UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

THIBAULT JOSEPH WILLIAM JACQUES DIT LAPIERRE

Otimização *hit-to-lead* de derivados de pirazinilpiperazinas e tiazóis contra a doença de Chagas e leishmaniose

TESE DE DOUTORADO

Hit-to-lead optimization of pyrazinylpiperazine and thiazole derivatives against Chagas disease and leishmaniasis

Ph. D. Thesis

Uberlândia, 2025

THIBAULT JOSEPH WILLIAM JACQUES DIT LAPIERRE

OTIMIZAÇÃO *HIT-TO-LEAD* DE DERIVADOS DE PIRAZINILPIPERAZINAS E TIAZÓIS CONTRA A DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSE

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Química.

Linha de pesquisa: Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior.

Uberlândia, 2025

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

L313 Lapierre, Thibault Joseph William Jacques Dit, 1998-
2025 Otimização hit-to-lead de derivados de pirazinilpiperazina e tiazóis contra a doença de Chagas e leishmaniose [recurso eletrônico] / Thibault Joseph William Jacques Dit Lapierre. - 2025.

Orientador: Celso de Oliveira Rezende Júnior.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2025.174
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Química. I. Rezende Júnior, Celso de Oliveira , 1987-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. III. Título.

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br

ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico, 167, PPGQUI				
Data:	Vinte e sete de fevereiro de dois mil e vinte e cinco	Hora de início:	8h	Hora de encerramento:	13:00
Matrícula do Discente:	12113QMI010				
Nome do Discente:	Thibault Joseph William Jacques Dit Lapierre				
Título do Trabalho:	Otimização hit-to-lead de derivados de pirazinilpiperazinas e tiazóis contra a doença de Chagas e leishmaniose				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Planejamento e síntese de candidatos a fármacos				
ODS	ODS 3 - Saúde e bem-estar: assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades				

Reuniu-se, por webconferência, no *link: https://teams.microsoft.com/l/meetup-join/19%3ameeting_N2QzZTlkMzYtYWEyMS00YWYyLWE3MDMtNmVjNTc3ZDZhZjBk%40thread.v2/0?context=%7b%22Tid%22%3a%22cd5e6d23-cb99-4189-88ab-1a9021a0c451%22%2c%22Oid%22%3a%22e120e85c-5dd1-41d7-864f-f961cf3585e4%22%7d*, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: **Amanda Danuello Pivatto,** da Universidade Federal de Uberlândia; **Luiz Carlos Dias**, da Universidade Estadual de Campinas, **Flávio da Silva Emery**, da Universidade de São Paulo; **Giovanni Wilson Amarante**, da Universidade Federal de Juiz de Fora; e **Celso de Oliveira Rezende Júnior**, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, **Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Documento assinado eletronicamente por **Amanda Danuello Pivatto**, **Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/02/2025, às 13:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Celso de Oliveira Rezende Júnior**, **Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/02/2025, às 13:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Giovanni Wilson Amarante**, **Usuário Externo**, em 27/02/2025, às 13:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Flavio da Silva Emery**, **Usuário Externo**, em 27/02/2025, às 13:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Luiz Carlos Dias**, **Usuário Externo**, em 28/02/2025, às 08:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6033339** e o código CRC **E1ECE366**.

Referência: Processo nº 23117.003244/2025-07 SEI nº 6033339

ATIVIDADES ACADÊMICAS RELEVANTES

Artigos publicados:

Jacques Dit Lapierre, T. J. W.; Cruz, M. G. F. de M. L.; Brito, N. P. F.; Resende, D. de M.; Souza, F. de O.; Pilau, E. J.; da Silva, M. F. B.; Neves, B. J.; Murta, S. M. F.; Rezende Júnior, C. de O. Hit-to-Lead Optimization of a Pyrazinylpiperazine Series against Leishmania Infantum and Leishmania Braziliensis. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *256*, 115445. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115445.

Laureano de Souza, M.; **Jacques Dit Lapierre, T. J. W.**; de Lima Marques, G. V.; Ribeiro Ferraz, W.; Penteado, A. B.; Goulart Trossini, G. H.; Fonseca Murta, S. M.; Barbosa de Oliveira, R.; de Oliveira Rezende Júnior, C.; Salgado Ferreira, R. Molecular Targets for Chagas Disease: Validation, Challenges and Lead Compounds for Widely Exploited Targets. *Expert Opin. Ther. Targets* **2023**, *27* (10), 911–925. https://doi.org/10.1080/14728222.2023.2264512.

Murta, S. M. F.; Lemos Santana, P. A.; **Jacques Dit Lapierre, T. J. W.**; Penteado, A. B.; El Hajje, M.; Navarro Vinha, T. C.; Liarte, D. B.; de Souza, M. L.; Goulart Trossini, G. H.; de Oliveira Rezende Júnior, C.; de Oliveira, R. B.; Ferreira, R. S. New Drug Discovery Strategies for the Treatment of Benznidazole-Resistance in Trypanosoma Cruzi, the Causative Agent of Chagas Disease. *Expert Opin. Drug Discov.* **2024**, *19* (6), 741–753. https://doi.org/10.1080/17460441.2024.2349155.

da Silva Oliveira, D. D.; Paz, F.; Brito, N. P. F.; Krüger, A.; Martinho, A. C. C.; **Jacques Dit Lapierre, T. J. W.**; de Oliveira Souza, F.; Maltarollo, V. G.; Kronenberger, T.; Mendes, M. S.; Nonato, M. C.; Pilau, E. J.; Wrenger, C.; Wunderlich, G.; Rezende Júnior, C. de O. Synthesis, Design, and Optimization of a Potent and Selective Series of Pyridylpiperazines as Promising Antimalarial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2024**, *275*, 116621. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116621.

da Silva Oliveira, D. D.; Sousa Silva, N. B.; **Jacques Dit Lapierre, T. J. W.**; Lemes de Souza, S.; Ferreira Brito, N. P.; Cassiano Martinho, A. C.; Clemente Dias, R. F.; Nascimento Farago, D.; Michelan-Duarte, S.; Consolin Chelucci, R.; de Moura Lodi Cruz, M. G. F.; de Melo Resende, D.; Andricopulo, A. D.; Fonseca Murta, S. M.; Ferreira, L. L. G.; Gomes Martins, C. H.; de Oliveira Rezende Júnior, C. Discovery of Arylpiperazines with Broad-Spectrum Antimicrobial Activity and Favorable Pharmacokinetic Profiles. *Chem. Biodivers.* **2024**, e202402100. https://doi.org/10.1002/cbdv.202402100.

Jacques Dit Lapierre, T. J. W.; Farago, D. N.; de Moura Lodi Cruz, M. G. F.; de Melo Resende, D.; de Oliveira, A. C. R.; dos Santos, B. R. M.; de Oliveira Souza, F.; Michelan-Duarte, S.; Chelucci, R. C.; Andricopulo, A. D.; Ferreira, L. L. G.; Pilau, E. J.; Murta, S. M. F.; de Oliveira Rezende Júnior, C. Evaluation and Discovery of Novel Benzothiazole Derivatives as Promising Hits against Leishmania Infantum. *Chem. Biol. Drug Des.* **2024**, *103* (4), 1–14. https://doi.org/10.1111/cbdd.14525.

Franco, M. D. S.; **Jacques Dit Lapierre, T. J. W.**; Martinho, A. C. C.; Bessas, N. C.; Caetano, M. M.; Tasso, T. T.; Beletti, M. E.; de Lima, R. G.; Rezende Júnior, C. de O.; Tsubone, T. M. Protoporphyrin IX Conjugated to Piperazine or Morpholine : Photophysical Properties and Photodynamic Activity. *Dye. Pigment.* **2025**, *236*, 112649. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2025.112649.

Cassiano Martinho, A. C.; de Melo Resende, D.; Landin, E. S.; **Jacques Dit Lapierre, T. J. W.**; Bernardes, T. C. D.; Martins, L. C.; Ferreira, R. S.; Murta, S. M. F.; de Oliveira Rezende Júnior, C. Synthesis, Design, and Structure-Activity Relationship of a Benzenesulfonylpiperazine Series against Trypanosoma Cruzi. *ChemMedChem* **2022**, *17* (19), e202200211. https://doi.org/10.1002/cmdc.202200211.

Oliveira, D. D. S.; **Jacques Dit Lapierre, T. J. W.**; Silva, F. C.; Cunha, I. V.; Souza, R. A. C.; Matos, P. A.; Almeida, G. M.; Oliveira, C. G.; Araújo, T. G.; Tsubone, T. M.; Rezende Jr., C. O. Advances in Breast Cancer Drug Discovery: A Review of Therapeutic Strategies and Studies Involving Photosensitizers, Caged Xanthones and Thiosemicarbazones Derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.* **2024**, *35* (1), 1–32. https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230128.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, eu gostaria de expressar toda a minha gratidão aos meus pais Catherine e Jean-Michel, à minha irmã Améline, à minha avó Gisèle, à minha tia Annick e ao meu tio Jacques, pelo apoio inabalável deles desde o início da minha carreira científica, e especialmente durante esses quatro anos de doutorado. Meus agradecimentos mais sinceros vão para vocês, por sempre serem presentes para mim, que seja à distância por telefone ou quando eu voltei para Savóia para descansar algum tempo, e por ter me ensinado os valores de esforço e perseverança que se mostraram cruciais mais de uma vez durante meu doutorado.

Eu também gostaria de expressar a minha profunda gratidão ao meu orientador, o Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior, por ter me acolhido na equipe do LaSFar e ter me providenciado a oportunidade de trabalhar num projeto tão interessante. A química medicinal, e especialmente a área de anti-infecciosos, sempre teve a minha preferência dentro da química, e fico grato por ter explorado a área de descoberta de fármacos antiparasitários graças a você.

Um agradecimento especial também vai para meu amigo e colega Douglas, que esteve ao meu lado no laboratório ao longo desses quatro anos de doutorado. Eu presenciei todo o progresso impressionante que você fez desde o início do seu mestrado há quatro anos e que você sempre manteve indo para o seu doutorado, e fico muito feliz por ter compartilhado o laboratório com o químico sério, trabalhador, curioso e meticuloso que você é. Sentirei falta das nossas conversas sobre planejamento de rotas, síntese e química medicinal em geral, mas tenho toda certeza de que você terá um futuro brilhante na pesquisa.

Eu gostaria também de agradecer todos os colegas que compartilharam o laboratório comigo ao longo desses anos. Especialmente, meu muito obrigado para Meiry, por sua gentileza e positividade durante esses anos (lembrarei dos seus “origamis”), e para Nícolas, você foi um aluno de iniciação cientifica incrivelmente eficiente que eu tive a sorte de supervisionar por um tempo. Rafaela, Mateus e Ana Paula, obrigado para vocês três por ter me mostrado, através dos seus esforços contínuos no laboratório, que podemos ter grandes esperanças na próxima geração de químicos medicinais. E meus agradecimentos também aos colegas dos outros laboratórios, e especialmente à Patrícia, Ieda e Maynne, conversar sobre pesquisa e química com vocês sempre trouxe um novo e muito bem-vindo ponto de vista.

A minha sincera gratidão também vai para meu amigo e mentor o Dr. François Keiff, por todos os conselhos e todo o conhecimento que ele compartilhou comigo, desde que entrei sob a supervisão dele durante meu mestrado. Você foi quem abriu para mim as portas da

química medicinal e dos anti-infecciosos, e sempre acompanhou a minha jornada científica desde então. Muitas vezes eu pude contar com as competências que adquiri graças a você, que seja na escrita acadêmica ou no laboratório, que são uma contribuição inestimável para mim como profissional e químico. Estou muito grato a você por ser um pilar na minha carreira, sempre providenciando conselhos sábios e confiáveis.

Além disto, eu gostaria de agradecer a todos os pesquisadores que contribuíram para este projeto, cada um de uma maneira diferente. Meus agradecimentos mais especiais à Mariza, que ficou responsável por avaliar *in vitro* e *in vivo* todos os compostos contra *L. infantum* e *L. braziliensis* sob a orientação da Profª. Drª. Silvane Maria Fonseca Murta, a quem também agradeço. A sua eficiência foi crucial para o desenvolvimento da série de pirazinilpiperazinas, especialmente nas etapas iniciais, e você merece muitos elogios por isto. Agradeço também à Drª. Daniela de Melo Resende por seu trabalho sério ao avaliar *in vitro* todos os compostos contra *T. cruzi*, e à Drª; Thamires Quadros Froes, à Profª. Drª. Rafaela Salgado Ferreira, ao Prof. Dr. Miguel Angel Chávez-Fumagalli, à Profª. Drª. Maria Cristina Nonato, ao Prof. Dr. Bruno Júnior Neves, ao Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau, ao Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo, à Profª. Drª. Lídia Moreira Lima, à Profª. Drª. Cláudia Magalhães Calvet, e à suas respectivas equipes, por suas contribuições valiosas com ambas as séries de compostos.

Agradeço também a todos os profissionais, professores e químicos com quem eu tive a chance de adquirir conhecimento na França, na Alemanha e no Brasil desde o início da minha carreira acadêmica, por suas contribuições respectivas para a minha formação profissional.

Enfim, eu gostaria de agradecer à Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Química, pelo apoio financeiro e técnico fornecido. Especialmente, eu gostaria de agradecer a Flaysner Magayver Portela por me ensinar a operar um espectrômetro de RMN e por seu apoio com experimentos de RMN. Agradeço também à FAPEMIG pela bolsa concedida, e à CAPES pelo apoio financeiro.

ACKNOWLEDGEMENT

First and foremost, I would like to express my gratitude to my parents Catherine and Jean-Michel, my sister Améline, my grandmother Gisèle, my aunt Annick and my uncle Jacques for their unfaltering support since the beginning of my scientific career, and especially during these four years of Ph. D. My most heartfelt thanks go to you, for being ever present for me, whether it was over the phone or when I came back to Savoy to rest for a while, and for teaching me the values of effort and perseverance which proved crucial more than once during my doctoral journey.

I would also like to express my deepest gratitude to my advisor, Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior, for welcoming me to the LaSFar team and providing me the opportunity to work on such a thrilling project. Medicinal chemistry, and especially anti-infectives, has always been a personal favorite of mine, and I am grateful to have delved into the field of antiparasitic drug discovery thanks to you.

A special thanks goes to my friend and colleague Douglas, who was at my side in the lab during these four years of Ph. D. I witnessed the staggering progress you have made since the beginning of your Master's degree four years ago and kept it going into your Ph. D., and all I can say is that I am very glad to have shared the lab with the serious, hard-working, curious and meticulous chemist that you are. I will miss our discussions about route-planning, synthesis and Medicinal Chemistry in general, but I am confident that you will have a brilliant future in research.

I would also like to thank all the colleagues who shared the lab with me during these years. Especially, many thanks to Meiry for your kindness and positivity along these years (your "origamis" will be remembered), and to Nícolas, you have been an outstandingly efficient graduate student I had the luck to supervise for a while. Rafaela, Mateus and Ana Paula, thank you to all three for showing me through your daily efforts that there are great hopes for the next generation of medicinal chemists. And my thanks to the colleagues from other labs, especially Patrícia, Ieda and Maynne, discussing research and chemistry with you has always brought a welcome new and mind-opening point of view.

My heartfelt gratitude also goes to my friend and mentor Dr. François Keiff, for all the advice and knowledge he shared with me since I got under his supervision during my Master's degree. You are the one who opened the doors of Medicinal Chemistry and anti-infectives to me, and accompanied my scientific journey ever since. Many a time I could rely on the skills I

acquired thanks to you, whether it be in academic writing or lab-oriented ones, which are an invaluable contribution to me as a professional and chemist. Thus, I am very grateful to you for being such a pillar in my career, always providing wise and reliable counsel.

Moreover, I would like to thank all the researchers who contributed to this project, one way or another. My most special thanks to Mariza, who performed the *in vitro* and *in vivo* assessment of all compounds against *L. infantum* and *L. braziliensis* under the supervision of Prof. Dr. Silvane Maria Fonseca Murta, whom I thank as well. Your efficiency proved crucial for the development of the pyrazinylpiperazine series, especially in the initial steps, and you deserve much praise for this. I also thank Dr. Daniela de Melo Resende for her earnest work assessing all compounds *in vitro* against *T. cruzi*, and Dr. Thamires Quadros Froes, Prof. Dr. Rafaela Salgado Ferreira, Prof. Dr. Miguel Angel Chávez-Fumagalli, Prof. Dr. Maria Cristina Nonato, Prof. Dr. Bruno Júnior Neves, Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau, Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo, Prof. Dr. Lídia Moreira Lima, Prof. Dr. Cláudia Magalhães Calvet, and their respective teams, for their valuable contributions with both series of compounds.

I also thank all the professionals, professors, and chemists I had the chance to learn from in France, Germany and Brazil since the beginning of my academic career, for their respective contributions to my professional self.

Finally, I would like to thank the Federal University of Uberlândia and the Institute of Chemistry, for the financial and technical support they provided. Especially, I would like to thank Flaysner Magayver Portela for teaching me how to operate an NMR spectrometer and for his support with NMR experiments. I also thank the FAPEMIG for the grant awarded, and the CAPES for their financial support.

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AmB	Anfotericina B
APT	Attached Proton Test
APTS	Ácido *para*-toluenesulfônico
atm.	Atmosfera
ATP	Trifosfato de adenosina
BALB/c	Linhagem de camundongos criados em laboratório
BBB	Barreira hematoencefálica
Boc	*Tert*-butil carbamato
$(Boc)_2O$	Di-*tert*-butil dicarbonato
BSA	Albumina de sérum bovino
Bzn	Benznidazol
cat.	Catalítico
CC_{20}	Concentração citotóxica resultando em 20% de inibição celular
CC_{50}	Concentração citotóxica meio-máxima
CDI	*N*,*N'*-carbonildiimidazol
Cl_{int}	*Clearance* intrínseco
CNS	Sistema nervoso central
CYP	Superfamília de enzimas citocromo
Cz	Cruzaína
DA	Dose acumulada
DCM	Diclorometano

DHO	(*S*)-diidroorotato
DHODH	Proteína diidroorotato desidrogenase
DMEM	Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	*N*,*N*-dimetilformamida
DMPK	*Drug metabolism and pharmacokinetics*, farmacocinética e metabolismo de fármacos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT	Dose máxima tolerada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpi	Dia(s) pós-infecção
DSF	Fluorimetria de varredura diferencial
DTN	Doença tropical negligenciada
DTT	Ditiotreitol
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EGTA	Ácido egtázico
eq	Equivalente(s)
ESI	Ionização por eletrospray
Et_3N	Trietilamina
EtOAc	Acetato de etila
EtOH	Etanol
F_a	Fração absorvida
FBS	Sérum fetal bovino
GI	Gastrointestinal

GSH	Glutationa
GSK-3	Proteína quinase glicogênio sintase 3
h	Hora(s)
HAT	Tripanossomíase humana africana
HBTU	Hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetrametilurônio
HEPES	Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfônico
HepG2	Linhagem celular de fígado humano
Hex	Hexano
HLM	Microssoma de fígado humano
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução
Hsp83	Proteína de choque térmico 83
HTS	*High-throughput screening*, triagem de alta eficiência
-I	Efeito indutivo retirador de elétrons
IC_{50}	Concentração inibitória meio-máxima
IC_{90}	Concentração inibitória resultando em 90% de inibição
iPrOH	Isopropanol
KS	Solubilidade cinética
L. braziliensis	*Leishmania braziliensis*
L. donovani	*Leishmania donovani*
L. infantum	*Leishmania infantum*
L929	Linhagem celular de fibroblasto de rato

LC-MS	Cromatografia liquida acoplada a espectrometria de massas
LC-MS/MS	Cromatografia liquida acoplada a espectrometria de massas em tandem
LD	Lado direito
LE	Lado esquerdo
LLE	*Ligand Lipophilic Efficiency*
M	mol/L
+M	Efeito doador de elétrons por ressonância
-M	Efeito retirador de elétrons por ressonância
MeOH	Metanol
min	Minuto(s)
MLM	Microssoma de fígado de rato
MoA	Mecanismo de ação
MTS	Sal de tetrazólio usado em ensaios colorimétricos
NADP+	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NBS	*N*-bromosuccinimida
ND	Não determinado
OD	Densidade óptica
PAINS	*Pan-Assay Interference Compounds*
PAMPA	Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela
PBS	Tampão fosfato-salino
P_e	Permeabilidade efetiva
PEG	Polietileno glicol
PhCOCl	Cloreto de benzoíla

PMA	Acetato de forbol miristato
ppm	Partes por milhão
PrOH	Propanol
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Meio de cultura Rowell Park Memorial Institute
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SAR	Relação estrutura-atividade
SI	Índice de seletividade
SMILES	*Simplified Molecular Input Line Entry System*
S_NAr	Substituição nucleofílica aromática
SOD	Proteína superóxido dismutase
SPR	Relação estrutura-propriedade(s)
T. cruzi	*Trypanosoma cruzi*
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
ta	Temperatura ambiente
^{t}BuONa	*Tert*-butóxido de sódio
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetraidrofurano
THP-1	Linhagem celular monocítica de leucemia humana
TLC	Cromatografia em camada delgada
TMS	Tetrametilsilano
TPP	*Target Product Profile*, perfil de produto alvo

TR-FRET	*Time-resolved fluorescence energy transfer*
UV	Ultravioleto
UV-Vis	Ultravioleto-visível
vs	*Versus*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO 8

ACKNOWLEDGEMENT 10

LISTA DE ABREVIAÇÕES 12

SUMÁRIO 18

LISTA DE FIGURAS 23

LISTA DE TABELAS 25

LISTA DE ESQUEMAS 27

RESUMO 28

ABSTRACT 29

I) INTRODUÇÃO 30

II) OBJETIVOS DO TRABALHO 40

III) OTIMIZAÇÃO DA SÉRIE DE PIRAZINILPIPERAZINAS CONTRA LEISHMANIOSE 41

III) 1. Síntese e atividade biológica do *hit* inicial 1 e dos derivados com modificações no fragmento benzoíla 42

III) 1. 1. Síntese e atividade biológica do *hit* inicial 1 42

III) 1. 2. Síntese e atividade biológica dos derivados de amida, sulfonamida e fenol 5 – 13 45

III) 1. 3. Síntese e atividade biológica dos derivados picolínicos e nicotínicos 14 – 24 .. 48

III) 1. 4. Síntese e atividade biológica dos derivados *para*-substituídos 25 – 29 51

III) 1. 5. Síntese e atividade biológica dos derivados com anéis aromáticos diversificados 30 – 34 53

III) 1. 6. Síntese e atividade biológica dos derivados benzóicos disubstituídos 35 – 44 . 56

III) 1. 7. Influência da lipofilicidade na atividade antileishmanial 60

III) 2. Síntese e atividade biológica dos derivados com modificações no fragmento pirazina e no *linker* 61

III) 2. 1. Síntese e atividade biológica dos derivados com modificações no anel pirazina 61
III) 2. 2. Síntese e atividade biológica dos derivados com modificações no *linker* 70
III) 2. 3. Síntese e atividade biológica dos derivados híbridos 72
III) 3. Perfil ADMET *in vitro* dos compostos com maior atividade antileishmanial 77
III) 4. Avaliação da eficácia antileishmanial de 6 *in vivo* em camundongos BALB/c 82
III) 5. Investigação do mecanismo de ação de 6 85
III) 5. 1. Sinergismo entre 6 e fármacos antimoniais 85
III) 5. 2. Mecanismo de ação 86
III) 5. 3. Investigação do alvo 90
III) 5. 3. 1. Ensaios de *target-fishing in silico* 90
III) 5. 3. 2. Ensaios enzimáticos *in vitro* 92
III) 6. Conclusões 93
IV) OTIMIZAÇÃO DA SÉRIE DE TIAZÓIS CONTRA A DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSE 95
IV) 1. Síntese do *hit* inicial 2 e de derivados 96
IV) 1. 1. Síntese do *hit* e dos derivados com modificações no fragmento 2-etiltiazol 96
IV) 1. 2. Síntese dos derivados com modificações no *linker* 97
IV) 2. Atividade biológica dos tiazóis contra *T. cruzi* e *L. infantum* 98
IV) 2. 1. Relação estrutura-atividade contra *T. cruzi* 98
IV) 2. 2. Relação estrutura-atividade contra *L. infantum* 109
IV) 3. Perfil ADME *in vitro* dos compostos com maior atividade (IC_{50} < 15 µM) contra cada parasita 113
IV) 4. Investigação do mecanismo de ação antitripanosomal da série 116
IV) 4. 1. Ensaios de *washout in vitro* 116
IV) 4. 2. Avaliação *in vitro* da inibição de Cruzaína (Cz) 118
IV) 5. Conclusões 123
V) CONCLUSÃO 125

VI) MATERIAIS E MÉTODOS 127
VI) 1. Síntese orgânica 127
VI) 1. 1. Informações gerais 127
VI) 1. 2. Procedimentos gerais 128
VI) 1. 2. 1. Procedimento geral A: Substituição nucleofílica aromática (S_NAr) 128
VI) 1. 2. 2. Procedimento geral B: Acoplamento de amida 128
VI) 1. 2. 3. Procedimento geral C: Desmetilação 128
VI) 1. 2. 4. Procedimento geral D: Síntese de ureias a partir de carbamoilimidazóis 129
VI) 1. 2. 5. Procedimento geral E: Síntese de ureias *one-pot* 129
VI) 1. 3. Síntese do *hit* 1 129
VI) 1. 4. Síntese dos derivados amida, sulfonamida e fenol 5 – 13 130
VI) 1. 5. Síntese dos derivados picolínicos e nicotínicos 14 – 24 135
VI) 1. 6. Síntese dos derivados *para*-substituídos 25 – 29 139
VI) 1. 7. Síntese dos derivados com anéis aromáticos diversificados 30 – 34 141
VI) 1. 8. Síntese dos derivados dissubstituídos 35 – 44 142
VI) 1. 9. Síntese dos derivados com modificações no fragmento arila 53 – 64 146
VI) 1. 10. Síntese do derivado diamida 67 152
VI) 1. 11. Síntese das pirazinas com substituintes carboxílicos 70 – 75 153
VI) 1. 12. Síntese dos derivados com modificações no *linker* 79 – 81 156
VI) 1. 13. Síntese dos derivados híbridos 82 – 93 158
VI) 1. 14. Síntese do *hit* 2 e dos derivados com modificações no lado direito 94 – 108 162
VI) 1. 15. Síntese dos derivados com modificações no *linker* e no lado esquerdo 117 – 120 168
VI) 1. 16. Métodos analíticos de espectrometria (HRMS) e cromatografia liquida (HPLC) 172
VI) 2. Ensaios biológicos 173
VI) 2. 1. Parasitologia 173
VI) 2. 1. 1. Ensaio *in vitro* de atividade contra amastigotas de *Leishmania* 173

VI) 2. 1. 2. Ensaio *in vitro* de citotoxicidade em macrófagos THP-1 174
VI) 2. 1. 3. Ensaio *in vitro* de atividade contra promastigotas de *L. infantum* 174
VI) 2. 1. 4. Ensaio *in vitro* de atividade contra *T. cruzi* 174
VI) 2. 1. 5. Ensaio *in vitro* de citotoxicidade em células L929 175
VI) 2. 1. 6. Ensaio *in vitro* de atividade contra *T. cruzi* (cepa *Dm28c-Luc*) 175
VI) 2. 1. 7. Ensaio *in vitro* de citotoxicidade em células Vero 176
VI) 2. 1. 8. Toxicidade aguda *in vivo* em camundongos BALB/c 176
VI) 2. 1. 9. Eficácia *in vivo* contra *L. infantum* em camundongos BALB/c 177
VI) 2. 1. 10. Sinergismo entre 6 e antimoniais 178
VI) 2. 2. Perfil ADMET da série de pirazinilpiperazinas 179
VI) 2. 2. 1. Ensaio de Permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) – Barreira hematoencefálica (BBB) 179
VI) 2. 2. 2. Ensaio de Permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) – Trato gastrointestinal (GI) 179
VI) 2. 2. 3. Estabilidade metabólica em microssomas de fígado de rato (MLM) 180
VI) 2. 2. 4. Hepatotoxicidade 181
VI) 2. 3. Mecanismo de ação de 6 181
VI) 2. 3. 1. Análise por citometria de fluxo das fases G0/G1 do ciclo celular 181
VI) 2. 3. 2. Análise por FACS para a determinação da externalização de fosfatidilserina (PS) 182
VI) 2. 3. 3. Ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) 182
VI) 2. 4. Ensaios de inibição enzimática 182
VI) 2. 4. 1. Enzimas GSK-3A e GSK-3B de *L. infantum* 182
VI) 2. 4. 2. Enzima DHODH de *L. braziliensis* 183
VI) 2. 4. 3. Enzimas Hsp83 e SOD de *L. braziliensis*, usando fluorimetria de varredura diferencial (DSF) 184
VI) 2. 4. 4. Inibição de cruzaína (Cz) 184
VI) 2. 5. Perfil ADME da série de tiazóis 185

VI) 2. 5. 1. Determinação experimental da lipofilicidade pelo coeficiente de distribuição ($log(D)_{7.4}$) 185

VI) 2. 5. 2. Permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) – Trato gastrointestinal (GI)..... 186

VI) 2. 5. 3. Ensaios de estabilidade metabólica em microssomas de fígado de rato (MLM) e humano (HLM) 186

VI) 2. 5. 4. Solubilidade cinética..... 187

VI) 2. 6. Ensaios *in vitro* de *washout* contra *T. cruzi Dm28c-Luc* 188

VI) 2. 7. Investigação *in silico* por *target-fishing* 188

VII) REFERÊNCIAS 190

VIII) ANEXOS 208

VIII) 1. Investigação *in silico* e *in vitro* do alvo molecular de 6..... 208

VIII) 2. Espectros de RMN dos compostos testados contra *L. infantum* e *T. cruzi* 209

VIII) 3. Espectrogramas de HRMS dos compostos testados contra *L. infantum* e *T. cruzi*304

VIII) 4. Traças de HPLC de 6 328

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de opções terapêuticas atualmente usadas para o tratamento da doença de Chagas e da leishmaniose visceral. 32
Figura 2. Estrutura do *hit* de cada série apresentada no trabalho, e potência e toxicidade previamente reportadas (*hit* **1**: [25]; *hit* **2**: [31]). 33
Figura 3. Processo de descoberta de fármacos. 37
Figura 4. Processo *hit-to-lead*. 37
Figura 5. Estratégia geral seguida para a otimização *hit-to-lead* das duas classes de compostos. 39
Figura 6. Planejamento para o estudo de SAR da série de pirazinilpiperazinas. 41
Figura 7. Espectro de RMN de ^{1}H de **1** (400 MHz, $CDCl_3$). 44
Figura 8. Espectro de RMN de ^{13}C de **1** (101 MHz, $CDCl_3$). 44
Figura 9. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **1**. 45
Figura 10. *Ligand Lipophilic Efficiency* (LLE) de todos os compostos avaliados contra a) *L. infantum* e b) *L. braziliensis*. LLE = pIC_{50} - clog(P). 61
Figura 11. Planejamento do derivado **93** a partir de **6** e de um composto com similaridade estrutural.[50] 73
Figura 12. Resumo do estudo de SAR da série de pirazinilpiperazinas contra *L. infantum*. 77
Figura 13. Eficácia *in vivo* de **6** (50 mg/kg/dia e 100 mg/kg/dia) em modelo de leishmaniose visceral em camundongos BALB/c (tratamento de 10 dias). 84
Figura 14. Atividade antileishmanial *in vitro* de **6**, Sb^{III} e da combinação deles. 86
Figura 15. Progressão do ciclo celular de células de *L. infantum* tratadas com **6** e miltefosina. 88
Figura 16. Histogramas de citometria de fluxo de **6** e da miltefosina. 89
Figura 17. Efeito de **6** sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em *L. infantum*. 90
Figura 18. Planejamento do estudo de SAR para a série de tiazóis. 95
Figura 19. Espectro de RMN de ^{1}H de **2** (400 MHz, $CDCl_3$). 100
Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **2** (101 MHz, $CDCl_3$). 101
Figura 21. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **2**. 101
Figura 22. Resumo gráfico do estudo de SAR contra *T. cruzi*. 108
Figura 23. Resumo gráfico do estudo de SAR contra *L. infantum*. 112
Figura 24. Similaridades estruturais entre **2** e os inibidores de Cz reportados.[102,103] 118

Figura 25. Relação entre $K_{m\ app}$ e a concentração de **107**..... 123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos critérios para compostos *hit*, *lead* e perfil de produto alvo (TPP) para o tratamento da doença de Chagas e da leishmaniose visceral. 35
Tabela 2. Atividade antileishmanial e seletividade *in vitro* do *hit* **1** e dos derivados **5** - **13**. ... 47
Tabela 3. Atividade antileishmanial e seletividade *in vitro* dos derivados picolínicos e nicotínicos **14** - **24**. 50
Tabela 4. Atividade antileishmanial e seletividade *in vitro* dos derivados *para*-substituídos **25** - **29**..... 52
Tabela 5. Atividade antileishmanial e seletividade *in vitro* dos derivados **30** - **34**. 55
Tabela 6. Atividade antileishmanial e seletividade *in vitro* dos compostos disubstituídos **35** - **44**. 59
Tabela 7. Atividade antileishmanial *in vitro* e seletividade dos derivados de arila não substituídos **53** – **56**, **62**, **64** e **67**. 65
Tabela 8. Atividade antileishmanial *in vitro* e seletividade das pirazinas com substituintes carboxílicos **70** - **75**. 67
Tabela 9. Atividade antileishmanial *in vitro* e seletividade dos derivados de arila com substituintes **57** – **61** e **63**. 69
Tabela 10. Atividade antileishmanial *in vitro* e seletividade dos derivados com modificações no *linker* **79** - **81**. 72
Tabela 11. Atividade antileishmanial *in vitro* e seletividade dos derivados híbridos **82** - **93**.. 75
Tabela 12. Potência antileishmanial, seletividade e propriedades ADME *in vitro* dos candidatos a estudos *in vivo*. 78
Tabela 13. Atividade e seletividade *in vitro* do *hit* **2** e dos derivados 2-etiltiazol **94** - **108** contra *T. cruzi* e *L. infantum*. 104
Tabela 14. Propriedades ADME *in vitro* do *hit* **2** e dos derivados com IC_{50} < 15 μM contra *T. cruzi*. 106
Tabela 15. Atividade e seletividade *in vitro* dos derivados com modificações no *linker* **117** - **120** contra *T. cruzi* e *L. infantum.* 108
Tabela 16. Propriedades ADME *in vitro* do *hit* **2** e dos derivados com IC_{50} < 15 μM contra *L. infantum*..... 112
Tabela 17. Propriedades ADME *in vitro* do *hit* **2**, do análogo 4-feniltiazol com modificação no *linker* **117**, e de derivados selecionados com IC_{50} < 15 μM. 115

Tabela 18. Atividade *in vitro* contra *T. cruzi* (cepa *Dm28c-Luc*) de compostos selecionados e ensaios de *washout* de 3 dias. 117
Tabela 19. Inibição de cruzaína (Cz) *in vitro* e IC_{50} contra Cz dos derivados **2** e **94** - **108**... 120
Tabela 20. Avaliação da possibilidade de formação de agregados por **104**. 122
Tabela 21. Valores de V_{max} e K_m para a inibição de Cz com **107**. 122

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntese do *hit* **1**. 42
Esquema 2. Síntese dos derivados amida, sulfonamida e fenol **5** - **13**. 46
Esquema 3. Síntese dos derivados picolínicos e nicotínicos **14** - **24**. 49
Esquema 4. Síntese dos derivados *para*-substituídos **25** - **29**. 52
Esquema 5. Síntese dos derivados **30** - **34**. 54
Esquema 6. Síntese dos derivados disubstituídos **35** - **44**. 57
Esquema 7. Síntese dos derivados com modificações no fragmento arila **53** - **64**..... 62
Esquema 8. Tentativas de derivatização por S_NAr e acoplamento de amida a partir de **62**. 63
Esquema 9. Síntese do derivado diamida **67**. 63
Esquema 10. Síntese das pirazinas com substituintes carboxílicos **70 - 75.** 67
Esquema 11. Síntese dos derivados com modificações no *linker* **79** - **81**. 71
Esquema 12. Síntese dos híbridos *para*-trifluorometilpiridina **82** - **92**. 74
Esquema 13. Síntese do híbrido de *N*,*N*-dimetilaminoetoxila **93**. 74
Esquema 14. Síntese otimizada de **6** em maior escala. 83
Esquema 15. Síntese do *hit* **2** e dos derivados com modificações no lado direito (LD) **94** - **108**. 96
Esquema 16. Síntese do intermediário 4-feniltiazol-2-amina **110** e dos derivados aminotiazolamida com modificações no *linker* **117** - **120**. 98

RESUMO

Este trabalho detalha a otimização *hit-to-lead* de duas séries de compostos contra a leishmaniose visceral e a doença de Chagas, duas doenças tropicais negligenciadas (DTNs) parasitárias. A série das pirazinilpiperazinas foi otimizada contra leishmaniose visceral a partir do *hit* **1**, proveniente da LeishBox, alvejando o parasita *Leishmania infantum*. Tal otimização envolveu um estudo extenso de relação estrutura-atividade, realizado nos três fragmentos estruturais de **1**. A primeira etapa da otimização focada no fragmento benzoíla identificou onze compostos com pelo menos o dobro da potência e da seletividade de **1**. Um destes foi o derivado *para*-hidroxila **6**, que permaneceu o candidato mais promissor para estudos *in vivo* após explorar 75 compostos com modificações em todos os fragmentos estruturais da série. A determinação *in vitro* do perfil ADME dele e de outros candidatos relevantes a estudos *in vivo* o confirmou como o mais indicado para tais estudos. Após reduzir a carga parasitária por mais de 90% em modelos da doença em camundongos, este derivado *para*-hidroxila de pirazinilpiperazina foi identificado como um novo composto *lead* para o tratamento da leishmaniose visceral, e a investigação do seu mecanismo de ação foi iniciada. A série dos tiazóis foi derivada do composto **2**, identificado *in silico* e validado *in vitro* como sendo um composto *hit* contra parasitas *Trypanosoma*. Este status contra *Trypanosoma cruzi* foi confirmado no presente trabalho, e foi ampliado de *hit* antitripanosomal para *hit* anti-kinetoplastida após confirmar sua atividade contra *Leishmania infantum*. Estudos de relação estrutura-atividade subsequentes identificaram vários tiazóis potentes contra cada parasita, com a série apresentando padrões de atividade radicalmente diferentes a depender do alvo parasitário, com compostos ativos contra *Trypanosoma cruzi* sendo inativos contra *Leishmania infantum* e inversamente. Após o estudo de vinte derivados, o *hit* inicial **2** permaneceu o tiazol mais potente contra *Trypanosoma cruzi*, embora um outro derivado também tenha apresentado uma atividade de nível nanomolar, porém inferior a **2**. No entanto, **2** e os derivados mais potentes contra *Trypanosoma cruzi* enfrentaram limitações devidas à instabilidade metabólica deles, os impedindo de chegar a estudos *in vivo* apesar de terem um mecanismo de ação promissor, conforme investigações *in vitro*. Esta limitação metabólica foi finalmente superada pelas diaminas **99** e **100**, que foram, juntas com **2**, os tiazóis mais potentes contra *Leishmania infantum*, assim resultando na identificação de dois novos tiazóis candidatos a *lead* contra leishmaniose visceral.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, *Trypanosoma cruzi*, perfil farmacocinético, descoberta de fármacos, descoberta de *lead*, mecanismo de ação.

ABSTRACT

This work details the hit-to-lead optimization of two series of compounds against two parasitic neglected tropical diseases (NTDs), visceral leishmaniasis and Chagas disease. The pyrazinylpiperazine series was optimized from the LeishBox hit **1** against visceral leishmaniasis, targeting *Leishmania infantum*. Such optimization was achieved after an extensive structure-activity relationship study, carried out on all three structural fragments of **1**. The first round of optimization, focused on the benzoyl fragment, delivered eleven compounds at least twice as potent and selective as **1**. One of these was the *para*-hydroxyl derivative **6**, which remained the most promising candidate for *in vivo* studies after exploring 75 compounds featuring modifications on all three structural fragments of the series. *In vitro* determination of its ADME profile, alongside other relevant *in vivo* candidates, confirmed **6** as the most relevant one for such an assessment. After reducing the parasitemia by over 90% in a BALB/c mice model of visceral leishmaniasis, this *para*-hydroxyl pyrazinylpiperazine derivative was effectively identified as a new lead compound for the treatment of visceral leishmaniasis, and an early investigation of its mechanism of action and molecular target was performed. The thiazole series was derived from compound **2**, identified *in silico* and confirmed *in vitro* as a hit against *Trypanosoma* parasites. Such a status against *Trypanosoma cruzi* was further confirmed in the present work, and was extended from antitrypanosomal hit to anti-kinetoplastid hit after confirming its activity against *Leishmania infantum*. Thence, subsequent structure-activity relationship efforts identified several potent thiazole derivatives against either parasite, though the series showed radically different patterns of activity depending on the target parasite, leaving compounds active against *Trypanosoma cruzi* inactive against *Leishmania infantum*, and the other way around. After the assessment of twenty derivatives, the initial hit **2** remained the most potent thiazole against *Trypanosoma cruzi*, though another derivative displayed activity in the nanomolar range as well, albeit being less potent than **2**. However, **2** and the most potent derivatives against *Trypanosoma cruzi* faced heavy limitations due to metabolic instability, preventing them from reaching *in vivo* assessment, despite showing a promising mechanism of action according to *in vitro* investigations. This metabolic liability was finally overcome by the two diamine derivatives **99** and **100**, which were together with **2** the most potent thiazoles against *Leishmania infantum*, thus resulting in the identification of two new thiazole lead candidates against visceral leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania infantum*, *Trypanosoma cruzi*, pharmacokinetics, drug discovery, lead discovery, mechanism of action.

I) INTRODUÇÃO

Os parasitas kinetoplastida são protozoários responsáveis por diversas infecções em seres humanos, que são pela maioria classificadas como doenças tropicais negligenciadas (DTN). Dentro das doenças classificadas como DTNs, a doença de Chagas e a leishmaniose visceral são duas que se espalharam para a maioria das regiões do mundo, se não for para todas. A doença de Chagas impacta principalmente as Américas, enquanto o sudeste da Ásia e a América do Sul são as regiões mais afetadas pela leishmaniose visceral, com seis países (o Brasil, a Índia, o Nepal, o Bangladesh, o Sudan, e a Etiópia) concentrando mais de 90% dos novos relatos da doença.[1–4] Aproximadamente 6 a 7 milhões de novos casos de doença de Chagas declaram-se a cada ano, causando 14,000 mortes, enquanto de 50 000 a 90 000 indivíduos são afetados pela leishmaniose visceral e de 20 000 a 40 000 falecem por conta da doença no mesmo período.[5–7]

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), um parasita aparentado ao *Trypanosoma brucei*, o agente causativo da Tripanossomíase Humana Africana (HAT, também conhecida como doença do sono), e que pertence ao mesmo gênero.[8] Os parasitas *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (*L. infantum*) pertencem ao gênero *Leishmania* e são os dois principais responsáveis pela leishmaniose visceral, sendo a localização geográfica o principal fator determinando por qual das duas espécies de *Leishmania* a doença é causada.[9,10] O ciclo de vida dos parasitas *Trypanosoma* e *Leishmania* segue etapas semelhantes, o que se traduz por semelhanças nos padrões de infecção e transmissão aos mamíferos para as duas doenças.[8]

A doença de Chagas é principalmente transmitida a seres humanos através da liberação por insetos *Triatominae* de fezes contendo tripomastigotas de *T. cruzi* ao morderem humanos, embora outras vias de transmissão que não envolvem um vetor inseto tenham sido reportadas.[2,8,11] Após terem infectado células na área da infecção, os tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas intracelulares, e replicam-se dentro das células infectadas. Em seguida, o ciclo de vida de *T. cruzi* chega ao fim após sua ingestão por um inseto *Triatominae* sadio, na sua forma encontrada na corrente sanguínea humana em decorrência de uma diferenciação previa do parasita da forma amastigota para tripomastigota.[8,11] Enfim, uma última diferenciação dos tripomastigotas de *T. cruzi* em epimastigotas ocorre dentro do vetor inseto, permitindo assim a replicação do parasita dentro do trato gastrointestinal dos *Triatominae*

seguida pela re-diferenciação deles em tripomastigotas, encerrando o ciclo de vida de *T. cruzi*.[8,11]

A leishmaniose visceral também precisa de um vetor para ser transmitida a seres humanos, *via* a picada de diferentes espécies de mosquitos *Phlebotominae*, ou "mosquito-palha", liberando promastigotas de *L. infantum* dentro da pele do futuro hóspede humano.[8] Após terem sido fagocitados por macrófagos humanos, o parasita diferencia-se em sua forma amastigota, que corresponde à forma intracelular dele, e inicia sua replicação dentro dos macrófagos. A penúltima etapa do ciclo de vida consiste na ingestão do parasita por um inseto *Phlebotominae* sadio, que, ao picar o hóspede infectado, ingere assim macrófagos infectados por amastigotas de *L. infantum*.[8,12,13] O ciclo de vida de *L. infantum* é completado após uma última diferenciação dos amastigotas em promastigotas dentro do trato gastrointestinal do inseto vetor, seguido pela migração dos promastigotas na probóscide do inseto *Phlebitominae*, completando assim o ciclo e permitindo a infecção de outros hóspedes humanos pelo vetor assim infectado.[8,13]

Apesar de apresentarem similaridades no ciclo de vida e nos padrões de infecções, tais similaridades não são refletidas pelas manifestações clínicas das duas doenças. A doença de Chagas separa-se em duas fases, a fase aguda sendo a fase inicial durante a qual o diagnóstico revela-se particularmente desafiador, considerando que os pacientes geralmente permanecem assintomáticos ou sentem apenas uma leve febre. A letalidade da doença de Chagas se dá por conta dos sintomas surgindo durante a fase crônica da doença, que se apresenta décadas após a fase aguda e aflita de 30 a 40% dos pacientes com falha cardíaca, complicações cárdio-digestivas ou megaesôfago.[2,5,14] A leishmaniose visceral não apresenta a mesma evolução em duas fases que a doença de Chagas, e os sintomas resultando de uma infecção por *Leishmania* manifestam-se geralmente alguns dias após tal infecção. Tais sintomas principalmente consistem em episódios de febre prolongada, anemia, pancitopenia (ou seja, uma redução significativa da quantidade de células sanguíneas), uma substancial perda de peso corporal, hepatomegalia, esplenomegalia, e a aparição de manchas escuras características na pele, com a combinação destes sintomas resultando na morte do indivíduo infectado em 90% dos casos na ausência de tratamento.[12,15]

Em detrimento da severidade dos sintomas e da letalidade dessas doenças, as opções terapêuticas apropriadas para a doença de Chagas e a leishmaniose visceral permanecem limitadas, tanto em termos de diversidade das opções quanto em termos de limitações inerentes a tais tratamentos. Os únicos fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas são

o benznidazol (**Bzn**) e o nifurtimox, dois compostos nitroheterocíclicos desenvolvidos na década de 1970 (Figura 1)[8,16], enquanto o tratamento da leishmaniose visceral conta com um leque levemente mais amplo de compostos aprovados por agências regulatórias no mundo inteiro incluindo a anfotericina B (**AmB**), a pentamidina, a miltefosina, e antimoniais pentavalentes como o estibogluconato de sódio ou o antimoniato de meglumina (Figura 1).[6,8,13] No entanto, todas estas opções terapêuticas enfrentam limitações importantes, como uma eficácia limitada e/ou dependente do caso, efeitos secundários indesejáveis pesados associados com uma alta toxicidade, um custo alto por dose, e o surgimento de cepas parasíticas resistentes aos tratamentos em algumas regiões do planeta.[8,16–21]

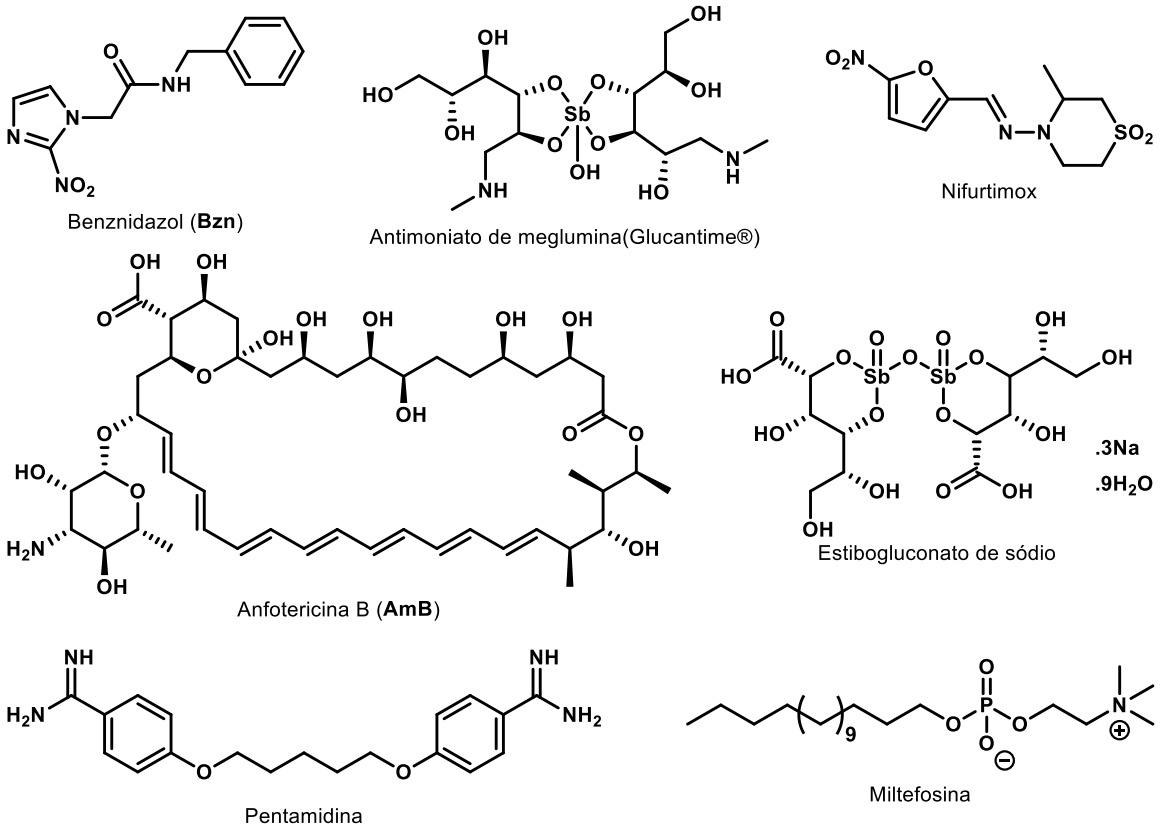


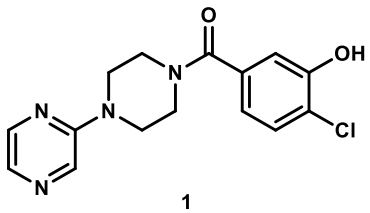
Figura 1. Exemplos de opções terapêuticas atualmente usadas para o tratamento da doença de Chagas e da leishmaniose visceral.

Devido às limitações atuais e crescentes dos tratamentos existentes, diversas iniciativas foram promovidas, com o objetivo de identificar novos candidatos a fármacos para tratar a doença de Chagas ou a leishmaniose visceral, superando as limitações apresentadas pelos tratamentos atuais.[1,16,22–24]

Uma destas incentivas constituiu na triagem de alta eficiência (HTS, *high-throughput screening*) de uma quimioteca interna da farmacêutica GSK constituída por 1.8 milhão de

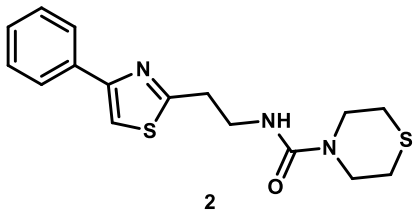
compostos, avaliando a atividade deles contra diversos parasitas kinetoplastidas e resultando na construção de três bibliotecas reagrupando compostos com atividade (*hits*) contra *L. donovani*, *T. cruzi* e *T. brucei*, chamadas LeishBox, ChagasBox e HATBox, respectivamente.[25] O *hit* inicial (composto **1**) da primeira série de compostos apresentada no presente trabalho, otimizada para o tratamento de leishmaniose visceral, foi então selecionado dentro da LeishBox, devido à boa atividade contra *L. donovani* e baixa toxicidade reportadas (Figura 2)[25], às possibilidades de otimização e modificação estrutural oferecidas pela estrutura de **1**[26] e à ausência de outros estudos de otimização *hit-to-lead* envolvendo o *scaffold* pirazinilpiperazina de **1** publicados antes do início do projeto.

Outros trabalhos realizados por dois grupos de pesquisa de maneira independente um do outro focaram no *scaffold* 2-etiltiazol para o tratamento da doença do sono, levando à exploração extensa desta classe contra *T. brucei*.[27–30] No entanto, apesar da proximidade entre *T. brucei* e ambos *T. cruzi* e *L. infantum*, o potencial dos 2-etiltiazóis contra os dois últimos parasitas não foi explorado. Além disto, uma campanha *in silico* almejando a identificação de novos *hits* contra parasitas tripanosomatidas identificou **2** como um composto promissor contra *T. brucei* e *T. cruzi*, e validou *in vitro* o potencial dele, com uma potência de ordem nanomolar contra os dois parasitas (*T. brucei*: forma encontrada na corrente sanguínea, *T. cruzi*: forma epimastigota) e baixa toxicidade em células humanas (Figura 2).[31] Portanto, considerando que essas predições *in silico* e os resultados *in vitro* associados classificam **2** como um *hit* apropriado contra kinetoplastidas de acordo com recomendações padrão[26], e com o devido acordo dos autores do estudo que identificou **2**, este composto foi selecionado como um *hit* para a avaliação *in vitro* dele e para estudos de *hit-to-lead* subsequentes contra ambas a doença de Chagas e a leishmaniose visceral.



1

IC_{50} (*L. donovani*) = 0.31 µM
CC_{50} (HepG2) > 100 µM



2

IC_{50} (*Trypanosoma brucei brucei*) = 0.010 µM
IC_{50} (*T. cruzi* Tulahuen) = 0.071 µM
IC_{50} (*T. cruzi* CL-Brener) = 0.050 µM
CC_{50} (MRC-5) > 100 µM
CC_{50} (HEK-293) = 104.9 µM

Figura 2. Estrutura do *hit* de cada série apresentada no trabalho, e potência e toxicidade previamente reportadas (*hit* **1**: [25]; *hit* **2**: [31]).

Para orientar no desenvolvimento de novas opções terapêuticas contra a doença de Chagas e a leishmaniose visceral, pesquisadores da área sugeriram perfis aceitáveis e ideais para tais compostos, conhecidos como perfil de produto alvo (TPP, *Target Product Profile*, Tabela 1). No início da pesquisa exploratória, os critérios para definir e escolher compostos *hit* e *lead* contra ambas a doença de Chagas e a leishmaniose visceral são relativamente amplos e menos restritivos do que os TPPs para candidatos a fármacos contra as mesmas doenças (Tabela 1). Um *hit* deve, idealmente, apresentar um valor de IC_{50} inferior ou igual a 10 μM contra a forma intracelular (amastigota) de *T. cruzi* (para doença de Chagas), *L. donovani* (para leishmaniose visceral) ou *L. infantum* (para leishmaniose visceral), ter índice de seletividade (SI) > 10 ao comparar o IC_{50} contra o parasita com o valor de CC_{50} em células mamíferas, ter a sua estrutura confirmada por ressíntese, estar em adequação com as regras de Lipinski, e não precisar de mais de 8 etapas para ser sintetizado.[26,32] A respeito dos compostos *lead* contra a doença de Chagas, esses devem idealmente apresentar uma redução da parasitemia de 80% nos órgãos e tecidos em modelos de fase aguda da doença de Chagas em camundongos, ou eliminar os parasitas (indetectáveis) e prolongar a vida dos animais tratados por 10 doses administradas por via oral.[26,32] Os *leads* contra leishmaniose visceral deveriam reduzir a carga parasitaria no fígado por ao menos 70% em modelos de camundongos infetados por *L. donovani* ou *L. infantum*, após administração intraperitoneal.[26,32] Além disto, os *leads* contra essas duas doenças deveriam, idealmente, apresentar um SI > 100, ter um perfil farmacocinético e uma estabilidade metabólica aceitáveis (*clearance* intrínseco < 50 μL/min/mg e meia-vida > 30 min), e serem isentos de toxicidade aguda *in vivo* e de fragmentos reativos ou toxicóforos.[26,32] Na fase de otimização do *lead*, os critérios dos TPPs para candidatos a fármacos contra a doença de Chagas e a leishmaniose visceral estão mais estritos, por tratar-se de potenciais fármacos. Para a doença de Chagas, um candidato aceitável tem que apresentar uma eficácia pelo menos igual ao **Bzn** para tratar a fase crônica da doença em adultos e um perfil de segurança superior ao mesmo fármaco de referência, sem induzir genotoxicidade ou arritmia cardíaca. O candidato aceitável tem ainda que ser administrável de forma oral, sem interações com fármacos antiarrítmicos ou anticoagulantes, e ser estável por 3 anos em zona climática IV.[11,16,19,33] O fármaco ideal para o tratamento da doença de Chagas tem, além dos requerimentos de um fármaco meramente aceitável, que ser utilizável para o tratamento da fase aguda da doença, sendo superior ao **Bzn** para o tratamento de ambas as fases da doença de Chagas, sem interagir com nenhum outro fármaco, e não pode induzir teratogenicidade. Ainda, o tratamento por via oral tem que ser duração menor de 30 dias, com o menor custo possível, e o fármaco deve poder ser conservado por 5 anos em zona climática IV.[11,19,33] Para a leishmaniose visceral, um

composto otimizado tem que demonstrar uma eficácia clínica superior a 95% contra todas as espécies de *Leishmania* causadoras da doença, em pacientes tanto imunocompetentes quanto imunodeficientes em todas as áreas do planeta, com atividade contra cepas resistentes aos fármacos atuais.[20,34,35] Da mesma maneira que o candidato ideal contra a doença de Chagas, o candidato ideal para o tratamento da leishmaniose visceral não pode interagir com outras medicações, não pode apresentar contraindicações nem levar a efeitos adversos ou precisar de algum monitoramento de segurança, e deve ser administrável por via oral para um tratamento de no máximo 10 dias ou por no máximo 3 injeções intramusculares no mesmo período, custando menos de US$10 per dose e sendo estável por 3 anos em regiões tropicais.[20,34,35]

Tabela 1. Resumo dos critérios para compostos *hit*, *lead* e perfil de produto alvo (TPP) para o tratamento da doença de Chagas e da leishmaniose visceral.

Critério	***Hit***		***Lead***		**TPP**	
	Chagas	**Leishmaniose**	**Chagas**	**Leishmaniose**	**Chagas**	**Leishmaniose**
Potência *in vitro*	IC_{50} < 10 µM (*T. cruzi*, amastigota)	IC_{50} < 10 µM (*L. infantum* ou *L. donovani*, amastigota)	Melhorias em relação ao *hit*, idealmente IC_{50} < 1 µM		NA	
Seletividade *in vitro*	SI > 10 comparando com o CC_{50} em células mamíferas.		SI > 100		NA	
Eficácia *in vivo*	Não aplicável (NA).		Redução da parasitemia > 80% em modelos de fase aguda, ou redução total e prorrogação da vida dos animais tratados.	Redução da parasitemia > 70% em modelos de infecção por *L. infantum* ou *L. donovani*.	Aceitável: eficácia igual ou superior ao **Bzn** para tratamento da fase crônica. Ideal: eficácia superior ao **Bzn** para ambas as fases.	Eficácia clínica > 95% contra todas as espécies de *Leishmania*, incluindo cepas resistentes, em pacientes com e sem imunodeficiência, em todas áreas geográficas.
ADME	Adequação com as regras de Lipinski.		Perfil farmacocinético aceitável. Estabilidade metabólica: Cl_{int} < 50 µL/min/mg e $t_{1/2}$ > 30 min.		NA	
Segurança	NA		Ausência de toxicidade aguda *in vivo*, nenhum fragmento reativo e/ou toxicóforo.		Aceitável e ideal: Superior ao **Bzn**.	Nenhum efeito adverso, sem necessidade de monitoramento.
Administração	NA		Via oral.	Via oral ou intraperitoneal.	Aceitável e ideal: Via oral, menos de 30 dias.	Via oral: menos de 10 dias. Via intraperitoneal: 3 injeções em até 10 dias.
Contra-indicações	NA		NA		Aceitável: sem indução de genotoxicidade ou arritmia cardíaca.	Nenhuma.

Interação com fármacos	NA	NA	Ideal: igual o aceitável + sem teratogenicidade. Aceitável: sem interação com antiarrítmicos ou anticoagulantes. Ideal: nenhuma.	Nenhuma.
Estabilidade	Estrutura confirmada por ressíntese.	*Vide* critérios de estabilidade metabólica.	Aceitável: 3 anos em zona IV. Ideal: 5 anos em zona IV.	3 anos em regiões tropicais.
Custo	< 8 etapas de síntese.	NA	Menor possível.	< US$10 per dose.

Para desenvolver estas novas opções terapêuticas cujo perfil ideal foi previamente apresentado, segue-se um processo de desenvolvimento de fármacos dividido em várias etapas, representado na Figura 3. O planejamento estratégico do processo começa na identificação de um alvo relevante para a doença almejada, cuja relevância têm que ser confirmada para dar-se início ao desenvolvimento do projeto. Com o alvo confirmado, inicia-se o processo de identificação de um composto *hit*, caracterizado como sendo um composto demonstrando atividade *in vitro* contra o alvo. Vários métodos existem para a identificação do *hit*, os mais comuns sendo a triagem virtual, baseada em métodos *in silico*, e a triagem de alta eficiência (HTS, *high-throughput screening*), explorando um ensaio *in vitro* previamente desenvolvido para identificar *hits* contra o alvo de maneira rápida e robusta em quimiotecas de milhares a milhões de compostos. Esta última triagem encontra-se mais frequentemente na indústria, cujas quimiotecas e cujos recursos são geralmente mais adequados para este tipo de ensaio do que aqueles encontrados no âmbito acadêmico. Com o *hit* assim identificado, inicia-se o processo de *hit-to-lead*, que almeja, a partir do *hit*, identificar um composto otimizado com maior atividade e seletividade *in vitro* e apresentando eficácia *in vivo* contra o alvo (Figura 4). Para isto, dezenas de análogos estruturais do *hit* são geralmente planejados, sintetizados, caracterizados e avaliados *in vitro*, a fim de identificar os compostos mais promissores contra o alvo *in vitro*. O perfil farmacocinético destes compostos mais promissores pode também ser avaliado, com o intuito de refinar mais ainda a seleção de um ou vários compostos a serem avaliados *in vivo*, permitindo assim a identificação do composto *lead* da série, que é o composto com maior eficácia em modelos da doença em animais infectados pelo alvo (Figura 4). Após a identificação do *lead*, o processo de desenvolvimento de fármacos segue com a fase de otimização do *lead* (*lead optimization*), em qual um foco maior é dado para o perfil farmacocinético dos compostos, seja ele *in vitro* (perfil ADME) ou *in vivo* (perfil DMPK), a

segurança dos compostos *in vivo* e a eficácia *in vivo* deles, ambas tendo que ser maximizadas. Assim, a fase de *lead optimization* permite identificar um candidato clínico, que será em seguida avaliado em ensaios clínicos em seres humanos, e finalmente, caso tenha sucesso nestes ensaios clínicos, será aprovado por agências regulatórias e disponibilizado para uso da comunidade médica e dos consumidores (Figura 3).

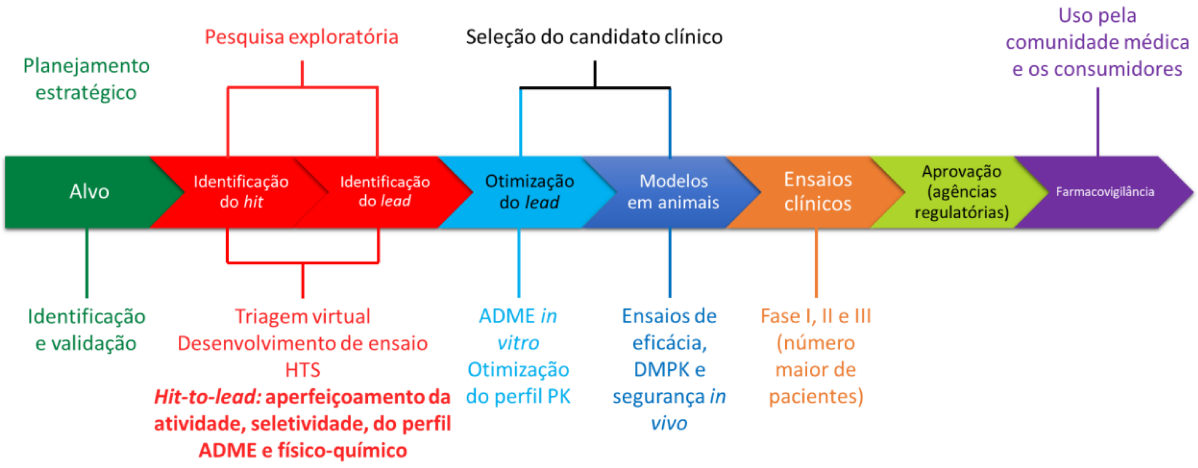


Figura 3. Processo de descoberta de fármacos.

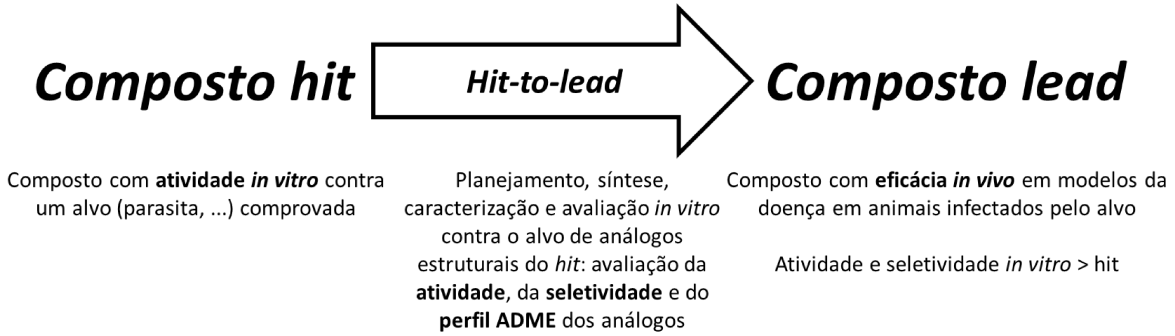


Figura 4. Processo *hit-to-lead*.

Considerando as recomendações e os perfis de compostos *hit*, *lead* e candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Chagas e da leishmaniose visceral previamente apresentados, foi realizado no presente trabalho a otimização de *hit* para *lead* (*hit-to-lead*) de uma série de pirazinilpiperazinas baseada no *hit* **1** contra a leishmaniose visceral, assim como foi desenvolvido um estudo similar com uma série de tiazóis a partir do *hit* **2** contra ambas a doença de Chagas e a leishmaniose visceral. A estratégia geral seguida nesta otimização está

representada na Figura 5. Brevemente, a partir da estrutura de cada *hit*, análogos com modificações estruturais foram planejados e, em seguida, sintetizados e caracterizados por RMN e HRMS. Com a estrutura dos análogos confirmada, os mesmos foram avaliados *in vitro* contra *L. infantum* em macrófagos THP-1 e/ou contra *T. cruzi* em células L929. Tal avaliação determinou a atividade dos compostos contra cada parasita, medida através do valor de concentração inibitória meio-máxima (IC_{50}), os compostos mais ativos tendo valores menores de IC_{50}. A citotoxicidade em células sadias dos compostos também foi avaliada, por meio do valor de concentração citotóxica meio-máxima (CC_{50}), com os compostos menos citotóxicos sendo aqueles para quais o valor de CC_{50} foi maior. O índice de seletividade (SI) de cada composto também foi determinado, pelo quociente de CC_{50} pelo IC_{50} ($SI = CC_{50}/IC_{50}$), com valores de SI altos sendo indicativos de compostos mais seletivos e, portanto, mais seguros. Assim, os melhores compostos em termos de atividade, citotoxicidade e seletividade foram identificados para cada lote de derivados planejados, e serviram de base para o planejamento dos futuros lotes de derivados. Em paralelo, seus perfis farmacocinéticos também foram avaliados *in vitro*, de maneira a identificar os compostos mais indicados para ensaios *in vivo*. Tais perfis incluíram propriedades essenciais para que um composto possa ter uma biodisponibilidade adequada em seres vivos, como permeabilidade gastrointestinal, permeabilidade hematoencefálica, lipofilicidade (calculada, exprimida como clog(P), e experimental, exprimida como elog(D)), solubilidade aquosa, e estabilidade metabólica, determinada pela medida do tempo de meia-vida e do *clearance* intrínseco de cada composto. Finalmente, a avaliação *in vivo* permitiu identificar novos compostos *lead*. A parte dedicada às pirazinilpiperazinas inclui uma relação estrutura-atividade (SAR) contra *L. infantum* focando sucessivamente nos fragmentos benzoíla, pirazina e *linker* piperazina de **1**, a avaliação farmacocinética dos derivados mais promissores provenientes deste SAR, e finalmente a avaliação da eficácia *in vivo* contra *L. infantum* do derivado mais relevante acompanhada por investigações do seu mecanismo de ação. A parte dos tiazóis apresenta um estudo de SAR contra *T. cruzi* e *L. infantum*, seguido por uma apresentação da relação estrutura-propriedade (SPR) derivada do perfil farmacocinético dos derivados com maior potencial antiparasitário, e uma seção dedicada ao mecanismo de ação dos tiazóis contra *T. cruzi*, incluindo ensaios de *washout* e inibição de cruzaína (Cz), encerra o trabalho.

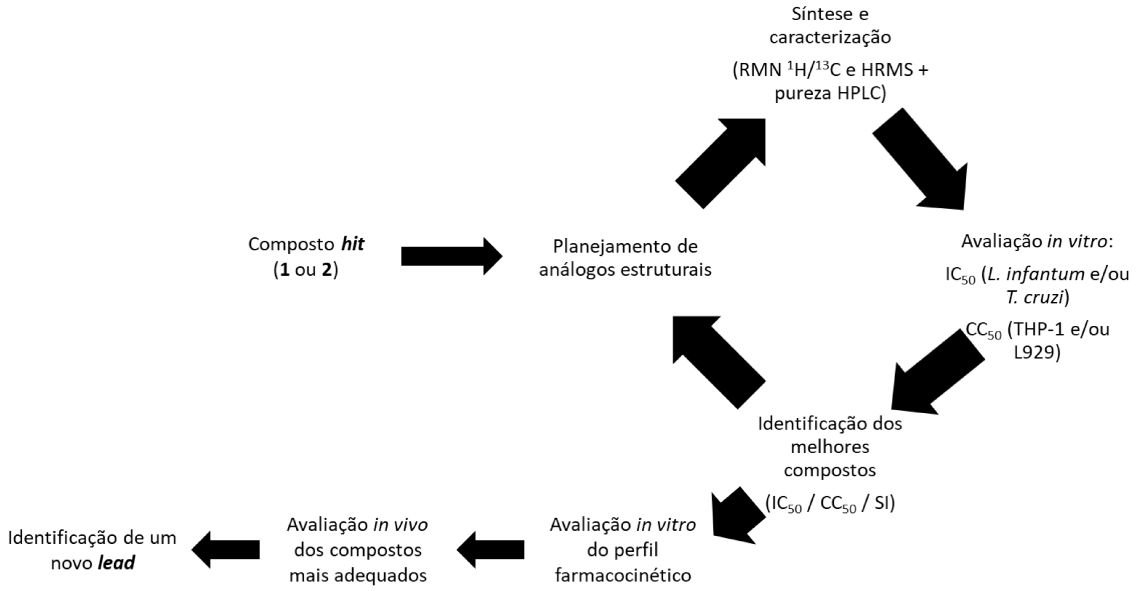


Figura 5. Estratégia geral seguida para a otimização *hit-to-lead* das duas classes de compostos.

II) OBJETIVOS DO TRABALHO

O objetivo principal deste trabalho almeja otimizar uma série de pirazinilpiperazinas contra *L. infantum* e uma série de tiazóis contra *T. cruzi* e/ou *L. infantum*, a partir do *hit* **1** para a série das pirazinilpiperazinas e do *hit* **2** para os tiazóis, idealmente otimizando as duas séries até o status de *lead* contra os respectivos alvos.

Os objetivos específicos são:

- Sintetizar e caracterizar os *hits* **1** e **2** para confirmar *in vitro* a potência (IC_{50}) deles contra *L. infantum* (para **1**) ou *T. cruzi* e *L. infantum* (para **2**), e suas citotoxicidades (CC_{50}) em células hospedeiras sadias (macrófagos THP-1 para *L. infantum*, células L929 para *T. cruzi*).

- Planejar, sintetizar, caracterizar e avaliar *in vitro* a potência contra *L. infantum* e a citotoxicidade de derivados de **1** com modificações nos três fragmentos (benzoíla, pirazina, e *linker* piperazina), levando em consideração as conclusões de cada série de modificações para o planejamento dos derivados subsequentes.

- Planejar, sintetizar e caracterizar uma ou várias pirazinilpiperazinas combinando os fragmentos mais promissores, e avaliar a potência e citotoxicidade *in vitro* dele(s).

- Planejar, sintetizar, caracterizar e avaliar *in vitro* a potência contra *T. cruzi* e *L. infantum* e a citotoxicidade de derivados de **2** com modificações nos três fragmentos (tiomorfolina, feniltiazol, e *linker* etila), levando em consideração as conclusões de cada série de modificações para o planejamento dos derivados subsequentes.

- Avaliar *in vitro* o perfil farmacocinético dos compostos mais promissores de cada série contra os respectivos parasitas.

- Avaliar a eficácia *in vivo* contra o(s) respectivo(s) parasita(s) dos compostos para quais a combinação da atividade *in vitro*, do perfil farmacocinético *in vitro* e do perfil de toxicidade aguda seja a mais adequada.

- Investigar o mecanismo de ação, incluindo alvos moleculares potenciais e/ou outros bioprocessos relevantes, dos compostos mais relevantes em cada série, usando métodos *in silico* e *in vitro*.

III) OTIMIZAÇÃO DA SÉRIE DE PIRAZINILPIPERAZINAS CONTRA LEISHMANIOSE

Todos os derivados de pirazinilpiperazina planejados foram sintetizados, caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{1}H e ^{13}C, espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, somente para o composto **6**), e testados em modelos *in vitro* contra a forma amastigota de *L. infantum*. Adicionalmente, os derivados com modificações no fragmento benzoíla (*hit* **1** e **5** – **44**) foram também testados contra amastigotas de *L. braziliensis*. A citotoxicidade de todas as pirazinilpiperazinas foi avaliada *in vitro* em macrófagos THP-1, e as propriedades ADME dos derivados mais ativos e seletivos foram avaliadas *in vitro*. O derivado com a combinação de atividade, seletividade e perfil farmacocinético mais relevante (composto **6**) foi avaliado *in vivo* em modelos de camundongos de leishmaniose visceral, e o mecanismo de ação dele foi investigado.

O planejamento para a exploração desta série seguiu a estratégia geral apresentada na Figura 5, e a sequência do estudo de SAR está apresentada na Figura 6. O primeiro fragmento de **1** a ter sido explorado foi o fragmento benzoíla. O tipo de anel aromático e a natureza, posição e efeitos eletrônicos dos substituintes deste anel foram as principais características exploradas no fragmento benzoíla, que para a maioria dos compostos permaneceu ligado à piperazina *via* uma função amida. Em seguida, mantendo na estrutura o fragmento benzoíla para qual a atividade e seletividade foram as melhores, o fragmento pirazina foi investigado, explorando principalmente o tipo de anel azina e seus possíveis substituintes, e o *linker* piperazina ficou finalmente no foco do estudo, avaliando trocas bioisostéricas da piperazina. Derivados híbridos, combinando os fragmentos mais promissores identificados, foram também considerados (Figura 6).

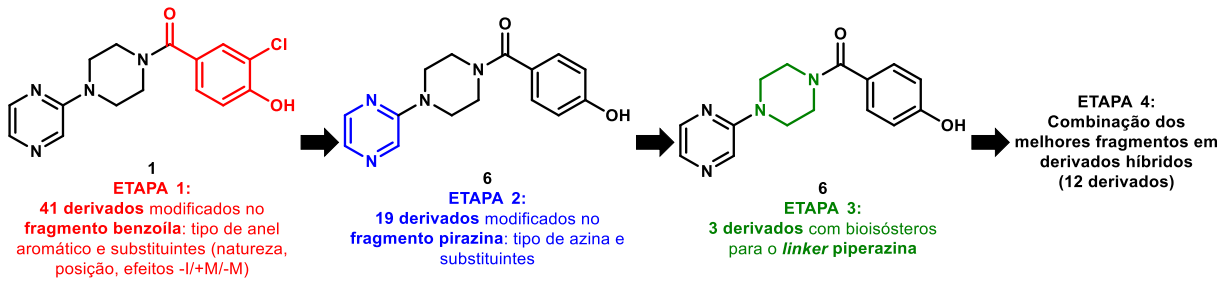
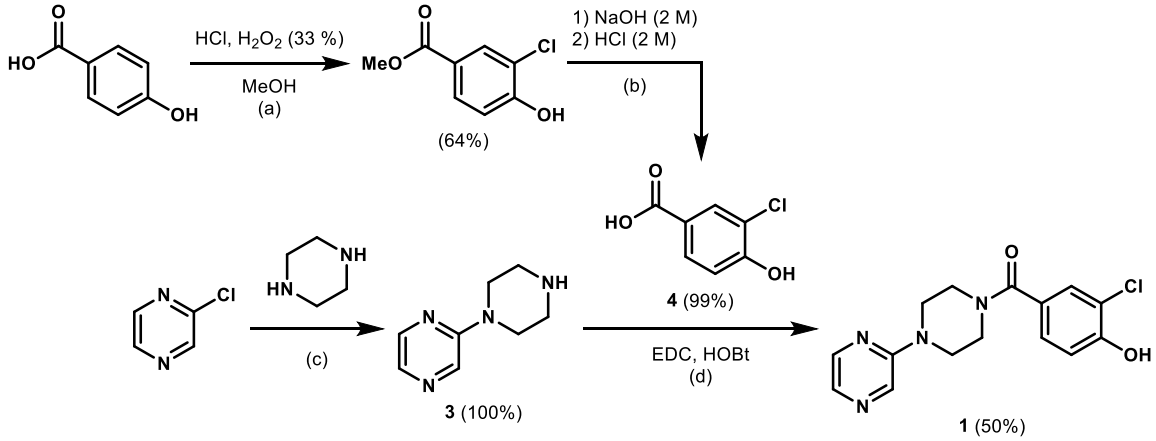


Figura 6. Planejamento para o estudo de SAR da série de pirazinilpiperazinas.

III) 1. Síntese e atividade biológica do *hit* inicial 1 e dos derivados com modificações no fragmento benzoíla

III) 1. 1. Síntese e atividade biológica do *hit* inicial 1

Primeiramente, o *hit* **1** foi sintetizado a partir dos compostos **3** e **4**, seguindo uma rota convergente (Esquema 1). **3** foi obtido graças à uma substituição nucleofílica aromática (S_NAr) na 2-cloropirazina com um excesso de piperazina em isopropanol, e **4** foi o produto da mono-cloração do ácido 4-hidroxibenzoico em metanol seguida da hidrólise do éster metílico formado na primeira etapa. Finalmente, uma amidação mediada por EDC/HOBt entre **3** e **4** deu o *hit* **1** com 50% de rendimento.



Esquema 1. Síntese do *hit* **1**.

Reagentes e condições: (a) 70 ºC, 3 h, 64% (b) 1) MeOH, ta, 2 h 2) 0 ºC, 99% (c) Na_2CO_3, iPrOH, 80 ºC, 24 h, 95% (d) Et_3N, DMF, ta, 48 h, 50%.

A estrutura de **1** foi confirmada por espectroscopia RMN de ^1H e ^{13}C, assim como por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS). Os três sinais mais desblindados no espectro de RMN de ^1H (Figura 7), com deslocamentos em 8.10, 8.07 e 7.85 ppm, foram atribuídos aos três átomos de hidrogênio do anel pirazina, mais desblindados que os hidrogênios aromáticos do fragmento benzoíla por conta da presença de um átomo de nitrogênio endocíclico na vizinhança de cada hidrogênio do anel pirazina. Apesar da multiplicidade não ter ficado bem definida para esses três sinais, o dupleto mais blindado pôde ser atribuído ao átomo de hidrogênio em posição *orto* em relação à pirazina, devido ao efeito doador de elétrons por ressonância exercitado pela pirazina nesta posição *orto*, resultando assim num sinal mais blindado para este hidrogênio. O valor da constante de acoplamento também é coerente com uma constante de tipo J^{meta}, resultante de um acoplamento com o hidrogênio em posição *para* em relação à pirazina. Os três outros sinais na zona de deslocamento de hidrogênios aromáticos

foram atribuídos aos três hidrogênios do fragmento benzoíla, sendo o mais desblindado deles (7.41 ppm) atribuído ao hidrogênio *orto*-carbonila vizinho ao substituinte *meta*-cloro devido à constante de acoplamento dele, característica de um acoplamento *meta* (J = 1.8 Hz). O duplo dupleto em 7.20 ppm foi atribuído ao outro hidrogênio *orto*-carbonila, sendo este o único capaz de acoplar com acoplamentos *orto* (J = 8.3 Hz) e *meta* (J = 1.8 Hz), e o sinal em 6.94 ppm foi atribuído ao hidrogênio *meta*-carbonila, sendo ele mais blindado do que os outros dois hidrogênios benzoíla por conta do efeito doador de elétrons por ressonância do substituinte hidroxila. Finalmente, o multipleto referente a oito hidrogênios equivalentes foi atribuído aos hidrogênios do anel piperazina. No RMN de ^{13}C (Figura 8), o sinal mais desblindado é referente ao carbono da função amida, para quais deslocamentos entre 160 e 180 ppm são esperados. O sinal em 154.8 ppm foi atribuído ao carbono quaternário do anel pirazina, diretamente ligado a dois átomos de nitrogênio, mais eletronegativos e, portanto, responsáveis por este deslocamento. O carbono sustentando o substituinte hidroxila no fragmento benzoíla apresentou deslocamento em 153.1 ppm, e os três carbonos primários na pirazina tiveram deslocamentos de 141.9, 134.0 e 131.3 ppm, respectivamente, sendo o carbono *meta*-pirazina, não sujeito ao efeito doador por ressonância da pirazina, o mais desblindado dos três. Os dois carbonos *orto*-carbonila no fragmento benzoíla tiveram deslocamentos próximos, em 128.9 e 128.0 ppm, com o mais desblindado sendo aquele mais próximo ao substituinte *meta*-cloro, por conta do efeito retirador por indução deste. O sinal em 128.6 ppm, cuja menor intensidade é característica de carbonos quaternários, foi atribuído ao carbono do anel benzoíla diretamente ligado à carbonila da amida, por este carbono ser mais desblindado que o outro carbono quaternário deste fragmento, que sustenta o substituinte *meta*-cloro e é sujeito à doação de elétrons por ressonância por parte da hidroxila, e cujo sinal aparece em 120.3 ppm. Por fim, o carbono primário *meta*-carbonila foi associado com o sinal mais blindado da região aromática, em 116.4 ppm, e o sinal em 44.8 ppm foi atribuído aos oito carbonos da piperazina. Além destes dados de RMN confirmando a estrutura de **1**, o espectrograma de HRMS (Figura 9) deste composto também identificou massas condizentes com a estrutura dele com erro inferior a 5 ppm, com o sinal em 341.0773 *m/z* sendo referente ao aduto de **1** com sódio e o sinal em 343.0745 *m/z* sendo característico da presença de cloro na molécula, devido à série isotópica deste elemento. Foram também observados os sinais referentes ao cátion $[M+H]^+$ de **1** em 319.0954 *m/z* e ao aduto com potássio em 357.0513 *m/z*.

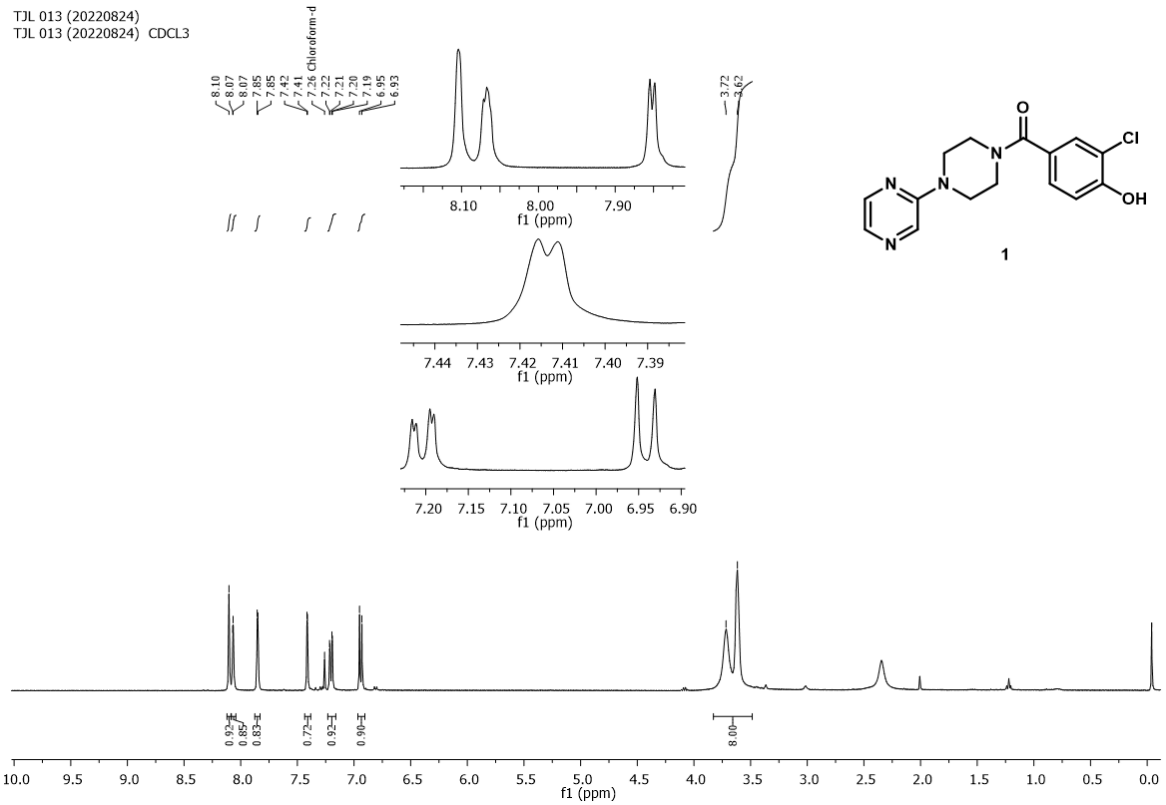


Figura 7. Espectro de RMN de ^{1}H de **1** (400 MHz, $CDCl_3$).

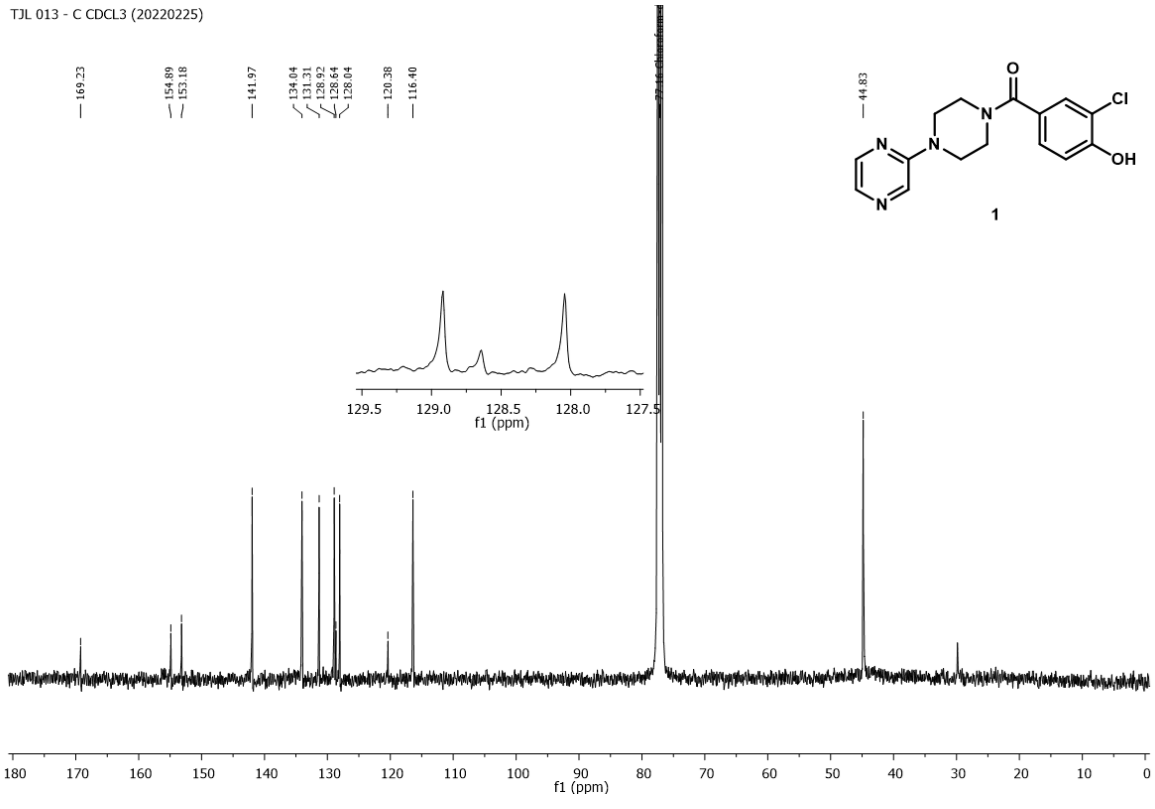


Figura 8. Espectro de RMN de ^{13}C de **1** (101 MHz, $CDCl_3$).

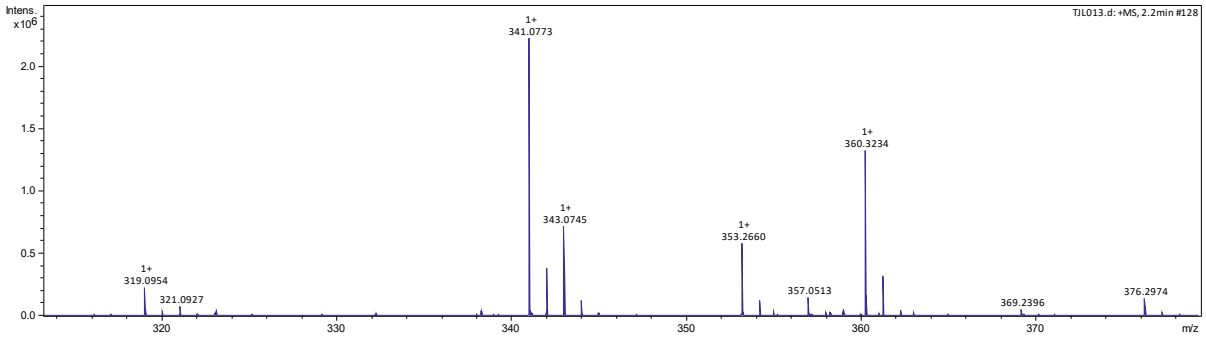
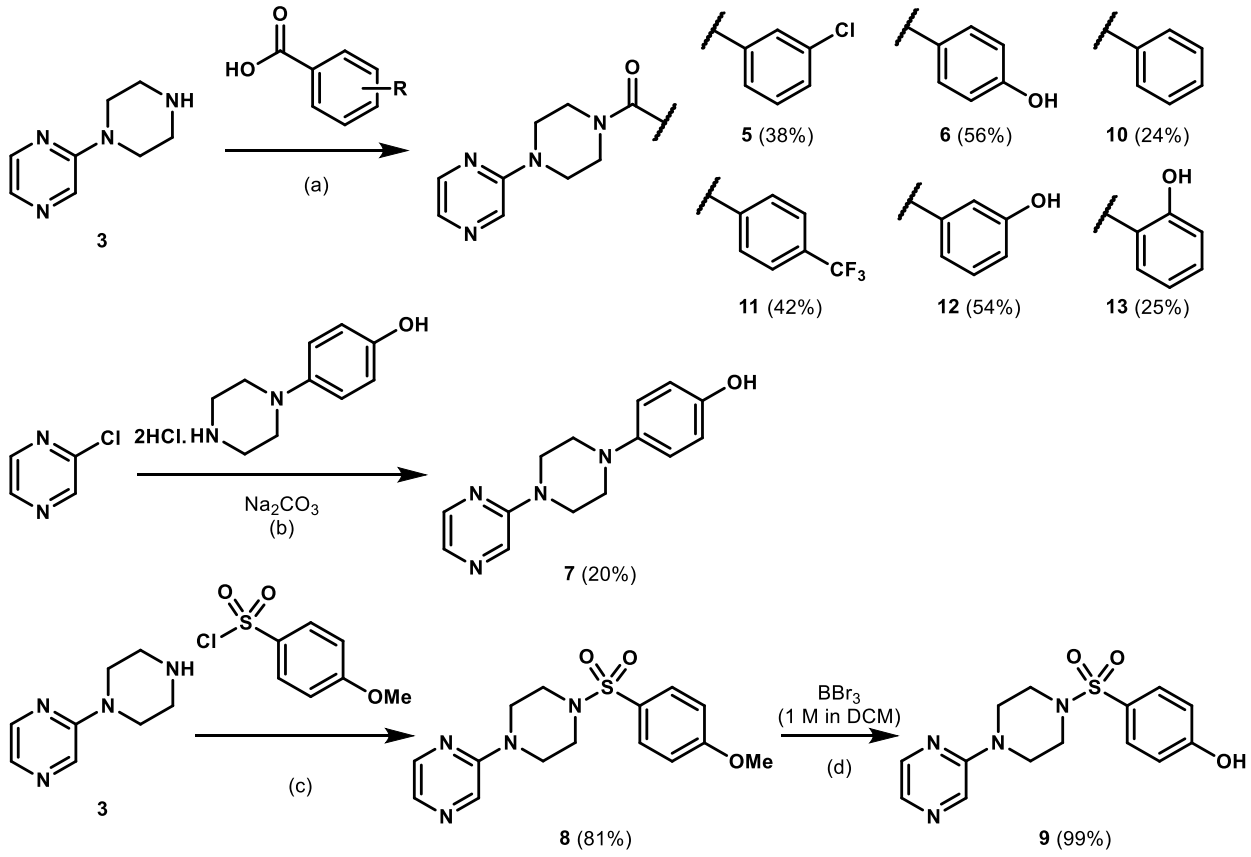


Figura 9. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **1**.

Com **1** sintetizado e caracterizado, foi possível confirmar a sua potência, que ficou menor no ensaio realizado neste trabalho (IC_{50} = 11.9 μM (*L. infantum*) e 11.7 μM (*L. braziliensis*)) do que previamente reportado (IC_{50} = 0.31 μM (*L. donovani*)).[25] Esta diferença pode provavelmente ser devida às diferenças tanto em termos do tipo de ensaio biológico realizado quanto em termos de espécies de parasitas *Leishmania* usadas nos ensaios.

III) 1. 2. Síntese e atividade biológica dos derivados de amida, sulfonamida e fenol 5 – 13

Em seguida, um primeiro lote de derivados foi planejado, para identificar os grupos farmacofóricos no anel benzoila de **1** (compostos **5** – **10**, **12** e **13**, Tabela 2) e avaliar a influência dos efeitos eletrônicos por ressonância sobre a atividade (composto **11**, Tabela 2). Os derivados de amida **5**, **6**, e **10** – **13** foram sintetizados com rendimentos de 25 a 56% a partir da amina (**3**) e do ácido carboxílico correspondente, usando EDC e HOBt como reagentes de acoplamento (Esquema 2). As únicas exceções foram a benzamida **10**, sintetizada usando cloreto de benzoila em condições básicas (24% de rendimento), e a *para*-trifluorometilbenzamida **11**, obtida em 42% de rendimento usando HBTU como reagente de acoplamento. O derivado de sulfonamida **8** foi preparado a partir da amina **3** e de cloreto de 4-metoxibenzenosulfonila, em condições básicas. A demetilação subsequente de **8** com BBr_3 permitiu isolar **9** com 99% de rendimento. O fenol **7** foi obtido da S_NAr na 2-cloropirazina com dicloridrato de 4-piperazinilfenol em condições básicas (Esquema 2).



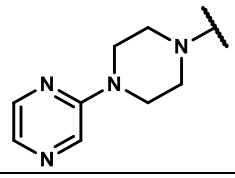
Esquema 2. Síntese dos derivados amida, sulfonamida e fenol **5** - **13**.

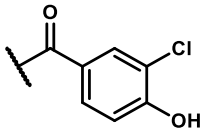
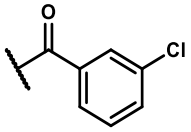
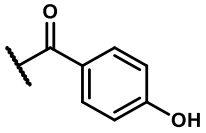
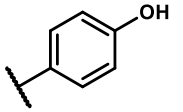
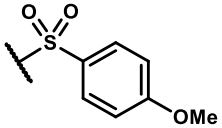
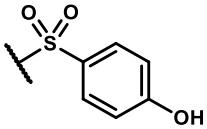
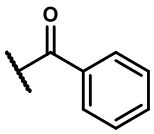
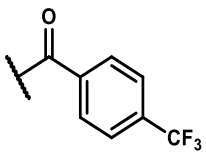
Reagentes e condições: (a) Para **5**, **6**, **12** e **13**: EDC, HOBt, Et_3N, DMF, ta, 18 – 50 h, 25 – 56% / Para **10**: PhCOCl, Et_3N, DCM, atm. Ar, ta, 24 h, 24% / Para **11**: HBTU, Et_3N, DMF, ta, 42 h, 42% (b) iPrOH/DMF (1:2), 90 ºC, 24 h, 20% (c) Et_3N, DCM, ta, 24 h, 81% (d) DCM, atm. Ar, 0 ºC – ta, 24 h, 99%.

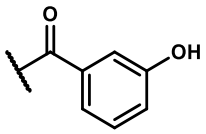
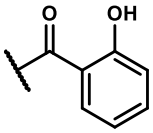
Estes primeiros resultados permitiram identificar a *para*-hidroxila de **1** como sendo o grupo farmacofórico, além de possibilitar a identificação de outras características chave no fragmento benzoila para a atividade anti-*Leishmania*. Primeiro, a presença de um átomo de cloro na posição *meta* não é muito importante para a atividade, visto a potência contra *L. infantum* quatro vezes maior de **6** (sem o substituinte *meta*-Cl) quando comparado com **1**. Ligar a piperazina e o anel benzoila com uma amida é essencial para a atividade, como o mostram as quedas de potência observadas quando o fenol está diretamente ligado à piperazina (composto **7**, Tabela 2) ou quando a amida está sendo trocada por uma sulfonamida (compostos **8** e **9**, Tabela 2). Substituintes que não sejam um átomo de hidrogênio na benzoila também são requeridos, visto a perda de potência consequente apresentada pelo derivado benzamida **10**. Entretanto, como o evidenciam as perdas de potência dos derivados *meta*-cloro **5** e *para*-trifluorometila **11** (Tabela 2), de cinco a dez vezes menos ativos que o *hit* **1**, substituintes que exercitem seus efeitos eletrônicos por ressonância são mais recomendáveis para aumentar a potência antileishmanial dessa série. A posição *para* do grupo hidroxila no anel também é

importante, pois a atividade decaiu progressivamente de acordo com a proximidade entre os grupos hidroxila e carbonila (compostos **12** e **13** *vs* **6**, Tabela 2). Todas estas características (ligação com uma função amida, substituinte com efeito por ressonância, *para*-hidroxila) podem ser encontrados em **6**, derivado que resultou num aumento interessante em potência (duas e quatro vezes maior que **1** contra *L. braziliensis* e *L. infantum*, respectivamente) e seletividade (três e sete vezes maior que **1**) (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antileishmanial e seletividade *in vitro* do *hit* **1** e dos derivados **5** - **13**.



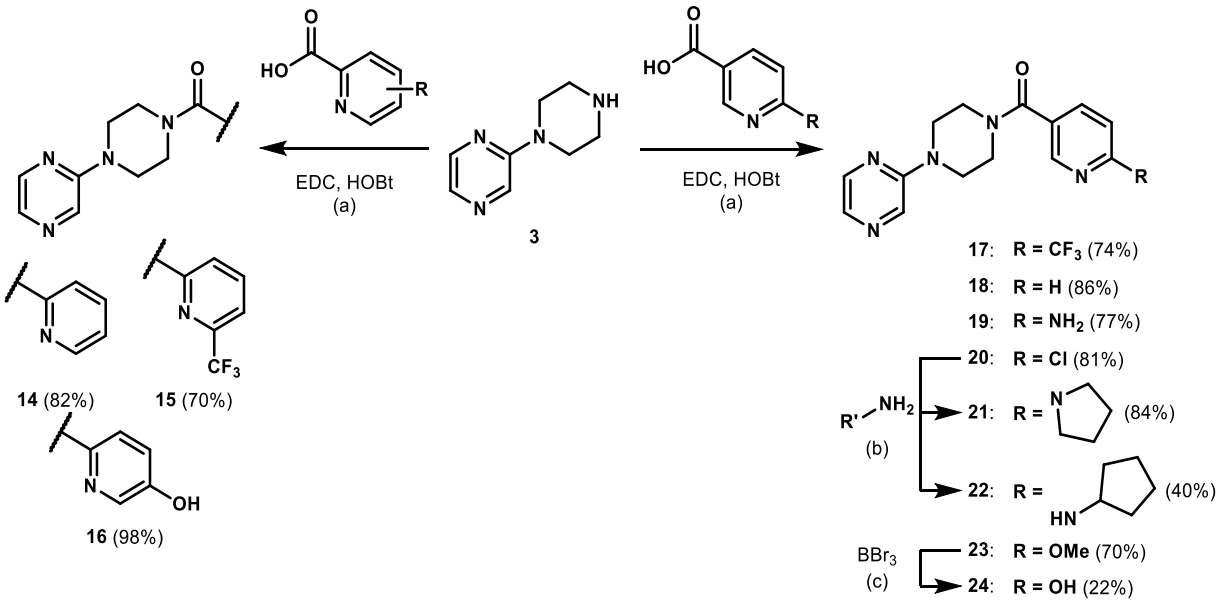
Composto	Estrutura	*L. infantum* IC_{50} (SI)[a]	*L. braziliensis* IC_{50} (SI)[b]	THP-1 CC_{50}[c]	clog(P)[d]
1		11.9 ± 2.2 (46)	11.7 ± 0.7 (46)	541.6 ± 1.6	1.36
5		112.7 ± 2.1 (6)	93.4 ± 3.0 (7)	662.2 ± 6.1	1.77
6		3.1 ± 1.3 (346)	7.6 ± 3.2 (141)	1074 ± 4.7	0.85
7		43.6 ± 3.9 (> 89)	27.1 ± 3.6 (> 144)	> 3901	1.14
8		122.3 ± 4.2 (> 24)	94.1 ± 8.1 (> 32)	> 2990	0.97
9		156.7 ± 2.4 (16)	113.4 ± 4.6 (22)	2507 ± 0.4	0.54
10		63.1 ± 1.6 (11)	24.7 ± 0.2 (29)	716.5 ± 3.4	1.26
11		84.5 ± 2.4 (5)	55.7 ± 3.1 (8)	420.9 ± 1.9	2.34

12		25.3 ± 0.1 (87)	14.1 ± 2.6 (156)	2201 ± 9.2	0.84
13		58.8 ± 2.4 (45)	85.2 ± 2.9 (31)	2620 ± 5.7	0.98
AmB[e]	-	0.25 ± 0.04 (1455)	0.13 ± 0.01 (2798)	363.8 ± 1.6	-

[a]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *L. infantum* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [b]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *L. braziliensis* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [c]: Valor de CC_{50} (μM) medido em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [d]: Valores de log(P) calculados com a ferramenta web SwissADME (http://www.swissadme.ch/index.php)[36]; [e]: A anfotericina B (fármaco de referência) foi usada como controle positivo. A determinação dos valores de IC_{50} e CC_{50} foi realizada por Me. Mariza Gabriela Faleiro de Moura Lodi Cruz e Prof[a]. Dr[a]. Silvane Maria Fonseca Murta (FIOCRUZ Minas).

III) 1. 3. Síntese e atividade biológica dos derivados picolínicos e nicotínicos 14 – 24

Depois, a influência da incorporação de um átomo de nitrogênio no anel benzoila foi avaliada, por conta dos potenciais benefícios que tal modificação pode trazer em termos de estabilidade metabólica e de lipofilicidade.[37–39] Como a presença de um átomo de nitrogênio endocíclico pode afetar de maneira significativa a resposta biológica aos compostos, esse lote ainda apresentou uma certa diversidade nos efeitos eletrônicos e na posição dos substituintes no anel heterocíclico dos compostos, para verificar se as conclusões sobre o substituinte do anel aromático obtidas anteriormente com anéis benzoila ainda estão válidas com anéis piridina (Tabela 3). Os derivados picolínicos e nicotínicos **14** – **20** e **23** foram preparados por acoplamento de amida usando EDC/HOBt como sistema de acoplamento (Esquema 3), com rendimentos de 70 a 98%. A S_NAr de **20** com a amina correspondente levou à obtenção dos derivados nicotínicos **21** e **22**, com um rendimento muito maior quando a substituição foi efetuada com uma amina secundária, o que é coerente com a maior nucleofilicidade das aminas secundárias *vs* primárias. O derivado nicotínico *para*-hidroxila **24** proveio da desmetilação de **23** usando BBr_3.



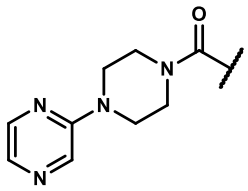
Esquema 3. Síntese dos derivados picolínicos e nicotínicos **14** - **24**.

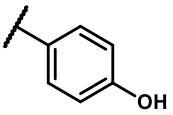
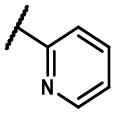
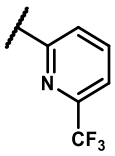
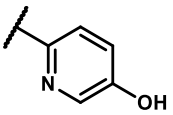
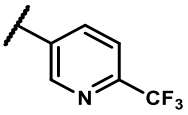
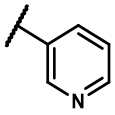
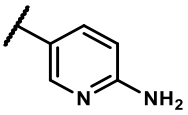
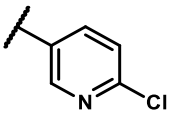
Reagentes e condições: (a) Et_3N, DMF, ta, 32 – 72 h, 70 – 98% (b) Na_2CO_3 (2 eq), DMF, 100 ºC, 80 h, 40 – 84% (c) DCM, atm. Ar, 0 ºC – ta, 26 h, 22%.

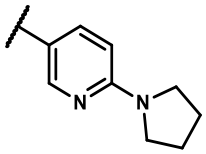
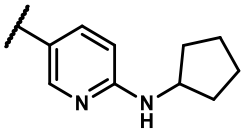
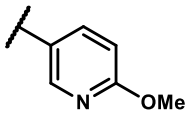
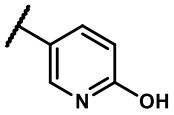
Na maioria dos casos, incorporar um átomo de nitrogênio no anel aromático levou à uma perda significativa de potência, ou até à perda completa de atividade (composto **15**, Tabela 3). Os derivados picolínicos tiveram o pior impacto na atividade quando comparados com os análogos benzoicos correspondentes (**16** *vs* **6**, redução da atividade de mais de uma ordem de grandeza contra *L. infantum*), e deveriam, portanto, serem evitados. No caso dos derivados nicotínicos, embora alguns não tenham apresentado uma potência ideal, dois análogos nicotínicos com um substituinte *para* semelhante à *para*-hidroxila de **6** demostraram uma atividade semelhante contra *Leishmania* (compostos **19** e **23**). O composto **24**, análogo nicotínico direto de **6**, mostrou uma atividade surpreendentemente baixa, fato que pode ser explicado pelo equilíbrio tautomérico entre as formas hidroxinicotínica e amida do anel benzoila de **24**, diminuindo assim a fração de forma *para*-hidroxila disponível. Os outros derivados nicotínicos **21** e **22**, com substituinte *para* tendo efeitos estereoeletrônicos comparáveis com o grupo amino de **19**, foram planejados para avaliar a influência da restrição conformacional e da disponibilidade de um átomo de hidrogênio no substituinte *para*. De modo interessante, o derivado de pirrolidina **21**, com maior restrição conformacional, chegou a níveis de potência comparáveis com **19**, enquanto a ciclopentanamina **22** ficou muito menos ativa. O intermediário comum desses dois compostos, **20**, também demonstrou uma das melhores potências da série contra *L. infantum*, mas não foi levado em consideração para os próximos passos apesar da alta potência, devido à alta suscetibilidade à nucleófilos do seu anel 2-

halopipidina.[40] Tais resultados sugerem que substituintes *para* com efeitos eletrônicos por ressonância são necessários para manter uma potência alta, e que derivados nicotínicos são tolerados, porém não necessários para melhorar a atividade. Substituintes mais volumosos podem também ser tolerados, com uma preferência para grupos com restrição conformacional, alta torsão de ciclo e pouca livre rotação em torno do átomo diretamente ligado ao anel aromático. Assim, o composto **6**, que foi inicialmente sintetizado para determinar o grupo farmacofórico do *hit* inicial, foi usado para planejar os próximos derivados da série, por ter se mantido o composto mais potente das investigações preliminares.

Tabela 3. Atividade antileishmanial e seletividade *in vitro* dos derivados picolínicos e nicotínicos **14** - **24**.



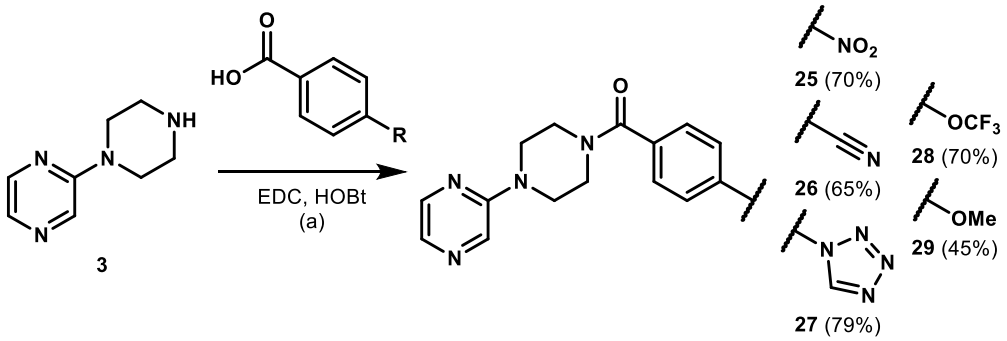
Composto	Estrutura	*L. infantum* IC_{50} (SI)[a]	*L. braziliensis* IC_{50} (SI)[b]	THP-1 CC_{50}[c]	clog(P)[d]
6		3.1 ± 1.3 (346)	7.6 ± 3.2 (141)	1074 ± 4.7	0.85
14		64.8 ± 0.7 (18)	34.9 ± 1.2 (32)	1133 ± 33	0.63
15		7431 ± 6.3 (0.2)	3541 ± 6.3 (0.5)	1697 ± 1.5	1.69
16		127.8 ± 5.9 (> 27)	94.0 ± 6.1 (> 37)	> 3505	0.21
17		35.2 ± 1.1 (298)	32.1 ± 2.1 (327)	10483 ± 12.6	1.59
18		141.7 ± 7.0 (> 26)	132.3 ± 4.2 (> 28)	> 3713	0.54
19		5.1 ± 2.1 (524)	11.9 ± 1.1 (224)	2670 ± 6.0	0.14
20		1.9 ± 1.4 (184)	10.1 ± 2.3 (35)	349.0 ± 4.7	1.15

21		5.3 ± 2.3 (53)	5.9 ± 3.2 (48)	280.4 ± 0.8	1.17
22		280.5 ± 5.8 (3)	337.4 ± 1.2 (2)	763.2 ± 2.8	1.60
23		6.2 ± 3.0 (231)	17.5 ± 1.2 (82)	1434 ± 2.4	0.66
24		175.8 ± 4.5 (> 20)	184.4 ± 1.5 (> 19)	> 3505	0.33
AmB[e]	-	0.25 ± 0.04 (1455)	0.13 ± 0.01 (2798)	363.8 ± 1.6	-

[a]: Valor de IC_{50} (µM) para a inibição do crescimento de *L. infantum* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [b]: Valor de IC_{50} (µM) para a inibição do crescimento de *L. braziliensis* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [c]: Valor de CC_{50} (µM) medido em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [d]: Valores de log(P) calculados com a ferramenta web SwissADME (http://www.swissadme.ch/index.php)[36]; [e]: A anfotericina B (fármaco de referência) foi usada como controle positivo. A determinação dos valores de IC_{50} e CC_{50} foi realizada por Me. Mariza Gabriela Faleiro de Moura Lodi Cruz e Prof[a]. Dr[a]. Silvane Maria Fonseca Murta (FIOCRUZ Minas).

III) 1. 4. Síntese e atividade biológica dos derivados *para*-substituídos 25 – 29

Com a importância para a atividade da posição *para* no fragmento benzoila confirmada, foi dado uma atenção particular à essa posição para a próxima etapa da investigação (compostos **25** – **29**, Tabela 4). De maneira mais específica, este lote de compostos foi planejado com objetivo de avaliar o impacto dos efeitos eletrônicos por ressonância do substituinte *para*, mantendo o mesmo efeito retirador por indução que o grupo hidroxila. Além disso, a relativa diversidade dos grupos doadores por ressonância incorporados nos derivados desse lote também permitiu avaliar se a formação de ligações de hidrogênio na posição *para* tinha uma influência significativa sobre a atividade. As condições previamente descritas (amidação com EDC e HOBt) foram usadas para a síntese dos derivados *para*-substituídos, a partir da amina **3** e do ácido carboxílico *para*-substituído adequado, com rendimentos de 45% a 79% (Esquema 4).

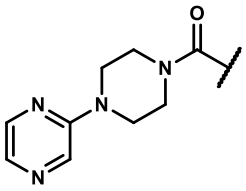


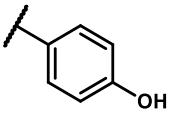
Esquema 4. Síntese dos derivados *para*-substituídos **25** - **29**.

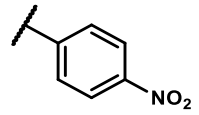
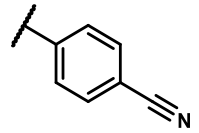
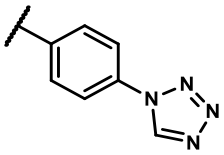
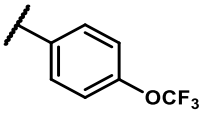
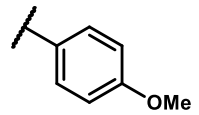
Reagentes e condições: (a) Et_3N, DMF, ta, 46 – 72 h, 45 – 79%.

Os resultados apresentados na Tabela 4 sugerem que a capacidade para estabelecer ligações de hidrogênio do substituinte *para* tem pouca relevância para a atividade, que seja como doador ou aceptor de ligações H: **27** é um excelente aceptor de ligações H graças ao seu fragmento tetrazol, mas a atividade dele ficou comparável com a de **6**, composto capaz tanto de aceitar quanto de doar ligações de hidrogênio, e ficou também comparável com **29**, análogo próximo de **6** capaz somente de aceitar ligações H. Conforme mostrado na Tabela 4, inverter o efeito por ressonância de um efeito doador para um retirador de elétrons (compostos **25** e **26**) levou à uma potência de 5 a 71 vezes menor que **6**, tal perda de atividade ficando maior com o aumento da intensidade do efeito retirador (**26**, com efeito retirador moderado, *vs* **25**, exercendo um efeito retirador mais forte). Os outros derivados (**27** – **29**) com efeito doador de elétrons por ressonância mantiveram uma atividade e seletividade comparáveis com **6**. Portanto, esses resultados apontam que substituintes com efeitos doadores de elétrons por ressonância no anel benzoila são cruciais para a atividade contra *Leishmania* dessa série de compostos.

Tabela 4. Atividade antileishmanial e seletividade *in vitro* dos derivados para-substituídos **25** - **29**.



Composto	Estrutura	*L. inf.* IC_{50} (SI)[a]	*L. bra.* IC_{50} (SI)[b]	THP-1 CC_{50}[c]	clog(P)[d]
6		3.1 ± 1.3 (346)	7.6 ± 3.2 (141)	1074 ± 4.7	0.85

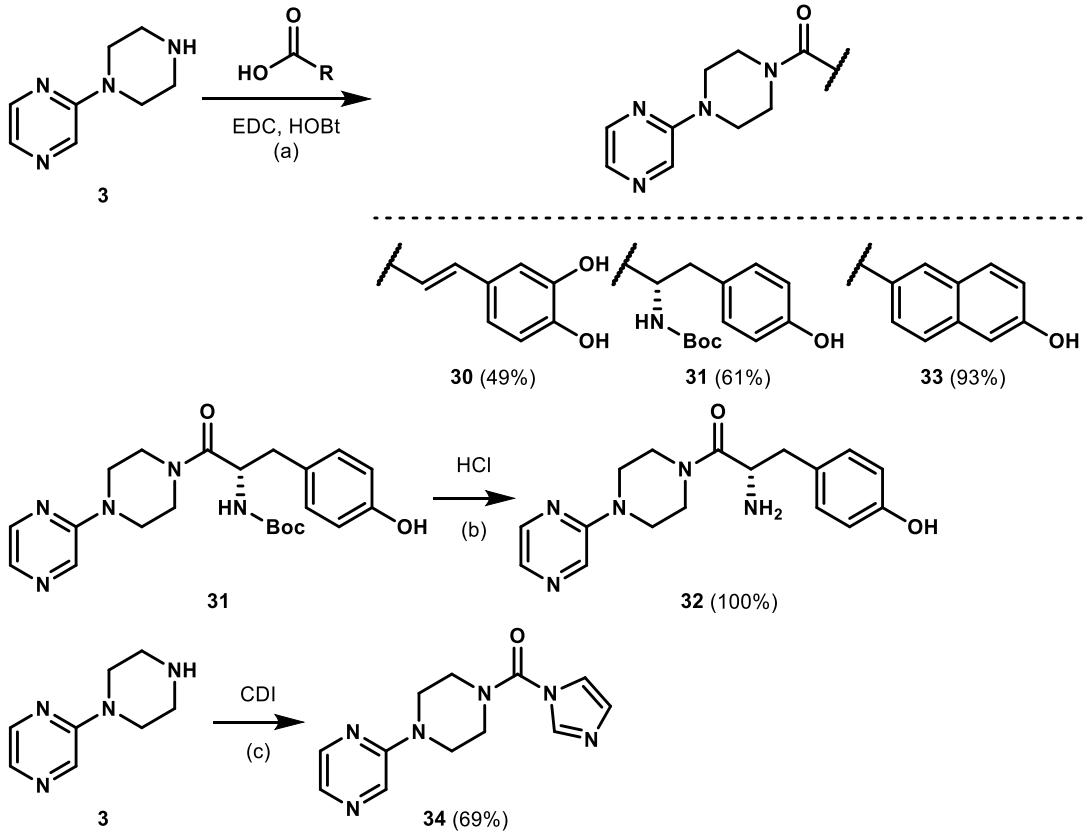
25		221.0 ± 2.9 (13)	161.0 ± 1.1 (17)	2810 ± 3.0	0.71
26		15.9 ± 3.0 (81)	22.7 ± 2.1 (57)	1289 ± 7.0	1.03
27		5.8 ± 1.1 (449)	8.9 ± 0.84 (293)	2607 ± 5.6	0.56
28		7.5 ± 1.0 (115)	17.5 ± 2.6 (49)	865.3 ± 1.8	2.13
29		4.5 ± 0.7 (422)	10.1 ± 2.8 (188)	1901 ± 13	1.24
AmB[e]	-	0.25 ± 0.04 (1455)	0.13 ± 0.01 (2798)	363.8 ± 1.6	-

[a]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *L. infantum* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [b]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *L. braziliensis* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [c]: Valor de CC_{50} (μM) medido em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [d]: Valores de log(P) calculados com a ferramenta web SwissADME (http://www.swissadme.ch/index.php[36]; [e]: A anfotericina B (fármaco de referência) foi usada como controle positivo. A determinação dos valores de IC_{50} e CC_{50} foi realizada por Me. Mariza Gabriela Faleiro de Moura Lodi Cruz e Prof[a]. Dr[a]. Silvane Maria Fonseca Murta (FIOCRUZ Minas).

III) 1. 5. Síntese e atividade biológica dos derivados com anéis aromáticos diversificados 30 – 34

Levando em consideração que todos os derivados com maior atividade são derivados benzóicos ou nicotínicos, com substituintes doadores de elétrons por ressonância na posição *para*, e levando também em consideração a potência similar e seletividade maior que **6** apresentadas pelo derivado de tetrazol **27**, mais volumoso, foi decidido avaliar na sequência a influência da distância entre a carbonila e o substituinte *para*. Para isso, compostos mais volumosos foram planejados, todos com um substituinte *para*-hidroxila, afim de avaliar a influência tanto da distância carbonila-OH quanto do volume do anel aromático (**30** – **33**, Tabela 5). A ureia de imidazol **34**, de tamanho menor, também foi sintetizada como parte da avaliação do volume do anel aromático. A reação entre a amina **3** e o ácido carboxílico correspondente, mediada por EDC/HOBt, rendeu as amidas **30**, **31** e **33**, com rendimentos de

49%, 61% e 93%, respectivamente (Esquema 5). O derivado **32** foi obtido de maneira quantitativa após remoção do grupo protetor Boc de **31** em condições ácidas, e a reação entre o CDI e a amina (**5**) em DCM permitiu isolar a ureia **34** com 69% de rendimento.



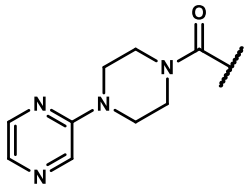
Esquema 5. Síntese dos derivados **30** - **34**.

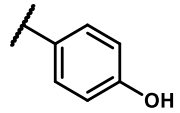
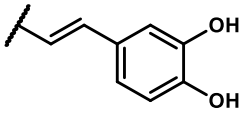
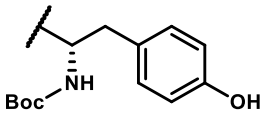
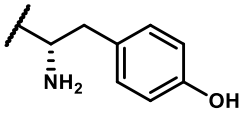
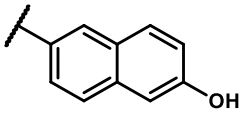
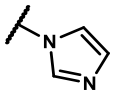
Reagentes e condições: (a) Et_3N, DMF, ta, 20 – 50 h, 49 – 93% (b) HCl (2 M em EtOAc), MeOH, 0 ºC – ta, 30 h, 100% (c) DCM, 0 ºC – ta, 12 h, 69%.

Estes resultados permitiram concluir que a distância entre os grupos hidroxila e carbonila não é um parâmetro chave para a atividade antileishmanial (Tabela 5). De fato, os derivados de naftol **33** e de tirosina **32** exibiram atividades drasticamente diferentes, apesar de manter distâncias carbonila-OH comparáveis, mas em conformações espaciais diferentes. O volume do anel aromático parece também ser de menor importância, visto as atividades no baixo micromolar apresentadas tanto pela menor ureia de imidazol **34** quanto pelo maior naftol **33**. A característica que se destaca desses compostos é a presença de substituintes maiores no átomo em posição α da carbonila, evidenciada pelas quedas de atividade apresentadas pelos derivados cafeico **30** e tirosina **32** em comparação com seus respectivos análogos naftol **33** e *N*-Boc-tirosina **31**. Entretanto, apesar da sua atividade e seletividade estarem de quatro a sete vezes maior que **1**, o intermediário *N*-Boc-tirosina **31** não foi mais considerado para o planejamento de novos derivados, pois a sua atividade alta pode ser relacionada mais à sua alta

lipofilicidade por conta do grupo Boc do que às suas propriedades estruturais intrínsecas, e também porque esse derivado pode rapidamente perder potência *in vivo* após metabolização no derivado de tirosina **32**. Assim, dada a alta potência e seletividade exibida pelos compostos **33** e **34**, a presença de anéis no átomo α-carbonila é necessária para melhorar a atividade antileishmanial da série, independente de se estiverem derivados benzoicos, nicotínicos ou naftoicos, enquanto eles tiverem um substituinte doador de elétrons por ressonância na posição *para*.

Tabela 5. Atividade antileishmanial e seletividade *in vitro* dos derivados **30** - **34**.



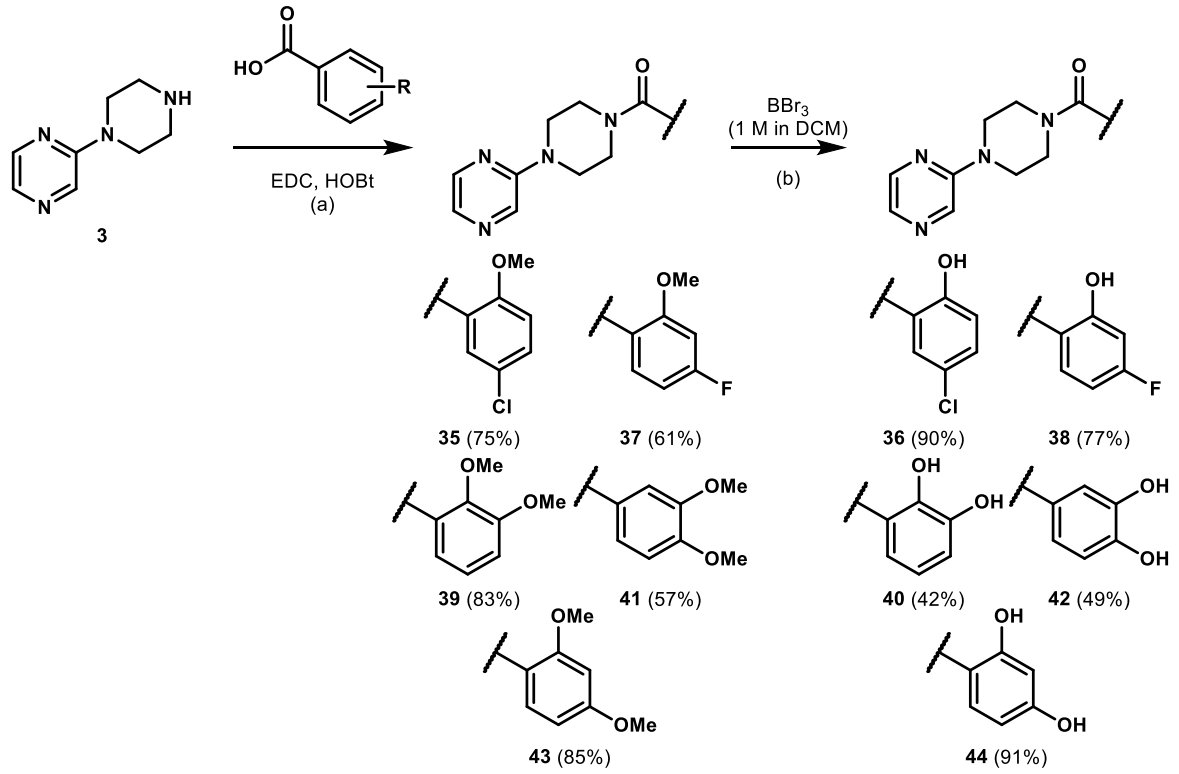
Composto	Estrutura	*L. infantum* IC_{50} (SI)[a]	*L. braziliensis* IC_{50} (SI)[b]	THP-1 CC_{50}[c]	clog(P)[d]
6		3.1 ± 1.3 (346)	7.6 ± 3.2 (141)	1074 ± 4.7	0.85
30		105.2 ± 1.6 (> 29)	74.6 ± 3.7 (> 41)	> 3064	0.84
31		2.9 ± 0.6 (349)	9.4 ± 2.3 (108)	1012 ± 2.5	1.54
32		86.5 ± 6.3 (28)	69.2 ± 2.6 (35)	2408 ± 27	0.39
33		3.3 ± 2.7 (241)	2.6 ± 0.2 (306)	796.1 ± 5.5	1.75
34		7.3 ± 1.5 (438)	9.2 ± 3.1 (347)	3194 ± 26	-0.03
AmB[e]	-	0.25 ± 0.04 (1455)	0.13 ± 0.01 (2798)	363.8 ± 1.6	-

[a]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *L. infantum* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [b]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *L. braziliensis* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [c]: Valor de CC_{50} (μM) medido em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [d]: Valores de log(P) calculados com a ferramenta web SwissADME (http://www.swissadme.ch/index.php[36]; [e]: A anfotericina B (fármaco de referência)

foi usada como controle positivo. A determinação dos valores de IC_{50} e CC_{50} foi realizada por Me. Mariza Gabriela Faleiro de Moura Lodi Cruz e Profª. Drª. Silvane Maria Fonseca Murta (FIOCRUZ Minas).

III) 1. 6. Síntese e atividade biológica dos derivados benzóicos disubstituídos 35 – 44

Após ter identificado as características mais importantes para o fragmento benzoila (ligado por uma amida à piperazina, sem *linker* adicional entre o anel e o grupo carbonila, substituído em *para* com um substituinte -I/+M, e com uma certa tolerância para anéis nicotínicos e naftalenos), o SAR foi concluído com a exploração de anéis disubstituídos, ou com uma hidroxila e um halogênio, de modo análogo a **1**, ou com dois grupos hidroxila (Tabela 6). Os intermediários metoxilados desses compostos disubstituídos também foram avaliados, para providenciar uma comparação mais extensa dos substituintes hidroxila e metoxila, ambos encontrados em derivados com algumas das maiores atividades antileishmaniais dentro dos derivados *para*-monosubstituídos (compostos **6** e **29**, Tabela 4). Acoplamento de amida entre a amina **3** e o ácido carboxílico disubstituído correspondente rendeu os derivados metoxilados com rendimentos de 57 a 85% (Esquema 6). Os derivados hidroxilados foram convenientemente sintetizados a partir dos derivados metoxilados correspondentes, usando BBr_3 para realizar as mono- e di-desmetilações com rendimentos de 42 a 91%.



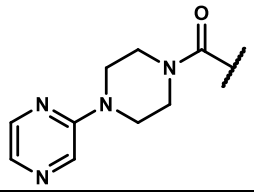
Esquema 6. Síntese dos derivados disubstituídos **35** - **44**.

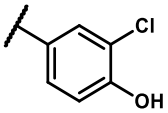
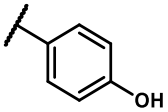
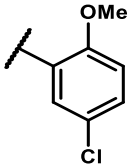
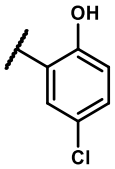
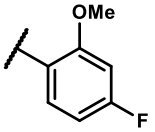
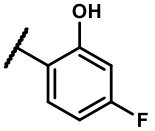
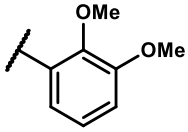
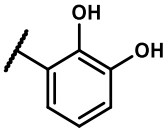
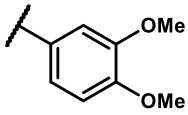
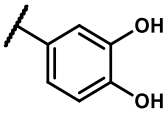
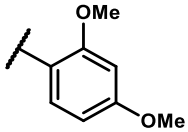
Reagentes e condições: (a) Et_3N, DMF, ta – 80 ºC, 44 – 92 h, 57 – 85% (b) BBr_3 (1 M em DCM) (5 – 10 eq), DCM, atm. Ar, 0 ºC – ta, 17 – 53 h, 42 – 91%.

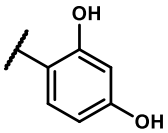
Os derivados com um substituinte metoxila/hidroxila e um halogênio forneceram resultados interessantes a respeito do padrão de substituição do anel e a natureza dos substituintes. Derivados com uma metoxila na posição *orto* (**35** e **37**, Tabela 6) apresentaram uma potência comparável com o *hit* **1**, e esta modificação até provou ser ligeiramente benéficial para a potência contra *L. braziliensis* quando foi mantido o substituinte 5-Cl em **35**. Trocar o halogênio de um 5-Cl (*hit* **1** e **35**) por um 4-F em **37** foi prejudicial para a atividade contra as duas espécies de *Leishmania*, apesar de ter ficado em níveis comparáveis com **1** contra *L. braziliensis*. Desmetilar os compostos **35** e **37** levou à uma potência duas a três vezes superior para ambos compostos desmetilados (**36** e **38**), sugerindo que no caso de compostos disubstituídos, o grupo hidroxila tem tendência a ser uma melhor opção que uma metoxila, e que a presença dessa hidroxila na posição *para* é menos importante em derivados disubstituídos do que em monosubstituídos. Essas duas tendências foram confirmadas pelos derivados dimetoxilados **39** e **41**, cuja potência foi drasticamente inferior àquela da maioria dos compostos do SAR, enquanto seus análogos desmetilados **40** e **42** exibiram uma potência antileishmanial alta. Em específico, o derivado 2,3-dihidroxila **40** apresentou uma potência semelhante a **6** e quatro vezes maior que **1** contra *L. infantum* e uma potência contra *L. braziliensis* melhorada

38 vezes quando comparado com **6** e 58 vezes quando comparando com **1**, chegando a níveis de potência nanomolar contra *L. braziliensis* (IC_{50} = 0.2 μM). A alta atividade de **40** pode sugerir algumas pistas para a elucidação de um possível mecanismo de ação desse composto, em qual a carbonila e o *orto*-OH possibilitam uma quelação ou uma ligação de hidrogênio parecida com um anel de 6 membros, o que poderia aumentar a afinidade de **40** para o seu alvo biológico enquanto deixaria livre o substituinte 3-hidroxila para se envolver na interação composto/alvo responsável pela atividade antileishmanial, aumentando assim a potência de **40** quando comparado com os compostos **6**, **33** e **42**. Esses três compostos possuem o mesmo grupo hidroxila que **40**, livre para interagir com o possível alvo e causar seu efeito anti-*Leishmania*, porém eles não beneficiam do aumento na afinidade pelo alvo possivelmente causado pela presença do *orto*-OH adicional de **40**, o que pode ter tendência a deixar **6**, **33** e **42** ligeiramente menos potentes que o derivado 2,3-dihidroxila **40**. Um detalhe importante é que a atividade nanomolar de **40** foi observada somente contra *L. braziliensis*, enquanto se manteve no baixo micromolar contra *L. infantum*. O sequenciamento e a comparação dos genomas de *Leishmania major*, *L. infantum* e *L. braziliensis* mostrou que *L. braziliensis* possui 47 genes específicos à sua espécie e que aproximadamente o mesmo número de genes está faltando ou degenerado em *L. braziliensis*, quando comparado com as duas outras espécies. Dentro dessas variações, o gene responsável pela oxoreductase é encontrado como o pseudogene LbrM23_V2.0770 em *L. braziliensis*[41], e essa espécie também possui diversas cópias do gene encodado pela enzima NADH-dependente fumarate reductase.[42] Tais particularidades genéticas podem contribuir a explicar a potência de **40** 14 vezes maior contra *L. braziliensis* do que contra *L. infantum*. Entretanto, o fragmento catecol de **40** é classificado como PAINS (*Pan-Assay Interference Compounds*), devido à possibilidade dos catecóis sofrerem oxidação enzimática em quinonas.[43] Assim, o composto **44** e seu intermediário **43** foram planejados, para combinar as interessantes *orto*-hidroxila de **40** e *para*-hidroxila de **6** sem provocar alertas PAINS relacionadas a catecóis. Infelizmente, a potência de **43** e ultimamente de **44** contra ambas as espécies de *Leishmania* permaneceu mediana, apesar de confirmar a maior potência dos derivados di-hidroxilados quando comparados com di-metoxilados.

Tabela 6. Atividade antileishmanial e seletividade *in vitro* dos compostos disubstituídos **35** - **44**.



Composto	Estrutura	*L. infantum* IC_{50} (SI)[a]	*L. braziliensis* IC_{50} (SI)[b]	THP-1 CC_{50}[c]	clog(P)[d]
1		11.9 ± 2.2 (46)	11.7 ± 0.7 (46)	541.6 ± 1.6	1.36
6		3.1 ± 1.3 (346)	7.6 ± 3.2 (141)	1074 ± 4.7	0.85
35		27.5 ± 0.8 (37)	7.8 ± 0.5 (130)	1011 ± 5.9	1.75
36		10.8 ± 1.0 (149)	4.5 ± 2.1 (357)	1605 ± 25	1.54
37		34.3 ± 2.4 (40)	13.1 ± 2.8 (104)	1357 ± 0.9	1.54
38		14.2 ± 1.1 (80)	25.8 ± 2.1 (44)	1129 ± 8.7	1.24
39		112.5 ± 1.2 (18)	82.1 ± 2.8 (24)	1999 ± 0.6	1.16
40		2.8 ± 1.1 (> 1189)	0.2 ± 0.2 (> 16650)	> 3330	0.63
41		55.3 ± 0.8 (13)	33.6 ± 4.3 (21)	721.0 ± 6.2	1.23
42		3.5 ± 0.8 (407)	9.4 ± 2.8 (151)	1423 ± 11	0.49
43		26.4 ± 0.8 (18)	30.6 ± 3.3 (16)	482.5 ± 9.7	1.24

44		21.9 ± 1.0 (20)	19.1 ± 2.6 (23)	443.2 ± 1.4	0.64
AmB[e]	-	0.25 ± 0.04 (1455)	0.13 ± 0.01 (2798)	363.8 ± 1.6	-

[a]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *L. infantum* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [b]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *L. braziliensis* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [c]: Valor de CC_{50} (μM) medido em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [d]: Valores de log(P) calculados com a ferramenta web SwissADME (http://www.swissadme.ch/index.php)[36]; [e]: A anfotericina B (fármaco de referência) foi usada como controle positivo. A determinação dos valores de IC_{50} e CC_{50} foi realizada por Me. Mariza Gabriela Faleiro de Moura Lodi Cruz e Prof[a]. Dr[a]. Silvane Maria Fonseca Murta (FIOCRUZ Minas).

III) 1. 7. Influência da lipofilicidade na atividade antileishmanial

Devido à tendência dos compostos mais lipofílicos a apresentarem atividades maiores graças à uma maior permeabilidade da membrana celular, o *Ligand Lipophilic Efficiency* (LLE) de todos os compostos foi determinado, para avaliar a influência da lipofilicidade na atividade antileishmanial deles (Figura 10).[44] Os compostos mais ativos apresentaram valores de LLE principalmente entre 4 e 5 contra ambas espécies de *Leishmania* (compostos **6**, **19**, **27**, **33**, **34**, e **42** contra ambos *L. infantum* e *L. braziliensis*; e adicionalmente compostos **20**, **23**, **29**, e **40** contra só *L. infantum*) e **40** até demonstrou um LLE de 5.85 contra *L. braziliensis*, o que indica que a atividade antileishmanial desses compostos pode ser ligada às suas propriedades estruturais intrínsecas, e não à uma interação hidrofóbica não-seletiva.[45,46] Esses resultados são promissores para o futuro desta classe de compostos, pois tais valores de LLE podem ser geralmente encontrados em compostos *lead*, *leads* otimizados, candidatos clínicos, e até em alguns fármacos com administração por via oral.[46,47]

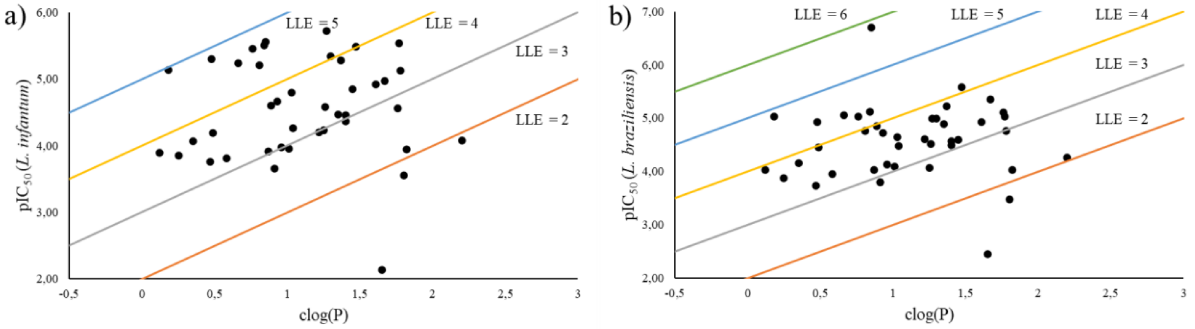


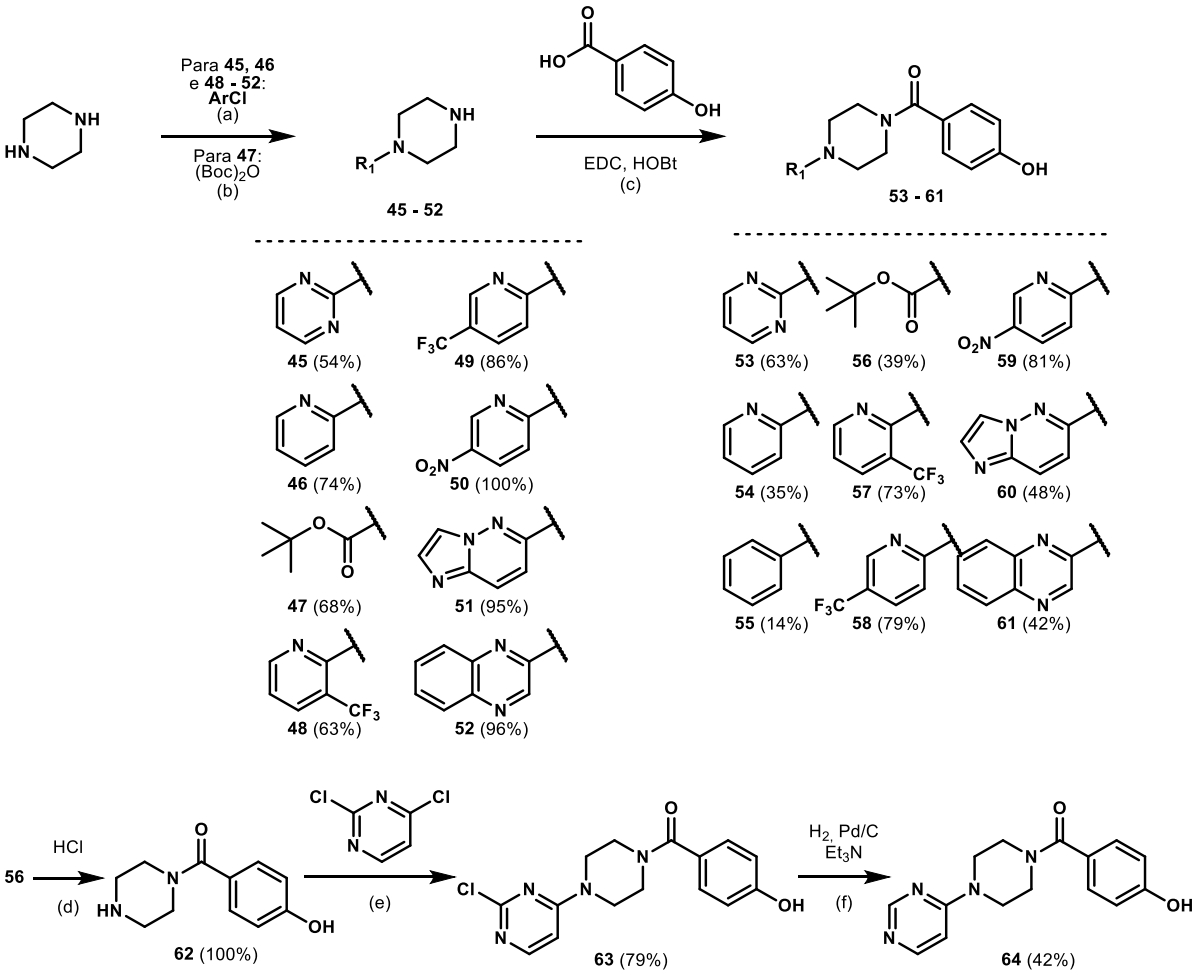
Figura 10. *Ligand Lipophilic Efficiency* (LLE) de todos os compostos avaliados contra a) *L. infantum* e b) *L. braziliensis*. LLE = pIC_{50} - clog(P).

III) 2. Síntese e atividade biológica dos derivados com modificações no fragmento pirazina e no *linker*

III) 2. 1. Síntese e atividade biológica dos derivados com modificações no anel pirazina

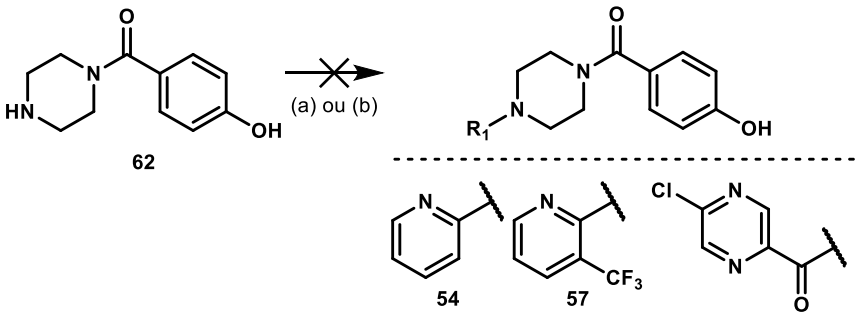
A síntese dos derivados com modificações no fragmento arila **53** – **61** descrita no Esquema 7 deu-se seguindo a mesma rota sintética que aquela previamente usada para a síntese dos derivados com modificações no fragmento benzoíla. Primeiro, os fragmentos arila contemplados para este lote de derivados foram instalados por S_NAr entre a piperazina e o cloreto de arila correspondente, levando à obtenção dos intermediários arilpiperazina (**45** – **52**) em rendimentos de 54 a 100%. Subsequentemente, uma reação de acoplamento de amida com o ácido *para*-hidroxibenzóico rendeu os compostos desejados, após uma rota simples em duas etapas. Os derivados *N*-Boc (composto **56**), piperazina (composto **62**), 2-cloropirimidin-4-ila (composto **63**) e cloropiridin-4-ila (composto **64**), portanto, requereram uma rota diferente e ligeiramente mais longa (quatro etapas para chegar na instalação do fragmento arila em **63**, Esquema 7). Ao invés de começar por uma reação de S_NAr, a primeira etapa consistiu na mono-proteção com grupo Boc da piperazina, que foi conseguida seletivamente frente à possibilidade de uma proteção dos dois nitrogênios da piperazina graças à adição lenta (gota-à-gota) do reagente de proteção $(Boc)_2O$ a um excesso (3 equivalentes) de piperazina. A *N*-Boc-piperazina assim obtida em rendimento de 68% foi em seguida submetida à uma reação de amidação com o ácido *para*-hidroxibenzóico, levando à obtenção de **56**. Obteve-se o derivado **62** de maneira quantitativa após desproteção de **56** em meio ácido, e a reação de S_NAr subsequente com 2,4-dicloropirimidina rendeu **63** seletivamente, devido à maior reatividade da posição 4 em relação à posição 2 deste cloreto de arila.[48] Finalmente, isolou-se o derivado **64** após hidrogenólise do

substituinte 2-Cl de **63**. Notavelmente, esta rota em quatro etapas até **63** foi inicialmente considerada para a síntese de todos os derivados com modificações no fragmento arila, pois teria permitido realizar a derivatização destes derivados na última etapa da rota, a partir de um intermediário comum (o composto **62**, Esquema 8). Porém, tal rota somente obteve sucesso para a síntese de **64** (Esquema 8), explicando assim o recurso à rota em duas etapas S_NAr/amidação, mais consistente, para a síntese dos outros derivados com modificações no fragmento arila.



Esquema 7. Síntese dos derivados com modificações no fragmento arila **53** - **64**.

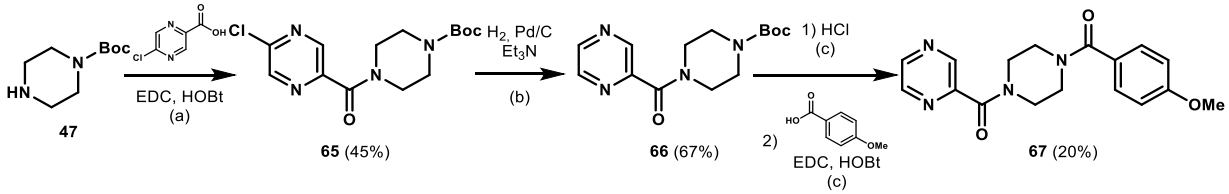
Reagentes e condições: (a) Na_2CO_3, iPrOH ou PrOH, 80 – 120 °C, 4 – 120 h, 54 – 100% (para **45**, **46** e **48** – **52**); (b) Et_3N, DCM, 0 °C – ta, 16 h, 68% (para **47**); (c) Et_3N, DMF, ta, 15 – 120 h, 14 – 81%; (d) HCl (2 M em EtOAc), DCM/MeOH (1:1), 0 °C – ta, 24 h, 100%; (e) Na_2CO_3, iPrOH, ta, 41 h, 79%; (f) EtOAc/MeOH (1:1), ta, 90 h, 42%.



Esquema 8. Tentativas de derivatização por S_NAr e acoplamento de amida a partir de **62**.

Reagentes e condições: (a) Cloreto de arila correspondente, Na_2CO_3, iPrOH, 80 °C, 65 – 120 h; (b) ácido 5-cloropirazin-2-carboxílico, EDC, HOBt, Et_3N, DMF, ta – 120 °C, 144 h.

Considerando que a derivatização a partir de **62** teve pouco sucesso, uma rota alternativa teve que ser considerada para a síntese do derivado diamida **67** (Esquema 9). A partir da *N*-Boc-piperazina **47**, um acoplamento de amida com o ácido 5-cloropirazin-2-carboxílico mediado por EDC/HOBt rendeu a cloropirazina **65**, que foi submetida à desclorinação por hidrogenólise para formar a pirazinamida **66**. Para esta última etapa, a presença de uma base como a trietilamina provou-se necessária para que a reação prosseguisse, provavelmente capturando o HCl formado para impedir reações paralelas indesejadas. De fato, condições padrão de hidrogenólise (10% m/m Pd/C, H_2 borbulhando) apenas resultaram na degradação lenta de **65** após 48 h de reação, enquanto a mesma reação em presença de Et_3N formou **66** em apenas 1 h com um rendimento de 87%. A desproteção de **66**, seguida por um acoplamento de amida com ácido *para*-metoxibenzóico finalmente levou à obtenção de **67**, num rendimento global de 11% nas 4 etapas a partir de **47**.



Esquema 9. Síntese do derivado diamida **67**.

Reagentes e condições: (a) Et_3N, DMF, ta, 44 h, 65%; (b) EtOAc/MeOH (1:1), ta, 1 h, 87%; (c) 1) HCl (2 M em EtOAc), DCM/MeOH (1:1), 0 °C – ta, 24 h, 100%, 2) Et_3N, DMF, ta, 86 h, 20%.

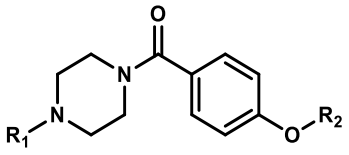
A exploração de SAR no fragmento pirazina de **6** começou com análogos aromáticos sem substituintes, focando na avaliação do impacto do número e da posição relativa dos átomos de nitrogênio endocíclicos no anel, assim como no impacto da presença de um anel aromático e no tipo de conexão com o núcleo piperazina. Para isto, os derivados de pirimidina **53** e **64** foram planejados primeiro, permitindo uma avaliação da influência da posição do segundo

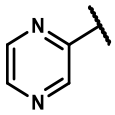
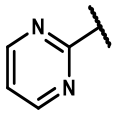
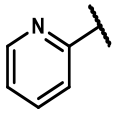
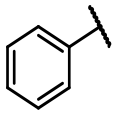
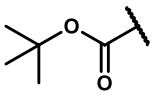
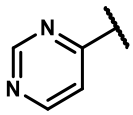
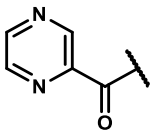
átomo de nitrogênio no fragmento pirazina, enquanto manteve-se um átomo de nitrogênio na posição 2 do anel. Apesar de não ter alcançado os mesmos níveis de potência que **6** (Tabela 7), a atividade do derivado 2-pirimidinila **53** apenas caiu por um fator 5, queda de atividade muito menor que a queda por um fator 24 apresentada por **64**, sugerindo que a posição relativa dos átomos de nitrogênio endocíclicos tenha um impacto crítico sobre a atividade antileishmanial, pelo menos quando se trata de diazinas sem substituintes.

O planejamento do análogo 2-piridinila **54** seguiu o mesmo raciocínio que para **53** e **64**, almejando avaliar o impacto de um segundo nitrogênio no anel aromático. A atividade deste derivado, no entanto, ficou 18 vezes menor que a atividade observada com **6** e três vezes menor que aquela apresentada por **53** (Tabela 7), destacando então a superioridade das diazinas para heterocíclos sem substituintes. O tipo de heterocíclo também foi investigado, com a fenila **55**, facilmente obtida a partir da *N*-fenilpiperazina comercial, porém sua atividade antiparasitária permaneceu inferior a aquela de **6** por quase uma ordem de grandeza (Tabela 7). Portanto, derivados do tipo *N*-fenila não foram considerados para o resto do trabalho, principalmente por razões sintéticas, já que esses derivados iriam requerer reações de acoplamento metal-catalisadas do tipo Chan-Evans-Lam ou Buchwald-Hartwig para serem sintetizados, reações cujo custo e sensibilidade são bem maiores do que as reações de tipo S_NAr usadas neste trabalho para a síntese dos derivados azina, e que levariam a compostos para quais espera-se uma menor atividade.

Enfim, a necessidade de um anel aromático foi evidenciada pela atividade dos derivados *N*-Boc **56** e piperazina **62**, que foram 100 e 50 vezes menor que a atividade de **6**, respectivamente (Tabela 7). Por razões sintéticas, o análogo diamida de **6** apresentou um substituinte *para*-metoxila no lugar da *para*-hidroxila no fragmento benzoico, porém este composto não deixa de ser relevante para o estudo, já que o trabalho de SAR desenvolvido no fragmento benzoíla detalhado na seção anterior mostrou que o análogo *para*-metoxila de **6** tem atividade similar a **6** (**6**: IC_{50} = 3.1 μM; *para*-metoxila **29**: IC_{50} = 4.5 μM). Entretanto, a queda de atividade entre **6** e a diamida **67** foi importante, o segundo mostrando uma potência 50 vezes menor que o primeiro (Tabela 7), o que sugere que uma ligação direta *N*-arila entre o núcleo piperazina e o fragmento aromático seja preferida a outros tipos de ligação, como por exemplo uma ligação do tipo amida encontrada em **67**.

Tabela 7. Atividade antileishmanial *in vitro* e seletividade dos derivados de arila não substituídos **53** – **56**, **62**, **64** e **67**.



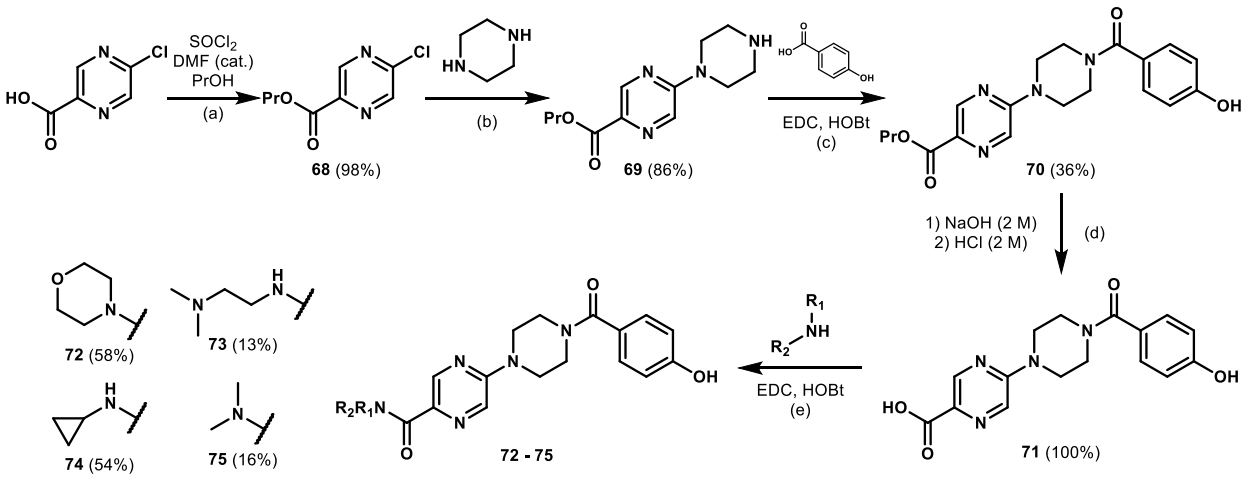
Composto	R_1	R_2	*L. infantum* IC_{50} (μM)[a]	THP-1 CC_{50} (μM)[b]	SI[c]	clog(P)[d]
6		H	3.1 ± 1.3	1074 ± 4.7	346	0.85
53		H	17.1 ± 0.3	> 3517	> 206	1.08
54		H	56.1 ± 5.2	1262 ± 8.0	22	1.54
55		H	20.8 ± 4.9	467.0 ± 8.8	22	2.12
56		H	> 326.4	> 3624	> 10	1.66
62		H	156.7 ± 5.0	1180 ± 8.9	8	0.65
64		H	74.5 ± 1.3	1015 ± 3.5	7	1.03
67		Me	154.4 ± 4.5	1015 ± 3.5	7	0.84
AmB[e]	-	-	0.25 ± 0.04	363.8 ± 1.6	1455	-

[a]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *L. infantum* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [b]: Valor de CC_{50} (μM) medido em macrófagos THP-1 (média de

pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [c]:índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [d]: Valores de log(P) calculados com a ferramenta web SwissADME (http://www.swissadme.ch/index.php)[36]; [e]: A anfotericina B (fármaco de referência) foi usada como controle positivo. A determinação dos valores de IC_{50} e CC_{50} foi realizada por Me. Mariza Gabriela Faleiro de Moura Lodi Cruz e Profª. Drª. Silvane Maria Fonseca Murta (FIOCRUZ Minas).

Após ter demonstrado que o *scaffold* preferencial foi a *N*-pirazinilpiperazina para derivados aromáticos sem substituintes, o próximo lote de análogos foi planejado para investigar os efeitos da introdução de substituintes no anel pirazina. Uma pequena variedade de substituintes carboxílicos, incluindo ésteres, ácidos e amidas, foi então incorporada na posição 5 do anel pirazínico dos derivados **70** – **75**. O raciocínio por trazer um foco em substituintes carboxílicos foi providenciar um centro de derivatização fácil e rápida para gerar derivados amida, e assim acrescentar um fragmento que poderia ser envolvido em novas interações com o parasita e potencialmente impactar o perfil ADME dos derivados resultantes.

