



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS 2-
IMINOTIOFEN-TIAZOLIDÍNICOS COMO INIBIDORES DE CISTEÍNA
PROTEASES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* E *LEISHMANIA
AMAZONENSIS***

(Volume 1)

Universidade Federal de Alagoas

**Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL**

PAULO FERNANDO DA SILVA SANTOS JUNIOR

**PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS 2-
IMINOTIOFEN-TIAZOLIDÍNICOS COMO INIBIDORES DE CISTEÍNA
PROTEASES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* E *LEISHMANIA
AMAZONENSIS***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção da aprovação em exame de defesa de tese.

Orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Thiago M. de Aquino

Maceió-AL

2022

Catlogação na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S237p Santos Junior, Paulo Fernando da Silva.
Planejamento e avaliação de novos derivados 2-iminotiofen-tiazolidínicos como inibidores de cisteína proteases de *Trypanosoma cruzi* e *leishmania amazonensis* / Paulo Fernando da Silva Santos Junior. – 2022.
2 v. : il., grafs., tabs. color.

Orientador: João Xavier de Araújo Júnior.
Coorientador: Thiago M. de Aquino.
Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2022.
Conteúdo: v. 1. Início até apêndices. 192 f. - v. 2. Material suplementar. Anexos. [105] f.

Bibliografia: f. 152-175.
Apêndices: f. 178-192.
Anexos. [3]-[105].

1. 2-aminotiofen-tiazolidínicos. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Docking molecular. 4. *Leishmania amazonensis*. 5. Cisteína proteases. 6. Cruzaina. I. Título.


CDU: 66:616.993.161

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **PAULO FERNANDO DA SILVA SANTOS JÚNIOR** intitulada: “PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS 2-IMINOTIOFEN-TIAZOLIDÍNICOS COMO INIBIDORES DE CISTEÍNA PROTEASES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* E *LEISHMANIA AMAZONENSIS*”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 23 de fevereiro de 2022, às 9h, por meio de videoconferência.

Maceió, 23 de fevereiro de 2022.

Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 Joao Xavier de Araujo Junior
Data: 24/03/2022 21:06:27-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Junior
Orientador - PPGQB/ICF/UFAL

Documento assinado digitalmente
 Isis Martins Figueiredo
Data: 24/03/2022 16:09:09-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>


Profa. Dra. Isis Martins Figueiredo
PPGQB/IQB/UFAL

Profa. Dra. Lídia Moreira Lima
ICB/UF RJ

Documento assinado digitalmente
 LIDIA MOREIRA LIMA
Data: 25/02/2022 10:24:59-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Documento assinado digitalmente
 Thiago Mendonca de Aquino
Data: 25/02/2022 11:31:50-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino
Coorientador - PPGOB/IOB/UFAL

Documento assinado digitalmente
 Edeildo Ferreira da Silva Junior
Data: 23/02/2022 20:19:10-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior
PPGQB/IQB/UFAL

Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas
IFAL-Maceió

Documento assinado digitalmente
 JOHNNATAN DUARTE DE FREITAS
Data: 22/03/2022 21:10:25-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai, Paulão (*in memoriam*), por todos os ensinamentos em vida, e por ter sido um dos idealizadores para que eu tivesse feito o curso de farmácia (embora não tenha visto minha aprovação no vestibular). À minha mãe, Antônia, minha vida. Sem ela não seria absolutamente nada. E a meu irmão Lekinho, por todo o companheirismo.

À minha esposa Darlene Nonato, por todo o amor, carinho e compreensão ao longo desses anos todos.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. João Xavier, pelo acolhimento no LQM desde o início da graduação, tendo me dado a oportunidade de trabalhar neste laboratório, e Prof. Dr. Thiago Aquino, por todos os ensinamentos passados perante a execução deste trabalho.

Aos grandes amigos do laboratório, por todo o convívio ao longo desses 10 anos de LQM: Igor Nascimento e Érica Erlanny.

Aos alunos de IC que eu pude orientar ao longo deste doutorado: Ana Flor, Manuele Figueiredo, Marcone Alcântara, Vitória Melo e Isabelle.

À banca julgadora deste trabalho, Prof. Dr. Edeildo Ferreira, Prof^a Dr^a Isis Figueiredo, Prof. Dr. Johnnatan Freitas e Prof^a Dr^a Lídia Moreira, por todas as contribuições acerca das melhorias a serem feitas.

Ao LADIC-UFDPar, sob responsabilidade do Prof. Dr. Klinger Rodrigues, pela realização dos testes frente *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*.

Aos professores do PPGQB, por todos os ensinamentos e contribuições.

À CAPES, CNPq e FAPEAL, por fornecer apoio financeiro, desde a iniciação científica até a execução deste projeto.

*There is a land, far far away
Where there's no night, there's only day
Look into the book of life, and you will see
That there's a land, far far away*

Satta Massagana, Abyssinians

RESUMO

O termo doenças negligenciadas refere-se a um conjunto de patologias que acometem cerca de 1 bilhão de indivíduos em todo o mundo, os quais vivem em exclusão social e pobreza, acarretando em um grande problema de saúde pública mundial. Neste sentido, a farmacoterapia frente às tripanossomíases leishmanioses e doença de Chagas permanecem ineficazes, especialmente frente às formas crônicas destas. Sendo assim, em trabalho reportado recentemente por nosso grupo de pesquisa, obteve-se o derivado **LQM83**, um híbrido molecular tiofeno-tiazolidínico, em que este apresentou potencial inibição frente à cruzaina, com $CI_{50} = 2,4 \mu M$. Com base nisto, prevendo contribuir diretamente com a melhoria do arsenal terapêutico antichagásico e leishmanicida, obteve 47 novos derivados, com rendimentos entre 58-95% grau de pureza relativo superior a 99%. Avaliação frente às formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* evidenciou os compostos promissores **5f** e **7c**, sendo mais potentes que o fármaco-padrão Antimoniato de meglumina e menos citóxicos que Anfotericina B. Em adição, **5f** foi mais seletivo que ambas, onde **7c** apresentou maior seletividade que esta última droga. Simulações de *docking* molecular frente o alvo proposto cruzaina sugerem que os derivados **1f** e **7e** apresentem potenciais interações em detrimento à **LQM83**, como interações do tipo carbono-hidrogênio e π -alquil com Ala¹⁵⁹ e ligação convencional de hidrogênio com resíduo de Asp¹⁴⁰, respectivamente. Tais resíduos podem ser a chave para obtenção de atividades mais potentes, onde ensaios biológicos frente às formas tripomastigotas e amastigotas estão em andamento. Por fim, os estudos envolvendo o *design* e obtenção dos compostos promissores contribuem para o desenvolvimento de novos derivados eficazes, de baixo custo e toxicidade frente à leishmaniose e doença de Chagas, visando sobretudo à população mais desassistida.

Palavras-chaves: 2-aminotiofen-tiazolidínicos; *Trypanosoma cruzi*; *Docking*; *Leishmania amazonensis*; CPB; Cruzaina.

ABSTRACT

The term neglected diseases refers to a set of pathologies that affect about 1 billion individuals worldwide, who live in social exclusion and poverty, resulting in a major global public health problem. In this sense, pharmacotherapy against trypanosomiasis, leishmaniasis and Chagas disease remains ineffective, especially when faced with their chronic forms. Thus, in a study recently reported by our research group, the **LQM83** derivative was obtained, a thiophene-thiazolidine molecular hybrid, in which it showed potential inhibition against cruzin, with $IC_{50} = 2.4 \mu\text{M}$. Based on this, intending to contribute directly to the improvement of the anti-chagasic and leishmanicidal therapeutic arsenal, it obtained 47 new derivatives, with yields between 58-95% and a purity in range of 99%. Evaluation against the amastigote forms of *Leishmania amazonensis* showed the promising compounds **5f** and **7c**, being more potent than the standard drug Meglumine Antimoniate and less cytotoxic than Amphotericin B. In addition, **5f** was more selective than both, where **7c** showed greater selectivity than this last drug. Molecular docking simulations against the proposed target cruzain suggest that derivatives **1f** and **7e** have potential interactions to the detriment of **LQM83**, such as carbon-hydrogen and π -alkyl interactions with Ala¹⁵⁹ and conventional hydrogen bonding with Asp¹⁴⁰ residue, respectively. Such residues may be the key to obtain more potent activities, where biological assays against trypomastigote and amastigote forms are in progress. Finally, studies involving the design and obtaining of promising compounds contribute to the development of new effective derivatives, with low cost and toxicity against leishmaniasis and Chagas disease, mainly targeting the most underserved population.

