UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

DAIANE SANTIAGO DA CRUZ OLIMPIO

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE INÉDITOS DERIVADOS PIRIDil-TIAZÓIs COMO AGENTES ANTIPARASITÁRIOS

Recife
2023

DAIANE SANTIAGO DA CRUZ OLIMPIO

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE INÉDITOS DERIVADOS PIRIDil-TIAZÓIS COMO AGENTES ANTIPARASITÁRIOS

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

Orientadora: Profª. Drª Ana Cristina Lima Leite

Recife

2023

Catalogação na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Olimpio, Daiane Santiago da Cruz.
Síntese e avaliação da atividade biológica de inéditos derivados piridil-tiazóis como agentes antiparasitários. / Daiane Santiago da Cruz Olimpio. – 2023.

72 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Ana Cristina Lima Leite.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação terapêutica, 2023.
Inclui referências.

1. Doença de Chagas. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Leishmaniose. 4. Piridina. 5. Tiazóis. I. Leite, Ana Cristina Lima. (Orient.). II.Título.

587 CDD (22.ed.) UFPE/CB – 2023-194

DAIANE SANTIAGO DA CRUZ OLIMPIO

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE INÉDITOS DERIVADOS PIRIDil-TIAZÓIS COMO AGENTES ANTIPARASITÁRIOS

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

.

Aprovado em: 16/05/2023

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Drª . Ana Cristina Lima Leite (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

_____

Profª. Drª. Valéria Pereira Hernandez (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

_____

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me permitido chegar até aqui.

Agradeço à minha orientadora, a professora Drª Ana Cristina por ter me recebido no LpQM me dando toda orientação necessária.

Agradeço à minha família, mãe, e avó por me darem suporte durante esse período.

Ao meu filho Augusto, por me inspirar a ser uma pessoa melhor todos os dias, ele é meu maior incentivo.

Agradeço ao meu namorado Caio por mesmo que muitas vezes distante, ter se feito presente como incentivador e porto seguro.

Agradeço a Daniel por ter compartilhado comigo esse período desafiador das nossas vidas, somando as alegrias e dividindo as tristezas.

Agradeço aos meus amigos Karen Loraine, Jaqueline Barbosa e Josué Brito pela parceria, companheirismo e todos os momentos incríveis que compartilhamos. Vocês foram essenciais.

Ao doutorando Anderson e ao IC Lucas por ajudarem na execução desse projeto. A vocês minha gratidão.

Aos demais colegas de laboratório, Vanessa, Elineide, Janine, Juliana, Expedito, por tornarem os dias mais leves.

Ao departamento de Química Fundamental pela realização da elucidação estrutural dos compostos.

A FIOCRUZ Pernambuco pela realização da atividade biológica.

A Capes por fornecer a bolsa de mestrado.

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho. A todos, agradeço.

RESUMO

A doença de Chagas e a Leishmaniose pertencem ao grupo das doenças negligenciadas, ocasionadas por agentes infecciosos, que afetam com maior incidencia os países com baixo indice de desenvolvimento, sendo a primeira causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e a segunda pelo parasita do gênero *Leishmania*. O tratamento utilizado para ambas as doenças possuem limitações; a doença de chagas é atualmente tratada pelo fármaco Benzonidazol, tendo em vista que o mesmo não possui uma boa eficácia na fase avançada da doença, já o tratamento da Leishmaniose apresenta problemáticas como: custo, resistência e segurança. Sendo assim, observa-se a necessidade de novas formas terapêuticas para essas doenças. Desta forma, nosso trabalho tem por objetivo identificar novos protótipos a fármacos com atividade antiparasitária através do planejamento estrutural, síntese e avaliação biológica de inéditos derivados de uma série piridil-1,3-tiazol. Diante disso foi planejada a síntese da série (DS-1A – DS-1B4) com 12 moléculas inéditas de piridil-1,3-tiazol, utilizando diferentes tiossemicarbazidas, as quais foram sintetizadas e devidamente caracterizadas. A elucidação estrutural foi realizada por meio de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Protón (RMN 1H) e Carbono (RMN 13C). Após a caracterização, os compostos foram avaliados quanto às atividades anti-T. *cruzi* e leishmanicida. Quanto à atividade anti-*T.cruzi*, foi utilizada a cepa Tulahuen, e a toxicidade avaliada em fibroblastos L929. Os testes anti-*Leishmania* foram realizados frente às formas promastigotas e amastigotas das espécies *L. amazonensis* e *L. infantum*, e a CC50 contra macrófagos RAW. Dentre os compostos testados DS-3B se destacou para a atividade frente à forma promastigota da espécie L. infantum, com valores de IC50 2,9 µM, enquanto o composto de referência apresenta IC50 de 17,2 µM. Já os compostos DS-3B, DS- 1B1 e DS-1B3 se destacaram na atividade anti-T.cruzi, com IC50 4,8 µM, 4,2 µM e 4,4 µM respectivamente.

Palavras-chave: Doença de Chagas; Trypanosoma cruzi; Leishmaniose; Piridina; Tiazóis.

ABSTRACT

Chagas' disease and Leishmaniasis belong to the group of neglected diseases, caused by infectious agents that affect with greater incidence the countries with low development index, the first being caused by the protozoan Trypanosoma cruzi and the second by the parasite of the genus Leishmania. The treatment used for both diseases has limitations; the Chagas' disease is currently treated by the drug Benzonidazol, considering that it does not have a high efficacy in the advanced phase of the disease, while the treatment of Leishmaniasis presents problems such as cost, resistance and safety. Thus, the need for new therapeutic forms for these diseases is observed. Thus, our work aims to identify new prototypes of drugs with antiparasitic activity through structural planning, synthesis and biological evaluation of novel derivatives of a pyridyl-1,3-thiazol series. The synthesis of the series (DS-1A - DS-1B4) of 12 novel pyridyl-1,3-thiazole molecules using different thiosemicarbazides was planned, which were synthesized and characterized. Structural elucidation was performed by means of proton (1H NMR) and carbon (13C NMR) nuclear magnetic resonance spectroscopy. After characterization, the compounds were evaluated for anti-T. cruzi and leishmanicidal activities. For anti-T.cruzi activity, the Tulahuen strain was used, and toxicity evaluated in L929 fibroblasts. The anti-Leishmania tests were performed against promastigotes and amastigotes forms of L. amazonensis and L. infantum species, and the CC50 against RAW macrophages. Among the compounds tested DS-3B stood out for its activity against the promastigote form of L. infantum species, with IC50 values of 2.9 μM, while the reference compound presents IC50 of 17.2 μM. The compounds DS-3B, DS-1B1 and DS-1B3 stood out in anti-T.cruzi activity, with IC50 4.8 μM, 4.2 μM and 4.4 μM respectively.

Keywords: Chagas disease; Trypanosoma cruzi; Leishmaniasis; Pyridine; Thiazoles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Carlos Chagas..... 17
Figura 2 – Endêmica em 21 países da America Latina..... 19
Figura 3 – Ciclo Biológico do Trypanossoma Cruzi..... 21
Figura 4 – Triatoma infestans..... 22
Figura 5 – Sinal de Romaña..... 24
Figura 6 – Mosquito Palha..... 29
Figura 7 – Ciclo biológico das leishmanioses..... 30
Figura 8 – Estruturas dos principais fármacos utilizados na leishmaniose..... 32
Figura 9 – Estrutura molecular da piridina..... 34
Figura 10 – Moléculas destaques da série de piridil-tiazóis de CARDOSO *et al.,* 2014..... 35
Figura 11 – Estrutura molecular do tiazol..... 35
Figura 12 – Moléculas desenvolvidas no LpQM, apresentando o núcleo tiazol e seus valores de toxicidade..... 36
Figura 13 – Estruturas destaques da série Silva, 2014..... 37
Figura 14 – Concepção dos novos derivados piridil-1,3-tiazóis..... 38
Figura 15 – Parâmetros propostos por Lipinski et al., (1997) e Veber et al., (2002) 45
Figura 16 – Espectro ^{1}H da molécula DS-3A..... 47
Figura 17 – Espectro C^{13} da molécula DS-3A..... 48
Figura 18 – Espectro ^{1}H da molécula DS-1A..... 49
Figura 19 – Espectro C^{13} da molécula DS-1A..... 50
Figura 20 – Espectro ^{1}H da molécula DS-1A3..... 51
Figura 21 – Espectro ^{13}C da molécula DS-1A3..... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características gerais dos compostos finais e rendimento das reações..... 43
Tabela 2 – Análise dos critérios da regra de Lipinsk e Veber obtidos no SwissADME (http://swissadme.ch/)..... 45
Tabela 3 – Propriedades ADME obtidos no SwissADME (http://swissadme.ch/)..... 46
Tabela 4 – Resultados obtidos para atividade anti-T. cruzi da série DS..... 63
Tabela 5 – Resultados da atividadde anti-L. amazonensis da série DS..... 65
Tabela 6 – Resultados da atividade anti-L.infantum da série DS..... 66

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Rota sintética da série A.....40

LISTA DE ABREVIATURAS

BDZ	Benzonidazol
CC_{50}	Concentração citotóxica para 50% das células
CCD	Cromatografia em camada delgada
CPRG	Ensaio da beta-galactosidase
d	Dupleto
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNDi	Drugs for Neglected Diseases Initiative
IC_{50}	Concentração inibitória para 50% do parasíta
IS	Índice de seletividade
LpQM	Laboratório de Planejamento em Química Medicinal
m	Multipleto
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PF	Ponto de fusão
RF	Fator de Retenção
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono -13
RMN ^{1}H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio -1
s	Singleto
t	Tripleto
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
2 OBJETIVOS 16
2.1 OBJETIVO GERAL 16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 16
3 REVISÃO DE LITERATURA 17
3.1 DOENÇA DE CHAGAS 17
3.2 HISTÓRICO 17
3.3 EPIDEMIOLOGIA 18
3.4 CICLO BIOLÓGICO DO *T.CRUZI* 20
3.5 TRANSMISSÃO DO *T.CRUZI* 22
3.5.1 Transmissão vetorial 22
3.5.2 Outras formas de transmissão 22
3.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO 24
3.7 TRATAMENTO CLÍNICO 25
4 LEISHMANIOSE 27
4.1 HISTÓRICO 27
4.2 EPIDEMIOLOGIA 28
4.3 VETOR E CICLO BIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE 28
4.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO 30
4.6 TRATAMENTO 32
4.7 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS 32
5 ESTRUTURAS PRIVILEGIADAS 34
5.1 PIRIDINAS 34
5.2 TIAZOL 35
6 PLANEJAMENTO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE INÉDITOS PIRIDÍNICOS TIAZÓLÍCOS 37
6.1 PLANEJAMENTO DAS MOLÉCULAS 37
7 METODOLOGIA 39
7.1 MATERIAIS E REAGENTES 39
7.2 ROTA SINTÉTICA 39
7.3 SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO 1 (DS-3A) 40
7.4 SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO 2 (DS-1A) 41

7.5 SÍNTESE DOS COMPOSTOS (DS-1A1 – DS-1B4) 41
7.6 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL 42
8 RESULTADOS E DISCUSSÃO 43
8.1 DADOS ESPECTROSCÓPICOS 46
9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-T.CRUZI DOS PIRIDIL-TIAZOIS 60
9.1 METODOLOGIA 60
9.2 ENSAIO TRIPANOCIDA 60
9.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM COMPOSTO TRIPANOCIDA 60
9.4 ÍNDICE DE SELETIVIDADE 61
9.5 ENSAIOS Com Promastigotas De *L. Amazonensis* E *L.INFANTUM* 61
9.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM COMPOSTOS ANTI-LEISHMANIA 62
10 RESULTADOS DA ATIVIDADE BIOLÓGICA 63
10.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI -*T. CRUZI* DA SÉRIE DS 63
10.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DA SÉRIE DS 64
11 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 67
11.1 CONCLUSÕES 67
11.2 PERSPECTIVAS 67
REFERÊNCIAS 68

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas consistem em um grupo de doenças transmissíveis, ocasionadas por agentes infecciosos, parasitas, bactérias, fungos e vírus. Os países mais afetados são os localizados em regiões tropicais e subtropicais, e com menores índices de desenvolvimento humano, atingindo em sua maioria a população que vive em situação de pobreza, onde não possuem acesso ao saneamento básico adequado, tornando-se vulneráveis aos agentes infecciosos. São intituladas de doenças negligenciadas pois há um baixo investimento por parte da indústria farmacêutica, em pesquisas e desenvolvimentos de novos medicamentos que auxiliem no tratamento dessas doenças (LINDOSO *et al.,* 2009).

Entre as doenças negligenciadas destaca-se a doença de chagas ocasionada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, transmitida ao ser humano em sua maioria por meio da picada do percevejo triatomíneo, ou por via oral, por meio da ingestão de alimentos e bebidas contaminadas. Ao ser infectado a doença se manifesta inicialmente na sua fase aguda que se não tratada adequadamente pode evoluir para fase crônica, onde a mesma é capaz de acometer o sistema digestivo, cardiovascular e nervoso central (ECHEVERRÍA *et al*., 2020).

O fármaco utilizado no tratamento da doença de chagas é o Benzonidazol, a quimioterapia com o mesmo é realizada durante um período de 60 dias, porém provoca uma gama de efeitos colaterais, levando à diminuição da adesão ao tratamento pelos pacientes. O Benzonidazol é recomendado na fase aguda da doença, já que a eficácia do mesmo durante fase crônica é reduzida em função da sua baixa biodisponibilidade, quando os parasitas estão situados em tecidos mais profundos e em lenta replicação. Esse atual cenário evidencia a carência de pesquisa de novos compostos protótipos, candidatos a fármacos (KRATZ, 2019).

Outra doença negligenciada que possui uma grande incidência é a leishimaniose, a mesma é uma doença parasitária ocasionada por protozoários do gênero Leishmania. No Brasil, existem dois tipos, a tegumentar e a visceral, que são transmitidas por diferentes protozoários. A leishmaniose tegumentar é mais comum em áreas rurais e está relacionada a lesões na pele ou mucosas. A visceral, por sua vez, ataca órgãos internos, como fígado, baço e medula óssea (BRASIL, 2022).

O tratamento da Leishmaniose também é um desafio, visto que, estão disponíveis no mercado os seguintes fármacos: anfotericina B, miltefosina e

pentamidina. Porém, esses fármacos apresentam uma alta toxicidade, além disso, a terapia com os mesmos em uma fase avançada da doença é ineficaz (FIOCRUZ, 2022; BRASIL, 2017).

Estruturas privilegiadas são blocos moleculares utilizados no planejamento e desenvolvimento de fármacos. Sendo que esses núcleos possuem características estruturais que apresentam um amplo espectro de *atividades* biológicas já comprovadas e associadas à sua estrutura principal, registrada na literatura. (POLONSKI *et al.,* 2012).

Os núcleos piridina e tiazol são bastantes pesquisados e estudados, por serem conhecidos na literatura como estruturas privilegiadas que apresentam um amplo espectro de atividades biológicas. Estudos já realizados pelo grupo de pesquisa LpQM, mostraram que compostos piridínicos possuem diferentes tipos de atividade biológica tanto anti-*T. Cruzi* (CARDOSO *et al.,*2014) quanto antitumoral (SILVA *et al.,*2017). Além de demais atividade que foram registradas por outros grupos de pesquisa, apontando o grupo piridina como fração importante em compostos que se mostraram biologicamente ativos (RIBEIRO, 2021).

Os tiazóis, assim como as piridinas, também possuem um vasto espectro de atividades biológicas já comprovadas na literatura, dentre as atividades, destacam-se antiviral, anticâncer, antibacteriano, antifúngico, anticonvulsivo, antiparkinsoniano e anti-inflamatório, que pode ser bem ilustrada pelo grande número de medicamentos no mercado que contêm este grupo funcional (SOUZA, 2015).

Investigando as propriedades farmacológicas dos núcleos piridina, tiazol e tiossemicarbazonas fundamentando-se em séries já desenvolvidas anteriormente pelo LpQM onde obteve-se estruturas com bons resultados de bioatividade, foi proposto a síntese de uma nova série de piridil-tiazol, visando identificar novas moléculas com atividade Anti-T. Cruzi e anti-Leishmanicida.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar protótipos à fármacos com atividade *Anti-T. Cruzi e Anti-leishmanicida*, por meio do planejamento estrutural, síntese e avaliação biológica de inéditos derivados piridil-tiazóis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar os novos derivados piridil-tiazóis;
- Caracterizar a estrutura química dos compostos obtidos através da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN 1 H) e Carbono (RMN 13 C).
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das moléculas em células de linhagem de macrófagos;
- Avaliar a atividade tripanocida dos inéditos derivados frente às formas amastigota e tripomastigota do parasita.
- Avaliar a atividade leishmanicida dos tiazóis frente às formas promastigota e amastigota das espécies *L. amazonensis* e *L. infantum*.

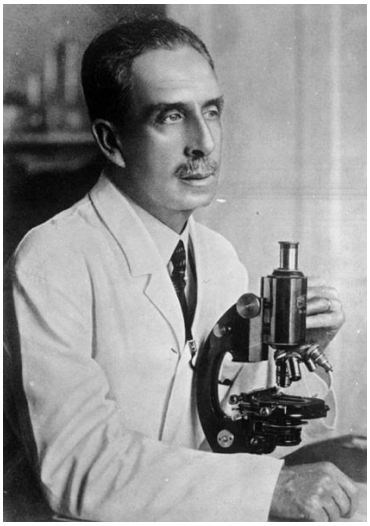
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DOENÇA DE CHAGAS

3.2 HISTÓRICO

A doença de Chagas ficou assim conhecida após sua descoberta ter sido anunciada em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas como mostra a **figura 1,** um pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, a mesma é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e é também chamada de tripanossomíase americana (CDC,2022).

Figura 1 - Carlos Chagas



Fonte: Casa de Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

A contribuição de Carlos Chagas para a medicina é considerada única, visto que até hoje apenas o pesquisador conseguiu descrever detalhadamente todo o ciclo de uma doença: o patógeno, ciclo evolutivo, inseto vetor e seus hábitos e a patologia (FIOCRUZ, 2017).