Uma rota sintética que permita derivatização na última etapa e ainda fornecesse intermediários relevantes para o SAR pôde ser implementada para a síntese dos derivados de pirazina com substituintes carboxílicos (Esquema 10). A proteção inicial do ácido 5-cloropirazina-2-carboxílico com éster propílico teve que ser realizada *via* um cloreto de acila para render **68** em rendimento quase-quantitativo, já que condições de Steglich não ativaram a carbonila do ácido o suficiente para que não haja competição entre esterificação e S_NAr no cloro em posição 5. Com a carboxila assim protegida, a S_NAr desejada na posição 5, com piperazina, levou à obtenção de **69** com 86% de rendimento. Outro acoplamento de amida, com o ácido *para*-hidroxibenzoico, permitiu a formação do derivado éster propílico **70**, porém com rendimento de apenas 36%. Em seguida, a hidrólise em meio básico do éster providenciou o ácido carboxílico **71** quantitativamente. Com **71** em mãos, as amidas **72** – **75** foram obtidas *via* acoplamento de amida, no entanto com rendimentos de apenas 13 a 58%.

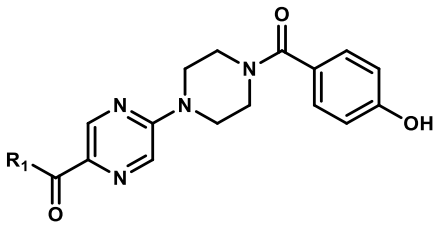


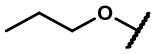
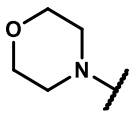
Esquema 10. Síntese das pirazinas com substituintes carboxílicos **70 - 75.**

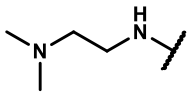
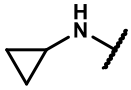
Reagentes e condições: (a) 80 °C, 2 h *depois* 50 °C, 2 h, 98%; (b) Na_2CO_3, DMF, 110 °C, 96 h, 86%; (c) Et_3N, DMF, ta, 72 h, 36%; (d) 1) MeOH/THF (1:1), 4 h, ta, 2) 0 °C, 100%; (e) Et_3N, DMF, ta, 21 – 65 h, 13 – 58%.

Infelizmente, o acréscimo de um substituinte carboxílico adicional no anel pirazina não trouxe melhorias na atividade contra *L. infantum*, evidenciado pelas potências demonstrada por **70** – **75**, que foram de 6 a 45 menores que a potência de **6** contra o parasita (Tabela 8).

Tabela 8. Atividade antileishmanial *in vitro* e seletividade das pirazinas com substituintes carboxílicos **70 - 75**.



Composto	R_1	*L. infantum* IC_{50} (µM)[a]	THP-1 CC_{50} (µM)[b]	SI[c]	clog(P)[d]
6	-	3.1 ± 1.3	1074 ± 4.7	346	0.85
70		21.0 ± 1.2	306.8 ± 2.1	15	1.57
71		89.2 ± 0.5	2094 ± 7.8	23	0.49
72		28.0 ± 3.7	936.0 ± 4.3	33	0.53

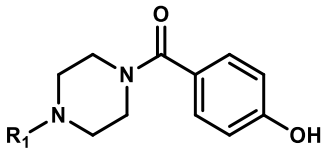
73		139.0 ± 1.3	1077 ± 3.5	8	0.65
74		19.8 ± 2.7	669.8 ± 5.8	34	0.99
75		109.3 ± 0.9	1024 ± 7.6	9	0.71
AmB[e]	-	0.25 ± 0.04	363.8 ± 1.6	1455	-

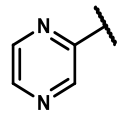
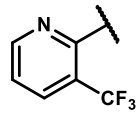
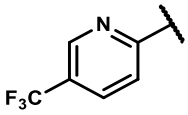
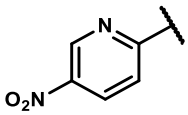
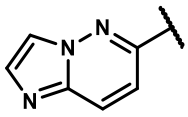
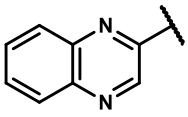
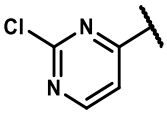
[a]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *L. infantum* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [b]: Valor de CC_{50} (μM) medido em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [c]:índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [d]: Valores de log(P) calculados com a ferramenta web SwissADME (http://www.swissadme.ch/index.php)[36]; [e]: A anfotericina B (fármaco de referência) foi usada como controle positivo. A determinação dos valores de IC_{50} e CC_{50} foi realizada por Me. Mariza Gabriela Faleiro de Moura Lodi Cruz e Prof[a]. Dr[a]. Silvane Maria Fonseca Murta (FIOCRUZ Minas).

A relativa falta de sucesso dos derivados carboxílicos provou ser um motivo para reconsiderar o tipo de anel aromático para uma exploração mais aprofundada de heterocíclos substituídos. Assim, não foram incluídas apenas pirazinas substituídas no próximo lote de derivados, mas também piridinas, pirimidinas, e até uma piridazina. A natureza retiradora de elétrons dos substituintes foi mantida, apesar do tipo e da posição dos grupos retiradores de elétrons terem sido alterados, trocando grupos -M na posição *para* (*para* em relação à piperazina) por grupos -I nas posições *orto*, *meta* e *para* (compostos **57**, **58** e **63**) e grupos -I/-M na posição *para* (composto **59**). Anéis aromáticos fundidos incluindo uma piridazina ou uma pirazina também foram incluídos (compostos **60** e **61**), pois a extensão da ressonância pode ser assimilada a um grupo retirador de elétrons de tipo -M, permitindo assim também a avaliação de sistemas aromáticos mais volumosos. Estes dois últimos derivados levaram à uma perda de potência por um fator 9 em comparação com **6**, sugerindo que, da mesma maneira que pôde ser observado com os derivados carboxílicos (compostos **70** – **75**), um aumento no volume tende a ser desfavorável para a atividade antileishmanial. A respeito dos outros grupos retiradores de elétrons, substituintes do tipo -I tiveram tendência a serem preferidos aos substituintes -I/-M, evidenciado pelo fato que a atividade do derivado *para*-NO_2 **59** foi 7 vezes menor que **6**, enquanto **58**, o análogo CF_3 direto de **59**, chegou a uma potência comparável com **6**, o que

também foi o caso com a 2-cloropirimidina **63**. Enquanto as posições *meta* e *para* apareceram equivalentes a respeito da atividade contra *L. infantum* (compostos **63** e **58**, Tabela 9), a introdução de um substituinte na posição *orto* levou à uma perda completa de atividade quando comparado a ambos **6** e seu equivalente *para*-substituído, além de uma perda completa de seletividade (compostos **57** *vs* **58**, Tabela 9).

Tabela 9. Atividade antileishmanial *in vitro* e seletividade dos derivados de arila com substituintes **57** – **61** e **63**.



Composto	R_1	*L. infantum* IC_{50} (µM)[a]	THP-1 CC_{50} (µM)[b]	SI[c]	clog(P)[d]
6		3.1 ± 1.3	1074 ± 4.7	346	0.85
57		> 284.6	364.0 ± 3.2	< 1.3	2.63
58		6.9 ± 1.6	932.9 ± 7.8	137	2.63
59		23.1 ± 1.2	> 1523	> 66	0.82
60		28.7 ± 2.1	229.8 ± 12.9	8	1.24
61		29.3 ± 3.7	117.2 ± 11.7	4	1.96
63		4.5 ± 2.0	612.1 ± 3.5	136	1.66

AmB[e]	-	0.25 ± 0.04	363.8 ± 1.6	1455	-

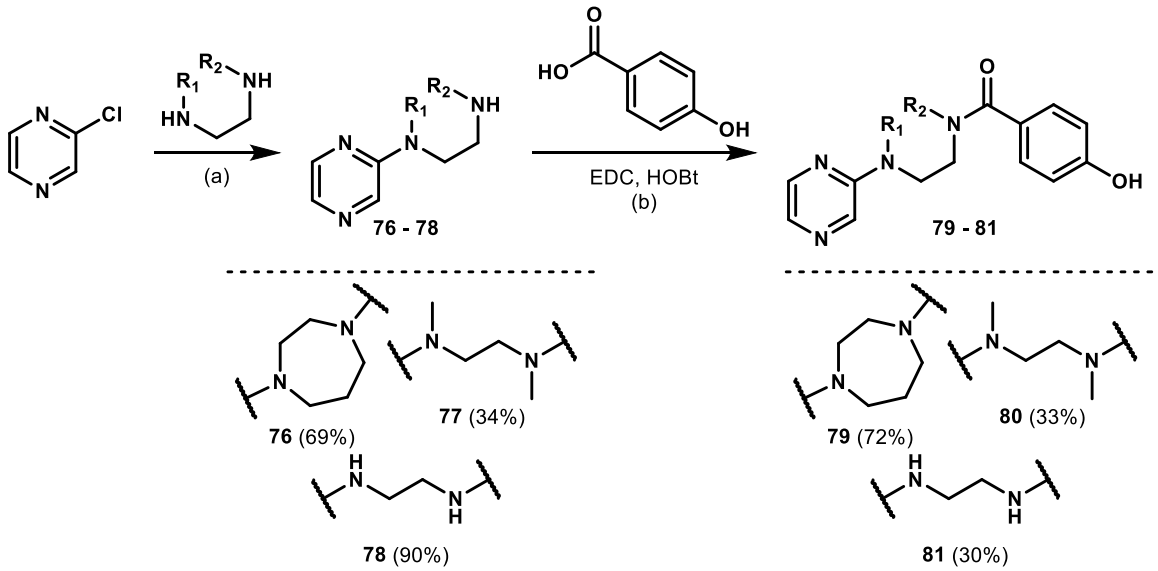
[a]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *L. infantum* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [b]: Valor de CC_{50} (μM) medido em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [c]:índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [d]: Valores de log(P) calculados com a ferramenta web SwissADME (http://www.swissadme.ch/index.php)[36]; [e]: A anfotericina B (fármaco de referência) foi usada como controle positivo. A determinação dos valores de IC_{50} e CC_{50} foi realizada por Me. Mariza Gabriela Faleiro de Moura Lodi Cruz e Prof[a]. Dr[a]. Silvane Maria Fonseca Murta (FIOCRUZ Minas).

Resultando desta investigação no fragmento pirazina de **6**, duas tendências apareceram a respeito do anel aromático no LE. Quando este anel não possui nenhum substituinte, a pirazina presente em **6** permanece o heterocíclo preferencial, apresentando potência cinco vezes maior que **53**, o derivado arila com a segunda melhor potência. Quando substituintes estão introduzidos no anel, no entanto, a pirazina não está mais a melhor opção, abrindo espaço para os anéis 5-trifluorometilpiridina e 2-cloropirimidina, cuja potência é comparável com **6**. Porém, e apesar de **58** e **63** apresentarem potência antileishmanial comparável com **6**, a troca da pirazina não substituída por esses dois heterocíclos não levou de modo geral à um aumento da potência em relação a **6**, já que **58** e **63** estão comparáveis mas não superiores em termos de potência. Portanto, o anel pirazina foi mantido para a exploração do *linker*, por ser o melhor LE.

III) 2. 2. Síntese e atividade biológica dos derivados com modificações no *linker*

O estudo de SAR no *linker* foi planejado para incorporar bioisósteros de piperazina, selecionados para avaliar uma grande diversidade de características dentro de um relativamente baixo número de compostos cíclicos ou lineares. Todos os derivados com modificações no *linker* apresentaram algum grau de relaxação conformacional, sendo todos mais flexíveis que **6**. Como uma desetilação foi sugerida como um possível mecanismo de metabolização para fármacos contendo o fragmento piperazina[49], essa foi simulada pelo derivado etilenodiamina **81**.

Como a natureza das modificações realizadas no *linker* dos derivados **79** – **81** implicou que todos tenham um fragmento central (“núcleo”) diferente, não foi possível incluir nenhum intermediário comum que possa servir de *scaffold* a ser derivatizado na síntese deles. Por isto, tais derivados foram sintetizados a partir das diaminas apropriadas na mesma maneira que **6** (Esquema 11).

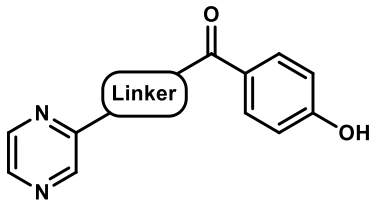


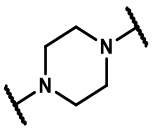
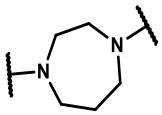
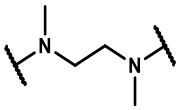
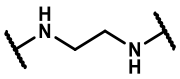
Esquema 11. Síntese dos derivados com modificações no linker **79** - **81**.

Reagentes e condições: (a) Na_2CO_3, PrOH, 80 °C, 24 – 48 h, 34 – 90%; (b) Et_3N, DMF, ta, 20 – 40 h, 30 – 72%.

A substituição do *linker* piperazina por bioisósteros mais flexíveis revelou ser altamente desfavorável para a atividade de **79** – **81** contra *L. infantum*, que despencou em comparação com **6** (Tabela 10). O derivado heterocíclico **79** apresentou melhores resultados que os seus equivalentes lineares **80** e **81**, sendo aproximadamente 5 vezes mais ativo que ambos os derivados lineares, assim sugerindo que diaminas cíclicas sejam preferidas frente a lineares para juntar o LE aromático com o lado direito (LD) benzoíla. No entanto, **79** ainda apresentou uma queda de atividade por um fator 11 em relação a **6**, indicando que diaminas cíclicas mais rígidas e com maior restrição conformacional podem ser ligadas à uma maior atividade, conforme observado no caso de **6** com o *linker* piperazina. Uma possível explicação para a perda de potência observada com **79** – **81** seria que a maior flexibilidade e menor restrição conformacional impeça esses derivados de encaixar adequadamente no sítio ativo do possível alvo, explicação sustentada pelo fato que o decaimento na atividade dos compostos segue o aumento na flexibilidade dos novos *linkers*. A identificação do alvo de série e estudos de mecanismo de ação (MoA), no entanto, ainda são necessários para poder plenamente confirmar ou infirmar tal hipótese.

Tabela 10. Atividade antileishmanial *in vitro* e seletividade dos derivados com modificações no *linker* **79** - **81**.



Composto	Linker	*L. infantum* IC_{50} (μM)[a]	THP-1 CC_{50} (μM)[b]	SI[c]	clog(P)[d]
6		3.1 ± 1.3	1074 ± 4.7	346	0.85
79		34.9 ± 3.5	1381 ± 5.2	40	1.12
80		169.3 ± 3.3	1540 ± 2.0	9	1.11
81		182.9 ± 2.5	1159 ± 19.2	6	0.79
AmB[e]	-	0.25 ± 0.04	363.8 ± 1.6	1455	-

[a]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *L. infantum* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [b]: Valor de CC_{50} (μM) medido em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [c]:índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [d]: Valores de log(P) calculados com a ferramenta web SwissADME (http://www.swissadme.ch/index.php)[36]; [e]: A anfotericina B (fármaco de referência) foi usada como controle positivo. A determinação dos valores de IC_{50} e CC_{50} foi realizada por Me. Mariza Gabriela Faleiro de Moura Lodi Cruz e Prof[a]. Dr[a]. Silvane Maria Fonseca Murta (FIOCRUZ Minas).

III) 2. 3. Síntese e atividade biológica dos derivados híbridos

Apesar da grande diversidade de compostos planejados, sintetizados e avaliados contra *L. infantum* para o estudo de SAR nos fragmentos pirazina e *linker*, nenhum conseguiu alcançar uma potência maior que **6** contra o parasita. Apenas dois compostos, **58** e **63**, chegaram a níveis de atividade comparáveis com **6**, porém ainda permaneceram inferiores neste quesito e em

termos de seletividade, que foi meramente metade do SI de **6**. Entre esses dois derivados com modificações no LE, **58** foi aquele que apresentou maior lipofilicidade, o que pode resultar numa maior potência devido a uma permeabilidade maior das membranas, além de ser o derivado para qual a rota sintética foi a mais simples e curta (duas etapas a menos comparando com **63**). Por essas razões, e porque **49** oferece um *scaffold* confiável para uma derivatização fácil e rápida, **58** foi selecionado para o planejamento de um último lote de derivados por hibridização molecular. Como o objetivo permaneceu ser a identificação de um análogo com potência maior que **6** contra *L. infantum*, **58** foi hibridizado com os fragmentos benzoíla presentes nos derivados com IC_{50} < 5 µM contra qualquer espécie de *Leishmania* provenientes do estudo de SAR no fragmento benzoíla descrito na primeira parte deste trabalho. Um último híbrido também foi planejado, devido ao fato que o fragmento *N*,*N*-dimetilaminoetoxila revelou-se essencial para a atividade antileishmanial de uma outra série de derivados do grupo de pesquisa, levando tal série a níveis de potência sub-micromolares (Figura 11).[50] Portanto, a alquilação de **6** foi realizada para incluir este fragmento, numa tentativa de levar sua atividade para níveis sub-micromolares também (composto **93**, Tabela 11).

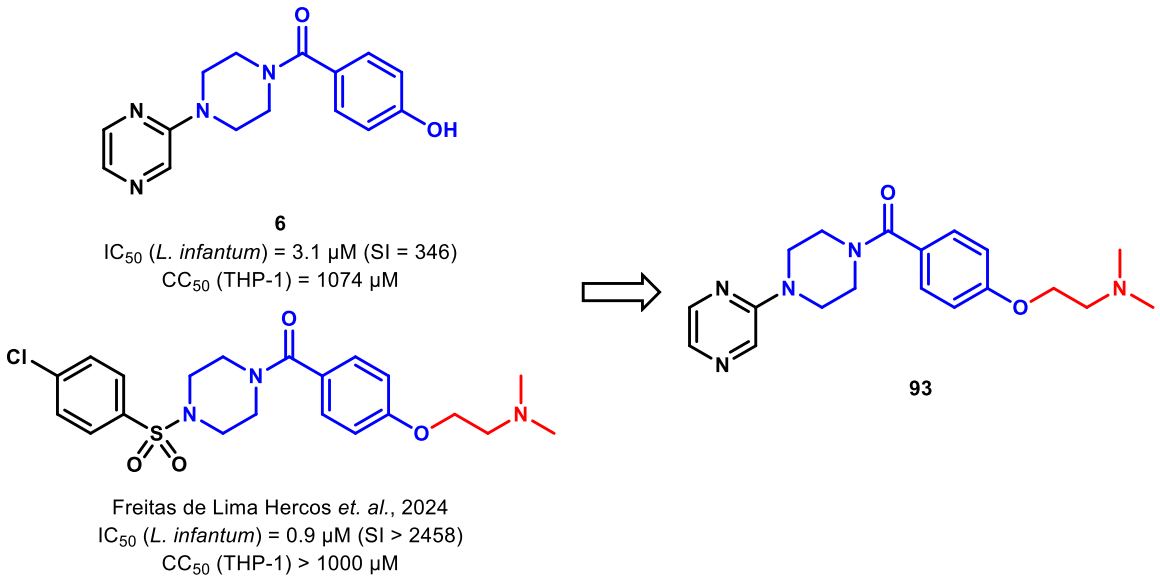
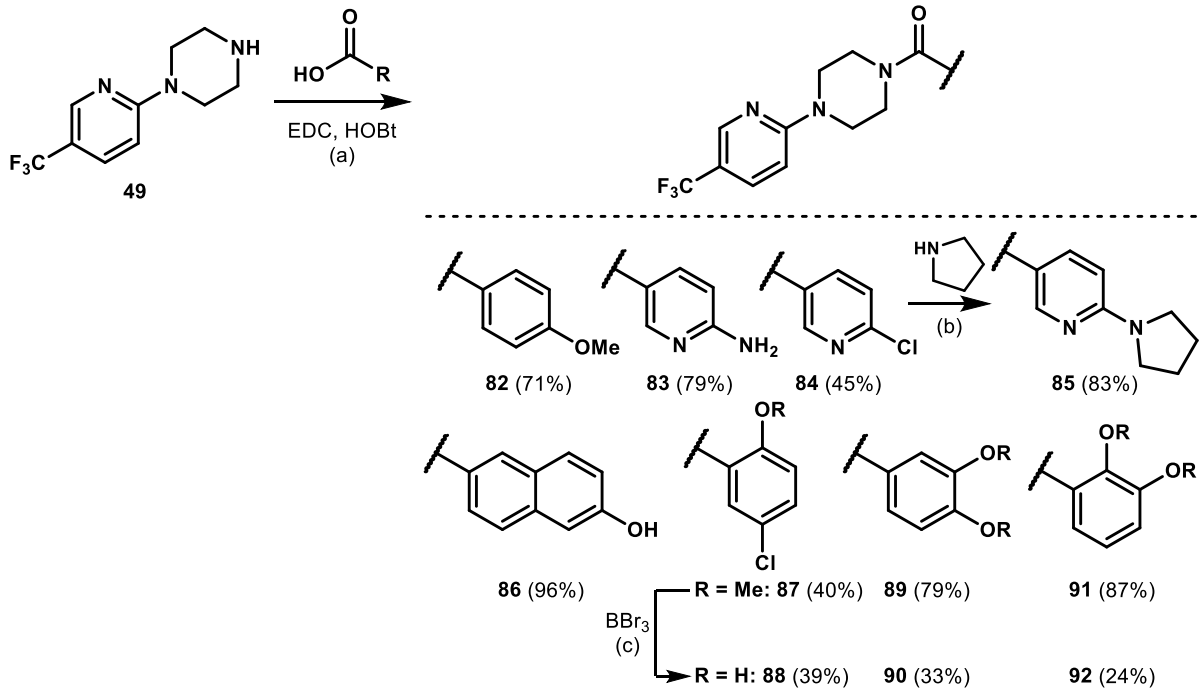


Figura 11. Planejamento do derivado **93** a partir de **6** e de um composto com similaridade estrutural.[50]

Todos os híbridos *para*-trifluorometilpiridina foram sintetizados a partir da arilpiperazina **49** seguindo os mesmos passos que para a síntese dos derivados de pirazina correspondentes descrita na parte dedicada ao fragmento benzoíla. Resumidamente, todos os fragmentos benzoíla foram introduzidos por acoplamento de amida entre **49** e o ácido carboxílico adequado, e a 6-cloronicotinamida **84** foi derivatizada na 6-pirrolinonicotinamida

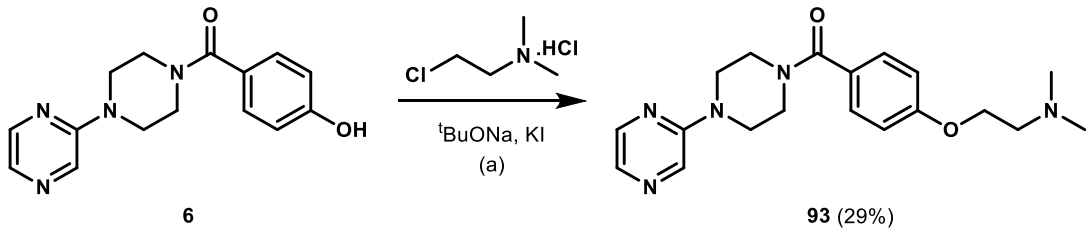
85 por S_NAr, enquanto a desmetilação dos derivados metoxilados **87**, **89** e **91** rendeu os compostos hidroxilados correspondentes **88**, **90** e **92**, respectivamente (Esquema 12).



Esquema 12. Síntese dos híbridos *para*-trifluorometilpiridina **82** - **92**.

Reagentes e condições: (a) Et_3N, DMF, ta, 12 – 24 h, 40 – 96%; (b) Na_2CO_3, DMF, 90 °C, 84 h, 83%; (c) DCM, Ar atm., 0 °C – ta, 13 – 48 h, 24 – 39%.

O híbrido de *N*,*N*-dimetilaminoetoxila **93** foi sintetizado por substituição nucleofílica do cloridrato de 2-cloro-*N*,*N*-dimetiletan-1-amina com **6** (Esquema 13), no entanto com rendimento baixo (29%) apesar da adição de iodeto de potássio (KI) para promover uma reação de Finkelstein *in situ*, levando à formação da 2-iodo-*N*,*N*-dimetiletan-1-amina mais reativa que o cloreto de alquila correspondente em reações de substituição nucleofílica com **6**.

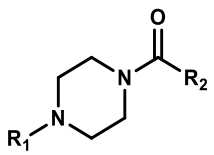


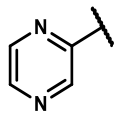
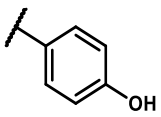
Esquema 13. Síntese do híbrido de *N*,*N*-dimetilaminoetoxila **93**.

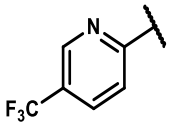
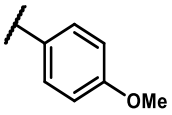
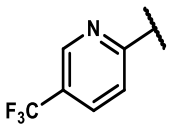
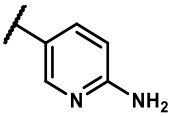
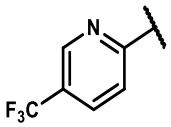
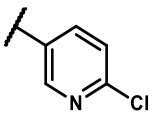
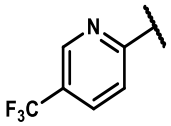
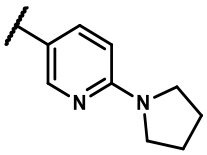
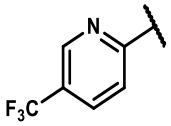
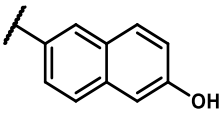
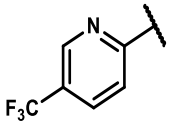
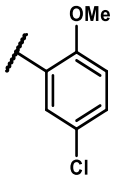
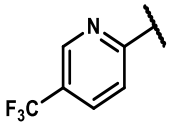
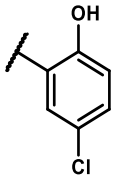
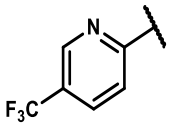
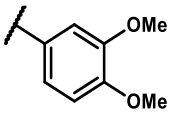
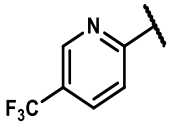
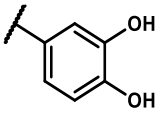
Reagentes e condições: (a) DMF, 120 °C, 120 h, 29%.

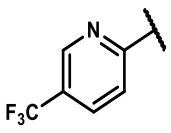
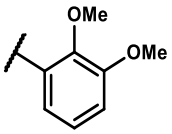
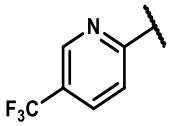
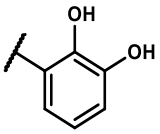
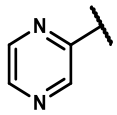
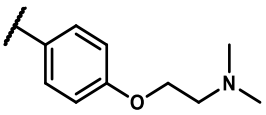
Nenhum dos híbridos **82** – **93** conseguiu apresentar uma potência contra o parasita próxima àquela apresentada por **6**. De fato, a maior atividade dentro dos híbridos foi alcançada pelo derivado 2-metoxi-5-cloro **87**, que ainda permaneceu 4 vezes menos ativo que **6**. Surpreendentemente, tendências radicalmente diferentes foram observadas na relação estrutura-atividade no fragmento benzoíla dentro deste lote de híbridos, quando comparadas com as tendências previamente destacadas com um anel pirazina no LE. Por exemplo, com uma pirazina no LE, a tendência geral era que derivados hidroxilados fossem mais favoráveis para a atividade antiparasitária que seus equivalentes metoxilados, enquanto o oposto foi observado com esse lote apresentando uma 5-(trifluorometil)piridina no LE, levando a uma perda de atividade por um fator 4 a 12 após desmetilação (compostos **87**, **89** e **91** *vs* **88**, **90** e **92**, respectivamente). Assim, mesmo que esses híbridos não tenham conseguido entregar um composto cuja potência seja maior que **6**, esse lote e sua atividade relativamente inferior estão de prima importância para o entendimento do SAR da série. De fato, a falta de atividade apresentada pelos híbridos combinando fragmentos provenientes de compostos com atividades no baixo micromolar sugere que a atividade seja dependente da estrutura como um todo quando mais de um fragmento está modificado de uma vez, e que tal dependência seja muito mais complexa e intricada que quando apenas um fragmento está sendo alterado. De modo mais geral, e de relativo interesse para a comunidade cientifica da área, uma conclusão estabelecida no estudo de SAR de uma série de compostos pode não levar aos mesmos resultados, ou até levar a resultados radicalmente opostos, quando aplicada a uma série diferente, mesmo que os fragmentos e/ou séries envolvidos apresentem similaridades (exemplificado pelos compostos **6** e **93**). Um resumo gráfico do estudo de SAR com a integralidade da série de pirazinilpiperazinas está disponível na Figura 12.

Tabela 11. Atividade antileishmanial *in vitro* e seletividade dos derivados híbridos **82** - **93**.



Comp.	R_1	R_2	*L. infantum* IC_{50} (µM)[a]	THP-1 CC_{50} (µM)[b]	SI[c]	clog(P)[d]
6			3.1 ± 1.3	1074 ± 4.7	346	0.85

82			84.4 ± 3.0	ND[e]	ND	3.00
83			127.4 ± 7.9	ND	ND	1.90
84			> 215.8	ND	ND	2.90
85			> 197.3	ND	ND	2.89
86			38.4 ± 3.0	ND	ND	3.51
87			12.2 ± 1.4	30.3 ± 3.1	2	3.45
88			150.0 ± 7.1	ND	ND	3.22
89			13.7 ± 0.3	38.7 ± 5.2	3	2.92
90			80.5 ± 3.9	ND	ND	2.18

91			23.9 ± 1.2	35.9 ± 5.2	2	2.93
92			103.8 ± 5.5	ND	ND	2.32
93			69.0 ± 3.1	ND	ND	1.36
AmB[f]	-	-	0.25 ± 0.04	363.8 ± 1.6	1455	-

[a]: Valor de IC_{50} (µM) para a inibição do crescimento de *L. infantum* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [b]: Valor de CC_{50} (µM) medido em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [c]:índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [d]: Valores de log(P) calculados com a ferramenta web SwissADME (http://www.swissadme.ch/index.php)[36]; [e]: Não determinado; [f]: A anfotericina B (fármaco de referência) foi usada como controle positivo. A determinação dos valores de IC_{50} e CC_{50} foi realizada por Me. Mariza Gabriela Faleiro de Moura Lodi Cruz e Prof[a]. Dr[a]. Silvane Maria Fonseca Murta (FIOCRUZ Minas).

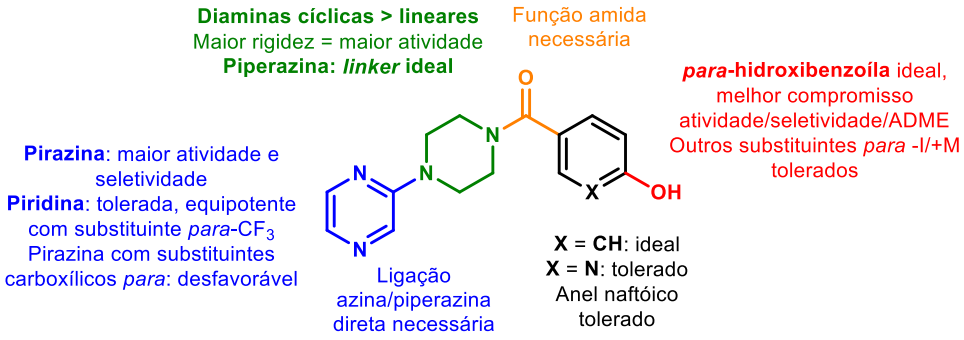


Figura 12. Resumo do estudo de SAR da série de pirazinilpiperazinas contra *L. infantum*.

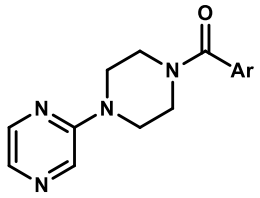
III) 3. Perfil ADMET *in vitro* dos compostos com maior atividade antileishmanial

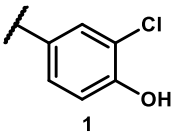
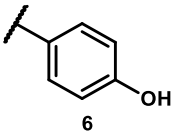
Para identificar o composto mais adequado para estudos *in vivo* em camundongos, foi avaliado o perfil ADME *in vitro* do hit inicial **1** e dos compostos mais ativos ($IC_{50} < 5$ µM) contra *L. infantum*. Alguns compostos encaixando neste critério de potência foram deliberadamente desconsiderados para essa avaliação, por apresentarem fragmentos classificados como PAINS ou outros grupos lábeis, como por exemplo o grupo protetor *N*-Boc que resultaria após clivagem em meio ácido numa amina pouco ativa (IC_{50} aumentando de 2.9 µM com **31** para 86.5 µM com **32**). O derivado 2-cloropirimidina **63** também foi

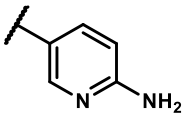
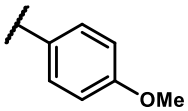
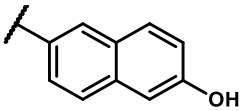
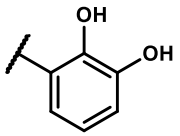
desconsiderado, devido à sua seletividade nitidamente inferior (SI = 136) aos compostos retidos para determinação do perfil ADME (SI > 240). Apesar de ter excluído a maioria dos compostos com características estruturais problemáticas (fragmentos PAINS ou grupos lábeis), o composto **40** ainda foi selecionado para estudos ADME *in vitro* devido à sua potência e seletividade contra ambos *L. infantum* e *L. braziliensis*, embora o fragmento catecol seja considerado como PAINS.[43]

As propriedades ADME a serem avaliadas *in vitro* para os candidatos selecionados **1**, **6**, **19**, **29**, **33** e **40** foram determinadas de maneira a proporcionar uma estimativa relevante tanto da biodisponibilidade quanto da estabilidade metabólica dos compostos. Assim, a permeabilidade na barreira hematoencefálica (BBB) e gastrointestinal (GI) foi avaliada por ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA). O tempo de meia-vida e o *clearance* intrínseco microssomais de todos os compostos foram avaliados em microssomas de fígado de rato (MLM), na presença de um sistema gerador de NADPH. Os perfis ADME *in vitro* assim determinados estão resumidos na Tabela 12.

Tabela 12. Potência antileishmanial, seletividade e propriedades ADME *in vitro* dos candidatos a estudos *in vivo*.



Ar	***L. infantum*** **IC_{50} (µM)[a]** **(SI)[a]**	***L. braziliensis*** **IC_{50} (µM)[b]** **(SI)[b]**	**clog(P)[c]**	***P_e* BBB** **(10^{-6} cm/s) e classificação CNS[d]**	***P_e* GI** **(10^{-6} cm/s)[e]**	***F_a* (%) e classificação[f]**	**$t_{1/2}$ (min)[g]**	**Cl_{int} (µL/min/mg)[h]**
 **1**	11.9 ± 2.2 (46)	11.7 ± 0.7 (46)	1.36	0.52 CNS-	12.92	99.26 Absorção alta	141.43	1.225
 **6**	3.1 ± 1.3 (346)	7.6 ± 3.2 (141)	0.85	0.55 CNS-	2.59	62.71 Absorção intermediária	315.00	0.550

 19	5.1 ± 2.1 (524)	11.9 ± 1.1 (224)	0.14	1.02 CNS-	18.41	99.91 Absorção alta	256.66	0.675
 29	4.5 ± 0.7 (422)	10.1 ± 2.8 (188)	1.24	2.21 CNS+/-	18.16	99.90 Absorção alta	187.30	0.925
 33	3.3 ± 2.7 (241)	2.6 ± 0.2 (306)	1.75	0.96 CNS-	1.61	45.70 Absorção intermediária	216.56	0.800
 40	2.8 ± 1.1 (> 1189)	0.2 ± 0.2 (> 16650)	0.63	4.51 CNS+	5.22	86.26 Absorção alta	41.25	4.200

[a]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *L. infantum* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [b]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *L. braziliensis* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [c]: Valores de log(P) calculados com a ferramenta web SwissADME (http://www.swissadme.ch/index.php)[36]; [d]: permeabilidade hematoencefálica. CNS-: baixa permeabilidade na BBB, P_e (10^{-6} cm/s) < 2.0. CNS+/-: permeabilidade na BBB incerta, 2.0 < P_e (10^{-6} cm/s) < 4.0. CNS+: alta permeabilidade na BBB, P_e (10^{-6} cm/s) > 4.0[51,52]; [e]: permeabilidade gastrointestinal; [f]: Fração absorvida (GI). Absorção alta: F_a > 70%, absorção intermediária: 30% < F_a < 70%, absorção baixa: F_a < 30%[53]; [g]: Meia-vida microssomal determinada em microssomas de fígado de rato (MLM), na presença do cofator NADPH; [h]: *Clearance* intrínseco determinado em MLM, na presença do cofator NADPH. Os ensaios de ADME in vitro foram realizados por Dr[a]. Gisele Barbosa e Prof[a]. Dr[a]. Lídia Moreira Lima (LASSBio ®).

De modo geral, o *hit* **1** e todos os candidatos para *in vivo* apresentaram perfis ADME satisfatórios para serem avaliados em camundongos.[26,32,54]

Com a exceção de **29** e **40**, todos os derivados exibiram uma baixa permeabilidade hematoencefálica e foram então classificados com CNS- (Tabela 12). O análogo *para*-metoxifenil **29** apresentou uma permeabilidade dentro da faixa de incerteza do ensaio (CNS+/-), impedindo-o de ser claramente classificado como CNS positivo (CNS+) ou negativo (CNS-), e foi demonstrado que **40** permeava facilmente a BBB (CNS+). Portanto, pode-se especular que os compostos **1**, **6**, **19** e **33** possam apresentar poucas interações fora de alvo com o sistema

nervoso central e outros possíveis efeitos colaterais associados com a permeação da barreira hematoencefálica.

Sobre a permeação no trato gastrointestinal, o *hit* já demonstrou boa permeabilidade com altos valores de P_e e fração absorvida (F_a) (**1**, Tabela 12), e ambos os derivados *para*-metoxibenzóico e 6-aminonicotínico conseguiram melhorá-la, em comparação com **1** (compostos **19** e **29**, Tabela 12). De modo surpreendente, **19** levou à maior absorção gastrointestinal do lote de candidatos a estudos *in vivo*, apesar de ser o composto com a menor lipofilicidade do lote (clog(P) = 0.14, Tabela 12). Em contraste com isto, a remoção do cloro em **6** e a troca do anel 3-cloro-4-hidroxibenzóico de **1** por um 2-naftol em **33** levou a valores de absorção gastrointestinal medianas para **6** e **33**, o último até chegando a exibir uma $F_a <$ 50%. Tal decaimento na permeabilidade GI, ao comparar com **1**, pode ser esperado e explicado por uma lipofilicidade menor em **6**, porém tal raciocínio não se aplica para o derivado naftóico **33**, cujo clog(P) foi o maior de todos os candidatos a *lead*. A menor permeabilidade GI deste último composto poderia então ser devida à simples presença do seu substituinte *para*-hidroxila, o que pode também contribuir à explicação da menor permeabilidade GI de **6** além da lipofilicidade já mencionada. O substituinte *para*-hidroxila sendo um aceptor e doador de ligações de hidrogênio encontrado livre de impedimento estérico nesses dois compostos, isso pode contribuir para uma diminuição não só da lipofilicidade de **6** e **33**, quando comparados com seus equivalentes 3-cloro-4-hidroxila, mas também da habilidade desses dois derivados a atravessar membranas celulares, permitindo o estabelecimento de ligações de hidrogênio com tais membranas mais facilmente sem o impedimento estérico induzido pelo cloro na vizinhança da hidroxila. Diferente dos dois derivados monohidroxilados, o catecol **40** exibiu uma absorção gastrointestinal relativamente alta (F_a = 86.26%, Tabela 12), isso apesar do grupo hidroxila adicional na estrutura dele e da sua lipofilicidade ligeiramente menor (clog(P) = 0.63). Tal absorção gastrointestinal, maior do que aquela observada com **6** e **33**, poderia ser causada por ligações de hidrogênio intramoleculares no fragmento catecol de **40**. De fato, ligações de hidrogênio intramoleculares podem contribuir significativamente ao aumento da permeabilidade em membranas de moléculas pequenas, ao simular a remoção de um aceptor e de um doador de ligações de hidrogênio na molécula e então "blindar" a polaridade da molécula, o que resulta numa maior permeabilidade.[55–57] Por isto, pode ser que a permeabilidade e a absorção gastrointestinal das pirazinilpiperazinas não dependa exclusivamente da natureza dos substituintes presentes no fragmento benzoíla, mas também do número e das posições relativas deles, como foi exemplificado pela comparação entre **6**, **33** e **40**.

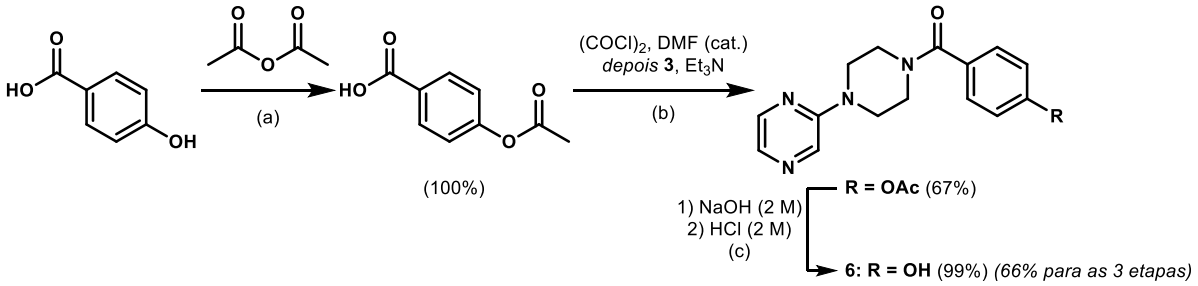
Satisfatoriamente, a grande maioria dos candidatos a estudos *in vivo* apresentou melhorias na estabilidade metabólica em relação a **1**. A única exceção foi observada com o catecol **40**, para qual o *clearance* intrínseco foi três vezes maior que o *hit* e a meia-vida microssomal foi diminuída pelo mesmo fator. Tais resultados podem se esperar com compostos contendo o fragmento catecol igual **40**, pois este fragmento foi reportado como propenso a metabolismo oxidativo por enzimas CYP gerando metabólitos quinoides altamente reativos, o que levou a classificação do fragmento como PAINS.[43,58] Essa queda na estabilidade metabólica, além da classificação CNS+, levaram **40** a ser desconsiderado para um potencial estudo *in vivo* contra *L. infantum*, apesar da potência e seletividade *in vitro* superiores demonstradas por esse derivado. A remoção do *meta*-Cl em **6** provou ser a modificação estrutural mais eficiente para o aumento da estabilidade metabólica, diminuindo o *clearance* intrínseco por mais da metade e levando a uma meia-vida microssomal 2.2 vezes maior, quando comparado com **1**, o que pode ser uma consequência da redução substancial de lipofilicidade de **1** para **6** (Tabela 12). Em contraste, o equivalente metoxila de **6** (composto **29**) teve seu *clearance* reduzido por um fator apenas 1.3 quando comparado a **1**, enquanto o análogo 6-aminonicotinico **19**, outro equivalente próximo de **6**, apresentou resultados similares a **6** em termos de estabilidade metabólica. Perfis metabólicos tão diferentes dentro de compostos tão similares podem ser explicados pelo fato que derivados metoxilados podem ser facilmente metabolizados por desmetilação, sugerindo que o grupo metoxila de **29** seja responsável por sua estabilidade metabólica inferior aos análogos próximos **6** e **19**.[59] No entanto, e apesar desta estabilidade microsomal inferior a **6**, a metabolização *in vivo* de **29** é susceptível de render principalmente **6** por desmetilação, o que resultaria na liberação de um composto mais ativo como metabólito principal.

Considerando os resultados apresentados acima, o derivado *para*-hidroxila **6** foi identificado como o candidato a estudos *in vivo* mais promissor, por apresentar o melhor perfil ADME e uma das maiores potências antileishmaniais do lote de candidatos. Apesar de uma permeabilidade e absorção gastrointestinal relativamente inferior a **19**, **6** se destacou como o composto com a menor permeabilidade hematoencefálica e a maior estabilidade metabólica microssomal, o que poderia contrabalancear a menor absorção gastrointestinal para garantir uma biodisponibilidade satisfatória. Além disto, **6** demonstrou uma citotoxicidade baixa em células HepG2 (CC_{50} > 64 μM), sugerindo que esse composto não seja hepatotóxico. Diante disto, **6** foi considerado o mais apropriado para ensaios *in vivo* e foi então selecionado para a avaliação da sua eficácia antileishmanial e da sua toxicidade em camundongos.

III) 4. Avaliação da eficácia antileishmanial de 6 *in vivo* em camundongos BALB/c

Antes da avaliação de **6** em modelos de leishmaniose visceral em camundongos, a dose máxima tolerada (DMT) dele foi determinada em camundongos BALB/c, seguindo os critérios recomendados para seleção de compostos *lead* contra *Leishmania*.[60] Dois camundongos BALB/c sadios (um macho, uma fêmea) receberam de modo intraperitoneal doses incrementais de **6** (emulsão em polietileno glicol) a cada 2 horas, até uma dose final acumulada de 100 mg/kg. Os camundongos foram inspetados para eventuais manifestações clínicas 24 horas após administração da última dose de **6**, e a observação não revelou nenhum sinal de toxicidade aguda em ambos os animais. Portanto, a avaliação *in vivo* da atividade antileishmanial de **6** em camundongos BALB/c foi realizada usando doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg.

Para tal avaliação *in vivo*, **6** teve que ser sintetizado em maior escala, devido às doses selecionadas para a realização do estudo. Porém, ao aumentar a escala para a síntese de **6** a partir de **3** e do ácido *para*-hidroxibenzoico conforme descrito no Esquema 2, o rendimento caiu por aproximadamente 20%, de um rendimento de 56% numa escala de 20 mg para um rendimento de 37% numa escala de 400 mg. Portanto, uma rota alternativa foi planejada para a síntese de **6** em escalas maiores, focada no uso de um cloreto de acila para o acoplamento de amida entre **3** e o ácido carboxílico, considerando que cloretos de acila apresentam uma reatividade maior que os ésteres ativados de EDC/HOBt neste tipo de reações (Esquema 14). Inicialmente, uma tentativa de amidação direta *via* formação de cloreto de acila entre o ácido *para*-hidroxibenzoico e **3** foi realizada, porém não obteve sucesso, provavelmente devido à reações paralelas envolvendo o grupo *para*-hidroxila do ácido carboxílico (troca hidroxi-cloro e/ou esterificação, principalmente). O ácido *para*-hidroxibenzoico foi então protegido com um grupo acetila para impedir tais reações paralelas na etapa subsequente, rendendo o ácido *para*-acetoxibenzoico de maneira quantitativa. Em seguida, o acoplamento de amida entre **3** e o ácido *para*-acetoxibenzoico formou o derivado acetilado desejado com 67% de rendimento numa escala de 170 mg, *via* a formação do intermediário cloreto de acila a partir de ácido *para*-acetoxibenzoico usando cloreto de oxalila. Finalmente, o grupo protetor acetila foi removido por hidrólise em condições básicas com 99% de rendimento, rendendo assim **6** em 66% de rendimento global para as três etapas a partir de ácido *para*-hidroxibenzoico, o que levou a uma melhoria significativa comparando com o rendimento de 37% obtido usando o sistema EDC/HOBt.



Esquema 14. Síntese otimizada de **6** em maior escala.

Reagentes e condições: (a) H_2SO_4 (96%) (cat.), 80 °C, 100%; (b) DCM, atm. Ar, 0 °C, 2 h *depois* DCM, atm. Ar, 0 °C – ta, 3 h, 67%; (c) 1) MeOH/THF (3:1), ta, 3 h, 2) 0 °C, 99%.

Relatos prévios reportaram que a transfeção de *L. infantum* com o gene *tdTomato* não alterava nem a infetividade do parasita, nem a eficácia do antimoniato de meglumina para o tratamento de animais infetados com parasitas transfectados *L. infantum::tdTomato*.[61] Portanto, a eficácia de **6** em modelos de leishmaniose visceral em camundongos BALB/c foi avaliada em camundongos infetados com linhagens de *L. infantum* mutantes (transfetados com *tdTomato*), usando antimoniato de meglumina como controle positivo.

Camundongos BALB/c machos infetados com parasitas *L. infantum* foram tratados de modo intraperitoneal com **6** (um grupo recebendo uma dose de 50 mg/kg/dia e outro grupo uma dose de 100 mg/kg/dia), antimoniato de meglumina (500 mg/kg/dia), ou foram deixados sem tratamento (grupo de controle). Deu-se início ao tratamento 7 dias depois da infeção (dpi) e teve uma duração de 10 dias consecutivos. Após 20 dpi (3 dias depois do fim do tratamento), a determinação da carga parasitária em ambos o baço e o fígado mostrou que o tratamento com **6** numa dose de 50 mg/kg/dia reduziu a parasitemia por 80.0% ($P < 0.05$) e 44.4% (não significativo de acordo com a análise estatística), respectivamente, ao comparar com o controle não tratado (Figura 13). Um aumento da dose de **6** para 100 mg/kg/dia promoveu uma melhoria significativa na redução da carga parasitaria, especialmente no fígado, chegando a uma redução da parasitemia por 91.1% ($P < 0.01$) e 90.0% ($P < 0.01$) no baço e no fígado, respectivamente. Conforme esperado, o tratamento com 500 mg/kg/dia de antimoniato de meglumina (controle positivo) levou a uma erradicação quase-completa de *L. infantum* em ambos os órgãos. Nenhum sinal de toxicidade aguda (irritação da pele, comportamento abnormal, irritação nos olhos, ...) foi observado em ambos os grupos tratados com **6** durante e depois o período do tratamento, sugerindo que **6** não apresente toxicidade aguda *in vivo* quando for usado em doses iguais ou inferiores a 100 mg/kg/dia durante períodos intermediários. Além disso, nenhuma morte foi

reportada dentro dos grupos tratados com **6** em ambas as doses, destacando assim seu perfil de baixa toxicidade como relevante para o tratamento não só da leishmaniose visceral, mas também de possivelmente outras doenças parasitárias, considerando que esses resultados foram obtidos após um tratamento relativamente longo (10 dias) usando uma dose diária relativamente alta (100 mg/kg). Portanto, regimes de tratamento com doses maiores em **6** poderiam ser consideradas em estudos futuros, almejando reduzir o prazo de tratamento e/ou completamente eliminar a carga parasitária no baço e fígado de camundongos infetados por *L. infantum*. Desses resultados, confirmando **6** como um *lead* eficaz contra leishmaniose visceral, e considerando que a permeabilidade maior de **29** deveria melhorar sua biodisponibilidade enquanto reteria atividade anti-*L. infantum* equivalente a **6**, o derivado metoxilado **29** aparece como um candidato promissor para uma futura avaliação *in vivo*, potencialmente atuando como um pró-fármaco de **6** em metabolismo de fase I.

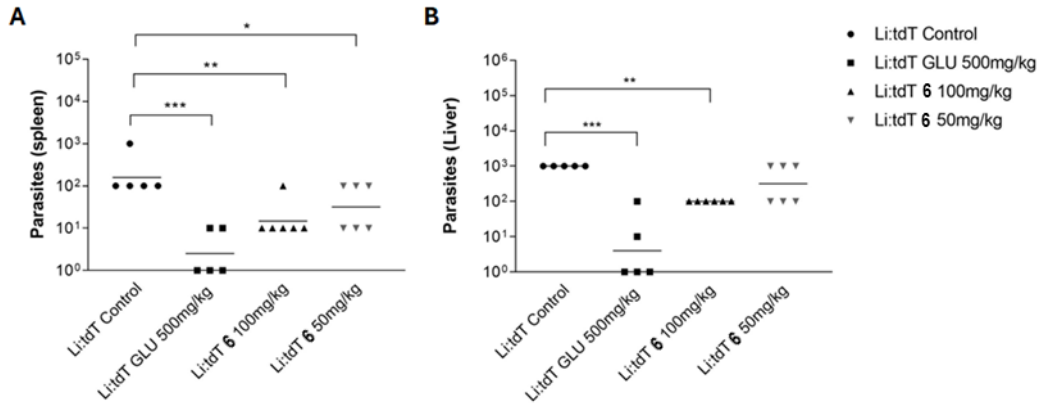


Figura 13. Eficácia *in vivo* de **6** (50 mg/kg/dia e 100 mg/kg/dia) em modelo de leishmaniose visceral em camundongos BALB/c (tratamento de 10 dias).

Antimoniato de meglumina (500 mg/kg/dia) foi usado como controle positivo, e um grupo foi deixado sem tratamento como controle negativo. A eficácia antileishmanial foi avaliada pelo número de parasitas viáveis recuperados do baço (A) e do fígado (B) dos camundongos tratados com **6** e antimoniato de meglumina, comparando com o controle não tratado (uma escala logarítmica foi usada para a representação gráfica). Barras horizontais representam o número médio de parasitas viáveis. Os grupos recebendo um tratamento foram comparados com o controle negativo usando uma análise da variância com o teste de Bonferroni *post hoc*. Astériscos (*) representam diferenças significativas em relação ao grupo não tratado (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$). GLU: Antimoniato de meglumina. *Li:tdT*: parasitas transfetados *L. infantum::tdTomato*. Os ensaios *in vivo* foram realizados por Me. Mariza Gabriela Faleiro de Moura Lodi Cruz e Profª. Drª. Silvane Maria Fonseca Murta (FIOCRUZ Minas).

III) 5. Investigação do mecanismo de ação de 6

III) 5. 1. Sinergismo entre 6 e fármacos antimoniais

O sinergismo caracteriza-se pela combinação de dois fármacos resultando num maior efeito que aquele esperado baseando-se na simples aditividade das suas atividades individuais.[62] Uma estratégia para combater a emergência de cepas de *Leishmania* resistentes a fármacos é o uso da terapia combinatória, que se aproveita, pelo menos parcialmente, dos efeitos sinergéticos de dois fármacos com diferentes mecanismos de ação.[1] Portanto, a avaliação de possíveis efeitos sinergéticos durante o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos contra a leishmaniose constitua uma etapa relevante do processo a respeito da terapia combinatória.[1,18]

Antimoniais pentavalentes supostamente atuam como pró-fármacos, sofrendo redução *in vivo* para seus equivalentes antimoniais trivalentes, que são responsáveis pela toxicidade dos antimoniais contra ambos o parasita e o hóspede humano.[63,64] Por isso, antimônio trivalente (Sb^{III}) foi usado para a avaliação *in vitro* de um possível sinergismo entre **6** e antimoniais. O valor de IC_{50} contra amastigotas intracelulares de *L. infantum* foi usado para tal avaliação, usando cinco concentrações aumentando gradativamente em **6** (IC_{50} = 3.1 ± 1.3 μM), Sb^{III} (IC_{50} = 2.4 ± 0.5 μM), e a combinação de ambos. A normalização dos dados como resposta fracional permitiu a realização dos cálculos usando um modelo Bayesiano.[65] A interferência Bayesiana permite determinar se uma combinação de compostos resulta em efeitos sinergéticos, antagônicos ou aditivos, levando em consideração parâmetros tais como a variabilidade entre diferentes experimentos, a variabilidade dentro do mesmo experimento (ou seja, a variabilidade entre os replicatos), e a variabilidade dentro das respostas observadas em experimentos de controle.[65] Aplicando este modelo aos dados coletados com **6**, Sb^{III} e a combinação deles mostrou que **6** e Sb^{III} não exibiram um efeito sinergético *in vitro* contra *L. infantum*, mas ao invés exibiram uma leve tendência antagônica. De fato, a combinação deles resultou numa resposta fracional menor do que ambas as respostas resultando de **6** e Sb^{III} quando avaliados separadamente contra *L. infantum* (Figura 14).

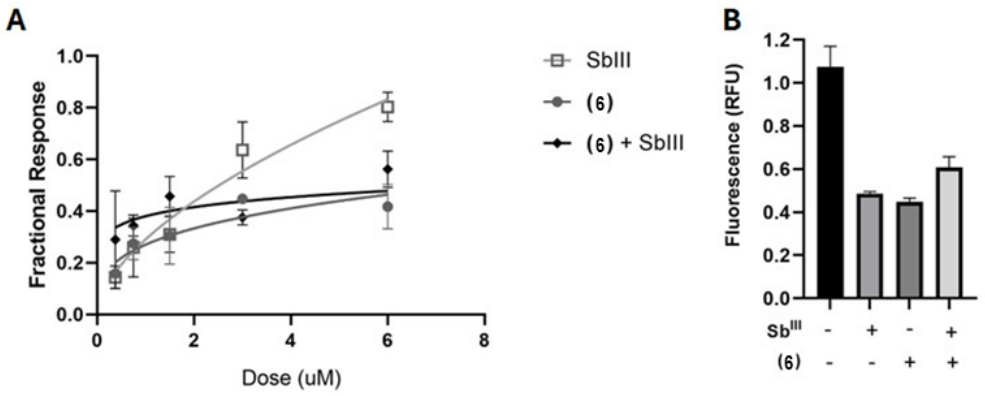


Figura 14. Atividade antileishmanial *in vitro* de **6**, Sb^{III} e da combinação deles.

Os valores de IC_{50} foram determinados por regressão não-linear usando um modelo *variable slope* com o software GraphPadPrism v8.2.0 (CA, USA). Os dados foram normalizados como resposta fractional e um modelo Bayesiano foi aplicado para sugerir se ocorria sinergismo, aditividade ou antagonismo entre os dois compostos. (A) Resposta fractional contra *L. infantum::tdTomato*. (B) Quantificação fluorimétrica (RFU) da inibição de amastigotas intracelulares. Os resultados são representativos de três experimentos independentes, cada realizado em duplicado. A investigação *in vitro* do sinergismo foi realizada por Me. Mariza Gabriela Faleiro de Moura Lodi Cruz e Profª. Drª. Silvane Maria Fonseca Murta (FIOCRUZ Minas).

III) 5. 2. Mecanismo de ação

Devido à atividade antileishmanial *in vivo* satisfatória apresentada por **6** (> 90% de redução da parasitemia)[60], seu potencial mecanismo de ação foi investigado por análise de citometria de fluxo, para examinar tanto os efeitos deste composto nas funções celulares de promastigotas de *L. infantum* quanto a sua habilidade para gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) no ambiente intracelular.

Primeiro, a atividade antileishmanial do *lead* **6** contra a forma promastigota de *L. infantum* foi avaliada, revelando um valor de IC_{50} de 7.9 µM contra promastigotas, o que corresponde a uma potência aproximadamente 2.5 vezes menor que contra a forma amastigota do parasita (IC_{50} = 3.1 µM, Tabela 12).

A citometria de fluxo é uma técnica poderosa para a caracterização dos efeitos de fármacos nas funções celulares de organismos unicelulares ou de células. O ensaio de ciclo celular é uma das técnicas englobadas na citometria de fluxo, e almeja identificar fases específicas do ciclo celular perturbadas por candidatos a fármacos em tripanossomatídeos. Este ensaio mede se as células pararam o processo de divisão através da avaliação da taxa de síntese

do DNA. Além disto, esse também permite a identificação do tipo de morte celular, que pode ser por apoptose ou por necrose.[66,67] Para avaliar os efeitos de **6** e da miltefosina (usada como controle positivo) no progresso normal do ciclo celular de promastigotas de *L. infantum*, o DNA contido em células tratadas e não tratadas foi analisado após 24 horas de incubação. As células foram tratadas com concentrações em compostos de 4.0 μM (metade do IC_{50} de **6**), 8.0 μM (IC_{50} de **6**) e 16.0 μM (2 x IC_{50}), e manchadas com iodeto de propídio (PI) antes da análise por citometria de fluxo.

A análise do DNA contido nas células tratadas e não tratadas (Figura 15) revelou uma redução no número de células, sem alteração nas fases do ciclo celular em comparação com o parasita sem tratamento. Uma parada notável na fase G0/G1 foi observada, em qual a maioria das células permaneceu, indicando um aumento do tamanho das organelas celulares, o que caracteriza esta fase. Como essas organelas duplicam-se uma vez por ciclo celular, foi concluído que a extrusão da flagela filha em promastigotas precede a mitose, como visto em citocinese. Portanto, tal parada do ciclo celular durante a fase G0/G1 pode contribuir à queda observada da população de parasitas, como está refletido nos gráficos de cinética de crescimento. Assim, pode ser sugerido que **6** promova a parada do ciclo celular na fase G0/G1, resultando num crescimento alterado e uma falta de proliferação do parasita. Isto também sugere que **6** possa exibir efeitos citostáticos e não citocidais.[68,69]

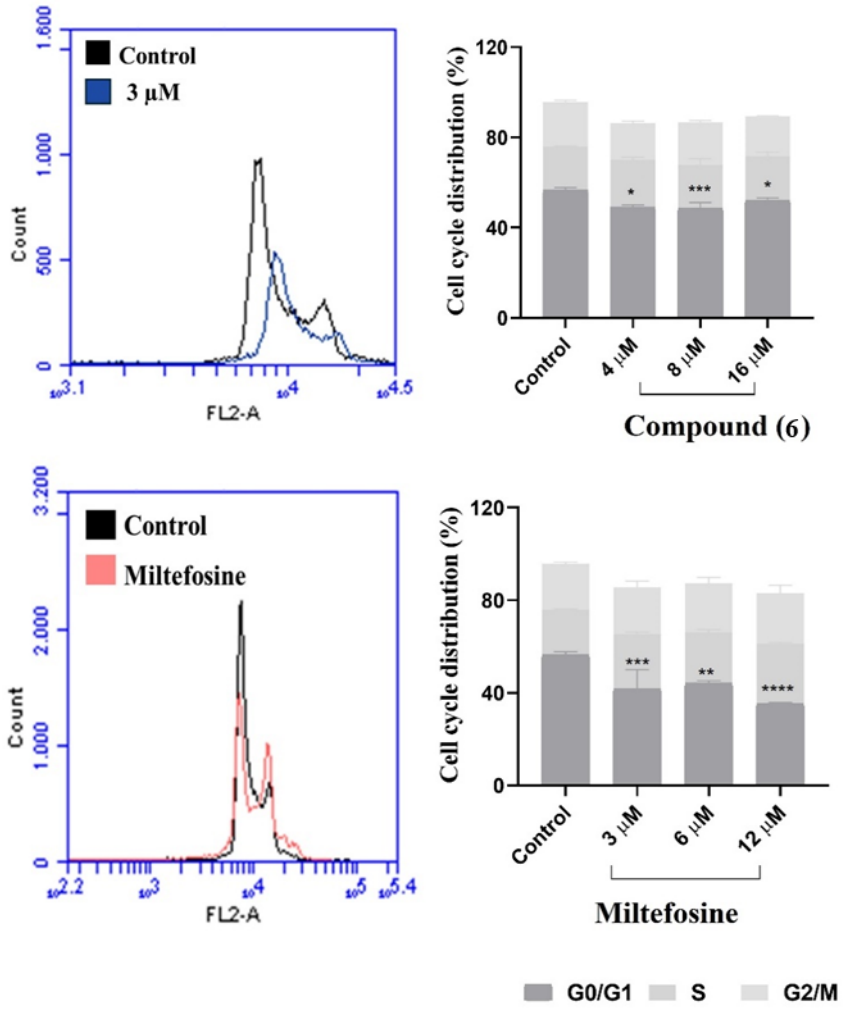


Figura 15. Progressão do ciclo celular de células de *L. infantum* tratadas com **6** e miltefosina.

Histogramas de citometria de fluxo de **6** e da miltefosina. Os parasitas foram cultivados com os compostos por 24 horas. Células de promastigotas não tratadas foram usadas como controle negativo. As percentagens correspondem à quantificação das células em cada fase do ciclo celular. As contagens de células em cada poço tratado foram comparadas com aquelas em poços não tratados usando teste de Dunnet, e a relevância estatística foi definida como $*P < 0.01$, $**P < 0.003$, $***P < 0.0001$ e $****P < 0.0001$. Os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes. Os ensaios de citometria de fluxo para investigação do mecanismo de ação de **6** foram realizados por Drª. Gisele Barbosa, Drª. Analu R. Costa, Prof. Dr. Leonardo L. G. Ferreira e Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo (IFSC – USP).

Tal parada do ciclo na fase G0/G1, e particularmente na fase G0, é característico de células apoptóticas. Ambos **6** e a miltefosina (usada como fármaco de referência) apresentaram este mesmo padrão de parada do ciclo celular, permitindo a observação de células tanto em estado de apoptose precoce quanto de apoptose tardia (Figura 16). Slater *et al.* sugeriram que a perda de glutationa citoplásmica (GSH) seja um evento chave na apoptose, influenciando assim o equilíbrio redox das células e as deixando mais susceptíveis a danos oxidativos.[70] Uma

redução nos níveis de GSH mitocondriais pode prejudicar a produção de energia, levando à morte da célula e à progressão para apoptose tardia (Figura 16).

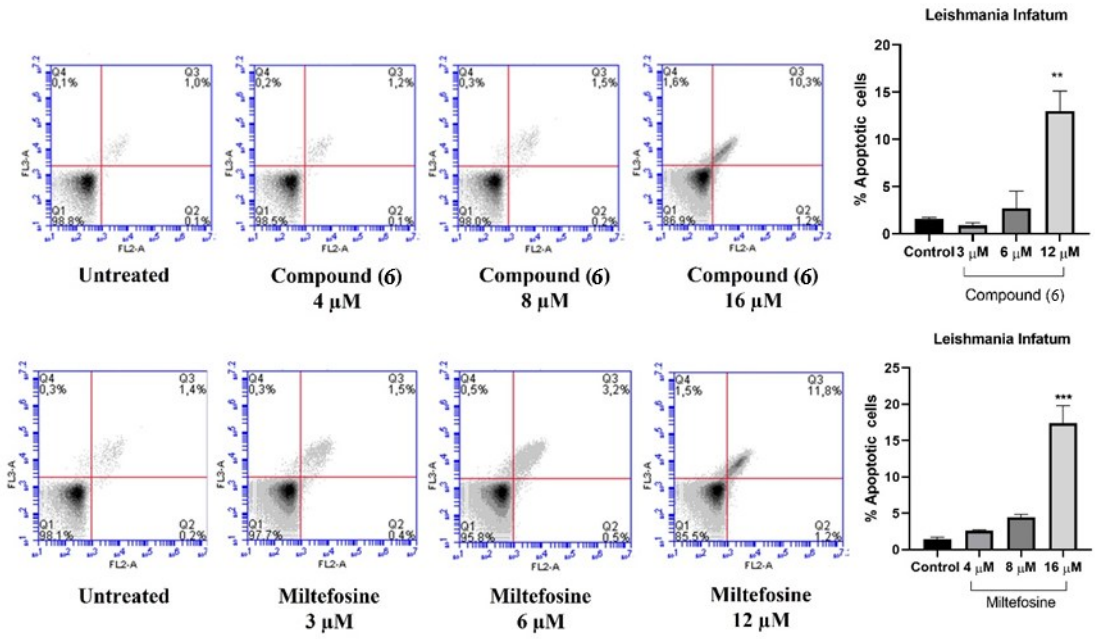


Figura 16. Histogramas de citometria de fluxo de **6** e da miltefosina.

As taxas de apoptose foram medidas e analisadas por citometria de fluxo usando Annexin V-FITC/PI para manchar células de *L. infantum* tratadas. Os parasitas foram cultivados com os compostos por 24 horas. Células de promastigotas não tratadas foram usadas como controle negativo. As percentagens correspondem à quantificação das células em cada fase do ciclo celular. As contagens de células em cada poço tratado foram comparadas com aquelas em poços não tratados usando teste de Dunnet, e a relevância estatística foi definida como $*P < 0.01$, $**P < 0.003$, $***P < 0.0001$ e $****P < 0.0001$. Os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes. Os ensaios de citometria de fluxo para investigação do mecanismo de ação de **6** foram realizados por Dr[a]. Gisele Barbosa, Dr[a]. Analu R. Costa, Prof. Dr. Leonardo L. G. Ferreira e Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo (IFSC – USP).

Esta afirmação é suportada pelos resultados do ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Uma disfunção mitocondrial, causada por perturbações no potencial da transmembrana mitocondrial e níveis reduzidos de ATP, promove a geração de ROS, que tem uma função crítica em acionar a apoptose tardia.[71] Conforme mostrado na Figura 17, **6** induziu uma produção de ROS comparável com aquela do padrão H_2O_2, sugerindo que a geração de ROS possa ser um mecanismo chave para a ação antileishmanial de **6** e a inibição da proliferação celular observada.

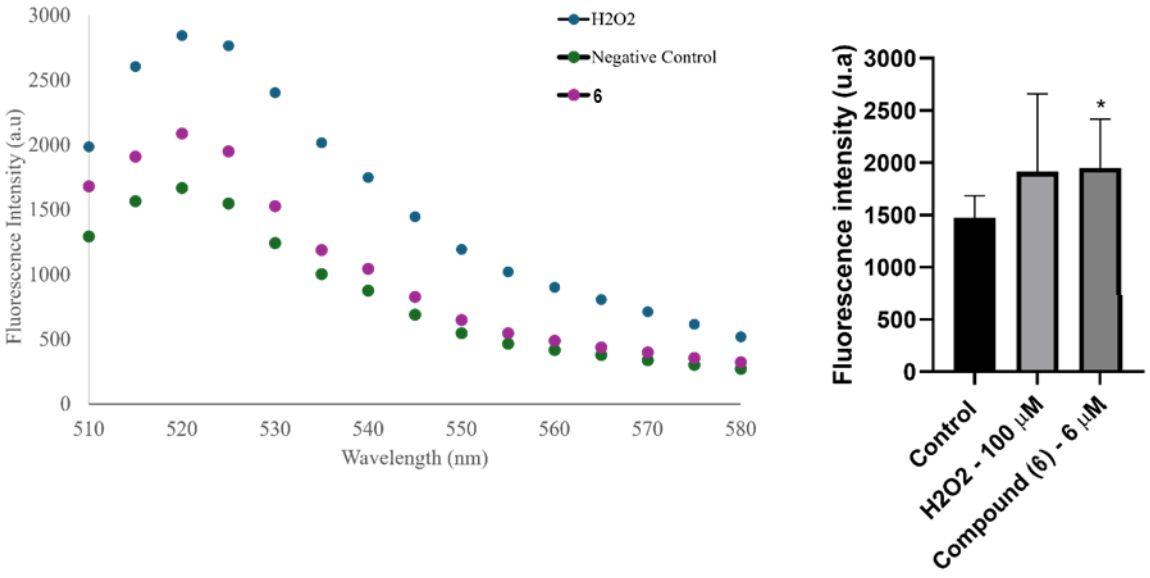


Figura 17. Efeito de **6** sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em *L. infantum*.
Os ensaios de geração de ROS para investigação do mecanismo de ação de **6** foram realizados por Drª. Gisele Barbosa, Drª. Analu R. Costa, Prof. Dr. Leonardo L. G. Ferreira e Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo (IFSC – USP).

Considerando os resultados apresentados nesta seção, é possível sugerir que **6** tenha um efeito citostático em promastigotas de *L. infantum*, promovendo uma parada do ciclo celular na fase G0/G1 e levando a um aumento na produção de ROS.

III) 5. 3. Investigação do alvo

III) 5. 3. 1. Ensaios de *target-fishing in silico*

Esforços iniciais atrás da identificação do alvo molecular de **6** foram realizados *in silico*, com o objetivo de providenciar orientações para estudos futuros de otimização (*lead optimization*) envolvendo a classe das piperazinas, assim como para outros esforços de descoberta de fármacos contra a leishmaniose baseados no alvo.

A estrutura de **6** foi examinada com várias ferramentas bioinformáticas para avaliar ambos sua rota de metabolização e seu alvo molecular em *L. infantum* e *L. braziliensis*. Os servidores SwissTarget, SEA, PharmMapper e SuperPred, que utilizam as semelhanças químicas para encontrar proteínas com ligantes conhecidos, encontraram 100, 48, 305 e 138 alvos moleculares humanos, respectivamente, enquanto somente 38 apresentaram resultados em duplicado para mais de dois servidores (Anexo 1A). Ao analisar a sequências homólogas

nos proteomas de *L. infantum* e *L. braziliensis*, usando o programa BLASTp, foi observado que 71 e 120 sequências, respectivamente, exibiram valores além do valor de corte. As sequências resultantes foram baixadas na plataforma Cytoscape para análise por enriquecimento funcional (Anexo 1B), onde o termo o mais enriquecido para ambas as espécies de parasita foi GO:0004674, que representa a "*atividade de proteína quinase serina/treonina*" (Anexo 1C e Anexo 1D). De maneira similar, tanto o segundo quanto o terceiro termo mais enriquecido GO:0016773 e GO:0016301 são associados com a atividade de uma quinase. Os quinomas de *L. infantum* e *L. braziliensis* foram definidos e comparados recentemente usando um *pipeline* bioinformático[72], resultando na identificação de 29 quinases com ortologia entre as duas espécies de parasita. As sequências destes alvos foram alinhadas para a visualização dos motivos conservados (Anexo 1E) e em seguida avaliados para a interação com **6** (Anexo 1F). Os resultados mostraram que **6** ligou com nove quinases alvos acima do valor de corte, sendo uma proteína quinase serina/treonina (Uniprot ID: A4IAZ8) aquela que apresentou a maior afinidade de ligação (-6.68 kcal/mol).

Assim, estas predições *in silico* sugerem que a atividade de **6** contra *L. infantum* possa resultar da inibição de uma proteína quinase serina/treonina não-específica no parasita, perturbando a fixação de ATP e a atividade fosforiltransferase em *L. infantum*.[73] No entanto, tais resultados *in silico* precisam ser confirmados por experimentos *in vitro*, pois a natureza deste tipo de resultado de *target-fishing in silico* é mais preditiva do que afirmativa. Por esta razão, ensaios de inibição com **6** contra quinases de *Leishmania* foram planejados, para providenciar elementos conclusivos sobre as predições *in silico*. Notavelmente, um estudo prévio de triagem de inibidores potenciais de quinase glicogênio sintase 3 (GSK-3) dentro dos compostos da Leishbox mostrou que o *hit* inicial **1** não inibia esta proteína GSK-3, que foi descrita como uma quinase serina/treonina multitarefa em células mamíferas com equivalentes próximos encontrados em espécies de *Leishmania*.[74] Essas conclusões aparentemente opostas entre as predições *in silico* para **6** e as investigações prévias envolvendo **1** motivaram então a avaliação *in vitro* da atividade inibitória de **6** contra dois isoformas de GSK-3 encontrados em *L. infantum*, antes de considerar outras quinases de *Leishmania*. Além disto, devido à relativa falta de conhecimento da biologia do parasita e à falta geral de estruturas cristalinas confirmadas para a grande maioria de suas proteínas[35], potenciais alvos podem ter sido omitidos no *target-fishing in silico*, o que levou outras enzimas de *Leishmania* a serem consideradas para os ensaios de inibição *in vitro* detalhados na próxima seção. Uma destas, a proteína de choque térmico 83 (Hsp83, *heat shock protein 83*), apesar de não ser uma quinase em si, foi associada com a

atividade de proteína quinase A em parasitas *Leishmania*.[75] Considerando que as predições *in silico* associaram a atividade de proteínas quinase com um potencial alvo, a Hsp83 foi então incluída no painel de proteínas não-quinases de *Leishmania* para a avaliação da atividade inibitória de **6**.

III) 5. 3. 2. Ensaios enzimáticos *in vitro*

Um estudo anterior de validação genética estabeleceu que ambos os isoformas A (GSK-3A) e B (GSK-3B) da proteína GSK-3 são essenciais em parasitas *Leishmania*.[76] Para avaliar o efeito de **6** contra GSK-3A e GSK-3B de *L. infantum*, a atividade das enzimas produzidas por recombinação foi monitorada usando um ensaio comercial baseado em TR-FRET (LANCE® TR-FRET, PerkinElmer). O composto **6** (0 – 30 μM) foi titulado com concentrações fixadas em proteína (50 nM de *L. infantum* GSK-3A ou 10 nM de *L. infantum* GSK-3B) e em substrato peptídico (50 nM). Os dados obtidos nesses ensaios de atividade enzimática mostraram que **6** não teve atividade inibitória em ambas as enzimas GSK-3A e GSK-3B em concentrações até 30 μM.

Além disto, **6** foi submetido a ensaios bioquímicos e biofísicos contra um painel de proteínas de *Leishmania* para identificar alvos potenciais. As proteínas Hsp83, superóxido dismutase (SOD), e diidroorotato desidrogenase (DHODH) de *L. braziliensis* foram selecionadas para a avaliação da atividade inibitória de **6**. As proteínas Hsp83 são proteínas ATP-dependentes desenvolvendo uma função crucial na estabilização de diversas proteínas clientes, muitas delas sendo vitais para a sinalização celular e as respostas adaptativas ao estresse celular.[77,78] A expressão das Hsp é crucial para a sobrevivência e a proteção do parasita em ambas as etapas do seu ciclo de vida, pois essas proteínas o conferem tolerância térmica, virulência aumentada, e adaptabilidade às mudanças de pH, temperatura, estresse oxidativo, e manipulação enzimática.[79] Consequentemente, inibir a proteína Hsp83 em *Leishmania* pode perturbar a sobrevivência em todas as etapas do ciclo de vida e limitar a progressão da doença. Espécies reativas de oxigênio (ROS) desenvolvem sua função na sinalização intercelular e na síntese de biomoléculas importantes.[80,81] Parasitas protozoários como as *Leishmania* spp. desenvolveram mecanismos de proteção eficientes contra ROS, envolvendo na primeira linha de defesa a proteína SOD (E.C. 1.15.1.1). Esta enzima é responsável para a conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular.[82] A atividade de FeSOD é crítica para a sobrevivência dos parasitas *Leishmania* dentro do hóspede. A superóxido dismutase em

L. braziliensis contém o ferro como grupo metálico prostético (FeSOD), enquanto a versão humana utiliza cobre e zinco (Cu/ZnSOD).[83,84] Esta diferença, junta com a baixa similaridade de sequência entre as versões parasitária e humana, sugere que a inibição seletiva de FeSOD em tripanosomatídeos é uma estratégia terapêutica viável.[85,86] A DHODH é uma flavoenzima catalisando a oxidação estereoseletiva do (*S*)-diidroorotato (DHO) para o orotato (ORO) na quarta etapa da biossíntese *de novo* de pirimidina. Estudos anteriores mostraram que a desativação do gene DHODH em *T. cruzi* resultava em inviabilidade celular[87], e que silenciar a expressão de DHODH em *T. brucei* inibia o crescimento do parasita.[88]

Geralmente, a fluorimetria de varredura diferencial (DSF) é usada para identificar as condições e as moléculas que possam afetar a estabilidade de proteínas.[89] Este ensaio baseia-se na interação de um fluoroforo com as regiões hidrofóbicas da proteína, que ficam expostas durante a desnaturação térmica.[90] A mudança de fluorescência corresponde a um aumento na temperatura e, consequentemente, ao desdobramento da proteína. Assim, o ponto médio de transição térmica (Tm) pode ser calculado, o que permite observar como os ligantes podem influenciar a proteína.[91] A interação entre **6** e *L. braziliensis* Hsp83 ou *L. braziliensis* SOD foi monitorada pela medida do valor de Tm para cada proteína, quando exposta ao composto **6** (100 μM), usando a DSF. Porém, **6** não conseguiu exibir efeitos significativos, sugerindo uma interação fraca com esses alvos (Anexo 2).

Os ensaios de inibição de DHODH também resultaram em menos de 25% de inibição da enzima por **6** numa concentração de 100 μM, o que sugere uma interação fraca com este alvo, da mesma maneira que previamente observado com Hsp83 e SOD.

III) 6. Conclusões

O estudo da relação estrutura-atividade realizado com a série das pirazinilpiperazinas contra *L. infantum* permitiu identificar as principais características estruturais responsáveis pela atividade da série contra o parasita, a maioria das quais encontraram-se ao investigar o fragmento benzoíla. De fato, a primeira fase da otimização da classe focalizou-se neste mesmo fragmento do *hit* inicial **1**, e levou à obtenção de vários derivados apresentando melhorias em relação a **1**, tanto em termos de potência antiparasitária quanto em termos de seletividade. A característica mais notável compartilhada por estes derivados foi a presença de substituintes com efeitos indutivos retiradores de elétrons e efeitos doadores de elétrons por ressonância como grupos hidroxila, metoxila, ou amino, no anel aromático, que, além de um anel benzoico, tolerou anéis nicotínicos e naftênicos. A posição *para*, no caso de derivados monossubstítuidos,

revelou-se crucial para a atividade antiparasitária dos compostos, enquanto análogos dissubstituídos toleraram mais flexibilidade em relação à posição relativa dos substituintes no fragmento benzoíla. Assim, os derivados *para*-monosubstituídos **6**, **19**, **29** e **33**, e o catecol **40**, dissubstituído, destacaram-se como otimizações em cima do *hit* **1**, e o derivado *para*-hidroxila **6**, devido à sua alta potência contra *L. infantum* e por razões de praticidade sintética e economia de etapas, foi selecionado como referência para prosseguir com a exploração dos fragmentos pirazina e *linker* piperazina. Tal exploração, no entanto, não levou ao sucesso esperado, resultando em apenas dois compostos (**58** e **63**) com atividade da mesma ordem de grandeza que **6**, porém ainda inferiores em termos de ambas potência e seletividade.

Portanto, a determinação *in vitro* do perfil farmacocinético das pirazinilpiperazinas mais promissores foi realizada com o *hit* **1** e os cinco candidatos a estudos *in vivo* **6**, **19**, **29**, **33** e **40**. O estudo farmacocinético identificou uma fraca estabilidade metabólica para **40**, comparando com os outros cinco compostos, resultando neste composto sendo desconsiderado para estudos *in vivo*. O *hit* e os outros candidatos para estudos *in vivo* apresentaram perfis ADME satisfatórios, com permeabilidade gastrointestinal razoável e baixa permeabilidade hematoencefálica, alto tempo de meia-vida microssomal e baixos valores de *clearance* intrínseco. O derivado *para*-hidroxila **6**, por sua maior potência e seletividade *in vitro* contra *L. infantum* e sua superioridade em termos de estabilidade metabólica, foi considerado o mais adequado para avaliação *in vivo* num modelo de leishmaniose visceral em camundongos BALB/c. **6** revelou-se eficiente nesta avaliação *in vivo*, reduzindo a carga parasitária por mais de 90% no baço e fígado sem apresentar nenhum sinal de toxicidade aguda, após um tratamento de 7 dias a 100 mg/kg/dia.

Apesar dos experimentos *in silico* e *in vitro* não terem conseguido identificar o alvo molecular de **6** em *L. infantum*, uma investigação complementar do mecanismo de ação de **6** evidenciou que esse composto levava à parada do ciclo celular do parasita na fase G0/G1 e induzia um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. Diante disto, aparece que a otimização da série das pirazinilpiperazinas a partir do *hit* **1** identificou com sucesso o derivado *para*-hidroxila **6** como um novo *lead* contra leishmaniose visceral, a partir de qual novos estudos de otimização de *lead* poderão ser desenvolvidos, focando tanto em aumentar a permeabilidade gastrointestinal enquanto mantêm-se adequado o resto do perfil ADME e a excelente eficácia *in vivo* quanto na identificação do alvo molecular de **6** e dos possíveis compostos *lead* otimizados

IV) OTIMIZAÇÃO DA SÉRIE DE TIAZÓIS CONTRA A DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSE

De maneira análoga à série de pirazinilpiperazinas, todos os derivados de tiazol planejados foram sintetizados, caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{1}H e ^{13}C, e espectrometria de massas de alta resolução (HRMS), e testados em modelos *in vitro* contra a forma amastigota de *T. cruzi* e de *L. infantum*. A citotoxicidade de todos os tiazóis foi avaliada *in vitro* em células L929 e em macrófagos THP-1, e as propriedades ADME dos derivados mais ativos e seletivos contra cada parasita foram avaliadas *in vitro*.

O planejamento geral do estudo de SAR desta série também seguiu a estratégia geral apresentada na Figura 5. O primeiro fragmento considerado para modificações estruturais foi o fragmento tiomorfolina de **2**, em qual uma grande diversidade química pôde ser implementada a partir do carbamoilimidazol **107**, para gerar ureias com diversas aminas, principalmente alifáticas, explorando assim o caráter cíclico ou acíclico destas, o número de átomos no ciclo e a presença de substituintes, principalmente. Em seguida, e numa tentativa de melhorar a estabilidade metabólica da série, os dois fragmentos *linker* etila e feniltiazol foram explorados em paralelo, investigando a substituição do anel 4-feniltiazol por sistemas aromáticos fundidos com o anel tiazol e a inclusão de uma função amida no *linker* ou a remoção dele (Figura 18).

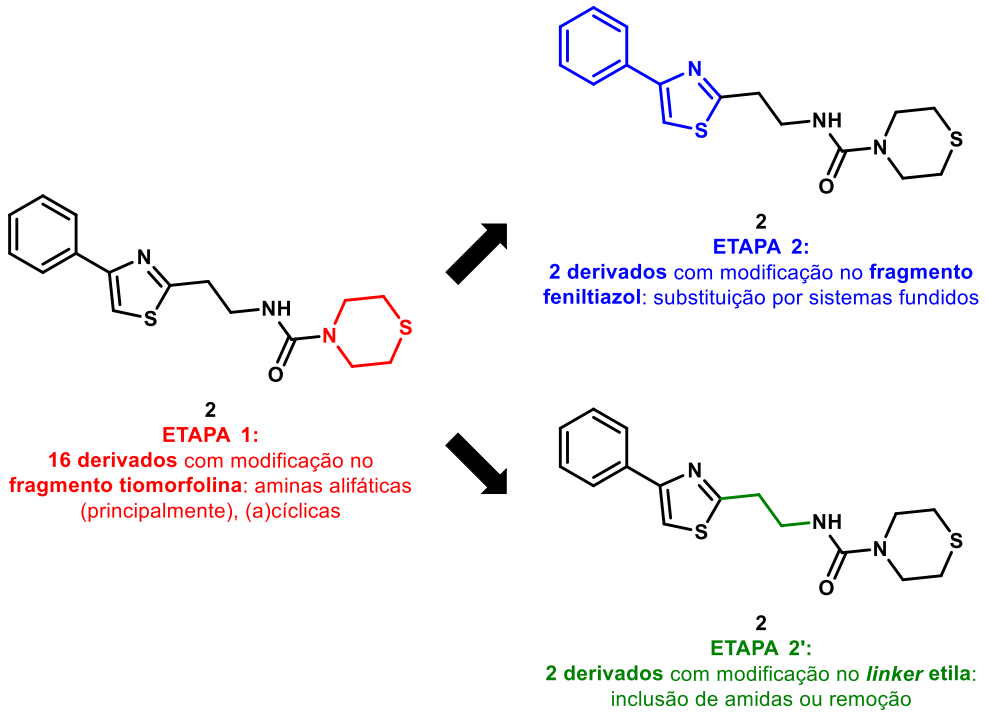
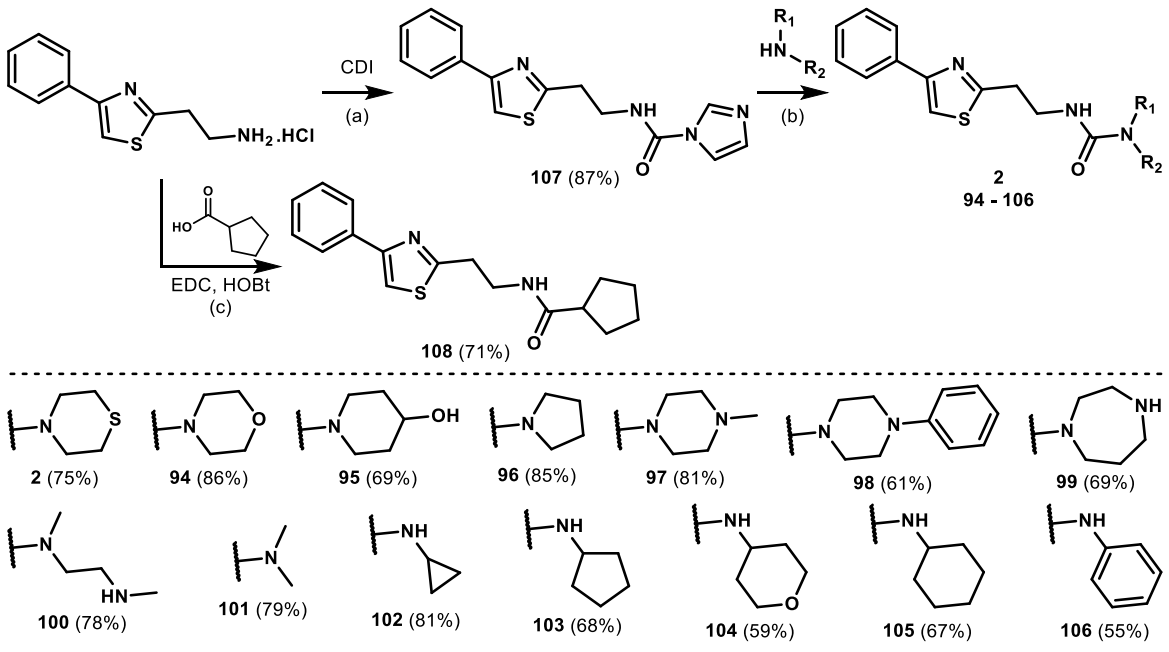


Figura 18. Planejamento do estudo de SAR para a série de tiazóis.

IV) 1. Síntese do *hit* inicial 2 e de derivados

IV) 1. 1. Síntese do *hit* e dos derivados com modificações no fragmento 2-etiltiazol

O *hit* e todos os derivados 2-etiltiazol foram sintetizados em uma ou duas etapas a partir de cloridrato de 2-(4-feniltizaol-2-il)etan-1-amina comercial (Esquema 15). Primeiramente, o cloridrato de etilamina foi reagido com CDI para render com rendimento de 87% o carbamoilimidazol **107**, que revelou ser um intermediário chave para a síntese de maioria dos derivados de ureia. De fato, os carbamoilimidazóis são substitutos relevantes para cloretos de *N*-carbonila e/ou isocianatos para a síntese de ureias assimétricas em quais o imidazol constitui um excelente grupo abandonador, da mesma maneira que o átomo de cloro nos cloretos de *N*-carbonila usados para a mesma finalidade.[92,93] Em seguida, transferência de carbamoila entre **107** e as aminas primárias ou secundárias correspondentes rendeu o *hit* inicial **2** e os derivados 2-etiltioureia **94** – **106** em rendimentos de 55 a 86%. Notavelmente, enquanto todas as reações envolvendo aminas alifáticas foram relativamente rápidas (16 – 20 h), a síntese do derivado de anilina **106** revelou ser extremamente lenta (120 h) e necessitou um excesso substancial de anilina para ser completada, o que pode ser explicado pela menor reatividade da anilina e de outras aminas aromáticas devido à deslocalização do par de elétrons do nitrogênio nucleofílico por ressonância. Finalmente, o derivado de ciclopentilamida **108** foi sintetizado por acoplamento de amida mediado por EDC/HOBt a partir do cloridrato de 2-(4-feniltizaol-2-il)etan-1-amina e de ácido ciclopentanoíco em 71% de rendimento.



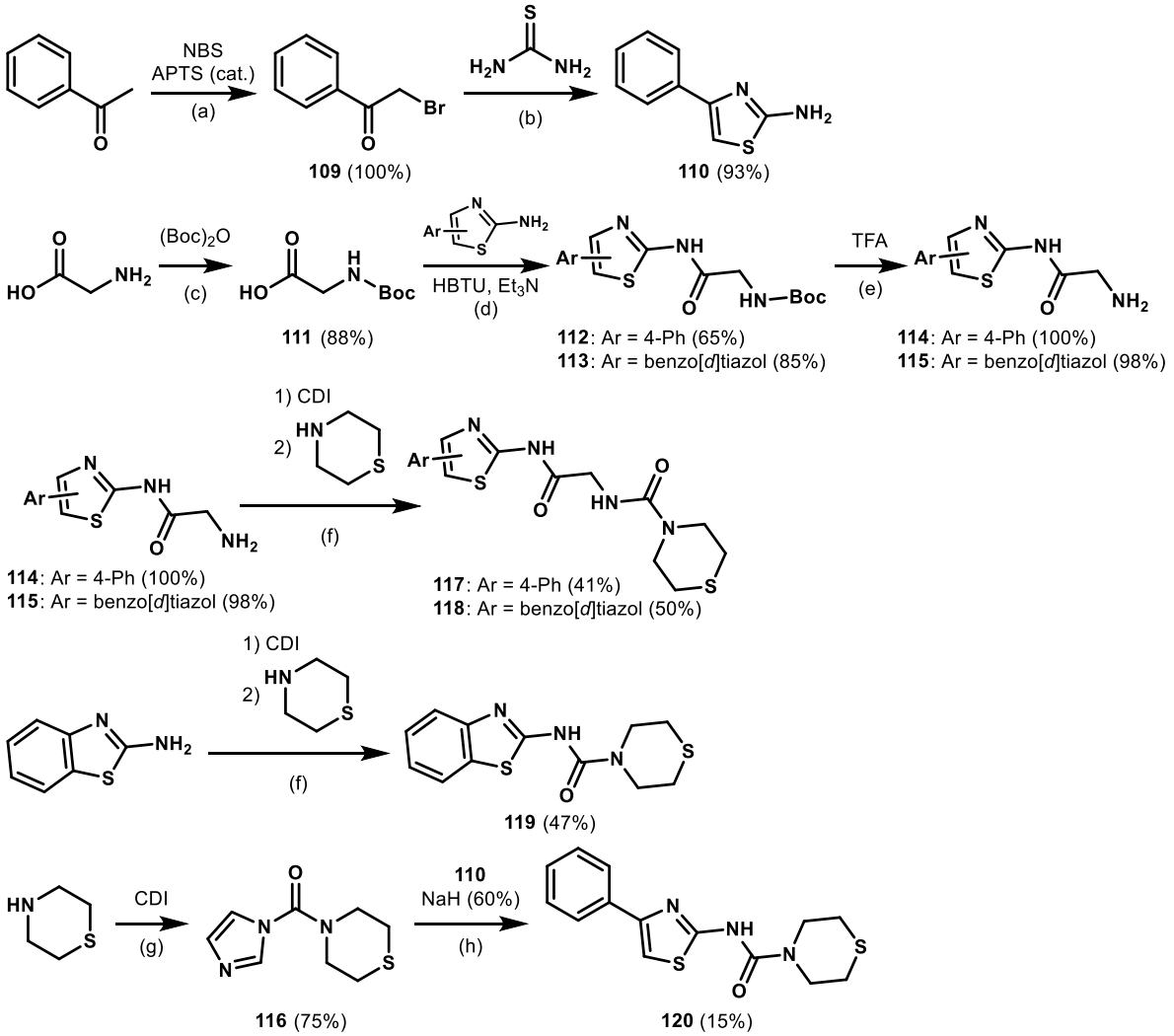
Esquema 15. Síntese do *hit* **2** e dos derivados com modificações no lado direito (LD) **94** - **108**.

Reagentes e condições: (a) Et_3N, DCM, 0 °C – ta, 16 h, 87%; (b) Et_3N, DCM, 0 °C – ta, 15 – 120 h, 55 – 86%; (c) Et_3N, DMF, ta, 24 h, 71%.

IV) 1. 2. Síntese dos derivados com modificações no *linker*

Os derivados com modificações no *linker* necessitaram mais etapas para serem sintetizados, conforme destacado no Esquema 16. Primeiramente, o intermediário 4-feniltiazol-2-amina **110** foi sintetizado em duas etapas a partir de acetofenona, *via* bromination quantitativa da acetofenona resultando na formação da alfa-bromocetona **109** correspondente seguida por uma síntese de tiazóis de Hantzsch com tioureia, formando **110** com um rendimento de 93% para as duas etapas. Depois, a síntese dos derivados glicinamida começou com a proteção com grupo Boc da glicina, e o acoplamento da amida subsequente entre a *N*-Boc-glicina **111** e a tiazol-2-amina **110** rendeu a glicinamida protegida **112** com 57% de rendimento nas duas etapas. **112** foi então desprotegido em condições ácidas, e a amina primária **114** obtida foi convertida na ureia desejada **117** *via* síntese de ureia *one-pot*, reagindo primeiro com CDI antes de converter o carbamoilimidazol formado *in situ* em ureia graças à adição de tiomorfolina, assim levando à formação da ureia almejada com rendimento global de 23% para as 4 etapas a partir da glicina. A síntese do derivado de benzotiazol **118** foi conseguida com rendimento global de 37% seguindo a mesma rota, usando benzo[*d*]tiazol-2-amina comercial no lugar de **110** para a amidação com a *N*-Boc-glicina **111**. Inesperadamente, a 4-feniltiazol-2-amina **110** provou menos reativa que a benzo[*d*]tiazol-2-amina, apesar de apresentar uma ressonância menos extensa que o seu equivalente benzotiazol, o que foi evidenciado pelo rendimento menor obtido na síntese de **112** comparando com a síntese de **113**. Portanto, a menor reatividade de **110** poderia ser explicada pelo impedimento estérico, provavelmente devido a uma rotação impedida em volta da ligação σ entre o anel fenila e o anel tiazol. Os derivados sem *linker* **119** e **120**, para quais a síntese também fica descrita no Esquema 16, precisaram de menos etapas para serem sintetizados, devido à estrutura mais simples deles. De fato, o benzotiazol sem *linker* **119** foi sintetizado em uma etapa só a partir de benzo[*d*]tiazol-2-amina, seguindo o mesmo procedimento de síntese de ureias *one-pot* que aquele usado para a última etapa da síntese de **117** e **118**, formando o composto-alvo num rendimento de 47%. Tal procedimento *one-pot* foi tentado inicialmente para a síntese de **120** a partir de **110**, porém revelou-se sem sucesso devido à reatividade menor de **110** previamente destacada. Portanto, para superar esta limitação, a rota sintética para **120** envolveu primeiro a síntese do carbamoilimidazol **116** a partir de tiomorfolina e de CDI, de maneira similar à síntese de **107**, seguida por uma transferência de carbamoila entre **116** e **110** rendendo **120** com rendimento de apenas 15%, apesar das tentativas

de aumentar a nucleofilicidade de **110** tanto aquecendo quanto usando uma base mais forte para gerar o amideto correspondente.



Esquema 16. Síntese do intermediário 4-feniltiazol-2-amina **110** e dos derivados aminotiazolamida com modificações no *linker* **117** - **120**.

Reagentes e condições: (a) DCM, ta, 24 h, 100%; (b) EtOH, 70 °C, 15 h, 93%; (c) NaOH, 1,4-dioxano/H_2O (1:1), 0 °C – ta, 24 h, 88%; (d) **110** (para **112**) ou benzo[*d*]tiazol-2-amina (para **113**), DMF, ta, 40 – 48 h, 65 – 85%; (e) DCM, ta, 16 h, 98 – 100%; (f) Et_3N, DCM *depois* tiomorfolina, 0 °C – ta, 20 – 70 h, 41 – 50%; (g) Et_3N, DCM, 0 °C – ta, 14 h, 75%; (h) DMF, 0 – 70 °C, 72 h, 15%.

IV) 2. Atividade biológica dos tiazóis contra *T. cruzi* e *L. infantum*

IV) 2. 1. Relação estrutura-atividade contra *T. cruzi*

De acordo com recomendações e orientações padrão para campanhas de otimização *hit-to-lead* de compostos antitripanossomais, **2** foi primeiramente sintetizado, caracterizado e avaliado *in vitro* contra *T. cruzi*.[26]

A estrutura de **2** foi confirmada por RMN de ^{1}H e ^{13}C (APT), e por espectrometria de massas de alta resolução. O sinal em 7.85 ppm no espectro de RMN de ^{1}H (Figura 19) foi atribuído aos dois hidrogênios da fenila em posição *orto* em relação ao anel tiazol, por serem os únicos a poder apresentar o padrão de acoplamento *orto*/*meta* (J^{orto} = 8.3 Hz, J^{meta} = 1.2 Hz) observado com este sinal. O multipleto em 7.45 – 7.32 ppm integrando para quatro hidrogênios foi atribuído aos três outros hidrogênios da fenila (*meta*-tiazol e *para*-tiazol) e ao hidrogênio presente no anel tiazol. O hidrogênio *NH* da ureia foi observável, e o sinal dele foi o único a integrar por um hidrogênio só, aparecendo como um singleto em 5.88 ppm. Os sinais referentes aos hidrogênios do CH_2 do *linker* etila ligado ao nitrogênio da ureia e aos hidrogênios da tiomorfolina vizinhos ao nitrogênio deste anel apresentaram deslocamentos próximos, levando-os a serem parcialmente sobrepostos e resultando num multipleto integrando por seis hidrogênios (3.75 – 3.65 ppm). O sinal correspondente aos dois outros hidrogênios do *linker* etila foi observado em 3.28 – 3.20 ppm, na forma de um tripleto resultando do acoplamento com os dois hidrogênios vizinhos da etila. Finalmente, os quatro hidrogênios dos CH_2 da tiomorfolina ligados ao enxofre deste anel apareceram como um multipleto, em 2.58 – 2.53 ppm. No espectro de ^{13}C (APT) (Figura 20), os quatro sinais mais desblindados corresponderam aos quatro carbonos quaternários de **2**, devido ao fato destes sinais apontar para baixo da linha de base e deles terem baixa intensidade, característica dos sinais de carbonos quaternários. Assim, o carbono quaternário do anel tiazol ligado a ambos o nitrogênio e o enxofre deste anel ficou o mais desblindado, por ser ligado a dois átomos mais eletronegativos, com um sinal em 168.8 ppm. O carbono da ureia, cujo deslocamento é esperado ser menor que carbonos de amida, apareceu em 157.1 ppm, e o sinal referente ao segundo carbono quaternário do anel tiazol, que sustenta a fenila, teve deslocamento de 155.4 ppm. Por fim, o último carbono quaternário, do anel fenila, apresentou um sinal em 134.4 ppm. Os três sinais apontando para cima entre 126 e 129 ppm foram atribuídos aos cinco carbonos primários da fenila, sendo o sinal de menor intensidade em 128.4 ppm atribuído ao carbono *para*-tiazol e os de maior intensidade atribuídos aos carbonos *orto*-tiazol (128.9 ppm) e *meta*-tiazol (126.3 ppm). O último sinal de carbono aromático, mais blindado (112.4 ppm), foi atribuído ao carbono primário do anel tiazol. Enfim, os quatro sinais de carbonos alifáticos foram atribuídos aos carbonos secundários do *linker* etila e da tiomorfolina, sendo os dois sinais mais intensos atribuídos aos carbonos da tiomorfilina (dois carbonos equivalentes por sinal) e os dois de menor intensidade aos carbonos do *linker*. Por conta da maior eletronegatividade do nitrogênio em relação ao enxofre, o sinal em 46.7 ppm foi atribuído aos carbonos ligados ao nitrogênio da tiomorfolina, enquanto o sinal dos dois outros carbonos da tiomorfolina, ligados ao enxofre, foi

observado em 27.0 ppm. O mesmo raciocínio, baseado na eletrofilicidade do nitrogênio, permitiu atribuir os sinais dos dois carbonos do *linker* etila, sendo o mais desblindado deles (40.1 ppm) referente ao carbono ligado ao nitrogênio da ureia e o menos desblindado (33.0 pm) referente ao carbono ligado ao anel tiazol. Além destes dados de RMN terem confirmado a estrutura de **2**, a espectrometria de HRMS (Figura 21) permitiu identificar os sinais referentes ao aduto de **2** com sódio (em 356.0861 *m/z*, erro = 0.00 ppm), sendo este o sinal mais intenso observado no espectrograma, ao cátion $[M+H]^+$ em 334.1041 *m/z* e ao aduto com potássio em 372.0599 *m/z*.

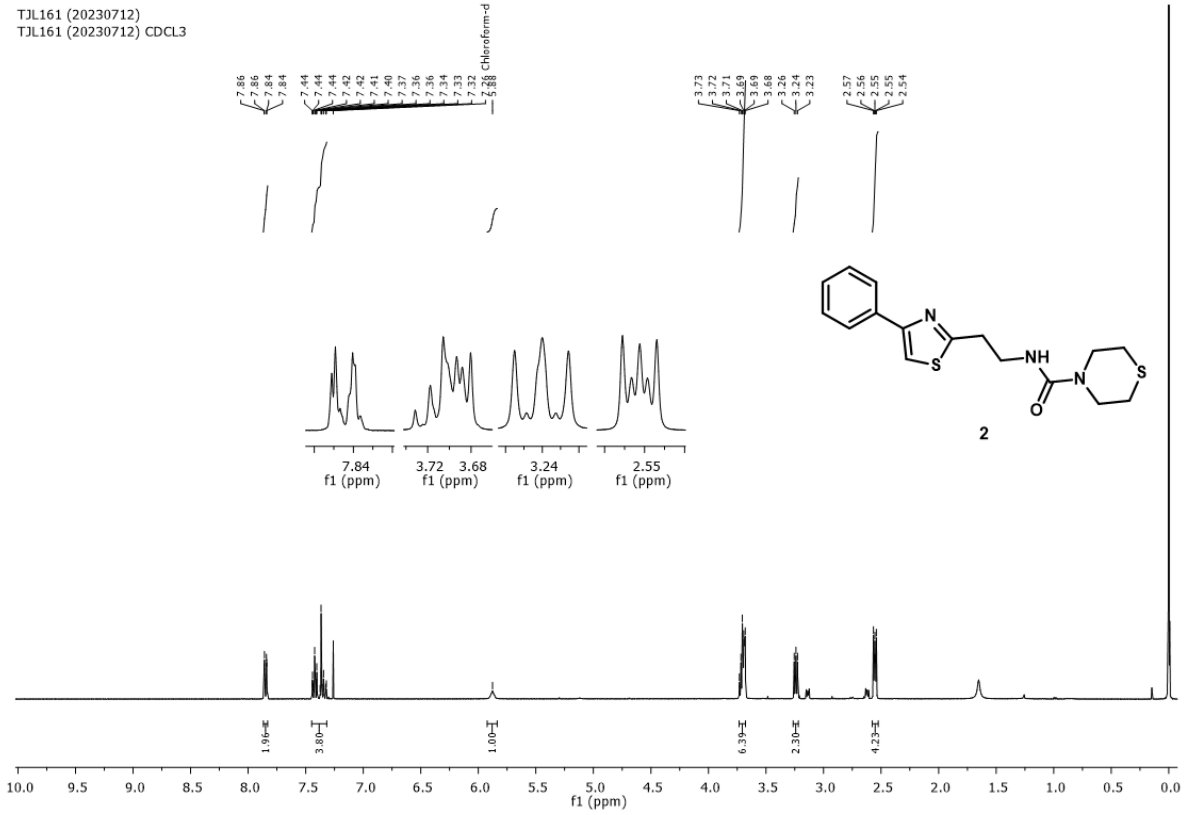


Figura 19. Espectro de RMN de ^{1}H de **2** (400 MHz, $CDCl_3$).

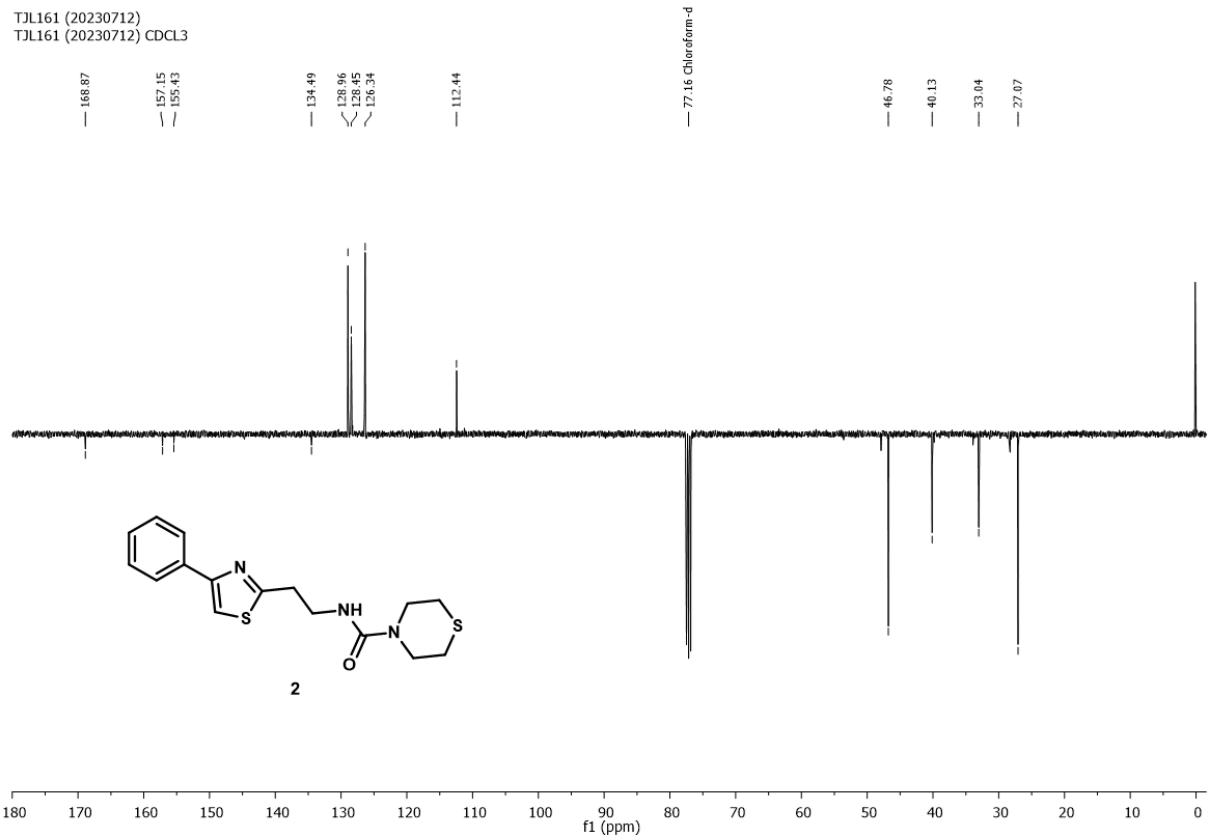


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **2** (101 MHz, $CDCl_3$).

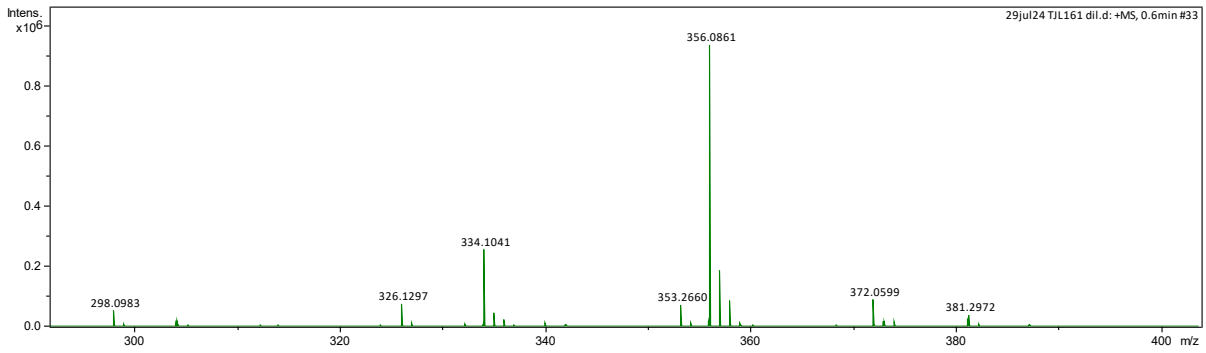


Figura 21. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **2**.

Agradavelmente, **2** apresentou uma excelente potência antitripanossomal assim como alta seletividade, com um valor de IC_{50} muito abaixo do valor de corte recomendado para *hits* antitripanossomais (IC_{50} < 10 μM) e um índice de seletividade muito acima do recomendado (SI > 10) (Tabela 13). Portanto, **2** foi validado como *hit* contra *T. cruzi*, permitindo então dar continuidade aos esforços de relação estrutura-atividade (SAR). O perfil ADME de **2** também foi determinado *in vitro* para identificar potenciais limitações farmacocinéticas, considerando

que estudos anteriores com a classe de compostos identificaram uma instabilidade metabólica notável para compostos altamente similares a **2**.[27–29] De acordo com os valores de clog(P) preditos (Tabela 13), a lipofilicidade experimental de **2** também ficou bastante alta, quase meia-unidade acima da predição, apesar de ainda respeitar as regras de Lipinski (Tabela 14 e Tabela 17).[94] **2** também demonstrou boa solubilidade aquosa tanto em meio ácido quanto em meio neutro, e permeabilidade gastrointestinal relativamente alta. Mais preocupante, as expectativas a respeito da estabilidade metabólica provaram-se verídicas, com **2** apresentando uma meia-vida microssomal criticamente baixa, apenas acima de 3 minutos, associada com um alto *clearance* intrínseco de 872.80 μL/min/mg, expondo assim uma grande limitação metabólica a ser superada. Dentro das possíveis razões para esta baixa estabilidade metabólica, as primeiras hipóteses incluíram a lipofilicidade relativamente alta de **2**, assim como a presença de pontes etila em ambos o *linker* e o fragmento tiomorfolina, que poderiam ser susceptíveis a desetilação metabólica.[49,95]

Apesar das limitações metabólicas, **2** ainda revelou ser um excelente ponto de partida em termos de potência antitripanossomal, e o estudo de SAR começou com foco no fragmento tiomorfolina, com o objetivo de avaliar a relevância deste fragmento como um possível grupo farmacofórico e a sua potencial influência na baixa estabilidade de **2**. Para isso, 15 análogos com modificações no lado direito (LD) foram planejados, em quais a tiomorfolina foi substituída por uma variedade de aminas, com a intenção de contemplar uma larga diversidade de características estruturais. Aminas primárias e secundárias, ou lineares ou cíclicas, aromáticas ou alifáticas, com ou sem substituintes ou outros heteroátomos, foram consideradas para esta etapa inicial. Os derivados também cobriram uma larga faixa de valores de clog(P), menores ou maiores que o valor de clog(P) de **2**, para sondar a hipótese ligando a alta lipofilicidade de **2** com sua baixa estabilidade metabólica.

De modo geral, aminas secundárias com exceção dos derivados de piperazina levaram aos melhores resultados, com dois compostos apresentando atividade sub-micromolar contra o parasita, o *hit* tiomorfolina **2** (IC_{50} = 0.2 μM) e o análogo de pirrolidina **96** (IC_{50} = 0.5 μM), e com o quarto composto mais potente da série (**94**). Além de apresentar alta potência, ambos os derivados **2** e **96** foram altamente seletivos (SI = 622 e 277, respectivamente, Tabela 13), tornando **2** quase 20 vezes mais potente que o fármaco de referência benznidazol com uma seletividade similar. A única exceção à tendência geral observada com este lote de aminas secundárias foi o derivado de 4-hidroxipiperidina **95**, para qual a atividade contra *T. cruzi* permaneceu quase 9 vezes menor que o seu equivalente endocíclico **94** e 22 vezes menor que

2. Portanto, tais resultados sugerem que aminas secundárias cíclicas sem substituintes sejam mais indicadas que as mesmas com substituintes para uma maior atividade antiparasitária.

Trocar o fragmento tiomorfolina por diaminas, que sejam primárias ou secundárias, foi desfavorável a respeito da atividade, exemplificado pela potência dos derivados de piperazina **97** e **98** pelo menos 595 vezes menor que **2** (Tabela 13). As diaminas **99** e **100**, que incorporam uma amina secundária no lugar da amina terciária presente nos fragmentos *N*-metil- e *N*-fenilpiperazina de **97** e **98**, apresentaram resultados semelhantes aos derivados piperazínicos, independente do fato deles serem cíclicos (composto **99**) ou lineares (composto **100**).

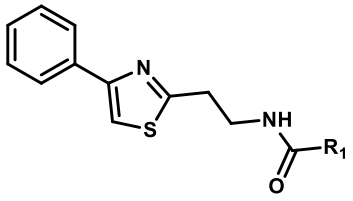
Ao contrário, o análogo *N*,*N*-dimetilamina **101** resultou na maior atividade de todas as ureias acíclicas, sendo quase 5 vezes mais potente que **100**, mesmo que ainda tenha permanecido mais de cem vezes menos ativo que **2** (Tabela 13).

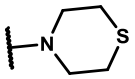
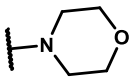
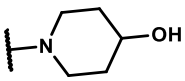
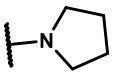
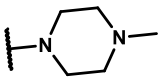
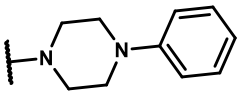
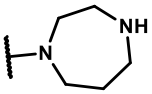
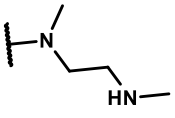
Passar de aminas alifáticas secundárias para primárias também revelou-se desfavorável para a atividade (Tabela 13). De fato, a ciclopentilamina **103** exibiu a maior atividade dentro dos derivados de aminas primárias, que ainda permaneceu 50 vezes menor que **2** e 20 vezes menor que o seu direto equivalente de amina secundária **96**, apesar de ter atividade relativamente boa (IC_{50} < 10 μM). A mesma tendência foi observada ao comparar o derivado tetrahidropiran-4-amina **104** com a morfolina **94**, com **94** ficando 21 vezes mais potente contra *T. cruzi* que **104**.

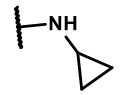
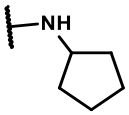
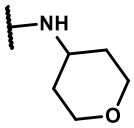
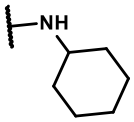
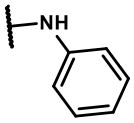
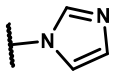
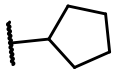
Ureias de aminas aromáticas também não levaram a melhorias na potência, já que ambos a fenilureia **106** e o carbamoilimidazol **107** apresentaram uma brusca queda de atividade antitripanossomal comparando com **2**, por um fator 348 e 1284, respectivamente (Tabela 13).

Assim, aminas cíclicas com anéis de 5 ou 6 membros apresentaram os melhores resultados no geral, com uma tolerância para heteroátomos na posição 4 do ciclo, apesar de que a potência provou altamente dependente da natureza de tal heteroátomo, o enxofre sendo preferido ao oxigênio e, de acordo com a baixa atividade dos derivados de piperazina, o nitrogênio tendo que ser evitado. Derivados de amida também são tolerados, levando a análogos com atividade contra *T. cruzi* no baixo micromolar (**108**, IC_{50} = 3.4 μM, Tabela 13), porém menos potentes que as ureias correspondentes, devido à queda de atividade de **96** para **108** por um fator 6.

Tabela 13. Atividade e seletividade in vitro do *hit* **2** e dos derivados 2-etiltiazol **94** - **108** contra *T. cruzi* e *L. infantum*.



Cpd	R_1	*T. cruzi* IC_{50} (SI)[a]	L929 CC_{50}[b]	*L. infantum* IC_{50} (SI)[c]	THP-1 CC_{50}[d]	clog(P)[e]
2		0.2 ± 0.0 (622)	124.3 ± ND[f]	4.9 ± 1.6 (ND)	ND	2.90
94		5.4 ± 1.6 (46)	247.3 ± 8.2	53.2 ± 6.2 (12)	646.8 ± 12.5	2.32
95		43.1 ± 10.9 (9)	375.2 ± ND	35.0 ± 2.6 (ND)	ND	2.34
96		0.5 ± 0.2 (277)	138.5 ± 1.6	187.1 ± 5.1 (ND)	ND	2.90
97		283.1 ± ND (ND)	ND	153.8 ± 4.7 (ND)	ND	2.30
98		119.3 ± 0.0 (4)	509.5 ± ND	14.6 ± 3.0 (ND)	ND	3.44
99		141.1 ± ND (ND)	ND	6.0 ± 3.5 (ND)	ND	2.22
100		118.3 ± ND (ND)	ND	3.8 ± 1.1 (ND)	ND	2.36
101		25.1 ± 1.8 (11)	278.4 ± ND	328.0 ± 6.6 (ND)	ND	2.51

102		12.2 ± 3.8 (17)	206.8 ± ND	61.1 ± 1.2 (10)	607.9 ± 8.4	2.72
103		9.8 ± 4.8 (7)	69.2 ± ND	222.2 ± 7.1 (ND)	ND	3.22
104		111.5 ± ND (ND)	ND	34.5 ± 2.2 (12)	404.3 ± 10.7	2.68
105		44.0 ± 10.3 (11)	498.7 ± ND	4.9 ± 1.4 (ND)	ND	3.59
106		69.6 ± 6.8 (6)	451.3 ± ND	8.2 ± 1.7 (ND)	ND	3.53
107		256.8 ± ND (ND)	ND	40.2 ± 1.0 (12)	466.4 ± 5.9	2.44
108		3.4 ± 0.2 (32)	107.8 ± ND	16.8 ± 3.1 (ND)	ND	3.52
Bzn[g]	-	3.8 ± ND (627)	2381 ± ND	ND	ND	-
AmB[h]	-	ND	ND	0.25 ± 0.04 (1455)	363.8 ± 1.6	-

[a]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *T. cruzi* (cepa *Tulahuen*) em células L929 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [b]: Valor de CC_{50} (μM) medido em células L929 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [c]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *L. infantum* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [d]: Valor de CC_{50} (μM) medido em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [e]: Valores de log(P) calculados com a ferramenta web SwissADME (http://www.swissadme.ch/index.php)[36]; [f]: Não determinado; [g]: O benznidazol (fármaco de referência) foi usado como controle positivo contra *T. cruzi*; [h]: A anfotericina B (fármaco de referência) foi usada como controle positivo contra *L. infantum*. A determinação dos valores de IC_{50} e CC_{50} foi

realizada por Me. Mariza Gabriela Faleiro de Moura Lodi Cruz, Dr[a]. Daniela de Melo Rezende e Prof[a]. Dr[a]. Silvane Maria Fonseca Murta (FIOCRUZ Minas).

Devido à limitação metabólica identificada para **2**, as propriedades ADME de todos os derivados com atividade aceitável contra *T. cruzi* (IC_{50} < 15 μM) foram determinadas *in vitro*, com o objetivo de validar as hipóteses feitas sobre as causas de tal limitação e as possíveis soluções. Porém, comparar a estabilidade metabólica de **2** com aquela dos outros derivados selecionados para os ensaios de ADME tem tendência a invalidar a hipótese ligando a baixa estabilidade de **2** com a alta lipofilicidade dele, pois compostos com um elog(D) (lipofilicidade experimental) ligeiramente maior ou menor foram mais estáveis que **2** em MLM, embora que tenha sido por uma margem fina (compostos **96** e **103**, Tabela 14). A desetilação sugerida no fragmento tiomorfolina também foi descartada, pois substituir este fragmento por um anel morfolina levou a um aumento da estabilidade metabólica por um fator 7, apesar de que ambos os fragmentos tiomorfolina e morfolina apresentem pontes etila propensas a desetilação. Alterar a natureza do grupo funcional entre o *linker* etila e o LD teve pouco impacto em termos tanto de meia-vida quanto de *clearance*, embora a função ureia tenha permanecido preferida frente à função amida (compostos **96** *vs* **108**, Tabela 14), a segunda sendo encontrada no composto o menos estável da série (**108**). De modo geral, e apesar de **94** e **102** apresentarem leves melhorias em relação a **2**, todos os compostos com uma substancial atividade antitripanossomal exibiram uma estabilidade metabólica relativamente baixa. Notavelmente, esses compostos compartilham duas características estruturais em comum, o *linker* etila e o anel 4-feniltiazol no lado esquerdo (LE), o que pode ser o foco para outras modificações estruturais nessa série.

Tabela 14. Propriedades ADME *in vitro* do hit **2** e dos derivados com IC_{50} < 15 μM contra *T. cruzi*.

Composto	elog(D) (pH 7.4)[a]	KS[b]		P_e GI (10^{-6} cm/s) e classificação[c]	$t_{1/2}$ (min)[d]		Cl_{int} (μL/min/mg)[e]	
		pH 2.0	pH 7.4		MLM	HLM	MLM	HLM
2	3.37	18.68	19.75	28.86	3.18	ND[f]	872.80	ND
94	2.71	18.34	18.93	18.20	22.00	ND	126.00	ND
96	3.18	18.14	18.97	26.30	3.87	ND	717.20	ND
102	2.88	38.36	> 53.87	21.95	23.90	47.15	116.00	58.80
103	3.67	> 24.26	> 40.19	31.20	5.39	25.67	514.80	108.00

108	3.75	17.61	19.18	47.12	2.59	ND	1068.80	ND

[a]: Lipofilicidade experimental, determinada em pH = 7.4; [b]: Solubilidade cinética (μg/mL); [c]: Permeabilidade gastrointestinal. $P_e < 1.5.10^{-6}$ cm/s: baixa permeabilidade, $P_e > 1.5.10^{-6}$ cm/s: alta permeabilidade; [d]: Meia-vida microssomal determinada em microssomas de fígado de rato (MLM) e microssomas de fígado humano (HLM), na presença do cofator NADPH; [e]: *Clearance* intrínseco determinado em MLM e HLM, na presença do cofator NADPH; [f]: Não determinado. A determinação das propriedades ADME in vitro foi realizada por *Dr*. Rafael Consolin Chelucci, Prof. Dr. Leonardo L. G. Ferreira e Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo (IFSC – USP).

A exploração inicial do SAR destacou **2** e **96** como os derivados com maior potência e seletividade dentro dos derivados 2-etiltiazol, porém com uma importante limitação ligada à estabilidade metabólica (Tabela 14 e Tabela 17). Por esta razão, análogos adicionais foram planejados, baseando-se em investigações e resultados previamente publicados com uma outra classe[96], mantendo a ureia de tiomorfolina encontrada na estrutura de **2** enquanto modificações em ambos o *linker* e o heterocíclo tiazol foram incorporadas, almejando assim melhorar a estabilidade metabólica e manter a potência contra *T. cruzi* comparável com **2**.

Conforme discutido na seção dedicada ao perfil ADME dos derivados desta série, a estabilidade metabólica de **117**, cuja estrutura incorpora um *linker* glicinamida ao invés de uma etila, melhorou drasticamente em relação a **2**, apesar de ainda não ser ideal (Tabela 17). No entanto, e apesar de parcialmente alcançar o objetivo sobre a estabilidade metabólica, a inclusão do *linker* glicinamida em **117** também fez despencar a potência deste composto, que foi mais de 300 vezes menor que o equivalente etila **2** (Tabela 15). Substituir o fragmento 4-feniltiazol no LE por um anel aromático fundido provou mais desfavorável ainda para a atividade antitripanossomal, independente da natureza do *linker*, visto que ambos benzotiazóis **118** e **119** foram aproximadamente três vezes menos potentes que os 4-feniltiazóis correspondentes **117** e **120**, respectivamente (Tabela 15). De modo geral, o comprimento do *linker* se revelou pouco influente na atividade, pois derivados sem *linker* apresentaram potência comparável aos seus equivalentes glicinamida (compostos **119** e **120** *vs* **118** e **117**, respectivamente, Tabela 15). Portanto, é possível sugerir que a perda de atividade observada em **117** – **120** seja devida à presença de um átomo de nitrogênio na posição 2 do anel tiazol, e não à natureza do *linker* em si. No entanto, e apesar da menor atividade apresentada pelos derivados com modificações no *linker*, esse lote de derivados permitiu a identificação do fragmento 4-feniltiazol como sendo necessário, porém não suficiente, para a atividade contra *T. cruzi* da série, considerando as perdas de potência observadas após sua substituição por seu equivalente fundido. A Figura 22 apresenta um resumo gráfico das principais conclusões deste estudo de SAR contra *T. cruzi*.

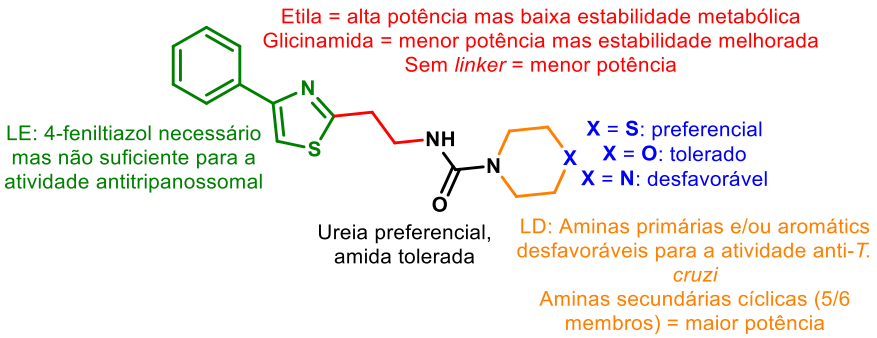
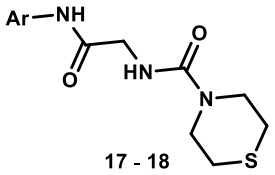
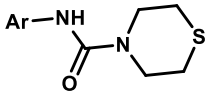


Figura 22. Resumo gráfico do estudo de SAR contra *T. cruzi*.

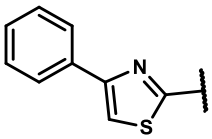
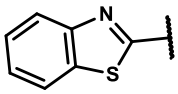
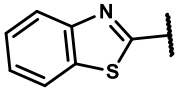
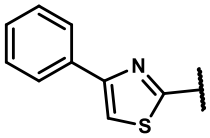
Tabela 15. Atividade e seletividade *in vitro* dos derivados com modificações no *linker* **117** - **120** contra *T. cruzi* e *L. infantum*.



17 - 18



19 - 20

Cpd	Ar	*T. cruzi* IC_{50} (SI)[a]	L929 CC_{50}[b]	*L. infantum* IC_{50} (SI)[c]	THP-1 CC_{50}[d]	clog(P)[e]
117		63.3 ± ND[f] (ND)	ND	14.2 ± 0.2 (ND)	ND	2.01
118		> 148.6 (ND)	ND	15.2 ± 0.2 (ND)	ND	1.70
119		> 179.0 (ND)	ND	35.6 ± 1.4 (ND)	ND	2.32
120		59.5 ± ND (ND)	ND	84.2 ± 4.6 (ND)	ND	2.62
Bzn[g]	-	3.8 ± ND (627)	2381 ± ND	ND	ND	-
AmB[h]	-	ND	ND	0.25 ± 0.04	363.8 ± 1.6	-

[a]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *T. cruzi* (cepa *Tulahuen*) em células L929 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [b]: Valor de CC_{50} (μM) medido em células L929 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [c]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *L. infantum* em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [d]: Valor de CC_{50} (μM) medido em macrófagos THP-1 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [e]: Valores de log(P) calculados com a ferramenta web SwissADME (http://www.swissadme.ch/index.php)[36]; [f]: Não determinado; [g]: O benznidazol (fármaco de referência) foi usado como controle positivo contra *T. cruzi*; [h]: A anfotericina B (fármaco de referência) foi usada como controle positivo contra *L. infantum*. A determinação dos valores de IC_{50} e CC_{50} foi realizada por Me. Mariza Gabriela Faleiro de Moura Lodi Cruz, Dr[a]. Daniela de Melo Rezende e Prof[a]. Dr[a]. Silvane Maria Fonseca Murta (FIOCRUZ Minas).

IV) 2. 2. Relação estrutura-atividade contra *L. infantum*

Como os parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* pertencem à classe dos kinetoplastidas e apresentam alto grau de similaridade no ciclo de vida deles, **2** foi também avaliado *in vitro* contra *L. infantum*, para determinar a capacidade da série a estender sua atividade antitripanossomal para uma atividade anti-kinetoplastida mais ampla. Apesar de ter uma potência antileishmanial bem menor que a antitripanossomal ($IC_{50}^{L.\ infantum}$ = 4.9 μM *vs* $IC_{50}^{T.\ cruzi}$ = 0.2 μM, Tabela 13), **2** ainda conseguiu apresentar uma atividade satisfatória contra *L. infantum*, de acordo com orientações sobre *hits* contra o parasita.[26] Portanto, seu status de *hit* antitripanossomal foi estendido para ficar um de *hit* anti-kinetoplastidas, e os compostos previamente testados contra *T. cruzi* foram também avaliados contra *L. infantum* (Tabela 13 e Tabela 15).

De maneira surpreendente, tendências radicalmente diferentes daquelas previamente observadas com *T. cruzi* surgiram ao avaliar os compostos contra *L. infantum*. Primeiro, todos os compostos que tinham sido destacados como tendo atividade satisfatória contra *T. cruzi*, tais como a maioria dos derivados de amina secundária ou alguns análogos de aminas primárias cíclicas, perderam potência de modo drástico contra *L. infantum*, com **2** e, em certa medida, **16** sendo as exceções (compostos **94**, **96**, **102** e **103**, Tabela 13).

Ao contrário, e agradavelmente, a maioria dos compostos com atividade subótima contra *T. cruzi* apresentaram melhorias de grau variável contra *L. infantum*, comparando com a performance deles contra *T. cruzi*. Para algumas aminas cíclicas com anéis de 6 membros,

apesar de permanecerem medianas ou sub-medianas, a atividade antileishmanial foi melhorada comparando com a antitripanossomal (compostos **95**, **97** e **104**, Tabela 13).

A inclusão de aromaticidade no LD se revelou altamente benéfica contra *L. infantum*, com todas as aminas aromáticas sendo de 6 a 9 vezes mais ativas contra este parasita do que contra *T. cruzi*, a fenilureia **106** até chegando a uma potência da mesma ordem de grandeza que **2**.

Apesar deste surto na potência antileishmanial das aminas aromáticas, as alifáticas permaneceram, no entanto, a escolha mais favorável contra *L. infantum*. Manter um anel de 6 membros na mesma maneira que o fragmento tiomorfolina em **2**, porém com um nitrogênio exocíclico ao invés de endocíclico e sem nenhum outro heteroátomo neste fragmento, deixou a ciclohexilaminoureia **105** equipotente a **2** contra *L. infantum*. Diaminas não-piperazínicas se mostraram os melhores análogos no geral em termos de potencial antileishmanial. Elas não só solucionaram o problema de estabilidade metabólica da série (*vide* próxima seção) mas também foram eficazes contra o parasita, sendo ou ligeiramente menos ativas (composto **99**, 1.2 vezes menos ativo, Tabela 13) ou ligeiramente mais ativas (composto **100**, 1.3 vezes mais ativo, Tabela 13) que **2**.

Os derivados com modificações no *linker* **117** – **120** também demonstraram uma mudança interessante de atividade contra *L. infantum*, ao comparar com *T. cruzi*. Primeiramente, apesar de serem menos potentes que **2**, as quedas de atividade comparando com este composto foram muito menores contra *L. infantum* (de 3 a 17 vezes menos potentes) do que contra *T. cruzi* (pelo menos 300 menos potentes), resultando em derivados com atividade antileishmanial mediana, porém aceitável (compostos **117** e **118**, IC_{50} ~ 15 μM, Tabela 15). Além disto, as características estruturais influenciando a atividade antiparasitária foram radicalmente diferentes, ao comparar os resultados dos compostos **117** – **120** contra cada um dos dois kinetoplastidas. Conforme mencionado na seção anterior, foi considerado que uma maior atividade antitripanossomal fosse ligada à presença do fragmento 4-feniltiazol no LE, enquanto a natureza do *linker* tinha pouca influência contra *T. cruzi*. Contra *L. infantum*, no entanto, essas conclusões foram basicamente invertidas: os resultados apresentados por esses compostos indicam que a natureza do fragmento aromático no LE tem agora pouca influência na atividade antileishmanial, considerando que ambos os 4-feniltiazóis **117** e **120** apresentaram uma atividade similar aos seus equivalentes **118** e **119**, respectivamente (Tabela 15). Também, a natureza do *linker* ficou agora prevalente na modulação da atividade contra *L. infantum*, já que ambas as glicinamidas **117** e **118** ficaram pelo menos duas vezes mais ativas que o mais

potente dos derivados sem *linker* **119** (Tabela 15). De modo geral, e apesar de serem ligeiramente menos ativos que **2** e outros derivados com modificações no LD previamente destacados, os compostos com modificações no *linker* ainda conseguiram providenciar conclusões interessantes sobre o potencial antileishmanial e as características estruturais chave desta classe de compostos, e entregaram, com **117** e **118**, derivados com potência respeitável contra *L. infantum* e maior estabilidade metabólica que **2**.

Da mesma maneira que com os derivados mais potentes contra *T. cruzi*, todos os compostos mais ativos (IC_{50} < 15 μM) contra *L. infantum* tiveram suas propriedades ADME avaliadas *in vitro*, devido à falta de estabilidade metabólica dos primeiros (Tabela *16*). Agradavelmente, todos os derivados anti-*Leishmania* apresentaram uma maior estabilidade metabólica que **2**, por pelo menos um fator 1.8 (composto **106**, Tabela 16), embora algumas discrepâncias tenham sido observadas dentro deste lote de compostos a respeito da extensão da melhoria. Os derivados com a maior similaridade estrutural com **2** levaram às menores melhorias na meia-vida e no *clearance* intrínseco, por fatores 2.1 e 1.8, respectivamente (compostos **105** e **106**, Tabela 16). Considerando as hipóteses e conclusões feitas a respeito da farmacocinética dos derivados antitripanossomais, esses dois compostos tendem a segui-las no assunto da lipofilicidade, com a estabilidade metabólica deles aumentando apesar de serem mais lipofílicos que **2**, sendo que eles nem foram os mais lipofílicos do lote. Os compostos **98** e **117** providenciaram mais elementos a favor da ausência de alguma ligação direta entre a lipofilicidade alta de **2** e sua baixa estabilidade metabólica, os dois derivados sendo respectivamente 7 e 15 vezes mais estáveis que **2** apesar de apresentarem ou o maior elog(D) da série (composto **98**), ou um elog(D) similar ao de **2** (composto **117**). No entanto, a lipofilicidade não pode ser completamente desconectada da estabilidade metabólica, e pode parcialmente contribuir à falta desta apresentada por **2**, considerando que as diaminas **99** e **100**, que se destacam pela lipofilicidade deles relativamente baixa comparando com o resto da série, resultaram no aumento mais pronunciado da estabilidade. Conforme inicialmente sugerido na discussão sobre compostos antitripanossomais, a presença do *linker* etila poderia ser envolvida de alguma maneira na limitação metabólica observada com a maioria da série, considerando o aumento na estabilidade resultando da substituição da etila por um *linker* glicinamida (compostos **117** *vs* **2**, Tabela 16). Entretanto, a única presença do *linker* etila não é suficiente para explicar sozinha a limitação metabólica de **2**, já que os dois compostos mais estáveis deste lote e da série ambos possuem tal *linker* (compostos **99** e **100**, Tabela 16), o que deixa os fatores influenciando a estabilidade metabólica da série sendo apenas parcialmente entendidos. Enfim,

considerando a alta potência antileishmanial desses dois mesmos compostos, e considerando que eles superaram os problemas de estabilidade metabólica apresentados por **2**, ambos os derivados **99** e **100** surgem como candidatos promissores para a identificação de novos *hits* de 2-etiltiazol contra *L. infantum*, o que ainda precisa ser confirmado ao confrontar o perfil ADME deles com o desempenho farmacocinético de toda a série. A Figura 23 apresenta um resumo das principais conclusões deste estudo de SAR contra *L. infantum*.

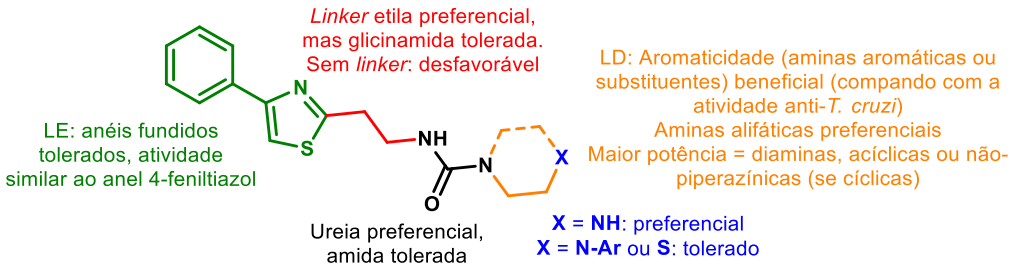


Figura 23. Resumo gráfico do estudo de SAR contra *L. infantum*.

Tabela 16. Propriedades ADME *in vitro* do hit **2** e dos derivados com IC_{50} < 15 µM contra *L. infantum*.

Composto	elog(D) (pH 7.4)[a]	KS[b]		P_e GI	$t_{1/2}$ (min)[d]		Cl_{int} (µL/min/mg)[e]	
		pH 2.0	pH 7.4	(10^{-6} cm/s) e classificação[c]	MLM	HLM	MLM	HLM
2	3.37	18.68	19.75	28.86	3.18	ND[f]	872.80	ND
98	4.13	0.03	32.26	28.02	21.13	11.55	131.20	240.00
99	2.16	52.91	48.70	0.52	301.37	277.26	< 12.00	< 12.00
100	2.18	> 42.72	> 19.78	0.19	231.05	84.53	12.00	32.80
105	3.94	> 15.98	> 36.14	26.73	6.78	21.94	408.80	126.40
106	3.82	0.04	32.01	24.75	5.58	17.59	497.20	157.60
117	3.39	1.57	1.62	7.00	48.47	78.77	57.20	35.20

[a]: Lipofilicidade experimental, determinada em pH = 7.4; [b]: Solubilidade cinética (µg/mL); [c]: Permeabilidade gastrointestinal. P_e < $1.5.10^{-6}$ cm/s: baixa permeabilidade, P_e > $1.5.10^{-6}$ cm/s: alta permeabilidade; [d]: Meia-vida microssomal determinada em microssomas de fígado de rato (MLM) e microssomas de fígado humano (HLM), na presença do cofator NADPH; [e]: *Clearance* intrínseco determinado em MLM e HLM, na presença do cofator NADPH; [f]: Não determinado. A determinação das propriedades ADME in vitro foi realizada por *Dr*. Rafael Consolin Chelucci, Prof. Dr. Leonardo L. G. Ferreira e Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo (IFSC – USP).

IV) 3. Perfil ADME *in vitro* dos compostos com maior atividade (IC_{50} < 15 µM) contra cada parasita

Além do estudo de SAR contra cada um dos parasitas detalhado nas seções respectivas, o perfil ADME dos compostos com atividade antiparasitária razoável (IC_{50} < 15 µM) contra *T. cruzi*, *L. infantum*, ou ambos, foi determinado, assim proporcionando um breve estudo de relação estrutura-propriedades (SPR) para a série. Notavelmente, em estudos anteriores realizados por outros grupos de pesquisa e focando em *Trypanosoma brucei*, incluindo estruturas altamente semelhantes às deste trabalho e até os compostos **94** e **96**, foi destacada uma instabilidade metabólica marcada para a maioria dos derivados de 2-etiltiazol considerados pelos respectivos autores.[27–29] Tais relatos contribuíram a incentivar a realização da avaliação farmacocinética *in vitro* com os derivados apresentados neste trabalho, pois uma limitação metabólica poderia influenciar de maneira crítica os desenvolvimentos futuros desta série.

A respeito da lipofilicidade, os valores experimentais foram maiores que os valores de clog(P) preditos, apesar de que os valores experimentais e preditos variaram de acordo com as mesmas tendências, com os valores experimentais sendo apenas deslocados por aproximadamente uma unidade (elog(D), Tabela 17). De modo geral, a maioria dos compostos foi bastante lipofílica, conforme o esperado devido à prevalência de fragmentos alifáticos e aromáticos hidrocarbonados na estrutura deles. Comparando com **2**, a remoção de um heteroátomo endocíclico ou a adição de um grupo fenila no LD levou a um aumento esperado da lipofilicidade, com a adição do grupo fenila tendo o efeito mais notável neste quesito (composto **98**, Tabela 17). A maior queda na lipofilicidade veio das diaminas **99** e **100**, cujo LD inclui em ambos os casos uma amina secundária que pode ser envolvida em ligações de hidrogênio tanto como doador de ligação de hidrogênio quanto como aceptor. Sendo assim mais propensos à formação de ligações de hidrogênio, isto resultou nos derivados **99** e **100** demonstrando uma menor lipofilicidade.

Esta menor lipofilicidade, combinada com o fato de que a amina secundaria deles também proporciona um sítio de ionização, levou **99** e **100** a apresentarem uma das maiores solubilidades aquosas da série, embora a maioria dos derivados tenha também demonstrado uma solubilidade muito aceitável, e isto independentemente do valor de pH considerado (Tabela 17). No entanto, duas exceções notáveis foram observadas, a primeira sendo que a inclusão de um anel fenila no LD (compostos **98** e **106**) resultou numa brusca queda de solubilidade em pH

ácido, comparando com a solubilidade aquosa observada com os mesmos derivados em pH neutro. A segunda exceção foi o derivado **117**, incorporando uma amida no *linker*, para qual esperar-se-ia um aumento na solubilidade graças ao sítio adicional de ionização (*via* o *NH*-amida) e de ligação de hidrogênio. Porém, **117** apresentou uma solubilidade aquosa pelo menos 10 vezes menor que os outros derivados, tanto em pH ácido quanto em pH neutro (Tabela 17). Um detalhe interessante a respeito da absorção oral e da biodisponibilidade foi observado com as diaminas **99** e **100**, para quais houve um aumento da solubilidade em pH ácido, provavelmente devido à formação de um cátion amônio secundário no LD delas.

Sobre a permeabilidade gastrointestinal, no entanto, **99** e **100** foram a exceção, apresentando uma permeabilidade criticamente baixa em comparação com o resto da série, o que contrabalanceia imediatamente os benefícios para a biodisponibilidade trazidos pela maior solubilidade destas diaminas em pH ácido. De fato, a amina secundária de ambos compostos é bastante livre de impedimento estérico, o que contribui, portanto, não só para a diminuição da lipofilicidade delas mas também para limitar a habilidade delas para atravessar membranas, principalmente através de ligações de hidrogênio com as membranas da parede gastrointestinal, que podem efetuar-se sem restrições estéricas. Apesar desta exceção, a maioria dos compostos demonstraram uma alta permeabilidade gastrointestinal, com valores de P_e na maioria constantes dentro da série (Tabela 17). O derivado de morfolina **94** permaneceu ligeiramente abaixo da média, o que pode ser explicado da mesma maneira que para **99** e **100**, devido à propensão do átomo de oxigênio no LD dele a formar ligações de hidrogênio, embora isto leve a consequências menores.

Considerando que investigações anteriores reportaram uma fragilidade de ordem metabólica para **94**, **96**, e outros derivados com estruturas parecidas, a estabilidade metabólica *in vitro* dos derivados mais potentes foi avaliada em microssomas de fígado de rato (MLM) e humano (HLM). Infelizmente, a baixa estabilidade metabólica de **94** e **96** foi confirmada nestes ensaios, com **96** exibindo uma meia-vida de meramente 3.87 minutos e alto *clearance* (717.20 μL/min/mg), deixando este composto completamente inelegível para estudos *in vivo* apesar da atividade antitripanossomal sub-micromolar dele (IC_{50} = 0.5 μM). Pior ainda, substituir o átomo de oxigênio de **94** por um enxofre em **2** levou a uma estabilidade metabólica ainda menor, tornando assim o *hit* e composto mais potente contra *T. cruzi* completamente inviável para avaliação *in vivo*. A substituição da ureia no LD por uma amida também diminuiu a estabilidade (compostos **96** *vs* **108**, Tabela 17), cuja menor da série foi observada com o derivado **108**. De modo geral, a maioria dos compostos com modificações no LD apresentaram baixa estabilidade

metabólica em MLM e HLM, sugerindo que ou o *linker* etila, ou o LE 4-feniltiazol, ou a combinação dos dois possa ser ligada à baixa estabilidade metabólica da série, ao menos parcialmente. Isto também é reforçado pelo forte aumento na estabilidade demonstrado pelo derivado glicinamida **117**, para qual o *clearance* ficou 15 vezes menor que o seu equivalente etila **2**, com uma meia-vida também melhorada pelo mesmo fator, apesar de permanecer relativamente pouco estável no absoluto (Tabela 17). No entanto, a baixa estabilidade não pode ser exclusivamente atribuída ao *linker* etila, o que os resultados obtidos com **117** sugeriam, desde que derivados incorporando tal *linker* na estrutura deles revelaram ser a exceção da série neste quesito. De fato, as duas diaminas **99** e **100** foram extremamente estáveis em MLM em comparação com o resto da série, apresentando uma meia-vida 95 e 73 vezes maior que **2**, respectivamente, e diminuindo o *clearance* microssomal pelos mesmos fatores (Tabela 17). Tais resultados provavelmente podem ser atribuídos à menor lipofilicidade dessas diaminas e, consequentemente, à presença de uma amina secundária na estrutura delas, já que o sítio ativo das enzimas CYP responsáveis pela metabolização de fármacos tende a ser mais lipofílico, e então terá interações mais restritas *via* ligação hidrofóbica não-especifica com substratos menos lipofílicos.[37–39] De maneira conveniente, **99** e **100** também foram previamente destacadas como compostos antileishmaniais promissores, sendo respectivamente o quarto mais potente e o mais potente da série neste assunto. Portanto, tal destaque do resto da série em termos de estabilidade metabólica, combinado com o potencial deles contra *L. infantum* e o restante do perfil ADME deles aceitável, destaca estes dois compostos, e principalmente **100**, como novos *hits* para a otimização da série contra *L. infantum*.

Tabela 17. Propriedades ADME *in vitro* do *hit* **2**, do análogo 4-feniltiazol com modificação no *linker* **117**, e de derivados selecionados com IC_{50} < 15 μM.

Composto	**elog(D) (pH 7.4)[a]**	**KS[b]**		***Pe* GI**	**$t_{1/2}$ (min)[d]**		**Cl_{int} (μL/min/mg)[e]**	
		pH 2.0	**pH 7.4**	**(10^{-6} cm/s) e classificação[c]**	**MLM**	**HLM**	**MLM**	**HLM**
2	3.37	18.68	19.75	28.86	3.18	ND[f]	872.80	ND
94	2.71	18.34	18.93	18.20	22.00	ND	126.00	ND
96	3.18	18.14	18.97	26.30	3.87	ND	717.20	ND
98	4.13	0.03	32.26	28.02	21.13	11.55	131.20	240.00
99	2.16	52.91	48.70	0.52	301.37	277.26	< 12.00	< 12.00

100	2.18	> 42.72	> 19.78	0.19	231.05	84.53	12.00	32.80
102	2.88	38.36	> 53.87	21.95	23.90	47.15	116.00	58.80
103	3.67	> 24.26	> 40.19	31.20	5.39	25.67	514.80	108.00
105	3.94	> 15.98	> 36.14	26.73	6.78	21.94	408.80	126.40
106	3.82	0.04	32.01	24.75	5.58	17.59	497.20	157.60
108	3.75	17.61	19.18	47.12	2.59	ND	1068.80	ND
117	3.39	1.57	1.62	7.00	48.47	78.77	57.20	35.20

[a]: Lipofilicidade experimental, determinada em pH = 7.4; [b]: Solubilidade cinética (μg/mL); [c]: Permeabilidade gastrointestinal. $P_e < 1.5.10^{-6}$ cm/s: baixa permeabilidade, $P_e > 1.5.10^{-6}$ cm/s: alta permeabilidade; [d]: Meia-vida microssomal determinada em microssomas de fígado de rato (MLM) e microssomas de fígado humano (HLM), na presença do cofator NADPH; [e]: *Clearance* intrínseco determinado em MLM e HLM, na presença do cofator NADPH; [f]: Não determinado. A determinação das propriedades ADME in vitro foi realizada por *Dr*. Rafael Consolin Chelucci, Prof. Dr. Leonardo L. G. Ferreira e Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo (IFSC – USP).

IV) 4. Investigação do mecanismo de ação antitripanosomal da série

IV) 4. 1. Ensaios de *washout in vitro*

Ensaios de *washout* são de prima importância para o descobrimento de fármacos contra tripanossomas, por eles providenciarem informações do mecanismo de ação (estático ou cidal) dos candidatos a fármacos e, consequentemente, no potencial deles conseguirem uma cura estéril nas etapas subsequentes do desenvolvimento.[11,97,98] Como dois compostos da série chegaram a níveis nanomolares de potência contra *T. cruzi*, ensaios de *washout in vitro* foram realizados com todos os compostos com IC_{50} < 15 μM contra *T. cruzi*, desta vez usando a cepa *Dm28c-Luc* em células Vero. Além dos resultados do ensaio de *washout* de 3 dias em si, os valores de IC_{50} e IC_{90} de **2**, **94**, **96**, **102**, **103** e **108** contra a cepa *Dm28c-Luc* e os CC_{50} e CC_{20} também foram reportados na Tabela 18.

Agradavelmente, os valores de IC_{50} foram consistentes entre as duas cepas, exceto para **102**, que apresentou uma atividade contra *T. cruzi Dm28c-Luc* duas vezes menor do que contra a cepa *Tulahuen* (Tabela 18). Os dois derivados com IC_{50} nanomolares conseguiram manter seus IC_{90} no baixo micromolar (< 5 μM), enquanto **108** também apresentou um IC_{90} de um dígito, porém não tão baixo quanto **2** e **96**. Notavelmente, todos os compostos se revelaram não citotóxicos em células Vero (CC_{50} > 300 μM), resultando em melhorias no índice de

seletividade comparando com a avaliação precedente deles contra a cepa *Tulahuen* em células L929 (Tabela 18). A respeito dos ensaios de *washout* de 3 dias em si, todos os compostos com a exceção de **103** apresentaram uma excelente inibição de *T. cruzi* em ambas as concentrações (IC_{90} e CC_{20}), sendo mais eficientes que o fármaco de referência (**Bzn**) na maioria dos casos. De forma satisfatória, os dois derivados com as maiores atividades antitripanossomais contra ambas as cepas (compostos **2** e **96**) também resultaram na maior inibição de *T. cruzi* 3 dias depois do *washout* (~ 95% nos respectivos IC_{90} e > 99% nos respectivos CC_{20}), conseguindo tal resultado apesar de terem sido usados em concentrações substancialmente menores que a maioria dos outros compostos considerados neste lote. Portanto, considerando que a maioria dos 2-etiltiazóis conseguiu reter mais de 90% de inibição neste ensaio de *washout* de 3 dias, esses resultados suportam que o mecanismo de ação desta série, e especialmente dos compostos **2** e **96**, seja tripanocida e não tripanostático. Tal mecanismo de ação é de tremenda importância para a relevância dessa classe e dos derivados previamente destacados **2** e **96** dentro da área do descobrimento de fármacos contra a doença de Chagas, pois muitas falhas de compostos antitripanossomais promissores em estágios mais avançados de desenvolvimento podem ser atribuídas ao mecanismo de ação tripanostático deles.[24,98–101]

Tabela 18. Atividade *in vitro* contra *T. cruzi* (cepa *Dm28c-Luc*) de compostos selecionados e ensaios de *washout* de 3 dias.

Cpd	*T. cruzi* Tulahuen IC_{50} (SI)[a]	*T. cruzi* Dm28c-Luc IC_{50} (SI)[b]	*T. cruzi* Dm28c-Luc IC_{90} (SI)[c]	Vero CC_{50}[d]	Vero CC_{20}[e]	3-day *washout* @ IC_{90} (% inibição)[f]	3-day washout @ CC_{20} (% inibição)[g]
2	0.2 ± 0.0 (622)	0.2 ± 0.08 (> 1304)	2.1 ± ND (> 145)	> 300	125	94.47 ± 1.42	99.77 ± 0.01
94	5.4 ± 1.6 (46)	4.9 ± 0.70 (> 61)	35.6 ± ND (> 8)	> 300	125	92.61 ± 2.39	95.21 ± 0.91
96	0.5 ± 0.2 (277)	0.5 ± 0.35 (> 566)	4.8 ± ND (> 63)	> 300	125	95.33 ± 0.91	99.77 ± 0.02
102	12.2 ± 3.8 (17)	21.1 ± 2.98 (> 14)	153.1 ± ND (> 2)	> 300	125	93.72 ± 4.35	95.07 ± 0.30
103	9.8 ± 4.8 (7)	6.9 ± 1.56 (> 43)	62.3 ± ND (> 5)	> 300	125	0.78 ± 6.87	- 9.94 ± 15.94
108	3.4 ± 0.2	1.1 ± 0.28	5.9 ± ND	> 300	125	92.43 ± 2.70	99.29 ± 0.51

	(32)	(> 268)	(> 51)				
Bzn[h]	3.8 ± ND[i] (627)	2.3 ± 1.20 (> 128)	24.5 ± ND (> 12)	> 300	125	87.21 ± 16.2	99.56 ± 0.01

[a]: Valor de IC_{50} (µM) para a inibição do crescimento de *T. cruzi* (cepa *Tulahuen*) em células L929 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}^{L929}/IC_{50}; [b]: Valor de IC_{50} (µM) para a inibição do crescimento de *T. cruzi* (cepa *Dm28c-Luc*) em células Vero (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}^{Vero}/IC_{50}; [c]: Valor de IC_{90} (µM) para a inibição do crescimento de *T. cruzi* (cepa *Dm28c-Luc*) em células Vero (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}^{Vero}/IC_{90}; [d]: Valor de CC_{50} (µM) medido em células Vero (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [e]: Valor de CC_{50} (µM) medido em células Vero (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$); [f]: Percentagem de inibição do crescimento de *T. cruzi* (cepa *Dm28c-Luc*) 3 dias após o *washout* do composto subsequente à exposição a uma concentração em cada composto igual aos respectivos IC_{90} contra *T. cruzi Dm28c-Luc* (média de duas determinações independentes); [g]: Percentagem de inibição do crescimento de *T. cruzi* (cepa *Dm28c-Luc*) 3 dias após o *washout* do composto subsequente à exposição a uma concentração em cada composto igual aos respectivos CC_{20} contra células Vero (média de duas determinações independentes); [h]: O benznidazol (fármaco de referência) foi usado como controle positivo; [i]: Não determinado. A determinação in vitro dos valores de IC_{50} e CC_{50} e os ensaios de washout foram realizados por Prof[a]. Dr[a]. Cláudia Magalhães Calvet Álvarez (FIOCRUZ – RJ)

IV) 4. 2. Avaliação *in vitro* da inibição de Cruzaína (Cz)

Numa tentativa de trazer uma explicação mecanística para as discrepâncias observadas na atividade antitripanossomal dentro da série, e para confirmar ou infirmar um potencial alvo molecular para os derivados mais potentes contra *T. cruzi*, os compostos **2** e **94** – **108** foram submetidos a ensaios *in vitro* de inibição de cruzaína (Cz). A escolha da Cz antes de outras proteínas como potencial alvo a ser investigado foi motivada por relatos de séries com estruturas similares como inibidores de Cz (Figura 24).[96,102–104]

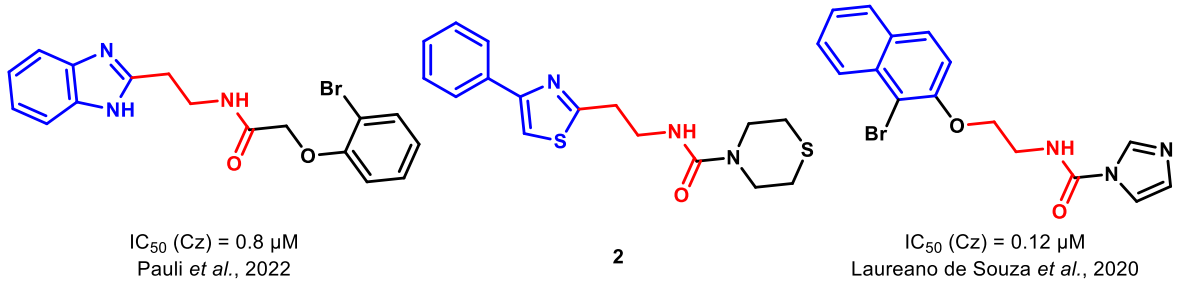


Figura 24. Similaridades estruturais entre **2** e os inibidores de Cz reportados.[102,103]

Primeiro, a percentagem de inibição de Cz de todos os compostos foi determinada numa concentração de 100 µM com pré-incubação de 10 minutos, sendo isso uma triagem preliminar dos possíveis inibidores de Cz. Os resultados foram bastante discrepantes dentro da série, sem

relação clara surgindo entre as características estruturais dos derivados e a inibição de Cz deles. De fato, análogos próximos como **102** e **103**, que também exibiram atividades similares contra *T. cruzi*, apresentaram resultados relativamente diferentes contra Cz, o primeiro chegando próximo de 95% de inibição enquanto o segundo apenas inibiu Cz por 24.7% (Tabela 19). Os compostos **104** e **105**, que apenas diferem por um átomo de oxigênio endocíclico no LD deles, mostraram uma discrepância semelhante, com o derivado oxigenado **104** demonstrando uma inibição 10 vezes maior que **105** contra Cz, embora outros derivados com heteroátomos endocíclicos no LD deles, como **2** ou **94**, foram mais próximos de **105** em termos de inibição de Cz (Tabela 19). Além disto, nenhuma correlação clara entre potência contra *T. cruzi* e inibição de Cz pôde ser evidenciada, considerando que os dois compostos com potência sub-micromolar apenas inibiram Cz por um mero 14.1% e 12.0%, respectivamente (compostos **2** e **96**, Tabela 19), enquanto o composto com a segunda menor atividade contra o parasita chegou a uma inibição de Cz surpreendentemente alta de 98.1% (composto **107**, Tabela 19). No geral, e com a exceção dos compostos **102**, **104** e **107**, todos os derivados tiveram um desempenho fraco ao inibir Cz, sugerindo que esta proteína possa não ser o alvo molecular da série, e especialmente não aquele dos derivados antitripanossomais mais promissores da série, **2** e **96**.

