IR (KBr, $\gamma_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$) 3494 ($\text{NH}_2\text{asymm.}$), 3388 ($\text{NH}_2\text{symm.}$) 2214 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1621 ($\text{C}=\text{N}$); ^1H –RMN (DMSO-d_6 400 MHz), δ : 8,78 (*t*, 1H, $J = 1,60$ Hz); 8,46 (*t*, 2H, $J = 8,4$ Hz); 8,43 (*d*, 2H, $J = 8.4$ Hz); 7,95 – 8,55 (*s*, 2H, NH_2); 7,91 (*t*, 1H) e 7,57–7,54 (*m*, 3H); ^{13}C –RMN (DMSO-d_6 300 MHz), δ : 166,0 (1C); 164,4 (1C); 164,2 (1C); 147,8 (1C); 138,0 (1C); 136,3 (1C); 135,0 (1C); 131,8 (1C); 130,3 (1C); 128, (2C); 128,4 (1C); 125,5 (1C); 123,3 (1C); 116,0 (2C) e 85,0 (1C). HRMS (MALDI-TOF MS: *m/z*) Massa molecular encontrada 318,0946 para $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, e Massa Molecular calculada 318,0984.

4-amino-6-(*p*-metoxifenil)-2-amidopirimidina-5-carbonitrila (7a): Este composto foi obtido como cristais brancos em 91% rendimento. ^1H e ^{13}C RMN (400 MHz, DMSO-d_6) 3,79 ppm (*s*, 3H, OCH_3), 6,52 – 6,58 ppm (2H, *m*, Ar e NH_2), 6,69 e 7,06 ppm (*m*, Ar, NH_2 amida), 2,99 e 1,65 ppm (2H, HCH amida), 6,99 – 7,27 ppm (4H, *m*, Ar), 105,9 ppm (1C, HCH amida), 168,7 ppm (1C, $\text{C}=\text{O}$), 160,3 ppm (1C, CN), 118 ppm (1C, Ar), 113,5 ppm (1C, Ar), 129,8 ppm (2C, Ar); 167,22 (2C, Ar), 118 ppm (1C, Pir), 158,3 ppm (1C, Pir), 77,8 ppm (1C, Pir), 152,3 ppm (1C, Pir). HRMS (Micro-TOF) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Massa Molecular calculada $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2$ 306,0961 e Massa Molecular Encontrada 306.0967.

4-amino-6-(*m*-nitrofenil)-2-amidopirimidina-5-carbonitrila (7b): Este composto foi obtido como cristais amorfos amarelos em 78% de rendimento; ^1H e ^{13}C RMN (400

MHz, DMSO- d_6), 6,72 – 6,68 ppm (2H, *m*, Ar e NH₂), 7,15 – 7,12 ppm (*m*, Ar, NH₂ amida), 2,97 e 1,65 ppm (2H, HCH amida), 7,73 – 8,31 ppm (4H, *m*, Ar), 106,4 ppm (1C, HCH amida), 168,0 ppm (1C, C=O), 160,3 ppm (1C, CN), 138,4 ppm (1C, Ar), 123,5 ppm (1C, Ar), 147,2 ppm (1C, Ar), 135,5 ppm (1C, Ar), 129,9 ppm (1C, Ar), 123,6 ppm (1C, Ar), 158,2 ppm (1C, Pir), 117,8 ppm (1C, Pir), 76,8 ppm (1C, Pir), 150 ppm (1C, Pir). HRMS (Micro-TOF) $[M+2Na-H]^+$ Massa Molecular calculada $C_{13}H_{11}N_6O_3^+$ 344,0598 e Massa Molecular encontrada 344,0364.

4.2 PREPARAÇÃO DE ALVOS E LIGANTES.

A estrutura do composto **ZN3F** (Figura 22 D) bem como, dos derivados pirimidínicos otimizados com base na estrutura do receptor (**5a-h** e **7a-b**), tabela 1, foram desenhadas e suas energias minimizadas utilizando o software BIOVIA Discovery Studio (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>). A estrutura cristalográfica da cruzaina de *T. cruzi* foi baixada do Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) com ID PDB: 3LXS.

4.3 DOCKING MOLECULAR E OTIMIZAÇÃO DE LEAD.

O docking molecular entre o ligante co-cristalizado **WWR-483**, o composto **ZN3F**, os compostos (**5a-h** e **7a-b**) e a 3LXS foi realizado utilizando o Molegro Virtual Docker, v. 6.0.1 (MVD). O *GRID* foi definido com um raio de 10 Å e 0,30 de resolução de modo a englobar todos os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da 3LXS. Parâmetros como algoritmo GPU *Screening* (CUDA), ES interno, *HBond* interno, torções sp^2-sp^2 , poses com RMSD inferior a 1,00, foram definidos no software. Os scores obtidos em KJ.mol⁻¹ foram gerados por cinco funções de pontuação distintas: GPU Score, MolDock Score [GRID], Rerank Score, Docking Score e Similarity Score. Foi realizada a análise de consenso de todos os scores obtidos através do método das Média das pontuações em escala automática (AASS) (BRYANT *et al.*, 2009). As melhores poses foram selecionadas e os compostos ranqueados em função da média consenso. Para a otimização de lead, as interações das melhores poses entre **WWR-483**, o composto **ZN3F** e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da 3LXS foram analisadas utilizando o software BIOVIA Discovery Studio

(<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>). Os compostos protótipos foram desenhados com base nessas interações e também foram analisadas no BIOVIA *Discovery Studio*.

4.4 PREVISÕES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS.

A análise do perfil farmacocinético e toxicológico dos compostos (**5a-h** e **7a-b**) foi realizada com base nas informações geradas pelo *software OSIRIS Property Explorer* (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

4.5 ILUSTRAÇÕES.

Ilustrações das interações entre ligantes e resíduos de aminoácidos foram realizadas usando o *BIOVIA Discovery Studio software* (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>).

4.6 ENSAIO *IN VITRO* DE FORMAS AMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS DE *T. CRUZI* DA CEPA TALAHUEN.

O teste *in vitro* da atividade tripanocida foi realizado utilizando *T. cruzi* (cepa Tulahuen) expressando o gene da β -galactosidase de *Escherichia coli*. Formas tripomastigotas infectantes foram obtidas através do cultivo em monocamadas de fibroblastos L929 de camundongos em meio RPMI-1640. Para o bioensaio, 4.000 células L929 foram adicionadas a cada poço de uma placa de 96 poços de fundo plano. Após incubação durante a noite, 40.000 tripomastigotas foram adicionados a cada poço e as células foram incubadas por 2 h. O meio contendo parasitas que não penetraram nas células foi substituído por 200 μ L de meio fresco e a placa foi incubada por mais 48 h para estabelecer a infecção. O meio foi então substituído por soluções de compostos em diferentes concentrações em meio fresco e a placa foi incubada por 96 h a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, 50 μ L de vermelho de clorofenol β -D-galactopiranósido 500 μ M em Nonidet P40 a 0,5% foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada por 16-20 h a 37°C, e em seguida a absorbância foi medida a 570 nm. Foram utilizados controles com células não infectadas, células

infectadas não tratadas, células infectadas tratadas com benznidazol (controle positivo) ou DMSO 1%. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição do crescimento do *T. cruzi* nas células testadas com o composto em comparação com as células infectadas e células não tratadas. Quadruplicados foram executados na mesma placa. A concentração inibitória de 50% (IC₅₀) foi determinada por interpolação linear com o auxílio do programa Excel.

4.7 CITOTOXICIDADE.

A citotoxicidade para células de mamíferos foi avaliada usando o ensaio alamarBlue®. Este sistema incorpora um indicador de oxidação-redução que fluoresce e muda de cor em resposta à redução química do meio de crescimento resultante do crescimento celular. A atividade metabólica inata das células resulta em uma redução química do alamarBlue® e a redução relacionada ao crescimento faz com que o indicador Redox mude da forma oxidada (não fluorescente, azul) para a forma reduzida (fluorescente, vermelha). Essa mudança pode ser medida usando análise espectrofotométrica

As células L929 foram semeadas em placas de 96 poços de fundo plano e incubadas por 72 h a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ para aderência. Os compostos foram então adicionados em concentrações de 0,78 a 100 µg/mL, seguido de incubação adicional por 96 h. Após 96 h de incubação com os compostos, o alamarBlue® foi adicionado e a absorbância foi lida em dois comprimentos de onda após 4-6 h usando o espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan FC. Controles com células não tratadas e tratadas com DMSO 1% foram executados em paralelo. Quadruplicados foram executados na mesma placa. Os resultados foram expressos como a diferença percentual na redução entre células tratadas e não tratadas usando a equação recomendada pelo fabricante. A concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) foi determinada por interpolação linear com auxílio do programa Excel.

4.8 ÍNDICE DE SELETIVIDADE

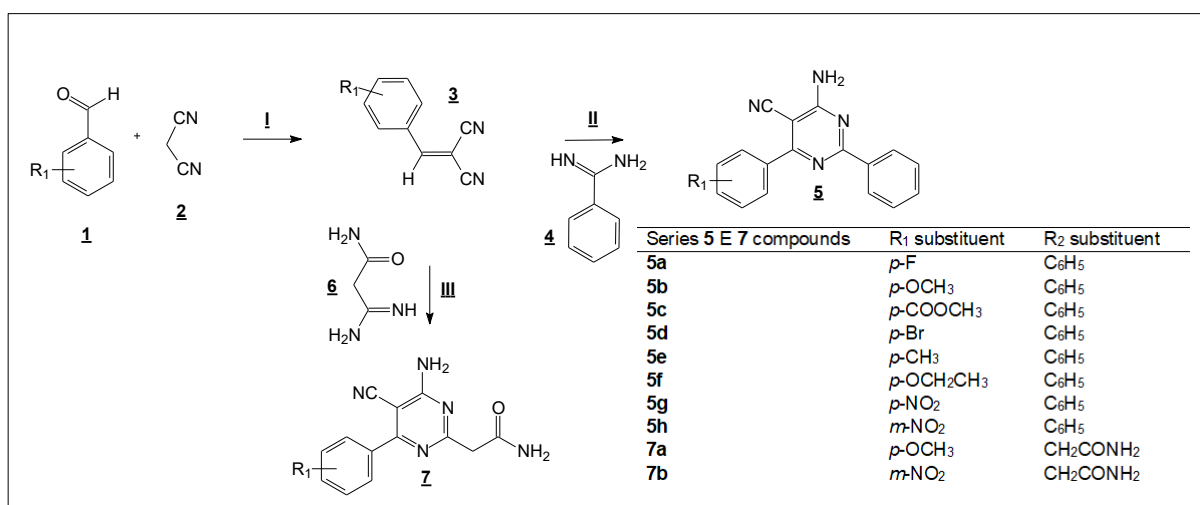
Para verificar o quanto os compostos foram seletivos para parasitas, foi calculado o índice de seletividade (IS) para a forma tripomastigota. IS consiste na

razão entre CC_{50} / IC_{50} . Valores mais altos de IS indicam maior especificidade para o parasita. Para a obtenção do IS, foram considerados os valores micromolares. Valores de IS menores que 1 foram considerados como não indicativos de seletividade parasitária (ROMANHA *et al.*, 2010).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção das pirimidinas **5a-h** e **7a-b** já é bem fundamentada, o processo sintético proposto inicia-se por benzaldeídos **1**, como material de partida, que são levados a reagir com a malononitrila **2** em meio metanólico sob refluxo, alcançando as bisnitrilas **3**. A condensação destes com arilamidinas **4** ou **6**, em meio metanólico, catalisada por trietilamina (TEA) ou piridina, sob refluxo, fornecem os 4-amino-5-ciano-2,6-diarilpirimidinas **5** e **7**, Figura 26 (MELO *et al.*, 2002).

Figura 26 – Rota sintética para obtenção das pirimidinas 4-amino-5carbonitrilas-2,6-substituídas **5** e **7**. Etapas I, II e III: CH₃OH, aquecimento e trietilamina.



Fonte – Produzida pelo autor.

O principal resultado esperado é a obtenção de novos derivados pirimidínicos **5c** e **7a-b** contendo o grupo metiléster e amida, grupamentos farmacofóricos que apresentam diversas atividades farmacológicas.

5.1 SÍNTESE DO ADUTO DE KNOEVENAGEL

O aduto **3** foi obtido através da condensação de Knoevenagel, por meio da reação de aldeídos **1** com a malonitrila **2** em meio básico (Figura 23), descrito por Patai (1960, apud FALCÃO *et al.*, 2006). Os produtos apresentam substituições variadas na posição *para* (F, OCH₃, CO₂CH₃, CH₃, Br, OCH₂CH₃, NO₂) e na posição

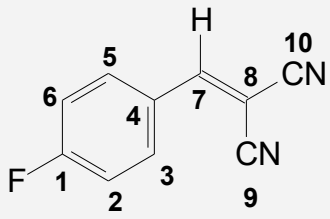
meta (NO₂) e foram obtidos com rendimentos acima de 80% por meio de recristalização em metanol à frio.

Foram obtidos oito tipos de produtos intermediários **3**, sendo apenas um inédito (substituinte CO₂CH₃, Ponto de Fusão 164,1°C). As bisnitrilas **3** são encontrados na forma de cristais de cor branca-amarelada, com R_f de aproximadamente 0,50 num sistema de hexano/ acetato de etila (8:2).

Os derivados **3** são compostos intermediários e seu uso é bem fundamentado na literatura (MELO *et al.*, 2002; FALCÃO *et al.*, 2006; MONTE *et al.*, 2020). Dessa forma, a fim de ratificar o sucesso desta etapa reacional um exemplar da bisnitrila **3** foi escolhido como modelo, apresentando na tabela 2 os sinais espectrométricos de RMN de ¹³C, ¹H e HMBC nas figuras 27, 28 e 29, respectivamente.

A escolha desta molécula para realizar a descrição dos sinais de RMN de ¹H e ¹³C foi devido a presença do átomo de flúor que provoca peculiaridades nos espectros de RMN. O átomo de flúor possui a característica de realizar acoplamentos com os átomos de ¹³C e ¹H. Através dos espectros de ¹H-RMN e do HMBC, figuras 28 e 29, podemos observar dois conjuntos de multipletos e um singlete na região dos aromáticos, formando um sistema de segunda ordem AA'BB' para-substituído.

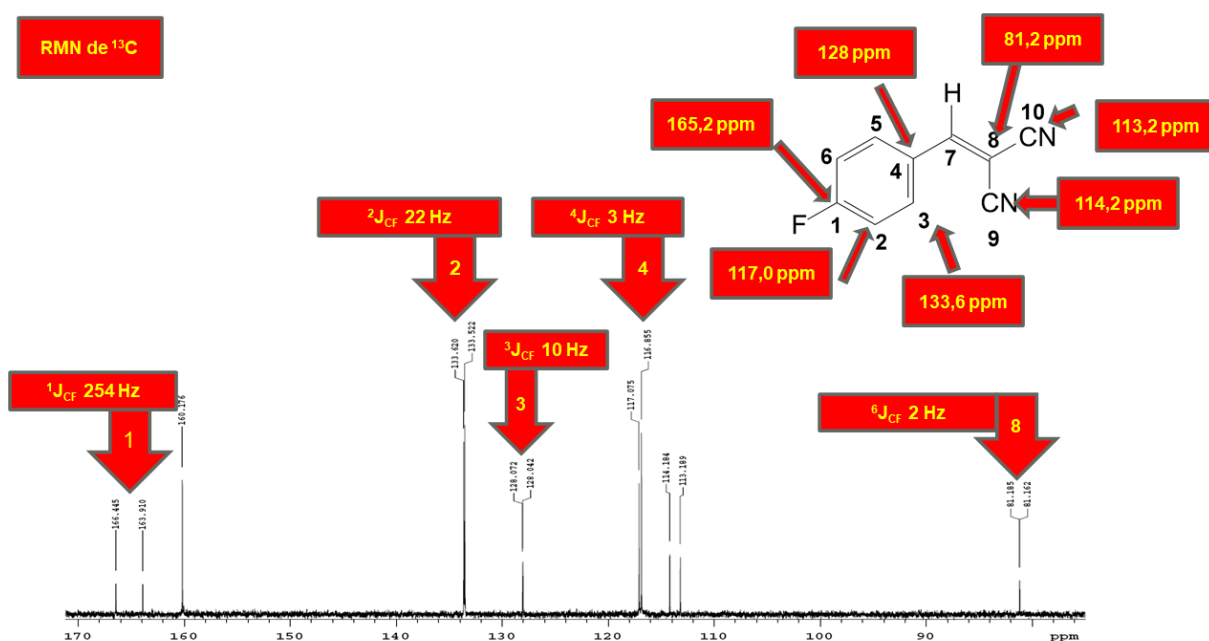
Tabela 2 – Sinais de RMN de ¹H e ¹³C de um exemplar do aduto Knoevenagel **3**.

			
Numeração dos sinais	¹ H-RMN (δ ppm)	¹³ C-RMN (δ ppm)	Acoplamentos com o átomo de F.
1	-	165,2	¹ J _{CF} 254 Hz
2	7,5 (m, 2H)	117,0	² J _{CF} δ 22 Hz
3	8,04 (m, 2H)	133,6	³ J _{CF} δ 10 Hz
4	-	128,0	⁴ J _{CF} δ 3 Hz
5	8,04 (m, 2H)	133,6	³ J _{CF} δ 10 Hz
6	7,5 (m, 2H)	117,0	² J _{CF} δ 22 Hz
7	8,54 (s, 2H)	160,2	-

8	-	81,2	${}^6J_{CF} \delta 2 \text{ Hz}$
9	-	114,2	-
10	-	113,2	-

Fonte: Produzida pelo autor.

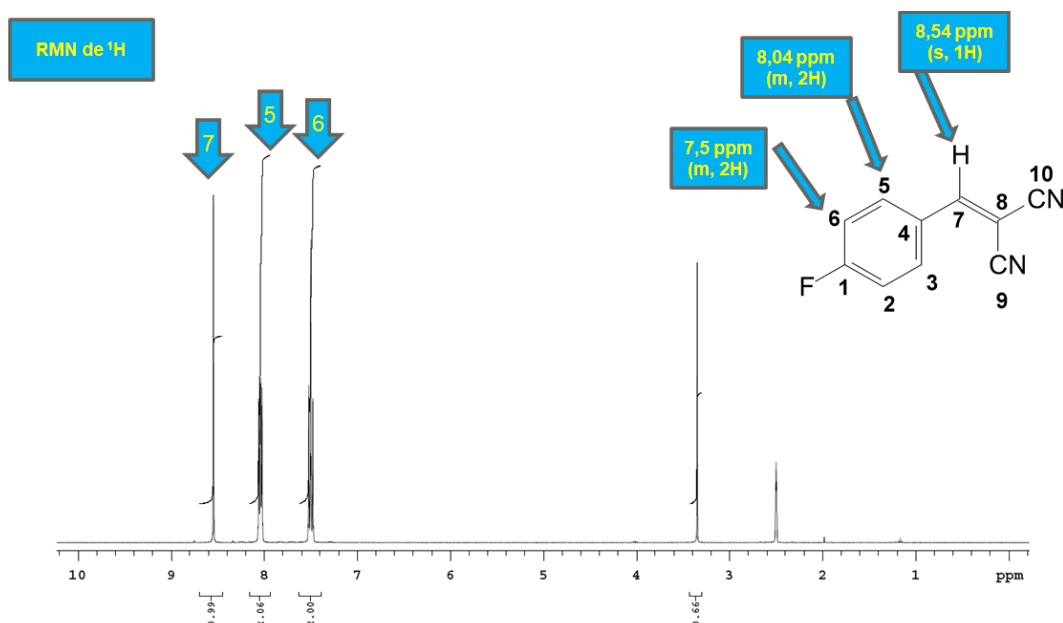
Figura 27 – Espectro de RMN de ${}^{13}\text{C}$ do aduto Knoevenagel **3** com substituição p-F. Sinais dos picos de RMN em ppm. Sinais dos acoplamentos em Hz.



Fonte – Produzida pelo autor.

O multipletos que se encontram entre δ 8,24 e 8,06 ppm correspondem aos dois hidrogênios *meta* e formam o acoplamento como átomo de flúor. Isto pode ser determinado devido aos acoplamentos entre hidrogênios H3 e H5 com o C7 vinílico (Figura 28). Por exclusão, o outro multipletos assinalados no δ 7,47–7,52 ppm correspondem a os hidrogênios 2 e 6, e também produzem um acoplamento com o flúor. Por fim, podemos encontrar o singletos δ 8,54 ppm que compreende o hidrogênio ligado ao carbono 7 da região vinílica

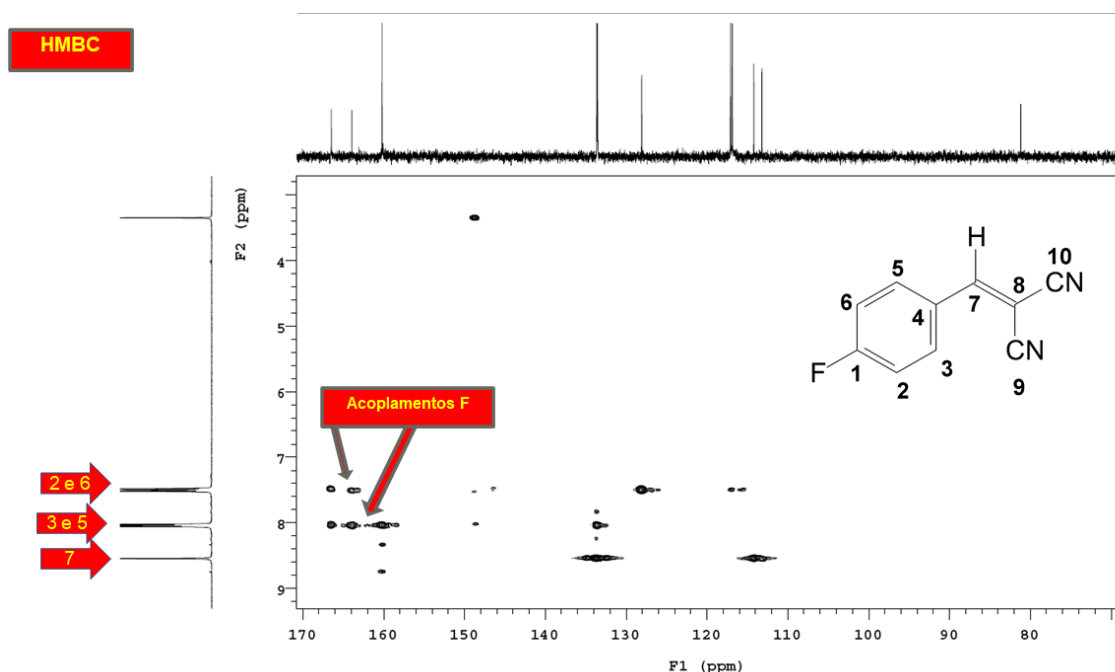
Figura 28– Espectro de RMN de ^1H do aduto Knoevenagel **3** com substituição p-F. Sinais dos picos de RMN em ppm.



Fonte – Produzida pelo autor.

Através do ^{13}C -RMN (Figura 27) foram observados os diversos acoplamentos entre os carbonos e átomo de flúor, na tabela 2 podemos ver os valores dos acoplamentos que abrangem um $^1J_{\text{CF}}$ δ 254 Hz do átomo ligado ao halogênio até $^6J_{\text{CF}}$ δ 2 Hz do carbono vinílico. Identificamos os respectivos carbonos da molécula através do espectro de HMBC (Figura 29) onde observamos os acoplamentos do C1 com o C3/C5 e C2/C6, C4 com C2/C6, C9 e C10 com C7, este último também acopla com C3/C5. Por fim, os carbonos C2 e C6 acoplam entre si., e o C8 sem acoplamento. Os sinais C9 e C10 produzem sinais diferentes devido ao efeito anisotrópico sobre a nitrila trans ao anel aromático.

Figura 29– Espectro de RMN-HMBC do aduto Knoevenagel **3** com substituição p-F. Sinais dos picos de RMN em ppm.



Fonte – Produzida pelo autor.

5.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS PIRIMIDÍNICOS

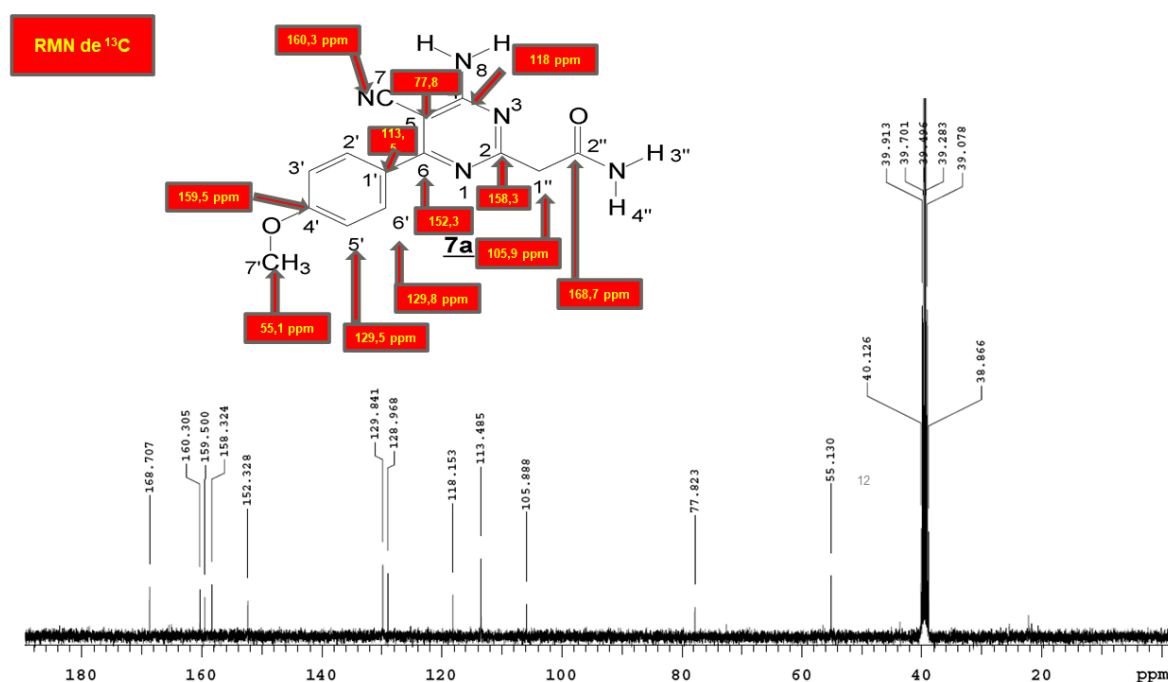
Com base nos resultados dos estudos computacionais realizados com o composto **ZN3F**, foram preparados os derivados 4-amino-5-carbonitrila-1,3-pirimidina contendo substituições aril e amida, e produzidos segundo metodologia descrita por (MELO *et al.*, 2002), a partir de reação sucessivas (Figura 26). Os compostos **5a-h** e **7a-b** foram obtidos, na forma de pós amorfos ou cristais, através de reações que apresentaram rendimentos entre 40-98%, podendo ser otimizado usando uma base orgânica mais forte como catalisadora.

Os derivados **5a**, **5b**, e **5d-h** expostos na tabela 1 já foram relatados em outros trabalhos do grupo (MELO *et al.*, 2002; FALCÃO *et al.*, 2006; ALEXANDRINO, 2011; MONTE *et al.*, 2020).

O principal resultado esperado nesta etapa de síntese é a obtenção dos novos derivados pirimidínicos **5c** e **7a-b** (Tabela 1) contendo o grupo metiléster e amida, respectivamente, grupamentos farmacofóricos que apresentam diversas atividades farmacológicas. Desta forma, apresentamos as Tabelas 3, 4 e 5, elencando os

principais sinais encontrados, e as Figuras 30 a 40 com os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , $g\text{COSY}$, HSQC e HMBC , além dos os espectros de Massas MALDI-TOF (Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo) na figura 45 (material suplementar), e os espectros de Micro-TOF estão descritos a seguir através das Figuras 46 a 50 (Material suplementar).

Figura 30– Espectro de RMN de ^{13}C da pirimidina **7a**. Sinais dos picos de RMN em ppm.

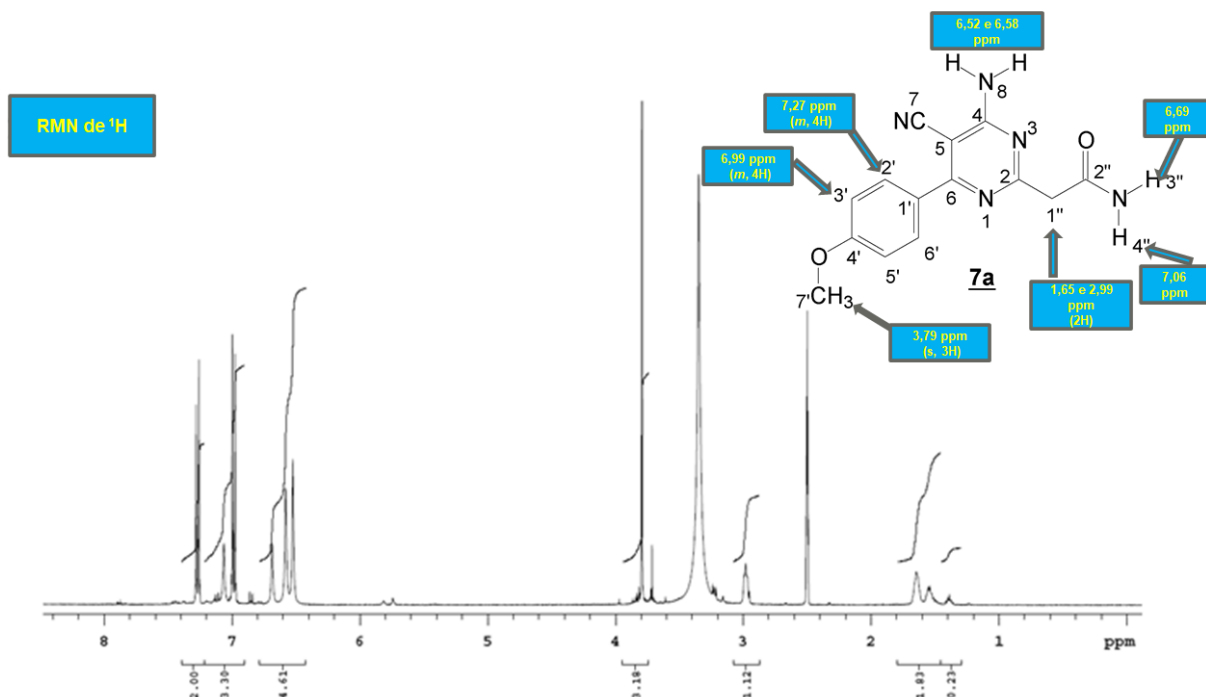


Fonte – Produzida pelo autor.

Portanto, podemos confirmar a síntese do composto **7a** através dos espectros de RMN de ^{13}C , ^1H , e do bidimensionais HMBC (Figuras 30, 31 e 32, respectivamente). Para esta descrição vamos distribuir os sinais através das regiões da amida e dos anéis pirimidínico e benzênico. Quando observamos o espectro de ^{13}C RMN (Figura 30) percebemos que há 12 sinais de carbono, o que converge com nossa estrutura (Tabela 3) que possui um esqueleto com anel benzênico e substituintes em *para*, com quatorze carbonos. Primeiramente identificamos a região corresponde ao C7' e H7', que possuem os sinais δ 55,1 ppm e 3,79 ppm, respectivamente, característicos de metoxila. No HMBC (Figura 32) vimos o acoplamento $^3J_{\text{CH}}$ do hidrogênio H7' em três ligações com o sinal em δ 159,5 ppm, correspondendo ao C4' que concomitantemente

acopla com outros dois hidrogênios no δ 7,27 ppm, que podemos determinar que são os H2' e H4' na região de multiplete aromático (4H) e seus respectivos carbonos, C2' e C4', δ em 129,8 ppm.

Figura 31– Espectro de RMN de ^1H da pirimidina **7a**. Sinais dos picos de RMN em ppm.