Keywords: *2-aminothiophen-thiazolidinone*; *Trypanosoma cruzi*; Docking; *Leishmania amazonensis*; CPB; Cruzain.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Mapa de distribuição das espécies de triatomíneos nas regiões endêmicas da América latina..... | 25 |
| Figura 2 – Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 26 |
| Figura 3 – Formas evolutivas infecciosas do <i>T. cruzi</i> em células e tecidos de hospedeiros..... | 27 |
| Figura 4 – Ciclo biológico infeccioso do parasito <i>T. cruzi</i> | 28 |
| Figura 5 – Formas clínicas da doença de Chagas em função da carga parasitária..... | 30 |
| Figura 6 – Primeiros compostos utilizados na farmacoterapia antichagásica.. | 33 |
| Figura 7 – Linha do tempo da descoberta de drogas frente à doença de Chagas..... | 34 |
| Figura 8 – Proposta de mecanismo simplificado para Nfx, Bzn e seus respectivos metabólitos ativos após ativação por sistemas celulares do parasito <i>T. cruzi</i> .. | 35 |
| Figura 9 – Potenciais Inibidores da esterol 14 α -desmetilase (CYP51)..... | 35 |
| Figura 10 – Nitroimidazol fexinidazol, promissor candidato a fármaco contra doença de Chagas..... | 38 |
| Figura 11 – Inibidor de proteassoma cinetoplastídeo GNF6702..... | 37 |
| Figura 12 – Promissor oxaborol AN4169..... | 37 |
| Figura 13 – Mecanismo catalítico de cisteíno proteases..... | 38 |
| Figura 14 – Tríade catalítica da enzima cruzaina..... | 39 |
| Figura 15 – Inibidor irreversível vinil sulfona mais potente frente à cruzaina..... | 40 |
| Figura 16 – Inibidores de catepsina K contendo grupo nitrila <i>warhead</i> redirecionados para cruzaina..... | 40 |
| Figura 17 – Interações do composto (18) obtido através de screening virtual..... | 41 |
| Figura 18 - Derivados de poliamina substituídos por <i>N, N</i> -tiofeno inibem a invasão e a multiplicação intracelular de parasita..... | 42 |
| Figura 19 - Compostos anti-tripanosossoma derivados de nafto [2,3- <i>b</i>] tiofen-4,9-quinonas..... | 43 |
| Figura 20 - Derivados tiofen-2-arilureia inibidores de cruzaina..... | 44 |
| Figura 21 - Composto anti-tripanosossoma de quinonas contendo anel de tiofeno..... | 45 |
| Figura 22 - Inibidores da trans-sialidase proveniente de <i>T. cruzi</i> desenhados por meio de triagem virtual..... | 45 |
| Figura 23 - Inibidores da tripanotiona redutase contendo anel benzotiofeno..... | 46 |
| Figura 24 - Derivado acetamidotiofeno potencialmente inibidor da enzima cruzaina..... | 47 |
| Figura 25 - Inibidor da classe tiofen-2-iminotiazolidina com base na hibridação molecular..... | 48 |
| Figura 26 – Fármacos disponíveis no mercado contendo o núcleo tiofeno..... | 50 |
| Figura 27 – Tiazolidinas bioativas contra amastigotas de <i>T. cruzi</i> | 51 |
| Figura 28 – Composto (40) reposicionado para amastigotas de <i>T. cruzi</i> | 51 |
| Figura 29 – Derivados planejados a partir do bioisosterismo não-clássico, HTS e 3D-QSAR..... | 52 |

| | |
|---|-----|
| Figura 30 – Novos derivados tiazolidínicos planejados por bioisosterismo não-clássico..... | 52 |
| Figura 31 – Recentes avanços no desenvolvimento de tiazolidinas frente doença de Chagas..... | 53 |
| Figura 32 – Fármacos disponíveis no mercado contendo o heterociclo tiazolidina em suas estruturas..... | 55 |
| Figura 33 - Ciclo biológico do parasito <i>Leishmania spp</i> | 57 |
| Figura 34 - Manifestações clínicas decorrentes da infecção por leishmanioses..... | 57 |
| Figura 35 - Linha do tempo do descobrimento das drogas antileishmania..... | 58 |
| Figura 36 – Modelo estrutural da enzima CPB, demonstrando local de ligação do substrato no sítio ativo..... | 60 |
| Figura 37 – Derivado benzoxazol ativo frente CPB de <i>L. amazonensis</i> | 60 |
| Figura 38 – Derivados bioativos frente amastigotas de <i>T. cruzi</i> planejados por meio da técnica de bioisosterismo..... | 61 |
| Figura 39 – Composto bioativo frente amastigotas planejado por meio de hibridação molecular..... | 63 |
| Figura 40 – Derivado tiossemicarbazônico de conformação livre e tiazolidínico (conformação restrita)..... | 64 |
| Figura 41 – Potencial redução da toxicidade dos derivados tiossemicarbazônicos rigidificados..... | 65 |
| Figura 37 – Promissores hits obtidos ou reposicionados por meio de estratégias de CADD..... | 57 |
| Figura 38 – Diagrama 2D das interações entre LQM83 e a enzima cruzaina..... | 62 |
| Figura 39 – Aplicação do bioisosterismo monovalente no anel fenil do <i>hit</i> LQM83, gerando a série 1a-f..... | 63 |
| Figura 40 – Planejamento das séries 2a, 3a e 4a com base no bioisosterismo monovalente (extensão da cadeia alquil)..... | 63 |
| Figura 41 – Aplicação do bioisosterismo não-clássico de grupo funcional para o planejamento das séries 5a, 6a, 7a-g..... | 64 |
| Figura 42 – Promissores hits obtidos ou reposicionados por meio de estratégias de CADD..... | 66 |
| Figura 43 – Diagrama 2D das interações entre LQM83 e a enzima cruzaina..... | 72 |
| Figura 44 – Aplicação do bioisosterismo monovalente no anel fenil do <i>hit</i> LQM83, gerando a série 1a-f..... | 73 |
| Figura 45 – Planejamento das séries 2a, 3a e 4a com base no bioisosterismo monovalente (extensão da cadeia alquil)..... | 73 |
| Figura 46 – Aplicação do bioisosterismo não-clássico para o planejamento das séries 5a, 6a, 7a-g..... | 74 |
| Figura 47 – Análise da REA para os compostos planejados frente amastigotas de <i>L. amazonensis</i> | 135 |
| Figura 48 – Alinhamento global da enzima CPLa com cruzaina (PDB ID: 1AIM)..... | 138 |
| Figura 49 – Gráfico de <i>Ramachandran</i> para a enzima CPLa (a) e superposição da cruzaina e CPLA (b)..... | 139 |
| Figura 50 – Gráficos de RMSD para a cruzaina (linha preta) e CPLa (linha vermelha) após uma simulação de dinâmica molecular de 100 ns (a) e gráficos de <i>Ramachandran</i> para cruzaina (b) e CPLa (c)..... | 140 |

| | |
|--|-----|
| Figura 51 – Diagrama 2D de interações entre o inibidor da literatura (67) e a enzima CPB..... | 141 |
| Figura 52 – Diagrama 2D de interações entre o composto 5f e a enzima CPB.. | 142 |
| Figura 53 – Diagrama 2D de interações entre o composto 7c e a enzima CPB.. | 142 |
| Figura 54 – Visualização do <i>Cluster</i> para as moléculas mais ativas 5f e 7c..... | 143 |
| Figura 55 – Visualização do <i>Cluster</i> para as moléculas de maior <i>fitscore</i> e LQM83..... | 144 |
| Figura 56 – Diagrama 2D de interações entre o composto 1f e a enzima cruzaina..... | 145 |
| Figura 57 – Diagrama 2D de interações entre o composto 7e e a enzima cruzaina..... | 146 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|--|-----|
| Esquema 1 – Obtenção sintética do núcleo 2-aminotiofeno..... | 49 |
| Esquema 2 - Obtenção de tiazolidinonas a partir da ciclização de tiossemicarbazonas por ácidos α -haloacéticos..... | 54 |
| Esquema 3 - Ciclização de Hantzsch para obtenção de tiazóis..... | 55 |
| Esquema 4 – Obtenção dos compostos (58-60) utilizando a síntese de Gewald..... | 75 |
| Esquema 5 – Método de obtenção dos derivados intermediários N-alkil-3-substituído-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofen-2-amina..... | 76 |
| Esquema 6 – Procedimento geral para obtenção dos derivados híbridos 2-iminotiofeno-3-tiazolidínicos..... | 77 |
| Esquema 7 – Procedimento geral para obtenção dos derivados ácidos carboxílicos (7a-g) mediante hidrólise básica..... | 78 |
| Esquema 8 – Mecanismos reacionais envolvendo a obtenção dos compostos (58-60)..... | 86 |
| Esquema 9 – Mecanismos reacionais envolvendo a obtenção dos compostos (61-66)..... | 88 |
| Esquema 10 - Mecanismo reacional para a rigidificação envolvendo o dieletrófilo 2-bromoacetofenona..... | 93 |
| Esquema 11 – Regiosseletividade da formação do heterociclo tiazolidina direcionada pelo equilíbrio tautomérico..... | 94 |
| Esquema 12 – Mecanismo reacional de hidrólise básica..... | 119 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 – Período de incubação em função do tipo de transmissão por meio do <i>T. cruzi</i> | 29 |
| Tabela 2 – Diagnóstico diferencial apropriado em função da fase infecciosa..... | 31 |
| Tabela 3 - Análise do grau de pureza relativo dos compostos híbridos tiofeno-2-iminotiazolidinas..... | 125 |
| Tabela 4 – Avaliação biológica série 1a-f frente à promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> | 127 |
| Tabela 5 – Avaliação biológica série 2a-g frente à promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> | 129 |
| Tabela 6 – Avaliação biológica série 3a-g frente à promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> | 130 |
| Tabela 7 – Avaliação biológica série 4a-f frente à promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> | 131 |
| Tabela 8 – Avaliação biológica série 5a-g frente à promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> | 131 |
| Tabela 9 – Avaliação biológica série 6a-g frente à promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> | 133 |
| Tabela 10 – Avaliação biológica série 7a-f frente à promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> | 134 |
| Tabela 11 – Valores de RMSD obtidos por <i>redocking</i> para as quatro funções de pontuação..... | 137 |
| Tabela 12 – Resultados calculados dos compostos com maior valor de <i>fitscore</i> em comparação com o protótipo LQM83 por meio de <i>docking</i> molecular..... | 143 |