Apesar de ter desconsiderado Cz como um potencial alvo da série, a triagem preliminar ainda identificou três derivados com inibição alta de Cz, acima de 80%. Uma avaliação complementar da inibição de Cz foi então realizada, nas mesmas condições mas sem pré-incubação desta vez, almejando avaliar se tal inibição fosse tempo-dependente. Enquanto uma inibição de Cz similar foi observada para **104** e **107**, **102** apenas inibiu Cz por 26.1% sem pré-incubação, sugerindo que este composto possa ser um inibidor tempo-dependente. Depois, considerando os resultados da triagem preliminar, o valor de IC_{50} de **102** (94.8% de inibição a 100 μM), **104** (99.4% de inibição a 100 μM) e **107** (98.1% de inibição a 100 μM) foram determinados *in vitro* contra Cz. Conforme o esperado, **102** apresentou o maior IC_{50} contra Cz, quase fora do baixo micromolar (9.63 μM, Tabela 19). Os outros dois, no entanto, chegaram a atividades sub-micromolares contra Cz, com **104** exibindo um IC_{50} respeitável de 0.51 μM e **107** brilhando por seu nível nanomolar de potências (8.9 nM, Tabela 19). De novo, nenhuma correlação entre potência antitripanossomal e inibição de Cz foi observada, pois o derivado com a menor potência dos três contra *T. cruzi* apresentou atividade nanomolar contra Cz (composto **107**), enquanto aquele com a maior atividade contra o parasita teve uma atividade contra Cz três ordens de grandeza menor.

Tabela 19. Inibição de cruzaína (Cz) *in vitro* e IC_{50} contra Cz dos derivados **2** e **94** - **108**.

Composto	*T. cruzi* IC_{50} (SI)[a]	Inibição de Cz @ 100 µM (%)[b]	Cz IC_{50}[c]
2	0.2 ± 0.0 (622)	14.1	ND[d]
94	5.4 ± 1.6 (46)	29.3	ND
95	43.1 ± 10.9 (9)	7.4	ND
96	0.5 ± 0.2 (277)	12.0	ND
97	283.1 ± ND (ND)	63.7	ND
98	119.3 ± 0.0 (4)	0.6	ND
99	141.1 ± ND (ND)	1.6	ND
100	118.3 ± ND (ND)	12.4	ND
101	25.1 ± 1.8 (11)	56.7	ND
102	12.2 ± 3.8 (17)	94.8	9.63
103	9.8 ± 4.8 (7)	24.7	ND
104	111.5 ± ND	99.4	0.51

	(ND)		
105	44.0 ± 10.3 (11)	9.0	ND
106	69.6 ± 6.8 (6)	15.9	ND
107	256.8 ± ND (ND)	98.1	0.0089
108	3.4 ± 0.2 (32)	6.7	ND

[a]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição do crescimento de *T. cruzi* (cepa *Tulahuen*) em células L929 (média de pelo menos duas determinações independentes, $P < 0.05$), SI: índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50}; [b]: Percentagem de inibição de Cz após exposição a uma concentração de 100 μM em cada composto após 10 minutos de incubação (média de duas determinações independentes); [c]: Valor de IC_{50} (μM) para a inibição da atividade enzimática de Cz (média de pelo menos duas determinações independentes); [d]: Não determinado. Os ensaios de inibição de cruzaína in vitro foram realizados por BSc. Lucas Abreu Diniz e Prof[a]. Dr[a]. Rafaela Salgado Ferreira (UFMG).

Enfim, tendo identificado **102**, **104** e **107** como inibidores de Cz, o modo de inibição deles foi investigado, para providenciar detalhes adicionais para o planejamento de futuros derivados tendo a mesma proteína como alvo. Primeiro, os valores de IC_{50} de ambos **102** e **107** foram determinados mais duas vezes, uma após pré-incubação com albumina de sérum bovino (BSA) e uma na presença de concentrações variáveis em Triton X-100, pois ambos a BSA e o Triton X-100 afetam a formação de agregados coloidais. A adição de Triton X-100 resultou em valores semelhantes aos da Tabela 19, no entanto a adição de BSA levou a valores de IC_{50} 10 e 4 vezes maiores para **107** e **102**, respectivamente, sugerindo que **107** esteja sujeito à formação de agregados. Para **104**, a percentagem de inibição de Cz numa concentração de 0.5 μM em **104** não foi alterada de maneira significativa nem com pré-incubação com BSA, nem na presença de Triton X-100, sugerindo que não ocorra formação de agregados com **104** (Tabela 20). Ensaios adicionais permitiram a determinação dos valores de K_m e V_{max} para a inibição de Cz com diferentes concentrações em **107**, usando uma regressão não-linear aplicada ao modelo de Michaelis-Menten, para propor um mecanismo de inibição para este composto (Tabela 21). Esses valores tiveram tendência a diminuir quando a concentração de **107** aumentou, apontando que **107** não seja um inibidor competitivo, pois esses têm tendência a apresentar um aumento nos valores de K_m e valores de V_{max} estáveis quando aumenta a concentração. Isto foi

confirmado pela ausência de correlação linear entre o $K_{m\ app}$ e a concentração de **107**, o que seria de se esperar de um inibidor competitivo (Figura 25). O modelo de *Mixed Inhibition* no software GraphPad Prism permitiu determinar o valor do parâmetro α para a relação entre o $K_{m\ app}$ e a concentração em **107**, que foi de 0.621. Considerando que inibidores competitivos habitualmente apresentam α > 1, este mecanismo de inibição foi razoavelmente desconsiderado para **107**. Portanto, outros mecanismos de inibição foram considerados, principalmente com base nas características estruturais do composto. A característica mais relevante é o sítio eletrófilo oferecido pelo carbamoilimidazol de **107**, que foi devidamente explorado para a síntese da maioria dos derivados nesta série, e levou a possibilidade de **107** ser um inibidor covalente a ser investigada. Assim, o valor de IC_{50} de **107** contra Cz foi determinado de novo, desta vez sem pré-incubação, levando a uma brusca redução de potência por um fator 100 (IC_{50} = 0.5 μM sem pré-incubação), indicando que **107** possa ser um inibidor covalente. Estudos adicionais estão, no entanto, necessários e em curso, para confirmar este mecanismo de inibição para **102** e **104** também, além de determinar se esses fossem inibidores covalentes reversíveis ou irreversíveis.

Tabela 20. Avaliação da possibilidade de formação de agregados por **104**.

Composto	**Inibição de Cz @ 0.5 μM (%)**			
	Triton 0.1%	**Triton 0.01%**	**Triton 0%**	**BSA + Triton 0%**
104	39.4	48.9	44.1	20.1

Os ensaios de inibição de cruzaína in vitro foram realizados por BSc. Lucas Abreu Diniz e Profª. Drª. Rafaela Salgado Ferreira (UFMG).

Tabela 21. Valores de V_{max} e K_m para a inibição de Cz com **107**.

	Concentração em 107 (nM)					
	0	**2.25**	**4.5**	**9**	**18**	**36**
V_{max}	302641	226409	170170	118089	52993	16133
K_m	0.7267	0.6083	0.5095	0.5830	0.5417	0.3245

Os ensaios de inibição de cruzaína in vitro foram realizados por BSc. Lucas Abreu Diniz e Profª. Drª. Rafaela Salgado Ferreira (UFMG).

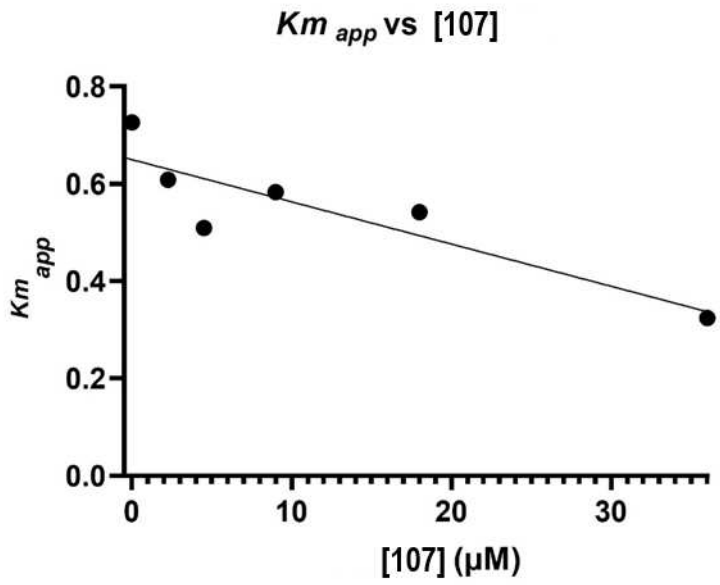


Figura 25. Relação entre $K_{m\ app}$ e a concentração de **107**.
Os ensaios de inibição de cruzaína *in vitro* foram realizados por BSc. Lucas Abreu Diniz e Profª. Drª. Rafaela Salgado Ferreira (UFMG).

IV) 5. Conclusões

A exploração da relação estrutura-atividade da série de tiazóis contra *T. cruzi* revelou o *hit* **2** como o composto mais potente e seletivo da série contra o parasita, embora um outro análogo próximo, o derivado de pirrolidina **96**, tenha também apresentado uma potência de ordem nanomolar contra o mesmo alvo. Juntos com outros compostos similares da série, esses sugeriram que derivados de ureias de aminas secundárias cíclicas possam ser associados com uma maior potência contra *T. cruzi*. O lado esquerdo 4-feniltiazol e o *linker* etila também revelaram-se importantes para a atividade antitripanossomal da série através da exploração dos outros fragmentos de **2**. Porém, tal exploração também destacou que a simples presença destas duas características não era suficiente para a atividade da série, considerando a proporção de derivados 4-fenil-2-etiltiazol com baixa potência contra *T. cruzi*. A investigação do mecanismo de ação da série também sugeriu que **2**, **96**, e a maioria dos derivados potentes contra *T. cruzi* fossem tripanocidas, e não tripanostáticos, considerando que a maioria deles manteve mais de 90% de inibição do parasita num ensaio de *washout* de 3 dias, sendo mais performantes neste quesito que o fármaco de referência contra a doença de Chagas, o benznidazol. No entanto, o alvo molecular em *T. cruzi* permanece desconhecido, apesar da cruzaína ter sido excluída para os derivados mais potentes.

Ao contrário, e agradavelmente considerando a diversificação das opções terapêuticas, a maioria dos compostos com atividade fraca contra *T. cruzi* revelou-se potente contra *L.*

infantum, e o contrário também provou-se verdadeiro, com a exceção de **2** que permaneceu potente contra os dois parasitas, sendo assim confirmado como *hit* contra *L. infantum* também. A diamina **100** apresentou melhorias na potência comparada àquela de **2**, enquanto o derivado de ciclohexilamina **105** exibiu exatamente a mesma atividade antileishmanial que **2**, e a atividade da outra diamina **99** permaneceu próxima a **2** contra *L. infantum*.

O perfil ADME dos derivados mais potente contra cada parasita revelou-se bom de modo geral, quando forem consideradas apenas a lipofilicidade, solubilidade aquosa e permeabilidade gastrointestinal dos compostos avaliados. No entanto, destacou-se uma limitação metabólica importante para **2**, **96**, e a maioria dos derivados de 2-etiltiazol, impedindo assim os compostos **2** e **96** de serem contemplados para potenciais estudos *in vivo* devido à curta meia-vida microssomal deles (< 4 minutos), apesar de eles terem chegado a níveis nanomolares de potência contra *T. cruzi*. As modificações no *linker* etila de **2** revelaram-se eficientes para melhorar moderadamente a estabilidade metabólica no composto **117**, porém foram acompanhadas por uma perda importante de atividade contra *T. cruzi*. As diaminas **99** e **100** foram as exceções ao perfil farmacocinético da série, apresentando uma estabilidade metabólica excepcionalmente alta considerando os outros derivados, chegando a quase 4 horas (para **100**) e acima (para **99**) de meia-vida em microssomas de fígado de rato, apesar de demonstrarem uma baixa permeabilidade gastrointestinal.

Assim, apesar de não ter identificado novos 2-etiltiazóis *lead* contra qualquer um dos dois parasitas, foram identificados pontos críticos do perfil farmacocinético em quais focar para continuar o desenvolvimento da série contra *T. cruzi* neste trabalho, que também trouxe elementos valiosos neste estágio da otimização sobre o mecanismo de ação dos 2-etiltiazóis mais potentes. Ainda, foram identificados dois novos *hits* contra *L. infantum*, sendo as diaminas **99** e **100**, para serem o ponto de partida de novas etapas de otimização da série, almejando melhorar a permeabilidade gastrointestinal delas e, idealmente, a potência contra *L. infantum*, retendo a superioridade na estabilidade metabólica.

V) CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram realizadas otimizações em duas séries de compostos contra parasitas kinetoplastida, a partir dos *hits* iniciais **1** e **2**. A maioria dos análogos planejados foi sintetizada seguindo rotas de síntese relativamente curtas, que requereram apenas de duas a cinco etapas para fornecer os compostos finais almejados a partir de reagentes comerciais simples. Dentro destas rotas, as reações de substituição nucleofílica aromática (S_NAr) e de acoplamento de amida revelaram-se particularmente robustas, com a maioria das etapas de S_NAr resultando em rendimentos superiores a 75% e os acoplamentos de amida geralmente rendendo os produtos com rendimentos superiores ao 50%, apesar de apresentar rendimentos mais disparates que reações de S_NAr. Assim, graças à robustez da S_NAr levando à obtenção do intermediário pirazinilpiperazina **3** com 100% de rendimento, as pirazinilpiperazinas mais promissores foram obtidas com rendimentos globais de 45 a 93% em duas ou três etapas, o que torna-se relevante levando em consideração a importância do custo para fármacos destinados ao tratamento da leishmaniose visceral. Carbamoilimidazóis, facilmente sintetizados em altos rendimentos a partir de CDI, também provaram-se cruciais na síntese da maioria dos derivados da série de tiazóis, sendo eles alternativas eficientes a isocianatos ou cloretos de *N*-carbonila para a síntese de ureias. Foi então obtida a maioria da série de tiazóis após substituição nucleofílica na acila do carbamoilimidazol **107**, em rendimentos de 55 a 86%, o que mais uma vez têm relevância crucial considerando a necessidade de otimização dos custos para fármacos contra a doença de Chagas e leishmaniose visceral. As diversas modificações estruturais assim introduzidas levaram à identificação de vários compostos promissores em ambas as séries tanto contra a leishmaniose visceral quanto contra a doença de Chagas. Dentro destes, duas diaminas oriundas da série de tiazóis destacaram-se pela estabilidade metabólica delas, chegando a valores de meia-vida de 301.37 e 231.05 min e de *clearance* inferiores a 12 µL/min/mg, respectivamente, combinados com valores de IC_{50} contra *L. infantum* de 6.0 e 3.8 µM, fazendo de **99** e **100** dois *hits* otimizados e possíveis candidatos a *lead* contra a leishmaniose visceral. **2** permaneceu um composto potente, chegando a valores de IC_{50} de ordem nanomolar (0.2 µM), com mecanismo de ação tripanocida relevante contra a doença de Chagas, junto com outros análogos estruturais próximos. No entanto, **2** e os outros derivados potentes contra *T. cruzi* ainda precisam de maiores otimizações para serem opções terapêuticas viáveis, visto a baixa estabilidade metabólica apresentada por estes com tempos de meia-vida inferiores a 4 minutos. O composto de maior destaque foi inegavelmente a pirazinilpiperazina **6**, que foi identificado como um novo composto *lead* potente contra *L. infantum*, demonstrando potência e seletividade

in vitro, com um IC_{50} de 3.1 μM contra o parasita e um SI de 346, um perfil farmacocinético *in vitro* adequado com excelente estabilidade metabólica ($t_{1/2}$ = 315 min; Cl_{int} = 0.550 μL/min/mg), e uma excelente eficácia *in vivo* em modelos de leishmaniose visceral em camundongos infectados por *L. infantum*, chegando a mais de 90% de redução da parasitemia tanto no baço quanto no fígado após tratamento em doses de 100 mg/kg/dia. Assim, **6** segue como um candidato promissor para maiores desenvolvimentos contra a leishmaniose visceral, visto que alguns parâmetros do perfil deste composto ainda podem ser otimizados para chegar num candidato clínico ideal, apesar de **6** permanecer um excelente composto *lead* e uma base sólida para futuros esforços de *lead optimization*.

Considerando a integralidade do trabalho, esta tese constitui uma adição sólida e relevante para a área de química medicinal, principalmente nas subáreas de descoberta de fármacos e doenças tropicais negligenciadas. Apesar de não ter entregado compostos *lead* oriundos das duas séries contra ambas as doenças consideradas, ainda conseguiu identificar com sucesso um novo *lead* pirazinlilpiperazina contra a leishmaniose visceral, sendo ele o composto *para*-hidroxila **6**, e propor elementos relevantes para o conhecimento tanto da biologia do parasita quanto da interação do *lead* **6** com esta, oriundos de investigações *in vitro* e *in silico*. O raciocínio apresentado ao longo do trabalho, tanto no planejamento dos derivados da relação estrutura-atividade das duas séries quanto na escolha dos ensaios biológicos complementares a serem realizados, ilustra a força e a relevância das parcerias acadêmicas na área de desenvolvimento de fármacos para doenças negligenciadas, e promete futuros sucessos para as próximas otimizações das séries das pirazinilpiperazinas e dos tiazóis contra a doença de Chagas e a leishmaniose visceral. Tais futuras otimizações precisarão incluir esforços visando a identificação de um composto *lead* contra ambas as doenças para a série de tiazóis, almejando otimizar a potência *in vitro* contra *L. infantum* a partir das duas diaminas mais promissoras da série, e melhorar de maneira significativa a estabilidade metabólica mantendo a potência contra *T. cruzi* para os futuros tiazóis candidatos a *lead* contra a doença de Chagas. A identificação do alvo molecular de **6** em *L. infantum* também será necessária, para otimizar as chances de sucesso de futuros estudos de *lead optimization*, almejando melhorar a potência *in vitro*, a eficácia *in vivo* e a permeabilidade gastrointestinal da série a partir de **6**.

VI) MATERIAIS E MÉTODOS

VI) 1. Síntese orgânica

VI) 1. 1. Informações gerais

Todas as reações foram realizadas sob agitação magnética, e os reagentes e solventes comerciais foram usados sem purificação adicional. O diclorometano (DCM), a trietilamina (Et_3N) e a *N*,*N*-dimetilformamida (DMF) foram secados com peneira molecular. O acetato de etila (EtOAc) e o hexano (Hex) foram previamente destilados. Purificação por coluna cromatográfica *flash* foi realizada usando gel de sílica Aldrich (35-70 *mesh*) ou Macherey-Nagel (230-400 *mesh* ASTM). Cromatografia analítica em camada delgada (TLC) foi realizada em folhas de cromatografia de alumínio revestidas com gel de sílica 60 F_{254} (Sigma-Aldrich), e as placas foram reveladas usando luz UV (254 nm) e/ou atmosfera de iodo. Todas as reações foram monitoradas por TLC. Espectros de RMN de ^{1}H, ^{13}C desacoplado próton e ^{13}C APT foram adquiridos em $CDCl_3$, CD_3OD ou DMSO-d_6 a 400 MHz (para ^{1}H) e 101 MHz (para ^{13}C e ^{13}C APT) (Bruker Ascend 400). Os deslocamentos químicos (δ) são reportados em ppm usando o sinal do solvente residual como referência interna ($CDCl_3$: 7.26 ppm, CD_3OD: 3.31 ppm, DMSO-d_6: 2.50 ppm, TMS: 0.00 ppm para RMN de ^{1}H, e $CDCl_3$: 77.16 ppm, CD_3OD: 49.00 ppm, DMSO-d_6: 39.52 ppm para RMN de ^{13}C e ^{13}C APT). A multiplicidade dos sinais foi reportada usando as abreviações seguintes: s = singleto, d = dupleto, t = tripleto, q = quarteto, dd = dupleto de dupletos, td = tripleto de dupletos, dt = dupleto de tripletos, m = multipleto. A multiplicidade é seguida pela(s) constante(s) de acoplamento em Hz e a integração. Prótons trocáveis não foram observáveis em alguns espectros de RMN. Para o RMN de ^{13}C APT, os sinais apontando para cima da linha de base correspondem a carbonos primários e terciários, e os sinais apontando para baixo correspondem a carbonos secundários e quaternários. Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) foi medida usando ionização por eletrospray (ESI) (Bruker Daltonics Corporation, Q-TOF Geometry Impact II). Os espectros de RMN e HRMS de todos os compostos testados contra *L. infantum* e *T. cruzi* estão disponíveis em Anexo.

VI) 1. 2. Procedimentos gerais

VI) 1. 2. 1. Procedimento geral A: Substituição nucleofílica aromática (S_NAr)

O cloreto de arila apropriado (1 eq) foi solubilizado em iPrOH, PrOH ou DMF (0.5 M), a diamina (3 – 4 eq) e Na_2CO_3 (3 – 4 eq) foram acrescentados, e a reação foi agitada a 80 – 120 °C até ser completada. O solvente foi então evaporado sob pressão reduzida, e água destilada fria (20 mL) foi adicionada. A fase aquosa foi extraída com DCM ou EtOAc (3 x 15 mL), e as fases orgânicas foram juntadas, secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para render o composto almejado.

Para **3**, **45** e **78**, o solvente da reação foi evaporado sob pressão reduzida, e o resíduo bruto foi diretamente purificado por coluna cromatográfica (DCM/MeOH, gradiente (9:1) até (8:2)) para render o composto.

VI) 1. 2. 2. Procedimento geral B: Acoplamento de amida

O ácido carboxílico apropriado (1 – 1.5 eq), EDC (1 – 1.5 eq) e HOBt (0.1 eq) foram solubilizados em DMF (0.1 – 0.3 M), Et_3N (1 – 1.5 eq) e a amina primária ou secundária adequada (1 – 5 eq) foram acrescentadas, e a reação foi agitada a temperatura ambiente até ser completada. A solução foi resfriada a 0 °C, e água fria foi acrescentada.

Em caso de precipitação, o precipitado formado foi filtrado, lavado com água fria e secado sob vácuo para render o composto almejado. Alguns precipitados necessitaram uma purificação adicional por coluna cromatográfica para isolar o produto.

Quando não ocorreu precipitação, a fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 15 mL), e as fases orgânicas foram juntadas, secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica para render o composto almejado. Em alguns casos, a purificação por coluna cromatográfica não foi necessária, pois o produto tinha sido isolado puro após a extração.

VI) 1. 2. 3. Procedimento geral C: Desmetilação

O derivado metoxilado apropriado (1 eq) foi solubilizado em DCM (0.1 mL) sob atmosfera de argônio, BBr_3 (5 eq por metoxila, solução 1 M em DCM) foi acrescentado a 0 °C, e a reação foi agitada a temperatura ambiente sob atmosfera de argônio até ser completada. Água destilada gelada (20 mL) foi acrescentada gota-a-gota a 0 °C para encerrar a reação, e a

fase aquosa foi extraída com DCM (3 x 10 mL). As fases orgânicas foram juntadas, secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica para render o composto almejado.

VI) 1. 2. 4. Procedimento geral D: Síntese de ureias a partir de carbamoilimidazóis

O carbamoilimidazol apropriado (1 eq) foi solubilizado em DCM (0.25 M), a amina primária ou secundária apropriada (1.1 – 9 eq) e Et_3N foram cuidadosamente adicionadas a 0 °C, e a reação foi agitada a temperatura ambiente até ser completada. A solução foi então diluída com DCM (10 mL) e lavada com água destilada e uma solução saturada de NaCl (3 x 5 mL). A fase orgânica foi secada sob Na_2SO_4 anidro, filtrada, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para render o composto almejado.

VI) 1. 2. 5. Procedimento geral E: Síntese de ureias *one-pot*

A amina primária apropriada foi suspendida em uma mistura de Et_3N (3 eq) e DCM (0.2 M), e a suspensão resultante foi resfriada a 0 °C. CDI (1.2 eq) foi acrescentado, e a mistura foi agitada por 2 h a 0 °C. Tiomorfolina (1.5 – 3 eq) foi então acrescentada a 0 °C, a reação foi deixada para aquecer gradativamente até temperatura ambiente, e agitada a temperatura ambiente até ser completada. A solução foi então diluída com DCM (20 mL) e lavada com água destilada e uma solução saturada de NaCl (3 x 10 mL). A fase aquosa foi re-extraída com EtOAc (3 x 10 mL), as fases orgânicas (DCM e EtOAc) foram juntadas, secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica (DCM/MeOH (95:5)) para render o composto almejado.

VI) 1. 3. Síntese do *hit* 1

2-(piperazin-1-il)pirazina (3)

Seguindo o Procedimento geral A, em 15 h a 80 °C a partir de 2-cloropirazina (300 mg, 2.62 mmol) e piperazina (676.8 mg, 7.86 mmol, 3 eq) em iPrOH.

3: óleo amarelo, 435.7 mg, 100%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.11 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 8.04 (dd, *J* = 2.7, 1.4 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 3.59–3.49 (m, 4H), 3.03–2.91 (m, 4H), 1.93 (s, 1H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 155.3, 141.8, 132.9, 131.1, 45.8, 45.6.

3-cloro-4-hidroxibenzoato de metila

Ácido 4-hidroxibenzoico (300 mg, 2.17 mmol) foi suspendido em uma mistura de HCl concentrado (0.735 mL, 4 eq) e MeOH (1 mL). H_2O_2 (33%) (0.165 mL, 1.1 eq) foi acrescentado gota-a-gota, e a reação foi agitada por 3 h a 70 °C. MeOH foi evaporado sob pressão reduzida, e água destilada fria (15 mL) foi adicionada. O precipitado branco formado foi filtrado, lavado com água destilada fria, e secado sob vácuo para render o composto almejado (sólido branco, 259.4 mg, 64%).

RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.05 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.89 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.94 (s, 1H), 3.89 (s, 3H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 166.7, 157.5, 131.5, 130.2, 122.9, 120.1, 116.7, 52.4.

Ácido 3-cloro-4-hidroxibenzoico (4)

3-cloro-4-hidroxibenzoato de metila (101.6 mg, 0.545 mmol) foi solubilizado em MeOH (0.5 M), e NaOH (solução aquosa 2 M, 15 eq) foi acrescentado. A reação foi agitada por 2 h a temperatura ambiente, e MeOH foi evaporado sob pressão reduzida. A mistura resultante foi resfriada a 0 °C, e HCl (2 M) foi acrescentado gota-a-gota até pH ~ 2. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada fria e secado sob vácuo para render o composto almejado.

4: sólido branco/bege, 93.5 mg, 99%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 12.77 (s, 1H), 11.07 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 166.6, 157.4, 131.5, 130.1, 122.9, 120.0, 116.6.

(3-cloro-4-hidroxifenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (1)

Seguindo o Procedimento geral B, em 48 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e **4** (25.3 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de EtOAc/Hex (95:5) para a coluna cromatográfica.

1: sólido branco, 19.5 mg, 50%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.10 (s, 1H), 8.07 (m, 1H), 7.85 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.20 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 3.75 – 3.60 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 169.2, 154.8, 153.1, 141.9, 134.0, 131.3, 128.9, 128.6, 128.0, 120.3, 116.4, 44.8. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{15}ClN_4O_2Na^+$ $[M + Na]^+$ = 341.0776 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 341.0773 *m/z*, erro = 0.88 ppm.

VI) 1. 4. Síntese dos derivados amida, sulfonamida e fenol 5 – 13

(3-clorofenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (5)

Seguindo o Procedimento geral B, em 18 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido 3-clorobenzoico (22.9 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de EtOAc/Hex (9:1) para a coluna cromatográfica.

5: sólido amarelado, 14.2 mg, 38%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.17 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.09 (dd, *J* = 2.6, 1.6 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.43 (m, 2H), 7.38 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.32 (dt, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1H), 3.75 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 169.1, 154.8, 141.9, 137.2, 134.9, 134.10 131.3, 130.3, 130.1, 127.5, 125.3, 44.8. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{15}ClN_4ONa^+$ $[M + Na]^+$ = 325.0827 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 325.0826 *m/z*, erro = 0.31 ppm.

(4-hidroxifenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (6)

Seguindo o Procedimento geral B, em 41 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido 4-hidroxibenzoico (20.2 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de EtOAc/Hex (95:5) para a coluna cromatográfica.

6: sólido branco, 19.5 mg, 56%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.15 (s, 1H), 8.10 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.77 (br. s, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.81 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 3.71 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 171.3, 158.6, 154.9, 142.1, 133.6, 131.0, 129.5, 126.4, 115.7, 44.8. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{16}N_4O_2Na^+$ $[M + Na]^+$ = 307.1165 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 307.1163 *m/z*, erro = 0.65 ppm. **Pureza**: 97.3% (HPLC).

*Otimização da síntese de **6** em maior escala*

Ácido 4-acetoxibenzoico

Ácido 4-hidroxibenzoico (1 g, 7.24 mmol) foi solubilizado em anidrido acético (3.43 mL, 3.70 g, 36.28 mmol, 5 eq), H_2SO_4 (96%) (0.1 mL, cat.) foi acrescentado, e a reação foi agitada por 16 h a 80 °C. Em seguida, a mistura reacional foi resfriada a 0 °C e cuidadosamente diluída com água destilada (30 mL). O precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada fria e secado sob vácuo para render o composto almejado (sólido marrom claro, 1.31 g, 100%).

RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 170.6, 168.9, 155.1, 131.9, 127.0, 121.8, 21.2.

Acetato de 4-(4-pirazin-2-il)piperazin-1-carbonil)fenila

Ácido 4-acetoxibenzoico (374.7 mg, 2.08 mmol, 2 eq) foi solubilizado em DCM anidro (10.4 mL) sob atmosfera de argônio, cloreto de oxalila (1.32 g, 10.4 mmol, 10 eq) e DMF (3 gotas, cat.) foram cuidadosamente acrescentados a 0 °C, e a reação foi agitada por 2 h a 0 °C sob atmosfera de argônio. Os voláteis foram evaporados sob pressão reduzida, e o resíduo foi solubilizado em DCM anidro (5.2 mL) e cuidadosamente acrescentado a uma mistura agitada de **3** (170 mg, 1.04 mmol) e Et_3N (315.7 mg, 3.12 mmol, 3 eq) a 0 °C, sob atmosfera de argônio. A reação foi deixada aquecer gradativamente até temperatura ambiente e agitada por 3 h a temperatura ambiente sob atmosfera de argônio. Em seguida, a mistura reacional foi diluída com DCM (20 mL) e lavada com água destilada e uma solução saturada de NaCl (3 x 10 mL). A fase aquosa foi re-extraída com DCM (3 x 10 mL), as fases orgânicas foram juntadas, secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica (EtOAc/Hex (95:5)) para render o composto almejado (sólido amarelado, 226.6 mg, 67%).

RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.17 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 8.09 (dd, *J* = 2.5, 1.2 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 3.93 – 3.58 (m, 8H), 2.32 (s, 3H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 169.9, 169.2, 154.8, 152.0, 141.9, 133.9, 132.9, 131.2, 128.8, 122.0, 44.8, 21.2.

(4-hidroxifenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (6)

O acetato de 4-(4-pirazin-2-il)piperazin-1-carbonil)fenila (215 mg, 0.659 mmol) obtido na etapa anterior foi solubilizado em MeOH/THF (3:1) (2 mL), e NaOH (solução aquosa 2 M) (4.95 mL, 9.89 mmol, 15 eq) foi acrescentado. A reação foi agitada por 3 h a temperatura ambiente, e os voláteis foram evaporados sob pressão reduzida. A mistura resultante foi resfriada a 0 °C, e HCl (2 M) foi acrescentado gota-a-gota a 0 °C até pH ~ 2. O pH foi ajustado até ~ 8 com NaOH (2 M), e a fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 15 mL). As fases orgânicas foram juntadas, secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para render **6**.

6: sólido branco, 185.7 mg, 99% (66% para as três etapas a partir do ácido 4-hidroxibenzoico).

Dados de caracterização: *vide* acima.

4-(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)fenol (7)

Dicloridrato de 4-(piperazin-1-il) fenol (78.9 mg, 0.314 mmol, 1.2 eq) foi suspendido em iPrOH/DMF (1:2) (3 mL), e 2-cloropirazina (30 mg, 0.262 mmol) e Na_2CO_3 (55.5 mg, 0.524

mmol, 2 eq) foram acrescentados. A reação foi agitada por 24 h a 90 °C, e água destilada fria (20 mL) foi adiciondada. A fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 15 mL), e as fases orgânicas foram juntadas, secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica (EtOAc/Hex (95:5)) para render o composto almejado.

7: sólido bege, 13.5 mg, 20%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD)** δ 8.24 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 8.11 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.74 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 3.81 – 3.68 (m, 4H), 3.20 – 2.97 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CD_3OD)** δ 146.1, 143.3, 133.2, 132.0, 120.5, 116.8, 52.3, 45.8. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{14}H_{17}N_4O^+$ $[M + H]^+$ = 257.1397 *m/z*, encontrado $[M + H]^+$ = 257.1388 *m/z*, erro = 3.50 ppm.

2-(4-((4-metoxifenil)sulfonil)piperazin-1-il)pirazina (8)

3 (50 mg, 0.304 mmol) e cloreto de 4-metoxibenzenesulfonato (62.8 mg, 0.304 mmol, 1 eq) foram solubilizados em DCM (3 mL), e Et_3N (153.8 mg, 1.52 mmol, 5 eq) foi acrescentada. A reação foi agitada por 24 h a temperatura ambiente, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Água destilada fria (20 mL) foi adiciondada, e o precipitado foi filtrado, lavado com água destilada fria e purificado por coluna cromatográfica (EtOAc/Hex (95:5)) para render o composto almejado.

8: sólido branco, 82.5 mg, 81%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.09 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.00 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.73 – 3.65 (m, 4H), 3.17 – 3.05 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 163.4, 154.5, 141.8, 133.8, 131.1, 130.0, 127.1, 114.5, 55.7, 45.7, 44.1. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{18}ClN_4O_3SNa^+$ $[M + Na]^+$ = 357.0992 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 357.0992 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

4-((4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)sulfonil)fenol (9)

Seguindo o Procedimento geral C, em 24 h a partir de **8** (20 mg, 0.060 mmol), usando uma mistura de DCM/MeOH (95:5) para a coluna cromatográfica.

9: sólido amarelo, 19.0 mg, 99%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.98 (s, 2H), 7.74 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.73 – 3.55 (m, 4H), 3.07 – 2.97 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 161.8, 154.5, 142.0, 133.0, 130.6, 130.0, 125.1, 115.9, 45.6, 43.9. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{14}H_{16}ClN_4O_3SNa^+$ $[M + Na]^+$ = 343.0835 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 343.0831 *m/z*, erro = 1.16 ppm.

Fenil(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (10)

3 (20 mg, 0.122 mmol) foi solubilizado em DCM (0.3 M) e Et_3N (28.5 mg, 0.282 mmol, 3 eq) sob atmosfera de argônio, e cloreto de benzoíla (34.3 mg, 0.244 mmol, 2 eq) foi acrescentado. A reação foi agitada por 24 h a temperatura ambiente sob atmosfera de argônio, e água destilada fria (20 mL) foi adiciondada. A fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 15 mL), e as fases orgânicas foram juntadas, lavadas com $NaHCO_3$ (solução saturada) e água destilada (2 x 15 mL), secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica (EtOAc/Hex (9:1)) para render o composto almejado.

10: óleo amarelado, 7.8 mg, 24%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.16 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 8.09 (dd, *J* = 2.5, 1.5 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.44 (s, 5H), 3.76 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 170.7, 154.9, 141.9, 135.5, 133.9, 131.2, 130.1, 128.7, 127.2, 44.8. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{16}N_4ONa^+$ $[M + Na]^+$ = 291.1216 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 291.1213 *m/z*, erro = 1.03 ppm.

(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)(4-(trifluorometil)fenil)metanona (11)

Ácido 4-trifluorometilbenzoico (25.5 mg, 0.134 mmol, 1.1 eq), HBTU (60.3 mg, 0.159 mmol, 1.3 eq) e Et_3N (37.0 mg, 0.366 mmol, 3 eq) foram solubilizados em DMF (0.3 M), e **3** (20 mg, 0.122 mmol) foi acrescentado sob agitação. A reação foi agitada por 42 h a temperatura ambiente, e água destilada fria (20 mL) foi adiciondada. A fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 15 mL), e as fases orgânicas foram juntadas, secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica (EtOAc/Hex (9:1)) para render o composto almejado.

11: óleo rosado, 17.5 mg, 42%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.16 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 3.78 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 169.2, 154.8, 141.9, 139.0, 134.1, 132.1 (q, *J* = 32.8 Hz), 131.3, 127.6, 125.9, 125.8, 128.9 – 118.9 (q), 44.8. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{15}F_3N_4ONa^+$ $[M + Na]^+$ = 359.1090 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 359.1082 *m/z*, erro = 2.23 ppm.

(3-hidroxifenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (12)

Seguindo o Procedimento geral B, em 46 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido 3-hidroxibenzoico (20.2 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de EtOAc/Hex (9:1) para a coluna cromatográfica.

12: sólido amarelo, 18.9 mg, 54%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD)** δ 8.23 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 8.12 (dd, *J* = 2.7, 1.5 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.29 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.92 – 6.89 (m, 1H), 6.89 (dd, *J* = 2.9, 1.0 Hz, 1H), 6.86 – 6.84 (m, 1H), 4.00 – 3.53 (m, 9H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CD_3OD)** δ 172.7, 159.0, 156.5, 143.3, 137.8, 133.5, 132.1, 131.0, 118.8, 118.1, 114.7, 45.8, 45.1. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{16}N_4O_2Na^+$ $[M + Na]^+$ = 307.1165 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 307.1158 *m/z*, erro = 2.28 ppm.

(2-hidroxifenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (13)

Seguindo o Procedimento geral B, em 50 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido 2-hidroxibenzoico (20.2 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de DCM/MeOH (8:2) para a coluna cromatográfica.

13: sólido amarelo, 8.5 mg, 25%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD)** δ 8.23 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.11 (dd, *J* = 2.7, 1.5 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.29 (ddd, *J* = 8.2, 7.4, 1.7 Hz, 1H), 7.22 (dd, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H), 6.92 (td, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 8.2, 0.6 Hz, 1H), 3.71 (s, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CD_3OD)** δ 170.9, 156.5, 154.9, 143.3, 133.4, 132.1, 132.1, 129.3, 124.2, 120.8, 116.7, 46.3, 45.5, 45.1. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{16}N_4O_2Na^+$ $[M + Na]^+$ = 307.1165 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 307.1160 *m/z*, erro = 1.63 ppm.

VI) 1. 5. Síntese dos derivados picolínicos e nicotínicos 14 – 24

(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)(piridin-2-il)metanona (14)

Seguindo o Procedimento geral B, em 48 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido picolinico (18.0 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de DCM/MeOH (95:5) para a coluna cromatográfica.

14: óleo amarelado, 26.9 mg, 82%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.60 (ddd, *J* = 4.8, 1.7, 0.9 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 8.08 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.82 (td, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.72 (dt, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 7.37 (ddd, *J* = 7.6, 4.9, 1.2 Hz, 1H), 3.98 – 3.91 (m, 2H), 3.84 – 3.78 (m, 2H), 3.78 – 3.73 (m, 2H), 3.69 – 3.62 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 167.7, 154.8, 153.7, 148.4, 141.9, 137.3, 133.7, 131.1, 124.9, 124.4, 46.7, 45.0, 44.4, 42.2. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{14}H_{15}N_5ONa^+$ $[M + Na]^+$ = 292.1169 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 292.1162 *m/z*, erro = 2.40 ppm.

(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)(6-(trifluorometil)piridin-2-il)metanona (15)

Seguindo o Procedimento geral B, em 54 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido 6-trifluorometilpicolinico (27.9 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de EtOAc/Hex (9:1) para a coluna cromatográfica.

15: óleo amarelo, 28.9 mg, 70%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.18 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.07 – 7.98 (m, 2H), 7.91 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.77 (dd, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H), 3.97 (dd, *J* = 6.2, 4.3 Hz, 2H), 3.87 (dd, *J* = 6.2, 4.0 Hz, 2H), 3.78 (dd, *J* = 6.1, 4.4 Hz, 2H), 3.72 (dd, *J* = 6.1, 4.1 Hz, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 165.8, 154.8, 153.7, 146.6 (q, *J* = 35.3 Hz), 141.9, 139.0, 133.8, 131.1, 127.5, 121.6 (q, *J* = 2.6 Hz), 121.2 (d, *J* = 274.3 Hz), 46.9, 44.9, 44.4, 42.5. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{15}F_3N_5O^+$ $[M + H]^+$ = 338.1223 *m/z*, encontrado $[M + H]^+$ = 338.1215 *m/z*, erro = 2.37 ppm.

(5-hidroxipiridin-2-il)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (16)

Seguindo o Procedimento geral B, em 44 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e monohidrato de ácido 5-hidroxipicolinico (22.9 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de DCM/MeOH (92:8) para a coluna cromatográfica.

16: sólido amarelo, 34.2 mg, 98%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.14 (m, 2H), 8.11 (dd, *J* = 2.5, 1.6 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.16 (dd, *J* = 8.5, 2.8 Hz, 1H), 3.81 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.2, 154.9, 154.8, 144.4, 142.2, 136.9, 133.4, 130.8, 125.8, 123.5, 47.0, 45.0, 44.3, 42.6. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{14}H_{15}N_5O_2Na^+$ $[M + Na]^+$ = 308.1118 *m/z*, enocntrado $[M + Na]^+$ = 308.1116 *m/z*, erro = 0.65 ppm.

(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)(6-(trifluorometil)piridin-3-il)metanona (17)

Seguindo o Procedimento geral B, em 72 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido 6-trifluorometilnicotinico (27.9 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de EtOAc/Hex (9:1) para a coluna cromatográfica.

17: sólido amarelo, 30.6 mg, 74%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.81 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.99 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.80 (dd, *J* = 8.0, 0.7 Hz, 1H), 3.72 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 166.7, 154.6, 149.4 (q, *J* = 35.3 Hz), 148.3, 141.9, 136.8, 134.3, 134.1, 131.3, 121.2 (q, *J* = 274.5 Hz), 120.7 (q, *J* = 2.7 Hz), 44.8. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{15}F_3N_5O^+$ $[M + H]^+$ = 338.1223 *m/z*, enocntrado $[M + H]^+$ = 338.1221 *m/z*, erro = 0.59 ppm.

(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)(piridin-3-il)metanona (18)

Seguindo o Procedimento geral B, em 32 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido nicotínico (18.0 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de DCM/MeOH (9:1) para a coluna cromatográfica.

18: óleo laranja, 28.3 mg, 86%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.69 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 8.16 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.38 (dd, *J* = 7.7, 4.9 Hz, 1H), 3.77 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.1, 154.7, 151.2, 148.1, 141.9, 135.3, 134.0, 131.3, 131.2, 123.7, 44.7. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{14}H_{15}N_5ONa^+$ $[M + Na]^+$ = 292.1169 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 292.1161 *m/z*, erro = 2.74 ppm.

(6-aminopiridin-3-il)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (19)

Seguindo o Procedimento geral B, em 50 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido 6-aminonicotinico (20.2 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de DCM/MeOH (9:1) para a coluna cromatográfica.

19: sólido amarelo, 26.7 mg, 77%; **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.23 (dd, *J* = 2.3, 0.7 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.09 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 1H), 6.52 (dd, *J* = 8.5, 0.8 Hz, 1H), 4.75 (s, 2H), 3.86 – 3.51 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 169.1, 159.5, 154.8, 148.2, 141.9, 138.1, 133.9, 131.2, 121.0, 108.0, 44.8. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{14}H_{17}N_6O^+$ $[M + H]^+$ = 285.1458 *m/z*, encontrado $[M + H]^+$ = 285.1453 *m/z*, erro = 1.75 ppm.

(6-cloropiridin-3-il)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (20)

Seguindo o Procedimento geral B, em 48 h a partir de **3** (200 mg, 1.22 mmol) e ácido 6-cloronicotinico (230.0 mg, 1.46 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de DCM/MeOH (92:8) para a coluna cromatográfica.

20: óleo amarelado, 299.0 mg, 81%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.50 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.78 (dd, *J* = 8.2, 2.4 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J* = 8.2, 0.7 Hz, 1H), 3.77 (d, *J* = 77.2 Hz, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 167.0, 154.6, 153.1, 148.2, 141.9, 138.1, 134.2, 131.2, 130.0, 124.6, 44.7. **HRMS (ESI+):** calculado para $C_{14}H_{15}ClN_5O^+$ $[M + H]^+$ = 304.0960 *m/z*, encontrado $[M + H]^+$ = 304.0957 *m/z*, erro = 0.99 ppm.

(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)(6-(pirrolidin-1-il)piridin-3-il)metanona (21)

20 (30 mg, 0.099 mmol) foi solubilizado em DMF (0.5 M), pirrolidina (8.4 mg, 0.119 mmol, 1.2 eq) e Na_2CO_3 (20.7 mg, 0.198 mmol, 2 eq) foram acrescentados, e a reação foi agitada por 80 h a 100 °C. Água destilada fria (20 mL) foi adicionada, e a fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 15 mL). As fases orgânicas foram juntadas, secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para render o composto almejado.

21: sólido amarelo, 28.1 mg, 84%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.32 (dd, *J* = 2.3, 0.6 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.08 (dd, *J* = 2.5, 1.5 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.37 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.84 – 3.74 (m, 4H), 3.65 (m, 4H), 3.50 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H), 2.11 – 1.94 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 169.9, 157.9, 154.9, 148.6, 141.9, 137.4, 133.8, 131.2, 117.6, 106.0, 46.9, 44.8, 25.6. **HRMS (ESI+):** calculado para $C_{18}H_{23}N_6O^+$ $[M + H]^+$ = 339.1928 *m/z*, encontrado $[M + H]^+$ = 339.1924 *m/z*, erro = 1.18 ppm.

(6-(ciclopentilamino)piridin-3-il)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (22)

20 (30 mg, 0.099 mmol) foi solubilizado em DMF (0.5 M), ciclopentilamina (12.7 mg, 0.149 mmol, 1.5 eq) e Na_2CO_3 (20.7 mg, 0.198 mmol, 2 eq) foram acrescentados, e a reação foi agitada por 80 h a 100 °C. Água destilada fria (20 mL) foi adicionada, e a fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 15 mL). As fases orgânicas foram juntadas, secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica (DCM/MeOH (95:5)) para render o composto almejado.

22: óleo marrom, 14.0 mg, 40%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.38 – 8.26 (m, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.69 – 7.59 (m, 1H), 6.52 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.12 (m, 1H), 3.87 – 3.73 (m, 4H), 3.71 – 3.62 (m, 4H), 3.14 (s, 4H), 2.52 – 2.33 (m, 1H), 2.06 – 1.79 (m, 2H), 1.64 (m, 1H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 169.7, 159.8, 154.9, 148.1, 141.9, 137.6, 133.6, 131.1, 117.8, 105.1, 44.8, 38.1, 33.3, 32.4, 25.2, 23.9. **HRMS (ESI+):** calculado para $C_{19}H_{25}N_6O^+$ $[M + H]^+$ = 353.2084 *m/z*, encontrado $[M + H]^+$ = 353.2082 *m/z*, erro = 0.57 ppm.

(6-metoxipiridin-3-il)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (23)

Seguindo o Procedimento geral B, em 48 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido 6-metoxinicotinico (22.4 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de DCM/MeOH (95:5) para a coluna cromatográfica.

23: óleo incolor, 25.7 mg, 70%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.30 (dd, *J* = 2.4, 0.6 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 8.08 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.70 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.6, 0.7 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.71 (m, 8H). **RMN de ^{13}C**

(101 MHz, $CDCl_3$) δ 168.6, 165.2, 154.8, 146.5, 141.9, 138.4, 134.0, 131.2, 124.2, 111.1, 53.9, 44.7. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{17}N_5O_2Na^+$ $[M + Na]^+$ = 322.1274 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 322.1266 *m/z*, erro = 2.48 ppm.

(6-hidroxipiridin-3-il)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (24)

Seguindo o Procedimento geral C, em 26 h a partir de **23** (13 mg, 0.043 mmol), usando uma mistura de DCM/MeOH (95:5) para a coluna cromatográfica.

24: sólido amarelado, 2.7 mg, 22%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.18 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.57 (dd, *J* = 9.7, 2.1 Hz, 1H), 6.61 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 3.75 (m, 4H), 3.66 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 167.0, 163.8, 154.7, 141.9, 140.6, 136.5, 134.2, 131.3, 120.5, 114.7, 44.7. **HRMS (ESI+):** calculado para $C_{14}H_{15}N_5O_2Na^+$ $[M + Na]^+$ = 308.1118 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 308.1115 *m/z*, erro = 0.97 ppm.

VI) 1. 6. Síntese dos derivados *para*-substituídos 25 – 29

(6-nitrofenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (25)

Seguindo o Procedimento geral B, em 48 h a partir de **3** (60 mg, 0.365 mmol) e ácido 4-nitrobenzoico (73.2 mg, 0.438 mmol, 1.2 eq). O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada fria e secado sob vácuo para render o composto almejado sem necessidade de purificação adicional.

25: sólido amarelo, 79.7 mg, 70%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD)** δ 8.35 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.24 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.05 – 3.46 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CD_3OD)** δ 170.4, 156.4, 150.0, 143.3, 142.8, 133.6, 132.1, 129.4, 124.9, 45.7, 45.1. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{16}N_5O_3^+$ $[M + H]^+$ = 314.1248 *m/z*, encontrado $[M + H]^+$ = 314.1245 *m/z*, erro = 0.95 ppm.

4-(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-carbonil)benzonitrila (26)

Seguindo o Procedimento geral B, em 46 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido 4-cianobenzoico (21.5 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de EtOAc/Hex (95:5) para a coluna cromatográfica.

26: sólido bege, 23.2 mg, 65%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.17 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 3.78 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.6, 154.7, 141.9, 139.8, 134.2, 132.7, 131.3, 128.0, 118.0, 114.1, 44.7.

HRMS (ESI +): calculado para $C_{16}H_{15}N_5ONa^+$ $[M + Na]^+$ = 316.1169 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 316.1161 *m/z*, erro = 2.53 ppm.

(4-(1*H*-tetrazol-1-il)fenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (27)

Seguindo o Procedimento geral B, em 72 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido 4-(1*H*-tetrazol-1-il)benzoico (27.8 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de DCM/MeOH (95:5) para a coluna cromatográfica.

27: sólido branco, 32.5 mg, 79%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 9.04 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.79 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.7, 154.7, 141.9, 137.2, 134.9, 134.2, 131.3, 129.4, 121.5, 44.8. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{17}N_8O^+$ $[M + H]^+$ = 337.1520 *m/z*, encontrado $[M + H]^+$ = 337.1516 *m/z*, erro = 1.19 ppm.

(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)(4-(trifluorometoxi)fenil)metanona (28)

Seguindo o Procedimento geral B, em 48 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido 4-trifluorometoxibenzoico (30.1 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de EtOAc/Hex (9:1) para a coluna cromatográfica.

28: óleo amarelo, 30.2 mg, 70%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.18 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.74 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 169.4, 154.9, 150.4, 142.0, 133.9, 133.9, 131.2, 129.1, 121.1, 120.4 (d, *J* = 258.0 Hz), 44.7. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{15}F_3N_4O_2Na^+$ $[M + Na]^+$ = 375.1039 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 375.1038 *m/z*, erro = 0.27 ppm.

(4-metoxifenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (29)

Seguindo o Procedimento geral B, em 70 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido 4-metoxibenzoico (22.2 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de EtOAc/Hex (9:1) para a coluna cromatográfica.

29: óleo amarelo, 16.3 mg, 45%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.16 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.42 (dd, *J* = 8.8, 4.6 Hz, 2H), 6.93 (dd, *J* = 8.8, 4.6 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.70 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 170.7, 161.2, 154.9, 141.9, 133.7, 131.2, 129.4, 127.5, 114.0, 55.5, 44.8. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{19}N_4O_2^+$ $[M + H]^+$ = 299.1502 *m/z*, encontrado $[M + H]^+$ = 299.1502 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

VI) 1. 7. Síntese dos derivados com anéis aromáticos diversificados 30 – 34

(*E*)-3-(3,4-dihidroxifenil)-1-(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)prop-2-en-1-ona (30)

Seguindo o Procedimento geral B, em 20 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido cafeíco (26.3 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de DCM/MeOH (91:9) para a coluna cromatográfica.

30: sólido amarelado, 19.5 mg, 49%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD)** δ 8.23 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.12 (dd, *J* = 2.7, 1.5 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.99 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.79 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CD_3OD)** δ 168.5, 156.4, 148.9, 146.6, 145.2, 143.3, 133.4, 131.9, 128.4, 122.3, 116.4, 115.4, 114.3, 45.4. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{19}N_4O_3^+$ $[M + H]^+$ = 327.1452 *m/z*, encontrado $[M + H]^+$ = 327.1440 *m/z*, erro = 3.67 ppm.

Tert-butil-(*S*)-(3-(4-hidroxifenil)-1-oxo-1-(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)propan-2-il)carbamato (31)

Seguindo o Procedimento geral B, em 50 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e *N*-Boc-(*S*)-tirosina (24.8 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de EtOAc/Hex (95:5) para a coluna cromatográfica.

31: sólido branco, 31.8 mg, 61%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.06 (dd, *J* = 2.4, 1.5 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.08 (s, 1H), 5.43 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.81 (td, *J* = 8.9, 5.5 Hz, 1H), 3.71 – 3.31 (m, 6H), 3.12 (m, 1H), 3.07 – 2.82 (m, 3H), 1.43 (s, 9H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 170.8, 155.3, 154.6, 142.0, 133.5, 130.8, 128.1, 115.6, 80.1, 51.3, 44.9, 44.0, 41.5, 39.7, 28.5. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{22}H_{29}N_5O_4Na^+$ $[M + Na]^+$ = 450.2112 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 450.2102 *m/z*, erro = 2.22 ppm.

(*S*)-2-amino-3-(4-hidroxifenil)-1-(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)propan- 1-ona (32)

31 (24.6 mg, 0.058 mmol) foi solubilizado em MeOH (1 mL), e a solução foi resfriada a 0 °C. HCl (1.16 mmol, 20 eq, solução 2 M em EtOAc) foi acrescentado a 0 °C, e a reação foi agitada por 30 h a temperatura ambiente. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, e o cloridrato resultante foi solubilizado com uma solução saturada de $NaHCO_3$ (pH ~ 8). A fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 15 mL). As fases orgânicas foram juntadas, secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para render o composto almejado.

32: sólido branco, 19.0 mg, 100%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.06 (m, 2H), 7.87 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 3.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.57 (m, 6H), 3.22 (m, 1H), 3.10 (m, 1H), 2.84 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 173.6, 155.3, 154.6, 142.0, 133.6, 130.9, 130.6, 128.9, 115.8, 52.7, 44.7, 44.2, 44.1, 42.3, 41.6. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{22}N_5O_2^+$ $[M + H]^+$ = 328.1768 *m/z*, encontrado $[M + H]^+$ = 328.1767 *m/z*, erro = 0.30 ppm.

(6-hidroxinaftalen-2-il)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (33)

Seguindo o Procedimento geral B, em 42 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido 6-hidroxi-2-naftóico (27.5 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq). O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada fria e secado sob vácuo para render o composto almejado sem necessidade de purificação adicional.

33: sólido branco, 37.8 mg, 93%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6)** δ 9.94 (s, 1H), 8.34 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 7.86 (m, 2H), 7.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.44 (dd, *J* = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.15 (m, 2H), 3.66 (s, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO-d_6)** δ 169.5, 156.4, 154.4, 141.4, 135.0, 132.7, 131.4, 130.0, 129.6, 126.8, 126.6, 126.0, 124.8, 119.3, 108.6, 43.9. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{19}H_{18}N_4O_2Na^+$ $[M + Na]^+$ = 357.1322 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 357.1319 *m/z*, erro = 0.84 ppm.

(1*H*-imidazol-1-il)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (34)

CDI (37.0 mg, 0.228 mmol, 1.1 eq) foi solubilizado em DCM (1 mL), e uma solução de **3** (34.0 mg, 0.207 mmol) em DCM (1 mL) foi acrescentada gota-a-gota a 0 °C. A reação foi agitada por 12 h a temperatura ambiente, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica (DCM/MeOH (91:9)) para render o composto almejado.

34: óleo amarelado, 37.0 mg, 69%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.17 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.09 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.23 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.12 – 7.11 (m, 1H), 3.77 – 3.73 (m, 4H), 3.72 – 3.68 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 154.5, 151.1, 141.9, 137.0, 134.3, 131.2, 130.1, 117.9, 46.0, 44.4. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{12}H_{15}N_6O^+$ $[M + H]^+$ = 259.1302 *m/z*, encontrado $[M + H]^+$ = 259.1295 *m/z*, erro = 2.70 ppm.

VI) 1. 8. Síntese dos derivados dissubstituídos 35 – 44

(5-cloro-2-metoxifenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (35)

Seguindo o Procedimento geral B, em 65 h a partir de **3** (60 mg, 0.365 mmol) e ácido 2-metoxi-5-clorobenzoico (81.7 mg, 0.438 mmol, 1.2 eq), a 80 °C. O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada fria e secado sob vácuo para render o composto almejado sem necessidade de purificação adicional.

35: sólido amarelo, 90.5 mg, 75%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.16 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.08 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.33 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.92 (d, *J* = 26.2 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.70 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.57 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H), 3.39 (d, *J* = 14.0 Hz, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 166.5, 154.8, 154.0, 141.9, 133.8, 131.3, 130.5, 128.2, 126.9, 126.3, 112.4, 56.1, 46.4, 44.9, 44.5, 41.4. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{17}ClN_4O_2Na^+$ $[M + Na]^+$ = 355.0932 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 355.0918 *m/z*, erro = 3.94 ppm.

(5-cloro-2-hidroxifenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (36)

Seguindo o Procedimento geral C, em 17 h a partir de **35** (10 mg, 0.030 mmol), usando uma mistura de DCM/MeOH (95:5) para a coluna cromatográfica.

36: sólido amarelado, 8.6 mg, 90%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 9.52 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H), 8.11 (dd, *J* = 2.5, 1.5 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.87 (dd, *J* = 6.4, 4.1 Hz, 4H), 3.71 (dd, *J* = 6.4, 4.1 Hz, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 170.0, 157.7, 154.6, 142.0, 134.1, 132.9, 131.2, 127.8, 123.7, 119.9, 118.0, 44.6. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{15}ClN_4O_2Na^+$ $[M + Na]^+$ = 341.0776 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 341.0768 *m/z*, erro = 2.34 ppm.

(4-fluoro-2-metoxifenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (37)

Seguindo o Procedimento geral B, em 92 h a partir de **3** (70 mg, 0.426 mmol) e ácido 2-metoxi-4-fluorobenzoico (86.9 mg, 0.511 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de DCM/MeOH (95:5) para a coluna cromatográfica.

37: sólido amarelo, 81.8 mg, 61%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.16 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 8.08 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.31 – 7.23 (m, 1H), 6.73 (td, *J* = 8.2, 2.3 Hz, 1H), 6.66 (dd, *J* = 10.8, 2.3 Hz, 1H), 3.92 (d, *J* = 25.4 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.70 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.56 (s, 2H), 3.39 (d, *J* = 15.3 Hz, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 167.3, 164.4 (d, *J* = 248.8 Hz), 157.0 (d, *J* = 10.1 Hz), 154.8, 141.9, 133.8, 131.3, 129.6 (d, *J* = 10.4 Hz), 121.5 (d, *J* = 3.5 Hz), 107.9 (d, *J* = 21.8 Hz), 99.6 (d, *J* = 26.0 Hz), 56.0, 46.4, 45.0, 44.6,

41.5. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{17}FN_4O_2Na^+$ $[M + Na]^+$ = 339.1228 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 339.1219 *m/z*, erro = 2.65 ppm.

(4-fluoro-2-hidroxifenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (38)

Seguindo o Procedimento geral C, em 29 h a partir de **37** (15 mg, 0.047 mmol), usando uma mistura de DCM/MeOH (95:5) para a coluna cromatográfica.

38: sólido amarelado, 11.0 mg, 77%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 10.19 (s, 1H), 8.17 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.28 (dd, *J* = 8.7, 6.4 Hz, 1H), 6.73 (dd, *J* = 10.3, 2.5 Hz, 1H), 6.60 (ddd, *J* = 8.6, 8.2, 2.5 Hz, 1H), 3.86 (dd, *J* = 6.4, 4.1 Hz, 4H), 3.70 (dd, *J* = 6.4, 4.1 Hz, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 171.1, 165.4 (d, *J* = 252.3 Hz), 161.9 (d, *J* = 13.4 Hz), 154.7, 141.9, 134.0, 131.1, 130.1 (d, *J* = 10.8 Hz), 112.8 (d, *J* = 3.0 Hz), 106.5 (d, *J* = 22.6 Hz), 105.5 (d, *J* = 24.1 Hz), 44.6. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{16}FN_4O_2^+$ $[M + H]^+$ = 303.1252 *m/z*, encontrado $[M + H]^+$ = 303.1248 *m/z*, erro = 1.32 ppm.

(2,3-dimetoxifenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (39)

Seguindo o Procedimento geral B, em 48 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido 2,3-dimetoxibenzoico (26.6 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de EtOAc/Hex (95:5) para a coluna cromatográfica.

39: óleo amarelado, 32.4 mg, 83%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.13 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 8.09 – 8.03 (m, 1H), 7.88 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.12 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.96 (dd, *J* = 8.2, 1.2 Hz, 1H), 6.85 (dd, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H), 4.07 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.86 (s, 2H), 3.80 (m, 2H), 3.69 – 3.59 (m, 1H), 3.56 (m, 2H), 3.46 (m, 1H), 3.37 – 3.26 (m, 1H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 167.8, 154.9, 152.8, 145.1, 141.9, 133.6, 131.2, 130.9, 125.1, 119.3, 113.3, 61.7, 55.9, 46.5, 45.1, 44.5, 41.4. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{20}N_4O_3Na^+$ $[M + Na]^+$ = 351.1427 *m/z*, encontrado $[M + Na]^+$ = 351.1427 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

(2,3-dihidroxifenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (40)

Seguindo o Procedimento geral C, em 21 h a partir de **39** (15.6 mg, 0.048 mmol), usando uma mistura de DCM/MeOH (92:8) para a coluna cromatográfica.

40: sólido amarelado, 6.0 mg, 42%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.12 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 6.94 (dd, *J* = 5.9, 3.4 Hz, 1H), 6.83 – 6.72 (m, 2H), 3.86 – 3.76 (m, 4H), 3.73 – 3.60 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 170.4, 154.8, 145.8, 144.7, 142.1, 133.3,

130.8, 119.8, 119.1, 119.0, 117.6, 44.6. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{16}N_4O_3Na^+$ [M + Na]$^+$ = 323.1115 *m/z*, encontrado [M + Na]$^+$ = 323.1112 *m/z*, erro = 0.93 ppm.

(3,4-dimetoxifenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (41)

Seguindo o Procedimento geral B, em 52 h a partir de **3** (20 mg, 0.122 mmol) e ácido 3,4-dimetoxibenzoico (26.6 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de DCM/MeOH (92:8) para a coluna cromatográfica.

41: sólido amarelado, 22.2 mg, 57%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.16 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.08 (dd, *J* = 2.6, 1.6 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 7.01 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.77 (s, 4H), 3.65 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 170.7, 154.9, 150.8, 149.3, 141.9, 133.9, 131.3, 127.7, 120.4, 111.2, 110.7, 56.1, 56.1, 44.8. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{20}N_4O_3Na^+$ [M + Na]$^+$ = 351.1427 *m/z*, encontrado [M + Na]$^+$ = 351.1427 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

(3,4-dihidroxifenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (42)

Seguindo o Procedimento geral C, em 53 h a partir de **41** (9.8 mg, 0.030 mmol), usando uma mistura de DCM/MeOH (92:8) para a coluna cromatográfica.

42: sólido amarelado, 4.4 mg, 49%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.15 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 2.5, 1.5 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.82 (s, 2H), 3.70 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 171.2, 154.9, 147.0, 144.4, 142.0, 133.9, 131.2, 126.6, 120.1, 115.4, 115.0, 44.8. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{16}N_4O_3Na^+$ [M + Na]$^+$ = 323.1115 *m/z*, encontrado [M + Na]$^+$ = 323.1108 *m/z*, erro = 2.17 ppm.

(2,4-dimetoxifenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (43)

Seguindo o Procedimento geral B, em 28 h a partir de **3** (40 mg, 0.244 mmol) e ácido 2,4-dimetoxibenzoico (53.4 mg, 0.293 mmol, 1.2 eq), usando uma mistura de DCM/MeOH (93:7) para a coluna cromatográfica.

49: óleo amarelado, 68.1 mg, 85%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.14 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 8.06 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.53 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.68 (m, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.40 (s, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.1, 162.1, 156.8, 154.9, 141.8, 133.6, 131.2, 129.5, 118.1, 105.2, 98.7, 55.7, 55.6, 46.5, 45.0, 44.6, 41.5. **HRMS (ESI+):**

calculado para $C_{17}H_{21}N_4O_3^+$ $[M + H]^+$ = 329.1608 *m/z*, encontrado $[M + H]^+$ = 329.1597 *m/z*, erro = 3.34 ppm.

(2,4-dihidroxifenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (44)

Seguindo o Procedimento geral C, em 66 h a partir de **43** (20 mg, 0.061 mmol), usando uma mistura de DCM/MeOH (92:8) para a coluna cromatográfica.

44: sólido amarelo, 16.7 mg, 91%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 9.78 (s, 1H), 9.61 (s, 1H), 8.33 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.09 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.31 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.26 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H), 3.68 – 3.40 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 167.8, 159.4, 155.1, 154.4, 141.4, 132.6, 131.4, 129.7, 114.2, 106.7, 102.3, 44.0. **HRMS (ESI+):** calculado para $C_{15}H_{17}N_4O_3^+$ $[M + H]^+$ = 301.1295 *m/z*, encontrado $[M + H]^+$ = 301.1286 *m/z*, erro = 2.99 ppm.

VI) 1. 9. Síntese dos derivados com modificações no fragmento arila 53 – 64

2-(piperazin-1-il)pirimidina (45)

Seguindo o Procedimento geral A, em 48 h a 80 °C a partir de 2-cloropirimidina (150 mg, 1.31 mmol) e piperazina (338.3 mg, 3.93 mmol, 3 eq) em PrOH.

45: óleo amarelo, 116.0 mg, 54%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, CDCl$_3$)** δ 8.29 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H), 6.46 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 3.78 (dd, *J* = 5.8, 4.4 Hz, 4H), 2.92 (dd, *J* = 5.8, 4.4 Hz, 4H), 1.80 (s, 1H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl$_3$)** δ 161.9, 157.8, 109.8, 46.1, 45.0.

1-(piridin-2-il)piperazina (46)

Seguindo o Procedimento geral A, em 120 h a 120 °C a partir de 2-cloropiridina (50 mg, 0.440 mmol) e piperazina (113.7 mg, 1.32 mmol, 3 eq) em DMF.

46: óleo amarelo/laranja, 53.5 mg, 74%. **RMN de ^{1}H NMR (400 MHz, CDCl$_3$)** δ 8.18 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 7.57 – 7.40 (m, 1H), 6.70 – 6.50 (m, 2H), 3.55 – 3.47 (m, 4H), 3.04 – 2.95 (m, 4H), 2.63 (m, 1H).

Tert-butil-piperazin-1-carboxilato (47)

Piperazina (2.30 g, 26.8 mmol, 2.5 eq) foi solubilizada em uma mistura de DCM (15 mL) e Et_3N (4.06 g, 40.1 mmol, 3.75 eq), uma solução de $(Boc)_2O$ (2.34 g, 10.7 mmol) em DCM (38.5 mL) foi acrescentada gota-a-gota a 0 °C, e a reação foi agitada por 15 h a temperatura ambiente. Os voláteis foram removidos sob pressão reduzida, e o resíduo foi solubilizado em EtOAc (30

mL). O precipitado branco formado foi removido por filtração, e o filtrato foi lavado com uma solução de NaCl (3 x 10 mL). A fase orgânica foi secada sob Na_2SO_4 anidro, filtrada, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para render o composto almejado.

47: sólido branco, 1.36 g, 68%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 3.43 – 3.33 (m, 4H), 2.85 – 2.75 (m, 4H), 1.70 (s, 1H), 1.46 (s, 9H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 155.0, 79.7, 46.0, 28.5.

1-(3-(trifluorometil)piridin-2-il)piperazina (48)

Seguindo o Procedimento geral A, em 72 h a 120 °C a partir de 2-cloro-3-(trifluorometil)piridina (50 mg, 0.275 mmol) e piperazina (71.1 mg, 0.825 mmol, 3 eq) em DMF.

48: óleo incolor, 40.1 mg, 63%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.44 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.86 (dd, *J* = 7.4, 1.5 Hz, 1H), 6.98 (dd, *J* = 7.4, 4.8 Hz, 1H), 3.31 – 3.23 (m, 4H), 3.05 – 2.98 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 160.1, 151.1, 137.3 (q, *J* = 5.1 Hz), 124.1 (q, *J* = 272.6 Hz), 116.9, 52.2, 46.2.

1-(5-(trifluorometil)piridin-2-il)piperazina (49)

Seguindo o Procedimento geral A, em 84 h a 90 °C a partir de 2-cloro-5-(trifluorometil)piridina (2-0 mg, 1.10 mmol) e piperazina (284.3 mg, 3.30 mmol, 3 eq) em PrOH.

49: sólido amarelo, 219.6 mg, 86%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.39 (s, 1H), 7.62 (dd, *J* = 9.0, 2.2 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.74 – 3.46 (m, 4H), 3.06 – 2.91 (m, 4H), 1.70 (s, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 160.7, 145.8 (q, *J* = 4.4 Hz), 134.5 (q, *J* = 3.2 Hz), 124.7 (q, *J* = 270.3 Hz), 115.2 (q, *J* = 32.9 Hz), 105.6, 46.0.

1-(5-nitropiridin-2-il)piperazina (50)

Seguindo o Procedimento geral A, em 4 h a 90 °C a partir de 2-cloro-5-nitropiridina (50 mg, 0.315 mmol) e piperazina (81.4 mg, 0.945 mmol, 3 eq) em PrOH.

50: sólido amarelo, 66.6 mg, 100%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 9.03 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 8.20 (dd, *J* = 9.5, 2.8 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 3.79 – 3.70 (m, 4H), 3.02 – 2.93 (m, 4H), 1.66 (s, 1H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 160.6, 146.6, 135.1, 133.1, 104.5, 46.2, 46.0.

6-(piperazin-1-il)imidazo[1,2-*b*]piridazina (51)

Seguindo o Procedimento geral A, em 15 h a 80 °C a partir de 6-cloroimidazo[1,2-*b*]piridazina (50 mg, 0.326 mmol) e piperazina (84.2 mg, 0.978 mmol, 3 eq) em PrOH.

51: sólido amarelo, 63.0 mg, 95%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.70 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.53 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 6.79 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 3.47 – 3.45 (m, 4H), 3.02 – 3.00 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 155.4, 136.6, 132.0, 126.0, 116.7, 110.2, 47.6, 45.8.

2-(piperazin-1-il)quinoxalina (52)

Seguindo o Procedimento geral A, em 14 h a 80 °C a partir de 2-cloroquinoxalina (50 mg, 0.304 mmol) e piperazina (78.6 mg, 0.912 mmol, 3 eq) em PrOH.

52: óleo amarelo, 62.7 mg, 96%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.57 (s, 1H), 7.88 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H), 7.68 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H), 7.57 (ddd, *J* = 8.3, 7.0, 1.4 Hz, 1H), 7.39 (ddd, *J* = 8.3, 7.0, 1.4 Hz, 1H), 3.79 – 3.72 (m, 4H), 3.09 – 2.98 (m, 4H), 1.79 (s, 1H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 152.6, 141.8, 137.0, 135.8, 130.2, 128.8, 126.6, 124.8, 46.1, 46.0.

(4-hidroxifenil)(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)metanona (53)

Seguindo o Procedimento geral B, em 41 h a partir de ácido 4-hidroxibenzoico (20.2 mg, 0.146 mmol, 1.2 eq) e **45** (20 mg, 0.122 mmol), usando uma mistura de EtOAc/Hex (95:5) para a coluna cromatográfica.

53: sólido branco, 21.9 mg, 63%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD)** δ 8.34 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.63 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 3.78 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CD_3OD)** δ 173.2, 162.9, 160.8, 159.1, 130.4, 127.1, 116.2, 111.6, 44.9. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{16}N_4O_2Na^+$ $[M+Na]^+$ = 307.1165 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 307.1155 *m/z*, erro = 3.26 ppm.

(4-hidroxifenil)(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)metanona (54)

Seguindo o Procedimento geral B, em 30 h a partir de ácido 4-hidroxibenzoico (25.1 mg, 0.182 mmol, 1.2 eq) e **46** (25 mg, 0.152 mmol), usando uma mistura de EtOAc/Hex (9:1) para a coluna cromatográfica.

54: sólido branco, 15.0 mg, 35%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD)** δ 8.14 – 8.07 (m, 1H), 7.62 – 7.54 (m, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.86 (m, 3H), 6.71 (dd, *J* = 6.7, 5.4 Hz, 1H), 3.74 (s, 4H), 3.57 (s, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CD_3OD)** δ 173.1, 160.8, 160.7, 148.5, 139.2, 130.4,

127.1, 116.2, 115.0, 109.3, 46.6. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{18}N_3O_2^+$ $[M+H]^+$ = 284.1393 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 284.1387 *m/z*, erro = 2.11 ppm.

(4-hidroxifenil)(4-fenilpiperazin-1-il)metanona (55)

Seguindo o Procedimento geral B, em 120 h a partir de ácido 4-hidroxibenzoico (25.6 mg, 0.185 mmol, 1.5 eq) e 1-fenilpiperazina (20 mg, 0.123 mmol), usando uma mistura de DCM/MeOH (95:5) para a coluna cromatográfica.

55: óleo laranja, 5.0 mg, 14%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.38 – 7.28 (m, 4H), 6.92 (m, 3H), 6.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 3.79 (s, 4H), 3.20 (s, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 171.2, 158.4, 151.0, 129.4, 126.6, 120.8, 116.8, 115.6, 49.9. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{19}N_2O_2^+$ $[M+H]^+$ = 283.1441 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 283.1437 *m/z*, erro = 1.41 ppm.

Tert-butil-4-(4-hidroxibenzoil)piperazin-1-carboxilato (56)

Seguindo o Procedimento geral B, em 45 h a partir de ácido 4-hidroxibenzoico (266.6 mg, 1.93 mmol, 1.2 eq) e **47** (300 mg, 1.61 mmol), usando uma mistura de EtOAc/Hex (95:5) para a coluna cromatográfica.

56: sólido branco, 193.5 mg, 39%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.22 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 2H), 6.78 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 2H), 3.43 (m, 8H), 2.82 (s, 1H), 1.42 (s, 9H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 171.5, 159.0, 154.8, 129.2, 125.8, 115.4, 80.6, 48.6, 28.3. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{22}N_2O_4Na^+$ $[M+Na]^+$ = 329.1472 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 329.1459 *m/z*, erro = 3.95 ppm.

(4-hidroxifenil)(4-(3-(trifluorometil)piridin-2-il)piperazin-1-il)metanona (57)

Seguindo o Procedimento geral B, em 23 h a partir de ácido 4-hidroxibenzoico (21.5 mg, 0.156 mmol, 1.2 eq) e **48** (30 mg, 0.130 mmol). O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada fria e secado sob vácuo para render o composto almejado sem necessidade de purificação adicional.

57: sólido branco, 33.2 mg, 73%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.46 (dd, *J* = 4.7, 1.4 Hz, 1H), 7.90 (dd, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.07 (dd, *J* = 7.8, 4.9 Hz, 1H), 6.79 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 3.77 (br. s, 4H), 3.28 (s, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 171.3, 159.8, 158.2, 151.3, 137.4 (q, *J* = 5.0 Hz), 129.3, 126.9, 123.9 (d, *J* = 272.4 Hz), 118.1, 115.6, 51.1. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{16}F_3N_3O_2Na^+$ $[M+Na]^+$ = 374.1087 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 374.1082 *m/z*, erro = 1.34 ppm.

(4-hidroxifenil)(4-(5-(trifluorometil)piridin-2-il)piperazin-1-il)metanona (58)

Seguindo o Procedimento geral B, em 46 h a partir de ácido 4-hidroxibenzoico (21.5 mg, 0.156 mmol, 1.2 eq) e **49** (30 mg, 0.130 mmol), usando uma mistura de DCM/MeOH (95:5) para a coluna cromatográfica.

58: sólido branco, 35.9 mg, 79%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD)** δ 8.36 (dd, *J* = 1.6, 0.8 Hz, 1H), 7.75 (dd, *J* = 9.1, 2.4 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.74 (s, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CD_3OD)** δ 173.2, 161.8, 160.8, 146.4 (q, *J* = 4.3 Hz), 135.8 (q, *J* = 3.1 Hz), 130.4, 127.0, 126.1 (d, *J* = 269.4 Hz), 116.5 (q, *J* = 32.9 Hz), 116.2, 107.6, 45.7. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{17}F_3N_3O_2^+$ $[M+H]^+$ = 352.1267 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 352.1261 *m/z*, erro = 1.70 ppm.

(4-hidroxifenil)(4-(5-nitropiridin-2-il)piperazin-1-il)metanona (59)

Seguindo o Procedimento geral B, em 16 h a partir de ácido 4-hidroxibenzoico (43.8 mg, 0.317 mmol, 1.1 eq) e **50** (60 mg, 0.288 mmol). O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada fria e secado sob vácuo para render o composto almejado sem necessidade de purificação adicional.

59: sólido amarelo, 76.7 mg, 81%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 9.87 (s, 1H), 8.98 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 8.26 (dd, *J* = 9.6, 2.8 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.94 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 3.83 (s, 4H), 3.62 (s, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 169.5, 160.0, 158.8, 145.9, 134.5, 132.9, 129.3, 125.7, 114.9, 105.7, 44.3. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{17}N_4O_4^+$ $[M+H]^+$ = 329.1244 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 329.1236 *m/z*, erro = 2.43 ppm.

(4-hidroxifenil)(4-(imidazo[1,2-*b*]piridazin-6-il)piperazin-1-il)metanona (60)

Seguindo o Procedimento geral B, em 15 h a partir de ácido 4-hidroxibenzoico (22.4 mg, 0.162 mmol, 1 eq) e **51** (20 mg, 0.162 mmol). A isolação do composto almejado não necessitou nenhuma purificação adicional após a extração da fase aquosa.

60: sólido amarelado, 25.4 mg, 48%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.72 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H7), 7.51 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.83 (m, 3H), 3.76 (br. s, 4H), 3.51 (br. s, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 171.3, 159.0, 154.9, 136.4, 131.7, 129.4, 126.04, 126.01, 116.8, 115.5, 110.5, 46.6. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{18}N_5O_2^+$ $[M+H]^+$ = 324.1455 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 324.1464 *m/z*, erro = 2.77 ppm.

(4-hidroxifenil)(4-(5-(trifluorometil)piridin-2-il)piperazin-1-il)metanona (61)

Seguindo o Procedimento geral B, em 24 h a partir de ácido 4-hidroxibenzoico (29.0 mg, 0.210 mmol, 1.5 eq) e **52** (30 mg, 0.140 mmol), usando uma mistura de EtOAc/Hex (95:5) para a coluna cromatográfica.

61: sólido amarelado, 19.7 mg, 42%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.60 (s, 1H), 7.91 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H), 7.71 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H), 7.61 (ddd, *J* = 8.3, 7.0, 1.4 Hz, 1H), 7.44 (ddd, *J* = 8.3, 7.0, 1.4 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 3.84 (br. s, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 171.1, 158.0, 152.2, 141.6, 137.2, 135.7, 130.5, 129.5, 128.8, 127.1, 126.8, 125.5, 115.6, 45.1. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{19}H_{19}N_4O_2^+$ $[M+H]^+$ = 335.1502 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 335.1502 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

(4-hidroxifenil)(piperazin-1-il)metanona (62)

56 (80 mg, 0.261 mmol) foi solubilizado em uma mistura de DCM/MeOH (1:1) (2 mL), e a solução foi resfriada a 0 °C. HCl (2.61 mmol, 10 eq, solução 2 M em EtOAc) foi acrescentado a 0 °C, e a reação foi agitada por 24 h a temperatura ambiente. Os voláteis foram evaporados sob pressão reduzida, e o sólido resultante foi secado sob vácuo para render o composto almejado.

62: sólido bege, 65.5 mg, 100% (cloridrato). **RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD)** δ 7.37 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 3.87 (m, 4H), 3.56 (s, 1H), 3.30 – 3.24 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CD_3OD)** δ 173.1, 161.3, 130.6, 125.8, 116.4, 44.5, 41.7. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{11}H_{15}N_2O_2^+$ $[M+H]^+$ = 207.1128 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 207.1124 *m/z*, erro = 1.93 ppm.

(4-(2-cloropirimidin-4-il)piperazin-1-il)(4-hidroxifenil)metanona (63)

2,4-dicloropirimidina (14.0 mg, 0.094 mmol) foi solubilizada em iPrOH (0.5 mL), **62** (25 mg, 0.103 mmol, 1.1 eq) e Na_2CO_3 (14.9 mg, 0.141 mmol, 1.5 eq) foram acrescentados, e a reação foi agitada por 41 h a temperatura ambiente. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, e água destilada fria (20 mL) foi adicionada. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada fria e secado sob vácuo para render o composto almejado.

63: sólido bege, 23.6 mg, 79%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d_6*)** δ 8.10 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.82 (m, 3H), 3.82 – 3.41 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO-*d_6*)** δ 169.5, 162.4, 159.5, 159.0, 157.5, 129.3, 125.6, 114.9, 102.4, 43.4. **HRMS (ESI +):**

calculado para $C_{15}H_{16}ClN_4O_2^+$ $[M+H]^+$ = 319.0956 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 319.0957 *m/z*, erro = 0.31 ppm.

(4-hidroxifenil)(4-(pirimidin-4-il)piperazin-1-il)metanona (64)

63 (18.8 mg, 0.059 mmol) foi solubilizado em uma mistura de EtOAc/MeOH (1:1) (3 mL), e Pd/C (4 mg, 20% (m/m)) e Et_3N (7.2 mg, 0.071 mmol, 1.2 eq) foram acrescentados. H_2 foi borbulhado no meio reacional, e a reação foi agitada por 90 h a temperatura ambiente sob atmosfera de H_2. A mistura reacional foi filtrada em Celite®, o filtro de Celite® foi lavado com uma mistura de DCM/MeOH (1:1), e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica (DCM/MeOH (92:8)) para render o composto almejado.

64: sólido branco, 7.0 mg, 42%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.52 (s, 1H), 8.15 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.51 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 3.67 (s, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 171.6, 161.4, 159.2, 158.0, 155.3, 129.4, 125.6, 115.4, 103.2, 43.7. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{17}N_4O_2^+$ $[M+H]^+$ = 285.1346 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 285.1336 *m/z*, erro = 3.51 ppm.

VI) 1. 10. Síntese do derivado diamida 67

Tert-butil-4-(5-cloropirazin-2-carbonil)piperazin-1-carboxilato (65)

Seguindo o Procedimento geral B, em 44 h a partir de ácido 5-cloropirazin-2-carboxílico (183.9 mg, 1.16 mmol, 1.2 eq) e **47** (180 mg, 0.966 mmol). O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada fria e secado sob vácuo para render o composto almejado sem necessidade de purificação adicional.

65: sólido branco, 204.8 mg, 45%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.79 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 8.54 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 3.77 (m, 2H), 3.63 (m, 2H), 3.60 – 3.54 (m, 2H), 3.50 (m, 2H), 1.48 (s, 9H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 164.4, 154.6, 150.4, 146.9, 145.7, 142.3, 80.6, 47.2, 42.8, 28.5.

Tert-butil-4-(pirazin-2-carbonil)piperazin-1-carboxilato (66)

65 (50 mg, 0.153 mmol) foi solubilizado em uma mistura de EtOAc/MeOH (1:1) (3 mL), Pd/C (5 mg, 10% (m/m)) e Et_3N (18.6 mg, 0.184 mmol, 1.2 eq) foram acrescentados, e a reação foi agitada sob borbulhamento de H_2 por 1 h a temperatura ambiente sob atmosfera de H_2. A mistura reacional foi filtrada em Celite®, o filtro de Celite® foi lavado com uma mistura de

DCM/MeOH (9:1), e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica (DCM/MeOH (95:5)) para render o composto almejado.

66: sólido amarelo, 38.8 mg, 87%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.97 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.65 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.54 (dd, *J* = 2.5, 1.5 Hz, 1H), 3.91 – 3.71 (m, 2H), 3.67 – 3.60 (m, 2H), 3.60 – 3.53 (m, 2H), 3.53 – 3.46 (m, 2H), 1.48 (s, 9H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 165.4, 154.7, 149.1, 146.0, 145.6, 142.6, 80.5, 47.1, 42.6, 28.5.

(4-(4-metoxibenzoil)piperazin-1-il)(pirazin-2-il)metanona (67)

66 (36.8 mg, 0.126 mmol) foi solubilizado em uma mistura de DCM/MeOH (1:1) (1 mL), e a solução foi resfriada a 0 °C. HCl (1.26 mmol, 10 eq, solução 2 M em EtOAc) foi acrescentado a 0 °C, e a reação foi agitada por 24 h a temperatura ambiente. Os voláteis foram evaporados sob pressão reduzida, e o sólido resultante foi secado sob vácuo para render a amina desprotegida na forma de cloridrato (sólido amarelo, 26.5 mg, 100%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6)** δ 9.59 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 3.89 (s, 2H), 3.74 (s, 2H), 3.21 (s, 2H), 3.13 (s, 2H).).

Depois, seguindo o Procedimento geral B, em 86 h a partir de ácido 4-metoxibenzoico (20.7 mg, 0.136 mmol, 1.2 eq) e da amina desprotegida da etapa anterior (25.9 mg, 0.113 mmol), usando uma mistura de DCM/MeOH (95:5) para a coluna cromatográfica.

67: sólido amarelado, 7.5 mg, 20%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 9.00 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.66 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.61 – 8.50 (m, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.95 – 3.66 (m, 11H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 170.8, 165.4, 161.3, 148.9, 146.2, 145.8, 142.5, 129.4, 127.2, 114.0, 55.5, 47.4, 42.9. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{18}N_4O_3Na^+$ $[M+Na]^+$ = 349.1271 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 349.1259 *m/z*, erro = 3.44 ppm.

VI) 1. 11. Síntese das pirazinas com substituintes carboxílicos 70 – 75

5-cloropirazin-2-carboxilato de propila (68)

Ácido 5-cloropirazin-2-carboxílico (300 mg, 1.89 mmol) foi solubilizado em $SOCl_2$ (6.3 mL) com 3 gotas de DMF anidro, e a solução foi agitada por 2 h a 80 °C. Os voláteis foram evaporados sob pressão reduzida, o resíduo foi solubilizado em PrOH (6.3 mL), e a reação foi agitada por mais 2 h a 50 °C. PrOH foi evaporado sob pressão reduzida, e o resíduo foi dissolvido em água destilada fria (30 mL). A fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 15 mL),

e as fases orgânicas foram juntadas, secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para render o composto almejado.

68: líquido oleoso amarelo, 373.3 mg, 98%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, Acetona-*d*$_6$)** δ 9.03 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.82 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 4.36 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.91 – 1.72 (m, 2H), 1.03 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

5-(piperazin-1-il)pirazin-2-carboxilato de propila (69)

Seguindo o Procedimento geral A, em 96 h a 110 °C a partir de **68** (340 mg, 1.69 mmol) e piperazina (582.3 mg, 6.76 mmol, 4 eq) em DMF.

69: óleo amarelo, 363.2 mg, 86%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, CDCl$_3$)** δ 8.78 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 4.32 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.79 – 3.54 (m, 4H), 3.09 – 2.94 (m, 4H), 1.94 – 1.75 (sextupleto, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.72 (s, 1H), 1.00 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl$_3$)** δ 164.9, 155.2, 145.3, 131.2, 129.6, 66.8, 45.9, 45.5, 22.2, 10.5.

5-(4-(4-hidroxobenzoil)piperazin-1-il)pirazin-2-carboxilato de propila (70)

Seguindo o Procedimento geral B, em 72 h a partir de ácido 4-hidroxibenzoico (238.9 mg, 1.73 mmol, 1.2 eq) e **69** (360 mg, 1.44 mmol), usando uma mistura de DCM/MeOH (98:2) para a coluna cromatográfica.

70: sólido branco, 192.8 mg, 36%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 9.87 (s, 1H), 8.67 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.20 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.80 (s, 4H), 3.63 (s, 4H), 1.79 – 1.63 (sextupleto, *J* = 7.3 Hz, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 169.53, 164.04, 158.88, 154.57, 144.30, 130.52, 130.31, 129.34, 125.75, 114.91, 65.75, 43.65, 21.62, 10.27. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{19}H_{22}N_4O_4Na^+$ $[M+Na]^+$ = 393.1533 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 393.1521 *m/z*, erro = 3.05 ppm.

Ácido 5-(4-(4-hidroxobenzoil)piperazin-1-il)pirazin-2-carboxílico (71)

70 (185.2 mg, 0.500 mmol) foi solubilizado em MeOH/THF (1:1) (4 mL), e NaOH (solução aquosa 2 M) (3.75 mL, 7.5 mmol, 15 eq) foi acrescentado. A reação foi agitada por 4 h a temperatura ambiente, e MeOH e THF foram evaporados sob pressão reduzida. A mistura resultante foi resfriada a 0 °C, e HCl (2 M) foi acrescentado gota-a-gota a 0 °C até pH ~ 2. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada fria e secado sob vácuo para render o composto almejado.

71: sólido amarelado, 165.8 mg, 100%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 12.69 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 8.66 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 3.79 (s, 4H), 3.62 (s, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 169.5, 165.4, 158.8, 154.5, 144.3, 130.9, 130.2, 129.3, 125.7, 114.9, 43.6. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{17}N_4O_4^+$ $[M+H]^+$ = 329.1244 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 329.1238 *m/z*, erro = 1.82 ppm.

(5-(4-(4-hidroxobenzoil)piperazin-1-il)pirazin-2-il)(morfolino)metanona (72)

Seguindo o Procedimento geral B, em 24 h a partir de **71** (20 mg, 0.061 mmol) e morfolina (5.3 mg, 0.061 mmol, 1 eq). A isolação do composto almejado não necessitou nenhuma purificação adicional após a extração da fase aquosa.

72: pasta amarela, 14.1 mg, 58%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, CDCl$_3$)** δ 8.58 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 3.77 (m, 16H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl$_3$)** δ 171.4, 166.1, 158.9, 154.2, 144.7, 136.9, 129.5, 127.3, 126.1, 115.7, 67.1, 44.4. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{20}H_{23}N_5O_4Na^+$ $[M+Na]^+$ = 420.1642 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 420.1630 *m/z*, erro = 2.86 ppm.

***N*-(2-(dimetilamino)etil)-5-(4-(4-hidroxobenzoil)piperazin-1-il)pirazin-2-carboxamida (73)**

Seguindo o Procedimento geral B, em 65 h a partir de **71** (20 mg, 0.061 mmol) e (*N'*,*N'*-dimetil)etan-1,2-diamina (10.8 mg, 0.122 mmol, 2 eq). O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada fria e secado sob vácuo para render o composto almejado sem necessidade de purificação adicional.

73: sólido branco, 3.2 mg, 13%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, CDCl$_3$)** δ 8.92 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 8.47 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.50 (dd, *J* = 8.1, 5.6 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.79 (m, 8H), 2.41 (s, 2H), 2.25 (m, 2H), 1.21 (s, 6H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl$_3$)** δ 171.5, 170.2, 162.9, 159.3, 155.2, 146.3, 129.8, 129.5, 128.8, 125.5, 122.2, 115.5, 45.0, 44.3, 44.2, 26.7.

***N*-ciclopropil-5-(4-(4-hidroxobenzoil)piperazin-1-il)pirazin-2-carboxamida (74)**

Seguindo o Procedimento geral B, em 48 h a partir de **71** (20 mg, 0.061 mmol) e ciclopropilamina (3.5 mg, 0.061 mmol, 1 eq). A isolação do composto almejado não necessitou nenhuma purificação adicional após a extração da fase aquosa.

74: óleo laranja, 12.0 mg, 54%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.86 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.75 (s, 8H), 2.96 – 2.87 (m, 1H), 0.86 (m, 2H), 0.72 – 0.53 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 171.2, 165.6, 158.7, 155.5, 142.5, 133.8, 129.5, 127.7, 126.4, 115.7, 44.5, 22.5, 6.7. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{19}H_{22}N_5O_3^+$ $[M+H]^+$ = 368.1717 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 368.1718 *m/z*, erro = 0.27 ppm.

5-(4-(4-hidroxobenzoil)piperazin-1-il)-*N*,*N*-dimetilpirazin-2-carboxamida (75)

Seguindo o Procedimento geral B, em 21 h a partir de **71** (20 mg, 0.061 mmol) e cloridrato de *N*,*N*-dimetilamina (24.9 mg, 0.305 mmol, 5 eq). A isolação do composto almejado não necessitou nenhuma purificação adicional após a extração da fase aquosa.

75: óleo amarelo, 3.5 mg, 16%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.55 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 3.75 (m, 8H), 3.17 (m, 6H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 171.2, 167.6, 158.4, 154.2, 144.1, 137.9, 129.5, 127.4, 126.6, 115.6, 44.5, 19.3. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{18}H_{22}N_5O_3^+$ $[M+H]^+$ = 356.1717 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 356.1727 *m/z*, erro = 2.80 ppm.

VI) 1. 12. Síntese dos derivados com modificações no *linker* 79 – 81

1-(pirazin-2-il)-1,4-diazepano (76)

Seguindo o Procedimento geral A, em 24 h a 80 °C a partir de 2-cloropirazina (50 mg, 0.437 mmol) e 1,4-diazepano (131.3 mg, 1.31 mmol, 3 eq) em PrOH.

76: sólido amarelado, 54.1 mg, 69%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.12 – 7.91 (m, 2H), 7.75 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.79 – 3.69 (m, 4H), 3.08 – 2.98 (m, 2H), 2.94 – 2.80 (m, 2H), 1.90 (quintuplet, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.82 (s, 1H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 154.1, 142.0, 131.6, 129.9, 50.0, 48.8, 48.4, 46.4, 29.6.

***N*,*N'*-dimetil-*N*-(pirazin-2-il)etan-1,2-diamina (77)**

Seguindo o Procedimento geral A, em 24 h a 80 °C a partir de 2-cloropirazina (50 mg, 0.437 mmol) e (*N*,*N'*-dimetil)etan-1,2-diamina (115.6 mg, 1.31 mmol, 3 eq) em PrOH.

77: óleo amarelo, 24.4 mg, 34%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.11 – 7.94 (m, 2H), 7.77 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 3.68 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.10 (s, 3H), 2.82 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 154.7, 141.8, 131.8, 130.0, 49.7 , 49.5, 36.6, 36.4.

_N_-(pirazin-2-il)etan-1,2-diamina (78)

Seguindo o Procedimento geral A, em 48 h a 80 °C a partir de 2-cloropirazina (50 mg, 0.437 mmol) e etan-1,2-diamina (78.8 mg, 1.31 mmol, 3 eq) em PrOH.

78: óleo amarelo, 54.4 mg, 90%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.89 – 7.86 (m, 2H), 7.66 (m, 1H), 3.48 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.19 (s, 3H), 2.97 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 154.9, 141.5, 133.6, 131.8, 41.1, 40.1.

(4-hidroxifenil)(4-(pirazin-2-il)-1,4-diazepan-1-il)metanona (79)

Seguindo o Procedimento geral B, em 20 h a partir de ácido 4-hidroxibenzoico (18.5 mg, 0.134 mmol, 1.2 eq) e **76** (20 mg, 0.112 mmol), usando uma mistura de EtOAc/MeOH (98:2) para a coluna cromatográfica.

79: sólido branco, 23.6 mg, 72%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6)** δ 9.72 (s, 1H), 8.15 (m, 1H), 8.06 – 7.89 (m, 1H), 7.77 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.01 – 6.60 (m, 4H), 3.88 – 3.38 (m, 8H), 1.79 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO-d_6)** δ 170.5, 158.1, 153.0, 141.6, 131.4, 131.3, 130.2, 128.1, 127.0, 115.0, 114.6, 47.2, 46.0, 22.0. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{19}N_4O_2^+$ $[M+H]^+$ = 299.1502 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 299.1505 *m/z*, erro = 1.00 ppm. (Deslocamentos e multiplicidades inusuais e/ou inesperados observados podem ser explicados por efeitos anisotrópicos e/ou conformacionais provenientes do *linker* 1,4-diazepano).

4-hidroxi-*N*-metil-*N*-(2-(metil(pirazin-2-il)amino)etil)benzamida (80)

Seguindo o Procedimento geral B, em 22 h a partir de ácido 4-hidroxibenzoico (22.7 mg, 0.164 mmol, 1.2 eq) e **77** (22.7 mg, 0.137 mmol), usando uma mistura de EtOAc/MeOH (95:5) para a coluna cromatográfica.

80: óleo branco translúcido, 13.0 mg, 33%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.09 – 7.98 (m, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.02 (s, 2H), 6.81 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.82 (m, 4H), 3.33 – 2.79 (m, 6H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 169.6, 161.5, 158.4, 142.2, 132.4, 131.3, 128.8, 126.8, 115.5, 47.3, 36.7. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{19}N_4O_2^+$ $[M+H]^+$ = 287.1502 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 287.1498 *m/z*, erro = 1.39 ppm. (Deslocamentos e multiplicidades inusuais e/ou inesperados observados podem ser explicados por efeitos anisotrópicos e/ou conformacionais provenientes da flexibilidade do *linker* (*N*,*N'*-dimetil)etan-1,2-diamina).

4-hidroxi-*N*-(2-(pirazin-2-il)amino)etil)benzamida (81)

Seguindo o Procedimento geral B, em 40 h a partir de ácido 4-hidroxibenzoico (24.0 mg, 0.174 mmol, 1.2 eq) e **78** (20 mg, 0.145 mmol), usando uma mistura de EtOAc/MeOH (92:8) para a coluna cromatográfica.

81: óleo branco translúcido, 11.1 mg, 30%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.94 – 7.78 (m, 2H), 7.65 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.63 – 3.40 (m, 4H), 3.00 (br. s, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.8, 160.3, 155.1, 141.3, 133.5, 132.1, 131.6, 128.9, 125.1, 115.3, 41.1, 40.3. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{13}H_{15}N_4O_2^+$ $[M+H]^+$ = 259.1189 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 259.1194 *m/z*, erro = 1.92 ppm.

VI) 1. 13. Síntese dos derivados híbridos 82 – 93

(4-metoxifenil)(4-(5-(trifluorometil)piridina-2-il)piperazin-1-il)metanona (82)

Seguindo o Procedimento geral B, em 16 h a partir de ácido 4-metoxibenzoico (13.1 mg, 0.086 mmol, 1 eq) e **49** (20 mg, 0.086 mmol). O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada fria e secado sob vácuo para render o composto almejado sem necessidade de purificação adicional.

82: sólido branco, 22.3 mg, 71%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.41 (s, 1H), 7.67 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.94 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.72 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 170.8, 161.2, 160.3, 145.9 (q, *J* = 4.3 Hz), 134.8 (q, *J* = 3.2 Hz), 129.4, 127.5, 124.6 (q, *J* = 270.6 Hz), 116.1 (q, *J* = 33.0 Hz), 114.0, 105.9, 55.5, 45.0. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{18}H_{18}F_3N_3O_2Na^+$ $[M+Na]^+$ = 388.1243 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 388.1243 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

(6-aminopiridin-3-il)(4-(5-(trifluorometil)piridina-2-il)piperazin-1-il)metanona (83)

Seguindo o Procedimento geral B, em 12 h a partir de ácido 6-aminonicotínico (11.9 mg, 0.086 mmol, 1 eq) e **49** (20 mg, 0.086 mmol). A isolação do composto almejado não necessitou nenhuma purificação adicional após a extração da fase aquosa.

83: sólido branco, 23.9 mg, 79%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.41 (dd, *J* = 1.5, 0.8 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, 1H), 6.66 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.52 (dd, *J* = 8.5, 0.8 Hz, 1H), 4.72 (s, 2H), 3.81 – 3.67 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 169.1, 160.2, 159.5, 148.3, 145.9 (q, *J* = 4.3 Hz), 138.1, 134.9 (q, *J* = 3.1 Hz), 124.6 (q, *J* = 258.0 Hz), 121.1, 116.1 (q, *J* = 33.4 Hz), 108.0, 105.9, 44.9. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{17}F_3N_5O^+$ $[M+H]^+$ = 352.1379 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 352.1374 *m/z*, erro = 0.56 ppm.

(6-cloropiridin-3-il)(4-(5-(trifluorometil)piridina-2-il)piperazin-1-il)metanona (84)

Seguindo o Procedimento geral B, em 21 h a partir de ácido 6-cloronicotínico (20.5 mg, 0.130 mmol, 1 eq) e **49** (30 mg, 0.130 mmol), usando uma mistura de EtOAc/Hex (7:3) para a coluna cromatográfica.

84: sólido branco, 21.8 mg, 45%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.50 (dd, *J* = 2.4, 0.7 Hz, 1H), 8.42 (dd, *J* = 2.1, 0.8 Hz, 1H), 7.77 (dd, *J* = 8.2, 2.4 Hz, 1H), 7.69 (dd, *J* = 9.0, 2.1 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J* = 8.2, 0.7 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.73 (br. s, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 167.1, 160.1, 153.2, 148.3, 145.9 (q, *J* = 4.3 Hz), 138.1, 135.0 (q, *J* = 3.2 Hz), 130.1, 124.6, 124.5 (q, *J* = 270.6 Hz), 116.5 (q, *J* = 33.0 Hz), 106.0, 44.9. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{15}ClF_3N_4O^+$ $[M+H]^+$ = 371.0881 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 371.0883 *m/z*, erro = 0.53 ppm.

(6-(pirrolidin-1-il)piridin-3-il)(4-(5-(trifluorometil)piridina-2-il)piperazin-1-il)metanona (85)

84 (15 mg, 0.040 mmol) foi solubilizado em DMF (0.5 mL), pirrolidina (4.3 mg, 0.060 mmol, 1.5 eq) e Na_2CO_3 (8.5 mg, 0.080 mmol, 2 eq) foram acrescentados, e a reação foi agitada por 24 h a 90 °C. Pirrolidina (4.3 mg, 0.060 mmol, 1.5 eq) adicional foi acrescentada, e a reação foi agitada por mais 60 h a 90 °C. A mistura foi resfriada a temperatura ambiente, e água destilada fria (20 mL) foi adicionada a 0 °C. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada fria e purificado por coluna cromatográfica (EtOAc/MeOH (92:8)) para render o composto almejado.

85: sólido branco, 13.4 mg, 83%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.41 (dd, *J* = 1.3, 0.7 Hz, 1H), 8.32 (dd, *J* = 2.2, 0.5 Hz, 1H), 7.66 (dd, *J* = 9.0, 2.2 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 8.5, 2.4 Hz, 1H), 6.66 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.38 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.80 – 3.75 (m, 4H), 3.73 – 3.69 (m, 4H), 3.54 – 3.46 (m, 4H), 2.08 – 2.00 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 169.9, 160.3, 157.8, 148.6, 145.9 (q, *J* = 4.2 Hz), 137.5, 134.8 (q, *J* = 3.2 Hz), 124.6 (q, *J* = 263.1 Hz), 117.6, 116.0 (q, *J* = 33.2 Hz), 106.0, 105.8, 47.0, 44.9, 25.6. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{20}H_{23}ClF_3N_5O^+$ $[M+H]^+$ = 406.1849 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 406.1849 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

(6-hidroxinaftalen-2-il)(4-(5-(trifluorometil)piridina-2-il)piperazin-1-il)metanona (86)

Seguindo o Procedimento geral B, em 12 h a partir de ácido 6-hidroxi-2-naftóico (16.2 mg, 0.086 mmol, 1 eq) e **49** (20 mg, 0.086 mmol). A isolação do composto almejado não necessitou nenhuma purificação adicional após a extração da fase aquosa.

86: sólido branco, 33.0 mg, 96%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.42 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.75 – 7.61 (m, 3H), 7.44 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.13 (m, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.73 (s, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 171.2, 160.3, 155.2, 145.9 (q, *J* = 4.2 Hz), 135.5, 134.9 (q, *J* = 3.2 Hz), 130.4, 130.1, 128.0, 127.4, 126.9, 127.9 – 122.8, 124.9, 119.2, 116.2 (q, *J* = 33.2 Hz), 109.7, 105.9, 45.0. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{21}H_{19}F_3N_3O_2^+$ $[M+H]^+$ = 402.1423 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 402.1423 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

(5-cloro-2-metoxifenil)(4-(5-(trifluorometil)piridina-2-il)piperazin-1-il)metanona (87)

Seguindo o Procedimento geral B, em 24 h a partir de ácido 5-cloro-2-metoxibenzoico (16.1 mg, 0.086 mmol, 1 eq) e **49** (20 mg, 0.086 mmol), usando uma mistura de EtOAc/Hex (1:1) para a coluna cromatográfica.

87: sólido branco, 13.7 mg, 40%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.41 (s, 1H), 7.67 (dd, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.66 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.94 – 3.87 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.73 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.65 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.37 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 166.5, 160.2, 154.1, 145.9 (q, *J* = 4.1 Hz), 134.9 (q, *J* = 2.9 Hz), 130.5, 128.3, 127.0, 126.4, 116.1 (d, *J* = 33.2 Hz), 112.5, 105.9, 56.1, 46.4, 45.1, 44.8, 41.5. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{18}H_{17}ClF_3N_3O_2Na^+$ $[M+Na]^+$ = 422.0853 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 422.0865 *m/z*, erro = 2.84 ppm.

(5-cloro-2-hidroxifenil)(4-(5-(trifluorometil)piridina-2-il)piperazin-1-il)metanona (88)

Seguindo o Procedimento geral C, em 48 h a partir de **87** (26.1 mg, 0.065 mmol), usando uma mistura de DCM/MeOH (98:2) para a coluna cromatográfica.

88: sólido branco, 9.7 mg, 39%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 9.51 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.69 (dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 7.25 (m, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.86 (m, 4H), 3.77 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 170.2, 160.1, 158.0, 146.0 (q, *J* = 4.3 Hz), 135.0 (q, *J* = 3.2 Hz), 133.1, 127.8, 124.5 (q, *J* = 267.4 Hz), 123.7, 119.9, 117.7, 116.4 (q, *J* = 39.9 Hz), 105.9, 44.7. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{15}ClF_3N_3O_2Na^+$ $[M+Na]^+$ = 408.0697 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 408.0696 *m/z*, erro = 0.24 ppm.

(3,4-dimetoxifenil)(4-(5-(trifluorometil)piridina-2-il)piperazin-1-il)metanona (89)

Seguindo o Procedimento geral B, em 14 h a partir de ácido 3,4-dimetoxibenzoico (15.7 mg, 0.086 mmol, 1 eq) e **49** (20 mg, 0.086 mmol). O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada fria e secado sob vácuo para render o composto almejado sem necessidade de purificação adicional.

89: sólido branco, 26.9 mg, 79%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.41 (s, 1H), 7.67 (dd, *J* = 9.0, 1.8 Hz, 1H), 7.03 (m, 2H), 6.89 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.66 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.73 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 170.7, 160.3, 150.8, 149.3, 145.9 (q, *J* = 4.3 Hz), 134.8 (q, *J* = 3.2 Hz), 127.7, 124.6 (q, *J* = 270.4 Hz), 120.4, 116.1 (q, *J* = 33.3 Hz), 111.2, 110.7, 105.9, 56.2, 56.1, 45.0. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{19}H_{20}F_3N_3O_3Na^+$ $[M+Na]^+$ = 418.1349 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 418.1349 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

(3,4-dihidroxifenil)(4-(5-(trifluorometil)piridina-2-il)piperazin-1-il)metanona (90)

Seguindo o Procedimento geral C, em 13 h a partir de **89** (20 mg, 0.051 mmol), usando uma mistura de DCM/MeOH (95:5) para a coluna cromatográfica.

90: sólido branco, 6.2 mg, 33%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.42 (s, 1H), 7.68 (dd, *J* = 9.0, 2.2 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.80 (s, 2H), 6.66 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.82 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 171.6, 160.2, 147.0, 145.9 (q, *J* = 4.1 Hz), 144.4, 134.9 (q, *J* = 3.1 Hz), 127.2 (d, *J* = 270.7 Hz), 126.4, 120.0, 116.3 (q, *J* = 34.1 Hz), 115.4, 114.9, 106.0, 44.9. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{16}F_3N_3O_3Na^+$ $[M+Na]^+$ = 390.1036 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 390.1036 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

(2,3-dimetoxifenil)(4-(5-(trifluorometil)piridina-2-il)piperazin-1-il)metanona (91)

Seguindo o Procedimento geral B, em 16 h a partir de ácido 2,3-dimetoxibenzoico (15.7 mg, 0.086 mmol, 1 eq) e **49** (20 mg, 0.086 mmol). A isolação do composto almejado não necessitou nenhuma purificação adicional após a extração da fase aquosa.

91: sólido branco translúcido, 29.6 mg, 87%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.40 (s, 1H), 7.65 (dd, *J* = 9.0, 2.2 Hz, 1H), 7.12 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.06 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.73 – 3.58 (m, 4H), 3.49 – 3.31 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 167.8, 160.3, 152.8, 145.9 (q, *J* = 4.3 Hz), 145.2, 135.0 – 134.6 (m), 131.0, 125.1, 124.6 (q, *J* = 270.8 Hz), 119.4, 115.9 (d, *J* = 33.1 Hz), 113.3, 105.8, 61.7, 56.0, 46.6, 45.3, 44.7, 41.5. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{19}H_{21}F_3N_3O_3^+$ $[M+H]^+$ = 396.1529 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 396.1529 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

(2,3-dihidroxifenil)(4-(5-(trifluorometil)piridina-2-il)piperazin-1-il)metanona (92)

Seguindo o Procedimento geral C, em 15 h a partir de **91** (25.8 mg, 0.065 mmol), usando um gradiente de DCM/MeOH (98:2) até (95:5) para a coluna cromatográfica.

92: sólido bege, 5.8 mg, 24%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 9.92 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.69 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 6.92 – 6.76 (m, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 5.73 (s, 1H), 3.96 – 3.85 (m, 4H), 3.76 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 171.3, 160.1, 146.9, 146.2, 145.9 (q, *J* = 4.6 Hz), 134.9 (q, *J* = 3.3 Hz), 119.3, 119.2, 117.8, 116.6, 105.8, 44.8. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{16}F_3N_3O_3Na^+$ $[M+Na]^+$ = 390.1036 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 390.1046 *m/z*, erro = 2.56 ppm.

(4-(2-(dimetilamino)etóxi)fenil)(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)metanona (93)

6 (20 mg, 0.070 mmol) foi solubilizado em DMF (0.2 mL), cloridrato de 2-cloro-*N*,*N*-dimetiletan-1,2-amina (20.2 mg, 0.140 mmol, 2 eq), KI (23.2 mg, 0.140 mmol, 2 eq) e ^{t}BuONa (26.9 mg, 0.280 mmol, 4 eq) foram acrescentados, e a reação foi agitada por 24 h a 120 °C. Cloridrato de 2-cloro-*N*,*N*-dimetiletan-1,2-amina (20.2 mg, 0.140 mmol, 2 eq), KI (23.2 mg, 0.140 mmol, 2 eq) e ^{t}BuONa (6.7 mg, 0.070 mmol, 1 eq) adicionais foram acrescentados, e a reação foi agitada por mais 96 h a 120 °C. A mistura foi resfriada a temperatura ambiente, e água destilada fria (20 mL) foi adicionada a 0 °C. A fase aquosa foi extraída com DCM (3 x 10 mL), e as fases orgânicas foram juntadas, secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica (gradiente de DCM/MeOH (9:1) até (8:2)) para render o composto almejado.

93: sólido branco, 7.2 mg, 29%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.16 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.08 (dd, *J* = 2.5, 1.5 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.17 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.70 (m, 8H), 2.86 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.43 (s, 6H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 170.7, 160.2, 154.9, 141.9, 133.9, 131.3, 129.4, 127.8, 114.6, 65.9, 58.1, 45.7, 44.8. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{19}H_{26}N_5O_2^+$ $[M+H]^+$ = 356.2081 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 356.2080 *m/z*, erro = 0.22 ppm.

VI) 1. 14. Síntese do *hit* 2 e dos derivados com modificações no lado direito 94 – 108

***N*-(2-(4-feniltiazol-2-il)etil)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (107)**

CDI (111.1 mg, 0.685 mmol, 1.1 eq) foi solubilizado em DCM (2.75 mL), cloridrato de 2-(4-feniltiazol-2-il)etan-1-amina (150 mg, 0.623 mmol) e Et_3N (63.0 mg, 0.623 mmol, 1 eq) foram cuidadosamente acrescentados em pequenas porções a 0 °C, e a reação foi agitada por 16 h a

temperatura ambiente. A solução foi então diluída com DCM (20 mL) e lavada com água destilada e uma solução saturada de NaCl (3 x 10 mL). A fase orgânica foi secada sob Na_2SO_4 anidro, filtrada, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para render o composto almejado.

107: sólido branco, 162.5 mg, 87%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.12 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.81 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 2H), 7.45 – 7.28 (m, 5H), 7.01 (dd, *J* = 1.4, 0.8 Hz, 1H), 3.86 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.31 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 167.7, 155.5, 149.0, 136.0, 134.1, 130.3, 129.0, 128.5, 126.3, 116.0, 112.6, 39.8, 32.1. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{15}N_4OS^+$ $[M+H]^+$ = 299.0961 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 299.0961 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

***N*-(2-(4-feniltiazol-2-il)etil)tiomorfolin-4-carboxamida (2)**

Seguindo o Procedimento geral D, em 24 h a partir de **107** (15 mg, 0.051 mmol) e tiomorfolina (5.8 mg, 0.056 mmol, 1.1 eq).

2: sólido branco, 12.7 mg, 75%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.85 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 2H), 7.45 – 7.32 (m, 4H), 5.88 (s, 1H), 3.75 – 3.65 (m, 6H), 3.28 – 3.20 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.58 – 2.53 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.8, 157.1, 155.4, 134.4, 128.9, 128.4, 126.3, 112.4, 46.7, 40.1, 33.0, 27.0. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{19}N_3OS_2Na^+$ $[M+Na]^+$ = 356.0861 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 356.0861 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

***N*-(2-(4-feniltiazol-2-il)etil)morfolin-4-carboxamida (94)**

Seguindo o Procedimento geral D, em 18 h a partir de **107** (15 mg, 0.051 mmol) e morfolina (6.7 mg, 0.077 mmol, 1.5 eq).

94: óleo translúcido, 14.0 mg, 86%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.85 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 2H), 7.52 – 7.28 (m, 4H), 5.87 (s, 1H), 3.72 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.66 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H), 3.37 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H), 3.24 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.7, 157.9, 155.4, 134.5, 128.9, 128.4, 126.3, 112.4, 66.6, 44.1, 40.0, 33.1. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{19}N_3O_2SNa^+$ $[M+Na]^+$ = 340.1090 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 340.1090 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

4-hidroxi-*N*-(2-(4-feniltiazol-2-il)etil)piperidin-1-carboxamida (95)

Seguindo o Procedimento geral D, em 16 h a partir de **107** (22.7 mg, 0.076 mmol) e piperidin-4-ol (8.5 mg, 0.084 mmol, 1.1 eq).

95: sólido branco, 17.5 mg, 69%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.89 – 7.82 (m, 2H), 7.45 – 7.30 (m, 4H), 5.83 (s, 1H), 3.88 – 3.73 (m, 3H), 3.69 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.23 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.06 (ddd, *J* = 13.2, 9.5, 3.3 Hz, 2H), 1.89 – 1.81 (m, 2H), 1.68 (s, 1H), 1.53 – 1.42 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.8, 157.6, 155.3, 134.5, 128.9, 128.3, 126.3, 112.4, 67.7, 41.5, 40.1, 34.1, 33.2. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{21}N_3O_2SNa^+$ $[M+Na]^+$ = 354.1246 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 354.1246 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

***N*-(2-(4-feniltiazol-2-il)etil)pirrolidin-1-carboxamida (96)**

Seguindo o Procedimento geral D, em 18 h a partir de **107** (15 mg, 0.051 mmol) e pirrolidina (6.0 mg, 0.081 mmol, 1.6 eq).

96: sólido branco, 13.0 mg, 85%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.91 – 7.84 (m, 2H), 7.50 – 7.29 (m, 4H), 5.27 (s, 1H), 3.73 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.34 (t, *J* = 6.6 Hz, 4H), 3.25 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.92 – 1.83 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.8, 156.9, 155.3, 134.6, 128.9, 128.2, 126.3, 112.3, 45.6, 39.8, 33.8, 25.7. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{19}N_3OSNa^+$ $[M+Na]^+$ = 324.1141 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 324.1141 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

4-metil-*N*-(2-(4-feniltiazol-2-il)etil)piperazin-1-carboxamida (97)

Seguindo o Procedimento geral D, em 16 h a partir de **107** (15 mg, 0.051 mmol) e *N*-metilpiperazina (5.6 mg, 0.056 mmol, 1.1 eq).

97: sólido branco, 13.7 mg, 81%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.86 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 2H), 7.48 – 7.29 (m, 4H), 5.82 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 3.70 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.41 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H), 3.24 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.37 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H), 2.29 (s, 3H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.8, 157.7, 155.3, 134.5, 128.9, 128.3, 126.3, 112.4, 54.8, 46.2, 43.8, 40.0, 33.2. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{23}N_4OS^+$ $[M+H]^+$ = 331.1587 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 331.1587 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

4-fenil-*N*-(2-(4-feniltiazol-2-il)etil)piperazin-1-carboxamida (98)

Seguindo o Procedimento geral D, em 16 h a partir de **107** (15 mg, 0.051 mmol) e *N*-fenilpiperazina (9.1 mg, 0.056 mmol, 1.1 eq).

98: sólido branco, 12.3 mg, 61%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.91 – 7.85 (m, 2H), 7.49 – 7.33 (m, 4H), 7.32 – 7.23 (m, 2H), 6.90 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 5.90 (s, 1H), 3.74 (q, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.59 – 3.52 (m, 4H), 3.26 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.18 – 3.11 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz,**

$CDCl_3$) δ 168.8, 157.7, 155.4, 151.2, 134.5, 129.3, 128.9, 128.4, 126.3, 120.4, 116.6, 112.4, 49.3, 43.8, 40.0, 33.1. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{22}H_{24}N_4OSNa^+$ $[M+Na]^+$ = 415.1563 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 415.1563 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

***N*-(2-(4-feniltiazol-2-il)etil)-1,4-diazepan-1-carboxamida (99)**

Seguindo o Procedimento geral D, em 16 h a partir de **107** (15 mg, 0.051 mmol) e 1,4-diazepano (15.3 mg, 0.153 mmol, 3 eq).

99: óleo branco, 11.7 mg, 69%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.89 – 7.81 (m, 2H), 7.46 – 7.30 (m, 4H), 5.63 (s, 1H), 3.72 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.50 – 3.47 (m, 4H), 3.25 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.94 – 2.88 (m, 2H), 2.86 – 2.81 (m, 2H), 1.82 – 1.73 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.9, 157.7, 155.4, 134.5, 128.9, 128.3, 126.3, 112.4, 49.8, 49.3, 48.4, 45.6 40.0, 33.4, 30.6. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{23}N_4OS^+$ $[M+H]^+$ = 331.1587 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 331.1589 *m/z*, erro = 0.60 ppm.

1-metil-1-(2-(metilamino)etil)-3-(2-(4-feniltiazol-2-il)etil)ureia (100)

Seguindo o Procedimento geral D, em 16 h a partir de **107** (15 mg, 0.051 mmol) e *N*,*N'*-dimetiletan-1,2-diamina (13.5 mg, 0.153 mmol, 3 eq).

100: óleo branco, 12.6 mg, 78%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.90 – 7.85 (m, 2H), 7.44 – 7.31 (m,4H), 6.31 (s, 1H), 3.69 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.33 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.25 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.90 (s, 3H), 2.70 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.9, 159.2, 155.3, 134.6, 128.9, 128.2, 126.4, 112.4, 50.6, 49.5, 40.2, 36.4, 35.0, 33.8. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{23}N_4OS^+$ $[M+H]^+$ = 319.1587 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 319.1584 *m/z*, erro = 0.94 ppm.

1,1-dimetil-3-(2-(4-feniltiazol-2-il)etil)ureia (101)

Seguindo o Procedimento geral D, em 15 h a partir de **107** (15 mg, 0.051 mmol) e cloreto de *N*,*N*-dimetilamina (8.3 mg, 0.102 mmol, 2 eq).

101: sólido branco, 11.1 mg, 79%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.87 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 2H), 7.47 – 7.30 (m, 4H), 5.53 (s, 1H), 3.71 (q, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.24 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.91 (s, 6H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.9, 158.6, 155.3, 134.6, 128.9, 128.2, 126.3, 112.4, 40.1, 36.2, 33.6. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{14}H_{17}N_3OSNa^+$ $[M+Na]^+$ = 298.0984 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 298.0984 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

1-ciclopropil-3-(2-(4-feniltiazol-2-il)etil)ureia (102)

Seguindo o Procedimento geral D, em 24 h a partir de **107** (15 mg, 0.051 mmol) e ciclopropilamina (5.8 mg, 0.102 mmol, 2 eq).

102: sólido branco, 11.8 mg, 81%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.96 – 7.82 (m, 2H), 7.50 – 7.27 (m, 4H), 5.88 (s, 1H), 4.67 (s, 1H), 3.77 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.27 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.47 – 2.24 (m, 1H), 0.67 – 0.56 (m, 2H), 0.53 – 0.41 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.5, 159.1, 155.4, 134.5, 128.8, 128.3, 126.4, 112.5, 39.3, 33.7, 22.5, 7.6. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{15}H_{17}N_3OSNa^+$ $[M+Na]^+$ = 310.0984 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 310.0984 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

1-ciclopentil-3-(2-(4-feniltiazol-2-il)etil)ureia (103)

Seguindo o Procedimento geral D, em 16 h a partir de **107** (15 mg, 0.051 mmol) e ciclopentilamina (6.6 mg, 0.077 mmol, 1.5 eq).

103: sólido branco, 11.0 mg, 68%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.94 – 7.81 (m, 2H), 7.47 – 7.27 (m, 4H), 5.20 (s, 1H), 4.31 (s, 1H), 3.89 (sextuplet, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.71 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.23 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.92 (sextuplet, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.64 – 1.47 (m, 4H), 1.33 (sextuplet, *J* = 6.3 Hz, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.6, 157.9, 155.4, 134.6, 128.9, 128.3, 126.4, 112.5, 52.5, 39.6, 33.8, 33.7, 23.7. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{21}N_3OSNa^+$ $[M+Na]^+$ = 338.1297 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 338.1297 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

1-(2-(4-feniltiazol-2-il)etil)-3-(tetrahidro-2*H*-piran-4-il)ureia (104)

Seguindo o Procedimento geral D, em 24 h a partir de **107** (15 mg, 0.051 mmol) e tetrahidro-2*H*-piran-4-amina (13.0 mg, 0.128 mmol, 2.5 eq).

104: sólido amarelo, 10.0 mg, 59%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.87 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 2H), 7.50 – 7.29 (m, 4H), 5.08 (s, 1H), 4.21 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.97 – 3.81 (m, 2H), 3.71 (q, *J* = 6.0 Hz, 3H), 3.41 (td, *J* = 11.8, 2.2 Hz, 2H), 3.23 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.87 (dd, *J* = 12.6, 2.0 Hz, 2H), 1.38 (ddd, *J* = 24.0, 11.3, 4.4 Hz, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.5, 157.2, 155.4, 134.5, 128.9, 128.4, 126.5, 112.6, 66.9, 46.8, 39.6, 34.0, 33.8. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{17}H_{21}N_3O_2SNa^+$ $[M+Na]^+$ = 354.1246 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 354.1246 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

1-ciclohexil-3-(2-(4-feniltiazol-2-il)etil)ureia (105)

Seguindo o Procedimento geral D, em 16 h a partir de **107** (15 mg, 0.051 mmol) e ciclohexilamina (7.6 mg, 0.077 mmol, 1.5 eq).

105: sólido branco, 11.2 mg, 67%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.87 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.38 (m, 4H), 5.10 (s, 1H), 4.25 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.69 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.49 – 3.36 (m, 1H), 3.23 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.90 (m, 2H), 1.70 – 1.61 (m, 2H), 1.60 – 1.51 (m, 1H), 1.35 – 1.23 (m, 2H), 1.15 – 1.00 (m, 3H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.6, 157.4, 155.4, 134.6, 128.9, 128.3, 126.5, 112.5, 49.5, 39.6, 34.0, 33.9, 25.7, 25.0. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{18}H_{24}N_3OS^+$ $[M+H]^+$ = 330.1634 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 330.1643 *m/z*, erro = 2.72 ppm.

1-fenil-3-(2-(4-feniltiazol-2-il)etil)ureia (106)

Seguindo o Procedimento geral D, em 120 h a partir de **107** (15 mg, 0.051 mmol) e anilina (42.7 mg, 0.459 mmol, 9 eq). O resíduo após evaporação da fase orgânica necessitou ser purificado por coluna cromatográfica (DCM/MeOH (95:5)) para render o composto almejado.

106: sólido amarelado, 9.0 mg, 55%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.80 – 7.74 (m, 2H), 7.42 – 7.31 (m, 4H), 7.22 (d, *J* = 4.3 Hz, 4H), 7.04 (dt, *J* = 8.5, 4.3 Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.65 (s, 1H), 3.78 (q, *J* = 5.9 Hz, 1H), 3.27 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.4, 155.7, 155.4, 138.3, 134.4, 129.5, 128.9, 128.2, 126.5, 124.3, 121.8, 112.5, 39.5, 33.6. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{18}H_{17}N_3OSNa^+$ $[M+Na]^+$ = 346.0984 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 346.0978 *m/z*, erro = 1.73 ppm.

***N*-(2-(4-feniltiazol-2-il)etil)ciclopentancarboxamida (108)**

Ácido ciclopentanóico (7.1 mg, 0.062 mmol, 1 eq), EDC (11.9 mg, 0.062 mmol, 1 eq) e HOBt (0.8 mg, 0.006 mmol, 0.1 eq) foram solubilizados em DMF (0.310 mL), cloridrato de 2-(4-feniltiazol-2-il)etan-1-amina (15 mg, 0.062 mmol) e Et_3N (6.3 mg, 0.062 mmol, 1 eq) foram acrescentados, e a reação foi agitada por 24 h a temperatura ambiente. Água destilada fria (20 mL) foi adicionada a 0 °C, e o precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada fria e secado sob vácuo para render o composto almejado.

108: sólido amarelado, 13.2 mg, 71%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.91 – 7.85 (m, 2H), 7.47 – 7.30 (m, 4H), 6.39 (s, 1H), 3.75 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.27 – 3.20 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.58 – 2.47 (m, 1H), 1.90 – 1.67 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 176.4, 168.2, 155.4, 134.5, 128.9, 128.3, 126.4, 112.4, 46.1, 38.6, 33.0, 30.5, 26.0. **HRMS (ESI +):** calculado para

$C_{17}H_{20}N_2OSNa^+$ $[M+Na]^+$ = 323.1188 *m/z*, encontrado $[M+Na]^+$ = 323.1188 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

VI) 1. 15. Síntese dos derivados com modificações no *linker* e no lado esquerdo 117 – 120

2-bromo-1-feniletan-1-ona (109)

Acetofenona (5 g, 41.6 mmol) foi solubilizada em DCM (25 mL), *N*-bromosuccinimida (8.2 g, 45.8 mmol, 1.1 eq) e ácido *para*-toluenesulfônico (716.3 mg, 4.16 mmol, 0.1 eq) foram acrescentados, e a reação foi agitada por 24 h a temperatura ambiente. A solução foi então diluída com DCM (20 mL) e lavada com água destilada, solução saturada de NaCl e solução saturada de $KHCO_3$ (3 x 20 mL). A fase orgânica foi secada sob Na_2SO_4 anidro, filtrada, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para render o composto almejado.

109: cristais brancos/amarelos deliquescentes, 8.3 g, 100%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.03 – 7.95 (m, 2H), 7.64 – 7.58 (m, 1H), 7.54 – 7.46 (m, 2H), 4.46 (s, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 191.4, 134.1, 134.0, 129.0, 129.0, 30.9.

4-feniltiazol-2-amina (110)

109 (8.3 g, 41.6 mmol) foi solubilizado em EtOH (35 mL), tioureia (3.9 g, 50.6 mmol, 1.2 eq) foi acrescentada, e a reação foi agitada por 15 h a 70 °C. A mistura reacional foi resfriada a temperatura ambiente, água destilada fria (70 mL) foi adicionada a 0 °C, e o pH foi ajustado até ~ 8 com uma solução saturada de $KHCO_3$. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada fria e secado sob vácuo para render o composto almejado.

110: sólido amarelo, 6.8 g, 93%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.80 – 7.73 (m, 2H), 7.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.29 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.72 (s, 1H), 5.18 (br. s, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 167.3, 151.2, 134.6, 128.7, 127.9, 126.1, 102.9.

(tert-butoxicarbonil)glicina (111)

Glicina (300 mg, 4.00 mmol) foi solubilizada em uma mistura de 1,4-dioxano/H_2O (1:1) (8.8 mL) com NaOH (175.6 mg, 4.4 mmol, 1.1 eq), e a solução foi resfriada a 0 °C. $(Boc)_2O$ (960.3 mg, 4.4 mmol, 1.1 eq) foi acrescentado gota-a-gota a 0 °C, e a reação foi agitada por 24 h a temperatura ambiente. 1,4-dioxano foi evaporado sob pressão reduzida, e HCl (2 M) foi adicionado gota-a-gota a 0 °C até pH ~ 2. A fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 15 mL),

e as fases orgânicas foram juntadas, secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para render o composto almejado.

111: sólido branco translúcido, 619.5 mg, 88%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 7.01 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 3.57 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H).

Tert-butil-(2-oxo-2-((4-feniltiazol-2-il)amino)etil)carbamato (112)

111 (99.5 mg, 0.568 mmol, 2 eq), HBTU (215.4 mg, 0.568 mmol, 2 eq) e Et_3N (57.5 mg, 0.568 mmol, 2 eq) foram solubilizados em DMF (1 mL) e agitados por 15 minutos. **110** (50 mg, 0.284 mmol) foi acrescentado, e a reação foi agitada por 24 h a temperatura ambiente. **111** (49.8 mg, 0.284 mmol, 1 eq), HBTU (107.7 mg, 0.284 mmol, 1 eq) e Et_3N (28.7 mg, 0.284 mmol, 1 eq) adicionais foram acrescentados, e a reação foi agitada por mais 24 h a temperatura ambiente. Água destilada fria (20 mL) foi adicionada a 0 °C, e o precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada fria e purificado por coluna cromatográfica (EtOAc/Hex (4:6)) para render o composto almejado.

112: sólido amarelado, 61.8 mg, 65%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 9.78 (s, 1H), 7.81 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 2H), 7.44 – 7.38 (m, 2H), 7.35 – 7.30 (m, 1H), 7.15 (s, 1H), 5.15 (s, 1H), 4.04 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H), 1.49 (s, 9H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 167.7, 157.2, 150.3, 134.4, 128.9, 128.2, 126.2, 108.1, 44.8, 28.4.

Tert-butil-(2-(benzo[*d*]tiazol-2-ilamino)-2-oxoetil)carbamato (113)

111 (116.7 mg, 0.666 mmol, 1 eq), HBTU (252.6 mg, 0.666 mmol, 1 eq) e Et_3N (67.4 mg, 0.666 mmol, 1 eq) foram solubilizados em DMF (1 mL) e agitados por 15 minutos. Benzo[*d*]tiazol-2-amina (100 mg, 0.666 mmol) foi acrescentado, e a reação foi agitada por 16 h a temperatura ambiente. **111** (11.7 mg, 0.066 mmol, 0.1 eq), HBTU (25.3 mg, 0.066 mmol, 0.1 eq) e Et_3N (6.7 mg, 0.066 mmol, 0.1 eq) adicionais foram acrescentados, e a reação foi agitada por mais 24 h a temperatura ambiente. Água destilada fria (25 mL) foi adicionada a 0 °C, e o precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada fria e purificado por coluna cromatográfica (EtOAc/Hex (1:1)) para render o composto almejado.

113: sólido branco, 174.4 mg, 85%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 10.22 (s, 1H), 7.80 (dd, *J* = 8.0, 7.6 Hz, 2H), 7.46 – 7.40 (m, 1H), 7.35 – 7.28 (m, 1H), 5.28 (s, 1H), 4.11 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.48 (s, 9H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.5, 157.7, 148.3, 132.3, 126.4, 124.3, 121.6, 121.1, 81.4, 44.8, 28.4.

2-amino-*N*-(4-feniltiazol-2-il)acetamida (114)

112 (61.8 mg, 0.185 mmol) foi solubilizado em DCM (0.620 mL), ácido trifluoroacético (0.620 mL) foi acrescentado, e a reação foi agitada por 16h a temperatura ambiente. Os voláteis foram evaporados sob pressão reduzida, e o sal de TFA foi suspendido em EtOAc (15 mL) e lavado com NaOH (2 M) (3 x 5 mL). A fase aquosa foi ajustada até pH ~ 10 com HCl (4 M) e extraída com EtOAc (2 x 10 mL). As fases orgânicas foram juntadas, secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para render o composto almejado.

114: sólido amarelado, 46.2 mg, 100%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.87 – 7.81 (m, 2H), 7.45 – 7.37 (m, 2H), 7.34 – 7.29 (m, 1H), 7.15 (s, 1H), 3.62 (s, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 171.0, 157.3, 150.2, 134.6, 128.8, 128.1, 126.2, 107.7, 44.5.

2-amino-*N*-(benzo[*d*]tiazol-2-il)acetamida (115)

113 (174 mg, 0.566 mmol) foi solubilizado em DCM (1.9 mL), ácido trifluoroacético (1.9 mL) foi acrescentado, e a reação foi agitada por 16h a temperatura ambiente. Os voláteis foram evaporados sob pressão reduzida, e o sal de TFA foi suspendido em EtOAc (25 mL) e lavado com NaOH (2 M) (3 x 10 mL). A fase aquosa foi ajustada até pH ~ 10 com HCl (4 M) e extraída com EtOAc (3 x 10 mL). As fases orgânicas foram juntadas, secadas sob Na_2SO_4 anidro, filtradas, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para render o composto almejado.

115: sólido amarelado, 114.1 mg, 98%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 10.73 (br. s, 1H), 7.81 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.45 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.32 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 3.64 (s, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 171.5, 157.4, 148.8, 132.4, 126.3, 124.1, 121.5, 121.2, 44.6.

(1*H*-imidazol-1-il)(tiomorfolino)metanona (116)

CDI (259.4 mg, 1.60 mmol, 1.1 eq) foi solubilizado em DCM (5.8 mL), tiomorfolina (150 mg, 1.45 mmol) e Et_3N (146.7 mg, 1.45 mmol, 1 eq) foram cuidadosamente acrescentados gota-a-gota a 0 °C, e a reação foi agitada por 14 h a temperatura ambiente. A solução foi então diluída com DCM (20 mL) e lavada com água destilada e uma solução saturada de NaCl (3 x 10 mL). A fase orgânica foi secada sob Na_2SO_4 anidro, filtrada, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para render o composto almejado.

116: sólido amarelado, 213.6 mg, 75%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.85 (s, 1H), 7.17 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 3.89 – 3.81 (m, 4H), 2.75 – 2.67 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 151.3, 136.9, 130.1, 117.9, 49.1, 27.5.

***N*-(2-oxo-2-((4-feniltiazol-2-il)amino)etil)tiomorfolin-4-carboxamida (117)**

Seguindo o Procedimento geral E, em 20 h a partir de **114** (20 mg, 0.086 mmol) e tiomorfolina (13.3 mg, 0.129 mmol, 1.5 eq), usando uma mistura de DCM/MeOH (95:5) para a coluna cromatográfica.

117: sólido amarelado, 12.9 mg, 41%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 10.87 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.41 (m, 3H), 7.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 4.07 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 3.75 (s, 2H), 3.66 (s, 2H), 2.66 (s, 2H), 2.57 (s, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 166.9, 159.8, 153.8, 148.5, 134.4, 128.6, 127.5, 125.5, 106.5, 46.8, 44.0, 41.4, 26.7, 26.4. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{16}H_{19}N_4O_2S_2^+$ $[M+H]^+$ = 363.0943 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 363.0943 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

***N*-(2-(benzo[*d*]tiazol-2-ilamino)-2-oxoetil)tiomorfolin-4-carboxamida (118)**

Seguindo o Procedimento geral E, em 20 h a partir de **115** (30 mg, 0.145 mmol) e tiomorfolina (37.5 mg, 0.363 mmol, 2.5 eq), usando uma mistura de DCM/MeOH (95:5) para a coluna cromatográfica.

118: sólido branco, 24.6 mg, 50%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 10.94 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.36 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.21 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 4.09 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.75 (s, 2H), 3.66 (s, 2H), 2.67 (s, 2H), 2.57 (s, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 166.7, 159.6, 153.6, 149.1, 131.4, 125.7, 122.6, 121.3, 119.7, 46.8, 44.0, 41.5, 26.7, 26.4. **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{14}H_{17}N_4O_2S_2^+$ $[M+H]^+$ = 337.0787 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 337.0789 *m/z*, erro = 0.60 ppm.

***N*-(benzo[*d*]tiazol-2-il)tiomorfolin-4-carboxamida (119)**

Seguindo o Procedimento geral E, em 70 h a partir de benzo[*d*]tiazol-2-amina (30 mg, 0.200 mmol) e tiomorfolina (30.9 mg, 0.300 mmol, 1.5 eq), usando uma mistura de DCM/MeOH (95:5) para a coluna cromatográfica. CDI (38.9 mg, 0.240 mmol, 1.2 eq) e tiomorfolina (30.9 mg, 0.300 mmol, 1.5 eq) adicionais foram acrescentados após 24 h de reação.

119: sólido branco, 26.1 mg, 47%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 7.78 (s, 1H), 7.48 (br. s, 1H), 7.35 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.19 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 3.84 (s, 4H), 2.64 – 2.55 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO-*d*$_6$)** δ 126.0, 122.6, 121.7, 46.1, 26.6 (nota: carbonos quaternários não apareceram, apesar de realizar a aquisição com 32 000 scans). **HRMS (ESI +):** calculado para $C_{12}H_{14}N_3OS_2^+$ $[M+H]^+$ = 280.0572 *m/z*, encontrado $[M+H]^+$ = 280.0572 *m/z*, erro = 0.00 ppm.

***N*-(4-feniltiazol-2-il)tiomorfolin-4-carboxamida (120)**

116 (140.1 mg, 0.710 mmol, 2.5 eq) foi solubilizado em DMF (1 mL), **110** (50 mg, 0.284 mmol) e NaH (60%) (22.7 mg, 0.568 mmol, 2 eq) foram acrescentados a 0 °C, e a reação foi agitada por 24 h a 70 °C. **116** (140.1 mg, 0.710 mmol, 2.5 eq) e NaH (60%) (34.1 mg, 0.852 mmol, 3 eq) adicionais foram acrescentados, e a reação foi agitada por mais 48 h a 70 °C. A mistura reacional foi resfriada a temperatura ambiente, e água destilada fria (20 mL) foi adicionada a 0 °C. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada fria e purificado por coluna cromatográfica (EtOAc/Hex (6:4)) para render o composto almejado.

120: sólido amarelo, 13.2 mg, 15%. **RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 8.77 (br. s, 1H), 7.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.32 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 3.80 – 3.70 (m, 4H), 2.64 – 2.54 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 160.9, 153.0, 149.5, 134.5, 128.9, 128.1, 126.0, 107.4, 47.0, 27.2.

VI) 1. 16. Métodos analíticos de espectrometria (HRMS) e cromatografia liquida (HPLC)

Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)

Análises de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) foram realizadas em um espectrômetro Q-TOF geometry Impect II (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI). A voltagem do capilar foi operada em modo íon positivo, com as regulagens seguintes: 4500 V com potencial de final de placa de 500 V; pressão do nebulizador 0.4 bar; fluxo de gás seco 4 L/min; temperatura seca 180 ºC. A frequência de aquisição do espectro foi de 1.00 Hz, monitorando uma faixa de massas de 50 a 700 *m/z*. Uma *syringe pump* (KDS Legato 100, KD Scientific, Hollistom, MA, USA) foi usada com um fluxo de 10 µL/min para infusar a solução de calibração de formato de sódio (10 mM; iPrOH/água, 1:1, v:v).

Todas as análises de HRMS foram realizadas por Dr. Felipe de Oliveira Souza, Me. Paula Derksen Macruz e Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau (LaBioMass – UEM).

Análise de pureza por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Análises por HPLC foram realizadas em um aparelho de cromatografia líquida Shimadzu Prominence equipado com um detetor UV-Vis acoplado a um espectrômetro de massas de armadilha iônica (Bruker Amazon SL, Bruker Daltonics Corporation, Alemanha). A amostra foi solubilizada em MeOH de grau LC-MS (500 µL), e 10 µL da solução foram injetados no aparelho de cromatografia. A análise foi realizada com uma coluna Hichrom C18 (250 x 4.6

mm, 5 µm) usando água (A) e MeOH + 0.1% ácido fórmico (B) como fase móvel, eluindo com eluição isocrática de A/B (70:30) (v/v). A temperatura foi estabilizada em 35 °C durante toda a análise, com um fluxo de 0.7 mL/min, e a detecção foi feita com comprimento de onde de 254 nm. Após detecção UV-Vis, os analitos foram analisados por espectrometria de massas, operando em modo positivo. A análise dos dados foi realizada usando o *software* Bruker DataAnalysis 5.2 (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha).

Todas as análises de HPLC foram realizadas por Me. Paula Derksen Macruz e Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau (LaBioMass – UEM).

VI) 2. Ensaios biológicos

VI) 2. 1. Parasitologia

VI) 2. 1. 1. Ensaio *in vitro* de atividade contra amastigotas de *Leishmania*

Células da linhagem humana monocítica THP-1 foram cultivadas em médio completo Rowell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (suplementado com sérum fetal bovino 10 %, penicilina 100 U/mL, e estreptomicina 100 µg/mL). Os monócitos foram diferenciados em macrófagos com a adição de acetato de forbol miristato (PMA) 20 ng/mL. Após 72 h, os macrófagos (5 x 10^4), em placas pretas de 96 poços (Corning Incorporated, Corning, NY, USA), foram infectados com promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904) ou *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) transfectados com o gene *tdTomato*, no segundo dia da fase estacionária (20 parasitas por macrófago) por 4 h. Os parasitas que não conseguiram infectar os macrófagos foram removidos (três lavagens com 1X PBS), e os macrófagos infectados foram incubados por 72 h em médio RPMI-1640 contendo concentrações diferentes dos compostos (80, 40, 20, 10, e 5 µg/mL). A concentração em composto que inibe 50 % do crescimento parasitário (IC_{50}) foi determinada pela diminuição da fluorescência dos parasitas na ausência e presença do composto, após 72 h de exposição, usando um leitor de microplacas (Varioskan LUX, Thermoscientific™), com excitação em 554 nm e emissão em 581 nm. Os valores de IC_{50} foram determinados por regressão não-linear usando um modelo de *variable slope* (log(concentração) *vs* inibição do crescimento) com o *software* GraphPadPrism v8.2.0 (CA, USA). Controles com células não infectadas, células infectadas não tratadas e células infectadas tratadas com anfotericina B a 0.25 µM (controle positivo) ou DMSO 1% foram usados.

Quadruplicatos foram realizados na mesma placa, e os experimentos foram repetidos pelo menos uma vez.

VI) 2. 1. 2. Ensaio *in vitro* de citotoxicidade em macrófagos THP-1

As células monocíticas humanas THP-1 foram diferenciadas em macrófagos em placas de 96 poços por 72 h, conforme descrito acima. O médio foi trocado, e as células foram expostas aos compostos em concentrações crescentes, começando no valor de IC_{50} contra *L. infantum*. Após 72 h de incubação com os compostos, AlamarBlue^{TM} foi adicionado e a absorbância a 570 e 600 nm foi medida após 4 h. Controles com células não tratadas e células tratadas com DMSO 1% foram conduzidos em paralelo. Os resultados foram exprimidos como a diferença em percentagem na redução de absorbância entre células tratadas e não tratadas. A concentração em composto que inibe 50 % da viabilidade das células THP-1 (CC_{50}) foi determinada. Os valores de CC_{50} foram determinados por regressão não-linear usando um modelo de *variable slope* (log(concentração) *vs* inibição do crescimento) com o *software* GraphPadPrism v8.2.0 (CA, USA). Triplicatos foram realizados na mesma placa, e os experimentos foram repetidos pelo menos uma vez.

VI) 2. 1. 3. Ensaio *in vitro* de atividade contra promastigotas de *L. infantum*

Promastigotas de *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) foram cultivados em médio completo Schneider (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA), consistindo de médio Schneider com 10% de sérum fetal bovino (FBS, SigmaAldrich) pH 7.4 inativado a 24 °C. Os promastigotas de *L. infantum* foram colocados em placas de 96 poços em uma concentração de 10^5 parasitas/mL, e **6** foi adicionado em concentrações de 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, e 0.125 µM. As células foram cultivadas por 72 h e após o período de incubação, a proliferação celular foi medida por colorimetria com MTS. As células em cada poço foram manchadas com 20 µL de MTS (Promega, G3580) por 3 h, e o valor de OD a 490 nm foi determinado com um leitor de microplacas. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes de maneira independente.[105]

VI) 2. 1. 4. Ensaio *in vitro* de atividade contra *T. cruzi*

A atividade contra *T. cruzi* foi avaliada em células L929 (de fibroblastos de rato) infectadas com a cepa *Tulahuen* do parasita, exprimindo β-galactosidase de *Escherichia coli* como gene reportador. Para o ensaio, 4000 células L929 foram adicionadas a cada poço de uma placa de 96 poços. Após uma noite de incubação, 40 000 tripomastigotas foram adicionados às células

e incubados por 2 h. Em seguida, o meio contendo parasitas extracelulares foi substituído por 200 µL de meio fresco e a placa foi incubada por mais 48 h para estabelecer a infecção. Para determinar o valor de IC_{50} dos compostos, as células foram expostas a cada composto em concentrações decrescentes (100, 50, 25, 12.5, 6.25 e 3.12 µg/mL) e a placa foi incubada por 96 h. Depois, 50 µL de vermelho de clorofenol beta-D-galactopiranosida (CPRG) 500 µM em Nonidet P40 0.5% foram acrescentados em cada poço, a placa foi incubada por mais 16 a 20 h, e a absorbância em 570 nm foi medida. Controles com células não infectadas, células infectadas não tratadas e células infectadas tratadas com benznidazol a 3.8 µM (controle positivo) ou DMSO 1% foram usados. Os resultados foram exprimidos como a percentagem de inibição do crescimento de *T. cruzi* nas células tratadas com os compostos comparando com as células infectadas e as células não tratadas. Os valores de IC_{50} foram determinados por regressão não-linear usando um modelo de *variable slope* (log(concentração) *vs* inibição do crescimento) com o *software* GraphPadPrism v8.2.0 (CA, USA). Quadruplicatos foram realizados na mesma placa, e os experimentos foram repetidos pelo menos uma vez.

VI) 2. 1. 5. Ensaio *in vitro* de citotoxicidade em células L929

Para o ensaio, 4000 células L929 em 200 µL de meio RPMI-1640 (pH 7.2 – 7.4) (Gibco BRL) com 10% de sérum fetal bovino e 2 mM de glutamina foram adicionadas a cada poço de uma placa de 96 poços, que foi incubada por 3 dias a 37 °C. Em seguida, o meio foi substituído por 200 µL de meio fresco, e as células foram expostas a cada composto em concentrações crescentes. Após 96 h de incubação com os compostos, AlamarBlue™ foi acrescentado, e a absorbância em 570 nm e 600 nm foi medida após 4 – 6 h. Controles com células não tratadas e células tratadas com DMSO 1% foram conduzidos em paralelo. Os resultados foram exprimidos como a percentagem de diferença na redução entre células tratadas e não tratadas. A concentração em composto que inibe 50 % da viabilidade das células L929 (CC_{50}) foi determinada. Quadruplicatos foram realizados na mesma placa, e os experimentos foram repetidos pelo menos uma vez.

VI) 2. 1. 6. Ensaio *in vitro* de atividade contra *T. cruzi* (cepa *Dm28c-Luc*)

Foram utilizadas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa *Y*, *Brazil* e *Dm28c-Luc* (geneticamente modificada expressando luciferase) derivadas de cultivo celular. Culturas de células Vero foram infectados numa multiplicidade de infecção de 10 parasitos/célula hospedeira (10:1). Células Vero foram tripsinizadas e o total de células foi quantificado em câmara de Neubauer. $1.5x10^4$ células/poço foram semeadas em placas de 96 poços com paredes

brancas foscas para permitir a leitura da luminescência. No mesmo dia do plaqueamento, as células foram infectadas com *T. cruzi Dm28c-Luc*, 10:1. Após 24 h, foi adicionado o tratamento. Os compostos (estoque em DMSO) foram diluídos de forma seriada em outra placa na proporção de 1:3, sendo a concentração inicial igual a 100 µM e a concentração final de 0.0457 µM para permitir cálculo do IC_{50}. Como os compostos foram muito potentes, nova série de ensaios foi realizada partindo de uma concentração inicial de 10 µM, e diluídos também 1:3. Após 72 h de incubação, as culturas tiveram o seu meio removido e 50 µL de solução de luciferina 300 µg/mL em PBS foi adicionado por poço, permitindo a detecção de parasitas expressando luciferase pela leitura de luminescência. As placas foram lidas em leitor de microplacas Glomax (Promega). O IC_{50} e IC_{90} (concentração do composto que reduziu em 50% e 90%, respectivamente, a viabilidade da forma amastigota do *T. cruzi*) foi determinado através do software GraphPad Prism através da curva dose-resposta dos valores de inibição (%) da viabilidade do parasita em relação ao controle não tratado.

VI) 2. 1. 7. Ensaio *in vitro* de citotoxicidade em células Vero

Linhagens de células Vero, originalmente obtidas de rim de macaco verde (ATCC#CCL-81), são mantidas rotineiramente no laboratório em meio RPMI suplementado com 8% sérum fetal bovino (FBS), 1 mM L-glutamina e antibióticos (penicilina e estreptomicina), e passadas por tripsinização quando a confluência celular atinge mais que 80%. Células Vero foram tripsinizadas e o total de células foi quantificado em câmara de Neubauer. $1.5x10^4$ células/poço foram semeadas em placas de 96 poços com paredes brancas foscas para permitir a leitura da luminescência. Células não infectadas foram tratadas com os compostos considerados ativos após triagem inicial, em diluição seriada 1:3 partindo de 300 µM. Após 72 h de incubação, a viabilidade celular foi quantificada através da adição de 20 µL/poço do reagente Cell Titer Glo (Promega), por 5 min sob agitação de 250 rpm. A luminescência resultante da detecção de ATP como indicador de viabilidade foi lida em leitor de microplacas Glomax (Promega). Os valores de CC_{50} e CC_{20} (concentração do composto que inibe 50% e 20% da viabilidade da célula hospedeira, respectivamente) foi calculado através da curva dose-resposta de inibição de viabilidade *vs* Log da concentração do composto.

VI) 2. 1. 8. Toxicidade aguda *in vivo* em camundongos BALB/c

A dose máxima tolerada (DMT) de **6** foi determinada em camundongos BALB/c. Um macho e uma fêmea, sadios, de seis semanas (peso ideal: 20 gramas), receberam por administração intraperitoneal uma amostra emulsificada preparada com 70% de PBS1X, 20% de PEG 400

(Polietileno glicol 400, Sigma-Aldrich), 0.16% de Tween 80 e 10% de **6**, com uma dose inicial de 5 mg/kg de **6**. Após 2 h, uma dose adicional de 15 mg/kg foi administrada (resultando numa dose acumulada (DA) de 20 mg/kg). Após mais 2 h, uma nova dose de 30 mg/kg foi administrada (DA = 50 mg/kg), e após outras 2 h, uma dose final de 50 mg/kg (DA = 100 mg/kg) foi administrada. 24 h após a administração da dose final, ambos os camundongos foram inspetados para avaliar manifestações clínicas de toxicidade e sub-toxicidade em acordo com as normas da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OCDE).[106,107] A inspeção não revelou nenhum sinal de toxicidade aguda em ambos os espécimens.

VI) 2. 1. 9. Eficácia *in vivo* contra *L. infantum* em camundongos BALB/c

Todos os animais foram manipulados de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal do Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas (licença LW-7/23). Os camundongos BALB/c foram obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas. Acesso livre a uma dieta padrão foi deixado durante todo o estudo, e água de torneira foi providenciada *ad libitum*.

Camundongos BALB/c (machos, 6 a 8 semanas, 18 a 20 g) foram inoculados por intravenosa (veia da cauda) com $2x10^7$ promastigotas de *L. infantum* oriundos de linhagens *Li::tdTomato*, e repartidos aleatoriamente em um dos quatro grupos (seis camundongos por grupo). Após 7 dias de infecção, cada grupo foi tratado de acordo com o seu regime de tratamento por 10 dias consecutivos: o grupo de controle positivo recebeu administrações intraperitoneais em dose única de 500 mg/kg/dia de antimoniato de meglumina (Glucantime®, Sanofi Medley), ambos os grupos tratados com **6** receberam duas injeções intraperitoneais diárias para uma dose total de 50 mg/kg/dia (para um grupo) ou 100 mg/kg/dia (para o outro), e o grupo do controle negativo recebeu injeções de solução-veículo. Para as injeções intraperitoneais, a formulação de **6** foi preparada conforme o seguinte: uma solução-estoque de **6** em DMSO (100 mg/mL) foi preparada diariamente, e uma solução de 70% de PBS1X, 20% de PEG 400 (Polietileno glicol 400, Sigma-Aldrich), 0.16% de Tween 80 e 10% de **6** (da solução-estoque) foi preparada. O grupo do controle negativo recebeu esta solução, substituindo **6** por 10% de DMSO. Todos os camundongos foram eutanasiados 3 dias após o fim do tratamento, e o baço e fígado de cada animal foram coletados.

A quantidade de parasitas viáveis em cada órgão foi determinada usando um ensaio de diluição limitante quantitativa. Brevemente, os órgãos foram macerados usando um dispersador Ultra-Turrax (IKA-Werke GmbH & Co. KG., Staufen, Alemanha), e um homogenato dos tecidos foi

obtido com 1 mL de meio M199. Cada homogenato de tecido foi submetido a diluições em sequência (10 vezes) em placas pretas de 96 poços e incubado por 10 dias a 26 °C. Os poços contendo promastigotas motis foram identificados com um microscópio invertido (Axiovert 25, Zeiss), e a carga parasitária foi determinada a partir da maior diluição em qual promastigotas tinham crescido após 10 dias de incubação.