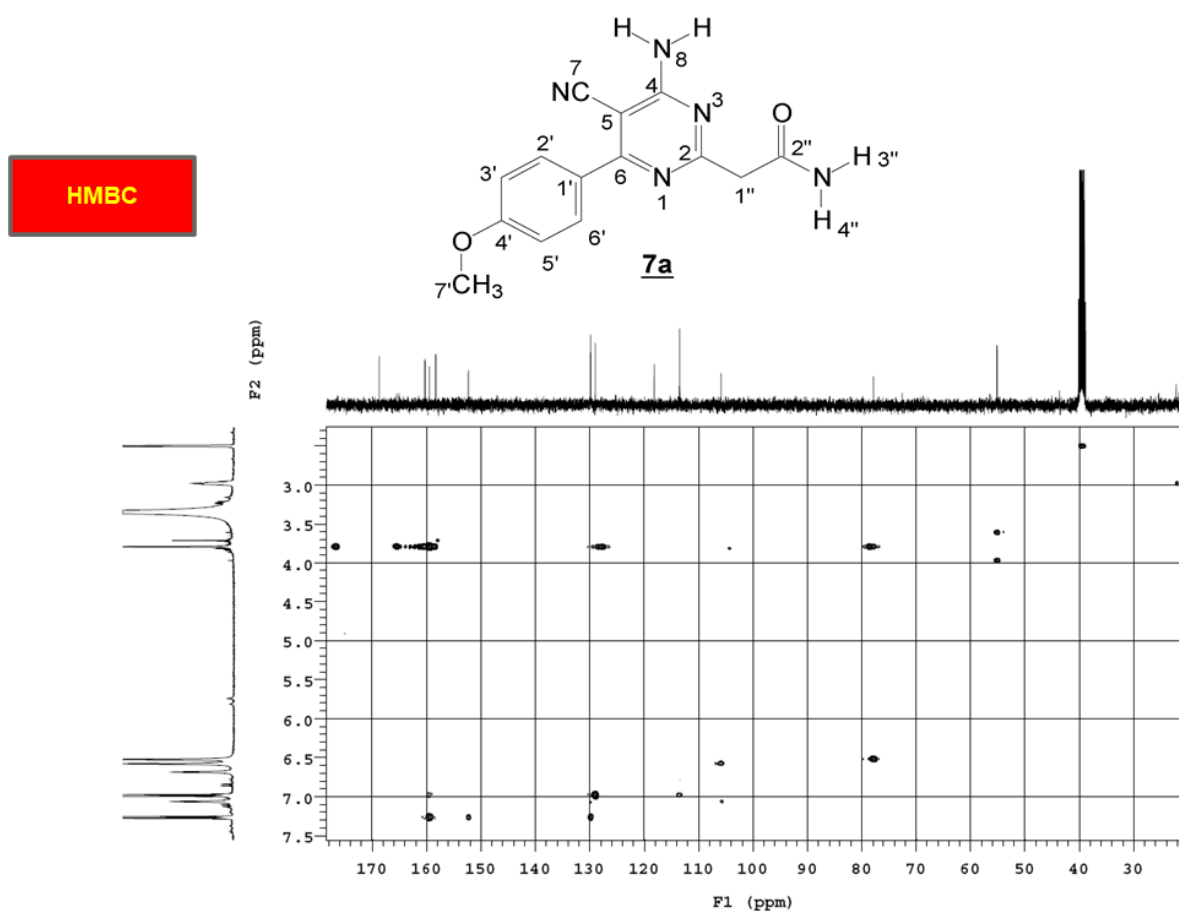
Fonte – Produzida pelo autor.

Os outros sinais que fazem parte do multiplete de 4 hidrogênios, característicos de sistema de segunda ordem AA'BB' *para*-substituído, podem ser observados no δ 6,99 ppm (H3' e H5') e, portanto, seus respectivos carbonos (C3' e C5') no δ 129,5 ppm. Para concluir a elucidação da região do anel benzeno podemos identificar um acoplamento $^3J_{CH}$ entre os sinais H3' e H5' e o carbono C1' que encontramos no δ 113,5 ppm.

Quando focamos na caracterização da amida, visualizamos na região de mais baixo campo um sinal de δ 168,7 ppm, caracterizando um carbono de carbonila. Também podemos destacar os hidrogênios ligados ao C1'' (105,9 ppm), pois se comportam como diasterotópicos nos δ 2,99 e 1,65 ppm. Contudo, para determinação dos hidrogênios ligados aos átomos de nitrogênio fizemos observações através do HMBC, onde identificamos dois sinais de acoplamentos $^3J_{CH}$, um primeiro na região

de médio campo, o que caracteriza não fazer parte de nenhum anel aromático, logo deduzimos que corresponderia ao C1'', pois acopla com os sinais que compreendem a região de hidrogênio de amidas nos δ 6,69 e 7,06 ppm (H3'' ou H4''). Deduzimos que os picos H3'' e H4'' são da amida por apresentar o efeito amida, quando há impedimento de livre rotação, cujo resultado é uma maior separação entre os sinais de hidrogênio geminal do nitrogênio.

Figura 32 – Espectro de RMN HMBC da pirimidina **7a**. Sinais dos picos de RMN em ppm.

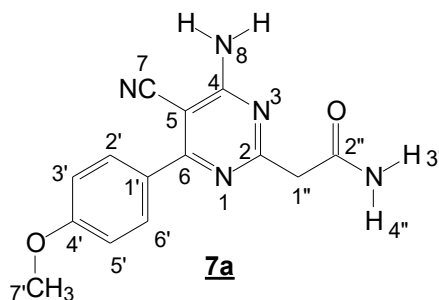


Fonte – Produzida pelo autor.

O outro acoplamento $^3J_{CH}$ acontece entre as aminas (δ 6,58 e 6,52 ppm), que estão ligadas diretamente ao anel pirimidínico, e o carbono do anel diazólico C5 (δ 77,8 ppm). Dentre os sinais que estão faltando para identificar os carbonos do anel pirimidínico, temos o C6 no δ 152,3 ppm que forma um acoplamento $^3J_{CH}$ entre os hidrogênios H2' e H4'. Em seguida, supomos que a presença do C2 entre dois

nitrogênios aromáticos correspondesse ao sinal no δ 158,3, encontrado no campo mais baixo. E por fim, o C4 sendo o sinal no δ 118,0 ppm.

Tabela 3 – Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **7a**. Os sinais de 2–8 são do heterociclo pirimidina. Os sinais de 1'–7' são do anel benzeno ligado ao C6 pirimidínico. Os sinais de 1''–4'' são correspondentes ao substituinte amida conectado ao C2 do esqueleto pirimidínico derivado **7a**.

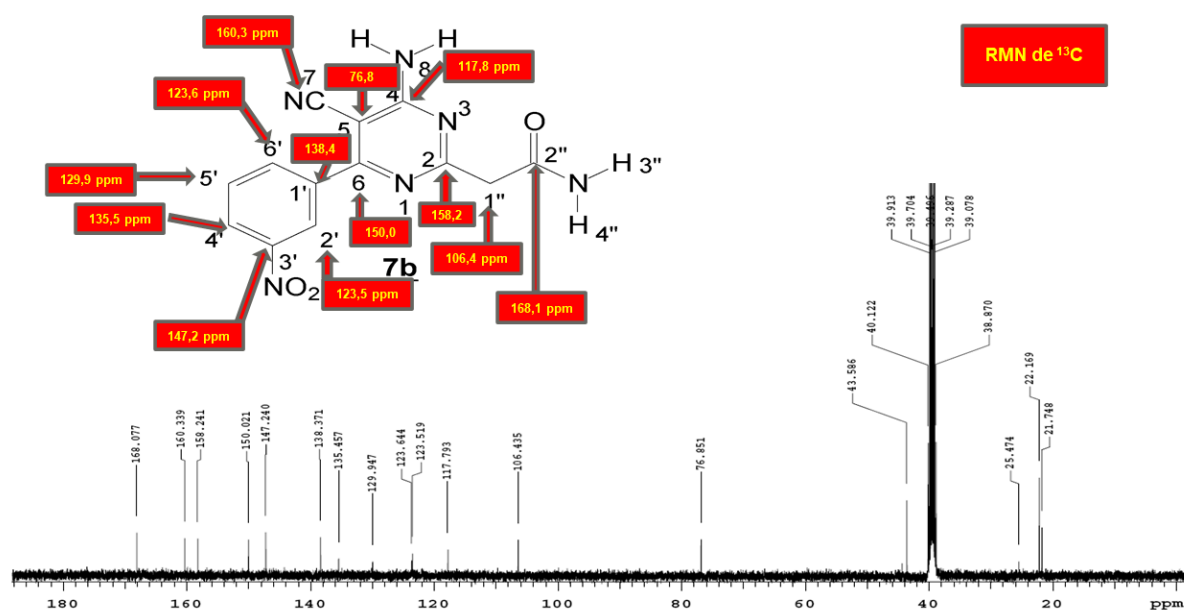


Numeração dos sinais	^1H -RMN (δ ppm)	^{13}C -RMN (δ ppm)
2	-	158,3
4	-	118,0
5	-	77,8
6	-	152,3
7	-	160,3
8	6,58 e 6,52	-
1'	-	113,5
2'	7,27 (m, 4H)	129,8
3'	6,99 (m, 4H)	129,5
4'	-	159,5
5'	6,99 (m, 4H)	129,5
6'	7,27 (m, 4H)	129,8
7'	3,79 (s, 3H)	55,1
1''	1,65 e 2.99	105,9
2''	-	168,7
3''	6,69	-
4''	7,06	-

Fonte: Produzida pelo autor

Para elucidação espectrométrica do composto **7b** recorremos aos RMN de ^{13}C , ^1H , gCOSY e HSQC (Figuras 33–36). Além desses espectros, utilizamos a experiência da caracterização do derivado **7a**, que nos facilitou para identificação do grupamento amida, e também através de outro trabalho do grupo de pesquisa, pois fizemos correlações com o composto nitro-substituído em meta produzido por Do Monte *et al* (2016).

Figura 33 – Espectro de RMN de ^{13}C da pirimidina **7b**. Sinais dos picos de RMN em ppm.



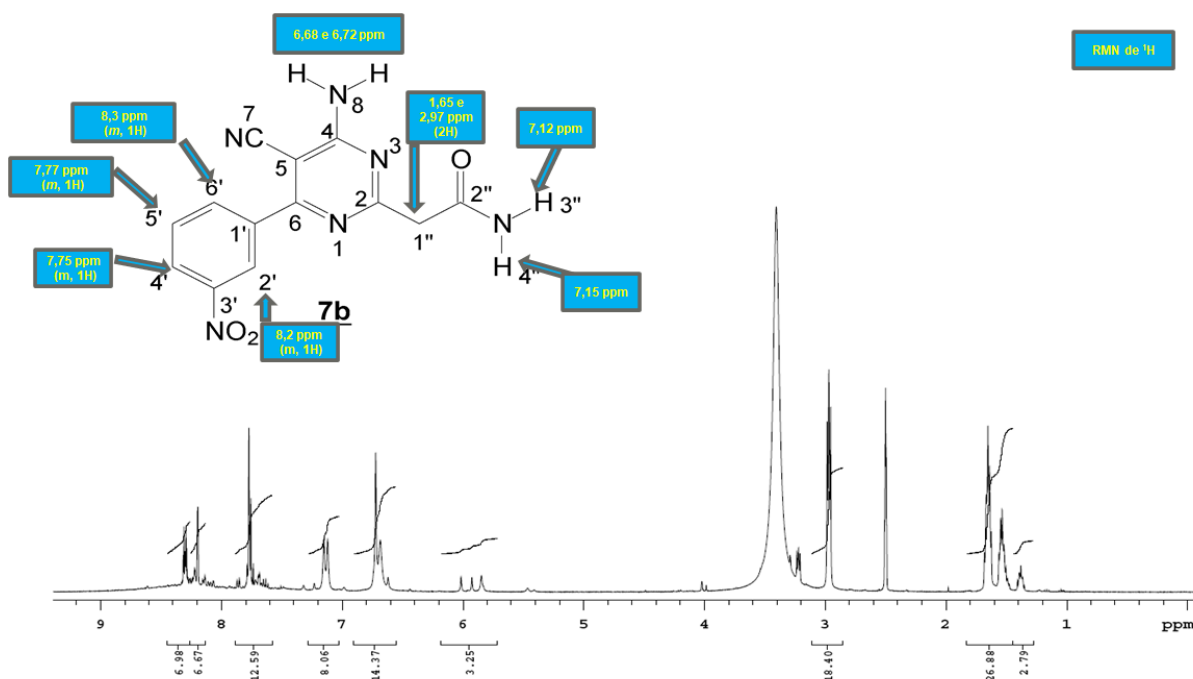
Fonte: Produzida pelo autor

Mantendo o roteiro de caracterização dos compostos por seções de grupamentos farmacofóricos, direcionamos esta fase ao anel pirimidínico e, desta forma, identificamos diretamente os carbonos do anel diazólico, sendo C2 em 158,2 ppm, C4 no δ 117,8 ppm, C5 no δ 76,8 ppm, C6 δ em 150,0 ppm, e C7 (CN) no δ 160,3 ppm. Podemos afirmar que tal determinação pode ser aceita devido aos espectros já caracterizados pelo composto **7a**, que pela similaridade estrutural também ratifica os sinais identificados no derivado **7b**.

Para identificar a caracterização do anel benzênico da molécula **7b** tomamos mão dos espectros gCOSY e HSQC (Figuras 35 e 36), que através dos acoplamentos $^1J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{HH}}$, respectivamente, nos permitiu confirmar os sinais em *meta*-substituição. Visualizamos um sistema de segunda ordem AA'BB' para a região de multipletos dos

aromáticos entre δ 7,12–8,32 ppm (Tabela 4). Em δ 8,2 ppm (*m*, 1H) para o H2' e o respectivo carbono C2' através do HSQC, podemos confirmar o sinal para o H2', pois no espectro de gCOSY não há nenhum hidrogênio acoplado $^3J_{HH}$ diretamente com H2'. Através do HSQC podemos identificar o H6' (δ 8,30 ppm) acoplando $^1J_{CH}$ com o C6' (δ 123,6 ppm), o H4' (δ 7,75 ppm) acoplando $^1J_{CH}$ com C4' (δ 135,5 ppm), o H5' (δ 7,77 ppm) com o C5' (δ 129,9 ppm). Pelo gCOSY podemos identificar acoplamentos $^3J_{HH}$ entre o H5', e os hidrogênios H4' e H6' na região de multiplete δ 7,78–8,32 ppm (*m*, 4H), confirmando o sistema *meta*-substituído.

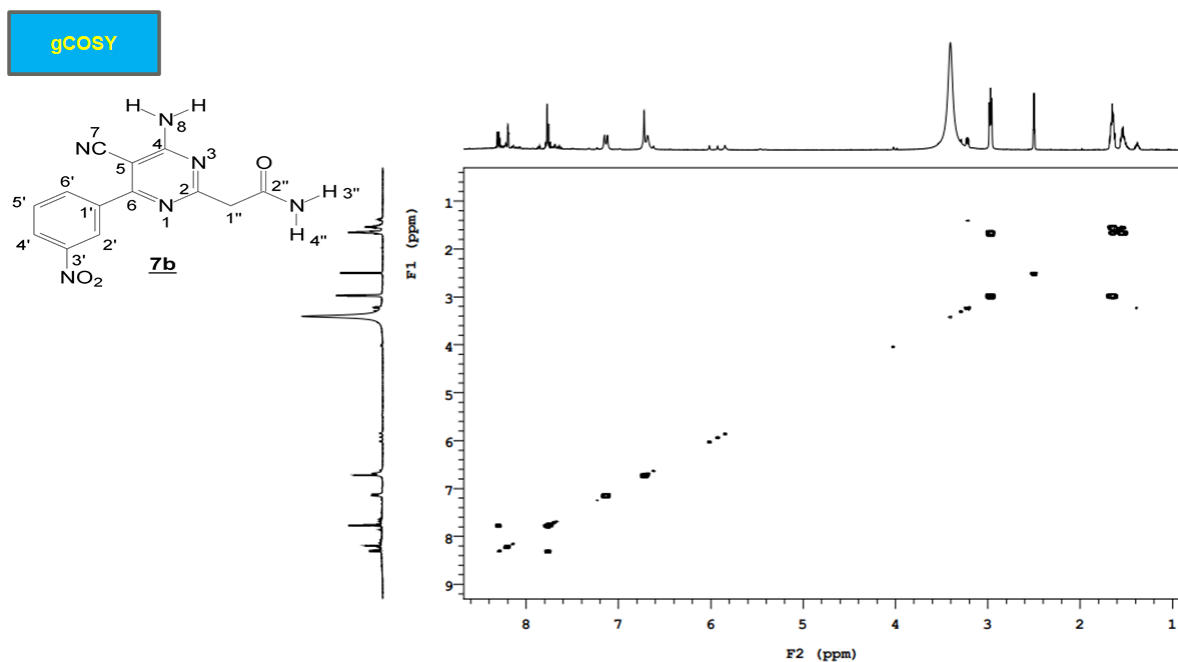
Figura 34 – Espectro de RMN de ^1H da pirimidina **7b**. Sinais dos picos de RMN em ppm.



Fonte: Produzida pelo autor.

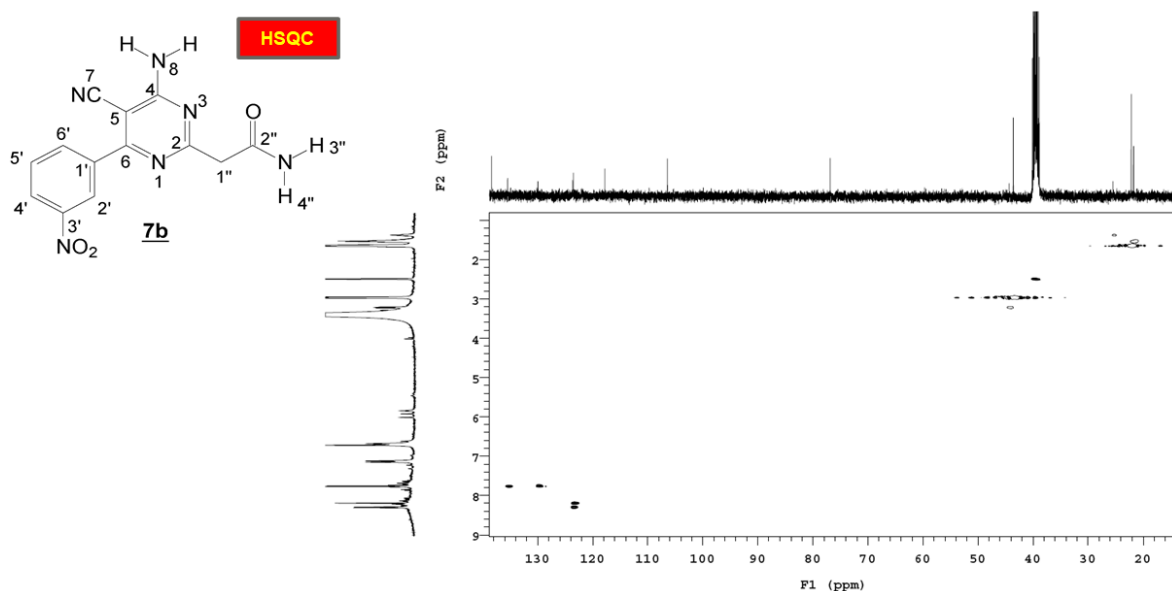
Utilizando como referência o trabalho de Do Monte *et al.* (2016) podemos identificar os carbonos quaternários do anel benzênico para o C1' no δ 138,4 ppm; e o C3' δ 147,2 ppm como mais desblindado, por estar ligado diretamente ao grupo nitro. Além disso, podemos distinguir os hidrogênios ligados aos nitrogênios, pois determinamos que os sinais da amina ligada ao anel pirimidina estão δ em 6,68 e 6,72 ppm.

Figura 35 – Espectro de gCOSY da pirimidina **7b**. Sinais dos picos de RMN em ppm.



Fonte: Produzida pelo autor.

Figura 36 – Espectro de HSQC da pirimidina **7b**. Sinais dos picos de RMN em ppm

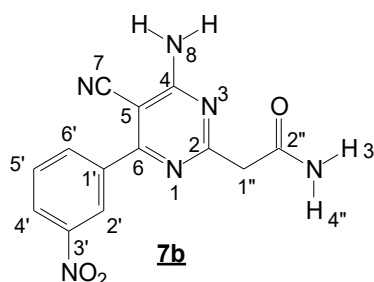


Fonte: Produzida pelo autor.

Desta forma, tendo como parâmetros os espectros que nos auxiliaram na identificação do composto **7b**, podemos apontar que os sinais no δ 2,97 e 1,65 ppm mantêm as características diasterópicas dos hidrogênios do carbono C1'' (δ 106,4 ppm) conectado a amida, finalmente identificamos o sinal mais desblindado que

corresponde ao carbono da carbonila C2'' em 168,1 ppm. Um fato interessante foi que a presença do substituinte nitro do composto **7b** parece ter influenciado na aproximação dos sinais dos hidrogênios da amida em 7,12 e 7,15 ppm, em relação ao que vimos no composto **7a**.

Tabela 4 – Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **7b**. Os sinais de 2-8 são do heterociclo pirimidina. Os sinais de 1'–7' são do anel benzeno ligado ao C6 pirimidínico. Os sinais de 1'' – 4'' são correspondentes ao substituinte amida conectado ao C2 do esqueleto pirimidínico derivado **7b**.

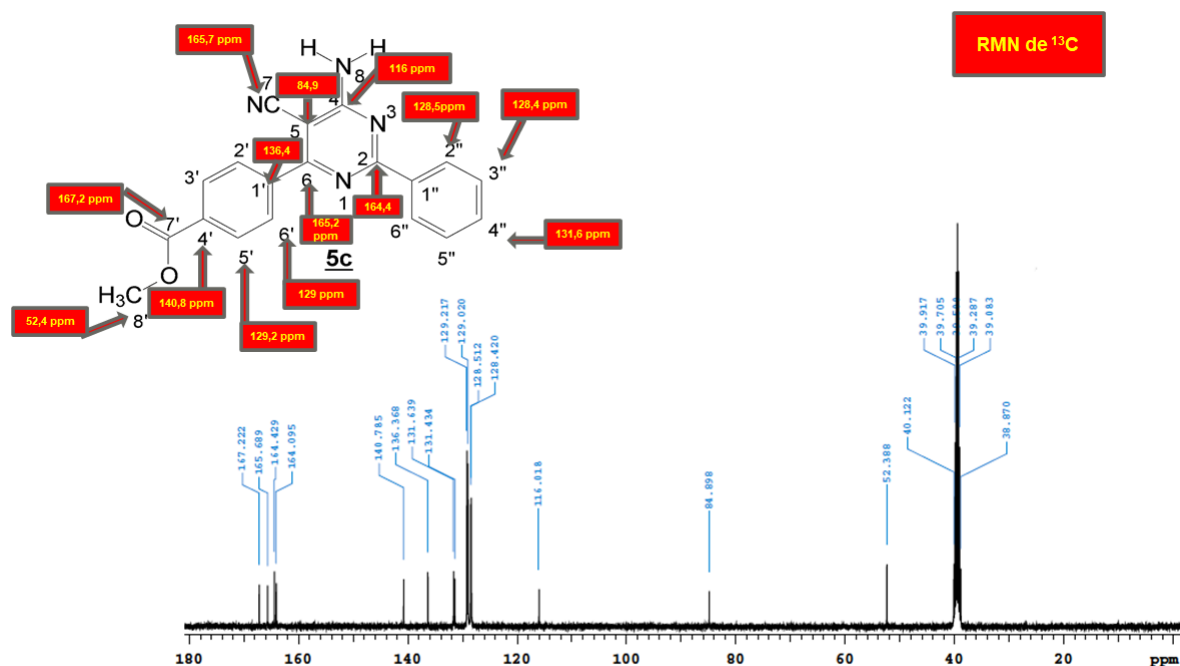


Numeração dos sinais	^1H -RMN (δ ppm)	^{13}C -RMN (δ ppm)
2	-	158,2
4	-	117,8
5	-	76,8
6	-	150,0
7	-	160,3
8	6,72 e 6,68	-
1'	-	138,4
2'	8,2 (<i>m</i> ,1H)	123,5
3'	-	147,2
4'	7,75 (<i>m</i> ,1H)	135,5
5'	7,77 (<i>m</i> ,1H)	129,9
6'	8,30 (<i>m</i> ,1H)	123,6
1''	1,65 e 2,97	106,4
2''	-	168,1
3''	7,12	-
4''	7,15	-

Fonte: Produzida pelo autor.

A atribuição para os 15 sinais de RMN de ^{13}C (Figura 37) do composto **5c** só foi possível usando os espectros de HSQC e gCOSY (Figuras 39 e 40), juntamente com os estudos de elucidação dos compostos **7a** e **7b**, e o trabalho de Do Monte *et al.* (2016). Este último responsável por uma elucidação criteriosa de alguns derivados do tipo **5**. Desta forma, a partir do espectro de ^1H -RMN observamos a presença de um sistema de segunda ordem AA'BB' do tipo *para*-substituído. Podemos verificar pelo gCOSY um acoplamento ($^3J_{HH}$) entre os hidrogênios δ 7,55 ppm (*m*, 3H) e δ 8,39 ppm (*m*, 2H). Estes sinais nos indicam que os H2'', H4'' e H6'' são multipletos de δ 7,55 ppm, acoplando com os hidrogênios H3'' e H5'' de δ 8,39 ppm. Através Do Monte *et al.* (2016) e o HSQC podemos verificar que o sinal de δ 128,4 ppm corresponde aos carbonos C3'' e C5'', e o sinal δ de 128,5 ppm são os carbonos C2'' e C6''. E por último, os carbonos C4'' (δ 131,4 ppm), e o C1'' (δ 131,6 ppm) que liga o anel benzeno ao anel pirimidínico.

Figura 37 – Espectro de RMN de ^{13}C da pirimidina **5c**. Sinais dos picos de RMN em ppm.

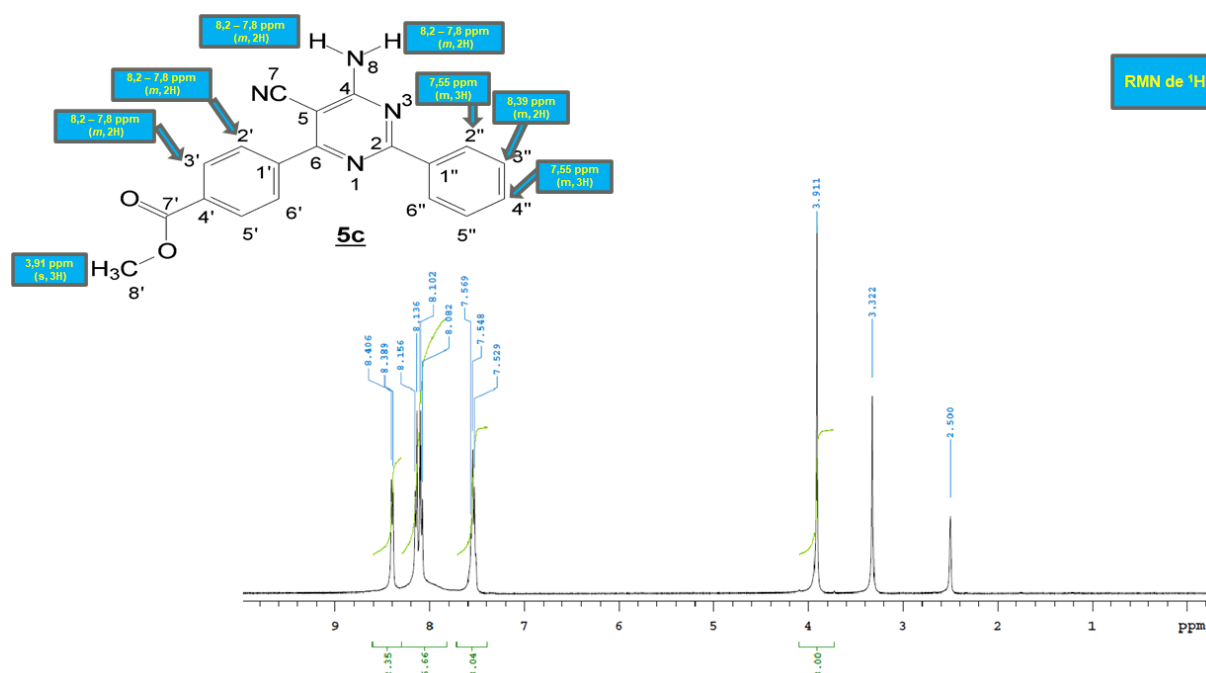


Fonte: Produzida pelo autor.

Através do ^{13}C -RMN podemos identificar sinais no campo baixo δ em 167,2 ppm que caracteriza o carbono de carbonila correspondente ao C7', e no campo alto

o sinal que é característico de carbonos ligados a oxigênio, e desta forma, aponta para o grupo metoxila δ em 52,3 ppm para o C8'. Quando avaliamos o HSQC (Figura 39), detectamos a interação entre o C8' e o hidrogênio δ em 3,91 ppm que corresponde ao H8' (s, 3H). Com o HSQC podemos determinar o sistema *para*-substituído AA'BB', onde os carbonos C2' e C3' provocam sinais bem próximos δ em 129,0 e 129,2 ppm, respectivamente. O sinal C2' possui a mesma correspondência do C6' δ em 129,0 ppm por sofrer uma menor influência de desblindagem do anel pirimidínico, enquanto os sinais iguais de C3' e C5' estão localizados no δ 129,2 ppm. O estudo de Do Monte *et al.* (2016) nos auxiliou para identificação dos carbonos quaternários do anel *para*-substituído, conseguindo apontar que o sinal δ 136,4 ppm corresponde ao C1', por estar ligado a uma carbonila, portanto, mais desblindado. E o último sinal do RMN- ^{13}C determinamos que o δ em 140,8 ppm é o C4'. Por fim, identificamos que os dois hidrogênios do grupo amino estão o localizados no conjunto de sinais de segunda ordem AA'BB do sistema *para*, correspondendo a parte dos seis hidrogênios do multipeto no δ 7,8–8,2 ppm.

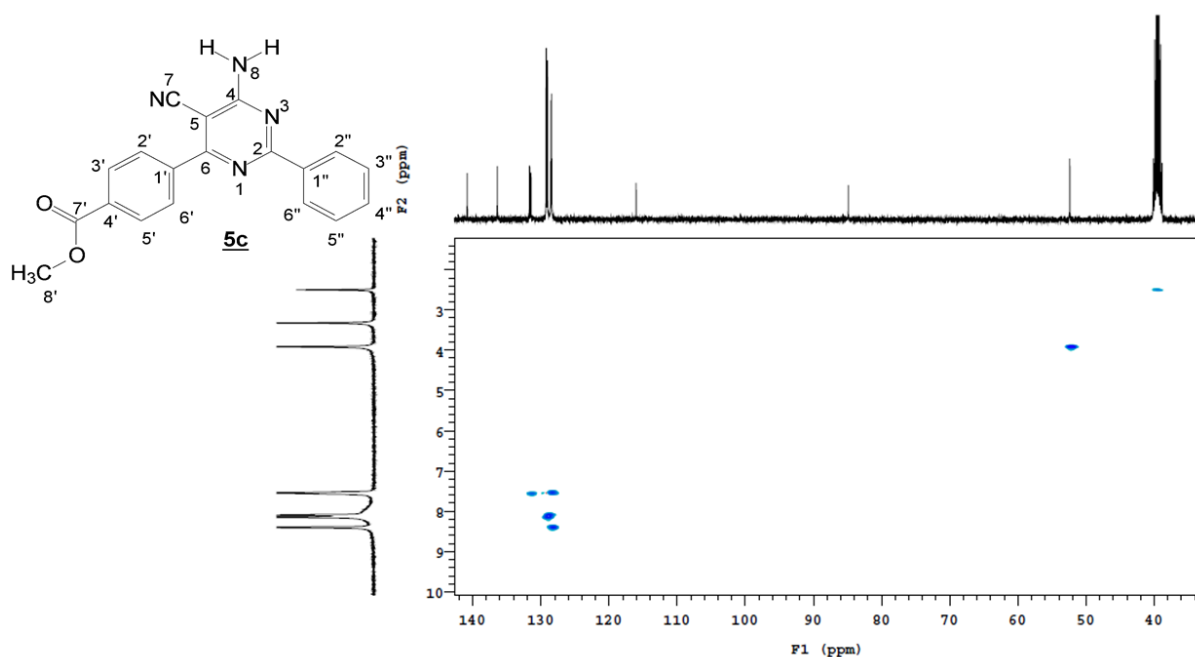
Figura 38 – Espectro de RMN de ^1H da pirimidina **5c**. Sinais dos picos de RMN em ppm.