LISTA DE ABREVIATURAS

BOD - *Biochemical Oxygen Demand*

Bzn - Benznidazol

CADD - *Computer Assisted Drug Design*

CCD – Cromatografia em camada delgada

CPB - Cisteína Protease B

DC - Doença de Chagas

DSS - Dodecil sulfato de sódio

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNDi - *Drugs for neglected disease initiative*

DTN - Doenças tropicais negligenciadas

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HPLC – *High-performance liquid chromatography*

HTS - *High-throughput screening*

IgG - Imunoglobulina G

LBDD - *Ligand Based Drug Design*

MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium

Nfx - Nifurtimox

PCR - Reação da cadeia da polimerase

REA - Relação estrutura-atividade

RMSD – *Root mean square deviation*

SBDD - *Structure Based Drug Design*

SFB – Soro fetal bovino

TR - Tripanotiona redutase

UCSF - *University of California San Francisco*

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 21 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 24 |
| 2.1 Aspectos históricos e impactos econômicos | 24 |
| 2.2 Mecanismos de transmissão | 27 |
| 2.3 Manifestações clínicas das fases aguda e crônica | 29 |
| 2.4 Diagnóstico diferencial | 30 |
| 2.5 Prevenção | 32 |
| 2.6 Farmacoterapia atual antichagásica | 33 |
| 2.6.1 Recentes avanços na farmacoterapia antichagásica | 35 |
| 2.6.1.1 Azóis tripanocidas: posaconazol, VNI, E1224/ravuconazol | 35 |
| 2.6.1.2 Nitroimidazol fexinidazol | 36 |
| 2.6.1.3 Inibidores de proteassoma | 37 |
| 2.6.1.4 Oxaboróis | 37 |
| 2.6.2 Enzima cruzaina como alvo promissor no desenvolvimento de novos compostos bioativos | 38 |
| 2.7 Compostos heterocíclicos contendo átomo de enxofre como farmacóforo frente o <i>Trypanosoma cruzi</i> | 42 |
| 2.7.1.1 Obtenção sintética de tiofenos | 48 |
| 2.7.2 Compostos bioativos contra <i>T. cruzi</i> contendo o heterociclo tiazolidina | 50 |
| 2.7.2.1 Obtenção sintética do heterociclo tiazolidina | 54 |
| 2.8 Ciclo biológico e aspectos patológicos relacionados às leishmanioses | 56 |
| 2.8.1 Farmacoterapia atual frente às leishmanioses | 58 |
| 2.9 Planejamento de compostos bioativos por meio da modificação molecular ... | 60 |
| 2.9.1 Bioisosterismo | 60 |
| 2.9.2 Hibridização molecular | 62 |
| 2.9.3 Rigidificação molecular (restrição conformacional) | 63 |
| 2.10 Planejamento de compostos bioativos por meio de modelagem molecular .. | 65 |
| 3.0 OBJETIVOS | 68 |
| 3.1 Objetivo geral | 68 |
| 3.1.1 Objetivos específicos | 68 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 70 |
| 4.1 Seção experimental | 70 |
| 4.1.1 Cromatografias | 70 |
| 4.1.2 Pontos de Fusão | 70 |
| 4.1.3 Caracterização estrutural por RMN de ¹ H e ¹³ C. | 70 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 4.1.4 | Análise do grau de pureza | 71 |
| 4.2 | Planejamento racional dos compostos 2-iminotiazolidínicos..... | 71 |
| 4.2.1 | Seleção do composto <i>hit</i> LQM83 | 71 |
| 4.2.2 | Aplicação das técnicas de bioisosterismo clássico (monovalente e extensão da cadeia alquil) e não clássico (grupos funcionais). | 72 |
| 4.3 | Procedimentos reacionais | 75 |
| 4.3.1 | Procedimento geral de síntese dos derivados 3-substituídos-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofen-2-amina. | 75 |
| 4.3.2 | Procedimento geral de síntese dos derivados N-alkil-3-substituído-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofen-2-amina. | 76 |
| 4.3.3 | Procedimento geral de síntese dos derivados 2-iminotiofeno-3-tiazolidina (2a-g, 3a-g, 4a-f, 5a-g, 6a-g). | 76 |
| 4.3.4 | Procedimento geral de síntese dos derivados 2-iminotiofeno-3-tiazolidina (7a-g).... | 77 |
| 4.4 | Avaliação biológica frente à promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> | 78 |
| 4.4.1 | Manutenção de parasitos e macrófagos | 78 |
| 4.4.2 | Preparo das substâncias avaliadas | 79 |
| 4.4.3 | Atividade antipromastigota | 79 |
| 4.4.4 | Atividade anti-amastigota | 79 |
| 4.4.5 | Citotoxicidade em macrófagos | 80 |
| 4.4.6 | Análise estatística..... | 80 |
| 4.5 | Modelagem <i>in silico</i> | 81 |
| 4.5.1 | Dados computacionais..... | 81 |
| 4.5.2 | Modelagem por homologia..... | 81 |
| 4.5.2 | Simulação de dinâmica molecular da enzima cruzaina | 82 |
| 4.5.3 | <i>Docking</i> molecular | 82 |
| 4.5.4 | Estudos de farmacocinética <i>in silico</i> | 83 |
| 5.0 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 85 |
| 5.1 | Obtenção dos compostos de partida (58-60) utilizando a síntese de Gewald. | 85 |
| 5.1.1 | Mecanismos reacionais | 85 |
| 5.1.2 | Caracterização por RMN ¹ H e ¹³ C | 86 |
| 5.2 | Obtenção dos derivados N-alkil-3-substituído-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofen-2-amina. | 87 |
| 5.3 | Obtenção dos derivados híbridos 2-iminotiofeno-3-tiazolidínicos – séries (1a-6a) | 91 |
| 5.3.1 | Mecanismos reacionais envolvendo a rigidificação promovida pelo dieletrófilo 2-bromoacetofenona | 92 |
| 5.3.2 | Caracterização por RMN ¹ H e ¹³ C | 94 |

| | |
|--|------------|
| 5.3.4.1 (Z)-etil2-((3-alil-4-(3-clorofenil)thiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (1a)..... | 94 |
| 5.3.4.2 (Z)-etil2-((3-alil-4-(4-clorofenil)thiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (1b)..... | 95 |
| 5.4 Obtenção derivados ácidos carboxílicos | 119 |
| 5.4.1 Mecanismo reacional | 119 |
| 5.4.2 Caracterização estrutural por RMN ¹ H e ¹³ C..... | 119 |
| 5.5 Análise do grau de pureza por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC-UV) | 124 |
| 5.6 Avaliação biológica frente à promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> | 127 |
| 5.7 Estudos de <i>docking</i> molecular | 136 |
| 5.7.1 Validação do protocolo de <i>docking</i> contra cruzaina: Escolha do PDB e algoritmo..... | 136 |
| 5.7.2 Construção do modelo de homologia entre cruzaina e cisteína protease de <i>Leishmania amazonensis</i> (CPLa) | 137 |
| 5.7.3 Simulações de dinâmica molecular (DM)..... | 139 |
| 5.8 <i>Docking</i> molecular dos mais ativos contra CPLa. | 140 |
| 5.8.1 Análise das interações entre os compostos mais ativos 5f e 7c contra amastigotas de <i>L. amazonensis</i> frente à enzima CPLa como alvo proposto..... | 140 |
| 5.9 <i>Docking</i> molecular dos compostos contra cruzaina..... | 143 |
| 5.10 Análise <i>in silico</i> do perfil farmacocinético para os compostos mais promissores apresentados neste trabalho | 146 |
| 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS | 148 |
| Apêndice A – Publicação do capítulo de livro “The role of thiophene core in medicinal chemistry of neglected tropical disease” baseado na revisão escrita nesta tese de doutorado..... | 178 |
| Apêndice B – Publicação do capítulo de livro “Molecular modeling applied to design of cysteine protease inhibitors – a powerful tool for the identification of hit compounds against neglected tropical disease” baseado na revisão escrita nesta tese de doutorado. | 179 |
| Apêndice C – Publicação do capítulo de livro “Drug Discovery Strategies Against Emerging Coronaviruses: A Global Threat” ao longo do doutorado. | 180 |
| Apêndice D – Publicação do capítulo de livro “Brief Introduction and Therapeutic Strategies Against the Measles Virus” ao longo do doutorado. | 181 |
| Apêndice E – Capítulo de livro aceito para publicação “Peptidomimetic and peptide-derived against 3CL^{pro} from coronaviruses” ao longo do doutorado. | 182 |