VI) 2. 1. 10. Sinergismo entre 6 e antimoniais

Células da linhagem humana monocítica THP-1 foram cultivadas em médio completo Rowell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (suplementado com sérum fetal bovino 10 %, penicilina 100 U/mL, e estreptomicina 100 μg/mL). Os monócitos foram diferenciados em macrófagos com a adição de acetato de forbol miristato (PMA) 20 ng/mL. Após 72 h, os macrófagos (5 x 10^4), em placas pretas de 96 poços (Corning Incorporated, Corning, NY, USA), foram infectados com promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) exprimindo proteínas de fluorescência vermelha no segundo dia da fase estacionária (20 parasitas por macrófago) por 4 h. Os parasitas que não conseguiram infectar os macrófagos foram removidos (três lavagens com 1X PBS). Para avaliar o sinergismo entre Sb^{III} e **6**, seis concentrações diferentes dos compostos foram usadas (1.0, 0.5, 0.2, 0.1, e 0.05 μg/mL). As diluições de Sb^{III} e **6** foram preparadas no dia do ensaio. Os compostos foram avaliados separadamente e em combinação. A concentração efetiva em composto que inibe 50 % do crescimento parasitário (EC_{50}) foi determinada pela diminuição da fluorescência dos parasitas na ausência e presença dos compostos, após 72 h de exposição, usando um leitor de microplacas (Varioskan LUX, Thermoscientific™), com excitação em 554 nm e emissão em 581 nm. Os valores de EC_{50} foram determinados por regressão não-linear usando um modelo de *variable slope* (log(concentração) *vs* inibição do crescimento) com o *software* GraphPadPrism v8.2.0 (CA, USA). A normalização dos dados em resposta fracional permitiu realizar os cálculos usando o modelo Bayesiano.[65] Os resultados foram comparados entre si para determinar se a combinação dos compostos tinha um efeito sinergético, antagônico ou aditivo. Controles com células não infectadas, células infectadas não tratadas e células infectadas tratadas com anfotericina B a 0.25 μM (controle positivo) ou DMSO 1% foram usados. Quadruplicatos foram realizados na mesma placa, e os experimentos foram repetidos pelo menos uma vez.

VI) 2. 2. Perfil ADMET da série de pirazinilpiperazinas

VI) 2. 2. 1. Ensaio de Permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) – Barreira hematoencefálica (BBB)

Em um frasco de 5 mL solubilizou-se 1 mg de cada composto em EtOH (1 mL), e EtOH (500 μL) e tampão PBS (pH 7.4) (3.5 mL) foram acrescentados a esta solução. A solução resultante foi filtrada através de um filtro de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0.45 μM, e o filtrato foi reservado. Em seguida, 180 μL de uma solução PBS (pH 7.4)/EtOH (70:30) foi adicionada aos poços de uma placa de 96 poços (placa receptora), e 5 μL de uma solução de lipídio de cérebro porcino (20 mg/mL em dodecano) foram adicionados aos poços de uma placa doadora de 96 poços. Após 5 minutos, 180 μL da solução reservada contento cada composto foram adicionados aos poços da placa doadora, em triplicata, e a placa doadora foi colocada cuidadosamente por cima da receptora, formando um sistema tipo "sanduíche" que foi deixado imóvel por 2 h 45 minutos a temperatura ambiente em um recipiente selado contendo 10 mL de PBS (pH 7.4). Após esse período, a placa doadora foi removida, e o conteúdo presente na placa receptora foi transferido para uma placa de leitura UV, a qual foi lida usando um leitor de microplacas (SpectraMax 5® – Molecular Devices). Uma amostra de referência para a correção interna do leitor de microplacas foi preparada usando 180 μL da solução PBS (pH 7.4)/EtOH (70:30) (adaptado de [51]). Os valores de densidade óptica do conteúdo das placas receptoras foram comparados com os valores obtidos nas leituras realizadas com as soluções iniciais contendo cada composto, antes da adição deles à placa doadora. Triplicatos foram realizados na mesma placa, e os experimentos foram repetidos pelo menos uma vez, usando os controles experimentais seguintes: atenolol, cafeína, diazepam, enoxacina, ofloxacina, testosterona e verapamil, que são compostos de referência com valores de permeabilidade diferentes previamente reportados e usados como padrão experimental.[52] Os valores de densidade óptica obtidos da placa doadora foram comparados com os dos controles experimentais, que foram usados para determinar a equação da regressão linear e determinar os valores de P_e de cada composto usando uma planilha interna no Microsoft Excel.

VI) 2. 2. 2. Ensaio de Permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) – Trato gastrointestinal (GI)

Uma solução de concentração 10 mM em cada composto em DMSO foi incialmente preparada, e foi em seguida homogeneizada em um frasco de 5 mL com tampão PBS (pH 6.6) (4.75 mL). A solução resultante foi filtrada através de um filtro de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0.45

μM, e o filtrato foi reservado. Em seguida, 180 μL de uma solução PBS (pH 7.4)/DMSO (95:5) foi adicionada aos poços de uma placa de 96 poços (placa receptora), e 5 μL de uma solução de L- α-fosfatidilcolina (20 mg/mL em dodecano) foram adicionados aos poços de uma placa doadora de 96 poços. Após 5 minutos, 180 μL da solução reservada contento cada composto foram adicionados aos poços da placa doadora, em triplicata, e a placa doadora foi colocada cuidadosamente por cima da receptora, formando um sistema tipo "sanduíche" que foi agitado (50 rpm) por 8 h a temperatura ambiente em um recipiente selado contendo 10 mL de PBS (pH 7.4). Após esse período, a placa doadora foi removida, e o conteúdo presente na placa receptora foi transferido para uma placa de leitura UV, a qual foi lida usando um leitor de microplacas (SpectraMax 5® – Molecular Devices). Uma amostra de referência para a correção interna do leitor de microplacas foi preparada usando 180 μL da solução PBS (pH 7.4)/DMSO (95:5) (adaptado de [108,109]). Os valores de densidade óptica do conteúdo das placas receptoras foram comparados com os valores obtidos nas leituras realizadas com as soluções iniciais contendo cada composto, antes da adição deles à placa doadora. Triplicatos foram realizados na mesma placa, e os experimentos foram repetidos pelo menos uma vez, usando os controles experimentais seguintes: aciclovir, atenolol, ceftriaxona, coumarina, diclofenaco, hidrocortisona, norfloxacina, ranitidina, sulfasalazina e verapamil, que são compostos de referência com valores de permeabilidade diferentes previamente reportados e usados como padrão experimental.[110] Os valores de F_a foram determinados para cada composto, comparado os valores de densidade óptica obtidos da placa doadora com os dos controles experimentais usando uma planilha interna no Microsoft Excel.

VI) 2. 2. 3. Estabilidade metabólica em microssomas de fígado de rato (MLM)

A um tubo de microcentrífuga foram adicionados 1 mg/mL de microssoma de fígado de rato (MLM), um sistema gerador de NADPH consistindo de 1 mM de NADP+, 1.5 mM de $MgCl_2$, 3.5 mM de glucose-6-fosfato e 0.5 U/mL de glucose-6-fosfato desidrogenase, e tampão fosfato (pH 7.4) em quantidade suficiente para um volume total de 248.75 μL. Após 15 minutos de pré-incubação a 37 °C em banho de água, as reações enzimáticas foram iniciadas pela adição de 2 μL de uma solução estoque de 500 μM em cada composto a ser avaliado, chegando a uma concentração final de 5 μM em composto avaliado.[111,112] As amostras foram novamente incubadas a 37 °C sob agitação (30 rpm) por períodos predeterminados (0, 15, 30, 45 e 60 minutos), e 500 μL de MeOH frio e 500 μL de acetonitrila fria foram acrescentados antes de homogeneizar e deixar as amostras de repouso em banho de gelo para acelerar a precipitação

da proteína. A mistura resultante foi centrifugada a 13 000 rpm por 15 minutos a 4 °C, a fase orgânica foi extraída e 2 µL de padrão interno (clonazepam 5 µM) foram acrescentados. Enfim, as amostras foram filtradas através de um filtro de PVDF (Millex® 0.22 µm x 13 mm) e analisadas por HPLC-PDA.[51,111,112]

Quatro controles experimentais foram usados para todas as análises: uma amostra de referência do meio enzimático sem o composto testado, para identificar os picos HPLC correspondendo ao meio enzimático; uma amostra contento o meio enzimático e o sistema gerador de NADPH, para identificar a atividade das diversas isoenzimas CYP450 e/ou das monooxigenases contendo flavinas, que são todas enzimas NADPH-dependentes; uma amostra sem o sistema gerador de NADPH, para identificar a atividade das carboxilesterases, cuja atividade não depende de NADPH; e uma amostra sem a fração microssomal, para avaliar a estabilidade dos compostos no meio reacional.

VI) 2. 2. 4. Hepatotoxicidade

Células HepG2 foram sediadas a $2x10^4$ células/mL em DMEM, as placas foram incubadas por 24 h (5% CO_2, 37 °C), e os compostos e doxorubicina (usada como controle positivo) foram adicionados em diluições seguidas. Após 72 h de incubação, 15 µL de reagente MTS (CellTiter96®) foi acrescentado a cada poço, e as placas foram incubadas por 4 h, e em seguida lidas usando um leitor de microplacas por absorbância a 490 nm.[113] A inibição do crescimento foi exprimida como uma percentagem de absorbância dos poços do controle negativo. Os valores de CC_{50} foram calculados automaticamente a partir das curvas de dose-resposta usando o logaritmo da concentração em inibidor *vs* a resposta normalizada entre 0 e 100% com um modelo de *variable slope*.

VI) 2. 3. Mecanismo de ação de 6

VI) 2. 3. 1. Análise por citometria de fluxo das fases G0/G1 do ciclo celular

Promastigotas de *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) em concentração de $1x10^6$ parasitas/mL foram tratados com uma concentração em composto de 0.5 x IC_{50}, IC_{50} e 2 x IC_{50} (valores de IC_{50} determinados contra promastigotas de *L. infantum*), e parasitas não tratados foram usados como controle negativo. Após tratamento por 24 h, as células foram coletadas, lavadas duas vezes com 1X PBS, e fixadas em EtOH 70% a 4 °C por 24 h. Os parasitas fixados foram lavados com 1X PBS e o resíduo foi tratado com 500 µL de RNase A (20 mg/mL) e incubados a 37 °C por 1 h. Em seguida, os parasitas foram manchados com 10 µg/mL de iodeto

de propídio (PI) no escuro por 20 minutos. A distribuição do ciclo celular, determinando a percentagem de células nas fases G0, G1, S e G2/M, foi analisada usando um citômetro de fluxo Accuri C5 BD. Os histogramas apresentados são representativos de resultados obtidos em três experimentos independentes.[114]

VI) 2. 3. 2. Análise por FACS para a determinação da externalização de fosfatidilserina (PS)

Um kit de detecção de apoptose annexin V/7-amino-actinomicina D (7-AAD) (BD Bioscience) foi usado para a detecção da morte celular por apoptose ou necrose em promastigotas de *L. infantum*. Após 72 h de incubação com os compostos a 0.5 x IC_{50}, IC_{50} e 2 x IC_{50} (valores de IC_{50} determinados contra promastigotas de *L. infantum*), os promastigotas de *L. infantum* (1 x 10^6 parasitas/mL) foram lavados em meio PBS e centrifugados a 13 000 rpm por 5 minutos. Em seguida, eles foram manchados com annexin V-PE/7-AAD por 15 minutos no escuro a 4 °C. Os dados foram adquiridos usando um citômetro de fluxo Accuri C5 BD.[115]

VI) 2. 3. 3. Ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A tinta fluorescente H_2DCFDA foi utilizada para avaliar a produção de ROS. Promastigotas de *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) em concentração de 2x10^6 parasitas/mL foram tratados com **6** em concentração igual ao seu IC_{50} contra promastigotas de *L. infantum* e com 100 µM H_2O_2 por 24 h. Após o tratamento, os parasitas foram coletados e lavados três vezes com 1X PBS. Em seguida, foram incubados com 10 µM de tinta H_2DCFDA em 500 µM de 1X PBS no escuro a temperatura ambiente por 30 minutos. As células foram então centrifugadas, resuspendidas em PBS frio e mantidas a 0 °C até a leitura em leitor de microplacas (SpectraMax Gemini™ XPS/EM). A intensidade de fluorescência media (MIF) foi medida numa população de pelo menos 10 000 células e os dados foram analisados usando Microsoft Excel 2021.[114]

VI) 2. 4. Ensaios de inibição enzimática

VI) 2. 4. 1. Enzimas GSK-3A e GSK-3B de *L. infantum*

Para as medidas de IC_{50}, **6** foi diluído em sequência em 100% DMSO (8 pontos, maior concentração final no ensaio 30 µM) e transferido (100 nL) para a placa do ensaio usando um sistema de transferência de líquidos automatizado (CyBio FeliX, Analytik Jena GmbH). Os controles seguintes foram incluídos: proteína em 1% DMSO (100% de atividade), 10 µM AZD-5438 (0% de atividade), e o meio sem enzima (branco).

Para detectar o progresso da reação enzimática, um ensaio comercial baseado na TR-FRET (LANCE® TR-FRET, PerkinElmer) foi usado. Na etapa enzimática, a proteína quinase purificada e o substrato peptídico foram incubados com os compostos por 30 minutos a 25 °C antes da adição de ATP para iniciar a reação, que foi conduzida a 30 °C (2 h para GSK-3A ou 1 h 15 minutos para GSK-3B). As concentrações finais de cada componente do ensaio foram: 50 nM de GSK-3A or 10 nM de GSK-3B, Km de ATP (6.2 µM de ATP para GSK-3A e 13.0 µM para GSK-3B), e 50 nM de peptídeo (substrato ULight-4E-BP1, PerkinElmer #TRF0128) em tampão 1X contendo 50 mM de HEPES (pH 7.5), 10 mM de MgCl2, 1 mM de EGTA, 0.01% de Tween-20 e 2 mM de DTT (volume de reação = 10 µL). Para a detecção, a placa foi incubada por 1 h a 25 °C após a adição de 6 mM de EDTA (para parar a reação) e 2 nM de anticorpo (Europium-anti-phospho-4E-BP1, PerkinElmer #TRF0216) em tampão 1X de detecção (PerkinElmer #CR97-100) (volume de reação final = 20 µL). Todas as reações enzimáticas foram realizadas em duplicatos, e a concentração em proteína foi estimada usando um espectrofotômetro UV/Vis NanoDrop2000 (Thermo Scientific), usando o peso molecular e o coeficiente de extinção molar da proteína.

O sinal de fluorescência foi medido usando um leitor de microplacas CLARIOstar (BMG LABTECH) com excitação em 320 nm e emissão em 665 nm. O *software* MARS (BMG LABTECH) foi utilizado para analisar os dados obtidos após a leitura de cada placa. O sinal de fluorescência de fundo (branco) foi subtraído do sinal de fluorescência obtido para cada reação, para refletir o sinal específico da atividade enzimática. Os dados foram analisados com o *software* GraphPad Prism, usando a equação "log(inibidor) *vs* resposta - *variable slope* (quatro parâmetros) - Y=Bottom + (Top-Bottom)/(1+10^((LogIC50-X)* HillSlope))" para obter curvas de dose-resposta e determinar os valores de IC_{50}. O fator Z' foi calculado para cada ensaio de maneira individual (valores entre 0.5 e 1 são considerados excelentes).

VI) 2. 4. 2. Enzima DHODH de *L. braziliensis*

O ensaio de inibição foi realizado nas condições seguintes: 50 mM de Tris (pH 8.15), 150 mM de KCl, 50 µM de DHO, 60 µM de DCIP, e 0.1% Triton X-100. **6** foi testado em triplicato em uma concentração de 100 µM, usando 5% (v/v) de DMSO para preparar as soluções estoque. A reação foi iniciada pela adição da enzima, chegando a uma concentração final em enzima de 165 nM. A atividade enzimática foi medida em seguida por 60 segundos a 610 nm usando um leitor de microplacas (SpectraMax® Plus 384, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) a 25 °C. A reação não-inibida, contendo 5% (v/v) de DMSO, foi usada como controle positivo (100% de atividade).

VI) 2. 4. 3. Enzimas Hsp83 e SOD de *L. braziliensis*, usando fluorimetria de varredura diferencial (DSF)

Os ensaios foram realizados usando o sistema de RT-PCR Applied Biosystems 7500 Fast RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), em triplicato, com placas de PCR de 96 poços (BioRad, Hercules, CA, USA) seladas com bandas transparentes (BioRad, Hercules, CA, USA). As placas foram centrifugadas por 2 minutos a 2000 rpm a 25 °C. Em seguida, a temperatura foi aumentada de 25 °C a 85 °C seguindo uma rampa de temperatura, aumentando de 1 °C por minuto, enquanto os sinais de fluorescência foram monitorados usando tinta SPYRO Orange, com excitação em 492 nm e emissão em 610 nm.

As condições de DSF usadas neste ensaio foram descritas previamente.[116,117] Resumidamente, cada poço conteve 10 μM de Hsp83 de *L. braziliensis* ou 5 μM de SOD de *L. braziliensis*, 1 μL de 5X SPYRO Orange, tampão A (50 mM de PBS, 100 mM de NaCl, pH 7.0 para SOD de *L. braziliensis* ou 50 mM de Tris-HCl, 100 mM de KCl, pH 8.0 para Hsp83 de *L. braziliensis*), e ou 1 μL de DMSO (5% v/v/, controle negativo) ou **6** (diluído em DMSO). Triplicatos foram realizados para todos os experimentos. Os dados brutos de fluorescência foram coletados usando o *software* Applied Biosystems 7500 Fast Software v2.0, e em seguida exportados para NAMI[118] para o calculo de Tm *via* o método da primeira-derivada. As diferenças nos valores de Tm (ΔTm) foram consideradas estatisticamente relevantes com $p < 0.05$, conforme determinado pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn para comparações múltiplas, realizados usando GraphPad Prism 10.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com).

VI) 2. 4. 4. Inibição de cruzaína (Cz)

Inicialmente, os compostos foram solubilizados em DMSO para preparar soluções estoque na concentração de 20 mM. A seguir, a solubilidade destes foi testada no tampão de ensaio, na concentração de 100 μM. A atividade enzimática foi mensurada com base na clivagem do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-Aminometilcumarina (Z-FR-AMC) catalisada pela cruzaína (Cz). Ao ser clivado, o composto fluorescente 7-amino-4-metilcumarina (AMC) é liberado e a sua fluorescência foi mensurada a 340/440 nm (comprimento de onda excitação/emissão) em um fluorímetro BioTek Synergy 2. Na presença de um inibidor, a formação deste produto reduz ou cessa. Dessa forma, a percentagem de inibição enzimática é obtida por meio da diferença da fluorescência detectada entre o poço da placa com o composto avaliado e o poço com o controle negativo de inibição, DMSO. A triagem inicial foi realizada a uma concentração de 100 μM de

composto, 2 nM de cruzaína e 2.5 μM de substrato, sendo feita em triplicata e em dois experimentos independentes. Os compostos foram avaliados em duas condições distintas: sem incubação previa e após pré-incubação de 10 minutos com a cruzaína. Após esse período, o substrato foi adicionado e a atividade enzimática foi monitorada por 5 minutos no fluorímetro. Os compostos que inibiram a atividade enzimática na triagem inicial por pelo menos 80% foram selecionados para a determinação do IC_{50}. Com o objetivo de avaliar a possibilidade de agregação, os ensaios foram realizados para determinar o valor de IC_{50} em duas condições: pré-incubação com albumina séria bovina (BSA) e diferentes concentrações de Triton X-100. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

VI) 2. 5. Perfil ADME da série de tiazóis

As análises ADME da série de tiazóis foram realizadas usando LC-MS/MS (cromatografia líquida-espectrometria de massas em tandem). O sistema de cromatografia utilizado foi um Prominence UFLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), em interface com um espectrômetro de massas a triple quadrupolo LCMS-8045 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI).

VI) 2. 5. 1. Determinação experimental da lipofilicidade pelo coeficiente de distribuição ($log(D)_{7.4}$)

Para a determinação do coeficiente de distribuição (log(D)), uma metodologia baseada no tempo de retenção das moléculas na fase estacionária foi usada. O cromatograma foi obtido com uma coluna de HPLC Supelco Ascentis express RP amide (5 cm x 2.1 mm, 2.7 μM) usando fases móveis de 5% MeOH em 10 mM de acetato de amônio (pH 7.4) (A) e 100% MeOH (B). A fase móvel foi eluida em modo de gradiente binário, conforme o seguinte: 0 min: 95% A; 0.3 min: 100% A; 5.2 min: 0% A; 5.6 min: 0% A; 5.8 min: 100% A; 7.0 min: 100% A. O tempo total da análise foi de 7 minutos, e 5 μL de cada amostra foram injetados. As soluções dos compostos testados foram preparadas em concentrações de 1.0 mg/mL em composto ao adicionar a solução estoque a uma mistura (1:1) das fases móveis A/B (com padrão interno a 200 nM), e a concentração em DMSO foi menor que 2%; A lipofilicidade dos compostos foi avaliada injetando individualmente os compostos e uma série de oito fármacos comerciais, abrangendo uma faixa de log(D) de -1.86 até 6.81 (aciclovir: -1.86, atenolol: 0.16, antipirina: 0.38, fluconazol: 0.50, metoprolol: 1.88, ketoconazol: 3.83, tolnaftato: 5.40, e amiodarona: 6.10).[119–121] O tempo de retenção (em minutos) de cada dos oito padrões foi plotado *vs* os

valores de log(D) deles. A equação resultante para a curva de calibração (y = mx + b) foi usada para calcular os valores de log(D) dos compostos testados a partir de seus tempos de retenção.

VI) 2. 5. 2. Permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) – Trato gastrointestinal (GI)

O ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela foi realizado num sistema de placas PAMPA de 96 poços pré-revestido (Corning Gentest # 353015). As soluções dos compostos testados foram preparadas diluindo as soluções estoque (10 mM) em tampão PBS (pH 6.5) até uma concentração final de 10 µM, e em seguida adicionadas à porção doadora da placa (300 µL/poço), enquanto a porção aceptora recebeu tampão PBS (pH 7.4) (200 µL/poço). A concentração em DMSO nas soluções foi menor que 1%. As duas porções da placa foram assembladas, e o sistema foi incubado por 5 h a 37 °C. Amostras das soluções doadoras iniciais (T0) foram coletadas e guardadas a -20 °C. No fim da incubação, amostras das placas aceptora e doadora foram coletadas e adicionadas a placas contendo uma solução (10% água e 90% MeOH/acetonitrila (50:50) + 50 nM tolbutamida), e as amostras T0 foram tratadas de maneira similar. As concentrações finais dos compostos nos poços doadores, aceptores e T0 foram quantificadas por LC-MS/MS. Os cromatogramas para a análise foram obtidos com uma coluna Supelco Ascentis express C18 (3 cm x 2.1 mm, 5 µM). As fases móveis foram: água + 0.1% ácido fórmico (A) e acetonitrila + 0.1% ácido fórmico (B). A fase móvel foi eluida em modo de gradiente binário, conforme o seguinte: 0 min: 95% A; 0.05 min: 95% A; 0.3 min: 2% A; 0.7 min: 2% A; 0.8 min: 95% A; 1.15 min: 95% A; 2.0 min: 95% A. O tempo total da análise foi de 2 minutos, e 10 µL de cada amostra foram injetados e eluidos com um fluxo de 0.7 mL/min. Os resultados foram usados para calcular um valor de permeabilidade efetiva (P_e). Todos os ensaios PAMPA foram realizados em triplicato.

VI) 2. 5. 3. Ensaios de estabilidade metabólica em microssomas de fígado de rato (MLM) e humano (HLM)

A estabilidade metabólica foi avaliada em microssomas de fígado humano (HLM) (20 mg/mL, GIBCO) e microssomas de fígado de rato (MLM) (20 mg/mL, GIBCO). As soluções dos compostos testados foram preparadas em concentrações de 0.5 µM em composto e incubadas com 0.25 mg/mL de microssomas de fígado em tampão PBS (pH 7.4). A concentração em DMSO nas soluções foi menor que 1%. A reação começou com a adição de 0.5 µM de cofator NADPH. Amostras foram prelevadas nos tempos 0 (imediatamente após a adição do cofator), 5, 10, 20, 30, e 60 minutos. As reações foram paradas com a adição de uma solução de

acetonitrila/MeOH (1:1) (com padrão interno a 50 nM). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 30 minutos para obter grânulos de proteína microssomal precipitada. As frações sobrenadantes foram quantificadas por LC-MS/MS. Os rácios da área dos picos (analito/padrão interno) foram convertidas em percentagem remanente, usando o rácio das áreas no tempo 0 minutos como 100%. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$ = ln(2)/k) em minutos e o *clearance* intrínseco (Cl_{int} = k x 1000/(0.25)) em µL/min/mg foram calculados por regressão não-linear a partir da percentagem remanente *vs* tempo de incubação. A partir deste gráfico, a inclinação (k) foi determinada. Os cromatogramas para a análise foram obtidos com uma coluna Supelco Ascentis express C18 (3 cm x 2.1 mm, 5 µM). As fases móveis foram: água + 0.1% ácido fórmico (A) e acetonitrila + 0.1% ácido fórmico (B). A fase móvel foi eluida em modo de gradiente binário, conforme o seguinte: 0 min: 95% A; 0.05 min: 95% A; 0.3 min: 2% A; 0.7 min: 2% A; 0.8 min: 95% A; 1.15 min: 95% A; 2.0 min: 95% A. O tempo total da análise foi de 2 minutos, e 10 µL de cada amostra foram injetados e eluidos com um fluxo de 0.7 mL/min. Os ensaios de estabilidade metabólica microssomal foram realizados em triplicatos.

VI) 2. 5. 4. Solubilidade cinética

Para a determinação da solubilidade cinética, soluções estoque dos compostos testados e dos controles (10 mM em DMSO) foram transferidas para duas placas de 96 poços (placa de incubação) em duplicato. Para cada amostra nas placas, tampão PBS (pH 7.4 ou 2.0) (concentração final 250 µM) foi adicionado. A concentração final em DMSO foi menor que 2.5%. As placas foram seladas e agitadas por 24 h a 200 rpm e 25 °C. Os precipitados na placa de incubação foram removidos por centrifugação (15 minutos, 3000 rpm, 25 °C), e as frações sobrenadantes foram quantificadas por LC-MS/MS. Uma solução padrão intermediária diluída a 0.5 mM em acetonitrila/água (1:1) foi preparada a partir da solução padrão 10 mM. Uma curva de calibração foi preparada para cada composto testado e os controles, diluindo várias vezes a solução padrão intermediária para chegar nas concentrações desejadas de 50, 40, 20, 2, e 1 µM. A equação da curva de calibração resultante (y = mx + b) foi usada para calcular os valores experimentais de concentração para os compostos. Os cromatogramas para a análise foram obtidos com uma coluna Supelco Ascentis express C18 (3 cm x 2.1 mm, 5 µM). As fases móveis foram: água + 0.05% ácido fórmico (A) e acetonitrila + 0.05% ácido fórmico (B). A fase móvel foi eluida em modo de gradiente binário, conforme o seguinte: 0 min: 98% A; 1.2 min: 2% A; 2.0 min: 2% A; tempo de re-equilibração: 0.6 min, 98% A. O tempo total da análise foi de 2 minutos, e 5 µL de cada amostra foram injetados e eluidos com um fluxo de 0.6 mL/min.

VI) 2. 6. Ensaios *in vitro* de *washout* contra *T. cruzi Dm28c-Luc*

Células Vero foram tripsinizadas e o total de células foi quantificado em câmara de Neubauer. $1.5x10^4$ células/poço foram semeadas em placas de 96 poços com paredes brancas foscas para permitir a leitura da luminescência. No mesmo dia do plaqueamento, as células foram infectadas com *T. cruzi Dm28c-Luc*, 10:1. Após 24 h, foi adicionado o tratamento. Os compostos foram previamente diluídos em outra placa, obtendo-se a concentração final equivalente ao IC_{90} e ao CC_{20}, com valores descrito em tabela. Após 72 h de incubação, as culturas foram lavadas, e meio novo sem compostos foi adicionado, e foram incubadas por mais 72 h. Após, o meio foi removido e 50 µL de solução de luciferina 300 µg/mL em PBS foi adicionado por poço, permitindo a detecção de parasitas expressando luciferase pela leitura de luminescência. As placas foram lidas em leitor de microplacas Glomax (Promega).

VI) 2. 7. Investigação *in silico* por *target-fishing*

A aproximação por *target-fishing* baseada no princípio de similaridade química usada para a triagem dos alvos moleculares de **6** foi adaptada de [122]. Resumidamente, o código SMILES de **6** foi carregado nos servidores Superpred (https://prediction.charite.de/, acessado no 14 de junho de 2023)[123], SwissTargetPrediction (https://www.swisstargetprediction.ch/, acessado no 14 de junho de 2023)[124], Similarity Ensemble Approach (SEA) (https://sea.bkslab.org/, acessado no 14 de junho de 2023)[125] e PharmMapper (https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/, acessado no 14 de junho de 2023)[126]. Os valores de corte foram selecionados por parâmetros padrão. Um diagrama de Venn com os alvos moleculares preditos encontrados por cada servidor foi gerado com a ferramenta web "Calculate and draw custom Venn diagrams" (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/). Como os principais meios oferecidos pelos servidores para avaliação de *target-fishing* são relacionados a proteínas humanas, uma correspondência com proteínas relacionadas em *L. infantum* (taxid: 5671) e *L. braziliensis* (taxid: 37617) foi realizada usando o programa BLASTp[127], aplicando um valor esperado (e-value) menor que 0.005 e um *hit score* maior que 100.0 para considerar sequências como homólogas.[128] Depois, as sequências identificadas foram carregadas na plataforma Cytoscape[129], em qual o *plugin* "*stringApp*" foi usado para o enriquecimento funcional e a representação das redes.[130] Gráficos em bolhas foram gerados para a visualização da analise por enriquecimento dentro da plataforma online SRplot (http://www.bioinformatics.com.cn/SRplot).[131] O pacote "*rBLAST*" foi usado para a comparação das sequências de proteínas no ambiente de programação R (versão 4.0.3), a opção "*ClustalW*" foi usada para o alinhamento das sequências, e o pacote "*ggmsa*" foi usado para a

representação visual.[132] O formato FASTA das sequências selecionadas foi carregado no servidor Iterative Threading Assembly Refinement (I-TASSER), onde modelos moleculares foram preditos e obtidos no formato PDB.[133] Aqueles com os maiores scores de confiança (c-score) representaram o melhor modelo. Os sítios ativos para cada modelo molecular foram identificados usando o servidor DoGSiteScorer[134], enquanto as simulações de docagem molecular foram realizadas usando a ferramenta AutoDock Vina.[135] Os modelos moleculares preditos foram carregados como macromoléculas, a uma pesquisa detalhada foi realizada ao ativar a opção "Run AutoGrid", que cria arquivos de configuração para o encaixe de menor energia do parâmetro da grade, e depois a opção "Run AutoDock", que utiliza o algoritmo de docagem Lanarckian GA. A simulação de docagem foi, em seguida, realizada com um parâmetro de exaustividade de 20 e instruída para produzir apenas a configuração de menor energia.

VII) REFERÊNCIAS

(1) van Griensven, J.; Dorlo, T. P.; Diro, E.; Costa, C.; Burza, S. The Status of Combination Therapy for Visceral Leishmaniasis: An Updated Review. *Lancet Infect. Dis.* **2024**, *24* (1), e36–e46. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00353-5.

(2) Lidani, K. C. F.; Andrade, F. A.; Bavia, L.; Damasceno, F. S.; Beltrame, M. H.; Messias-Reason, I. J.; Sandri, T. L. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front. Public Heal.* **2019**, *7*, 166. https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166.

(3) Gebremichael Tedla, D.; Bariagabr, F. H.; Abreha, H. H. Incidence and Trends of Leishmaniasis and Its Risk Factors in Humera, Western Tigray. *J. Parasitol. Res.* **2018**, *2018*, 8463097. https://doi.org/10.1155/2018/8463097.

(4) World Health Organization. *Leishmaniasis*. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis.

(5) Rassi, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas Disease. *Lancet* **2010**, *375* (9723), 1388–1402. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X.

(6) Choi, H. L.; Jain, S.; Ruiz Postigo, J. A.; Borisch, B.; Dagne, D. A. The Global Procurement Landscape of Leishmaniasis Medicines. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, *15* (2), 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009181.

(7) Alvar, J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; de Boer, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One* **2012**, *7* (5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671.

(8) Field, M. C.; Horn, D.; Fairlamb, A. H.; Ferguson, M. A. J.; Gray, D. W.; Read, K. D.; De Rycker, M.; Torrie, L. S.; Wyatt, P. G.; Wyllie, S.; Gilbert, I. H. Anti-Trypanosomatid Drug Discovery: An Ongoing Challenge and a Continuing Need. *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15* (4), 217–231. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.193.

(9) Akhoundi, M.; Kuhls, K.; Cannet, A.; Votýpka, J.; Marty, P.; Delaunay, P.; Sereno, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10* (3), 1–40. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349.

(10) Cecílio, P.; Cordeiro-da-Silva, A.; Oliveira, F. Sand Flies: Basic Information on the Vectors of Leishmaniasis and Their Interactions with Leishmania Parasites. *Commun.*

Biol. **2022**, *5* (1). https://doi.org/10.1038/s42003-022-03240-z.

(11) Chatelain, E. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. *J. Biomol. Screen.* **2015**, *20* (1), 22–35. https://doi.org/10.1177/1087057114550585.

(12) Burza, S.; Croft, S. L.; Boelaert, M. Leishmaniasis. *Lancet* **2018**, *392* (10151), 951–970. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2.

(13) Nagle, A. S.; Khare, S.; Kumar, A. B.; Supek, F.; Buchynskyy, A.; Mathison, C. J. N.; Chennamaneni, N. K.; Pendem, N.; Buckner, F. S.; Gelb, M. H.; Molteni, V. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (22), 11305–11347. https://doi.org/10.1021/cr500365f.

(14) Nunes, M. C. P.; Dones, W.; Morillo, C. A.; Encina, J. J.; Ribeiro, A. L. Chagas Disease: An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2013**, *62* (9), 767–776. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046.

(15) Karimi, A.; Alborzi, A.; Amanati, A. Visceral Leishmaniasis: An Update and Literature Review. *Arch. Pediatr. Infect. Dis.* **2016**, *4* (3). https://doi.org/10.5812/pedinfect.31612.

(16) Torchelsen, F. K. V. da S.; Mazzeti, A. L.; Mosqueira, V. C. F. Drugs in Preclinical and Early Clinical Development for the Treatment of Chagas´s Disease: The Current Status. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2024**, *33* (6), 575–590. https://doi.org/10.1080/13543784.2024.2349289.

(17) Singh, R.; Kashif, M.; Srivastava, P.; Manna, P. P. Recent Advances in Chemotherapeutics for Leishmaniasis: Importance of the Cellular Biochemistry of the Parasite and Its Molecular Interaction with the Host. *Pathogens* **2023**, *12* (5). https://doi.org/10.3390/pathogens12050706.

(18) Ponte-Sucre, A.; Gamarro, F.; Dujardin, J. C.; Barrett, M. P.; López-Vélez, R.; García-Hernández, R.; Pountain, A. W.; Mwenechanya, R.; Papadopoulou, B. Drug Resistance and Treatment Failure in Leishmaniasis: A 21st Century Challenge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11* (12), e0006052. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052.

(19) Paucar, R.; Moreno-Viguri, E.; Pérez-Silanes, S. Challenges in Chagas Disease Drug Discovery: A Review. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 3154–3170. https://doi.org/10.2174/0929867323999160625l.

(20) Freitas-Junior, L. H.; Chatelain, E.; Kim, H. A.; Siqueira-Neto, J. L. Visceral Leishmaniasis Treatment: What Do We Have, What Do We Need and How to Deliver It? *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2012**, *2*, 11–19. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.01.003.

(21) Dorlo, T. P. C.; Balasegaram, M.; Beijnen, J. H.; de vries, P. J. Miltefosine: A Review of Its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67* (11), 2576–2597. https://doi.org/10.1093/jac/dks275.

(22) Majumder, N.; Banerjee, A.; Saha, S. A Review on New Natural and Synthetic Anti-Leishmanial Chemotherapeutic Agents and Current Perspective of Treatment Approaches. *Acta Trop.* **2023**, *240* (November 2022), 106846. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106846.

(23) De Rycker, M.; Wyllie, S.; Horn, D.; Read, K. D.; Gilbert, I. H. Anti-Trypanosomatid Drug Discovery: Progress and Challenges. *Nat. Rev. Microbiol.* **2023**, *21* (1), 35–50. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00777-y.

(24) Pinazo, M. J.; Malchiodi, E.; Ioset, J. R.; Bivona, A.; Gollob, K. J.; Dutra, W. O. Challenges and Advancements in the Development of Vaccines and Therapies against Chagas Disease. *The Lancet Microbe* **2024**, *5*, 100972. https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2024.100972.

(25) Peña, I.; Pilar Manzano, M.; Cantizani, J.; Kessler, A.; Alonso-Padilla, J.; Bardera, A. I.; Alvarez, E.; Colmenarejo, G.; Cotillo, I.; Roquero, I.; De Dios-Anton, F.; Barroso, V.; Rodriguez, A.; Gray, D. W.; Navarro, M.; Kumar, V.; Sherstnev, A.; Drewry, D. H.; Brown, J. R.; Fiandor, J. M.; Julio Martin, J. New Compound Sets Identified from High Throughput Phenotypic Screening against Three Kinetoplastid Parasites: An Open Resource. *Sci. Rep.* **2015**, *5*. https://doi.org/10.1038/srep08771.

(26) Katsuno, K.; Burrows, J. N.; Duncan, K.; Van Huijsduijnen, R. H.; Kaneko, T.; Kita, K.; Mowbray, C. E.; Schmatz, D.; Warner, P.; Slingsby, B. T. Hit and Lead Criteria in Drug Discovery for Infectious Diseases of the Developing World. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14* (11), 751–758. https://doi.org/10.1038/nrd4683.

(27) Patrick, D. A.; Wenzler, T.; Yang, S.; Weiser, P. T.; Wang, M. Z.; Brun, R.; Tidwell, R. R. Synthesis of Novel Amide and Urea Derivatives of Thiazol-2-Ethylamines and Their Activity against Trypanosoma Brucei Rhodesiense. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24*,

2451–2465. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.04.006.

(28) Patrick, D. A.; Gillespie, J. R.; McQueen, J.; Hulverson, M. A.; Ranade, R. M.; Creason, S. A.; Herbst, Z. M.; Gelb, M. H.; Buckner, F. S.; Tidwell, R. R. Urea Derivatives of 2-Aryl-Benzothiazol-5-Amines: A New Class of Potential Drugs for Human African Trypanosomiasis. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 957–971. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01163.

(29) Russell, S.; Rahmani, R.; Jones, A. J.; Newson, H. L.; Neilde, K.; Cotillo, I.; Rahmani Khajouei, M.; Ferrins, L.; Qureishi, S.; Nguyen, N.; Martinez-Martinez, M. S.; Weaver, D. F.; Kaiser, M.; Riley, J.; Thomas, J.; De Rycker, M.; Read, K. D.; Flematti, G. R.; Ryan, E.; Tanghe, S.; Rodriguez, A.; Charman, S. A.; Kessler, A.; Avery, V. M.; Baell, J. B.; Piggott, M. J. Hit-to-Lead Optimization of a Novel Class of Potent, Broad-Spectrum Trypanosomacides. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9686–9720. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00442.

(30) Varghese, S.; Rahmani, R.; Russell, S.; Deora, G. S.; Ferrins, L.; Toynton, A.; Jones, A.; Sykes, M.; Kessler, A.; Eufrásio, A.; Cordeiro, A. T.; Sherman, J.; Rodriguez, A.; Avery, V. M.; Piggott, M. J.; Baell, J. B. Discovery of Potent N-Ethylurea Pyrazole Derivatives as Dual Inhibitors of Trypanosoma Brucei and Trypanosoma Cruzi. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 278–285. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00218.

(31) Lemos, J. M.; Brito Da Silva, M. F.; Dos Santos Carvalho, A. M.; Vicente Gil, H. Pietro; Fiaia Costa, V. A.; Andrade, C. H.; Braga, R. C.; Grellier, P.; Muratov, E. N.; Charneau, S.; Moreira-Filho, J. T.; Dourado Bastos, I. M.; Neves, B. J. Multitask Learning-Driven Identification of Novel Antitrypanosomal Compounds. *Future Med. Chem.* **2023**, *15* (16), 1449–1467. https://doi.org/10.4155/fmc-2023-0074.

(32) Don, R.; Ioset, J. R. Screening Strategies to Identify New Chemical Diversity for Drug Development to Treat Kinetoplastid Infections. *Parasitology* **2014**, *141*, 140–146. https://doi.org/10.1017/S003118201300142X.

(33) Chatelain, E.; Scandale, I. Animal Models of Chagas Disease and Their Translational Value to Drug Development. *Expert Opin. Drug Discov.* **2020**, *15* (12), 1381–1402. https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1806233.

(34) Thompson, A. M.; O'Connor, P. D.; Marshall, A. J.; Blaser, A.; Yardley, V.; Maes, L.; Gupta, S.; Launay, D.; Braillard, S.; Chatelain, E.; Wan, B.; Franzblau, S. G.; Ma, Z.;

Cooper, C. B.; Denny, W. A. Development of (6 R)-2-Nitro-6-[4-(Trifluoromethoxy)Phenoxy]-6,7-Dihydro-5 H -Imidazo[2,1- b] [1,3]Oxazine (DNDI-8219): A New Lead for Visceral Leishmaniasis. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (6), 2329–2352. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01581.

(35) Zulfiqar, B.; Shelper, T. B.; Avery, V. M. Leishmaniasis Drug Discovery: Recent Progress and Challenges in Assay Development. *Drug Discov. Today* **2017**, *22* (10), 1516–1531. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.004.

(36) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717. https://doi.org/10.1038/srep42717.

(37) Nassar, A. E. F.; Kamel, A. M.; Clarimont, C. Improving the Decision-Making Process in Structural Modification of Drug Candidates: Enhancing Metabolic Stability. *Drug Discov. Today* **2004**, *9* (23), 1020–1028. https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03280-5.

(38) Miller, R. R.; Madeira, M.; Wood, H. B.; Geissler, W. M.; Raab, C. E.; Martin, I. J. Integrating the Impact of Lipophilicity on Potency and Pharmacokinetic Parameters Enables the Use of Diverse Chemical Space during Small Molecule Drug Optimization. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (21), 12156–12170. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01813.

(39) Arnott, J. A.; Planey, S. L. The Influence of Lipophilicity in Drug Discovery and Design. *Expert Opin. Drug Discov.* **2012**, *7* (10), 863–875. https://doi.org/10.1517/17460441.2012.714363.

(40) Brenk, R.; Schipani, A.; James, D.; Krasowski, A.; Gilbert, I. H.; Frearson, J.; Wyatt, P. G. Lessons Learnt from Assembling Screening Libraries for Drug Discovery for Neglected Diseases. *ChemMedChem* **2008**, *3* (3), 435–444. https://doi.org/10.1002/cmdc.200700139.

(41) Peacock, C. S.; Seeger, K.; Harris, D.; Murphy, L.; Ruiz, J. C.; Quail, M. A.; Peters, N.; Adlem, E.; Tivey, A.; Aslett, M.; Kerhornou, A.; Ivens, A.; Fraser, A.; Rajandream, M. A.; Carver, T.; Norbertczak, H.; Chillingworth, T.; Hance, Z.; Jagels, K.; Moule, S.; Ormond, D.; Rutter, S.; Squares, R.; Whitehead, S.; Rabbinowitsch, E.; Arrowsmith, C.; White, B.; Thurston, S.; Bringaud, F.; Baldauf, S. L.; Faulconbridge, A.; Jeffares, D.;

Depledge, D. P.; Oyola, S. O.; Hilley, J. D.; Brito, L. O.; Tosi, L. R. O.; Barrell, B.; Cruz, A. K.; Mottram, J. C.; Smith, D. F.; Berriman, M. Comparative Genomic Analysis of Three Leishmania Species That Cause Diverse Human Disease. *Nat. Genet.* **2007**, *39* (7), 839–847. https://doi.org/10.1038/ng2053.

(42) Rogers, M. B.; Hilley, J. D.; Dickens, N. J.; Wilkes, J.; Bates, P. A.; Depledge, D. P.; Harris, D.; Her, Y.; Herzyk, P.; Imamura, H.; Otto, T. D.; Sanders, M.; Seeger, K.; Dujardin, J. C.; Berriman, M.; Smith, D. F.; Hertz-Fowler, C.; Mottram, J. C. Chromosome and Gene Copy Number Variation Allow Major Structural Change between Species and Strains of Leishmania. *Genome Res.* **2011**, *21* (12), 2129–2142. https://doi.org/10.1101/gr.122945.111.

(43) Baell, J. B.; Holloway, G. A. New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (7), 2719–2740. https://doi.org/10.1021/jm901137j.

(44) Leeson, P. D.; Springthorpe, B. The Influence of Drug-like Concepts on Decision-Making in Medicinal Chemistry. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6* (11), 881–890. https://doi.org/10.1038/nrd2445.

(45) Tsopelas, F.; Giaginis, C.; Tsantili-Kakoulidou, A. Lipophilicity and Biomimetic Properties to Support Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2017**, *12* (9), 885–896. https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1344210.

(46) Leeson, P. D. Molecular Inflation, Attrition and the Rule of Five. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *101*, 22–33. https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.018.

(47) Tarcsay, Á.; Nyíri, K.; Keserű, G. M. Impact of Lipophilic Efficiency on Compound Quality. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (3), 1252–1260. https://doi.org/10.1021/jm201388p.

(48) Das, N.; Roy, J.; Patra, B.; Saunders, E.; Sarkar, D.; Goon, S.; Sinha, B. P.; Roy, S.; Roy, S.; Sarif, J.; Bandopadhyay, P.; Barik, S.; Mukherjee, S.; McNamara, N.; Varghese, S.; Simpson, K.; Baell, J.; McConville, M.; Ganguly, D.; Talukdar, A. Hit-to-Lead Optimization of 2-Aminoquinazolines as Anti-Microbial Agents against Leishmania Donovani. *Eur. J. Med. Chem.* **2024**, *269* (November 2023), 116256. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116256.

(49) McGonagle, K.; Tarver, G. J.; Cantizani, J.; Cotillo, I.; Dodd, P. G.; Ferguson, L.; Gilbert, I. H.; Marco, M.; Miles, T.; Naylor, C.; Osuna-Cabello, M.; Paterson, C.; Read,

K. D.; Pinto, E. G.; Riley, J.; Scullion, P.; Shishikura, Y.; Simeons, F.; Stojanovski, L.; Svensen, N.; Thomas, J.; Wyatt, P. G.; Manzano, P.; De Rycker, M.; Thomas, M. G. Identification and Development of a Series of Disubstituted Piperazines for the Treatment of Chagas Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *238*, 114421. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114421.

(50) Freitas de Lima Hercos, G.; Gabriela Faleiro de Moura Lodi Cruz, M.; Clara Cassiano Martinho, A.; de Melo Resende, D.; Farago Nascimento, D.; Derksen Macruz, P.; Jorge Pilau, E.; Maria Fonseca Murta, S.; de Oliveira Rezende Júnior, C. Optimization of Benzenesulfonyl Derivatives as Anti-Trypanosomatidae Agents: Structural Design, Synthesis, and Pharmacological Assessment against Trypanosoma Cruzi and Leishmania Infantum. *Bioorganic Med. Chem.* **2024**, *105* (March), 117736. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2024.117736.

(51) Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. High Throughput Artificial Membrane Permeability Assay for Blood-Brain Barrier. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38* (3), 223–232. https://doi.org/10.1016/S0223-5234(03)00012-6.

(52) Pérez, D. I.; Pistolozzi, M.; Palomo, V.; Redondo, M.; Fortugno, C.; Gil, C.; Felix, G.; Martinez, A.; Bertucci, C. 5-Imino-1,2-4-Thiadiazoles and Quinazolines Derivatives as Glycogen Synthase Kinase 3β (GSK-3β) and Phosphodiesterase 7 (PDE7) Inhibitors: Determination of Blood-Brain Barrier Penetration and Binding to Human Serum Albumin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *45* (5), 677–684. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.01.007.

(53) Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. Physicochemical High Throughput Screening : Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (7), 1007–1010. https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jm970530e.

(54) Uliana, S. R. B.; Trinconi, C. T.; Coelho, A. C. Chemotherapy of Leishmaniasis: Present Challenges. *Parasitology* **2018**, *145*, 464–480. https://doi.org/10.1017/S0031182016002523.

(55) Alex, A.; Millan, D. S.; Perez, M.; Wakenhut, F.; Whitlock, G. A. Intramolecular Hydrogen Bonding to Improve Membrane Permeability and Absorption in beyond Rule of Five Chemical Space. *Medchemcomm* **2011**, *2*, 669–674.

https://doi.org/10.1039/c1md00093d.

(56) Kuhn, B.; Mohr, P.; Stahl, M. Intramolecular Hydrogen Bonding in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2601–2611. https://doi.org/10.1021/jm100087s.

(57) Ettorre, A.; D'Andrea, P.; Mauro, S.; Porcelloni, M.; Rossi, C.; Altamura, M.; Catalioto, R. M.; Giuliani, S.; Maggi, C. A.; Fattori, D. HNK2 Receptor Antagonists. the Use of Intramolecular Hydrogen Bonding to Increase Solubility and Membrane Permeability. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1807–1809. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.01.074.

(58) Subbaiah, M. A. M.; Meanwell, N. A. Bioisosteres of the Phenyl Ring: Recent Strategic Applications in Lead Optimization and Drug Design. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (19), 14046–14128. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01215.

(59) Ohe, T.; Mashino, T.; Hirobe, M. Novel Metabolic Pathway of Arylethers by Cytochrome P450: Cleavage of the Oxygen-Aromatic Ring Bond Accompanying Ipso-Substitution by the Oxygen-Atom of the Active Species in Cytochrome P450 Models and Cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *310* (2), 402–409. https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1185.

(60) Nwaka, S.; Ramirez, B.; Brun, R.; Maes, L.; Douglas, F.; Ridley, R. Advancing Drug Innovation for Neglected Diseases - Criteria for Lead Progression. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2009**, *3* (8). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000440.

(61) de Moura Lodi Cruz, M. G. F.; Santi, A. M. M.; de Morais-Teixeira, E.; Caldeira, A. S. P.; de Siqueira, E. P.; Oliveira, E.; de Almeida Alves, T. M.; Murta, S. M. F. Anti-Leishmania Compounds Can Be Screened Using Leishmania Spp. Expressing Red Fluorescence (TdTomato). *Antimicrob. Agents Chemother.* **2024**, *68* (1), 1–21. https://doi.org/10.1128/aac.00509-23.

(62) Ma, J.; Motsinger-Reif, A. Current Methods for Quantifying Drug Synergism. *Proteomics Bioinforma.* **2019**, *1* (2), 43–48.

(63) Loiseau, P.; Bories, C. Mechanisms of Drug Action and Drug Resistance in Leishmania as Basis for Therapeutic Target Identification and Design of Antileishmanial Modulators. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 539–550. https://doi.org/10.2174/156802606776743165.

(64) Frézard, F.; Demicheli, C.; Ribeiro, R. R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules* **2009**, *14*, 2317–2336. https://doi.org/10.3390/molecules14072317.

(65) Hennessey, V. G.; Rosner, G. L.; Bast, R. C.; Chen, M. Y. A Bayesian Approach to Dose-Response Assessment and Synergy and Its Application to In Vitro Dose-Response Studies. *Biometrics* **2010**, *66*, 1275–1283. https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2010.01403.x.

(66) Azas, N.; Di Giorgio, C.; Delmas, F.; Gasquet, M.; Timon-David, P. Leishmania Infantum Promastigotes: Flow Cytometry as a Possible Tool for Assessing the Effects of Drugs on Cellular Functions. *Exp. Parasitol.* **1997**, *87* (1), 1–7. https://doi.org/10.1006/expr.1997.4182.

(67) Shapiro, H. M.; Natale, P. J.; Kamentsky, L. A. Estimation of Membrane Potentials of Individual Lymphocytes by Flow Cytometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76* (11), 5728–5730. https://doi.org/10.1073/pnas.76.11.5728.

(68) Amlabu, W. E.; Antwi, C. A.; Awandare, G.; Gwira, T. M. Elucidating the Possible Mechanism of Action of Some Pathogen Box Compounds against Leishmania Donovani. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14* (4), e0008188. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008188.

(69) Magalhães, T. B. dos S.; Silva, D. K. C.; Teixeira, J. da S.; De Lima, J. D. T.; Barbosa-Filho, J. M.; Moreira, D. R. M.; Guimarães, E. T.; Soares, M. B. P. A Betulinic Acid Derivative, BA5, Induces G0/G1 Cell Arrest, Apoptosis Like-Death, and Morphological Alterations in Leishmania Sp. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 846123. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.846123.

(70) Slater, A. F. G.; Stefan, C.; Nobel, I.; Van Den Dobbelsteen, D. J.; Orrenius, S. Signalling Mechanisms and Oxidative Stress in Apoptosis. *Toxicol. Lett.* **1995**, *82/83*, 149–153. https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03474-9.

(71) Jiang, Y.; Wang, X.; Hu, D. Furanodienone Induces G0/G1 Arrest and Causes Apoptosis via the Ros/Mapks-Mediated Caspase-Dependent Pathway in Human Colorectal Cancer Cells: A Study in Vitro and in Vivo. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2815. https://doi.org/10.1038/cddis.2017.220.

(72) Borba, J. V. B.; Silva, A. C.; Ramos, P. I. P.; Grazzia, N.; Miguel, D. C.; Muratov, E.

N.; Furnham, N.; Andrade, C. H. Unveiling the Kinomes of Leishmania Infantum and L. Braziliensis Empowers the Discovery of New Kinase Targets and Antileishmanial Compounds. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2019**, *17*, 352–361. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.02.005.

(73) Efstathiou, A.; Smirlis, D. Leishmania Protein Kinases: Important Regulators of the Parasite Life Cycle and Molecular Targets for Treating Leishmaniasis. *Microorganisms* **2021**, *9*, 691. https://doi.org/10.3390/microorganisms9040691.

(74) Martínez de Iturrate, P.; Sebastián-Pérez, V.; Nácher-Vázquez, M.; Tremper, C. S.; Smirlis, D.; Martín, J.; Martínez, A.; Campillo, N. E.; Rivas, L.; Gil, C. Towards Discovery of New Leishmanicidal Scaffolds Able to Inhibit Leishmania GSK-3. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35* (1), 199–210. https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1693704.

(75) Nation, C. S.; Stephany-Brassesco, I.; Kelly, B. L.; Pizarro, J. C. Transgenic Overexpression of Heat Shock Protein (HSP83) Enhances Protein Kinase A Activity, Disrupts GP63 Surface Protease Expression and Alters Promastigote Morphology in Leishmania Amazonensis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2023**, *255*, 111574. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2023.111574.

(76) Baker, N.; Catta-Preta, C. M. C.; Neish, R.; Sadlova, J.; Powell, B.; Alves-Ferreira, E. V. C.; Geoghegan, V.; Carnielli, J. B. T.; Newling, K.; Hughes, C.; Vojtkova, B.; Anand, J.; Mihut, A.; Walrad, P. B.; Wilson, L. G.; Pitchford, J. W.; Volf, P.; Mottram, J. C. Systematic Functional Analysis of Leishmania Protein Kinases Identifies Regulators of Differentiation or Survival. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1244. https://doi.org/10.1038/s41467-021-21360-8.

(77) Wandinger, S. K.; Richter, K.; Buchner, J. The Hsp90 Chaperone Machinery. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (27), 18473–18477. https://doi.org/10.1074/jbc.R800007200.

(78) Sahasrabudhe, P.; Rohrberg, J.; Biebl, M. M.; Rutz, D. A.; Buchner, J. The Plasticity of the Hsp90 Co-Chaperone System. *Mol. Cell* **2017**, *67*, 947-961.e5. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.004.

(79) Prasanna, P.; Upadhyay, A. Heat Shock Proteins as the Druggable Targets in Leishmaniasis: Promises and Perils. *Infect. Immun.* **2021**, *89* (2), e00559-20. https://doi.org/10.1128/IAI.00559-20.

(80) Handy, D. E.; Loscalzo, J. Redox Regulation of Mitochondrial Function. *Antioxidants Redox Signal.* **2012**, *16* (11), 1323–1367. https://doi.org/10.1089/ars.2011.4123.

(81) Tomás, A. M.; Castro, H. Redox Metabolism in Mitochondria of Trypanosomatids. *Antioxidants Redox Signal.* **2013**, *19* (7), 696–707. https://doi.org/10.1089/ars.2012.4948.

(82) Turrens, J. F. Oxidative Stress and Antioxidant Defenses: A Target for the Treatment of Diseases Caused by Parasitic Protozoa. *Mol. Aspects Med.* **2004**, *25*, 211–220. https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.02.021.

(83) Prakash, K.; Goyal, M.; Soni, A.; Siddiqui, A. J.; Bhardwaj, J.; Puri, S. K. Molecular Cloning and Biochemical Characterization of Iron Superoxide Dismutase from the Rodent Malaria Parasite Plasmodium Vinckei. *Parasitol. Int.* **2014**, *63*, 817–825. https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.07.004.

(84) Miller, A. F. Superoxide Dismutases: Active Sites That Save, but a Protein That Kills. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 162–168. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.02.011.

(85) O'Shea, I. P.; Shahed, M.; Aguilera-Venegas, B.; Wilkinson, S. R. Evaluating 5-Nitrothiazoles as Trypanocidal Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (2), 1137–1140. https://doi.org/10.1128/AAC.02006-15.

(86) Papadopoulou, M. V.; Bloomer, W. D.; Rosenzweig, H. S.; Wilkinson, S. R.; Szular, J.; Kaiser, M. Antitrypanosomal Activity of 5-Nitro-2-Aminothiazole-Based Compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *117*, 179–186. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.04.010.

(87) Annoura, T.; Nara, T.; Makiuchi, T.; Hashimoto, T.; Aoki, T. The Origin of Dihydroorotate Dehydrogenase Genes of Kinetoplastids, with Special Reference to Their Biological Significance and Adaptation to Anaerobic, Parasitic Conditions. *J. Mol. Evol.* **2005**, *60* (1), 113–127. https://doi.org/10.1007/s00239-004-0078-8.

(88) Arakaki, T. L.; Buckner, F. S.; Gillespie, J. R.; Malmquist, N. A.; Phillips, M. A.; Kalyuzhniy, O.; Luft, J. R.; DeTitta, G. T.; Verlinde, C. L. M. J.; Van Voorhis, W. C.; Hol, W. G. J.; Merritt, E. A. Characterization of Trypanosoma Brucei Dihydroorotate Dehydrogenase as a Possible Drug Target; Structural, Kinetic and RNAi Studies. *Mol. Microbiol.* **2008**, *68* (1), 37–50. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06131.x.

(89) Senisterra, G.; Chau, I.; Vedadi, M. Thermal Denaturation Assays in Chemical Biology.

Assay Drug Dev. Technol. **2012**, *10* (2), 128–136. https://doi.org/10.1089/adt.2011.0390.

(90) Reinhard, L.; Mayerhofer, H.; Geerlof, A.; Mueller-Dieckmann, J.; Weiss, M. S. Optimization of Protein Buffer Cocktails Using Thermofluor. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2013**, *69*, 209–214. https://doi.org/10.1107/S1744309112051858.

(91) Matulis, D.; Kranz, J. K.; Salemme, F. R.; Todd, M. J. Thermodynamic Stability of Carbonic Anhydrase: Measurements of Binding Affinity and Stoichiometry Using Thermofluor. *Biochemistry* **2005**, *44* (13), 5258–5266. https://doi.org/10.1021/bi048135v.

(92) Bansagi, J.; Wilson-Konderka, C.; Debrauwer, V.; Narayanan, P.; Batey, R. A. N-Alkyl Carbamoylimidazoles as Isocyanate Equivalents: Exploration of the Reaction Scope for the Synthesis of Ureas, Hydantoins, Carbamates, Thiocarbamates, and Oxazolidinones. *J. Org. Chem.* **2022**, *87*, 11329–11349. https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c00803.

(93) Ghosh, A. K.; Brindisi, M. Urea Derivatives in Modern Drug Discovery and Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 2751–2788. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01541.

(94) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3–25. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1.

(95) Shackleford, D. M.; Chiu, F. C. K.; Katneni, K.; Blundell, S.; McLaren, J.; Wang, X.; Zhou, L.; Sriraghavan, K.; Alker, A. M.; Hunziker, D.; Scheurer, C.; Zhao, Q.; Dong, Y.; Möhrle, J. J.; Abla, N.; Matile, H.; Wittlin, S.; Vennerstrom, J. L.; Charman, S. A. Cytochrome P450-Mediated Metabolism and CYP Inhibition for the Synthetic Peroxide Antimalarial OZ439. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7*, 1885–1893. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00225.

(96) Espinoza-Chávez, R. M.; de Oliveira Rezende Júnior, C.; Laureano de Souza, M.; Consolin Chelucci, R.; Michelan-Duarte, S.; Krogh, R.; Gomes Ferreira, L. L.; Valli, M.; Sena de Oliveira, A.; Andricopulo, A. D.; Carlos Dias, L. Structure-Metabolism Relationships of Benzimidazole Derivatives with Anti-Trypanosoma Cruzi Activity for Chagas Disease. *ChemMedChem* **2024**, *19*, e202400293.

https://doi.org/10.1002/cmdc.202400293.

(97) Orlando, L. M. R.; Lechuga, G. C.; Lara, L. da S.; Ferreira, B. S.; Pereira, C. N.; Silva, R. C.; Dos Santos, M. S.; Pereira, M. C. S. Structural Optimization and Biological Activity of Pyrazole Derivatives: Virtual Computational Analysis, Recovery Assay and 3d Culture Model as Potential Predictive Tools of Effectiveness against Trypanosoma Cruzi. *Molecules* **2021**, *26*, 6472. https://doi.org/10.3390/molecules26216742.

(98) Cal, M.; Ioset, J. R.; Fügi, M. A.; Mäser, P.; Kaiser, M. Assessing Anti-T. Cruzi Candidates in Vitro for Sterile Cidality. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2016**, *6*, 165–170. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.08.003.

(99) Lin, C.; Hulpia, F.; Da Silva, C. F.; Batista, D. D. G. J.; Van Hecke, K.; Maes, L.; Caljon, G.; Soeiro, M. D. N. C.; Van Calenbergh, S. Discovery of Pyrrolo[2,3- b]Pyridine (1,7-Dideazapurine) Nucleoside Analogues as Anti- Trypanosoma Cruzi Agents. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (19), 8847–8865. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01275.

(100) MacLean, L. M.; Thomas, J.; Lewis, M. D.; Cotillo, I.; Gray, D. W.; De Rycker, M. Development of Trypanosoma Cruzi in Vitro Assays to Identify Compounds Suitable for Progression in Chagas' Disease Drug Discovery. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12* (7), e0006612. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006612.

(101) Calvet, C. M.; Choi, J. Y.; Thomas, D.; Suzuki, B.; Hirata, K.; Lostracco-Johnson, S.; de Mesquita, L. B.; Nogueira, A.; Meuser-Batista, M.; Silva, T. A.; Siqueira-Neto, J. L.; Roush, W. R.; de Souza Pereira, M. C.; McKerrow, J. H.; Podust, L. M. 4-Aminopyridyl-Based Lead Compounds Targeting CYP51 Prevent Spontaneous Parasite Relapse in a Chronic Model and Improve Cardiac Pathology in an Acute Model of Trypanosoma Cruzi Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11* (12), e0006132. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006132.

(102) De Souza, M. L.; De Oliveira Rezende Junior, C.; Ferreira, R. S.; Espinoza Chávez, R. M.; Ferreira, L. L. G.; Slafer, B. W.; Magalhães, L. G.; Krogh, R.; Oliva, G.; Cruz, F. C.; Dias, L. C.; Andricopulo, A. D. Discovery of Potent, Reversible, and Competitive Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity: A Structure-Based Drug Design Approach. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60*, 1028–1041. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00802.

(103) Pauli, I.; Rezende, C. de O.; Slafer, B. W.; Dessoy, M. A.; de Souza, M. L.; Ferreira, L.

L. G.; Adjanohun, A. L. M.; Ferreira, R. S.; Magalhães, L. G.; Krogh, R.; Michelan-Duarte, S.; Del Pintor, R. V.; da Silva, F. B. R.; Cruz, F. C.; Dias, L. C.; Andricopulo, A. D. Multiparameter Optimization of Trypanocidal Cruzain Inhibitors With In Vivo Activity and Favorable Pharmacokinetics. *Front. Pharmacol.* **2022**, *12*, 774069. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.774069.

(104) Medeiros, A. R.; Ferreira, L. L. G.; de Souza, M. L.; Rezende Junior, C. de O.; Espinoza-Chávez, R. M.; Dias, L. C.; Andricopulo, A. D. Chemoinformatics Studies on a Series of Imidazoles as Cruzain Inhibitors. *Biomolecules* **2021**, *11*, 579. https://doi.org/10.3390/biom11040579.

(105) Azzouz, S.; Lawton, P. In Vitro Effects of Purine and Pyrimidine Analogues on Leishmania Donovani and Leishmania Infantum Promastigotes and Intracellular Amastigotes. *Acta Parasitol.* **2017**, *62* (3), 582–588. https://doi.org/10.1515/ap-2017-0070.

(106) Walum, E. Acute Oral Toxicity. *Environ. Health Perspect.* **1998**, *106* (SUPPL. 2), 497–503. https://doi.org/10.1289/ehp.98106497.

(107) Mačianskienė, R.; Zigmantaitė, V.; Andriulė, I.; Pangonytė, D.; Sadauskienė, I.; Arandarčikaitė, O.; Stankevičius, A.; Grigas, J.; Pautienius, A.; Treinys, R.; Navalinskas, A.; Grigalevičiūtė, R.; Kučinskas, A.; Pudžiuvelytė, L.; Bernatonienė, J.; Jurevičius, J. Acute and Sub-Chronic Intraperitoneal Toxicity Studies of the Elsholtzia Ciliata Herbal Extract in Balb/c Mice. *Pharmaceutics* **2023**, *15* (10). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15102417.

(108) Sugano, K.; Hamada, H.; Machida, M.; Ushio, H.; Saitoh, K.; Terada, K. Optimized Conditions of Bio-Mimetic Artificial Membrane Permeation Assay. *Int. J. Pharm.* **2001**, *228*, 181–188. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00845-6.

(109) Fortuna, A.; Alves, G.; Soares-da-Silva, P.; Falcão, A. Optimization of a Parallel Artificial Membrane Permeability Assay for the Fast and Simultaneous Prediction of Human Intestinal Absorption and Plasma Protein Binding of Drug Candidates: Application to Dibenz[b,f]Azepine-5-Carboxamide Derivatives. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101* (2), 530–540. https://doi.org/10.1002/jps.22796.

(110) Zhu, C.; Jiang, L.; Chen, T. M.; Hwang, K. K. A Comparative Study of Artificial Membrane Permeability Assay for High Throughput Profiling of Drug Absorption

Potential. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 399–407. https://doi.org/10.1016/S0223-5234(02)01360-0.

(111) Di, L.; Kerns, E. H.; Li, S. Q.; Petusky, S. L. High Throughput Microsomal Stability Assay for Insoluble Compounds. *Int. J. Pharm.* **2006**, *317*, 54–60. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.03.007.

(112) Ulenberg, S.; Belka, M.; Król, M.; Herold, F.; Hewelt-Belka, W.; Kot-Wasik, A.; Baczek, T. Prediction of Overall in Vitro Microsomal Stability of Drug Candidates Based on Molecular Modeling and Support Vector Machines. Case Study of Novel Arylpiperazines Derivatives. *PLoS One* **2015**, *10* (3), e0122772. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122772.

(113) Barltrop, J. A.; Owen, T. C.; Cory, A. H.; Cory, J. G. 5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-Dimethylthiazolyl)-3-(4-Sulfophenyl)Te Trazolium, Inner Salt (MTS) and Related Analogs of 3-(4,5-Dimethylthiazolyl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reducing to Purple Water-Soluble Formazans As Cell-Viability Indica. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1991**, *1* (11), 611–614. https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)81162-8.

(114) Ali, R.; Tabrez, S.; Akand, S. K.; Rahman, F.; Husein, A.; Arish, M.; Alqahtani, A. S.; Ahmed, M. Z.; Husain, M.; Rub, A. Sesamol Induces Apoptosis-Like Cell Death in Leishmania Donovani. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 749420. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.749420.

(115) Aloui, Z.; Messaoud, C.; Haoues, M.; Neffati, N.; Bassoumi Jamoussi, I.; Essafi-Benkhadir, K.; Boussaid, M.; Guizani, I.; Karoui, H. Asteraceae Artemisia Campestris and Artemisia Herba-Alba Essential Oils Trigger Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Leishmania Infantum Promastigotes. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2016**, *2016*, 9147096. https://doi.org/10.1155/2016/9147096.

(116) Froes, T. Q.; Guido, R. V. C.; Metwally, K.; Castilho, M. S. A Novel Scaffold to Fight Pseudomonas Aeruginosa Pyocyanin Production: Early Steps to Novel Antivirulence Drugs. *Future Med. Chem.* **2020**, *12* (16), 1489–1503. https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0351.

(117) Batista, F. A. H.; Ramos, S. L.; Tassone, G.; Leitão, A.; Montanari, C. A.; Botta, M.; Mori, M.; Borges, J. C. Discovery of Small Molecule Inhibitors of Leishmania Braziliensis Hsp90 Chaperone. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35* (1), 639–649.

https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1726342.

(118) Grøftehauge, M. K.; Hajizadeh, N. R.; Swann, M. J.; Pohl, E. Protein-Ligand Interactions Investigated by Thermal Shift Assays (TSA) and Dual Polarization Interferometry (DPI). *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2015**, *71*, 36–44. https://doi.org/10.1107/S1399004714016617.

(119) McGaw, E. A.; Phinney, K. W.; Lowenthal, M. S. Comparison of Orthogonal Liquid and Gas Chromatography-Mass Spectrometry Platforms for the Determination of Amino Acid Concentrations in Human Plasma. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (37), 5822–5831. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.025.

(120) Lombardo, F.; Obach, R. S.; Shalaeva, M. Y.; Gao, F. Prediction of Volume of Distribution Values in Humans for Neutral and Basic Drugs Using Physicochemical Measurements and Plasma Protein Binding Data. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (13), 2867–2876. https://doi.org/10.1021/jm0200409.

(121) Lombardo, F.; Obach, R. S.; Shalaeva, M. Y.; Gao, F. Prediction of Human Volume of Distribution Values for Neutral and Basic Drugs. 2. Extended Data Set and Leave-Class-Out Statistics. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (5), 1242–1250. https://doi.org/10.1021/jm030408h.

(122) Chávez-Fumagalli, M. A.; Schneider, M. S.; Lage, D. P.; Tavares, G. D. S. V.; Mendonça, D. V. C.; Santos, T. T. D. O.; Pádua, R. M.; Machado-De-Ávila, R. A.; Leite, J. P. V.; Coelho, E. A. F. A Computational Approach Using Bioinformatics to Screening Drug Targets for Leishmania Infantum Species. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2018**, *2018*, 6813467. https://doi.org/10.1155/2018/6813467.

(123) Gallo, K.; Goede, A.; Preissner, R.; Gohlke, B. O. SuperPred 3.0: Drug Classification and Target Prediction - a Machine Learning Approach. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, W726–W731. https://doi.org/10.1093/nar/gkac297.

(124) Gfeller, D.; Grosdidier, A.; Wirth, M.; Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissTargetPrediction: A Web Server for Target Prediction of Bioactive Small Molecules. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, W32–W38. https://doi.org/10.1093/nar/gku293.

(125) Lagunin, A.; Stepanchikova, A.; Filimonov, D.; Poroikov, V. PASS: Prediction of Activity Spectra for Biologically Active Substances. *Bioinformatics* **2000**, *16* (8), 747–748. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.8.747.

(126) Liu, X.; Ouyang, S.; Yu, B.; Liu, Y.; Huang, K.; Gong, J.; Zheng, S.; Li, Z.; Li, H.; Jiang, H. PharmMapper Server: A Web Server for Potential Drug Target Identification Using Pharmacophore Mapping Approach. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W609–W614. https://doi.org/10.1093/nar/gkq300.

(127) Boratyn, G. M.; Camacho, C.; Cooper, P. S.; Coulouris, G.; Fong, A.; Ma, N.; Madden, T. L.; Matten, W. T.; McGinnis, S. D.; Merezhuk, Y.; Raytselis, Y.; Sayers, E. W.; Tao, T.; Ye, J.; Zaretskaya, I. BLAST: A More Efficient Report with Usability Improvements. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, W29–W33. https://doi.org/10.1093/nar/gkt282.

(128) Collins, J. F.; Coulson, A. F. W.; Lyall, A. The Significance of Protein Sequence Similarities. *Methods Enzymol.* **1988**, *4* (1), 67–71. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/4.1.67.

(129) Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498–2504. https://doi.org/10.1101/gr.1239303.metabolite.

(130) Doncheva, N. T.; Morris, J. H.; Gorodkin, J.; Jensen, L. J. Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. *J. Proteome Res.* **2019**, *18*, 623–632. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00702.

(131) Tang, D.; Chen, M.; Huang, X.; Zhang, G.; Zeng, L.; Zhang, G.; Wu, S.; Wang, Y. SRplot: A Free Online Platform for Data Visualization and Graphing. *PLoS One* **2023**, *18* (11), e029436. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294236.

(132) Zhou, L.; Feng, T.; Xu, S.; Gao, F.; Lam, T. T.; Wang, Q.; Wu, T.; Huang, H.; Zhan, L.; Li, L.; Guan, Y.; Dai, Z.; Yu, G. Ggmsa: A Visual Exploration Tool for Multiple Sequence Alignment and Associated Data. *Brief. Bioinform.* **2022**, *23* (4), 1–12. https://doi.org/10.1093/bib/bbac222.

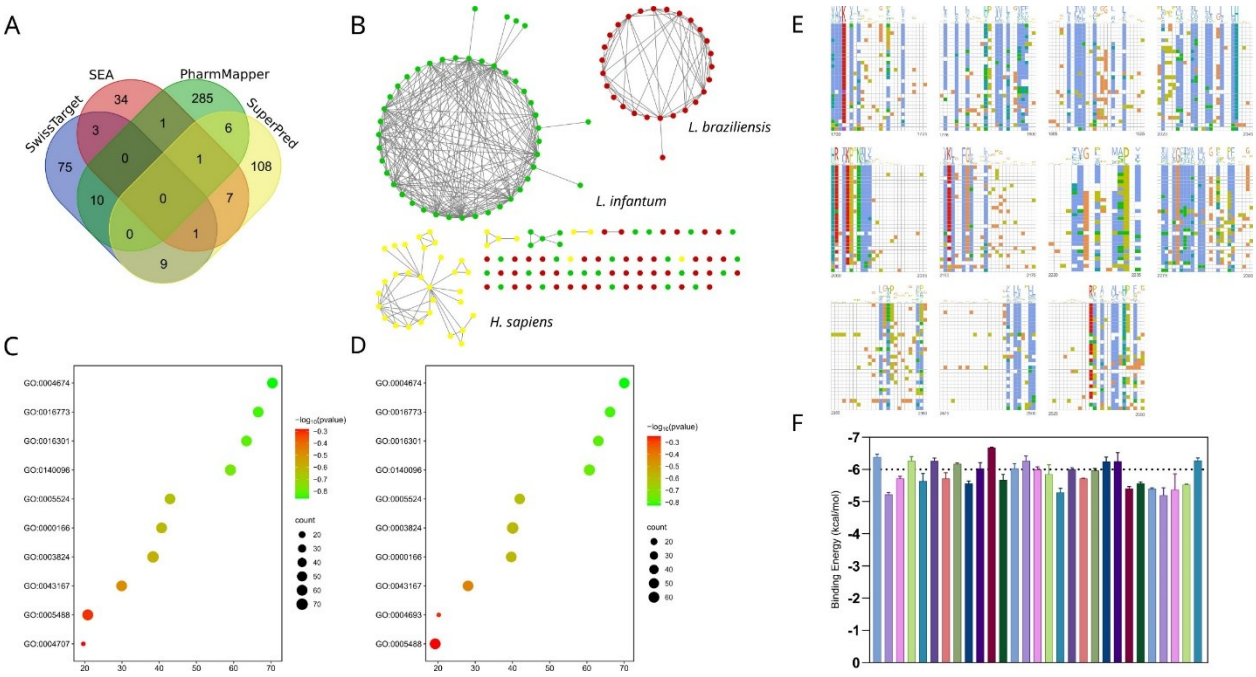
(133) Yang, J.; Zhang, Y. Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **2015**, *52*, 5.8.1-5.8.15. https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0508s52.

(134) Volkamer, A.; Kuhn, D.; Rippmann, F.; Rarey, M. Dogsitescorer: A Web Server for Automatic Binding Site Prediction, Analysis and Druggability Assessment. *Bioinformatics* **2012**, *28* (15), 2074–2075. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts310.

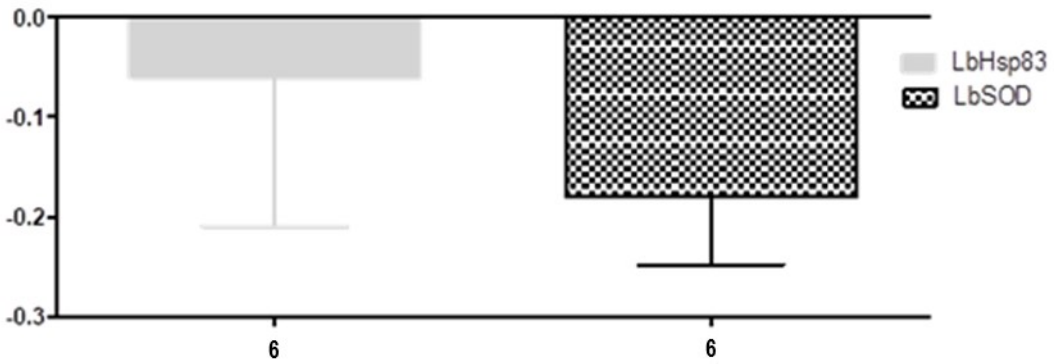
(135) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461. https://doi.org/10.1002/jcc.21334.

VIII) ANEXOS

VIII) 1. Investigação *in silico* e *in vitro* do alvo molecular de 6

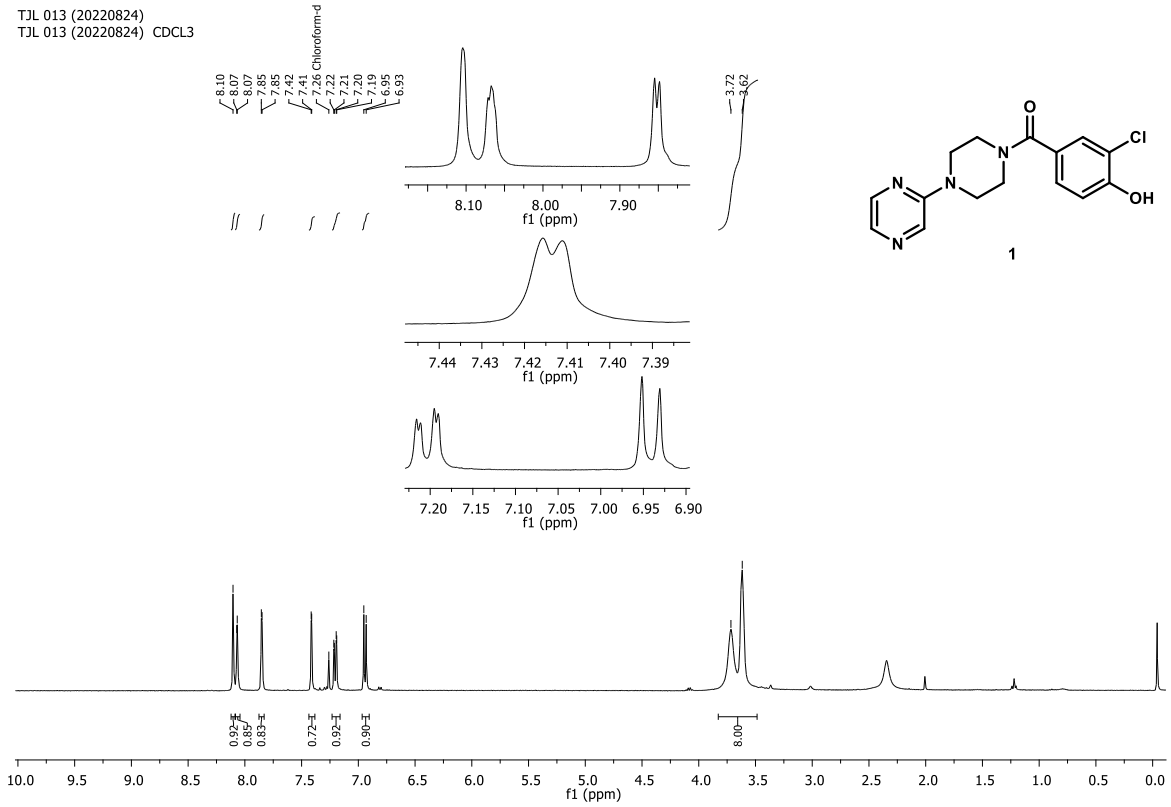


Anexo 1. Predição *in silico* dos alvos moleculares de **6** por *target-fishing*. (A) Diagramas de Venn do número de "hits" preditos pelos diferentes servidores utilizados. (B) Diagramas de rede de proteínas preditas como alvos de **6** em *Homo sapiens* (nódulos amarelos), *L. infantum* (nódulos verdes) e *L. braziliensis* (nódulos vermelhos). (C) e (D) Análise por enriquecimento funcional em *L. infantum* (C) e *L. braziliensis* (D), os alvos preditos estão mostrados nos gráficos em bolhas. (E) Os alinhamentos das sequências mostram a conservação dos resíduos para as sequências selecionadas, enquanto o eixo horizontal representa o número das colunas do alinhamento de sequências múltiplas. (F) As afinidades de ligação para os alvos moleculares selecionados estão mostradas no gráfico como barras, onde a linha tracejada representa o valor de corte (> 6 kcal/mol).
As predições *in silico* foram realizadas por Prof. Dr. Miguel Angel Chávez-Fumagalli (UCSM – Peru).

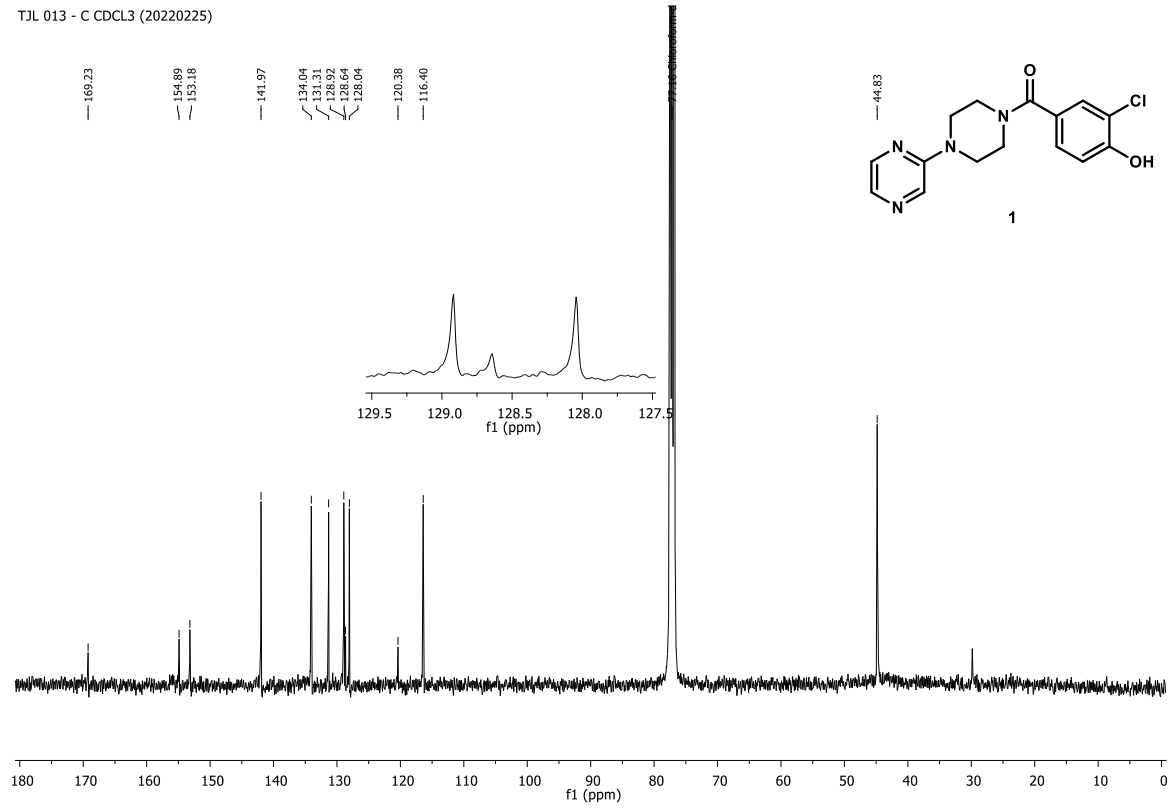


Anexo 2. Inibição de *Lb*Hsp83 e *Lb*SOD pelo composto **6** (100 µM).
Os ensaios enzimáticos *in vitro* com **6** foram realizados por Drª. Thamires Quadros Froes (FIOCRUZ-BA, CRAFT e USP-Ribeirão Preto), Drª. Priscila Zonzini Ramos (CQMED-UNICAMP), Profª. Drª. Thalita Carolyne Souza Trindade (FIOCRUZ-BA), Profª. Drª. Patricia Sampaio Tavares Veras (FIOCRUZ-BA), Profª. Drª. Maria Cristina Nonato (CRAFT e USP-Ribeirão Preto) e Profª. Drª. Katlin Brauer Massirer (CQMED-UNICAMP).

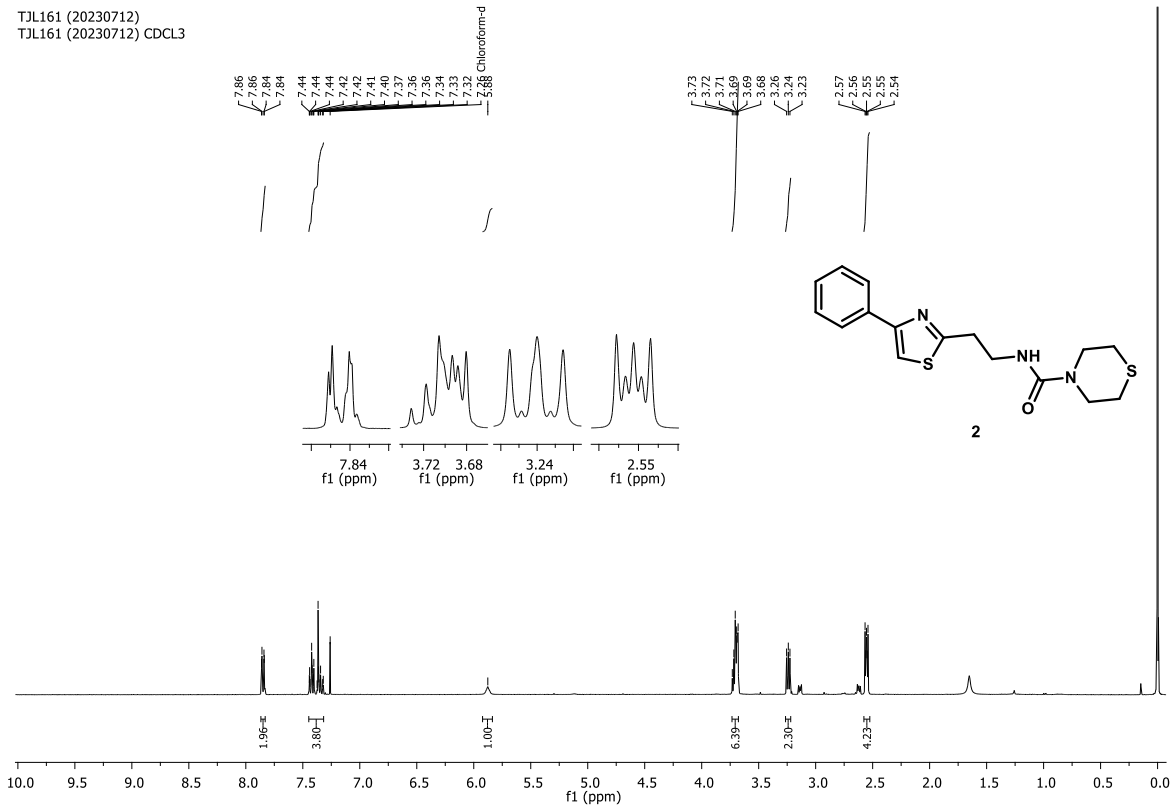
VIII) 2. Espectros de RMN dos compostos testados contra *L. infantum* e *T. cruzi*



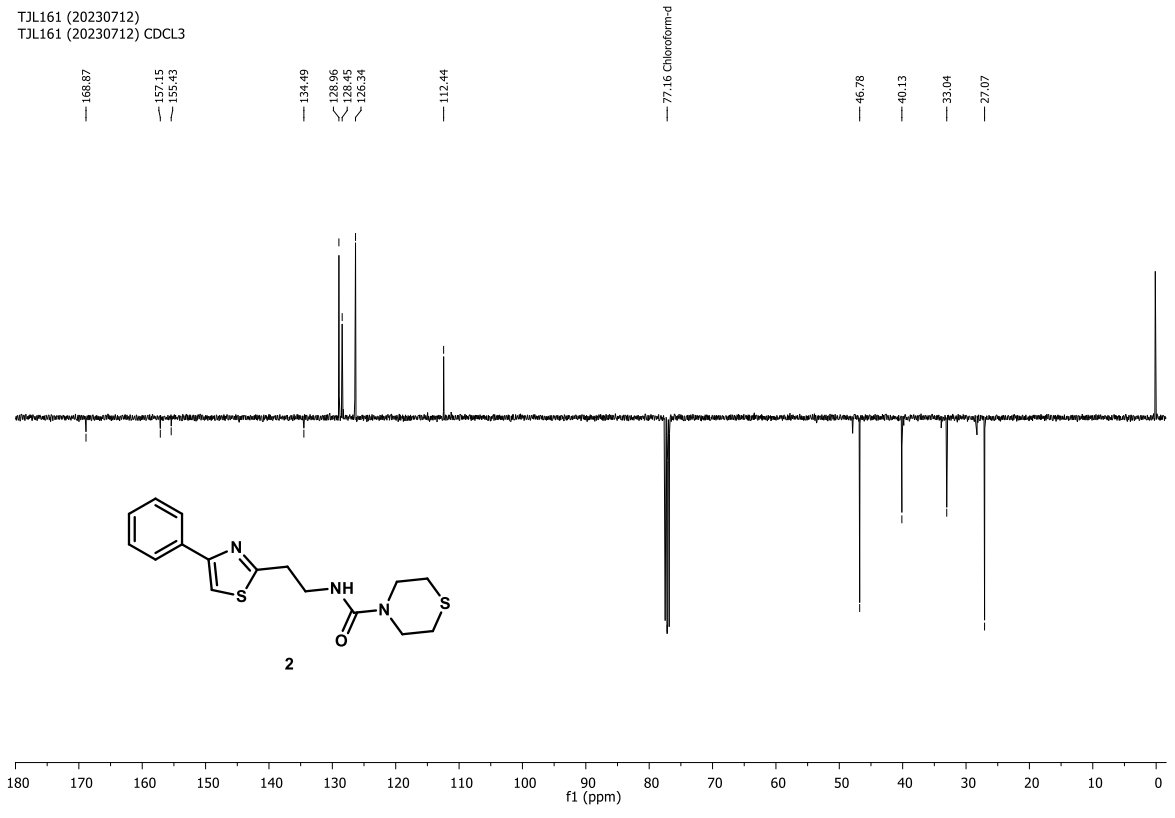
Anexo 3. Espectro de RMN de ^{1}H de **1** (400 MHz, $CDCl_3$)



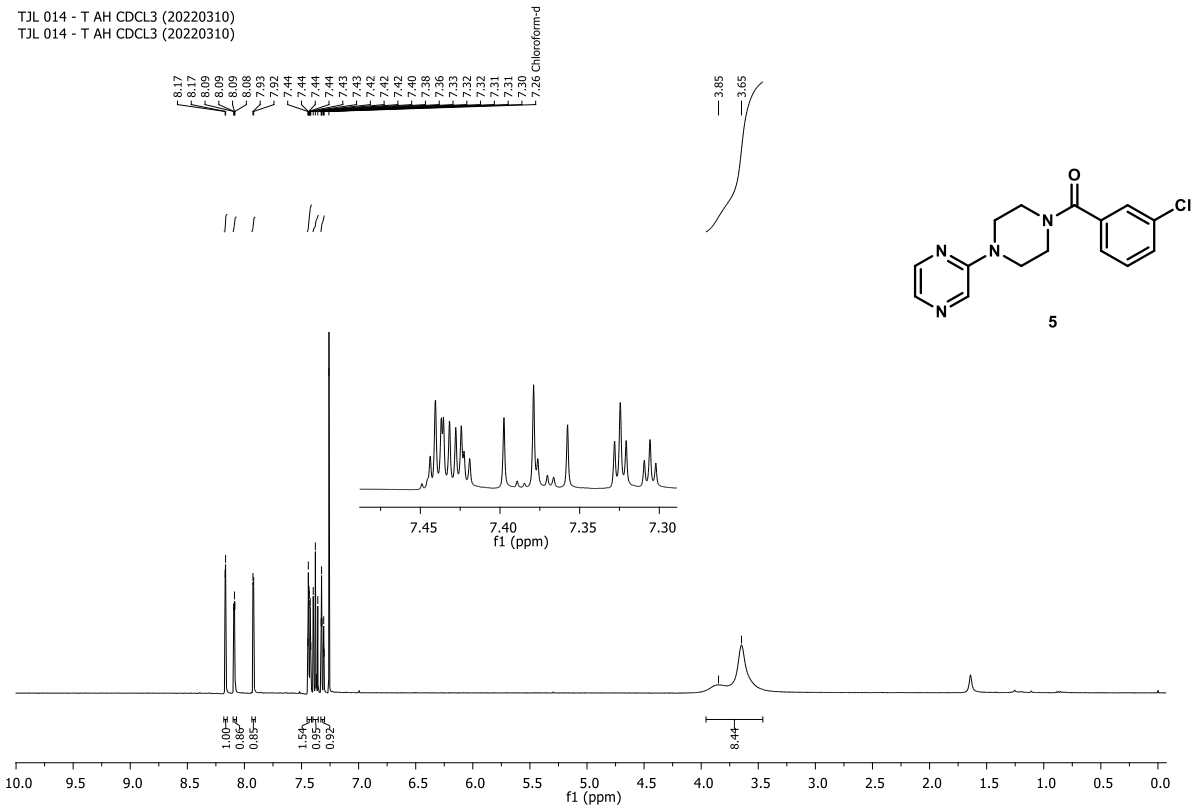
Anexo 4. Espectro de RMN de ^{13}C de **1** (101 MHz, $CDCl_3$)



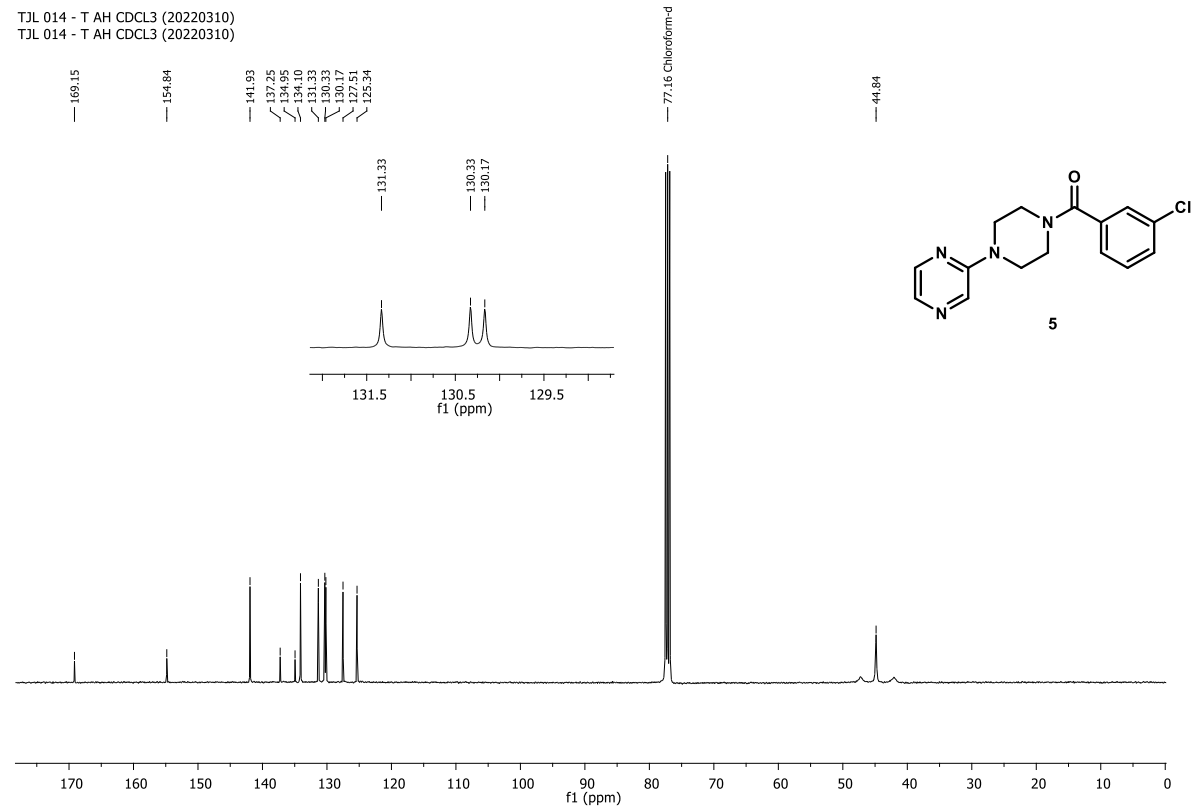
Anexo 5. Espectro de RMN de ^{1}H de **2** (400 MHz, $CDCl_3$)



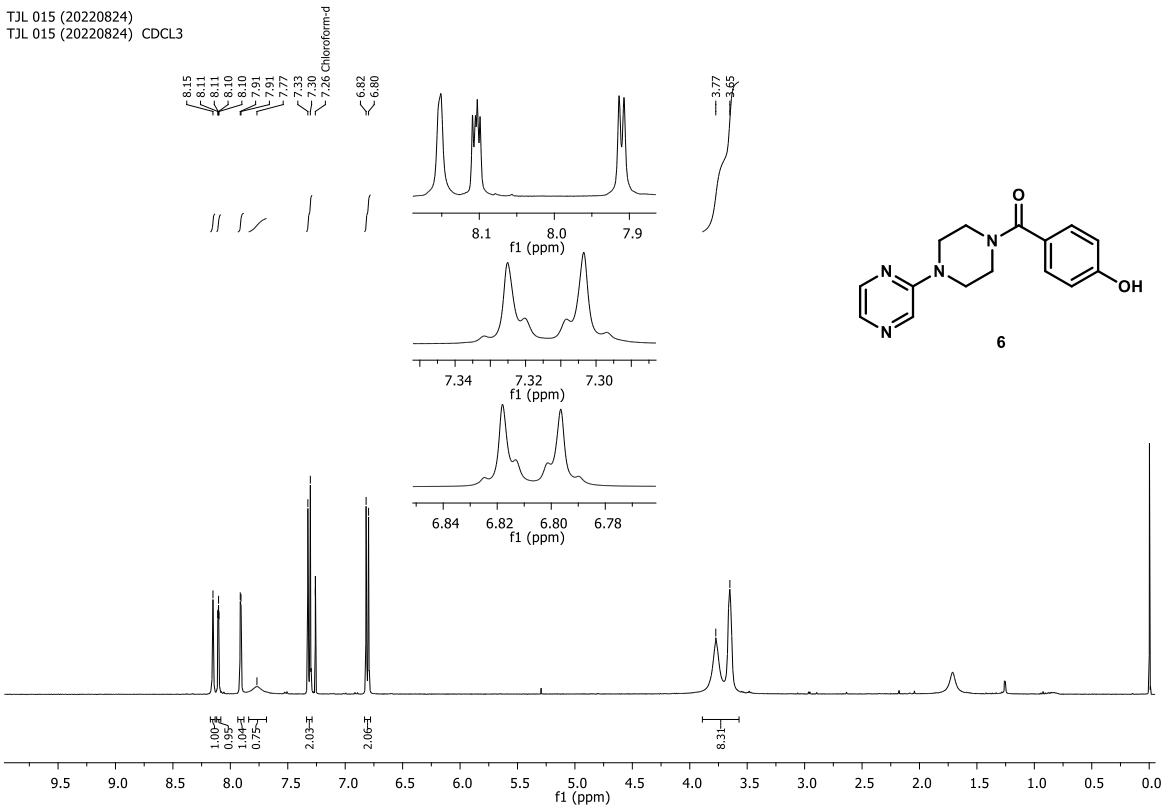
Anexo 6. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **2** (101 MHz, $CDCl_3$)



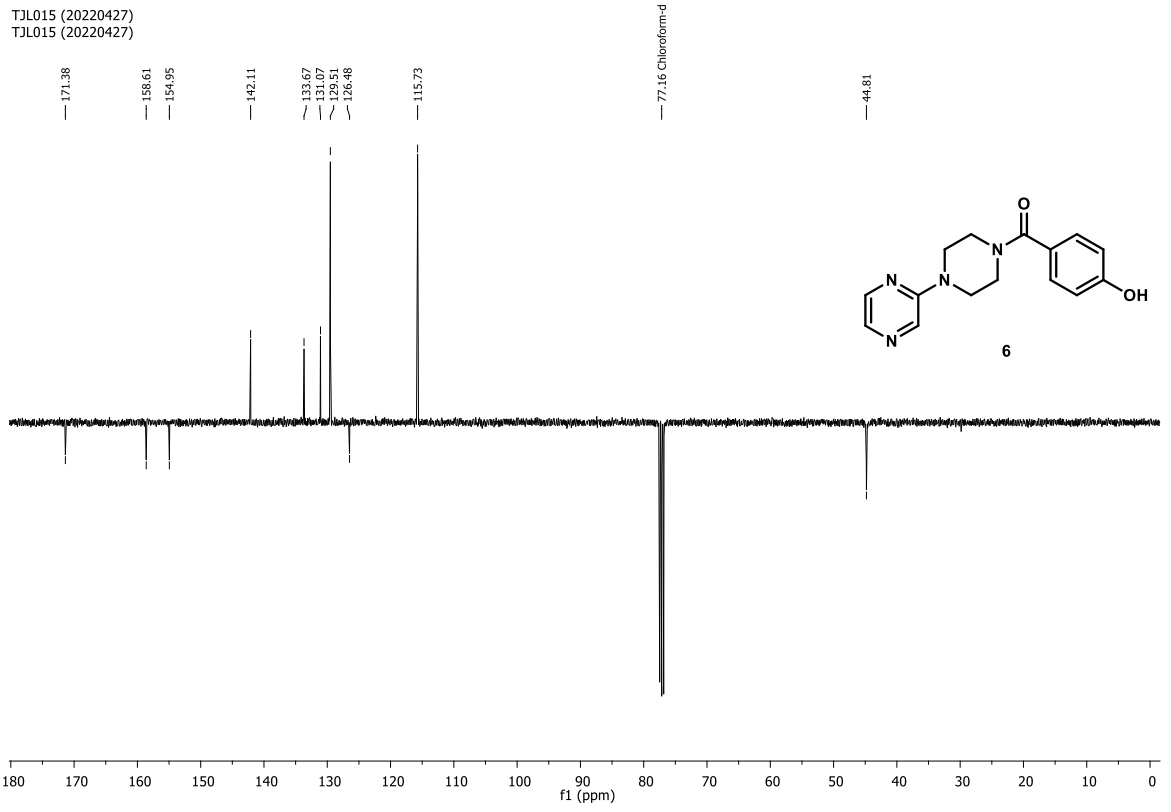
Anexo 7. Espectro de RMN de ^{1}H de **5** (400 MHz, $CDCl_3$)



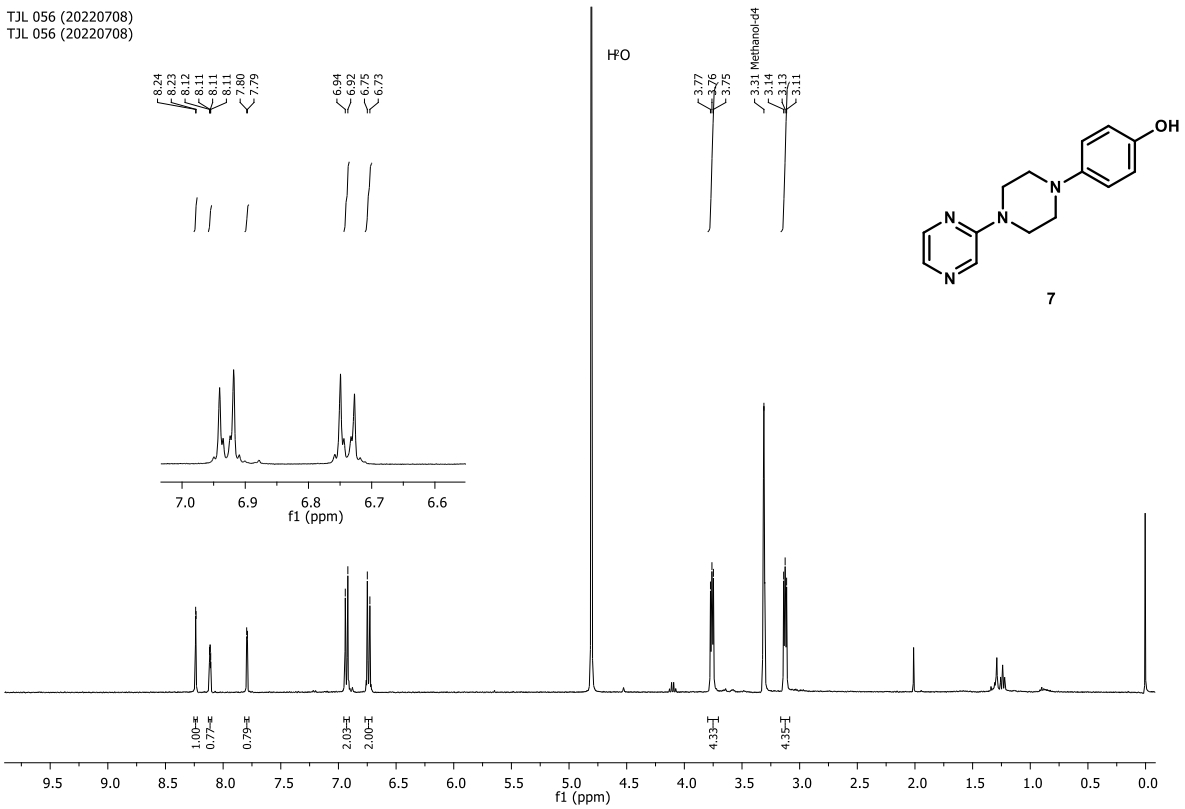
Anexo 8. Espectro de RMN de ^{13}C de **5** (101 MHz, $CDCl_3$)



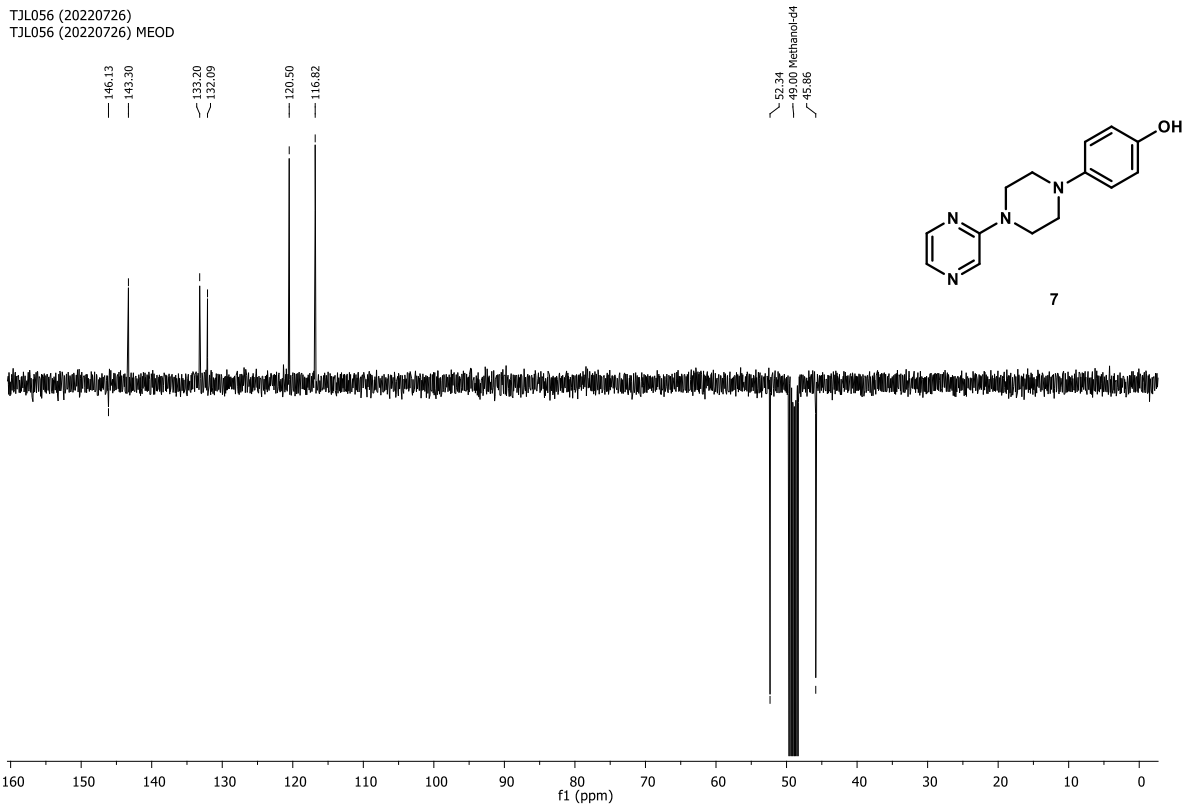
Anexo 9. Espectro de RMN de ^{1}H de **6** (400 MHz, $CDCl_3$)



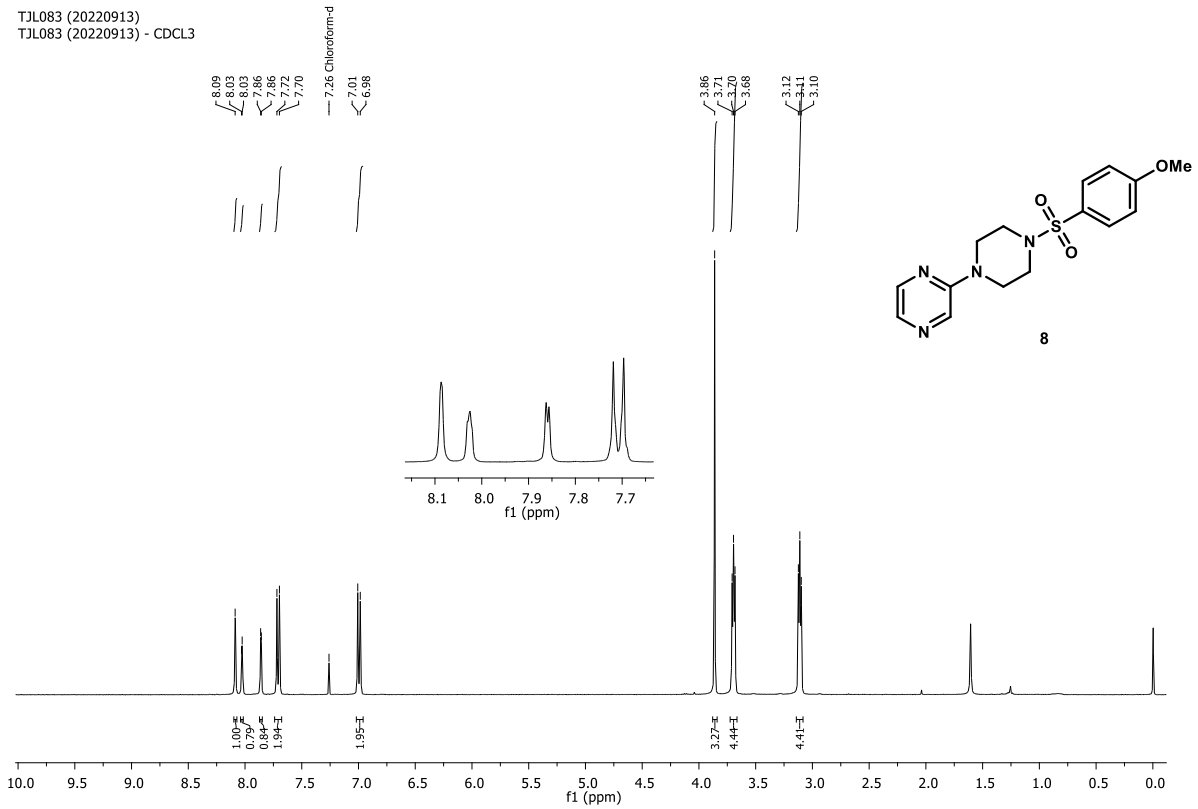
Anexo 10. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **6** (101 MHz, $CDCl_3$)



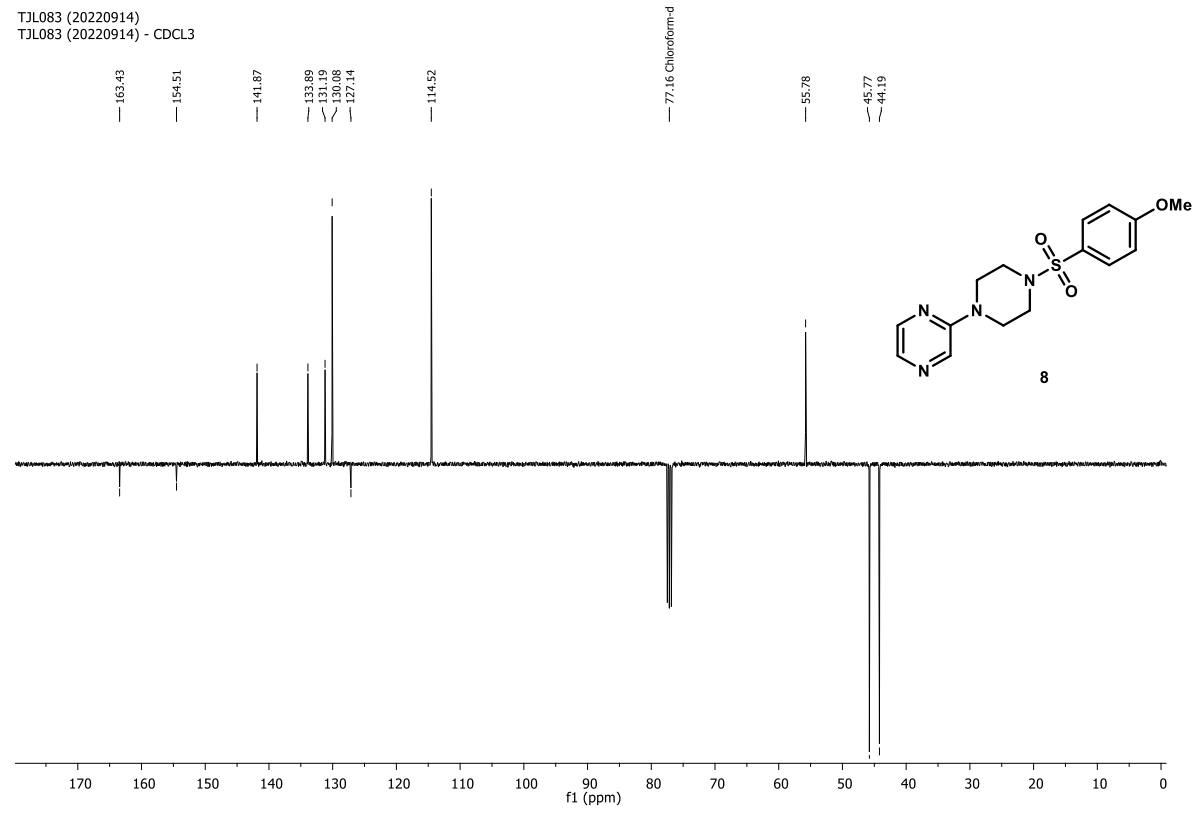
Anexo 11. Espectro de RMN de ^{1}H de **7** (400 MHz, CD_3OD)



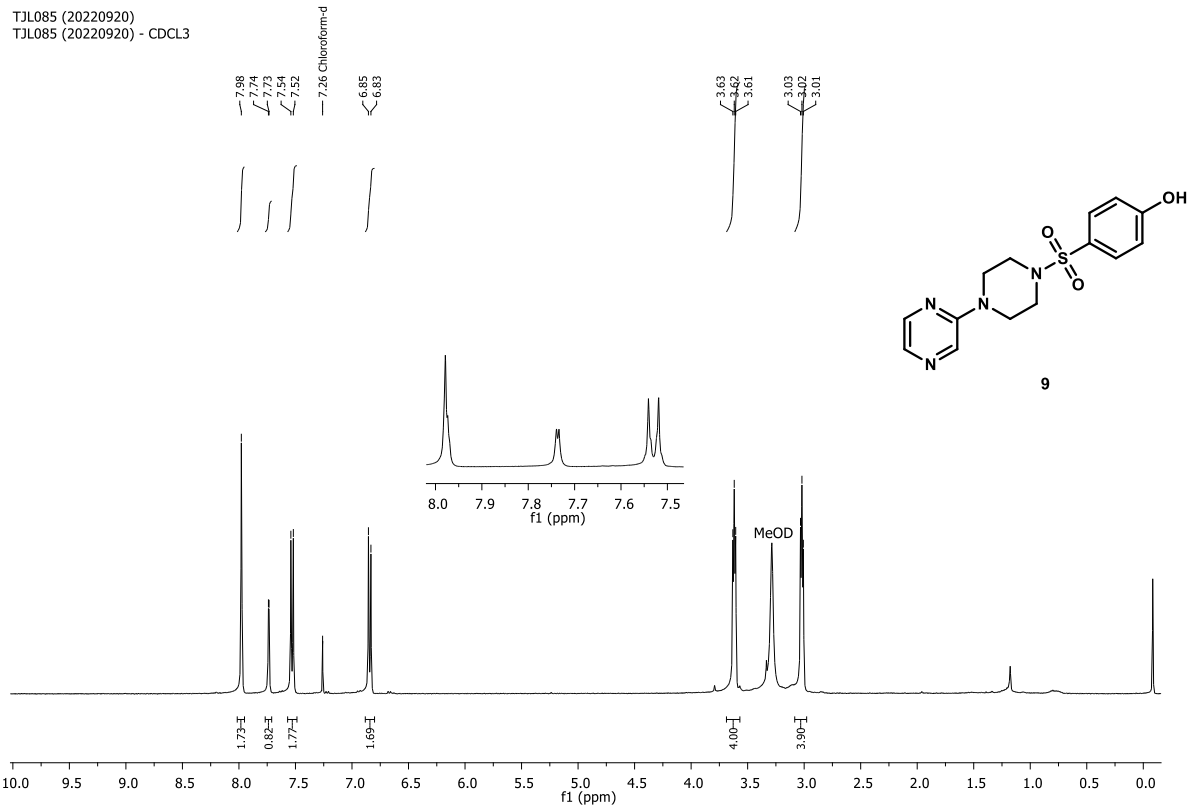
Anexo 12. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **7** (101 MHz, CD_3OD)



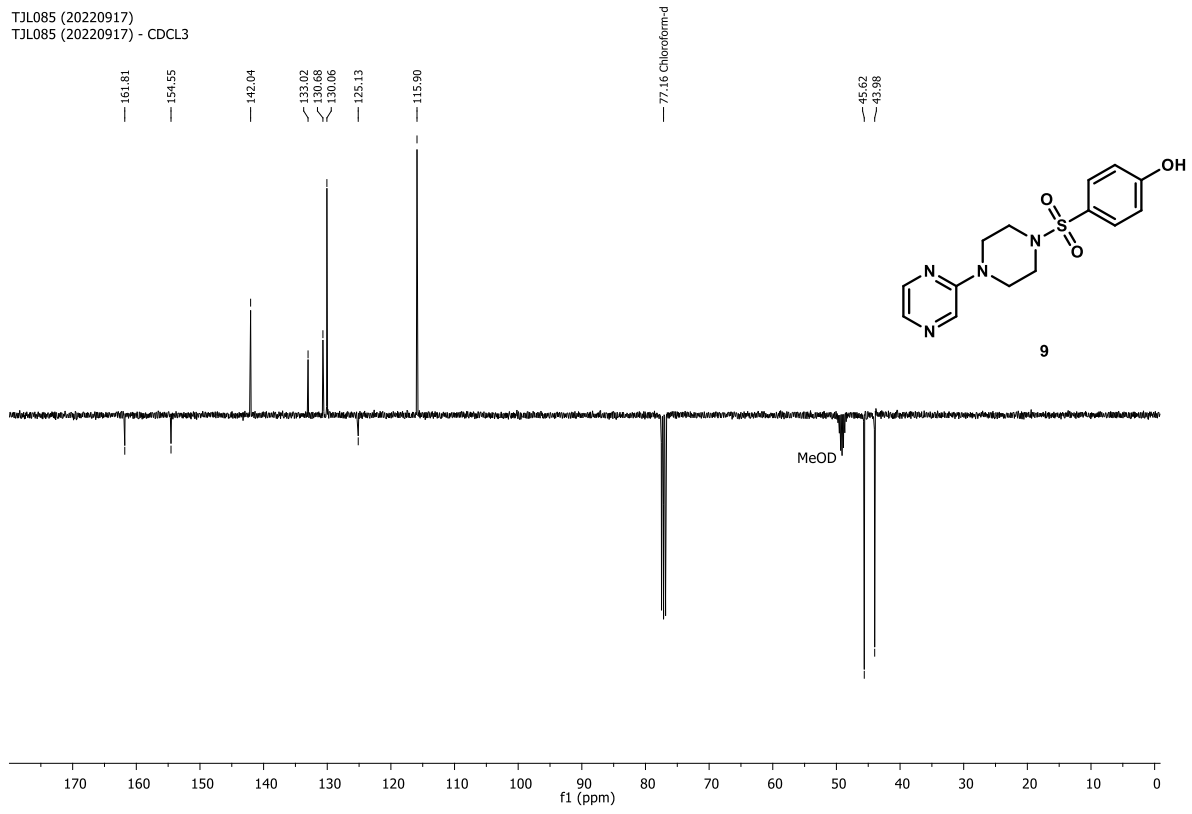
Anexo 13. Espectro de RMN de ^{1}H de **8** (400 MHz, $CDCl_3$)



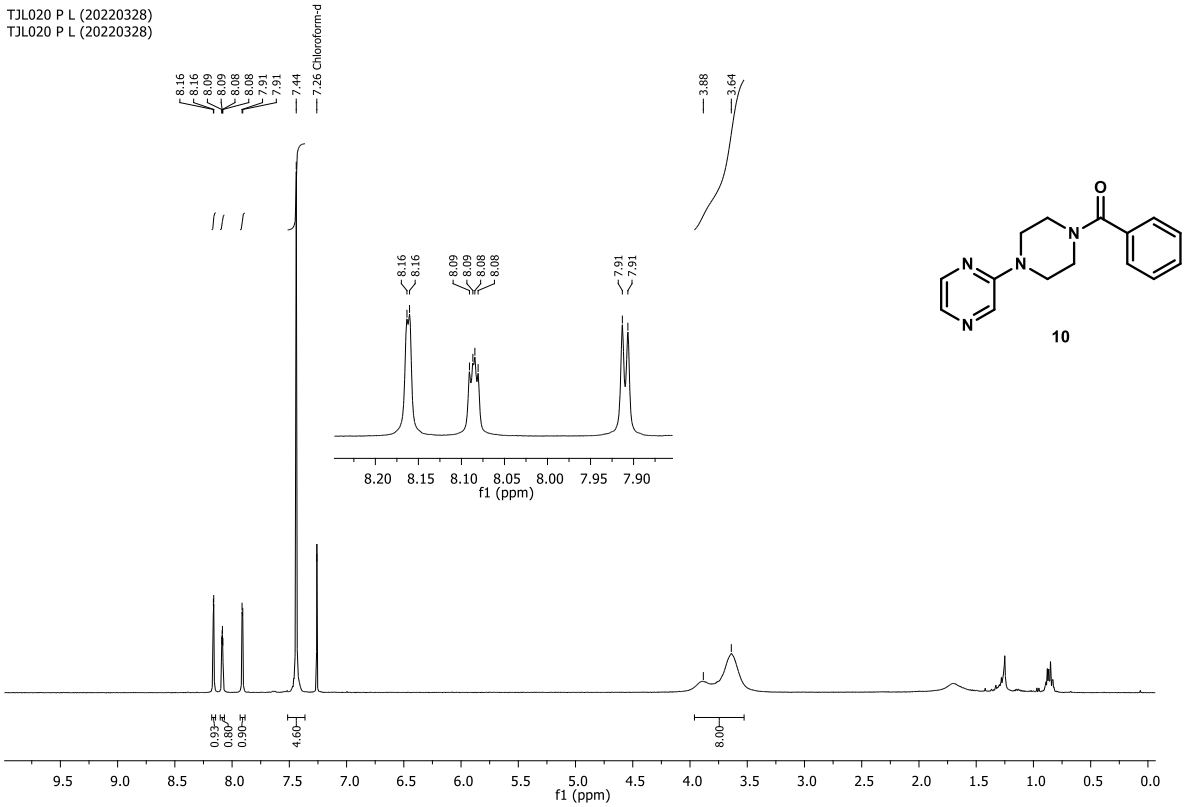
Anexo 14. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **8** (101 MHz, $CDCl_3$)



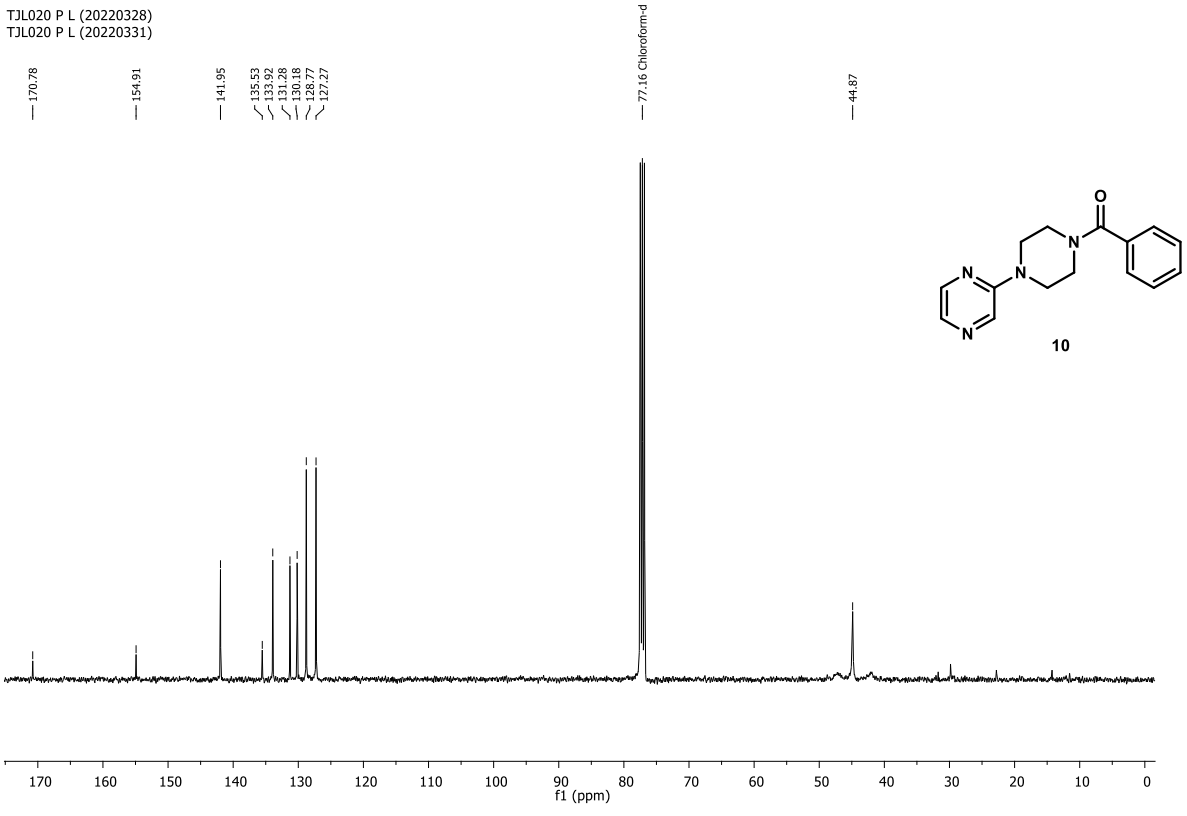
Anexo 15. Espectro de RMN de ^{1}H de **9** (400 MHz, $CDCl_3$)



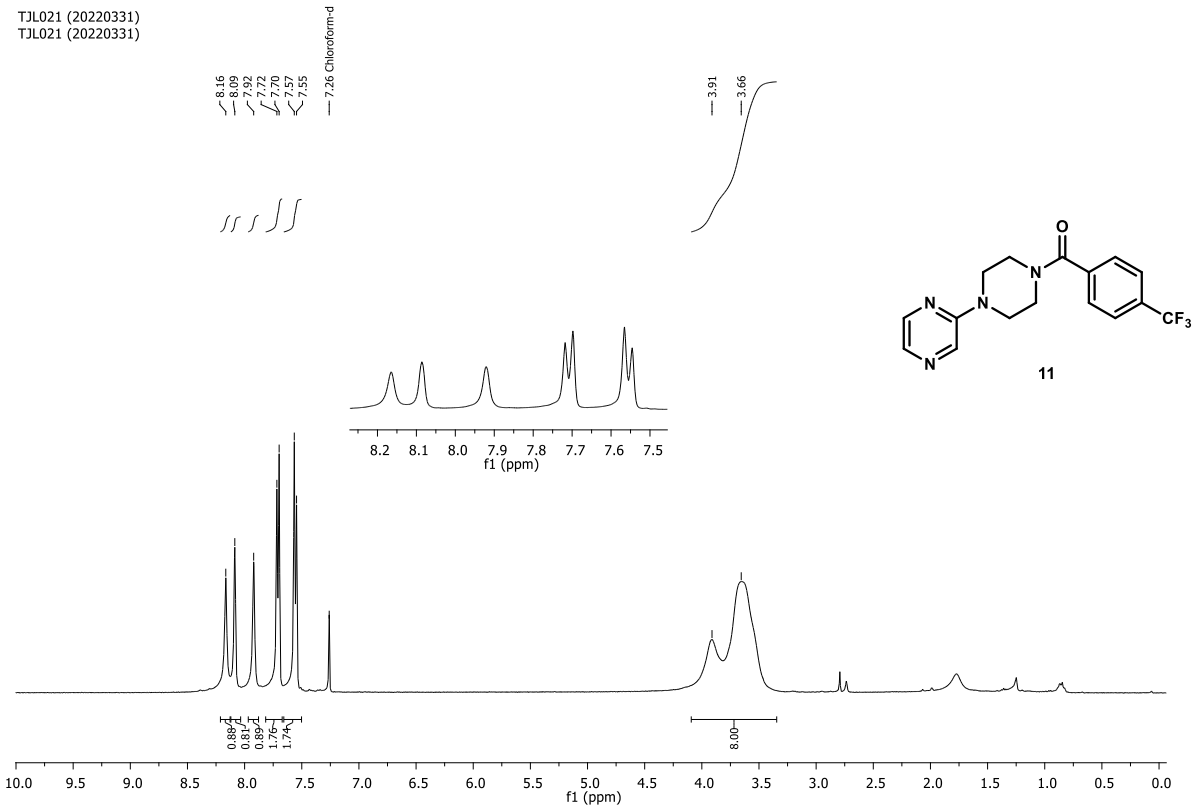
Anexo 16. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **9** (101 MHz, $CDCl_3$)



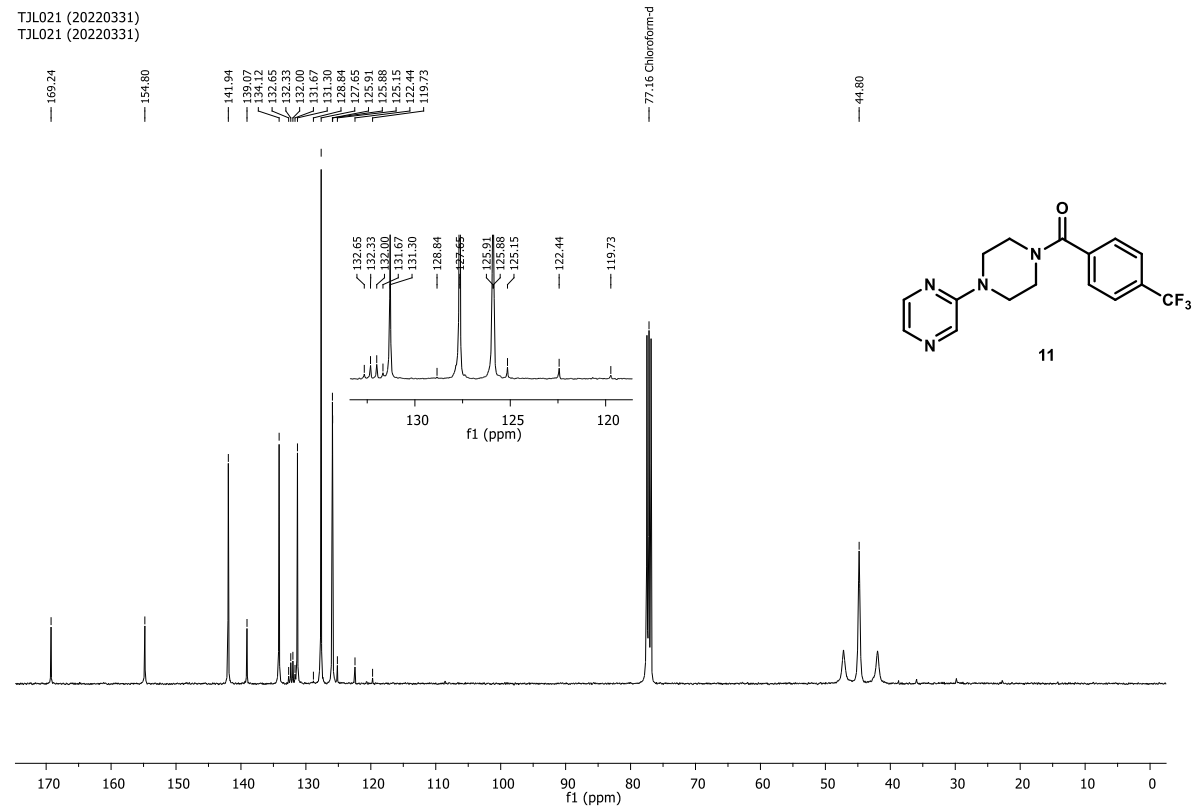
Anexo 17. Espectro de RMN de ^{1}H de **10** (400 MHz, $CDCl_3$)



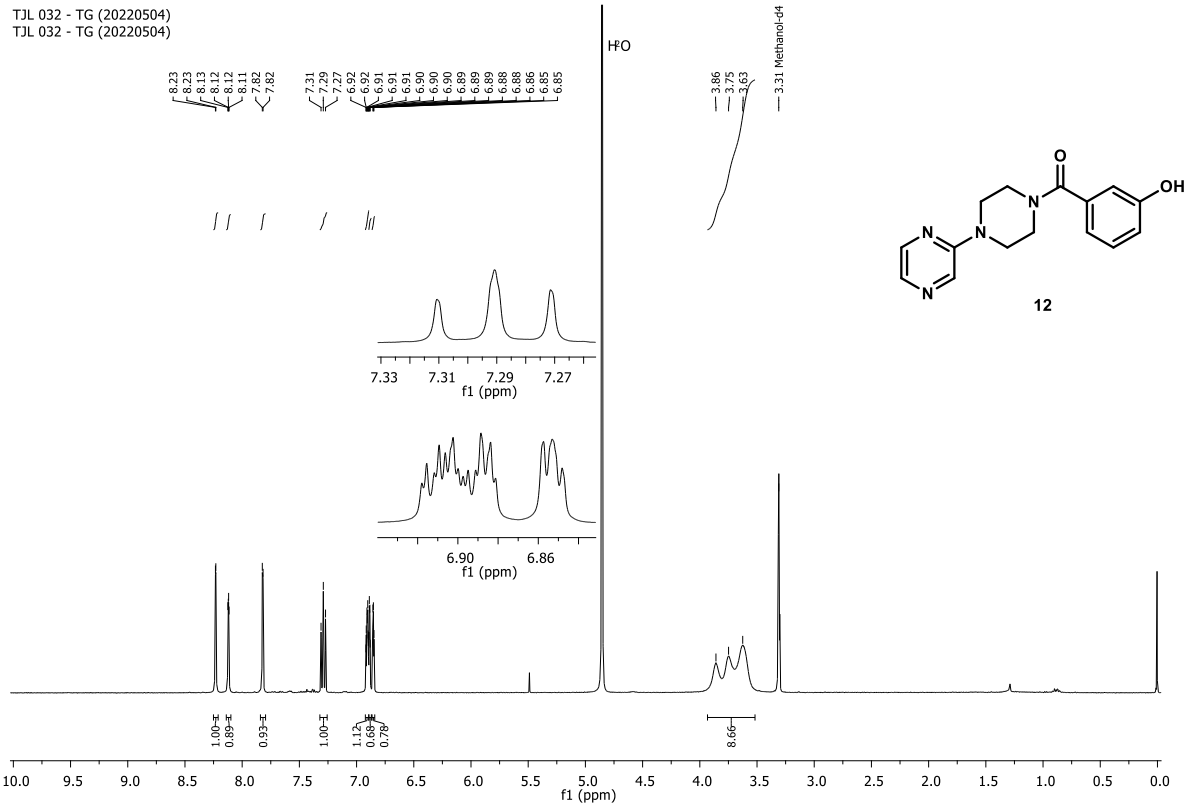
Anexo 18. Espectro de RMN de ^{13}C de **10** (101 MHz, $CDCl_3$)



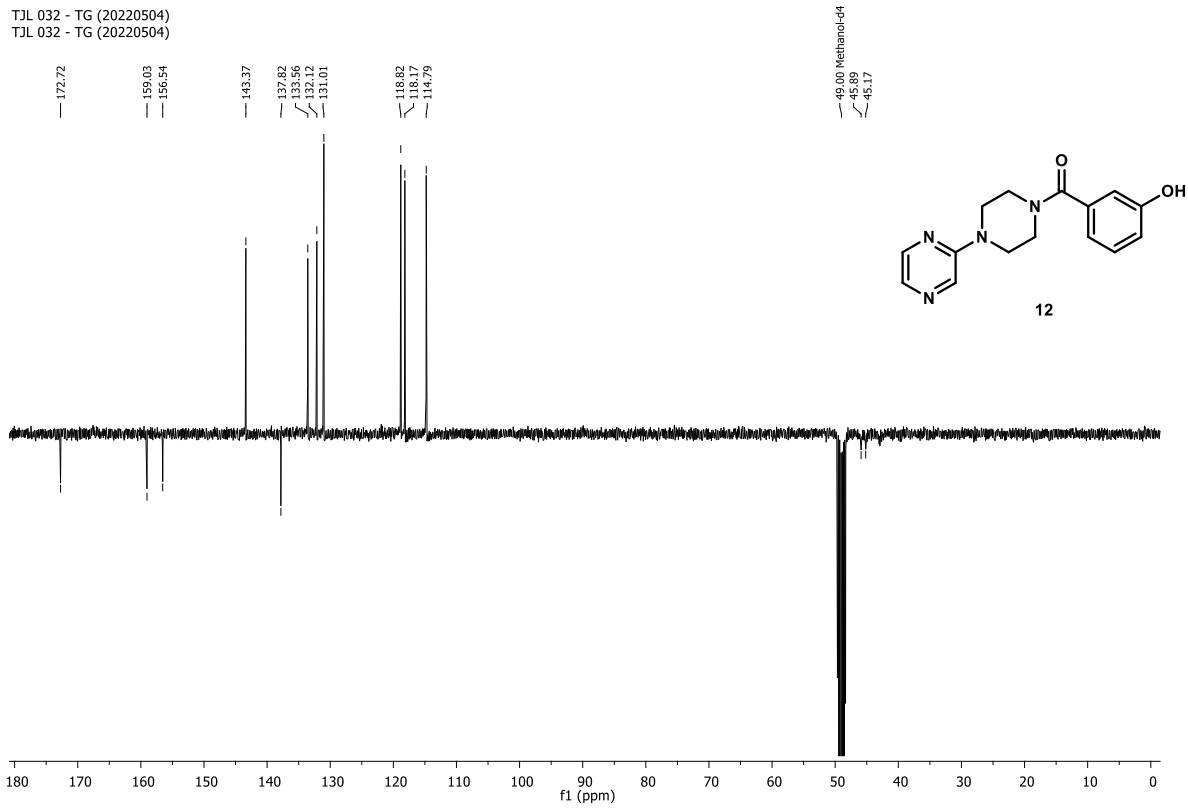
Anexo 19. Espectro de RMN de ^{1}H de **11** (400 MHz, $CDCl_3$)



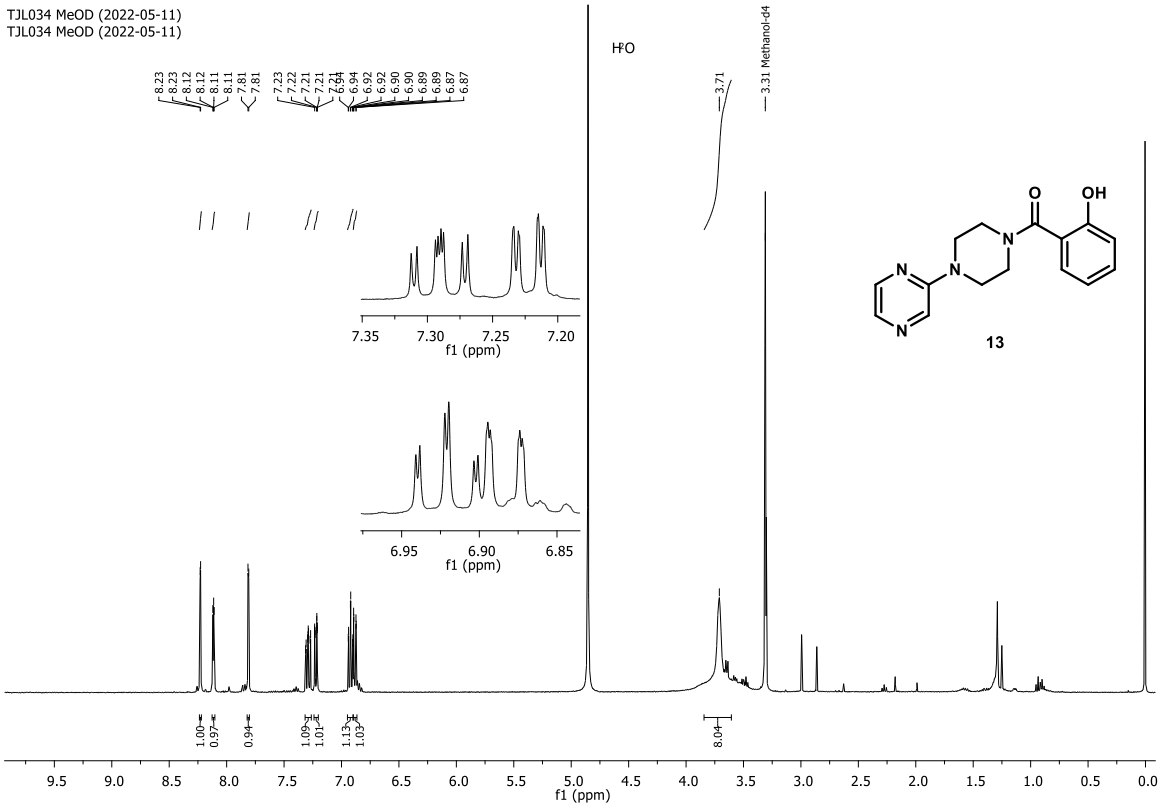
Anexo 20. Espectro de RMN de ^{13}C de **11** (101 MHz, $CDCl_3$)



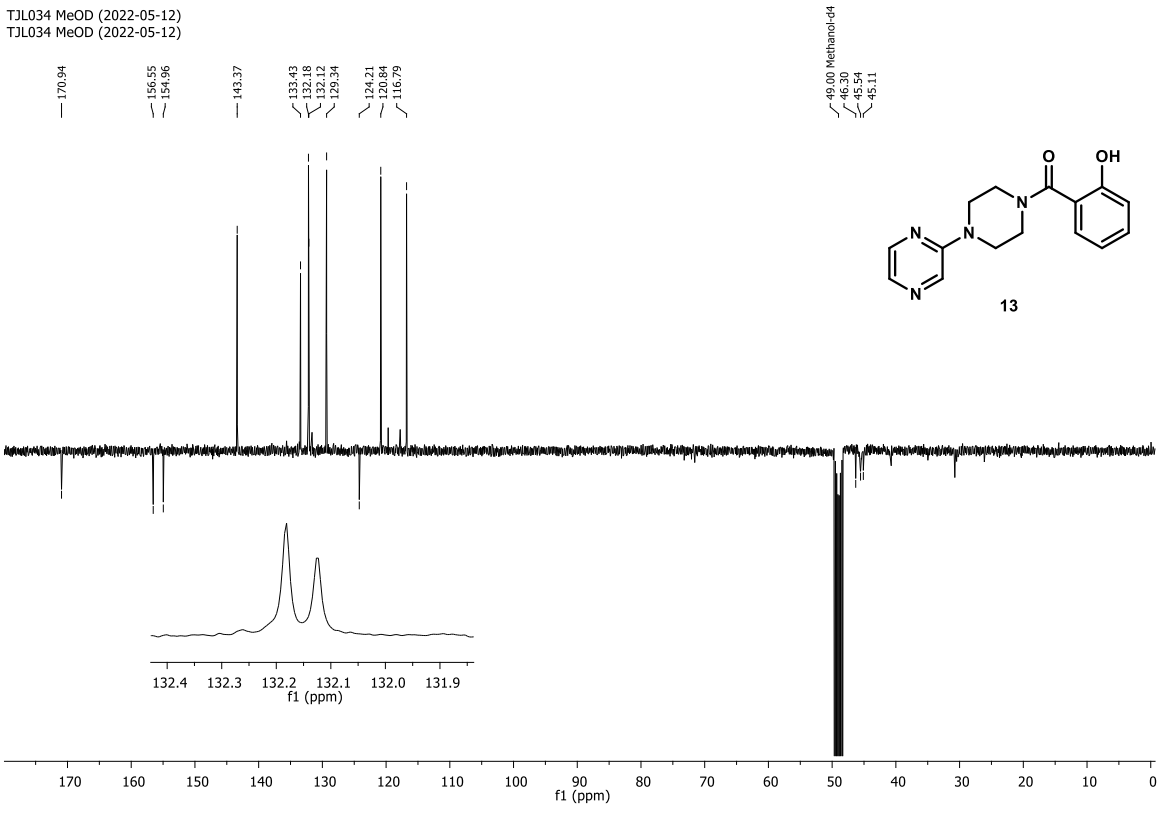
Anexo 21. Espectro de RMN de ^{1}H de **12** (400 MHz, CD_3OD)



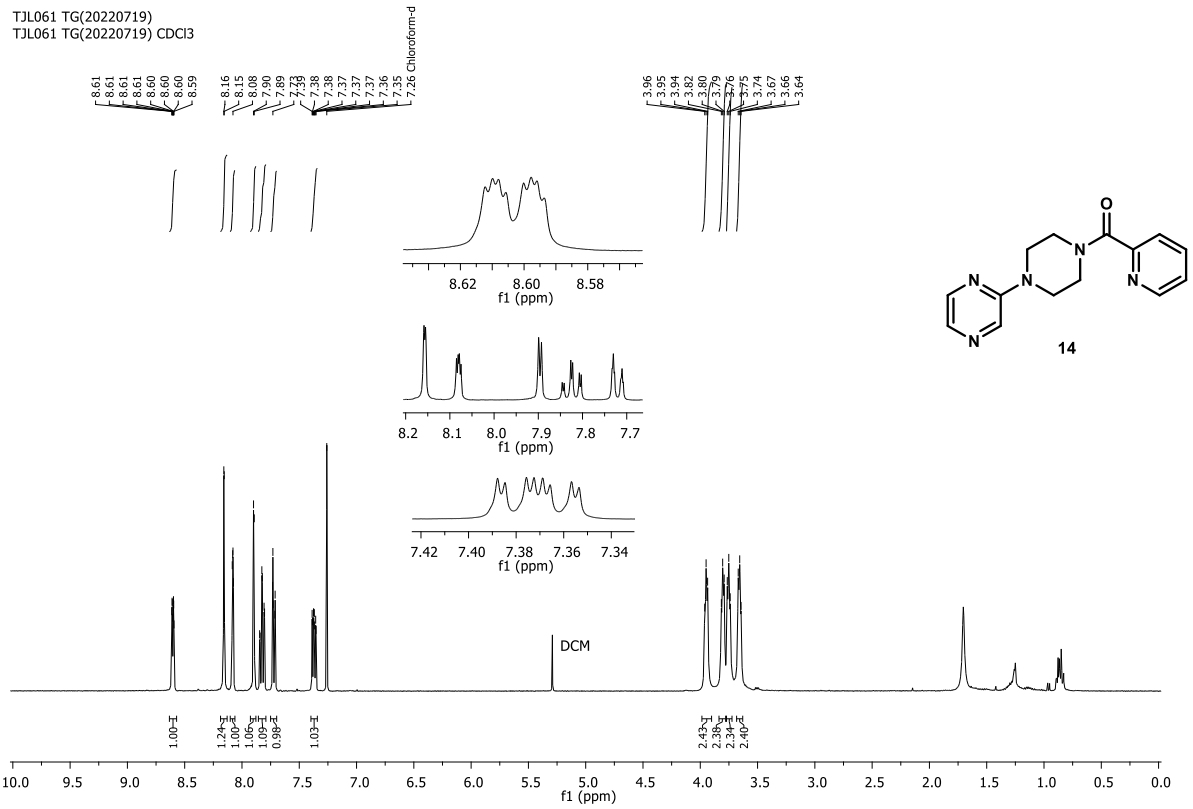
Anexo 22. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **12** (101 MHz, CD_3OD)



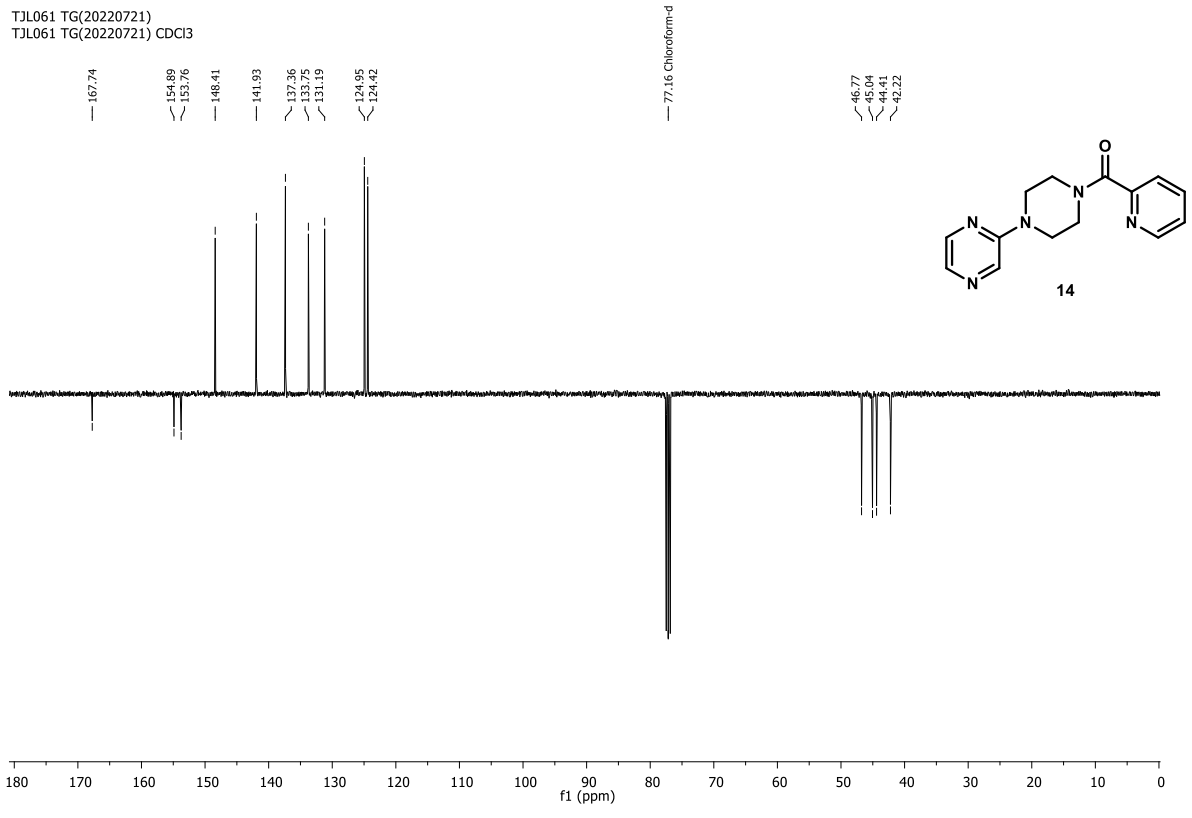
Anexo 23. Espectro de RMN de ^{1}H de **13** (400 MHz, CD_3OD)



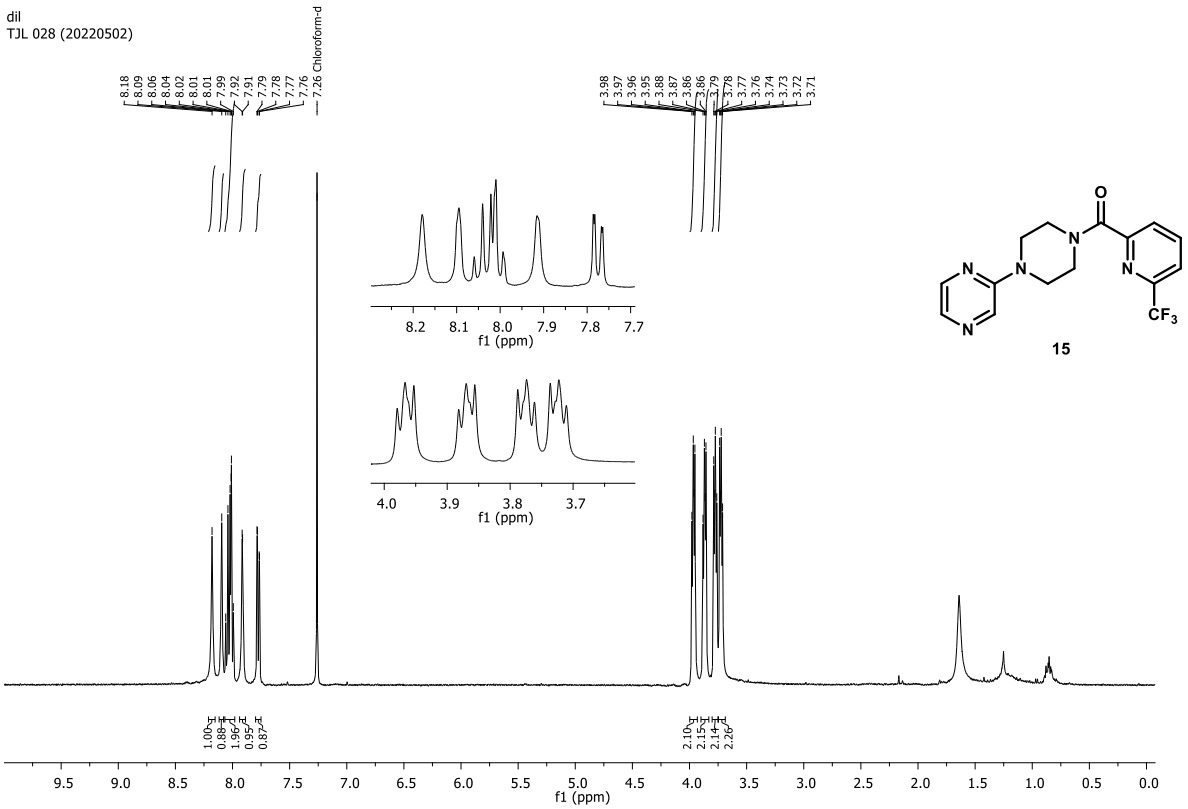
Anexo 24. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **13** (101 MHz, CD_3OD)



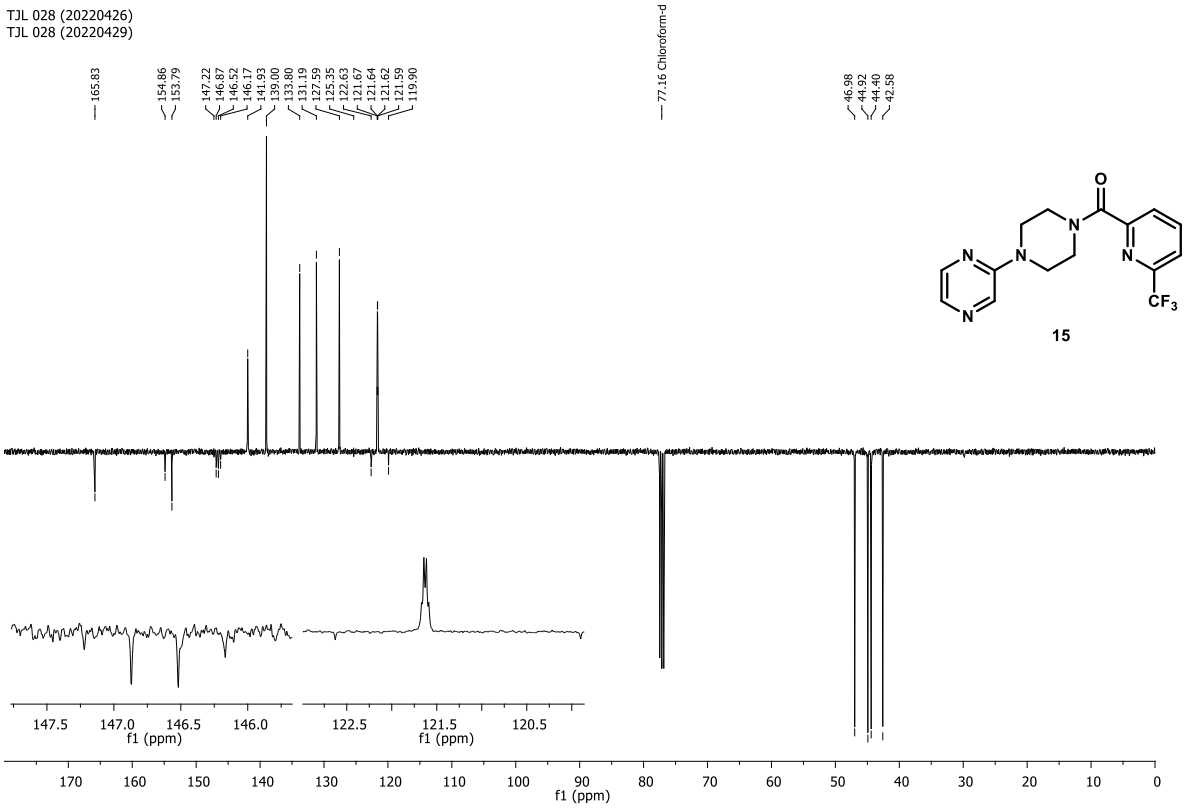
Anexo 25. Espectro de RMN de ^{1}H de **14** (400 MHz, $CDCl_3$)