Fonte: Produzida pelo autor.

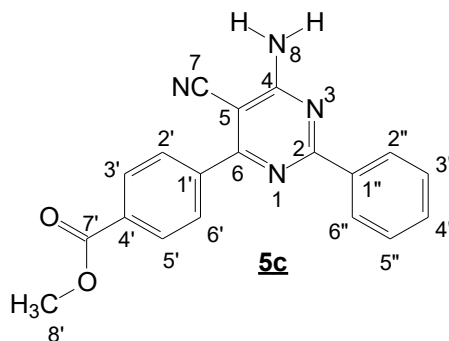
Realizando uma comparação entre os sinais de RMN ^1H e ^{13}C do composto **5c** (pertencente aos derivados **5**), e dos compostos **7a** e **7b**, conseguimos supor que os valores δ para os carbonos C2 (δ 164,4 ppm), C5 (δ 84,9 ppm) e C6 (δ 164,1 ppm) do compostos **5c** são encontrados no campo mais baixo. Desta forma, parecem sofrer alguma influência do anel benzeno ligado a esses carbonos, provocando uma maior desblindagem. A presença do anel aromático também interage com a nitrila (C7, δ 165,7 ppm), e os hidrogênios do grupo amino (8,1 ppm) promovendo o deslocamento dos sinais para o campo mais baixo.

Figura 39 – Espectro de HSQC da pirimidina **5c**. Sinais dos picos de RMN em ppm.



Fonte: Produzida pelo autor

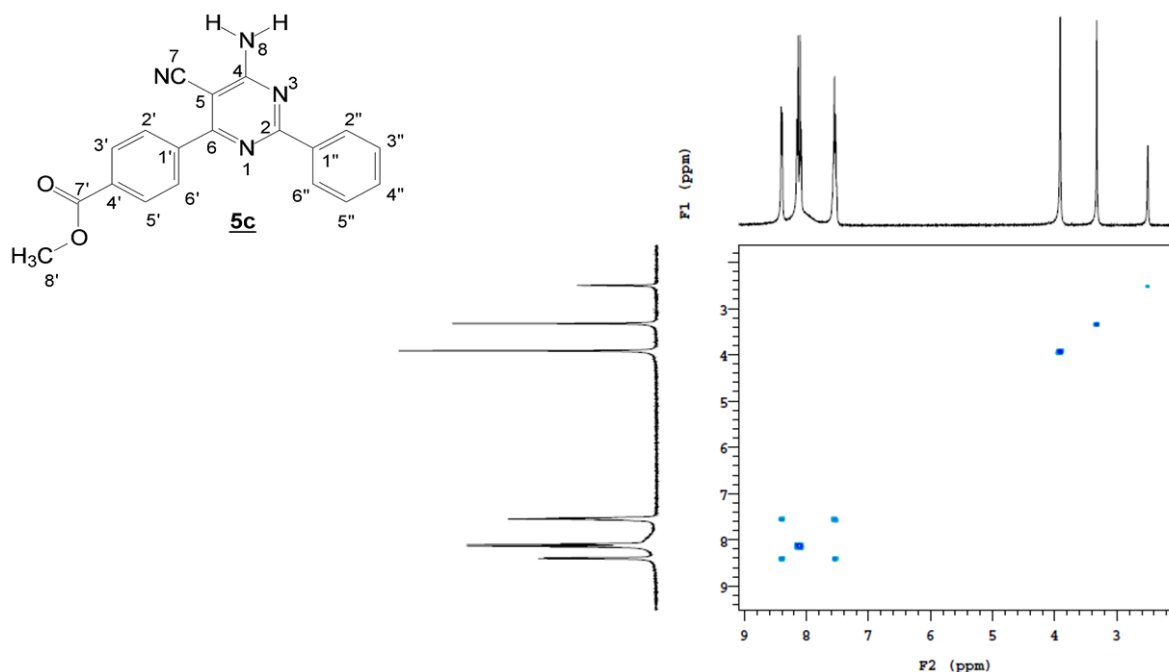
Tabela 5 – Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **5c**. Os sinais de 2-8 são do heterociclo pirimidina. Os sinais de 1'-8' são do anel benzeno ligado ao C6 pirimidínico. Os sinais de 1''-6'' são correspondentes ao substituinte fenil conectado ao C2 do esqueleto pirimidínico do derivado **5c**.



Numeração dos sinais	^1H -RMN (δ ppm)	^{13}C -RMN (δ ppm)
2	-	164,4
4	-	116,0
5	-	84,9
6	-	164,1
7	-	165,7
8	8,2 – 7,8 (<i>m</i> , 2H)	-
1'	-	136,4
2'	8,2 – 7,8 (<i>m</i> , 4H)	129,0
3'	8,2 – 7,8 (<i>m</i> , 4H)	129,2
4'	-	140,8
5'	8,2 – 7,8 (<i>m</i> , 4H)	129,2
6'	8,2 – 7,8 (<i>m</i> , 4H)	129,0
7'	-	167,2
8'	3,91	52,4
1''	-	131,4
2''	7,55 (<i>m</i> , 3H)	128,5
3''	8,39 (<i>m</i> , 2H)	128,4
4''	7,55 (<i>m</i> , 3H)	131,6
5''	8,39 (<i>m</i> , 2H)	128,4
6''	7,55 (<i>m</i> , 3H)	128,5

Fonte: Produzida pelo autor.

Figura 40– Espectro de gCOSY da pirimidina **5c**. Sinais dos picos de RMN em ppm.



Fonte: Produzida pelo autor.

Motivados pela boa atividade do composto **ZN3F** contra *T. cruzi* ($CI_{50} = 13,96 \pm 0 \mu M$ e $SI = 14,58$) (DE MELO *et al.*, 2018b) e a pela necessidade de desenvolver novos medicamentos para o tratamento da doença de Chagas, estudos de docking molecular de derivados contendo o núcleo pirimidínico **5** foram realizados a fim de otimizar a atividade tripanocida e identificar novos inibidores da enzima cruzaina .

5.3 SELEÇÃO E REDOCKING DE CRUZAÍNA.

A cruzaina é a principal cisteína protease do *T. cruzi*, sendo expressa ao longo de toda a vida do parasita e desempenhando importantes funções na sua sobrevivência (CHEN *et al.*, 2010). Estudos mostraram que estruturalmente, a cruzaina é altamente homóloga à papaína, apresentando o mesmo padrão geral de enovelamento e de estrutura do sítio ativo, com sete sítios de ligação ao substrato (lado acil - S4, S3, S2 e S1 e lado amino - S19, S29 e S39) e Cys25, His159 e Asn175 como tríade catalítica (CHEN *et al.*, 2010). Esses e outros fatores tornam a cruzaina um importante alvo biológico contra o *T. cruzi*.

A estrutura do sítio ativo da cruzaina de *T. cruzi* (PDB ID: 3LXS), determinada através das interações entre os seus respectivos resíduos de aminoácidos e o inibidor derivado de vinil sulfona (WRR483), foi utilizada como modelo para a realização dos estudos de docking molecular.

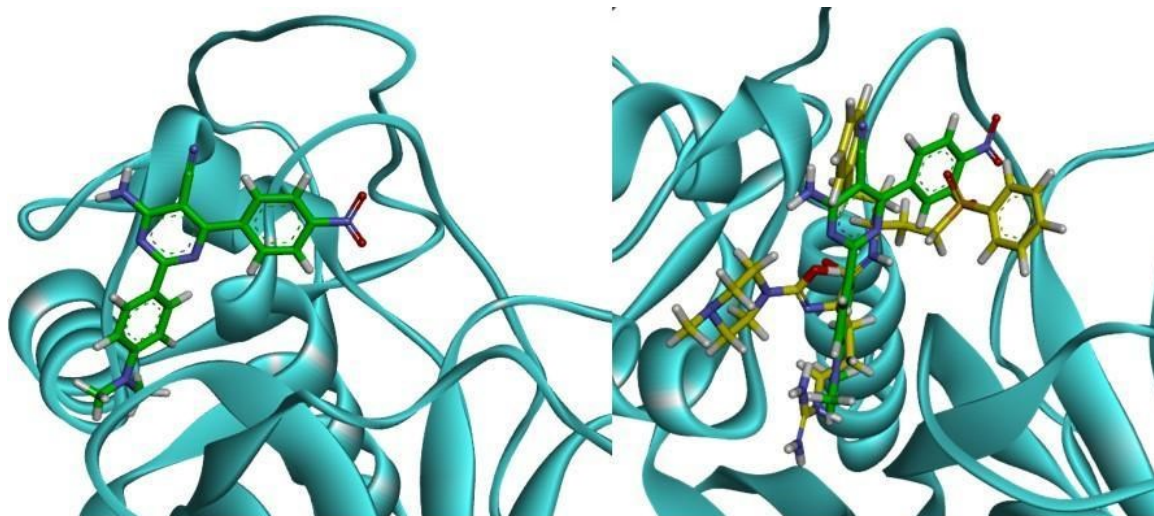
O docking molecular, um dos métodos mais empregados para o desenvolvimento de medicamentos, pode apresentar grandes variações de acordo com o complexo ligante-proteína a ser estudado (ARÉVALO; AMORIM, 2022). Uma maneira de validar o método utilizado é através do redocking do ligante cocrystalizado de modo a avaliar a capacidade do software em reproduzir a sua pose cristalográfica. Esse parâmetro é medido pelo *Root Mean Square Deviation* (RMSD) (SHIVANIKA *et al.*, 2022).

Deste modo, a validação do software empregado (MDV) foi realizada através do reencaixe do ligante cocrystalizado de 3XLS, **WRR-483** e a sobreposição das poses ao complexo cocrystalizado. O valor de RMSD obtido para a melhor pose foi inferior a 0,5 e mostra uma ótima capacidade do MVD em reproduzir a pose cristalográfica do **WRR-483**.

5.4 ANÁLISE DE DOCKING MOLECULAR DO ZN3F.

Ao analisarmos a pose com melhor pontuação para a interação entre o composto **ZN3F** e a cruzaina foi possível observar que toda a molécula encontra-se imersa no sítio ativo da 3LXS, sendo a porção *N,N*-dimetilanilina mais profundamente ancorada e o anel pirimidina, juntamente com o *p*-nitrobenzeno, mais para fora do sítio ativo (Figura 41A). Quando observamos a sobreposição do composto **ZN3F** e o ligante cocrystalizado, notamos que a ancoragem de ambas as moléculas ocorre no mesmo local do sítio ativo (Figura 41B) e que possuem interações com sete resíduos de aminoácidos em comum: Gln19, Cys25, Gly66, Ala138, His162, Trp184 e Glu208. Essas informações fornecem indícios de que o composto **ZN3F** age como um possível inibidor de cruzaina, possibilitando assim o desenho de novos compostos baseados em estrutura do receptor com potência otimizada.

Figura 41 –Análise do sítio de ligação da cruzaina. Complexo de ligação entre o ligante **ZN3F** e a enzima 3LXS (A). Cluster do composto **ZN3F** (Verde) e o ligante co-cristalizado **WRR-483** (Amarelo) ancorados no sítio ativo da cruzaina (B).



Fonte: Produzida pelo autor.

5.5 OTIMIZAÇÃO DO ZN3F.

Para desenhar estruturas de novos compostos potencialmente mais ativos, o primeiro passo foi obter mais informações da melhor pose entre o **ZN3F** e a cruzaina e relacioná-las com as informações estruturais e eletrônicas do sítio ativo.

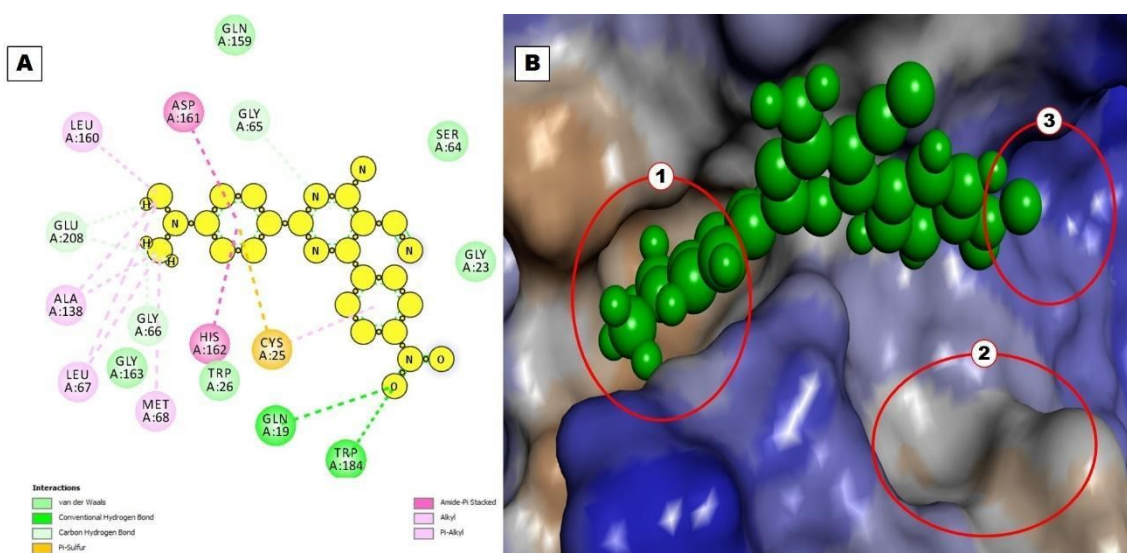
Notavelmente, como observado na Figura 42A, as interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos Gly66, Leu67, Met68, Ala138, Leu160, Asp161, His162 e Glu208, parecem ser as mais importantes para uma ancoragem energeticamente favorável. Estudos demonstraram que Glu208 é um resíduo crítico localizado no subsítio S2 do sítio ativo, o qual está ausente em diversas outras proteases, inclusive nas catepsinas humanas (PAULI *et al.*, 2022).

Uma outra interação fundamental é com o resíduo Cys25, o qual faz parte da tríade catalítica. A presença do grupo nitro na posição 4 do anel benzênico, favorece a formação de pontes de hidrogênio com os resíduos Gln19 e Trp184 e diminui a densidade eletrônica no anel aromático e, desde modo, diminui a capacidade de interação com a Cys25.

A análise da superfície hidrofóbica da cruzaina com o composto **ZN3F** (Figura 42 B) também forneceu informações importantes para o design dos novos compostos, como a área 1, que demonstra a bolsa hidrofóbica S2, a área 2, com possibilidade de

interações hidrofóbicas e também polares na bolsa S' e a área 3, com potencial para interações polares na bolsa S1.

Figura 42 – Otimização do composto **ZN3F** baseado na estrutura do receptor. Interações entre o ligante **ZN3F** e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima 3XLS (A). Superfície hidrofóbica do sítio ativo da enzima 3XLS, com o composto **ZN3F** (verde) ancorado e os respectivos subsítios S2 (área 1), S' (área 2) e S1 (área 3) destacados (B).



Fonte: Produzida pelo autor.

Com base nas análises acima, os derivados pirimidínicos foram desenhados visando o aumento da afinidade com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da cruzaina e, consequentemente, a potência e a seletividade. As modificações estruturais foram realizadas explorando substituições nas cadeias laterais do anel pirimidínico.

Os dez compostos análogos (**5a-h** e **7a-b**) foram ancorados *in silico* no sítio ativo de 3LXS e o consenso das suas pontuações e interações foram analisadas e comparadas com a do composto **ZN3F** e o ligante co-cristalizado. O composto com melhor score foi o **5f**, acima dos compostos **ZN3F** e **WRR-483**, seguido pelos compostos **5b**, e **5c**, **5g** e **5h**. Os demais compostos apresentaram scores ligeiramente inferiores ao composto **ZN3F**. Todos os compostos apresentaram interações em comum como, por exemplo, com o resíduo de aminoácido Cys25 (Tabela 6).

Tabela 6 – Ranking do consenso e resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações:

Id	Score	Interação
5f	0.944	Cys25, Leu67, Met68, Ala138, Leu160, Asp161 e Glu208
5b	0.909	Cys25, Met68, Ala138, Leu160 e His162
5c	0.898	Gln19, Cys25, Ser64, Met68, Ala138, Asp161, His162 e Trp184
5g	0.884	Gln19, Cys25, Ser64, Met68, Trp104, Ala138, Asp161 e His162
5h	0.883	Gln19, Cys25, Met68, Ala138, Asp161 e His162
ZN3F	0.883	Gln19, Cys25, Gly65, Gly66, Leu67, Met68, Ala138, Leu160, Asp161, His162, Gly163, Trp184 e Glu208
5d	0.875	Gly23, Cys25, Met68, Ala138, Asp161 e His162
5e	0.869	Cys25, Met68, Ala138 e Asp161
5a	0.863	Cys25, Met68, Asp161, His162 e Glu208
7a	0.856	Cys25, Gly66, Met68 e His162
7b	0.823	Cys25, Ser64, Met68, Ala138, Asp161
WRR-483	0.802	Gln19, Cys25, Gly66, Met68, Ala138, Leu160, Asp161, His162, Trp184 e Glu208

Fonte: Produzida pelo autor.

5.6 ANÁLISES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS DE DERIVADOS DE PIRIMIDINAS.

Dos dez análogos do **ZN3F** sintetizados neste estudo, três são inéditos e oito não possuem as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas relatadas na literatura. Deste modo, o segundo passo foi avaliar os parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos *in silico* de todos os compostos através do software Osiris. As propriedades farmacocinéticas (Tabela 7) foram avaliadas de acordo com a Regra dos Cinco de Lipinski, a qual envolve parâmetros como absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) (LIPINSKI *et al.*, 2001)

Todos os compostos sintetizados neste estudo se mantiveram dentro dos critérios estabelecidos pela Regra dos Cinco de Lipinski e seus parâmetros ADMET

indicaram boa absorção e solubilidade aquosa variando de boa a moderada. A análise das predições de toxicidade também demonstrou que, contrariamente ao **ZN3F** (Alta probabilidade de ser mutagênico e tumorgênico), os compostos não são mutagênicos, tumorgênicos, ou cause problemas de reprodutibilidade e irritação.

Tabela 7 – Perfil ADMET dos análogos pirimidínicos (**5a-h** e **7a-b**). ^a Aceptores de ligação de hidrogênio, ^d Doadores de ligação de hidrogênio, ^c Reproductive effective (RE).

ID	Peso molar	cLogP	H-Acc ^a	H-Don ^b	Violação	Mutagênico	Tumorgênico	RE ^c	Irritante
5a	290.3	3.1001	4	1	0	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
5b	302.336	2.9293	5	1	0	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
5c	330.346	2.9123	6	1	0	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
5d	351.206	3.7245	4	1	0	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
5e	286.337	3.3432	4	1	0	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
5f	346.389	3.2656	6	1	0	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
5g	317.307	2.0777	7	1	0	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
5h	317.307	2.0777	7	1	0	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
7a	283.29	0.2612	7	2	0	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
7b	298.261	-0.5904	9	2	0	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
ZN3F	360.38	1.7906	8	1	0	Nenhum	Alto	Nenhum	Nenhum

Fonte: Produzida pelo autor.

5.7 ATIVIDADE TRIPANOCIDA.

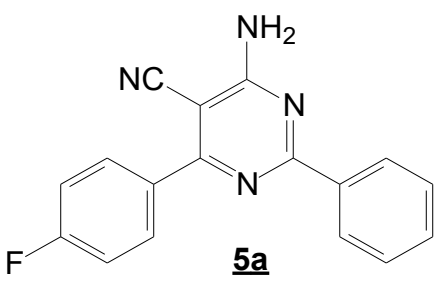
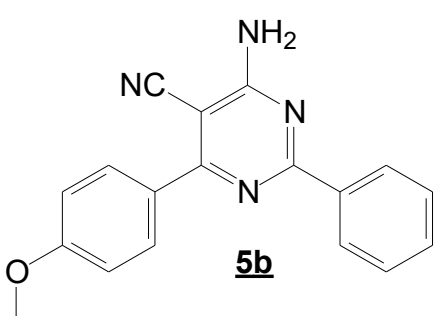
Avaliamos os derivados **5a-h** e **7a-b** contra *T. cruzi*. Todos os derivados inibiram a forma tripomastigota da cepa Talahuen de *T. cruzi*. Identificamos que os melhores resultados corresponderam aos da série **5**, e os compostos **5a**, **5b**, **5d** e **5f** apresentaram IC₅₀ muito baixa (variando de 3,31±1,32- 8,26±1,71µM), como pode ser visto na Tabela 8. Os derivados **5c** e **5h** (IC₅₀ respectivamente 27,54±1,82 µM e 19,24 ± 5,67 µM) inibiram os parasitas em valores próximos ao medicamento padrão, benznidazol, sendo o produto **5e** aquele com menor IC₅₀, 2,79±0 µM. Já os compostos **7a** e **7b** tiveram IC₅₀ elevadas, 229,09±43,77e 107,95±35,2µM, respectivamente. Realizamos uma avaliação da viabilidade celular de nossos compostos, tendo como

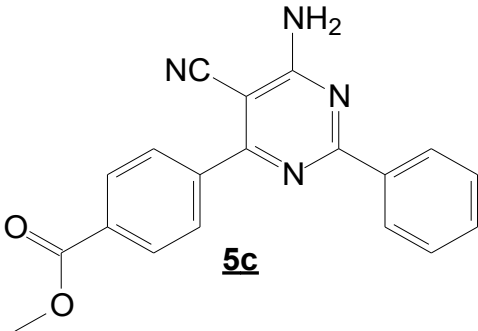
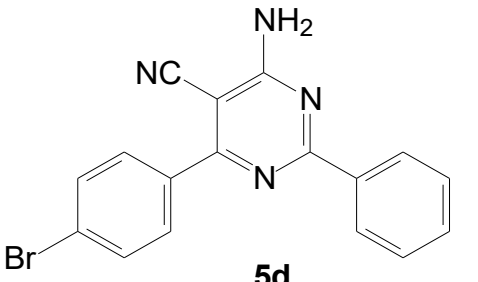
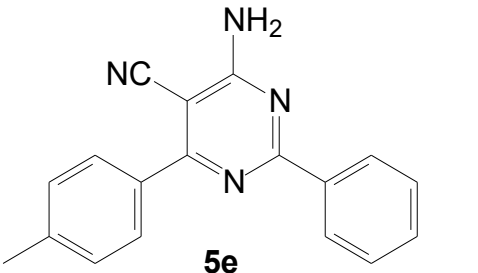
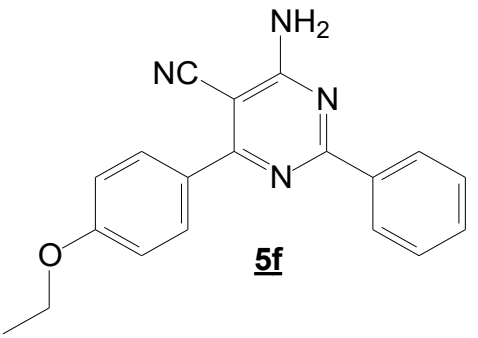
indicador de citotoxicidade as concentrações de inibição contra as linhagens celulares de mamíferos L929. Como podemos observar na Tabela 8, praticamente todos os compostos apresentaram valores de citotoxicidade (CC_{50}) superiores às concentrações de IC_{50} parasitárias. Os melhores resultados de IS foram apresentados pelos compostos **5e** e **5b**, respectivamente 31,3 e 25.

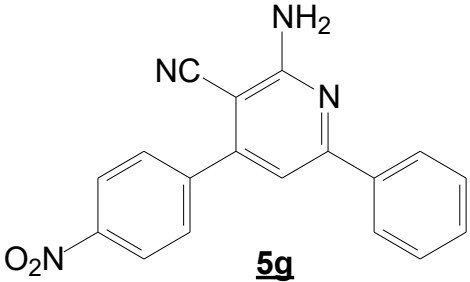
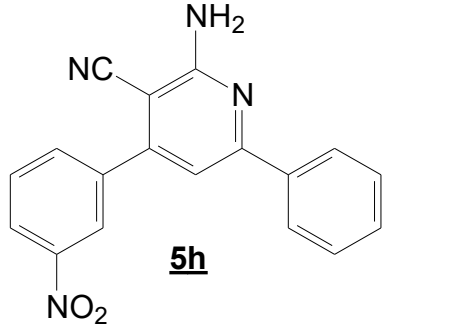
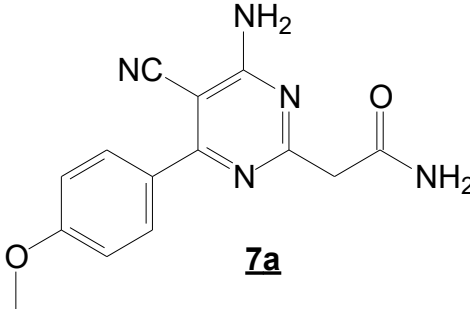
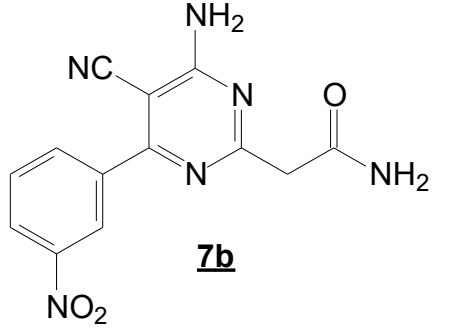
Dessa forma, podemos perceber que as variações nas cadeias laterais do anel pirimidínico influenciam diretamente nas propriedades eletrônicas e físico-químicas e, conseqüentemente, na variação da potência da atividade tripanocida destes compostos.

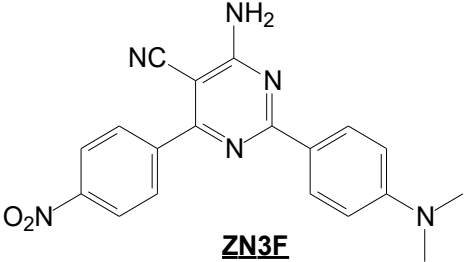
Tabela 8 – Estrutura e atividade contra *T. cruzi* de derivados de pirimidina **5a-h** e **7a-b**.

¹Concentração do composto que reduz o crescimento do parasita em 50%, ²Concentração do composto que inibe a viabilidade das células L929 em 50%, ³ CC_{50} do composto nas células dividida por IC_{50} do composto no parasite.

ID	IC_{50} sobre o <i>T. cruzi</i> ¹ (μM)	CC_{50} sobre a célula L929 ² (μM)	Índice de Selectividade ³ (IS)
 5a	6,55±3,44	43,06	6,6
 5b	3,31±1,32	82,69	25

 <u>5c</u>	27,54±1,82	75,68	2,7
 <u>5d</u>	8,26±1,71	71,18	8,6
 <u>5e</u>	2,79±0	87,30	31,3
 <u>5f</u>	5,37±1,26	39,51	7,4

 5g	20,17 ± 5.04	157,57±0	7,8
 5h	19,24 ± 5,67	315,15±0	16,38
 7a	229,09±43,77	352,99	1,5
 7b	107,95±35,2	335,27	3,1

 <u>ZN3F</u>	13.96±0.00	203.56	14.58
Benzimidazol	1,84±0,12	2074,93±219,02	1125

Fonte: Produzida pelo autor.

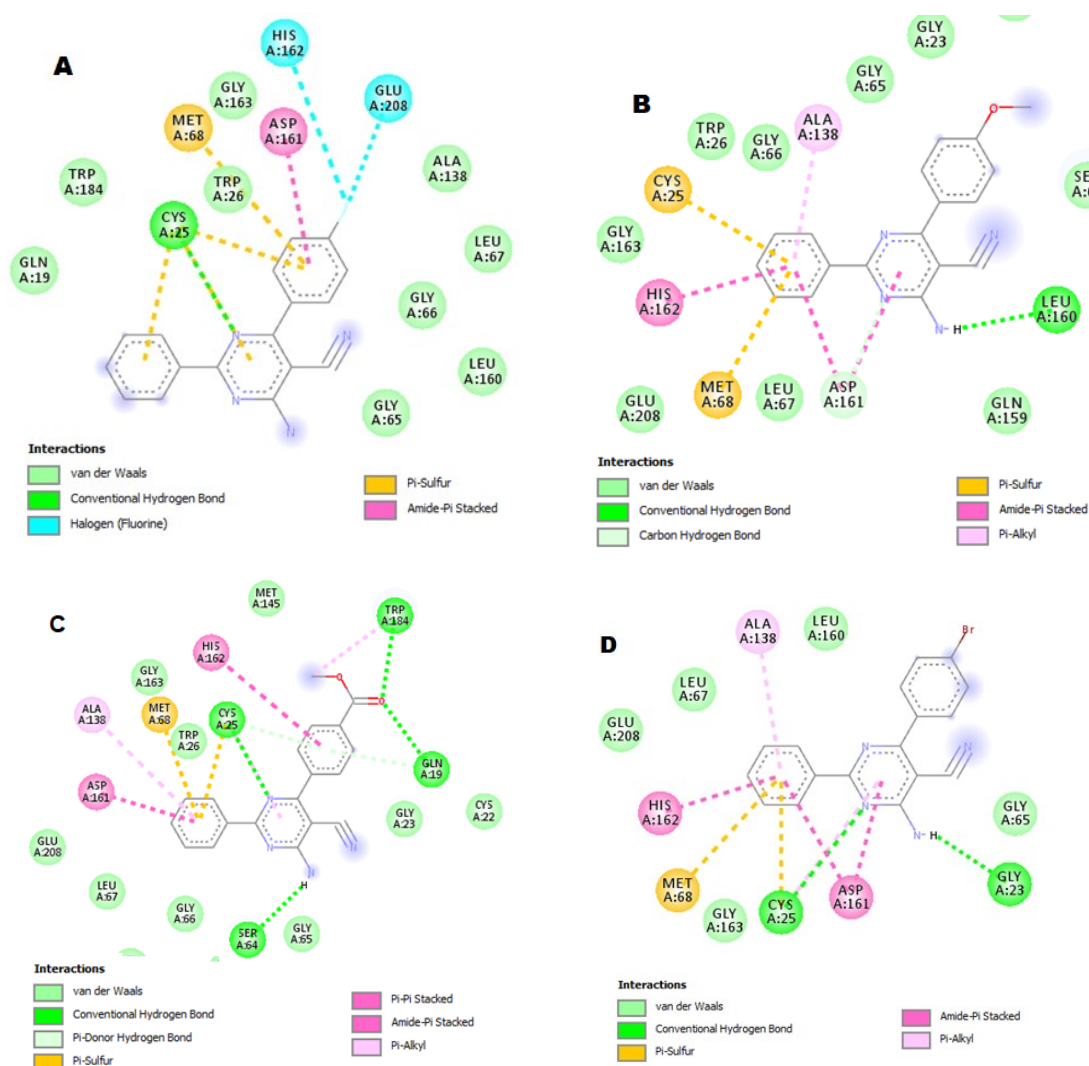
Em vista disso, podemos observar que substituições realizadas no grupo alquila do C6 do anel pirimidínico (planejadas visando interações com os resíduos de aminoácidos presentes na bolsa hidrofóbica do subsítio S2) apresentaram tanto um melhor score *in silico* contra a cruzaina, quanto maior potência *in vitro* contra *T. cruzi*. Ademais, quando comparamos os compostos **7a** e **7b** (ambos modificados no C2 visando o aumento da hidrofiliidade e a interação com a bolsa S' ou S1), com os da série **5**, percebemos que há uma perda da atividade *in vitro*.