| | |
|---|-----|
| Apêndice F – Capítulo de livro aceito para publicação “Design of antimalarial compounds on quinoline scaffold: from plant to drug” ao longo do doutorado. | 183 |
| Apêndice G – Publicação do artigo “Sterol 14α-Demethylase from Trypanosomatidae Parasites as a Promising Targets for Designing New Antiparasitic Agents” baseado na revisão escrita nesta tese de doutorado. | 184 |
| Apêndice H – Publicação do artigo “Druggable Targets from Coronaviruses for Designing New Antiviral Drugs” ao longo do doutorado. | 185 |
| Apêndice I – Publicação do artigo “In vitro and in vivo evaluation of dialkylphosphorylhydrazones against Leishmania chagasi promastigotes and amastigotes” ao longo do doutorado. | 186 |
| Apêndice J – Publicação do artigo “Insights on Dengue and Zika NS5 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitors” ao longo do doutorado. ... | 187 |
| Apêndice K – Publicação do artigo “Synthesis of hybrids thiazole–quinoline, thiazole–indole and their analogs: in vitro anti-proliferative effects on cancer cell lines, DNA binding properties and molecular modeling” ao longo do doutorado. | 188 |
| Apêndice L – Publicação do artigo “Synthesis, Antileishmanial Activity and in silico Studies of Aminoguanidine Hydrazones (AGH) and Thiosemicarbazones (TSC) Against Leishmania chagasi Amastigotes” ao longo do doutorado. | 189 |
| Apêndice M – Aceite para publicação do artigo “Inhibitors targeting Hepatitis C virus (HCV) entry” ao longo do doutorado. | 190 |
| Apêndice N – Aceite para publicação do artigo “Strategies in Medicinal Chemistry to Discovery New Hits Compounds Against Ebola and Marburg Virus: Challenges and Perspectives in Drug Discovery” ao longo do doutorado. | 191 |
| Apêndice O – Aceite para publicação do artigo “In vitro antitumor activity of 2-N,N'-dialkylamine-1,4-naphtoquinones on human glioblastoma multiforme cells” ao longo do doutorado. | 192 |

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), doenças negligenciadas tropicais (DNT) referem-se a um conjunto de 20 patologias de origem bacteriana, parasitária ou viral, que envolvem vetores, hospedeiros e ciclo de vida complexos (BELLERA *et al.*, 2019; BERGLUND, 2019; BRAHMACHARI, 2019; HOTEZ, 2020; HOTEZ; LO, 2020).

Dados do ano de 2018 demonstram que DNT acometeram cerca de 1,5 bilhão de indivíduos em 149 países que vivem em exclusão social e pobreza, perfazendo 11% das enfermidades totais mundial, o que corresponde a um grande problema de saúde pública mundial (BAILEY *et al.*, 2019; FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019; SILVA-JÚNIOR, DA; SCHIRMEISTER; ARAÚJO-JÚNIOR, DE, 2019).

A Família *Trypanosomatidae* pertence à ordem *Kinetoplastida*, que compreende invertebrados parasitas obrigatórios, acometendo plantas e todas as classes de vertebrados, principalmente o homem e os insetos (ARONSON; MAGILL, 2020; LÓPEZ-VÉLEZ; NORMAN; BERN, 2020; ROBERTS, 2018).

Dentre estas, destaca-se a doença de Chagas (DC), patologia causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, perfazendo ampla incidência no Brasil e no mundo, sendo endêmica em 21 regiões da América latina (CORTES-SERRA *et al.*, 2020; DAUDA *et al.*, 2020; MORETTI; MORTARA; SCHENKMAN, 2019a).

De acordo com a OMS, estima-se que 7 milhões de pessoas se encontram infectadas, além de cerca de 10600 mil óbitos anualmente devido a esta severa doença (MILLS, 2020; SANTOS, É.; MENEZES FALCÃO, 2020). No Brasil, a estimativa é de que cerca de 4,6 milhões de pessoas estejam infectadas, destacando as regiões norte e nordeste, uma vez que são as localidades de maior incidência de infecções (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL; SAÚDE, 2020).

Por outro lado, a leishmaniose corresponde a um complexo maior que 20 protozoários do gênero *Leishmania* que afeta 1 bilhão de pessoas em 92 países e 83 territórios, chegando a 1 milhão de novos casos por ano (ARONSON; JOYA, 2019; ARONSON; MAGILL, 2020). Quanto às manifestações clínicas, a Leishmaniose Tegumentar (LT) causa lesões e nódulos na pele e mucosa dos hospedeiros, correspondendo à forma mais comum desta doença, representando 97% dos casos globais (90.000 por ano). Em contraste, a Leishmaniose Visceral (LV), também

conhecida como Kala-Azar, afeta as vísceras dos hospedeiros infectados (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; THAKUR; JOSHI; KAUR, S., 2020; WHO, 2020).

A farmacoterapia atual destas doenças ainda permanece restrita, com os fármacos Nifurtimox e Benznidazol para doença de Chagas (NASCIMENTO, I. *et al.*, 2019) e antimoniais pentavalentes, antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio como tratamento de primeira escolha para leishmaniose (MARTÍN-ESCOLANO, R. *et al.*, 2019; MELO-FILHO *et al.*, 2019). No entanto, ambos tratamentos apresentam diversos efeitos adversos, sendo ineficazes especialmente na fase crônica (BHATTACHARYA *et al.*, 2020).

Assim, cisteína proteases correspondem a potenciais alvos drogáveis em comum a ambos parasitos, compreendendo uma classe de enzimas proteolíticas expressas em diferentes organismos que participam da regulação de diversos processos fisiológicos e patológicos (FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, Adriano D., 2017a; JUDICE *et al.*, 2021; SIQUEIRA-NETO, Jair L. *et al.*, 2018).

No que diz respeito à inibição proliferativa de amastigotas chagásicas, estudos recentes têm demonstrado que tal fato ocorre principalmente por meio da inibição da enzima cruzaina - uma cisteína protease de cunho essencial ao metabolismo do parasito, bem como interação com o hospedeiro (NASCIMENTO, I. *et al.*, 2020). Neste sentido, cisteína protease B (CPB) constitui importante fator de virulência relacionada a todas as formas evolutivas de leishmaniose (JUDICE *et al.*, 2021).

A partir da seleção destes alvos, por meio de estudos computacionais, podem ser propostas análises de interações molécula-enzima, mecanismo de ação, bem como energia de ligação, indicando a possível forma mais estável do complexo enzima-ligante (CHAN *et al.*, 2019; KHANNA; RANGANATHAN; PETROVSKY, 2019; PANTELEEV; GAO, H.; JIA, L., 2018).

Neste contexto, em trabalho reportado recentemente por nosso grupo de pesquisa, obteve-se o derivado **LQM83**, um híbrido molecular tiofeno-tiazolidínico, em que este apresentou potencial inibição frente à cruzaina, com $CI_{50} = 2,4 \mu M$ constituindo um *hit* no que diz respeito ao desenvolvimento de compostos tripanocida (SILVA-JÚNIOR, E F *et al.*, 2016).

Tendo-se em vista os resultados apresentados pelo derivado **LQM83**, bem como a elevada incidência destas doenças no Brasil, este trabalho tem o propósito de realizar melhorias moleculares frente tal composto, com a finalidade de se obter novos compostos ativos, mais eficazes e de baixo custo para a população mais carente.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos históricos e impactos econômicos

Descrita pela primeira vez no dia 14 de Abril de 1909 pelo médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (Carlos Chagas), a qual deu seu sobrenome, a doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, refere-se a uma antropozoonose que possui como vetor o parasito *Trypanosoma cruzi* (subgênero *Schizotrypanum*) e como vetor o os insetos triatomíneos – popularmente chamados de barbeiro (ARAUJO-JORGE; TELLERIA; DALENZ, 2017; CORTES-SERRA *et al.*, 2020; ROSE; CARVALHO, J. L.; HECHT, 2020).

No entanto, a doença ocorre há milhões de anos como uma enzootia entre animais silvestres que, devido ao avanço do homem nos ecótopos silvestres, passou a ser transmitida de forma acidental a este (MINISTERIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2019; MORETTI; MORTARA; SCHENKMAN, 2019b). Em adição, resquícios moleculares do *T. cruzi* foram encontrados em múmias da região do Atacama – Chile, constituindo indícios de que esta infecção humana ocorre ao menos há cinco mil anos A.C. (CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020; DIAS, J., 2011).

Relacionado aos impactos econômicos globais desta severa doença, dados estimam que os custos giram em torno de US\$ 7 bilhões anuais, valores estes superiores a soma do que é gasto com câncer de colo do útero (US\$ 4,7 bilhões) e rotavírus (US\$ 2 bilhões) (LEE, B. Y. *et al.*, 2013; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018) Surpreendentemente, as pesquisas ressaltam que cerca de 10% desses valores advêm de EUA e Canadá – áreas não consideradas de risco para esta parasitose.