A descoberta da mesma teve ínicio em 1908, quando Carlos Chagas foi enviado a um povoado no norte de Minas Gerais afim de fazer uma campanha contra malária, lá o mesmo analisou o sangue de um sagui e encontrou um *Tripanosoma,* que nomeou de *Trypanosoma minasense,* porém que não causou doença nos macacos, em seguida Carlos Chagas foi informado que existia na localidade um inseto sugador de sangue, que ficou conhecido popularmente como barbeiro por picar o rosto

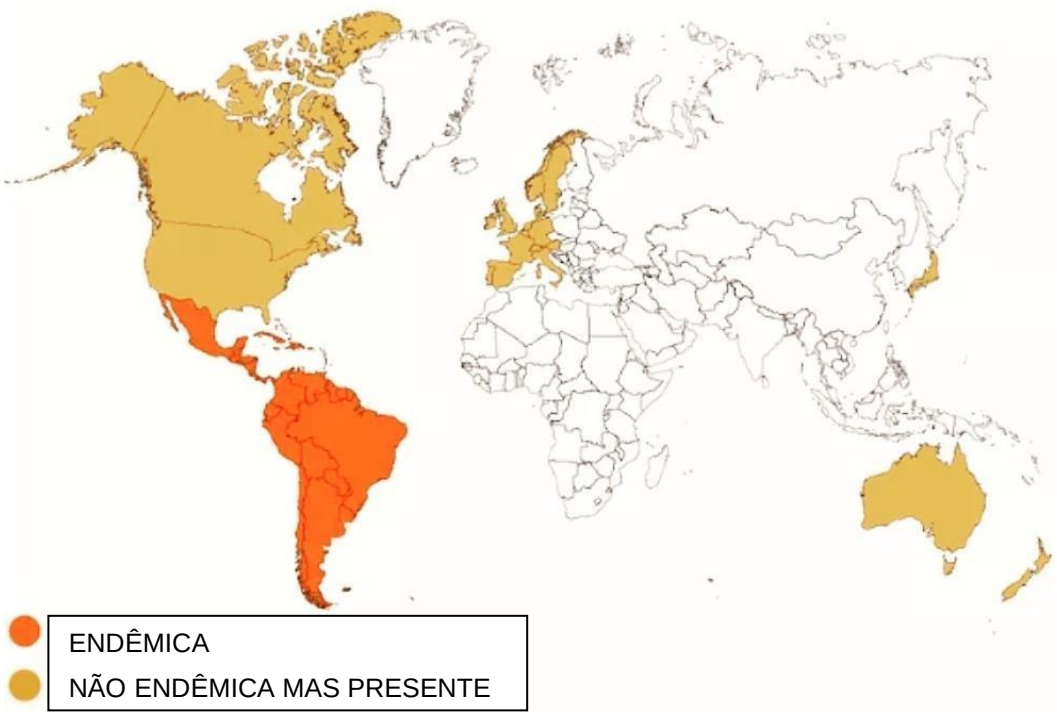
da pessoas. Alguns desses insetos foram capturados e enviados para o Instituto Oswaldo Cruz, e ao colocá-los em laboratório juntos com outros animais dectectou *trypanosoma* no sangue dos mesmo, então Carlos Chagas deduziu que se tratava de uma nova espécie de *Trypanosoma* que chamou de *Trypanosoma Cruzi* em homenagem a Oswaldo Cruz. (FIOCRUZ,2017).

Embora a doença de chagas tenha sido descoberta a mais de um século, a mesma surgiu há milhões de anos como uma infecção enzoótica nos animais silvestres e se estabeleceu como uma antropozoonose, quando o homem começou a explorar áreas selvagens provocando o desmatamento para da espaço para a agricultura, esses insetos adaptaram-se ao ambiente domiciliar (ZINGALES *et al.,*2011).

3.3 EPIDEMIOLOGIA

Chagas é classificada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença negligenciada que persiste como um problema de saúde pública causando impacto socioeconômico em vários países da América Latina (MELO *et a.l*, 2021). A doença é endêmica em 21 países da América Latina como mostra a **figura 2**, visto que na América do sul existe um controle maior, diferentemente da América Central. Devido a globalização a doença passou a estar presente também na Europa, Ásia, África e América do norte. (SANTOS *et al.,* 2020).

Figura 2 - Endêmica em 21 países da America Latina



Fonte: DNDi (Adaptado)

Cerca de 6 a 8 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo parasita nos países endêmicos das Américas, e que outras 75 milhões de pessoas nessas regiões estejam em risco de contrair a doença, visto que aproximadamente 70% dos infectados não tem conhecimento da enfermidade pois não apresentam sintomas ou tem sintomas leves. A infecção por *Trypanosoma Cruzi,* conta com a incidência de 30 mil novos casos por ano, por transmissão vetorial nas regiões endêmicas, causando em média 14 mil mortes por ano e 8 mil novos casos de transmissão congênita (OPAS, 2021).

O Brasil é um dos principais países da região endêmica da doença, porém com a realização das campanhas e ações de controle desde a década de 70, o Brasil ganhou no ano de 2006 o selo internacional da eliminação do *Tríatoma Infestans,* espécie principal do inseto, responsável pela transmissão vetorial (FIOCRUZ, 2019). Entretanto, atualmente estima-se que há cerca de 1,9 e 4,6 milhões de pessoas acometidas pela doença de chagas no Brasil, visto que, boa parte destes são portadores da doença em sua fase crônica. A enfermidade é a quarta causa de morte entre as doenças infecto-parasitárias no país, ocasionando cerca de 10 mil mortes por ano, em decorrência de complicações clínicas.(MELO *et al.,* 2021).

No ano de 2020, vários estados brasileiros registraram casos confirmados da

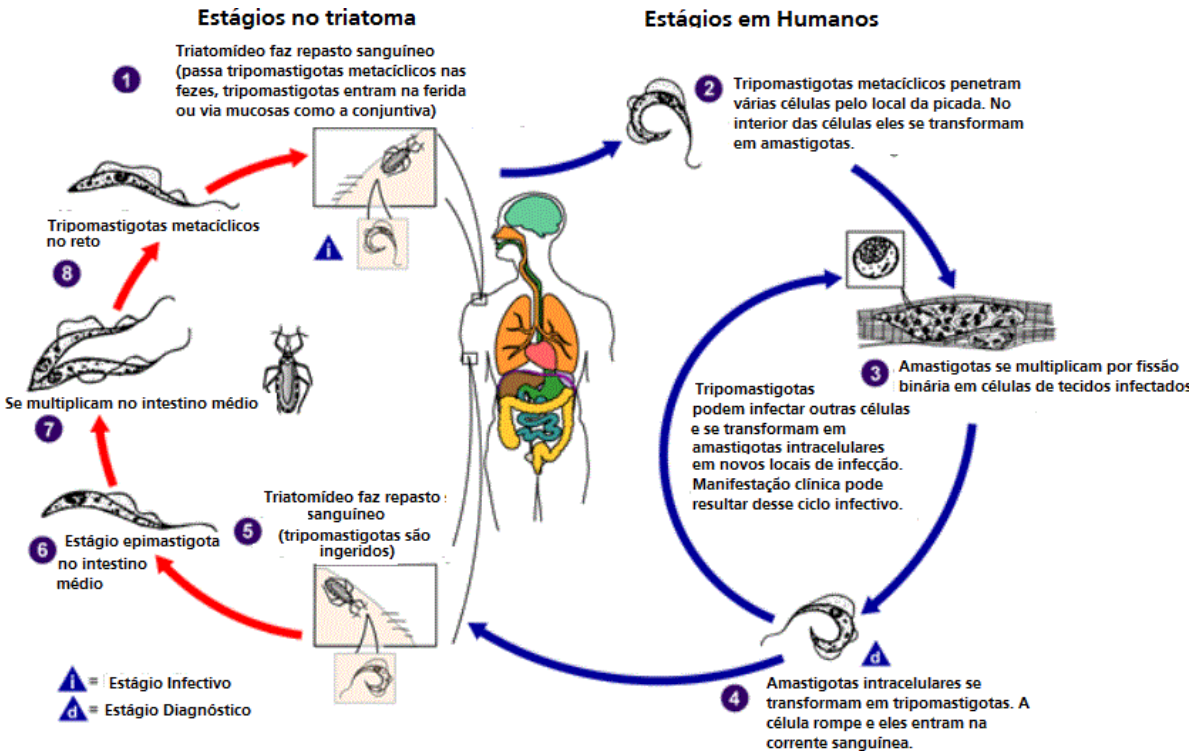
doença de Chagas, tendo em vista que a região Norte destacou-se concentrando 95% dos casos, onde destes 88% ocorreram no Pará. No que diz respeito às principais vias de transmissão dos casos sucedidos, 75% foram transmissão oral, 6% por transmissão vetorial e 15% não identificada (BRASIL, 2021).

3.4 CICLO BIOLÓGICO DO *T.CRUZI*

No que diz respeito ao ciclo biológico do *Trypanosoma Cruzi* é possível afirmar que o mesmo infectou diferentes ordens de mamíferos somando-se mais de 100 ordens. Os parasitas estão presentes em diversas populações como: humanos, animais domésticos, selvagens e invertebrados, como é o caso dos insetos vetores. O parasita apresenta variação funcional e morfológica, onde alterna entre estágios de divisão binária e as formas não replicativas e infectantes, visto que as não replicativas são os epimastigotas que são encontrados no tubo digestivo do inseto e amastigotas que acham-se no meio intracelular dos mamíferos. Já os tripomastigotas metacíclicos e os tripomastigotas são formas replicativas, que são encontrados respectivamente, em fezes e urina do vetor, e circulando no sangue de mamíferos. A **figura 3** apresenta de forma didática como ocorre o ciclo biológico do *Trypanosoma Cruzi* (FIOCRUZ, 2019).

No entanto, novos estudos apontam que tanto os tripomastigotas metacíclicos são infecciosos para o hospedeiro vertebrado, assim como os epimastigotas que foram recentemente diferenciados (rdEpi) também têm capacidade infecciosa (KESSLER *et al.,* 2017).

Figura 3 - Ciclo Biológico do Trypanossoma Cruzi



Fonte: CDC (adpatado)

(1) Um vetor triatomíneo faz um repasto sanguíneo, as fezes do inseto são expelidas sobre a pele do humano que ao coçar o local da picada, o hospedeiro possibilita a entrada das formas tripomastigotas metacíclicas através do ferimento ou de uma membrana mucosa, até alcançarem a corrente sanguínea. (2) Dentro do hospedeiro, os flagelados piramidais invadem as células para escapar do mecanismo de defesa do hospedeiro, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares. (3) Os amastigotas se multiplicam por fissão binária nas células dos tecidos infectados. (4) No interior das células as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, e são então liberadas na circulação como tripomastigotas da corrente sanguínea. (5) Tripomastigotas infectam células de vários tecidos e se transformam em amastigotas intracelulares em novos locais de infecção. A replicação recomeça somente quando os parasitas entram em outra célula ou são ingeridos por outro vetor. O inseto se infecta ao se alimentar de sangue humano ou de animal que contém parasitas circulantes. (6) Nessa fase os tripomastigotas ingeridos se transformam em epimastigotas no intestino médio do inseto vetor. (7) Os parasitas se multiplicam e se diferenciam no intestino médio (8) e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infectivos no intestino terminal, concluindo assim o ciclo

da vida que ocorre entre o parasita e o vetor (UMESH, 2011).

3.5 TRANSMISSÃO DO *T.CRUZI*

3.5.1 Transmissão vetorial

A doença de chagas é transmitida vetorialmente pelos insetos triatomíneos, que são popularmente conhecidos como barbeiros. Entre as mais de 100 espécies existentes de triatomíneos, três ganham maior destaque como transmissores do trypanossoma cruzi, sendo elas: *Triatoma infestans, Rhodnius prolixua e Triatoma diamediata,* tendo em vista que a espécie apresentada de forma ilustrativa na **figura 4** *Triatoma infestans* estar mais presente nas regiões endêmicas (SHORT *et al.,* 2017) (CDC, 2022).

Figura 4 - Triatoma infestans

Fonte: FCFAR – UNESP

A enfermidade é transmitida aos seres humanos, como também mais 150 espécies de animais domésticos (cães, gatos etc) e selvagens (guaxinins, roedores, tatus etc) podem ser infectados pelo trypanosoma cruzi principalmente por meio dos insetos vetores (FONSECA *et al., 2017)*. Grande parte dos indivíduos que vivem na região endêmica e são infectados pelo contato direto com o inseto vetor, estão expostos a condições de moradia precária e em áreas de extrema pobreza. (GUARNER, 2019).

3.5.2 Outras formas de transmissão

A Tripanossomíase Americana ou doença de chagas além da transmissão vetorial, pode ser transmitida por diferentes formas, sendo elas: transmissão congênita ou vertical, quando a doença passa de mãe para filho, transmissão oral, por meio da ingestão de alimentos contaminados, transmissão sexual, e por meio de transfusão de sangue ou transplante de órgãos (SILVA, 2021) (ARAÚJO *et al., 2017).*

A transmissão congênita ou vertical, ocorre quando a mãe infectada pelo *Trypanosoma cruzi* transmite o parasita para o feto, isso pode acontecer em qualquer fase da gestação, tendo em vista que grande parte dos recém-nascidos infectados pela doença de chagas congênita, não apresentam sintomas (CEVALLOS; HERNÁNDEZ, 2014). Sendo assim, para que esses recém nascidos não desenvolvam a condição crônica da doença é de suma importância que haja um diagnóstico e um tratamento precoce, porém em várias regiões do país o exame para o diagnóstico da doença de chagas não é incluso no pré-natal das gestantes, com isso casos assintomáticos da transmissão vertical acabam sendo negligenciados (LIVINGSTON, *et al., 2021)*.

Além disso a doença pode ser transmitida por via oral, após o consumo de alimentos e bebidas infectadas pelas fezes ou urina do inseto vetor, como: extrato de cana-de-açúcar, carnes de animais silvestres, polpa de açaí e de alguns sucos de frutas regionais, goiaba, babaçu, entre outros. Ademais, surtos da doença de chagas transmitida por via oral foram registrados em diversos países da América Latina, como: Brasil, Venezuela, Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa e Argentina (SANTOS *et al.,* 2017). No Brasil o boletim epidemiológico divulgado pelo Ministério da Saúde em 2021, mostra a via oral como principal via de transmissão da doença de chagas no país com ênfase na região norte (BRASIL, 2021).

Pesquisas recentes relatam que há transmissão sexual da doença de chagas, e a mesma ocorre quando indivíduos infectados pelo *T. Cruzi,* que encontra-se na fase aguda da doença mantém relação sexual com uma pessoa não infectada, sem uso de preservativo (ARAÚJO *et al.,* 2017). A enfermidade também pode ser contraída por meio da transfusão sanguínea ou transplante de órgãos infectados pelo *T. cruzi* tendo em vista que, muita vezes a doença é assintomática, com isso hoje os doadores passam por uma triagem onde exames são executados visando comprovar que os mesmo não estão acometidos pela doença (LYNN *et al*., 2022).

3.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO

A doença de chagas pode se manifestar em três fases, sendo elas: fase aguda assintomática também intitulada como fase intermediária ou indeterminada (onde o indivíduo infectado não apresenta os sintomas da doença), fase aguda sintomática que dura até dois meses após a infecção e a fase crônica que se desenvolve ao longo dos anos (SILVA et al., 2020).

A fase aguda perdura durante dois meses e pode se manifestar como assintomática, quando o infectado não apresenta sintomas, geralmente quando a carga parasitária é muito baixa. Em casos sintomáticos leves os pacientes costumam apresentar febre constante entre 37,5 a 38,5, outros sintomas que podem ser apresentados nessa fase sâo: diarreia, vômitos, cefaléia, dores musculares, aumento das glândulas linfáticas, palidez e erupção cutânea. Ambos os casos quando não diagnosticados e não tratados devidamente podem evoluir para a forma crônica indeterminada, e mais adiante para a forma cardíaca, digestiva ou mista. Quando a transmissão ocorre via vetorial, o indivíduo apresenta o sinal de entrada conhecido como chagoma que é um inchaço cutâneo observado no local da picada, já quando o mesmo é infectado pela mucosa ocular observa-se o sinal de romaña, inchaço de tom roxo em uma das pálpebras como mostra a **figura 5** (BRASIL, 2019).

Figura 5 - Sinal de Romaña

Fonte: Fciência

A fase crônica indeterminada ocorre quando o paciente não apresenta os sintomas e a mesma perdura por toda a vida do infectado a menos que seja tratado,

nessa fase o parasita costuma se esconder dentro dos tecidos dos órgãos especialmente no coração e no músculo digestivo. A fase crônica avançada ocorre geralmente em 30% dos infectados, é quando a doença se desenvolve anos após sua infecção (WHO,2022). Grande parte dos pacientes apresentam problemas cardíacos como: insuficiência cardíaca congênita e miocardiopatia dilatada que pode levar àmorte. Os pacientes também podem vir a apresentar problemas digestivos, como megacólon ou megaesôfago, ou a forma cardiodigestiva da doença que ocorre quando há lesões cardíacas e digestivas simultaneamente (BRASIL,2019).

Na fase aguda o infectado apresenta uma maior quantidade de parasita do sangue, o diagnóstico nessa fase pode ser realizado através de métodos parasitológicos diretos ou indiretos, onde é possível a visualização dos parasitas circulantes. Na fase crônica, devido a baixa quantidade de parasita no organismo, os métodos parasitológicos são ineficazes, nesse caso o Ministério da Saúde recomenda a realização de dois testes sorológicos, o ELISA (Ensaio Imunoenzimático), o IFI (Imunofluorescência Indireta), e o HAI (Hemaglutinação Indireta). Os métodos de diagnóstico da doença de chagas são muitos, com o passar do tempo os mesmos vêm sendo aprimorados, e apresentando resultados mais precisos (LIMA, *et al.*2019).

3.7 TRATAMENTO CLÍNICO

O benzonidazol é o fármaco utilizado na terapia da doença de chagas, faz-se uso do mesmo tanto na fase aguda da doença quanto na fase crônica, porém o tratamento mostra-se mais eficaz na fase aguda, sendo assim é importante que o tratamento seja iniciado imediatamente após diagnóstico. Na fase aguda a chance de cura é de aproximadamente 100%, já na fase inicial crônica essa eficácia diminui, indo de 50% a 60%, os casos crônicos antigos a eficácia chega apenas até 20% (BRASIL,2015). Quando o paciente apresenta intolerância ao Benzonidazol, o tratamento é feito com Nifurtimox. Ambos os fármacos agem tanto nas formas sanguíneas (tripomastigotas), quanto na forma teciduais (amastigotas), mas a atividade sob as formas amastigota é inferior, o que resulta em uma menor eficácia durante a fase crônica (WHO, 2020).

A terapia com uso do Benzonidazol apresenta alguns problemas como: as altas doses administradas, o longo período de tratamento, e os efeitos adversos. O tratamento que conta com duração de 60 dias, onde 40% dos pacientes em

tratamento apresentam efeitos colaterais como: febre, erupções cutâneas, dores musculares, articulares, edema generalizado ou peritoneal, febre, entre outros. Em virtude dessa elevada incidência de efeitos colaterais, que se manifestam principalmente em adultos, ocasiona o abandono do tratamento por uma parte significativa dos pacientes; tendo em vista que crianças tem uma maior tolerância ao fármaco. O tratamento é contraindicado para gestantes, devido à toxicidade dos fármacos disponíveis no mercado, a menos que se trate de um agudo grave (KAWAGUCH, *et al.* 2019).