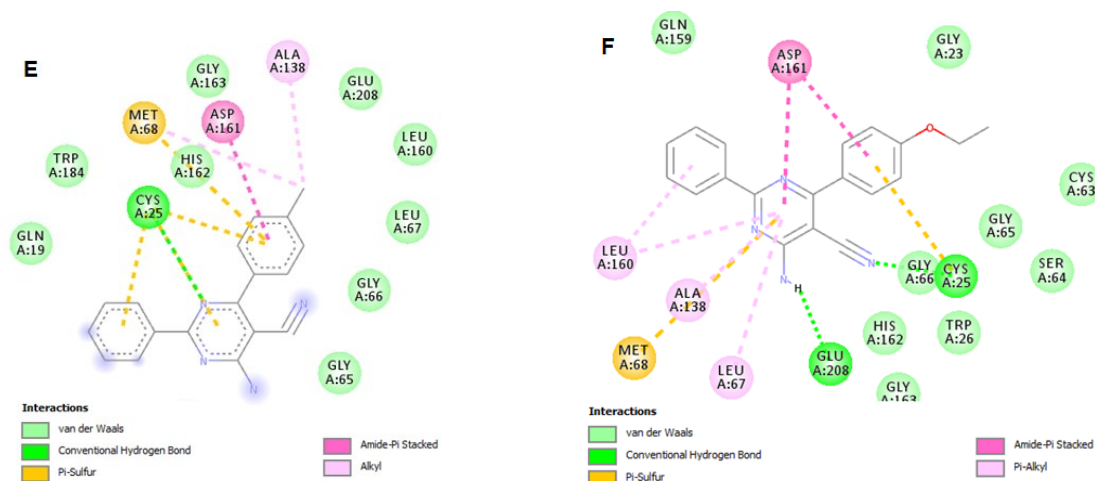
Estudos relatam que compostos com substituintes hidrofóbicos que interagem com resíduos de aminoácidos do sítio S2 foram mais potentes e mais seletivos contra cruzaina (BRYANT *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010; PAULI *et al.*, 2022). O sítio hidrofóbico S2 pôde ser alcançado de forma mais efetiva pela incorporação/presença de anéis fenil sem substituintes e fenil substituídos com grupos metila, fluoro e metóxi na posição -*para*.

O composto **5e** (Figura 43 E), substituído com o *p*-toluil no C6 do anel pirimidínico, foi o mais potente e mais seletivo dentre os análogos testados ($IC_{50} = 2,79 \pm 0 \mu M$, SI > 31,3). A presença da metila grupo *p*-toluil, grupo menos volumoso que as duas metilas presentes no *N,N*-dimetilanilina do composto **ZN3F**, provavelmente permitiu uma maior aproximação entre superfície molecular e a superfície do sítio ativo da proteína, bem como, uma maior imersão no subsítio S2. E grupo metila está imerso no subsítio S2, realizando interações hidrofóbicas com Ala138. Seu efeito de hiperconjugação, aumenta a densidade eletrônica no anel aromático e possibilita duas interações do tipo sulfur- π com Met68 e Cys25. Além

disso, outras duas interações do tipo sulfur- π foram observadas com Cys25 e os anéis pirimidina e o fenil.

Figura 43 – **A** - Estrutura 2D do composto **5a** dentro do sitio ativo da Cruzipaína (3LXS). **B** - Estrutura 2D do composto **5b** dentro do sitio ativo da Cruzipaína (3LXS). **C** - Estrutura 2D do composto **5c** dentro do sitio ativo da Cruzipaína (3LXS). **D** - Estrutura 2D do composto **5d** dentro do sitio ativo da Cruzipaína (3LXS). **E** - Estrutura 2D do composto **5e** dentro do sitio ativo da Cruzipaína (3LXS). **F** - Estrutura 2D do composto **5f** dentro do sitio ativo da Cruzipaína (3LXS).





Fonte: Produzida pelo autor

As interações com Cys25, resíduo importante da tríade catalítica, pode ter sido fundamental para a excelente atividade e seletividade do composto **5e** contra *T. cruzi*. Estudos mostram que esse tipo de interação pode gerar tanto estabilização intermolecular, quanto intramolecular e aumentar a afinidade droga/alvo (BENO *et al.*, 2015). Observamos também que a grande maioria dos compostos apresentaram interações do tipo sulfur- π com a Cys25.

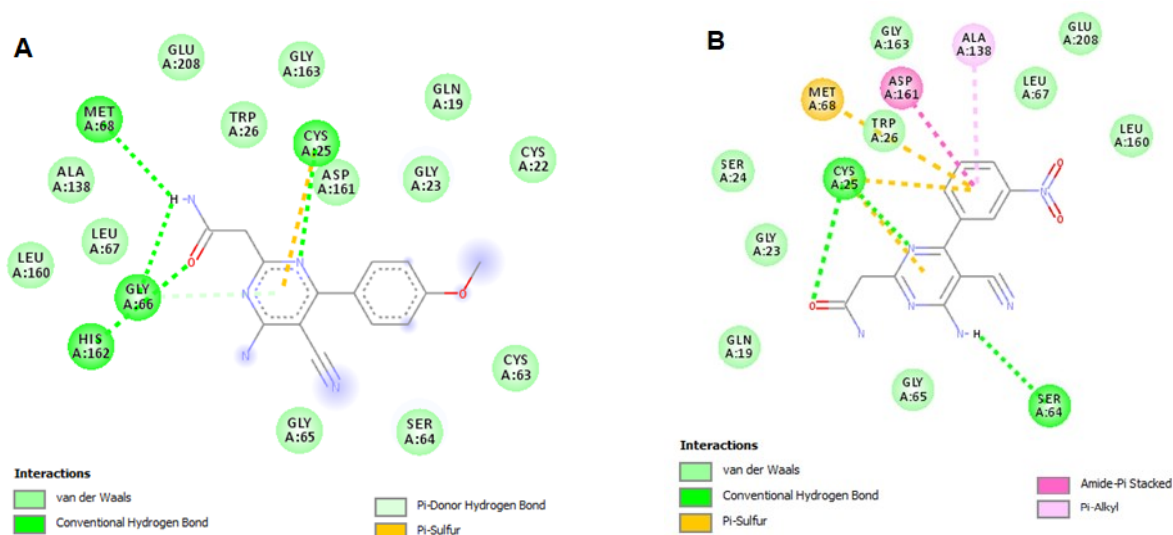
Os compostos **5b** e **5f** (Figura 43 B e 43 F), também apresentaram potente ação tripanocida ($IC_{50} = 3,31 \pm 1,32$ e $5,37 \pm 1,26$, respectivamente). As interações hidrofóbicas também foram predominantes e evidenciam a sua importância para um efeito inibitório potente.

Compostos halogenados também são relatados na literatura como potentes inibidores do *T. cruzi* (LIÑARES *et al.*, 2007; SALSI *et al.*, 2018; CUEVAS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020). Em nosso estudo, o composto **5a** (Figura 43 A) apresentou uma excelente inibição, $IC_{50} = 6,55 \pm 3,44 \mu M$. Apesar de interagir com o sítio ativo da cruzaina de forma semelhante ao composto **5e**, o composto **5a** apresentou menos interações hidrofóbicas com o bolsão S2. A interação entre o flúor e Glu208 pode ter sido importante para sua seletividade superior ao composto padrão benznidazol.

Já o composto **5d** (Figura 43 D), apresentou interações hidrofóbicas com o bolsão S2 que podem ter relações com sua excelente atividade tripanocida ($IC_{50} = 8,26 \pm 1,71$ e SI > 8,6).

Por fim, o composto **5c** (Figura 43 C) apresentou interações interessantes como sulfur- π com a Cys25, interações hidrofóbicas com o bolso S2 e pontes de hidrogênio com Gln19 e Trp184, e mostrou boa inibição ($IC_{50} = 27,54 \pm 1,82 \mu M$), todavia, foi mais discreta entre os compostos da série 5.

Figura 44 – **A** - Estrutura 2D do composto **7a** dentro do sitio ativo da Cruzipaina (3LXS). **B** - Estrutura 2D do composto **7b** dentro do sitio ativo da Cruzipaina (3LXS).



Fonte: Produzida pelo autor

Os compostos que obtiveram as menores atividades de inibição foram **7a** e **7b** (Figuras 44 A e 44 B, respectivamente), $IC_{50} = 229,09 \pm 43,77$ e $107,95 \pm 35,2 \mu M$, respectivamente, ambos modificados no C2 visando o aumento da hidrofiliicidade e a interação com a bolsa S' ou S1. Esses compostos apresentaram poucas interações com o bolso hidrofóbico S2 e fortalecem ainda mais a hipótese da importância dessas interações para potência da atividade tripanocida.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizado uma nova proposta para obtenção de derivados do núcleo pirimidínico 5-amino-4-carbonitrilas com ações farmacológicas potencializadas a partir da otimização estrutural utilizando docking molecular. Desta forma, o composto **ZN3F** desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo como potente agente antichagásico foi utilizado como *Lead* para a síntese planejada de análogos com atividade tripanocida otimizada baseada na estrutura da cruzaina.

Esse estratagema abordou interações estratégicas com resíduos de aminoácidos importantes do sítio ativo da cruzaina, bem como, parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos que foram confirmados através do estudo *in vitro* contra a cepa Talahuen do *T. cruzi*. Todos os compostos sintetizados, dos quais três foram inéditos (**5c**, **7a** e **7b**), apresentaram atividade tripanocida. O destaque foi para o composto **5e** que apresentou potência semelhante ao benznidazol. As possíveis interações entre os substituintes hidrofóbicos no C6 do anel pirimidínico e o bolsão S2, contribuíram de forma altamente significativa para a potência contra *T. cruzi*. Além disso, os estudos computacionais mostram que interações do tipo sulfur- π com a Cys25 parecem ser uma estratégia interessante a ser explorada no desenvolvimento de inibidores reversível de cruzaina.

Os compostos inéditos produzidos foram elucidados por espectroscopia RMN de ^1H e ^{13}C , e foi identificado o aumento da desblindagem dos carbonos que formam o anel pirimidínico quando os derivados apresentam substituintes fenil na posição C2. As avaliações farmacocinéticas *in silico* da nova série produzida também demonstrou uma diminuição da lipossolubilidade dos novos derivados **7a** e **7b**, que possuem os substituintes amida, o que era um objetivo idealizado pelo grupo de pesquisa.

Além disso, o perfil de moléculas desenvolvido neste estudo se mostrou eficaz para o melhoramento das propriedades toxicológicas dos compostos sintetizados. Portanto, esses resultados introduzem novos e interessantes aspectos que podem contribuir para o modo de ligação e mecanismo de ação dos inibidores da cruzaina.

Consequentemente, a partir desta nova abordagem de aquisição de derivados de forma planejada podemos explorar as modificações e os perfis toxicológicos e farmacocinéticos de derivados com substituições amida, que podem oferecer produtos de melhor especificidade e lipofilicidade.

7 PERSPECTIVAS

Ampliar os estudos de docking sobre a cruzafina partindo do núcleo base 4-ami-5-cianopirimidinas com substituições que promovam melhores interações com o sítio ativo da enzima;

Realizar uma busca dos compostos produzidos pelo nosso grupo e que já possuem atividade biológica comprovadas afim de serem utilizados como composto *Lead* de outros alvos, promovendo a síntese planejada de novos derivados 4-ami-5-cianopirimidinas.

Ampliar o número de derivados que possuem o grupo amida e éster na sua estrutura afim de aproveitar as contribuições de hidrofilicidade e toxicidade que esses substituintes oferecem.

Selecionar os derivados do nosso núcleo pirimidínico que apresentarem melhor potencial farmacológico, e produzir lipossomas destes compostos a fim de melhorar o potencial de ação destas drogas.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SRIVASTAVA, K.; PURI, S. K.; CHAUHAN, P. M. S. Antimalarial activity and synthesis of new trisubstituted pyrimidines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, vol. 15, no. 12, p. 3130–3132, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.04.014>.

AHMAD, O. K.; HILL, M. D.; MOVASSAGHI, M. Synthesis of densely substituted pyrimidine derivatives. **Journal of Organic Chemistry**, vol. 74, no. 21, p. 8460–8463, 2009. <https://doi.org/10.1021/jo9017149>.

ALEXANDRINO, DANIEL DE SENNA. **Síntese de Novos Heterociclos 4-amino-pirimidínicos-2,6-bissubstituídos Ligados a Porção Monossacarídica e Avaliação de sua Atividade Citotóxica**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco - Vitória de Santo Antão, 2011.

ANDERSON, E. D.; BOGER, D. L. Scope of the inverse electron demand Diels-Alder reactions of 1,2,3-triazine. **Organic Letters**, vol. 13, no. 9, p. 2492–2494, 2011. <https://doi.org/10.1021/ol2007428>.

ANTINORI, S.; GALIMBERTI, L.; BIANCO, R.; GRANDE, R.; GALLI, M.; CORBELLINO, M. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. **European Journal of Internal Medicine**, vol. 43, p. 6–15, 1 Sep. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.05.001>.

ARÉVALO, J. M. C.; AMORIM, J. C. Virtual screening, optimization and molecular dynamics analyses highlighting a pyrrolo[1,2-a]quinazoline derivative as a potential inhibitor of DNA gyrase B of *Mycobacterium tuberculosis*. **Scientific Reports**, vol. 12, no. 1, p. 1–13, 2022. DOI 10.1038/s41598-022-08359-x. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08359-x>.

BELTRAN-HORTELANO, I.; ALCOLEA, V.; FONT, M.; PÉREZ-SILANES, S. Examination of multiple *Trypanosoma cruzi* targets in a new drug discovery approach

for Chagas disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, vol. 58, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116577>.

BENO, B. R.; YEUNG, K. S.; BARTBERGER, M. D.; PENNINGTON, L. D.; MEANWELL, N. A. A Survey of the Role of Noncovalent Sulfur Interactions in Drug Design. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 58, no. 11, p. 4383–4438, 2015. <https://doi.org/10.1021/jm501853m>.

BERMUDEZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; PABLO REAL, J.; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, vol. 156, p. 1–16, 1 Apr. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.017>.

BORI, J.; MAHATA, S.; MANIVANNAN, V. A new route for the synthesis of 2,4-bis(2-pyridyl)-6-(pyridyl)pyrimidines: Synthesis and characterization of Co(II), Ni(II) complexes of 2,4,6-tris(2-pyridyl)pyrimidine. **Inorganica Chimica Acta**, vol. 506, no. February, p. 119506, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119506>.

BRYANT, C.; KERR, I. D.; DEBNATH, M.; ANG, K. K. H.; RATNAM, J.; FERREIRA, R. S.; JAISHANKAR, P.; ZHAO, D. M.; ARKIN, M. R.; MCKERROW, J. H.; BRINEN, L. S.; RENSLO, A. R. Novel non-peptidic vinylsulfones targeting the S2 and S3 subsites of parasite cysteine proteases. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, vol. 19, no. 21, p. 6218–6221, 2009. DOI 10.1016/j.bmcl.2009.08.098. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.098>.

CARDONA-G, W.; YEPES, A. F.; HERRERA-R, A. Hybrid Molecules: Promising Compounds for the Development of New Treatments Against Leishmaniasis and Chagas Disease. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 25, no. 30, p. 3637–3679, 9 Mar. 2018. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180309111428>.

CHEN, Y. T.; BRINEN, L. S.; KERR, I. D.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; MCKERROW, J. H.; ROUSH, W. R. *In vitro* and in vivo studies of the trypanocidal properties of WRR-483 against *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 4, no. 9, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000825>.

CRESPILO-ANDÚJAR, C.; CHAMORRO-TOJEIRO, S.; NORMAN, F.; MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; PÉREZ-MOLINA, J. A. Toxicity of nifurtimox as second-line treatment after benznidazole intolerance in patients with chronic Chagas disease: when available options fail. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 24, no. 12, p. 1344.e1-1344.e4, 1 Dec. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.006>.

DE CLERCQ, E. Antiretroviral drugs. **Current Opinion in Pharmacology**, vol. 10, no. 5, p. 507–515, 2010. DOI 10.1016/j.coph.2010.04.011. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2010.04.011>.

DE CLERCQ, E. Antivirals: Past, present and future. **Biochemical Pharmacology**, vol. 85, no. 6, p. 727–744, 2013. DOI 10.1016/j.bcp.2012.12.011. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.011>.

DE MELO, S. J.; DO MONTE, Z. S.; DA SILVA SANTOS, A. C.; SILVA, A. C. C.; FERREIRA, L. F. G. R.; HERNANDES, M. Z.; SILVA, R. O.; DA SILVA FALCÃO, E. P.; BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A.; SRIVASTAVA, R. M.; PEREIRA, V. R. A. Synthesis, antitrypanosomal activity and molecular docking studies of pyrimidine derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, vol. 27, no. 11–12, p. 2512–2522, 1 Dec. 2018b. <https://doi.org/10.1007/s00044-018-2253-2>.

DE MORAIS, C. G. V.; CASTRO LIMA, A. K.; TERRA, R.; DOS SANTOS, R. F.; DA-SILVA, S. A. G.; DUTRA, P. M. L. The dialogue of the host-parasite relationship: Leishmania spp. and Trypanosoma cruzi Infection. **BioMed Research International**, vol. 2015, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/324915>.

DEIBL, N.; KEMPE, R. Manganese-Catalyzed Multicomponent Synthesis of Pyrimidines from Alcohols and Amidines. **Angewandte Chemie - International Edition**, vol. 56, no. 6, p. 1663–1666, 2017. <https://doi.org/10.1002/anie.201611318>.

DO MONTE, Zenaide Severina; MONTEIRO, M. R. L.; BORBA, C. B. A.; DE GUSMÃO, N. B.; FALCÃO, E. P. DA S.; SILVA, R. O.; SRIVASTAVA, R. M.; DE MELO, S. J. Synthesis of 4-amino-2,6-diaryl-5-cyanopyrimidines as antimicrobial agents.

Synthetic Communications, vol. 46, no. 11, p. 983–991, 2 Jun. 2016. DOI 10.1080/00397911.2016.1151051. Available at: <https://doi.org/10.1080/00397911.2016.1151051>.

DOS SANTOS NASCIMENTO, I. J.; DE AQUINO, T. M.; DA SILVA-JÚNIOR, E. F. Cruzain and Rhodesain Inhibitors: Last Decade of Advances in Seeking for New Compounds Against American and African Trypanosomiases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, vol. 21, no. 21, p. 1871–1899, 2021. <https://doi.org/10.2174/1568026621666210331152702>.

FALCÃO, E. P. D. S.; DE MELO, S. J.; SRIVASTAVA, R. M.; CATANHO, M. T. J. D. A.; DO NASCIMENTO, S. C. Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3- and 4-(N-phthalimidophenyl)} pyrimidines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 41, no. 2, p. 276–282, Feb. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.09.009>.

FERNANDES, V. de S.; DA ROSA, R.; ZIMMERMANN, L. A.; ROGÉRIO, K. R.; KÜMMERLE, A. E.; BERNARDES, L. S. C.; GRAEBIN, C. S. Antiprotozoal agents: How have they changed over a decade? **Archiv der Pharmazie**, vol. 355, no. 2, 1 Feb. 2022. <https://doi.org/10.1002/ardp.202100338>.

FORSYTH, C. J.; HERNANDEZ, S.; OLMEDO, W.; ABUHAMIDAH, A.; TRAINA, M. I.; SANCHEZ, D. R.; SOVEROW, J.; MEYMANDI, S. K. Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 63, no. 8, p. 1056–1062, 15 Oct. 2016. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw477>.

FRUTOS, R. P.; WEI, X.; PATEL, N. D.; TAMPONE, T. G.; MULDER, J. A.; BUSACCA, C. A.; SENANAYAKE, C. H. One-pot synthesis of 2,5-disubstituted pyrimidines from nitriles. **Journal of Organic Chemistry**, vol. 78, no. 11, p. 5800–5803, 2013. <https://doi.org/10.1021/jo400720p>.

GLINKERMAN, C. M.; BOGER, D. L. Cycloadditions of 1,2,3-Triazines Bearing C5-Electron Donating Substituents: Robust Pyrimidine Synthesis. **Organic Letters**, vol.

17, no. 16, p. 4002–4005, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b01870>.

GUO, W.; LI, C.; LIAO, J.; JI, F.; LIU, D.; WU, W.; JIANG, H. Transition Metal Free Intermolecular Direct Oxidative C-N Bond Formation to Polysubstituted Pyrimidines Using Molecular Oxygen as the Sole Oxidant. **Journal of Organic Chemistry**, vol. 81, no. 13, p. 5538–5546, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b00867>.

HE, H.; XIA, H.; XIA, Q.; REN, Y.; HE, H. Design and optimization of N-acylhydrazone pyrimidine derivatives as E. coli PDHc E1 inhibitors: Structure-activity relationship analysis, biological evaluation and molecular docking study. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, vol. 25, no. 20, p. 5652–5661, 2017. DOI 10.1016/j.bmc.2017.08.038. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.08.038>.

KIM, D. W. *et al.* Activity and safety of ceritinib in patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-1): updated results from the multicentre, open-label, phase 1 trial. **The Lancet Oncology**, vol. 17, no. 4, p. 452–463, 2016. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00614-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00614-2).

KLENC, J.; RAUX, E.; BARNES, S.; SULLIVAN, S.; DUSZYNSKA, B.; BOJARSKI, A. J.; STREKOWSKI, L. Synthesis of 4-Substituted 2- (4-Methylpiperazino) pyrimidines and Quinazoline Analogs as Serotonin 5-HT 2A Receptor Ligands. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, vol. 46, no. November, p. 1259–1265, 2009. <https://doi.org/10.1002/jhet>.

KOURBELI, V.; CHONTZOPOULOU, E.; MOSCHOVOU, K.; PAVLOS, D.; MAVROMOUSTAKOS, T.; PAPANASTASIOU, I. P. An overview on target-based drug design against kinetoplastid protozoan infections: Human african trypanosomiasis, chagas disease and leishmaniasis. **Molecules**, vol. 26, no. 15, 1 Aug. 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26154629>.

KUMAR, S.; NARASIMHAN, B. Therapeutic potential of heterocyclic pyrimidine scaffolds. **Chemistry Central Journal**, vol. 12, no. 1, p. 1–29, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0406-5>.

LIÑARES, G. G.; GISMONDI, S.; CODESIDO, N. O.; MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R.; RODRIGUEZ, J. B. Fluorine-containing aryloxyethyl thiocyanate derivatives are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* proliferation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, vol. 17, no. 18, p. 5068–5071, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.07.012>.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. vol. 46, p. 3–26, 2001. .

MAHFOUDH, M.; ABDERRAHIM, R.; LECLERC, E.; CAMPAGNE, J. M. Recent Approaches to the Synthesis of Pyrimidine Derivatives. **European Journal of Organic Chemistry**, vol. 2017, no. 20, p. 2856–2865, 2017. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700008>.

MARTINEZ-PEINADO, N.; LORENTE-MACÍAS, Á.; GARCÍA-SALGUERO, A.; CORTES-SERRA, N.; FENOLLAR-COLLADO, Á.; ROS-LUCAS, A.; GASCON, J.; PINAZO, M. J.; MOLINA, I. J.; UNCITI-BROCETA, A.; DÍAZ-MOCHÓN, J. J.; VILLATORO, M. J. P. de las I. y.; IZQUIERDO, L.; ALONSO-PADILLA, J. Novel purine chemotypes with activity against *plasmodium falciparum* and *trypanosoma cruzi*. **Pharmaceuticals**, vol. 14, no. 7, 1 Jul. 2021. <https://doi.org/10.3390/ph14070638>.

MARTINS-MELO, F. R.; CARNEIRO, M.; RIBEIRO, A. L. P.; BEZERRA, J. M. T.; WERNECK, G. L. Burden of Chagas disease in Brazil, 1990–2016: findings from the Global Burden of Disease Study 2016. **International Journal for Parasitology**, vol. 49, no. 3–4, p. 301–310, 1 Mar. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.008>.

MASTALIR, M.; GLATZ, M.; PITTENAUER, E.; ALLMAIER, G.; KIRCHNER, K. Sustainable Synthesis of Quinolines and Pyrimidines Catalyzed by Manganese PNP Pincer Complexes. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 138, no. 48, p. 15543–15546, 2016. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b10433>.

MATHI, G. R.; KANG, C. H.; LEE, H. K.; ACHARY, R.; LEE, H. Y.; LEE, J. Y.; HA, J. Du; AHN, S.; PARK, C. H.; LEE, C. O.; HWANG, J. Y.; YUN, C. S.; JUNG, H. J.; CHO, S. Y.; KIM, H. R.; KIM, P. Replacing the terminal piperidine in ceritinib with aliphatic amines confers activities against crizotinib-resistant mutants including G1202R. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 126, p. 536–549, 2017. DOI 10.1016/j.ejmech.2016.11.046. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.11.046>.

MELO, S. J. DE; SANTOS, L. C. DE; FALCÃO, E. P. DA S.; SRIVASTAVA, R. M.; LUU-DUC, C. Synthesis of new 4-amino-2,6-diarylpyrimidine-5- carbonitriles. **Journal of chemical Research**, vol. 2002, no. M, p. 216–217, 2002.

MOLLICK, T.; LAÍN, S. Modulating pyrimidine ribonucleotide levels for the treatment of cancer. **Cancer & Metabolism**, vol. 8, no. 1, p. 1–11, 2020. <https://doi.org/10.1186/s40170-020-00218-5>.

MONTE, ZENAIDE S; SOUZA, S. M.; COSTA, N. T. C.; SANTOS, A. C. S.; MILITÃO, G. C. G.; HERNANDES, M. Z.; PEREIRA, V. R. A.; SILVA, R. O.; FALCÃO, E. P. S.; MELO, S. J. **In Silico Studies on the Antileishmania, Cytotoxicity and Anticancer Activities of Pyrimidine Analogs**. [S. l.: s. n.], 2020.

MONTENEGRO, Oswaldo Viveiros. Metade. In: MONTENEGRO, Oswaldo. **Oswaldo Montenegro ao vivo – 1988**, Rio de Janeiro: Som Livre, 1988. Faixa 3. Disco Vinil).

MOVASSAGHI, M.; HILL, M. D. Single-step synthesis of pyrimidine derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 128, no. 44, p. 14254–14255, 2006. <https://doi.org/10.1021/ja066405m>.

OKESLI, A.; KHOSLA, C.; BASSIK, M. C. Human pyrimidine nucleotide biosynthesis as a target for antiviral chemotherapy. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 48, p. 127–134, 2017. DOI 10.1016/j.copbio.2017.03.010. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2017.03.010>.

ORTIZ, J. V.; PEREIRA, B. V. M.; COUCEIRO, K. D. N.; E SILVA, M. R. H. DA S.; DORIA, S. S.; DA SILVA, P. R. L.; DE LIRA, E. DA F.; GUERRA, M. DAS G. V. B.; GUERRA, J. A. de O.; FERREIRA, J. M. B. B. Cardiac evaluation in the acute phase of chagas' disease with post-treatment evolution in patients attended in the state of Amazonas, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, vol. 112, no. 3, p. 240–246, 1 Mar. 2019. <https://doi.org/10.5935/abc.20190007>.

PATEL, R. V.; KEUM, Y. S.; PARK, S. W. Sketching the historical development of pyrimidones as the inhibitors of the HIV integrase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 97, no. 1, p. 649–663, 2015. DOI 10.1016/j.ejmech.2014.07.005. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.005>.

PAULI, I.; REZENDE, C. DE O.; SLAFER, B. W.; DESSOY, M. A.; DE SOUZA, M. L.; FERREIRA, L. L. G.; ADJANO HUN, A. L. M.; FERREIRA, R. S.; MAGALHÃES, L. G.; KROGH, R.; MICHELAN-DUARTE, S.; DEL PINTOR, R. V.; DA SILVA, F. B. R.; CRUZ, F. C.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Multiparameter Optimization of Trypanocidal Cruzain Inhibitors With In Vivo Activity and Favorable Pharmacokinetics. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 12, no. January, p. 1–21, 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.774069>.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; PEREZ, A. M.; NORMAN, F. F.; MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Old and new challenges in Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, vol. 15, no. 11, p. 1347–1356, 1 Nov. 2015. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00243-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00243-1).

POLLACK, S. R.; KUETHE, J. T. Chemoselective Reduction of α -Cyano Carbonyl Compounds: Application to the Preparation of Heterocycles. **Organic Letters**, vol. 18, no. 24, p. 6388–6391, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b03285>.

PRACHAYASITTIKUL, S.; PINGAEW, R.; WORACHARTCHEEWAN, A.; SINTHUPOOM, N.; PRACHAYASITTIKUL, V.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Roles of Pyridine and Pyrimidine Derivatives as Privileged Scaffolds in Anticancer Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, vol. 17, no.

10, p. 869–901, 2016. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160923125801>.

RASHID, H.; MARTINES, M. A. U.; DUARTE, A. P.; JORGE, J.; RASOOL, S.; MUHAMMAD, R.; AHMAD, N.; UMAR, M. N. Research developments in the syntheses, anti-inflammatory activities and structure-activity relationships of pyrimidines. **RSC Advances**, vol. 11, no. 11, p. 6060–6098, 2021. <https://doi.org/10.1039/d0ra10657g>.

CUEVAS-HERNÁNDEZ, R. I.; GIRARD, R. M. B. M; MARTÍNEZ-CERÓN, S.; DA SILVA, M. S; ELIAS, M. C.; CRISPIM, M.; TRUJILLO-FERRARA, J. G.; SILBER, A. M. Fluorinated Phenylbenzothiazole Arrests the Trypanosoma Host Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 64, no. 2, p. 1–16, 2020.

ROMANHA, A. J. *et. al.* *In vitro* and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 105, no. 2, p. 233–238, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000200022>.

ROSTAMIZADEH, S.; NOJAVAN, M.; ARYAN, R.; SADEGHIAN, H.; DAVOODNEJAD, M. A novel and efficient synthesis of pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives and the study of their anti-bacterial activity. **Chinese Chemical Letters**, vol. 24, no. 7, p. 629–632, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2013.04.035>.

SAKAI, N.; AOKI, Y.; SASADA, T.; KONAKAHARA, T. New approach to the practical synthesis of tri- or tetrasubstituted pyrimidine derivatives: A four-component coupling reaction from a functionalized silane, two types of aromatic nitriles, and acetals. **Organic Letters**, vol. 7, no. 21, p. 4705–4708, 2005. <https://doi.org/10.1021/ol051901l>.

SALSI, F.; BULHÕES PORTAPILLA, G.; SCHUTJAJEW, K.; CARNEIRO, Z. A.; HAGENBACH, A.; DE ALBUQUERQUE, S.; DA SILVA MAIA, P. I.; ABRAM, U. Thiosemicarbazones and thiadiazines derived from fluorinated benzoylthioureas: Synthesis, crystal structure and anti-Trypanosoma cruzi activity. **Journal of Fluorine Chemistry**, vol. 215, no. August, p. 52–61, 2018. DOI 10.1016/j.jfluchem.2018.08.004.

Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2018.08.004>.

SAMEER CHITRE, T.; DHIRENDRA ASGAONKAR, K.; MANOJ PATIL, S.; KUMARADOSS KATHIRAVAN, M.; BALKRISHNA PADHYE, S. Exploring Pyrimidine Pharmacophore as Thymidine Monophosphate Kinase Inhibitors for Antitubercular Activity: A Review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, vol. 16, no. 28, p. 3211–3223, 2016. <https://doi.org/10.2174/1568026616666160506130914>.

SANTOS, M. S. DOS; BERNARDINO, A. M. R.; SOUZA, M. C. DE. Principais métodos de síntese de amidinas. **Química Nova**, vol. 29, no. 6, p. 1301–1306, 2006. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000600027>.

SASADA, T.; KOBAYASHI, F.; SAKAI, N.; KONAKAHARA, T. An unprecedented approach to 4,5-disubstituted pyrimidine derivatives by a ZnCl₂-catalyzed three-component coupling reaction. **Organic Letters**, vol. 11, no. 10, p. 2161–2164, 2009. <https://doi.org/10.1021/ol900382j>.