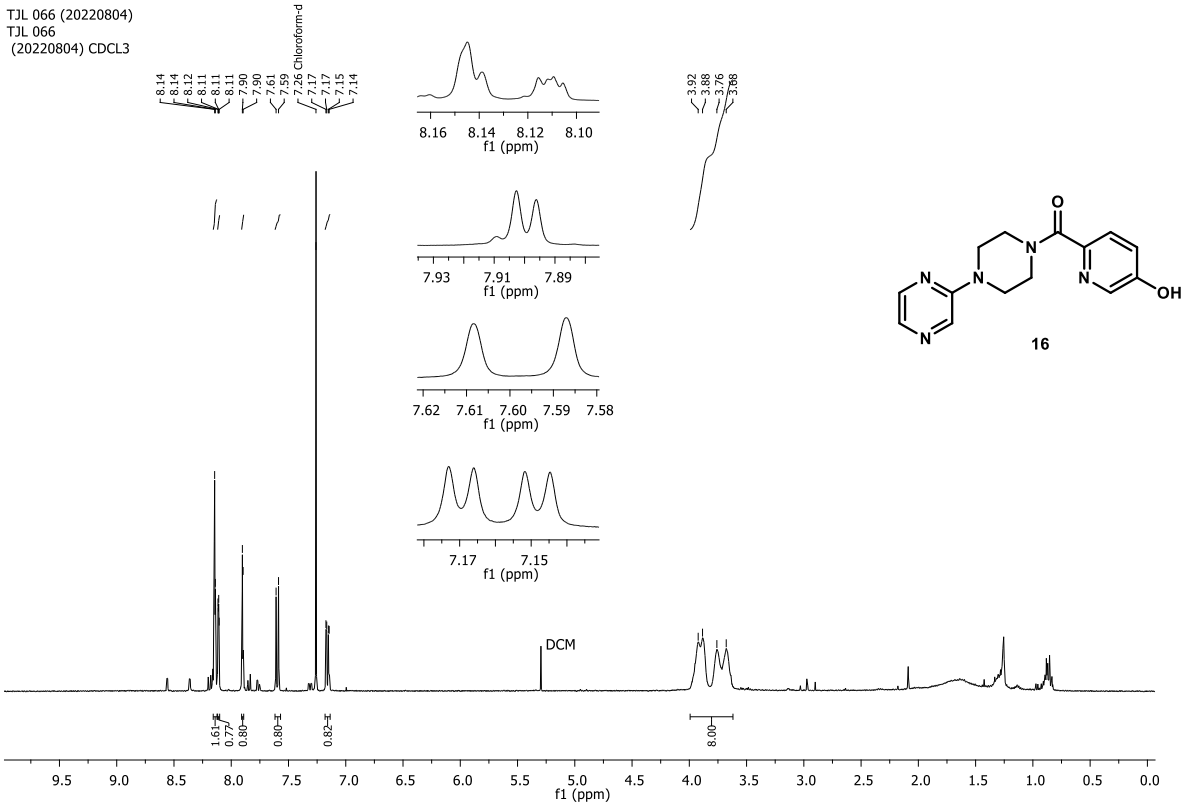
Anexo 26. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **14** (101 MHz, $CDCl_3$)



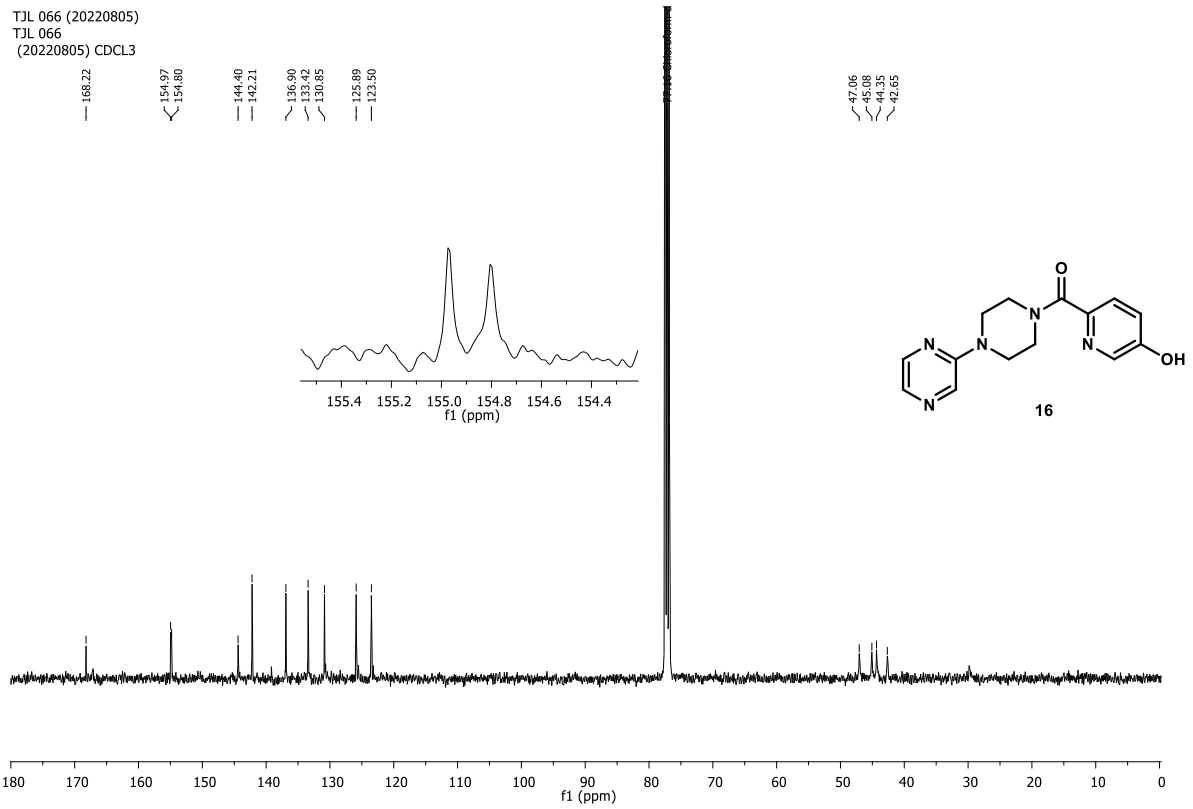
Anexo 27. Espectro de RMN de ^{1}H de **15** (400 MHz, $CDCl_3$)



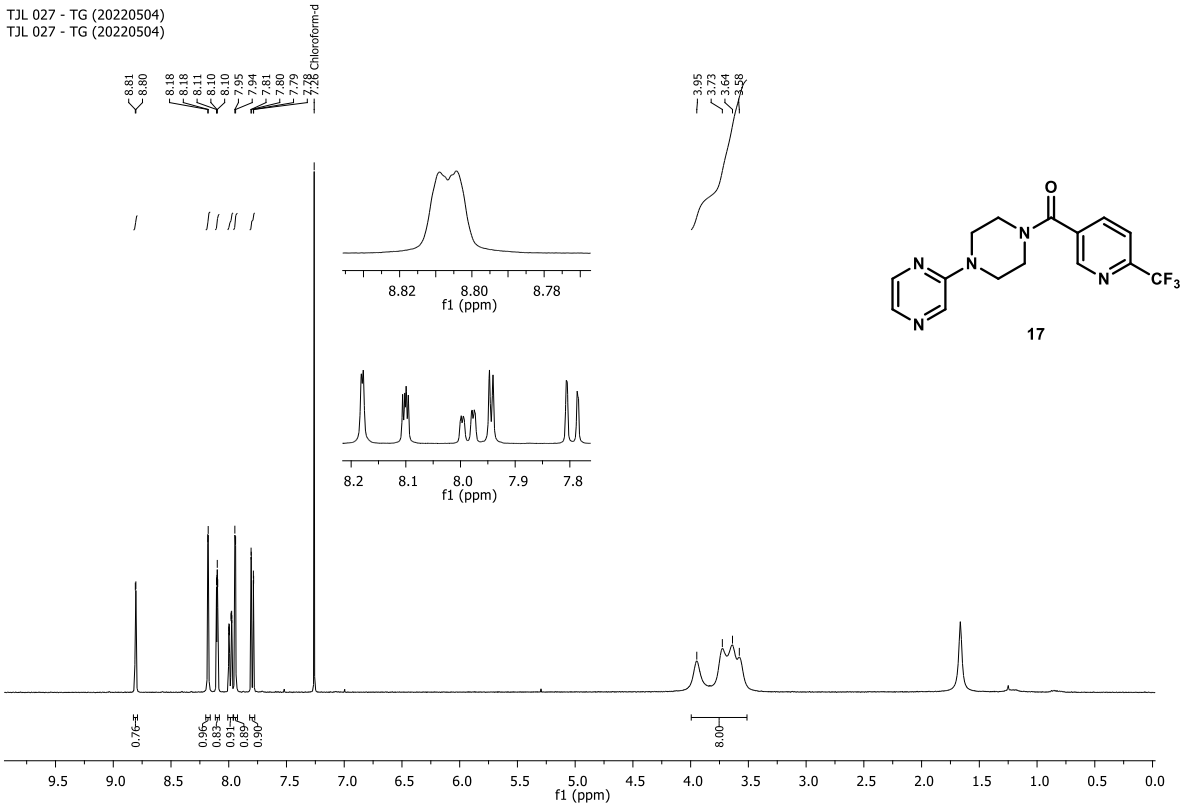
Anexo 28. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **15** (101 MHz, $CDCl_3$)



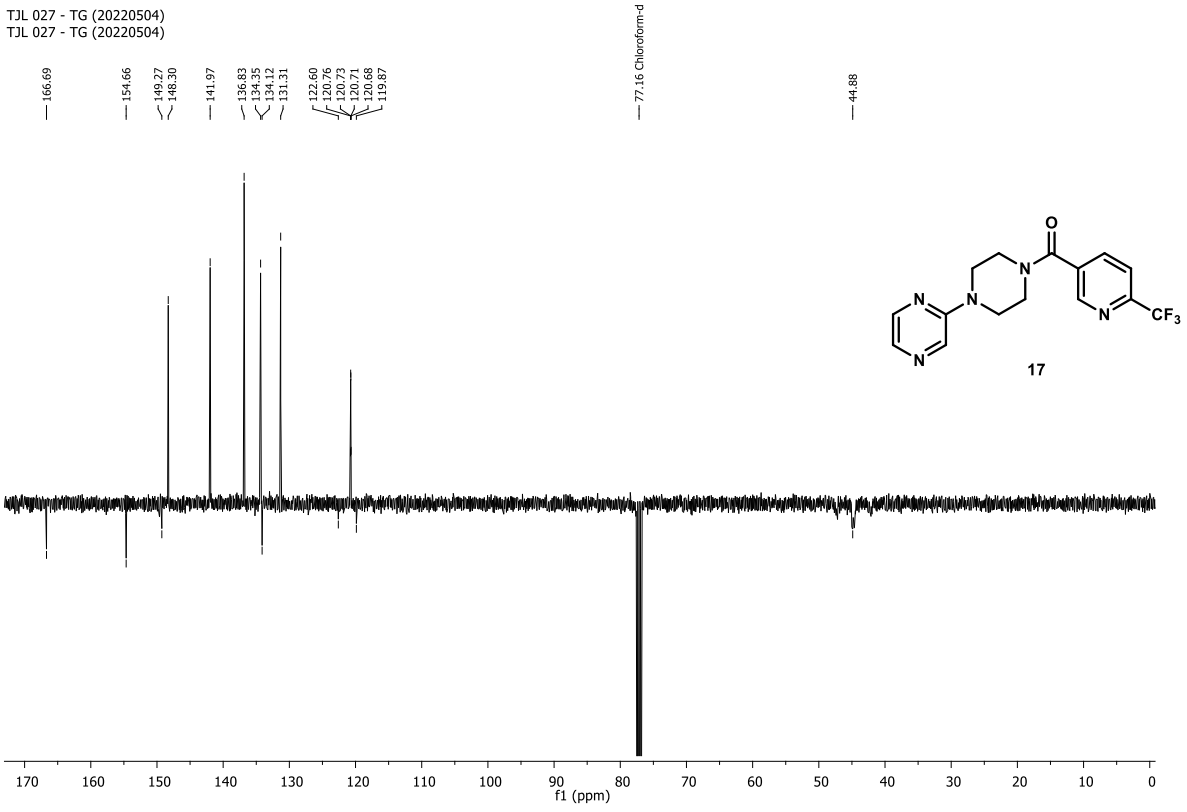
Anexo 29. Espectro de RMN de ^{1}H de **16** (400 MHz, $CDCl_3$)



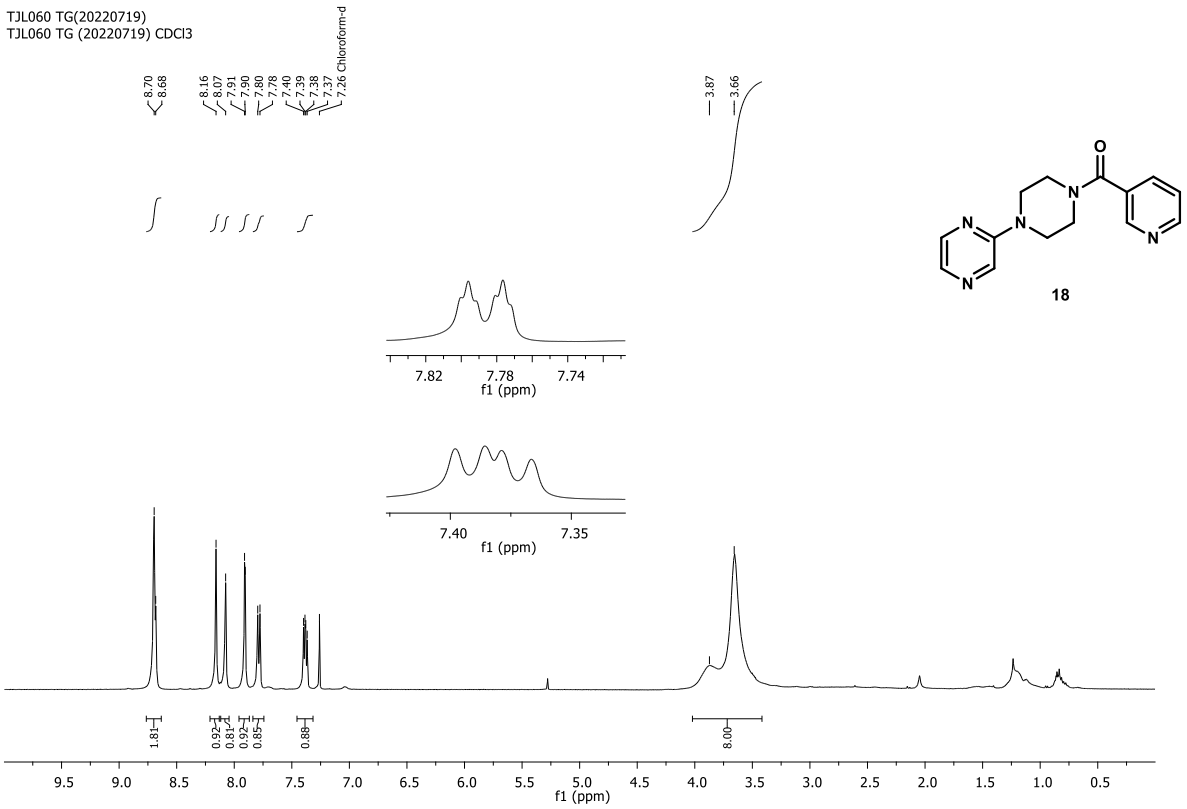
Anexo 30. Espectro de RMN de ^{13}C de **16** (101 MHz, $CDCl_3$)



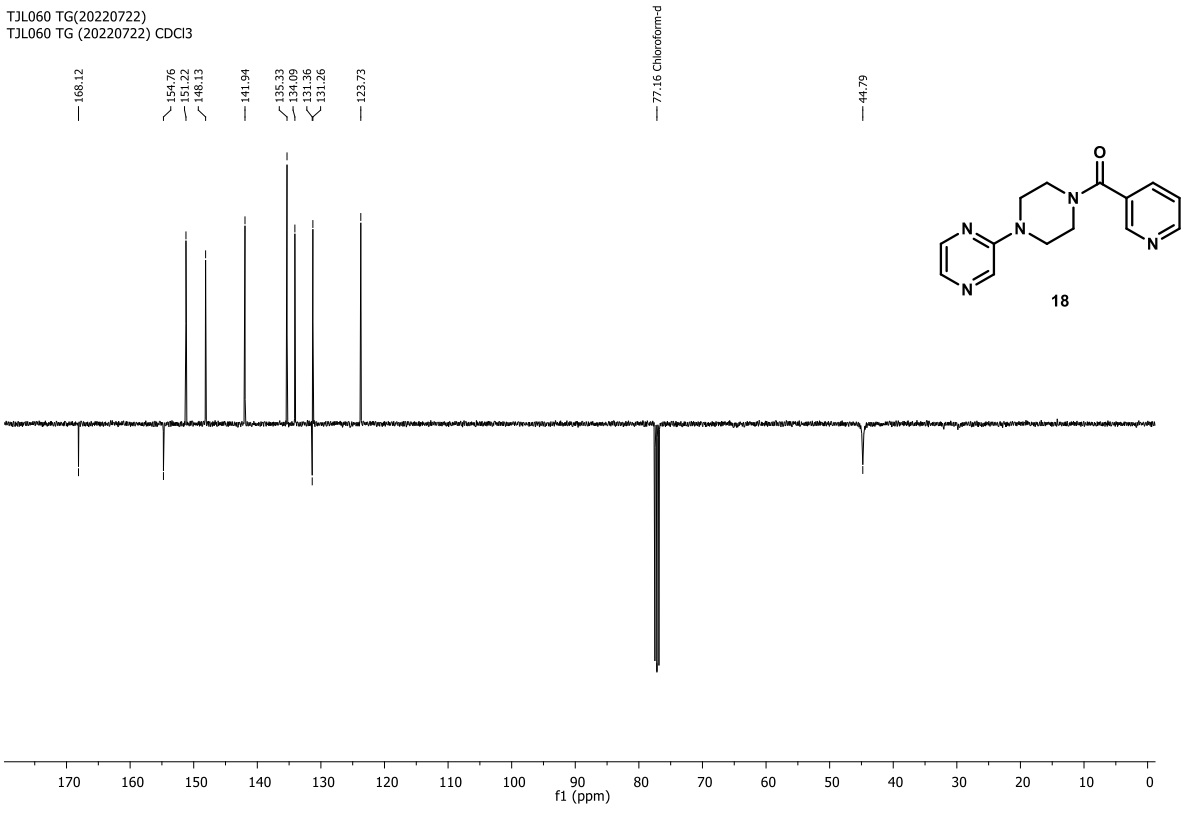
Anexo 31. Espectro de RMN de ^{1}H de **17** (400 MHz, $CDCl_3$)



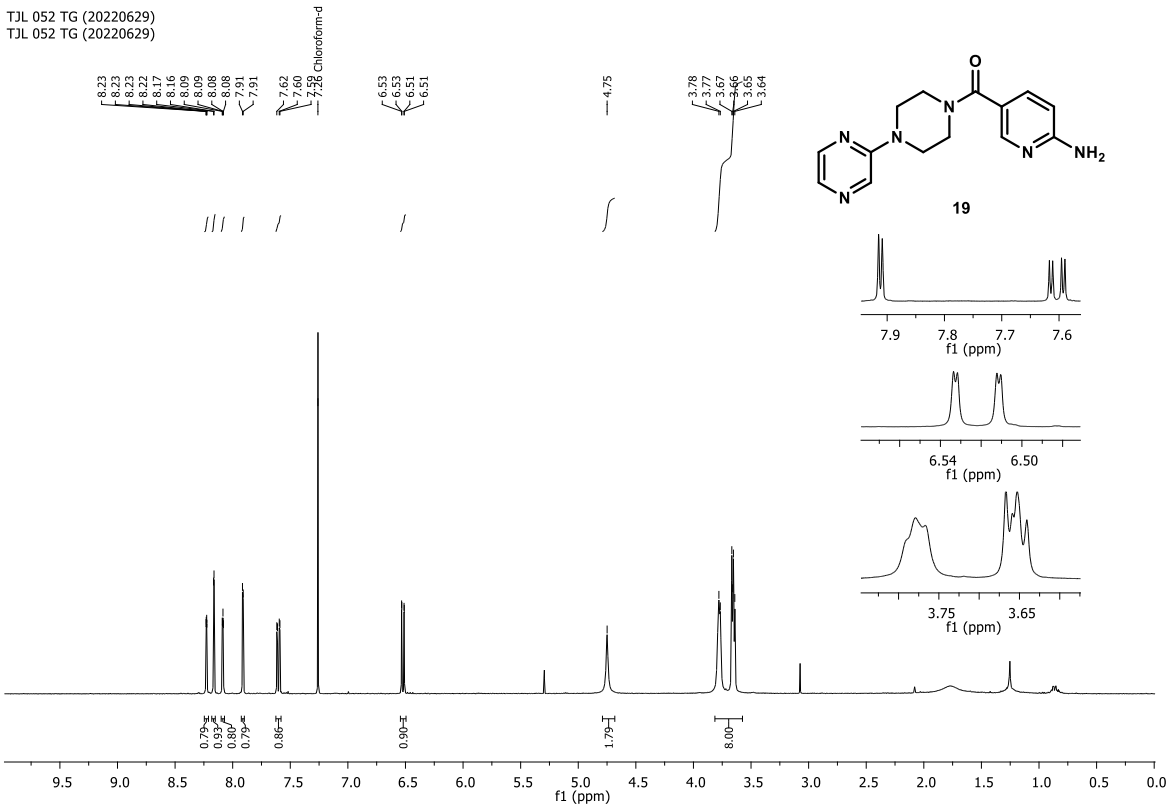
Anexo 32. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **17** (101 MHz, $CDCl_3$)



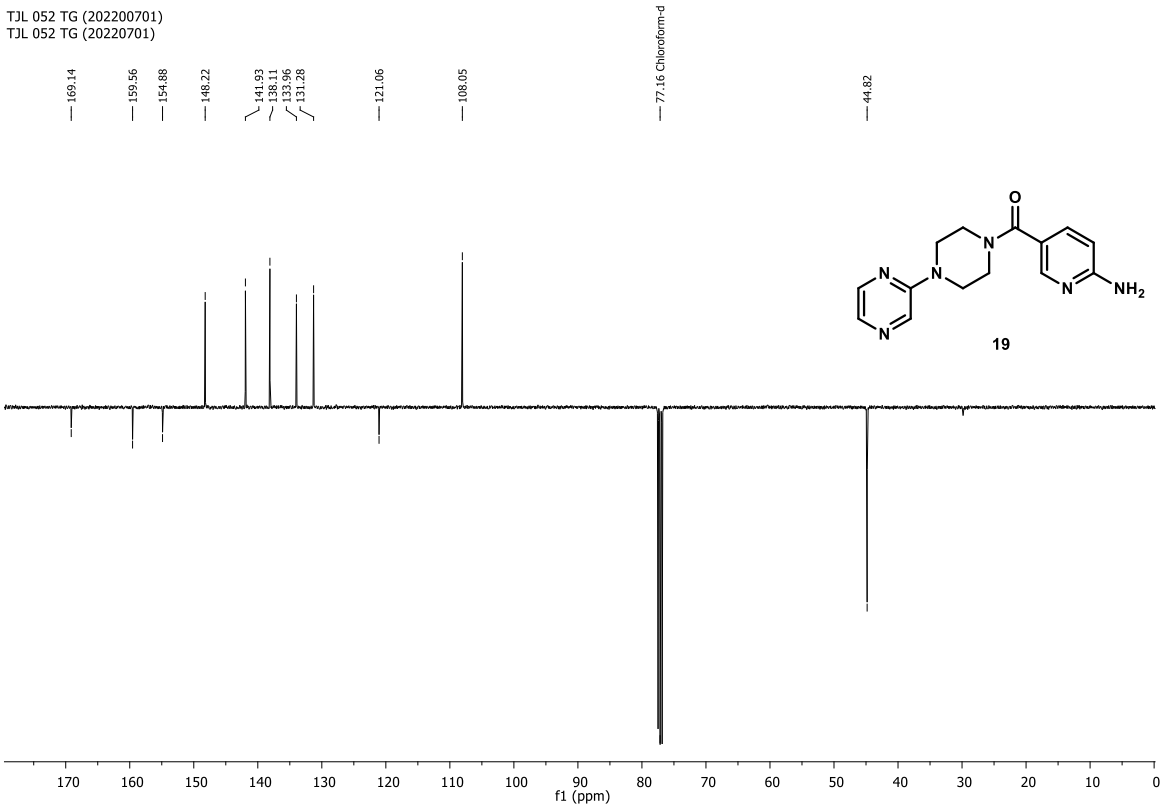
Anexo 33. Espectro de RMN de ^{1}H de **18** (400 MHz, $CDCl_3$)



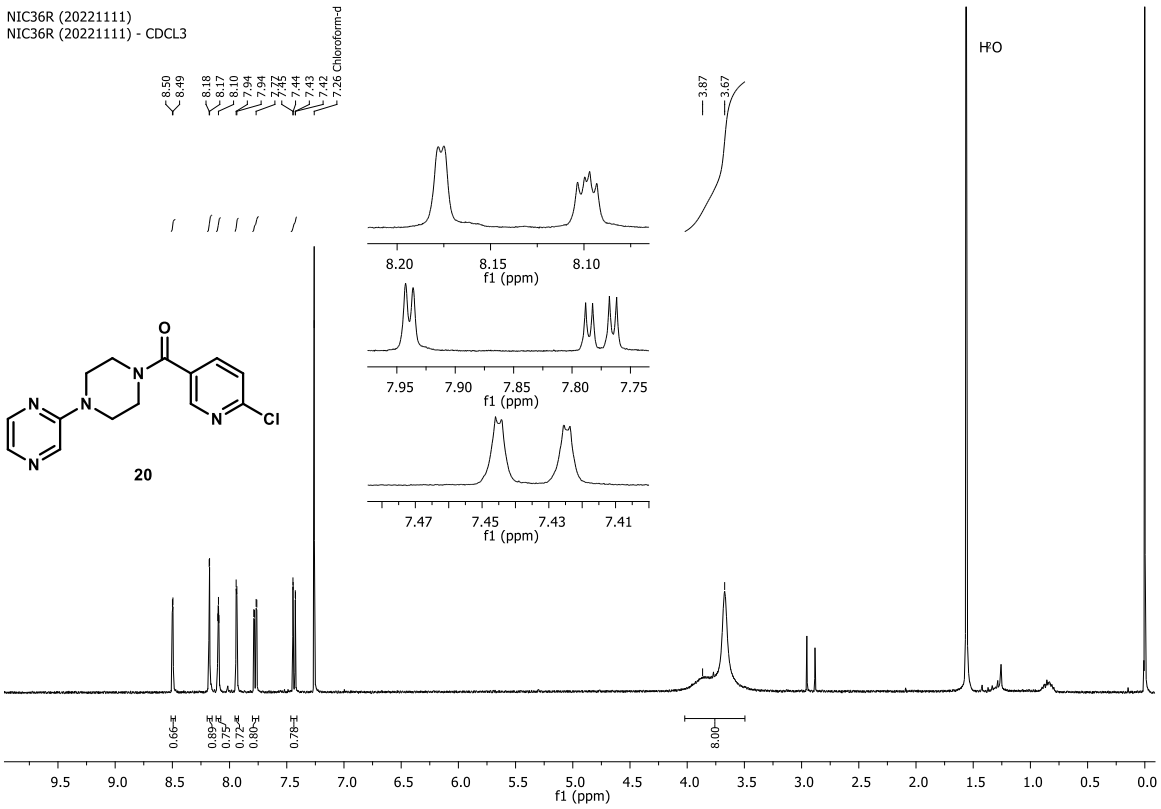
Anexo 34. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **18** (101 MHz, $CDCl_3$)



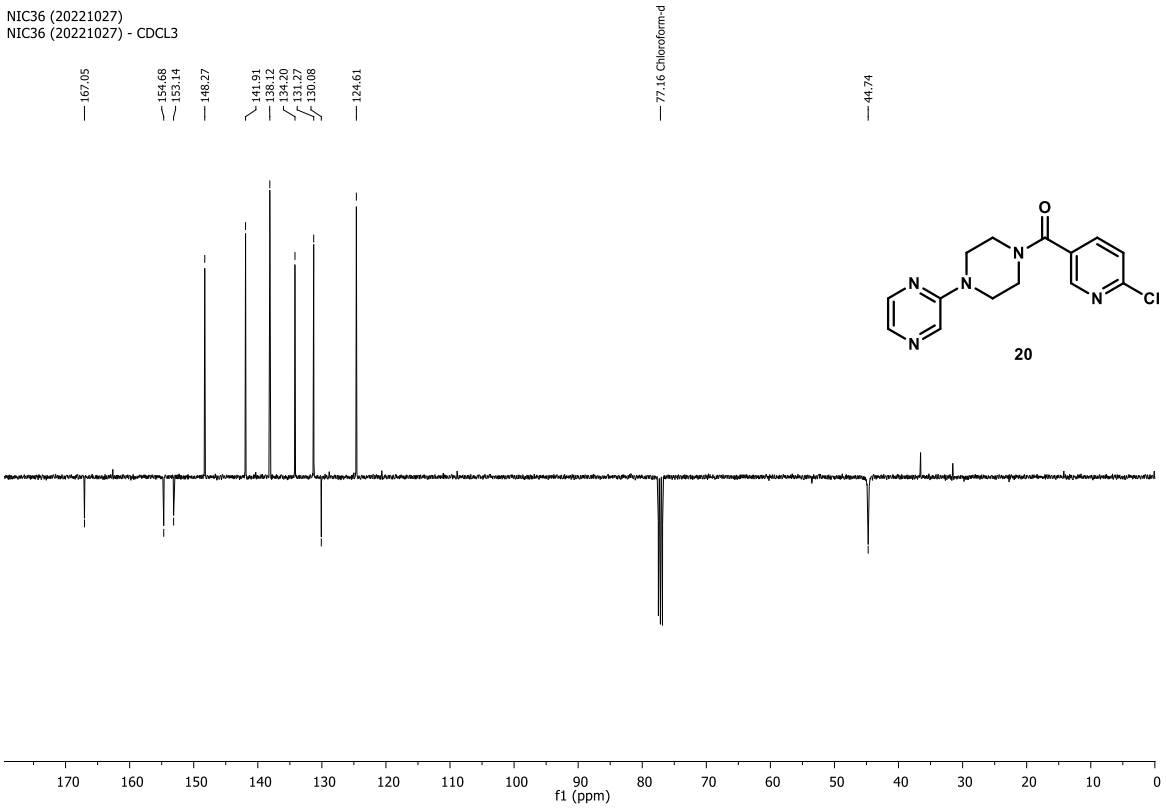
Anexo 35. Espectro de RMN de ^{1}H de **19** (400 MHz, $CDCl_3$)



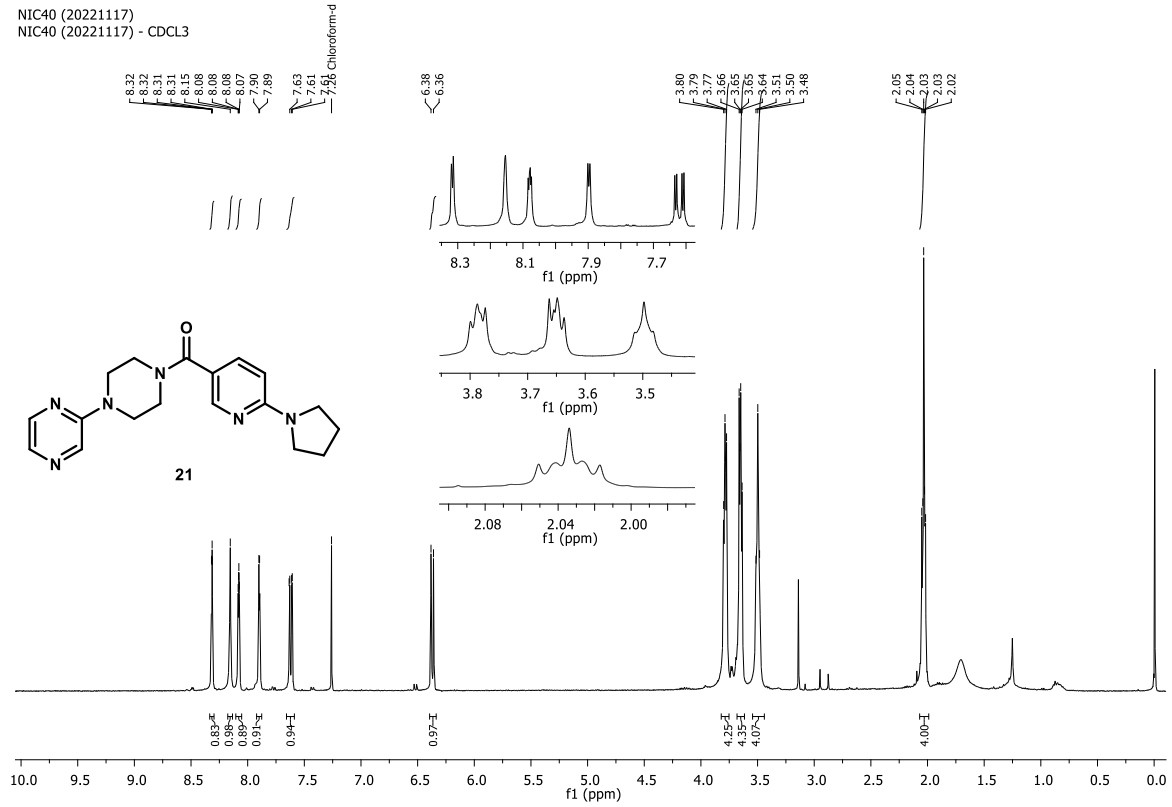
Anexo 36. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **19** (101 MHz, $CDCl_3$)



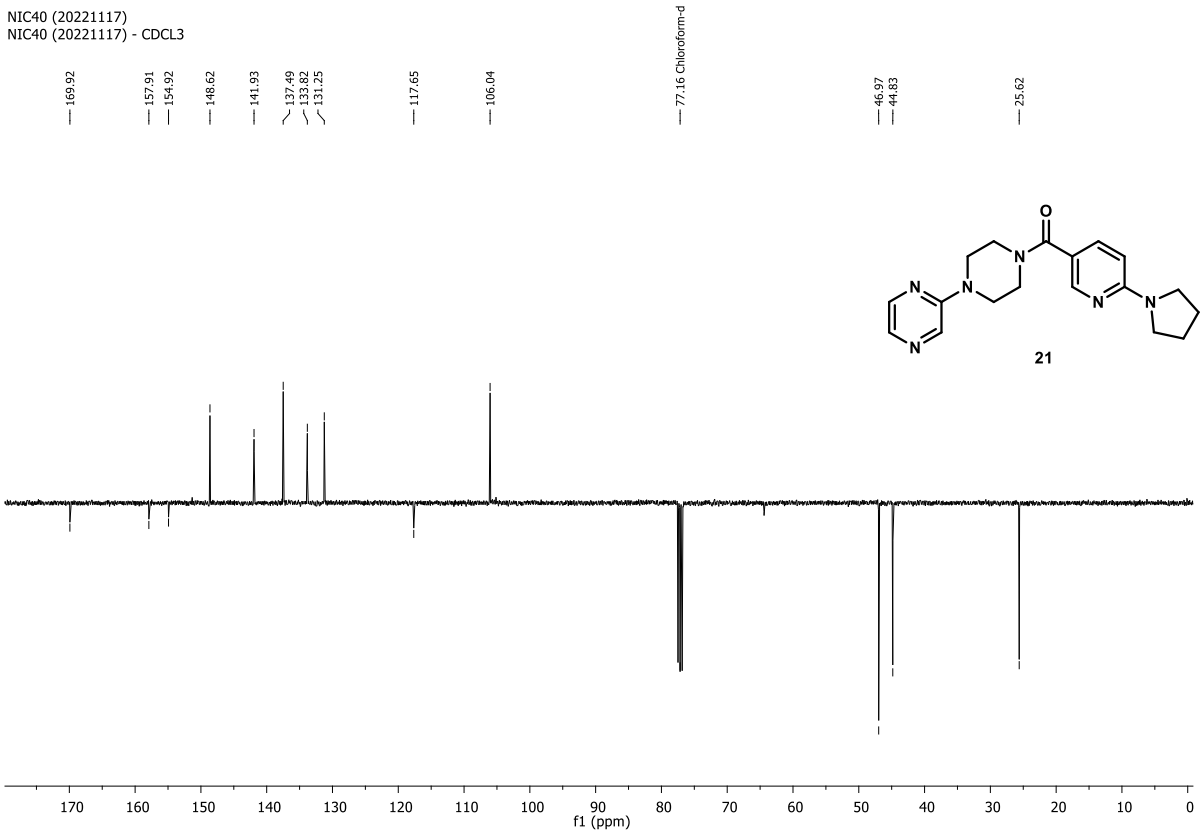
Anexo 37. Espectro de RMN de ^{1}H de **20** (400 MHz, $CDCl_3$)



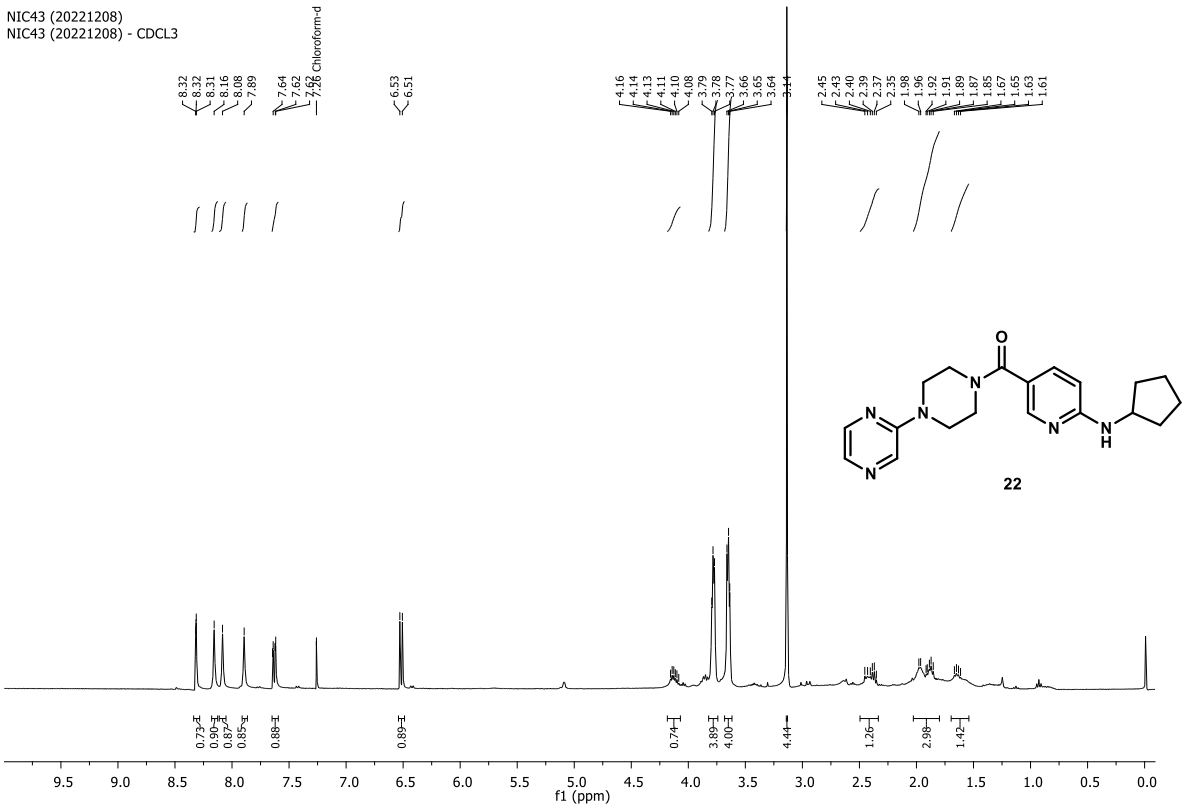
Anexo 38. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **20** (101 MHz, $CDCl_3$)



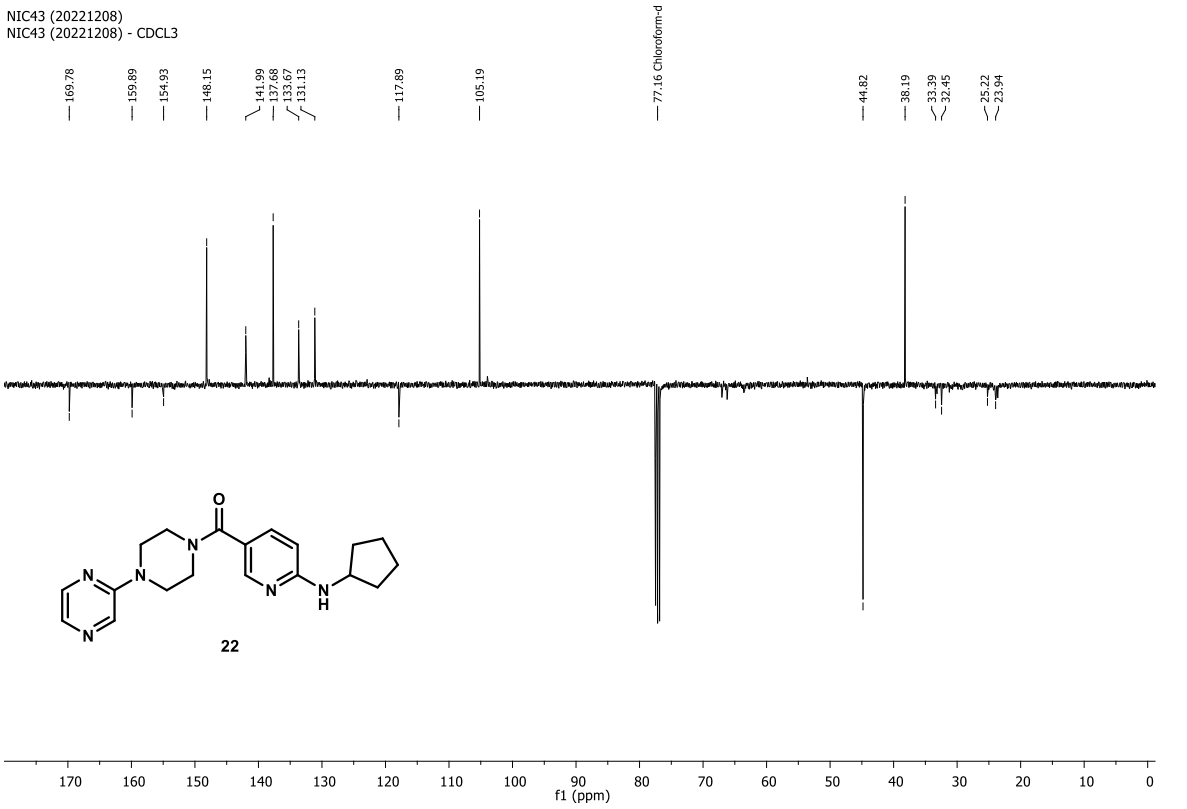
Anexo 39. Espectro de RMN de ^{1}H de **21** (400 MHz, $CDCl_3$)



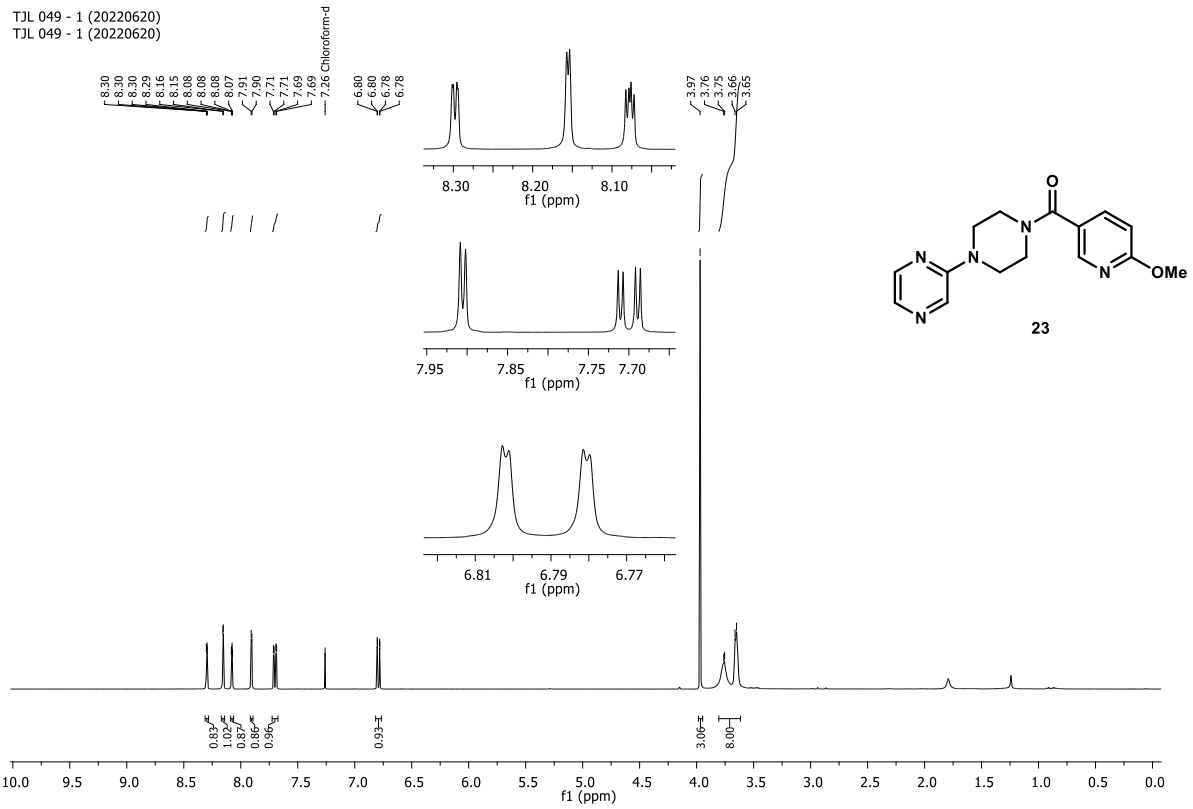
Anexo 40. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **21** (101 MHz, $CDCl_3$)



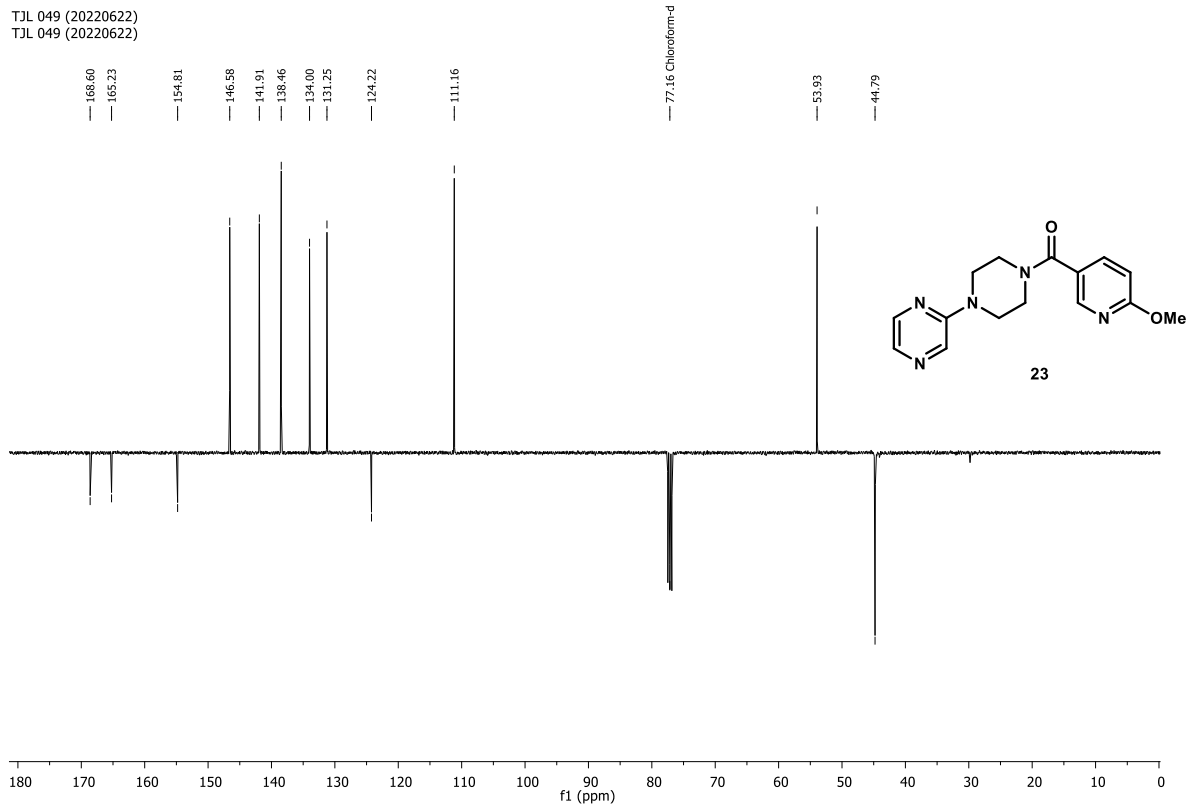
Anexo 41. Espectro de RMN de ^{1}H de **22** (400 MHz, $CDCl_3$)



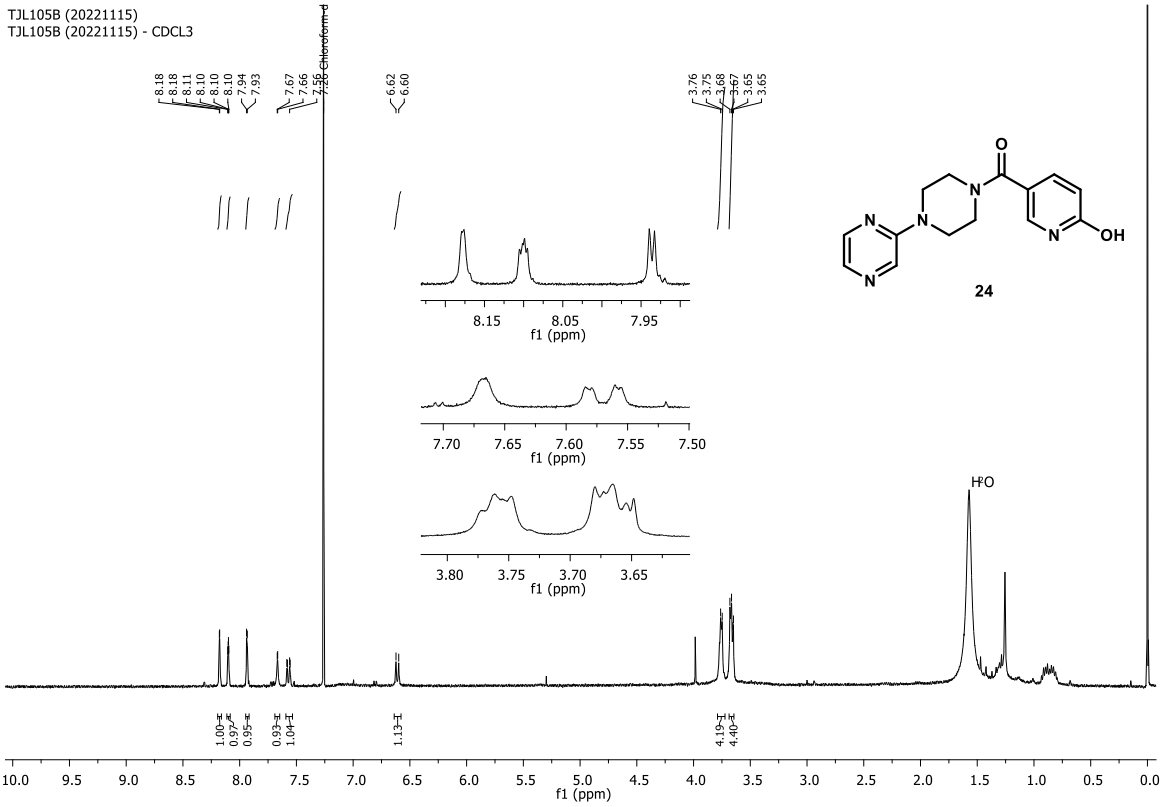
Anexo 42. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **22** (101 MHz, $CDCl_3$)



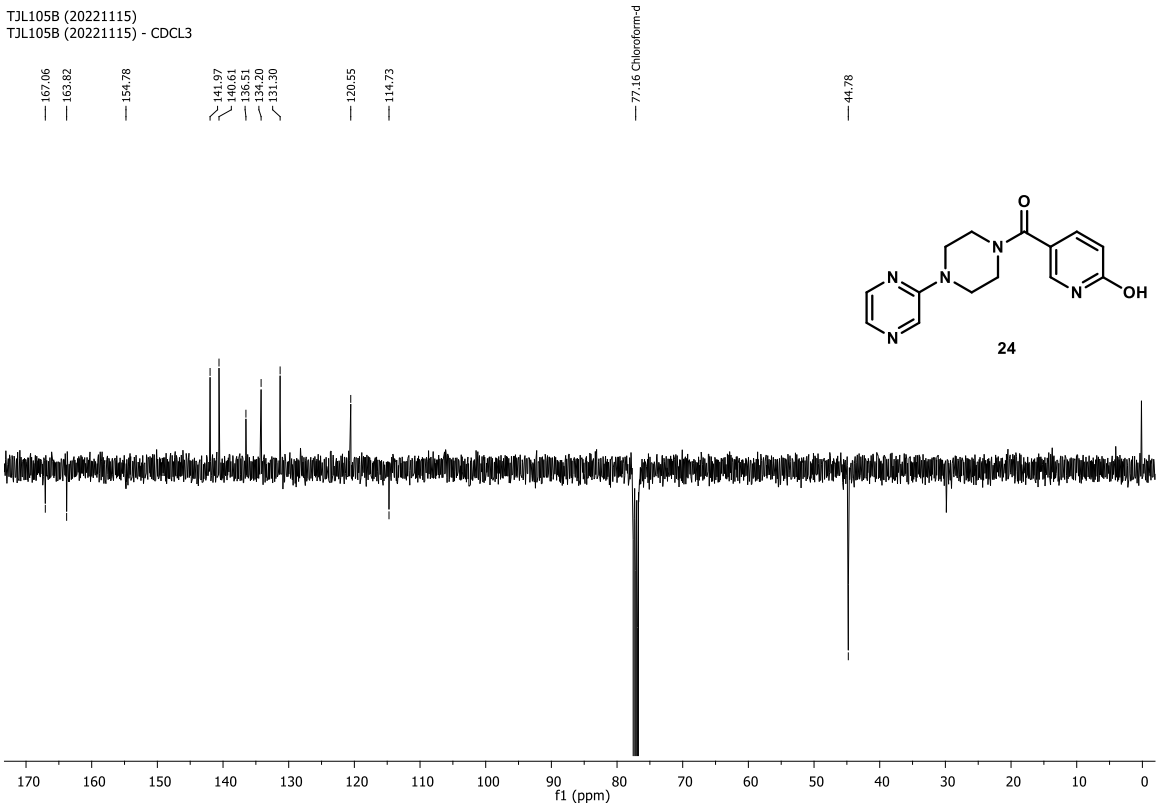
Anexo 43. Espectro de RMN de ^{1}H de **23** (400 MHz, $CDCl_3$)



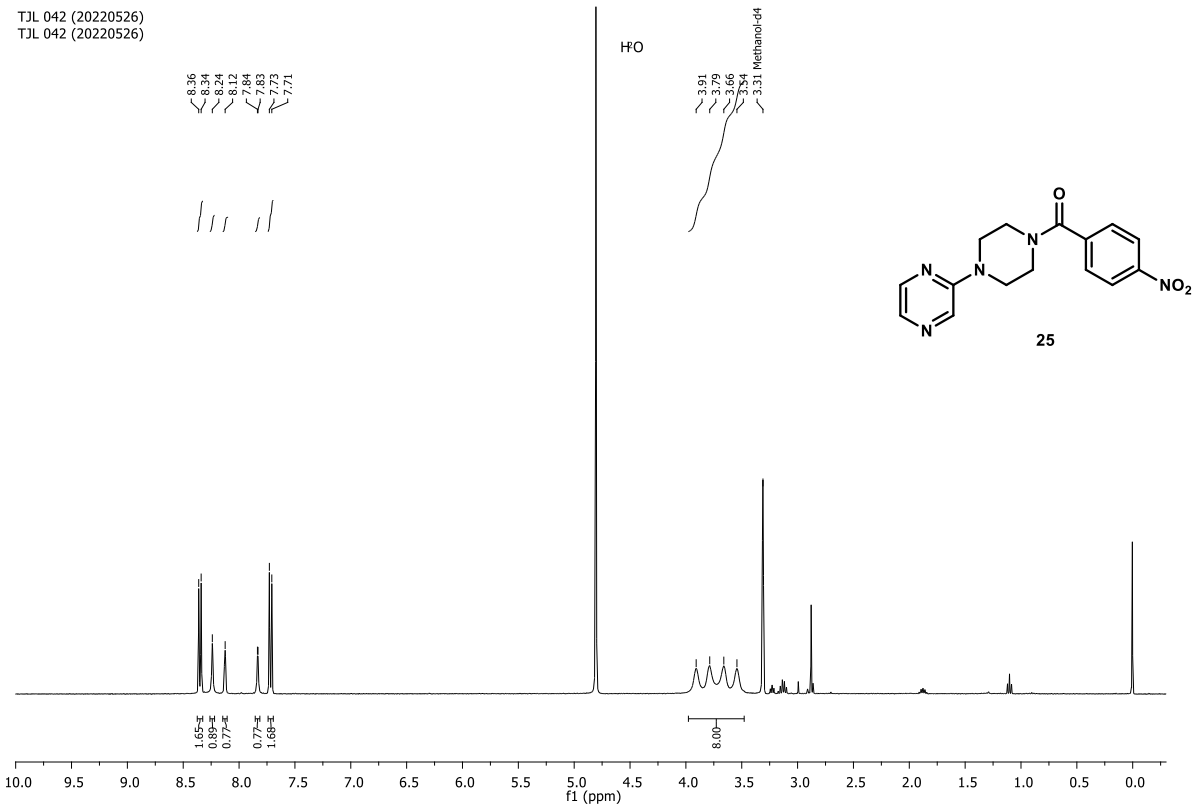
Anexo 44. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **23** (101 MHz, $CDCl_3$)



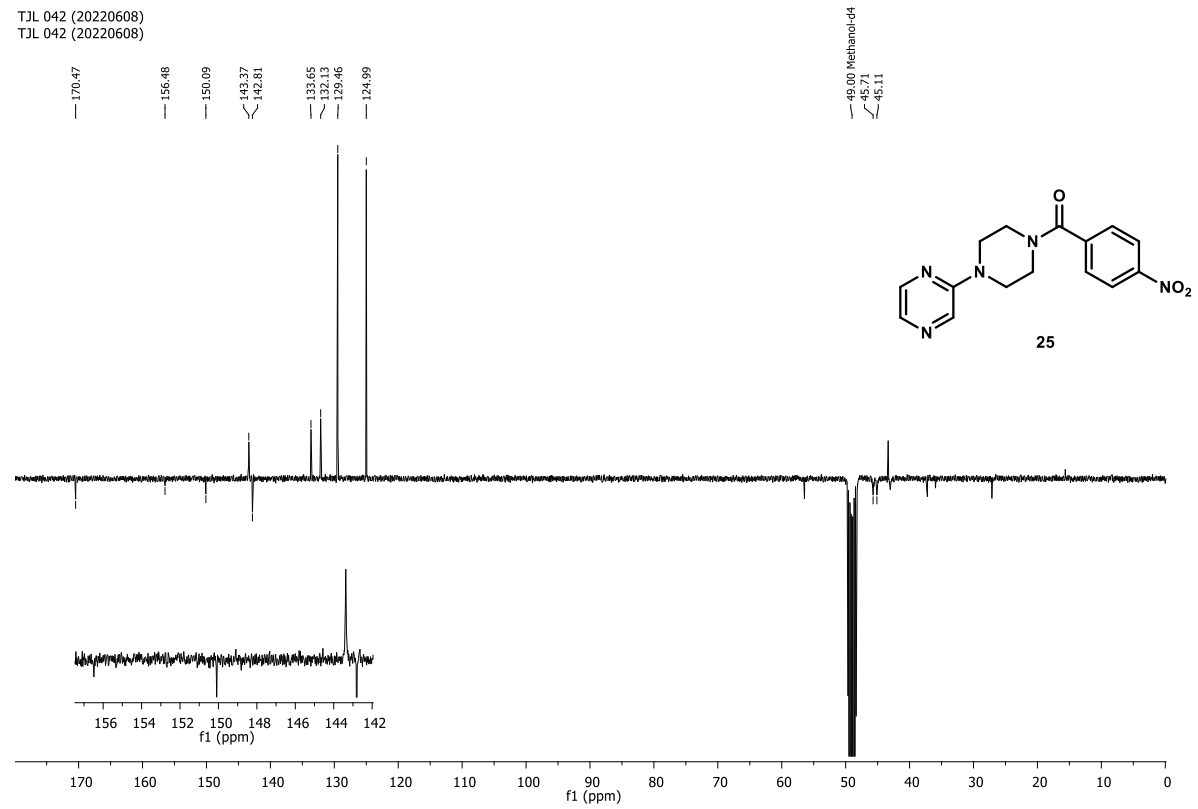
Anexo 45. Espectro de RMN de ^{1}H de **24** (400 MHz, $CDCl_3$)



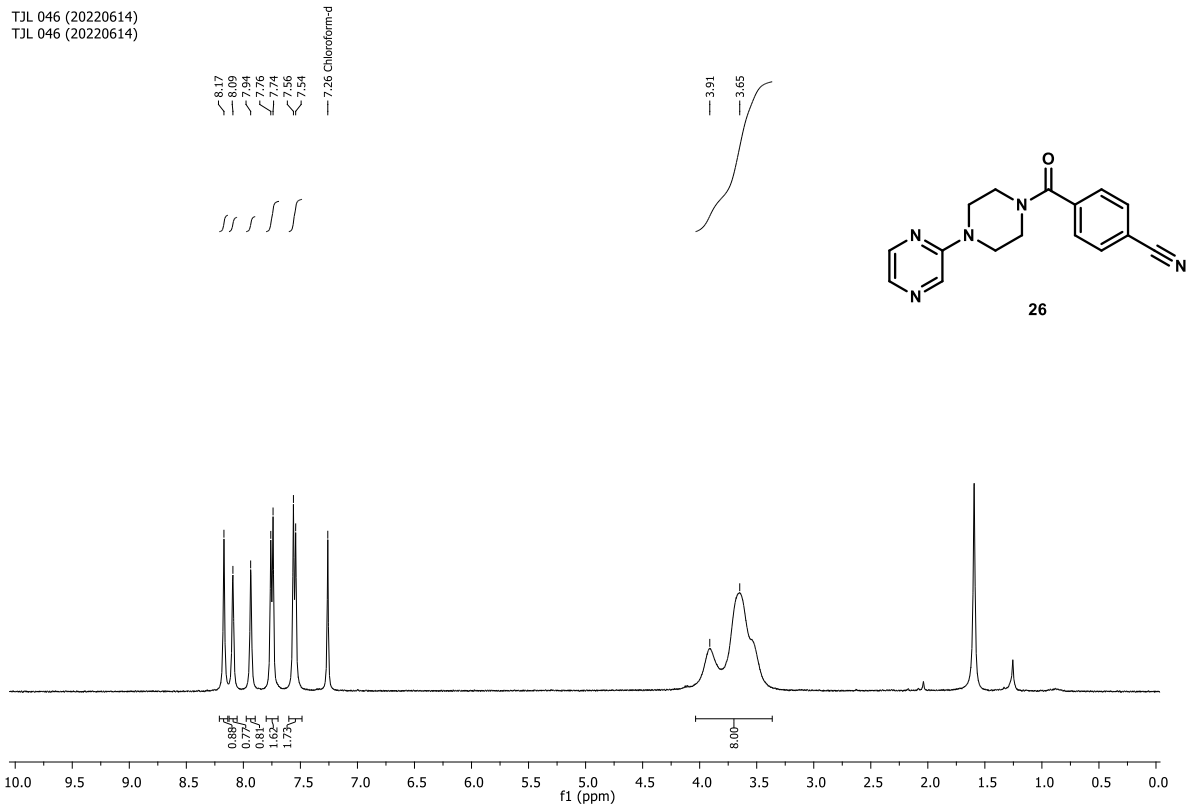
Anexo 46. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **24** (101 MHz, $CDCl_3$)



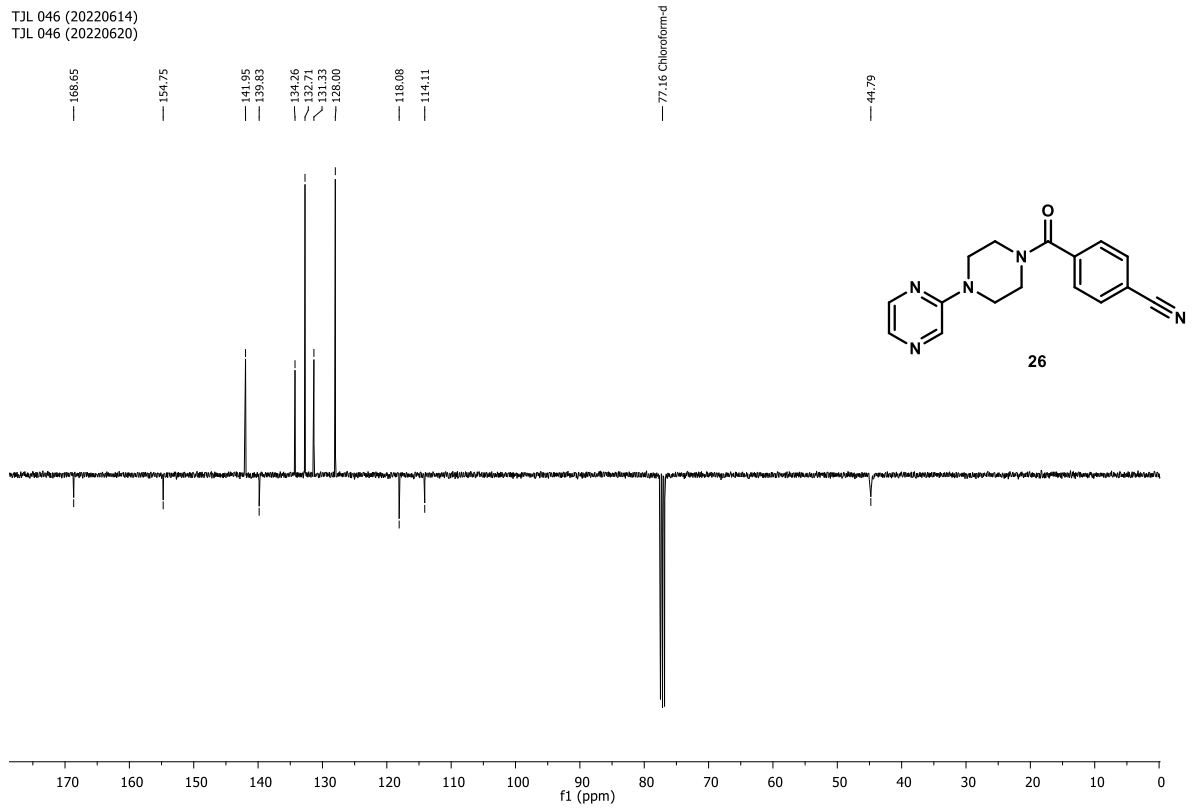
Anexo 47. Espectro de RMN de ^{1}H de **25** (400 MHz, CD_3OD)



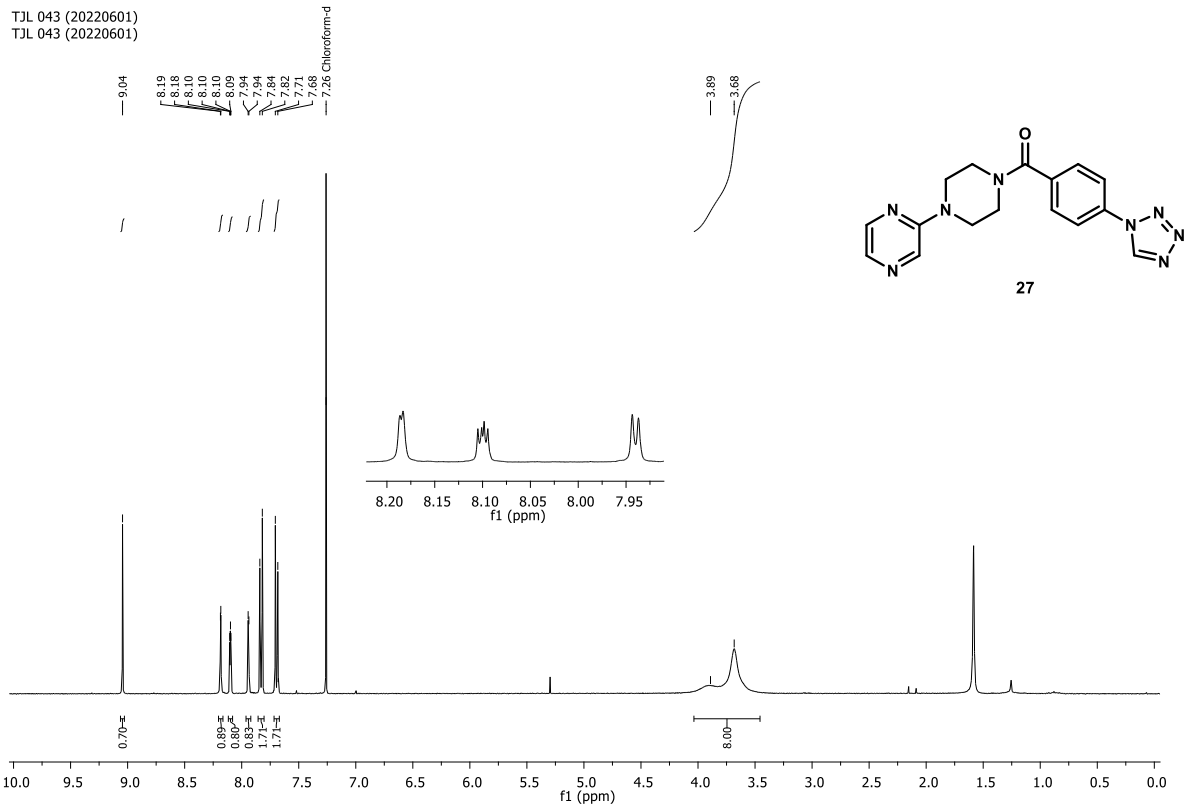
Anexo 48. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **25** (101 MHz, CD_3OD)



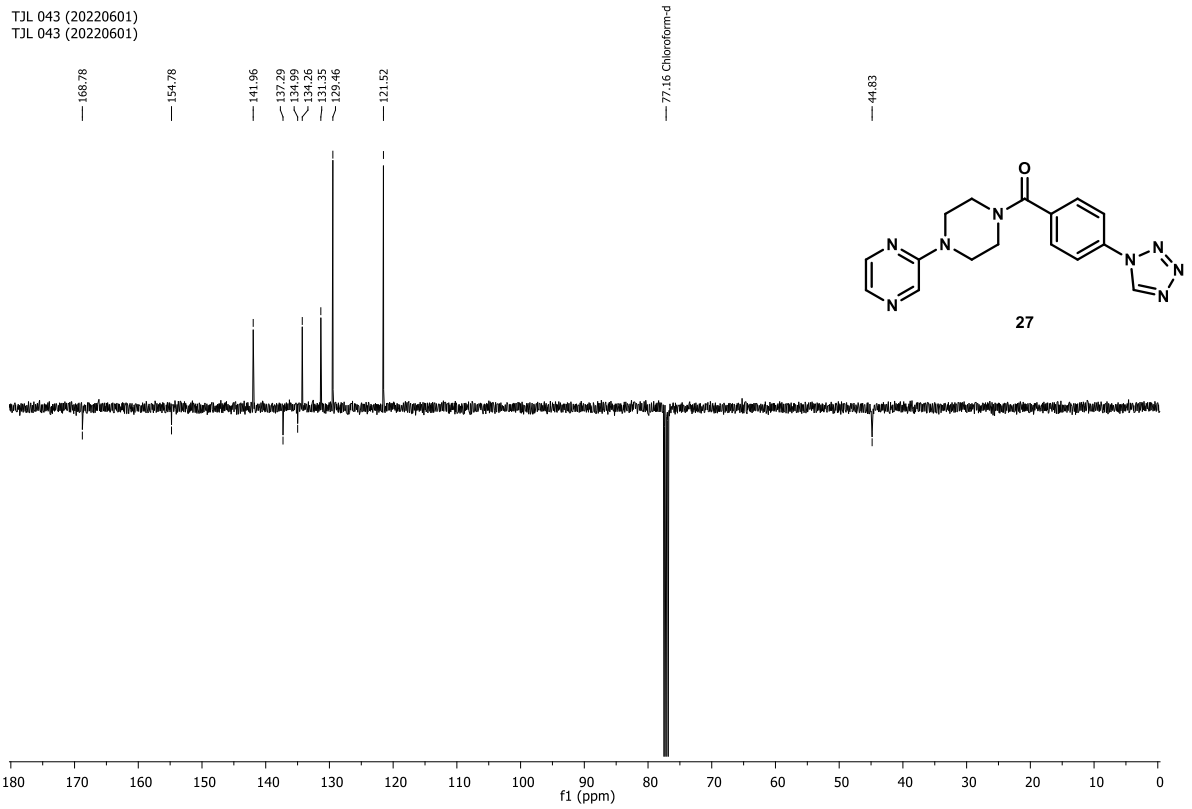
Anexo 49. Espectro de RMN de ^{1}H de **26** (400 MHz, $CDCl_3$)



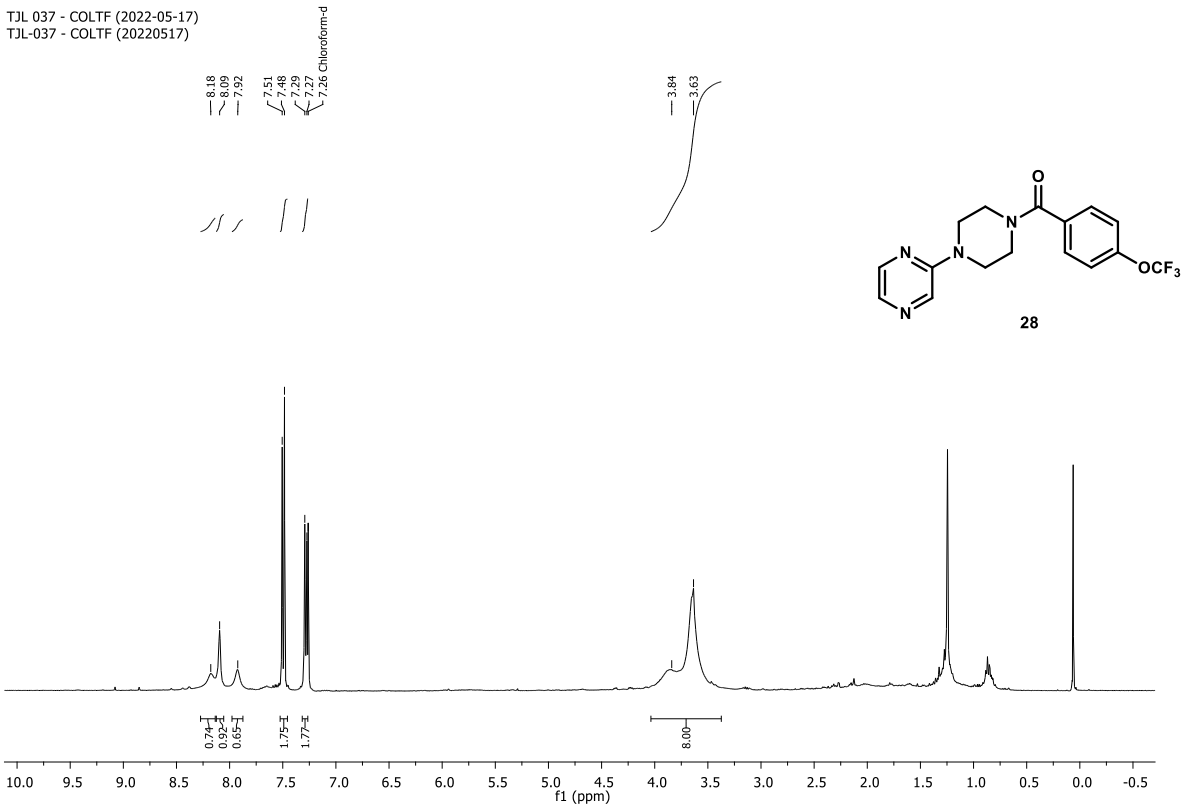
Anexo 50. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **26** (101 MHz, $CDCl_3$)



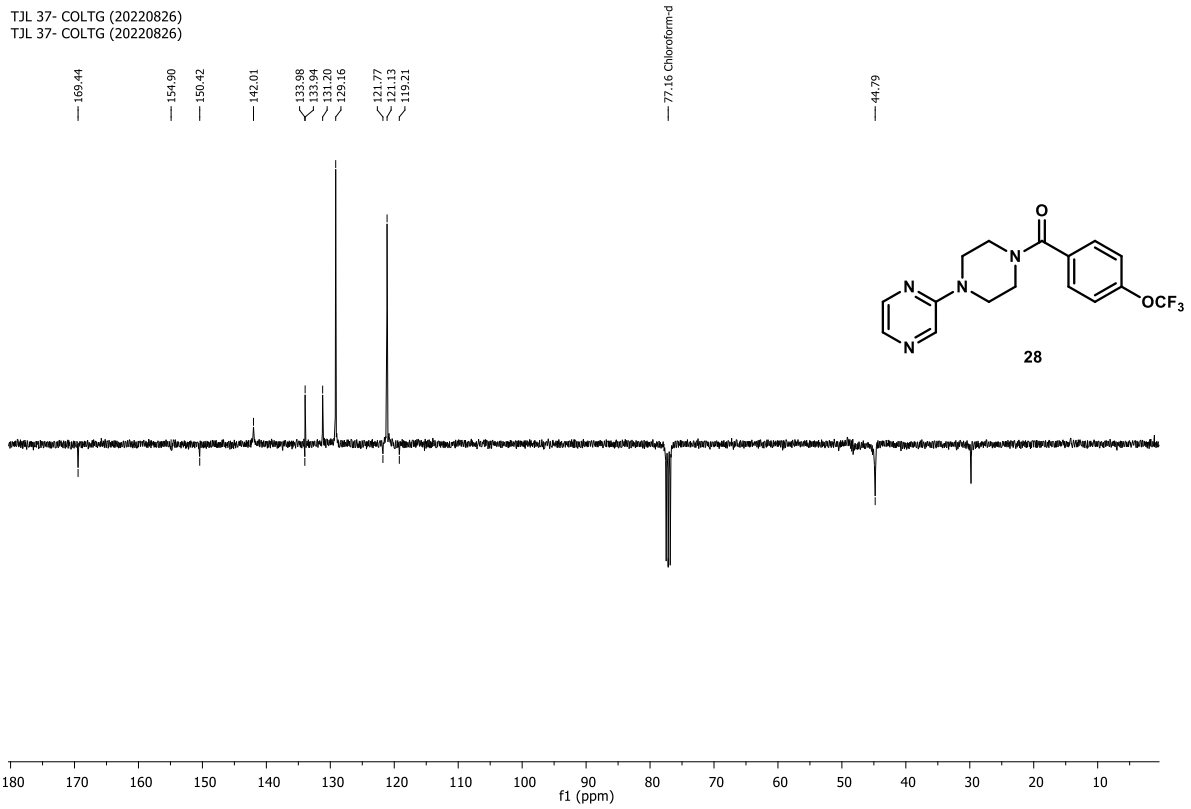
Anexo 51. Espectro de RMN de ^{1}H de **27** (400 MHz, $CDCl_3$)



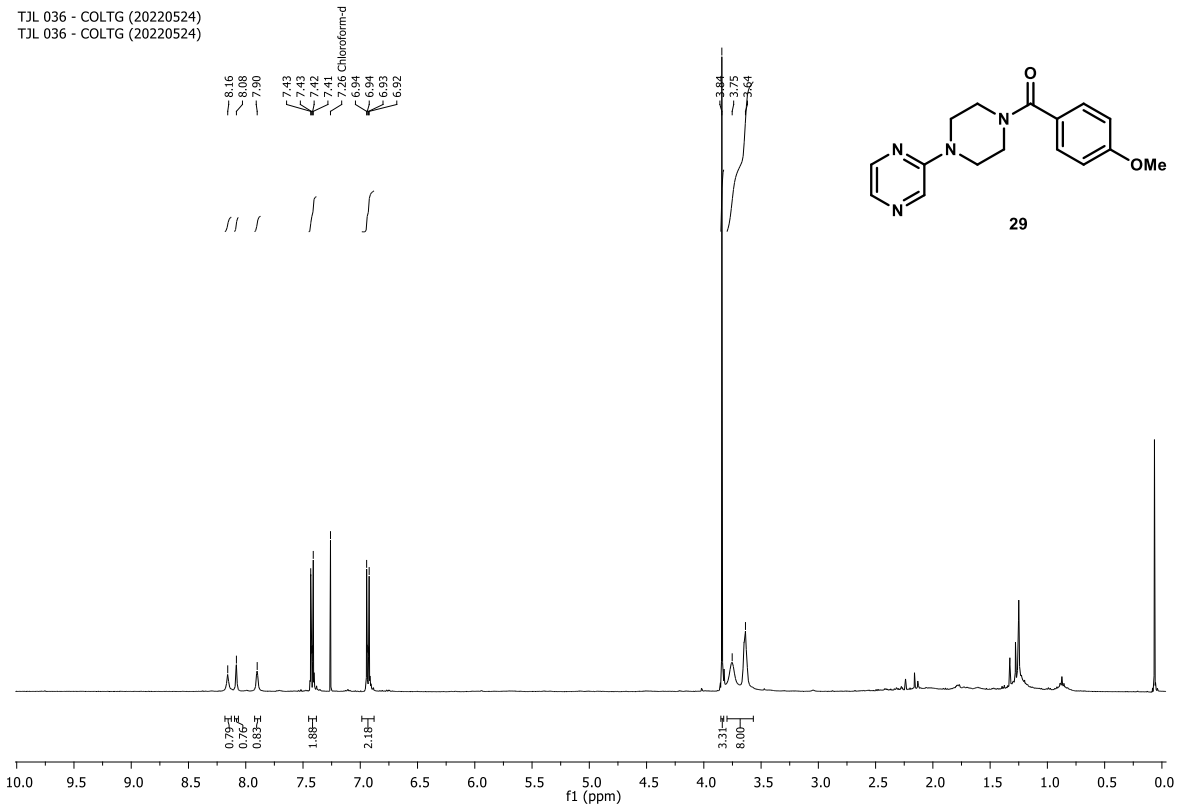
Anexo 52. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **27** (101 MHz, $CDCl_3$)



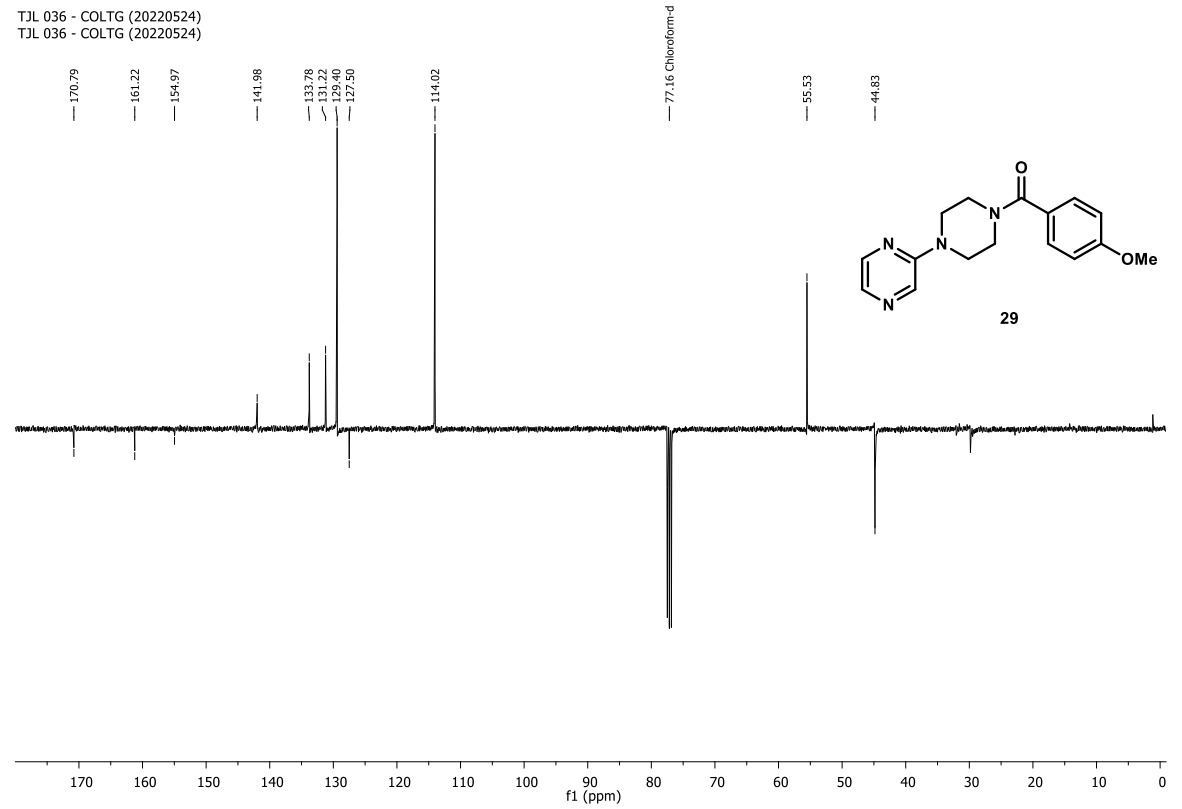
Anexo 53. Espectro de RMN de ^{1}H de **28** (400 MHz, $CDCl_3$)



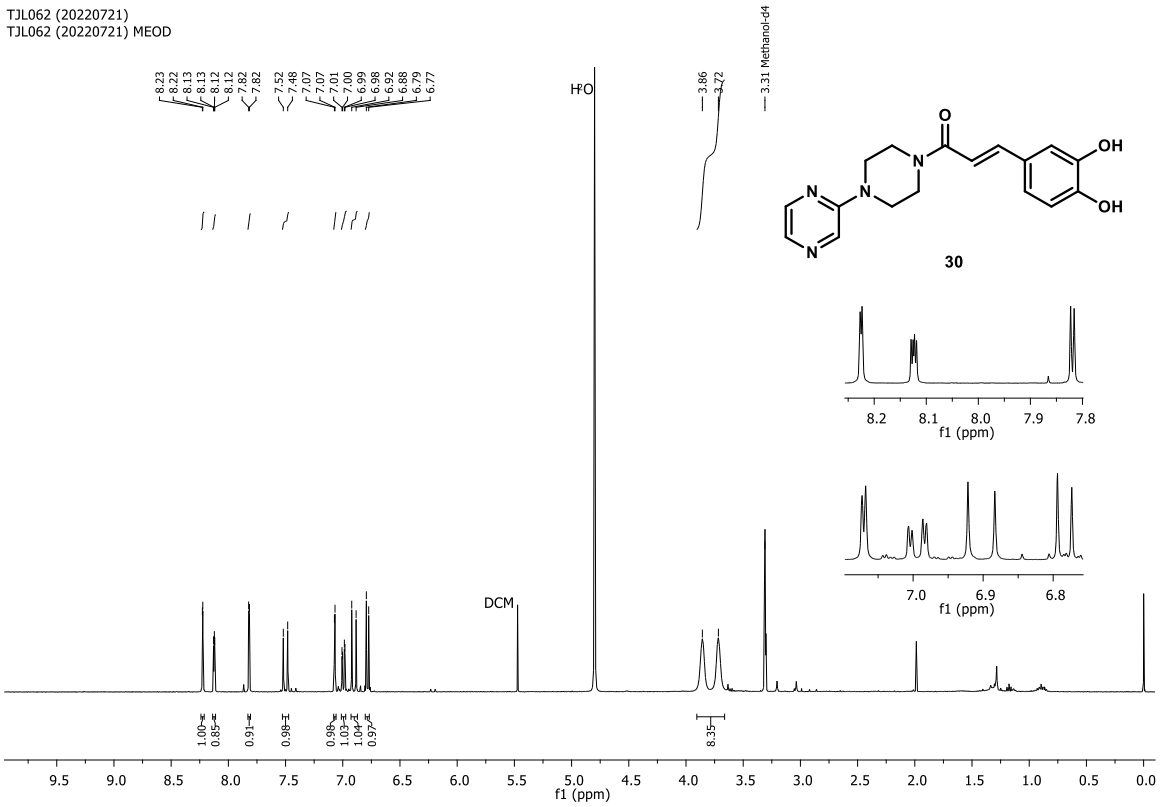
Anexo 54. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **28** (101 MHz, $CDCl_3$)



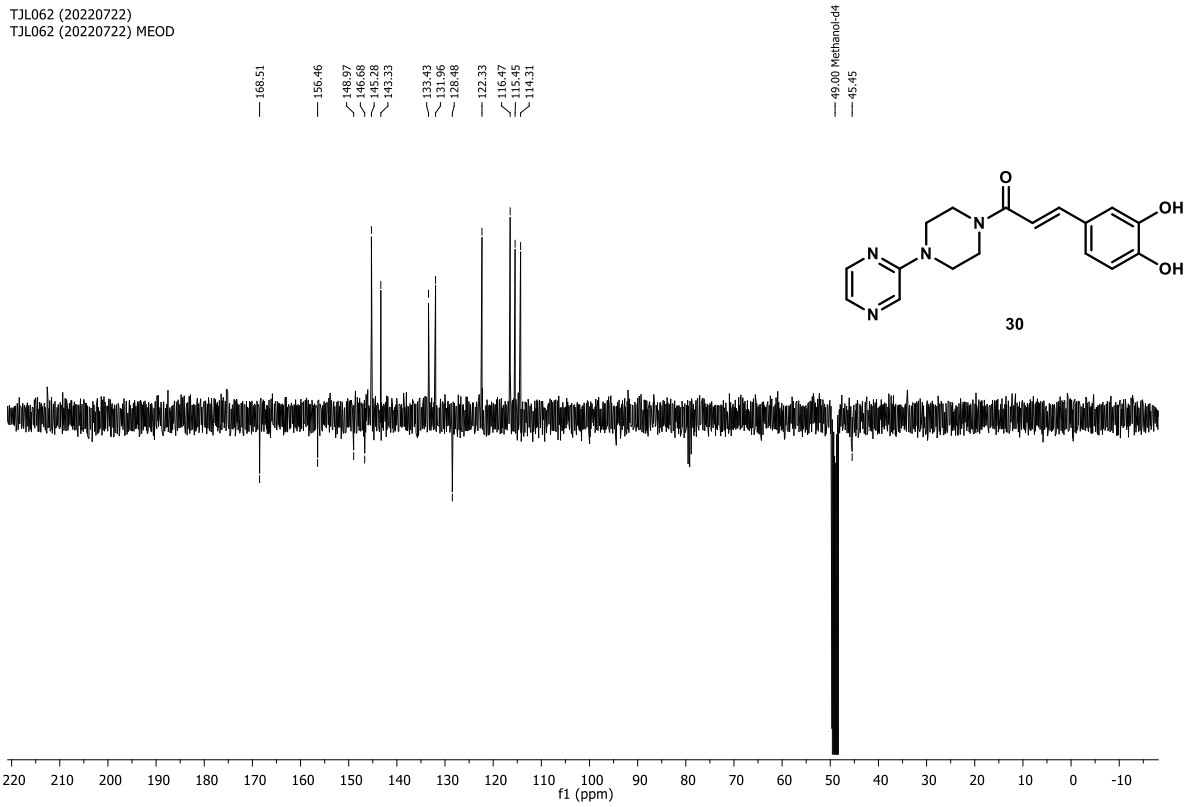
Anexo 55. Espectro de RMN de ^{1}H de **29** (400 MHz, $CDCl_3$)



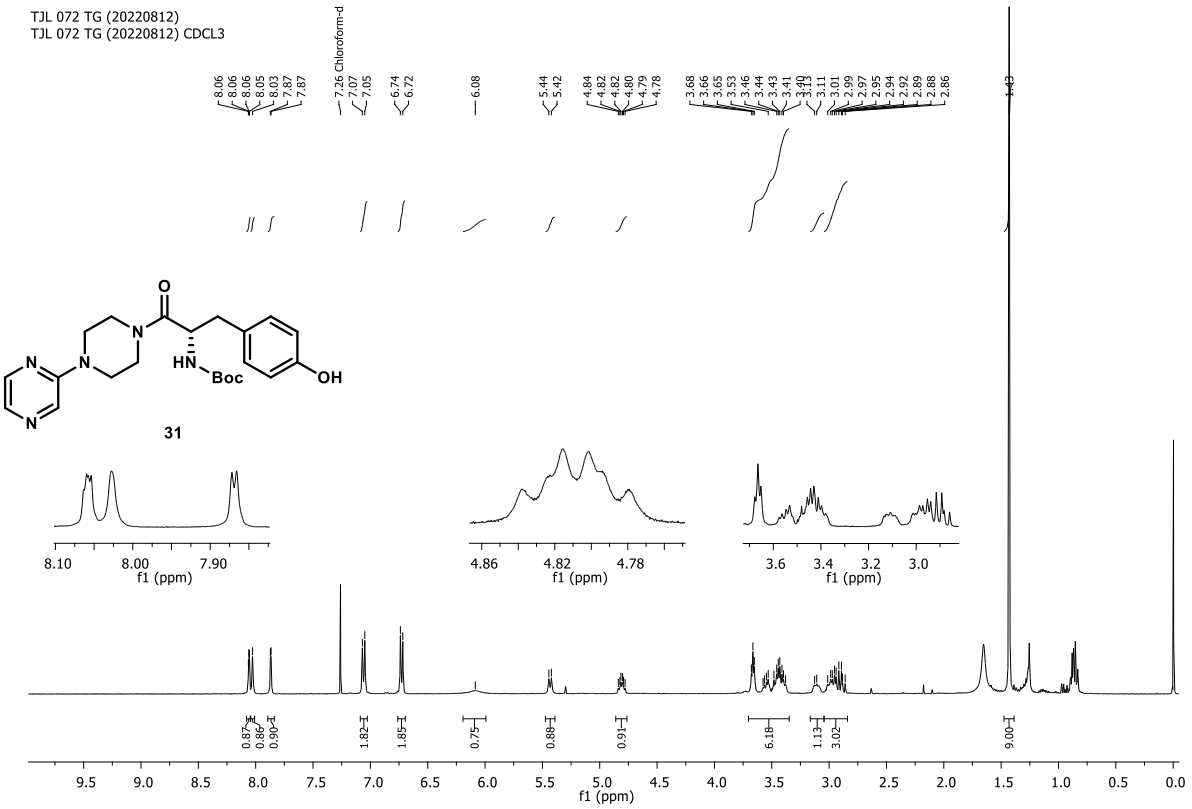
Anexo 56. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **29** (101 MHz, $CDCl_3$)



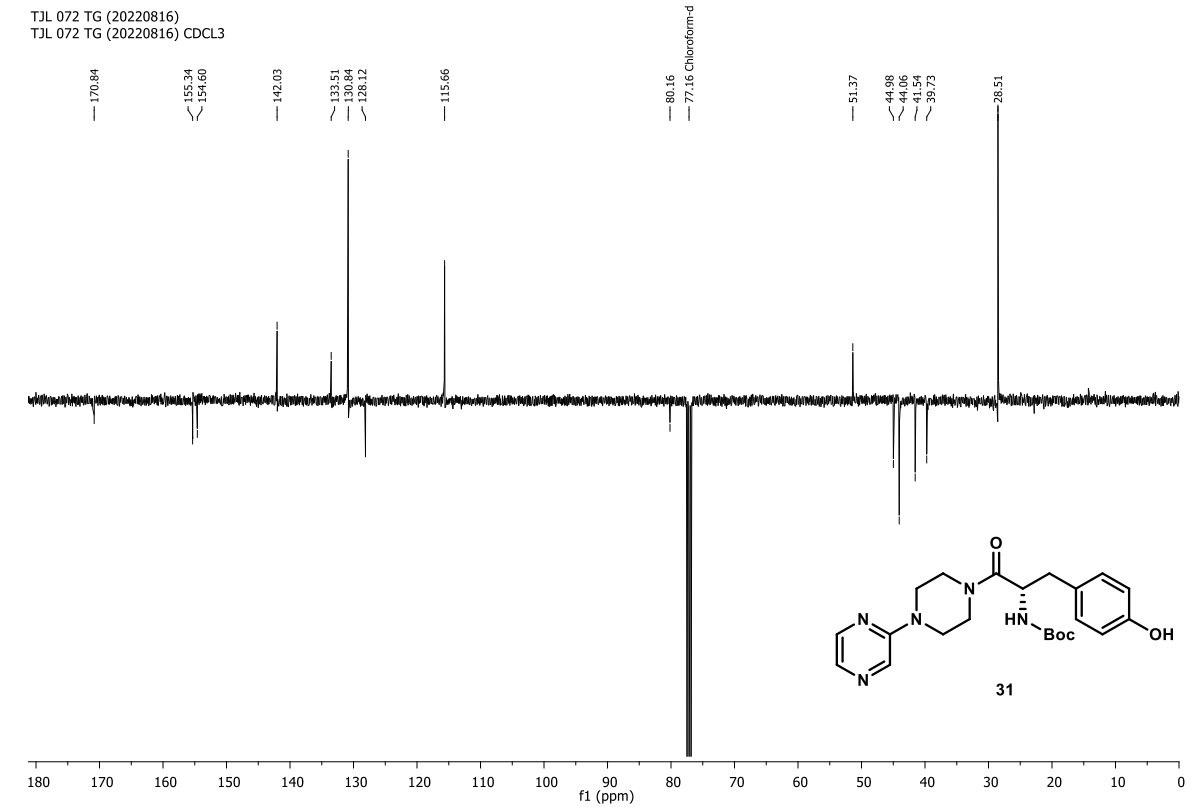
Anexo 57. Espectro de RMN de ^{1}H de **30** (400 MHz, CD_3OD)



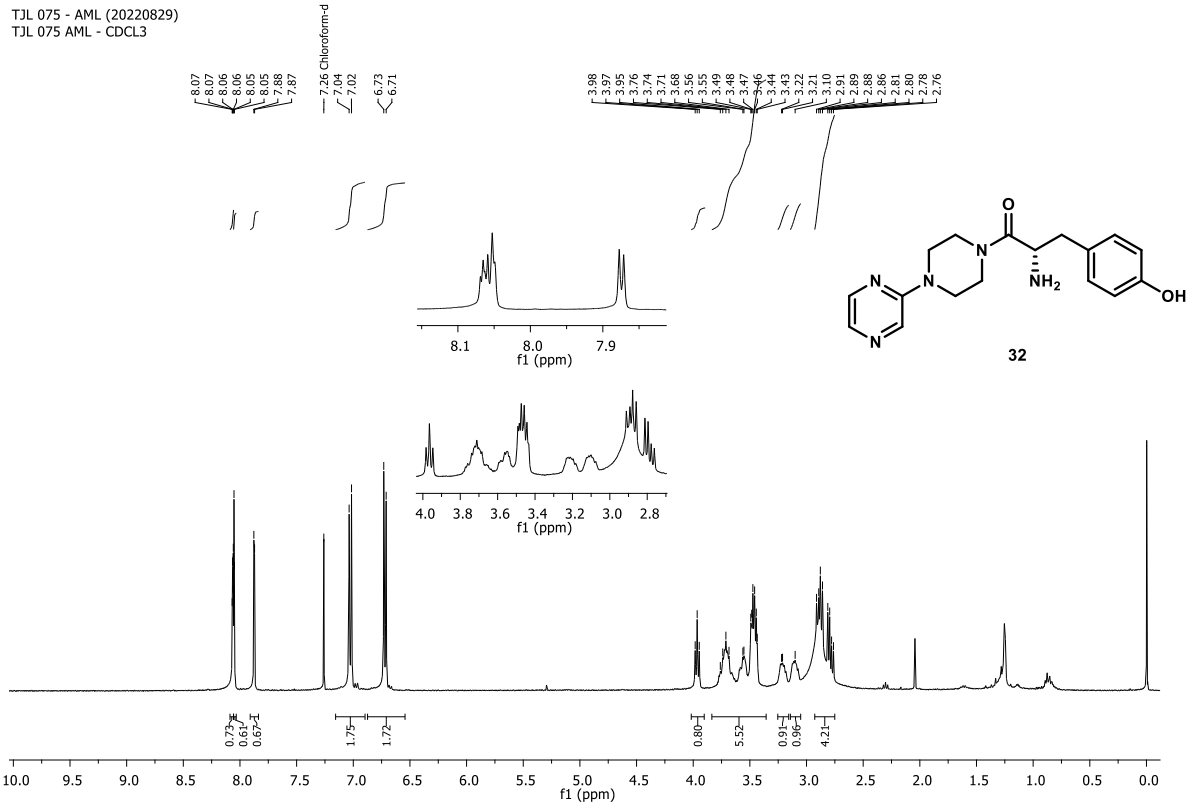
Anexo 58. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **30** (101 MHz, CD_3OD)



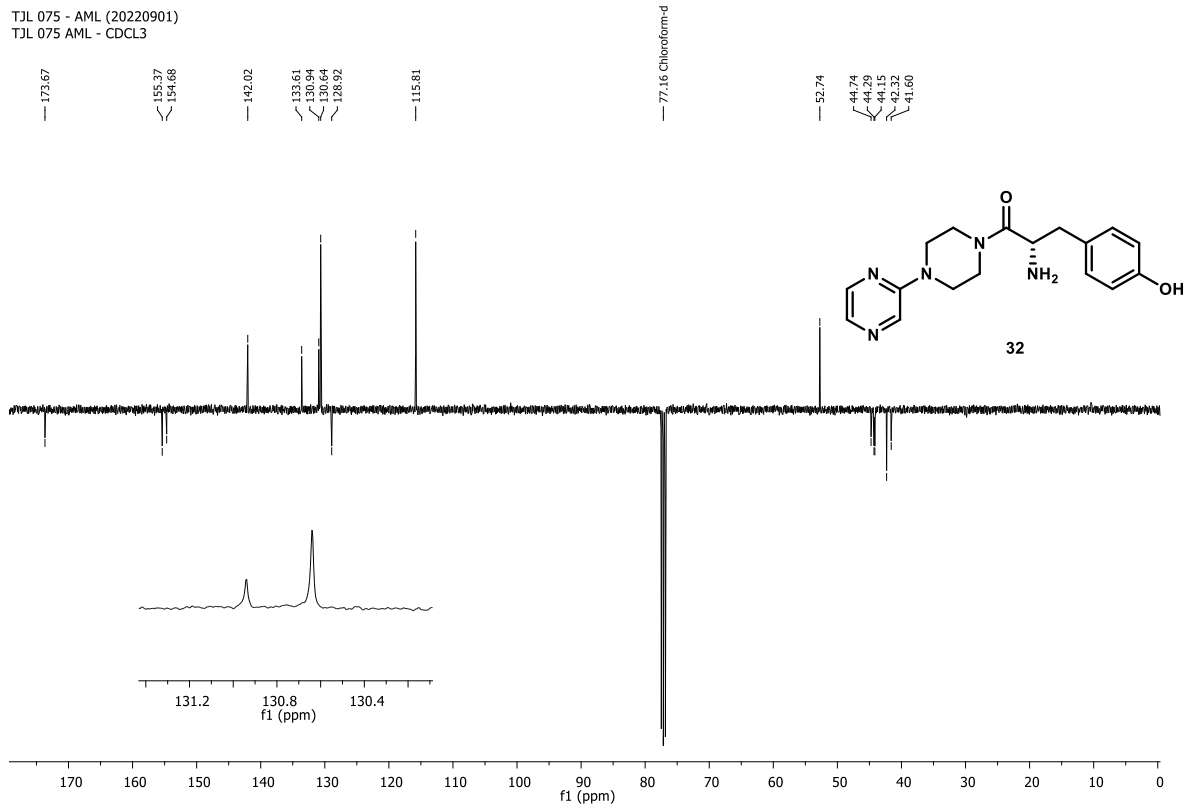
Anexo 59. Espectro de RMN de ^{1}H de **31** (400 MHz, $CDCl_3$)



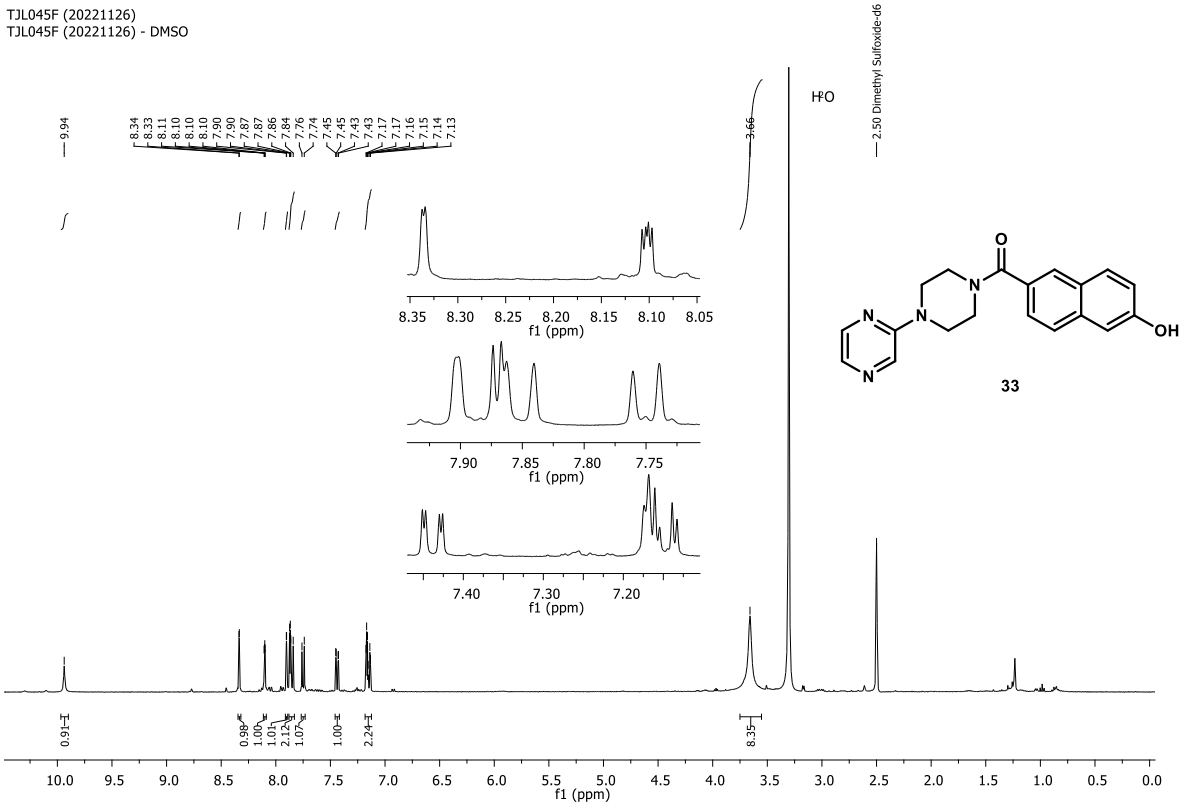
Anexo 60. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **31** (101 MHz, $CDCl_3$)



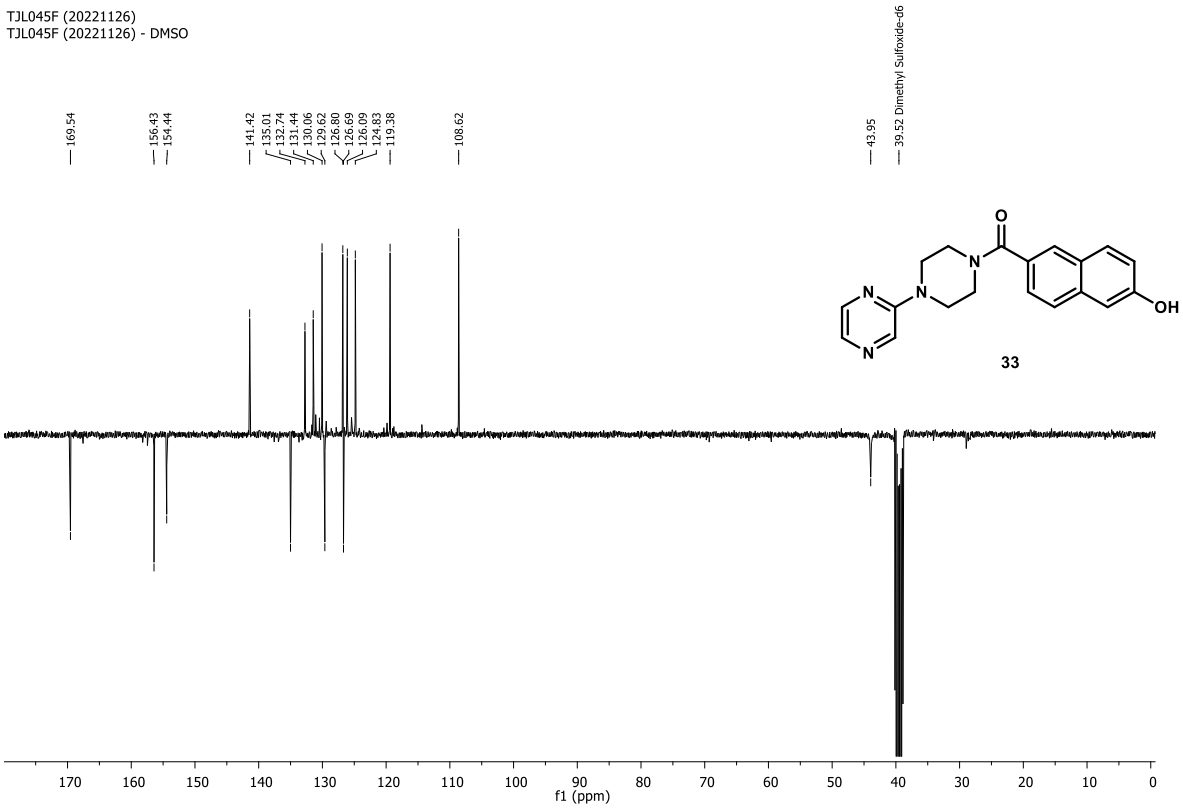
Anexo 61. Espectro de RMN de ^{1}H de **32** (400 MHz, $CDCl_3$)



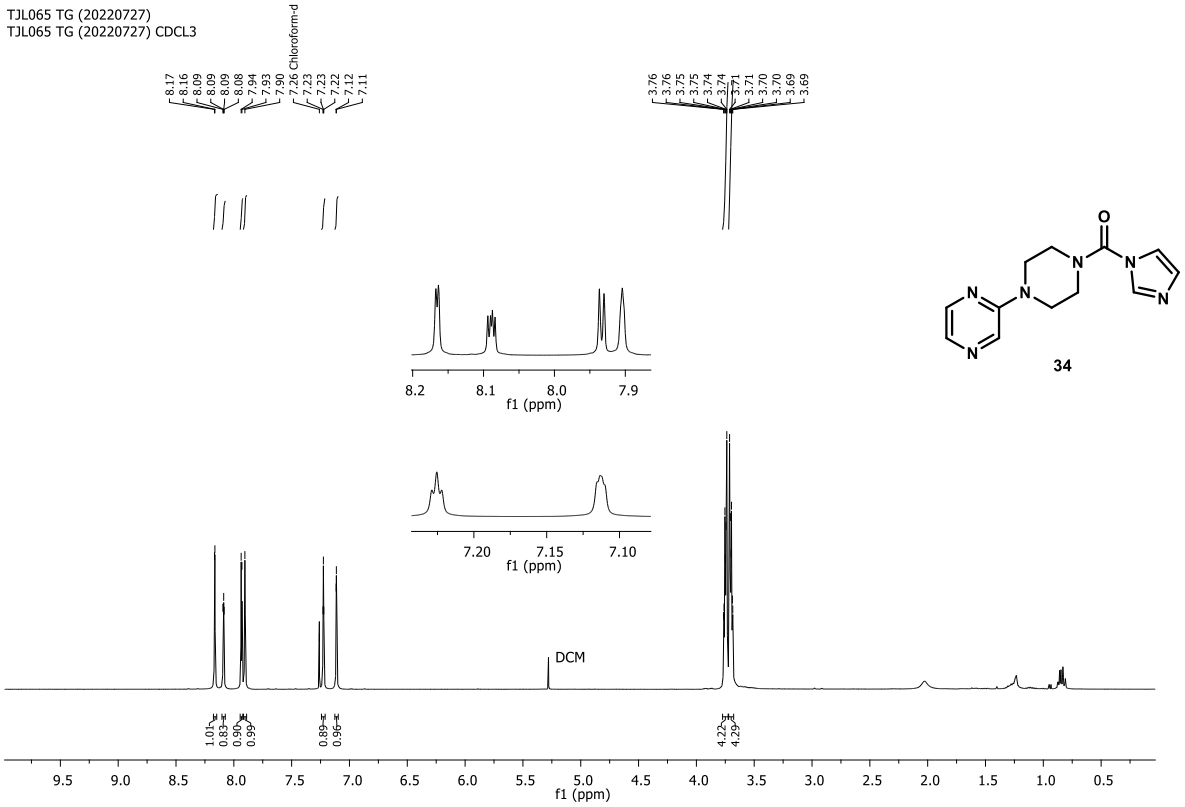
Anexo 62. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **32** (101 MHz, $CDCl_3$)



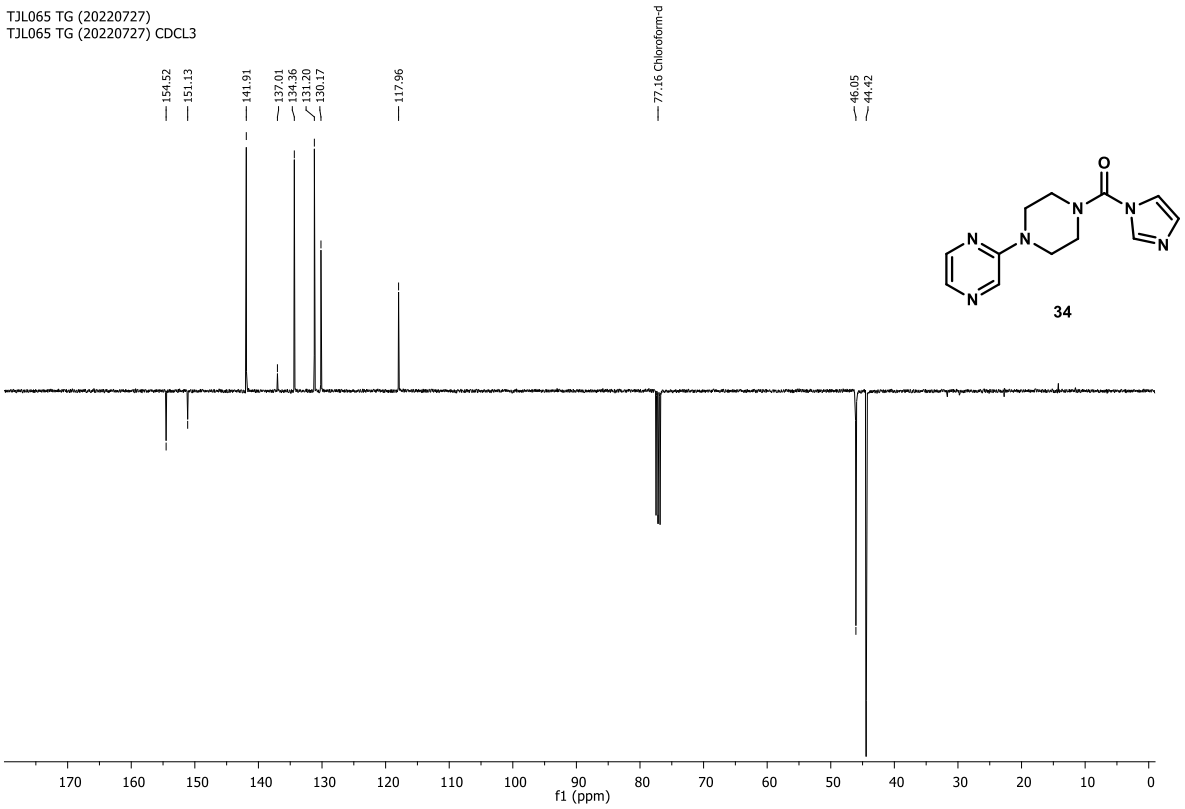
Anexo 63. Espectro de RMN de ^{1}H de **33** (400 MHz, DMSO-d_6)



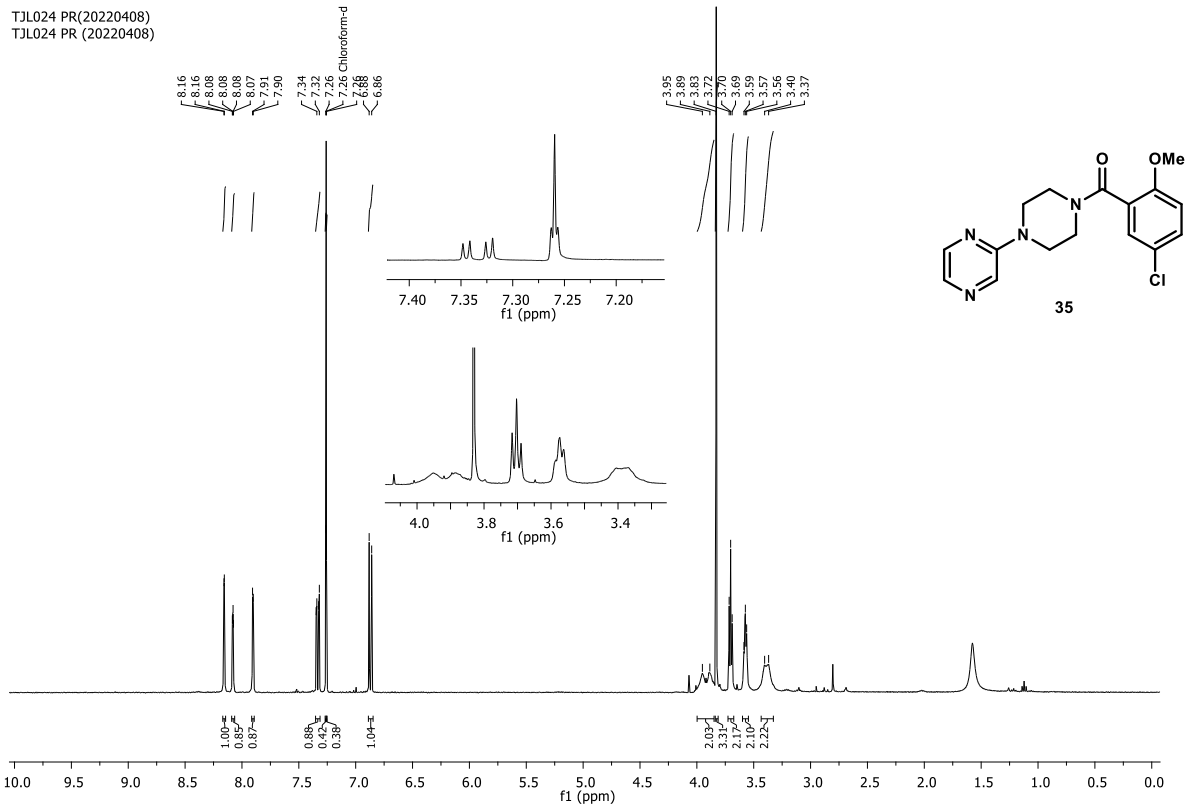
Anexo 64. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **33** (101 MHz, DMSO-d_6)



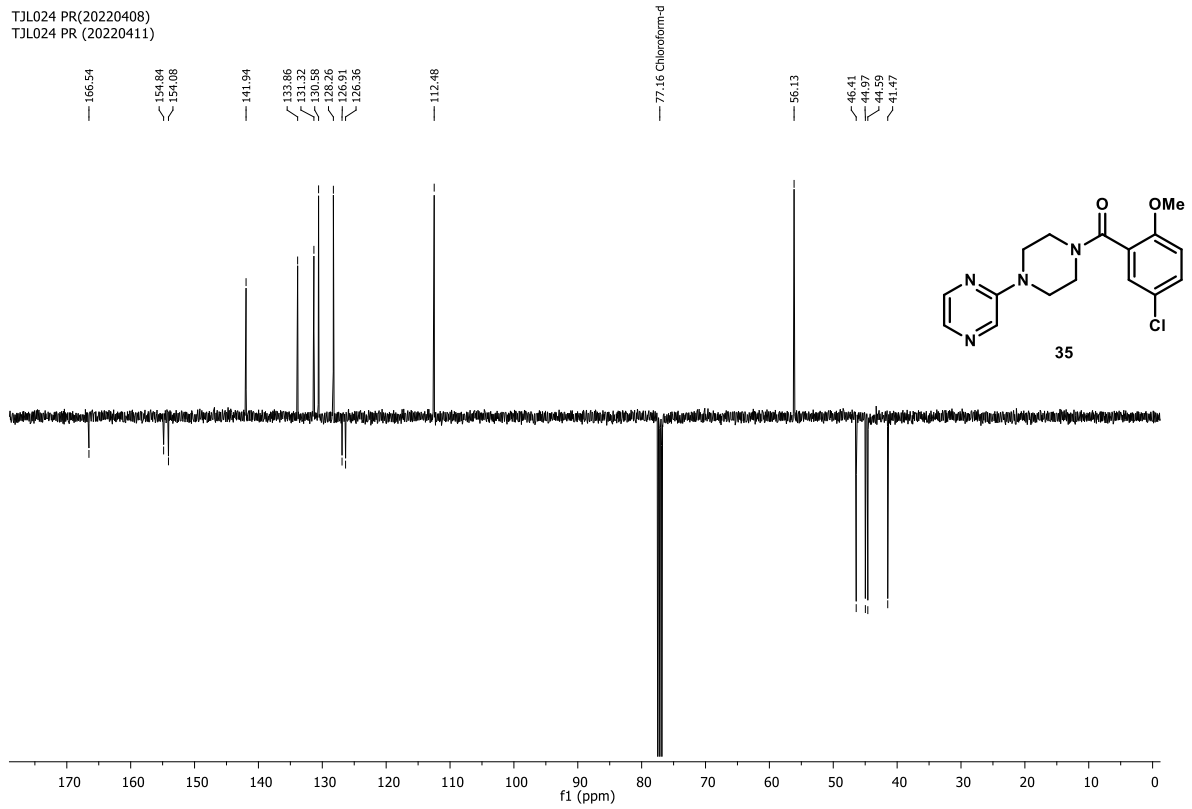
Anexo 65. Espectro de RMN de ^{1}H de **34** (400 MHz, $CDCl_3$)



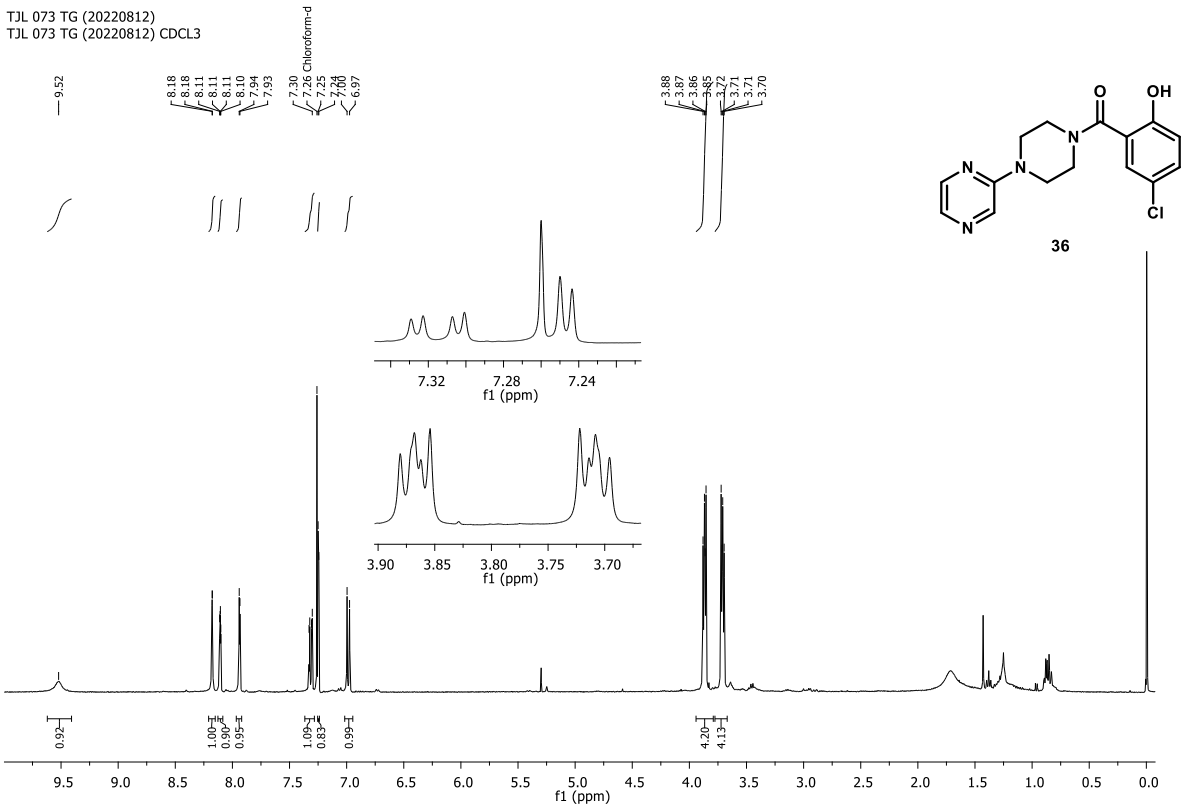
Anexo 66. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **34** (101 MHz, $CDCl_3$)



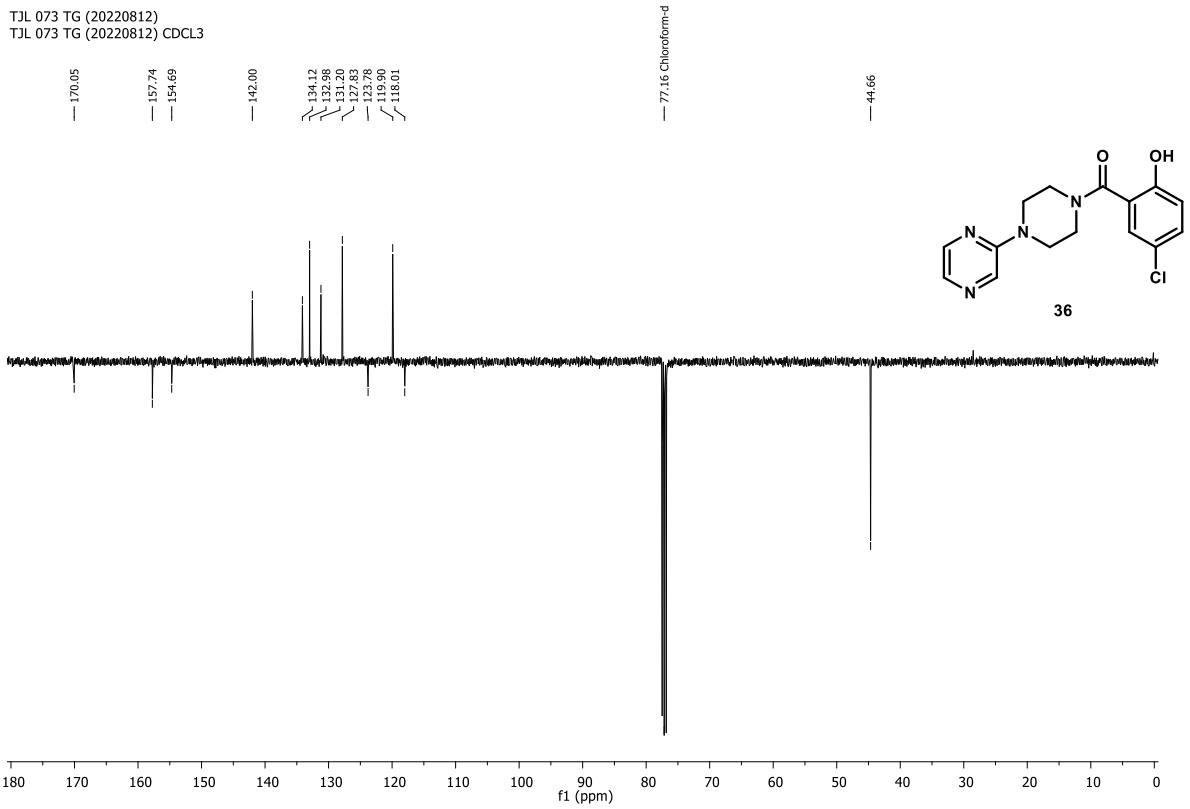
Anexo 67. Espectro de RMN de ^{1}H de **35** (400 MHz, $CDCl_3$)



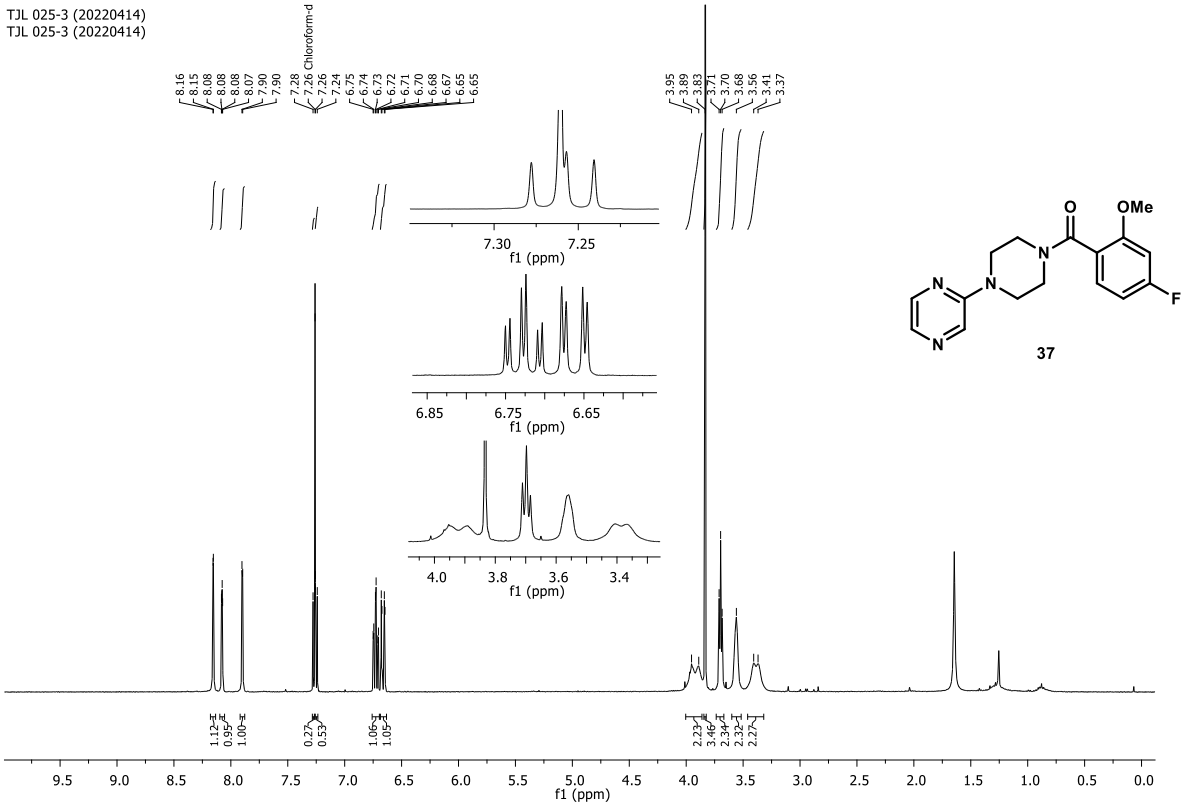
Anexo 68. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **35** (101 MHz, $CDCl_3$)



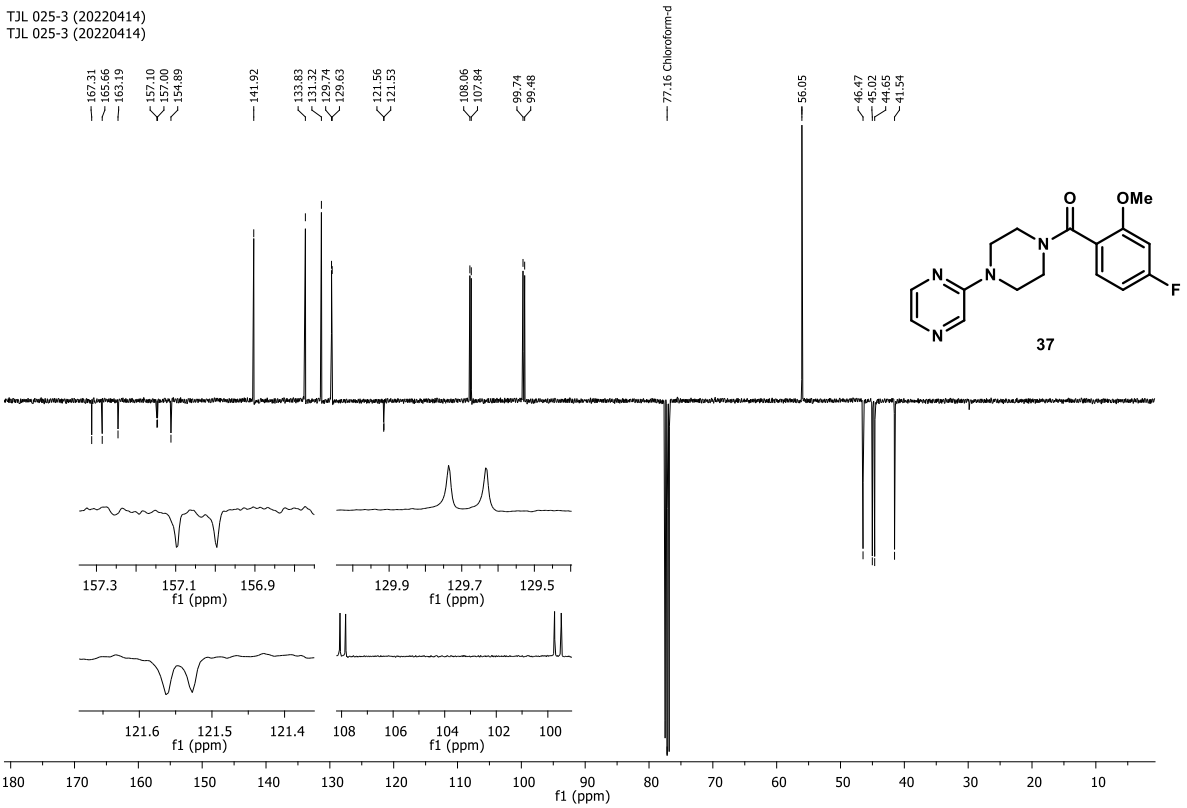
Anexo 69. Espectro de RMN de ^{1}H de **36** (400 MHz, $CDCl_3$)



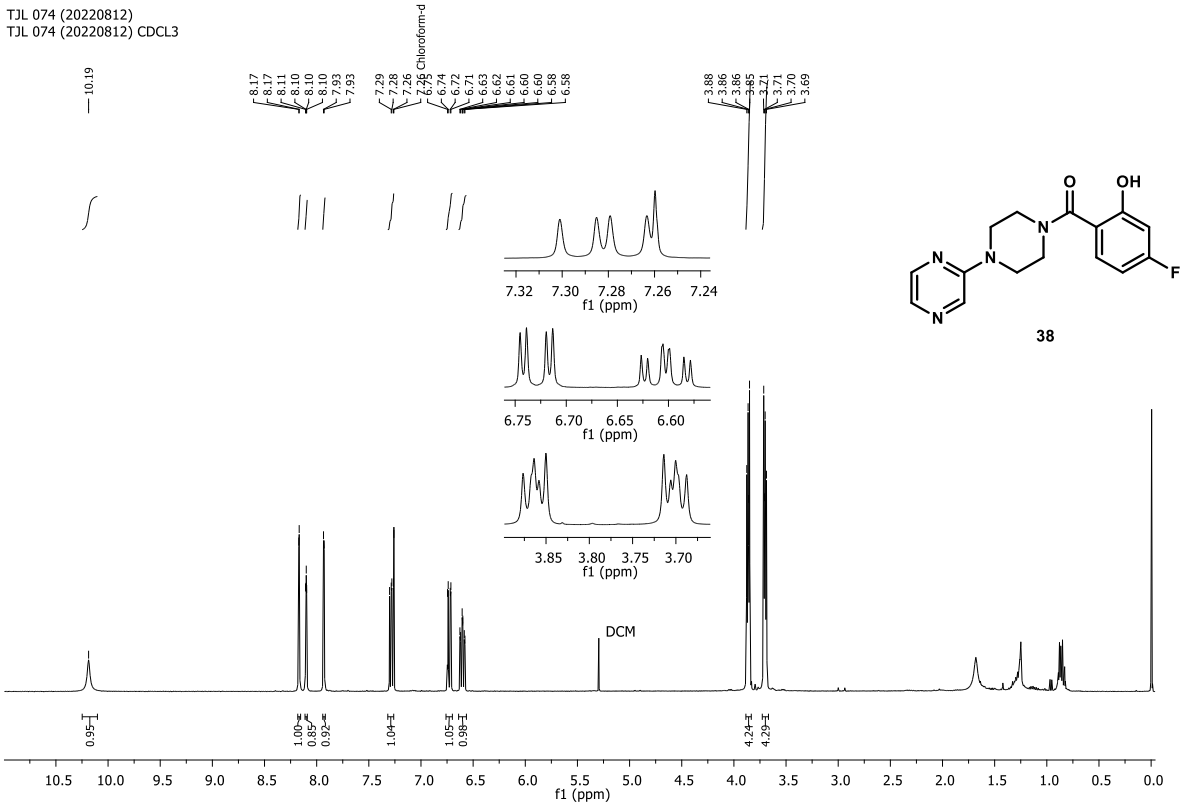
Anexo 70. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **36** (101 MHz, $CDCl_3$)



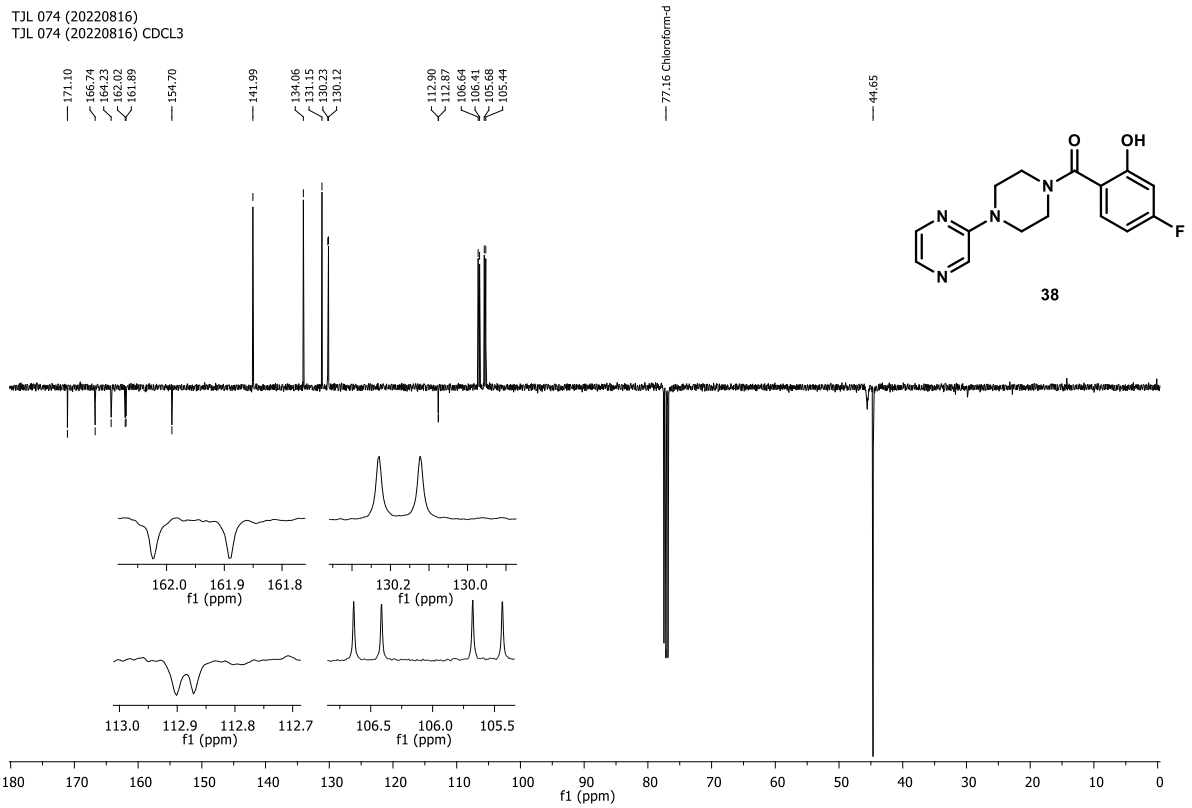
Anexo 71. Espectro de RMN de ^{1}H de **37** (400 MHz, $CDCl_3$)



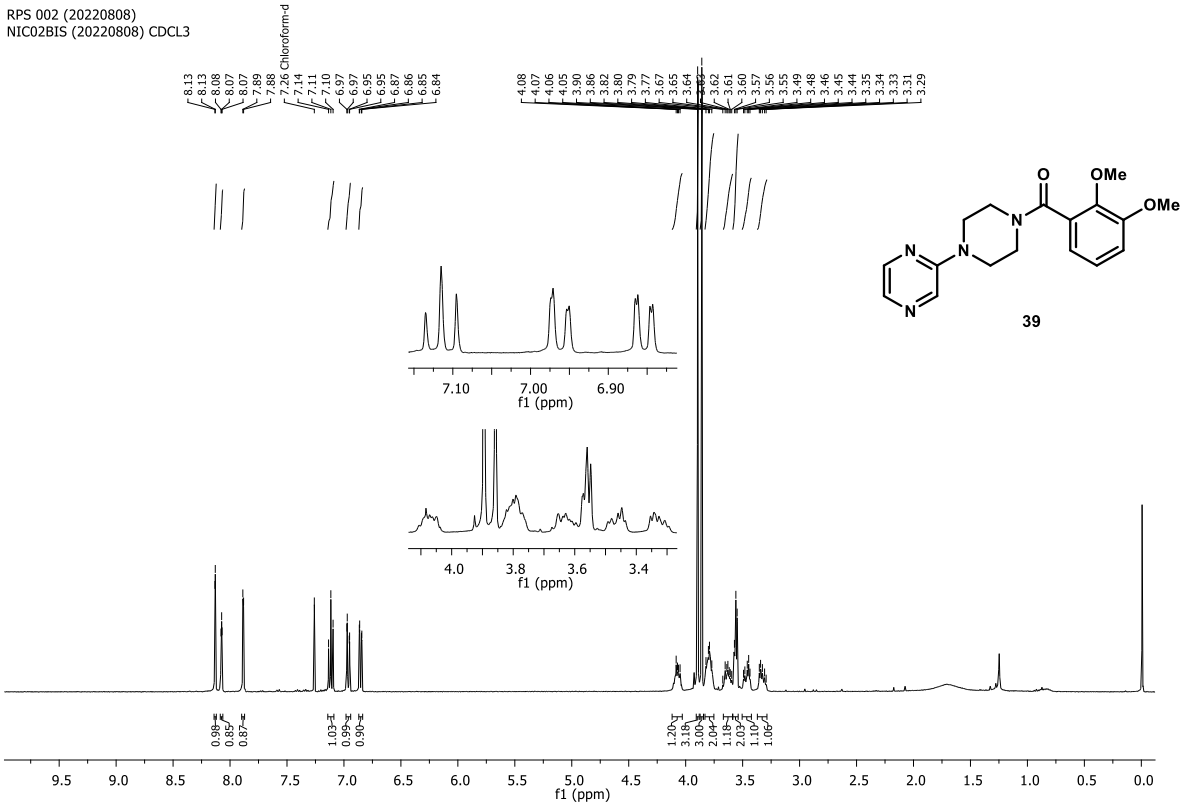
Anexo 72. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **37** (101 MHz, $CDCl_3$)



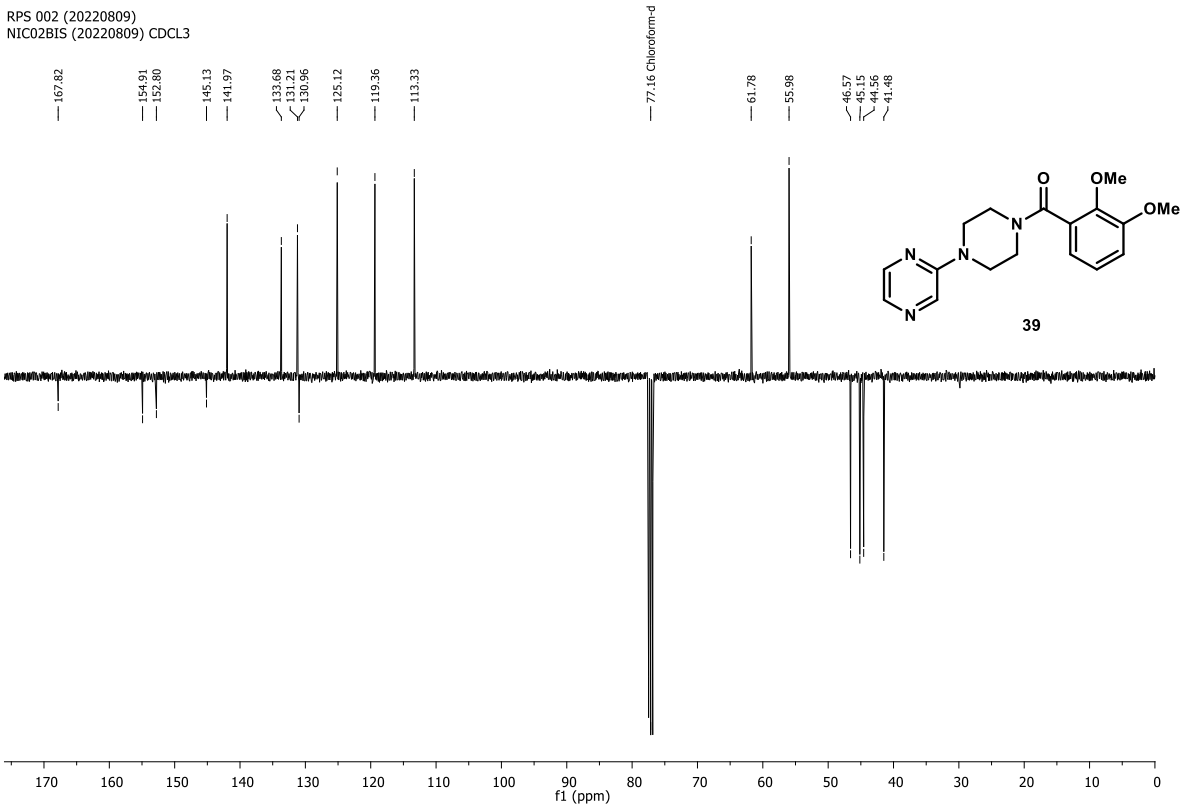
Anexo 73. Espectro de RMN de ^{1}H de **38** (400 MHz, $CDCl_3$)



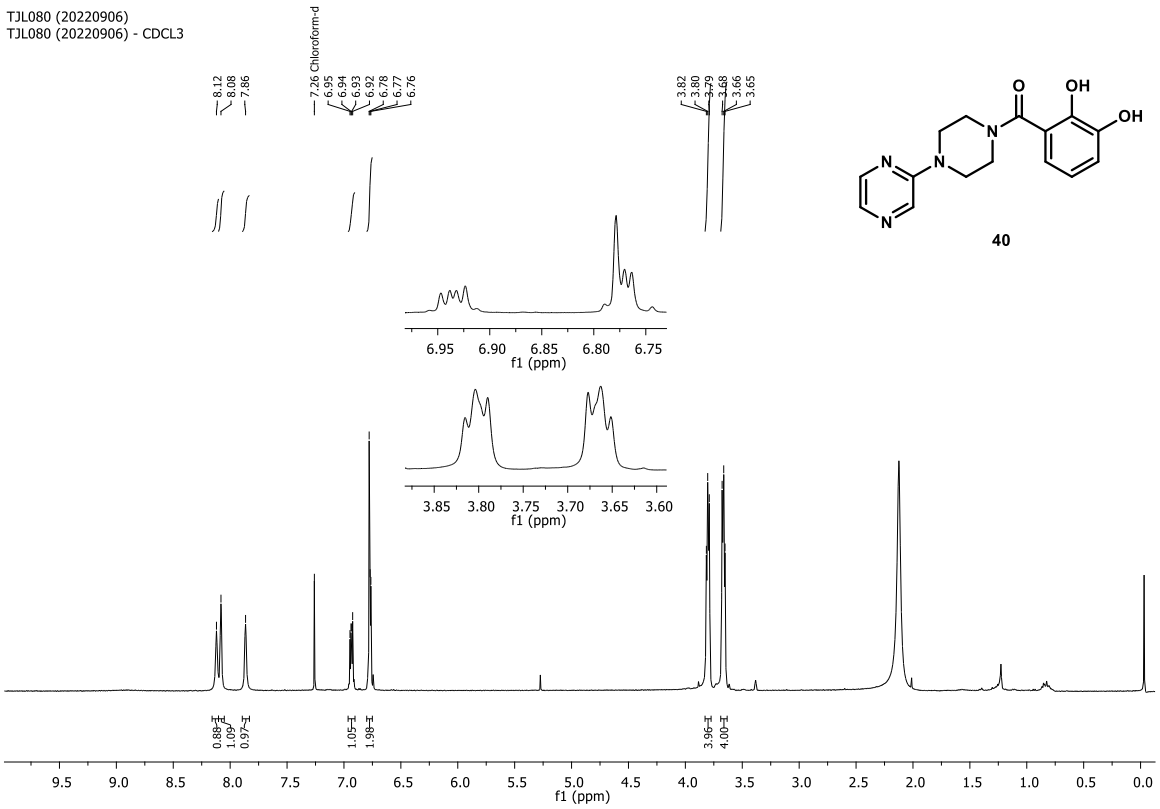
Anexo 74. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **38** (101 MHz, $CDCl_3$)



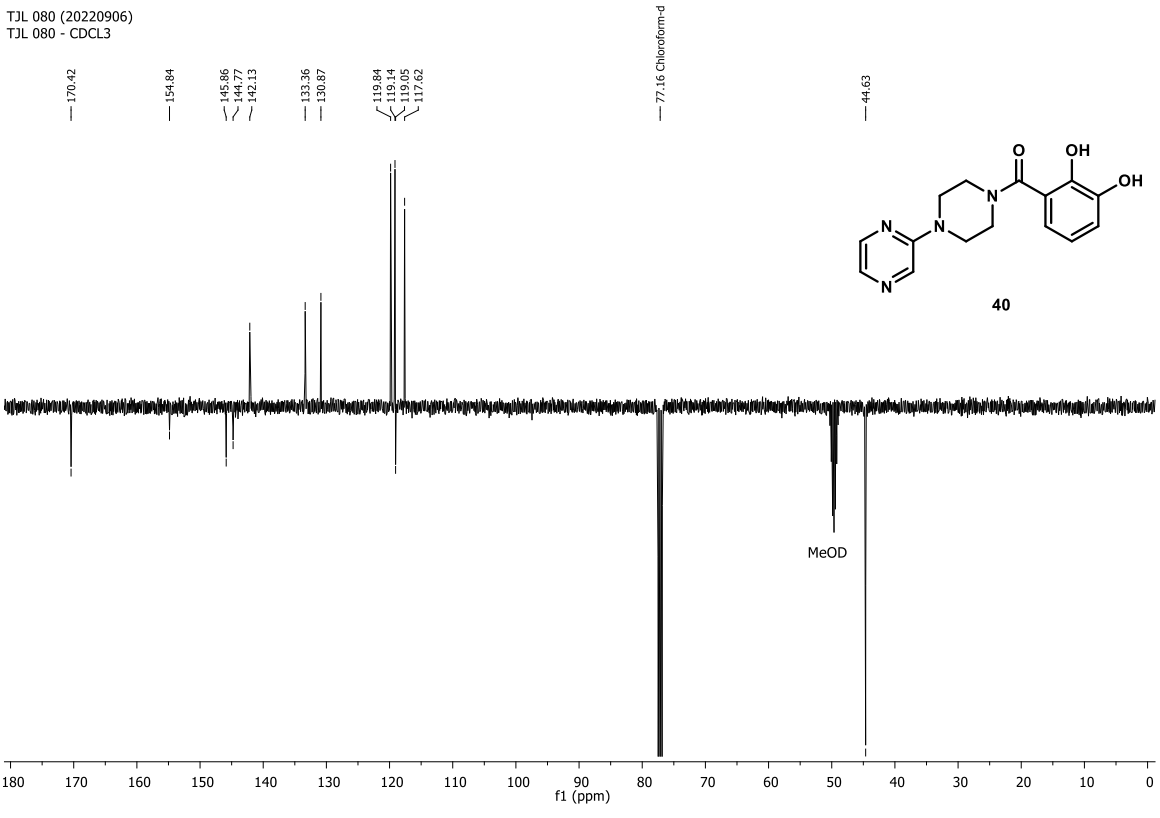
Anexo 75. Espectro de RMN de ^{1}H de **39** (400 MHz, $CDCl_3$)



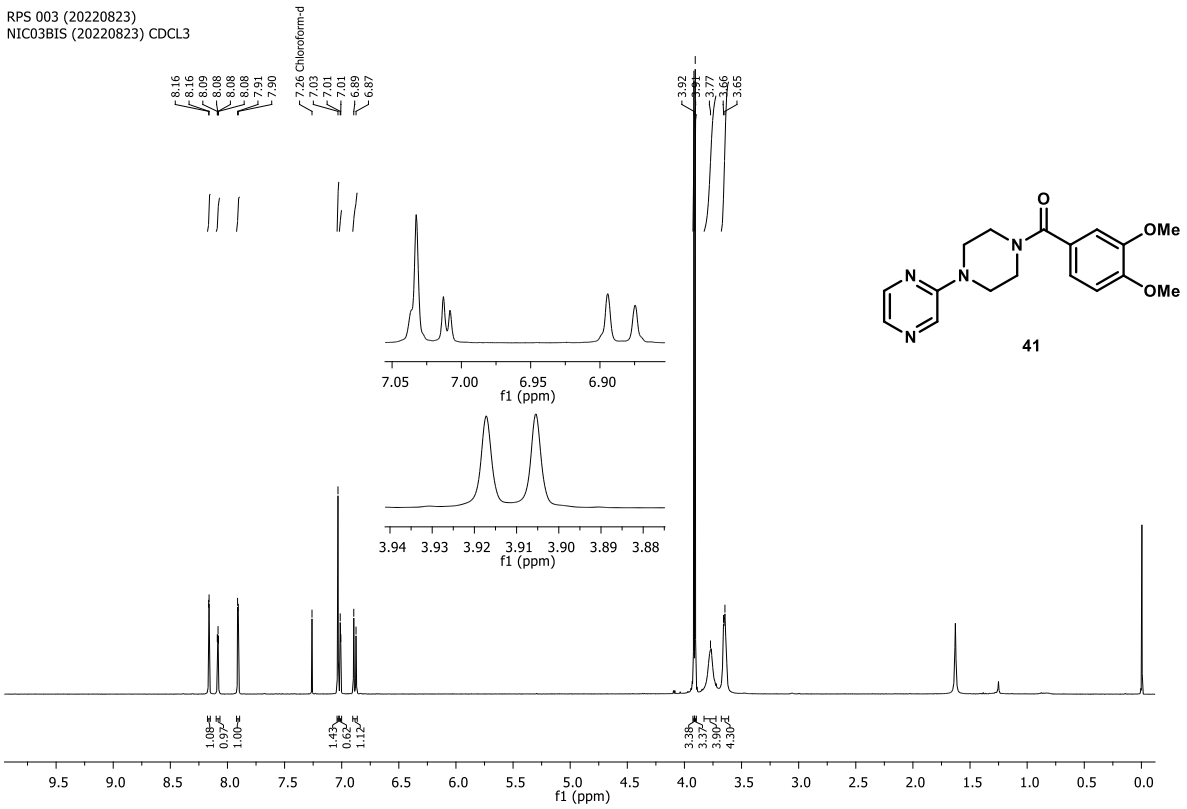
Anexo 76. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **39** (101 MHz, $CDCl_3$)