4. LEISHMANIOSE

4.1 HISTÓRICO

O patologista Willian Boog Leishman e o cirurgião dentista Charles Donovan, trabalhando de forma independente, identificaram em 1903 um protozoário como o agente etiológico do calazar. Um novo gênero – *Leishmania* – foi então criado para acomodar o parasito classificado como *Leishmania-Donovani.* E em 1906, um médico pesquisador alemão chamado de Max Luhe mostrou que havia grande semelhança morfológica entre este protozoário e o *Helcosoma tropicum*, do Botão do Oriente, sendo este reclassificado como *Leishmania tropica*. Desde então, várias outras espécies de Leishmania foram relatadas por médicos (SASIDHARAN, SAUDAGAR, 2021).

No Brasil, a leishmaniose era conhecida por Cerqueira desde 1855, através do encontro de lesões de pele similares às do botão-do-oriente. Em 1908, durante a construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, em São Paulo, ocorreram numerosos casos, principalmente na cidade de Bauru, ficando conhecida por úlcera-de-Bauru, os quais foram nomeados por Gaspar Vianna, em 1909, como *Leishmania braziliensis* (BENCHIMOL *et al.,* 2019).

Apenas no ano de 1922, o médico e pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz Henrique Aragão demonstrou o papel do flebotomíneo (inseto vetor da doença conhecido popularmente como mosquito palha) na transmissão das Leishmanioses tegumentar e mucocutânea. A forma visceral da Leishmania, foi diagnosticado o primeiro caso em 1913,pelo médico Migone em necrópsia de um paciente proveniente do Estado do Mato Grosso. Já depois de 1930 é que o inseto Lutzomyia longipalpus foi identificado como vetor da L.brasiliensis. A partir disso, a transmissão da doença vem se manifestando nas mais diversas cidades em todos os estados do país (BRASIL, 2017).

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por um protozoário parasita da família Trypanosomatidae, do gênero leishmania, há mais de 20 espécies de interesse médico, que são nocivas à saúde do homem. Uma vez infectado, o parasita vive e se multiplica no interior das células que fazem parte do sistema defensivo do indivíduo, os macrófagos (WHO, 2022).

4.2 EPIDEMIOLOGIA

Considerada até hoje como um problema sério de saúde pública, a leishmaniose, possui um número alarmante de infectados sendo ele, mais de 12 milhões de infectados em todo o mundo, e estar entre as dez principais doenças negligenciadas. Atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para leishmaniose e correm risco de contrair a infecção. Estima-se que 30.000 novos casos de leishmaniose visceral e mais de 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea ocorrem anualmente, assim como de 20.000 a 30.000 mil mortes por ano decorrente dessas doenças (OPAS/OMS, 2022).

A leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) é endêmica em 18 países das Américas. No período de 2001-2019 foram notificados 1.028.054 novos casos de LC e LM, distribuídos em 17 dos países endêmicos. Em 2019, o Brasil registrou 15. 484 casos, sendo o país com maior incidência. Junto com Colômbia (5.907), Peru (5.349), Nicarágua (3.321) e Bolívia (2.052) representaram 77% do total de casos na região (OPAS/OMS, 2020). No Brasil, tem sido associada a sete espécies: *L. braziliensis, L. guyanensis, L. lainsoni, L. naiffi, L. shawi, L. lindenberg e L. amasonensis* (BRASIL, 2022).

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

4.3 VETOR E CICLO BIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE

As Leishmanias estão distribuídas por todo mundo, existindo 30 espécies conhecidas, das quais 10 estão presentes no Velho Mundo e as outras 20 no Novo Mundo. Dentre elas, cerca de 16 de 20 espécies estão envolvidas no desenvolvimento de doenças no homem. Sistematicamente estão organizados na ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, Gênero Leishmania, divididos nos

Subgêneros Leishmania e Viannia (SHAW, 1994; NEVES, 2005).

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

Os flebotomíneos (também conhecidos como mosquito-palha, tatuquira, cangalhinha e birigui) são os hospedeiros invertebrados responsáveis pela leishmaniose. Pertencentes à 22 ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, esses insetos apresentam coloração amarelada, corpo pequeno e piloso, asas que se mantêm eretas sobre o corpo em formato de ¨V¨, **figura 6**. Os insetos adultos de ambos os sexos se alimentam dos açúcares de plantas, entretanto as fêmeas apresentam hábitos hematofágicos, necessários para a maturação dos ovos. Em geral, os flebotomíneos são altamente suscetíveis à desidratação, portanto, costumam se alimentar durante o crepúsculo e à noite, abrigando-se durante o dia (ALEMAYEHU, 2017; VILELA et al., 2014)

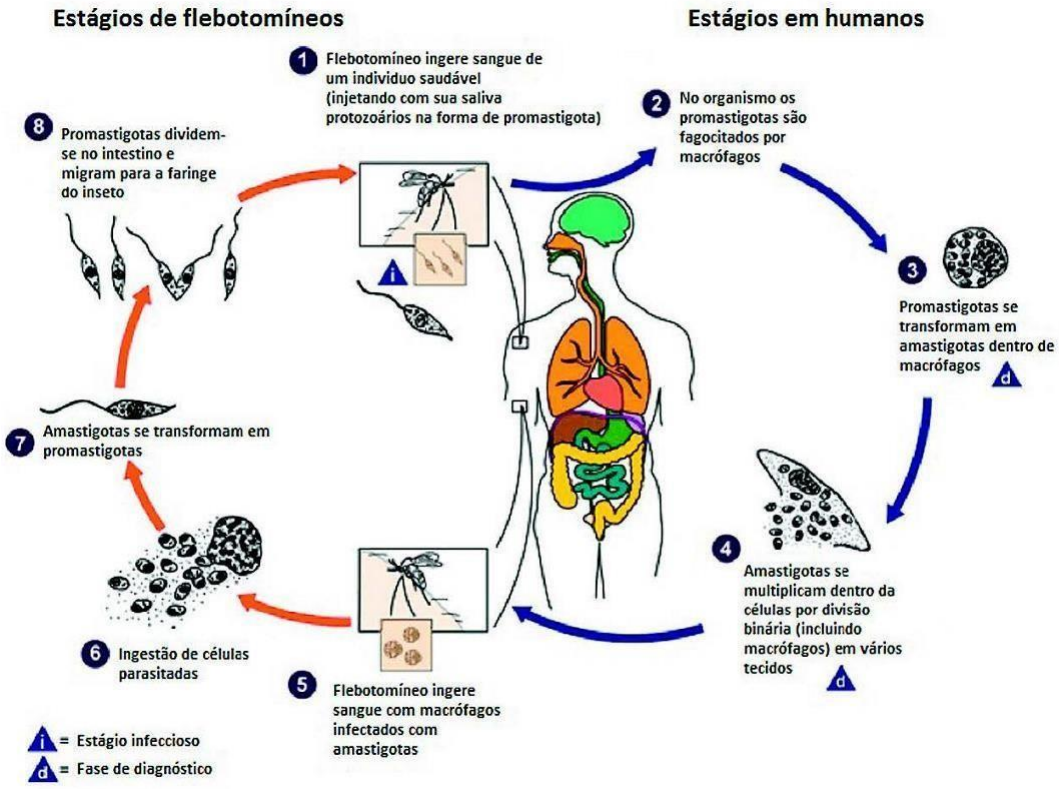
Figura 6 - Mosquito Palha

Fonte: Ig São Paulo (2018).

A *Leishmania sp.* apresenta duas fases distintas em seu ciclo de vida: promastigota e amastigota. O ciclo biológico das leishmanioses se inicia a partir do momento em que as fêmeas do inseto vetor ingerem macrófagos parasitados na forma amastigota de Leishmania presentes no sangue de animais infectados. Após isso, ocorre o rompimento dos macrófagos para liberar o parasita ainda na forma

amastigota, o qual se reproduz e se desenvolve no trato digestivo do inseto, transformando-se em promastigota, a qual é flagelada e extracelular. Desta forma se reproduz no esôfago e faringe do vetor, até se diferenciarem em promastigotas metacíclicas (forma infectante). Com isso, ao picar novamente um hospedeiro vertebrado, estas formas são liberadas. Na epiderme do hospedeiro, são fagocitadas por macrófagos e se diferenciam na forma amastigota novamente. Estas se multiplicam até romper os macrófagos para serem fagocitadas por outros macrófagos e repetirem o processo, **figura 7**. Desta forma 23 ocorre a infecção do patógeno pelo sangue para outros tecidos, como os do fígado, baço e medula óssea (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; MANN, 2021).

Figura 7 - Ciclo biológico das leishmanioses.



Fonte: CDC (adpatado)

4.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO

Há três tipos principais de manifestações da doença leishmaniose, sendo esses: Leishmaniose Visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (MCL). Sendo a leishmaniose cutânea a mais comum e a leishmaniose Visceral o tipo mais grave e com maior índice de letalidade entre os três principais e

a leishmaniose mucocutânea a mais incapacitante (SASIDHARAN, SAUDAGAR, 2021)..

Grande parte das pessoas infectadas com o parasita não desenvolve nenhum sintoma durante a vida. Sendo assim, o termo leishmaniose refere-se à condição de adoecer devido à infecção pela *Leishmania*, e não à infecção pelo parasita. Em áreas endêmicas, pessoas podem ser infectadas *por Leishmania*, mas podem não desenvolver a doença. Nesse caso, nenhum tratamento é necessário (WHO, 2022).

A leishmaniose visceral é conhecida popularmente como calazar, a enfermidade quando não tratada adequadamente é fatal em mais de 95% dos casos, a mesma afeta principalmente os órgãos internos e é caracterizada pela incidências de sintomas, como: febre irregular, indisposição, emagrecimento, nódulos linfáticos aumentados, inchaço do baço, fígado e anemia grave (WHO, 2022).

A leishmaniose cutânea é a mais comum ou seja mais recorrente, a mesma produz uma lesão de pele bem demarcada no local da picada do inseto após várias semanas a meses. Lesões múltiplas podem ocorrer após picadas múltiplas infectadas ou disseminação metastática. A lesão inicial na maioria das vezes é uma pápula que aumenta lentamente, úlcera-se no centro e desenvolve uma borda eritematosa elevada, na qual parasitas intracelulares estão concentrados. As Lesões de LC cicatrizam de forma espontânea após meses, mas podem persistir durante anos. Deixam uma cicatriz deprimida, semelhante a uma queimadura (WHO, 2022).

Já a leishmaniose mucocutânea caracteriza-se também pelo surgimento de lesões que podem cicatrizar espontaneamente; no entanto , lesões progressivas da mucosa podem não se tornar aparentes por meses ou anos. Normalmente , os pacientes apresentam congestão nasal , dor e desconforto, com o passar do tempo, a infecção pode evoluir, resultando em mutilação importante do nariz, palato, faringe oral ou face (DNDi, 2022)

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

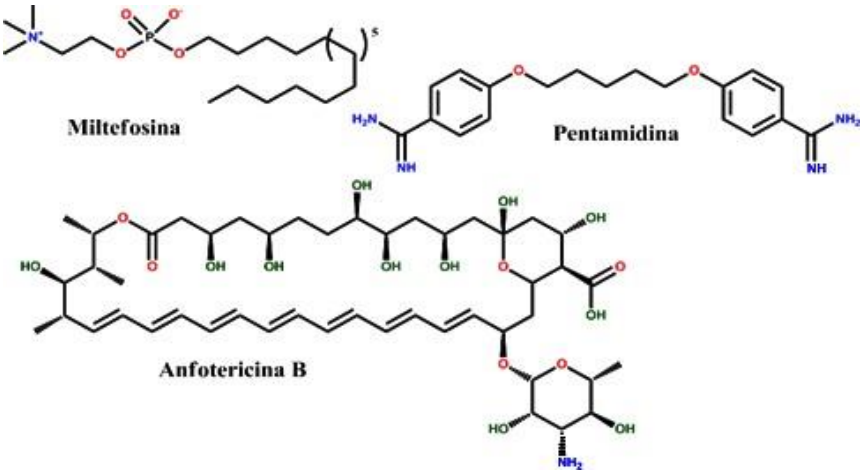
.

4.6 TRATAMENTO

.

A terapia utilizada para leishmaniose trata-se de medicações em sua maioria injetáveis, porém que apresentam uma certa problemática, visto que os fármacos disponíveis no mercado exprimem relevantes barreiras que dificultam um tratamento eficiente como: toxicidade, longa duração de tratamento, alto custo de produção e, consequentemente, comercialização, eficácia reduzida, dificuldade de administração e, mais importante, o surgimento de cepas resistentes. A quimioterapia com esses fármacos precisa ser aplicada por profissionais experientes, o tempo e a dosagem dessa terapia dependem da forma clínica que o paciente desenvolveu a doença, há casos em que o paciente só consegue evoluir para a cura, após diversos esquemas terapêuticos serem testados. Portanto, como mostra a **figura 8** o método de tratamento atual é a terapia convencional, ou seja, antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), miltefosina, anfotericina B e pentamidina.

Figura 8 - Estruturas dos principais fármacos utilizados na leishmaniose



Fonte: Autoria própria (2023)

4.7 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Tanto a doença de Chagas quanto a leishmaniose trata-se de doenças negligenciadas, e assim como outras desse grupo, não são atrativas para a indústria farmarcêutica, visto que atingem principalmente a indivíduos de baixo poder aquisitivo.

Essa industria empenha-se no estudo, desenvolvimento, fabricação e comercialização de medicamentos para doenças globais, visando a geração de lucros. Entre os anos 1975 e 2004 foram desenvolvidos 1.556 medicamentos registrados, porém desses apenas 21 se destinavam especificamente para as doenças negligenciadas (FIOCRUZ,2019).

Mais de 500 milhões de indivíduos correm risco de serem acometidos por uma doença negligenciada seja ela: doença de chagas, leishmaniose visceral ou doença do sono, em virtude disso, uma pesquisa realizada recentemente, sobre o financiamento mundial de inovação para doença negligenciadas, constatou que menos de 5% deste financiamento foram destinado para estudos dessas doenças em questão. Diante desse contexto, originou-se a iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi), que trata-se de uma organização de pesquisas e desenvolvimento sem fins lucrativos, que empenha-se a fim de oferecer novas terapias para doenças negligenciadas. A partir de sua criação, ocorrida em 2003, o DNDi, concedeu seis tratamentos, sendo eles: a dosagem pediátrica do benzonidazol para doença de chagas, dois antimaláricos de dose fixa, terapia combinada para fase aguda da doença do sono com nifurtimox e eflornitina, a terapia combinada para o tratamento de leishmaniose visceral à base de estibogluconato de sódio e paromomicina na frica e um conjunto de terapias de combinação para leishmaniose visceral na Ásia. (FIOCRUZ,2019).

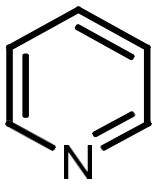
5 ESTRUTURAS PRIVILEGIADAS

Estruturas privilegiadas trata-se de uma subestrutura ou andaime que serve como ponto de partida para ligantes que têm afinidade para mais de um tipo de receptor. Estas estruturas contam com uma gama de compostos biologicamente ativos que alcançam diferentes alvos e vias farmacêuticas (LEITE, *et al.,2019).* A partir disso compreende-se que determinadas características estruturais produzem efeitos biológicos mais frequentes que outras. Atualmente as Estruturas privilegiadas têm sido frequentemente utilizadas na química medicinal como um modelo eficaz, possibilitando a descoberta de novas drogas e potenciais candidatos no campo das doenças negligenciadas (Zhuang. *et al.,2021)*.

5.1 PIRIDINAS

A palavra piridina vem do grego onde pyr significa fogo e idina, que é utilizado para bases aromáticas, a estrutura representada pela **figura 9**, contém um único anel heterocíclico que vem da substituição de um grupo de CH no anel de benzeno pelo átomo de nitrogênio (MARINESCU; POPA, 2022).

Figura 9 - Estrutura molecular da piridina.



Fonte: Autoria própria (2023)

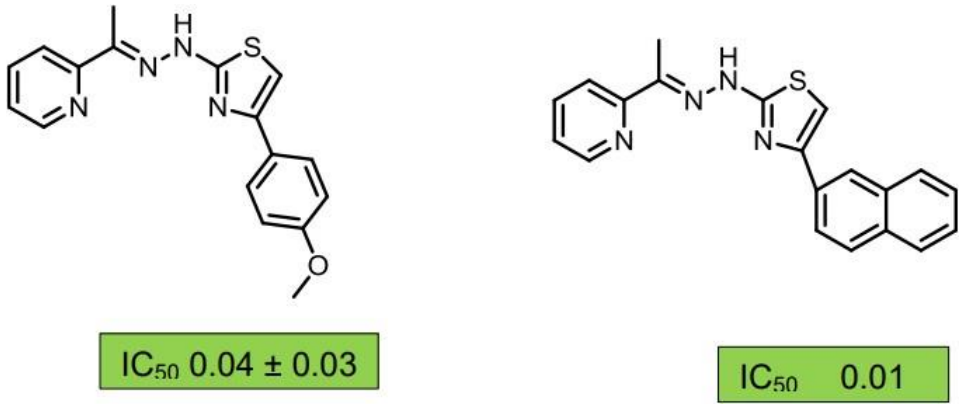
O núcleo piridina é um importante composto heterocíclico, que está naturalmente presente em muitas moléculas, como vitaminas, coenzimas e alcalóides. Se destacando por sua ampla propriedade medicinal como: antimicrobianas, antivirais, antioxidantes, anti-inflamatórias, antiparasitárias, antidiabéticas, antimaláricas e antipsicóticas, anti-Alzheimer (TAHIR, *et al.,*2021).

Além disso, os andaimes de piridina fazem parte de muitos medicamentos tendo em vista que aumentam as características farmacológicas dos mesmos devido à sua basicidade fraca e melhor solubilidade em água, como exemplo é possível citar os fármacos: Apalutamida, Lorlatinib e Ivosidenib que foram aprovados recentemente

para tratamento do câncer (LING, *et al.*2021).

Estudos do nosso grupo de pesquisa, o LpQM, revelaram que 20 compostos de uma série de 26 piridil-tiazóis apresentaram ser agentes tripanocidas mais potentes que o Benzonidazol (BDZ), duas dessas moléculas são apresentadas na **figura 10**. (CARDOSO *et al*., 2014).

Figura 10 - Moléculas destaques da série de piridil-tiazóis de CARDOSO *et al.,* 2014

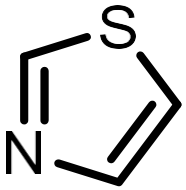


Fonte: CARDOSO *et al.,* 2014 (adaptado)

5.2 TIAZOL

Uma importante classe de compostos que também se destacam pelo amplo espectro de atividades biológicas são os tiazóis. Entre os anéis heteroarílicos de cinco membros, o tiazol é um anel único que carrega átomos de nitrogênio e enxofre, o que o torna uma entidade versátil em ações e reações. O anel do tiazol mostrado na **figura 11**, é encontrado em vários compostos naturais, como alcalóides, peptídeos, metabólitos e ciclopeptídeos (Arshadi *et al.,2022)*.