SHAW, A. T. *et al.* Ceritinib in ALK -Rearranged Non–Small-Cell Lung Cancer . **New England Journal of Medicine**, vol. 370, no. 13, p. 1189–1197, 2014. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1311107>.

SHIVANIKA, C.; DEEPAK KUMAR, S.; RAGUNATHAN, V.; TIWARI, P.; SUMITHA, A.; BRINDHA DEVI, P. Molecular docking, validation, dynamics simulations, and pharmacokinetic prediction of natural compounds against the SARS-CoV-2 main-protease. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, vol. 40, no. 2, p. 585–611, 2022. DOI 10.1080/07391102.2020.1815584. Available at: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1815584>.

TEJERO, T. N.; KÜMMERLE, A. E.; BAUERFELDT, G. F. Theory behind biginelli reaction revisited. **Revista Virtual de Química**, vol. 11, no. 4, p. 1203–1224, 2019. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190083>.

UPARE, A.; SATHYANARAYANA, P.; KORE, R.; SHARMA, K.; BATHULA, S. R.

Catalyst free synthesis of mono- and disubstituted pyrimidines from O-acyl oximes. **Tetrahedron Letters**, vol. 59, no. 25, p. 2430–2433, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.05.023>.

VERBITSKIY, E. V.; CHEPRAKOVA, E. M.; SLEPUKHIN, P. A.; KRAVCHENKO, M. A.; SKORNYAKOV, S. N.; RUSINOV, G. L.; CHUPAKHIN, O. N.; CHARUSHIN, V. N. Synthesis, and structure-activity relationship for C(4) and/or C(5) thienyl substituted pyrimidines, as a new family of antimycobacterial compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 97, p. 225–234, 2015. DOI 10.1016/j.ejmech.2015.05.007. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.05.007>.

VIEIRA, R. P.; SANTOS, V. C.; FERREIRA, R. S. Structure-based Approaches Targeting Parasite Cysteine Proteases. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 26, no. 23, p. 4435–4453, 2017. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170810165302>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases**. [S. l.: s. n.], 2017. Available at: https://unitingtocombatntds.org/wp-content/uploads/2017/11/4th_who_ntd_report.pdf.

ZANATTA, N.; AMARAL, S. S.; DOS SANTOS, J. M.; DE MELLO, D. L.; FERNANDES, L. DA S.; BONACORSO, H. G.; MARTINS, M. A. P.; ANDRICOPULO, A. D.; BORCHHARDT, D. M. Convergent synthesis and cruzain inhibitory activity of novel 2-(N'-benzylidenehydrazino)-4-trifluoromethyl-pyrimidines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, vol. 16, no. 24, p. 10236–10243, 2008. DOI 10.1016/j.bmc.2008.10.052. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2008.10.052>.

ZARENEZHAD, E.; FARJAM, M.; IRAJI, A. Synthesis and biological activity of pyrimidines-containing hybrids: Focusing on pharmacological application. **Journal of Molecular Structure**, vol. 1230, p. 129833, 2021. DOI 10.1016/j.molstruc.2020.129833. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129833>.

ZHAN, J. L.; WU, M. W.; CHEN, F.; HAN, B. Cu-Catalyzed [3 + 3] Annulation for the Synthesis of Pyrimidines via β -C(sp³)-H Functionalization of Saturated Ketones. **Journal of Organic Chemistry**, vol. 81, no. 23, p. 11994–12000, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b02181>.

ZHAO, D.; HUANG, S.; QU, M.; WANG, C.; LIU, Z.; LI, Z.; PENG, J.; LIU, K.; LI, Y.; MA, X.; SHU, X. Structural optimization of diphenylpyrimidine derivatives (DPPYs) as potent Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors with improved activity toward B leukemia cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 126, p. 444–455, 2017. DOI 10.1016/j.ejmech.2016.11.047. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.11.047>.

ZHOU, N.; XIE, T.; LI, Z.; XIE, Z. CuI/TEMPO-promoted one-pot synthesis of highly substituted pyrimidines from amino acid esters. **Chemistry - A European Journal**, vol. 20, no. 52, p. 17311–17314, 2014. <https://doi.org/10.1002/chem.201405447>.

APÊNDICES – ARTIGOS SUBMETIDOS

ARTIGO 1 – STRUCTURE-BASED DESIGN, OPTIMIZATION OF LEAD, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF COMPOUNDS ACTIVE AGAINST *TRYPANOSOMA CRUZI*

Periódico: Chemical Biology & Drug Design

Fator de Impacto (2021): 2,873

Structure-Based Design, Optimization of Lead, Synthesis and Biological Evaluation of Compounds Active against *Trypanosoma cruzi*

Gleybson Correia de Almeida², Gerliny Bezerra de Oliveira², Zenaide da Silva Monte², Érick Caique Santos Costa¹, Emerson Peter da Silva Falcão³, Luciana Scotti⁴, Marcus Tullius Scotti⁴, Ricardo de Oliveira Silva⁶, Valéria Rêgo Alves Pereira⁵, Elis Dionisio da Silva⁵, Policarpo Ademar Sales Junior⁵, Marton Kaique de Andrade Cavalcante⁵ and Sebastião José de Melo^{*1,2}

¹Postgraduate Program in Biological Sciences, Department of Biosciences, Federal University of Pernambuco/UFPE, Av. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50740-560 Recife, PE, Brazil.

²Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco/UFPE, Av. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50740-560 Recife, PE, Brazil.

³Vitória Academic Center, Federal University of Pernambuco - St Alto do Reservatório, Bela Vista, s/n, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.

⁴Laboratory of Cheminformatics, Program of Natural and Synthetic Bioactive Products (PgPNBSB), Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

⁵Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Federal University of Pernambuco - Campus da Av. Prof. Moraes Rego, s/n - University City, Recife - PE, 50740-465

⁶Department of Fundamental Chemistry, Center for Exact and Natural Sciences
Federal University of Pernambuco, Av. Journalist Anibal Fernandes, s/nº
University City - Recife, PE - CEP 50.740-560

***Correspondence:** Sebastião José de Melo

Abstract: Chagas' disease affects approximately eight million people throughout the world, especially the poorest individuals. The protozoan that causes this disease – *Trypanosoma cruzi* – has the enzyme cruzipain, which is the main therapeutic target. As no available medications have satisfactory effectiveness and safety, it is of fundamental importance to design and synthesize novel analogues that are more active and selective. In the present study, molecular docking and the *in silico* prediction of ADMET properties were used as strategies to optimize the trypanocidal activity of the pyrimidine compound **ZN3F** based on interactions with the target site in cruzipain. From the computational results, eight 4-amino-5-carbonitrile-pyrimidine analogues were proposed, synthesized (**5a-f** and **7g-h**) and, tested *in vitro* on the trypomastigote form of the Tulahuen strain of *T. cruzi*. The *in silico* study showed that the designed analogues bond favorably to important amino acid residues of the active site in

cruzipain. An *in vitro* evaluation of cytotoxicity was performed on L929 mammal cell lines. All derivatives inhibited the Tulahuen strain of *T. cruzi* and also exhibited lower toxicity to L929 cells. The **5e** product, in particular, proved to be a potent, selective ($IC_{50} = 2.79 \pm 0.00 \mu M$, selectivity index = 31.3) inhibitor of *T. cruzi*. The present results indicated the effectiveness of drugs based on the structure of the receptor, revealing the potential trypanocidal of pyrimidines. This study also provides information on molecular aspects for the inhibition of cruzipain.

Keywords: Pyrimidines, structure-based, molecular docking, *Trypanosoma cruzi*, cruzipain, Lead compound.

1. INTRODUCTION

Neglected tropical diseases constitute a group of twenty conditions that mainly affect low-income individuals. There are no completely effective medications for some of these diseases, such as American trypanosomiasis (Chagas' disease), which underscores the need for the development of novel drugs [1].

American Trypanosomiasis is a disease that affects approximately 8 million individuals. Caused by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), a protozoan normally transmitted by the bite of *Triatoma infestans* (blood-sucking beetles) which, after being bitten, defecates releasing *T. cruzi*, which penetrates through injured regions or in contact with the mucous membranes, and starts the cycle in mammals. Endemic to Latin America, Chagas disease can be transmitted orally by eating food contaminated by parasite [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]. In addition, this disease has been a concern in developed countries that have identified immigrants who presented the parasite and cause dissemination via blood and placental transmission [9,10], with an estimated 75 million people at risk of infection, especially in the 21 countries of Latin America [9, 11, 12, 13]. In humans, the disease manifests in the acute, undetermined or chronic form [3, 14], the latter of which affects nearly one-third of infected individuals and can impact different organs, including the heart, causing the most lethal form of the disease [15, 16, 17, 18]. The drug treatment of Chagas disease is based on nifurtimox and benznidazole, and the success rate of the treatment varies with the patient's age and stage of the disease. The best results are found when the patients are treated in the acute phase, obtaining a parasitological cure rate of 70 and 90% in young and congenital patients, respectively. There is a loss of effectiveness of these drugs with the passage of time of infection, and the use of benznidazole for patients in the chronic phase can obtain a cure rate above 60 % for young patients, and 2-40% in adult patients [3, 19, 20, 21, 22].

Although the Romaña sign (periorbital swelling syndrome) is characteristic in children bitten by insects [23, 24], most symptoms in the acute phase of the disease are nonspecific, which complicates the diagnosis, as the site of the bite is normally not evident [25, 26, 27]. Besides the loss of effectiveness of first-line medications in later stages of the disease [28, 29, 30, 31], nearly 40% of patients experience side effects of these drugs, exerting a negative impact on adherence to treatment, which takes approximately two months [32, 33, 34, 35, 36, 37].

The search for alternative drugs for *T. cruzi*, especially products that contain nitrogen heterocycles, has been the object of numerous studies [38, 39, 40, 41, 42]. Diazole compounds, such as pyrimidines, constitute the skeletal structure of some drugs used in anticancer and antiviral therapies [43, 44, 45, 46, 47]. Indeed, a large number of studies have been conducted on the development of pyrimidine compounds with a spectrum of action

ranging from antimicrobial to anti-Parkinson's activity [47]. Falcão *et al.* (2006) developed a variety of 4-amino-5-carbonitrile pyrimidine derivatives with diverse biological activities [48, 49].

Computational studies, such as molecular docking, constitute an approach for the determination of what variables can lead to the best results, enabling a better sampling of conformations at the binding site of the target enzyme [50, 51, 52, 53]. Based on previous studies conducted by our research group [49], in which a set of pyrimidines were active against *T. cruzi*, the compound **ZN3F** was used in the present investigation for the optimization of anti-Chagas' disease activity using molecular docking and the *in silico* prediction of ADMET properties to design analogues based on the target site of cruzipain.

2. MATERIALS AND METHODS

All materials, reagents and solvents were acquired (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) and used without additional purification. Monitoring of the chemical reactions was performed using thin-layer chromatography in silica gel 60 F254 acquired from Merck (New Jersey) wrapped in aluminum foil and viewed under an ultra-violet (UV) light using a VL-6.MC device with lamps of 6 W/312 nm and 6 W/254 nm (power: 12 W). Column chromatography was conducted in silica 60 (35-70 microns) with n-hexane-ethyl acetate (7:2) as the eluent. ¹H-NMR spectra were recorded in a VARIAN VNMRS400 spectrometer operating at 400 MHz and 100 MHz for ¹H and ¹³C nuclei, respectively, on the δ scale, using DMSO-d₆ as the solvent and tetramethylsilane (TMS) as the internal standard. Chemical shifts in this study were obtained in parts per million (ppm) using TMS for the internal standard as the reference for ¹H-NMR (δ = 0.00 ppm). Coupling constants (J) were measured in Hertz (Hz) and multiplicities were expressed as singlet (s), doublet (d), triplet (t), doublet of doublets (dd) and multiplet (m). Mass analyses were performed using Maldi-TOF (Bruker Daltonics), a Deisi-Nermag mass spectrometer, coupled to GC (HP 5890) at an ionization potential of 70 eV and Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS) with Esquire 3000 Plus, Amazon speed ETD, MicroTOF and Maxis 3G. Melting points were determined using the BUCHI M-560 device (Switzerland) (UFPE control: 15165/2013).

3. EXPERIMENTAL

3.1. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF PYRIMIDINES

Synthesis of Knoevenagel 3 adduct:

Equal molar quantities of aromatic aldehyde with electron donating or electron withdrawing substituents (1.587 mmol) and malononitrile (1.587 mmol) were placed in a round bottom flask. The reagents were kept under stirring, using methanol as the solvent (20 mL), and in reflux. The reaction was monitored by thin-layer chromatography. At the end of the reaction, after cooling to room temperature, a precipitate of the product was observed in the form of crystals in the reaction medium, which were filtered by vacuum. The presence of a small amount of product in the supernatant was also observed. Thus, the solvent was evaporated under reduced pressure and subsequently purified by column chromatography, obtaining a second portion of the pure product [54].

Obtainment of amidines 4 and 6.

Amidines were purchased from Sigma-Aldrich.

Preparations of pyrimidine derivatives 5 and 7:

Pyrimidine derivatives **5** and **7** were prepared through the reaction of equal molar quantities of the intermediate bisnitrile **3** (1.24 mmol) and amidine **4** or **6** (1.24 mmol) catalyzed by triethylamine or piperidine (4–12 drops) in a methanolic medium (20 mL) in a round bottom flask. The reaction was kept under agitation and refluxed for three to seven hours. After confirmation at the end of the reaction by thin-layer chromatography, the reaction medium was cooled to room temperature and the formed crystals were separated by vacuum filtration in a sintered filter. The reaction liquid was evaporated at low pressure and the resulting solid was purified by recrystallization with cold methanol. The product was recrystallized in an adequate solvent [54].

The compounds **5a**, **5b**, and **5d–5f** are described in the literature [54, 55] and their spectroscopic data are presented below:

4-Amino-2-(phenyl)-6-(p-fluorophenyl)-pyrimidine-5-carbonitrile (5a): This compound was generated as white crystals in 77% yield. M.p. 225–227°C; $R_f = 0.52$ (n-hexane–ethyl acetate 8:2); $\lambda_{\max}/\text{cm}^{-1}$ (KBr): 3474, 3350, 2217, 1640; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 8.40 (2H, dd, $J = 7.00$ Hz); 8.07 (2H, dd, $J = 8.08$ Hz, $J = 5.60$ Hz); 8.00 (2H, b, NH_2); 7.43–7.58 (3H, m); 7.43 (2H, t, $J = 8.80$ Hz). m/z (rel. int) 290 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100), 187 (78): [Found: C 68.29; H 3.82; N 18.50; Calc. for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{FN}_4 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$: C 68.25; H 4.04; N 18.71%].

4-amino-6-(p-methoxyphenyl)-2-phenylpyrimidine-5-carbonitrile (5b): This compound was obtained as white crystals in 54.6% yield, m.p. 214–215°C; $R_f = 0.39$ (n-hexane/ ethyl acetate, 8:2); (KBr, $\lambda_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3475 (NH_2 asym), 3343 (NH_2 sym), 2217 (CN), 1638 ($\text{C}=\text{N}$); $^1\text{H-NMR}$: (DMSO- d_6 , 300 MHz), δ 8.38 ppm (m, 2H), 7.12 ppm (d, 2H), 7.72 ppm (s, 2H, NH_2), 8.0 ppm (d, 2H), 7.52 ppm (m, 3H), 3.84 ppm (s, 3H, CH_3O), MS: m/z (rel. int.) 317 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100), 318 (49.66). Anal. Calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O} \cdot 1/4\text{H}_2\text{O}$: C, 61.44%; H, 3.86%; N, 19.90%. Found: C, 61.40%; H, 3.75%; N, 19.96%.

4-amino-6-(p-bromophenyl)-2-phenylpyrimidine-5-carbonitrile (5d): This compound was obtained as white crystals in 47% yield. M.p. 228–230°C, (KBr, $\lambda_{\max}/\text{cm}^{-1}$) 3447 cm^{-1} , 3358 cm^{-1} (NH_2), 2234 cm^{-1} (CN), 1627 cm^{-1} , 1613 cm^{-1} ($\text{C}=\text{N}$), 1557 cm^{-1} (Ar) cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) 3.85 ppm (3H, Br), 7.52–8.41 ppm (m, Ar e NH_2); HRMS (Micro-TOF) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{BrN}_4^+$ 353.0219, found 353.0255.

4-amino-6-(p-toluyphenyl)-2-phenylpyrimidine-5-carbonitrile (5e): This compound was obtained as white crystals in 47% yield. M.p. 208–210 °C; IR (KBr, $\lambda_{\max}/\text{cm}^{-1}$) 3456 cm^{-1} , 3321 cm^{-1} (NH_2), 2208 cm^{-1} (CN), 1651 cm^{-1} , 1623 cm^{-1} ($\text{C}=\text{N}$), 1557 cm^{-1} (Ar); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) 2.38 ppm (3H, s, CH_3), 7.42–8.20 ppm (m, Ar and NH_2); HRMS (Micro-TOF) $[\text{M}+\text{K}]^+$ calculated $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4$ 325.0849, found 325.1047.

4-amino-6-(p-ethoxyphenyl)-2-phenylpyrimidine-5-carbonitrile (5f): This compound was obtained as white crystals in 52% yield. M.p. 206–208 °C; IR, (KBr, $\lambda_{\max}/\text{cm}^{-1}$) 3433 cm^{-1} , 3368 cm^{-1} (NH_2), 2234 cm^{-1} (CN), 1634 cm^{-1} , 1616 cm^{-1} ($\text{C}=\text{N}$), 1559 cm^{-1} (Ar); $^1\text{H-NMR}$, (300 MHz, DMSO- d_6) 3.81 ppm (3H, OC_2H_5), 7.47–8.22 ppm (m, Ar e NH_2); HRMS (Micro-TOF) $[\text{M}+2\text{Na-H}]^+$ calculated $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}^+$ 362.1108, found 362.9787.

The spectroscopic data of the compounds unpublished are presented below:

4-Amino-5-cyano-2-phenyl-6-(p-formylbenzoate)-pyrimidine (5c): This compound was obtained as white crystals in 37% yield. M.p. 264.5 °C; R_f 0.38 (n-hexane/ ethyl acetate, 7:3). ^1H and ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6): 8.4 ppm (2H, d, ArH); 7.57 e 7.53 ppm (3H, t, Ar-H, J 1.6 Hz); 8.16 e 8.08 ppm (6H, m, ArH); 3.91 ppm (3H, s, CH_3); 164.09 ppm (1C, CN); 128.42 ppm (2C, Ar); 1131.64 ppm (3C, Ar); 167.22 ppm (1C, $\text{C}=\text{O}$); 165.69 ppm (1C, Pir); 164.42 ppm (1C, Pir); 164.09 ppm (1C, CN); 140.79 ppm (1C, Ar); 136.37 ppm (1C, Ar); 131.43 ppm (1C, Ar); 130.3 ppm (2C, Ar); 129.02 ppm (1C, Ar); 129.21 ppm (2C, Ar); 128.51 ppm (2C, Ar); 116.02 ppm (1C, pir); 84.9 ppm (1C, Pir); 52.4 ppm (1C, OCH_3). HRMS (MALDI-TOF) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ 331.1150, found 331.1226.

4-amino-6-(p-methoxyphenyl)-2-amidopyrimidine-5-carbonitrile (**7g**): This compound was obtained as white crystals in 91% yield. ^1H and ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) 3.79 ppm (s, 3H, OCH₃), 6.52-6.58 ppm (2H, m, Ar and NH₂), 6.69 and 7.06 ppm (m, Ar, NH₂ amide), 2.99 and 1.65 ppm (2H, HCH amide), 6.99-7.27 ppm (4H, m, Ar), 105.9 ppm (1C, HCH amide), 168.7 ppm (1C, C=O), 160.3 ppm (1C, CN), 118 ppm (1C, Ar), 113.5 ppm (1C, Ar), 129.8 ppm (2C, Ar); 167.22 (2C, Ar), 118 ppm (1C, Pir), 158.3 ppm (1C, Pir), 77.8 ppm (1C, Pir), 152.3 ppm (1C, Pir). HRMS (Micro-TOF) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculated C₁₄H₁₃N₅O₂ 306.0961, found 306.0967.

4-amino-6-(m-nitrophenyl)-2-amidopyrimidine-5-carbonitrile (**7h**): This compound was obtained as yellow amorphous crystals in 78% yield, ^1H and ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6), 6.72-6.68 ppm (2H, m, Ar and NH₂), 7.15-7.12 ppm (m, Ar, NH₂ amide), 2.97 and 1.65 ppm (2H, HCH amide), 7.73-8.31 ppm (4H, m, Ar), 106.4 ppm (1C, HCH amide), 168.0 ppm (1C, C=O), 160.3 ppm (1C, CN), 138.4 ppm (1C, Ar), 123.5 ppm (1C, Ar), 147.2 ppm (1C, Ar), 135.5 ppm (1C, Ar), 129.9 ppm (1C, Ar), 123.6 ppm (1C, Ar), 158.2 ppm (1C, Pir), 117.8 ppm (1C, Pir), 76.8 ppm (1C, Pir), 150 ppm (1C, Pir). HRMS (Micro-TOF) $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$ calculated C₁₃H₁₁N₆O₃⁺ 344.0598, found 344.0364.

3.2. TARGET AND LIGANDS PREPARATION

The structures of the ZN3F compound and the pyrimidine derivatives optimized based on the structure of the receptor (**5a-f** and **7g-h**) were drawn and the respective energies were minimized using the BIOVIA Discovery Studio software (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>). The crystallographic structure of cruzipain from *T. cruzi* was downloaded from the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) with ID PDB: 3LXS [42].

3.3. MOLECULAR DOCKING AND LEAD OPTIMIZATION

Molecular docking between the co-crystallized **WRR-483** ligand, the **ZN3F** compound, compounds **5a-f** and **7g-h** and **3LXS** was performed using the Molegro Virtual Docker, v. 6.0.1. The GRID was defined with a radius of 10Å and 0.30 resolution to encompass all amino acid residues of the active site of 3LXS. The GPU Screening algorithm (CUDA), internal ES, internal HBond, sp²-sp² torsions and poses com RMSD lower than 1.00 were defined in the software. Scores in KJ.mol⁻¹ were generated by five different scoring functions: GPU Score, MolDock Score [GRID], Rerank Score, Docking Score and Similarity Score. Consensus analysis of all scores was performed using the average of auto-scaled scores (AASS) [55] (Supplementary material 1). The best poses were selected, and the compounds were ranked as a function of the consensus average. For lead optimization, interactions of the best poses among **WRR-483**, the **ZN3F** compound and amino acid residues of the active site of 3LXS were analyzed using the BIOVIA Discovery Studio (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>). The prototype compounds were designed based on these interactions and were also analyzed in the BIOVIA Discovery Studio.

3.4. PHARMACOKINETIC AND TOXICOLOGICAL PREDICTIONS

Analysis of the pharmacokinetic and toxicological profile of compounds **5a-f** and **7g-h** was performed using information generated by the OSIRIS Property Explorer software (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

3.5. ILLUSTRATIONS

Illustrations of the interactions between ligands and amino acid residues were created using the BIOVIA Discovery Studio (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>).

3.6. IN VITRO ASSAY OF AMASTIGOTE AND TRYPOMASTIGOTE FORMS OF *T. CRUZI*

The *in vitro* test of trypanocidal activity was performed using a *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain) expressing the *Escherichia coli* β -galactosidase gene. Infective trypomastigote forms were obtained through culture in monolayers of mouse L929 fibroblasts in RPMI-1640 medium. For the bioassay, 4,000 L929 cells were added to each well of a flat-bottom 96-well plate. After an overnight incubation, 40,000 trypomastigotes were added to each well and the cells are incubated for 2 h. Medium containing parasites that did not penetrate the cells was replaced with 200 μ L of fresh medium and the plate was incubated for an additional 48 h to establish infection. The medium was then replaced with solutions of compounds at different concentrations in fresh medium and the plate was incubated for 96 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. After this period, 50 μ L of 500 μ M chlorophenol red β -D-galactopyranoside in 0.5% Nonidet P40 was added to each well and the plate was incubated for 16-20 h at 37°C, after which the absorbance at 570 nm was measured. Controls with uninfected cells, untreated infected cells, infected cells treated with benznidazole (positive control) or DMSO 1% were used. The results were expressed as the percentage of *T. cruzi* growth inhibition in compound-tested cells as compared to the infected cells and untreated cells. Quadruplicates were run in the same plate. The 50% inhibitory concentration (CI₅₀) were determined by linear interpolation with the aid of Excel program.

3.7. CYTOTOXICITY

Cytotoxicity to mammalian cells was evaluated using the alamarBlue® assay. This system incorporates an oxidation-reduction indicator that both fluoresces and changes color in response to chemical reduction of growth medium resulting from cell growth. Innate metabolic activity of the cells results in a chemical reduction of alamarBlue® and reduction related to growth causes the Redox indicator to change from oxidized (non-fluorescent, blue) form to reduced (fluorescent, red) form. This change can be measured using spectrophotometric analysis

L929 cells were plated in flat-bottom 96-well plates and incubated for 72 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for adherence. The compounds were then added at concentrations of 0.78 to 100 μ g/mL, followed by further incubation for 96 h. After 96 h of incubation with the compounds the alamarBlue® was added and the absorbance was read at two wavelengths after 4-6 h using the Thermo Scientific Multiskan FC spectrophotometer. Controls with untreated and DMSO 1%-treated cells were run in parallel. Quadruplicates were run in the same plate. The results were expressed as the percent difference in the reduction between treated and untreated cells using the equation recommended by manufacturer. The cytotoxic concentration for 50% of the cells (CC₅₀) was determined by linear interpolation with the aid of Excel program.

3.8. SELECTIVITY INDEX

The selectivity index (SI) was calculated for the parasite to determine the selectivity of the compounds. The SI is the CC_{50}/CI_{50} ratio, with higher values indicating greater specificity for the parasite. Micromolar values were considered for the determination. SI values less than 1 were considered not indicative of parasitic selectivity [56].

4. RESULTS

4.1. CRUZAPAIN SELECTION AND REDOCKING:

Cruzapain is the main cysteine protease of *T. cruzi* and is expressed throughout the life of the parasite, playing important roles in its survival [58, 59, 60, 61, 62]. Studies have shown that cruzipain is structurally highly homologous to papain, exhibiting the same general entanglement pattern and structure of the active site, with seven binding sites to the substrate (acyl side - S4, S3, S2 and S1; amino side - S19, S29 and S39) as well as Cys25, His159 and Asn175 as the catalytic triad [58, 63]. These and other factors make cruzipain an important biological target in *T. cruzi* [64, 65, 66, 67, 68].

The structure of the active site of cruzipain in *T. cruzi* (PDB ID: 3LXS), which is determined by interactions between its respective amino acid residues and the vinyl sulphone-derived inhibitor (**WRR483**), was used as the model for the molecular docking studies.

Despite being one of the most widely used methods for the development of drugs, molecular docking can have considerable variation depending on the ligand-protein complex studied [69, 70]. One way to validate the method is through the redocking of the co-crystallized ligand to evaluate the capacity of the software program to reproduce its crystallographic pose. This aspect is measured using the root mean square deviation (RMSD) [71].

Thus, the validation of the Molegro Virtual Docker program was performed by the redocking of the co-crystallized ligand of 3LXS, **WRR-483** and the overlap of poses on the co-crystallized complex. The RMSD value obtained for the best pose was less than 0.5, demonstrating the excellent capacity of the program to reproduce the crystallographic pose of **WRR-483**.

4.2. MOLECULAR DOCKING ANALYSES OF ZN3F.

The analysis of the pose with the best score for the interaction between **ZN3F** and cruzipain revealed that the entire molecule was immersed in the active site of 3LXS, with the N,N-dimethylaniline portion anchored more deeply than the pyrimidine ring and with *p*-nitrobenzene more towards the outer portion of the active site (Fig. 1A). The analysis of the overlap of **ZN3F** and the co-crystallized ligand revealed that the anchorage of both molecules occurs in the same location of the active site (Fig. 1B) and the two molecules have common interactions with seven amino acid residues: Gln19, Cys25, Gly66, Ala138, His162, Trp184 and Glu208. This indicates that the **ZN3F** compound serves as a possible inhibitor of cruzipain, enabling the design of novel compounds with optimized potency based on the structure of the receptor.

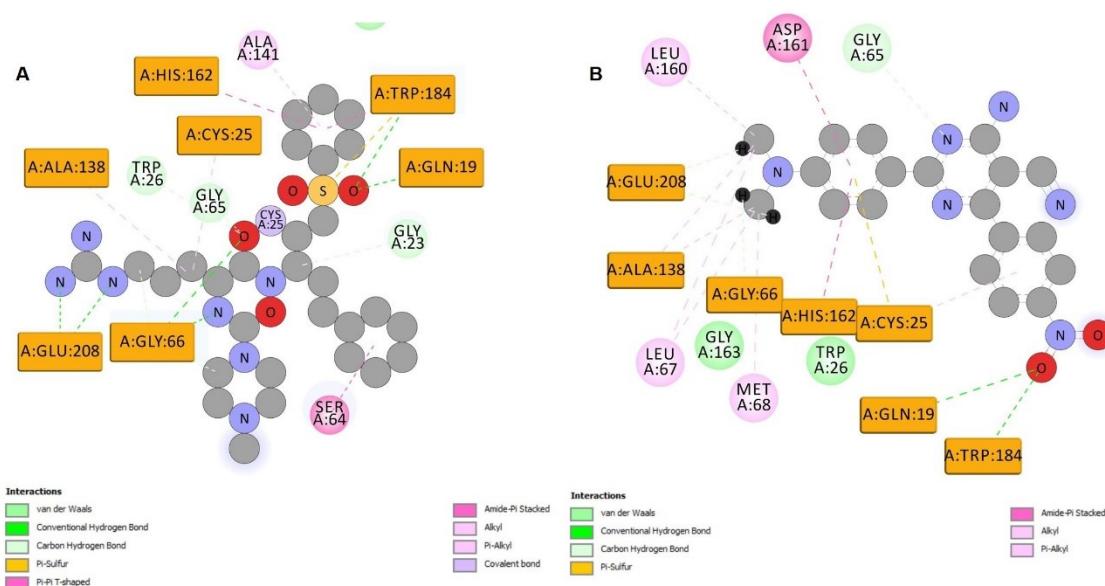


FIGURE 1 | Analysis of cruzipain binding site. Binding complex between co-crystallized WRR-483 ligand and 3LXS enzyme (**A**). Binding complex between **ZN3F** ligand and 3LXS enzyme (**B**). The amino acid residues in common between co-crystallized WRR-483 ligand and **ZN3F** are highlighted as an orange rectangle.

4.3. OPTIMIZATION OF ZN3F:

To design structures of potentially more active compounds, the first step was to obtain more information on the best pose between **ZN3F** and cruzipain and relate it to structural and electronic information regarding the active site.

As shown in Figure 2A, hydrophobic interactions with the amino acid residues Gly66, Leu67, Met68, Ala138, Leu160, Asp161, His162 and Glu208 seem to be the most important to energetically favorable anchorage. Studies have demonstrated that Glu208 is a critical residue located in the S2 subsite of the active site, which is absent from diverse other proteases, including human cathepsins [72, 73]. Another fundamental interaction involves the Cys25 residue, which is part of the catalytic triad. Despite favoring the formation of hydrogen bridges with the Gln19 and Trp184 residues, the presence of the nitro group in position 4 of the benzene ring diminishes electronic density in the aromatic ring, consequently diminishing the interaction capacity with Cys25.

The analysis of the hydrophobic surface of cruzipain with the **ZN3F** compound also furnished important information for the design of novel compounds, such as area 1, which demonstrates the S2 hydrophobic pocket, area 2, with the possibility of hydrophobic interactions and polar interactions in the S' pocket, and area 3, with potential for polar interactions in the S1 pocket.