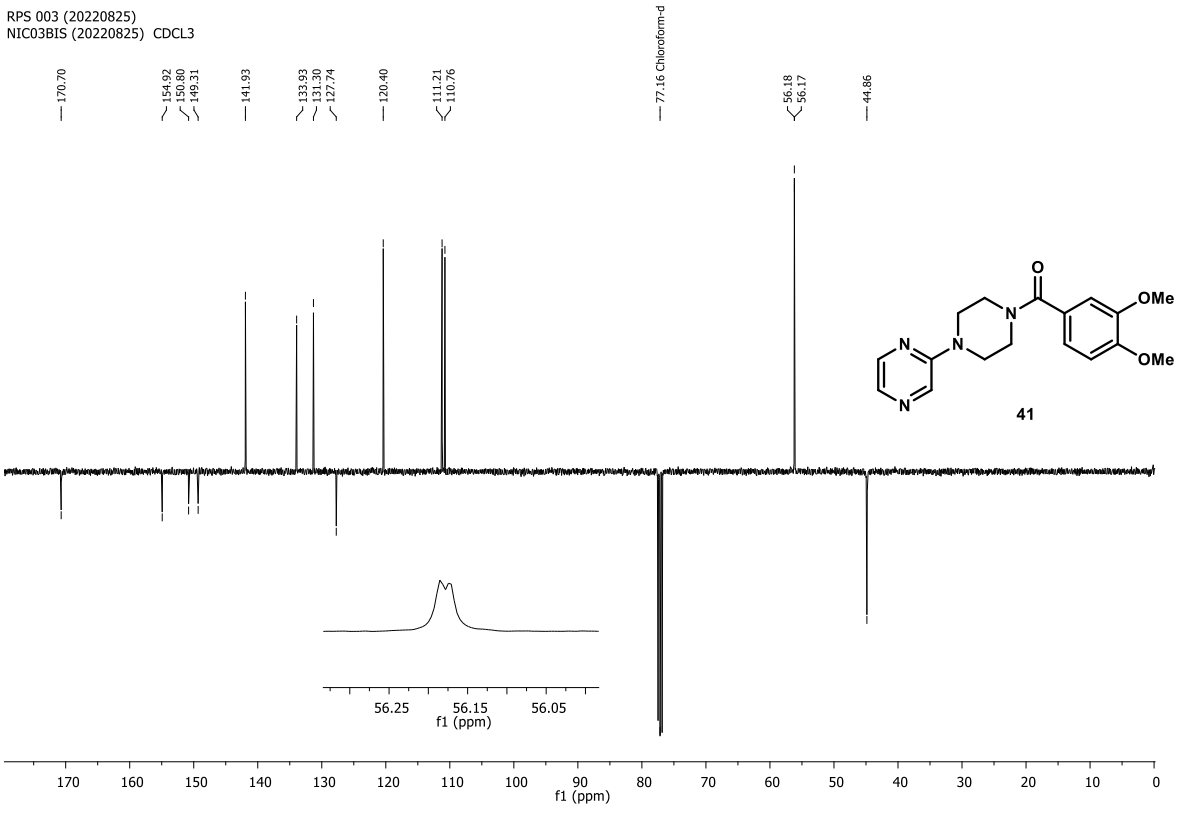
Anexo 77. Espectro de RMN de ^{1}H de **40** (400 MHz, $CDCl_3$)



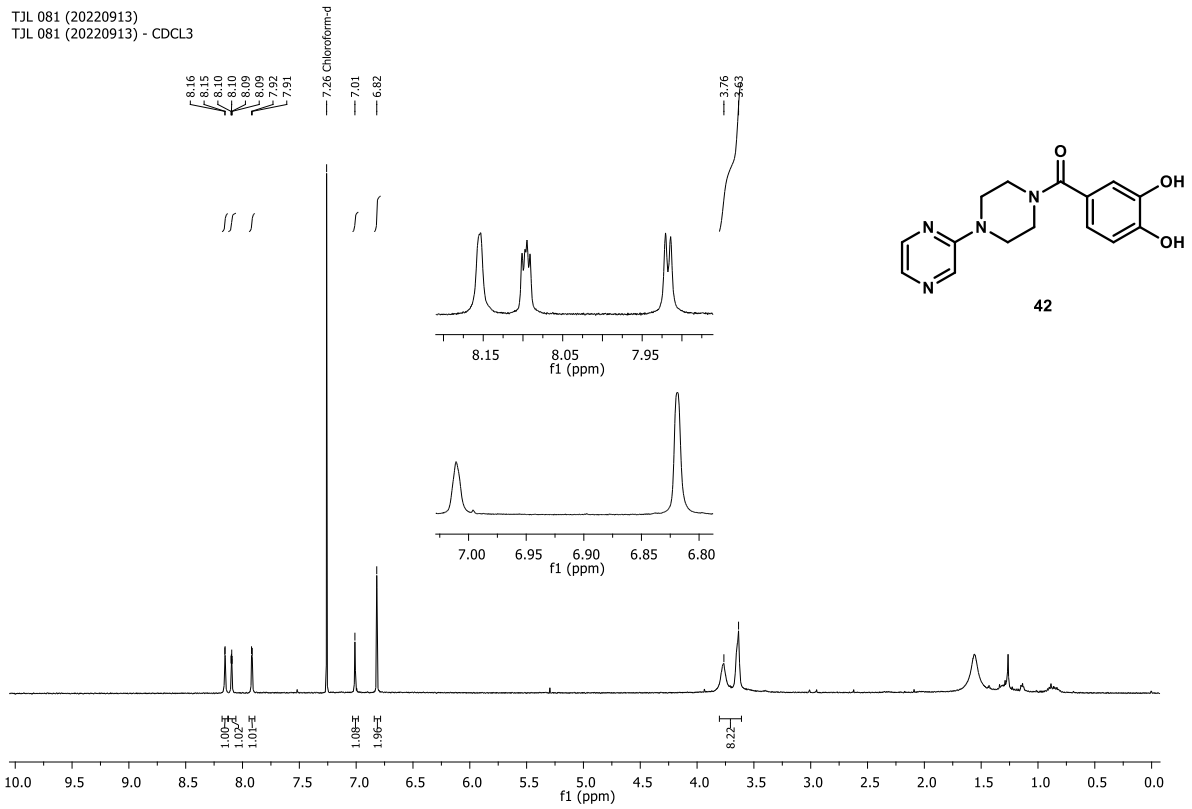
Anexo 78. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **40** (101 MHz, $CDCl_3$)



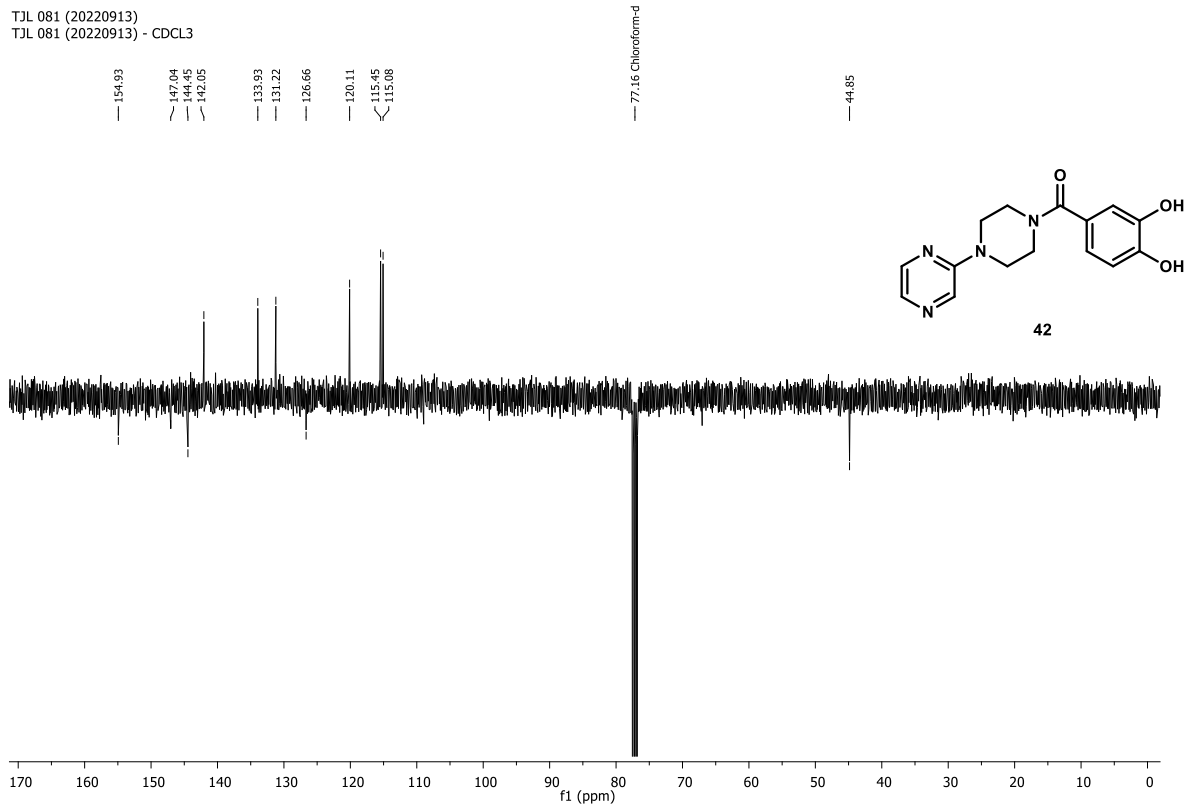
Anexo 79. Espectro de RMN de ^{1}H de **41** (400 MHz, $CDCl_3$)



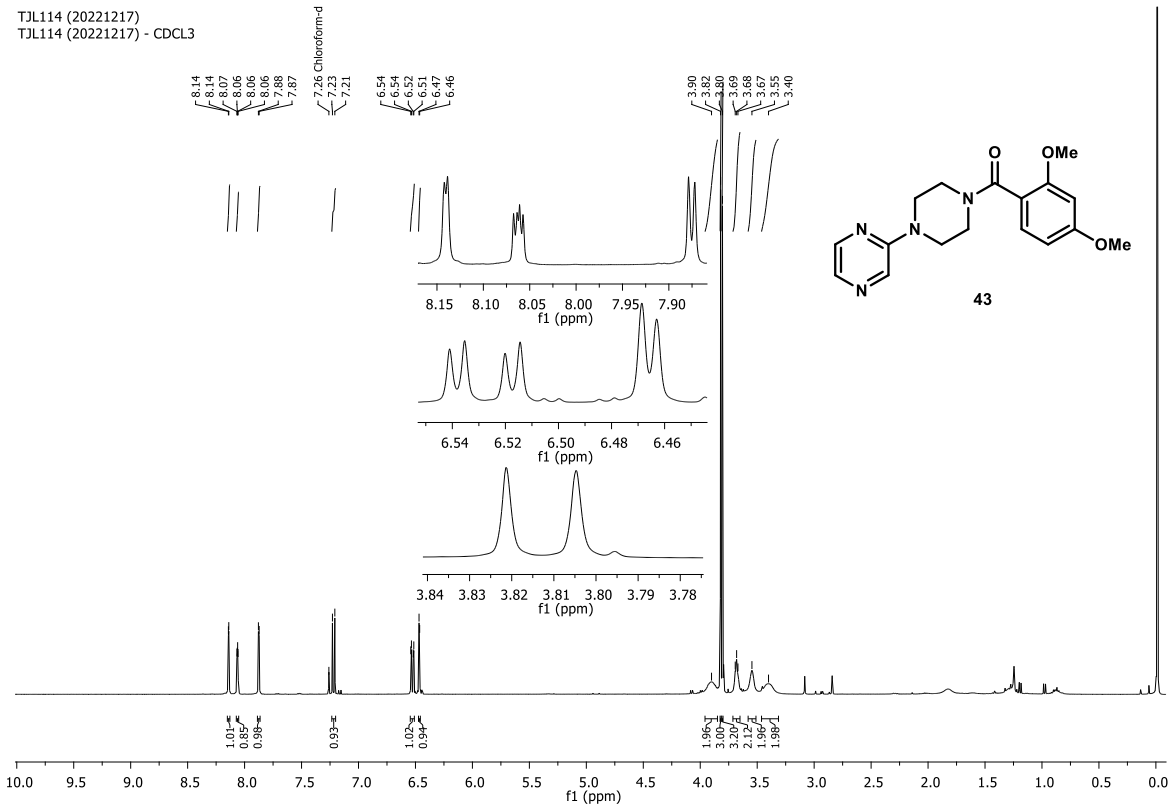
Anexo 80. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **41** (101 MHz, $CDCl_3$)



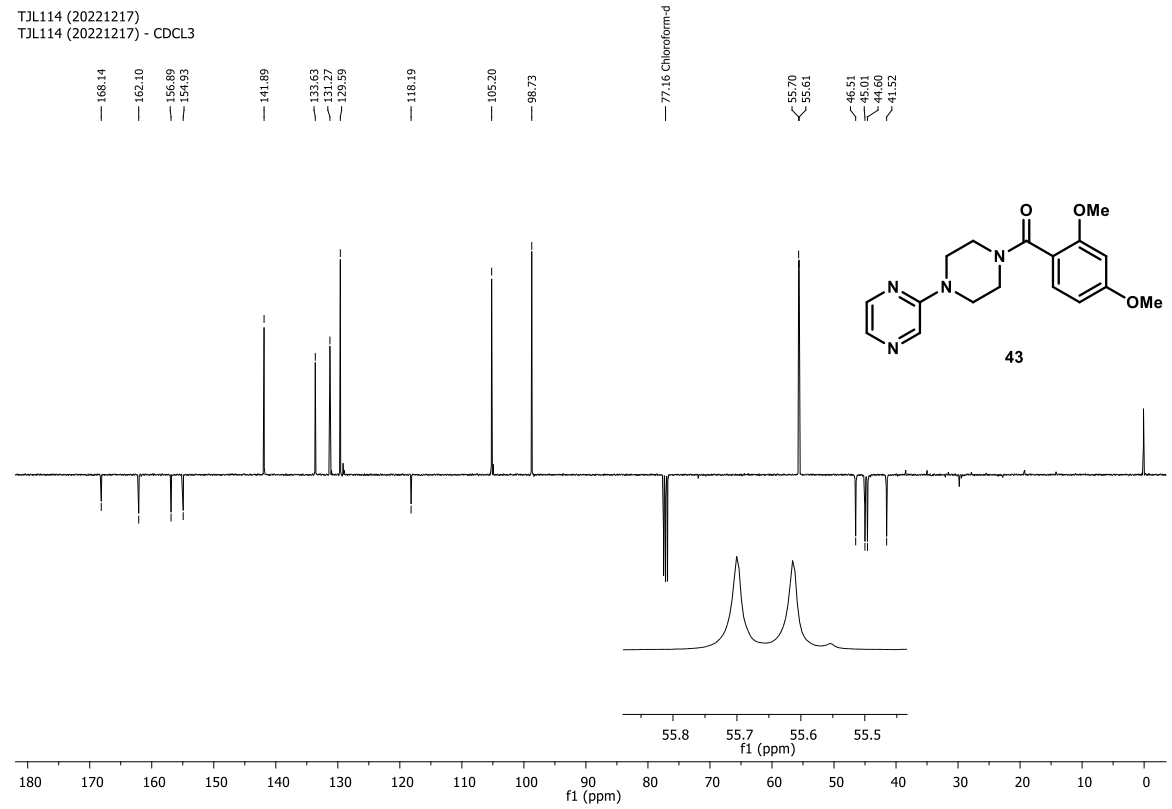
Anexo 81. Espectro de RMN de ^{1}H de **42** (400 MHz, $CDCl_3$)



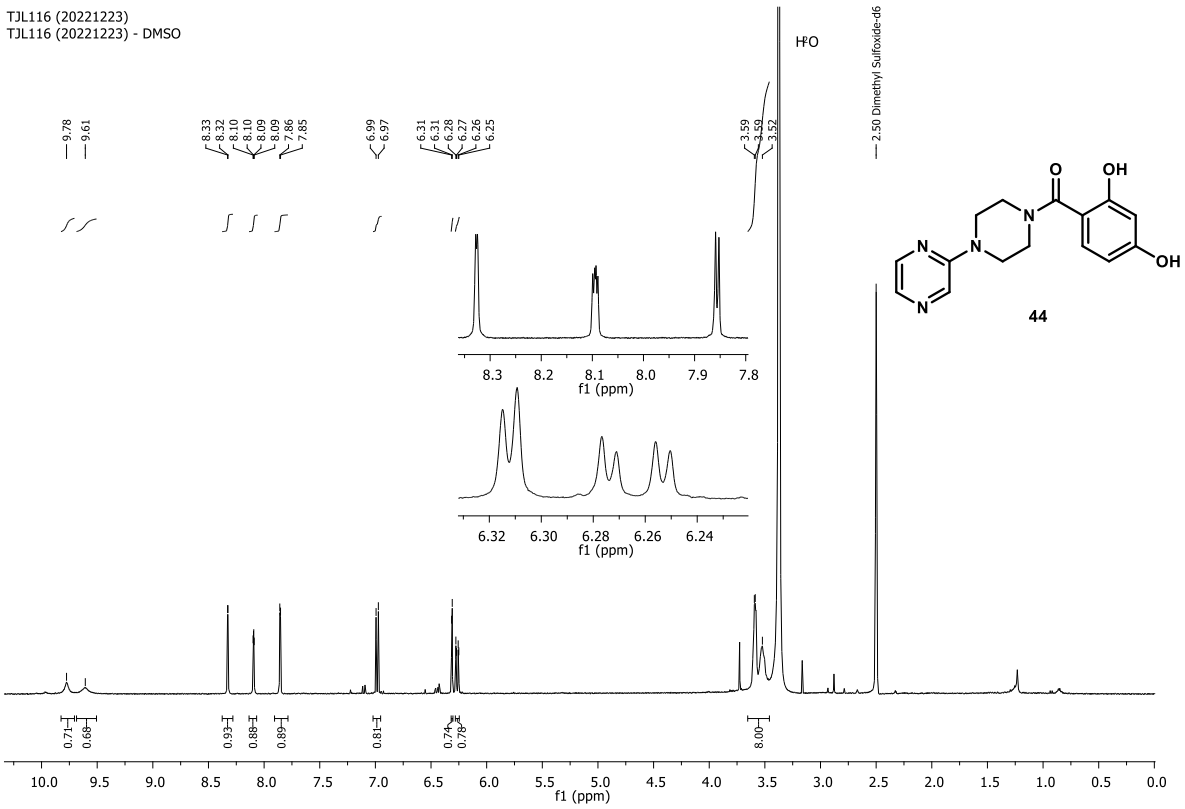
Anexo 82. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **42** (101 MHz, $CDCl_3$)



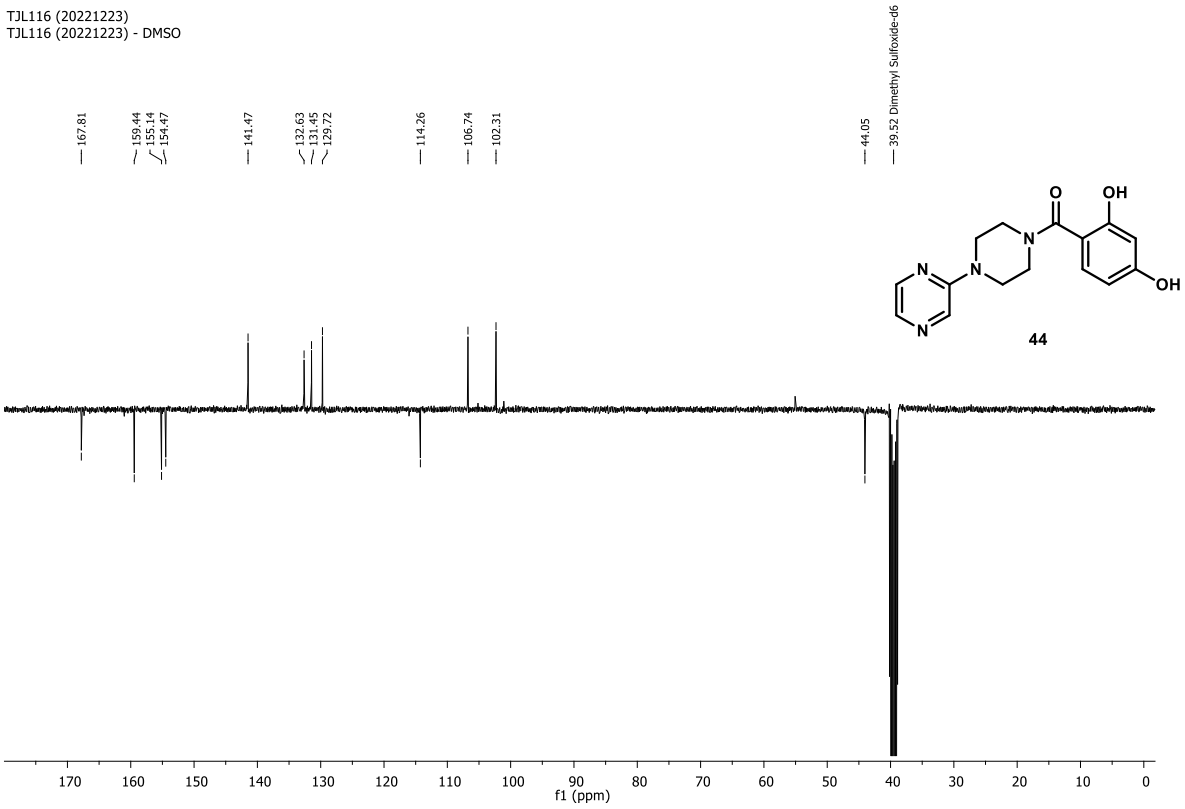
Anexo 83. Espectro de RMN de ^{1}H de **43** (400 MHz, $CDCl_3$)



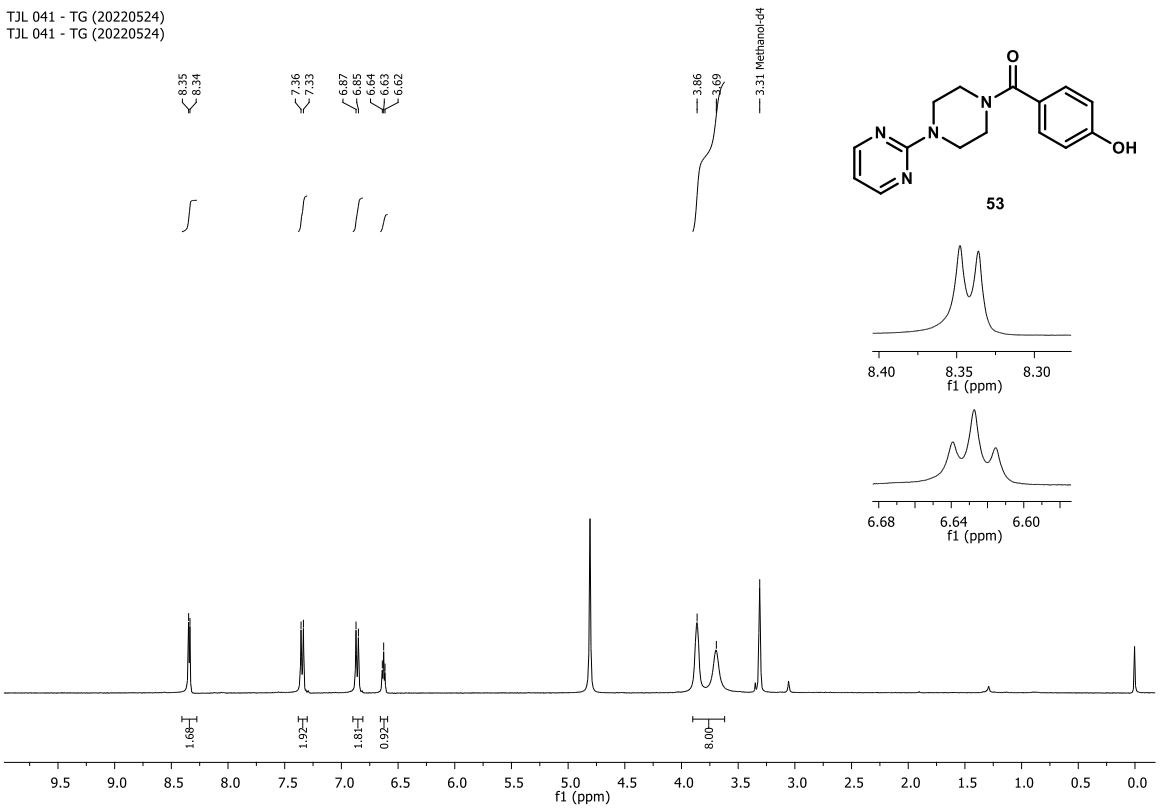
Anexo 84. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **43** (101 MHz, $CDCl_3$)



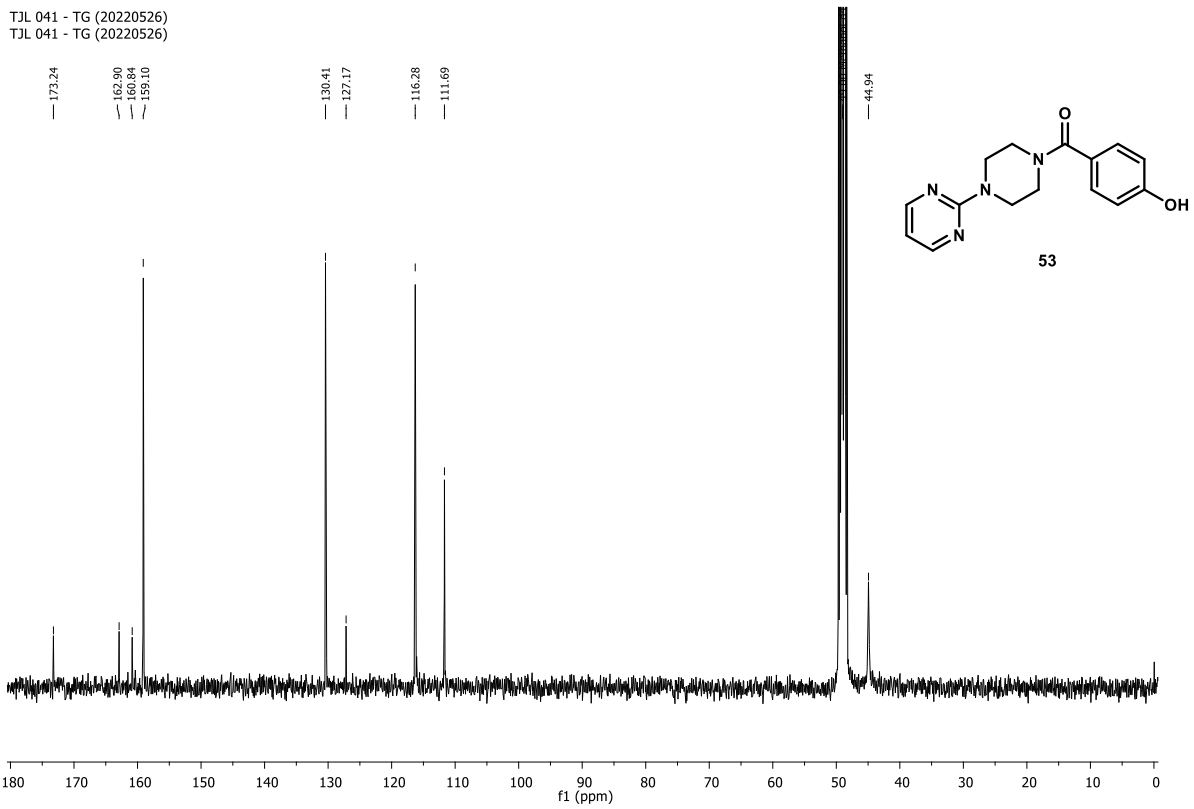
Anexo 85. Espectro de RMN de ^{1}H de **44** (400 MHz, DMSO-d_6)



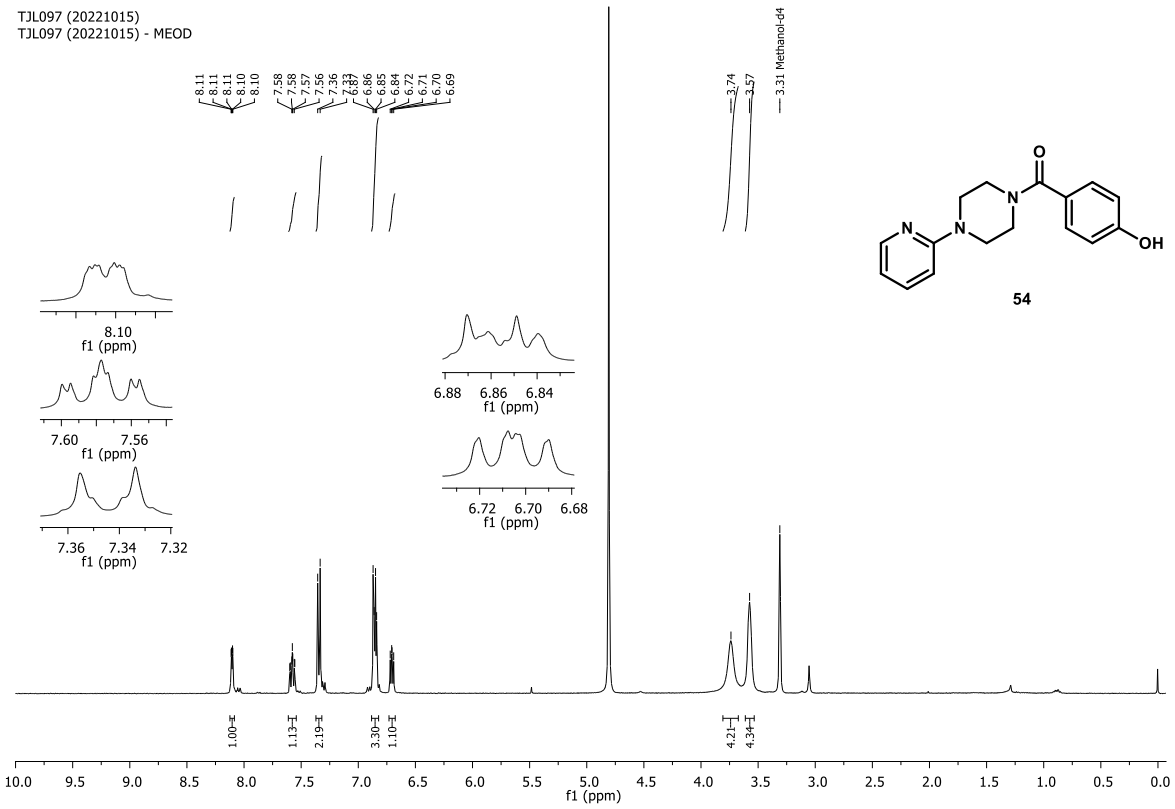
Anexo 86. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **44** (101 MHz, DMSO-d_6)



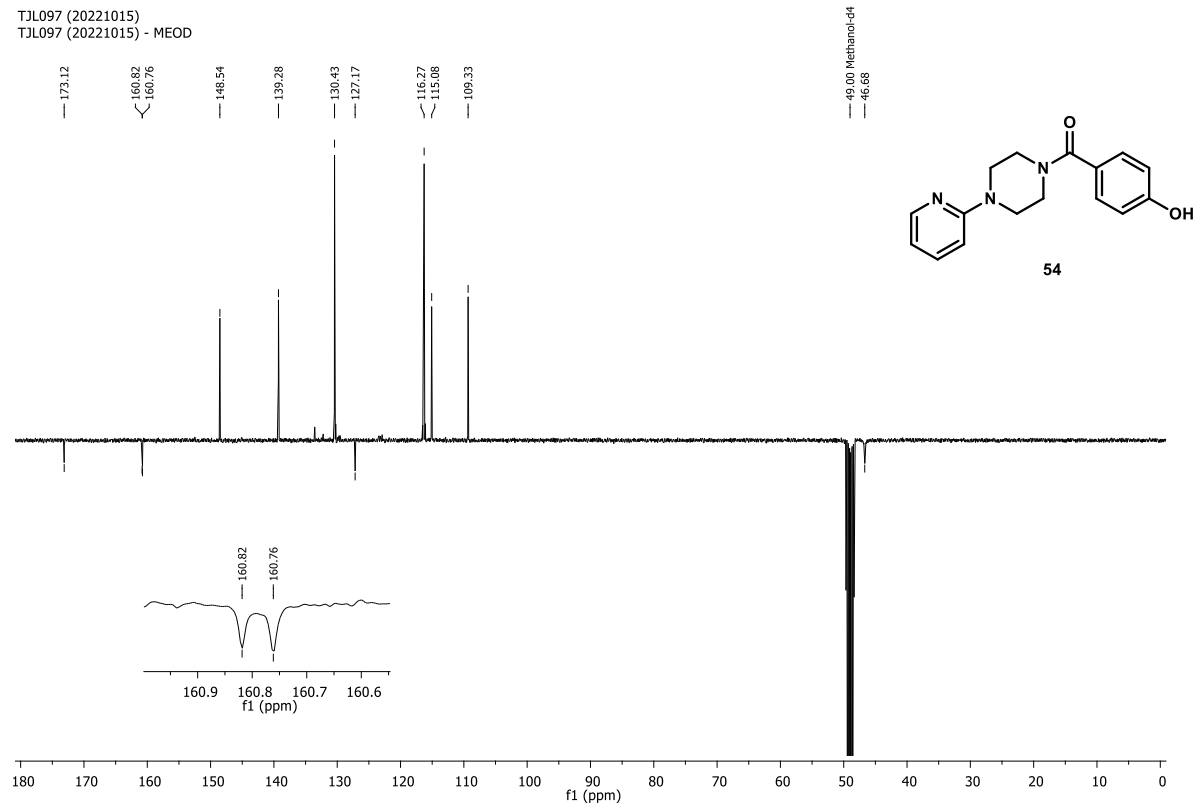
Anexo 87. Espectro de RMN de ^{1}H de **53** (400 MHz, CD_3OD)



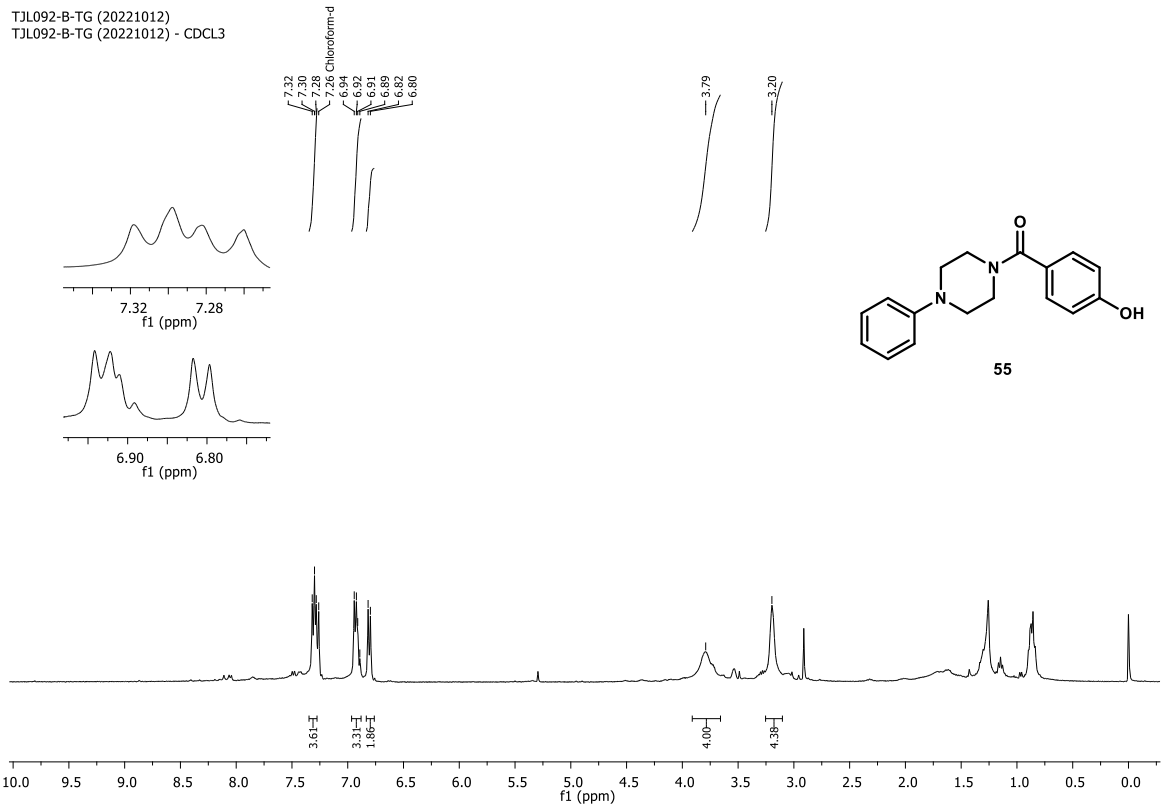
Anexo 88. Espectro de RMN de ^{13}C de **53** (101 MHz, CD_3OD)



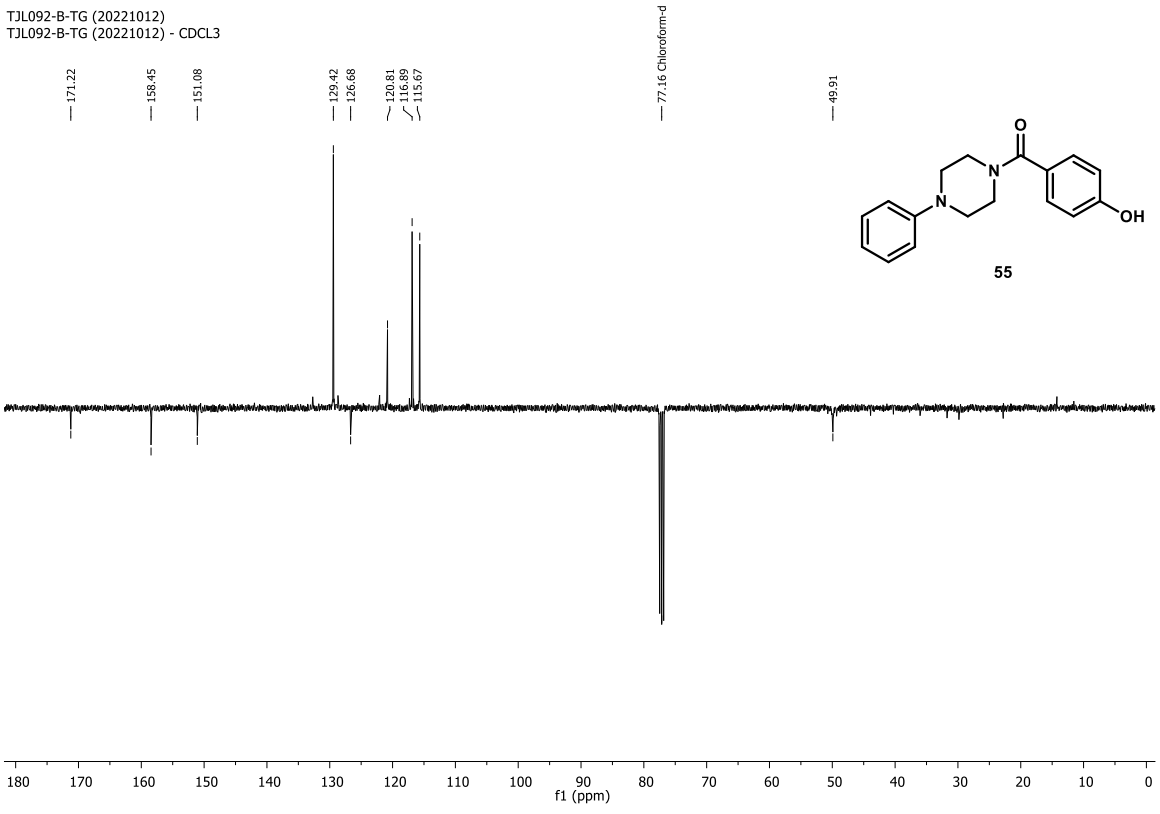
Anexo 89. Espectro de RMN de ^{1}H de **54** (400 MHz, CD_3OD)



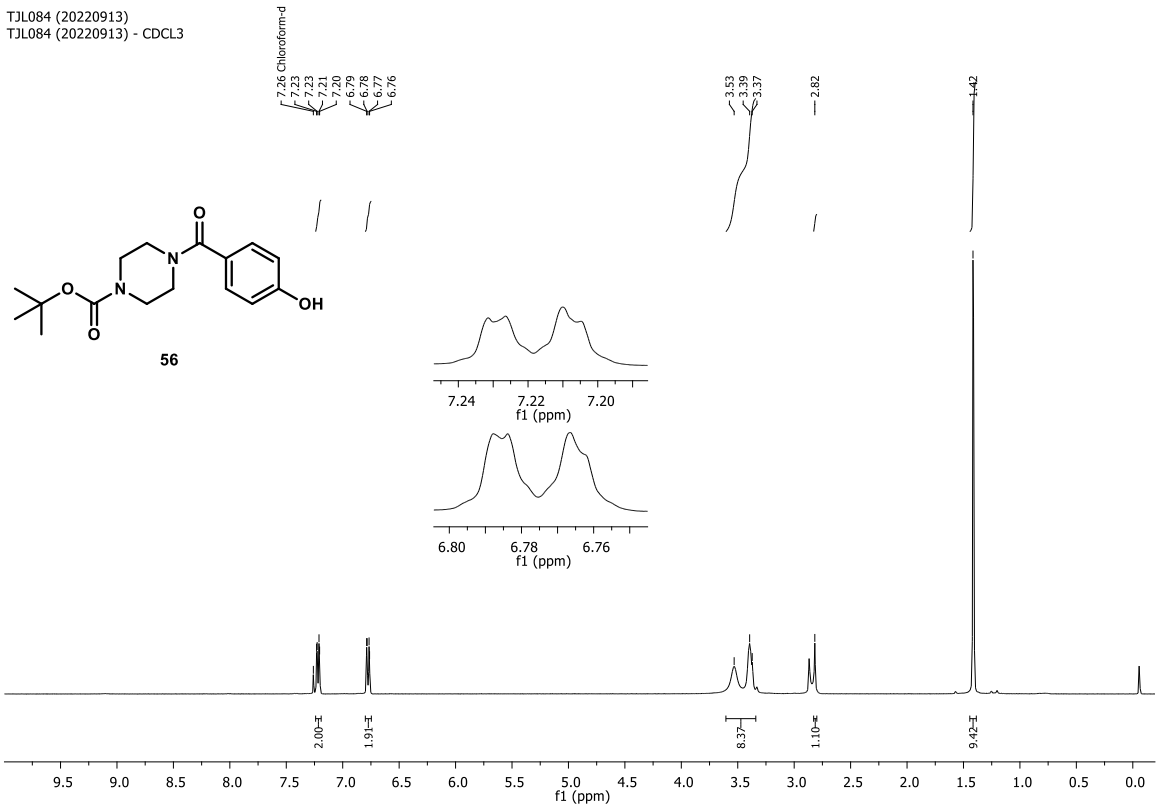
Anexo 90. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **54** (101 MHz, CD_3OD)



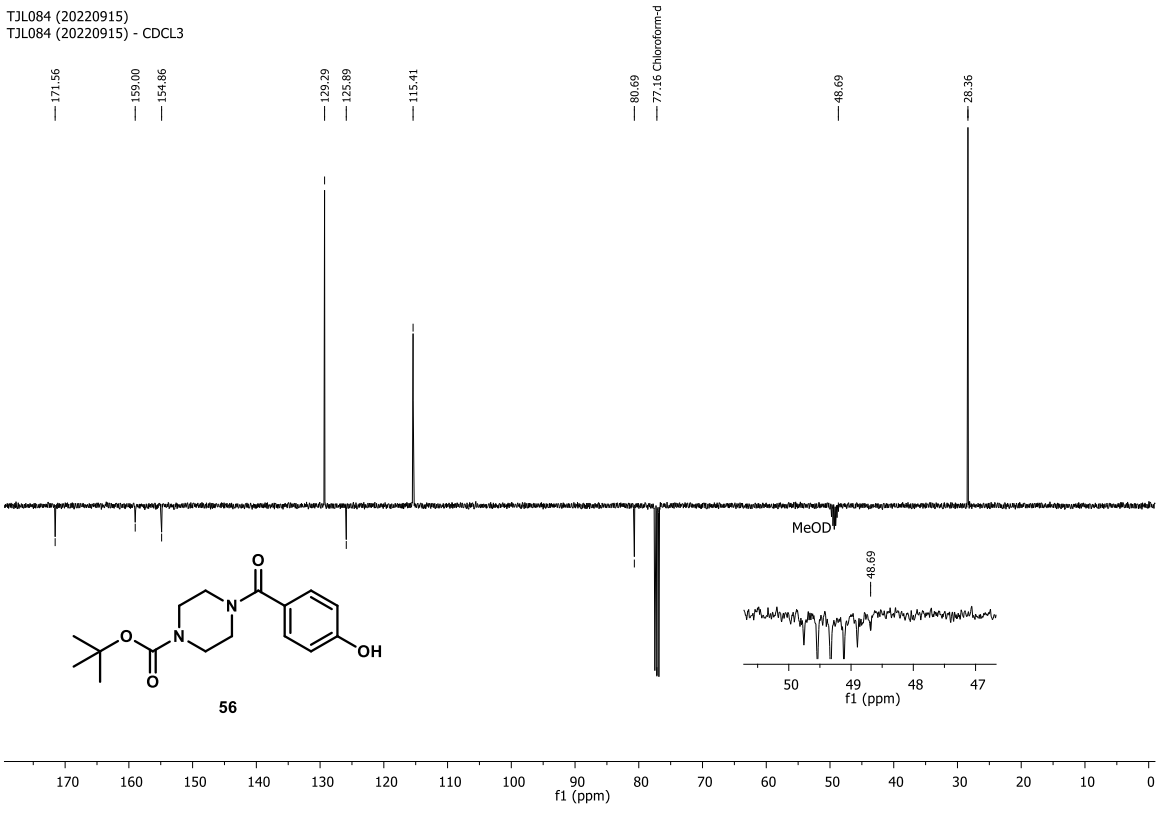
Anexo 91. Espectro de RMN de ^{1}H de **55** (400 MHz, $CDCl_3$)



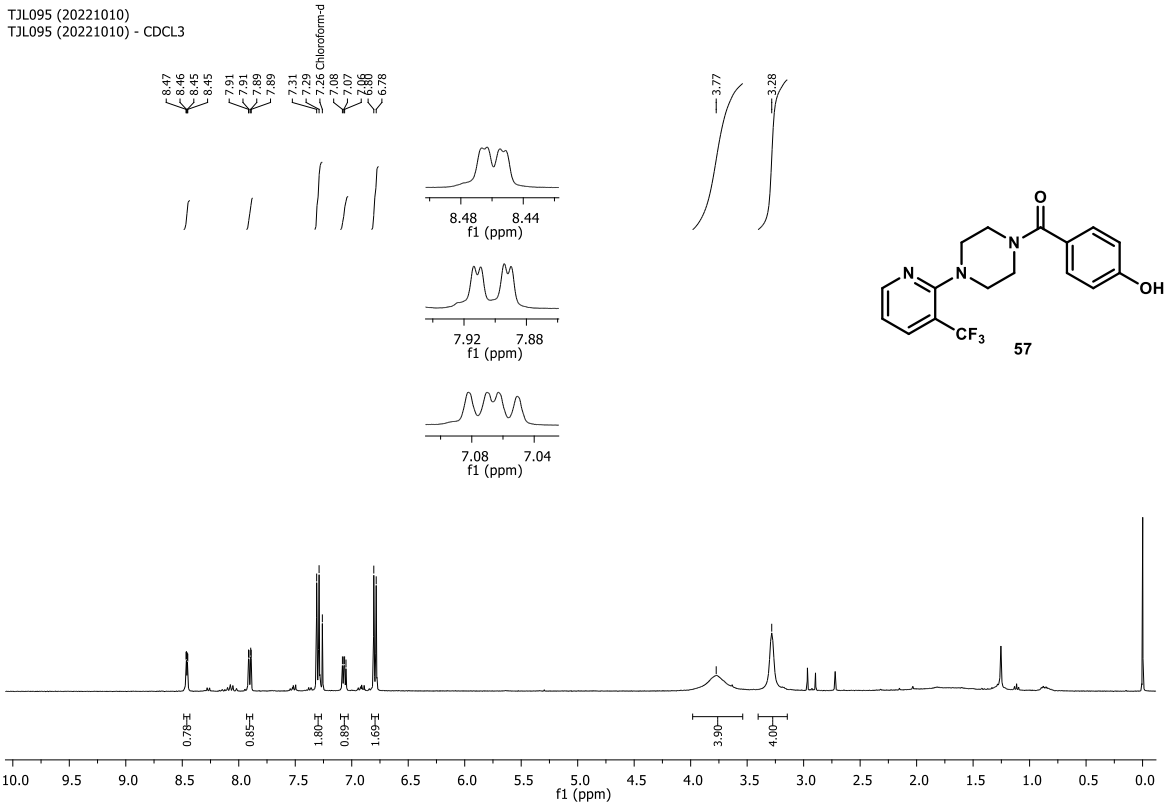
Anexo 92. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **55** (101 MHz, $CDCl_3$)



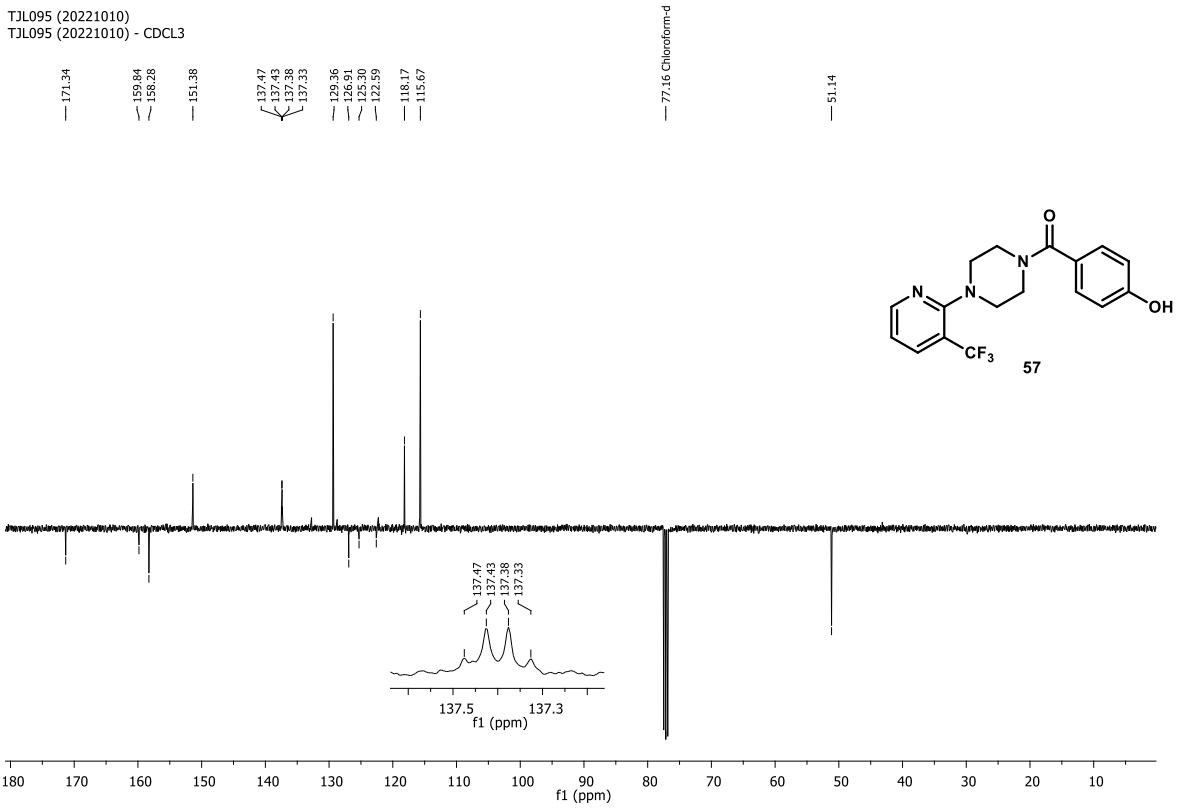
Anexo 93. Espectro de RMN de ^{1}H de **56** (400 MHz, $CDCl_3$)



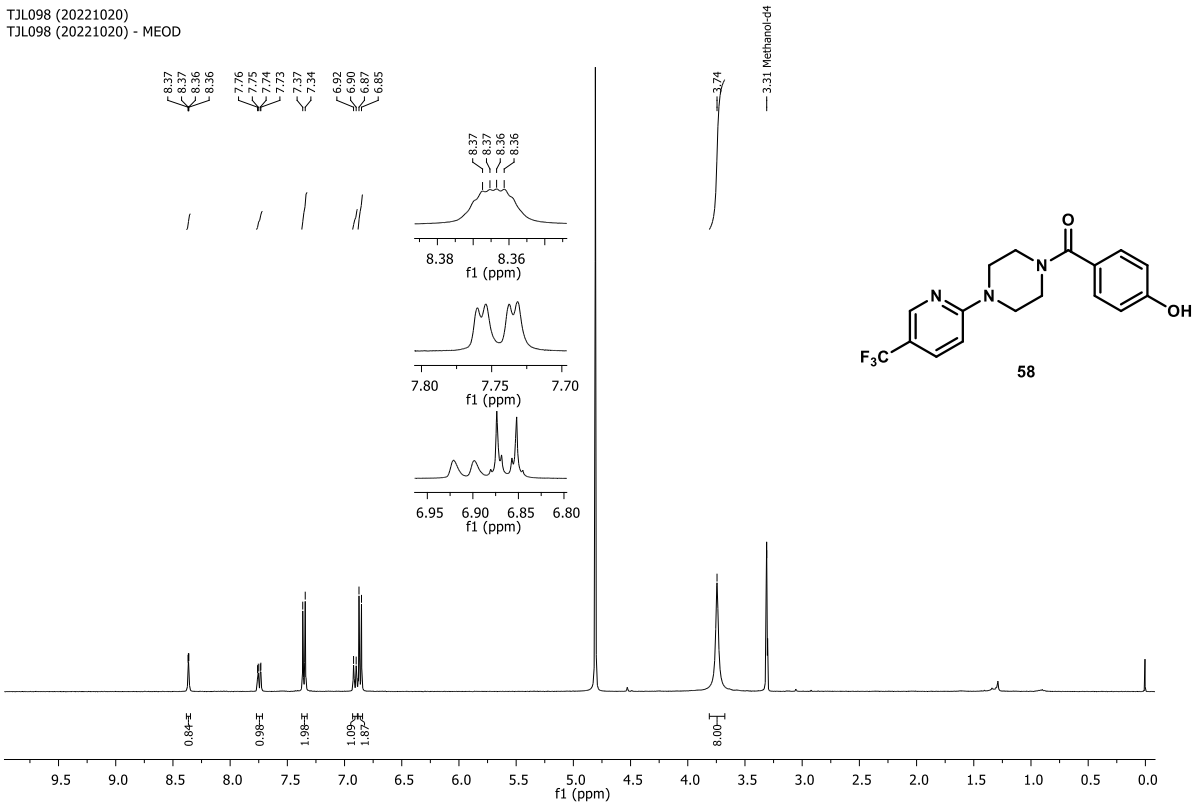
Anexo 94. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **56** (101 MHz, $CDCl_3$)



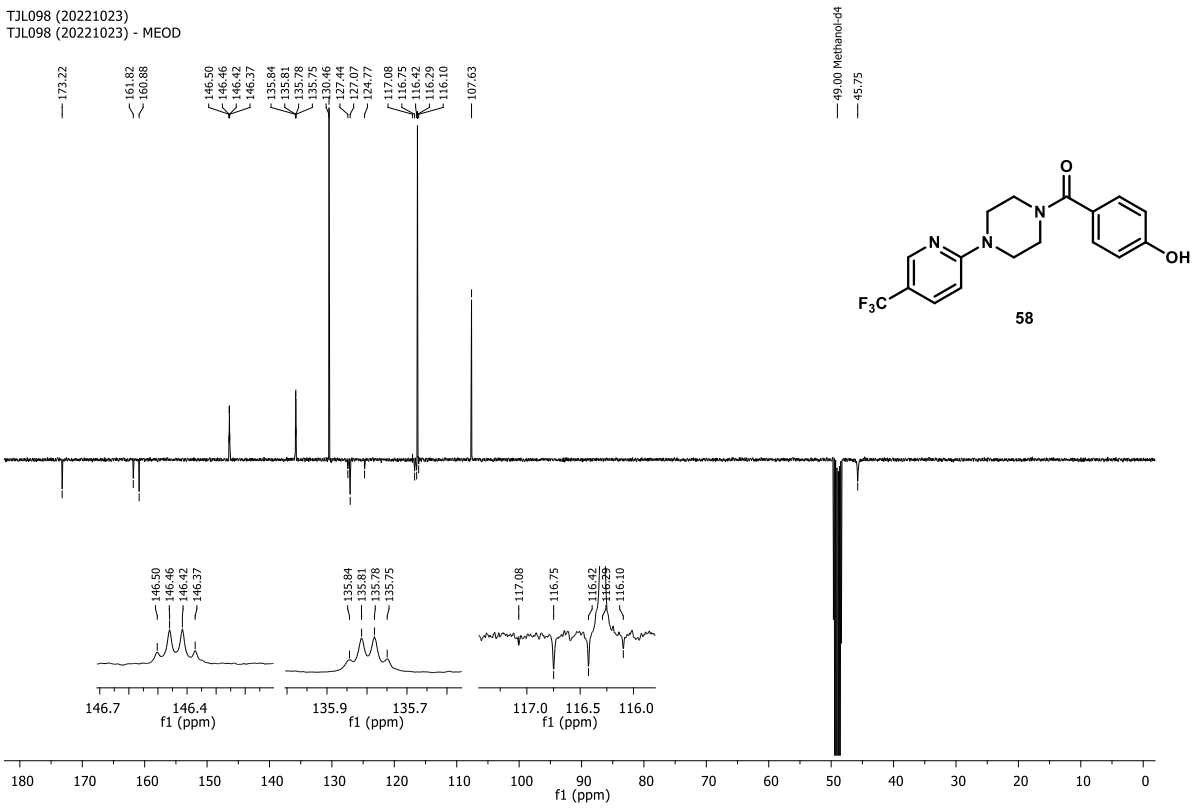
Anexo 95. Espectro de RMN de ^{1}H de **57** (400 MHz, $CDCl_3$)



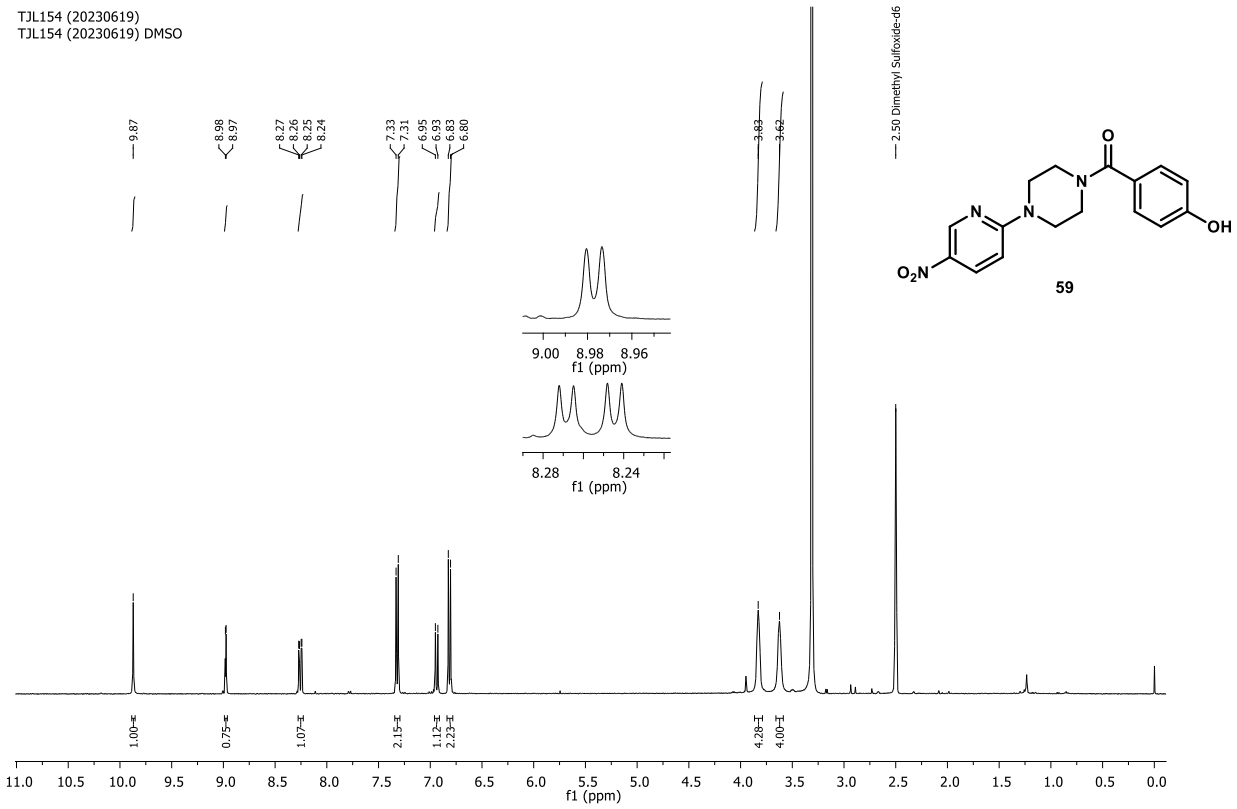
Anexo 96. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **57** (101 MHz, $CDCl_3$)



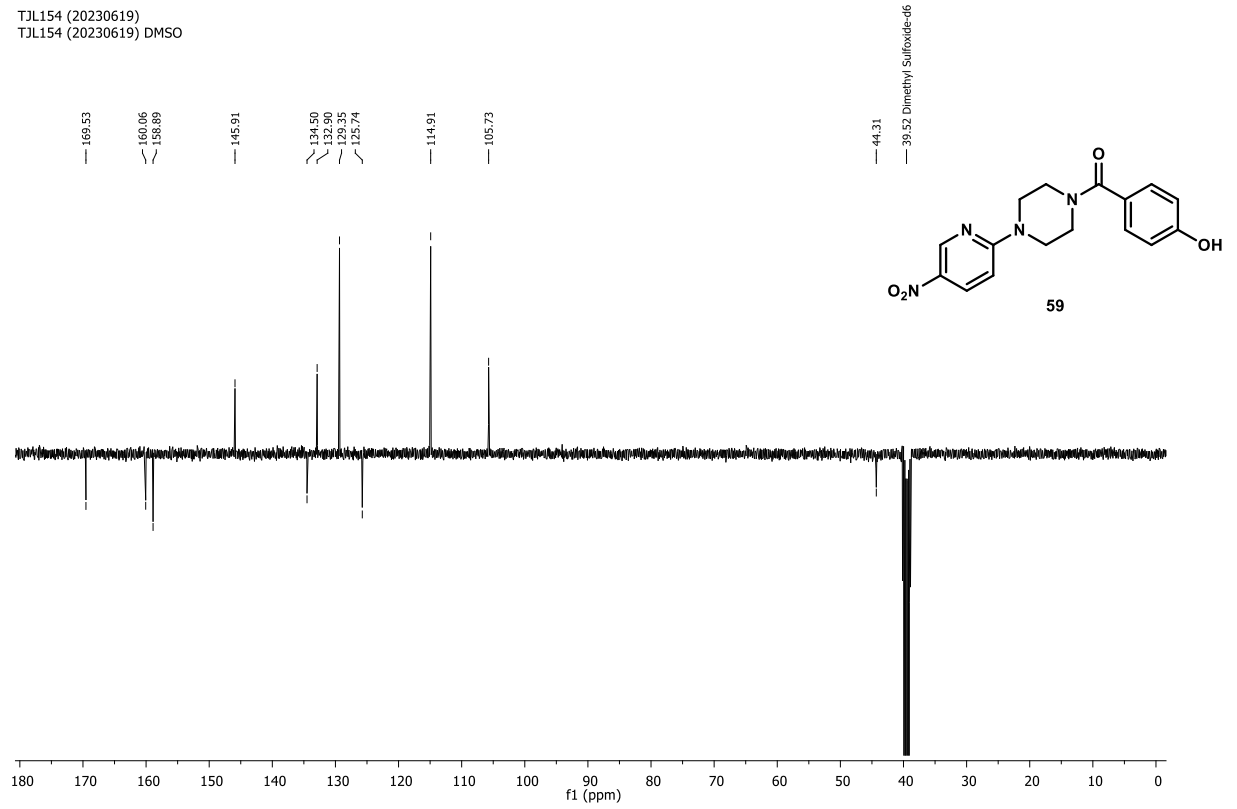
Anexo 97. Espectro de RMN de ^{1}H de **58** (400 MHz, CD_3OD)



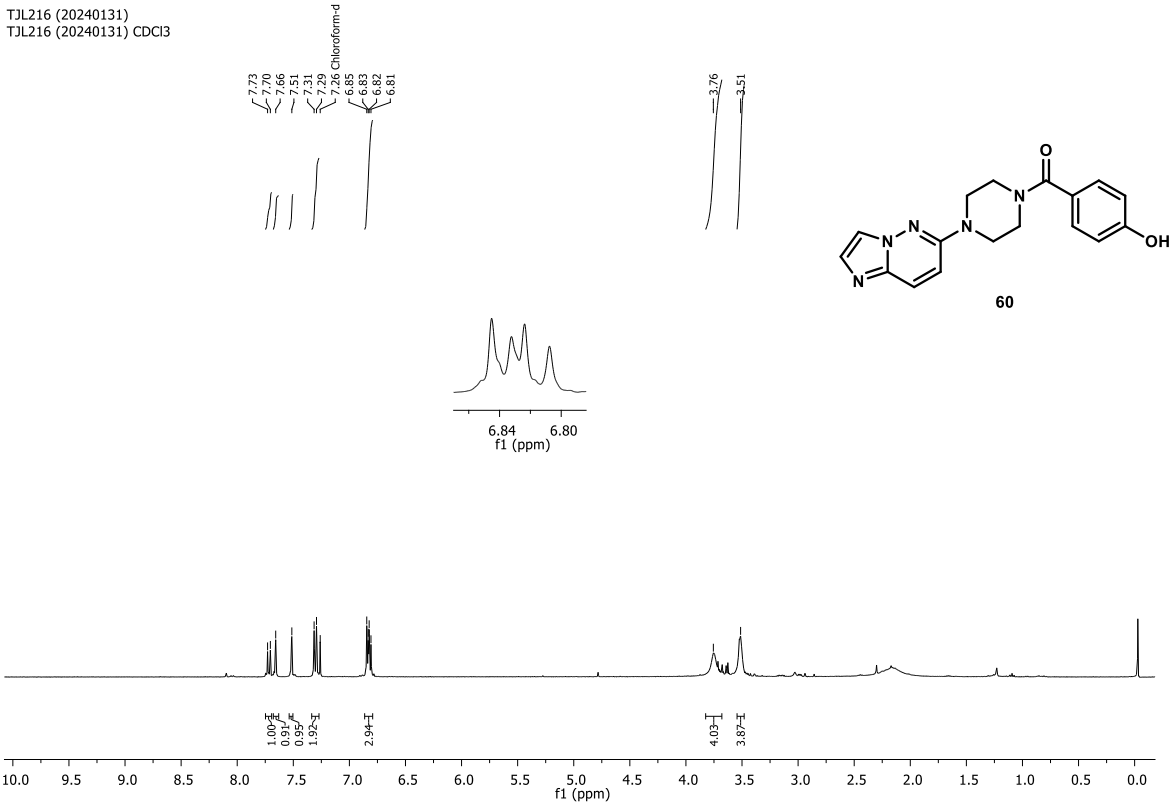
Anexo 98. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **58** (101 MHz, CD_3OD)



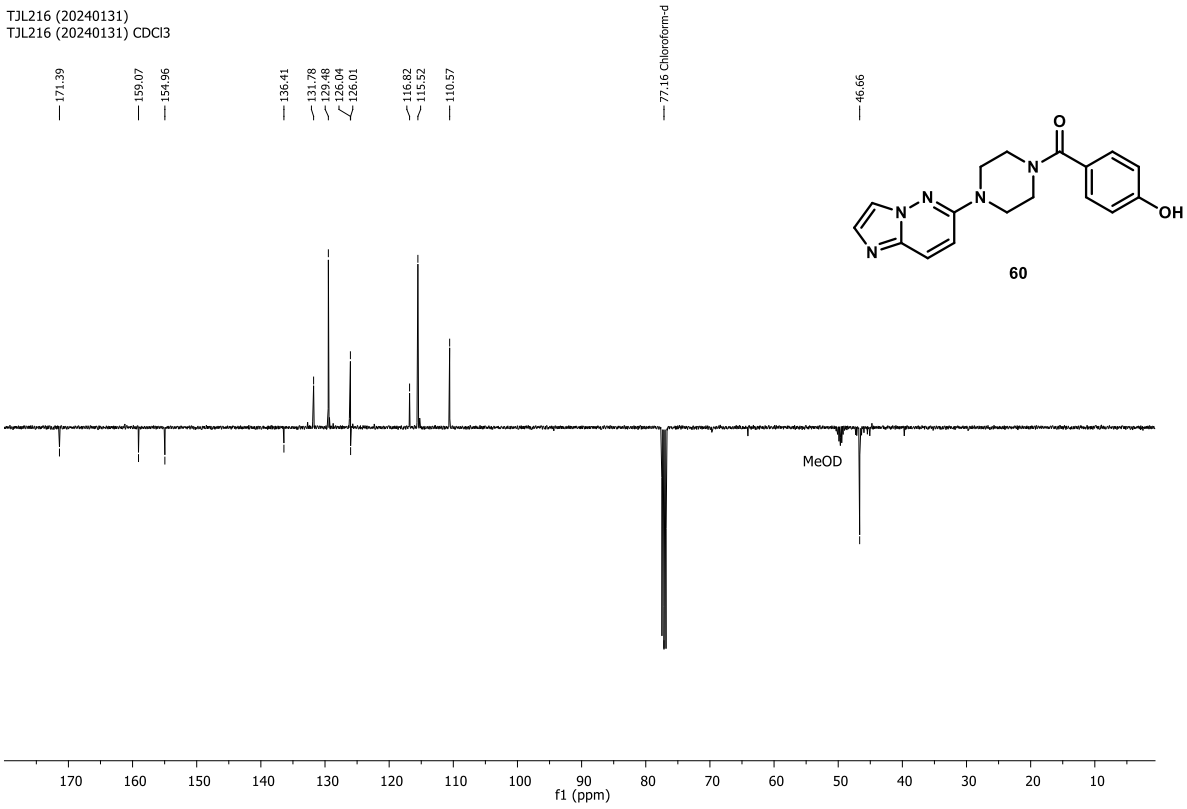
Anexo 99. Espectro de RMN de ^{1}H de **59** (400 MHz, DMSO-d_6)



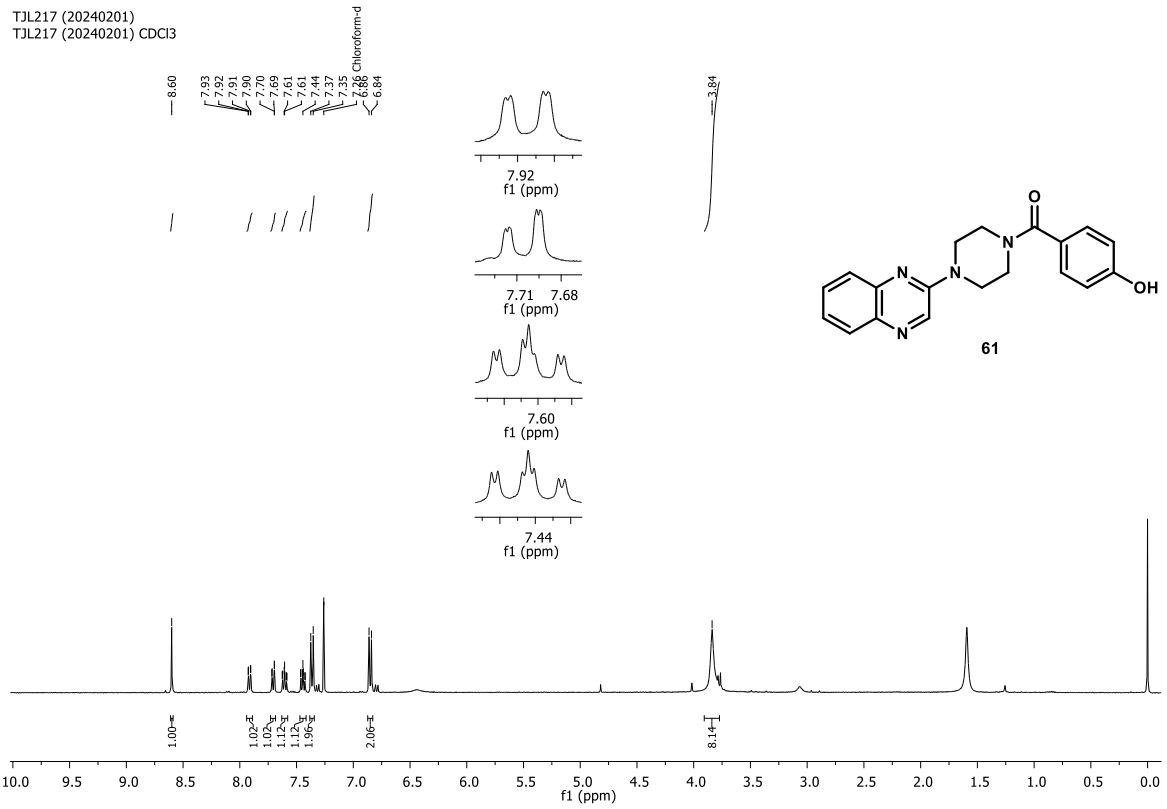
Anexo 100. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **59** (101 MHz, DMSO-d_6)



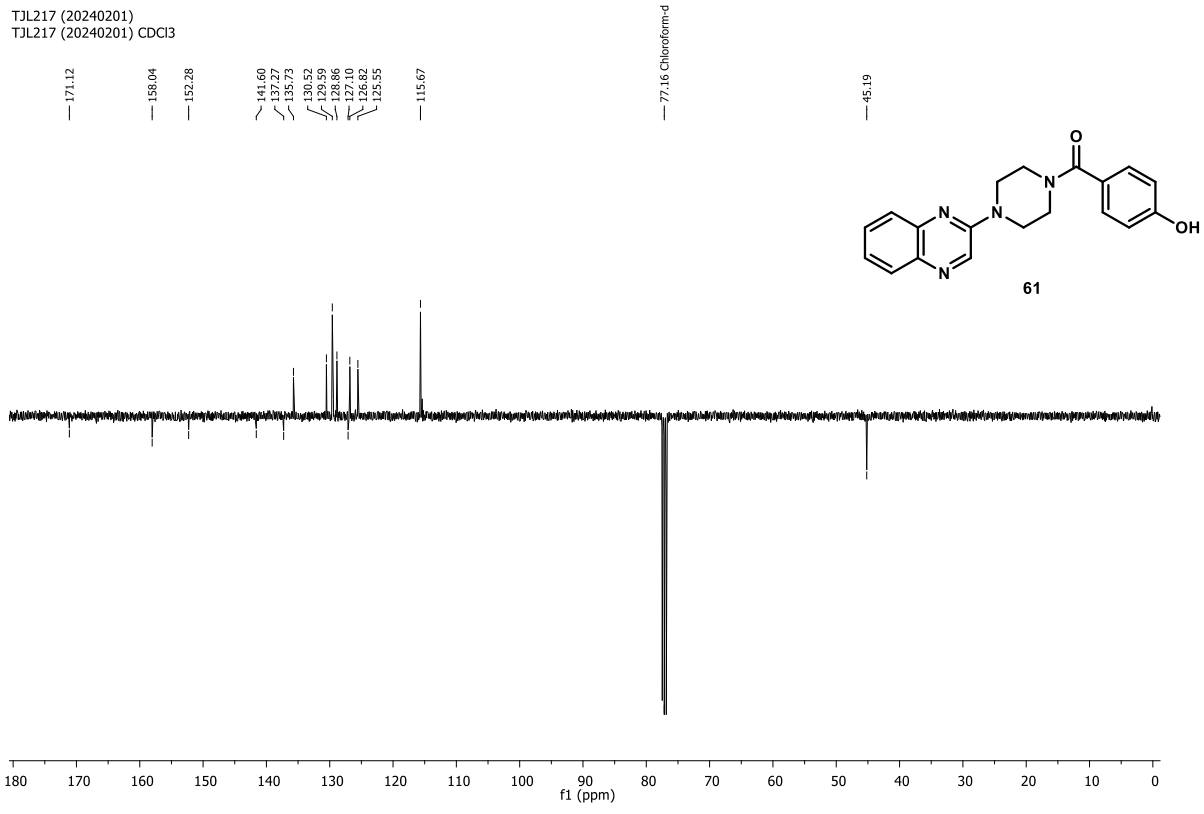
Anexo 101. Espectro de RMN de ^{1}H de **60** (400 MHz, $CDCl_3$)



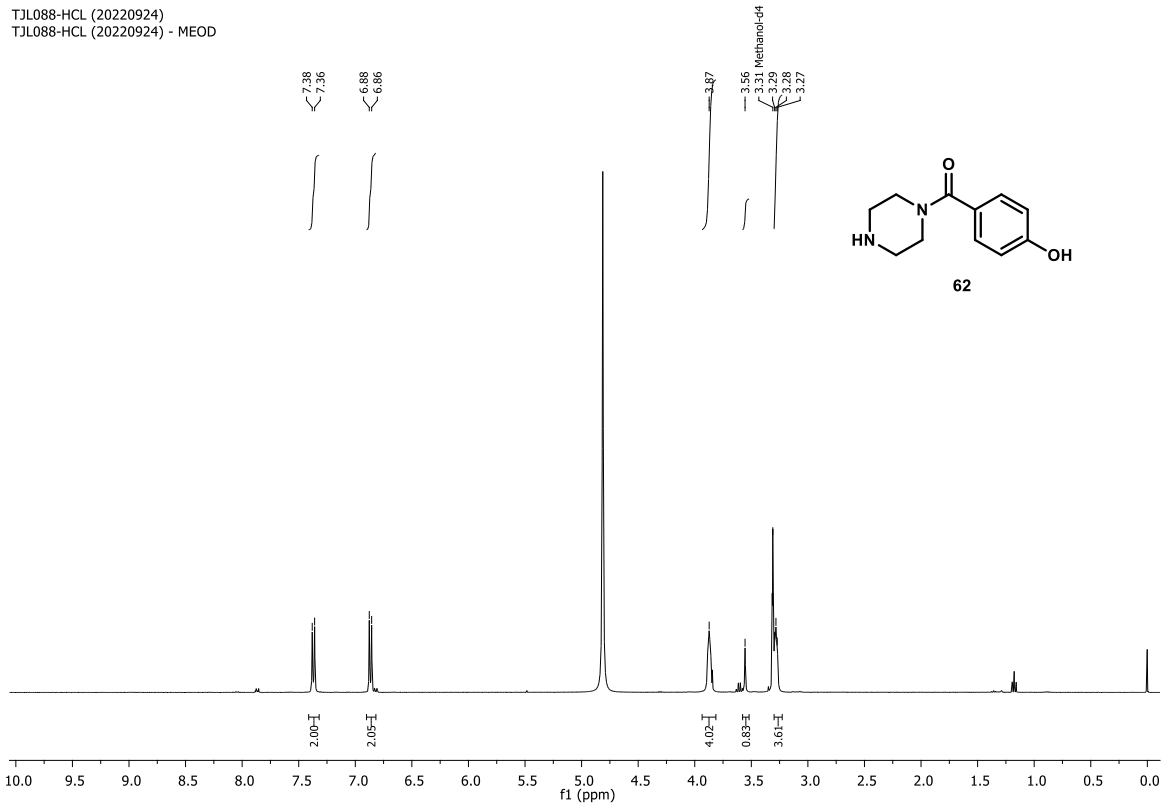
Anexo 102. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **60** (101 MHz, $CDCl_3$)



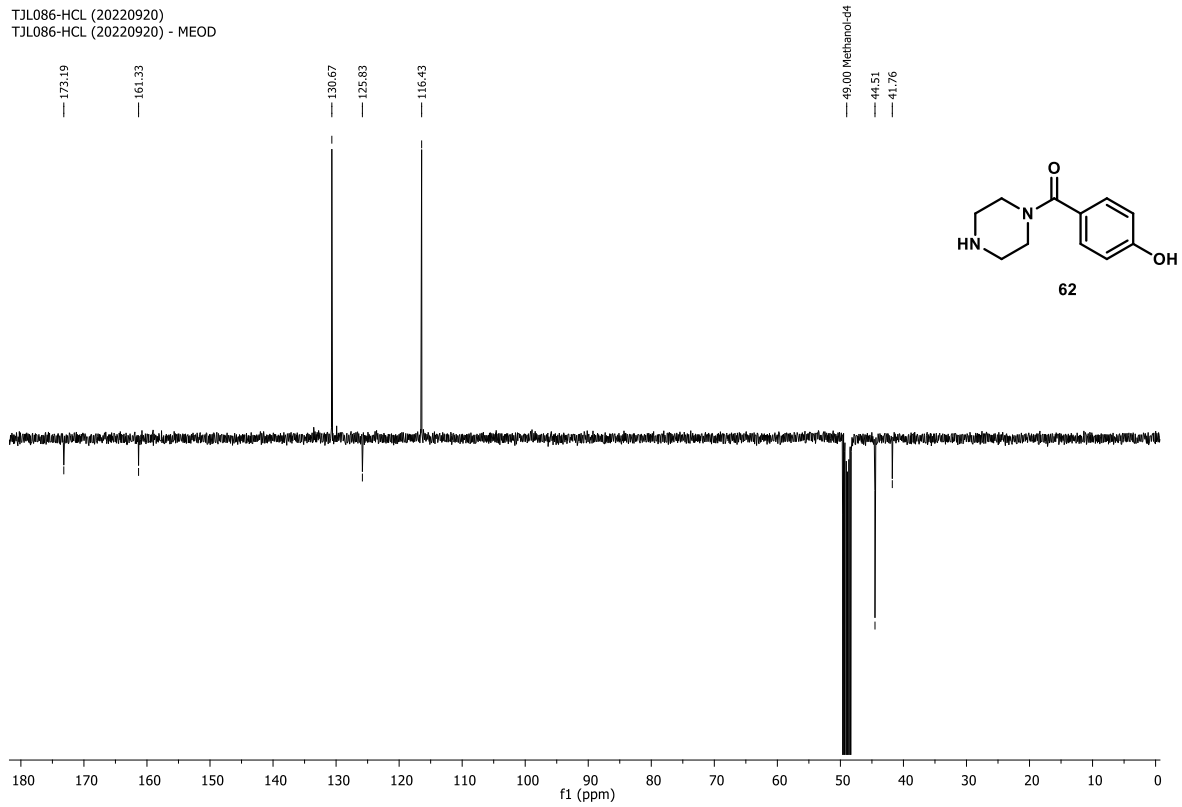
Anexo 103. Espectro de RMN de ^{1}H de **61** (400 MHz, $CDCl_3$)



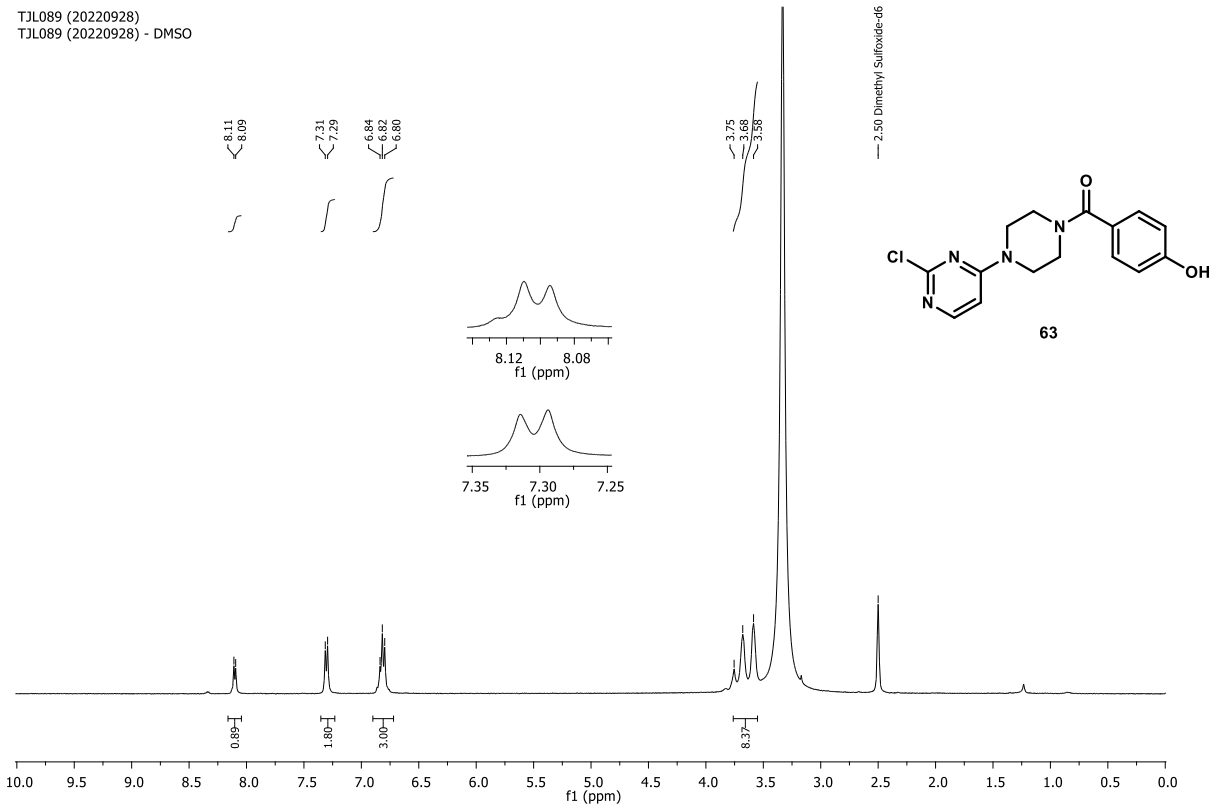
Anexo 104. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **61** (101 MHz, $CDCl_3$)



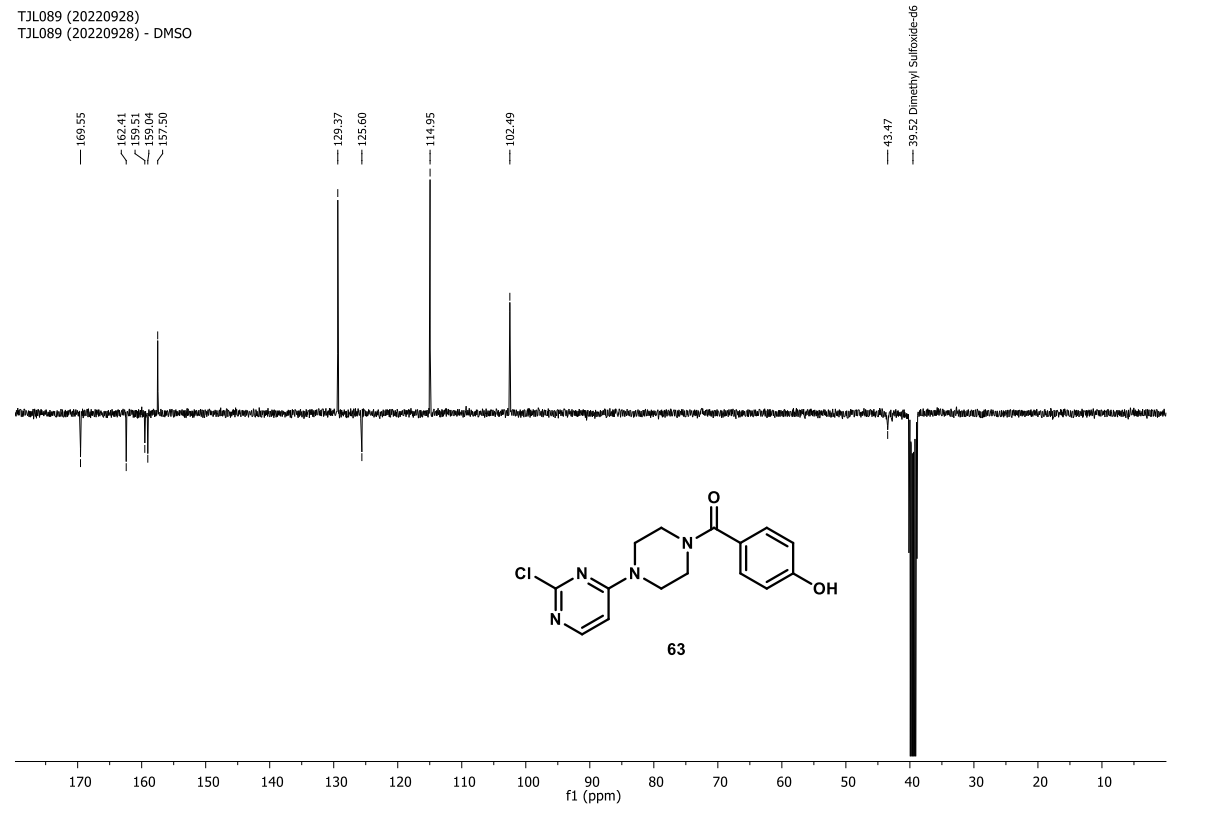
Anexo 105. Espectro de RMN de ^{1}H de **62** (400 MHz, CD_3OD)



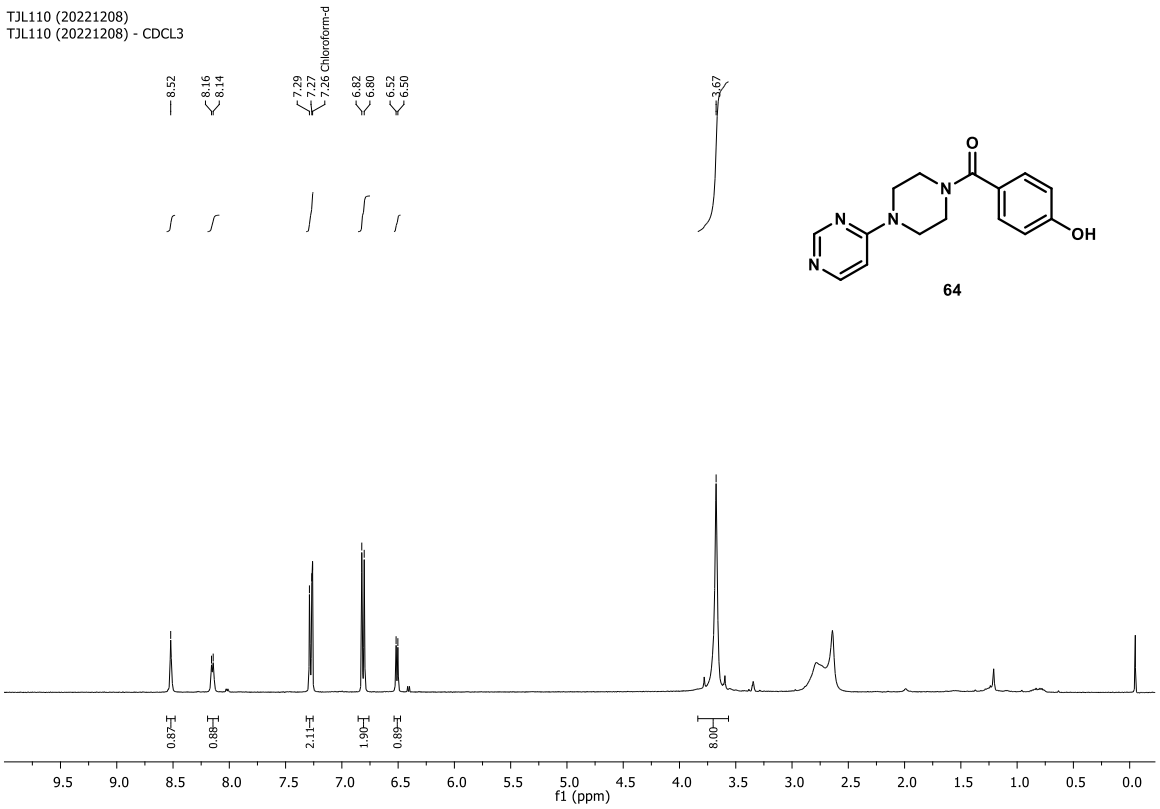
Anexo 106. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **62** (101 MHz, CD_3OD)



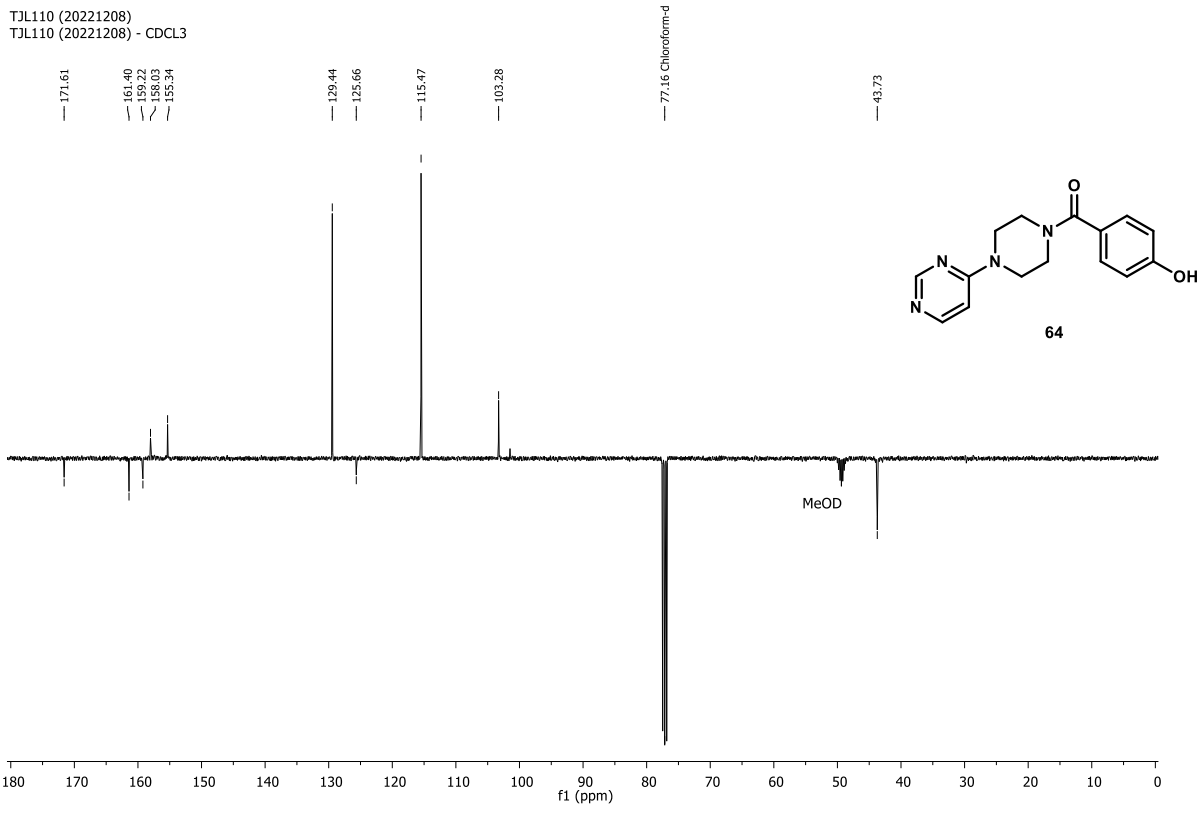
Anexo 107. Espectro de RMN de ^{1}H de **63** (400 MHz, DMSO-d_6)



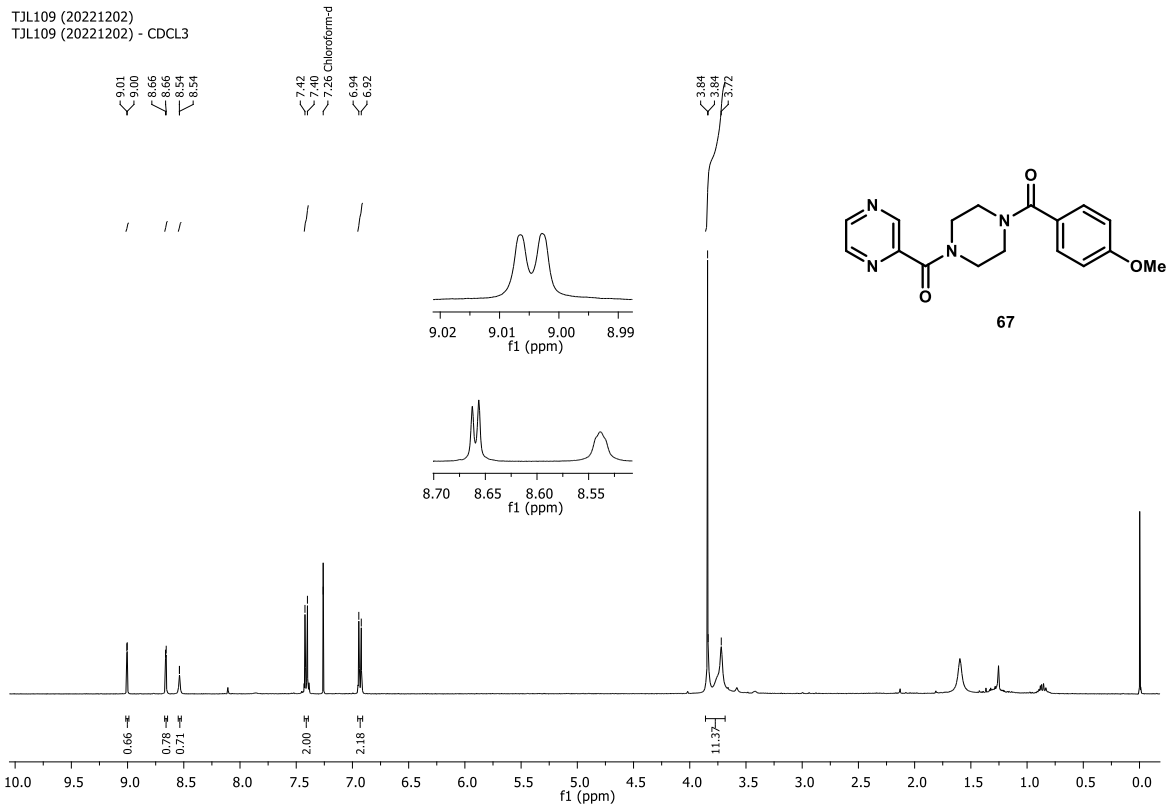
Anexo 108. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **63** (101 MHz, DMSO-d_6)



Anexo 109. Espectro de RMN de ^{1}H de **64** (400 MHz, $CDCl_3$)



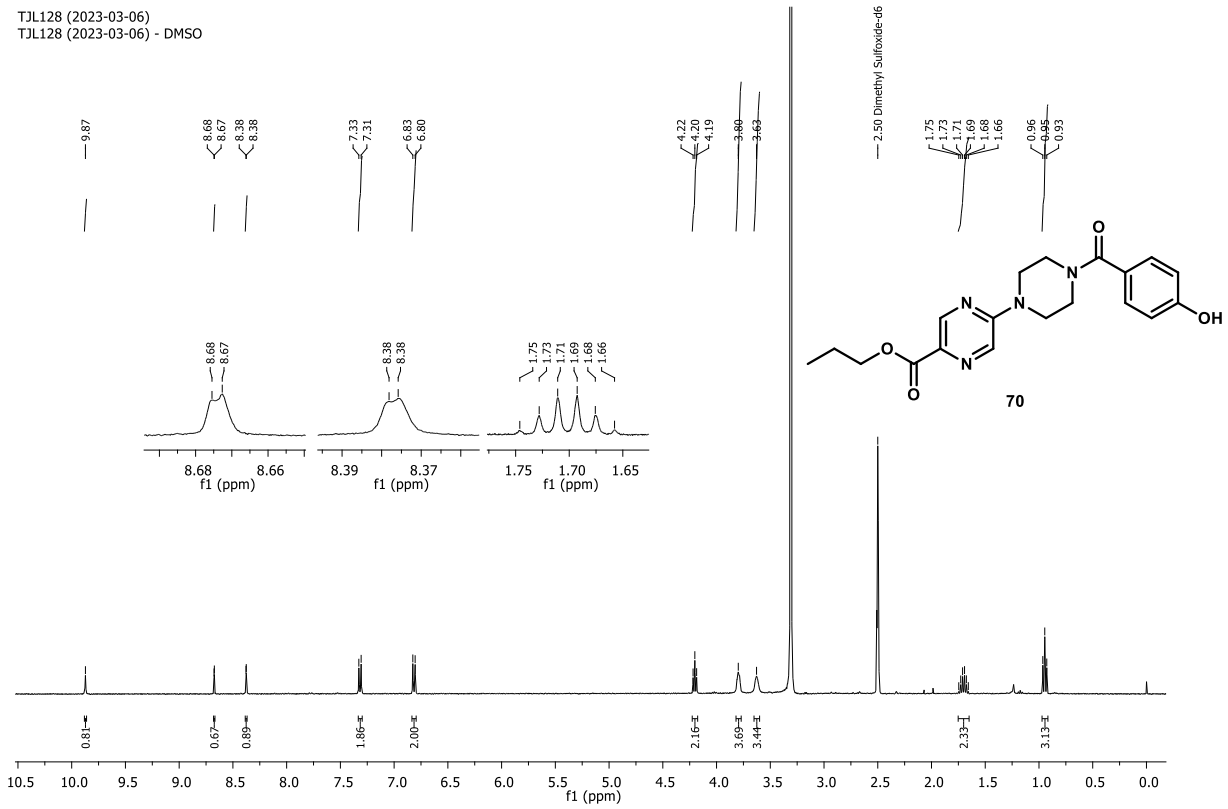
Anexo 110. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **64** (101 MHz, $CDCl_3$)



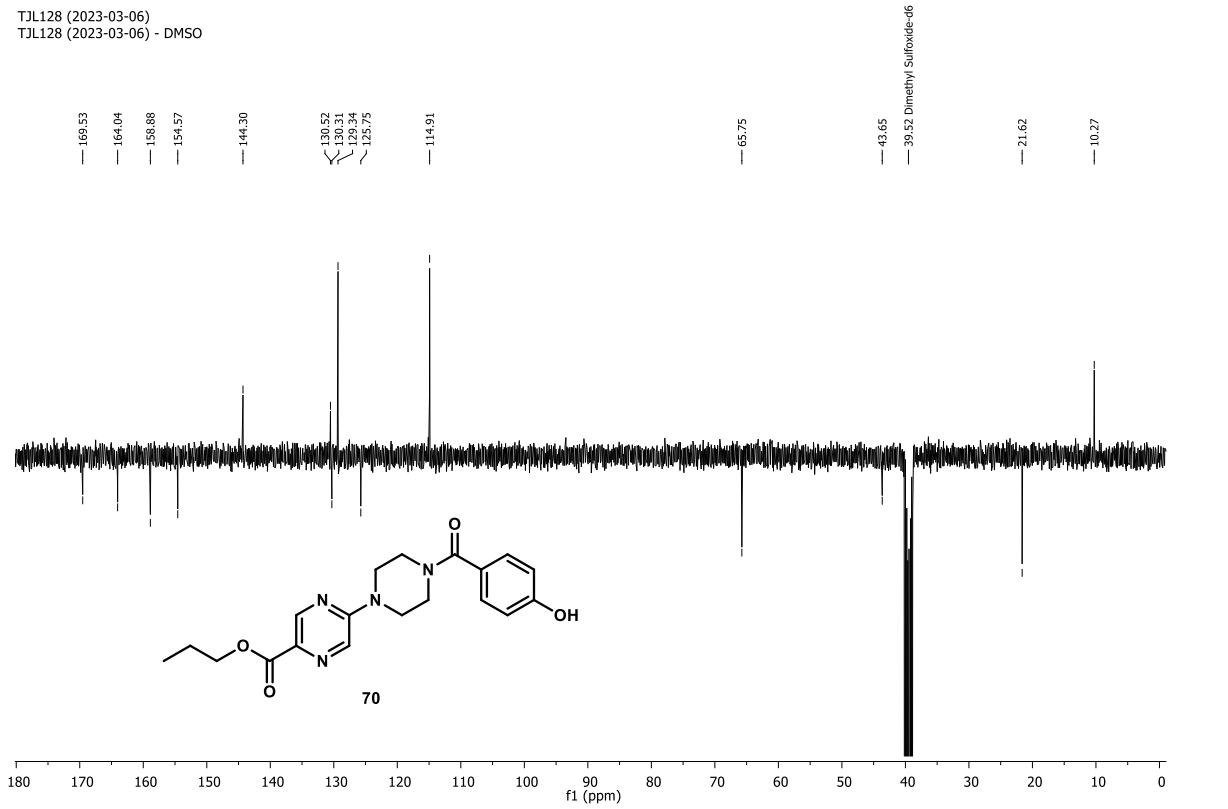
Anexo 111. Espectro de RMN de ^{1}H de **67** (400 MHz, $CDCl_3$)



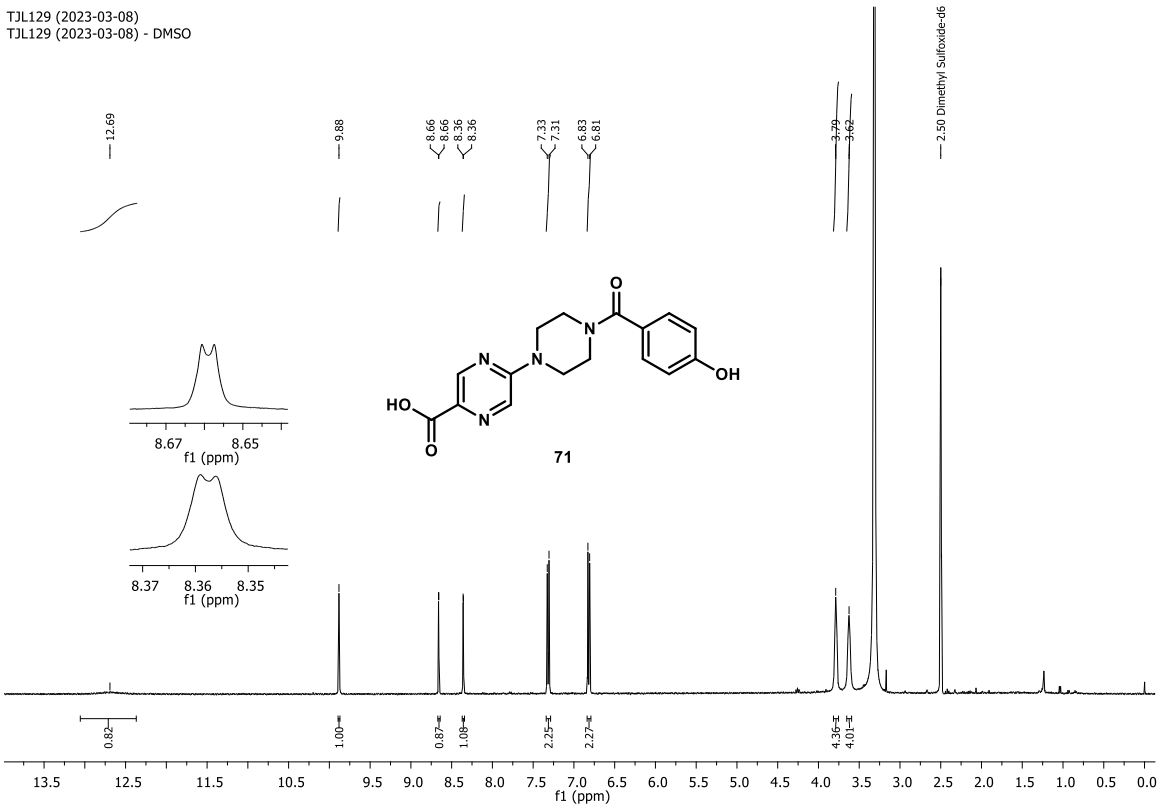
Anexo 112. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **67** (101 MHz, $CDCl_3$)



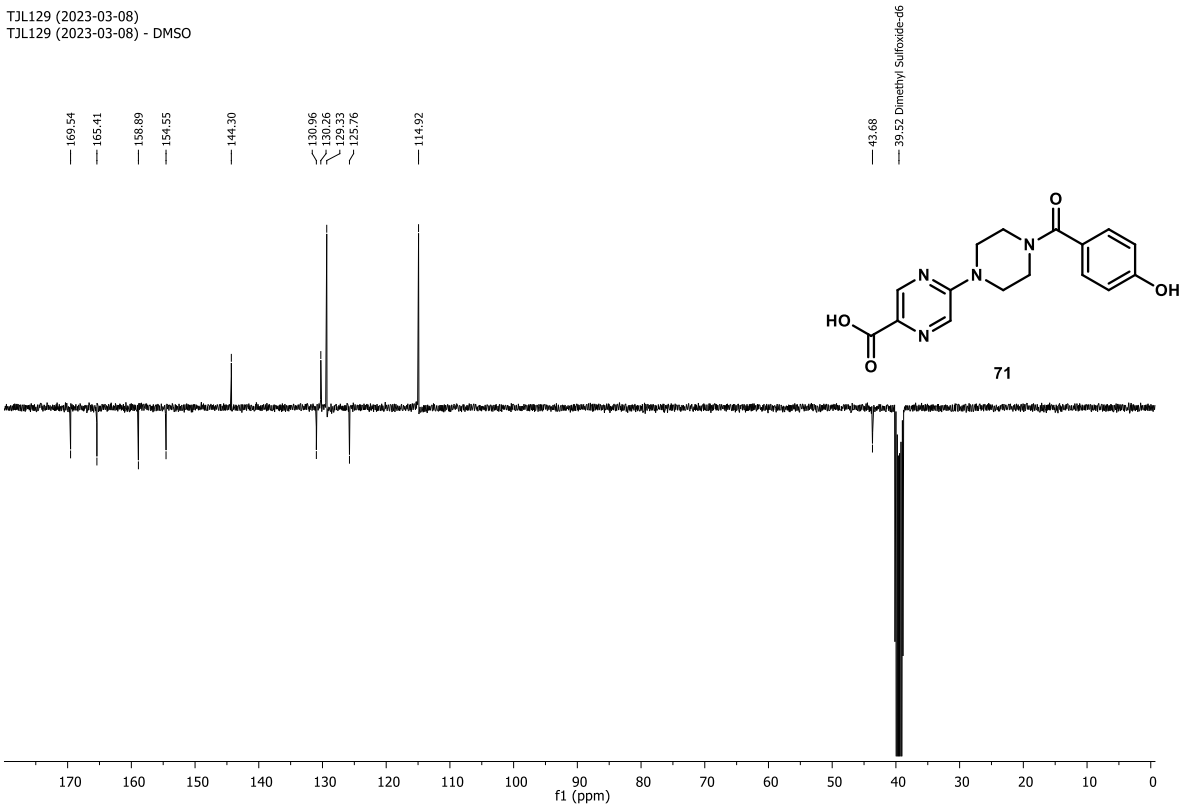
Anexo 113. Espectro de RMN de ^{1}H de **70** (400 MHz, DMSO-d_6)



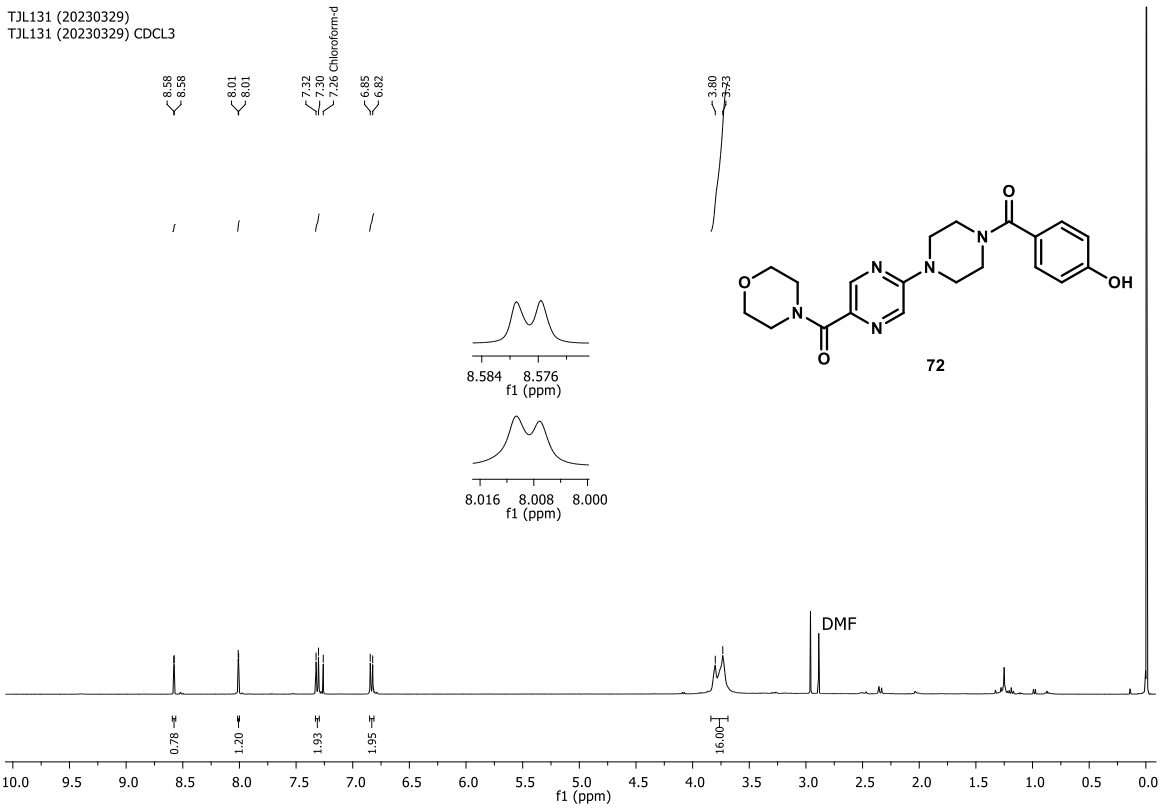
Anexo 114. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **70** (101 MHz, DMSO-d_6)



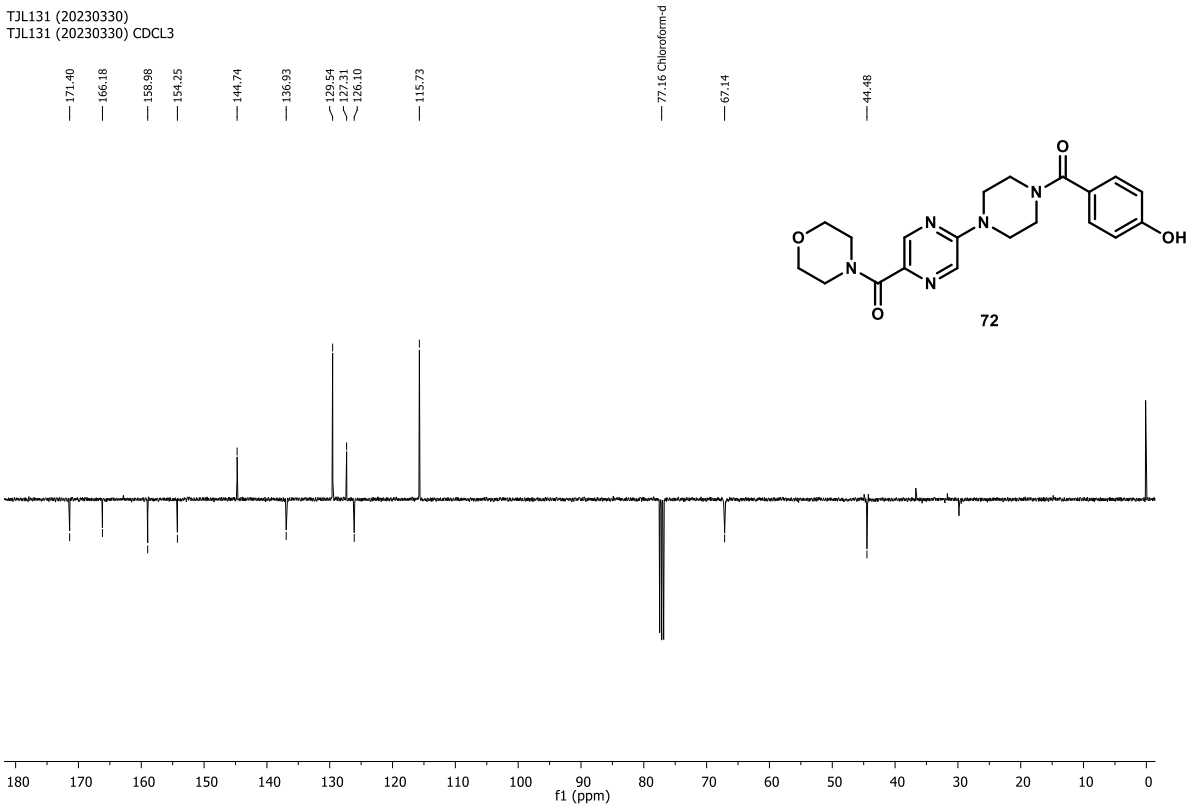
Anexo 115. Espectro de RMN de ^{1}H de **71** (400 MHz, DMSO-d_6)



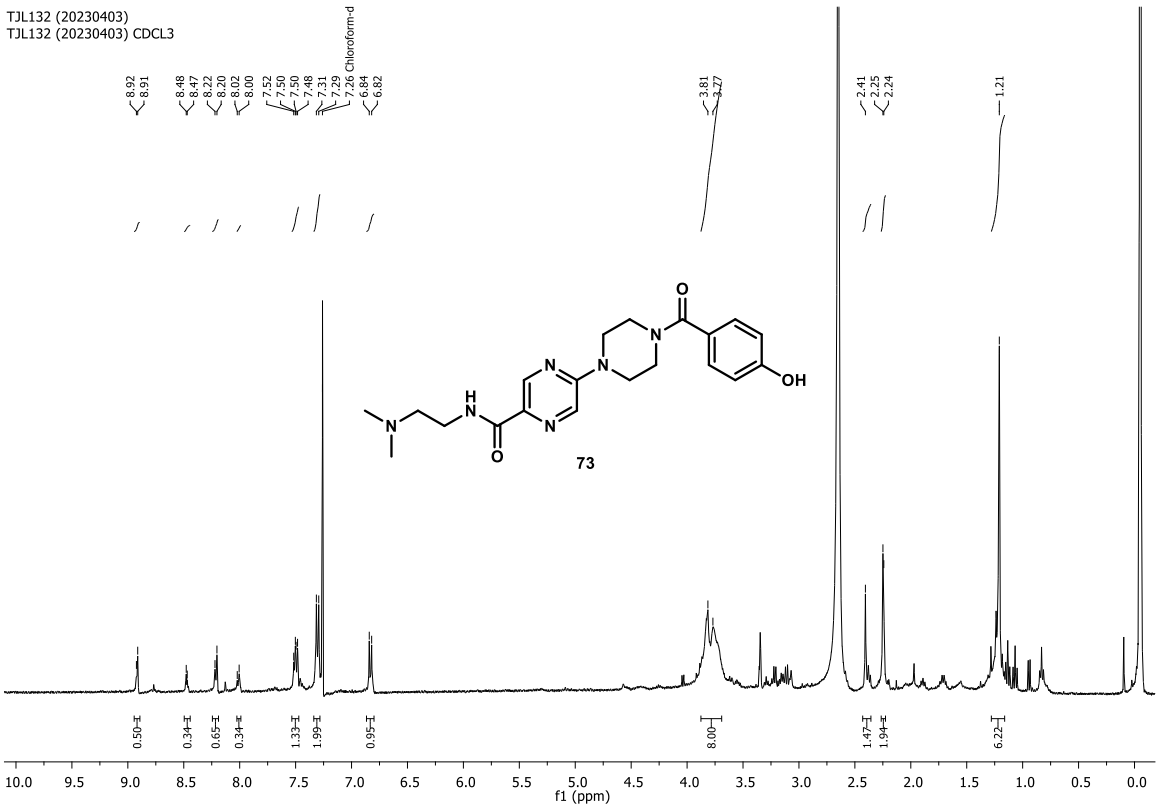
Anexo 116. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **71** (101 MHz, DMSO-d_6)



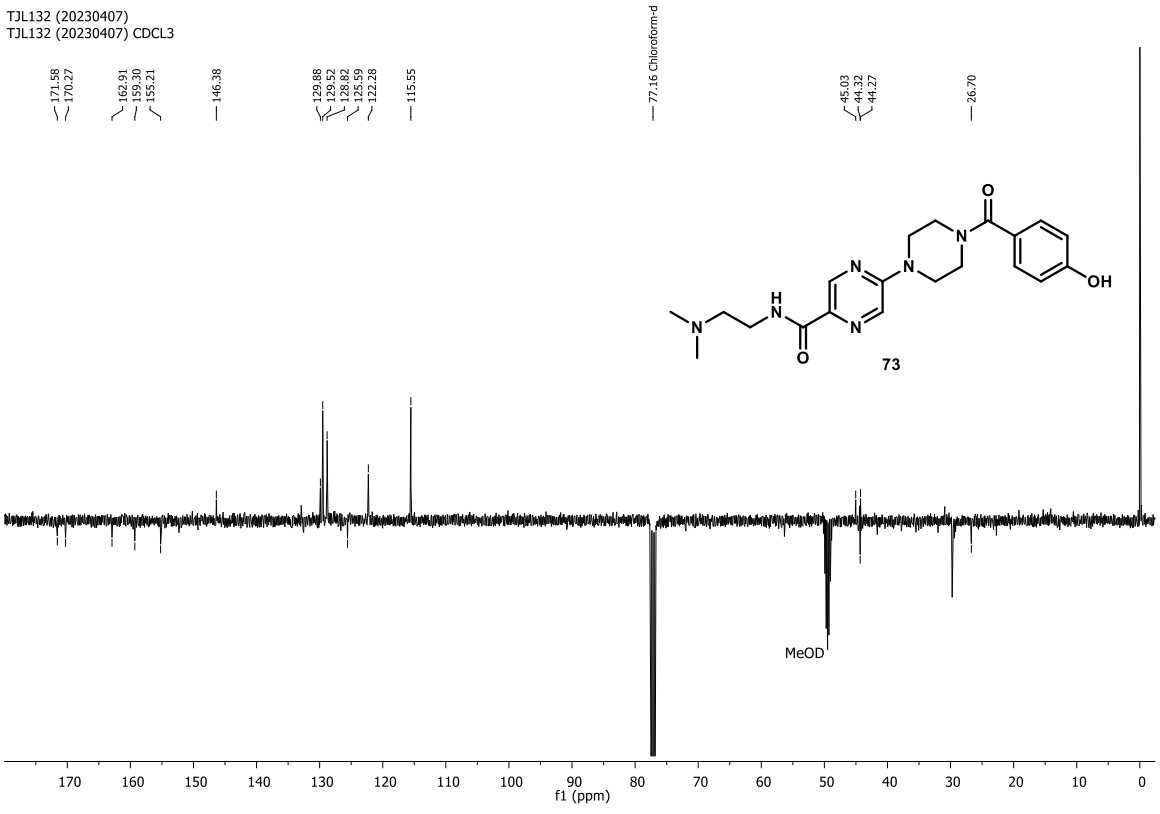
Anexo 117. Espectro de RMN de ^{1}H de **72** (400 MHz, $CDCl_3$)



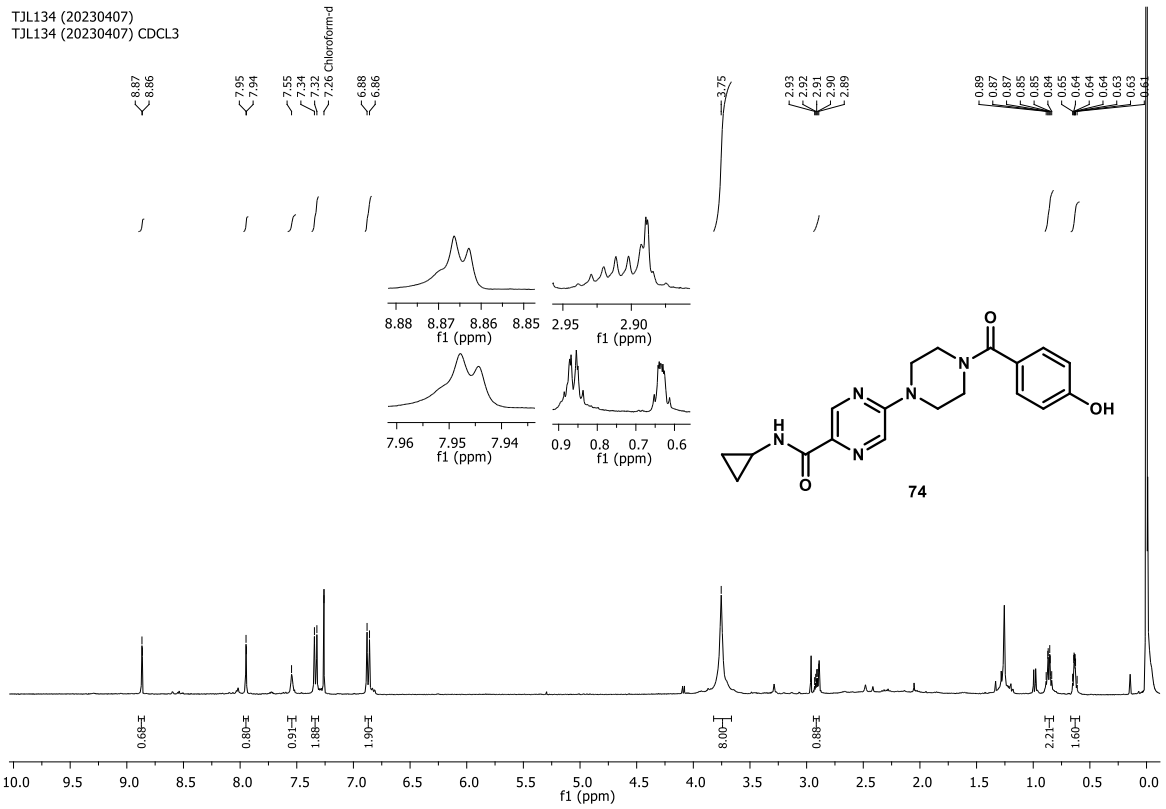
Anexo 118. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **72** (101 MHz, $CDCl_3$)



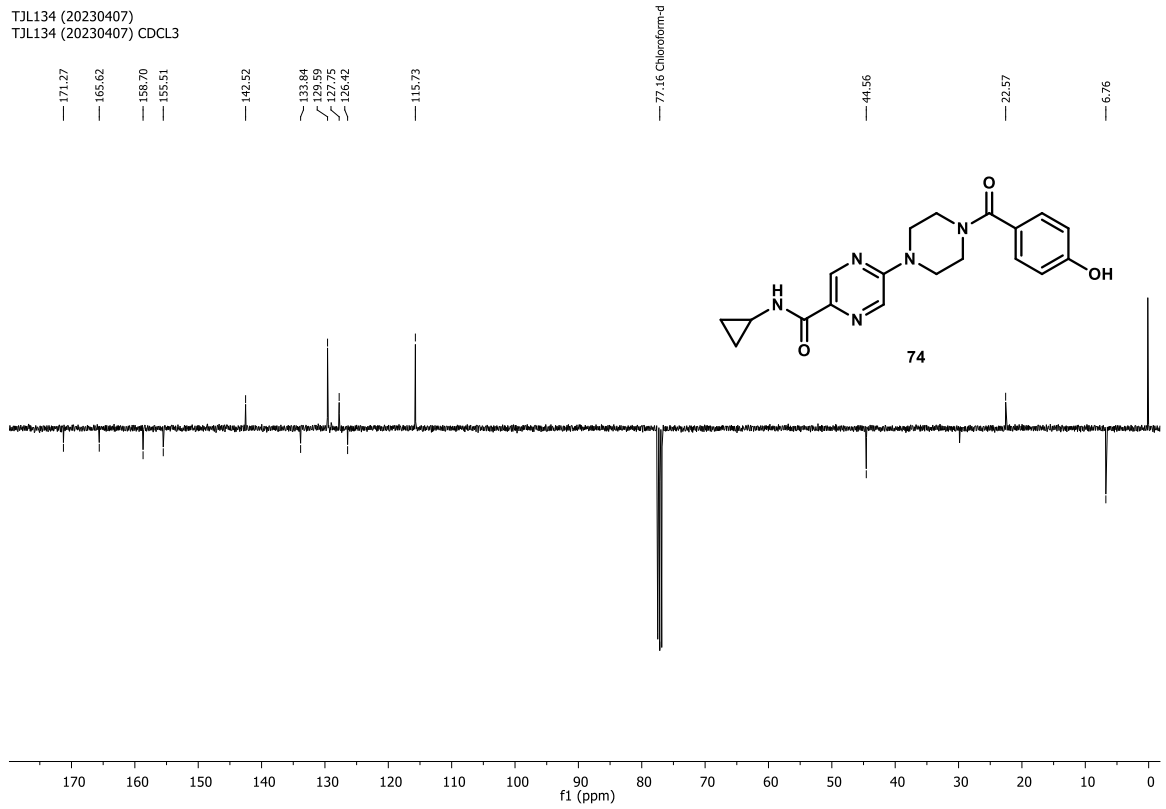
Anexo 119. Espectro de RMN de ^{1}H de **73** (400 MHz, $CDCl_3$)



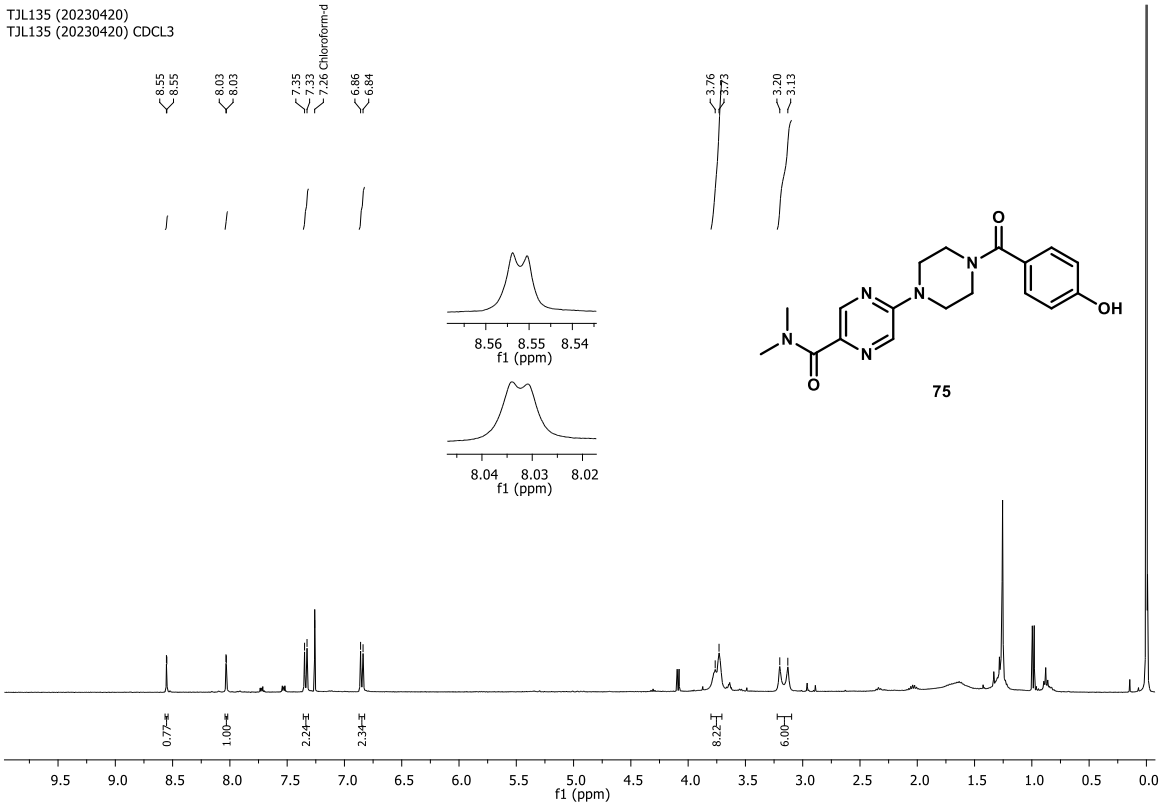
Anexo 120. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **73** (101 MHz, $CDCl_3$)



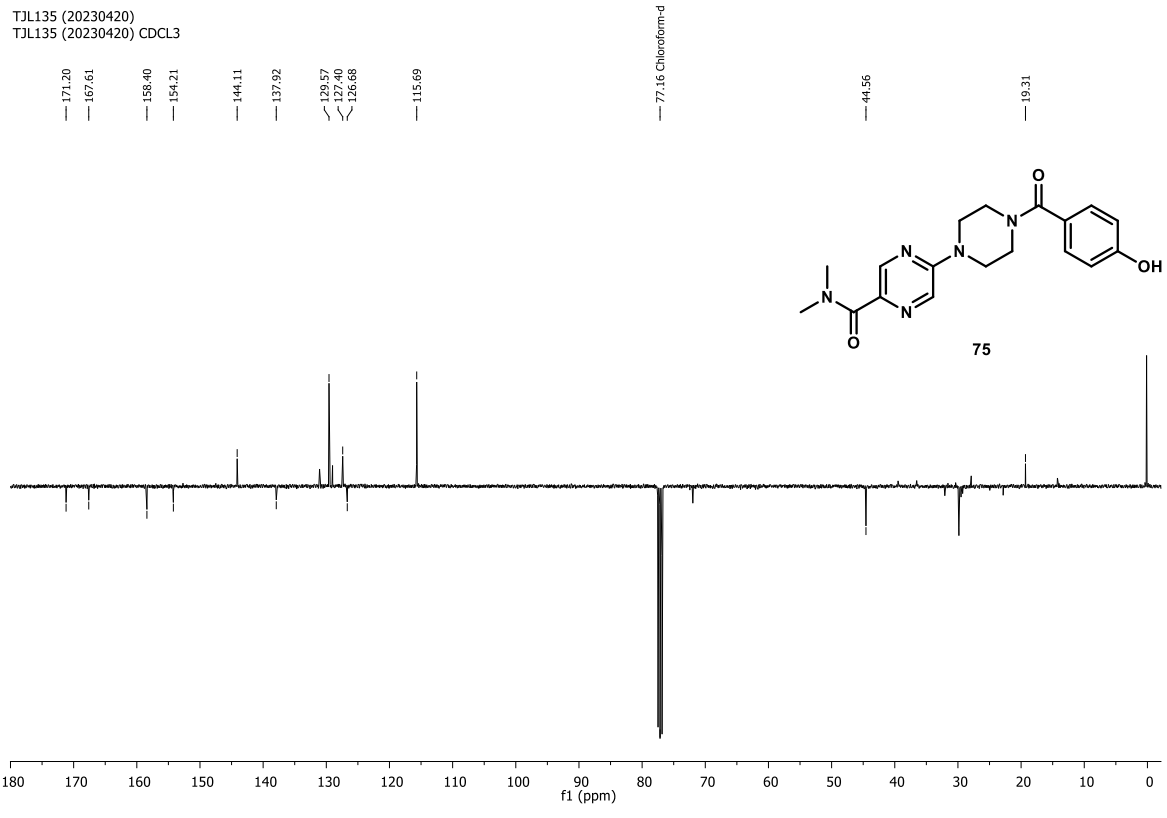
Anexo 121. Espectro de RMN de ^{1}H de **74** (400 MHz, $CDCl_3$)



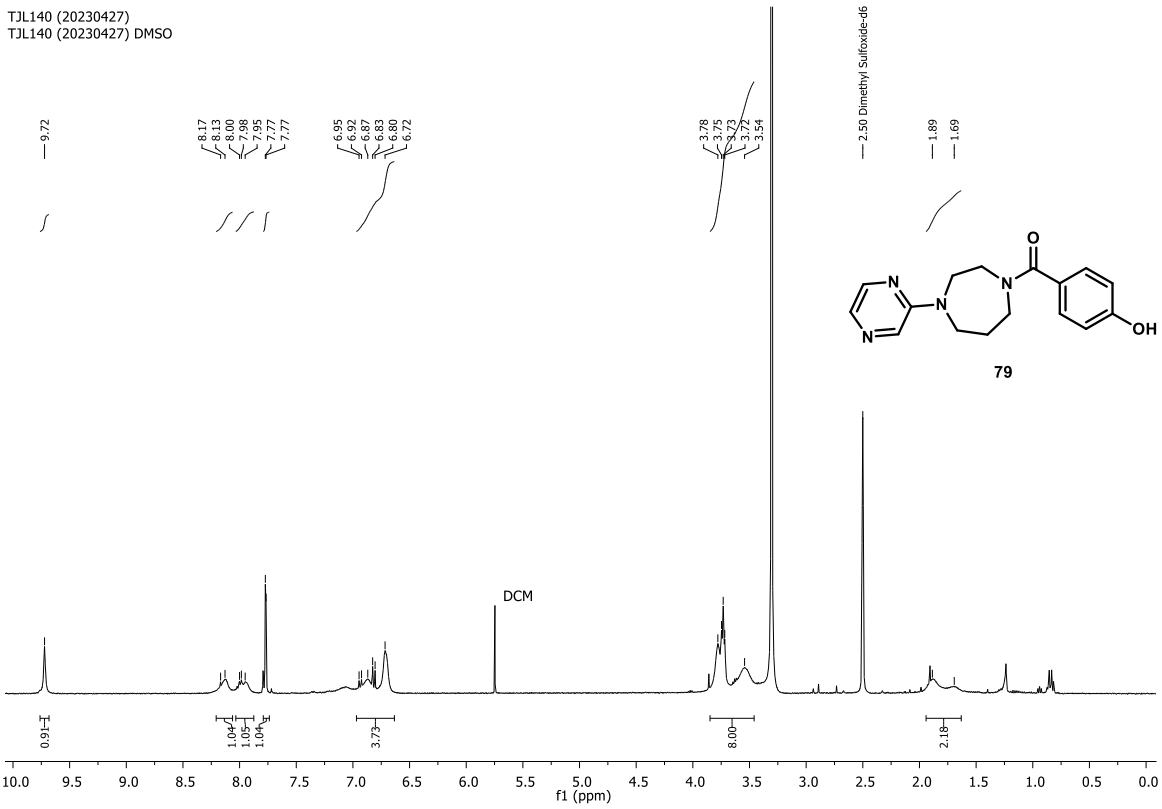
Anexo 122. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **74** (101 MHz, $CDCl_3$)



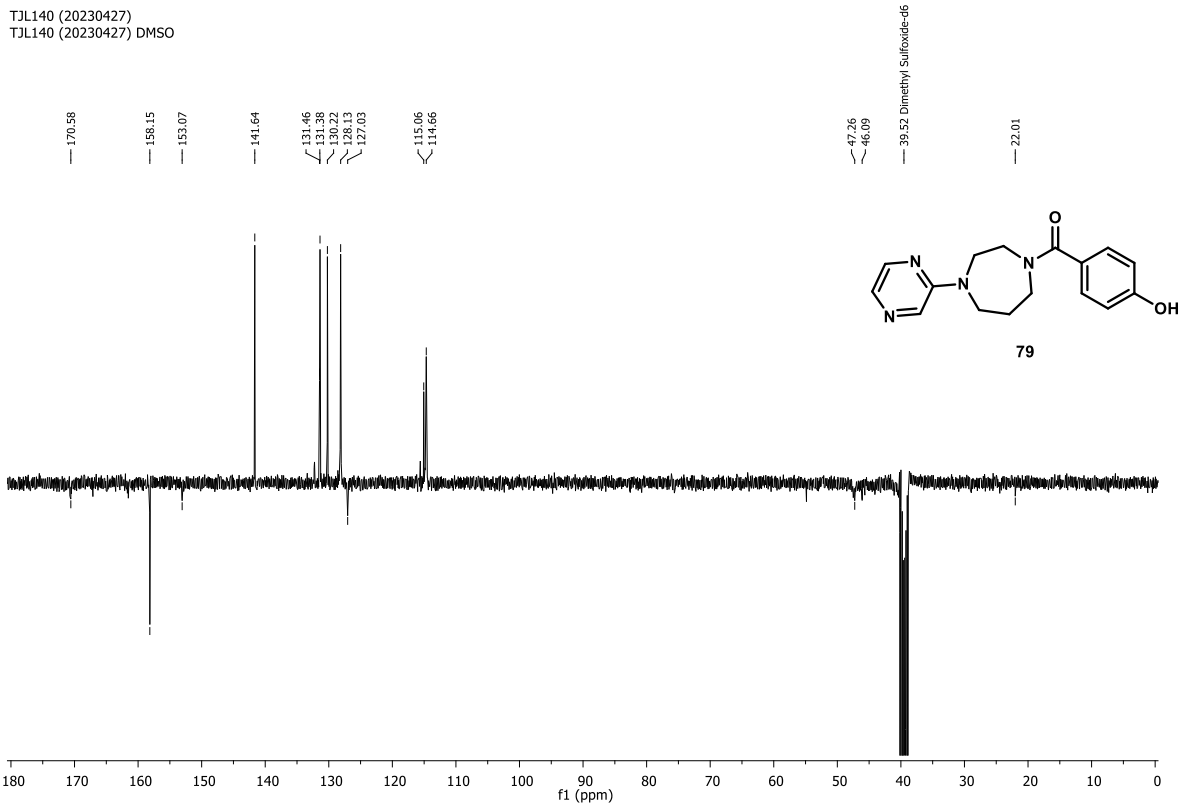
Anexo 123. Espectro de RMN de ^{1}H de **75** (400 MHz, $CDCl_3$)



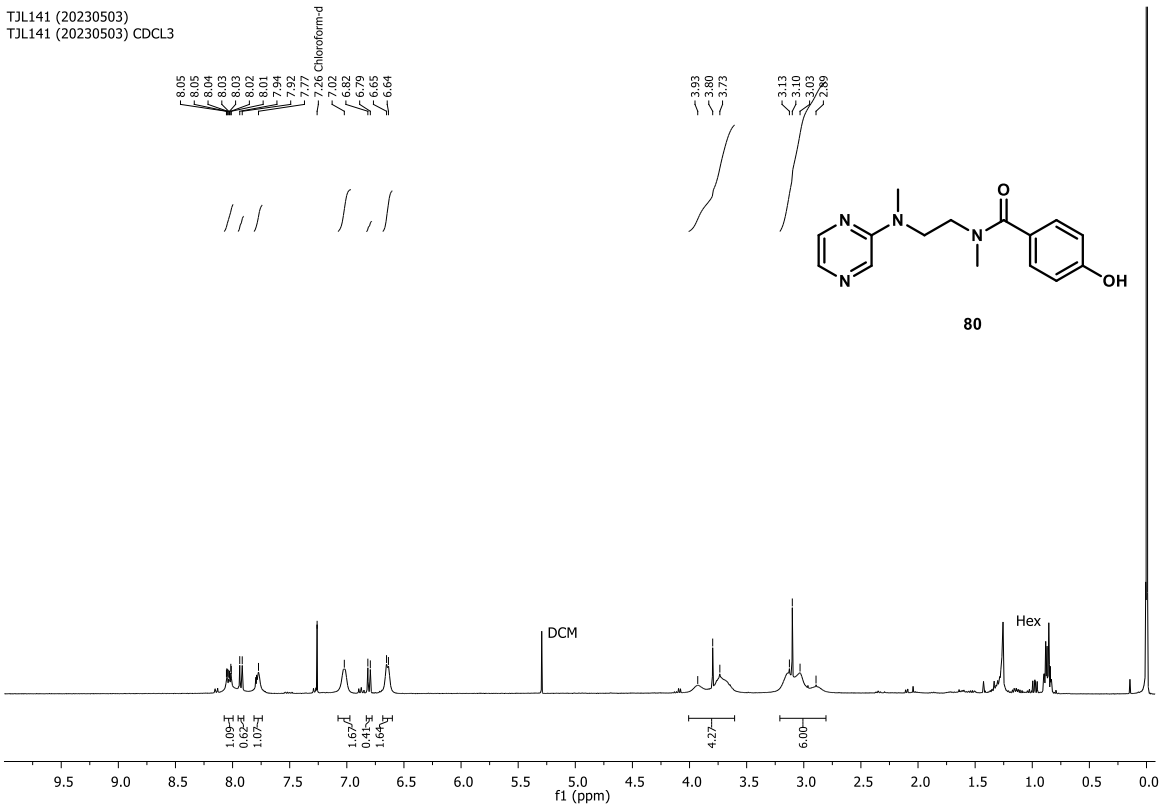
Anexo 124. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **75** (101 MHz, $CDCl_3$)



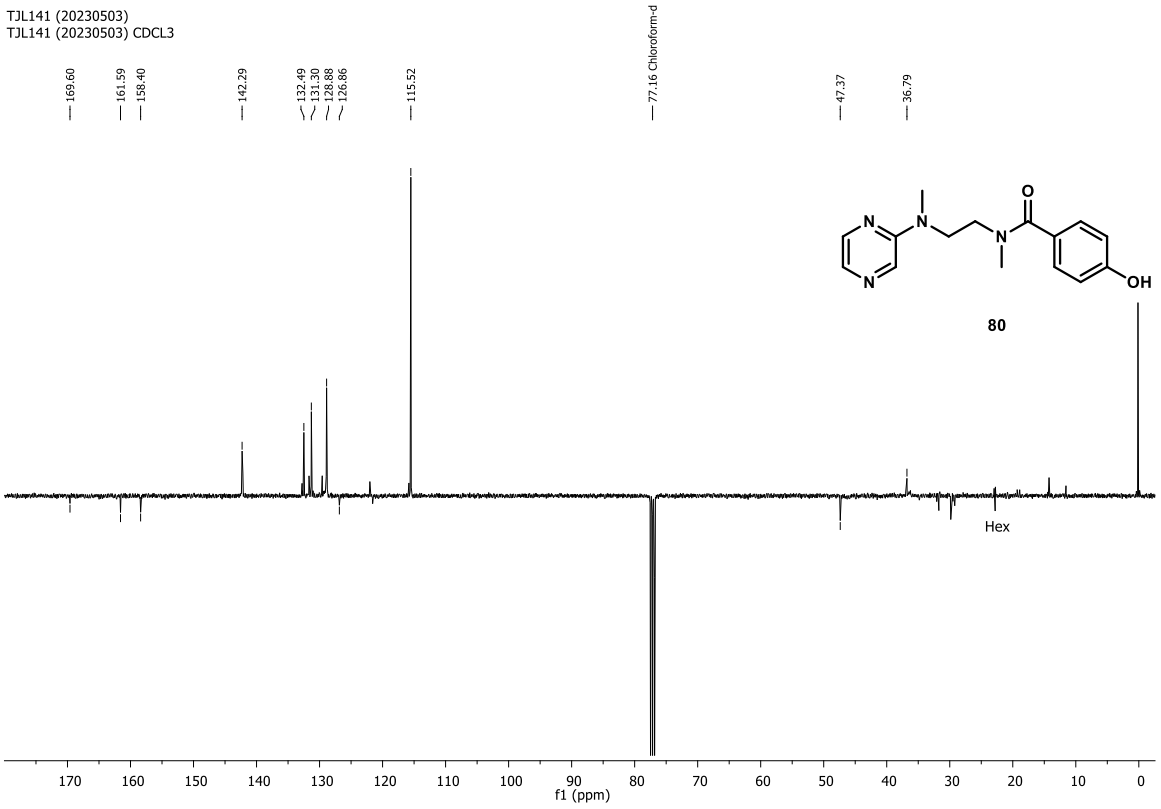
Anexo 125. Espectro de RMN de ^{1}H de **79** (400 MHz, $CDCl_3$)



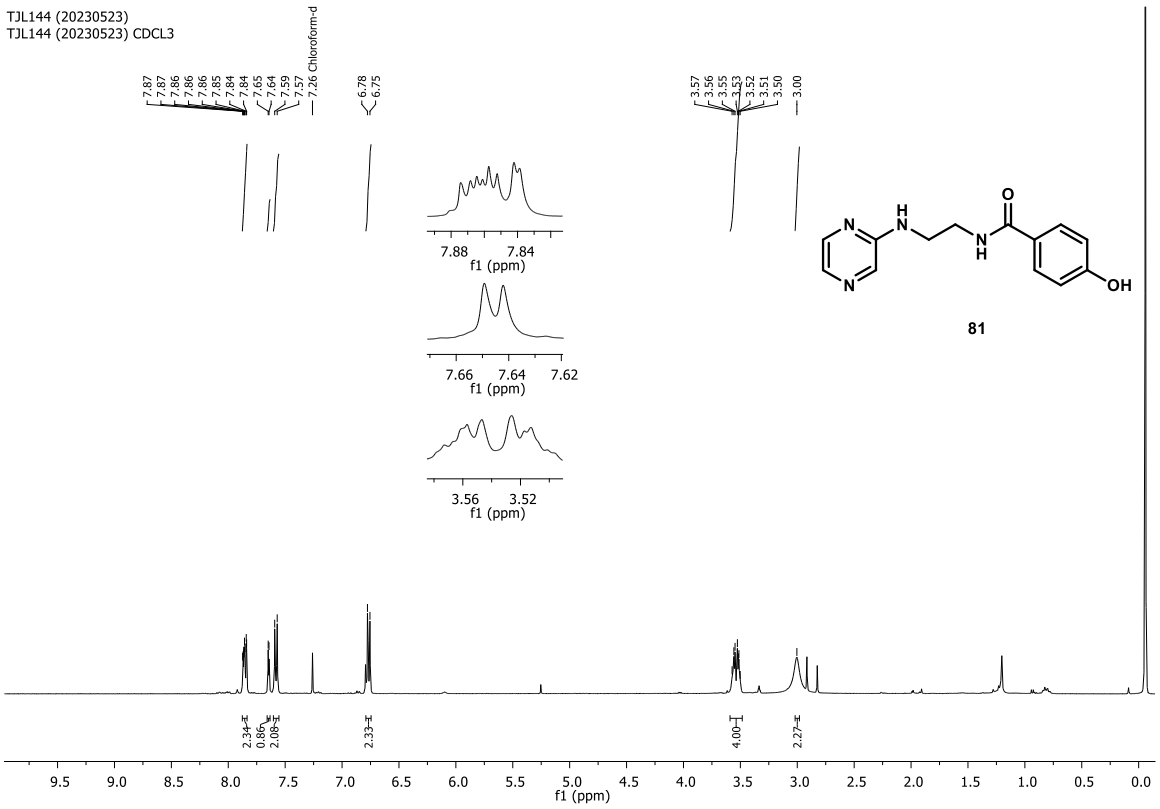
Anexo 126. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **79** (101 MHz, $CDCl_3$)



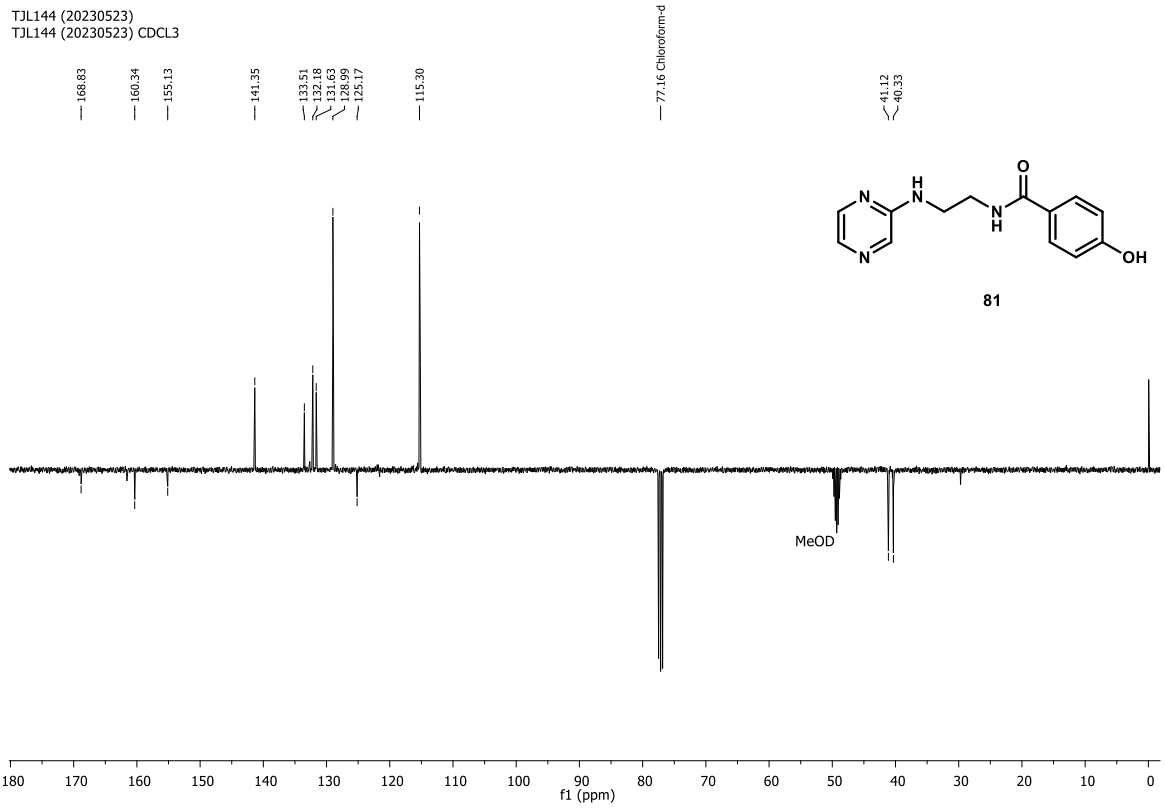
Anexo 127. Espectro de RMN de ^{1}H de **80** (400 MHz, $CDCl_3$)



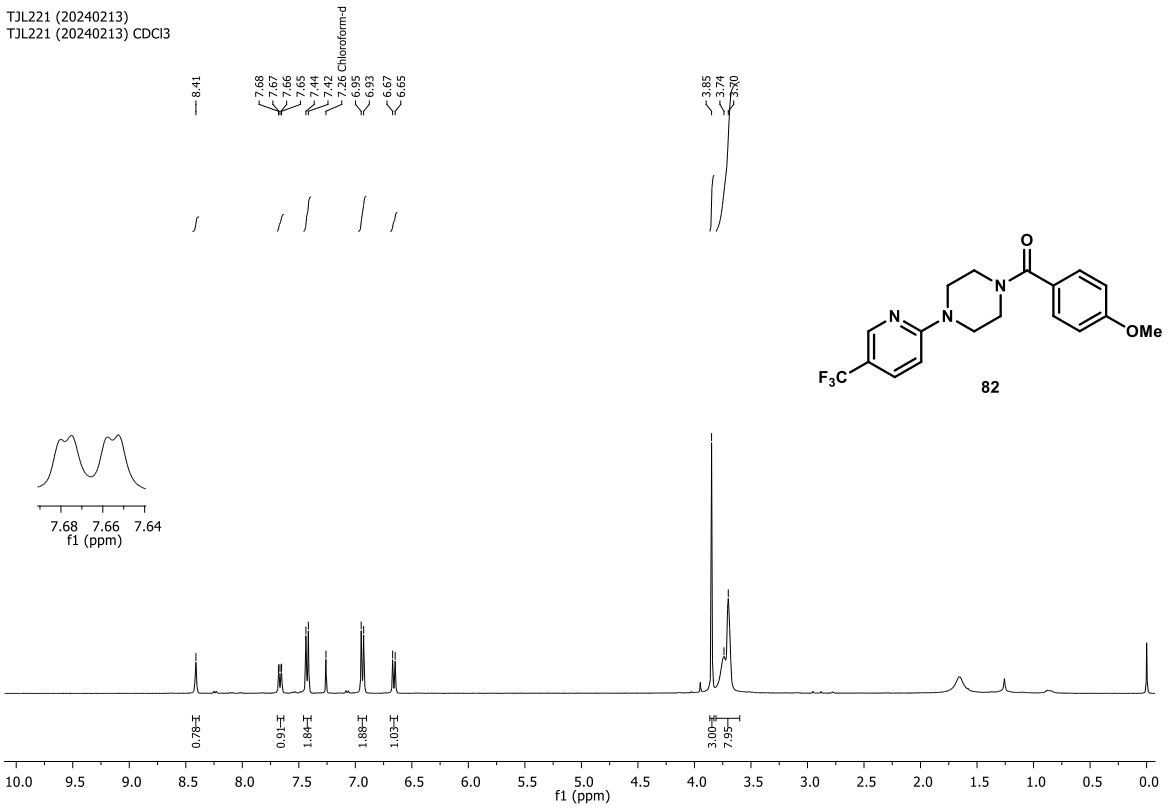
Anexo 128. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **80** (101 MHz, $CDCl_3$)



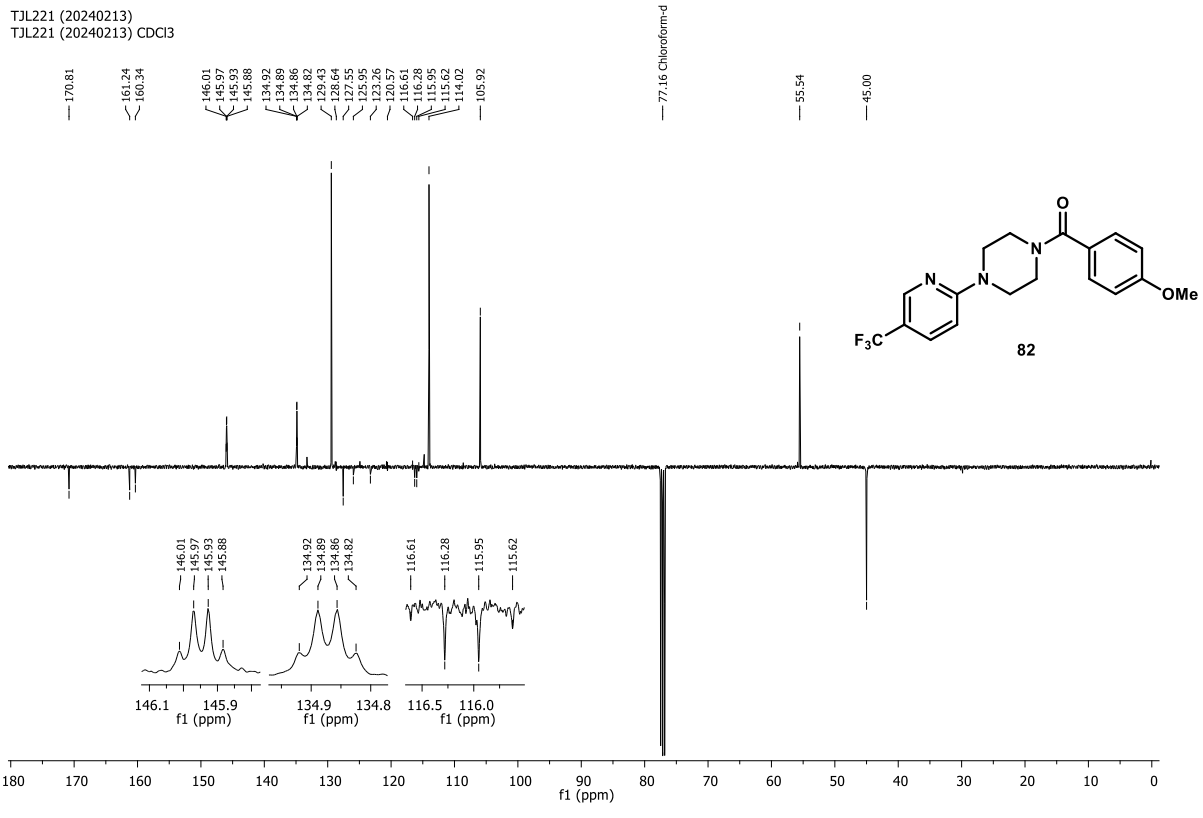
Anexo 129. Espectro de RMN de ^{1}H de **81** (400 MHz, $CDCl_3$)