Figura 11 - Estrutura molecular do tiazol



Fonte: Autoria própria (2023)

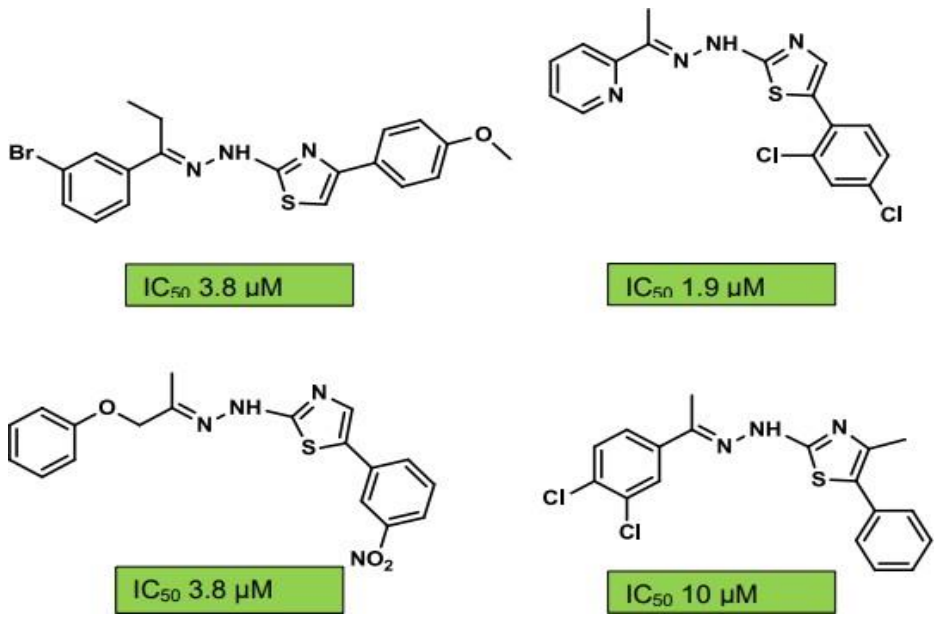
Os derivados do tiazol sempre despertaram o interesse de químicos sintéticos e biológicos devido às suas várias propriedades químicas, físicas e farmacológicas.

Dentre as atividades farmacológicas, destacam-se antiviral, anticâncer, antibacteriano, antifúngico, anticonvulsivo, antiparkinsoniano e anti-inflamatório, que pode ser bem ilustrada pelo grande número de medicamentos no mercado que contêm este grupo funcional (SOUZA, 2015).

A fração tiazol tem se destacado nas últimas décadas, com vários artigos enfatizando a importância do núcleo tiazólico na concepção e otimização de novos candidatos a fármacos bioativos (Arshadi *et al.,2022)*. Tendo em vista que esse núcleo heterocíclico, está presente em mais de 18 medicamentos com moléculas farmacologicamente ativas potentes, como Sulfatiazol (antimicrobiano), Ritonavir (antirretroviral), Tiazofurin (antineoplásico) e Abafungina (antifúngico) e em mais de 70 medicamentos experimentais (Singh *et al.,* 2020*)*.

Trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório (LpQM), identificaram novos potentes inibidores da enzima cruzaína e inibidores do crescimento do *T. cruzi*, por meio de índices de IC_{50} satisfatórios, como é possível visualizar na figura na **Figura 12** (CARDOSO, 2012; MOREIRA *et al*., 2012; FILHO, 2013). Essas pesquisas indicam que o tiazol também é um núcleo promissor para protótipos de fármacos antichagásicos.

Figura 12 - Moléculas desenvolvidas no LpQM, apresentando o núcleo tiazol e seus valores de toxicidade.



Fonte: CARDOSO, 2012; MOREIRA *et al.,* 2012; FILHO, 2013 (adaptado)

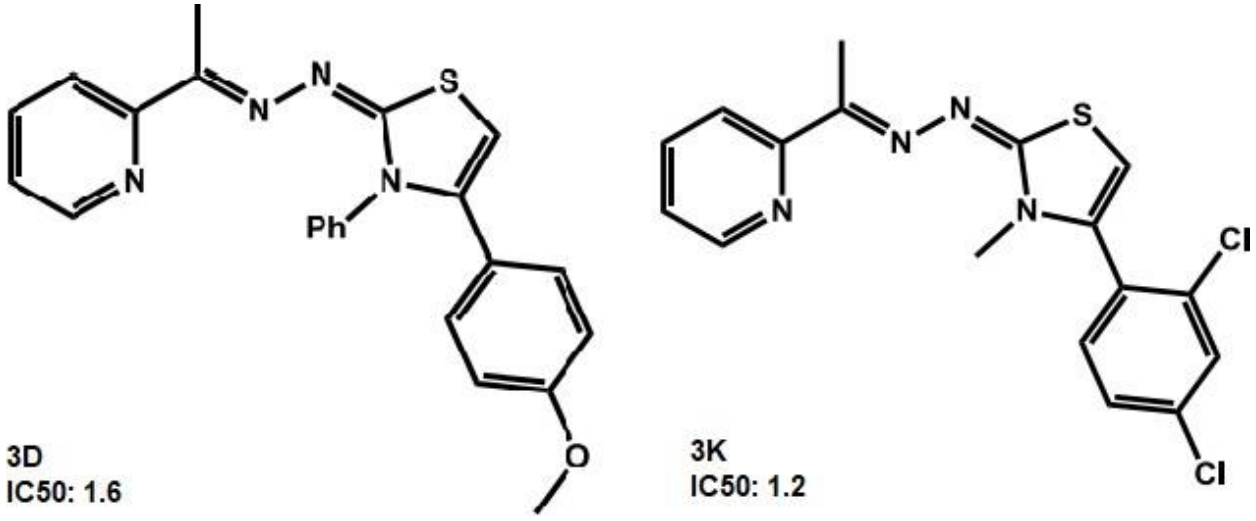
6 PLANEJAMENTO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE INÉDITOS PIRIDÍNICOS TIAZÓLÍCOS

6.1 PLANEJAMENTO DAS MOLÉCULAS

O planejamento da série D.S foi realizado levando em conta as moléculas desenvolvidas anteriormente e analisadas atividades biológicas de tais, pelo grupo LpQM (Laboratório de Planejamento e Síntese em Química Medicinal).

O planejamento foi direcionado a partir de resultados satisfatórios obtidos de derivados piridil-1,3-tiazóis sintetizados no LpQM, os mesmos apresentaram potente atividade anti-Trypanossoma Cruzi, até 5 vezes mais potente que o fármaco de referência Benzonidazol, é possível verificar a estrutura das moléculas destaques dessa serie na **figura 13.** (SILVA, 2014).

Figura 13 - Estruturas destaques da série Silva, 2014.

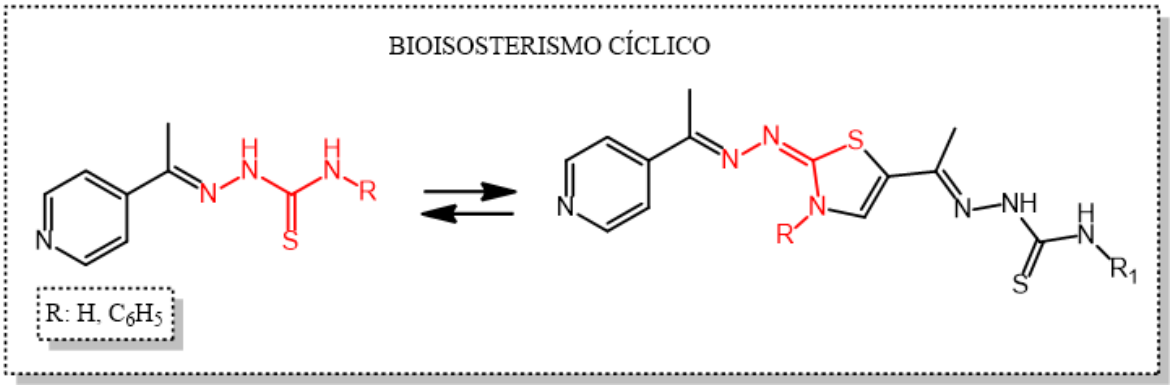


Fonte: Silva, 2014 (Adaptado)

A partir disso foi construído a inédita série D.S de piridil-1,3-tiazóis, a fim desenvolver compostos com potente atividade tripanocida. Embasado na hibridação molecular do núcleo piridina A com o núcleo tiazol B, esboçado com base no bioisosterismo cíclico não clássico das tiossemicarbazonas como mostra a **figura 14**, classe relevante potencial tripanocida. Além disso, decidiu-se inserir substituintes na posição N^3 , pois em trabalhos recentes foi possível observar que a inserção de

subtitutos nessa posição foi favorável para a atividade antiparasitária (SILVA, 2014).

Figura 14 - Concepção dos novos derivados piridil-1,3-tiazóis



Fonte: Autoria própria (2023)

7 METODOLOGIA

7.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os solventes utilizados para as reações foram: etanol, isopropanol, tolueno, hexano, acetato de etíla e DMF, adquiridos das marcas Dinâmicas, Química Moderna ou Cinética Química Ltda. Em relação aos reagentes utilizados, foram eles: 4-Acetilpiridina, tiossemicarbazida, 4-Metil-tiossemicarbazida, 4-Etil-tiossemicarbazida, 4-Fenil-tiossemicarbazida, 3-Cloro-2,4-pentanodiona, ácído sulfúrico, obtidos das marcas Sigma-Aldrich, Química Moderna, Cinética Química Ltda ou Petroquímicos.

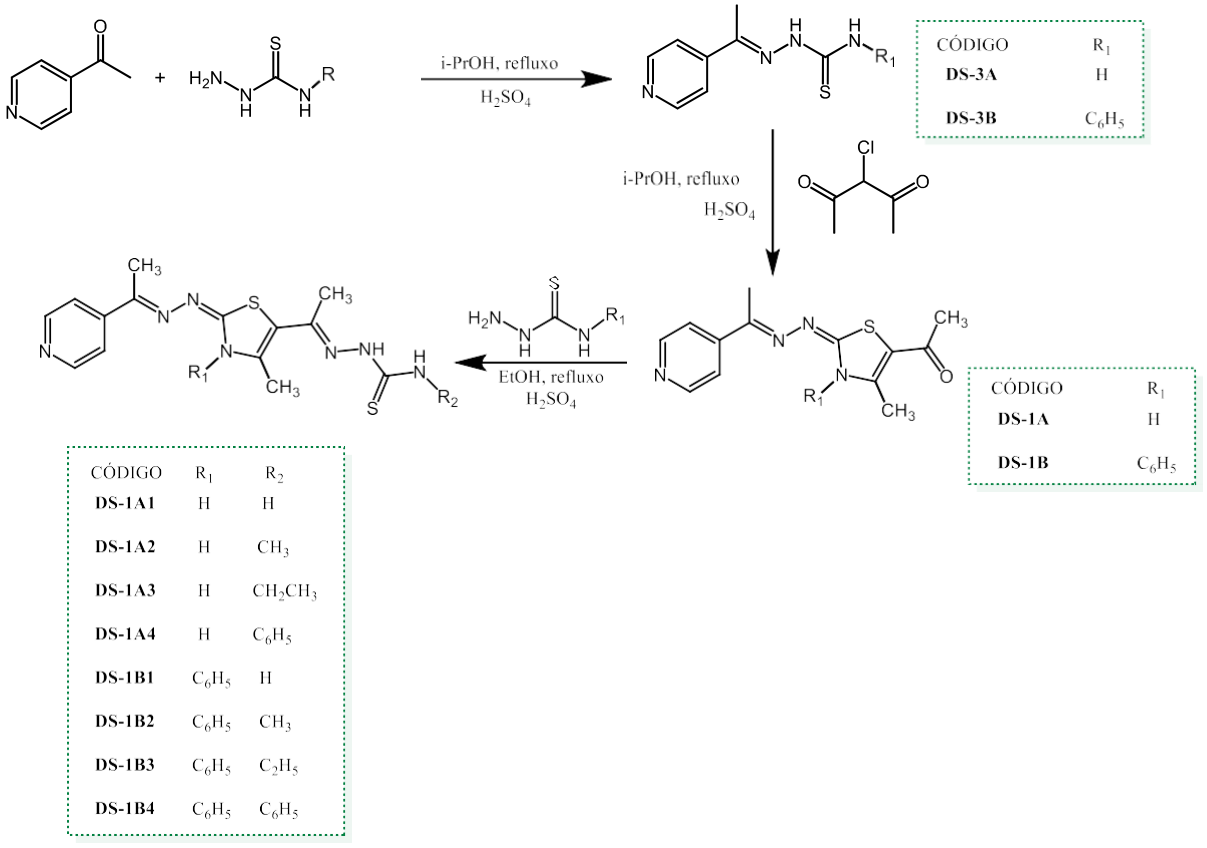
As reações foram acompanhadas por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), usando como fase estacionária sílica-gel 60 da marca Alugram® com indicador fluorescente F254. As placas foram visualizadas por meio de uma câmara de radiação ultravioleta da marca Viber Lourmat (com duplo comprimento de onda 365 ou 254 nm). Os pontos de fusão foram medidas através do aparelho fusiômetro da marca Fisatom, modelo 430D.

As estruturas químicas das moléculas obtidas foram determinadas pela ressonância magnética nuclear (RMN ^{13}C e ^{1}H) da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE. Utilizando espectrômetro VARIAN UNMRS 400MHz, o padrão utilizado foi o tetrametilsilano e como solvente foi utilizado o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d6).

7.2 ROTA SINTÉTICA

A síntese foi realizada em três etapas. Após a obtenção dos produtos, a elucidação estrutural foi realizada por RMN ^{1}H e ^{13}C.

Esquema 1 - Rota sintética da série A



Fonte: Autoria própria (2023)

7.3 SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO 1 (DS-3A)

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, adicionou-se 0,9 g de tiossemicarbazida, em seguida para solubilizar a mesma foi adicionado aproximadamente 20 mL de isopropanol, depois adicionou-se 1,2g (0,01 mol) da 4-acetilpiridina. A mistura reacional foi levada para agitação magnética, posteriormente foram adicionadas 7 gotas de ácido sulfúrico. A reação ocorreu em refluxo com temperatura de 80 ºC, a mesma foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD), a mistura de Acetato de Etila/Hexano na proporção 7:3 foi utilizada como fase móvel. A reação teve duração de 5 horas, após o término, o balão foi levado à geladeira onde permaneceu até o dia seguinte, ocorrendo a precipitação

de um produto branco, que foi filtrado em funil sinterizado. Por fim, o produto foi levado ao dessecador a vácuo onde ficou por 24 horas, e posteriormente foi pesado para obtenção dos dados de rendimento.

7.4 SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO 2 (DS-1A)

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, adicionou-se 1,9g (0,01mol) o intermediário 1, solubilizou-se com 20 mL de isopropanol, em seguida adicionou-se 1,346g de 3-cloro-2,4 pentanodiona. Após agitação e aquecimento por cerca de 20 minutos, foram adicionadas 5 gotas de ácido sulfúrico. A mistura reacional foi submetida à agitação magnética em refluxo a 80 ºC durante 5 horas. A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD), utilizando como fase móvel a mistura de Acetato de Etila/Hexano na proporção de 7:3. Após término da reação a mesma foi levada à geladeira até o dia seguinte, formando um precipitado de cor amarela, em seguida o produto foi filtrado em funil sinterizado e levado ao dessecador a vácuo onde permaneceu por 24 horas, por fim o produto foi pesado para obtenção dos dados de rendimento.

7.5 SÍNTESE DOS COMPOSTOS (DS-1A1 ‑ DS-1B4)

Em balão de fundo redondo de 100 mL, adicionou-se o 0,4g (0,0015 mol) do intermediário 2, e uma das tiossemicarbazidas (Tiossemicarbazida, 4-metil-tiossemicarbazida, 4-etil-tiossemicarbazida, 4-fenil-tiossemicarbazida), em seguida solubilizou-se os compostos em 15ml de etanol. A mistura reacional foi submetida a agitação magnética e aquecimento por cerca de 20 minutos, em seguida foi adicionado 5 gotas de ácido sulfúrico. A reação foi mantida em agitação magnética em refluxo a 75ºC durante 5 horas, a mesma foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada (CCD), utilizando como fase móvel a mistura de Acetato de etila/Hexano na proporção de 7:3. Após término da reação, o balão foi levado à geladeira até o dia seguinte, formando precipitado de cor vermelha que foi filtrado em funil sinterizado e levado ao dessecador onde permaneceu por 24 horas, em seguida o produto final foi pesado para obtenção dos dados de rendimento.

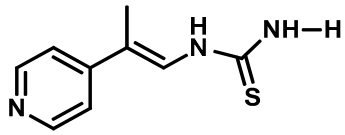
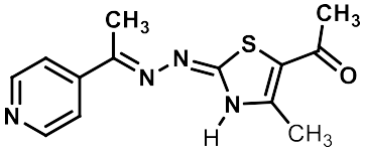
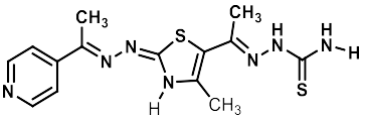
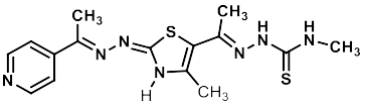
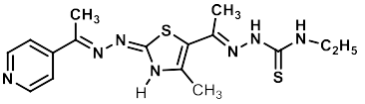
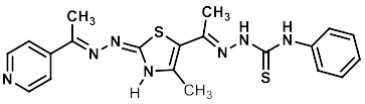
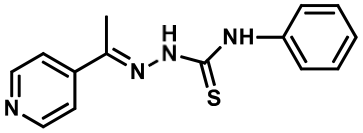
7.6 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

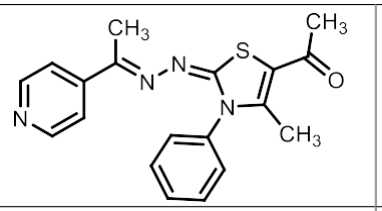
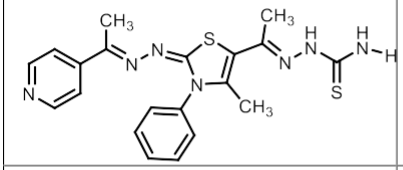
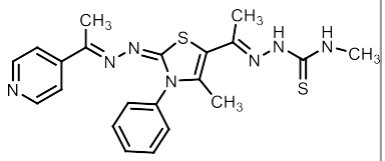
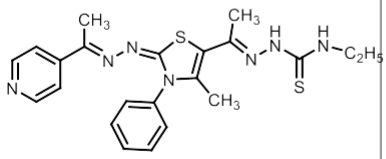
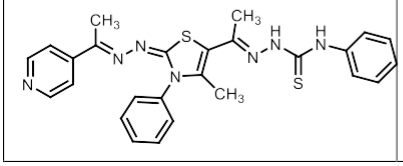
A estrutura química das moléculas foi verificadas através da realização de análises espectroscópicas dos compostos finais (RMN ^{13}C e ^{1}H). Também foram vistos o fator de retenção (RF) em CCD e o ponto de fusão (PF) das moléculas sintetizadas.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os derivados da série DS foram obtidos em forma de sólidos. **Na tabela 1**, estão expostas as principais propriedades dos derivados desta série, como: estrutura molecular, rendimento, ponto de fusão e fator de retenção. Os rendimentos obtidos para cada produto final se apresentaram na faixa de 20,13% e 93,53%.