Ainda segundo Pérez-Molina; Molina (2018), estes custos globais vão além de medicamentos, pois requer tratamentos dispendiosos como transplante de coração, uso de marca-passo e desfibrilador. Com isto, soma-se a despesa do estado com aposentadorias, 806170 anos de vida ajustados por incapacidade (*DALYs*), além de um impacto anual de perda de US\$ 1-2 bilhões em produtividade.

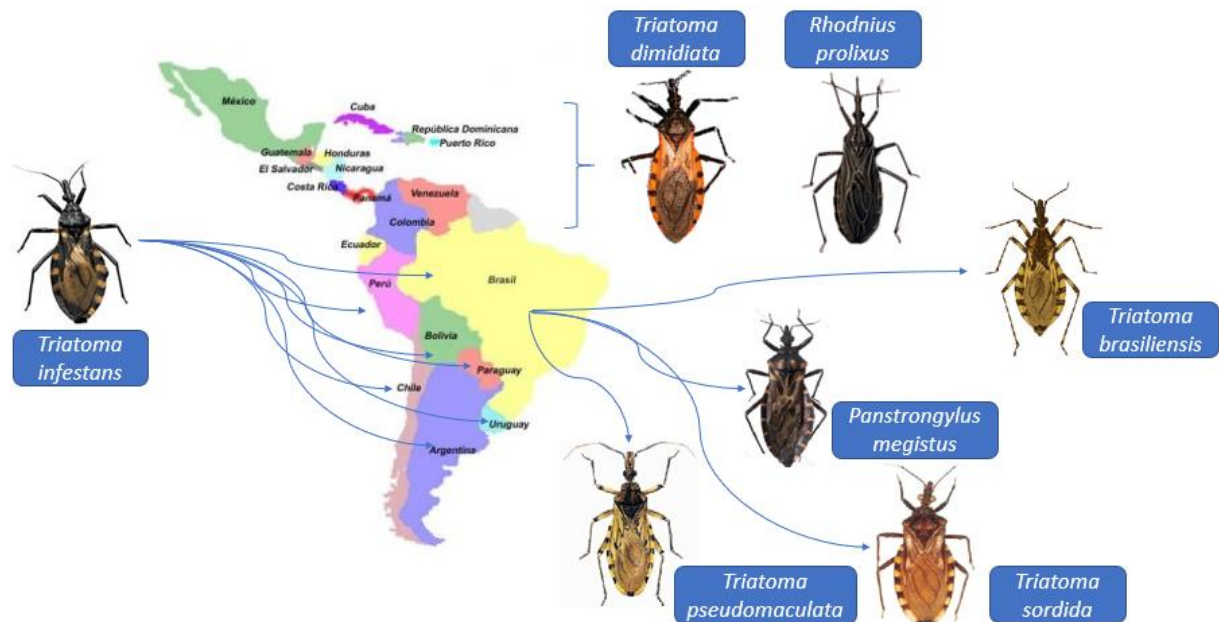
Adicionalmente, em estudo descrito por Martins-Melo *et al.* (2018), foi observado que, no Brasil, dentre as DTN incidentes no país, a DC constitui a principal razão anos de vida ajustados por incapacidade (*DALYs*), especialmente entre homens e idosos, o que demonstra seu silencioso potencial debilitante e de letalidade.

2.1 Ciclo biológico evolutivo

Em condições naturais, o parasito *T. cruzi* consegue infectar aproximadamente 100 espécies de mamíferos, dentre os quais, seres humanos, animais domésticos e silvestres e, ainda, alguns invertebrados, como os vetores triatomíneos (MORETTI; MORTARA; SCHENKMAN, 2019b).

Dentre estes, cerca de 15 gêneros de Triatomíneos (*Reduviidae*) constituem potenciais transmissores, onde destacam-se as espécies (Figura 1): *Triatoma infestans* (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Peru, Paraguai e Uruguai); *Triatoma dimidiata* e *Rhodnius prolixus* (América central e norte da América do Sul); além de *Panstrongylus megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* decorrentes do Brasil, onde foram identificadas 63 das 141 espécies conhecidas (LÓPEZ-VÉLEZ; NORMAN; BERN, 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL; SAÚDE, 2020; WOOD; OHIO; STATES, 2019).

Figura 1 – Mapa de distribuição das espécies de triatomíneos nas regiões endêmicas da América latina.



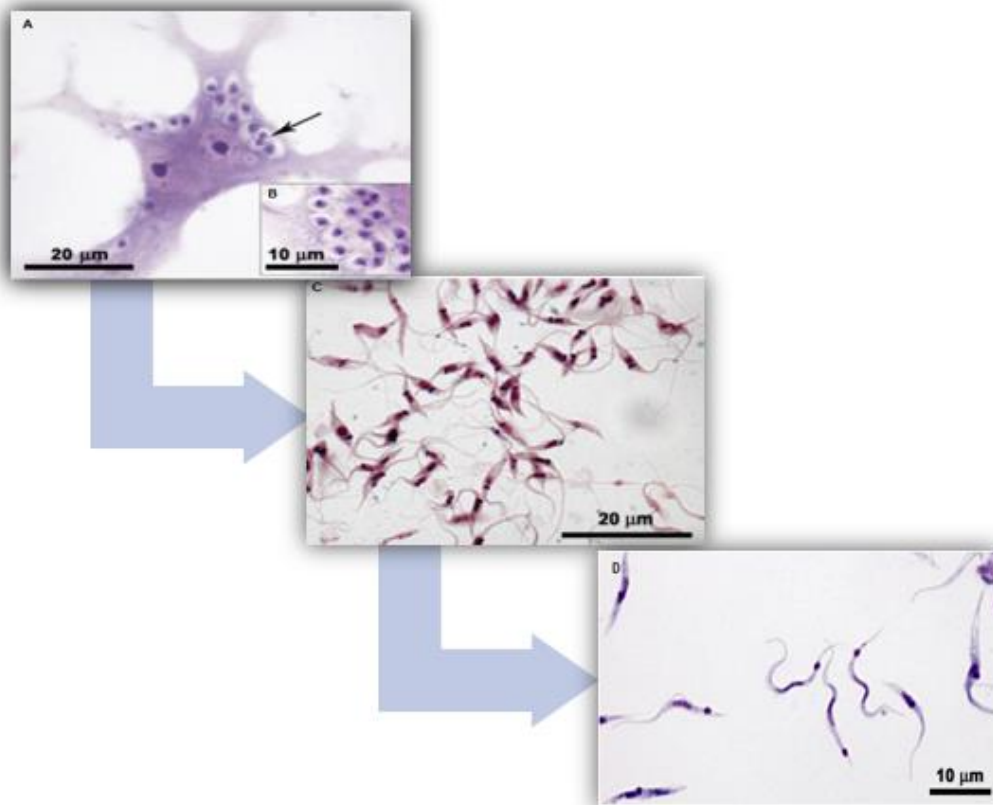
FONTE: AUTOR, 2020. Principais espécies de triatomíneos presentes na América Latina.

Em adição, estes insetos habitualmente se encontram em ambientes silvestre, peridomiciliar e domiciliar. Geralmente se deparam em locais recuados e frestas nas

paredes e telhados de moradias de barro ou ainda de alvenaria, bem como móveis, malas, colchões dentre outros, de modo que a invasão humana em ambientes silvestres propiciaram tais migrações (LANA, DE; MENEZES MACHADO, DE, 2017; MILLS, 2020).

A partir destes insetos, os parasitos do gênero *Trypanosoma* desenvolvem-se no intestino baixo e no reto, se valendo deste vetor para infectar outros hospedeiros (como o homem), subdividindo-se em 3 formas evolutivas: amastigota, epimastigota e tripomastigota (Figura 2). Adicionalmente, a morfologia do parasito indica a presença de um núcleo e o cinetoplasto sempre em posição emergente ao flagelo, de modo a proporcionar a diferenciação destas (LANA, DE; MENEZES MACHADO, DE, 2017).

Figura 2 – Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*.



FONTE: AUTOR, 2020. Formas evolutivas identificadas por microscopia óptica, coradas com Giemsa. Em A e B, amastigotas; Em B, epimastigotas; Em C, Tripomastigotas metacíclicas (metaciclogênese *in vitro*).