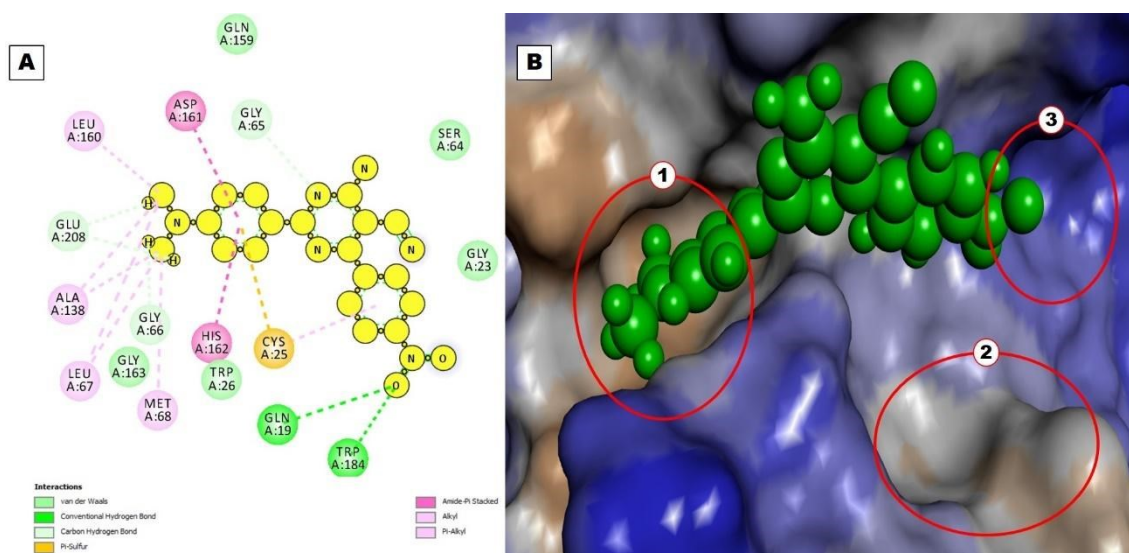


FIGURE 2 | Optimization of **ZN3F** compound based on structure of receptor. Interactions between **ZN3F** ligand and amino acid residues of active site of 3LXS enzyme (**A**). Hydrophobic surface of active site of 3LXS enzyme, with anchored **ZN3F** (green) and respective S2 (area 1), S' (area 2) and S1 (area 3) subsites highlighted.

Based on the analyses described above, pyrimidine derivatives were designed with the aim of enhancing the affinity with the amino acid residues of the active site in cruzipain, consequently enhancing potency and selectivity. Structural changes were performed by exploring substitutions in the lateral chains of the pyrimidine ring.

The eight analogue compounds (**5a-f** and **7g-h**) were anchored *in silico* in the active site of 3LXS. The consensus of their scores and interactions were analyzed and compared to that of the **ZN3F** compound and co-crystallized ligand. The compound with the best score was **5f**, which was higher than that of **ZN3F** and **WRR-483**, followed by compounds **5b** and **5c**. The other compounds had scores slightly lower than that of **ZN3F**. All compounds had interactions in common, such as with the Cys25 amino acid residue (Table 1).

TABLE 1 – Consensus ranking and amino acid residues involved in interactions.

Id	Score	Interactions
5f	5. 0.944	Cys25, Leu67, Met68, Ala138, Leu160, Asp161 e Glu208
5b	6. 0.909	Cys25, Met68, Ala138, Leu160 e His162
5c	7. 0.898	Gln19, Cys25, Ser64, Met68, Ala138, Asp161, His162 e Trp184
ZN3F	0.883	Gln19, Cys25, Gly65, Gly66, Leu67, Met68, Ala138, Leu160, Asp161, His162, Gly163, Trp184 e Glu208
5d	8. 0.875	Gly23, Cys25, Met68, Ala138, Asp161 e His162
5e	9. 0.869	Cys25, Met68, Ala138 e Asp161
5a	10. 0.863	Cys25, Met68, Asp161, His162 e Glu208

7g	11.0.856	Cys25, Gly66, Met68 e His162
7h	12.0.823	Cys25, Ser64, Met68, Ala138, Asp161
WRR-483	13.0.802	Gln19, Cys25, Gly66, Met68, Ala138, Leu160, Asp161, His162, Trp184 e Glu208

13.1. PHARMACOKINETIC AND TOXICOLOGICAL ANALYSES OF PYRIMIDINE DERIVATES:

Although five of the eight analogues proposed have been described in the literature, their pharmacokinetic and toxicological properties have not been reported. Therefore, the second step was the *in silico* evaluation of the pharmacokinetic and toxicological aspects of all compounds with the aid of the Osiris software program. Pharmacokinetic properties (Table 2) were evaluated according to Lipinski's Rule of Five, which involves the variables absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) [74].

None of the compounds violated the Rule of Five and the ADMET parameters indicated good absorption as well as solubility ranging from good to moderate. The analysis of toxicity predictions also demonstrated that, unlike **ZN3F** (high mutagenic and tumorigenic probability), the compounds are not mutagenic or tumorigenic and do not cause reproductive problems or irritation.

TABLE 2 – ADMET profile of pyrimidine analogues (5a-f and 7g-h)

ID	Molweight	cLogP	H-Acc ^a	H-Don ^b	Violation	Mutagenic	Tumorigeni ^c	RE ^c	Irritant
5a	290.3	3.1001	4	1	0	None	None	None	None
5b	302.336	2.9293	5	1	0	None	None	None	None
5c	330.346	2.9123	6	1	0	None	None	None	None
5d	351.206	3.7245	4	1	0	None	None	None	None
5e	286.337	3.3432	4	1	0	None	None	None	None
5f	346.389	3.2656	6	1	0	None	None	None	None
7g	283.29	0.2612	7	2	0	None	None	None	None
7h	298.261	-0.5904	9	2	0	None	None	None	None
ZN3F	360.38	1.7906	8	1	0	High	High	None	None

^ahydrogen bond acceptors. ^bhydrogen bond donors. ^cReproductive effective.

13.2. SYNTHESIS OF PYRIMIDINES (5A-F AND 7G-H):

Based on the results of the computational studies conducted with the **ZN3F** compound, 4-amino-5-carbonitrile-1,3-pyrimidine derivatives containing aryl and amide substitutions (**5a-f** and **7g-h**) were prepared as shown in Figure 3.

Compound **3**, obtained by the Knoevenagel reaction between aldehydes **1** and bisnitrile **2**, were submitted to the condensation reaction with the amidines (**4** and **6**) under reflux to obtain pyrimidines **5a-f** and **7g-h** as post-amorphs or crystals, with yields that ranged from 50 to 90%. Among these compounds, the **5c** and **7g-h** derivatives are unprecedented. However, none of the derivatives described in the literature have been tested for trypanocidal activity. For the known compounds, the structural confirmation was performed based on the literature [54].

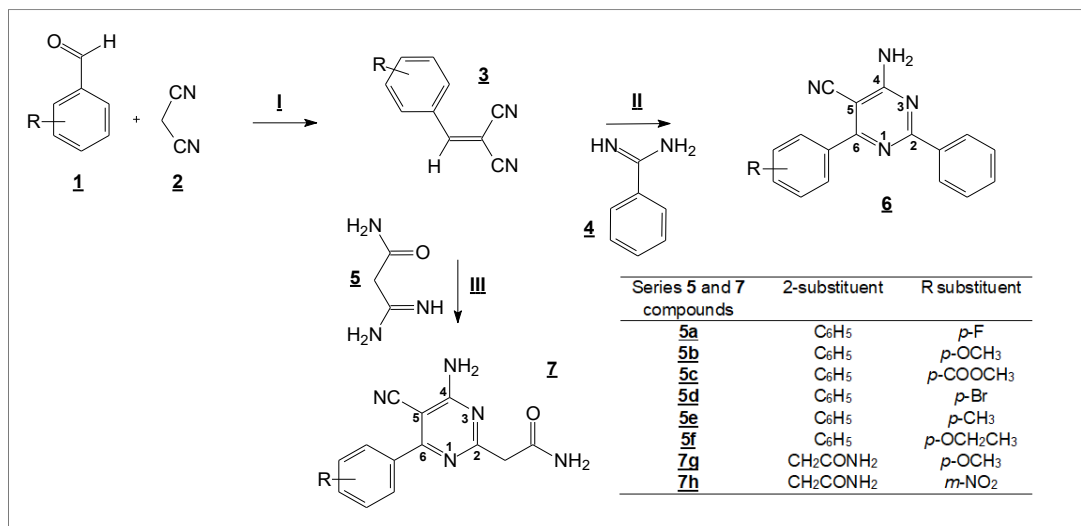


Figure 3:
Reaction steps for

obtainment of pyrimidines. I) aldehyde **1**, malononitrile **2**, in methanol and room temperature or reflux. II) and III) intermediate of bisnitrile **3**, amidine **4** or **6**, methanol and room temperature or reflux.

13.3. TRYPANOCIDAL ACTIVITY:

We evaluated the activity of the **5a-f** and **7g-h** derivatives against *T. cruzi*. All derivatives inhibited the trypomastigote form of the Tulahuen strain of *T. cruzi*. The best results were found with the **5** series and compounds **5a**, **5b** and **5d** had very low IC₅₀ values, when compared with the compound ZN3F used as lead compound, as shown in Table 3. Derivative **5e** had the lowest IC₅₀ (2.79±0.00 μM) among those tested in this study, and compound **5c** had an IC₅₀ slightly above the best performing derivatives, but with values close to these. Cell viability analysis was then performed considering the toxicity of the inhibition concentrations of the compounds to the L929 mammal cell lines. As shown in Table 3, practically all compounds had higher cytotoxicity values (CC₅₀) than parasite IC₅₀ values. The best SI results were found for the **5e** and **5b** derivatives (31.3 and 25, respectively), which performed better than benznidazole.

TABLE 3 - Structure of pyrimidine derivatives and activity against *T. cruzi*

ID	IC ₅₀ about the parasite ¹ (μM)	CC ₅₀ about L929 ² (μM)	Selectivity Index ³ (SI)
5a	6.55±3.44	43.06	6.6

5b	3.31±1.32	82.69	25
5c	27.54±1.82	75.68	2.7
5d	8.26±1.71	71.18	8.6
5e	2.79±0.00	87.30	31.3
5f	5.37±1.26	39.51	7.4
7g	229.09±43.77	352.99	1.5
7h	107.95±35.2	335.27	3.1
ZN3F	13.96±0.00	203.56	14.58
Benznidazole	1.84±0.12	2074.93	1125

¹Concentration of compound that reduces growth of parasite by 50%, (average ± standard deviation from at least two experiments), ²Concentration of compound that inhibits viability of L929 cells by 50%, ³CC₅₀ of compound to cells divided by IC₅₀ of compound to parasite.

5. DISCUSSION

Motivated by the good activity of the **ZN3F** compound against *T. cruzi* (IC₅₀ = 13.96 µM and SI = 14.58) and the need to develop novel drugs for the treatment of Chagas' disease, molecular docking studies were conducted to optimize trypanocidal activity and identify novel inhibitors of the enzyme cruzipain.

Although all analogues docked favorably in the binding region, different degrees of inhibition were found. For instance, the pyrimidine compounds **5a**, **5b**, **5d**, **5e** and **5f** had enhanced trypanocidal activity, with IC₅₀ values ranging from 2.79±0.00 to 8.26±1.71 µM. Despite exhibiting good activity (IC₅₀ = 27.54 ± 1.82 µM), the **5c** analogue was less active than **ZN3F** and compounds **7g** and **7h** had high IC₅₀ values (229.09 ± 43.77 µM and 107.95±35.2 µM, respectively).

The variations in the lateral chains of the pyrimidine ring directly influenced the electronic and physicochemical properties and consequently exerted an influence on the trypanocidal activity of these compounds.

Substitutions in the alkyl group of C6 of the pyrimidine ring, which were planned considering interactions with amino acid residues in the hydrophobic pocket of the S2 subsite, resulted in compounds with a lower *in silico* score for cruzipain and greater *in vitro* potency against *T. cruzi*. Previous studies reported that compounds containing hydrophobic substituents that interact with amino acid residues of the S2 site were more potent and more selective with regards to cruzipain [75, 58, 76].

The hydrophobic S2 site could be reached more effectively by the incorporation/presence of phenyl rings without substituents and phenyl substituted with methyl, fluoro and methoxy groups in the *-para* position.

Compound **5e** – substituted with *p*-toluoyl at C6 of the pyrimidine ring – was the most potent and most selective of the analogues tested ($IC_{50} = 2.79 \pm 0.00 \mu M$, SI > 31.3). The presence of the methyl *p*-toluoyl group, which is less voluminous than the two methyl present in the *N,N*-dimethylaniline of the **ZN3F** compound, likely enabled greater approximation between the molecular surface and surface of the active site of the protein as well as greater immersion in the S2 subsite. As shown in Figure 3 (Supplementary material 1), the methyl group is immersed in the S2 subsite, performing hydrophobic interactions with Ala138. Its hyperconjugation effect increases electronic density in the aromatic ring and enables two sulfur- π interactions with Met68 and Cys25. Two other sulfur- π interactions were found between Cys25 and both the pyrimidine rings and phenyl.

The interaction with Cys25, which is an important residue of the catalytic triad, may have been fundamental to the excellent activity and selectivity of compound **5e** (Figure S5) for *T. cruzi*. Studies have shown that this type of interaction can generate both intermolecular and intramolecular stabilization and enhance drug/target affinity [77]. Moreover, most of the compounds had sulfur- π interactions with Cys25. The compound **5e** also proved to be twice as selective as **ZN3F** (SI = 14.58).

Compounds **5f** and **5b** (Figure S6 and S2, respectively) also exhibited potent trypanocidal activity ($IC_{50} = 5.37 \pm 1.26$ and $3.31 \pm 1.32 \mu M$, respectively). Hydrophobic interactions were also predominant, demonstrating the importance of these interactions for a potent inhibitory effect.

Halogenated compounds have also been reported to be potent inhibitors of *T. cruzi* [78, 79, 80]. In the present study, compound **5a** (Figure S1) exhibited excellent inhibition ($IC_{50} = 6.55 \pm 3.44 \mu M$). Despite interaction with the active site of cruzipain in a similar manner as compound **5e**, compound **5a** (Figure S1) exhibited fewer hydrophobic interactions with the S2 pocket. The interaction between fluorine and Glu208 may have been important to its greater selectivity compared to the standard compound benznidazole.

Compound **5d** (Figure S4) exhibited hydrophobic interactions with the S2 pocket, which may be related to its excellent trypanocidal activity ($IC_{50} = 8.26 \pm 1.71 \mu M$ and SI > 8.6).

Lastly, despite interesting interactions, such as the sulfur- π interaction with Cys25, hydrophobic interaction with the S2 pocket and hydrogen bridges with Gln19 and Trp184, compound **5c** (Figure S3) achieved good inhibition ($IC_{50} = 27.54 \pm 1.82 \mu M$), but its inhibitory action was the lowest among the compounds of the 5 series. The compounds with the lowest inhibition activity were **7g** and **7h**, Figure S7 and S8, respectively, ($IC_{50} = 229.09 \pm 43.77 \mu M$ and $107.95 \pm 35.2 \mu M$, respectively), both of which were modified at C2 with the aim of enhancing hydrophilicity and the interaction with the S' or S1 pocket. These compounds exhibited few interactions

with the hydrophobic S2 pocket, lending further strength to the hypothesis of the importance of these interactions to the potency of trypanocidal activity.

6. CONCLUSION

A strategy was developed using molecular docking for the optimization of pyrimidine derivatives for the treatment of Chagas' disease. The compound **ZN3F**, which had previously been studied for its effects on *T. cruzi* by our research group, was used as the lead for the design of analogues with optimized trypanocidal activity based on the structure of cruzipain using *in silico* approaches. This strategy addressed strategic interactions with important amino acid residues of the active site of cruzipain as well as pharmacokinetic and toxicological aspects. All nine compounds synthesized – three of which (**5c**, **7g** and **7h**) were unprecedented – presented trypanocidal activity. Compound **5e** stood out for its similar potency to benznidazole and approximately 2 times greater selectivity compared to the lead compound **ZN3F**. Possible interactions between the hydrophobic substituents at C6 of the pyrimidine ring and the S2 pocket contributed in a highly significant manner to the potency against *T. cruzi*. Moreover, the computational studies showed that sulfur- π interactions with Cys25 are a promising strategy to explore in the development of reversible cruzipain inhibitors. These results offer interesting novel aspects that can contribute to the binding mode and mechanism of action of cruzipain inhibitors. The optimization strategy also proved effective at improving toxicological aspects of the compounds synthesized. The present findings demonstrate the potential of pyrimidines in the treatment of Chagas' disease and broaden our understanding of the molecular aspects of cruzipain inhibition.

7. FUNDING

“This work was funded between applicable grants CAPES (grant number 88882.379875/2019-01)”.

8. REFERENCES

- [1] World Health Organization. (2017). Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255011>. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [2] De Morais CGV, Castro Lima AK, Terra R, Dos Santos RF, Da-Silva SAG, Dutra PML. The dialogue of the host-parasite relationship: Leishmania spp. and Trypanosoma cruzi Infection. BioMed Research International. Hindawi Publishing Corporation 2015; 2015. <https://dx.doi.org/10.1155/2015/324915>
- [3] Pérez-Molina JA, Perez AM, Norman FF, Monge-Maillo B, López-Vélez R. Old and new challenges in Chagas disease. The Lancet Infectious Diseases. Lancet Publishing Group 2015; 15: 1347–56.
- [4] Herrera CP, Licon MH, Nation CS, Jameson SB, Wesson DM. Genotype diversity of Trypanosoma cruzi in small rodents and Triatoma sanguisuga from a rural area in New Orleans, Louisiana. Parasites and Vectors 2015; 8: 123–131.
- [5] Dias FBS, Quartier M, Diotaiuti L, Mejía G, Harry M, Lima ACL, et al. Ecology of Rhodnius robustus Larrousse, 1927 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Attalea palm trees of the Tapajós River Region (Pará State, Brazilian Amazon). Parasites and Vectors 2014; 7: 1–11.

- [6] De Jesus AC, Madeira FP, Moraes MH da S, de Moraes AA, de Oliveira J, da Rosa JA, et al. Occurrence of triatomines (Hemiptera, reduviidae) and their natural infection by *trypanosoma cruzi* (chagas, 1909) in boca do moa community, cruzeiro do sul, acre, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2021; 54: 1–5.
- [7] Shender LA, Lewis MD, Rejmanek D, Mazet JAK. Molecular Diversity of *Trypanosoma cruzi* Detected in the Vector *Triatoma protracta* from California, USA. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10: 1–22.
- [8] Martins-Melo FR, Carneiro M, Ribeiro ALP, Bezerra JMT, Werneck GL. Burden of Chagas disease in Brazil, 1990–2016: findings from the Global Burden of Disease Study 2016. *Int J Parasitol*. 2019; 49: 301–10.
- [9] Garcia MN, Woc-Colburn L, Aguilar D, Hotez PJ, Murray KO. Historical Perspectives on the Epidemiology of Human Chagas Disease in Texas and Recommendations for Enhanced Understanding of Clinical Chagas Disease in the Southern United States. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9:1–15.
- [10] Antinori S, Galimberti L, Bianco R, Grande R, Galli M, Corbellino M. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. *European Journal of Internal Medicine*. Elsevier B.V. 2017; 43: 6–15.
- [11] Costa TF, Rocha AVVO, Miranda LM, Lima LFS, Santos FLN, Silva ÂAO, et al. Seroprevalence and detection of *Trypanosoma cruzi* in dogs living in a non-endemic area for Chagas disease in the legal Amazon region, Brazil. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 2021; 26 <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100648>.
- [12] Aguilar VHM, Abad-Franch F, Racines VJ, Paucar CA. Epidemiology of Chagas Disease in Ecuador. A Brief Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 387–93.
- [13] Santana KH, Oliveira LGR, Barros de Castro D, Pereira M. Epidemiology of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Americas: systematic review and meta-analysis. *Trop Med Int Heal* 2020; 25: 752–63.
- [14] Bern C, Messenger LA, Whitman JD, Maguire JH. Chagas disease in the united states: A public health approach. *Clin Microbiol Rev*. 2019; 33. <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-19>.
- [15] Carmo M, Nunes P, Beaton A, Chair V, Acquatella H, Bern C, et al. On behalf of the American Heart Association Rheumatic Fever, Endo-carditis and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; and Stroke Council Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management A Scientific Statement From the American Heart Association. 2018; 138: 169–209.
- [16] Ortiz JV, Pereira BVM, Couceiro KDN, E Silva MRH da S, Doria SS, da Silva PRL, et al. Cardiac evaluation in the acute phase of chagas' disease with post-treatment evolution in patients attended in the state of Amazonas, Brazil. *Arq Bras Cardiol*. 2019;112: 240–6.
- [17] Nunes MCP, Beaton A, Acquatella H, Bern C, Bolger AF, Echeverría LE, et al. Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association 2018; 138: 169–209.
- [18] Benck L, Kransdorf E, Patel J. Diagnosis and Management of Chagas Cardiomyopathy in the United States. *Curr Cardiol Rep* 2018; 20: 131. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11886-018-1077-5>
- [19] Alpern JD, Lopez-Velez R, Stauffer WM. Access to benznidazole for Chagas disease in the United States-

- Cautious optimism? PLoS Neg Trop Dis 2017; 11. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005794>
- [20] Bermudez J, Davies C, Simonazzi A, Pablo Real J, Palma S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica*. Elsevier B.V. 2016; 156: 1–16.
 - [21] Yoshioka K, Manne-Goehler J, Maguire JH, Reich MR. Access to chagas disease treatment in the united states after the regulatory approval of benznidazole. *PLoS Neg Trop Dis*. 2020; 14: 1–15.
 - [22] Navarro M, Norman FF, Pérez-Molina JA, López-Vélez R. Short report: Benznidazole shortage makes chagas disease a neglected tropical disease in developed countries: Data from Spain. *Am J Trop Med Hyg*. 2012; 87: 489–90.
 - [23] Lescure F, Canestri A, Melliez H, Jauréguiberry S, Develoux M, Dorent R, et al. Chagas Disease, France. 2008;14: 2004–6.
 - [24] Da Costa AC, Rocha EA, da Silva Filho JD, de Barros Vasconcelos Fidalgo ASO, Nunes FMM, Viana CEM, et al. Prevalence of trypanosoma cruzi infection in blood donors. *Arq Bras Cardiol*. 2020; 115: 1082–91.
 - [25] Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buckens P. Frequency of the congenital transmission of Trypanosoma cruzi: A systematic review and meta-analysis. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2014; 121: 22–33.
 - [26] Colombo V, Giacomelli A, Casazza G, Galimberti L, Bonazzetti C, Sabaini F, et al. Trypanosoma cruzi infection in Latin American pregnant women living outside endemic countries and frequency of congenital transmission: a systematic review and meta-analysis. *J Travel Med*. 2021; 28: 1–9.
 - [27] Crespillo-Andújar C, Chamorro-Tojeiro S, Norman F, Monge-Maillo B, López-Vélez R, Pérez-Molina JA. Toxicity of nifurtimox as second-line treatment after benznidazole intolerance in patients with chronic Chagas disease: when available options fail. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24: 1344.e1-1344.e4.
 - [28] Soares AKA, Neves PAF, Nascimento A V., Esmeraldo AAM, Moreira LR, Higino TMM, et al. Benznidazole: Hero or villain of cellular immune response in chronic Chagas disease patients? *Immunobiology*. 2021; 226: 152046.
 - [29] Jackson Y, Wyssa B, Chappuis F. Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article/75/3/690/5637337>
 - [30] Ciapponi A, Barreira F, Perelli L, Bardach A, Gascón J, Molina I, et al. Fixed vs adjusted-dose benznidazole for adults with chronic chagas disease without cardiomyopathy: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14: 1–18.
 - [31] Forsyth CJ, Hernandez S, Olmedo W, Abuhamidah A, Traina MI, Sanchez DR, et al. Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. *Clin Infect Dis*. 2016; 63: 1056–62.
 - [32] Villar JC, Herrera VM, Carreño JGP, Herrera EV, Domínguez YZC, Vásquez SM, et al. Correction to: Nifurtimox versus benznidazole or placebo for asymptomatic Trypanosoma cruzi infection (Equivalence of Usual Interventions for Trypanosomiasis - EQUITY): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. 2019; 20:1–10.
 - [33] Pérez-Molina JA, Crespillo-Andújar C, Bosch-Nicolau P, Molina I. Trypanocidal treatment of Chagas disease. *Enfermedades Infecc y Microbiol Clin*. 2021; 39: 458–70.

- [34] Carlos Villar J, Herrera M, Guillermo Pérez Carreño J, Herrera EV, Castellanos Domínguez YZ, Marcell Vázquez S, et al. Nifurtimox versus benznidazole or placebo for asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection (Equivalence of Usual Interventions for Trypanosomiasis-EQUITY): study protocol for a randomised controlled trial. 2019; 20: 431. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13063-019-3423-3>.
- [35] Crespillo-Andújar C, Chamorro-Tojeiro S, Norman F, Monge-Maillo B, López-Vélez R, Pérez-Molina JA. Toxicity of nifurtimox as second-line treatment after benznidazole intolerance in patients with chronic Chagas disease: when available options fail. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24: 458-470.
- [36] Crespillo-Andújar C, López-Vélez R, Trigo E, Norman F, Díaz-Menéndez M, Monge-Maillo B, et al. Comparison of the toxicity of two treatment schemes with benznidazole for chronic Chagas disease: a prospective cohort study in two Spanish referral centres. *Clin Microbiol Infect*. 2020; 26:384.e1-384.e4.
- [37] Scarim CB, Jornada DH, Chelucci RC, de Almeida L, dos Santos JL, Chung MC. Current advances in drug discovery for Chagas disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018; 155: 824–38.
- [38] Poletto J, da Silva MJV, Jacomini AP, Bidóia DL, Volpato H, Nakamura CV, et al. Antiparasitic activities of novel pyrimidine N-acylhydrazone hybrids. *Drug Dev Res*. 2021; 82: 230–40.
- [39] Cardona-G W, Yepes AF, Herrera-R A. Hybrid Molecules: Promising Compounds for the Development of New Treatments Against Leishmaniasis and Chagas Disease. *Curr Med Chem*. 2018; 25: 3637–79.
- [40] Martinez-Peinado N, Lorente-Macías Á, García-Salguero A, Cortes-Serra N, Fenollar-Collado Á, Ros-Lucas A, et al. Novel purine chemotypes with activity against *plasmodium falciparum* and *trypanosoma cruzi*. *Pharmaceuticals* 2021;14: 638–90.
- [41] Fernandes V de S, da Rosa R, Zimmermann LA, Rogério KR, Kümmerle AE, Bernardes LSC, et al. Antiprotozoal agents: How have they changed over a decade? *Arch. Pharm*. 2022; 355: e2100338. <https://doi.org/10.1002/ardp.202100338>.
- [42] De Clercq E. Antivirals: Past, present and future. *Biochem Pharmacol*. 2013; 85: 727–744. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.011>.
- [43] De Clercq E. Dancing with chemical formulae of antivirals: A panoramic view (Part 2). *Biochem Pharmacol*. 2013; 86: 1397–14410. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.09.010>.
- [44] Zarenezhad E, Farjam M, Iraj A. Synthesis and biological activity of pyrimidines-containing hybrids: Focusing on pharmacological application. *J Mol Struct*. 2021; 1230: 129833–129853 . Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129833>.
- [45] Patel R V., Keum YS, Park SW. Sketching the historical development of pyrimidones as the inhibitors of the HIV integrase. *Eur J Med Chem*. 2015; 97: 649–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.005>.
- [46] Kumar S, Narasimhan B. Therapeutic potential of heterocyclic pyrimidine scaffolds. *Chem Cent J*. 2018; 12: 1–29.
- [47] Falcão EPDS, De Melo SJ, Srivastava RM, Catanho MTJDA, Do Nascimento SC. Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3-and4-(N-phthalimidophenyl)} pyrimidines. *Eur J Med Chem*. 2006; 41: 276–82.
- [48] De Melo SJ, do Monte ZS, da Silva Santos AC, Silva ACC, Ferreira LFGR, Hernandez MZ, et al. Synthesis, antitrypanosomal activity and molecular docking studies of pyrimidine derivatives. *Med Chem*

- Res. 2018; 27: 2512–22.
- [49] Cotuá J, Llinás H, Cotes S. Virtual Screening Based on QSAR and Molecular Docking of Possible Inhibitors Targeting Chagas CYP51. *J Chem.* 2021; 2021.
 - [50] Harrison JR, Sarkar S, Hampton S, Riley J, Stojanovski L, Sahlberg C, et al. Discovery and Optimization of a Compound Series Active against *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *J Med Chem.* 2020; 63: 3066–89.
 - [51] Dos Santos Nascimento IJ, de Aquino TM, da Silva-Júnior EF. Cruzain and Rhodesain Inhibitors: Last Decade of Advances in Seeking for New Compounds Against American and African Trypanosomiasis. *Curr Top Med Chem.* 2021; 21: 1871–99.
 - [52] Kourbeli V, Chontzopoulou E, Moschovou K, Pavlos D, Mavromoustakos T, Papanastasiou IP. An overview on target-based drug design against kinetoplastid protozoan infections: Human african trypanosomiasis, chagas disease and leishmaniasis. Vol. 26, *Molecules.* 2021; 26: 4529–69.
 - [53] Melo SJ de, Santos LC dos, Falcão EP da S, Srivastavac RM, Luu-Ducd C. *J Chem Res.* 2002; (M):216–7.
 - [54] Alexandrino DDS. síntese de Novos Heterociclos 4-amino-pirimidínicos-2,6-bissubstituídos Ligados a Porção Monossacarídica e Avaliação de sua Atividade Citotóxica. Vitória de Santo Antão, 2011;
 - [55] Oda A, Tsuchida K, Takakura T, Yamaotsu N, Hirano S. Comparison of Consensus Scoring Strategies for Evaluating Computational Models of Protein - Ligand Complexes. *J. Chem. Inf. Model.* 2006; 46: 380–91.
 - [56] Romanha AJ, de Castro SL, Soeiro M de NC, Lannes-Vieira J, Ribeiro I, Talvani A, et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105: 233–8.
 - [57] Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J of Immunol. Methods.* 1983; 65:55–63.
 - [58] Chen YT, Brinen LS, Kerr ID, Hansell E, Doyle PS, McKerrow JH, et al. In vitro and in vivo studies of the trypanocidal properties of WRR-483 against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4: e825
 - [59] Tomas AM, Kelly JM. Transformation as an approach to functional analysis of the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Soc Trans.* 1994; 22: 3969.
 - [60] Tomás AM, Kelly JM. Stage-regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; 76: 91–103.
 - [61] Tomas AM, Miles MA, Kelly JM. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *Eur J Biochem.* 1997; 244: 596–603.
 - [62] Doyle PS, Zhou YM, Hsieh I, Greenbaum DC, McKerrow JH, Engel JC. The *trypanosoma cruzi* protease cruzain mediates immune evasion. *PLoS Pathog.* 2011; 7: 1–11.
 - [63] Durrant JD, Keränen H, Wilson BA, McCammon JA. Computational identification of uncharacterized cruzain binding sites. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4: e676. doi:10.1371/journal.pntd.0000676 (5).
 - [64] Silva-Júnior EF, Silva EPS, França PHB, Silva JPN, Barreto EO, Silva EB, et al. Design, synthesis, molecular docking and biological evaluation of thiophen-2-iminothiazolidine derivatives for use against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic Med Chem.* 2016; 24: 4228–40.