Tabela 1- Características gerais dos compostos finais e rendimento das reações

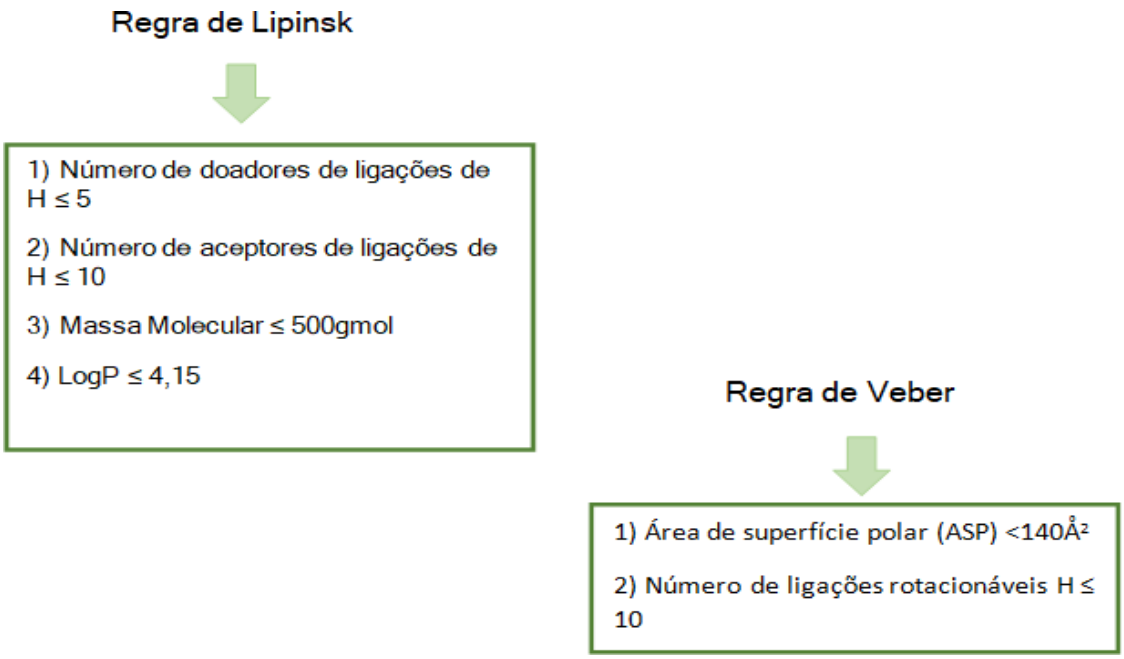
Estrutura Molecular	Referência	Rendimento	Massa	Ponto de Fusão	RF
	DS-3ª	76,98%	194,26g/mol	240ºc	0,56
	DS-1ª	83,62%	274,34g/mol	285ºc	0,46
	DS-1A1	64,57%	349,48g/mol	224ºc	0,58
	DS-1A2	78,75%	361,49g/mol	214ºc	0,59
	DS-1A3	67,65%	375,51g/mol	220ºc	0,63
	DS-1A4	75,59%	423,56g/mol	235ºc	0,51
	DS-3B	93,53%	270,35g/mol	200ºc	0,58

	DS-1B	83,78%	350,44g/mol	287ºc	0,59
	DS-1B1	41,56%	423,56g/mol	208ºc	0,51
	DS-1B2	20,13¨%	437,58g/mol	198ºc	0,48
	DS-1B3	32,68%	451,61g/mol	191ºc	0,44
	DS-1B4	32,63%	499,65g/mol	222ºc	0,58

Fonte: Autoria própria (2023)

As estruturas das moléculas planejadas foram antecipadamente analisadas por meio da Regra dos 5 de Linpinsk *et al*., (1997), que refere-se a abordagens experimentais e computacionais para estimar a solubilidade e a permeabilidade das configurações de fármacos que estão em fase de desenvolvimento. Outra regra aplicada é a Regra do 5 (Rule of 5) que considera que candidatos bioativos têm que apresentar quatro particularidades físico-químicas que são observados com frequência em fármacos ativos por via oral já existentes. Demais críterios observados nos compostos foram os parâmetros de Veber *et al., (*2002), que utilizou a referência complementar a Área Polar (ASP) e o número de ligações rotaveis, afim de estudar a absorção por via oral desses protótipos a fármacos.

Figura 15 - Parâmetros propostos por Lipinski et al. (1997) e Veber et al. (2002).



Fonte: Autoria própria (2023)

Na **tabela 2**, é possível observar que os compostos DS-1A1, DS-1A2, DS-1A3, DS-1A4 e DS-1B1 apresentam área de superfície polar (ASP) acima do limite esperado. Porém, de modo geral todas as moléculas foram satisfatórias quanto a regra de Lipinsk e Veber, tendo em vista que a transgressão de um único parâmetro não desqualifica a molécula.

Tabela 2 - Análise dos critérios da regra de Lipinsk e Veber obtidos no SwissADME (http://swissadme.ch/).

Composto	H_A ≤10	H_D ≤5	MLog*P* ≤4,15	Massa ≤500 g/mol	Ligações Rotáveis ≤10	ASP $_2$ <140Å
DS-3A	2	2	-0,14	194,26	3	95,39
DS-1A	4	1	3,13	274,34	3	98,71
DS-1A1	4	3	3,13	349,48	5	157,44
DS-1A2	4	3	3,13	361,49	6	150,15
DS-1A3	4	3	3,13	375,51	7	150,15
DS-1A4	4	3	3,13	423,56	7	150,15
DS-3B	2	2	1,62	270,35	5	81,40
DS-1B	4	0	3,13	350,44	4	87,85
DS-1B1	4	2	3,13	423,56	6	153,28
DS-1B2	4	2	3,13	437,58	7	139,29
DS-1B3	4	2	3,13	451,61	8	139,29
DS-1B4	4	2	3,13	499,65	8	139,29

Fonte: Autoria própria (2023)

Legenda: H_A = Aceptores de ligação de hidrogênio.
H_D = Doadores de ligação de hidrogênio
ASP = Área de superfície polar

Na **tabela 3**, observa-se que todos os doze compostos contam com uma alta absorção gastrointestinal, dez deles atravessam a barreira hematoencefálica, dois deles apresentam uma biodisponibilidade de 0,55, e os demais de 0,85.

Tabela 3 - Propriedades ADME obtidas no SwissADME (http://swissadme.ch/).

Composto	Absorção gastrointestinal	Barreira hematoencefálica	Biodisponibilidade
DS-3A	Alta	Não	0,55
DS-1A	Alta	Alto	0,85
DS-1A1	Alta	Sim	0,85
DS-1A2	Alta	Sim	0,85
DS-1A3	Alta	Sim	0,85
DS-1A4	Alta	Sim	0,85
DS-3B	Alta	Não	0,55
DS-1B	Alta	Sim	0,85
DS-1B1	Alta	Sim	0,85
DS-1B2	Alta	Sim	0,85
DS-1B3	Alta	Sim	0,85
DS-1B4	Alta	Sim	0,85

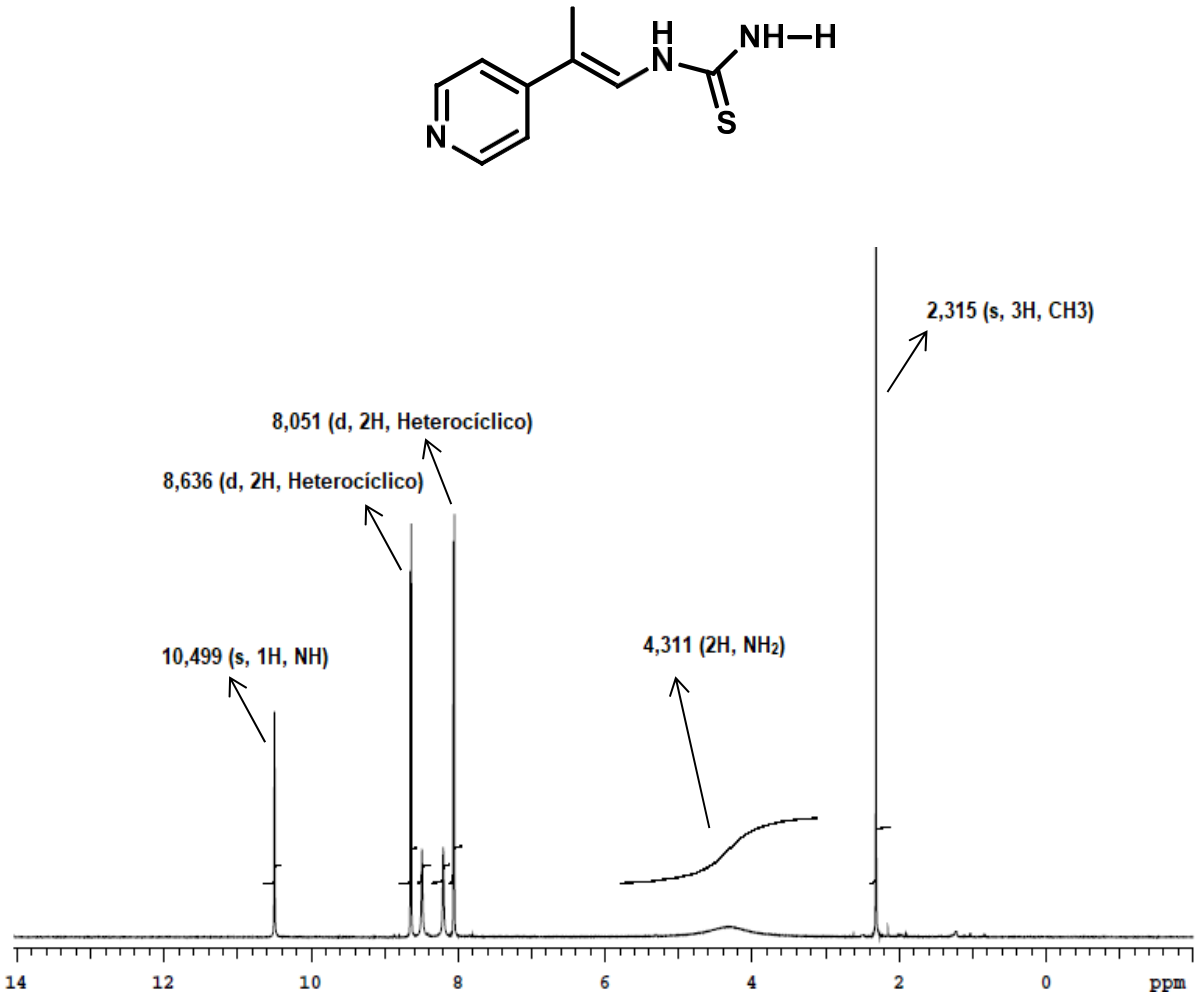
Fonte: Autoria própria (2023)

8.1 DADOS ESPECTROSCÓPICOS

Os dados espectroscópicos obtidos confirmaram as estruturas químicas das moléculas, sendo assim a formação dos produtos planejados foi comprovada. Conforme os espectros apresentados abaixo, é possível visualizar o processo de caracterização por RMN ^{1}H e ^{13}C das moléculas DS-3A, DS-1A, DS-1A3.

A **figura 16** apresenta o RMN de ^{1}H do compostos DS-3ª. No pico 2.315 ppm encontramos um singleto com integração para 3 hidrogênios, em 4.311 ppm encontramos dois hidrogênios do grupo NH_2, em 10.499 encontramos um singleto integrado para 1 hidrogênio de NH, continuando em 8.051 podemos observar um dupleto e por fim em 8.636 outro dupleto correspondente 2 hidrogênios do heterociclo.

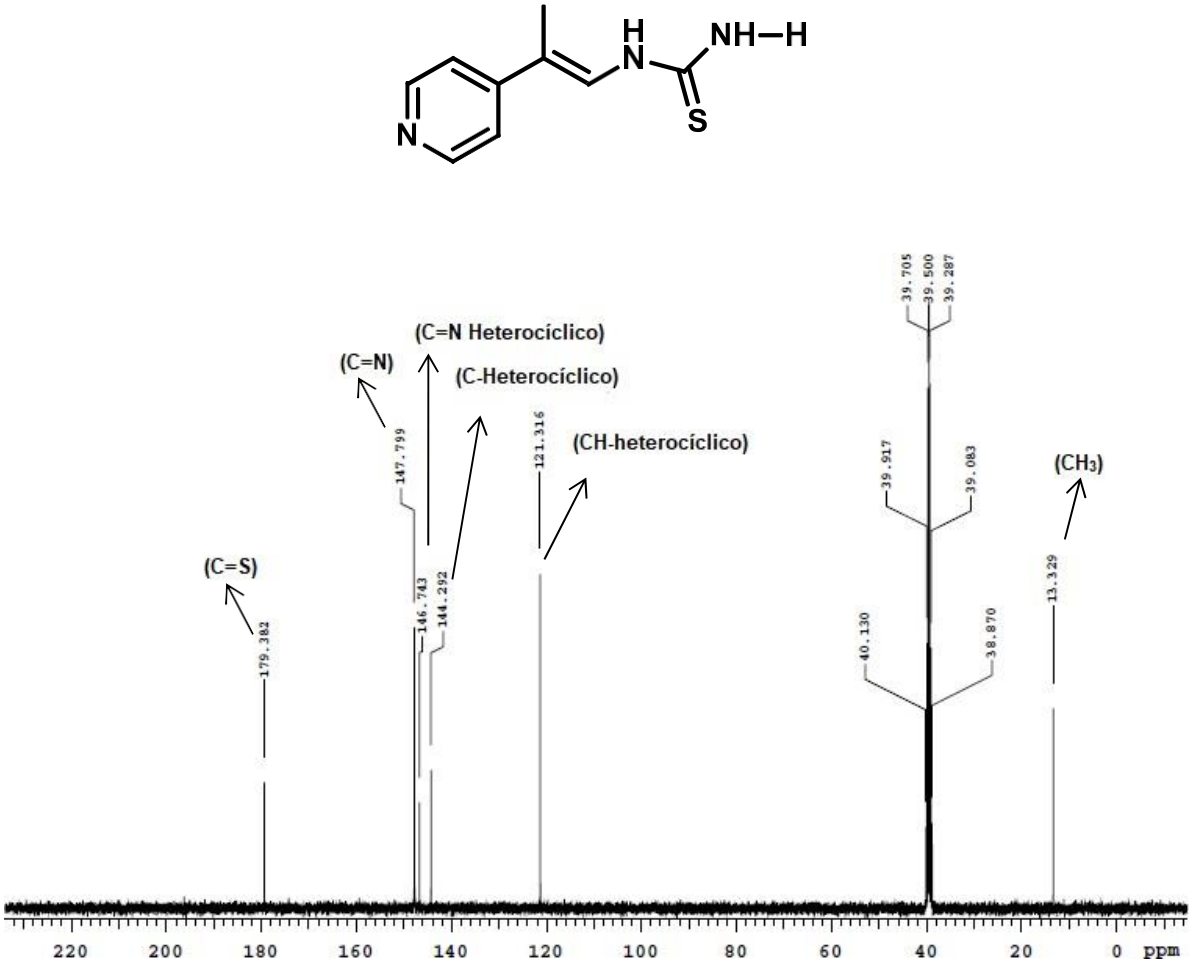
Figura 16 - Espectro ^{1}H da molécula DS-3A



Fonte: Autoria própria (2023)

Dando continuidade a caracterização do composto DS-3A, na **figura 17** podemos observar no RMN ^{13}C todos os sinais referentes aos átomos de carbono quimicamente diferentes. Em 13.329 ppm podemos observar um sinal do grupo CH_3 presente no compostos, em 121.316 ppm podemos observar o carbono do C=C, em 144.292 ppm podemos observar o sinal referente a carbono do anel aromático, em 146.743 ppm o carbono C-N do anel piridina e por fim em 179.382 ppm podemos observar o sinal referente ao carbono C=S.

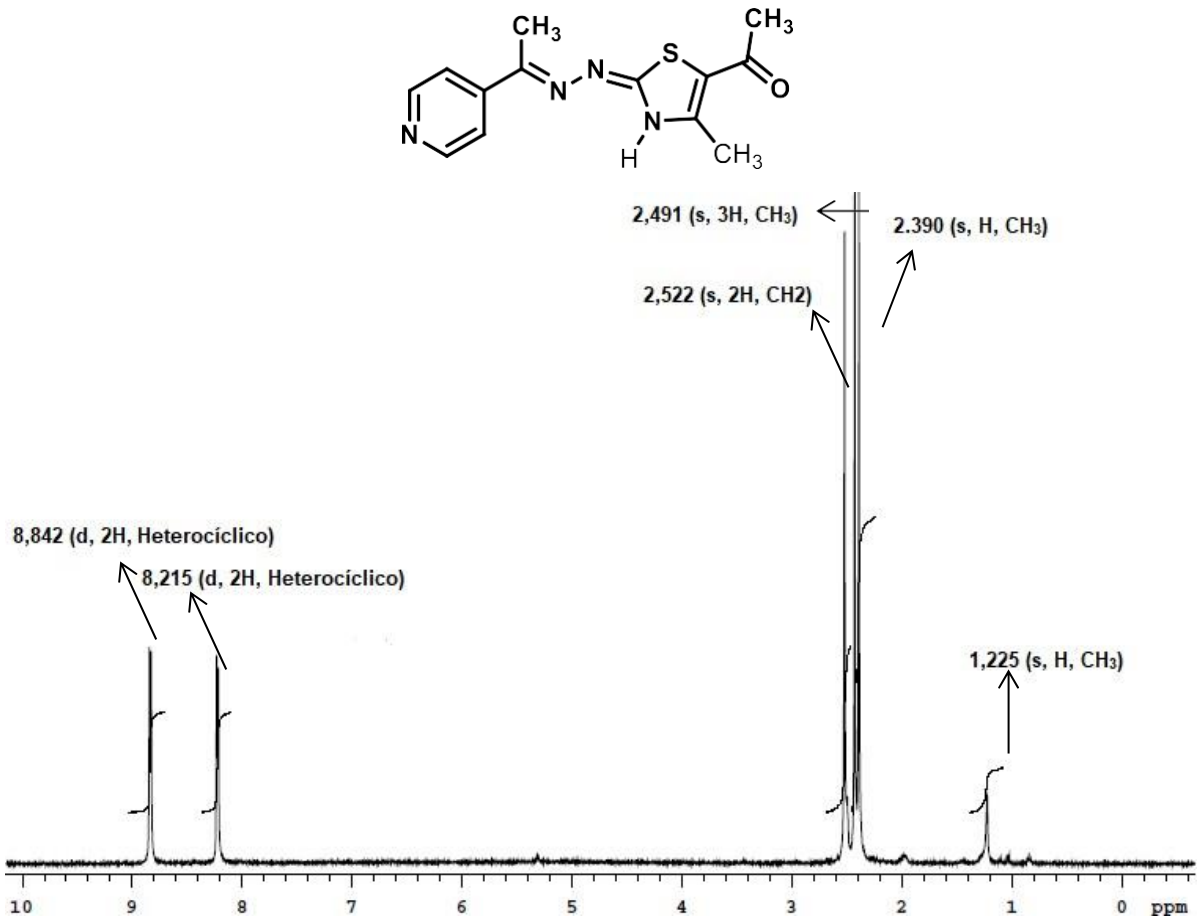
Figura 17 - Espectro C^{13} da molécula DS-3A



Fonte: Autoria própria (2023)

Na **figura 18,** podemos observar o espectro de RMN ^{1}H obtido para compostos DS-1A, onde foi constatado a presença de um simpleto em 2.390 ppm integrando para três hidrogênios, referentes aos prótons da metila do tiazol, em 2.492 ppm podemos observar outro singleto correspondente a metila ligada ao carbono da carbonila, em 2.552 ppm podemos observar um sinal referente a metila ligada ao C=N. Em 8.232 ppm encontramos 1 dupleto referente aos hidrogênios da piridina, por fim em 8.842 ppm também referentes a 2 hidrogênios da piridina.