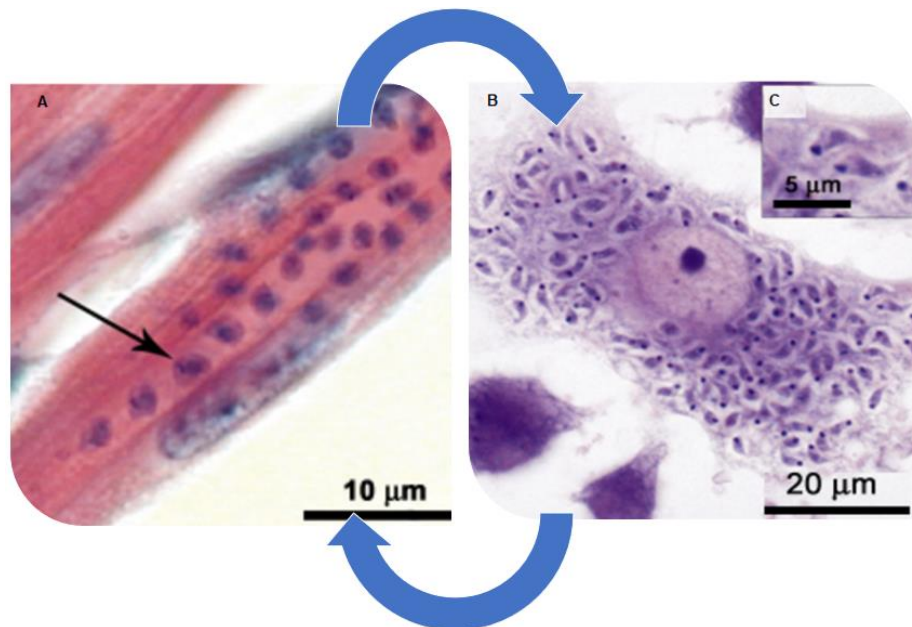
Conforme a figura supracitada, as formas evolutivas do *T. cruzi* são diferenciadas por meio de microscopia óptica, onde a forma amastigota é caracterizada pela forma arredondada e flagelo curto, sendo a forma infectante para

os mamíferos (Figura 4 A), além de se multiplicar por fissão binária (GUARNER, 2019; LANA, DE; MENEZES MACHADO, DE, 2017).

Diferentemente desta, a forma epimastigota não é infecciosa aos mamíferos, de modo a ser encontrada na urina e trato gastrointestinal do inseto vetor, possuindo flagelo livre, cinetoplasto em forma de bastão e se multiplicando por fissão binária longitudinal (GUARNER, 2019; LANA, DE; MENEZES MACHADO, DE, 2017).

A partir da forma supracitada se origina a tripomastigota, onde se encontra no sangue periférico dos mamíferos e infectando os triatomíneos no momento do repasto sanguíneo, estando presente também nas fezes e urina deste (tripomastigotas metacíclicas – figuras 2 e 3). Além disto, não se multiplicam e podem se originar a partir de amastigotas em culturas (GUARNER, 2019; LANA, DE; MENEZES MACHADO, DE, 2017).

Figura 3 – Formas evolutivas infecciosas do *T. cruzi* em células e tecidos de hospedeiros.



FONTE: AUTOR, 2020. Em A, tecido cardíaco de camundongo infectado por amastigotas; Em B e C, célula hospedeira repleta de tripomastigotas infecciosas.

2.2 Mecanismos de transmissão

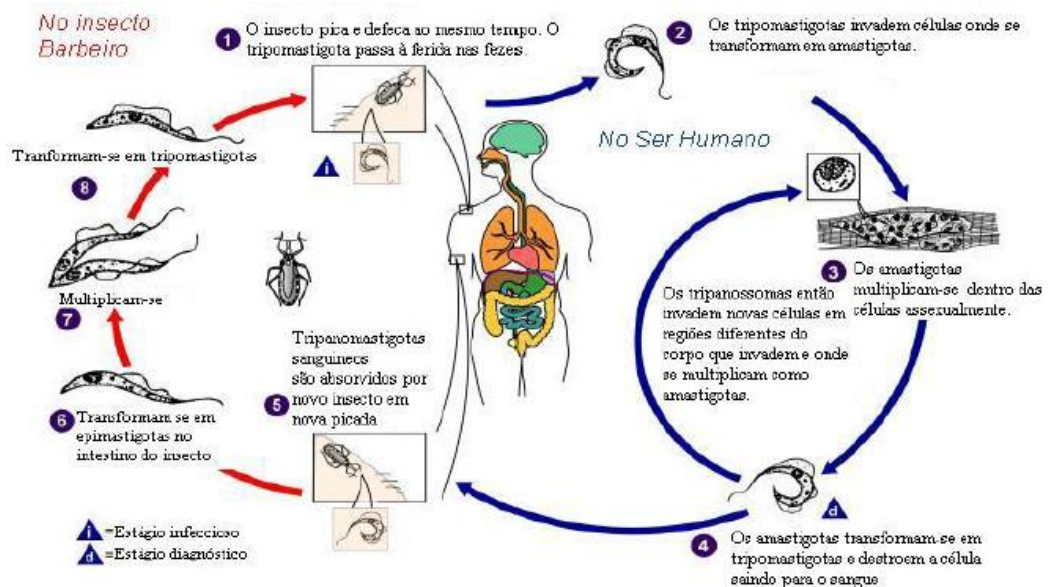
Os triatomíneos são insetos hematófagos, onde se alimentam de sangue proveniente de animais endotérmicos como aves e mamíferos, de modo que possuem

uma estrutura específica para a ocorrência deste fato, chamada de probóscide. Desta maneira, tais invertebrados são atraídos pelo calor, CO₂, umidade e odores por meio destes animais, picando-os para promover seu repasto sanguíneo (LÓPEZ-VÉLEZ; NORMAN; BERN, 2020; ROSE; CARVALHO, J. L.; HECHT, 2020).

Logo após a inserção da probóscide, o inseto suga um volume sanguíneo de até 10 vezes sua massa corpórea, em menos de 30 minutos. Neste momento, substâncias anestésicas e vasodilatadoras são injetadas por meio da saliva, o que promove tal fato sem que o hospedeiro não sinta dor e, assim, possa impedir a ação (FIELD *et al.*, 2017; FRANCO, J.; SCARONE; COMINI, 2018; MILLS, 2020).

Desta forma, o triatomíneo defeca logo após a picada, despejando, nesta, o parasito em sua forma tripomastigota, que adentra ao hospedeiro por meio de soluções de continuidade promovidas pela inserção da probóscide, fazendo com que haja a infecção por meio do parasito em questão (Figura 4) (DOCAMPO; MORENO, 2017; GUHL, 2017).

Figura 4 – Ciclo biológico infeccioso do parasito *T. cruzi*.



FONTE: PINHEIRO, 2012.

Contudo, além da transmissão vetorial supracitada, há outras formas de infecção por meio do parasito, conforme elencados na tabela 1, onde é citada a transmissão devido a transfusões de sangue, acidentes de punção, recepção de órgãos, bem como alimentos contaminados como açaí, caldo de cana, dentre outros (FUJITA; NASCIMENTO, M. S.; ANDRADE JÚNIOR, DE, 2019; GUARNER, 2019;

MONCAYO; SILVEIRA, A. C., 2017). Em adição, a transmissão sexual tem sido, reportada recentemente, contribuindo para a disseminação desta grave enfermidade (GOMES *et al.*, 2019).

Tabela 1 – Período de incubação em função do tipo de transmissão por meio do *T. cruzi*.

| | |
|---------------------------|------------------------------|
| Transmissão vetorial | 7 a 15 dias |
| Transmissão transfusional | 30 a 40 dias em diante |
| Transmissão acidental | Até 20 dias, aproximadamente |
| Transmissão oral | 3 a 22 dias |

FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL; SAÚDE, 2020 (adaptado).

2.3 Manifestações clínicas das fases aguda e crônica

Alguns fatores recorrentes são observados durante a fase aguda da doença, de modo que a carga parasitária é consideravelmente elevada durando, em média, cerca de dois meses, sendo frequentemente assintomática neste período. Em adição, a taxa de mortalidade atualmente encontra-se abaixo de 5%, podendo haver cura (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019a; MILES, 2017; WOOD, 2019).

Contudo, apesar de raros, alguns sinais sistêmicos podem ser apresentados: febre moderada, cefaleia, mal estar, mialgia, diarreia, anorexia, linfadenopatia, edema local ou generalizado, erupção cutânea, miocardite, taquicardia, arritmias, além de bloqueio atrioventricular. Embora em menor proporção, meningoencefalite também pode ser observada (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019a; MILES, 2017; RASSI *et al.*, 2017; WOOD, 2019).

Quando a transmissão é decorrida de um vetor, algumas observações clássicas podem ser ressaltadas (Figura 5), como o sinal de romaña (50%), que é representado por um edema indolor, unilateral e periorbital nas pálpebras, além de uma reação inflamatória na pele, chamada de chagoma (25%) (RASSI *et al.*, 2017).