- [65] Da Silva EB, Oliveira e Silva DA, Oliveira AR, da Silva Mendes CH, dos Santos TAR, da Silva AC, et al. Design and synthesis of potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. *Eur J Med Chem.* 2017; 130: 39–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.02.026>.
- [66] Beltran-Hortelano I, Alcolea V, Font M, Pérez-Silanes S. Examination of multiple *Trypanosoma cruzi* targets in a new drug discovery approach for Chagas disease. *Bioorganic Med Chem.* 2022; 58. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116577>.
- [67] Vieira RP, Santos VC, Ferreira RS. Structure-based Approaches Targeting Parasite Cysteine Proteases. *Curr Med Chem.* 2017; 26: 4435–53.
- [68] Salas-Sarduy E, Landaburu LU, Karpiak J, Madauss KP, Cazzulo JJ, Agüero, FA, Vanina EM. Novel Scaffolds for Inhibition of Cruzipain Identified from high-throughput Screening of Anti-Kinetoplastid Chemical Boxes. *Sci. Rep.* 2018; 7: 12073. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12170-4>.
- [69] Fu Y, Zhao J, Chen Z. Insights into the Molecular Mechanisms of Protein-Ligand Interactions by Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation: A Case of Oligopeptide Binding Protein. *Comput Math Methods Med.* 2018; 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3502514>.
- [70] Arévalo JMC, Amorim JC. Virtual screening, optimization and molecular dynamics analyses highlighting a pyrrolo[1,2-a]quinazoline derivative as a potential inhibitor of DNA gyrase B of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep.* 2022; 12: 1–13. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08359-x>.
- [71] Shivanika C, Deepak Kumar S, Ragunathan V, Tiwari P, Sumitha A, Brindha Devi P. Molecular docking, validation, dynamics simulations, and pharmacokinetic prediction of natural compounds against the SARS-CoV-2 main-protease. *J Biomol Struct Dyn* 2022; 40: 585–611. Available from: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1815584>
- [72] Oda A, Tsuchida K, Takakura T, Yamaotsu N, Hirono S, Doyle PS, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Sci Rep.* 2022; 12: 1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep18115>.
- [73] Santos VC, Oliveira AER, Campos ACB, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC, Teixeira SMR, et al. The gene repertoire of the main cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*, cruzipain, reveals four sub-types with distinct active sites. *Sci Rep.* 2021; 11: 1–14. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97490-2>.
- [74] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. 2001; 46: 3–26.
- [75] Bryant C, Kerr ID, Debnath M, Ang KKH, Ratnam J, Ferreira RS, et al. Novel non-peptidic vinylsulfones targeting the S2 and S3 subsites of parasite cysteine proteases. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2009; 19: 6218–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.098>.
- [76] Pauli I, Rezende C de O, Slafer BW, Dessoy MA, de Souza ML, Ferreira LLG, et al. Multiparameter Optimization of Trypanocidal Cruzain Inhibitors With In Vivo Activity and Favorable Pharmacokinetics. *Front Pharmacol.* 2022; 12: 1–21.
- [77] Beno BR, Yeung KS, Bartberger MD, Pennington LD, Meanwell NA. A Survey of the Role of Noncovalent Sulfur Interactions in Drug Design. *J Med Chem.* 2015; 58: 4383–438.

- [78] Liñares GG, Gismondi S, Codesido NO, Moreno SNJ, Docampo R, Rodriguez JB. Fluorine-containing aryloxyethyl thiocyanate derivatives are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* proliferation. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2007; 17: 5068–71.
- [79] Salsi F, Bulhões Portapilla G, Schutjajew K, Carneiro ZA, Hagenbach A, de Albuquerque S, et al. Thiosemicarbazones and thiadiazines derived from fluorinated benzoylthioureas: Synthesis, crystal structure and anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *J Fluor Chem*. 2018; 215: 52–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2018.08.004>
- [80] Roberto I. Cuevas-Hernández RMBMG, Martínez-Cerón S, Silva MS da, Elias MC, Crispim M, Trujillo-Ferrara JG, et al. A Fluorinated Phenylbenzothiazole Arrests the *Trypanosoma* Host Cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020; 64: 1–16.

ARTIGO 2 – 4-AMINO-2-PHENYL-6-(*P*-FLUOROPHENYL)-5-CARBONITRILE-PYRIMIDINE-BIS-SUBSTITUTED-LOADED LIPOSOMES AS PROMISING SYSTEM FOR CANCER TREATMENT.

Revista: Anais da Academia de Brasileira de Ciências (AABC)

Fator de Impacto: 1,280

4-amino-2-phenyl-6-(*p*-fluorophenyl)-5-carbonitrile-pyrimidine-bis-substituted-loaded liposomes as promising system for cancer treatment

Janice Vasconcelos Oliveira¹, Gleybson Correia de Almeida², Mariane Cajuba de Brito Lira Nogueira^{3,7}, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior⁴, Audenes de Oliveira Melo¹, Thiago David dos Santos Silva⁵, Noemia Pereira da Silva Santos^{1,3}, Nereide Stela Santos Magalhães^{2,3}, Sebastião José de Melo^{2,6}, Emerson Peter da Silva Falcão^{1*}.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Programa de Pós-graduação em Saúde Humana. Rua Alto do Reservatório S/N – Alto José Leal, CEP. 55608-680, Vitória de Santo Antão – Pernambuco, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-3779-5009>, <https://orcid.org/0000-0001-8138-3522>; <https://orcid.org/0000-0002-0960-6135>, <https://orcid.org/0000-0003-2346-8477>.

² Universidade Federal de Pernambuco, Prédio das Pós-graduações do Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Avenida da Engenharia, S/N – 2º Andar, CEP. 50740-600 – Cidade Universitária, Recife – Pernambuco, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-3539-1369>, <https://orcid.org/0000-0002-2576-4213>, <https://orcid.org/0000-0002-4134-6169>.

³ Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA). Av. Professor Moraes Rego, n. 1235, CEP. 55670-901 – Cidade Universitária, Recife – PE, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-7556-4746>, <https://orcid.org/0000-0002-0960-6135>, <https://orcid.org/0000-0002-2576-4213>.

⁴ Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Laboratório de Biotecnologia e Fármacos. Rua Alto do Reservatório S/N – Alto José Leal, CEP. 55608-680, Vitória de Santo Antão – Pernambuco, Brasil. <https://orcid.org/0000-0001-8676-4826>.

⁵ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Produtos Naturais. Rodovia Mário Covas S/N, CEP. 50670-420 – Cidade Universitária, Recife – Pernambuco, Brasil. <https://orcid.org/0000-0001-7495-0621>.

⁶ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos, Laboratório de Química e Síntese de Produtos Naturais. Avenida Professor Moraes Rego N. 1235, CEP. 50670-901, Cidade Universitária, Recife – Pernambuco. Brasil; <https://orcid.org/0000-0002-4134-6169>.

⁷ Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células. Rua Alto do Reservatório S/N – Alto

José Leal, CEP. 55608-680, Vitória de Santo Antão – Pernambuco, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-7556-4746>.

Keywords: Antitumor activity, Mitotic count, Hela cells, Liposomes, Pyrimidine.

Running title: Antitumor action of liposomal 4-amino-pyrimidine.

Medical Sciences

***Correspondence:** Emerson Peter da Silva Falcão; Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Laboratório de Síntese e Isolamento de Fármacos (SIM), Rua Alto do Reservatório, S/N, Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil. Tel: +55-81-3114 4101 (fone/fax), e-mail: emerson.sfalcao@ufpe.br

1. INTRODUCTION

Cancer comprises a group of diseases characterized by the uncontrolled multiplication of cells capable of developing and spreading tumors throughout the body (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde 2015). According to the World Health Organization (WHO), cancer was the first or second leading cause of death before age 70 in 112 countries in 2019 and ranked third or fourth in 23 other countries (Sung et al. 2021). Despite considerable progress in cancer therapy, GLOBOCAN reports that around 19.3 million new cases of cancer occurred worldwide in 2020, with almost 10.0 million deaths and an expected increase to 28.4 million by 2040 (Sung et al. 2021).

Chemotherapy is the main form of treatment for most malignant tumors due to its ability to reach metastatic cells. However, this treatment modality has numerous side effects (Jesus et al. 2016). To find drugs that are effective at resisting anti-tumor cells and can reduce the occurrence of side effects caused by the use of current anticancer drugs, new molecules lethal to neoplastic cells are under development, most of which have heterocycles in their structure, especially pyrimidines (Zarenezhad et al. 2021). The pyrimidine nucleus is one of the constituents of DNA and RNA chains in living beings (Jubeen et al. 2018) and is found in the scaffold of drugs widely used against diseases such as cancer, i.e., 5-fluorouracil (5-FU) (Vodenkova et al. 2020), and AIDS, i.e., zidovudine (De Clercq 2010). The pyrimidine nucleus has also been the object of numerous studies for the development new prototypes with several biological activities (De Coen et al. 2016), such as antibacterial (Verbitskiy et al. 2015), anticancer (Zarenezhad et al. 2021), antiviral (Zhuang et al. 2020) and antiparasitic (De Melo et al. 2018).

Despite considerable advances in the production of molecules for cancer therapy, directing the action to neoplastic cells is a line of research of considerable growth (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde 2015) and has achieved success in overcoming harm to non-neoplastic cells. Such studies are based on the production of drug delivery systems (Dianat-Moghadam et al. 2018). Nano-encapsulation systems, such as liposomes, improve the solubility of substances, serving as carriers to the target, promote better stability of the compound within

the body by interfering with the process of biodegradation or systemic biodistribution and favor the pharmacokinetics of therapeutic agents, which would drastically decrease the therapeutic index and, consequently, the toxic effects of drugs (Belfiore et al. 2018).

De Melo et al. (2002) developed pyrimidine prototypes using derivatives with numerous biological activities. The present study involves the encapsulation of 2-phenyl-4-amino-6-(*p*-fluorophenyl)-5-carbonitrile-pyrimidine (Pyr-Free) and the use of this encapsulated compound in studies with the HeLa cell line (cervical epithelial carcinoma) and sarcoma 180. Sarcoma-180 was discovered in 1914 as a solid mass in the right armpit of a white mouse (Qi & Xu 2006). The tumor invades skeletal muscle, fatty tissue, nerves and blood vessels. Despite its locally aggressive behavior, this neoplasm does not metastasize (Kurashige & Mitsuhashi, 1982). Thus, the aim of the present study was to investigate the optimization of the antineoplastic potential of 4-amino-pyrimidinic-bis-substituted derivatives.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

The synthesized 4-amino pyrimidine compound was kindly supplied by the Research Group on New Bioactive Drugs and Natural Products supervised by Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão. Cholesterol (CHO), stearylamine (SA) and 5-FU were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Soybean phosphatidylcholine (PC) was obtained from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Methanol and chloroform were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Aqueous solutions were prepared with purified water obtained from the Human UP 900 purification system (Human Corporation, Seoul, Korea).

2.2 Synthesis of pyrimidine compounds

The pyrimidine derivative was produced by the Research Group on New Drugs and Bioactive Natural Products through consecutive reactions (Figure 1) using the method described by De Melo et al. (2002). An appropriate aromatic aldehyde initially (Figure **1a**) reacted with malononitrile (Figure **1b**) to give substituted bisnitrile (Figure **1c**), which was purified and crystallized and then reacted with an amidine (Figure **1d**), yielding the compound Pyr-Free (Figure **1e**). The synthetic reaction was monitored by thin layer chromatography (TLC). The synthetic structure was confirmed by the common technique of mass spectrometry (Delsi-Nermag mass spectrometer coupled to a HP 5890 gas chromatograph), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) (UNITY spectrophotometer, Varian model), infrared spectrometry (Burker spectrometer, IFS 66 model) and the melting point (Electrothermal digital - model 9100).

2.3 Preparation of liposomes containing 2-phenyl-4-amino-6-(*p*-fluorophenyl)-5-carbonitrile-pyrimidine compound

Liposomes containing the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound (Pyr-LIPO) were prepared using the hydration lipid film method (Lira et al. 2009). Lipids (PC, CHO and SA - 7:2:1, 42 mM) and the pyrimidine derivative (10 mg) were solubilized in a mixture of chloroform and methanol (3:1 v/v). The mixture was submitted to vacuum evaporation for

complete elimination of the organic solvents and consequent formation of a thin lipid film. The film was then hydrated with 10 mL of 7.4 pH phosphate buffer to form Multilamellar Lipid Vesicles (MLVs). Small Unilamellar Vesicles (SUVs) were obtained from the sonication of the MLVs (Vibra cell, BRANSON, USA) at 200 W and 40 Hz for 300 s.

2.4 Characterization of liposomes containing 2-phenyl-4-amino-6-(*p*-fluorophenyl)-5-carbonitrile-pyrimidine compound

The following physicochemical characteristics of the Pyr-LIPOs were analyzed: macroscopic appearance, pH, particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential and drug encapsulation efficiency. Pyr-LIPOs were checked at predetermined times to determine stability.

In the study of physical stability under forced conditions, the preparations were submitted to stress conditions to simulate processes such as those occurring during transport and storage (Lapenda et al. 2012). For such, the formulations were aliquoted and subjected to centrifugation at 6000 rpm for 1 h at 4 ± 1 °C (KN-70 centrifuge, Kubota, Japan), simulating the accelerated passage of time. For the mechanical stress tests, the samples were placed into an microtube, immersed in a water bath and subjected to horizontal shaking at 180 vibrations/min at a controlled temperature of 37 ± 1 °C for 48 h (Polytest® 20 Bioblock Scientific, France) to simulate transport conditions. Stability tests were conducted at predetermined times (0, 7, 15 and 30 days) (Santos-Magalhães et al. 2000) and the formulations were maintained at 4 °C and under atmospheric pressure.

Macroscopic analysis was performed to observe changes in the general appearance of the preparations, such as homogeneity, color, viscosity, deposition of materials, formation of crumbs, cremating, flocculation, coalescence and separation of phases. Particle size and the polydispersity index were determined by photon correlation spectroscopy using a laser particle size analyzer (Beckman Coulter, UK). For such, three samples of each liposome (50 µL) formulation were diluted in ultra-pure water (950 µL) (Lapenda et al. 2012). The zeta potential (surface charge of vesicles) was measured by determining electrophoretic mobility (Nanotrac®, USA). Three 50-µL samples were diluted in 950 µL of ultrapure water. All results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD).

Drug content and encapsulation efficiency were analyzed by UV-Vis spectrophotometry (Ultrospec® 3000 pro, Amersham Biosciences, Sweden). Analyses were performed in triplicate and values were expressed as mean $\pm$ SD. The content of the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound was quantified by withdrawing an aliquot of the liposome suspension (20 µL), which was dissolved in methanol and sonicated for 5 min. The compound was then quantified by spectrophotometry (260 nm) using the standard 4-amino-pyrimidine-bis-substituted curve with concentrations ranging from 0.5 to 5 µg/mL in methanol.

Encapsulation efficiency was determined by the ultrafiltration/ultracentrifugation technique (Andrade et al. 2004, Da Silva Santos et al. 2006) using Microcon® units (Millipore, USA). An aliquot of the liposome formulation (400 µL) was centrifuged at 10,000 rpm for 1 h at 4 °C. The filtrate was quantified by UV-Vis spectrophotometry (260 nm). Encapsulation

efficiency was calculated by the equation $EE\% = ((\text{total 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound}) - (\text{4-amino-pyrimidine-bis-substituted free}) / (\text{total of 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound})) \times 100\%$.

2.5 Cell culture

In vitro assays were performed at the NanoBioCel Laboratory (UFPE – CAV) using the HeLa cell line in the exponential growth phase. The cells were obtained from the Cell Bank of Rio de Janeiro (BCRJ), cultured in a DMEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% antibiotic solution (penicillin 1000 IU/mL + streptomycin 250 mg/mL) and 1% L-glutamine 200 mM and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere with 80% humidity.

2.6 Determination of cell viability

Cell viability was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Mosmann 1983), which is based on the reduction of the yellow salts of tetrazolium by mitochondrial reductase from metabolically active cells. Purple crystals are formed intracellularly, which are solubilized and further analyzed by UV-visible spectrophotometry. A lower MTT reduction and lower spectrophotometric signal indicate lower cell viability.

The cell suspension (10⁵ cells/mL) was distributed in a 96-well culture plate (198 µL/well). The plates were incubated at 37 °C in an incubator (Sedas, Milan-Italy) with a humid atmosphere enriched with 5% CO₂. After 24 h of incubation, the 4-aminopyrimidine-bis-substituted compound in its free form (DMSO-diluted) and encapsulated forms, in addition to 5-FU, were diluted in DMEM to obtain final concentrations of 20, 10, 5 and 2.5 µg/mL. Next, 22 µL of each solution were added to the wells. Untreated cells were used as control. The cytotoxic effects of the test samples were assessed after 72 h and the cells were incubated for 3 h with MTT for further reading. Absorbance was read using a plate reader at a wavelength of 490 nm. Mean absorbance of the control group was considered 100% viability. Thus, the results were assessed by determining the inhibition of cell proliferation in relation to the control. Each test was performed three times. In the analyses, the results were expressed as a mean ± SD and were interpreted using analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's correction to identify significant differences ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed with the aid of the GraphPad Prisma 5.0 program.

2.7 *In vivo* antitumor assay

2.7.1 Experimental animals

Male Swiss albino (*Mus musculus*) mice aged 35 to 60 days with a mean weight of 30.0 g (n = 24) were acquired from the Keizo Asami Immunopathology Laboratory (UFPE) and kept at 22 °C ± 2 °C under a natural 12-h light/dark photoperiod with free access to water and food throughout the experiment. The animals were distributed in groups according to experimental design (negative control group treated with saline, positive control groups treated with 5-FU, Pyr-free and Pyr-LIPO). The experiments were conducted in accordance with the protocol of

the UFPE Ethics Commission on Animal Experimentation (Recife, Brazil) (process no. 23076.050686/2012-43).

2.7.2 Antitumor activity of 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound in free and encapsulated forms

The *in vivo* antitumor activity of the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound was assessed in its free and encapsulated forms against sarcoma 180. Tumor cells ($5.0 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ cells) in ascitic form were obtained by puncture and subcutaneous inoculation in the right axillary region of the mice. The test was performed with four groups of six animals each (negative control group treated with saline, positive control group treated with 5-FU, Pyr-free and Pyr-LIPO). Treatment began 24 h after tumor inoculation and was carried out for seven consecutive days. Injections of free 4-amino-pyrimidine-bis-substituted solutions and encapsulated in liposomes at a dose equivalent to 15 mg/Kg of body weight, 5-FU (positive control) at a dose of 20 mg/Kg and weight-dependent placebos (saline) were given intraperitoneally. The therapeutic doses were studied previously (Da Silva et al. 2008, Falcão et al. 2006). The 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound was dissolved in a solution of 2.5% Tween 80 in sterile 0.9% NaCl solution.

After one week of treatment, the animals were sacrificed with an overdose of urethane (1.25 g/kg). The tumors were removed and weighed prior to microscopic analysis. Tumor inhibition was determined from the mean tumor weight of the groups of treated animals relative to the untreated control group using the following equation: $IT\% = (C - T / C) \times 100\%$, in which C is the mean tumor weight of the animals from the control group (saline solution) and T corresponds to the mean tumor weight of the animals in the treated groups (Pyr-free, Pyr-LIPO and 5-FU).

2.7.3 Mitotic counts

The tumors were removed and submitted to mitotic count analysis. The tissues were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Sections were cut using a microtome set to 4 μm and submitted to hematoxylin-eosin staining. The histological images of the slides were captured by a digital camera (Moticam 3.0) coupled to the optical microscope (Nikon-E200) with a fixed focus and field clarity, obtaining 10 fields per slide with a final magnification of 400 x. The photomicrographs were evaluated using ImageJ version 1.44 (Research Services Branch, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). In each field, the number of mitoses were counted and determined as the mean number of mitoses per tumor. To create the graph, the values were normalized to the control, which was considered equal to 100%. The data from the histomorphometric analysis were statistically analyzed. The results were expressed as a mean $\pm$ SD and were interpreted using ANOVA with Tukey's post hoc test to identify significant differences ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed with the aid of the GraphPad Prisma 5.0 program.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Preparation and characterization of liposomes

Pyr-LIPO (1 mg/mL) was prepared using the lipid film hydration method, which is suitable for the encapsulation of liposoluble substances, as the low polarity makes these substances insoluble in aqueous solutions (identified by solubility tests). The organic phase (chloroform:methanol) was added and the compound could then be incorporated into the liposome membranes (Frézard et al. 2005). After the preparation process, the liposome formulations had an opaque, homogeneous milky appearance with an evident Tyndall effect, confirming the presence of SUVs (Lapenda et al. 2012). A stability study was performed to analyze the behavior of the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound in the formulations. A previous study demonstrated an interesting interaction between 4-amino pyrimidine compounds and lipid membranes (Luna et al. 2011), avoiding possible drug precipitation. Macroscopic aspects, particle size, PDI and pH of the formulations were analyzed in the study of physical stability in forced conditions (Table I), as recommended in the literature (Batista et al. 2007). The liposome formulations containing the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound did not present changes in visual appearance and were stable during centrifugation and mechanical stress, as shown in Table I.

Stability tests at predetermined times (Table II) performed over a 30-day period demonstrated no macroscopic changes and the formulations maintained the characteristics presented after preparation. The diameter of the liposomes containing 4-amino-pyrimidine-bis-substituted ranged from 270.04 ± 24.94 (Day 0) to 341 ± 25.32 (Day 30), with PDI values around 0.37. The diameter increased due to the presence of the lipolytic substance (Chorilli et al. 2007). Moreover, the discrete increase may be related to the tendency of the particles to aggregate over time (Schaffazick et al. 2003). No significant changes were found in the PDI, indicating homogeneity in the distribution of vesicle size (Chorilli et al. 2007). A slight decrease in pH was found between the onset of the test (7.17 ± 0.23) and the last day of assessment (6.61 ± 0.12). However, these variations do not constitute instability in the formulations.

The pyrimidine-loaded liposomes had a zeta potential value of 37.7 ± 2.26 , whereas the unloaded liposomes had a potential of 37.5 ± 1.62 . The presence of positively charged lipid stearylamine in the bilayer composition gives liposomes a positively charged surface. The similar zeta potentials of the pyrimidine-loaded and unloaded liposomes indicate no drug on the surface of the liposomes, remaining in the lipid bilayer, as expected. Liposomes with negative or positive zeta potential values above 30 mV are stable in suspensions, as repulsive forces prevent the aggregation of the vesicles (Calvo et al. 1997, Schaffazick et al. 2003). Divergent opinions are found in the literature regarding the interaction between the charge of the nanocarrier and tumor. However, Honary & Zahir (2013) found that nanoparticles with a positive charge are preferentially absorbed by tumor cells and retained for a longer time compared to neutral or negative nanoparticles. The authors also found that a more positive nanoparticle surface led to stronger bonds between the nanoparticle and plasma membrane of tumor cells, which are generally anionic. Thus, the positive zeta potential values likely determine that the liposomes developed in this investigation contribute to the increase in the antitumor activity of the pyrimidine compound.

Encapsulation efficiency calculated by relating the total and free percentage of the compound was 82.93 ± 0.04 . The standard curve equation was $Y = 0.1675X + 0.0442$, in which

the X axis is the concentration of liposome (dissolved in analytical grade methanol) and the Y axis corresponds to absorbance at the wavelength of 203 nm, with an $R^2 = 0.9885$.

3.2 Cell viability study

The viability study with the HeLa cell line was performed to assess the effect of the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound in its free and encapsulated forms and 5-FU, which is a drug with known activity. Figure 2 demonstrates the cell viability of HeLa versus the compounds tested. An increase in the concentration of the compounds generated a decrease in cell viability, denoting increased mortality, as reported in the literature (Moghimpour et al. 2018). Pyr-LIPO exhibited greater cytotoxicity compared to the other compounds tested at concentrations of 5, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$. This result is in agreement with data described in the literature (Mirgorodskaya et al. 2020), showing an increase in the therapeutic efficacy of compounds when encapsulated.

Cytotoxic activity of the compounds was determined according to the National Cancer Institute (NCI) scale (Cocco et al. 2006). Compounds are considered to lack cytotoxic activity when inhibition is in the range of 1-20% and exhibit little activity when between 20 and 50%, moderate activity when inhibition is 50 to 70% and high activity when the inhibition range is between 70 to 100%. Therefore, the compound encapsulated at the concentration of 20 $\mu\text{g/mL}$ had high activity (75.91%), while the free compound at the same concentration had little activity (46.63%) and 5-FU had moderate activity (60%). These data underscore the advantages of liposomes and are in agreement with the results of the analyses carried out in this study, demonstrating that the compound encapsulated in liposomes has greater cytotoxicity at lower concentrations compared to the other compounds tested, even 5-FU.

3.3 Study of antitumor activity *in vivo*

In addition to the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound in its free and encapsulated forms, we used 5-FU as a positive control in this study because this drug has been shown to be clinically effective against cancer in mice and humans (Zhang et al. 2012) and is a pyrimidine analog, thus a possible mechanism of action may be attributed to the drug. The doses used were defined based on preliminary studies conducted by Falcão et al. (2006) with the aim of defining the toxicity of some pyrimidine derivatives, demonstrating that these derivatives have low toxicity. Thus, a minimal dose capable of producing an antitumor effect was defined for this study. Antitumor activity was calculated by comparing the mean weight of the tumors from the various experimental groups to that of the control group. After treatment, a change was found in tumor weight (Figure 3). A greater reduction was found in the group treated with liposomes containing the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound (1.42 ± 1.14 g), compared to its free form (2.10 ± 0.69 g) and 5-FU (3.63 ± 0.39 g). The animals in the control group had tumors with a mean mass of 4.24 ± 0.91 g. These results demonstrate that Pyr-LIPO produced a greater regressive effect on tumor mass than Pyr-Free and even 5-FU, which has recognized antitumor activity.

The animals treated with Pyr-LIPO presented satisfactory tumor inhibition of $66.47 \pm 26.8\%$ (Figure 4). According to the NCI, tumor inhibition rates above 60% are considered

satisfactory. The suspension compound achieved $50.46 \pm 16.24\%$ inhibition, whereas inhibition in the 5-FU group was $14.47 \pm 9.22\%$, which was less than that produced by the compound tested. The antitumor activity of compounds containing the pyrimidine scaffold has been described in the literature and is attributed to the presence of the pyrimidine ring and *p*-fluorophenyl region (Muthuraja et al. 2019).

The increase in the effectiveness of these compounds when encapsulated, however, has not previously been reported in the literature, although some studies report that liposomes are able to increase the effectiveness of the substances they encapsulate. Pyrimidine derivatives, such as CDK inhibitors, α -TNF inhibitors, protein tyrosine kinase inhibitors, kinase inhibitors (PI-3 and AKT) and cytokine inhibitors, have potent antitumor activity (Xie et al. 2009). 5-FU, which is a pyrimidine analogue, mainly interferes with thymidylate synthesis (Zhang et al. 2012). It is possible that the 4-amino-pyrimidine compound studied has a similar mechanism of action, but additional data are needed to infer the specific mechanism with certainty.

The increased inhibition found with the 4-amino-pyrimidine compound when encapsulated demonstrates that liposomes may be suitable carriers for this class of compounds used for antitumor therapy due to the ability to enhance drug effectiveness (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde 2015). It is possible that this effect is due to a change in the pharmacokinetics and biodistribution of the drug, as documented for other antineoplastic drugs (Dianat-Moghadam et al. 2018).

3.4 Determination of mitotic count

Regardless of the group studied, the tumors invaded muscle, bone and fatty tissues. Areas of necrosis and hemorrhage were also found. Neoplastic cells were predominantly arranged in a large solid pleomorphic pattern, with abundant cytoplasm and no defined edges. The nuclei were hyperchromatic and large and ranged in shape from oval to elongated. Several mitotic figures were observed, some of which were atypical. As the number of mitoses expresses cell division activity, a greater number of mitoses denotes greater proliferative activity in the tissue (Ministério da Saúde 2019). Thus, the mitotic count is an important indicator of adequate cell proliferation (Gadano et al. 2002), enabling better knowledge on mitoses (degree of cellular activity of the tissue under study) and providing information on biological behavior. The inhibition of cell division demonstrated by the mitotic index values (Figure 5) shows greater inhibition of the number of mitoses in animals treated with the Pyr-LIPO compound (32.15%) compared to those treated with 5-FU (71.39%) and Pyr-Free (87.69%). This demonstrates that the compound tested has an antiproliferative capacity that is enhanced by encapsulation in liposomes, thereby increasing the therapeutic efficacy of the compound.

The results demonstrated that liposome formulations containing the compound 2-phenyl-4-amino-6-*p*-fluorophenyl-5-carbonitrile-pyrimidine increased the effect and efficacy of the test compound compared to use in its free form, producing greater tumor inhibition compared to the control group and 5-fluoracil. Therefore, the development of liposomes containing the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound is an option that can be adopted to overcome limitations related to current antineoplastic treatment, thus ensuring safety and

therapeutic efficacy. Furthermore, the compound was shown to be more effective than 5-FU, which is a clinically accepted drug in antitumor therapy.

4. ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial assistance granted through a Master's scholarship provided through the Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI).

5. AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Janice Vasconcelos Oliveira, designed the study and realized the experiments;

Gleybson Correia de Almeida, contributed to the chemical experiments;

Mariane Cajuba de Brito Lira Nogueira, contributed to the experiments and analyses of liposomes;

Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior, was responsible for monitoring the histological analysis;

Audenes de Oliveira Melo, assisted in the preparation of experiments *in vivo*;

Thiago David dos Santos Silva, contributed in performed the histological analyzes;

Noemia Pereira da Silva Santos, supervisor of the *in vitro* studies;

Nereide Stela Santos Magalhães^{2,3}, was responsible for monitoring experiments and analyses of liposomes;

Sebastião José de Melo, supervised all experiments and

Emerson Peter da Silva Falcão, supervisor of the synthesis of the 4-amino-pyrimidine derivative.

6. REFERENCES

ANDRADE CAS, CORREIA MTS, COELHO LCBB, NASCIMENTO SC & SANTOS-

- MAGALHÃES NS. 2004. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *Int J Pharm.* 278: 435–45.
- BATISTA CM, DE CARVALHO CMB & MAGALHÃES NSS. 2007. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Rev Bras Ciencias Farm J Pharm Sci.* 43: 167–79.
- BELFIORE L, SAUNDERS DN, RANSON M, THURECHT KJ, STORM G & VINE KL. 2018. Towards clinical translation of ligand-functionalized liposomes in targeted cancer therapy: Challenges and opportunities. *J Control Release.* 277: 1–13.
- CALVO P, VILA-JATO JL & ALONSO MJ. 1997. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. *Int J Pharm.* 153: 41–50.
- CHORILLI M, RIMÉRIO TC, DE OLIVEIRA AG & SCARPA MV. 2007. Obtaining and characterization of small unilamellar liposomes containing caffeine. *Lat Am J Pharm.* 26: 715–22.
- COCCO MT, CONGIU C, LILLIU V & ONNIS V. 2006. Synthesis and in vitro antitumoral activity of new hydrazinopyrimidine-5-carbonitrile derivatives. *Bioorganic Med Chem.* 14: 366–72.
- DA SILVA, J. B. P. et. al. 2008. Quantitative structure-activity relationships (QSAR) of 4-amino-2,6-diarylpyrimidine-5-carbonitriles with anti-inflammatory activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society.* 19: 337–343.
- DA SILVA SANTOS NP, NASCIMENTO SC, WANDERLEY MSO, PONTES-FILHO NT, DA SILVA JF, DE CASTRO CMDB, PEREIRA EC, DA SILVA NH, HONDA NK & SANTOS-MAGALHÃES NS. 2006. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. *Eur J Pharm Biopharm.* 64: 154–60.
- DE CLERCQ E. 2010. Antiretroviral drugs. *Curr Opin Pharmacol.* 10: 507–15.
- DE COEN LM, HEUGEBAERT TSA, GARCÍA D & STEVENS C V. 2016. Synthetic Entries to and Biological Activity of Pyrrolopyrimidines. *Chem Rev.* 116: 80–139.
- DE MELO SJ, SANTOS LC DE, FALCÃO EP DA S, SRIVASTAVA RM & LUU-DUC C. 2002. Synthesis of new 4-amino-2,6-diarylpyrimidine-5-carbonitriles. *J Chem Res.* 2002: 216–217.
- DE MELO SJ et al. 2018. Synthesis, antitrypanosomal activity and molecular docking studies of pyrimidine derivatives. *Med Chem Res.* 27: 2512–22.
- DIANAT-MOGHADAM H, HEIDARIFARD M, JAHANBAN-ESFAHLAN R, PANAHI Y, HAMISHEHKAR H, POUREMAMALI F, RAHBARGHAZI R & NOURI M. 2018. Cancer stem cells-emanated therapy resistance: Implications for liposomal drug delivery systems. *J Control Release* 288: 62–83.