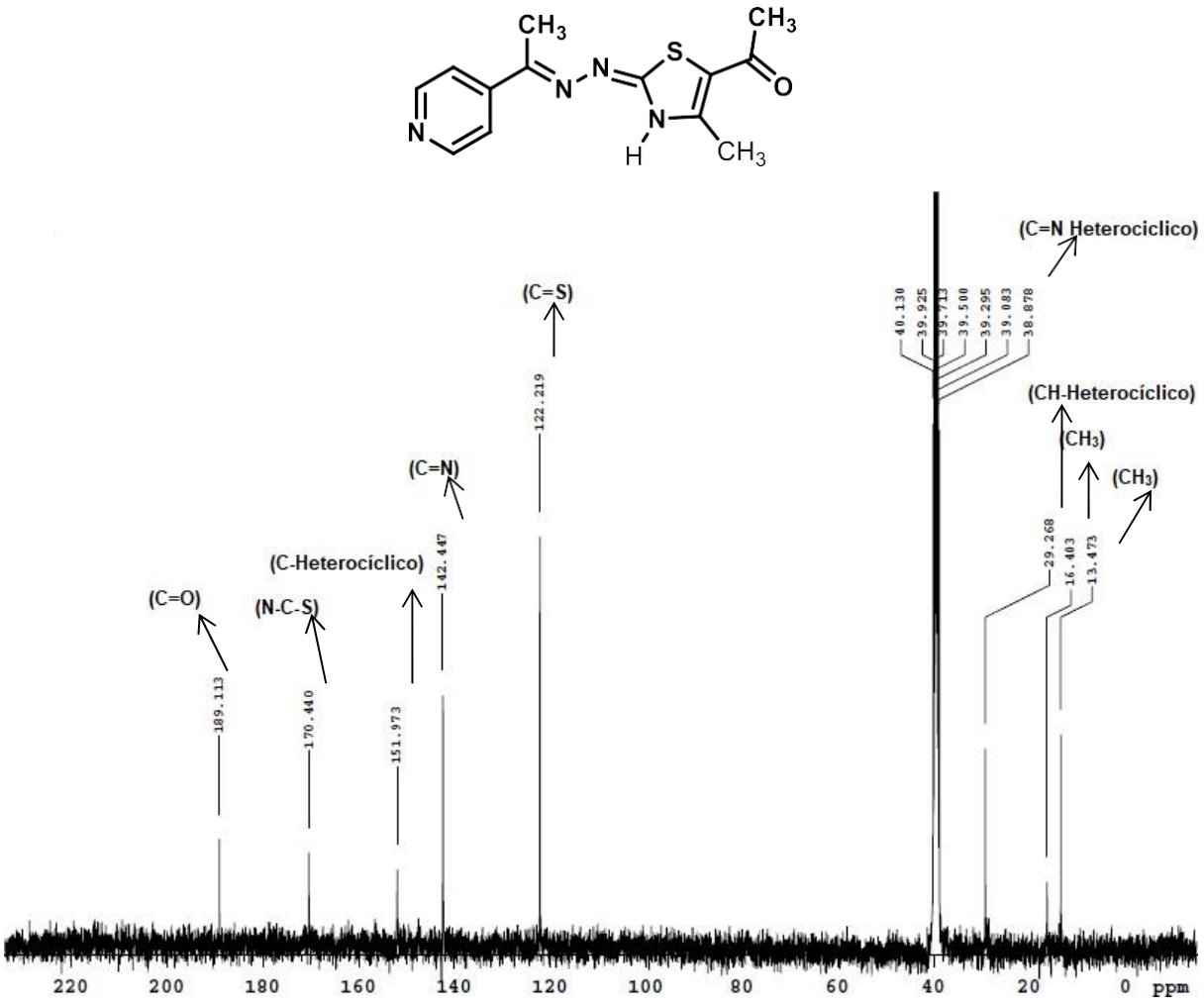
Figura 18 - Espectro ^{1}H da molécula DS-1A



Fonte: Autoria própria (2023)

Continuando a carcterização do compostos DS-1A, podemos observar na **figura 19**, o espectro de ^{13}C do composto citado, em 13.403 ppm podemos observar um sinal referente ao CH_3 ligada ao carbono C=N, em 16.043 ppm podemos observar um sinal referente ao CH_3 ligada ao anel tiazol, em 29.260 ppm observamos um sinal referente ao CH_3 ligado ao carbono da carbonila. Em 38.878 ppm podemos observar um sinal referente ao carbono da ligação C=N, em 122.219 ppm podemos observar um sinal referente a ligação C-S, entre 142.447 ppm e 151.973 ppm podemos observar os carbonos referentes aos carbonos do anel piridina, em 170.440 ppm podemos observa rum sinal referente ao carbono da ligação N-C-S, por fim em 199.113 ppm podemos observar um sinal referente ao carbono da ligação C=O.

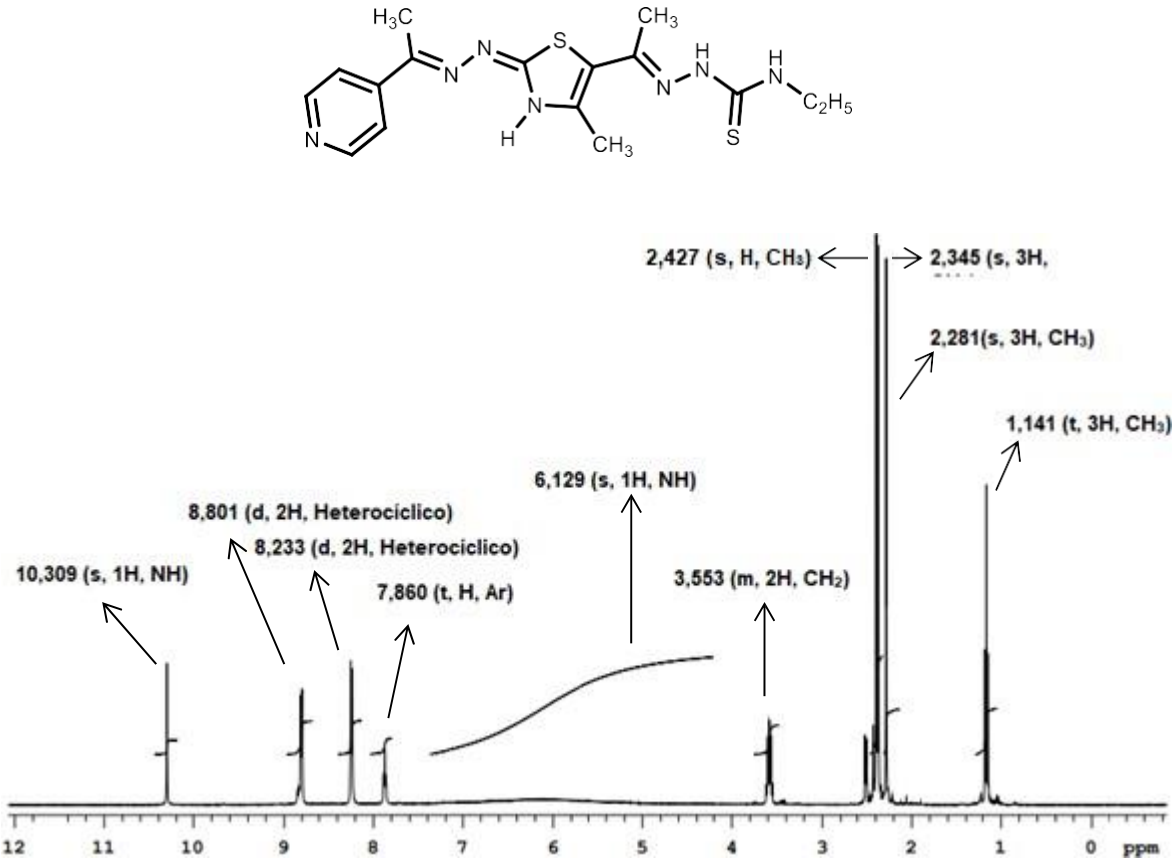
Figura 19 - Espectro C^{13} da molécula DS-1A



Fonte: Autoria própria (2023)

Na **figura 20** podemos observar os singletos em 10,309 ppm e 6,129 ppm, integrando para um hidrogênio cada, referem-se aos hidrogênios N-H. Os dois dupletos em 8,801 ppm e 8,233 ppm, integrando para dois hidrogênios cada, compreendem os hidrogênios do anel piridínico. O tripleto em 7,860 ppm, integrando para um hidrogênio corresponde ao hidrogênio do anel tiazólico. O multipleto em 3,553 ppm, integrando para dois hidrogênios, é relativo aos hidrogênios metilênicos. Os singletos em 2,345 ppm e 2,281 ppm, integrando para dois hidrogênios cada, equivalem aos hidrogênios metílicos. O tripleto em 1,141 ppm, integrando para três hidrogênios, representam os hidrogênios metílicos.

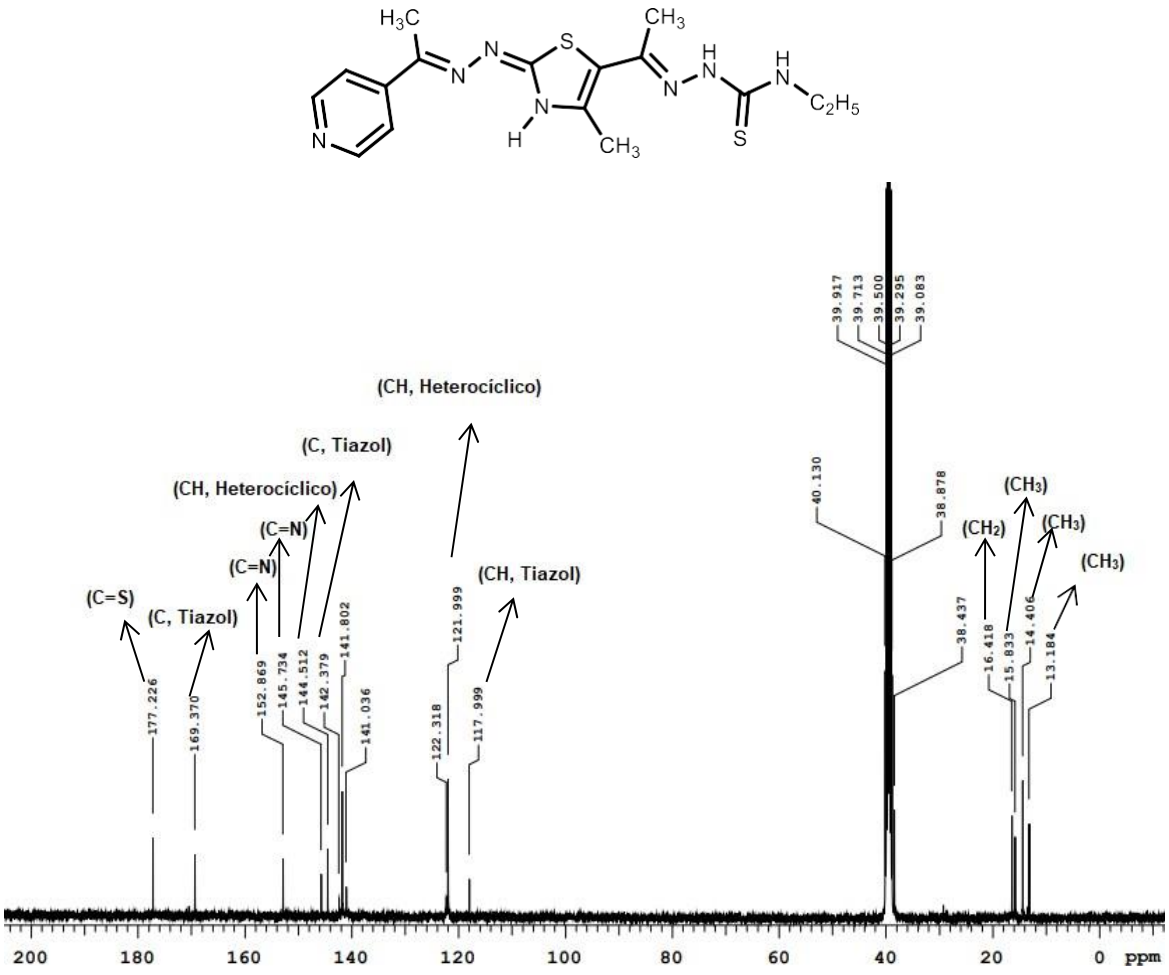
Figura 20 - Espectro ¹H da molécula DS-1A3



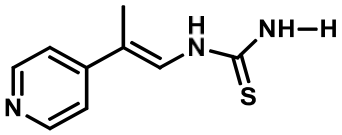
Fonte: Autoria própria (2023)

Já na **figura 21** é possível observar sinal em 177,226 ppm, refere-se ao carbono tioamídico. Os sinais em 169,370, 142,375 e 117,999 ppm, são carbonos relativos ao anel tiazólico. Os sinais em 152,869 e 145,734 ppm, correspondem aos carbonos imínicos. Os sinais em 144,312 e 122,318 ppm, compreendem aos carbonos piridínicos. O sinal em 16,418 ppm equivale ao carbono metilénico. Os sinais em 15,833 ppm, 14,406 ppm e 13,184 ppm, representam aos carbonos metílicos.

Figura 21 - Espectro ^{13}C da molécula DS-1A3



1- (E)-2-(1-(pyridin-4-yl)ethylidene)hydrazine-1-carbothioamide (DS-3A)



Fórmula Molecular: $C_9H_{11}N_3S$

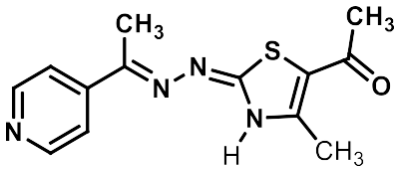
Massa Molar: 194,26g/mol

,

RMN ^1H (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 8,636 (d, 2H, Heterocíclico), 8,051 (d, 2H, Heterocíclico), 10,499 (s, 1H, NH), 4,311 (2H, NH_2), 2,315 (s, 3H, CH3)..

RMN ^{13}C (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 179,382 (C=S), 147,799 (C=N), 146,743 (C=N Heterocíclico), 144,292 (C, Heterocíclico), 121,316 (CH-heterocíclico), 13,329 (CH_3).

2-(*E*)-1-(2-(2-(1-(pyridin-4-yl)ethylidene)hydrazineyl)thiazol-5-yl)ethan-1-one(DS-1a)



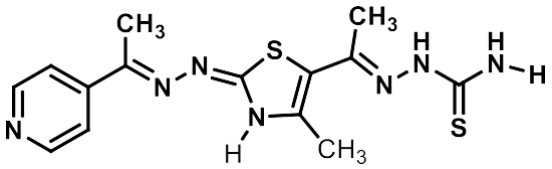
Fórmula Molecular: $C_{13}H_{14}N_4OS$

Massa Molar: 274,34g/mol

RMN ^{1}H (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 8,842 (d, 2H, Heterocíclico), 8,215 (d, 2H, Heterocíclico), 2,522 (s, 2H, CH2), 2,491 (s, 3H, CH_3), 2.390 (s, H, CH_3), 1,225 (s, H, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 199,113 (C=O), 170,440 (N-C-S), 151,973 (C-Heterocíclico), 142,447 (C=N), 122,219 (C=S), 38,878 (C=N heterociclico), 29,268 (CH-Heterocíclico), 16.403 (CH_3), 13,403 (CH_3).

3-(*E)*-2-(1-(2-2-((*E*)-1-(pyridin-4-yl)ethylidene)hydrazineyl)thiazol-5-yl)ethylidene)hydrazine-1-carbothioamide (DS-1a1)



Fórmula Molecular: $C_{14}H_{19}N_7S_2$

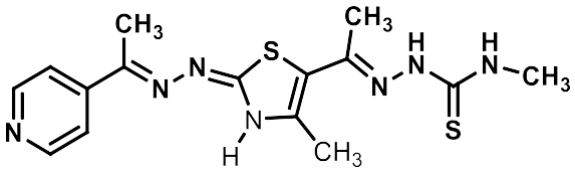
Massa Molar: 349,48g/mol

RMN ^{1}H (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 10,375 (s, 2H, NH2), 8,799 (d, 2H, Heterocíclico), 8,234, (d, 2H, Heterocíclico), 7,265 (s, 1H, NH), 5,299 (s, H, NH), 3,409 (t, 2H, NH_2), 2.431(s,2H, CH2-tiazol), 2.392 (s, 3H, CH_3) 2.291 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 178,304 (C=S), 169,416 (N=C-S), 152,076 (C=N), 145,954 (C=N exocíclico), 122,007 (C-tiazol), 117,915 (CH-tiazol), 144,884 (C-C=C, Heterocíclico),141,893 (CH-Heterocíclico), 141,142, (CH-Heterocíclico), 16,258

(CH_3), 15,841 (CH_3).

4- (*E*)-*N*-methyl-2-(1-(2-(2-((*E*)-1-1(pyridin-4-yl)ethylidene)hydrazineyl)thiazol-5-yl)ethylidene)hydrazine-1-carbothioamide (DS-1A2)



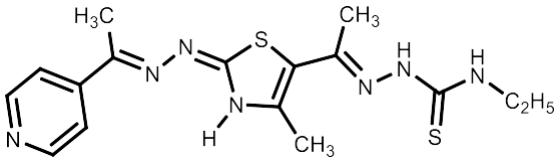
Fórmula Molecular: $C_{14}H_{17}N_7S_2$

Massa Molar: 347,46g/mol

RMN ^{1}H (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 10,325 (s, 2H, NH2), 8,807 (d, 2H, Heterocíclico), 8,249 (d, 2H, Heterocíclico), 7,890 (s, H, tiazol), 5,313 (s, H, NH), 2,391 (d, 3H, CH_3), 2,369 (s, 3H, CH_3), 2,284 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 178,243 (C=S), 169,499 (N=C-S),152,930 (C=N), 145,764 (C=N), 144,709 (CH-Heterocíclico), 141,741 (CH-Heterocíclico), 140,929 (C=C-S), 122,052 (=C-tiazol), 117,999 (=C-tiazol), 31,173 (CH_3), 16,342 (CH_3), 15,803 (CH_3).