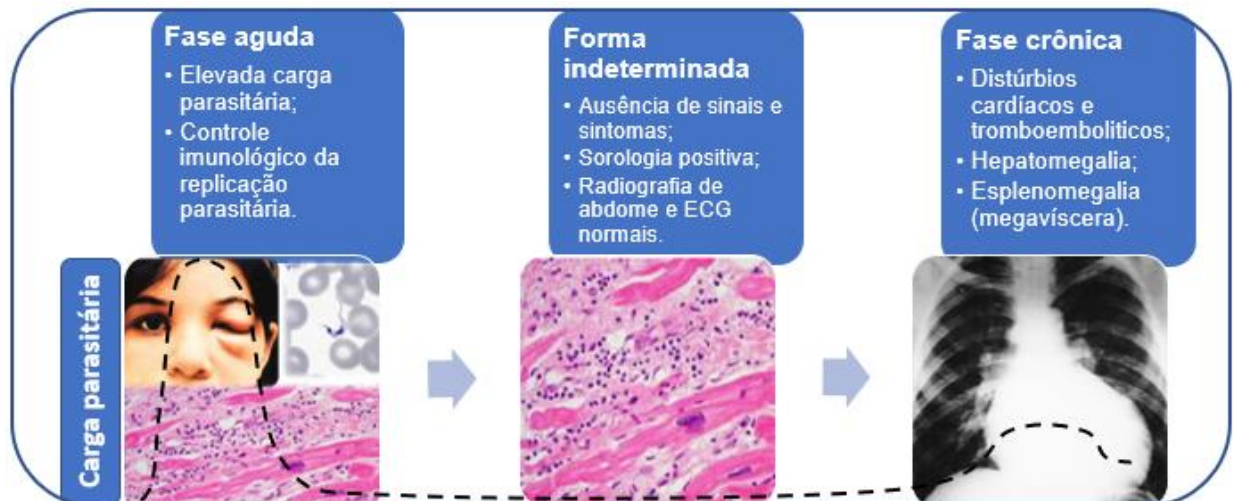
Além disso, alterações laboratoriais podem ser analisadas por meio de hemograma, observa-se leucocitose de leve a moderada, com eosinofilia, linfocitose (linfócitos atípicos) e neutropenia. No exame bioquímico, proteína C-reativa sérica pode estar elevada, além de hiper celularidade (linfocitose), leve aumento de proteínas

e decréscimo de glicose no líquido cefalorraquidiano, nos casos em que meningoencefalite é observada (ROBERTS, 2018; THOMPSON; CAMACHO-GONZALEZ, 2018).

Já na fase crônica da doença, manifestações cardíacas graves são mais comuns, como alterações no ritmo cardíaco, distúrbios tromboembolíticos, morte súbita cardíaca e insuficiência cardíaca sistólica crônica (Figura 5), de modo que tais fatores são decorrentes da presença massiva de amastigotas no (BENZIGER; CARMO, DO; RIBEIRO, A. L. P., 2017; GUARNER, 2019).

Neste sentido, hepatoesplenomegalia também pode ser observada nesta fase, de modo que tal fator é resultante da deservação dos plexos autonômicos digestivos, ocasionando distúrbios intestinais, dilatação e formação de megavíscera (SANTOS, É.; MENEZES FALCÃO, 2020; TZIZIK; BORCHARDT, 2018).

Figura 5 – Formas clínicas da doença de Chagas em função da carga parasitária.



FONTE: AUTOR, 2020.

2.4 Diagnóstico diferencial

O diagnóstico da doença de Chagas é realizado em função da fase em que se encontra o paciente, de modo que possíveis sinais e sintomas, somados a exames laboratoriais e de imagem, poderão direcionar o método mais apropriado a ser realizado: parasitológico, molecular ou sorológico (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019b; MILES, 2017).

De acordo com os métodos de diagnósticos listados na tabela 2, o exame parasitológico, realizado por microscopia óptica com aumento de 400 vezes, é consideravelmente eficaz durante a fase aguda da infecção, de modo a forma tripomastigota poderá ser vista em lâmina a fresco, se movimentando rapidamente por entre as hemácias, ou por gota espessa, fixado e corado por giemsa (BALOUZ; AGÜERO; BUSCAGLIA, 2017; LUQUETTI; SCHMUÑIS, 2017).

Tabela 2 – Diagnóstico diferencial apropriado em função da fase infecciosa.

| | Fase aguda | Infecção congênita | Fase crônica | Transplante de órgãos/ acidentes | Reativação (imuno comprometidos) |
|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------|---|---|
| Microscopia | Adequado | Adequado | Inadequado | Adequado | Adequado |
| PCR (molecular) | Mais adequado | Mais adequado | Inadequado | Mais adequado | Quantitativo é mais adequado |
| Sorologia anti-IgG | Positivo somente após semanas | Adequado até 6-9 semanas | Mais adequado | Adequado | Inadequado |

FONTE: AUTOR, 2020.

Neste sentido, caso haja considerável indicação clínica de infecção e as análises supracitadas sejam negativas ou para transmissão congênita, poderá ser realizado o teste de concentração (micro-hematócrito ou strout), onde uma amostra de sangue é centrifugada em microcapilar e então, o sedimento é analisado, apresentando eficácia de 80-90% (LÓPEZ-VÉLEZ; NORMAN; BERN, 2020; SÁNCHEZ-VEGA *et al.*, 2020).

Em caso de reativação da infecção em pacientes imunocomprometidos (coinfecção por HIV, por exemplo), tais métodos poderão ser analisados. Além disso, na fase crônica, contudo, a análise microscópica frequentemente não é indicada, uma vez que há decréscimo considerável da carga parasitária e, neste contexto, a forma tripomastigota circulante dificilmente será vista (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019a; ROBERTS, 2018).

Os testes moleculares realizados através de PCR (reação da cadeia da polimerase) em tempo real são valiosos para a detecção do DNA parasitário na fase aguda, transmissão congênita, reativação e transplante de órgãos/acidentes; contudo, na fase crônica, este não é indicado devido à baixa carga parasitária. No entanto, sua complexidade e custo ainda impede deste ser realizado rotineiramente (LUQUETTI; SCHMUÑIS, 2017; SCHIJMAN, 2018).

Adicionalmente, a análise sorológica apresenta-se mais eficaz na forma crônica da doença, onde é realizada a pesquisa de IgG por meio de testes rápidos comerciais, geralmente com especificidade e eficácia acima de 95%; contudo, reação cruzada poderá acontecer devido infecção por leishmaniose (MILES, 2017; MILLS, 2020).

Além disso, no caso de investigação de transmissão congênita, devido IgG poder ser transferido através da placenta, o teste poderá ser positivo por até 9 meses (CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020; LUQUETTI; SCHMUÑIS, 2017; SANTOS, É.; MENEZES FALCÃO, 2020).

2.5 Prevenção

Devido a doença de Chagas estar atrelada principalmente a regiões em que há precariedade em moradias, saneamento básico e educação, preveni-la constitui uma tarefa árdua e diretamente relacionada a aspectos de políticas públicas, sobretudo envolvendo medidas de melhorias em tais moradias e conscientização populacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL; SAÚDE, 2020).

Sendo assim, o uso de inseticidas, redes de proteção, roupas de manga longa, repelentes e limpeza frequente constituem ferramentas que podem ajudar na prevenção do aparecimento de triatomíneos nestas moradias precárias, somadas ao cozimento de alimentos acima de 45°C. Ainda, ao observar o inseto na moradia, é de grande importância não danificá-lo e apreendê-lo em recipiente fechado para evitar fuga (LANA, DE; MENEZES MACHADO, DE, 2017; MILES, 2017).

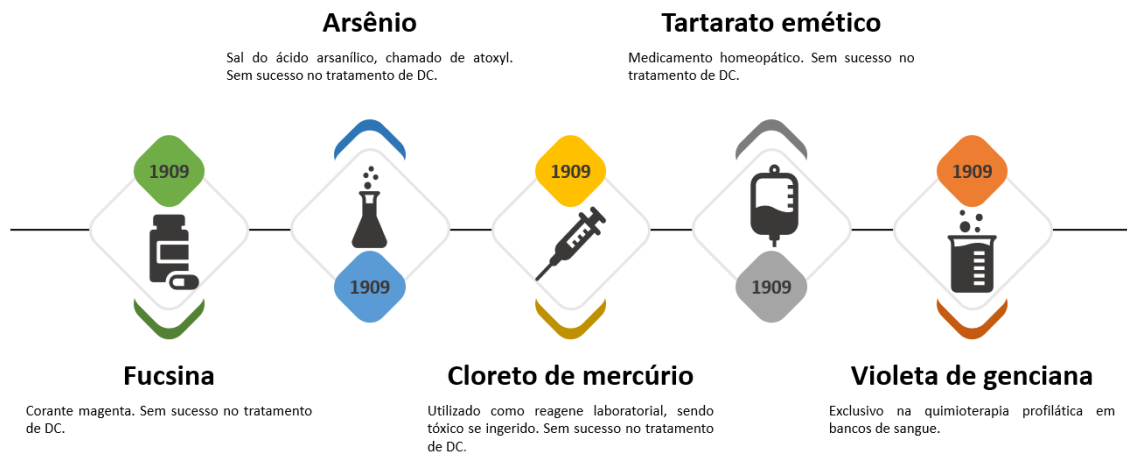
Neste contexto, a triagem em bancos de sangue, bem como a vigilância sorológica no pré-natal para minimizar a transmissão congênita compõem medidas decorrentes em ambiente hospitalar (DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, 2017; PADILLA; BRANDAN; BASOMBRÍO, 2017).