FALCÃO EPDS, DE MELO SJ, SRIVASTAVA RM, CATANHO MTJDA & NASCIMENTO SCD. 2006. Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3- and 4-(N-phthalimidophenyl)} pyrimidines. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 41: 276 - 282.

FRÉZARD F, SCHETTINI DA, ROCHA OGF & DEMICHELI C. 2005. Liposomes: Physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. *Quim Nova*. 28: 511–8.

GADANO A, GURNI A, LÓPEZ P, FERRARO G & CARBALLO M. 2002. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *J Ethnopharmacol*. 81: 11–6.

HONARY, S.; ZAHIR, F. 2013. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 12: 255–264.

JESUS LG DE, CICCHELLI M, MARTINS GB, PEREIRA MCC, LIMA HS & MEDRADO ARAP. 2016. Repercussões orais de drogas antineoplásicas: uma revisão de literatura. *Rev da Fac Odontol - UPF*. 21: 130–5.

JUBEEN F, IQBAL SZ, SHAFIQ N, KHAN M, PARVEEN S, IQBAL M & NAZIR A. 2018. Eco-friendly synthesis of pyrimidines and its derivatives: A review on broad spectrum bioactive moiety with huge therapeutic profile. *Synth Commun*. 48: 601–25.

KURASHIGE S & MITSUHASHI S. 1982. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. *Gann Gan*. 73: 85–90.

LAPENDA TLS, MORAIS WA, ALMEIDA FJF, FERRAZ MS, LIRA MCB, SANTOS NPS, MACIEL MAM & SANTOS-MAGALHÃES NS. 2012. Encapsulation of trans-dehydrocrotonin in liposomes: An enhancement of the antitumor activity. *J Biomed Nanotechnol*. 9: 499–510.

LIRA MCB, SIQUEIRA-MOURA MP, ROLIM-SANTOS HML, GALETTI FCS, SIMIONI AR, SANTOS NP, DO EGITO EST, SILVA CL, TEDESCO AC & SANTOS-MAGALHÃES NS. 2009. *In vitro* uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. *J Liposome Res*. 19: 49–58.

LUNA DMN, FALCÃO EPS, MELO SJ & ANDRADE CAS. 2011. Interfacial properties of a novel pyrimidine derivative and poly(ethylene glycol)-grafted phospholipid floating monolayers. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 373: 22–8.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). MANUAL DE BASES TÉCNICAS DA ONCOLOGIA - SIA/SUS - SISTEMA DE INFORMAÇÕES AMBULATORIAIS. BRASILIA - DF.: MINISTÉRIO DA SAÚDE; 2019.

MIRGORODSKAYA AB et al. 2020. Soft nanocarriers for new poorly soluble conjugate of pteridine and benzimidazole: Synthesis and cytotoxic activity against tumor cells. *J Mol Liq*. 317: 114007.

MOGHIMIPOUR E, REZAEI M, RAMEZANI Z, KOUCHAK M, AMINI M, ANGALI KA,

DORKOOSHF FA & HANDALI S. 2018. Folic acid-modified liposomal drug delivery strategy for tumor targeting of 5-fluorouracil. *Eur J Pharm Sci.* 114: 166–74.

MOSMANN T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J of Immunological Methods* 65: 55–63.

MUTHURAJA P, VEERAMANI V, PRAKASH S, HIMESH M, VENKATASUBRAMANIAN U & MANISANKAR P. 2019. Structure-activity relationship of pyrazolo pyrimidine derivatives as inhibitors of mitotic kinesin Eg5 and anticancer agents. *Bioorg Chem.* 84: 493–504.

PÉREZ-HERRERO E & FERNÁNDEZ-MEDARDE A. 2015. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 93: 52–79.

QI L & XU Z. 2006. *In vivo* antitumor activity of chitosan nanoparticles. *Bioorganic Medical Chemistry.* 16: 4243–4245.

SANTOS-MAGALHÃES NS, PONTES A, PEREIRA VMW & CAETANO MNP. 2000. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *Int J Pharm.* 208: 71–80.

SCHAFFAZICK SR & GUTERRES SS. 2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quím. Nova* 26: 726–737.

SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A & BRAY F. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 0: 1–41.

VERBITSKIY E V., CHEPRAKOVA EM, SLEPUKHIN PA, KRAVCHENKO MA, SKORNYAKOV SN, RUSINOV GL, CHUPAKHIN ON & CHARUSHIN VN. 2015. Synthesis, and structure-activity relationship for C(4) and/or C(5) thienyl substituted pyrimidines, as a new family of antimycobacterial compounds. *Eur J Med Chem* 97: 225–34.

VODENKOVA S, BUCHLER T, CERVENA K, VESKRNOVA V, VODICKA P & VYMETALKOVA V. 2020. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther* 206: 107447.

XIE F, ZHAO H, ZHAO L, LOU L & HU Y. 2009. Synthesis and biological evaluation of novel 2,4,5-substituted pyrimidine derivatives for anticancer activity. *Bioorganic Med Chem Lett* 19: 275–8.

ZARENEZHAD E, FARJAM M & IRAJI A. 2021. Synthesis and biological activity of pyrimidines-containing hybrids: Focusing on pharmacological application. *J Mol Struct.* 1230: 129833.

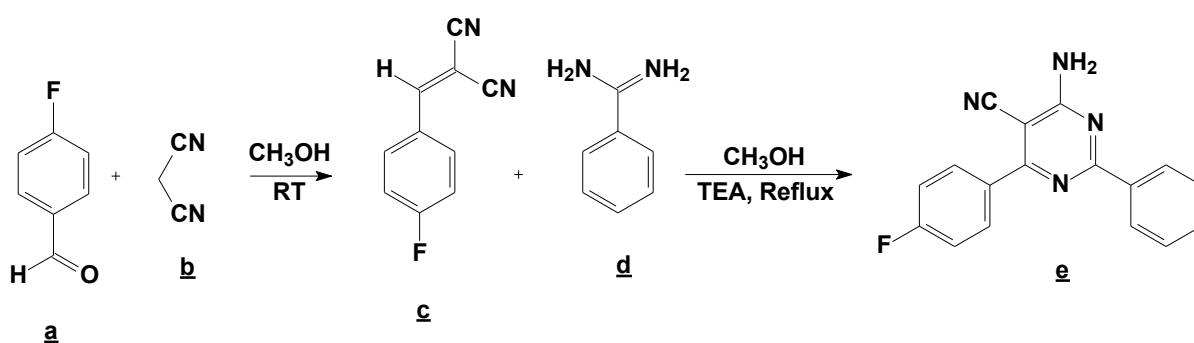
ZHANG C, LI G, WANG Y, CUI F, ZHANG J & HUANG Q. 2012. Preparation and characterization of 5-fluorouracil-loaded PLLA-PEG/PEG nanoparticles by a novel

supercritical CO₂ technique. Int J Pharm. 436: 272–281.

ZHUANG C, PANNECOUQUE C, DE CLERCQ E & CHEN F. 2020. Development of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs): our past twenty years. Acta Pharm Sin B 10: 961–978.

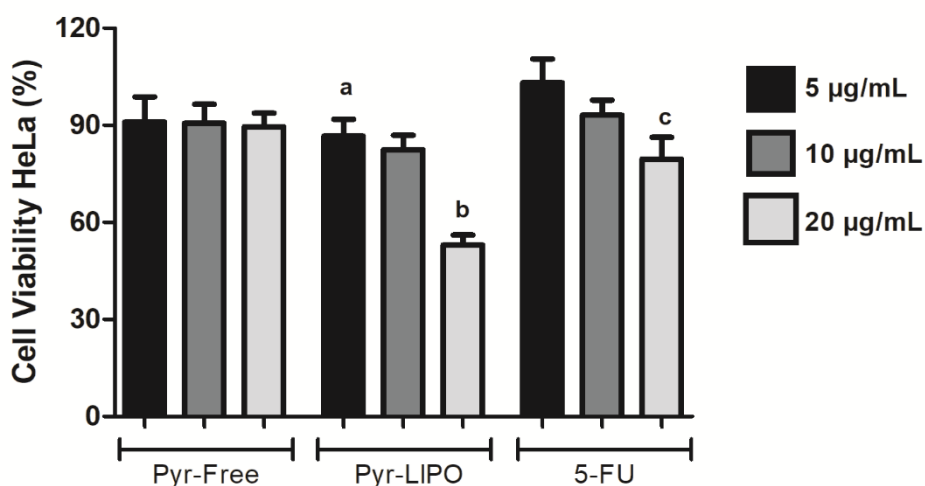
7. FIGURE AND TABLE LEGENDS

Figure 1 – Reaction scheme.



a: Aromatic aldehyde; **b**: Malononitrile; **c**: Substituted bisnitrile; **d**: Amidine; **e**: 2-Phenyl-4-amine-5-carbonitrile-6-(*p*-fluorophenyl)-pyrimidine.

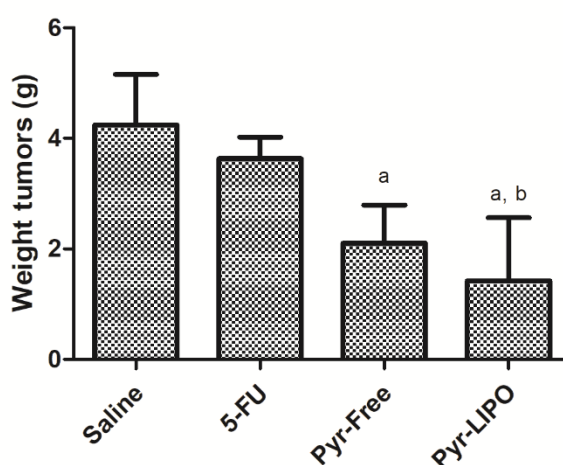
Figure 2 – Viability of HeLa cells exposed to free pyrimidine (Pyr-Free), encapsulated pyrimidine (Pyr-LIPO) and 5-fluororucil (5-FU).



Statistically significant differences between groups determined by ANOVA with Bonferroni correction, **p* < 0.05. Data expressed as mean ± SD of three independent experiments. “a”

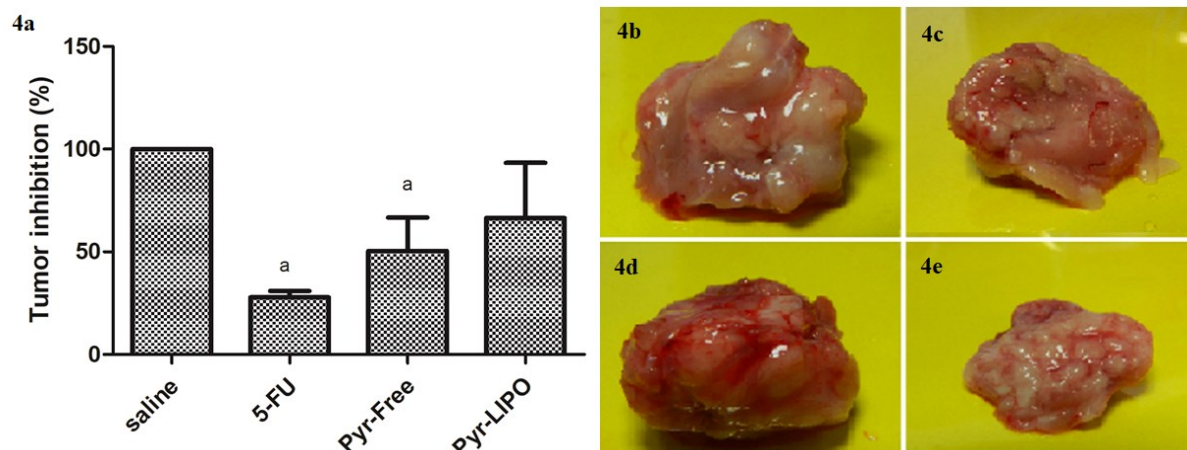
significantly less than 5-FU at same concentration; “b” significantly less than Pyr-Free and 5-FU at same concentration; “c” significantly less than Pyr-Free.

Figure 3 – Tumor weight in groups treated with saline solution, 20 mg/kg body weight of 5-fluorouracyl (5-FU) and 15 mg/kg body weight of free (Pyr-Free) and encapsulated 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound (Pyr-LIPO).



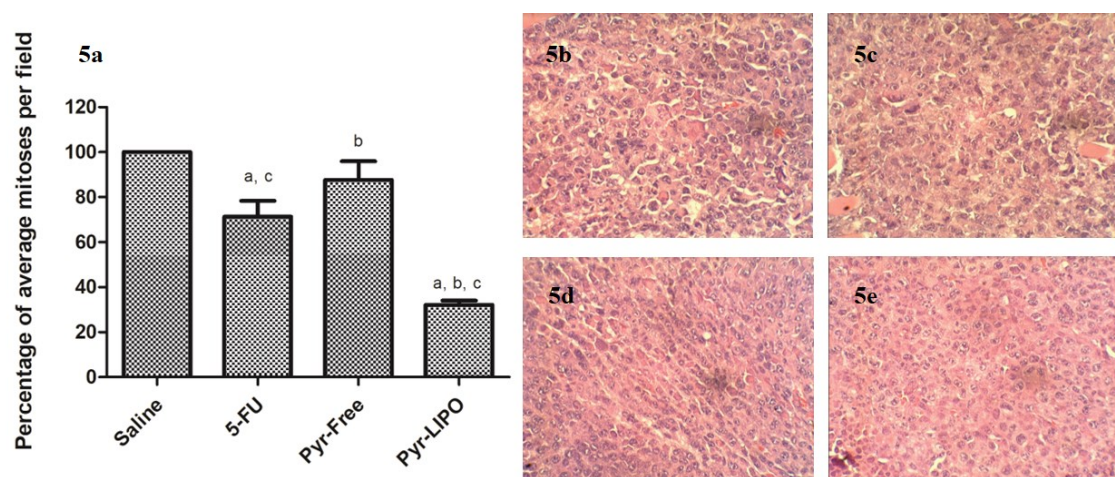
Statistically significant differences between groups determined by ANOVA followed by Tukey's post hoc test, * $p < 0.05$. Data expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments. “a” significant difference compared to saline group; “b” significant difference compared to 5-FU group.

Figure 4 – Tumor inhibition in groups treated with free 5-FU (20 mg/kg), Pyr-Free (15 mg/kg body weight) and Pyr-LIPO (15 mg/kg of body weight) (Fig 4 a). Macroscopic aspect of tumor after treatment with saline (Fig. 4 b), 5-FU (Fig. 4 c), Pyr-Free (Fig. 4 d) and Pyr-LIPO (Fig. 4 e).



Statistically significant differences between groups determined by ANOVA followed by Tukey's test, $*p < 0.05$. Data expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments. "a" significant difference compared to saline group.

Figure 5 - Effect of administration of free 5-FU (20 mg/kg), Pyr-Free (15 mg/kg body weight) and Pyr-LIPO (15 mg/kg body weight) on quantity of mitoses. Values normalized to control (100%) (Fig. 5 a). Histological photomicrographic images stained with hematoxylin/eosin of groups treated with saline (Fig. 5 b), 5-FU (Fig. 5 c), Pyr-Free (Fig. 5 d) and Pyr-LIPO (Fig. 5 e).



* Indicates statistically significant differences ($p < 0.05$). Significant differences between groups determined by ANOVA followed by Tukey's test, $*p < 0.05$. Data expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments. "a" significant difference compared to saline group; "b" significant difference compared to 5-FU group; "c" significant difference compared to Pyr-Free group.

Table I – Study of physical stability in forced conditions of liposomes containing 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound.

PARAMETERS	Unloaded-LIPO	Pyr-LIPO
INITIALS	Ø: 138.45 ± 25.04	Ø: 270.04 ± 24.94
	PDI: 0.32 ± 0.04	PDI: 0.39 ± 0.10
	pH: 6.53 ± 0.05	pH: 7.17 ± 0.23
	macroscopic evaluation: no changes	macroscopic evaluation: no changes
CENTRIFUGATION	Ø: 149.55 ± 9.83	Ø: 276.90 ± 35.21
	PDI: 0.31 ± 0.05	PDI: 0.34 ± 0.05
	pH: 7.34 ± 0.13	pH: 7.16 ± 0.16
	macroscopic evaluation: no changes	macroscopic evaluation: no changes
MECANIC STRESS	Ø: 103.82 ± 8.73	Ø: 285.18 ± 20.88
	PDI: 0.36 ± 0.01	PDI: 0.38 ± 0.02
	pH: 6.58 ± 0.10	pH: 7.41 ± 0.13
	macroscopic evaluation: no changes	macroscopic evaluation: no changes

Ø: Particle size; IPD: Polydispersity Index; pH: Hydrogenic potential; Micro and macroscopic analysis: homogeneity, color, viscosity, deposition of material, formation of lumps, flocculation, coalescence and separation of phases.

Table II – Study of stability at predetermined times (0 to 30 days) of blank liposomes and liposomes containing 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound. Formulations maintained at 4 °C and under atmospheric pressure.

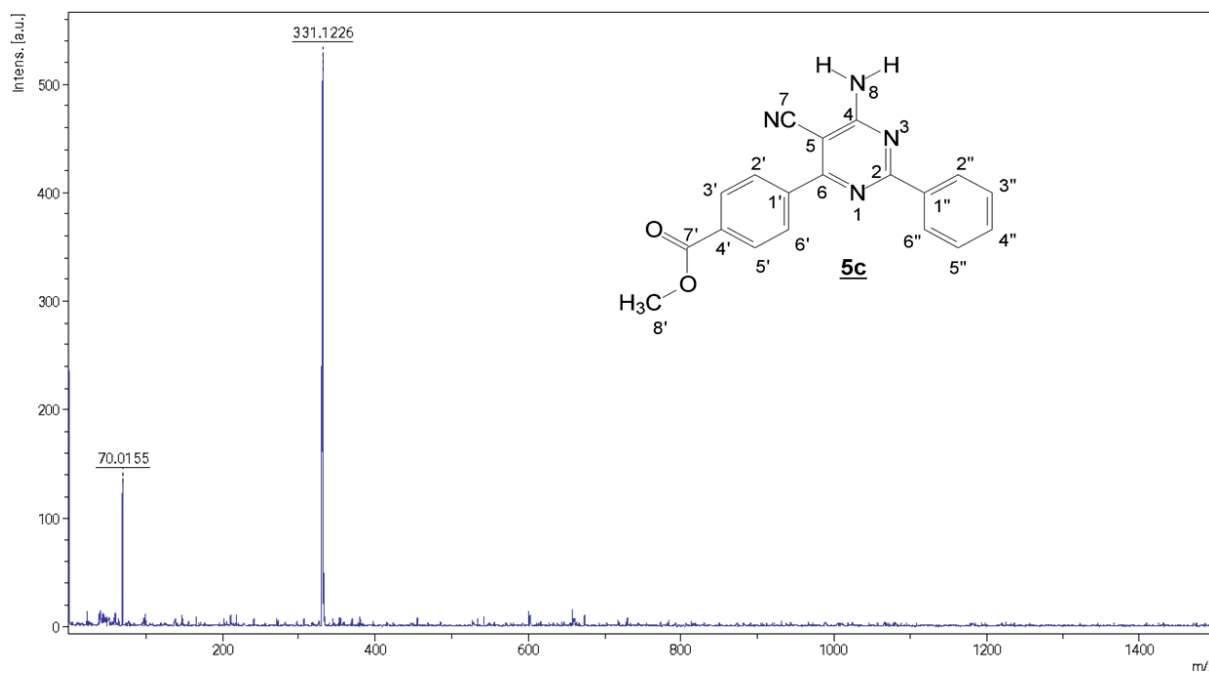
Unloaded LIPO				Pyr-LIPO		
(days)	Ø	PDI	pH	Ø	PDI	pH

0	138.45 ± 25.04	0.32 ± 0.04	6.53 ± 0.05	270.04 ± 24.94	0.39 ± 0.10	7.17 ± 0.23
7	151.86 ± 26.31	0.26 ± 0.03	6.22 ± 0.02	287.88 ± 20.58	0.37 ± 0.01	7.12 ± 0.39
15	151 ± 27.47	0.31 ± 0.18	6.01 ± 0.11	295.74 ± 73.10	0.36 ± 0.03	6.58 ± 0.04
30	170 ± 12.94	0.33 ± 0.05	6.02 ± 1.33	341.35 ± 25.32	0.36 ± 0.02	6.61 ± 0.12

Ø: Particle size; PDI: Polydispersity Index; pH: Hydrogenic potential.

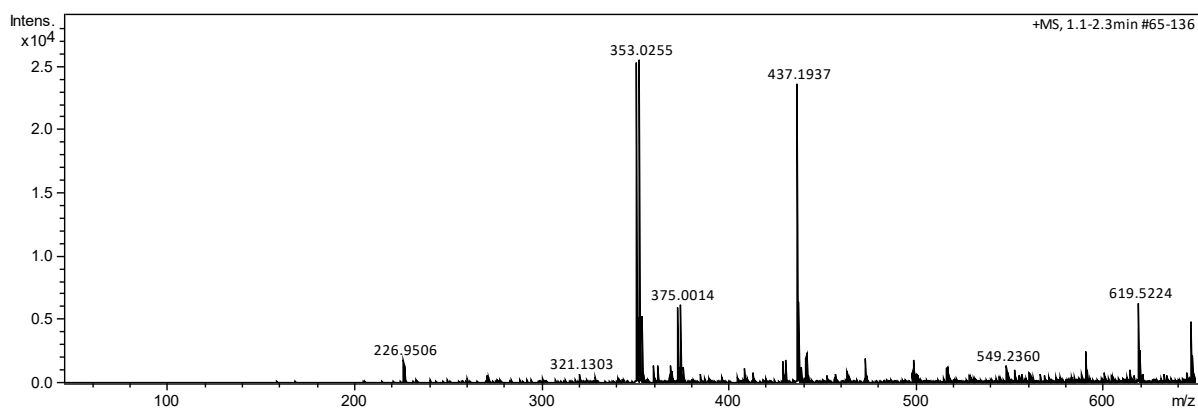
ANEXO – ESPECTROS DE MASSAS

Figura 45 – Espectro de massa MALDI-TOF da pirimidina **5c**.

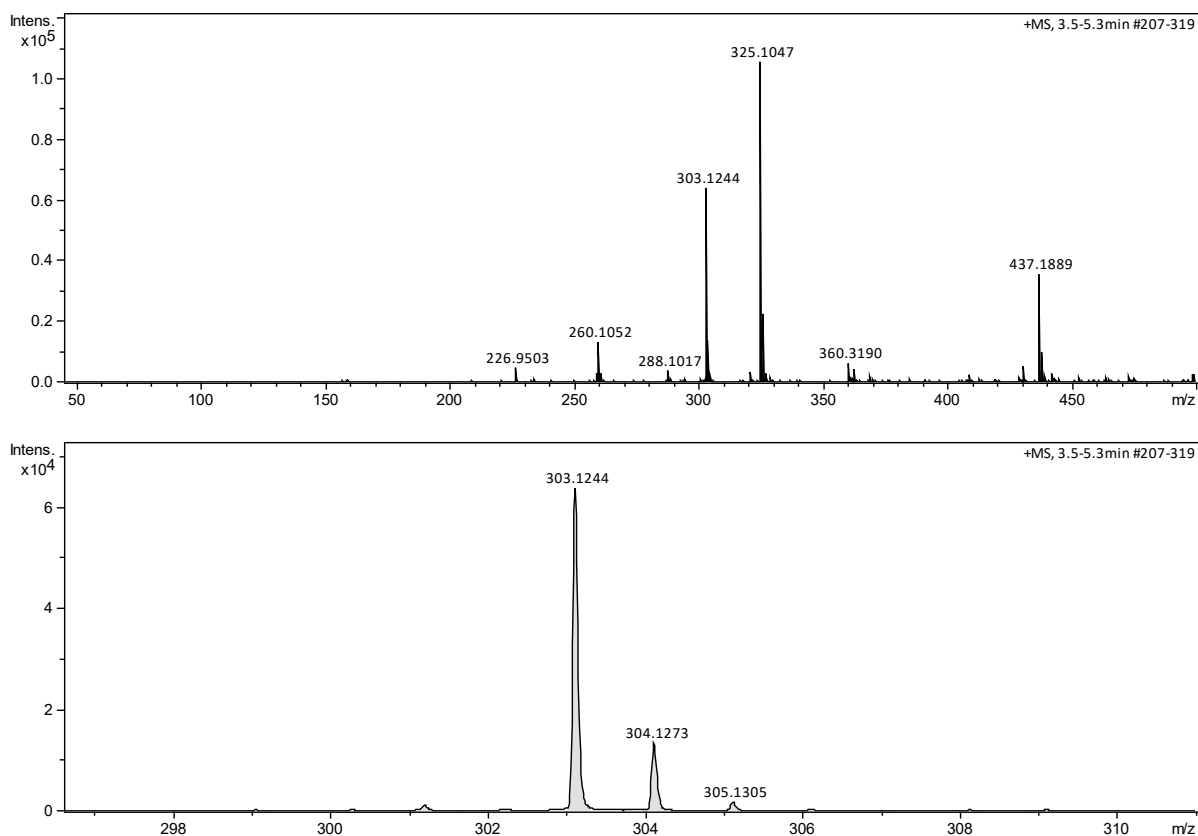


Fonte: Produzida pelo autor.

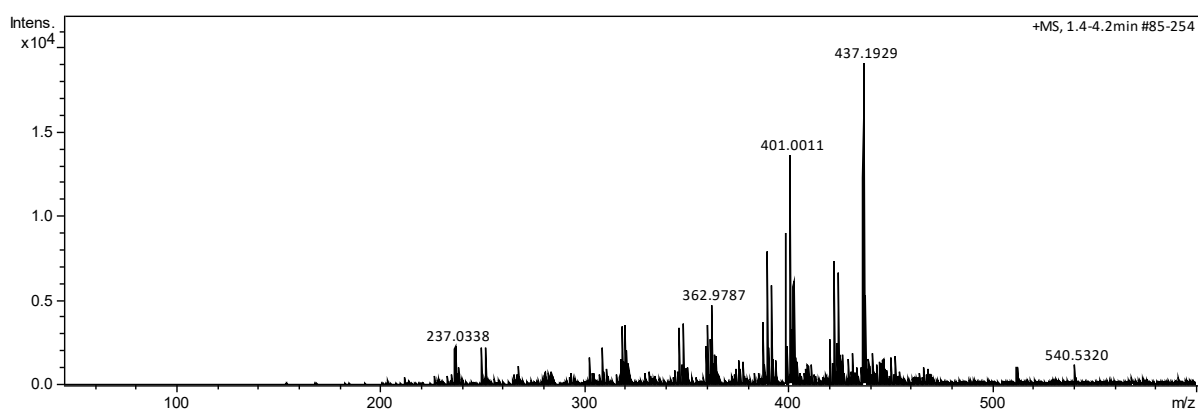
Figura 46 – Espectro de massa MICROTOF da pirimidina **5d**.



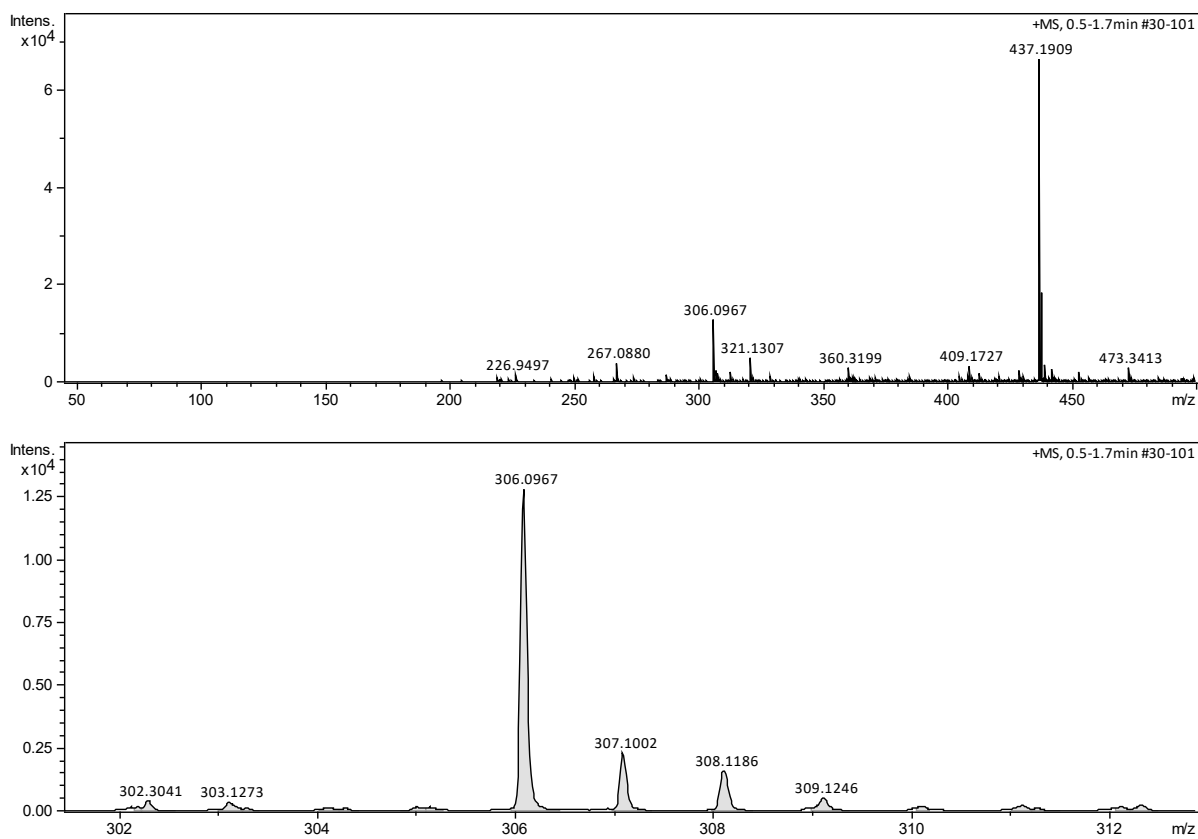
Fonte: Produzida pelo autor.

Figura 47 – Espectros de massa MICROTOF da pirimidina **5e**.

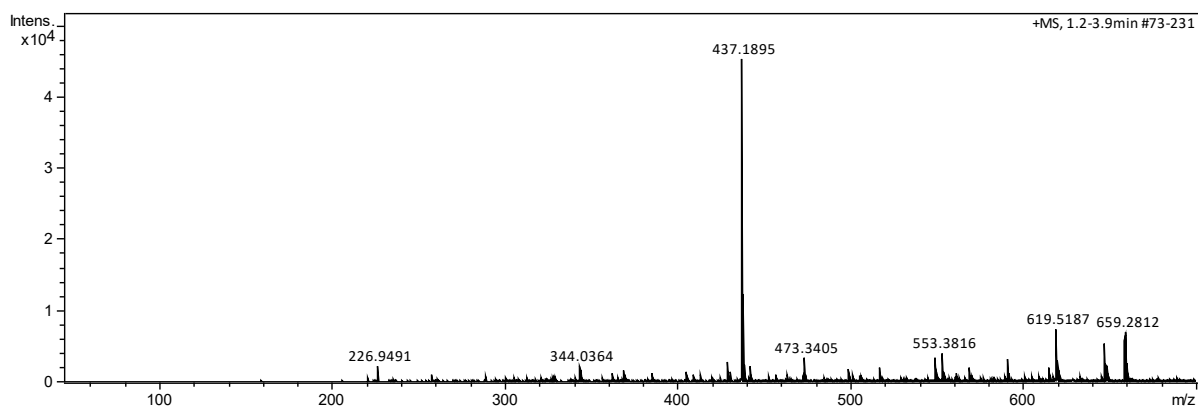
Fonte: Produzida pelo autor.

Figura 48 – Espectro de massa MICROTOF da pirimidina **5f**.

Fonte: Produzida pelo autor.

Figura 49 – Espectros de massa MICROTOF da pirimidina **7a**

Fonte: Produzida pelo autor.

Figura 50 – Espectros de massa MICROTOF da pirimidina **7b**.

Fonte: Produzida pelo autor.