5-(E)-N-etil-2-(1-(2-(2-((E)-1-(piridin-4-il)etilideno)hidrazinail)tiazol-5-il)etilideno)hidrazinail)tiazol-5-il)etilideno)hidrazina-1-carbotioamida DS1A3:



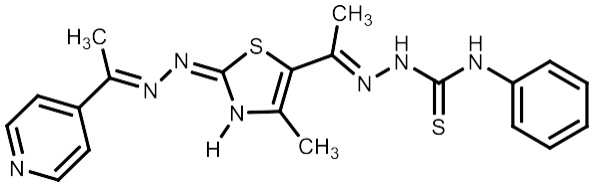
Fórmula Molecular: $C_{16}H_{21}N_7S_2$

Massa Molar: 375,51 g/mol

RMN ^{1}H (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 10,309 (s, 1H, NH), 8,801 (d, 2H, Heterocíclico), 8,233 (d, 2H, Heterocíclico), 7,860 (t, H, Ar), 6,129 (s, 1H, NH), 3,553 (m, 2H, CH_2), 2,345 (s, 3H, CH_3), 2,281(s, 3H, CH_3) 1,141 (t, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 177,226 (C=S), 169,370 (C, Tiazol), 152,869 (C=N), 145, 734 (C=N), 144,512 (CH, Heterocíclico), 142,379 (C, Tiazol), 122,318 (CH, Heterocíclico), 117,999 (CH, Tiazol), 16,418 (CH_2), 15,833 (CH_3), 14,406 (CH_3), 13,184 (CH_3).

6-(E)-N-fenil-2-(1-(2-(2-((E)-1-(piridin-4il)etilideno)hidrazinail)tiazol-5-il)etilideno)hidrazina-1-carbotioamida DS-1A4



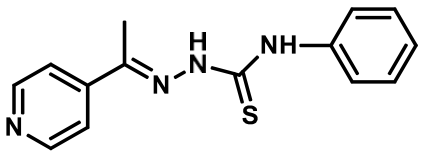
Fórmula Molecular: $C_{20}H_{21}N_7S_2$

Massa Molar: 423,56 g/mol

RMN ^{1}H (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 10,788 (s,1H, NH), 9,602 (s,1H, NH), 8,831 (s,1H, NH), 8,847 (s,1H, NH), 8,776 (d, 2H, Heterocíclico), 8,207 (d, 2H, Heterocíclico), 7,143 (m, 6H, Ar), 5,129 (s, 1H,NH), 1,069 (s, 3H, CH_3), 1,035 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 189,151 (C=S), 175,875 (C, Tiazol), 170,501 (C=N), 152,717 (C=N), 145,992 (CH, Heterocíclico), 142,508 (C, Heterocíclico), 138,925 (C, Ar), 128,261 (CH, Ar), 124,193 (CH, Ar), 122,272 (CH, Heterocíclico), 117,786 (CH, Tiazol), 16,114 (CH_3), 13,268 (CH_3).

7-(E)-N-phenyl-2-(1-(pyridin-4-yl)ethylidene)hydrazine-1-carbothioamide(DS-3B)



Fórmula Molecular: $C_{14}H_{14}N_4S$

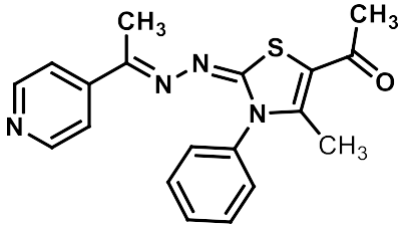
Massa Molar: 270,35g/mol

RMN ^{1}H (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 10,788 (s,1H, NH), 9,602 (s,1H, NH), 8,831 (s,1H, NH), 8,847 (s,1H, NH), 8,776 (d, 2H, Heterocíclico), 8,207 (d, 2H, Heterocíclico),

7,143 (m, 6H, Ar), 5,129 (s, 1H,NH), 1,069 (s, 3H, CH_3), 1,035 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 189,151 (C=S), 175,875 (C, Tiazol), 170,501 (C=N), 152,717 (C=N), 145,992 (CH, Heterocíclico), 142,508 (C, Heterocíclico), 138,925 (C, Ar), 128,261 (CH, Ar), 124,193 (CH, Ar), 122,272 (CH, Heterocíclico), 117,786 (CH, Tiazol), 16,114 (CH_3), 13,268 (CH_3).

8-1-((*E*)-3-phenyl-2-(((*E*)-1-(pyridin-4-yl)ethylidene)hydrazineylidene)-2,3-dihydrothiazol-5-yl)ethan-1-one (DS-1B)



Fórmula Molecular: $C_{19}H_{18}N_4OS$

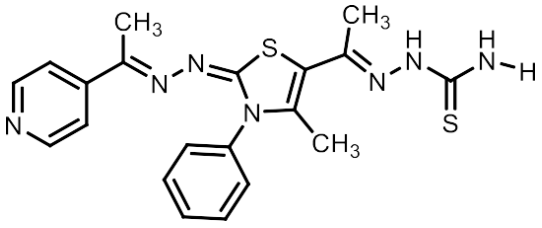
Massa Molar: 350,44g/mol

RMN ^{1}H (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 8,855 (d, 2H, Heterocíclico), 8,261(d, 2H, Heterocíclico), 7,645 (m, 5H, Ar), 4,582 (s, H, tiazol), 2,269 (s, CH_3), 2,139 (s, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 177,378 (C=O), 170,972 (N=C-S), 152,816 (CH, piridina) 150,903 (C-Ar), 143,700 (C=N, tiazol), 141,924 (C, Heterocíclico), 136,876 (CH-Ar), 129,756 (CH-Ar), 128,496 (CH, Heterocíclico), 122,174 (CH-Ar), 115,570 (C-S, tiazol), 14,209 (CH_3), 13,260 (CH_3).

9-(E)-2-(1-((E)-3-fenil-2-(((E)-1-(piridin-4-il)etilideno)hidrazina)-2,3-dihidrotiazol-5-il) etilideno)hidrazina-1-carbotioamida (DS-1B1)

DS-1B1



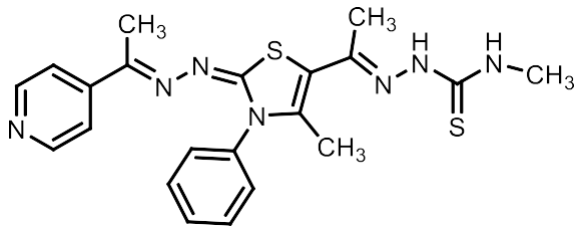
Fórmula Molecular: $C_{20}H_{21}N_7S_2$

Massa Molar: 423,56g/mol

RMN ^{1}H (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 10,484 (s, H, NH), 8,807 (d, 2H, piridina), 8,335 (s,2H,NH_2), 8,229 (d, 2H, piridina), 7,624 (m, 5H, Ar), 7,363 (s, H, tiazol), 2,334 (s, CH_3), 2,124 (s, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 178,516 (C=S), 170,767 (N=C-S, tiazol), 152,626 (C=N), 151,062 (C, piridina), 144,117 (C, tiazol), 142,121 (=C-N), 137,134 (C-Ar), 136,284 (C-Ar), 129,559 (C-Ar), 129,504 (C-Ar), 128,502 (C, piridina) 122,128 (C=N), 115,562 (C, tiazol), 16,767 (CH_3), 13,260 (CH_3).

10-(E)-N-metil-2-(1-((E)-3-fenil-2-(((E)-1-(piridin-4-il)etilideno)hidrazinailideno)-2,3-dihidrotiazol-5-il)etilideno)hidrazina-1-carbotioamida) DS-1B2



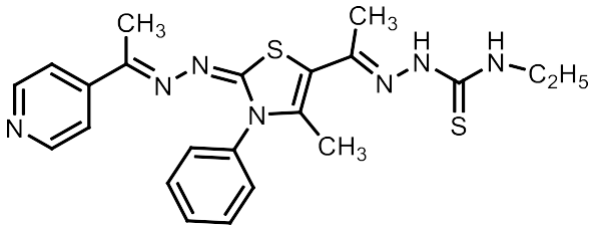
Fórmula Molecular: $C_{21}H_{23}N_7S_2$

Massa Molar: 437,58g/mol

RMN ^{1}H (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 10,445 (s, H, NH), 8,818 (d, 2H,Heterocíclico), 8,241 (d, 2H, Heterocíclico), 8,005 (s, H, tiazol), 7,621 (m, 5H, Ar), 8,211 (s, H, NH), 3,060 (d, 3H, CH_3), 2,330 (s, CH_3), 2,131 (s, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 178,372 (C=S), 170,919 (N=C-S), 152,918 (C=N), 150,918 (C, Heterocíclico), 143,867 (C, tiazol), 142,083 (=C-N), 136,853 (C-Ar), 136,292 (C-Ar), 129,567 (C-Ar), 129,278 (C-Ar), 128,489 (C, Heterocíclico), 128,489 (C=N), 31,211 (CH_3), 14,549 (s, CH_3), 13,245 (CH_3).

11-(E)-N-etil-2-1(1-((E)-3-fenil-2-(((E)-1-(piridin-4-il)etilideno)hidrazinailideno)-2,3-dihidrotiazol -5-il)etilideno)hidrazina-1-carbotioamida (DS-1B3)



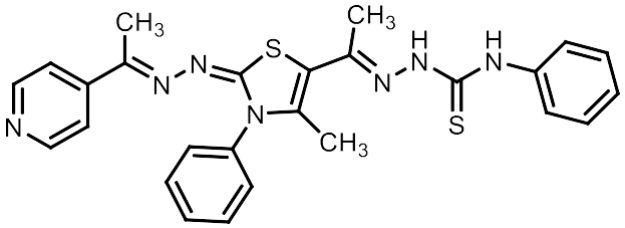
Fórmula Molecular: $C_{22}H_{25}N_7S_2$

Massa Molar: 451,61g/mol

RMN ^{1}H (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 10,418 (s, H, NH), 8,795 (d, 2H, Heterocíclico), 8,219 (d, 2H, Heterocíclico), 7,961 (t, 1H, Ar), 7,424 (m, 5H, Ar), 10,437 (s, 1H, NH), 3,714 (m, 2H, CH_2), 1,147 (t, 3H, CH_3), 1,097 (s, 3H, CH_3), 1,000 (s, 3H, CH_3),

RMN ^{13}C (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 177,378 (C=S), 170, 972 (C, Tiazol), 152,816 (C=N), 149,734 (C=N), 150,903 (CH, Heterocíclico), 143,700 (C-Ar), 141,924 (CH, Tiazol), 136,876 (C, Heterocíclico),129,756 (CH- Ar), 129,324 (CH, Heterocíclico), 128,496 (CH- Ar), 122,174 (CH- Ar), 115,570 (C, Tiazol), 16,866 (CH_2), 14,384 (CH_3), 14,209 (CH_3), 13,260 (CH_3).

12-(E)-N-fenil-2-(1-((E)-3-fenil-2-(((E)-1-(piridin-4-il)etilideno)hidrazinailideno)-2,3-dihidrotiazol- 5-il)etilideno)hidrazina-1-carbotioamida (DS-1B4)



Fórmula Molecular: $C_{26}H_{25}N_7S_2$

Massa Molar: 499,65g/mol

RMN ^{1}H (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 11,290 (s, 1H, NH), 11,320 (s, H, NH), 8,660 (d, 2H, Heterocíclico), 7,740 (d, 2H, Heterocíclico), 9,350 (s, 1H. Tiazol), 7,090(m, 10H, Ar), 2,950 (s, 3H, CH_3), 2,070 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO-d6, 400MHz) δ ppm: 189,226 (C=S), 170,364 (C, Tiazol), 153,074 (C=N), 152,148 (C=N), 145,696 (CH, Heterocíclico), 142,599 (C-Ar), 135,715 (CH,

Tiazol), 129,688 (C, Heterocíclico), 129,605 (CH- Ar), 128,876 (C-Ar), 128,504 (C-Ar), 122,379 (C, Heterocíclico), 128,375 (C-Ar), 117,005 (C, Tiazol), 14,687 (CH_3), 13,458 (CH_3).

9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-T.CRUZI DOS PIRIDIL-TIAZOIS

9.1 METODOLOGIA

9.2 ENSAIO TRIPANOCIDA

Foi utilizado o ensaio da beta-galactosidase desenvolvido por Buckner e colaboradores (1996), com modificações (Romanha et al., 2010). Este ensaio utiliza a cepa Tulahuen de T. cruzi que expressa o gene da beta-galactosidase de Escherichia coli. Esta cepa foi construída e gentilmente cedida pelo Prof. Frederick Buckner, da Universidade de Washington. Resumidamente, para a realização dos ensaios, fibroblastos de camundongos da linhagem L929 foram semeados em placas de 96 poços e incubados por 24 horas a 37°C para a adesão e, infecção com 10 parasitas/célula. Após 2 h, o meio contendo os parasitas extracelulares foi substituído por meio novo e a placa novamente incubada a 37°C por 48 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio novo, além de compostos em concentrações decrescentes, a partir de 100 µg/mL, até se chegar ao IC_{50}. Após 96 horas de incubação, foi adicionado o substrato CPRG, a placa incubada a 37°C, e a leitura realizada após 16-20 h em espectrofotômetro utilizando um filtro de 570 nm. O benzonidazol no seu IC_{50} (1 µ/mL = 3,81 µM) foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição do crescimento parasitário.

9.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM COMPOSTO TRIPANOCIDA

Os compostos com atividade tripanocida foram testados contra as células L929 para determinação da citotoxicidade (Romanha et al., 2010). A viabilidade das células submetidas aos tratamentos foi determinada utilizando-se o indicador de viabilidade celular 50 alamarBlue™. As amostras foram testadas em concentrações crescentes a partir da IC_{50} encontrada sobre o parasita, utilizando o mesmo número de células, tempo de desenvolvimento celular e tempo de exposição aos compostos usados no ensaio da betagalactosidase. Após a adição do alamarBlueTM, a placa foi incubada por 6 h e a leitura realizada a 570 e 600

nm. Os resultados foram expressos como a diferença na porcentagem de redução entre células tratadas (CT) e células não tratadas (CNT), através da seguinte equação:

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

9.4 ÍNDICE DE SELETIVIDADE

O Índice de Seletividade (IS) foi calculado dividindo-se a CC_{50} dos compostos sobre as células L929 pela IC_{50} encontrado sobre o *T. cruzi*. Somente compostos que apresentam IS ≥ 50 são recomendados a ensaios *in vivo*.

9.5 ENSAIOS Com Promastigotas De *L. Amazonensis* E *L.INFANTUM*

Formas promastigotas de leishmania amazonensis (cepa whom/00 ltb 0016) e linfantum (cepa mhom/ma/67/itmap-263) foram mantidas a 26° c em meio schneider ' s (sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (meio completo). Parasitas na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos. Para o ensaio de atividade leishmanicida, os parasitas foram contados e diluídas em meio schneider' s (sigma) completo a 1 x 106 células/ml. Os parasitas foram incubados a 26° c na presença de diferentes concentrações dos compostos (1,5 a 200 μ g/ml) por 72h. Parasitas incubados apenas com meio de cultura e com o veículo foram utilizados como controle negativo. Após a incubação, os poços foram lavados e foi adicionada solução de CPRG (500µm, 0,5% de nonidet p-40, em pbs), seguida de nova incubação por 10 minutos, a 22°c. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro thermo scientific multiskan fc. A atividade leishmanicida dos compostos foi verificada pela diminuição no número de promastigotas nas culturas tratadas em comparação com a cultura controle sem tratamento. A miltefosina foi utilizada como controle positivo. Os valores de ic50 foram calculados por análise de regressão utilizando o software graphpad prism. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

9.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM COMPOSTOS ANTI-LEISHMANIA

A citotoxicidade em células de mamíferos foi avaliada através de ensaios com MTT. Esse ensaio baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Cristais de formazan são formados no interior dessas células, que devem ser lisadas para a solubilização e posterior análise por espectrofotometria. Uma vez que a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis, quanto maior for a viabilidade celular, maior será a proporção de redução do MTT e maior será a absorbância. Os fibroblastos da linhagem L929 foram soltos das garrafas de cultura e foram plaqueados em placas de 96 poços, fundo reto e incubadas por 24h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO2, para aderência. Após esse tempo, os compostos foram adicionados nas concentrações de 6,25 a 200 µg/mL e incubados novamente por um período de 48h. Foram utilizados poços apenas com meio de cultura como controle negativo. Após a incubação foi acrescentado 25µL de MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo difenil tetrazólio) a 5mg/mL em PBS, seguida de uma nova incubação por 2h, a 37°C e ao abrigo da luz. Parte do meio de cultura juntamente com o restante de MTT foi aspirado e 100µL de DMSO foi adicionado por poço para solubilização dos cristais de formazan resultantes da redução do MTT. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A concentração citotóxica para 50% da cultura (CC50) foi determinada por análise de regressão pelo software GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

10. RESULTADOS DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

10.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI -*T. CRUZI* DA SÉRIE DS

A **tabela 4**, dispõe os resultados dos testes de atividade da série DS, exibindo a citotoxicidade, IC_{50} e índice de seletividade.

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

Composto	IC_{50} µM	CC_{50} (µM)	IS
DS-3A	303,7	360,3	1,2
DS-1A	48,1	>62,3	>1,3
DS-1A1	227,2	286,1	1,3
DS-1A2	11,1	13,0	1,2
DS-1A3	7,7	211,4	27,4
DS-1A4	25,7	>236,1	>9,2
DS-3B	4,8	17,4	3,6
DS-1B	12,3	45,1	3,7
DS-1B1	4,2	>236,1	>55,6
DS-1B2	6,4	177,8	27,8
DS-1B3	4,4	204,8	46,3
DS-1B4	13,8	105,5	7,6
BZD	**3,8**	**2.381**	**626,58**

Fonte: Autoria própria (2023)
Legenda: **CC_{50}** = Concentração citotóxica para 50% das células;
IC_{50} = Concentração que inibe o crescimento parasitário em 50%.;
IS = Índice de seletividade.

A atividade tripanocida foi realizada frente a forma tripomastigota de *T. cruzi*, para isso, dados de toxicidade, IC_{50} e índice de seletividade foram obtidos no teste. O fármaco benzonidazol foi utilizado como referência nesse experimento.