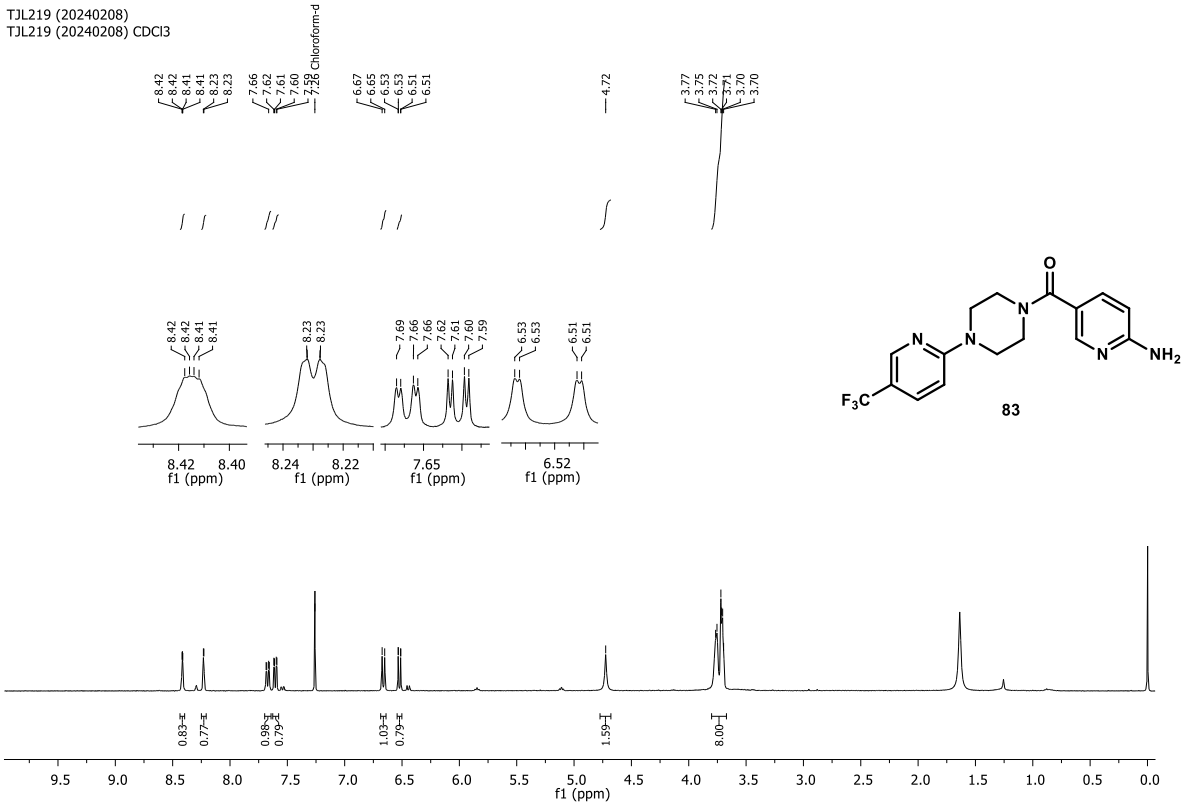
Anexo 130. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **81** (101 MHz, $CDCl_3$)



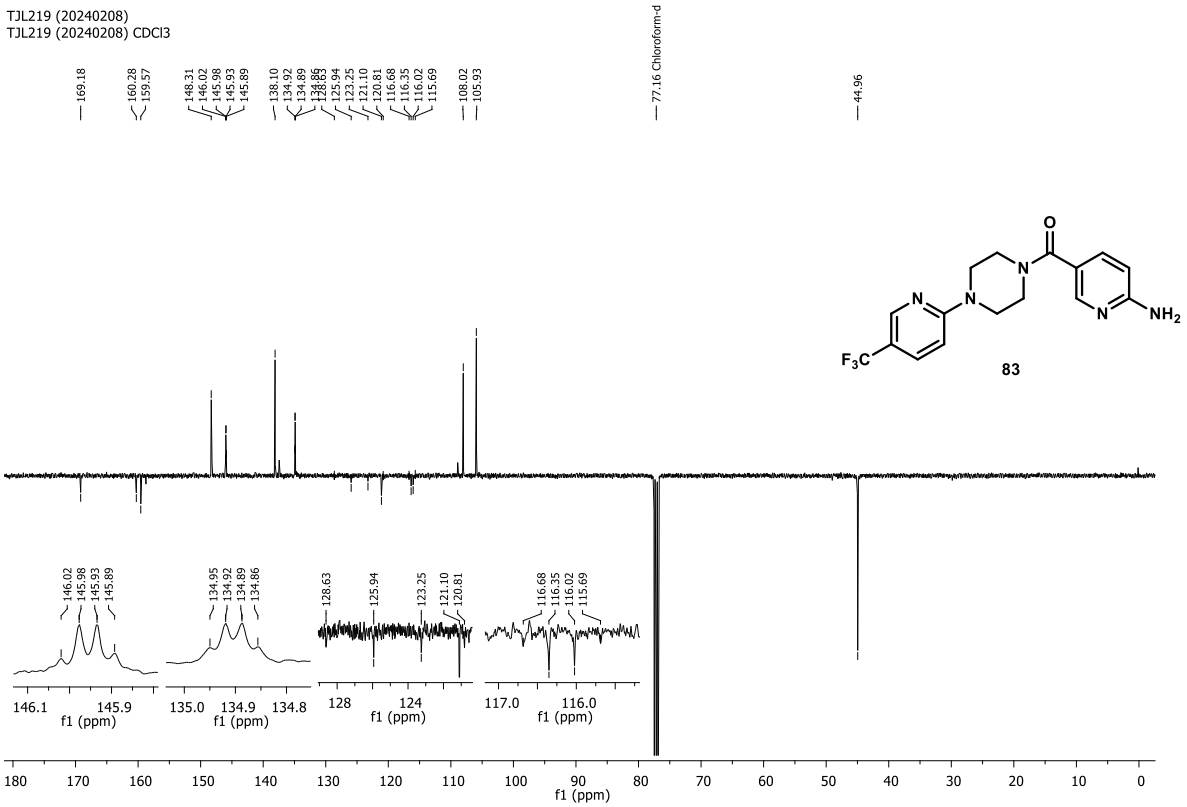
Anexo 131. Espectro de RMN de ^{1}H de **82** (400 MHz, $CDCl_3$)



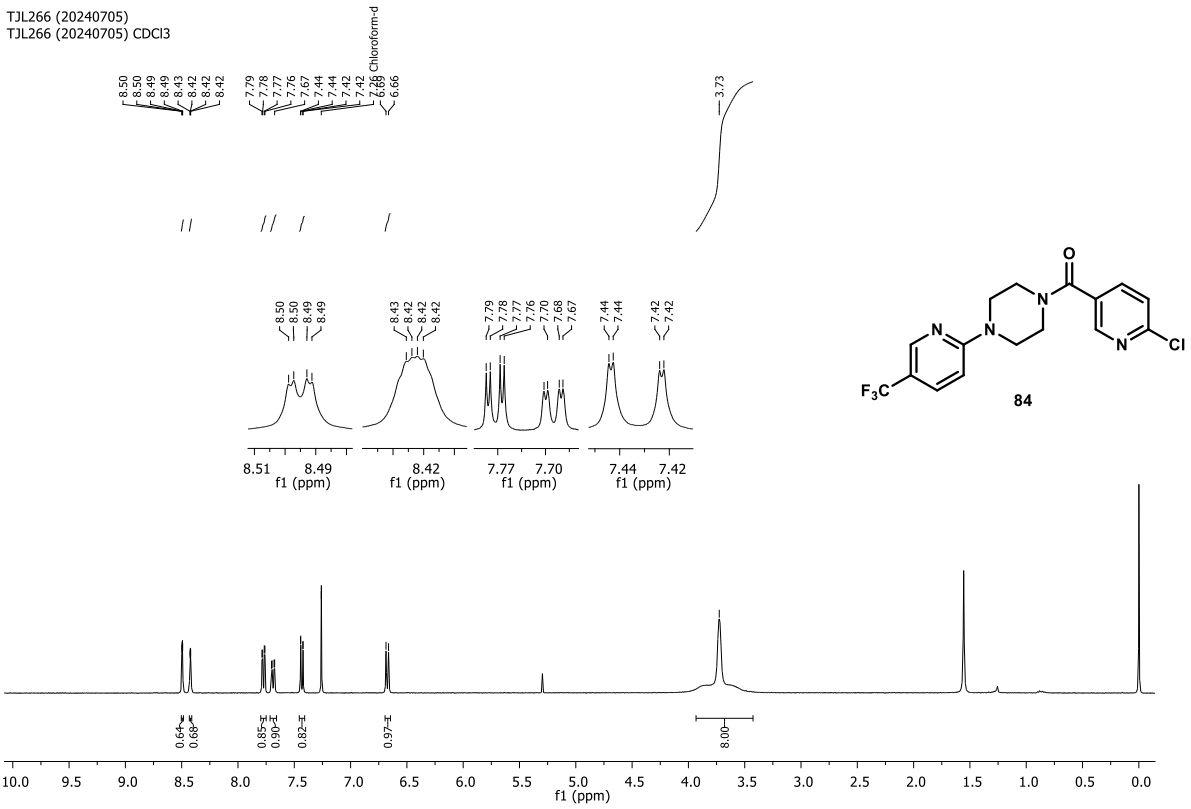
Anexo 132. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **82** (101 MHz, $CDCl_3$)



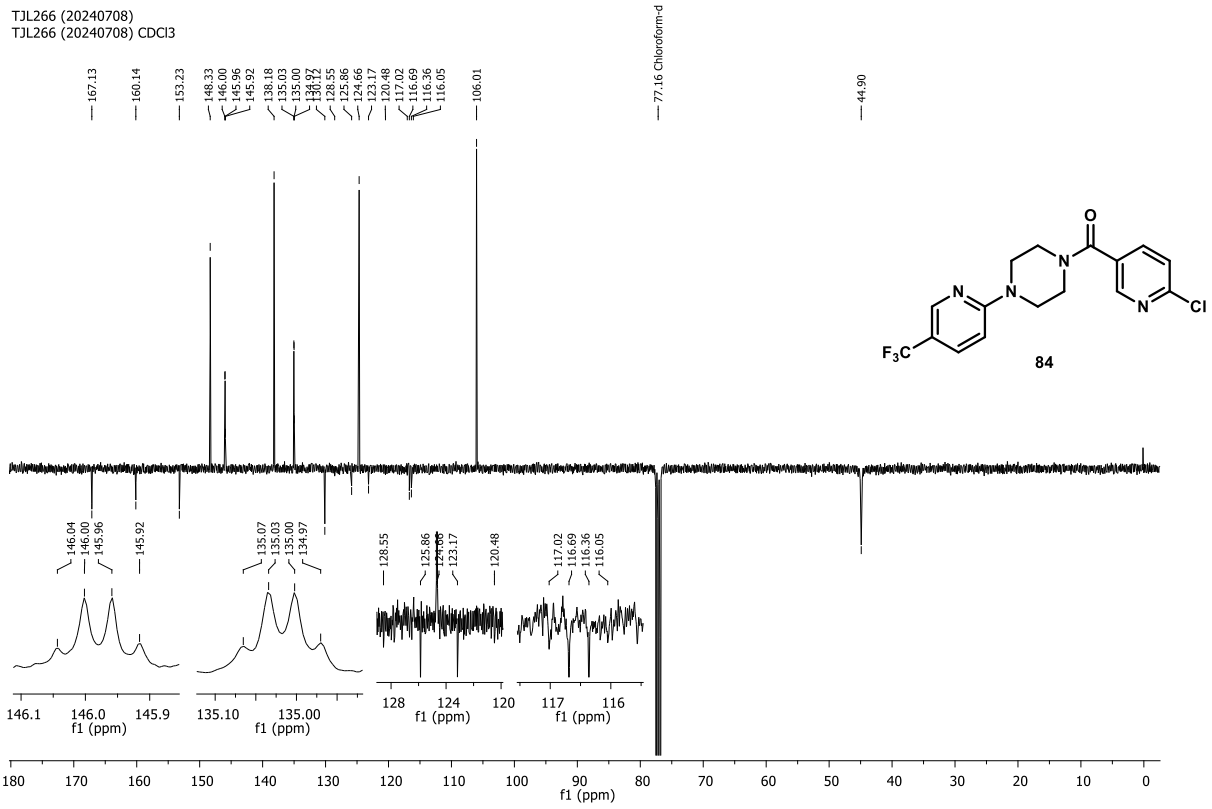
Anexo 133. Espectro de RMN de ^{1}H de **83** (400 MHz, $CDCl_3$)



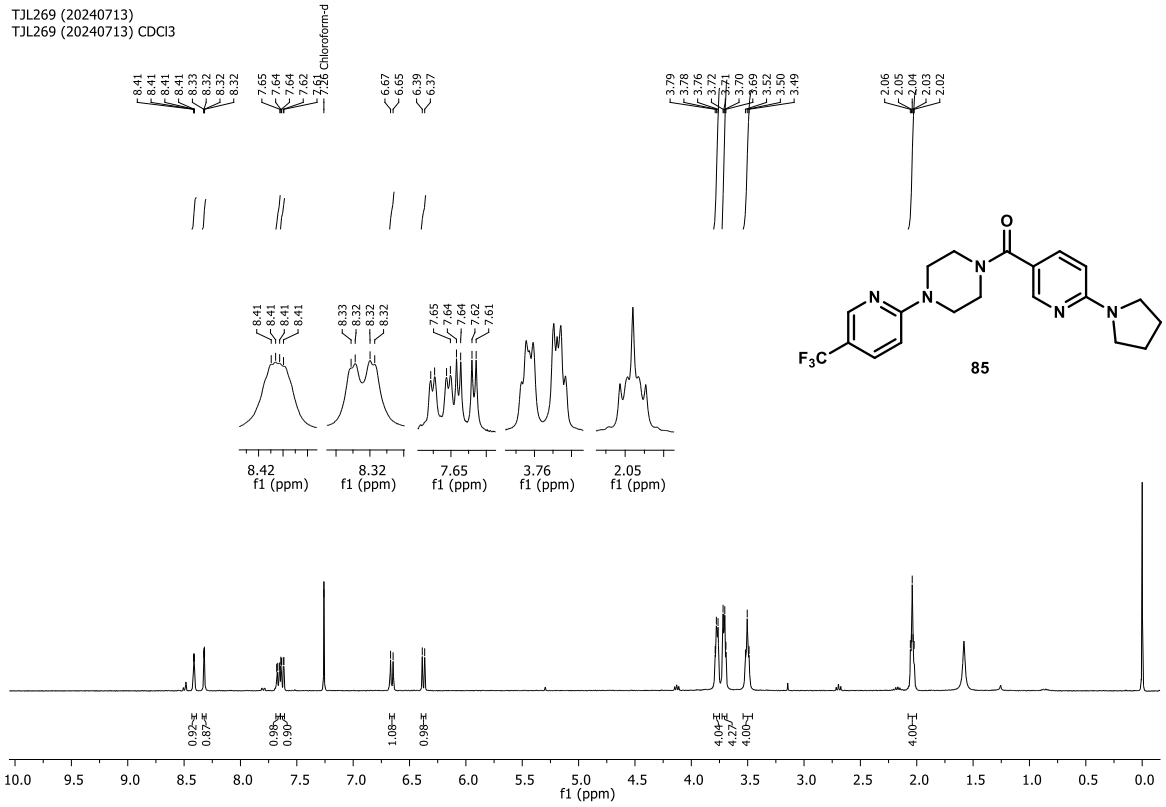
Anexo 134. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **83** (101 MHz, $CDCl_3$)



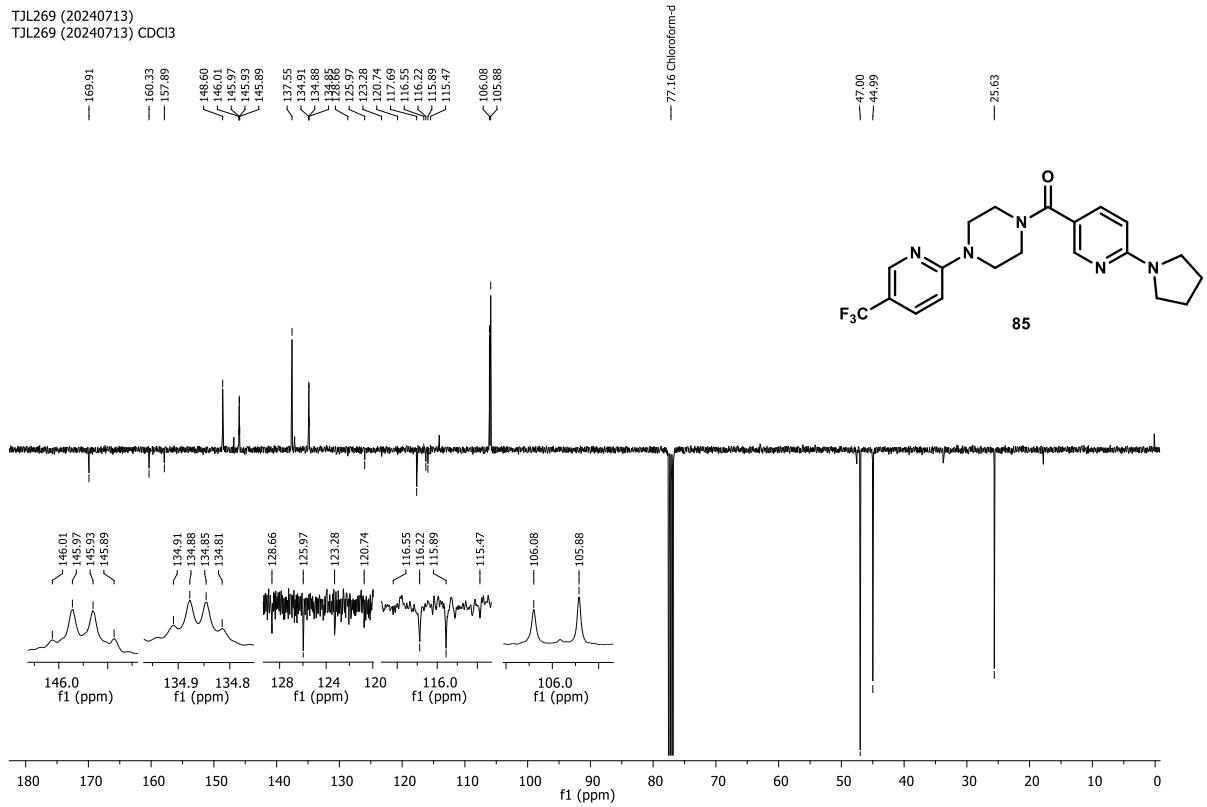
Anexo 135. Espectro de RMN de ^{1}H de **84** (400 MHz, $CDCl_3$)



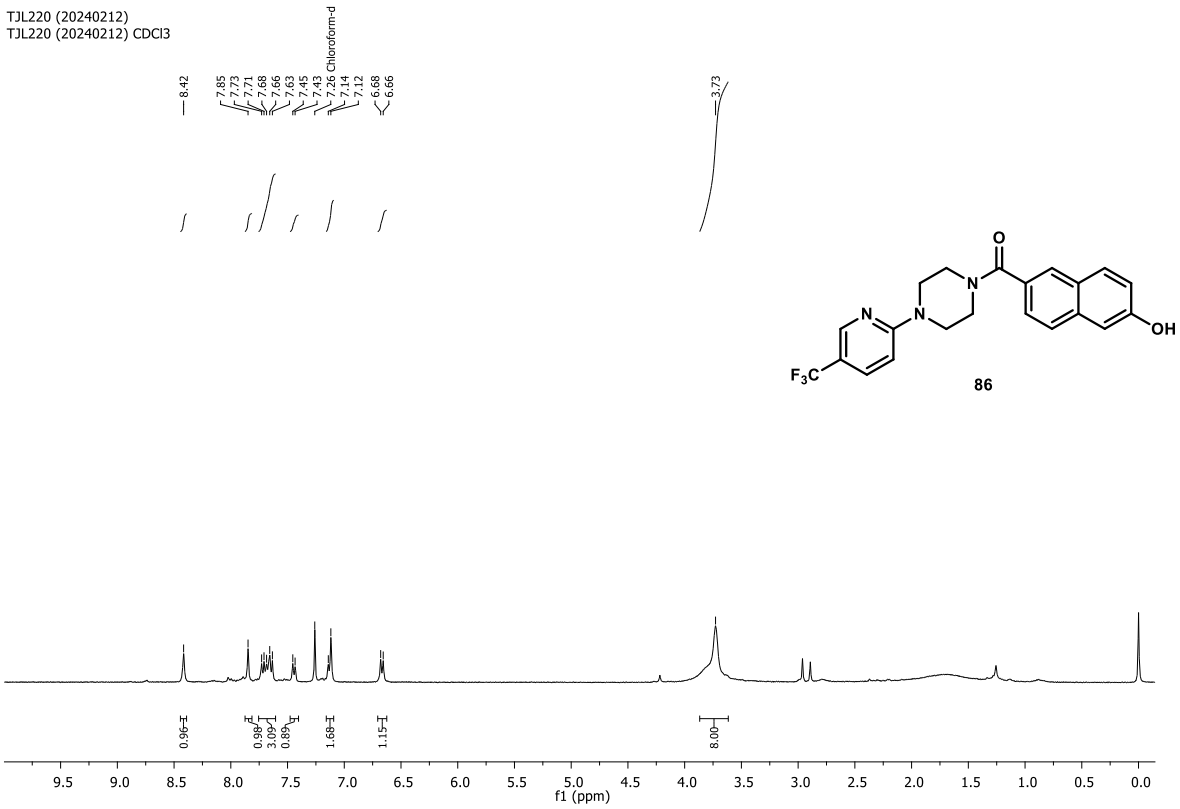
Anexo 136. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **84** (101 MHz, $CDCl_3$)



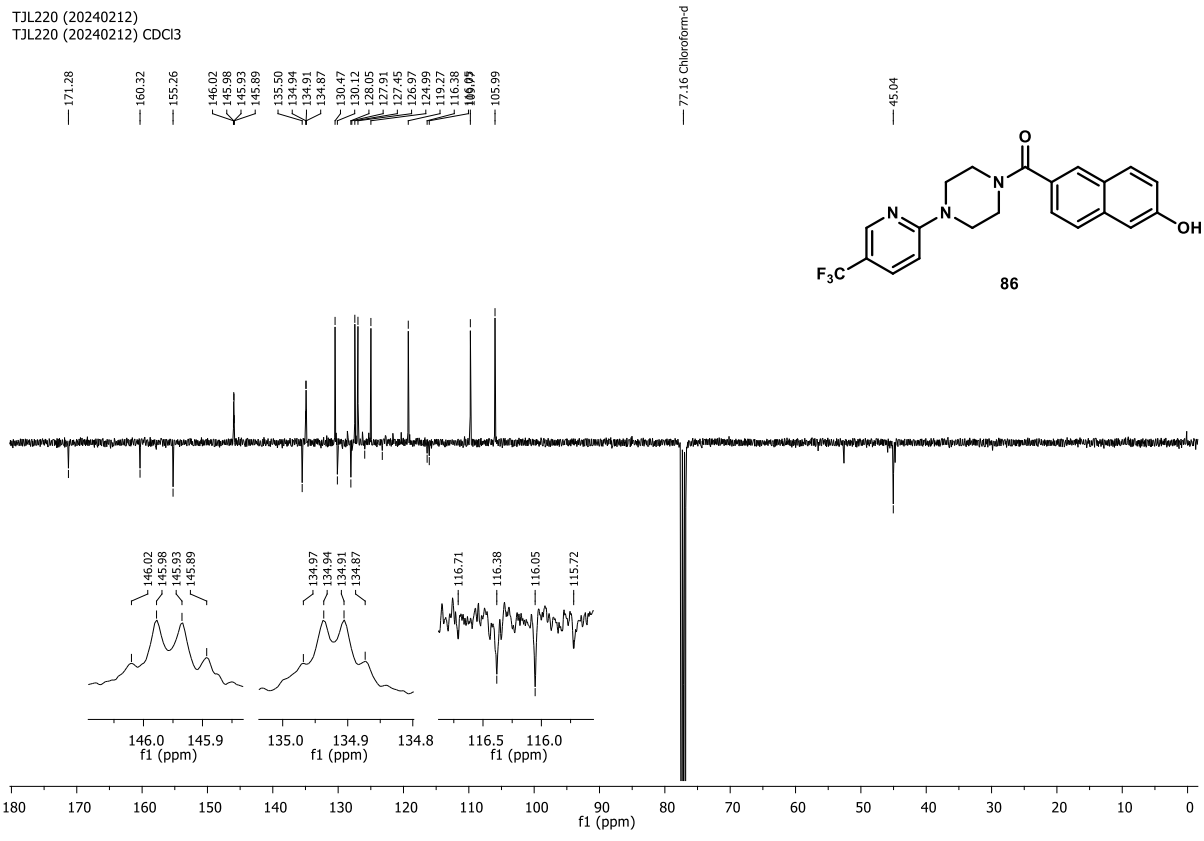
Anexo 137. Espectro de RMN de ^{1}H de **85** (400 MHz, $CDCl_3$)



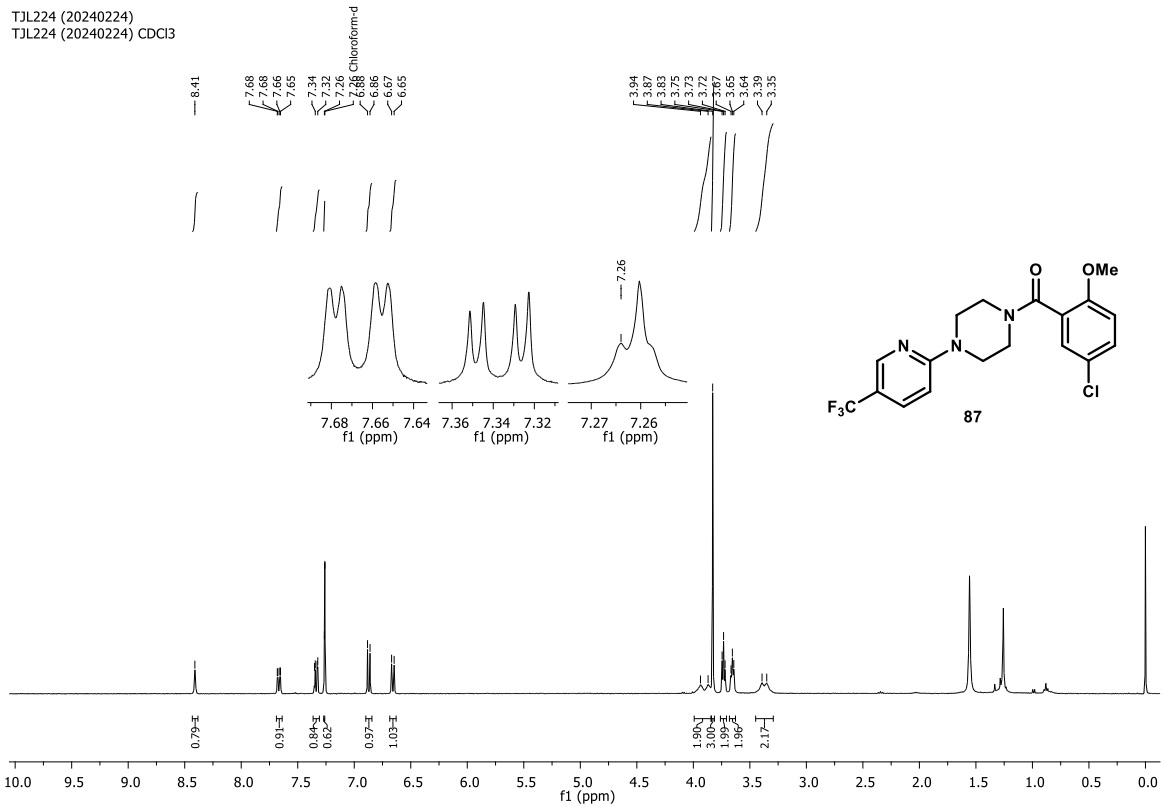
Anexo 138. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **85** (101 MHz, $CDCl_3$)



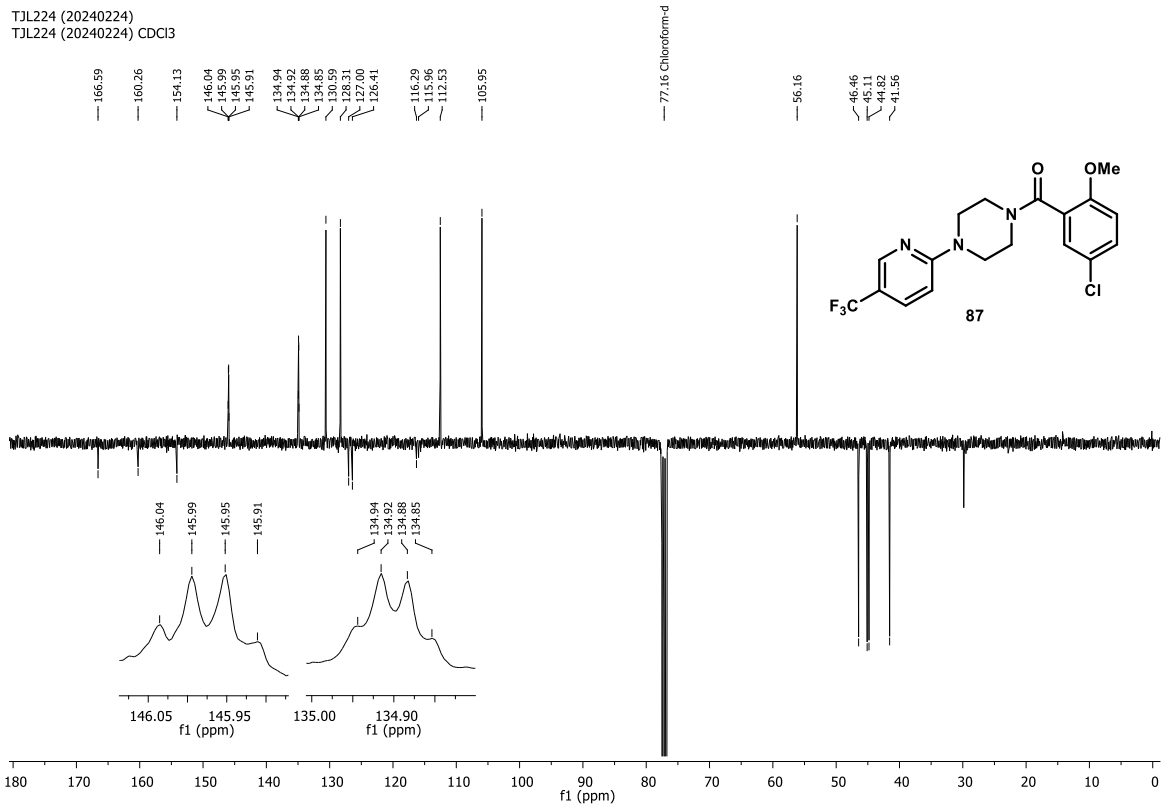
Anexo 139. Espectro de RMN de ^{1}H de **86** (400 MHz, $CDCl_3$)



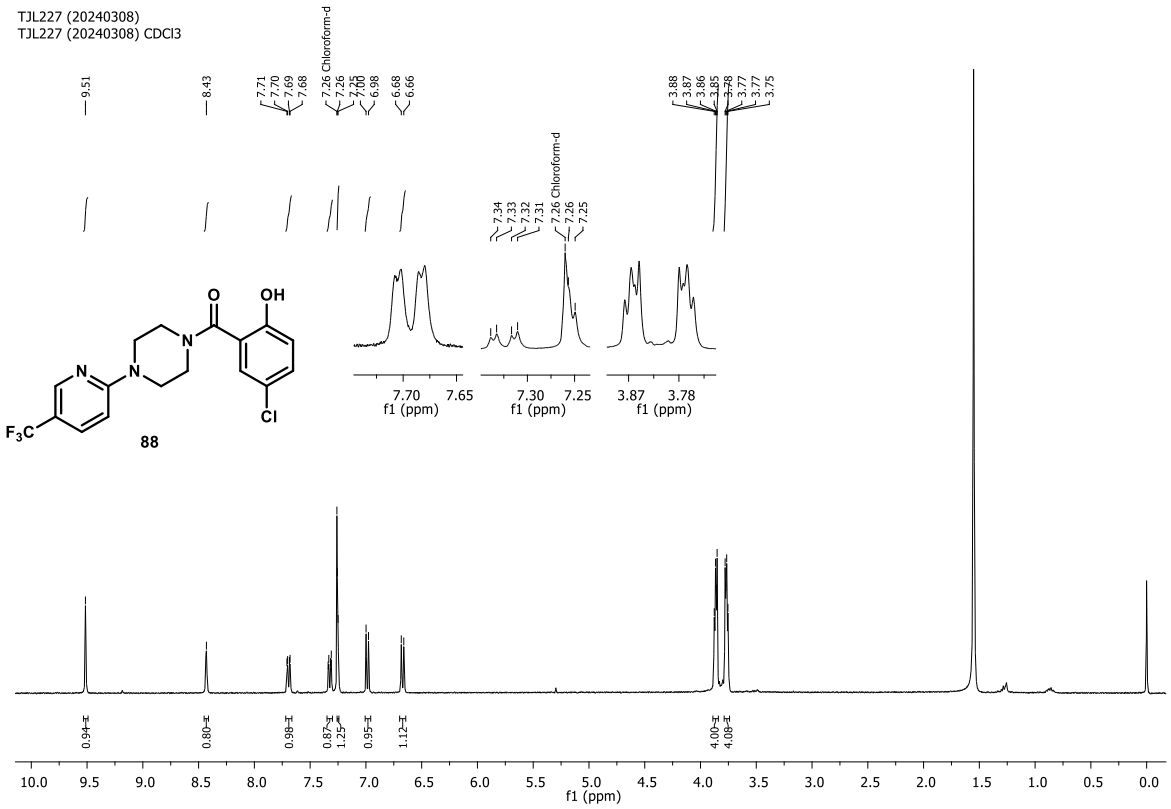
Anexo 140. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **86** (101 MHz, $CDCl_3$)



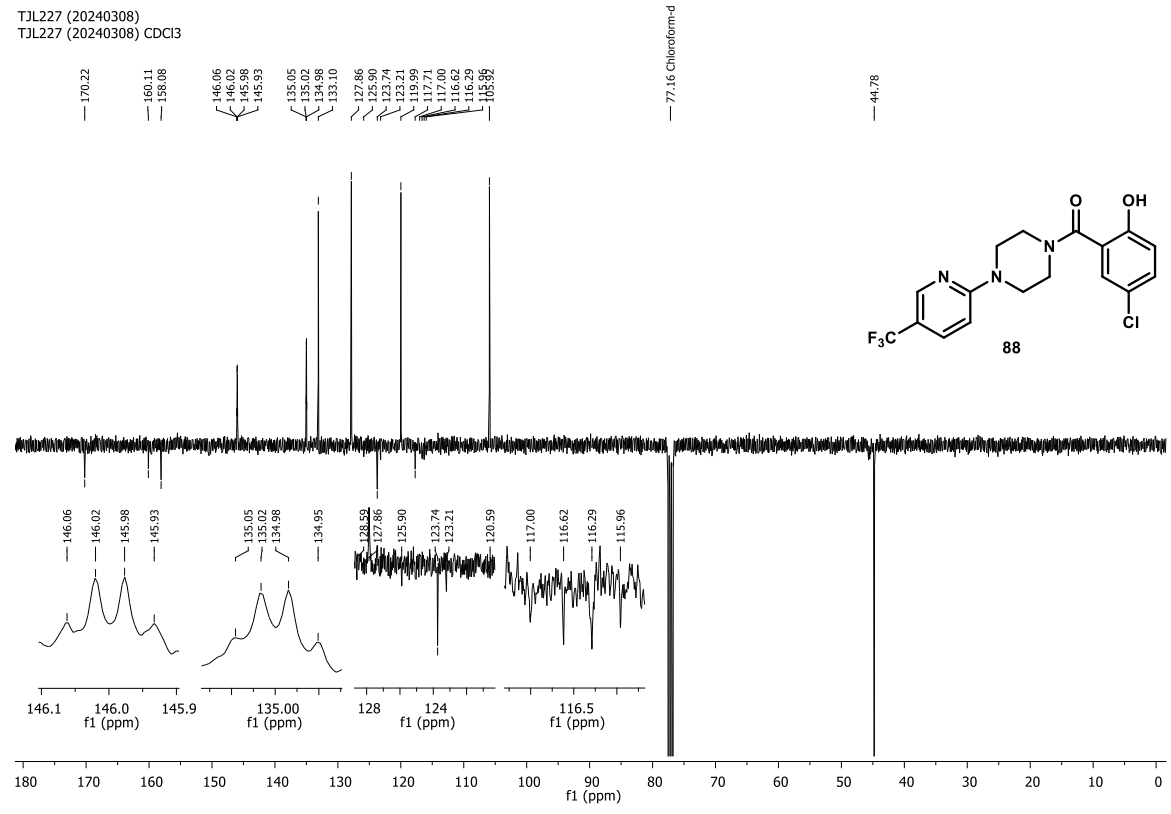
Anexo 141. Espectro de RMN de ^{1}H de **87** (400 MHz, $CDCl_3$)



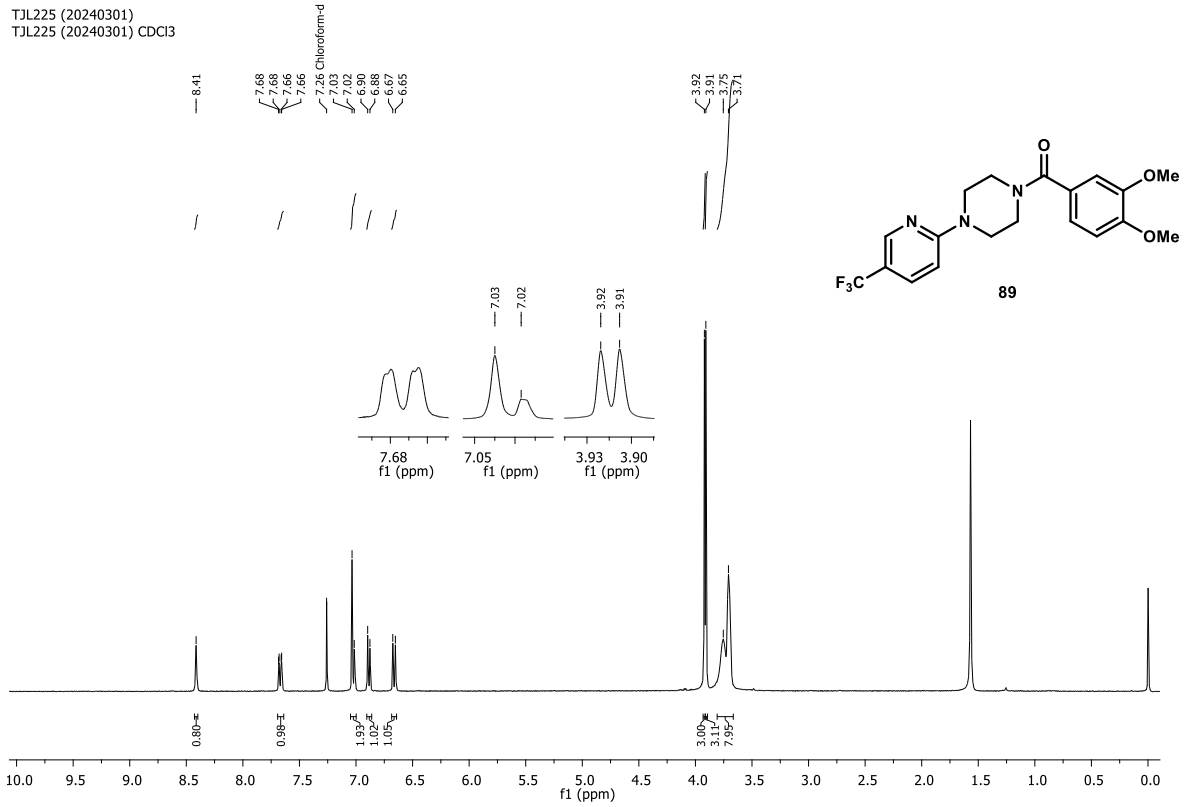
Anexo 142. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **87** (101 MHz, $CDCl_3$)



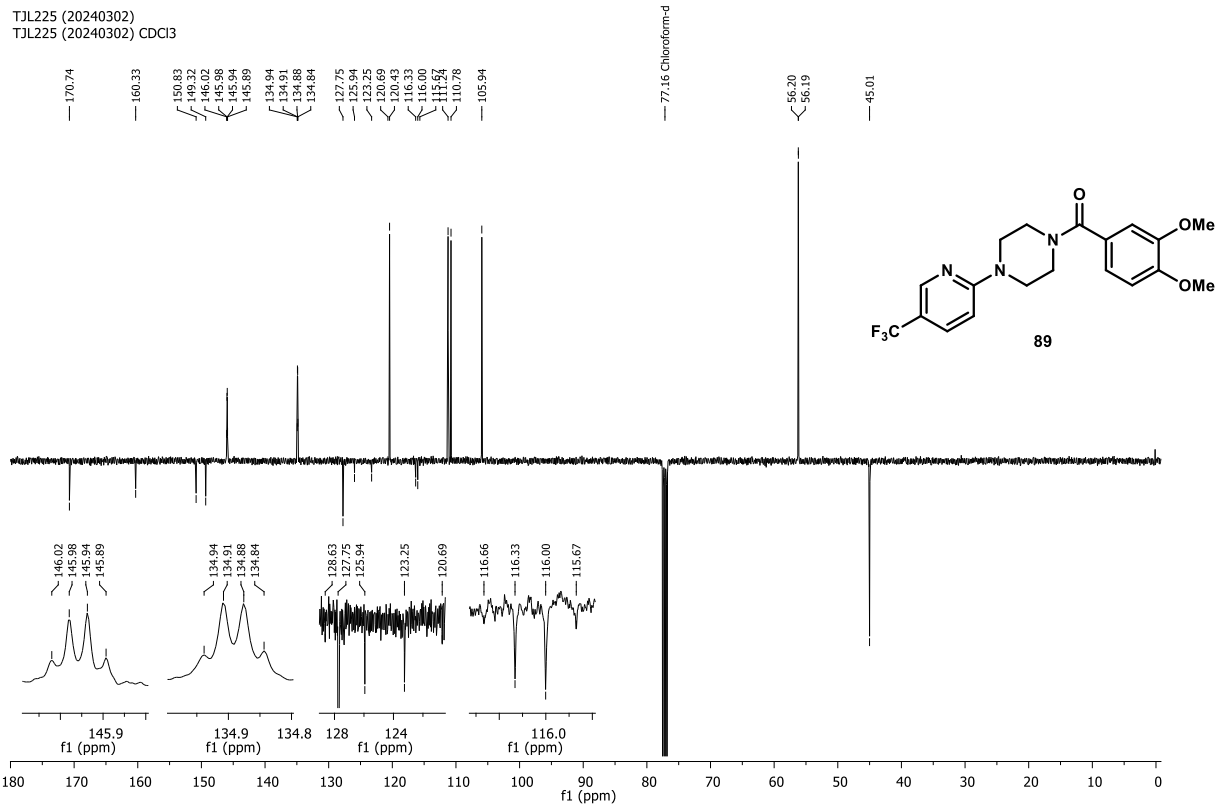
Anexo 143. Espectro de RMN de ^{1}H de **88** (400 MHz, $CDCl_3$)



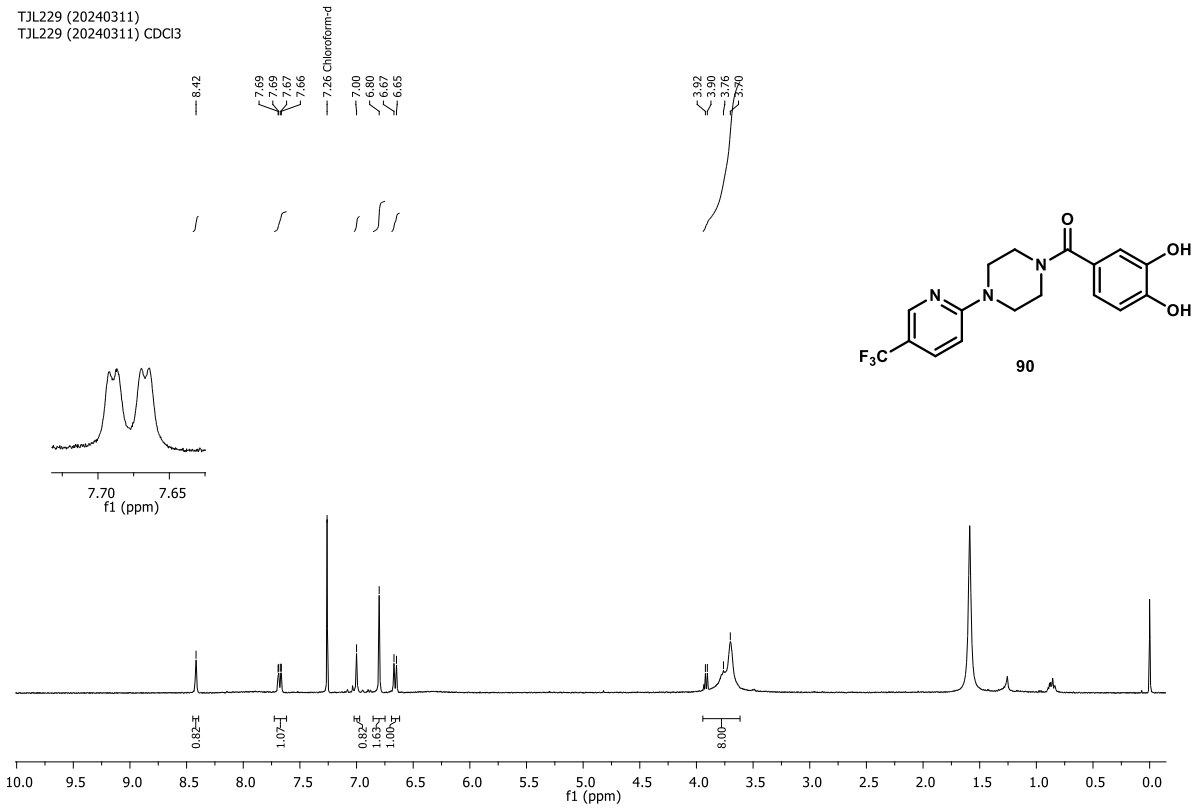
Anexo 144. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **88** (101 MHz, $CDCl_3$)



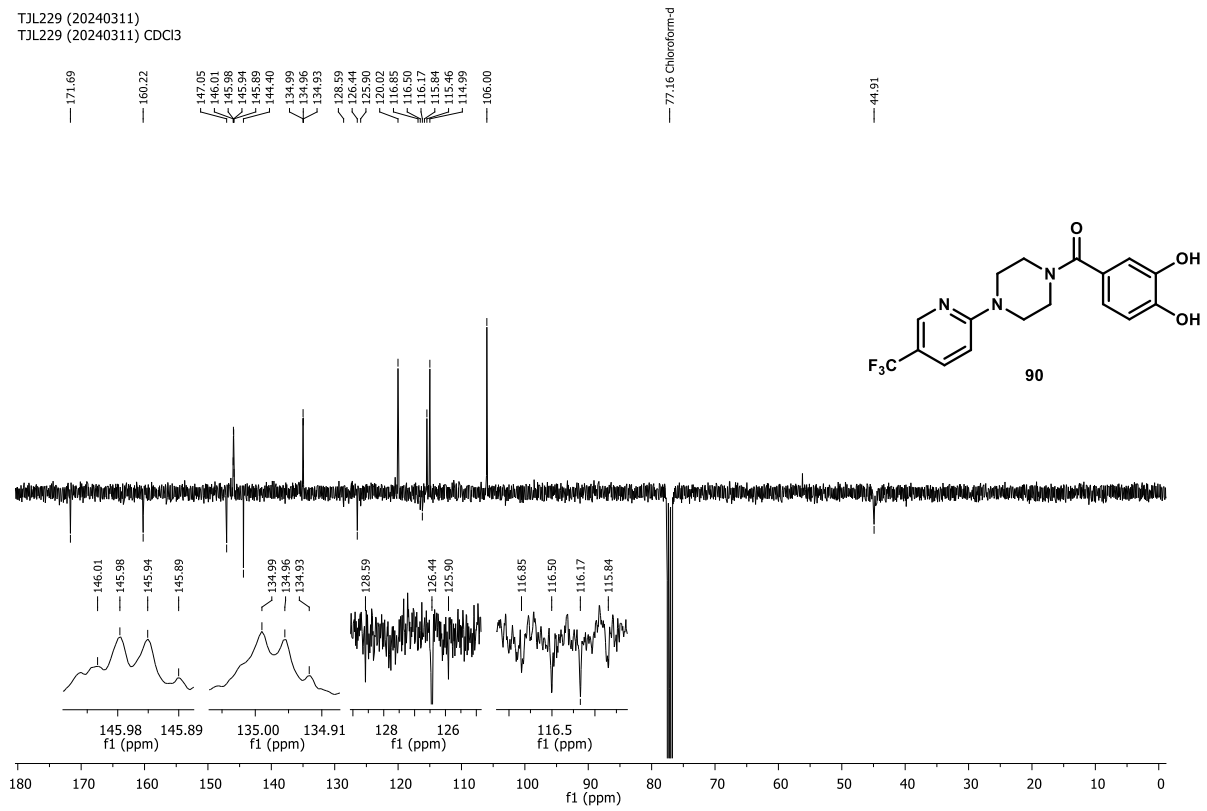
Anexo 145. Espectro de RMN de ^{1}H de **89** (400 MHz, $CDCl_3$)



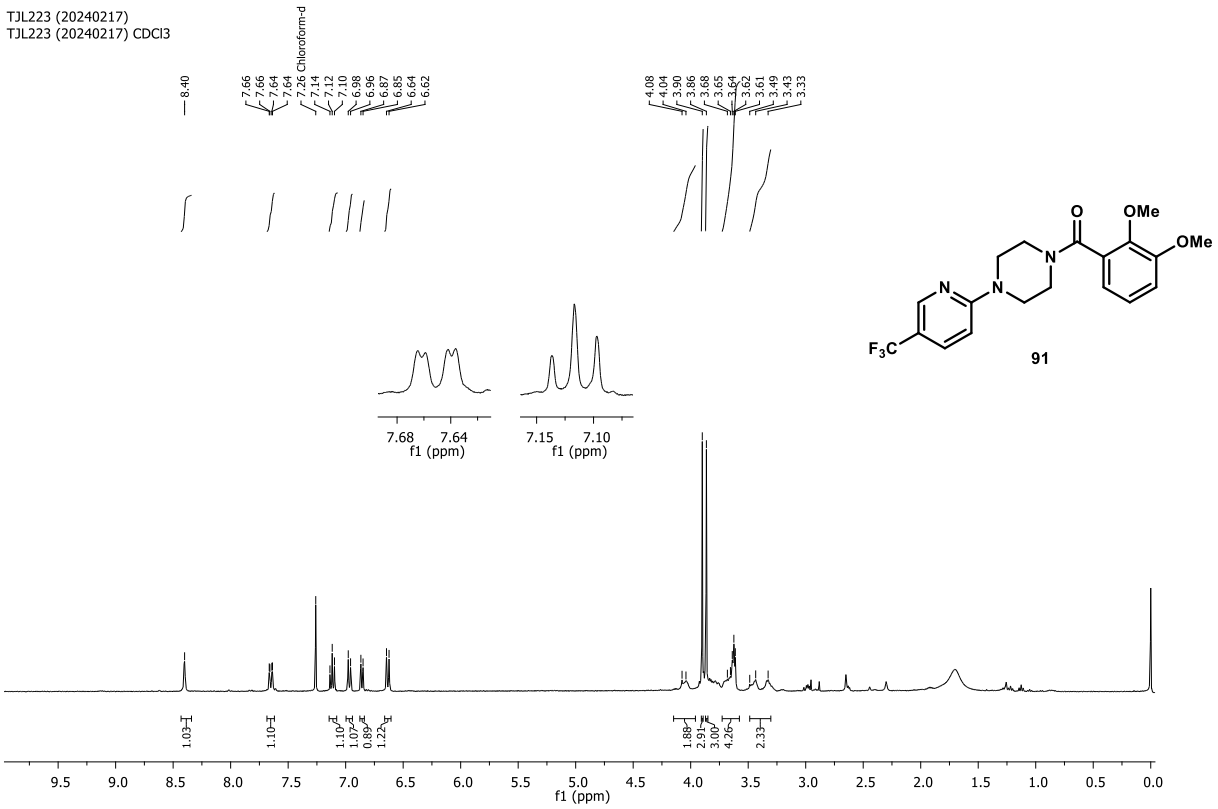
Anexo 146. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **89** (101 MHz, $CDCl_3$)



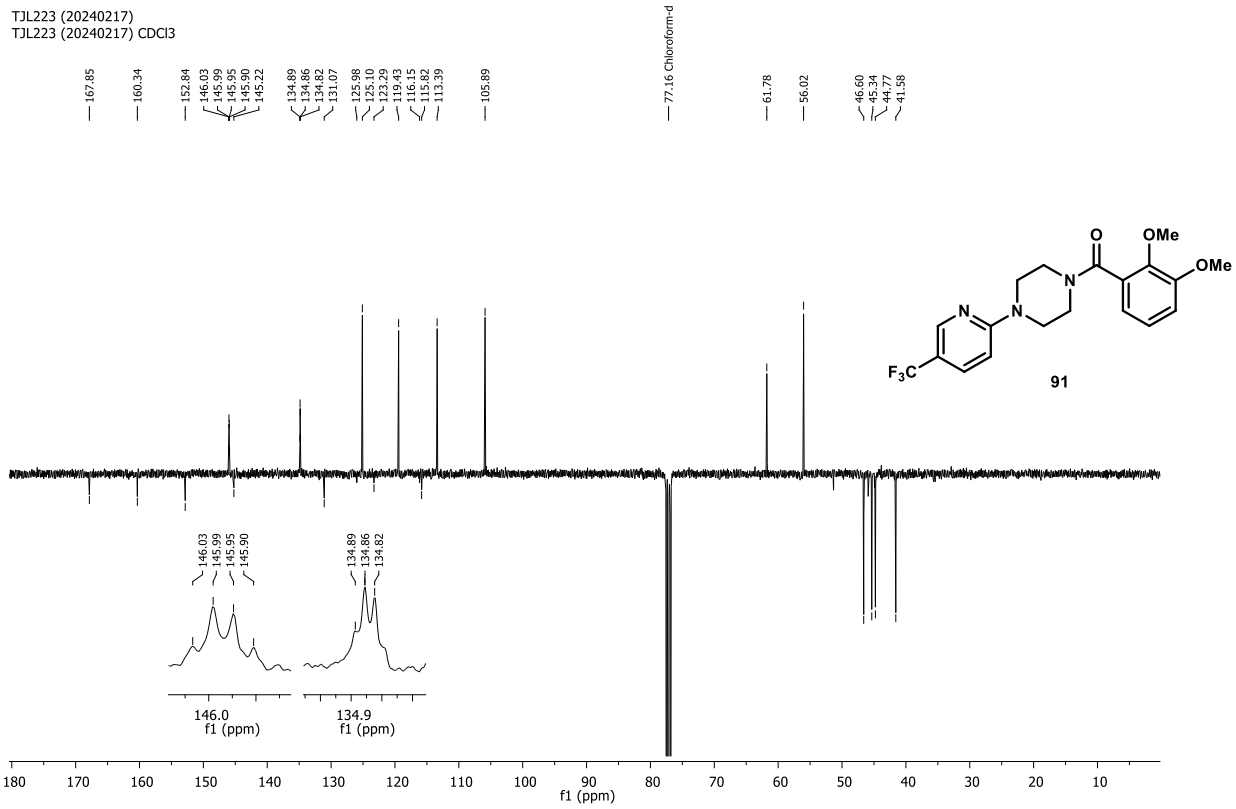
Anexo 147. Espectro de RMN de ^{1}H de **90** (400 MHz, $CDCl_3$)



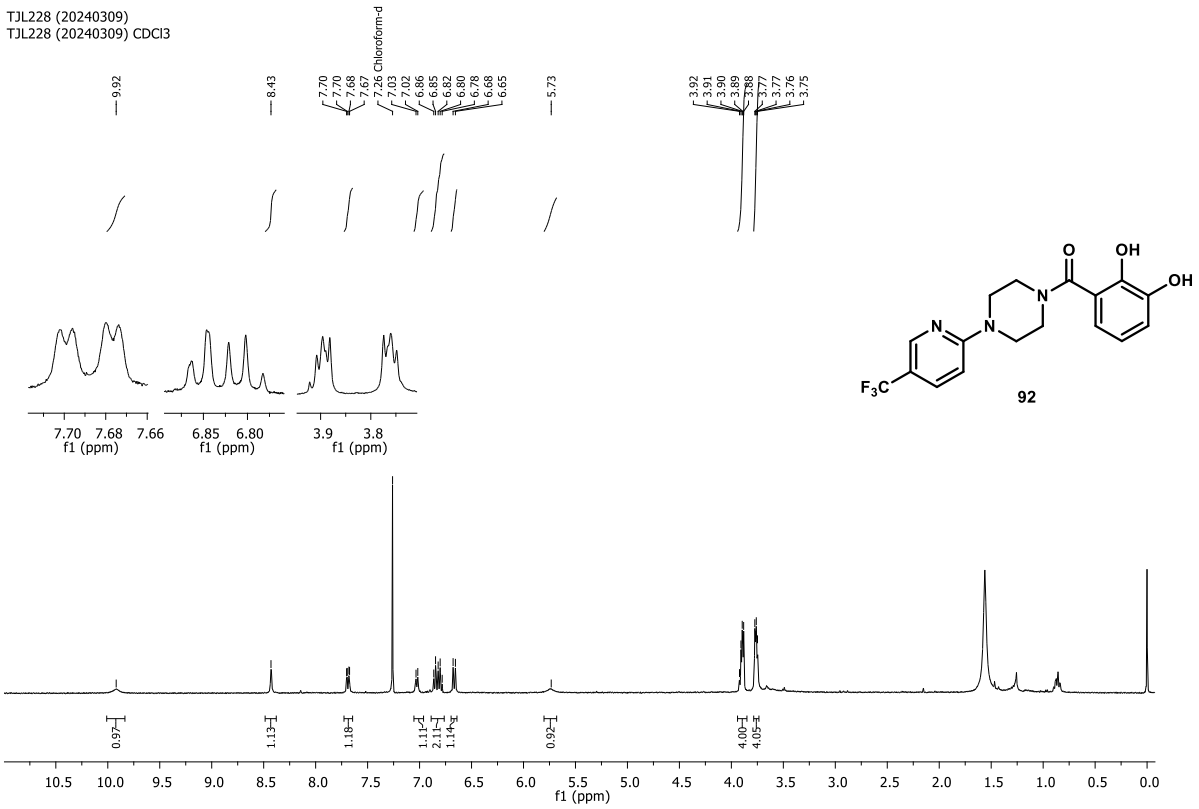
Anexo 148. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **90** (101 MHz, $CDCl_3$)



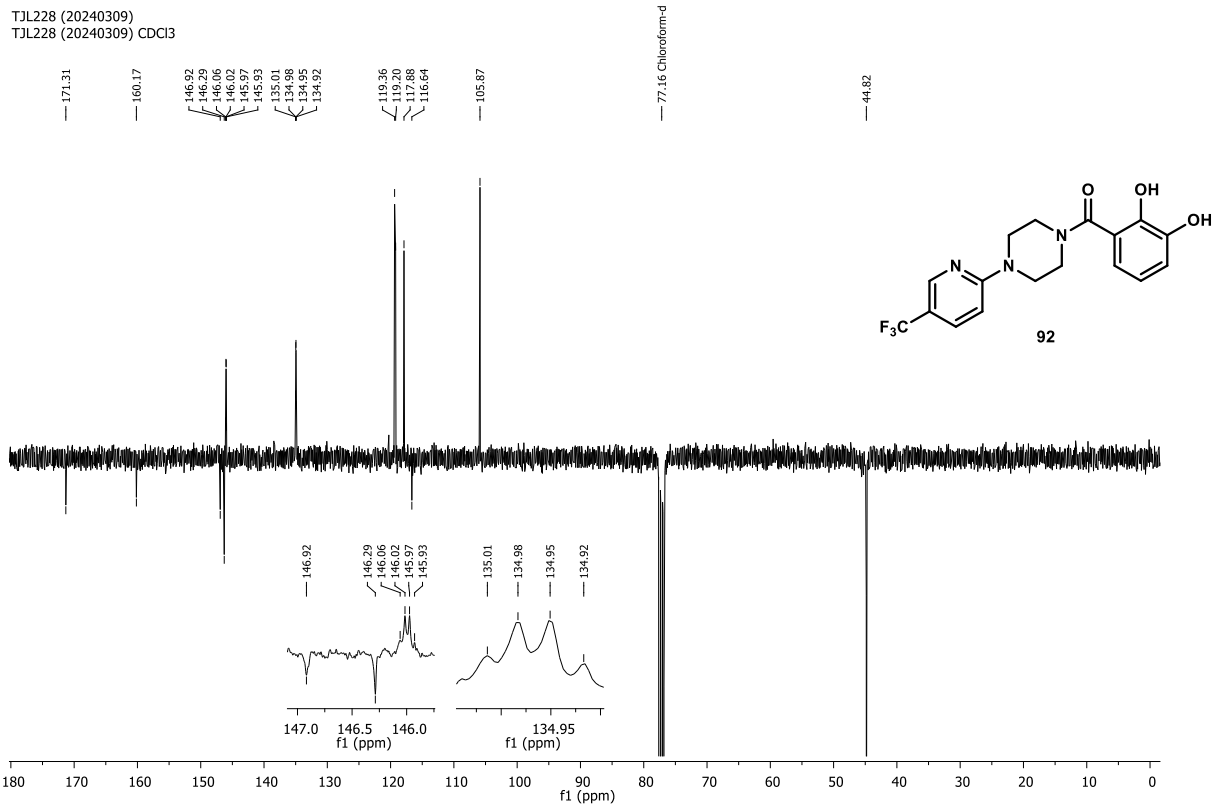
Anexo 149. Espectro de RMN de ^{1}H de **91** (400 MHz, $CDCl_3$)



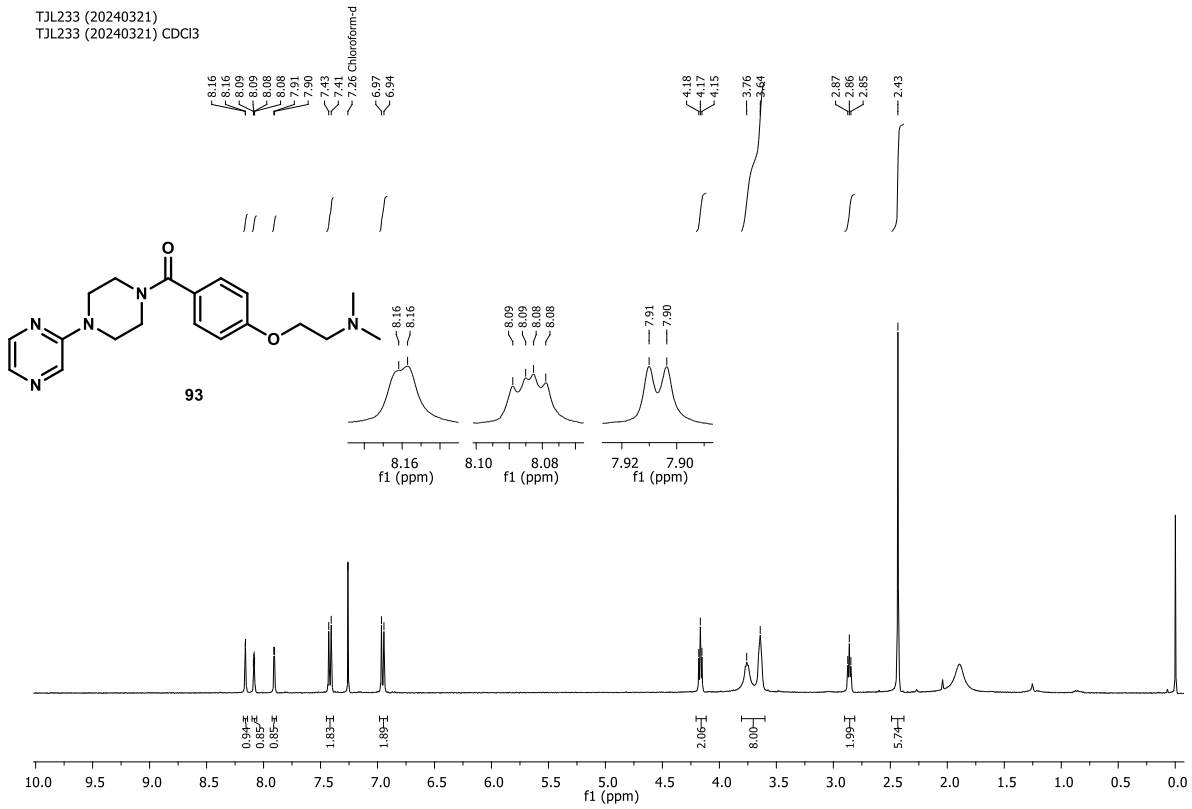
Anexo 150. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **91** (101 MHz, $CDCl_3$)



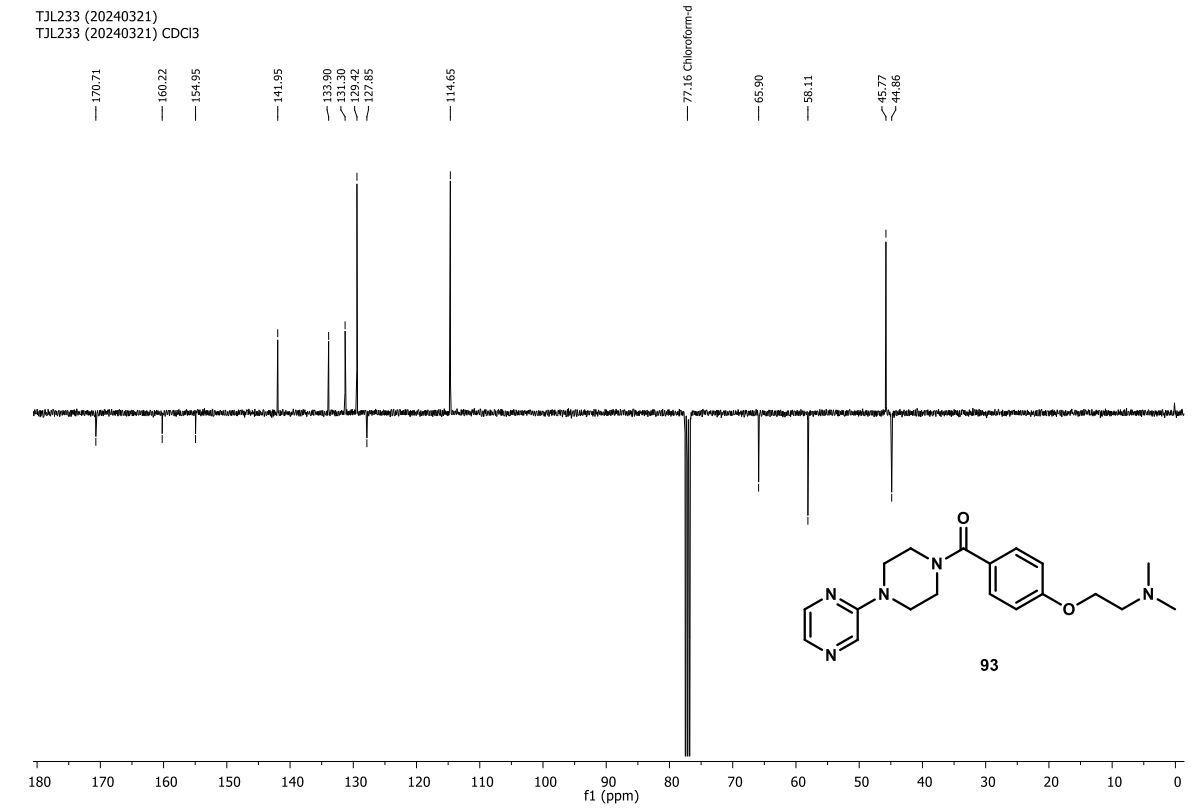
Anexo 151. Espectro de RMN de ^{1}H de **92** (400 MHz, $CDCl_3$)



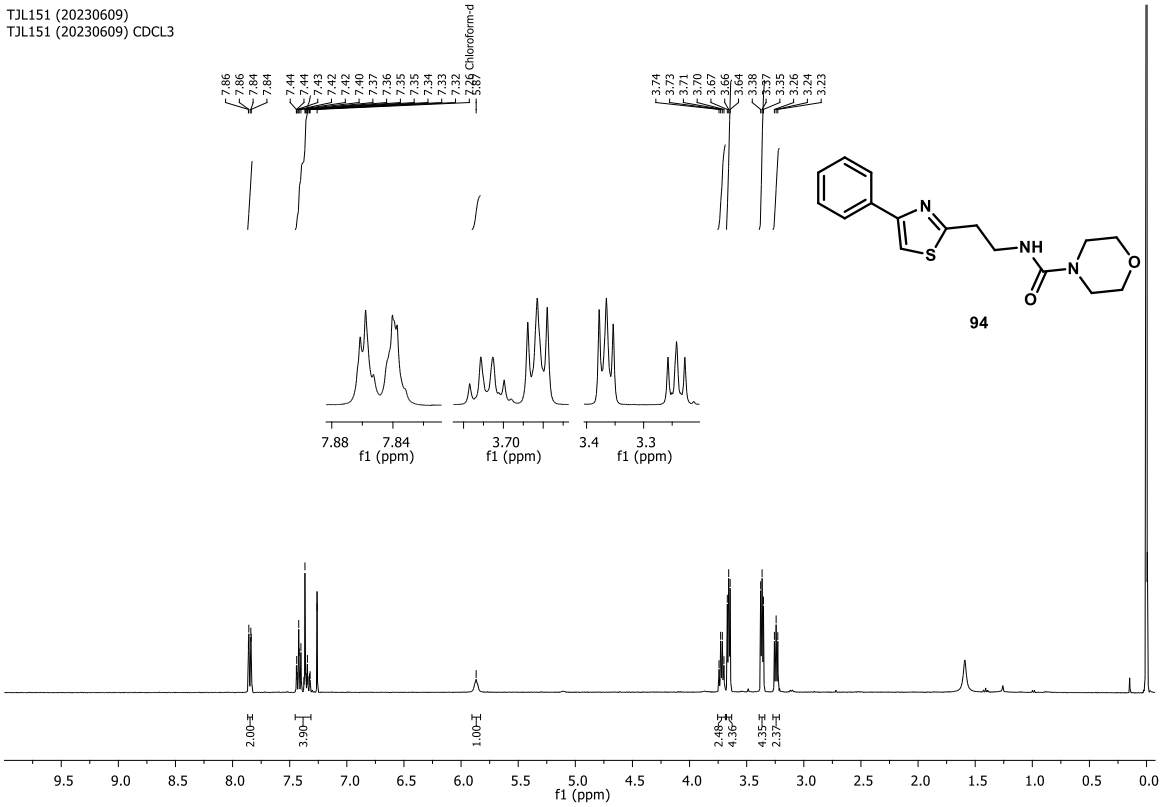
Anexo 152. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **92** (101 MHz, $CDCl_3$)



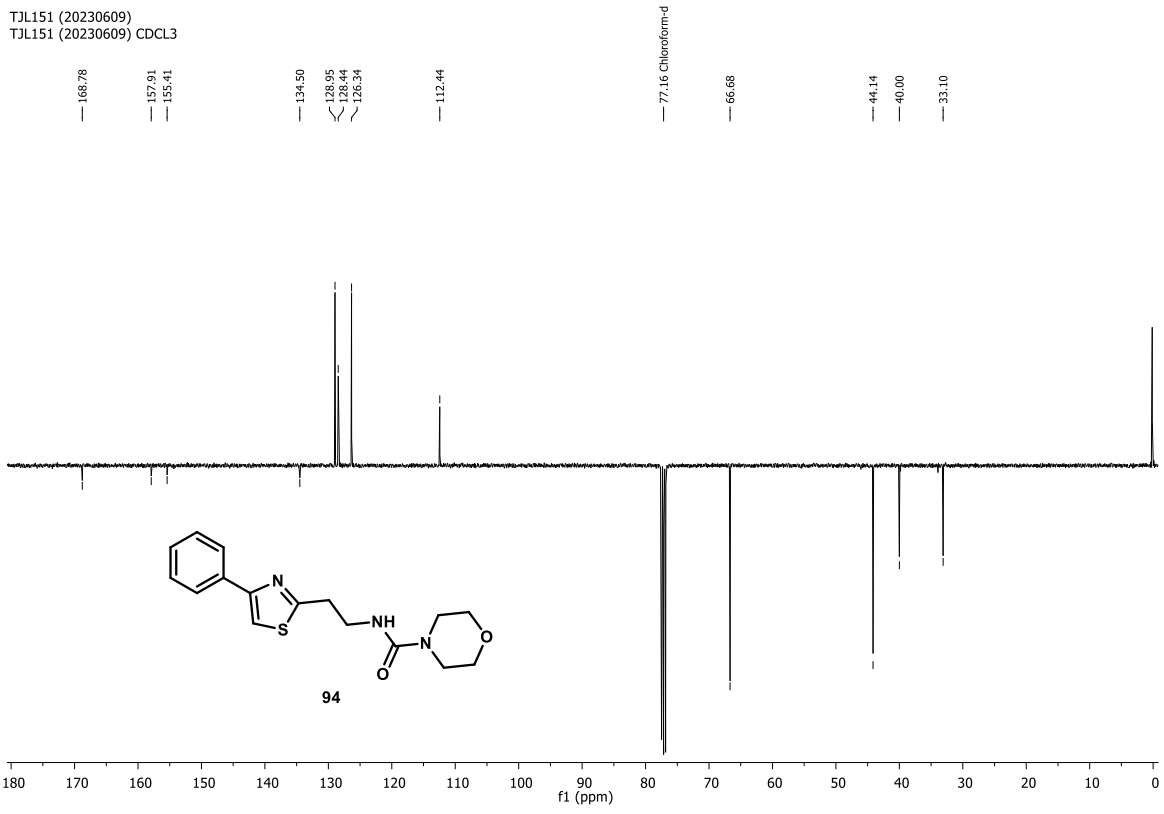
Anexo 153. Espectro de RMN de ^{1}H de **93** (400 MHz, $CDCl_3$)



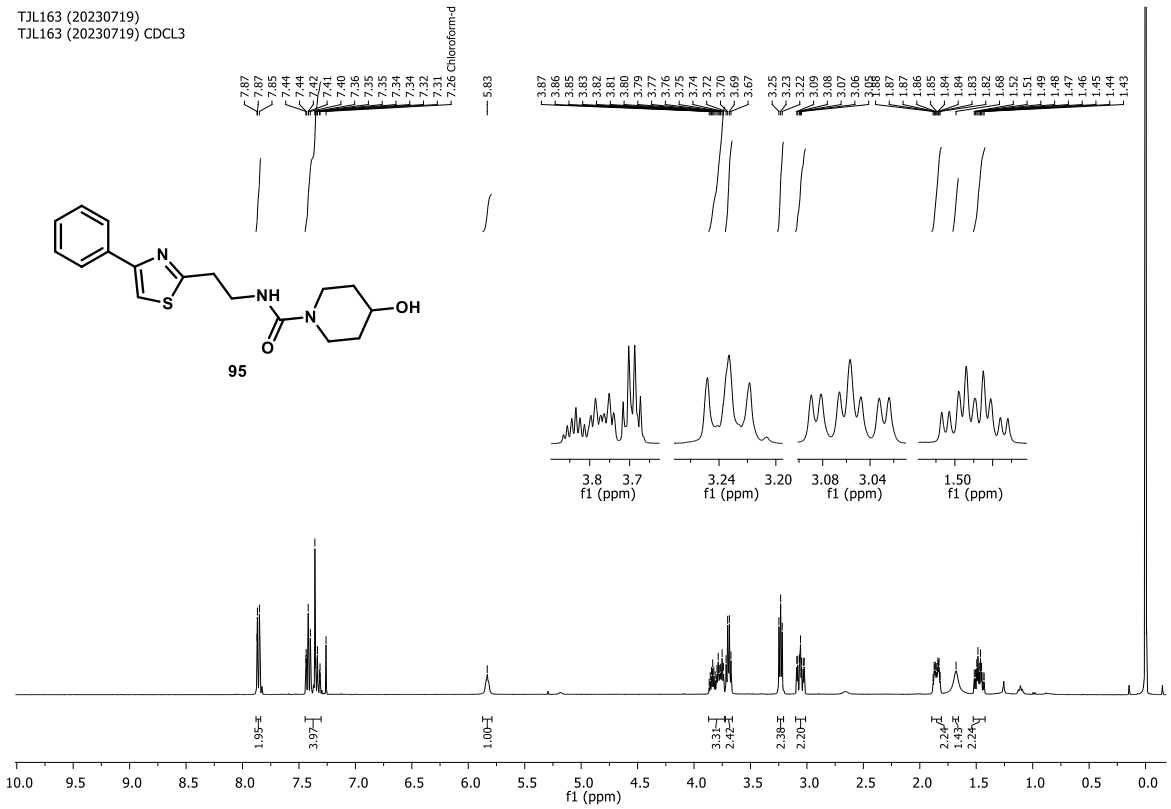
Anexo 154. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **93** (101 MHz, $CDCl_3$)



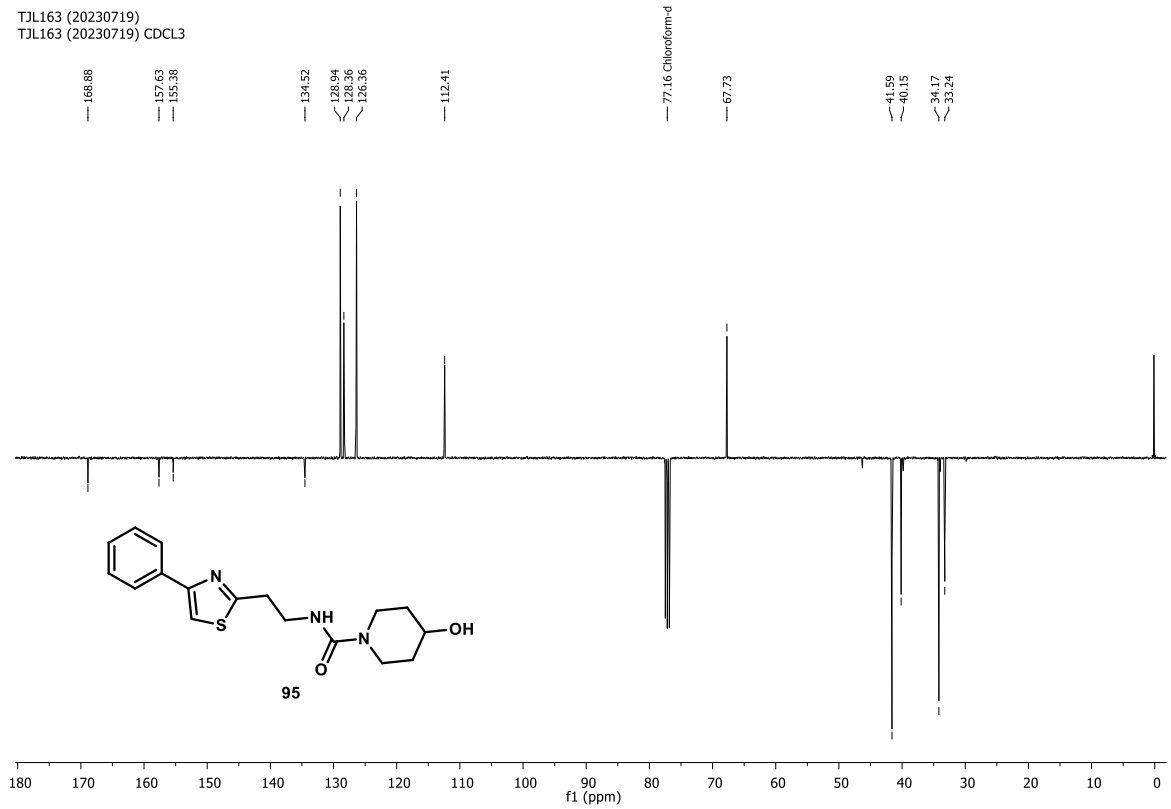
Anexo 155. Espectro de RMN de ^{1}H de **94** (400 MHz, $CDCl_3$)



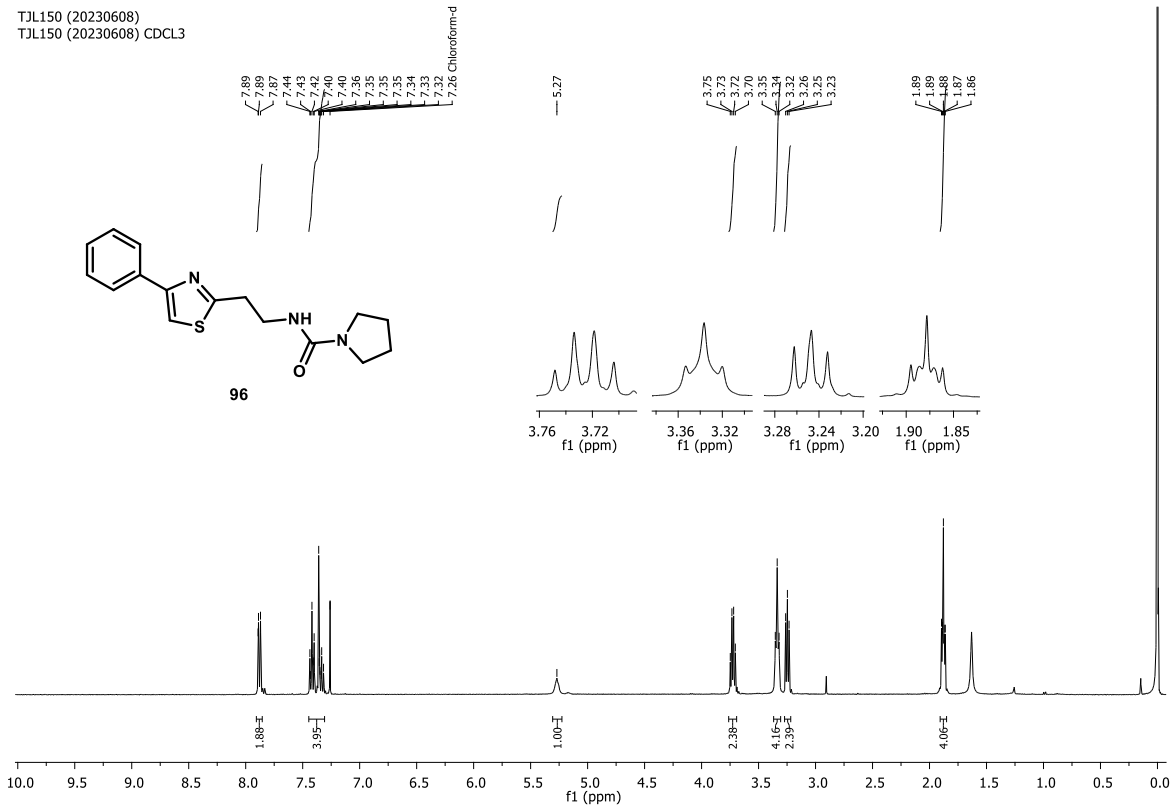
Anexo 156. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **94** (101 MHz, $CDCl_3$)



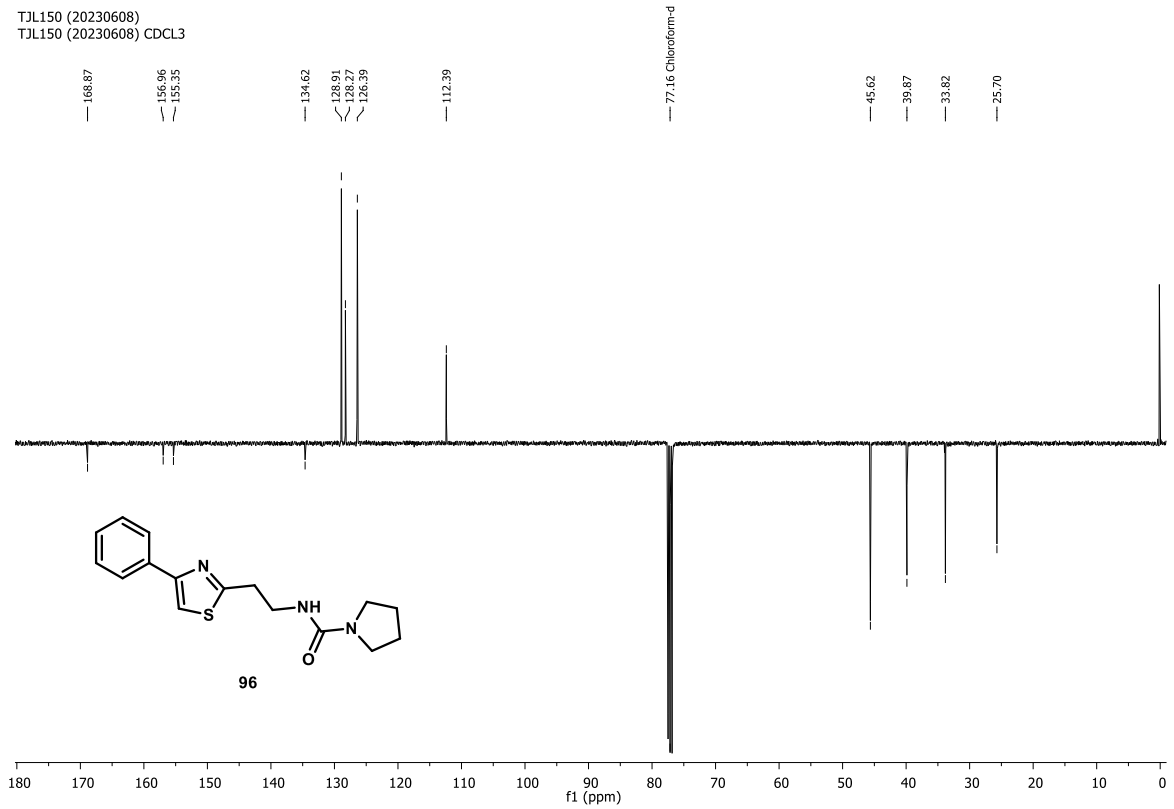
Anexo 157. Espectro de RMN de ^{1}H de **95** (400 MHz, $CDCl_3$)



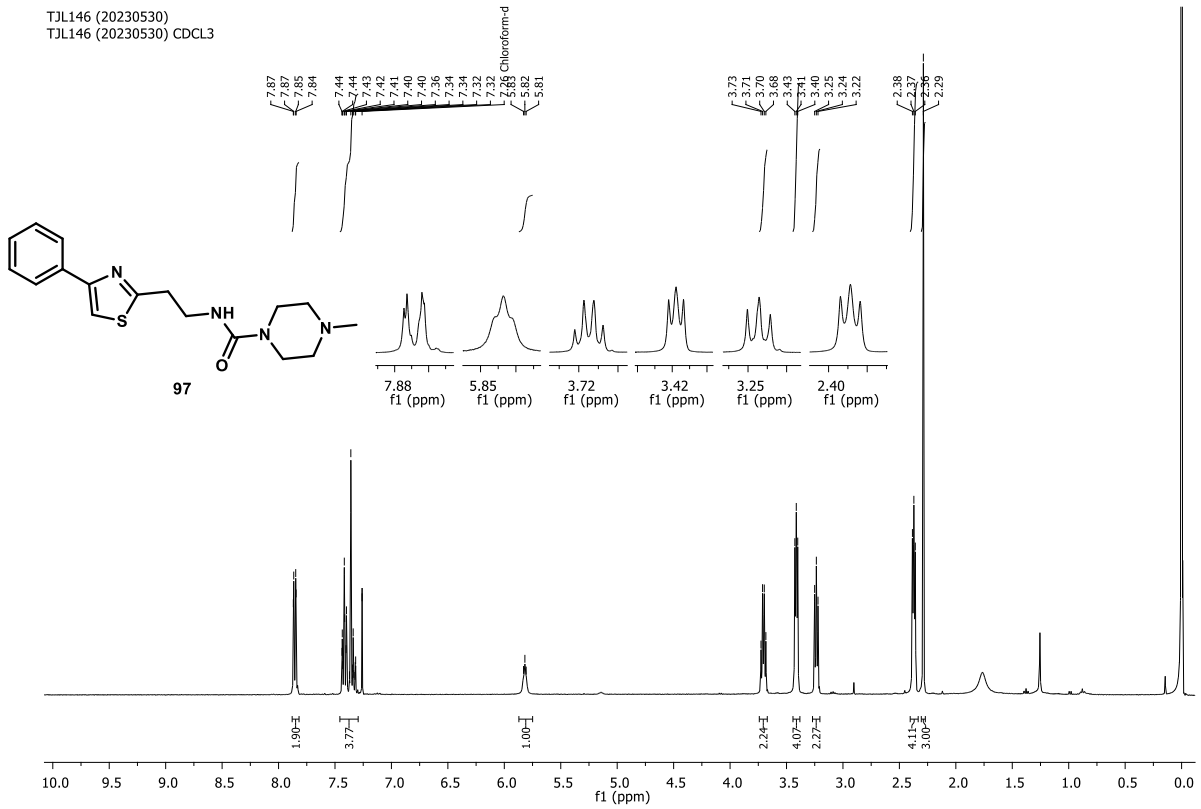
Anexo 158. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **95** (101 MHz, $CDCl_3$)



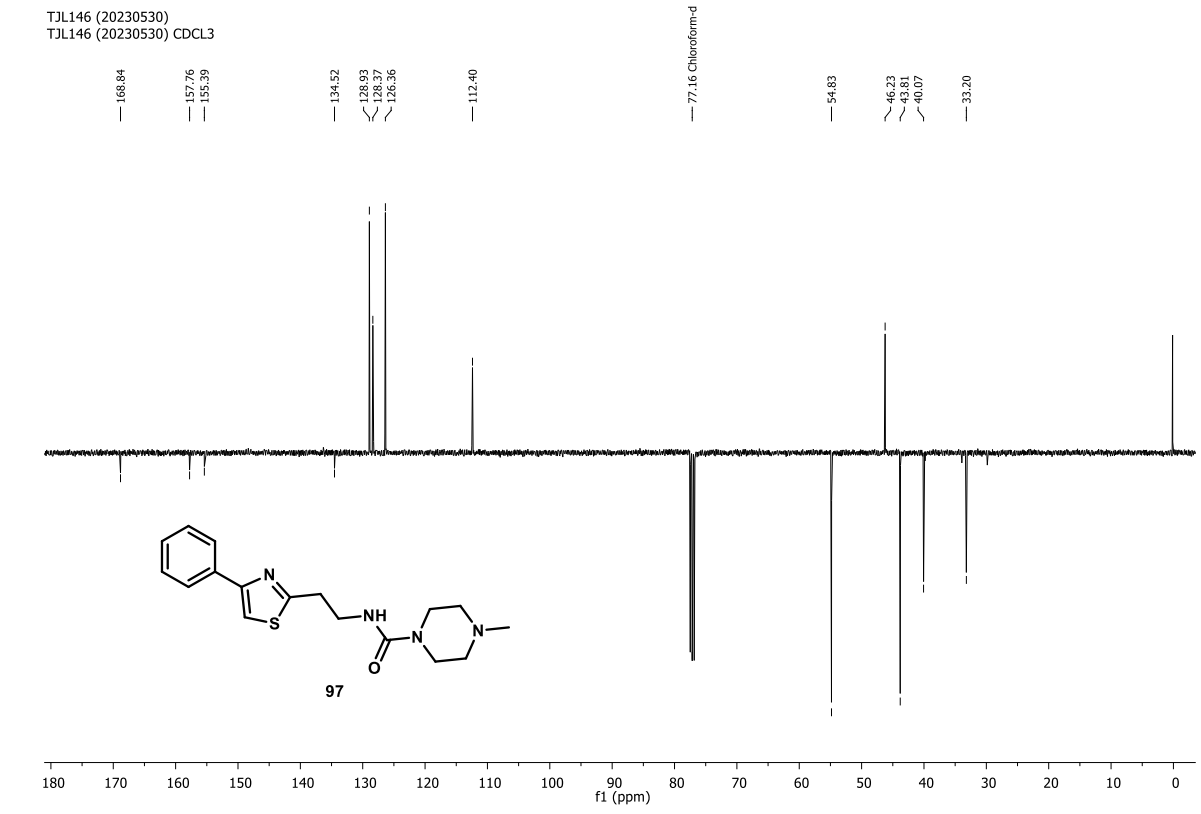
Anexo 159. Espectro de RMN de ^{1}H de **96** (400 MHz, $CDCl_3$)



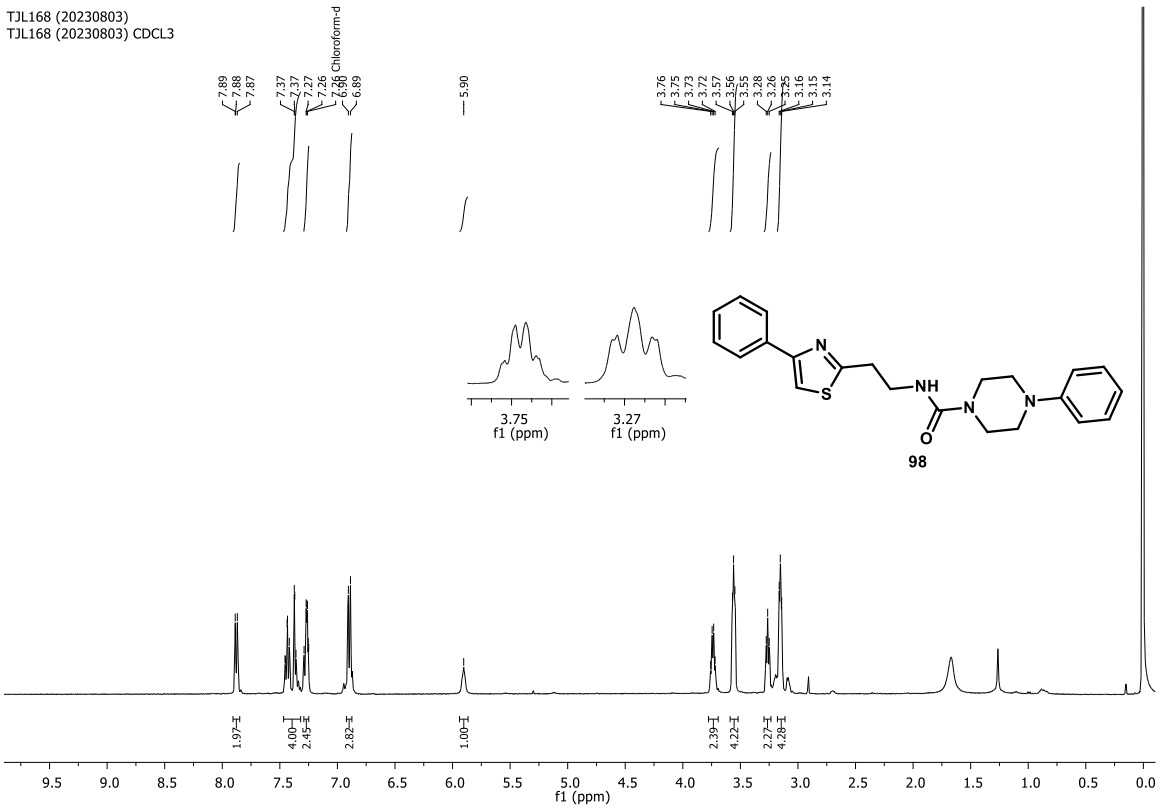
Anexo 160. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **96** (101 MHz, $CDCl_3$)



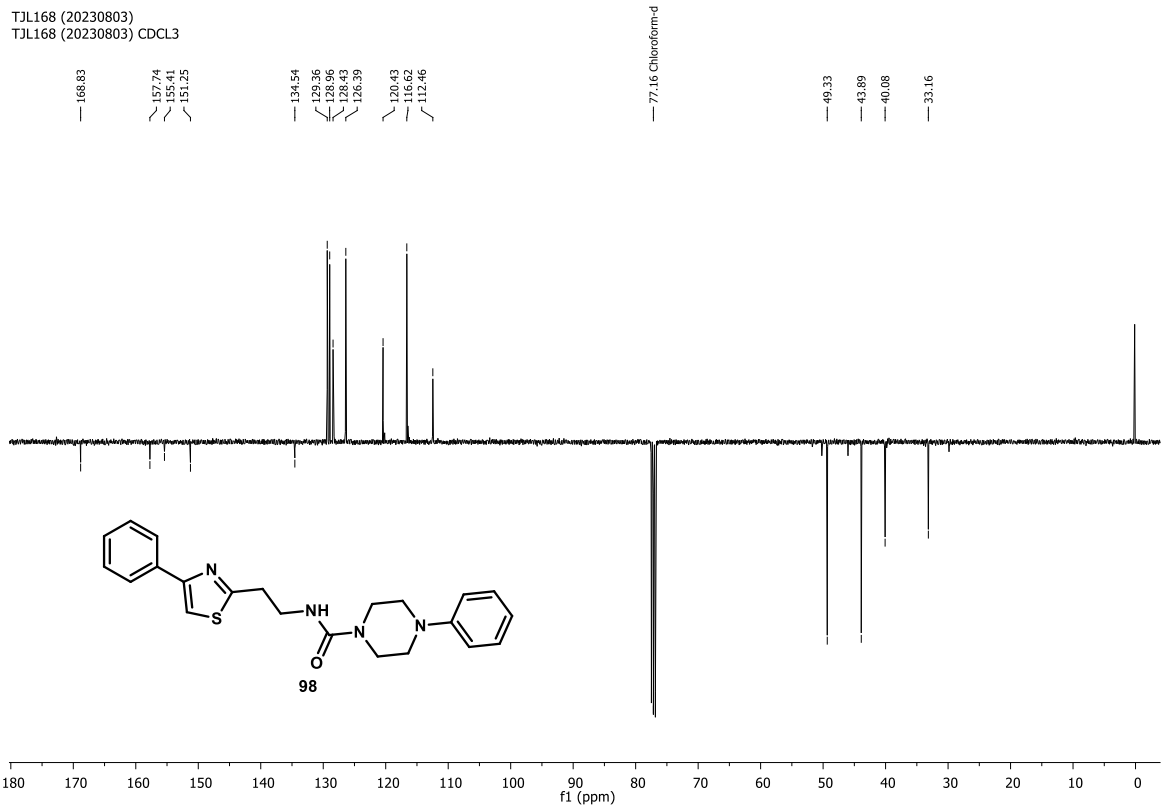
Anexo 161. Espectro de RMN de ^{1}H de **97** (400 MHz, $CDCl_3$)



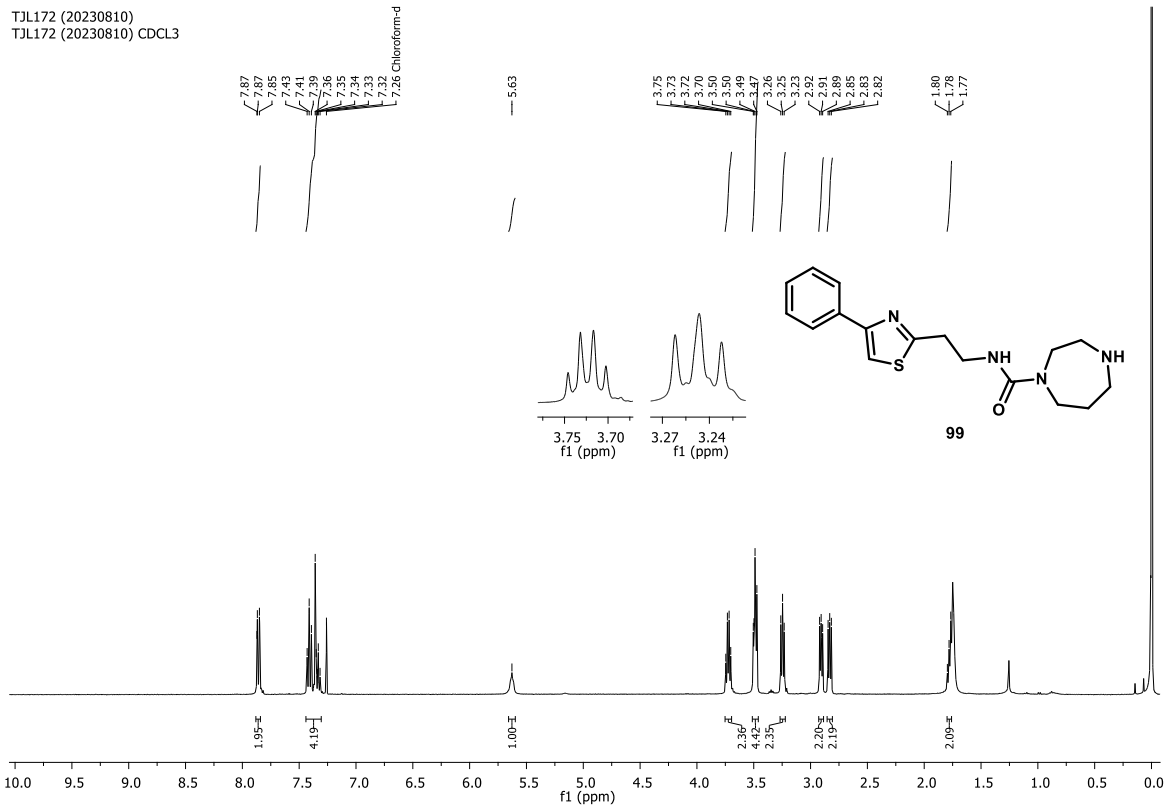
Anexo 162. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **97** (101 MHz, $CDCl_3$)



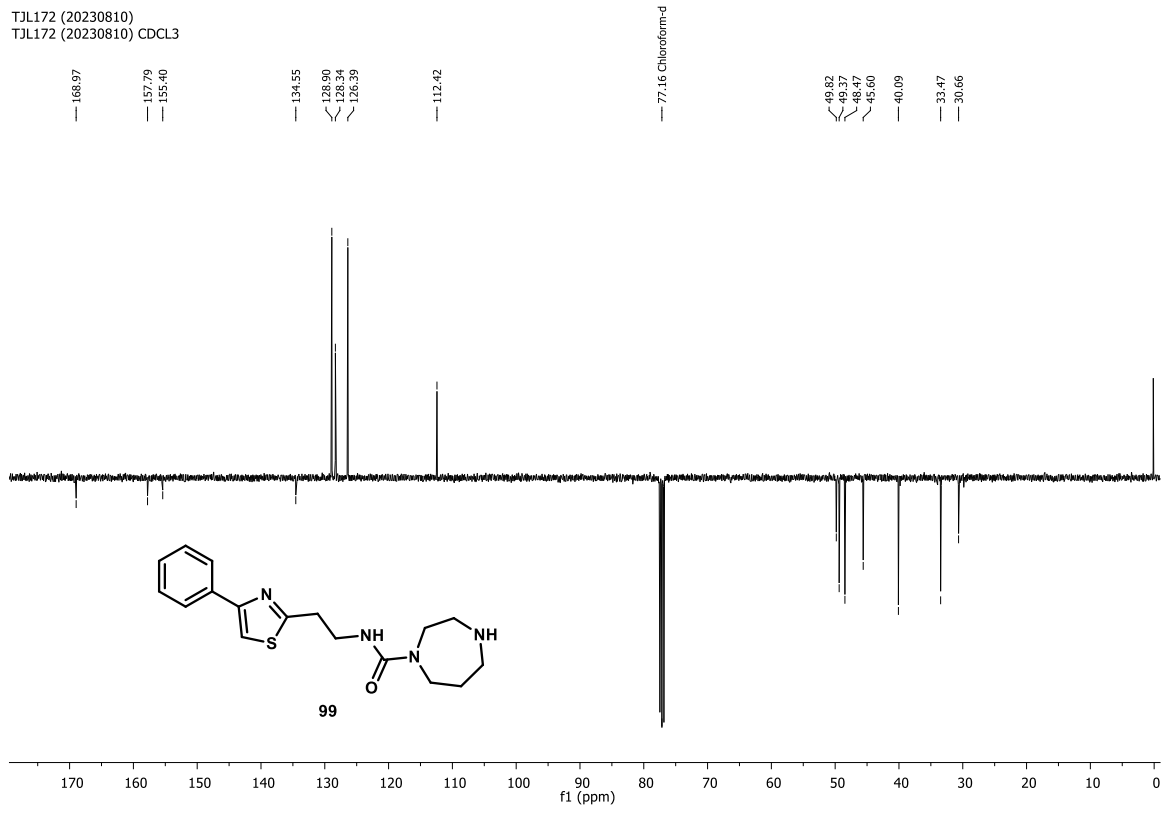
Anexo 163. Espectro de RMN de ^{1}H de **98** (400 MHz, $CDCl_3$)



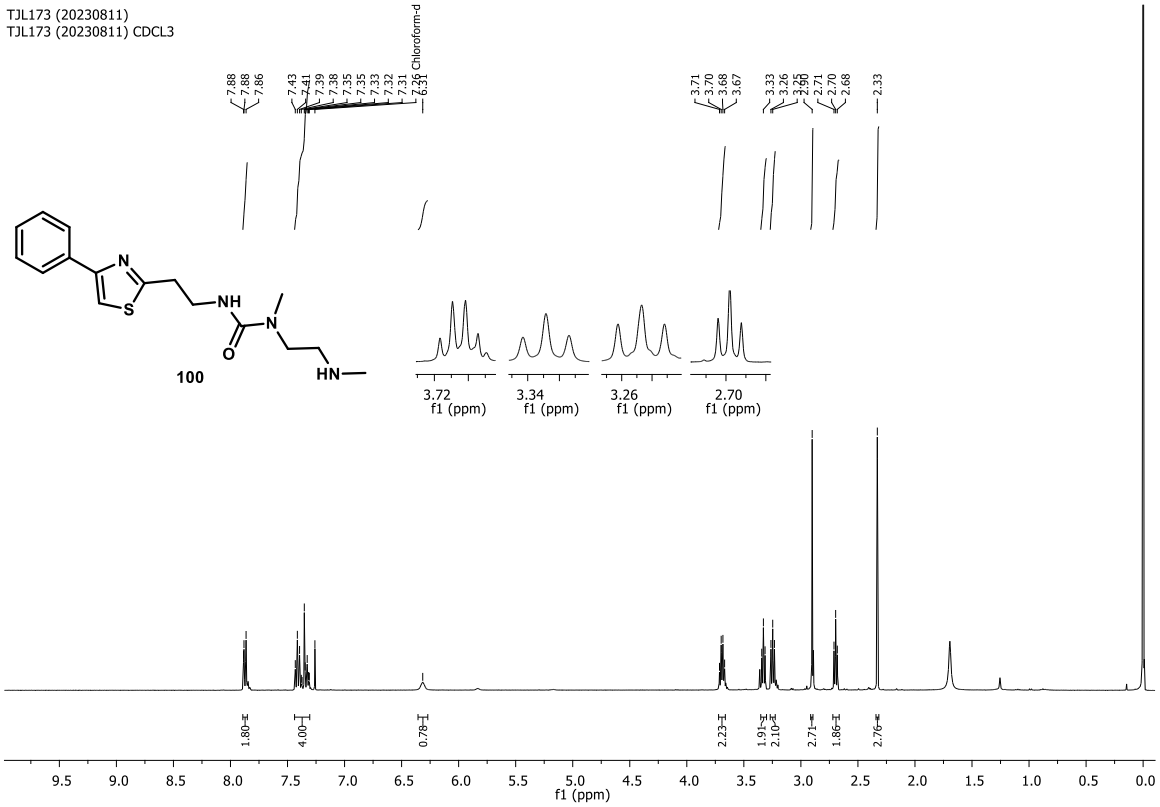
Anexo 164. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **98** (101 MHz, $CDCl_3$)



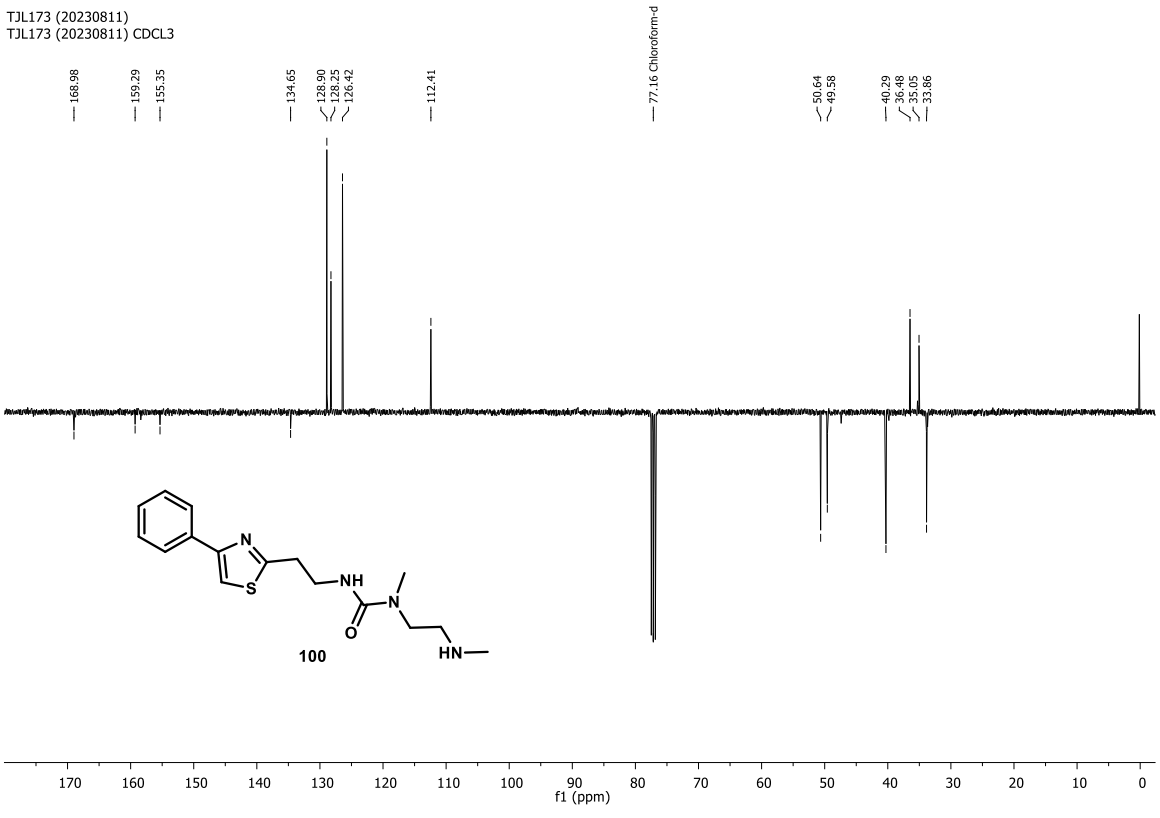
Anexo 165. Espectro de RMN de ^{1}H de **99** (400 MHz, $CDCl_3$)



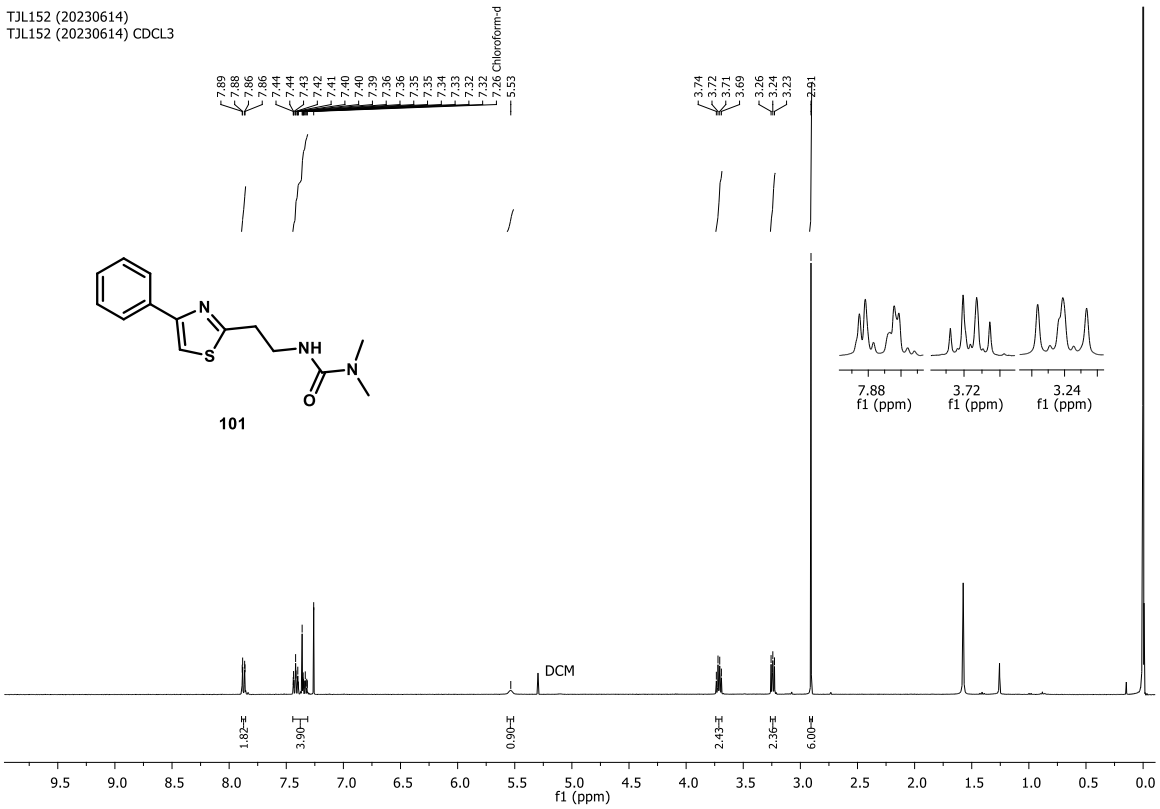
Anexo 166. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **99** (101 MHz, $CDCl_3$)



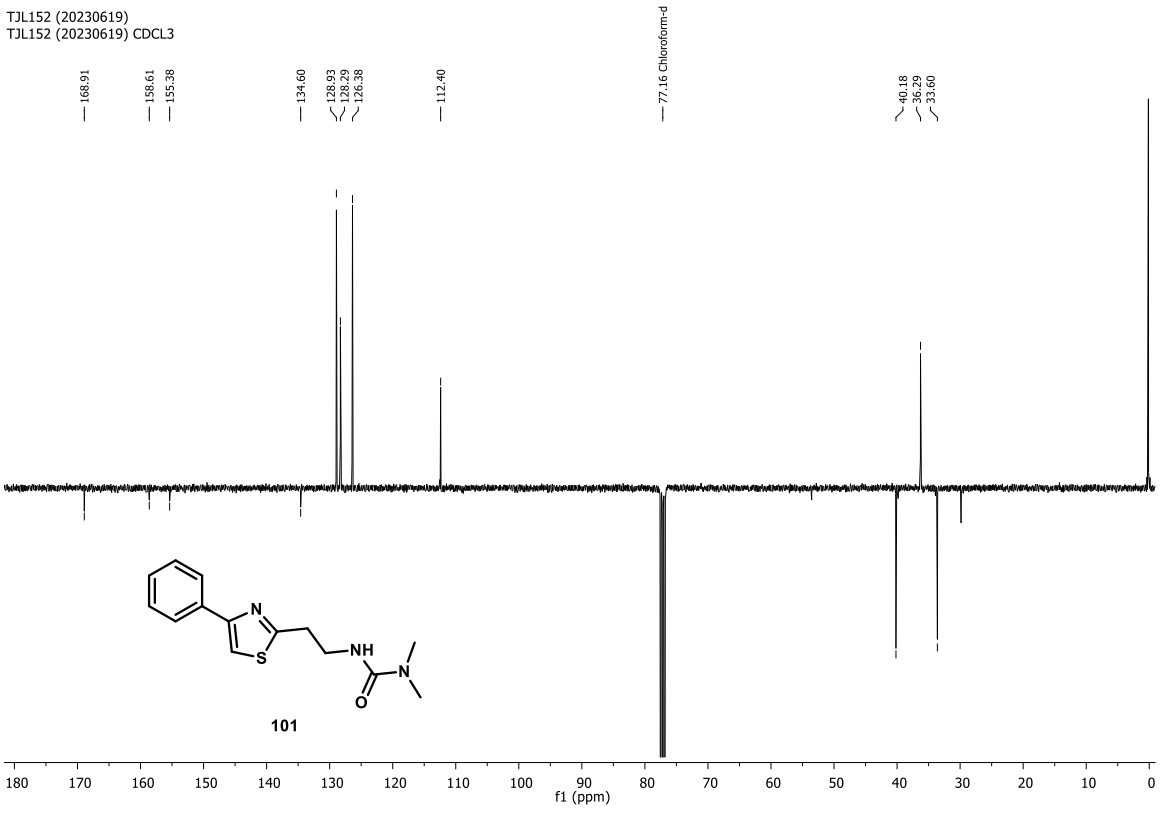
Anexo 167. Espectro de RMN de ^{1}H de **100** (400 MHz, $CDCl_3$)



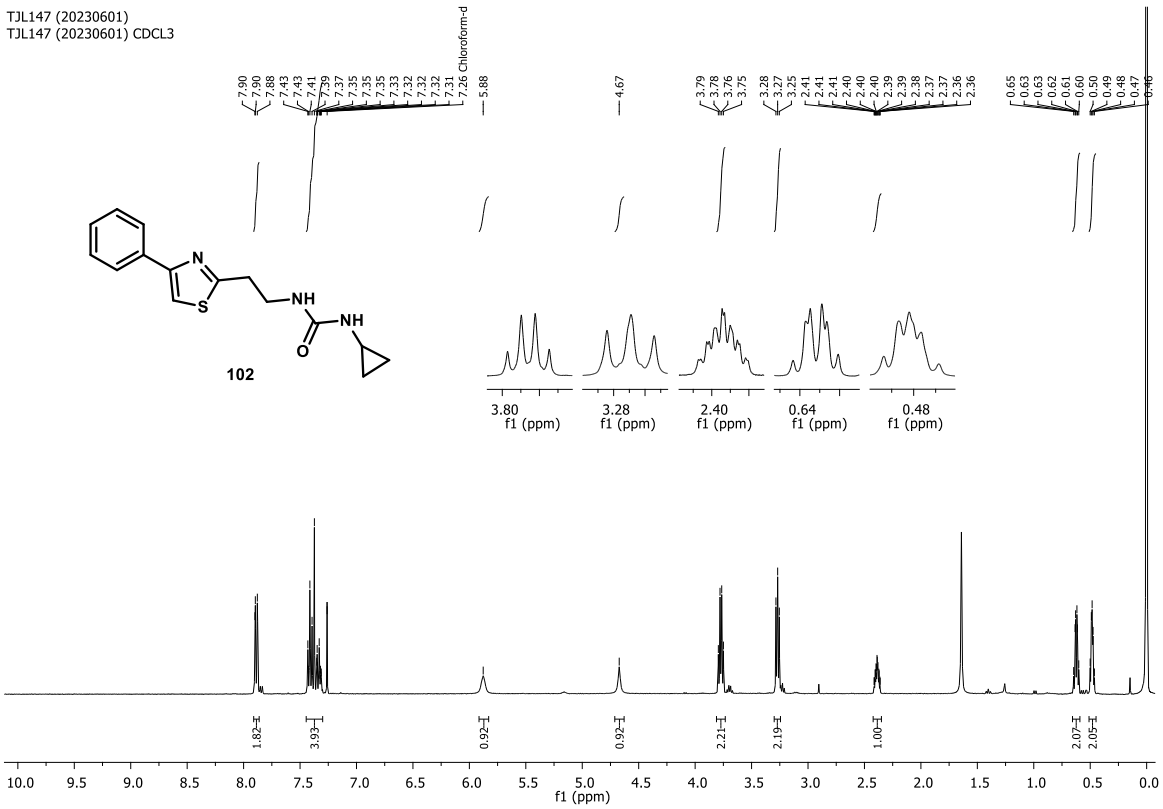
Anexo 168. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **100** (101 MHz, $CDCl_3$)



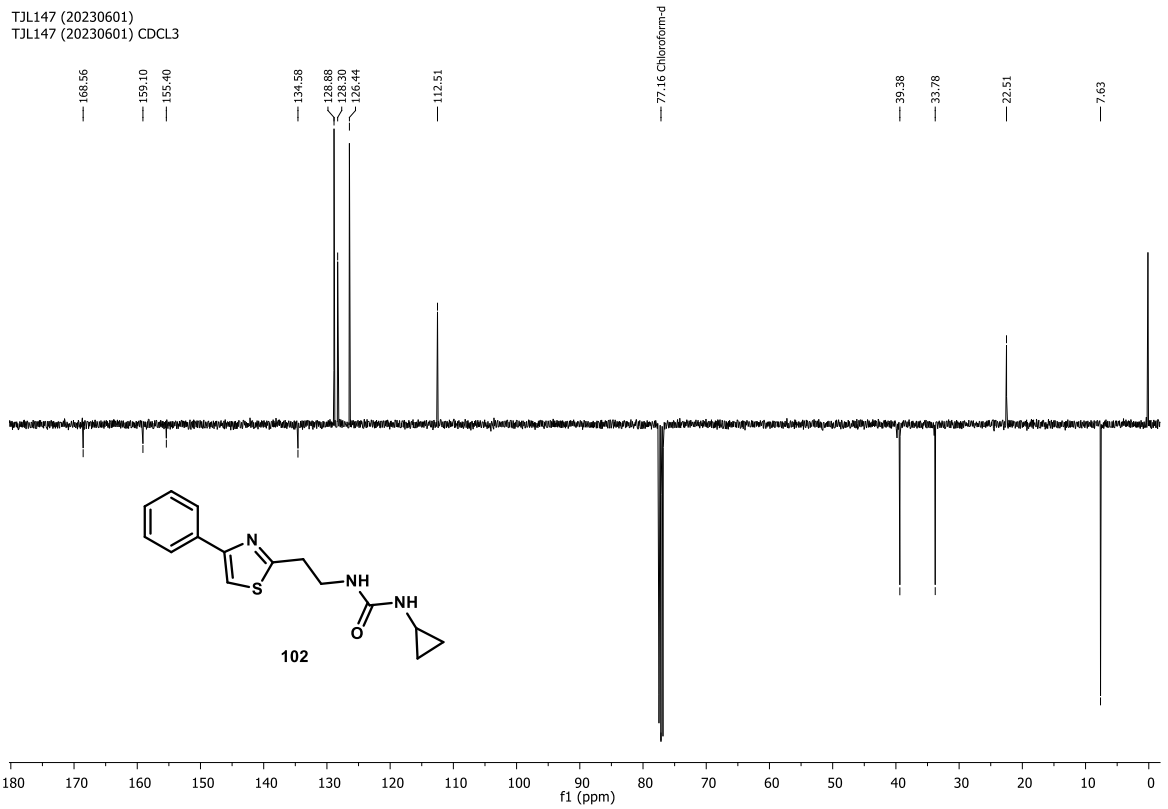
Anexo 169. Espectro de RMN de ^{1}H de **101** (400 MHz, $CDCl_3$)



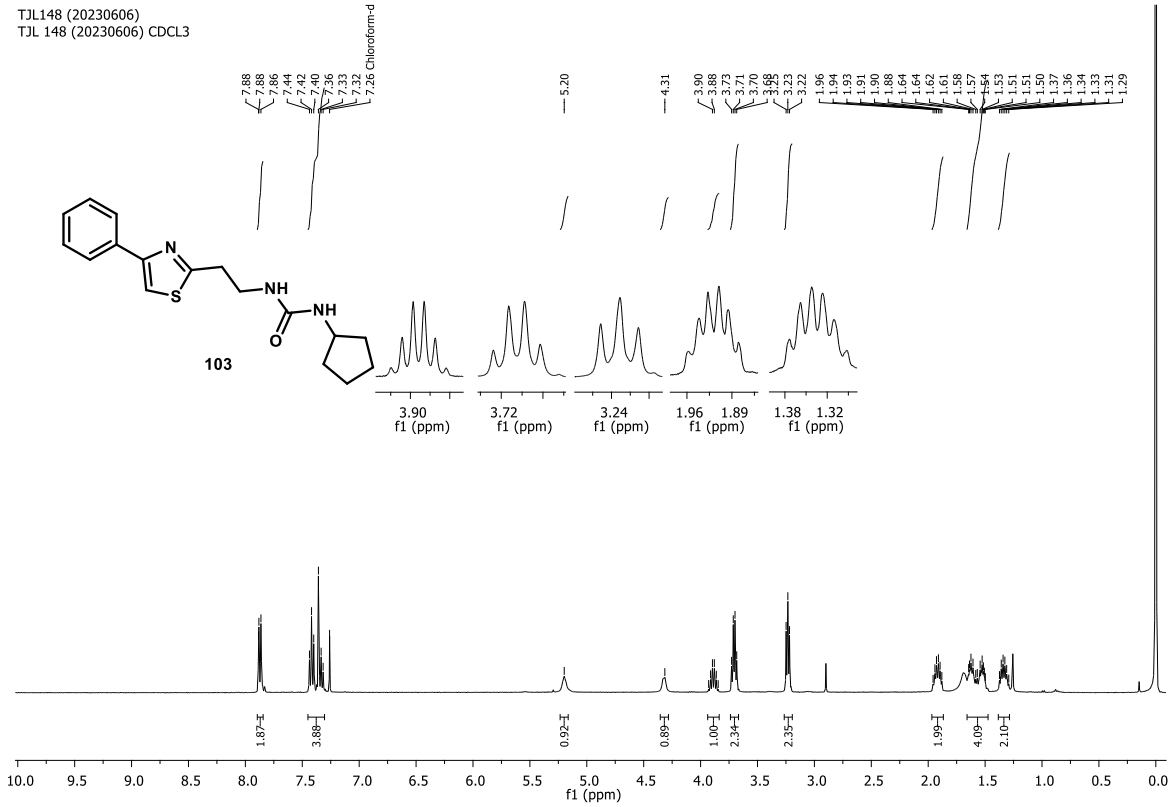
Anexo 170. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **101** (101 MHz, $CDCl_3$)



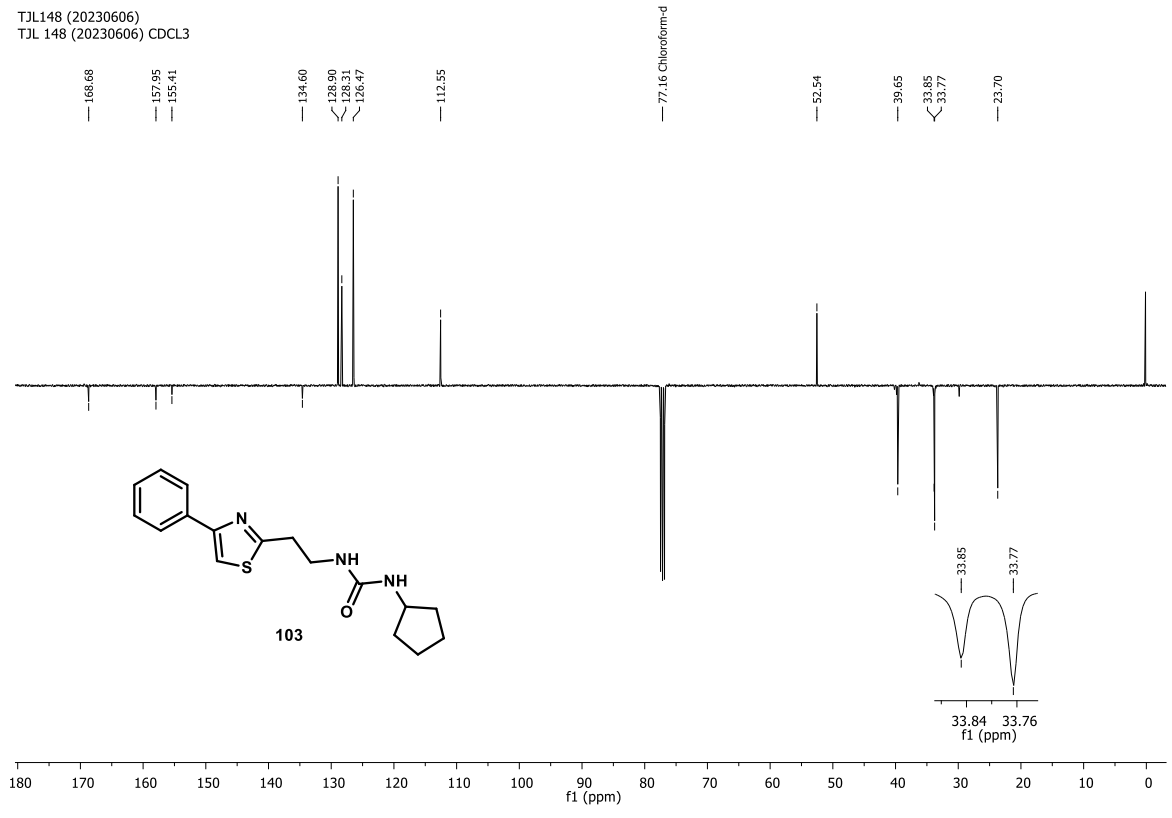
Anexo 171. Espectro de RMN de ^{1}H de **102** (400 MHz, $CDCl_3$)



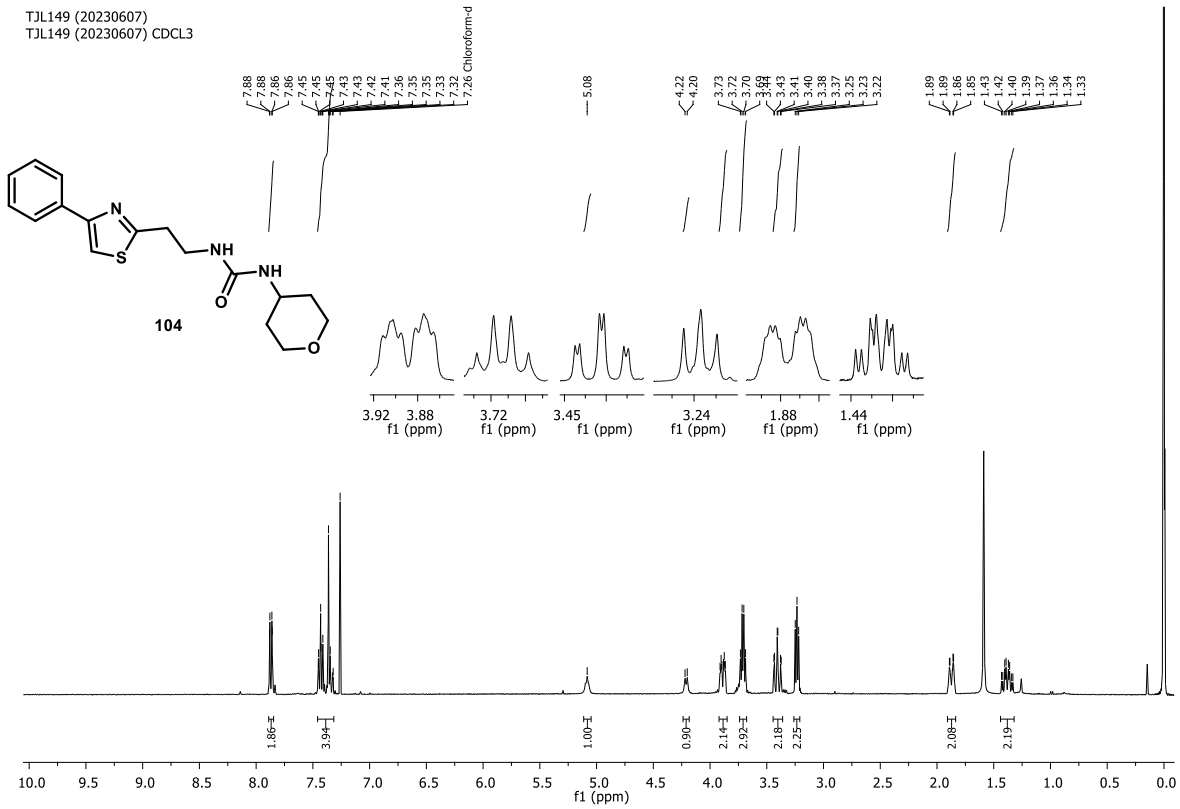
Anexo 172. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **102** (101 MHz, $CDCl_3$)



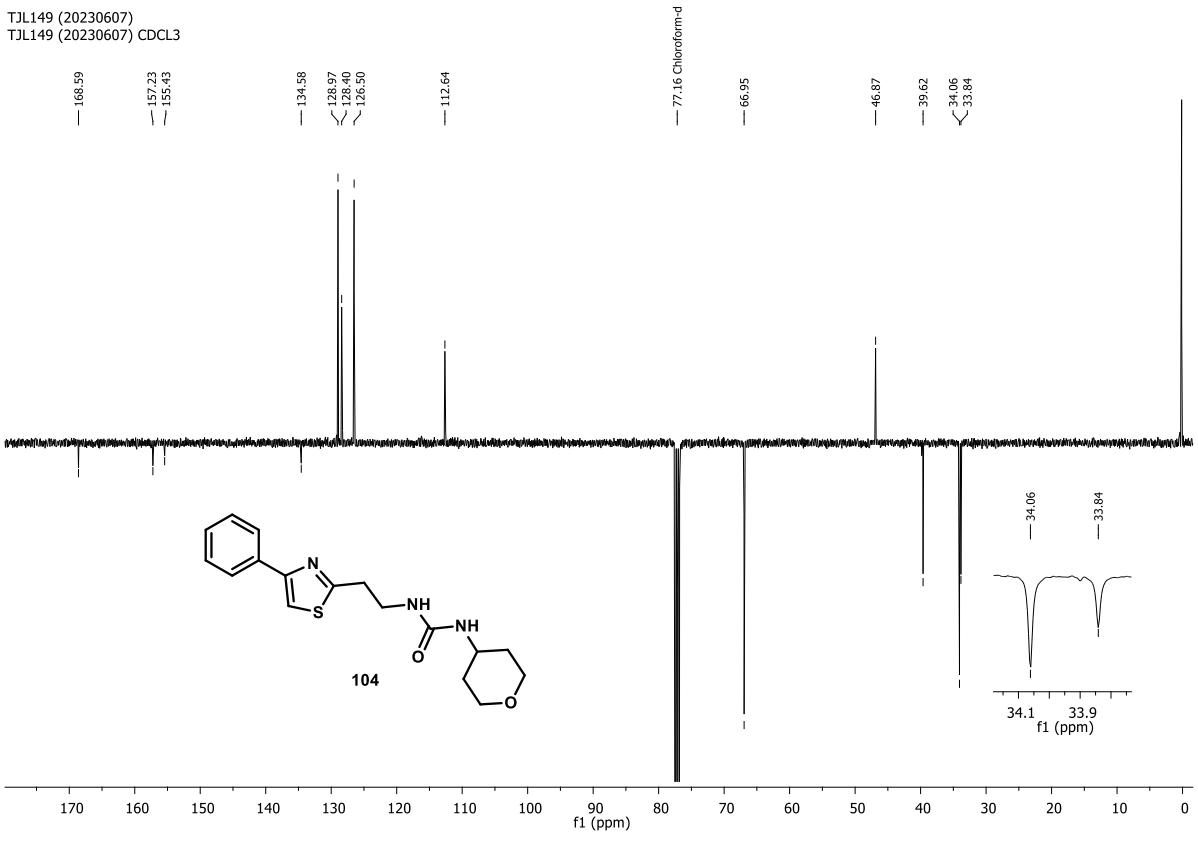
Anexo 173. Espectro de RMN de ^{1}H de **103** (400 MHz, $CDCl_3$)



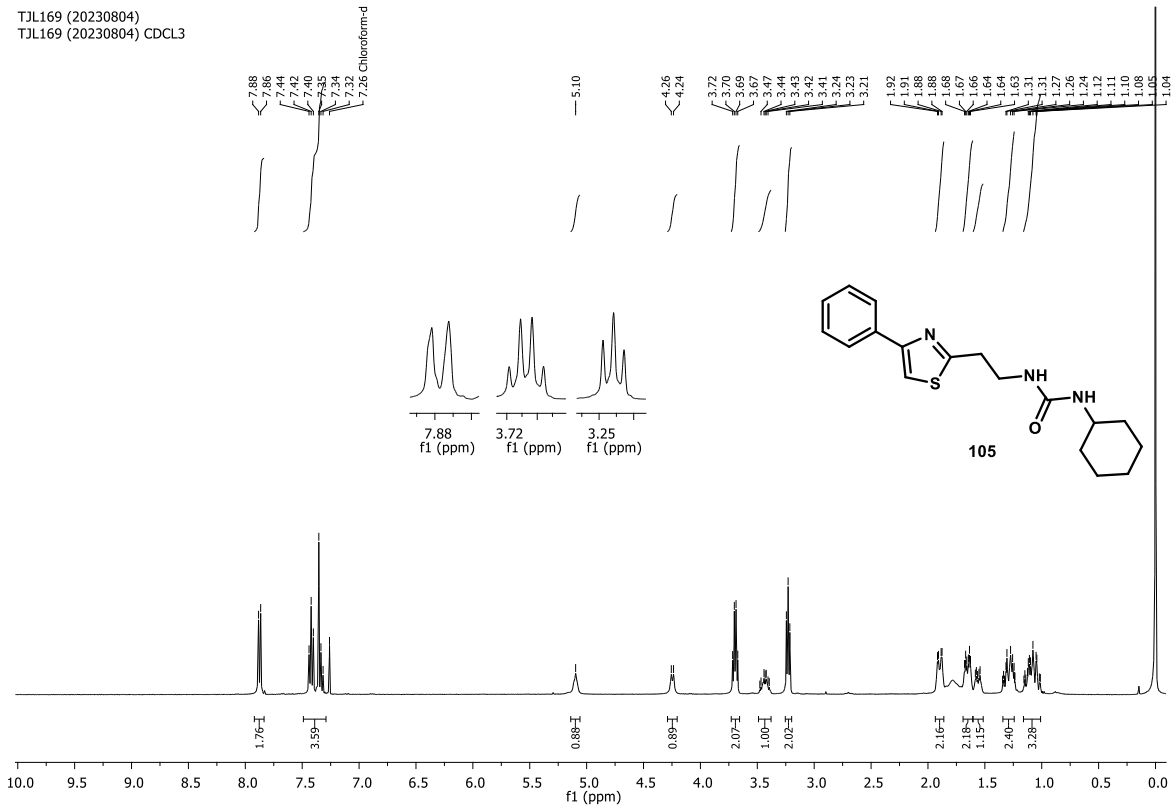
Anexo 174. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **103** (101 MHz, $CDCl_3$)



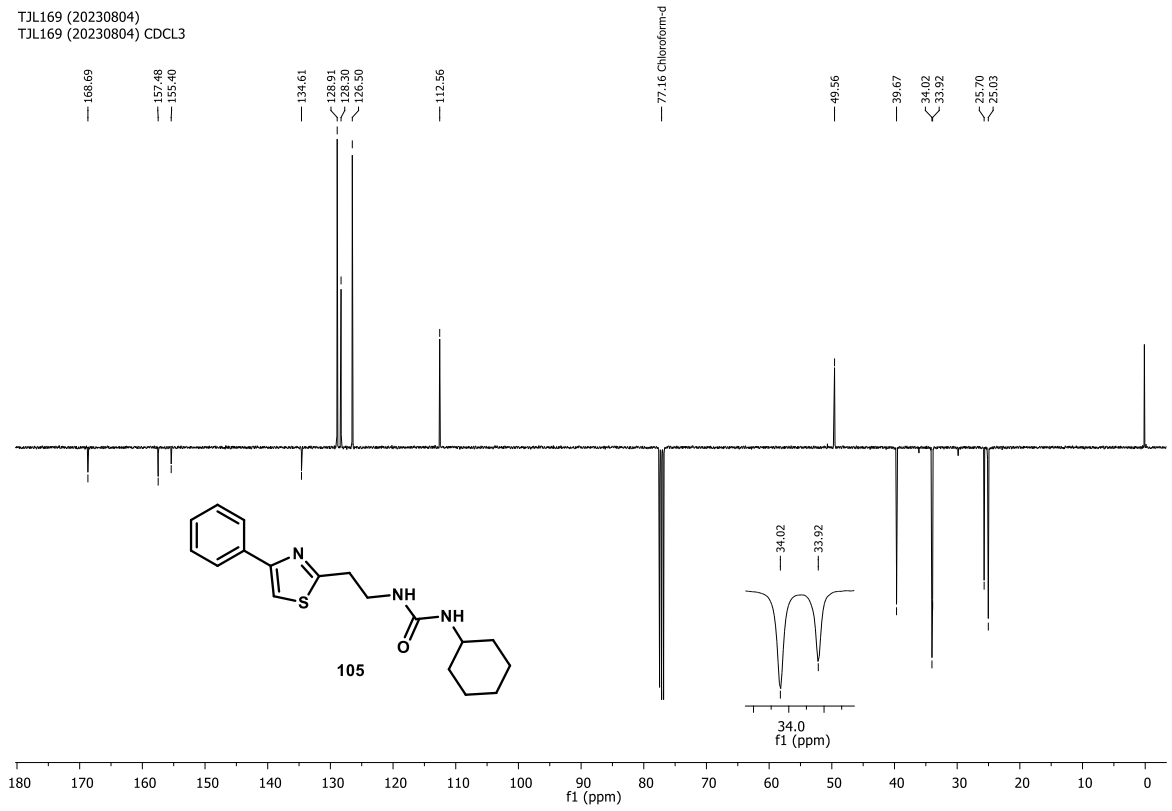
Anexo 175. Espectro de RMN de ^{1}H de **104** (400 MHz, $CDCl_3$)



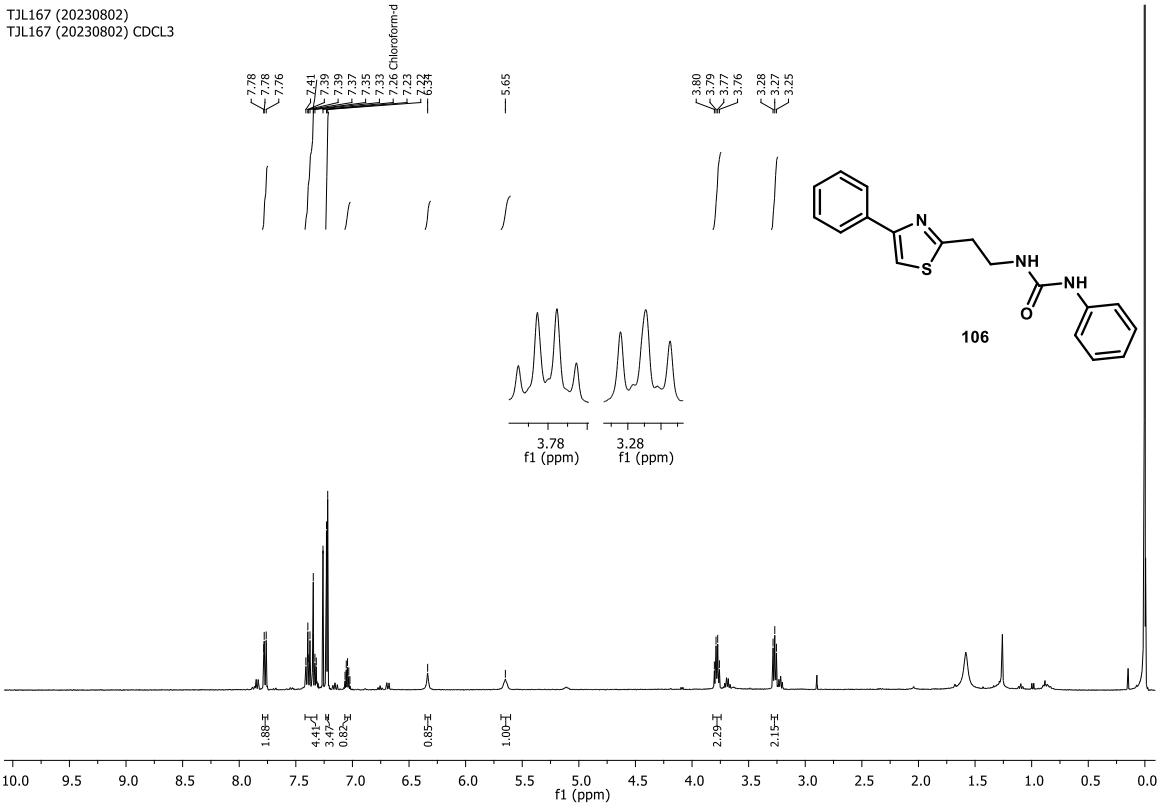
Anexo 176. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **104** (101 MHz, $CDCl_3$)



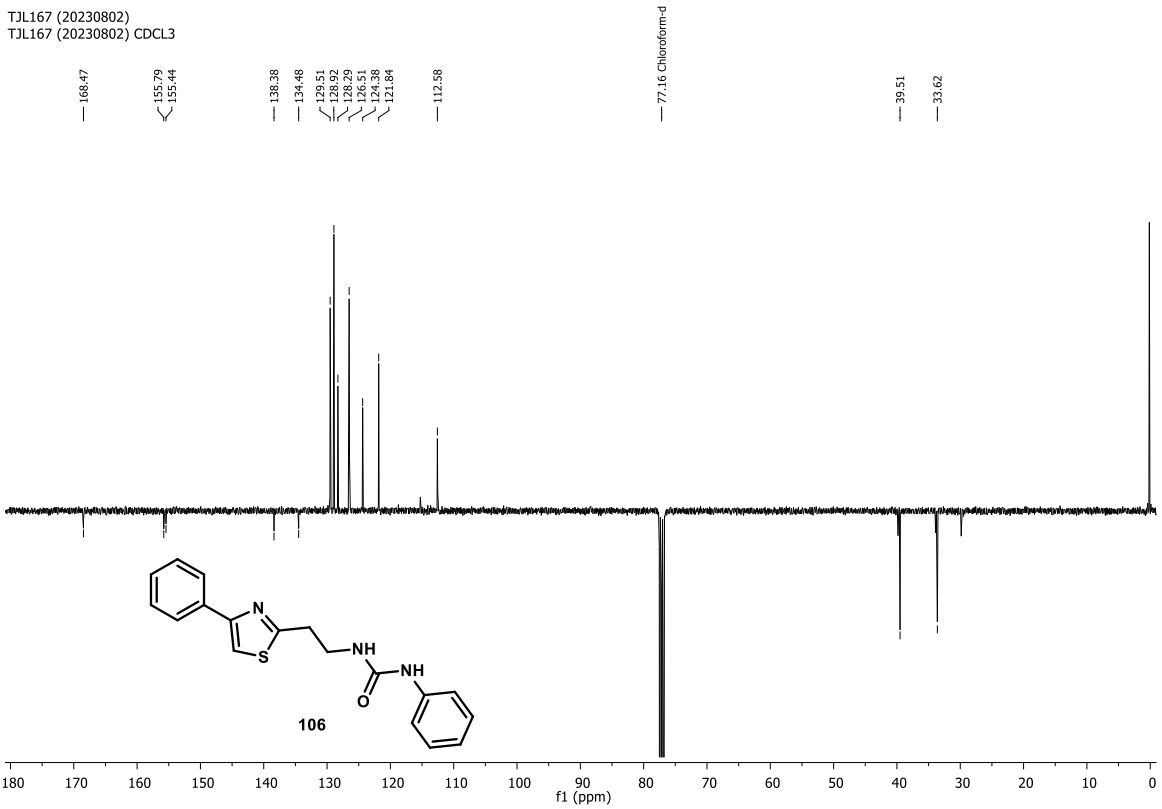
Anexo 177. Espectro de RMN de ^{1}H de **105** (400 MHz, $CDCl_3$)



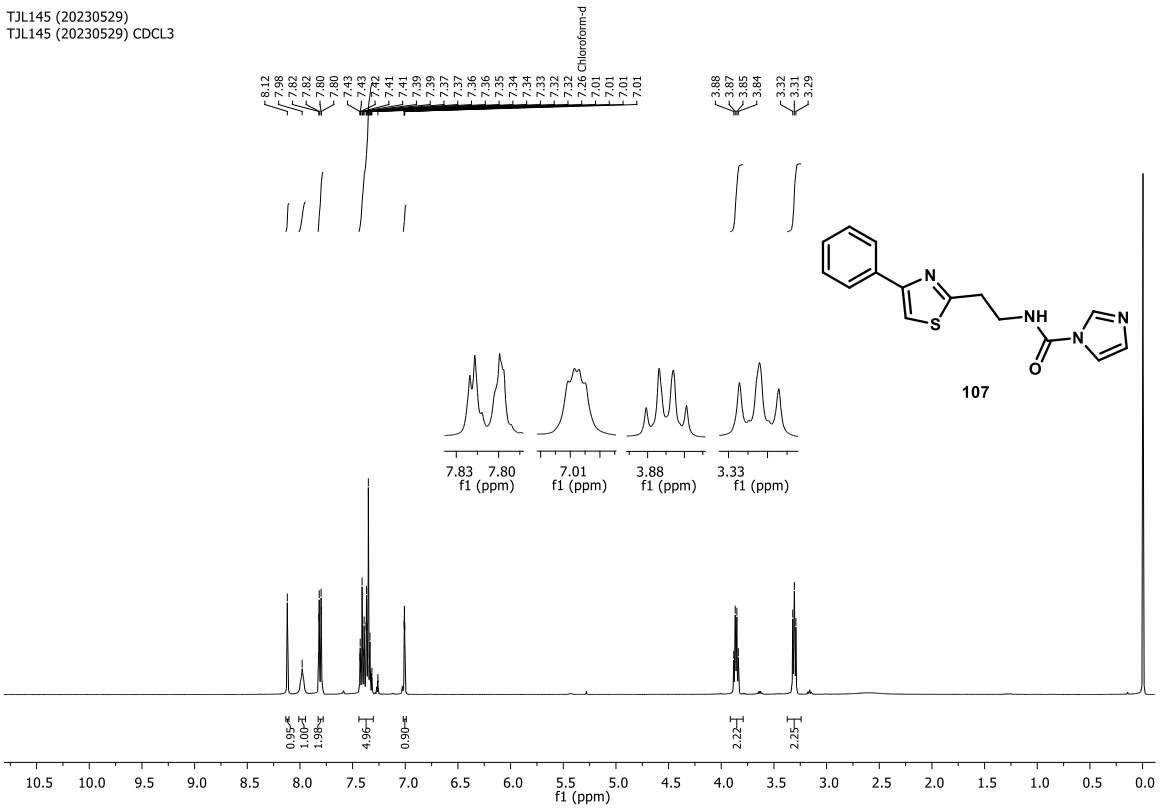
Anexo 178. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **105** (101 MHz, $CDCl_3$)



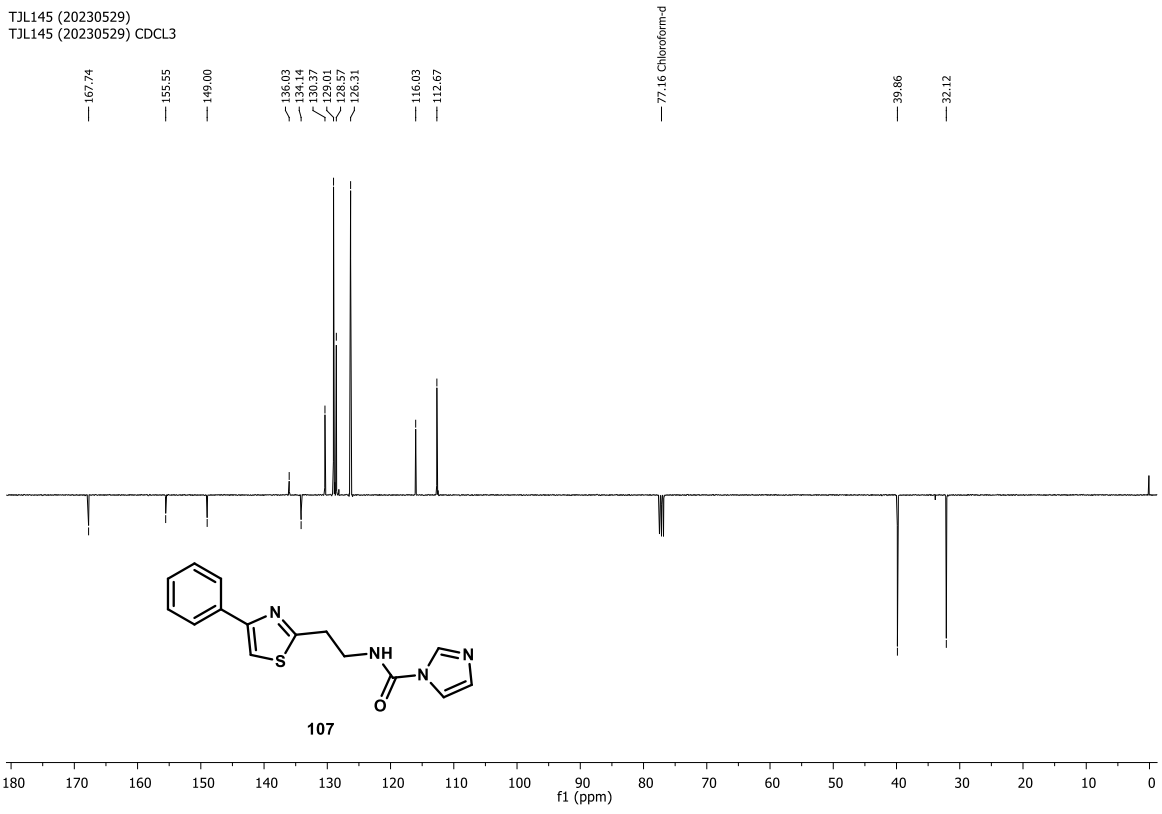
Anexo 179. Espectro de RMN de ^{1}H de **106** (400 MHz, $CDCl_3$)



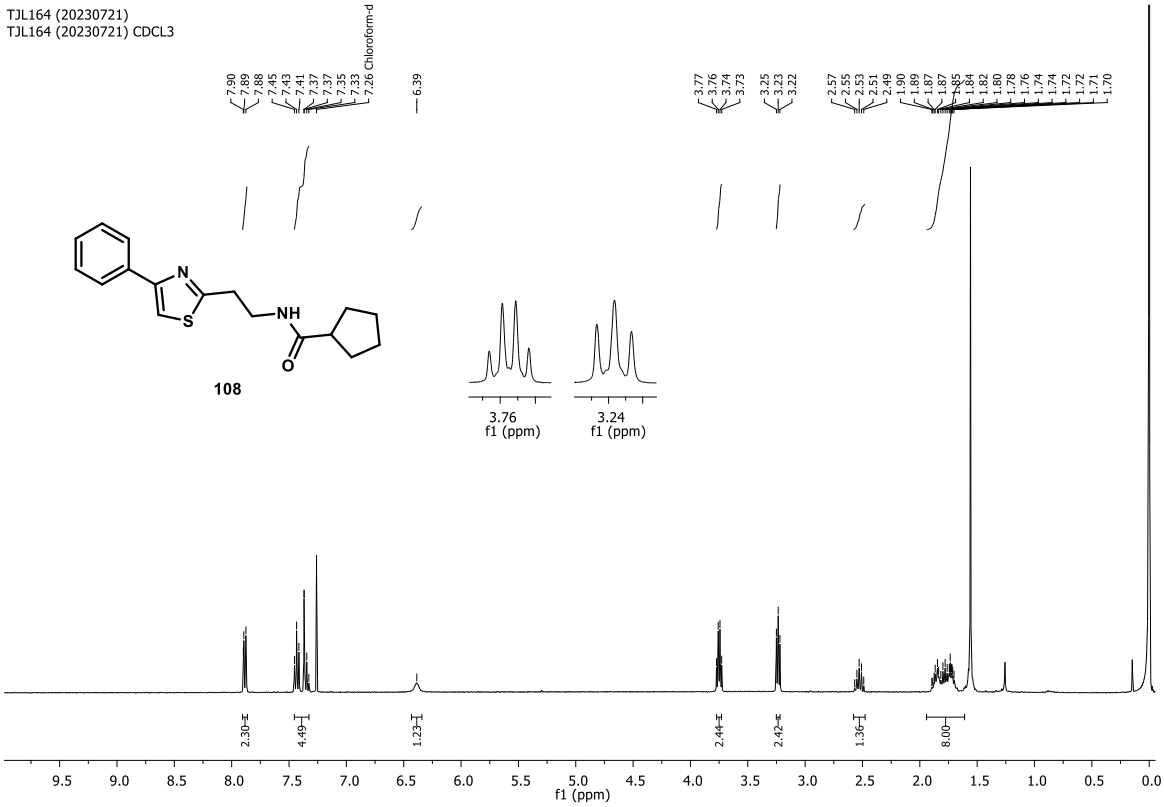
Anexo 180. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **106** (101 MHz, $CDCl_3$)



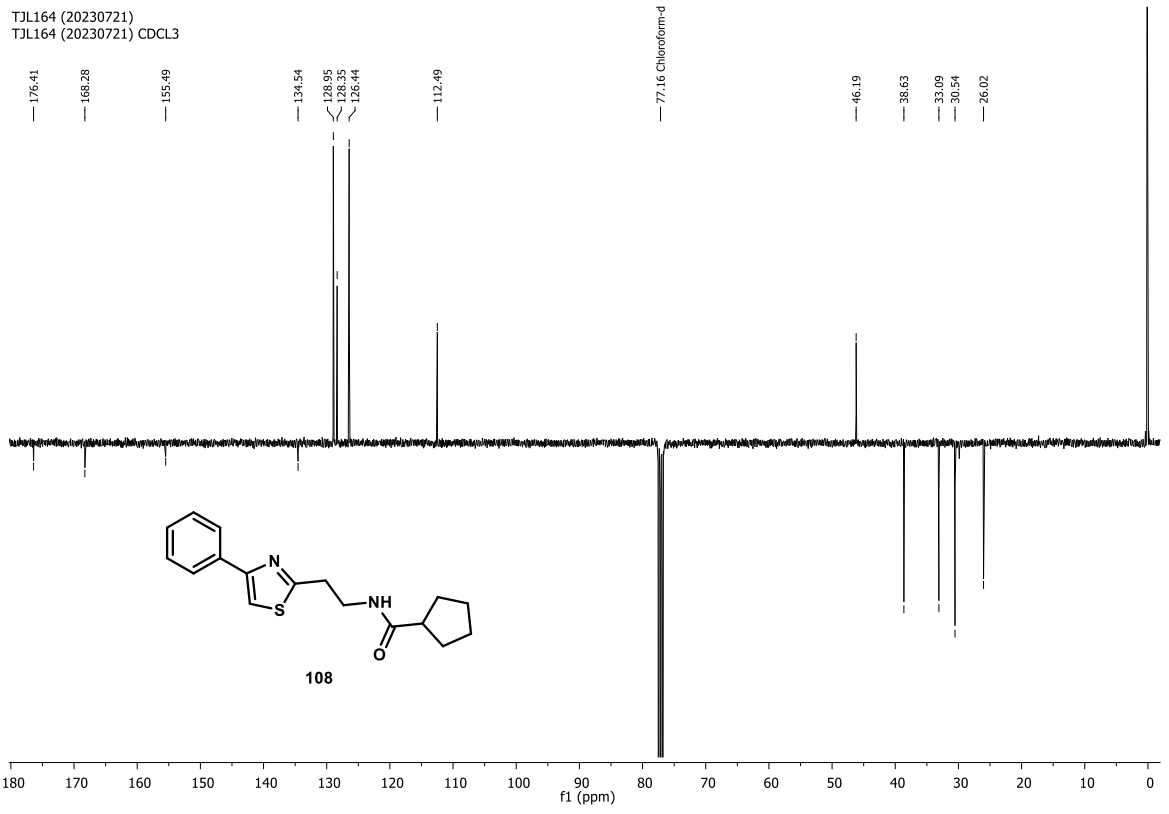
Anexo 181. Espectro de RMN de ^{1}H de **107** (400 MHz, $CDCl_3$)



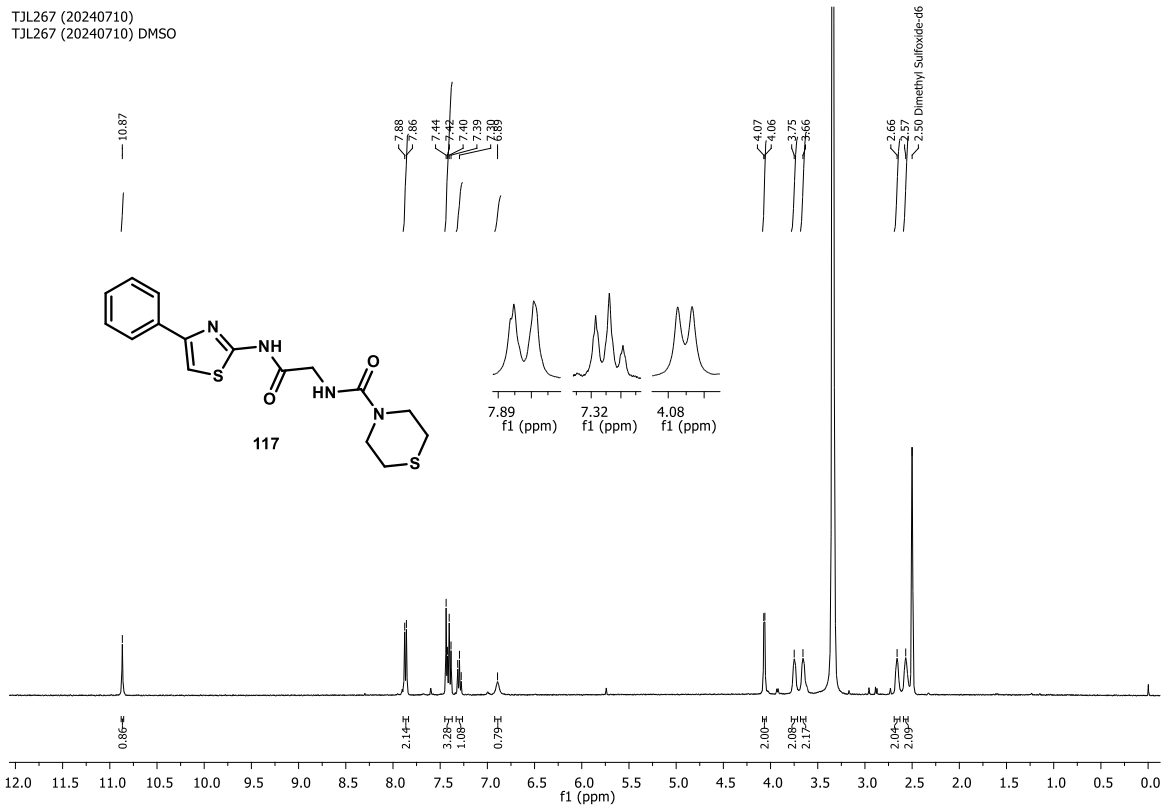
Anexo 182. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **107** (101 MHz, $CDCl_3$)



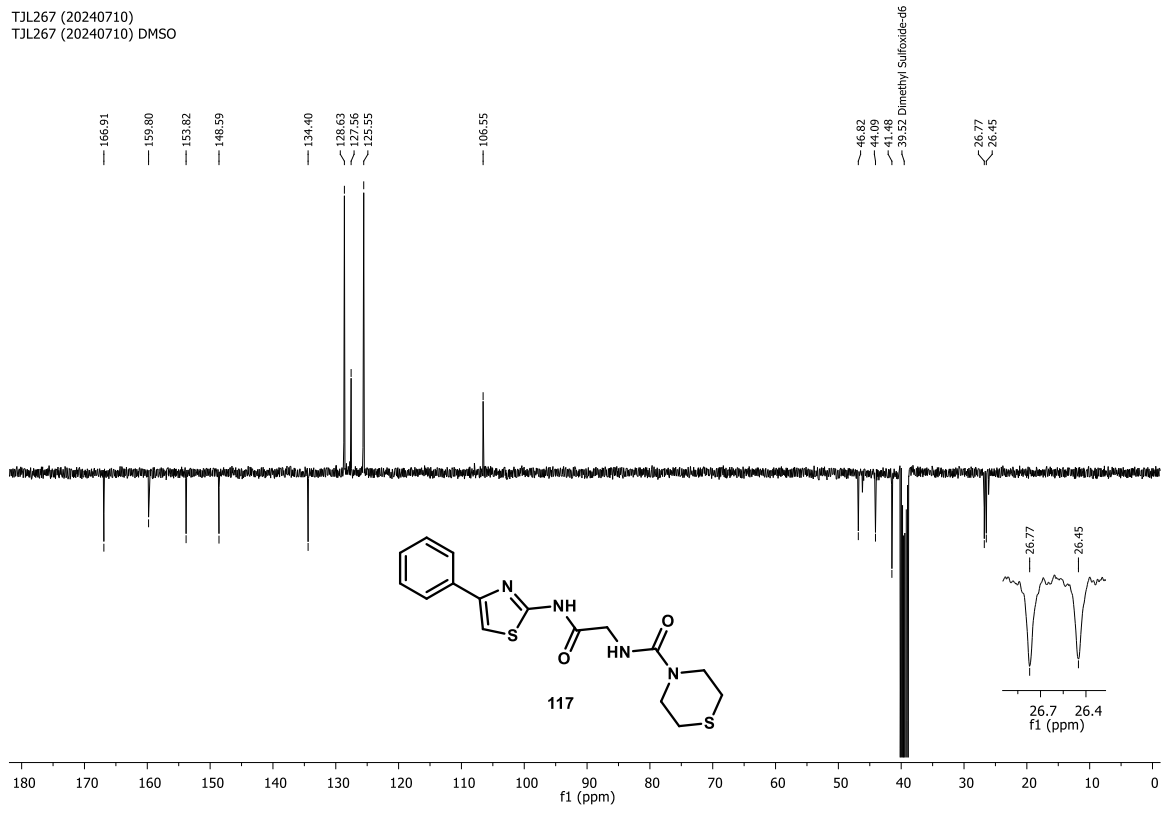
Anexo 183. Espectro de RMN de ^{1}H de **108** (400 MHz, $CDCl_3$)



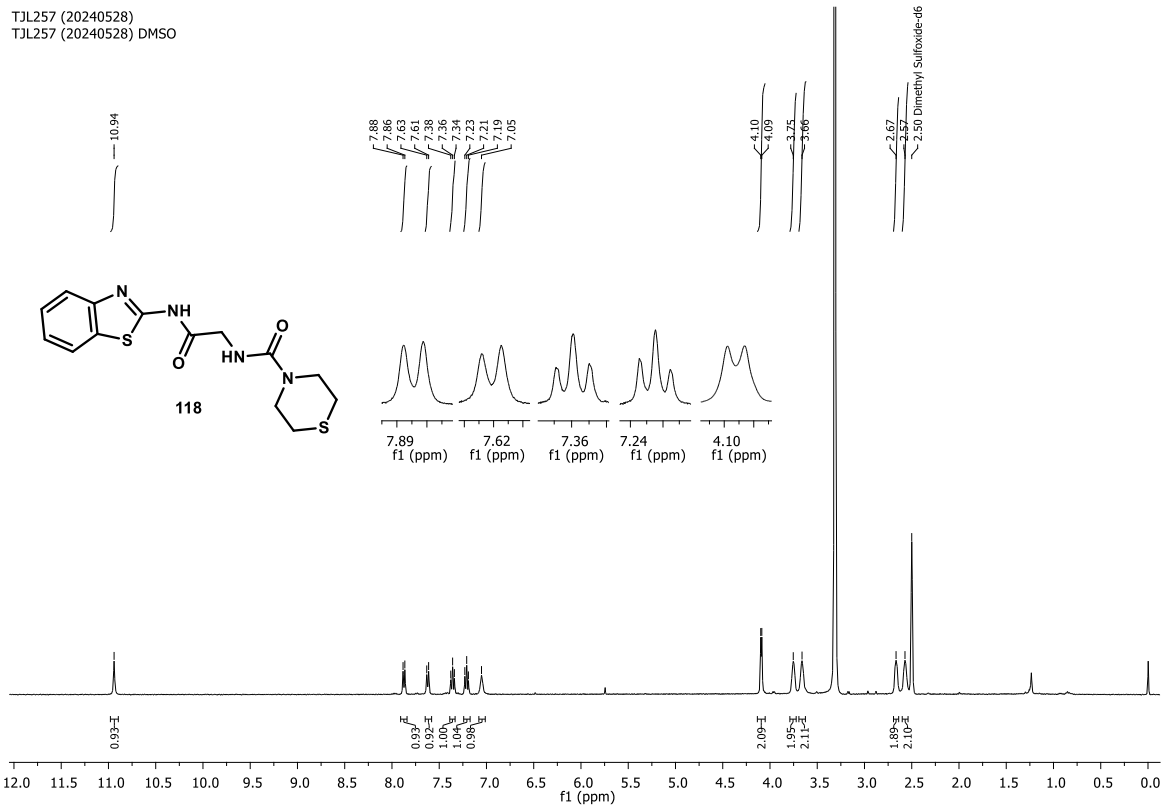
Anexo 184. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **108** (101 MHz, $CDCl_3$)



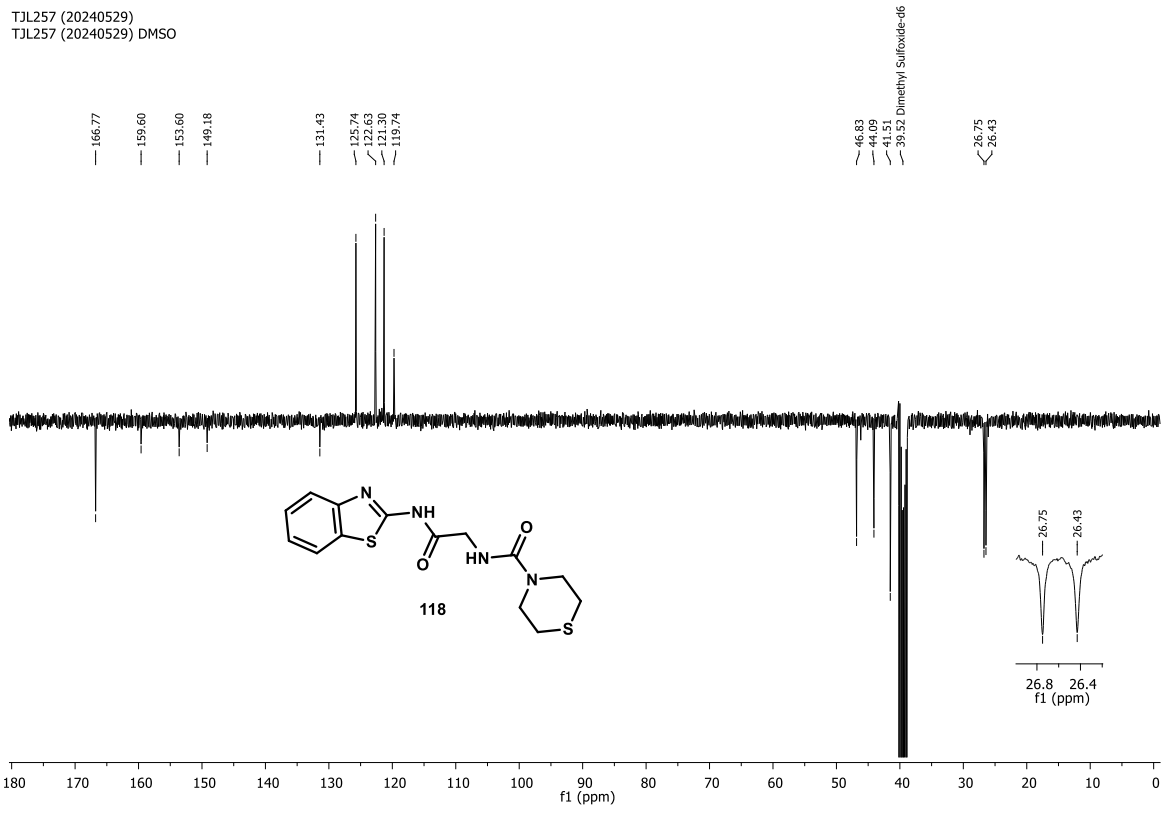
Anexo 185. Espectro de RMN de ^{1}H de **117** (400 MHz, DMSO-d_6)



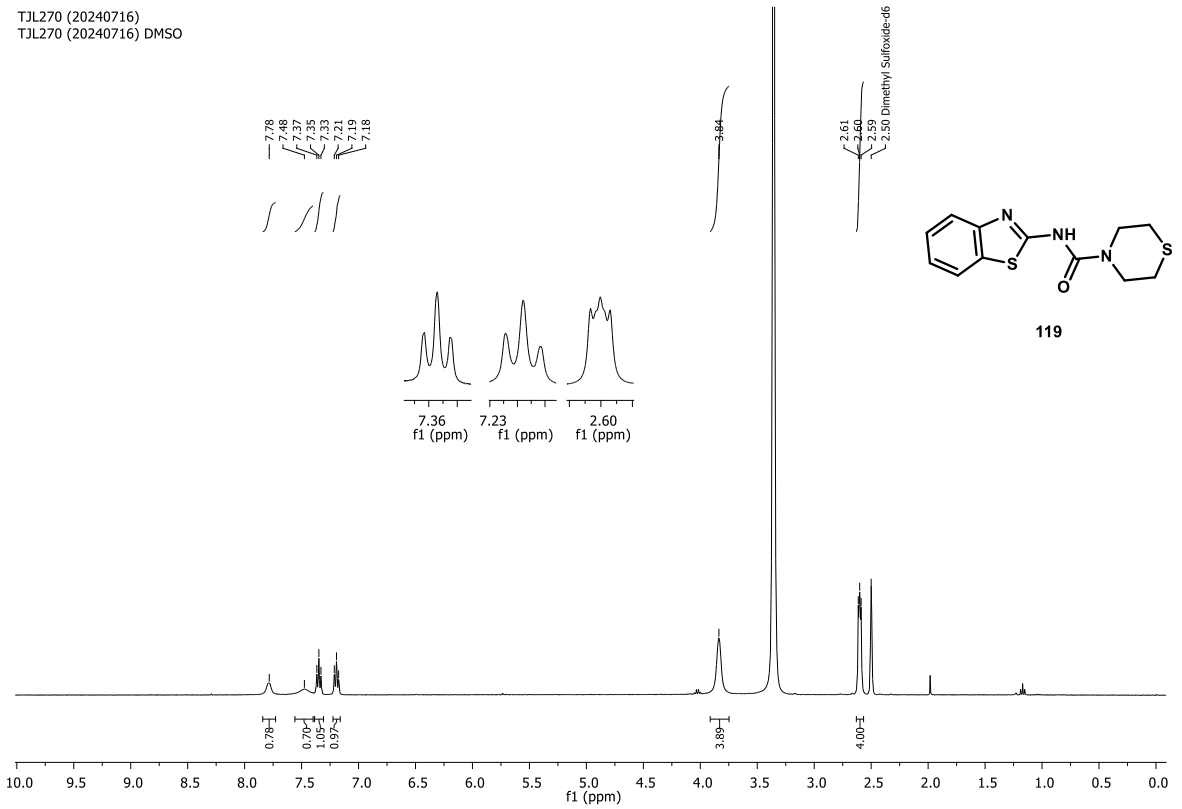
Anexo 186. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **117** (101 MHz, DMSO-d_6)



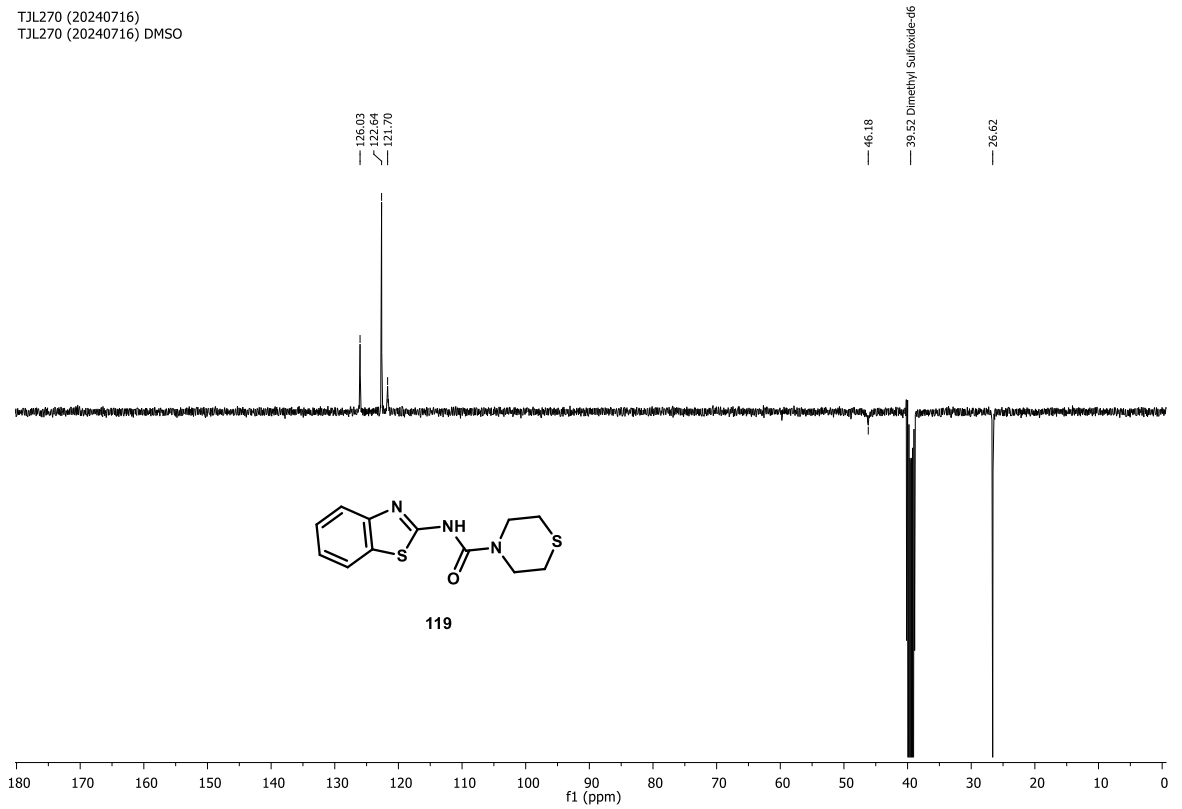
Anexo 187. Espectro de RMN de ^{1}H de **118** (400 MHz, DMSO-d_6)



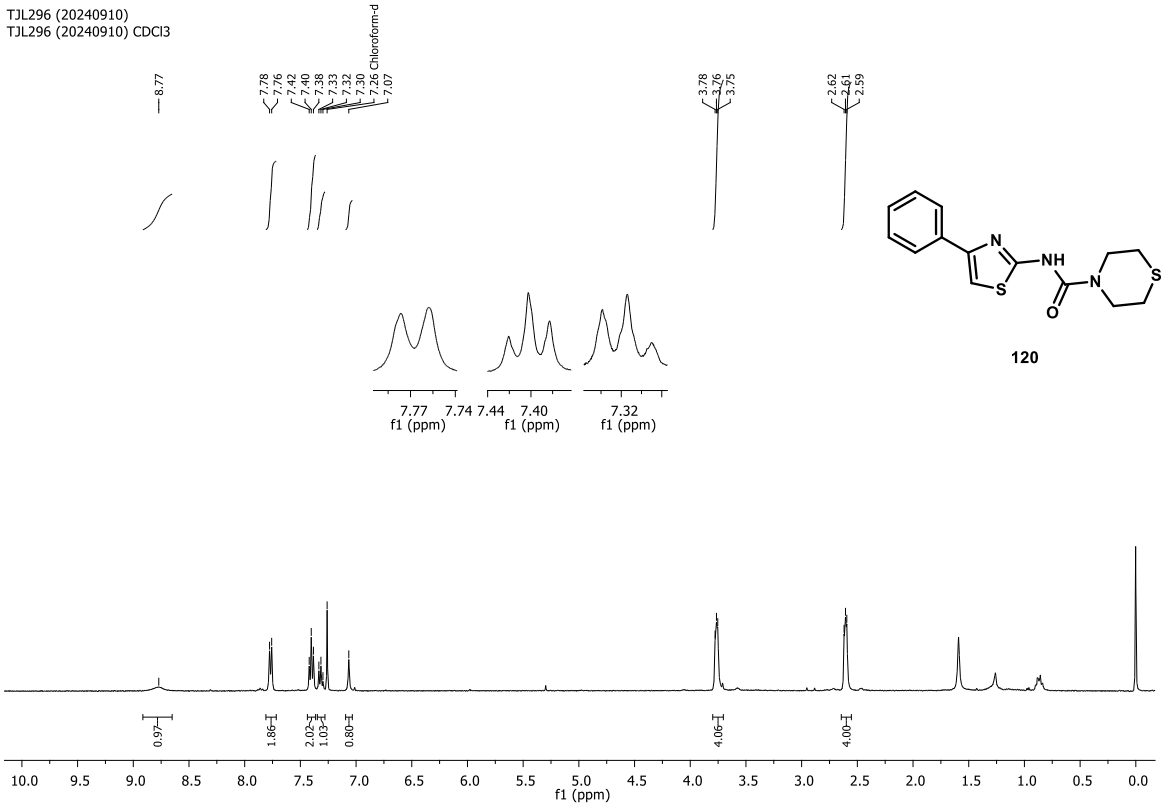
Anexo 188. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **118** (101 MHz, DMSO-d_6)



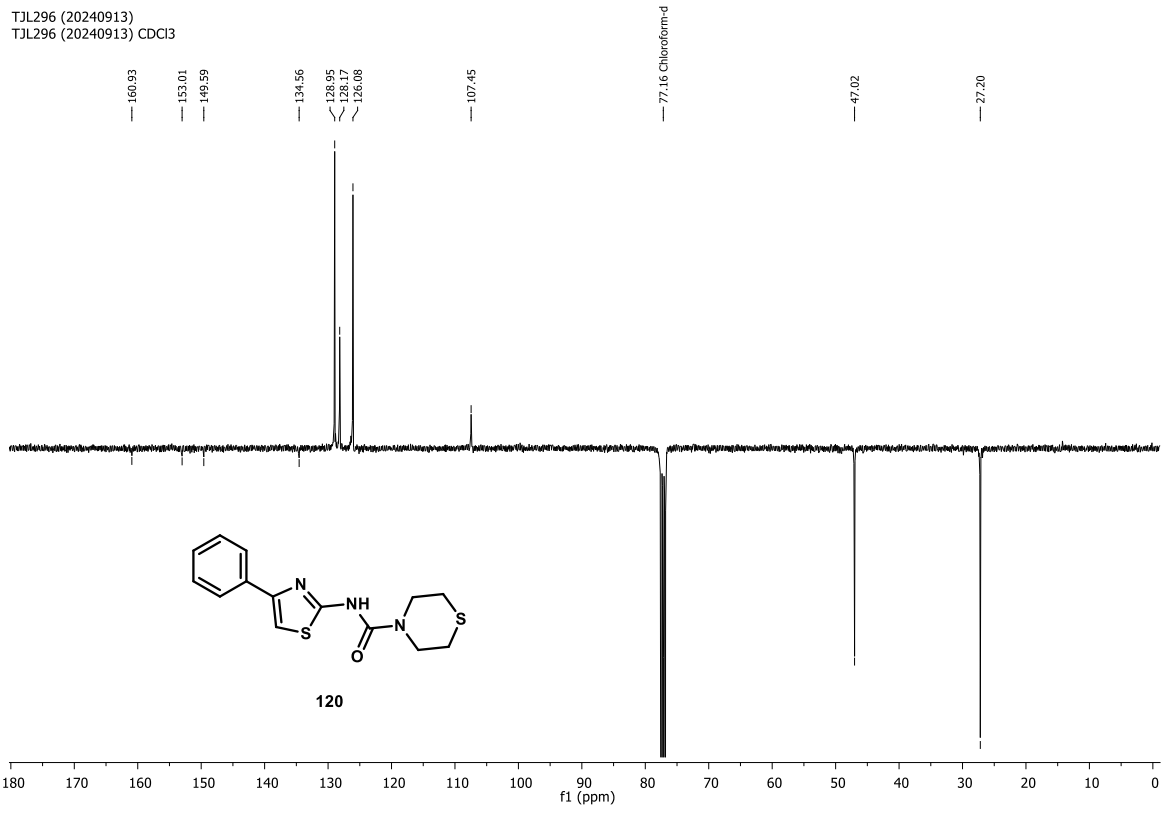
Anexo 189. Espectro de RMN de ^{1}H de **119** (400 MHz, DMSO-d_6)



Anexo 190. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **119** (101 MHz, DMSO-d_6)

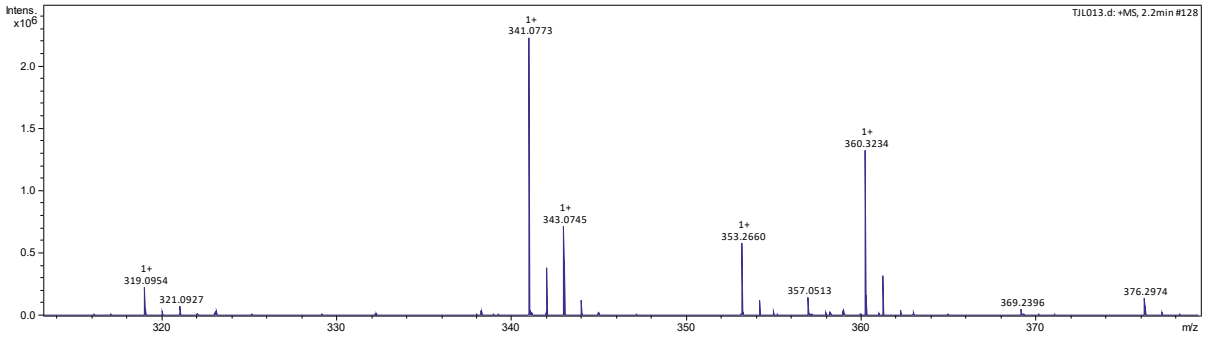


Anexo 191. Espectro de RMN de ^{1}H de **120** (400 MHz, $CDCl_3$)

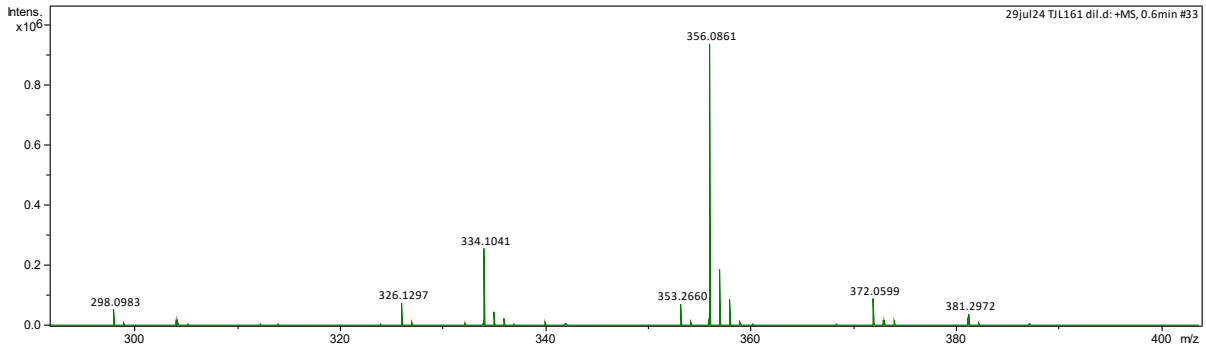


Anexo 192. Espectro de RMN de ^{13}C APT de **120** (101 MHz, $CDCl_3$)

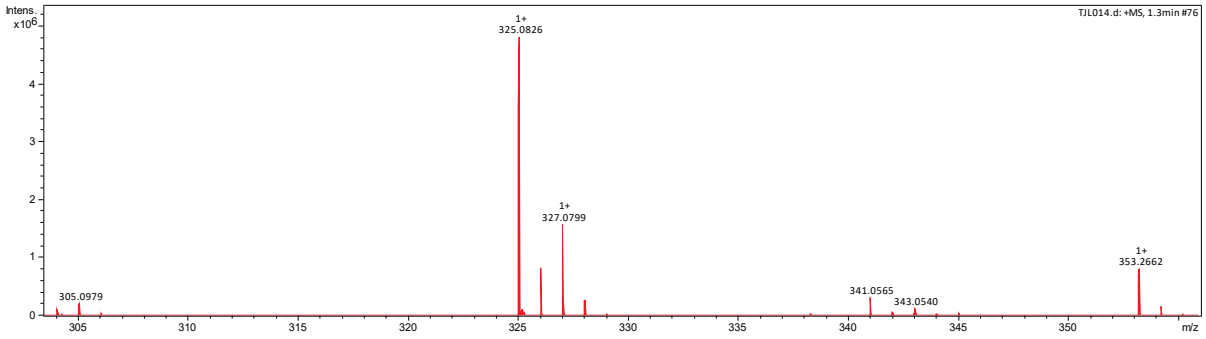
VIII) 3. Espectrogramas de HRMS dos compostos testados contra *L. infantum* e *T. cruzi*



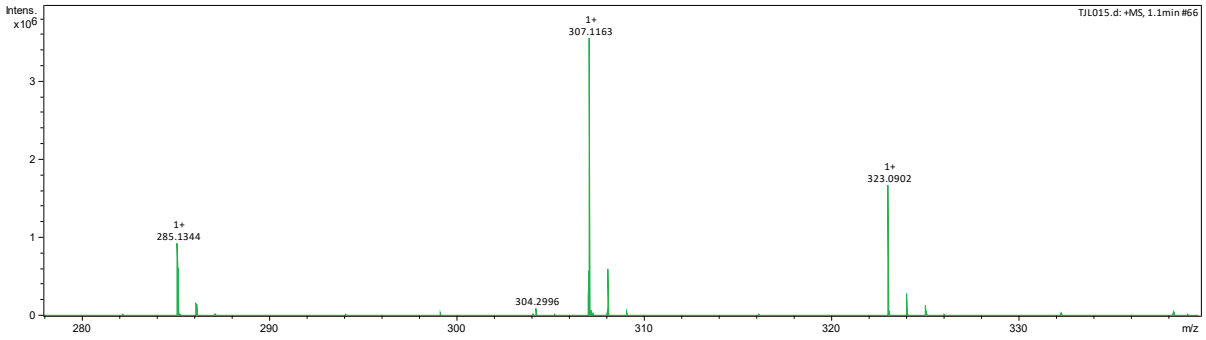
Anexo 193. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **1**



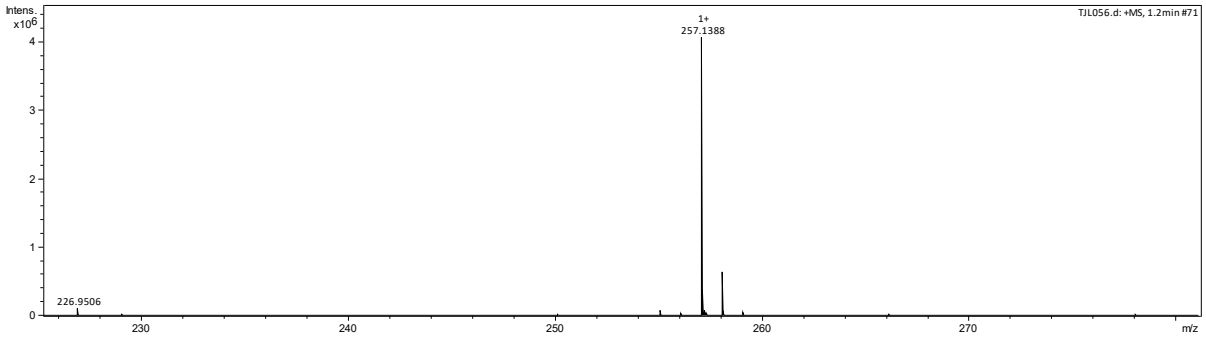
Anexo 194. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **2**



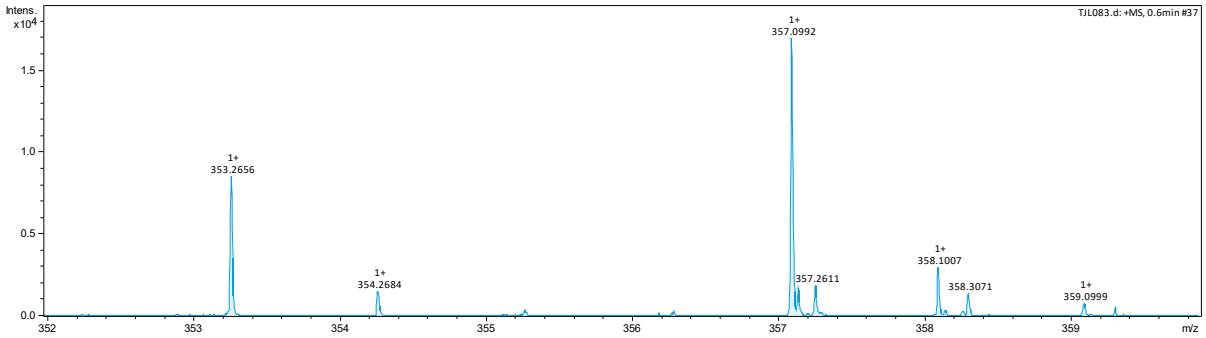
Anexo 195. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **5**



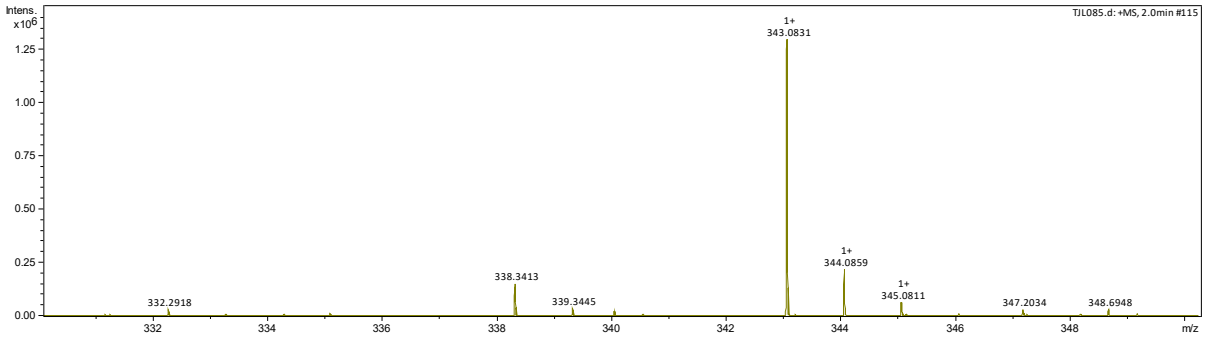
Anexo 196. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **6**



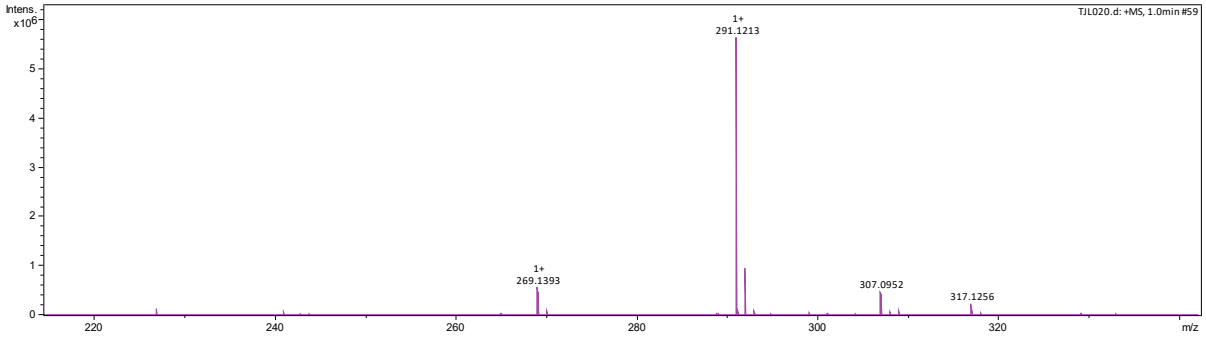
Anexo 197. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **7**



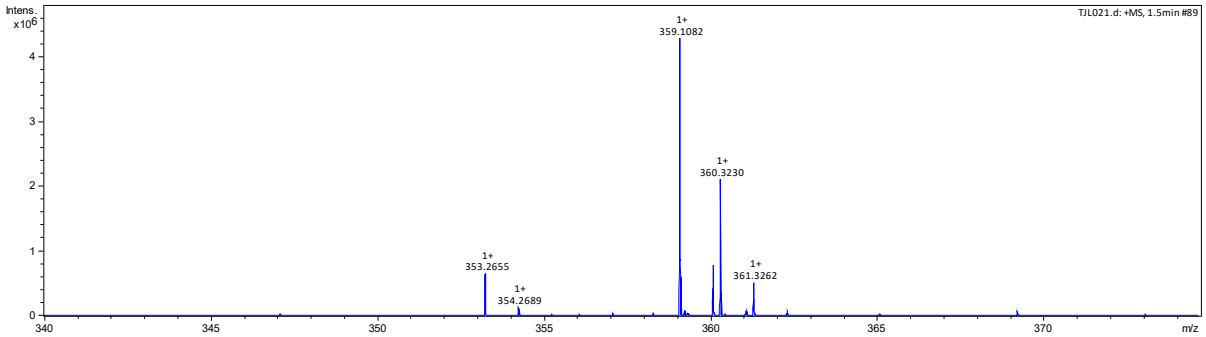
Anexo 198. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **8**



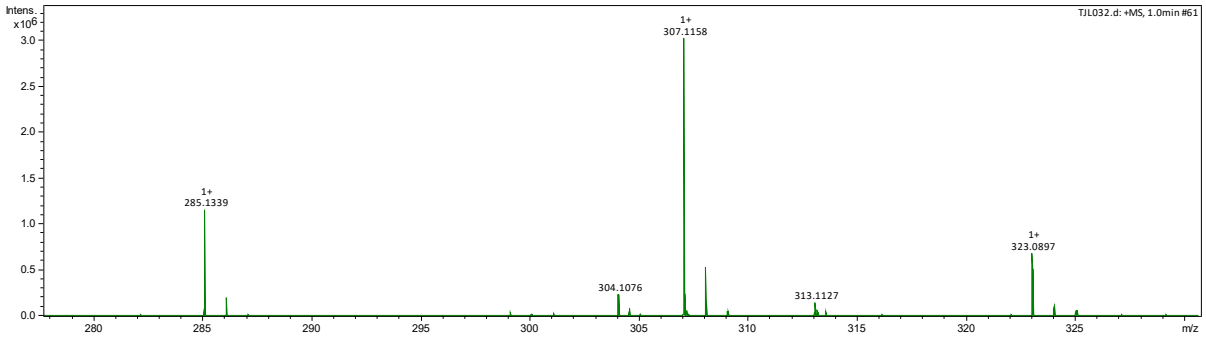
Anexo 199. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **9**



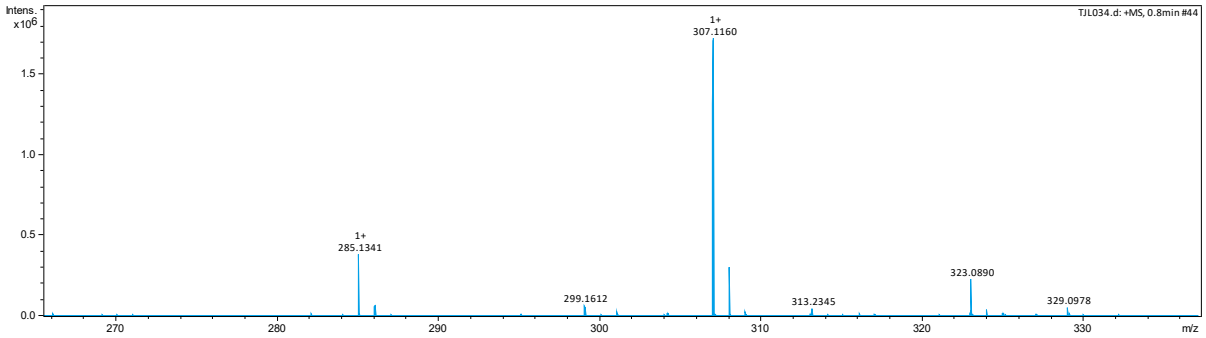
Anexo 200. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **10**



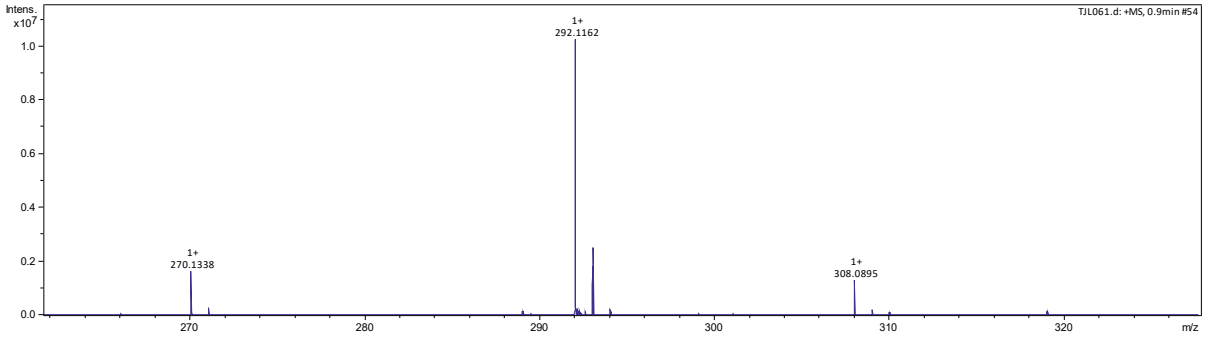
Anexo 201. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **11**



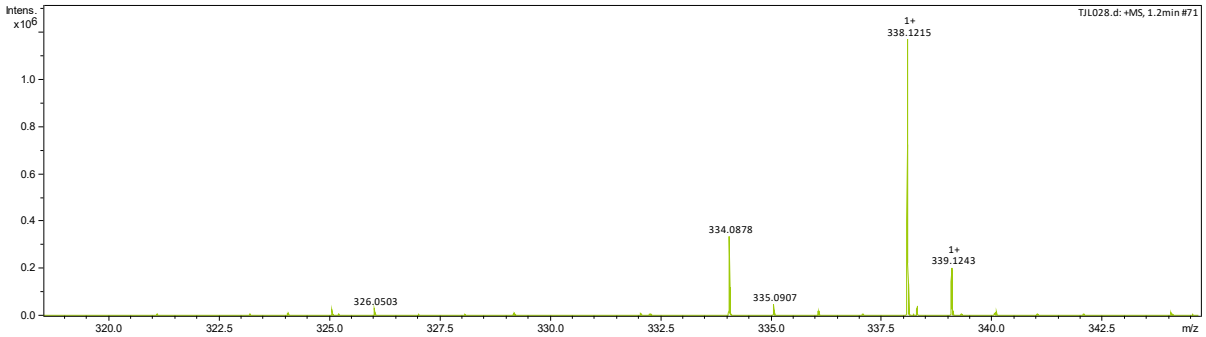
Anexo 202. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **12**



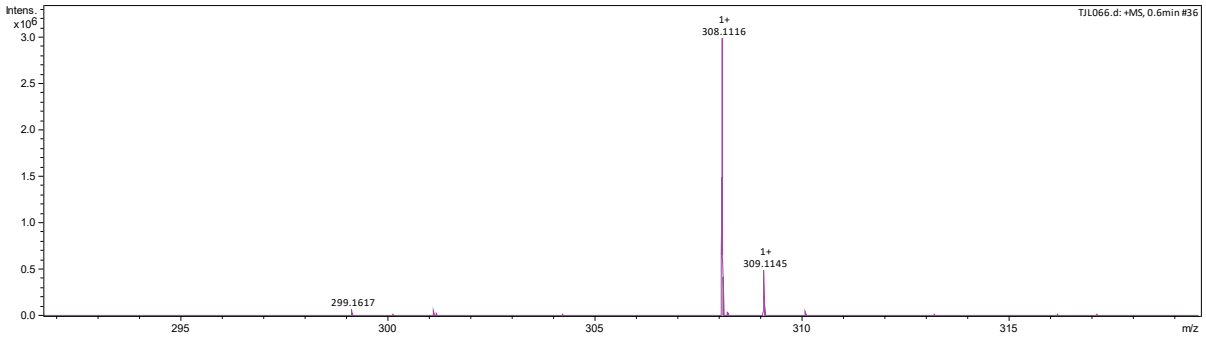
Anexo 203. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **13**



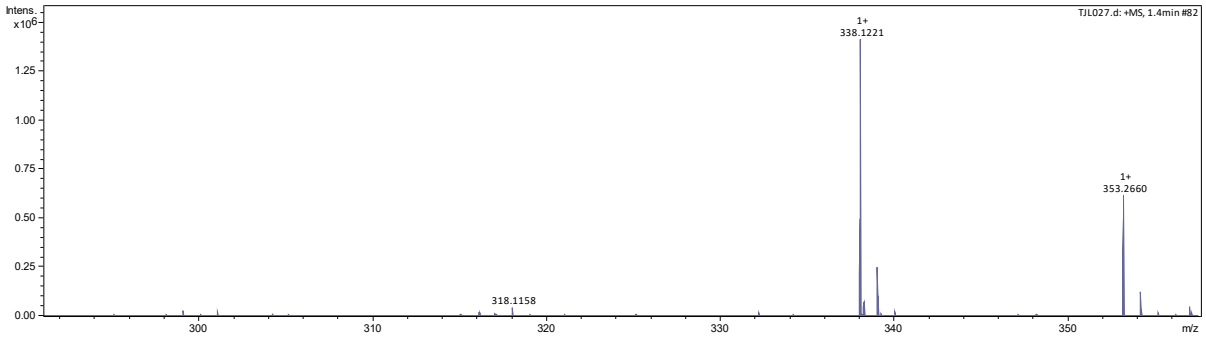
Anexo 204. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **14**



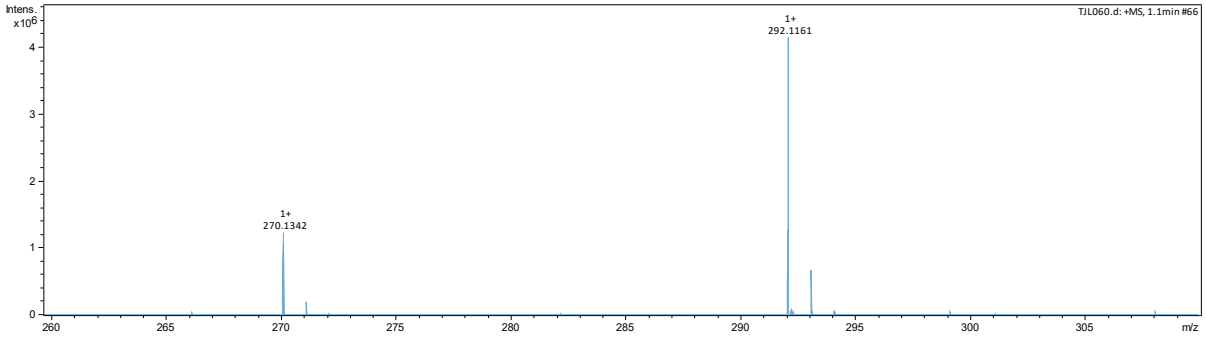
Anexo 205. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **15**



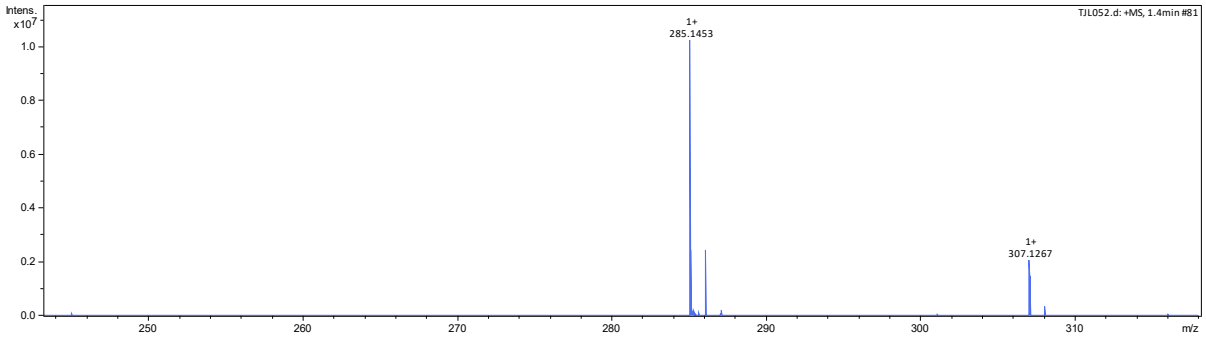
Anexo 206. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **16**



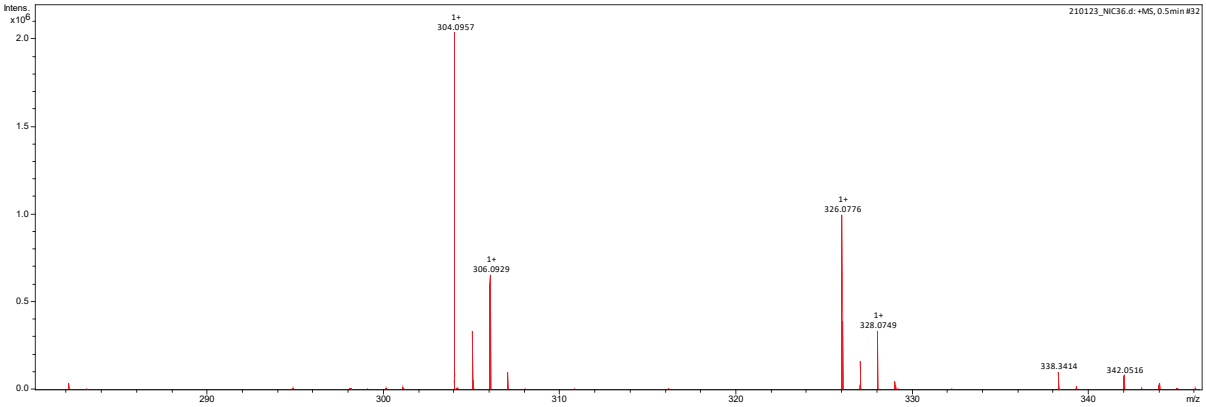
Anexo 207. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **17**



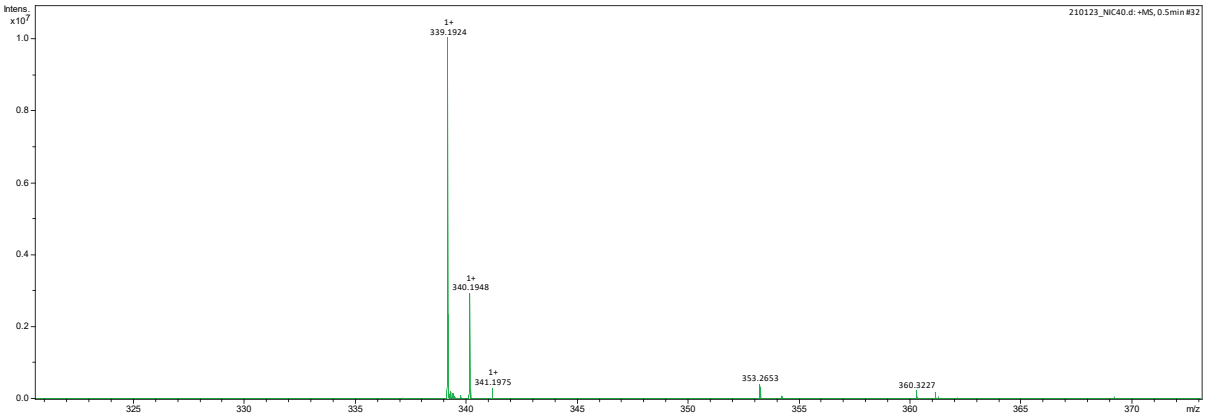
Anexo 208. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **18**



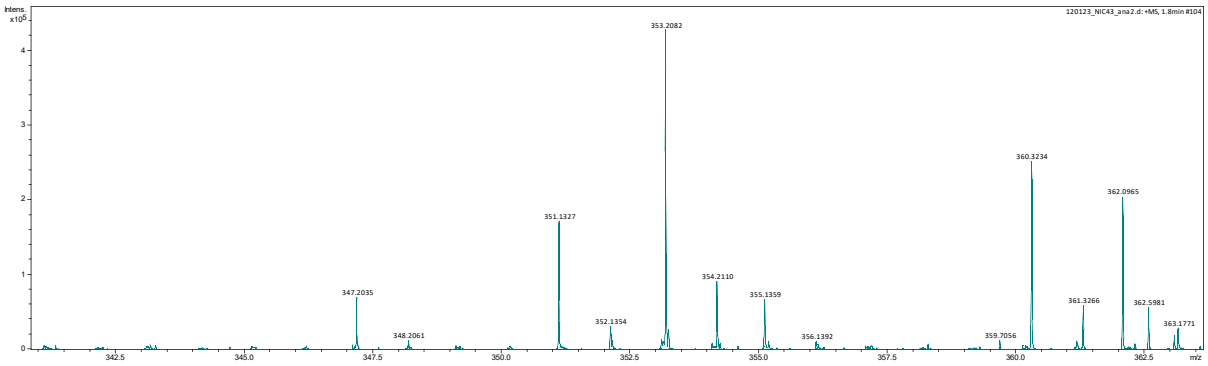
Anexo 209. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **19**



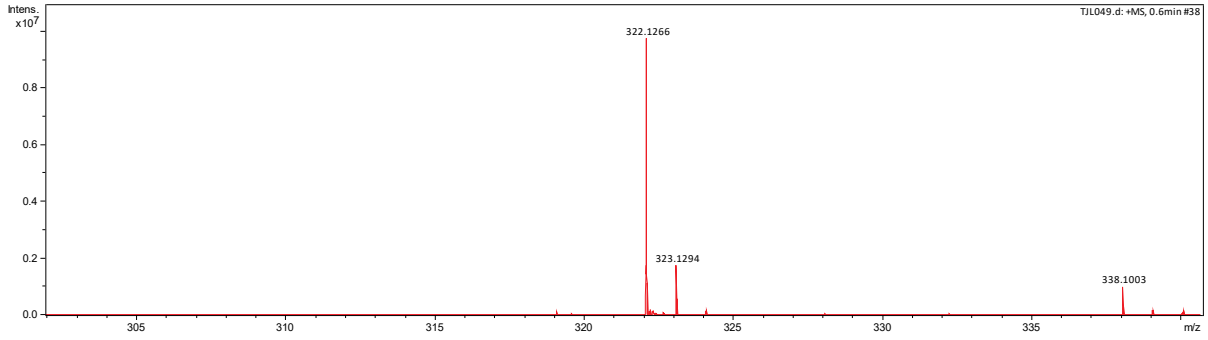
Anexo 210. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **20**



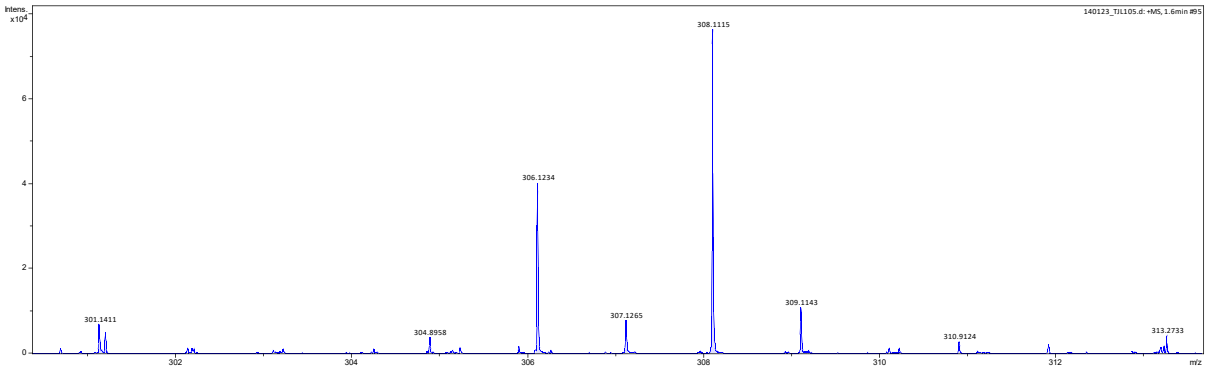
Anexo 211. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **21**



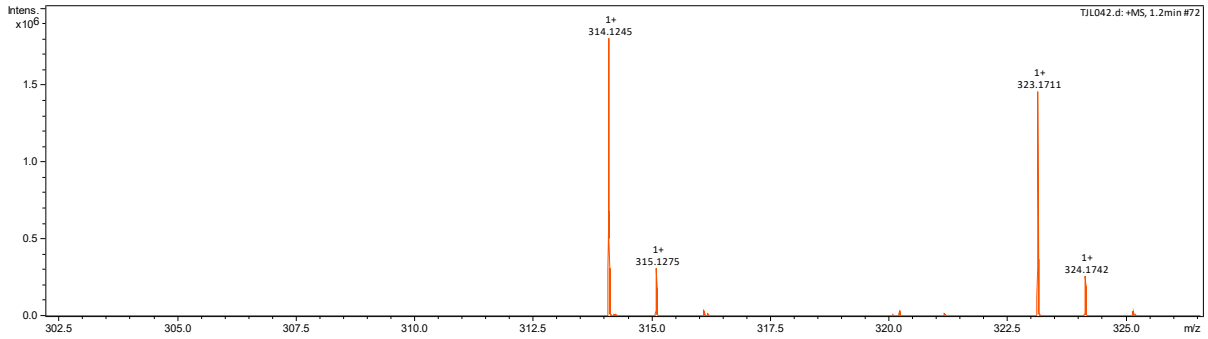
Anexo 212. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **22**



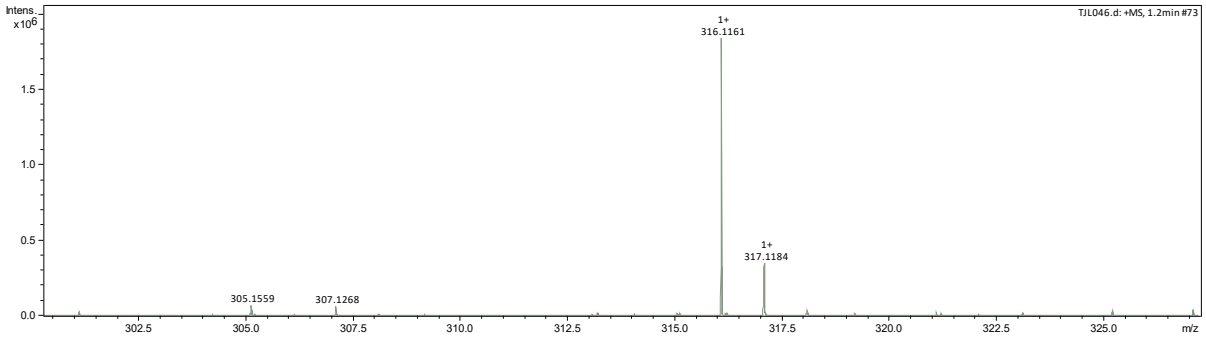
Anexo 213. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **23**



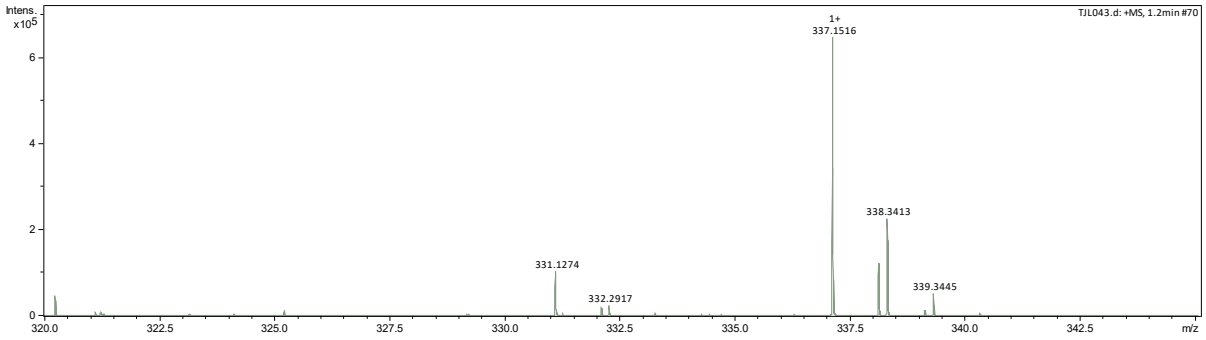
Anexo 214. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **24**



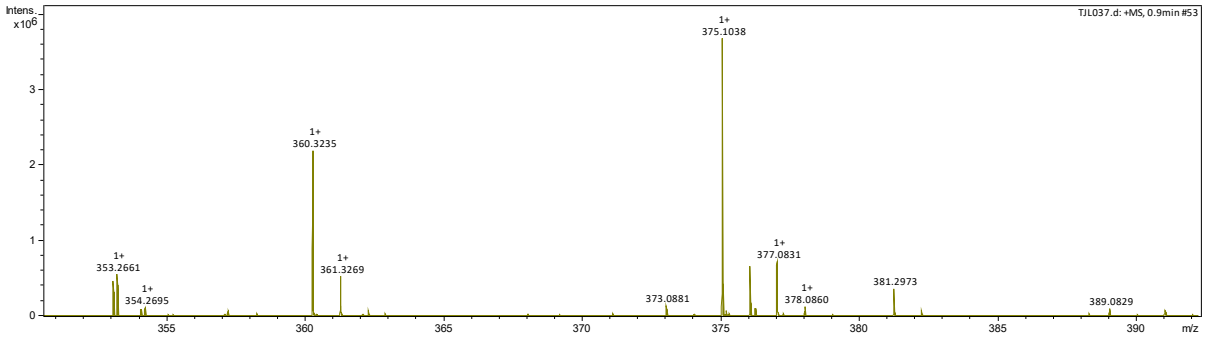
Anexo 215. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **25**



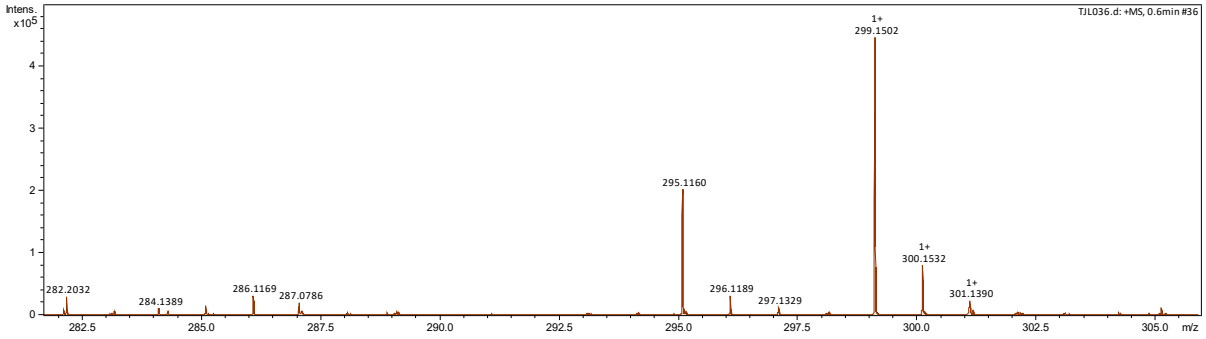
Anexo 216. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **26**



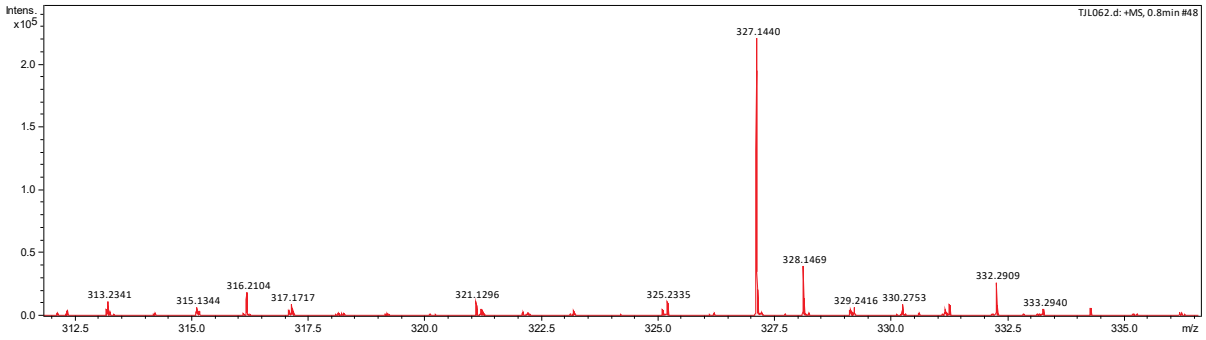
Anexo 217. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **27**



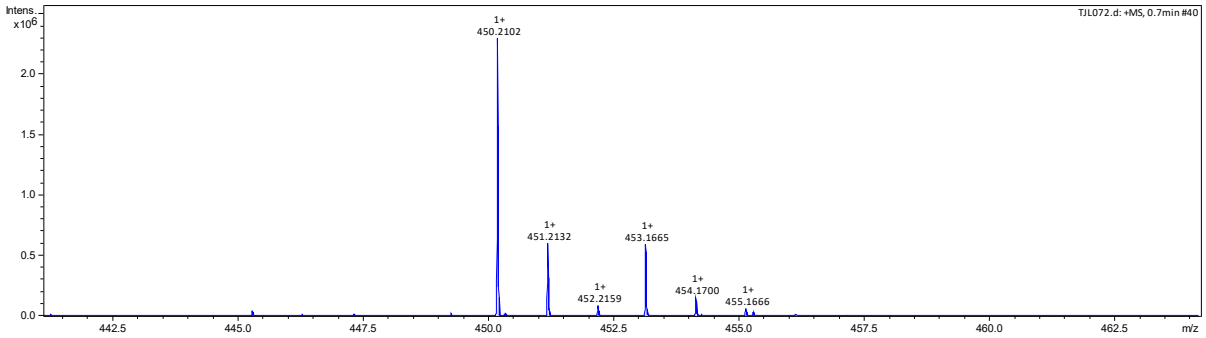
Anexo 218. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **28**



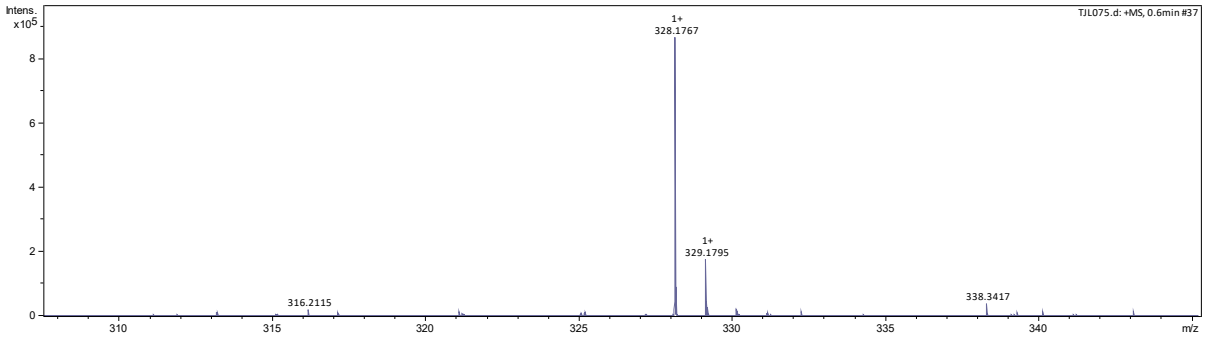
Anexo 219. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **29**



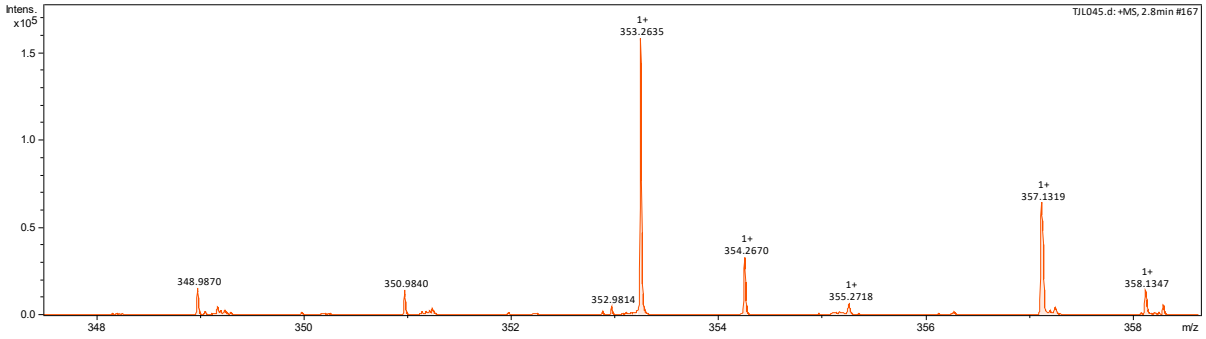
Anexo 220. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **30**



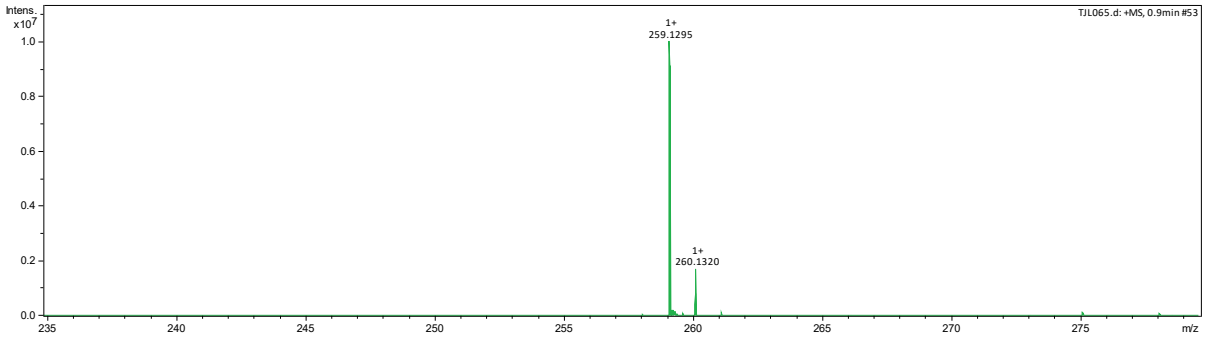
Anexo 221. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **31**



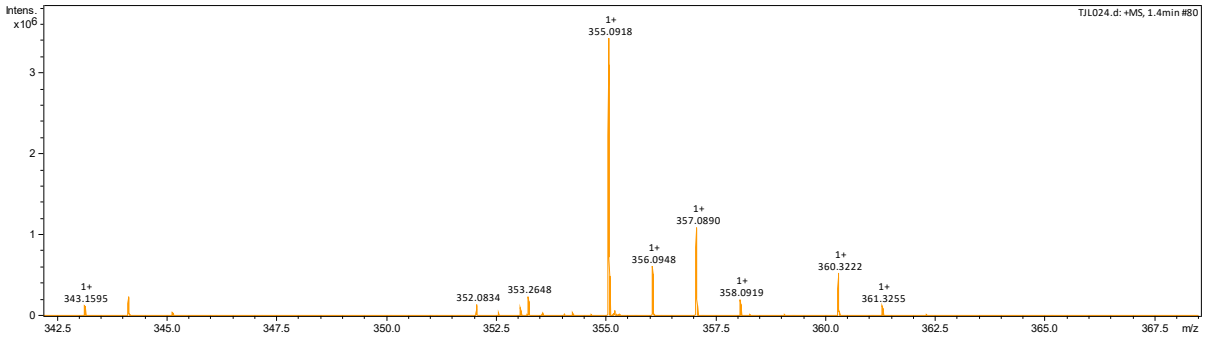
Anexo 222. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **32**



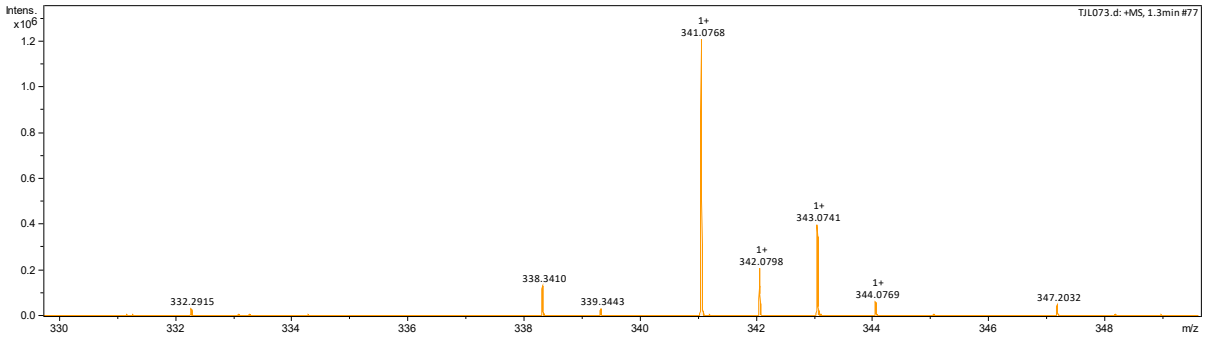
Anexo 223. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **33**



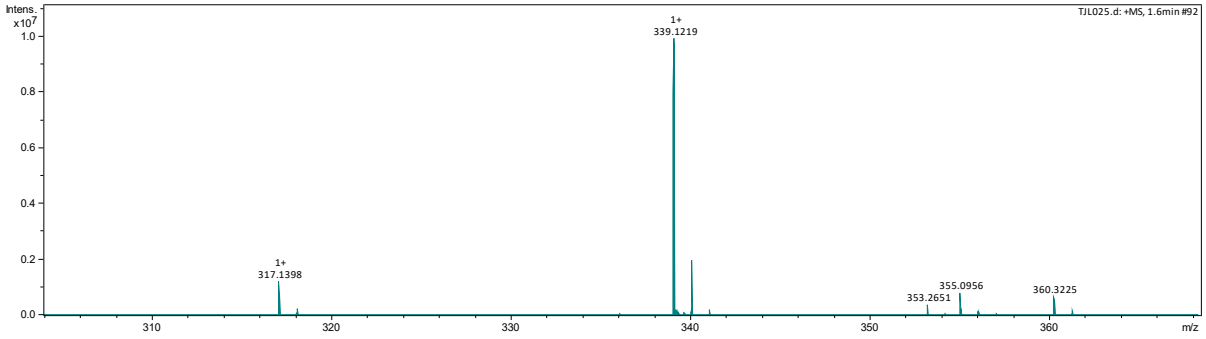
Anexo 224. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **34**



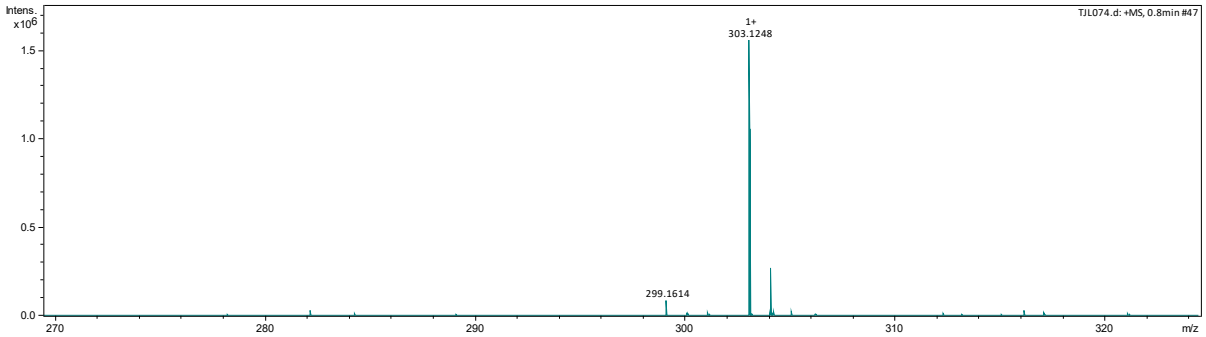
Anexo 225. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **35**



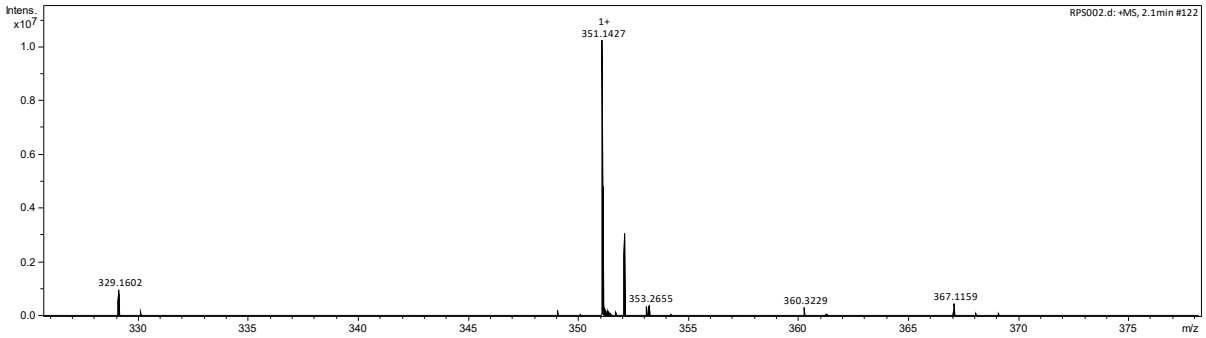
Anexo 226. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **36**



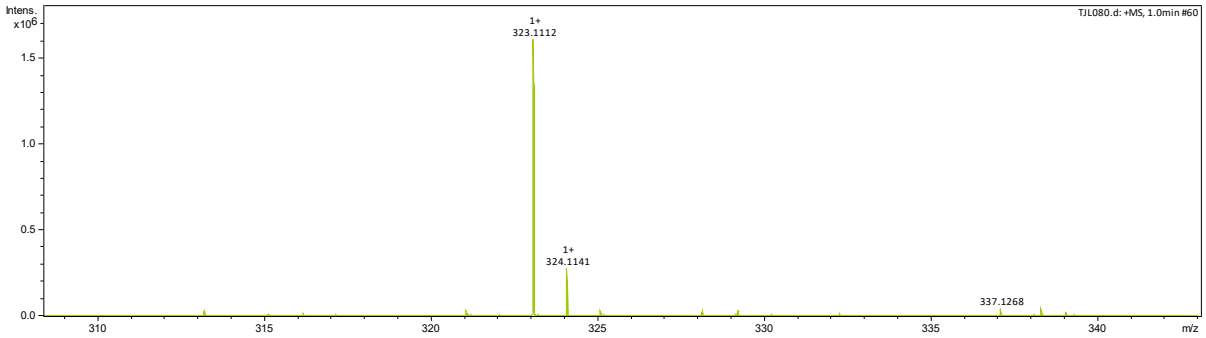
Anexo 227. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **37**



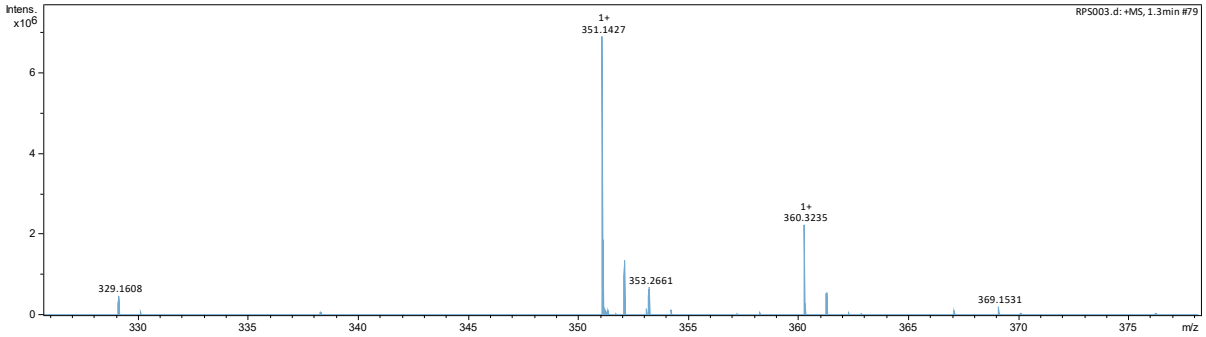
Anexo 228. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **38**



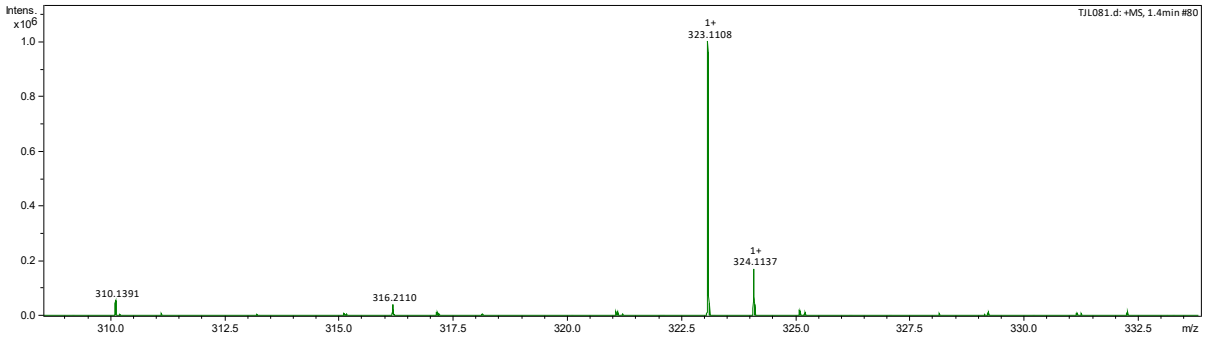
Anexo 229. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **39**



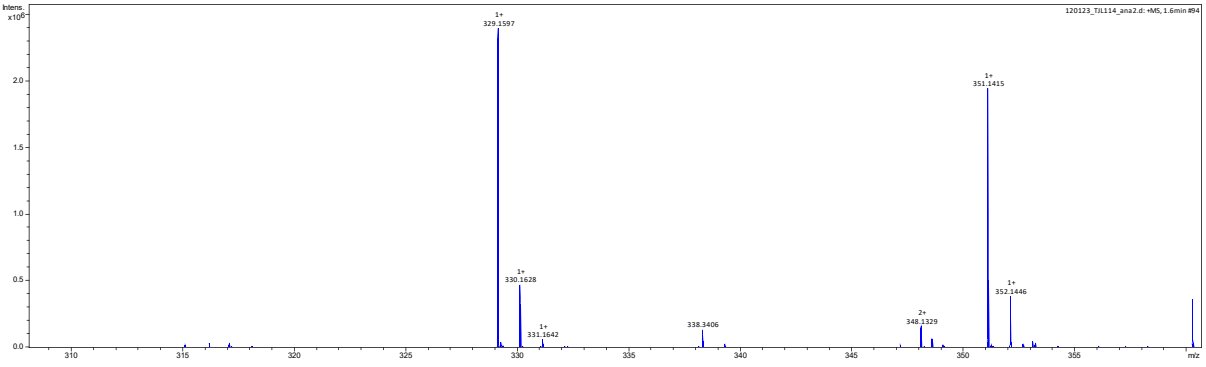
Anexo 230. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **40**



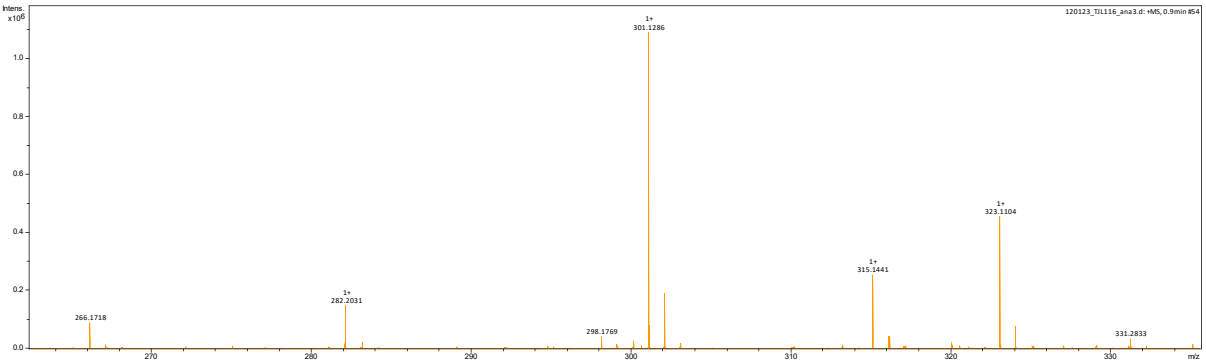
Anexo 231. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **41**



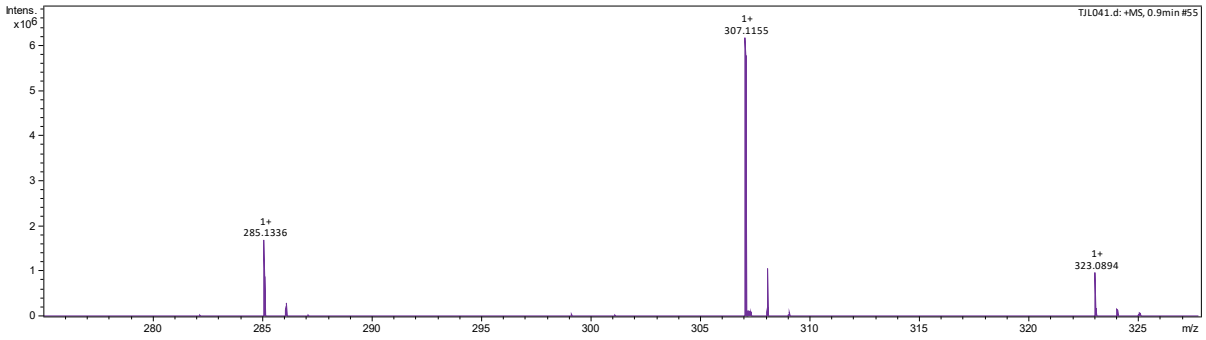
Anexo 232. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **42**



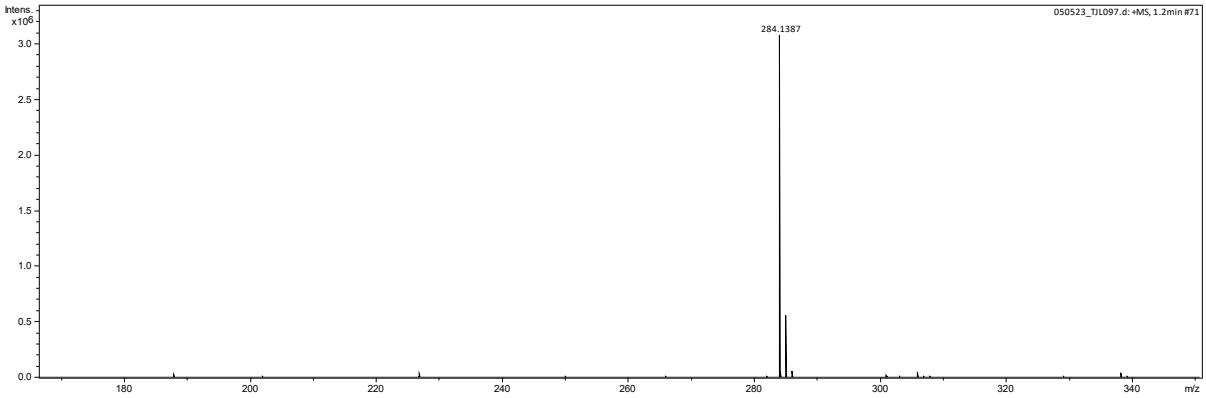
Anexo 233. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **43**



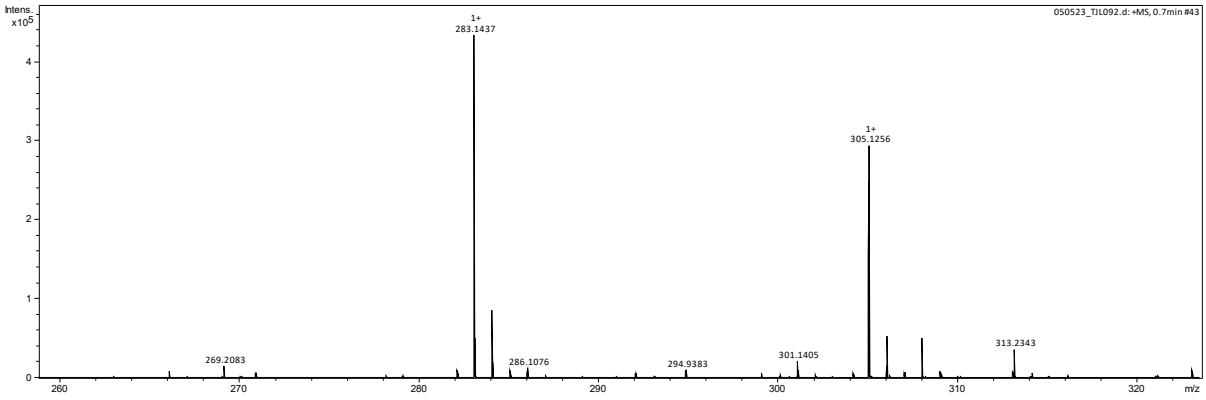
Anexo 234. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **44**



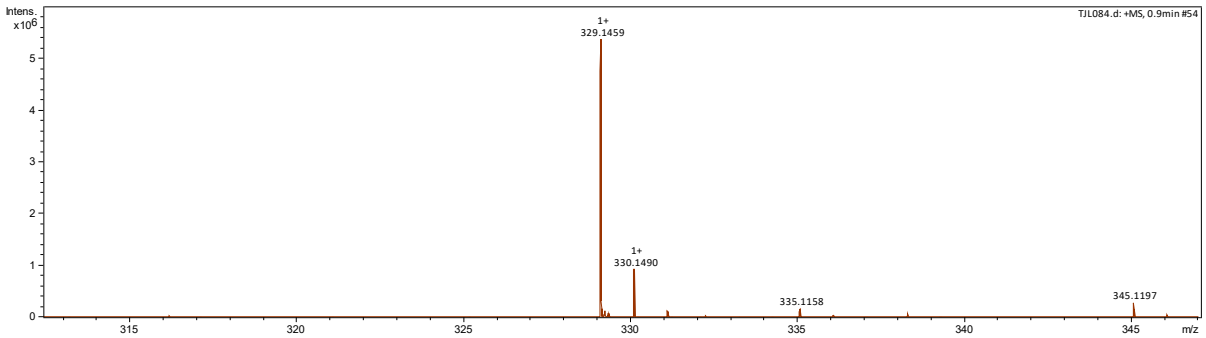
Anexo 235. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **53**



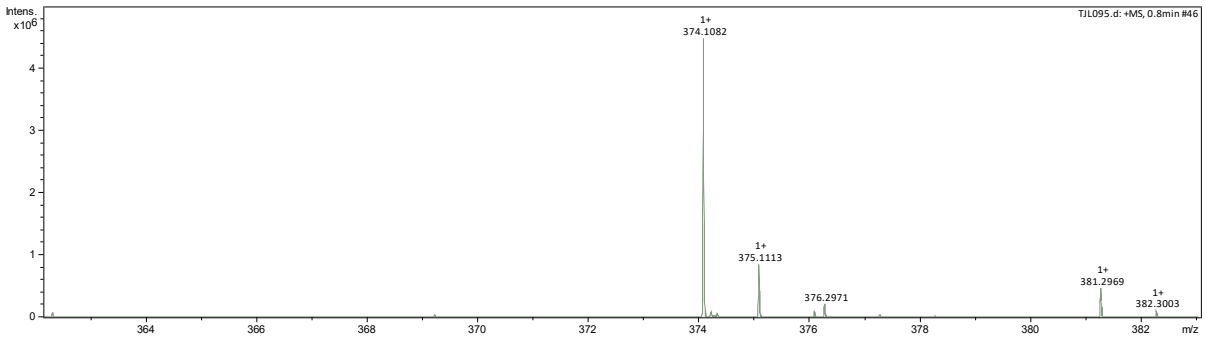
Anexo 236. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **54**



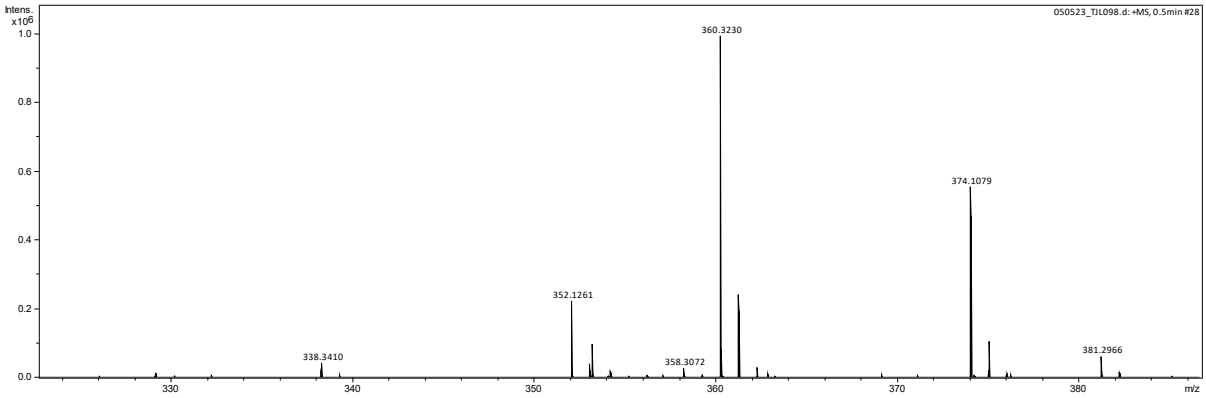
Anexo 237. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **55**



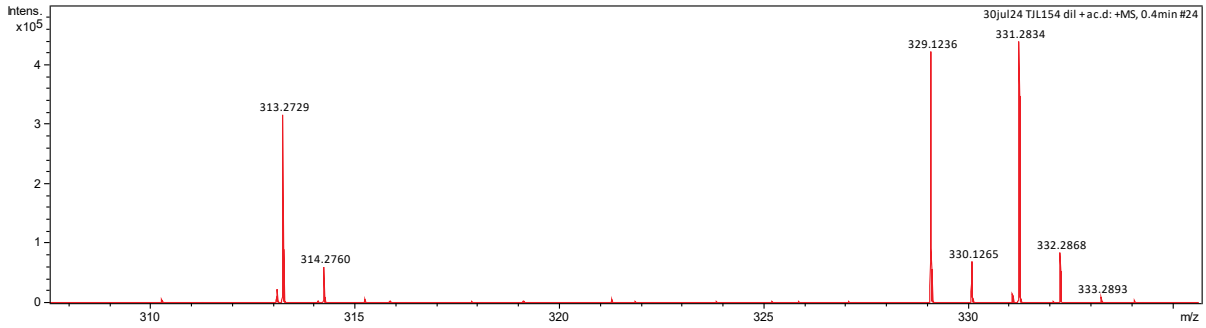
Anexo 238. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **56**



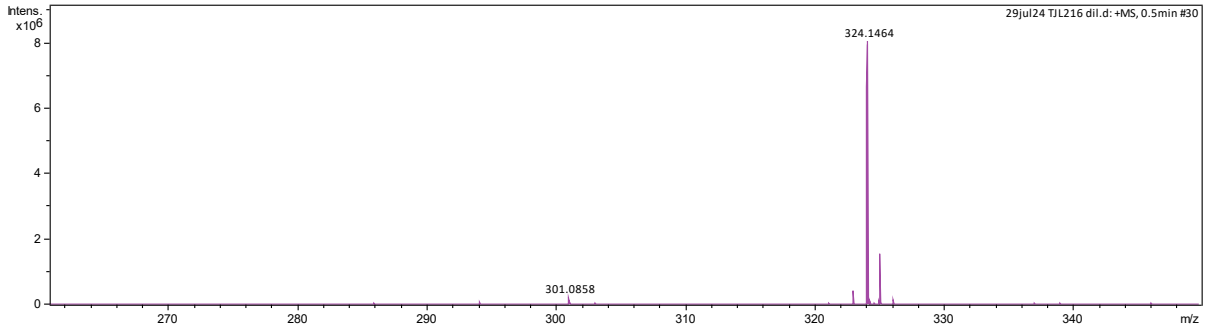
Anexo 239. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **57**



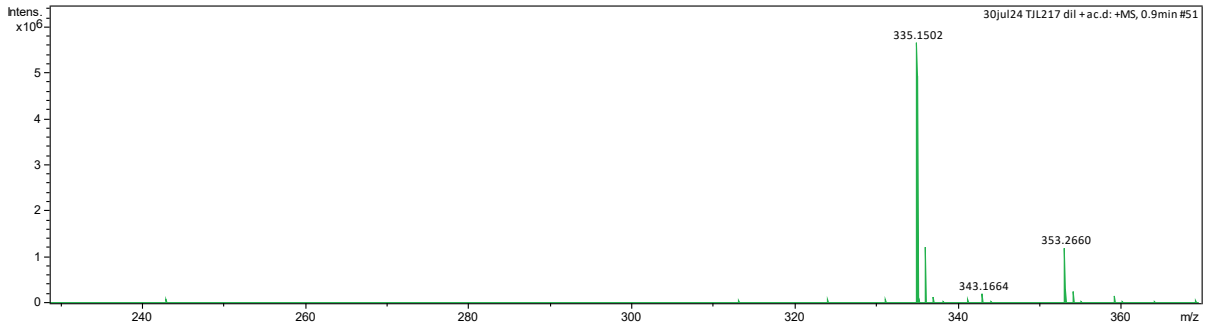
Anexo 240. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **58**



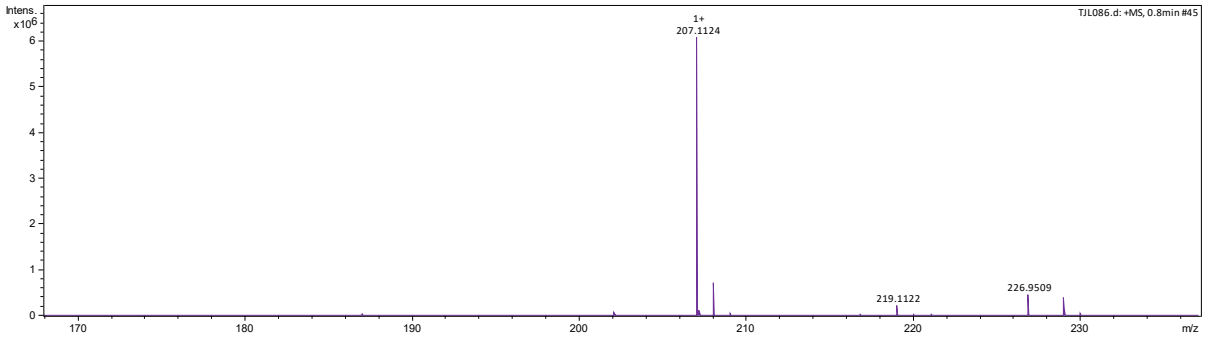
Anexo 241. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **59**



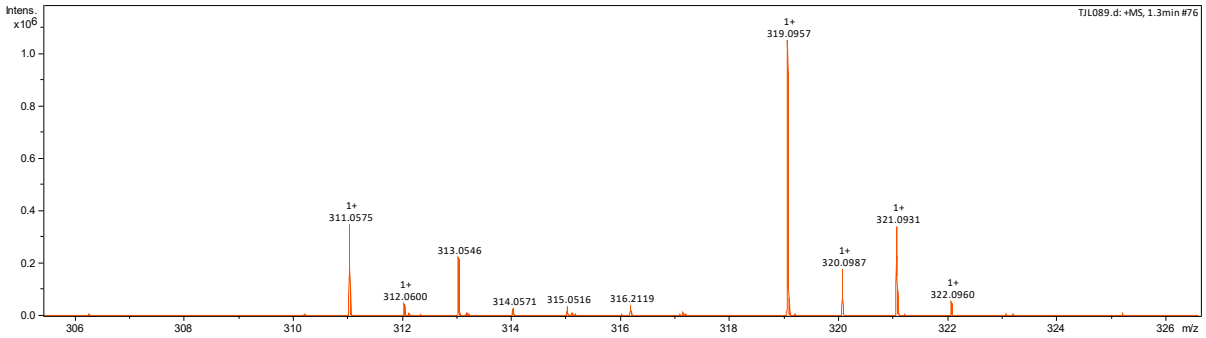
Anexo 242. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **60**



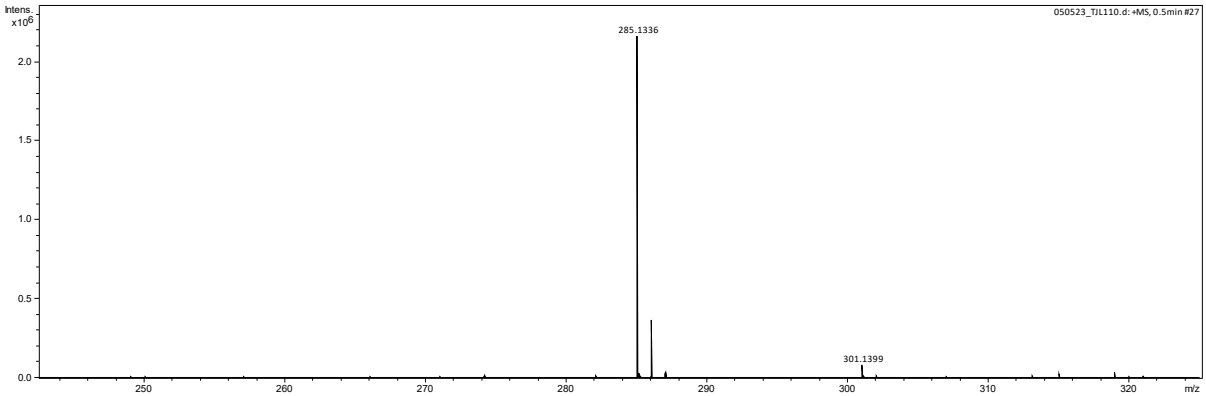
Anexo 243. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **61**



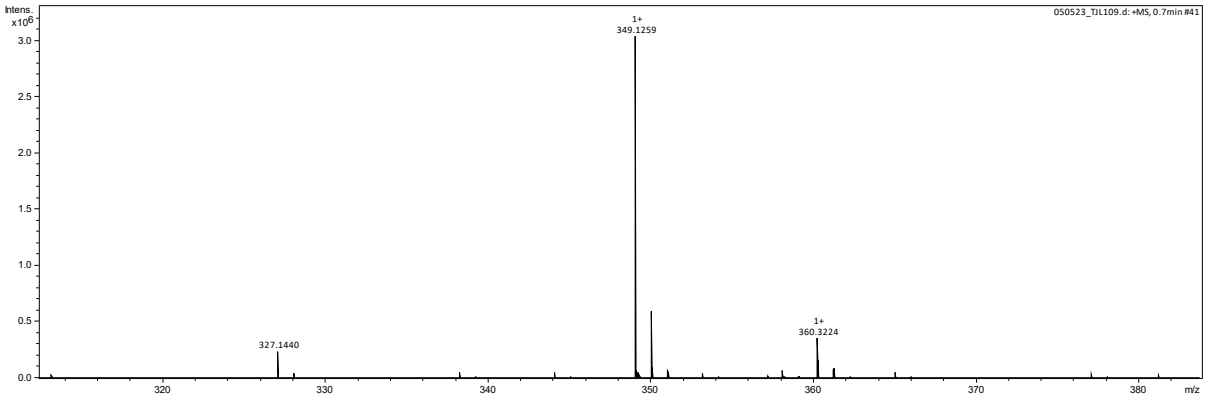
Anexo 244. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **62**



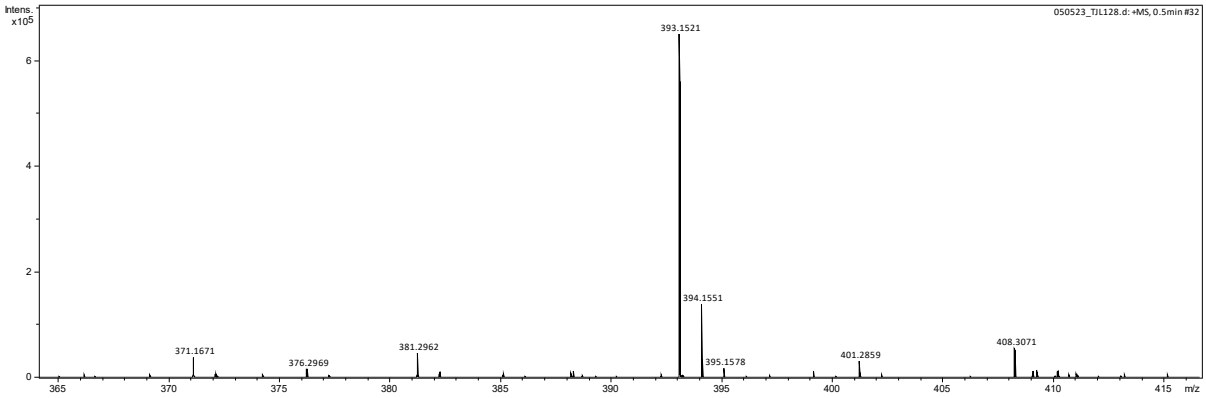
Anexo 245. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **63**



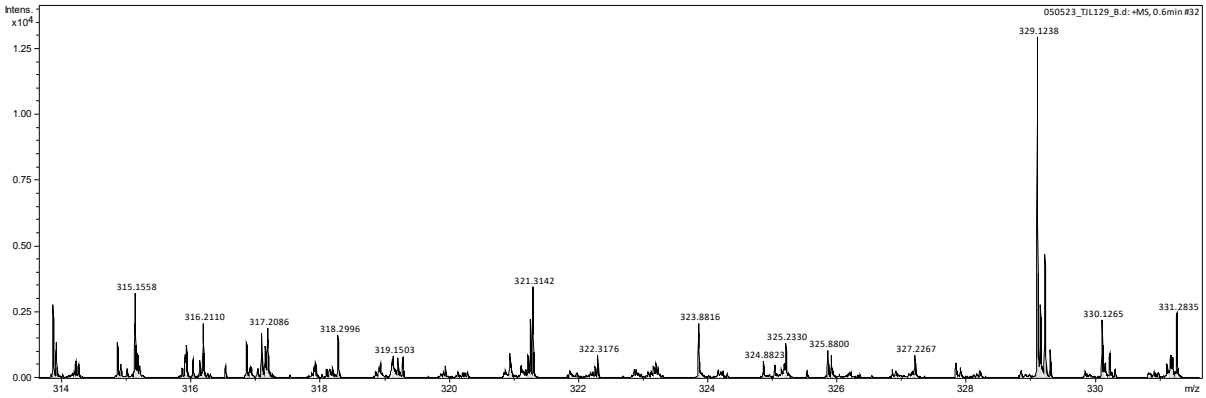
Anexo 246. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **64**



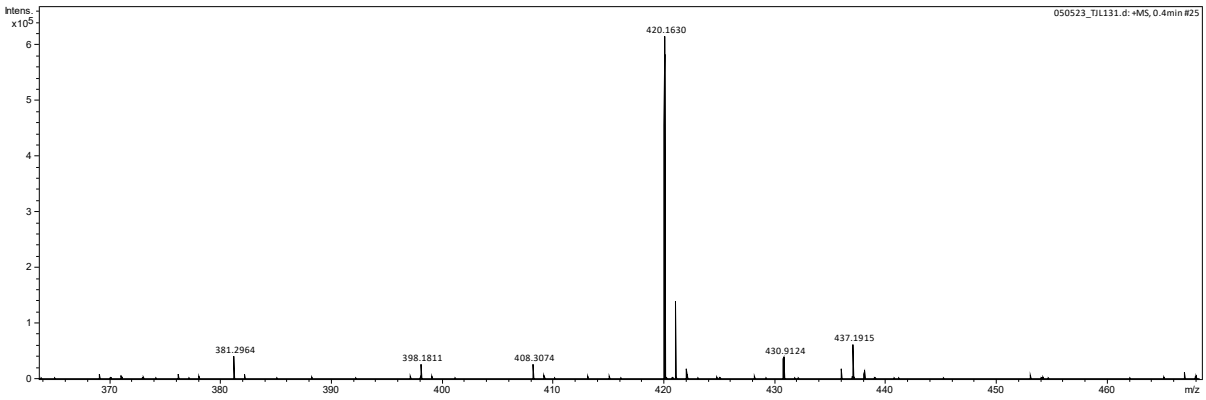
Anexo 247. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **67**



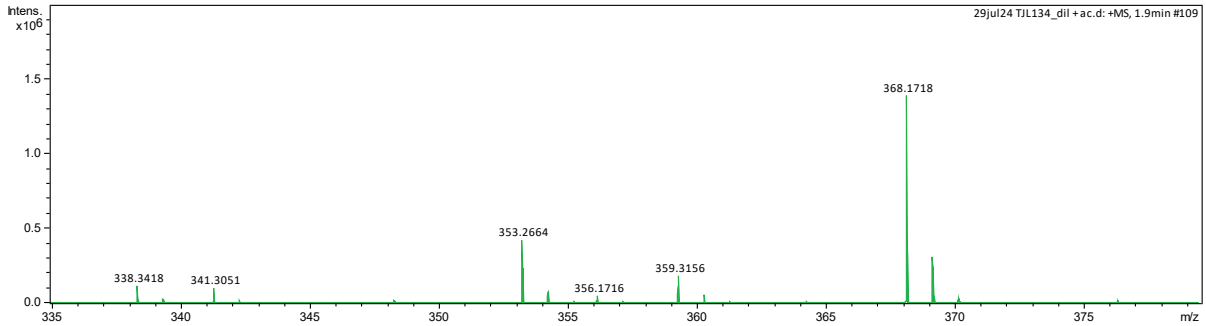
Anexo 248. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **70**



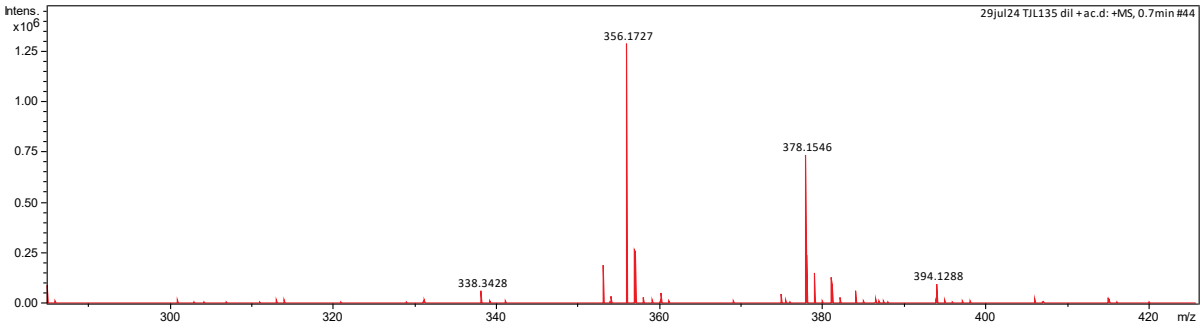
Anexo 249. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **71**



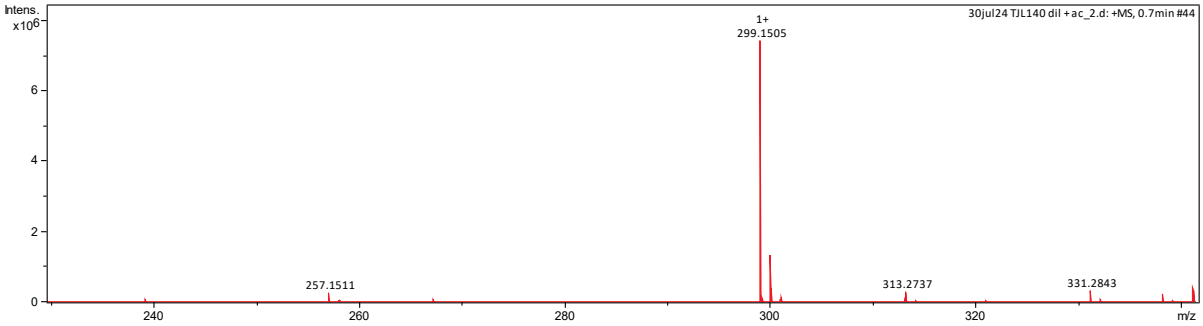
Anexo 250. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **72**



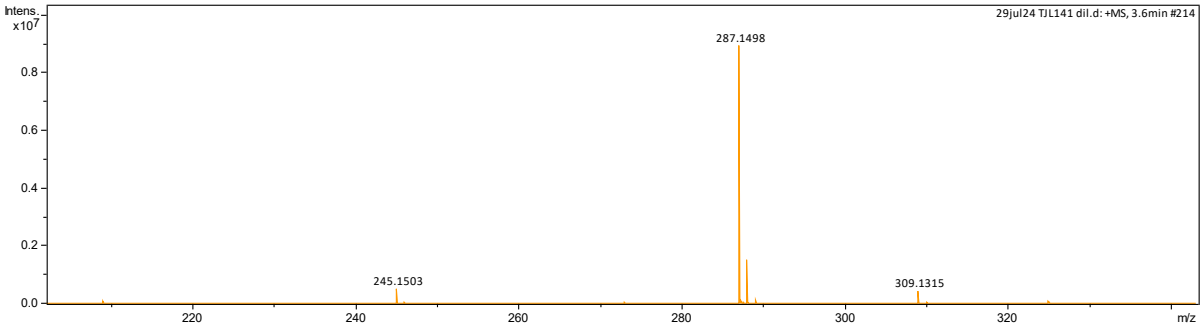
Anexo 251. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **74**



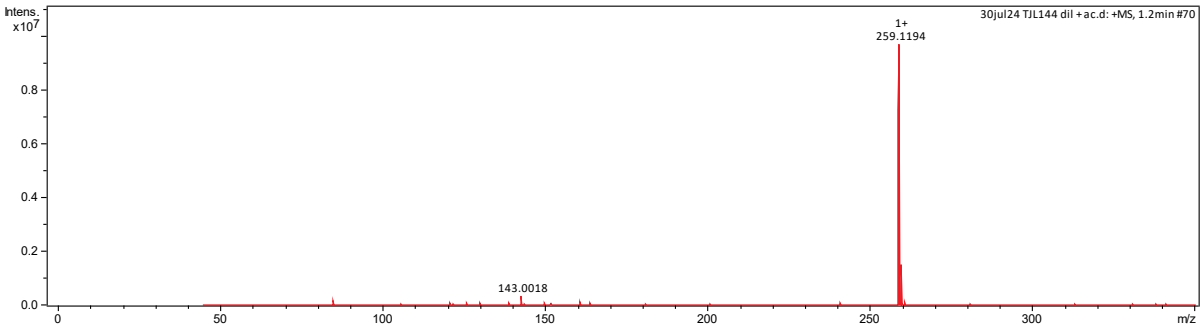
Anexo 252. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **75**



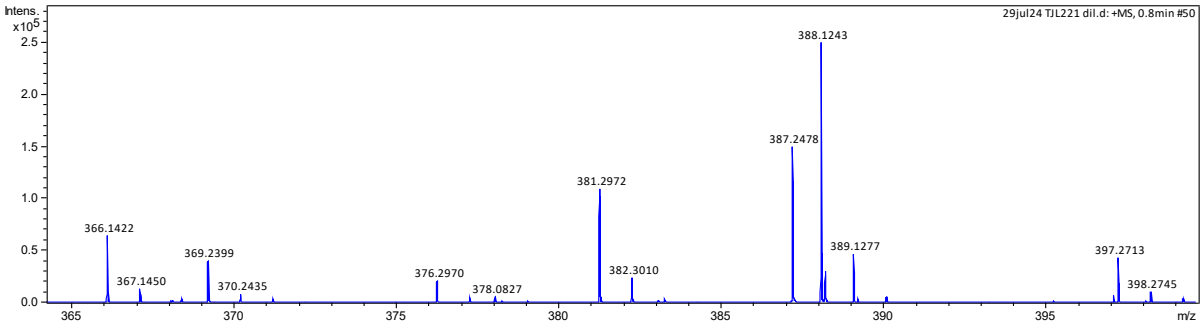
Anexo 253. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **79**



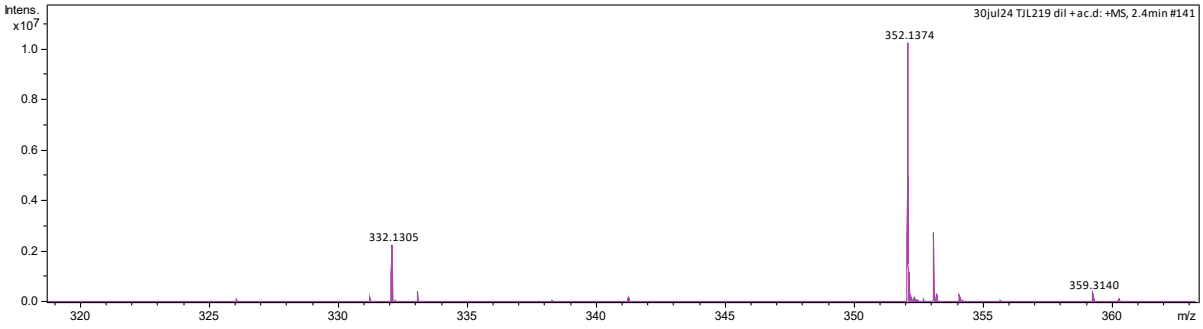
Anexo 254. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **80**



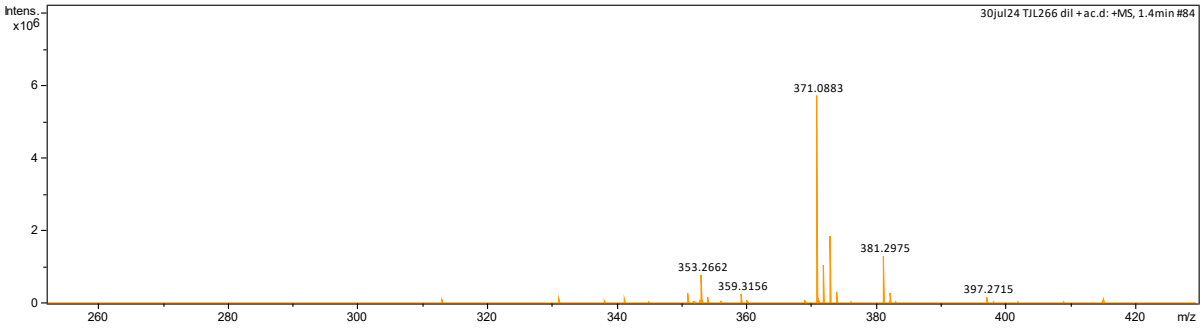
Anexo 255. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **81**



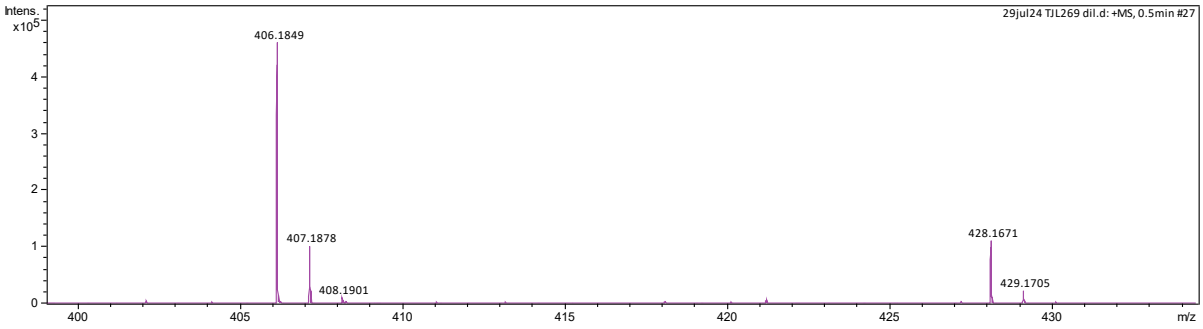
Anexo 256. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **82**



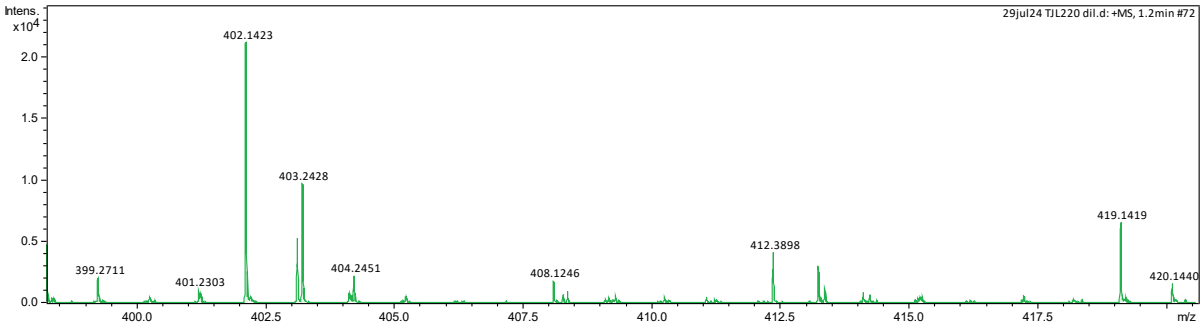
Anexo 257. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **83**



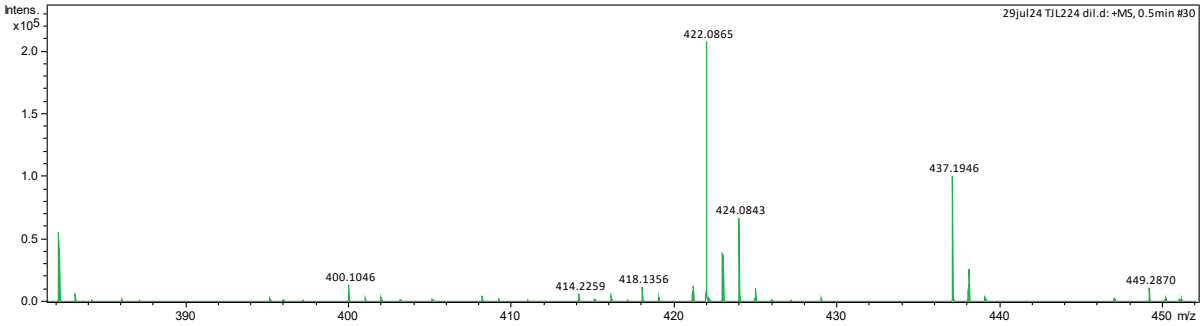
Anexo 258. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **84**



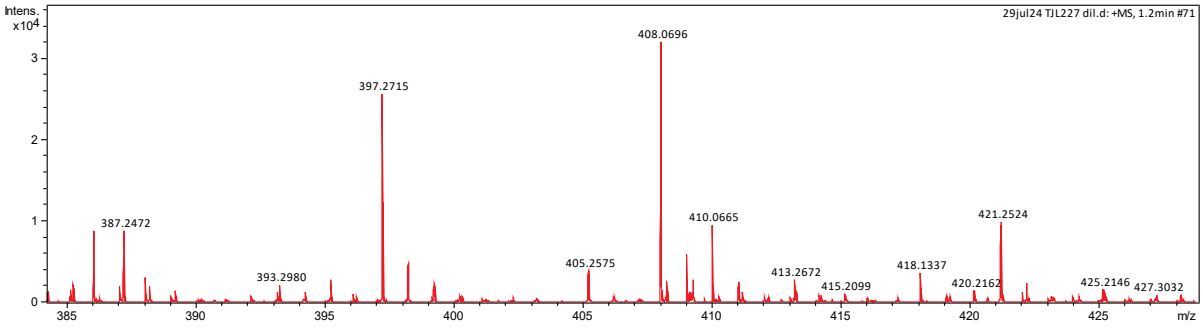
Anexo 259. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **85**



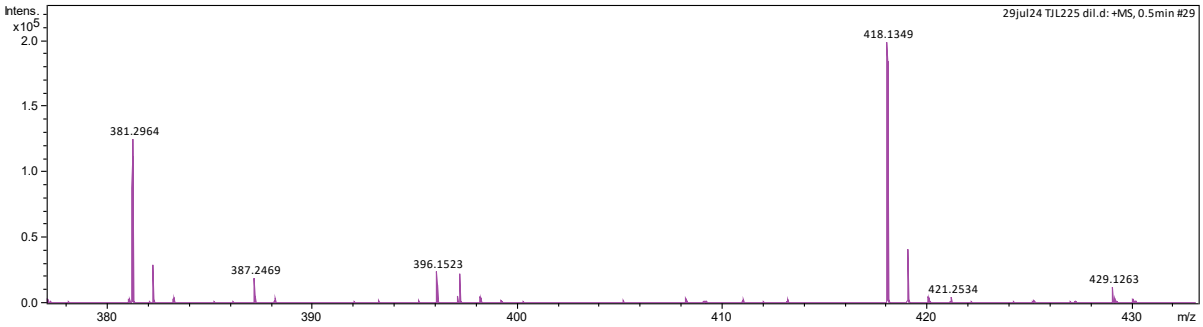
Anexo 260. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **86**



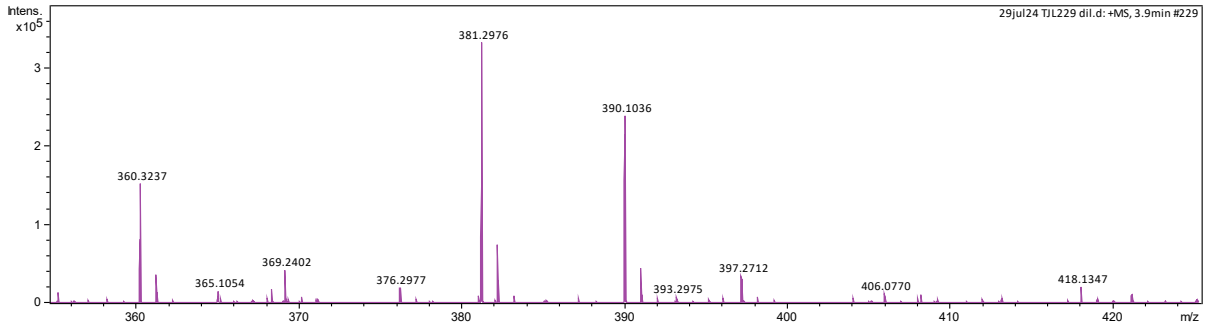
Anexo 261. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **87**



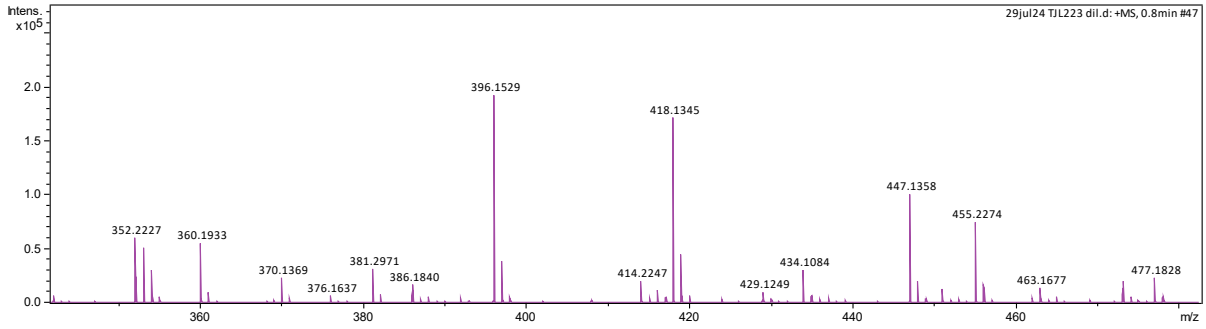
Anexo 262. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **88**



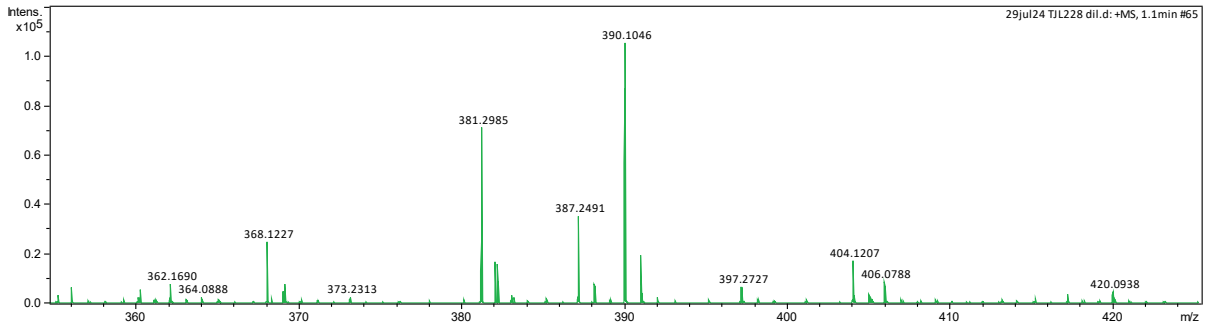
Anexo 263. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **89**



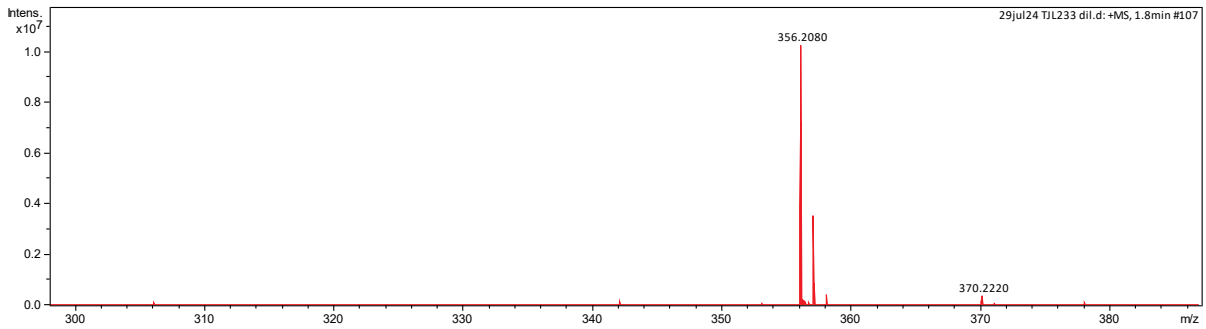
Anexo 264. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **90**



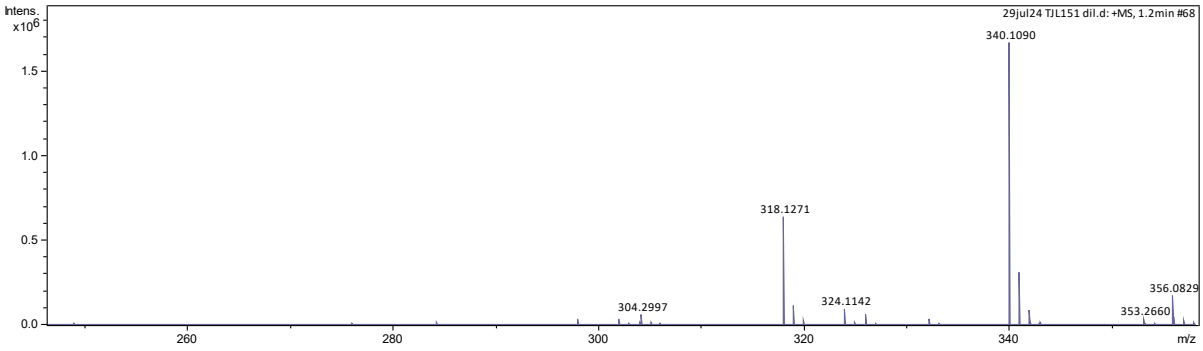
Anexo 265. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **91**



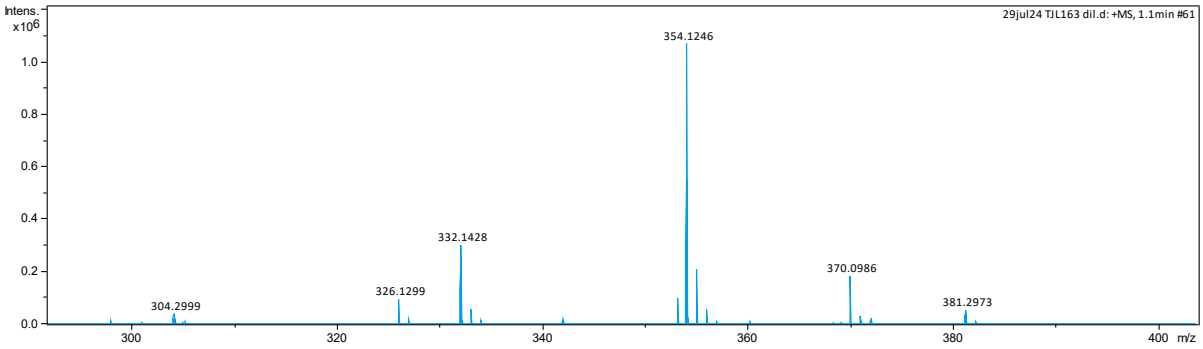
Anexo 266. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **92**



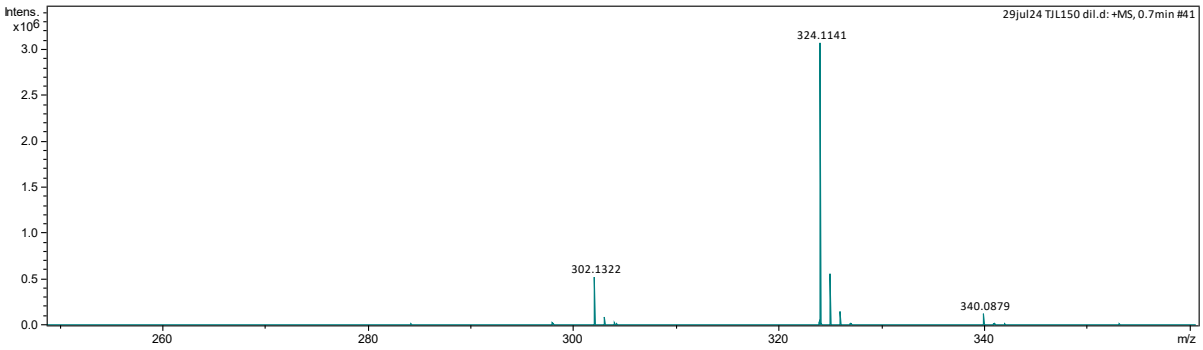
Anexo 267. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **93**



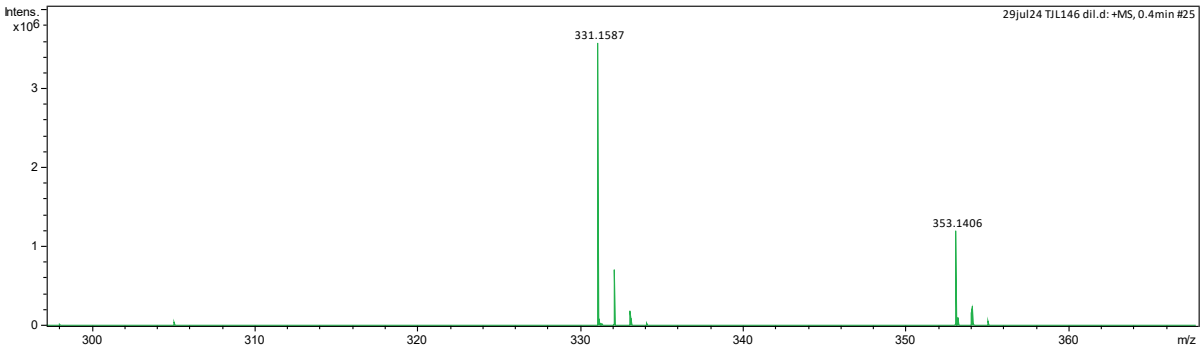
Anexo 268. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **94**



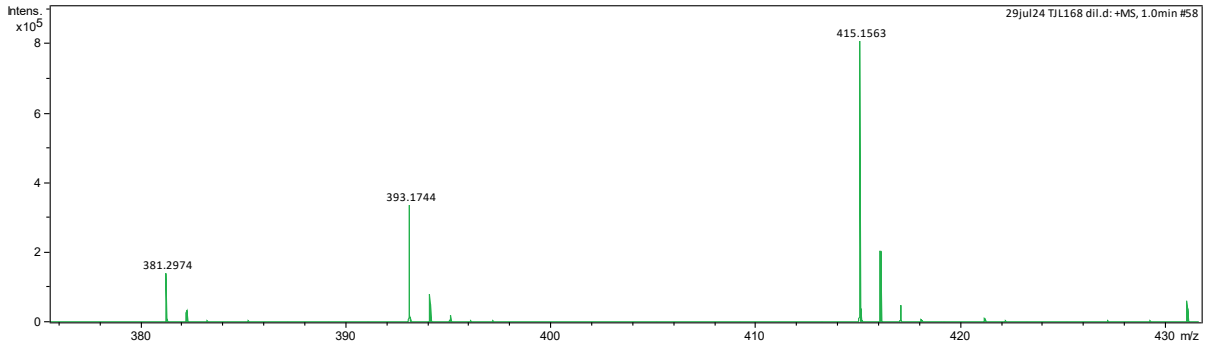
Anexo 269. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **95**



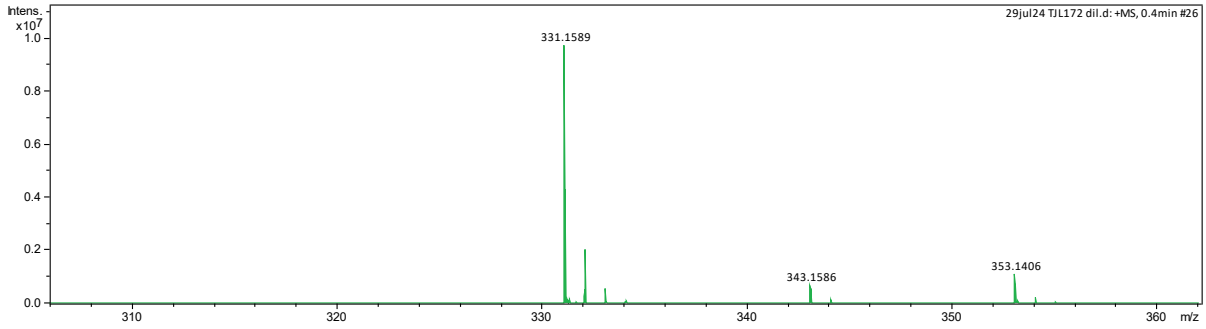
Anexo 270. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **96**



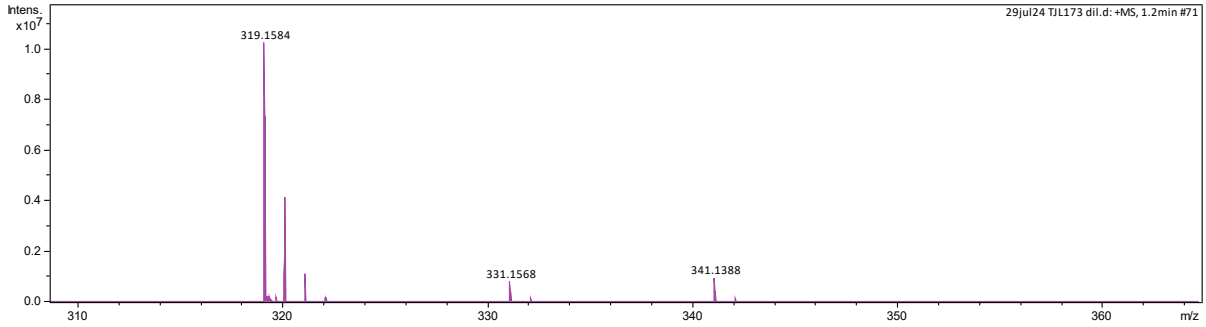
Anexo 271. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **97**



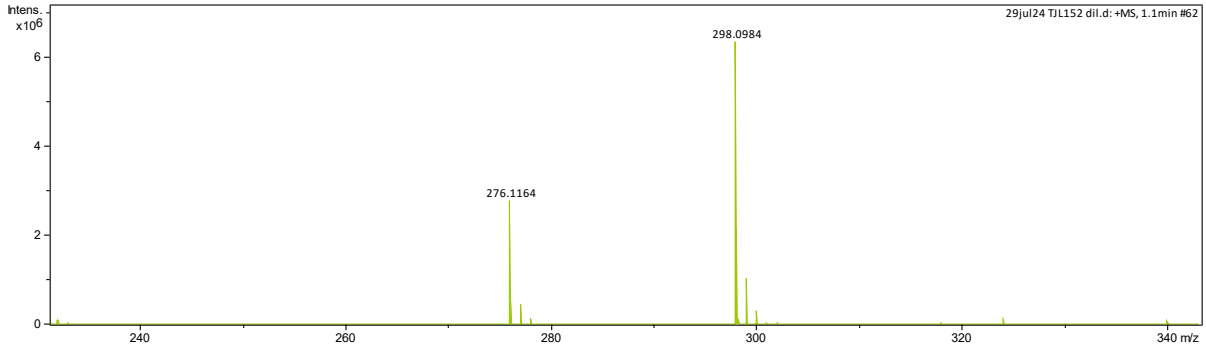
Anexo 272. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **98**



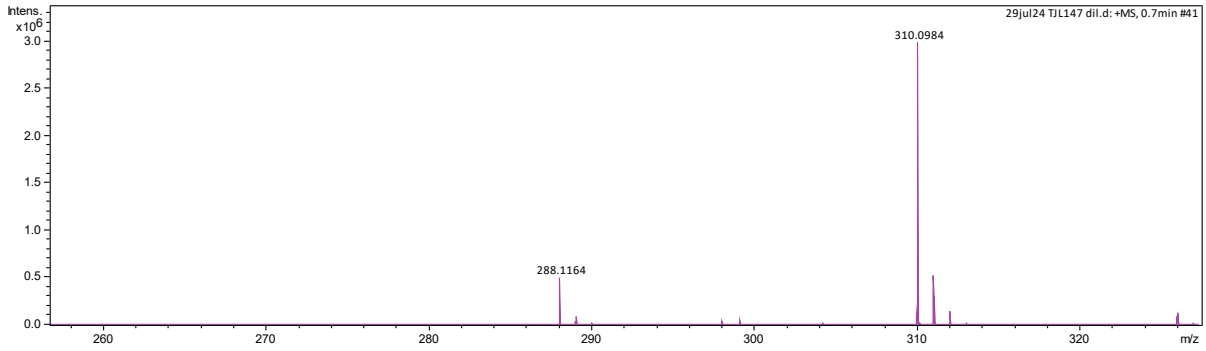
Anexo 273. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **99**



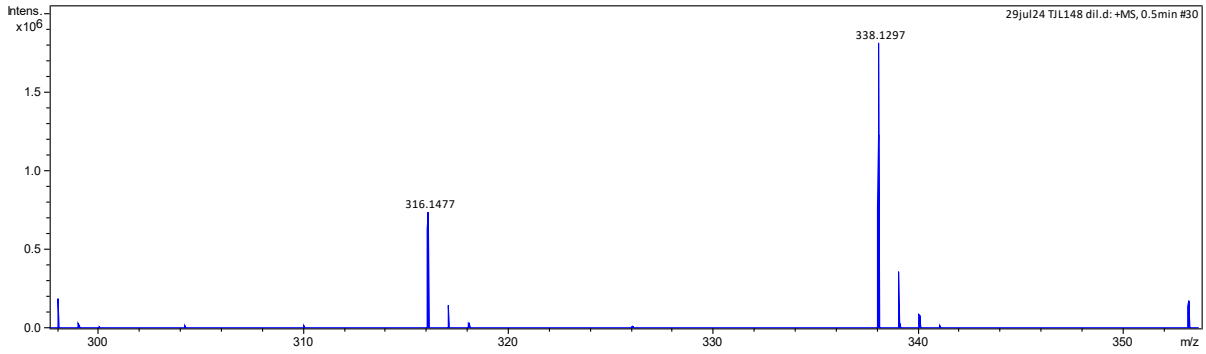
Anexo 274. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **100**



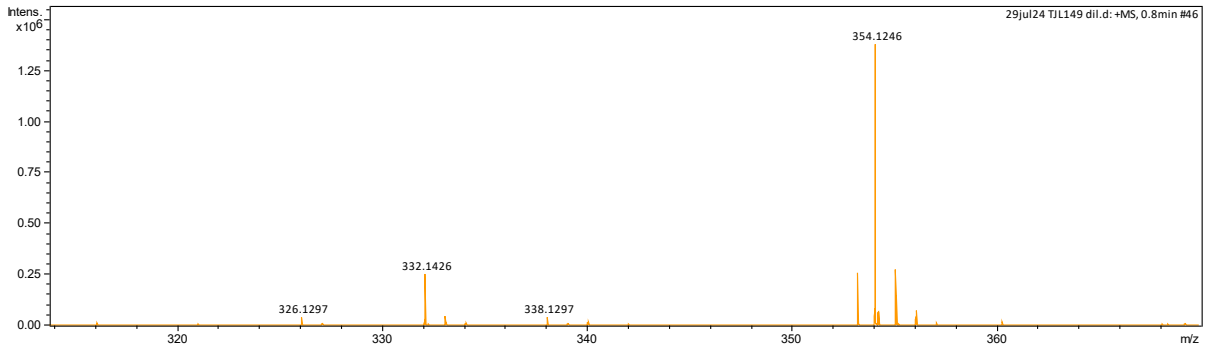
Anexo 275. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **101**



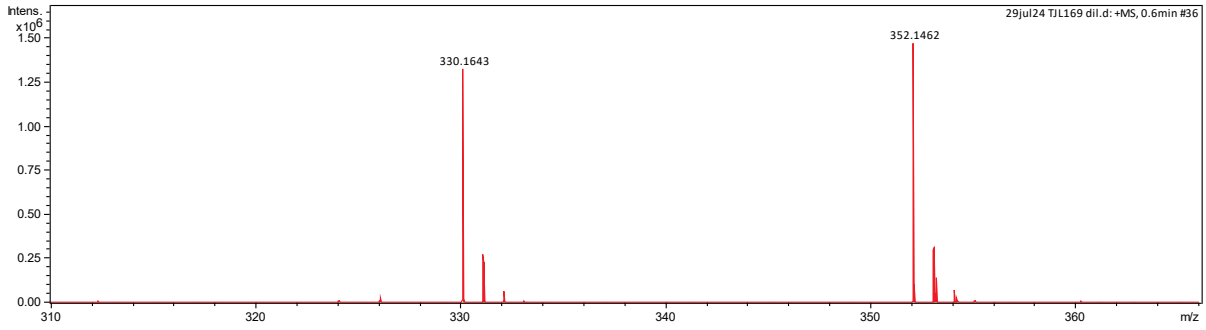
Anexo 276. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **102**



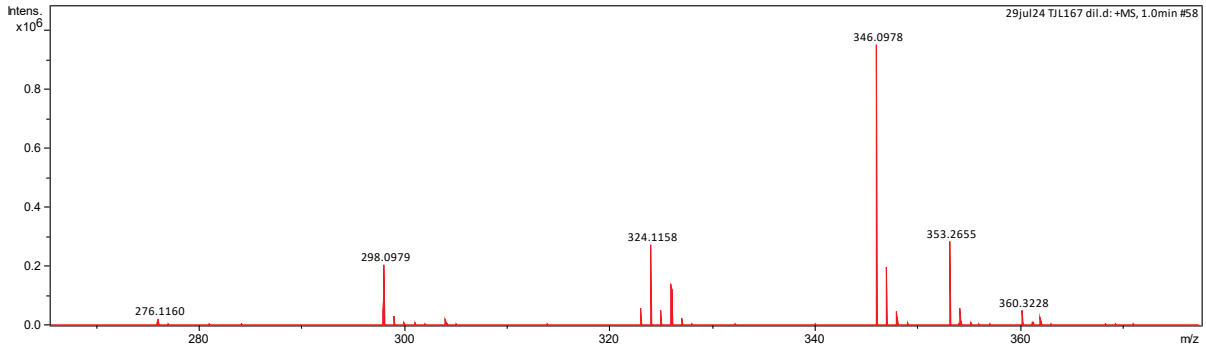
Anexo 277. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **103**



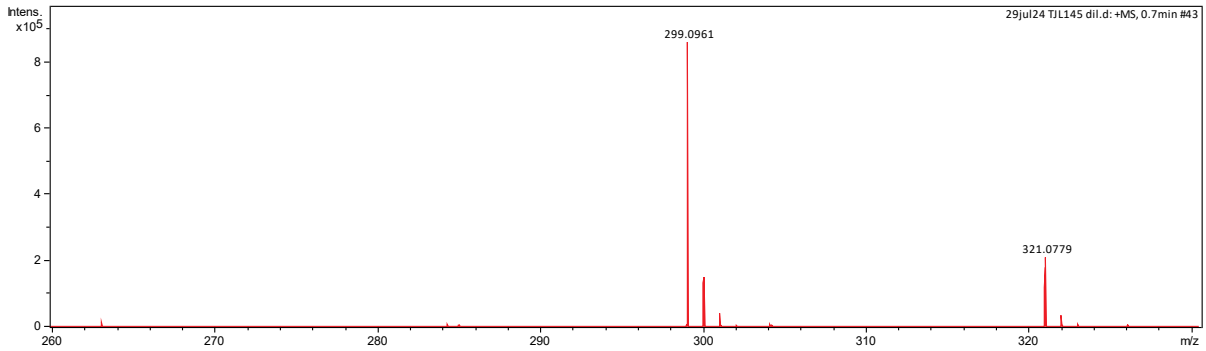
Anexo 278. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **104**



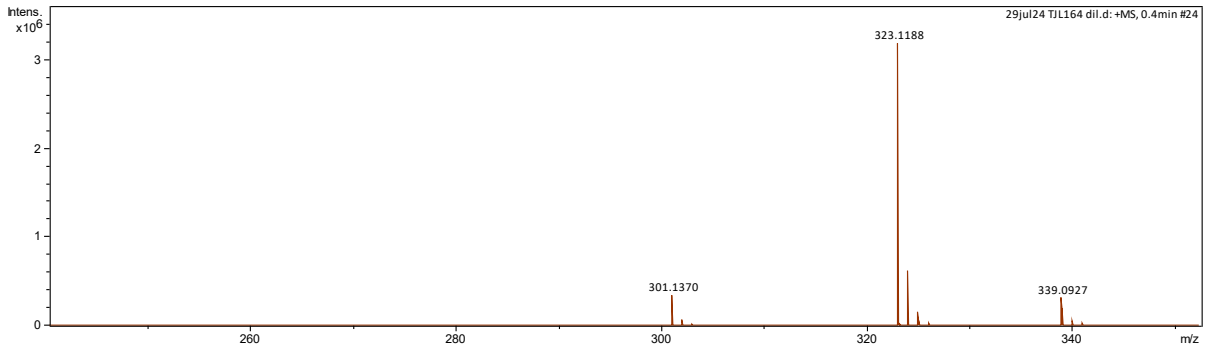
Anexo 279. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **105**



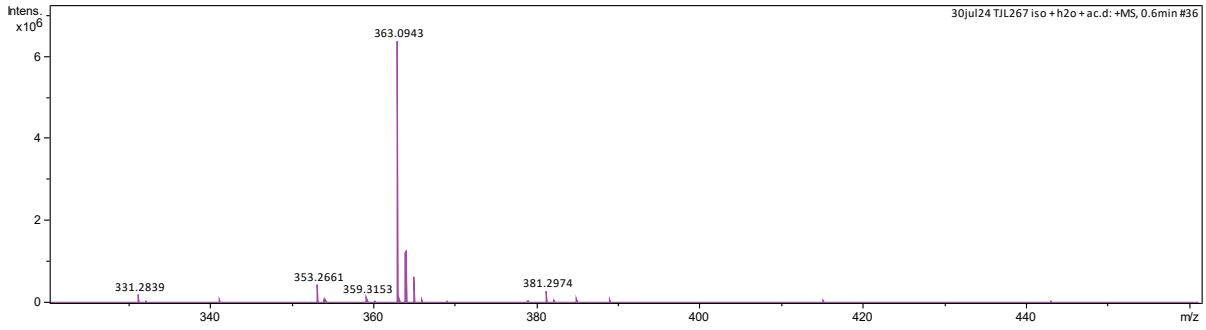
Anexo 280. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **106**



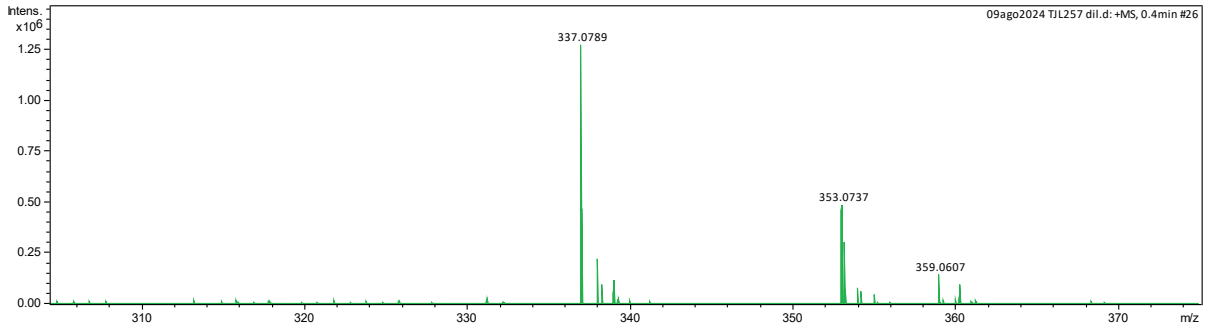
Anexo 281. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **107**



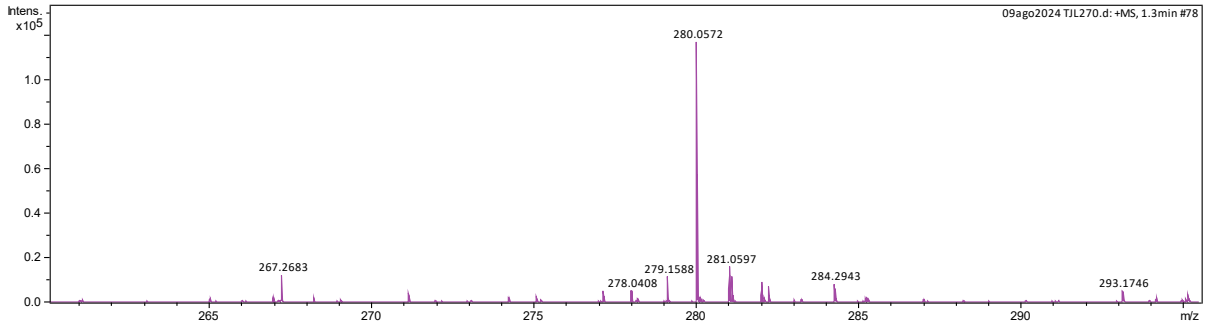
Anexo 282. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **108**



Anexo 283. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **117**

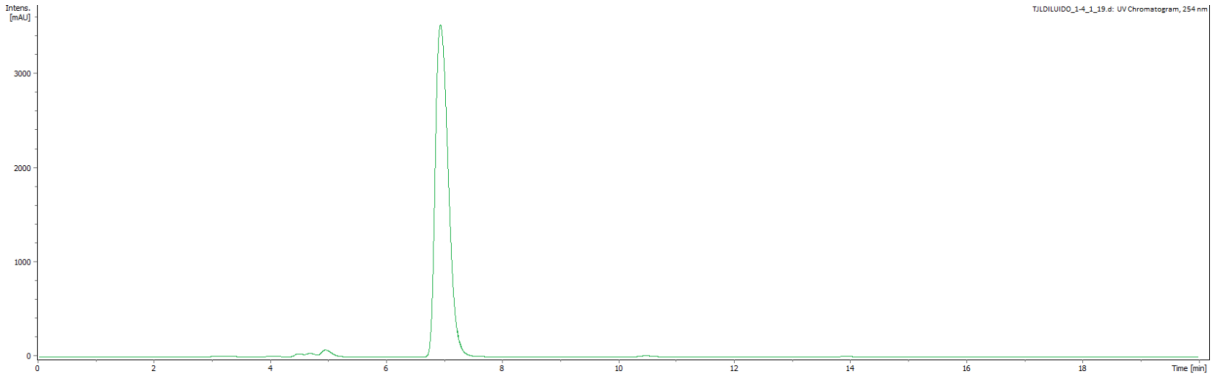


Anexo 284. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **118**



Anexo 285. Espectrograma de HRMS (ESI +) de **119**

VIII) 4. Traças de HPLC de 6



Anexo 286. Cromatograma HPLC de **6** usado para a determinação da pureza HPLC (97.3%)