Na **tabela 4**, é possível identificar que nenhum dos compostos foram mais ativos que o BZD, fármaco de referência. No entanto, valores próximos podem ser observados. O composto DS-1B1 e DS-1B3, apresentam IC_{50} = 4,2 µM e 4,4 µM, respectivamente, quando comparados com o BZD, com IC_{50} 3,8 µM podem ser considerados o destaque desta série.

É possível observar que o núcleo fenil ligado ao nitrogênio do anel tiazol

incrementou na atividade dos compostos da série b. Os compostos com melhor atividade frente a T. *Cruzi,* foram os DS-1B1 e DS-1B3, ambos possuem o mesmo substituinte ligado ao nitrogênio do anel tiazol, o núcleo fenil, porém o DS-1B3 possui um hidrogênio e um grupo etila C_2H_5, ligados a cadeia lateral da tiossemicarbazona, nota-se no composto DS-1B1 que ao substituir esse grupo etila C_2H_5, por um hidrognênio há um aumento na atividade tripanocida.

Em relação a citotoxicidade, os compostos que apresentaram valores significativos foram: DS-3A, DS-1A1, DS-1A4 e DS-1B1 apresentaram valores de CC_{50} igual a 360,3 µM, 286,1 µM, >236,1 µM, >236,1 µM, respectivamente. Com destaque para o composto DS-3A, com valor de 360,3 µM que mais se aproximou do fármaco de referência BZD.

Sobre o índice de seletividade dos compostos, nenhum apresentou valor superior ao do fármaco utilizado como referência nesse experimento, porém o composto DS-1B1, se destacou entre os demais nesse quesito, visto que o mesmo obteve um valor maior que 50.

10.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DA SÉRIE DS

Os valores obtidos em teste de atividade para as formas promastigotas e amastigotas da *Leishmania amazonensis*, como a citotoxicidade, IC_{50} e índice de seletividade, dos compostos sintetizados, estão dispostos na **Tabela 5.**

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 5**, pode-se verificar que frente a espécie Leishmania *Amazonensis*, a forma amastigota, os compostos testados apresentaram valor de IC_{50} maior que a Miltefosina, o fármaco de referência utilizado, o composto que mais se aproximou do fármaco de referência foi o DS-1B3. Em relação à atividade para a forma promastigota a maioria dos compostos se apresentaram inativos e os ativos apresentaram valor de IC_{50} maior que a Miltefosina, sendo que o composto DS-1B2 foi o mais próximo do fármaco de referência.

O índice de seletividade (IS) frente a forma amastigota destaca-se o composto DS-1B1, que apresentou uma melhor seletividade que o fármaco de referência, com IS 11,1 µM, enquanto o fármaco de referência apresentou um IS 8,6 µM. Já em relação ao IS frente a forma promastigota, os compostos testados apresentaram uma seletividade menor que o fármaco de referência, sendo que o composto DS-1B2 foi o que mais se aproximou do Miltefosina.

Tabela 5 - Resultados da atividadde anti-*L. amazonensis* da série DS

Composto	CC50 (µM)	Promastigota *L. amazonensis* IC50 (µM)	Promastigota *L. amazonensis* IS (µM)	Amastigota *L. amazonensis* IC50 (µM)	Amastigota *L. amazonensis* IS (µM)
DS-1A	73,3	INATIVO	-	INATIVO	-
DS-1A1	286,1	INATIVO	-	122,5	2,3
DS-1A2	45,6	INATIVO	-	276,6	0,17
DS-1A3	79,4	INATIVO	-	76,2	1,0
DS-1A4	57,4	INATIVO	-	35,2	1,6
DS-3A	267,7	INATIVO	-	541,8	0,5
DS-1B	79,9	68,8	1,2	59,9	1,3
DS-1B1	236,1	INATIVO	-	21,2	11,1
DS-1B2	77,5	26,1	3,0	24,9	3,1
DS-1B3	44,5	INATIVO	-	18,4	2,4
DS-1B4	103,3	INATIVO	-	39,8	2,6
DS-3B	22,2	INATIVO	-	20,3	1,1
Miltefosina	**60,9**	**10,0**	**6,1**	**7,1**	**8,6**

Fonte: Autoria própria (2023)

Legenda: **CC_{50}** = Concentração citotóxica para 50% das células;
IC_{50} = Concentração que inibe o crescimento parasitário em 50%.;
IS = Índice de seletividade.

Os valores obtidos em teste de atividade para as formas promastigotas e amastigotas da *Leishmania infantum*, como a citotoxicidade, IC50 e índice de seletividade, dos compostos sintetizados, estão dispostos na **Tabela 6**

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 6**, pode-se verificar que frente a espécie Leishmania *Infantum*, a forma amastigota, os compostos testados apresentaram valor de IC50 maior que a Miltefosina, o fármaco de referência utilizado. Apenas o composto DS-1B3 apresentou IC50 (3,9 µM) próximo ao composto de referência com IC50 (1,7 µM). Em relação à atividade para a forma promastigota 50% dos compostos da série se apresentaram inativos e os ativos apresentaram valor de IC50 maior que a Miltefosina, exceto o composto DS-3B que apresentou atividade mais potente que o fármaco de referência com IC50 (2,9 µM) enquanto o composto de referência apresenta IC50 (17,2 µM).

O índice de seletividade (IS) frente a forma amastigota dos compostos apresentaram uma seletividade menor que o fármaco de referência, sendo que o composto DS-1B4 foi o que mais se aproximou do fármaco de referência. Já em relação ao IS frente a forma promastigota, os compostos testados apresentaram uma seletividade menor que o fármaco de referência, exceto o composto DS-3B que apresentou um IS (7,7 µM), sendo maior que a Miltefosina.

Tabela 6 - Resultados da atividade anti-*L.infantum* da série DS

Composto	CC50 (µM)	Promastigota *L. infantum* IC50 (µM)	Promastigota *L. infantum* IS (µM)	Amastigota *L. infantum* IC50 (µM)	Amastigota *L. infantum* IS (µM)
DS-1A	73,3	INATIVO	-	INATIVO	-
DS-1A1	286,1	INATIVO	-	134,8	2,8
DS-1A2	45,6	INATIVO	-	212,0	0,2
DS-1A3	79,4	INATIVO	-	287,8	0,3
DS-1A4	57,4	INATIVO	-	276,6	0,2
DS-3A	267,7	INATIVO	-	76,9	1,7
DS-1B	79,9	62,2	1,3	29,7	2,8
DS-1B1	236,1	166,9	1,4	19,0	12,8
DS-1B2	77,5	24,7	3,1	12,3	6,5
DS-1B3	44,5	57,8	0,8	3,9	11,8
DS-1B4	103,3	101,7	1,0	5,6	19,1
DS-3B	22,2	2,9	7,7	14,4	1,5
Miltefosina	**60,9**	**17,2**	**3,5**	**1,7**	**35,5**

Fonte: Autoria própria (2023)

Legenda: **CC_{50}** = Concentração citotóxica para 50% das células;
IC_{50} = Concentração que inibe o crescimento parasitário em 50%.;
IS = Índice de seletividade.

Quanto à toxicidade frente a macrófagos RAW, é possível notar que os compostos DS-3A, DS-1B1, DS-1B4, e principalmente o DS-1A1 com valor de CC50 286,1 µM se destacaram, evidenciando menor citotoxicidade frente às células testadas.

Frente ambas as espécies *L. Amazonensis* e *L. Infantum* nota-se que o quando o composto apresenta um hidrogênio fazendo ligação com o nitrogênio do anel tiazol a atividade é menor ou nula, já quando esse hidrogênio é substituído por um núcleo fenil em mesma posição, a maioria dos compostos mostram atividade, sendo assim o núcleo fenil da molécula incrementou atividade a serie b dos compostos DS.

Em relação a molécula DS-3B, a condensação com a tiossemicarbazida do fenil foi o que incrementou e conferiu uma maior atividade biológica a essa molécula, que foi destaque pois apresentou uma maior atividade leishmanicida que o fármaco de referência frente a espécie Leishmania *Infantum.*

11 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

11.1 CONCLUSÕES

As comprovações de dados estruturais através da análise de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C mostram que os novos derivados do piridil-tiazol, propostos em rota sintética, foram efetivamente formados. Todos os compostos foram testados enquanto a atividade anti-*T. cruzi* (formas amastigota e tripomastigota) e anti-*Leishmania* (formas amastigota e promastigota), assim como a citotoxicidade em macrófagos RAW.

No geral, os compostos foram pouco ativos quando testados contra a forma tripomastigota do *T*. cruzi de cultura celular. O composto destaque com atividade tripanocida aproximada ao fármaco de referência foi o composto DS-1A1 com IC50 4,2 µM. Quanto a sua toxicidade, o destaque foi para o composto DS-3A com valor de 360,3 µM. Já em relação ao IS, o composto destaque foi o DS-1A1 apresentando um IS >55,6 µM.

O teste leishmanicida evidenciou que um dos composto foi mais ativo que a miltefosina, o mesmo apresentou um IC50 de 2,9 µM enquanto o composto de referência apresenta IC50 de 17,2 µM, sendo ele o DS-3B frente a forma promastigota de L. *Infantum.* Para os melhores resultados da citotoxicidade, quando comparados a Miltefosina, o mais eficaz foi o composto DS-1A1 com valor de citotoxicidade igual a 286,1µM. Sobre o IS, o composto DS-1B1 apresentou o melhor resultado com um valor de IS 11,1 µM para forma amastigota do parasita do L. *Amazonensis*, enquanto o fármaco de referência apresentou IS 8,6 µM.

11.2 PERSPECTIVAS

- Aprofundar o estudo da série DS buscando por novos ensaios a fim de analisar o possível mecanismo tripanocida e leishmanicida;
- Realizar a espectrometria de massa para complementar os dados de caracterização estrutural;
- Investir em novas sínteses, a partir das moléculas bem sucedidas;
- Redigir artigos científicos com as séries DS.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, Perla F. *et al.* Transmissão sexual da tripanossomíase americana em humanos: uma nova via pandêmica potencial para parasitas de Chagas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** , v. 112, p. 437-446, 2017.

ARSHAD, Mohammed F. et al. Thiazole: a versatile standalone moiety contributing to the development of various drugs and biologically active agents. **Molecules**, v. 27, n. 13, p. 3994, 2022.

BELARDO, H.; GRAMBINO, D. The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 31-39, 2004.

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

BRASIL, Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilancia em Saúde. **Doença de Chagas**; Boletim Epideiológico, vol 46, nº especial, 2021.

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

BRASIL, Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle de Chagas. **DOENÇA DE CHAGAS AGUDA. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Guia de consulta rápida para profissionais de saúde.** Disponível em: https://www.revistas.ufg.br › iptsp › article › download. Acessado em: 23 nov. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Disponível em: http://vigilancia.saude.mg.gov.br/index.php/download/manual-de-vigilancia-da-leishmaniose-tegumentar/2013. Acessado em: 23 abr. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde; **Leishmaniose**. Disponível em: https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2021/10/saiba-quais-sao-os-tipos-os-sintomas-e-a-transmissao-das-leishmanioses-em-humanos. Acesso em: 23 abr. 2023.

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

CARDOSO, Marcos Veríssimo de Oliveira. **Síntese e Avaliação da Atividade Antichagásica de Novas Hidrazonas**. Dissertação de mestrado. Recife-PE, 2012.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention; **Trypanosomiasis, American**. Disponível em: https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html.

Acesso em: 26 jan. 2023.

CEVALLOS, A. M., & Hernández, R. Chagas' disease: pregnancy and congenital transmission. **BioMed research international**, vol. 2014, n. 401864, 2014.

DNDi – Drugs for Neglected Diseases Initiative. Disponível em: https://dndi.org/diseases/chagas/facts/; Acesso em: 15 jan. 2023.

DNDi – Drugs for Neglected Diseases Initiative. Disponível em: https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/tratamentos-atuais-leish/. Acesso em: 07 abr. 2023.

DE OLIVEIRA CARDOSO, Marcos Veríssimo et al. 2-Piridil tiazóis como novos agentes anti-Trypanosoma cruzi: desenho estrutural, síntese e avaliação farmacológica. **European Journal of Medicinal Chemistry** , v. 86, p. 48-59, 2014.

DE SOUSA LIMA, Ronildo. Doença de Chagas: uma atualização bibliográfica. **RBAC**, v. 51, n. 2, p. 103-06, 2019.

ECHEVERRÍTZA, Luís E.; MORILLO, Carlos A. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious disease clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 119-134, 2019.

ESPÍNDOLA, J. W. P. et al. Synthesis and Structureeactivity Relationship Study of a New Series of Antiparasitic Aryloxyl Thiosemicarbazones Inhibiting Trypanosoma cruzi Cruzain. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 111, p. 818-835, 2015.

FILHO, G. B. O. **Planejamento estrutural, síntese e avaliação ds propriedades tripanocidas de 4-tiazolinonas e seus análogos estruturais do tipo 1,3-tiazóis.** 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

FIOCRUZ – **Quem foi Carlos Chagas.** Disponível em: https://www.icc.fiocruz.br/carlos-chagas-3/. Acessado em: 05 jan 2023.

FIOCRUZ – **Assembléia da OMS reconhece dia mundial da doença de chagas**. Disponível em: https://agencia.fiocruz.br/assembleia-da-oms-reconhece-dia-mundial-da-doenca-de-chagas. Acessado em: 10 jan. 2023.

FIOCRUZ – **Vetor**. Disponível em: http://chagas.fiocruz.br/sessao/vetor/. Acessado em: 14 Jan. 2023.

FIOCRUZ – **Leishmaniose**; Disponível em: https://portal.fiocruz.br/taxonomia-geral7doencasrelacionadas/leishmaniose0#:~:text=As%20leishmanioses%20s%C3%A3o%20um%20conjunto,)%2C%20que%20ataca%20%C3%B3rg%C3%A3os%20internos. Acesso em: 21 abr. 2023.

FONSECA, A. M. et al. Seropositivity for Trypanosoma cruzi in domestic dogs from Sonora, Mexico. **Infectious diseases of poverty**, v. 6 , p. 120; 2017.

GUARNER, Jeannette. Chagas disease as example of a reemerging

parasite.” **Seminars in diagnostic pathology** , 2019. p. 164-169.

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

KAWAGUCHI, Wilton Hideki et al. Chagas Disease: from emergence to treatment – a literature review. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 37, n. 2, p. 182-9, 2019.

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

KESSLER, R. L. et al. Recently differentiated epimastigotes from Trypanosoma cruzi are infective to the mammalian host. **Molecular microbiology**; v. 104, p. 712-736; 2017.

LEITE, Ana Cristina Lima et al. Privileged Structures in the Design of Potential Drug Candidates for Neglected Diseases. **Current Medicinal Chemistry** , v. 26, n. 23, p. 4323-4354, 2019.

LINDOSO, José Ângelo; LINDOSO, Ana Angélica BP. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** , v. 51, p. 247-253, 2009.

LING, Yong. et al.; The Expanding Role of Pyridine and Dihydropyridine Scaffolds in Drug Design. **Drug design, development and therapy**, v. 15 p. 4289-4338, 2021.

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

LIVINGSTON, Elizabeth G.; DUGGAL, Ryan; DOTTERS-KATZ, Sarah. Screening for Chagas Disease during Pregnancy in the United States-A Literature Review. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 6, n. 4, p. 202, 2021

LYNN, Mary K. et al. Evidence of likely autochthonous Chagas disease in the southwestern United States: A case series of Trypanosoma cruzi seropositive blood donors. **Transfusion**, v. 62, n. 9, p. 1808-1817, 2022.

MANN, S. et al. A review of leishmaniasis: current knowledge and future directions. **Current tropical medicine reports**, v. 8, n. 2, p. 121-132, 2021.

MARINESCU, Maria; POPA, Claudia-Valentina. Pyridine Compounds with Antimicrobial and Antiviral Activities. **International Journal of Molecular Sciences** , v. 23, n. 10, p. 5659, 2022.

MARTINS-MELO, Francisco Rogerlândio; CASTRO, Márcia C.; WERNECK, Guilherme Loureiro. Levels and trends in Chagas disease-related mortality in Brazil. **Acta Tropica** , v. 220, p. 105948, 2021.

MILLS, Roger M. Chagas Disease: Epidemiology and Barriers to Treatment. **The American Journal of Medicine** , v. 133, n. 11, p. 1262-1265, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de controle e vigiância da Leishmaniose Visceral**. 1 a edição, 5 a reimpressão. Brasília, DF. 2019. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral _1edicao.pdf Acesso em: 14 abr. 2023.

MOREIRA, et al. Conformational Restriction of Aryl Thiosemicarbazones Produces Potent and Selective Anti-Trypanosoma cruzi Compounds Which Induce Apoptotic Parasite Death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 467-478, 2014.

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde; **OPAS: 70% das pessoas com Chagas não sabem que estão infectadas**. Disponível em: https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2021-opas-70-das-pessoas-com-chagas-nao-sabem-que-estao-infectadas. Acessado em: 10 jan. 2023.

POLANSKY, J. et al. Privilegied Structures – Dream or Reality: Preferentical Organization of Azanaphtalene Scaffold. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, 2012.

ROMANHA, Álvaro José et al. Modelos experimentais in vitro e in vivo para triagem e desenvolvimento de fármacos para doença de Chagas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 233-238, 2010.

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

SANTOS, S. D. et al. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to Trypanosoma cruzi infection and target tissues. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005507, 2017.

SASIDHARAN, S. ; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading?. **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1541-1554, 2021.

SHORT, E. et al. Climate Change Contribution to the Emergence or Re-Emergence of Parasitic Diseases. **Infect Dis Res Treat** , v. 10, p. 1-7; 2017.

SILVA, Brígida Adriene Muniz et al. Perfil de transmissão da doença de Chagas no Brasil: 2008 a 2020. **Revista Presença**, v. 7, n. 15, p. 22-42, 2021.

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

SILVA, Whesley Tanor et al. Prevalence and determinants of depressive symptoms in patients with Chagas cardiomyopathy and predominantly preserved cardiac

function. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

SINGH, Inder P.; GUPTA, Shiv; KUMAR, Sanjay. Thiazole Compounds as Antiviral Agents: An Update. **Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 4-23, 2020..

SOUZA, M. V. N. et al. Métodos de obtenção e aplicação sintética de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 77-84, 2015.

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

TAHIR, Tehreem et al. Pyridine Scaffolds, Phenols and Derivatives of Azo Moiety: Current Therapeutic Perspectives. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 4872, 2021.

UMESH, S. P. et al. Review: Chagas Disease; **American Journal of Pharmtech Research**; Volume 1, Issue 3, 2011.

VEBER, Daniel F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

WHO (World Health Organization). Leishmaniasis. 8 jan. 2022. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis. Acesso em: 13 abr. 2023.

YOGEESWARI, P. et al. Anticonvulsant and Neurotoxicity Evaluation of Some 6-Chlorobenzothiazolyl-2-Thiosemicarbazones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 231-236, 2002.

ZINGALES, Bianca et al. The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 12, n. 2, p. 240-253, 2012.

ZHUANG, Chunlin et al. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews** , v. 117, n. 12, p. 7762-7810, 2017