Contudo, ainda não se tem uma vacina efetiva frente à infecção por tripanossomíases, de modo que, para a doença de Chagas, a possível patogênese autoimune, somada a difícil perspectiva para realização de ensaios clínicos, constituem desafios para o desenvolvimento do que seria uma valiosa arma contra o *T. cruzi* (BERGLUND, 2019; BIVONA *et al.*, 2020; MILES, 2017).

2.6 Farmacoterapia atual antichagásica

Logo após a descoberta da doença de chagas, em 1909, diversos agentes foram testados no intuito de descobrir um composto ativo frente à emergente enfermidade, como fucsina arsênio, cloreto de mercúrio e tartarato emético, onde nenhum destes demonstrou resultados promissores (RIBEIRO, V. *et al.*, 2020; ROQUERO *et al.*, 2019). Além destes, a violeta de genciana também foi testada, onde, contudo, atualmente é de uso exclusivo na quimioterapia profilática em bancos de sangue (CRISTOVÃO-SILVA *et al.*, 2019; KRATZ, 2019; RIBEIRO, V. *et al.*, 2020; ROQUERO *et al.*, 2019) (Figura 6).

Figura 6 – Primeiros compostos utilizados na farmacoterapia antichagásica.

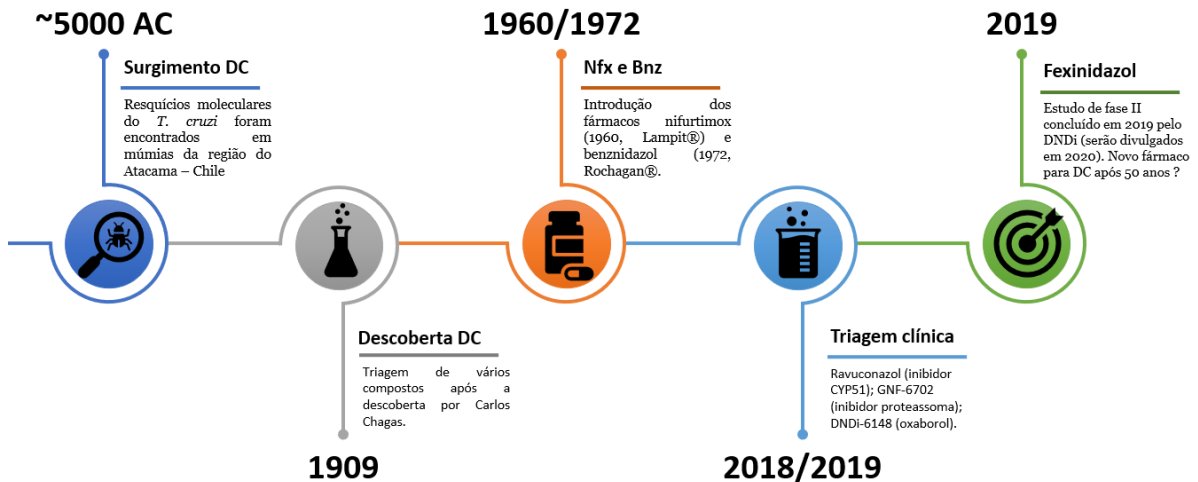


FONTE: AUTOR, 2020.

Atualmente, a farmacoterapia antichagásica está restrita a basicamente dois fármacos (Figura 7): nifurtimox - **Nfx (1)**, descoberto em 1960, com 8-10 mg/kg em 3 doses por 1-4 meses (Lampit®, Bayer); além do benznidazol - **Bzn (4)**, em 2 doses de 5-10 mg/kg por 1-2 meses, introduzido no mercado em 1972 (Rochagan®, Roche). Tais fármacos, no entanto, apresentam diversos efeitos deletérios, somados à

resistência parasitária (FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, 2017; GODOY *et al.*, 2019).

Figura 7 – Linha do tempo da descoberta de drogas frente à doença de Chagas.



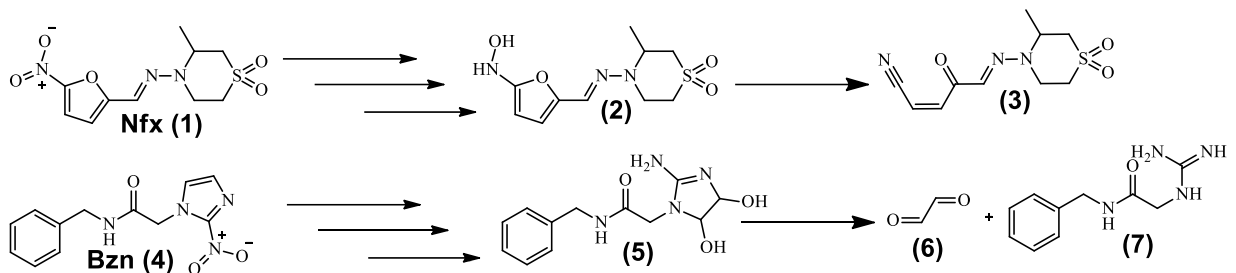
FONTE: SANTOS-JÚNIOR *et al.*, 2021.

Contudo, estas drogas nitroaromáticas apenas são relativamente efetivas na fase aguda da doença, sendo esta difícil de ser diagnosticada por ser geralmente assintomática, além do mecanismo de ação destas não ter sido ainda totalmente elucidado (FRANCO, J.; SCARONE; COMINI, 2018; GODOY *et al.*, 2019).

Em adição, estas constituem pró-fármacos, de modo que, para o Nfx **(1)**, sua ativação está relacionada à formação de um intermediário nitroso, seguido de hidroxamina **(2)**, onde uma fragmentação aromática dá origem a um grupo nitrila de cadeia aberta **(3)** (Figura 8). Assim, este grupo atua como aceptor de Michael, o que pode formar adutos com o kDNA e grupo tiol parasitários (FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, Adriano D, 2017; FRANCO, J.; SCARONE; COMINI, 2018; GODOY *et al.*, 2019; PRAMANIK *et al.*, 2019; SCARIM *et al.*, 2018).

Por sua vez, a ativação do Bzn **(4)** ocorre devido à formação de hidroxamina e hidroxila, de modo que um rearranjo dá origem ao intermediário diidroxidiidro **(5)**, onde, por sua vez, sua fragmentação está relacionada à formação do produto glicoxal **(6)** e guanidinoacetamida **(7)**. Neste contexto, o Bzn **(4)** interfere na síntese de RNA, kDNA e proteínas, ocasionando mutações e citotoxicidade (Figura 8) (FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, Adriano D, 2017; FRANCO, J.; SCARONE; COMINI, 2018; GODOY *et al.*, 2019; PRAMANIK *et al.*, 2019; SCARIM *et al.*, 2018).

Figura 8 – Proposta de mecanismo simplificado para Nfx, Bzn e seus respectivos metabólitos ativos após ativação por sistemas celulares do parasito *T. cruzi*.



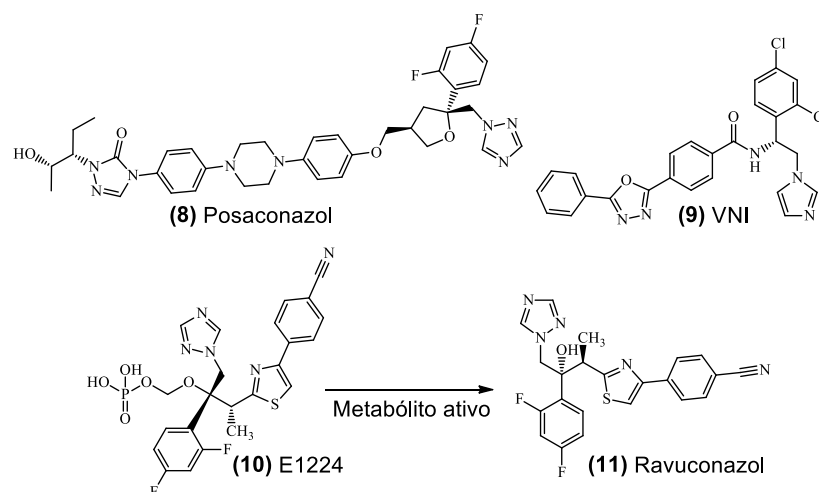
FONTE: AUTOR, 2020.

2.6.1 Recentes avanços na farmacoterapia antichagásica

2.6.1.1 Azóis tripanocidas: posaconazol, VNI, E1224/ravuconazol

Alguns antifúngicos triazólicos, inibidores da biossíntese de ergosterol, estão sendo propostos como potenciais tripanocidas, como o posaconazol (8), VNI (9), além do ravuconazol (11) e seu pró-fármaco E1224 (10) (Figura 9). Isto se dá pelo fato do *T. cruzi* depender de forma exclusiva da síntese de ergosterol endógeno, necessário para o crescimento do protozoário, sendo potentes inibidores da enzima C14 α -esterol desmetilase (CYP51) (FIELD *et al.*, 2017; FIGUEIREDO DINIZ, DE *et al.*, 2018; VERMELHO; RODRIGUES, G. C.; SUPURAN, 2019).

Figura 9 – Potenciais Inibidores da C14 α -esterol desmetilase (CYP51).



FONTE: AUTOR, 2020.

Estudos demonstraram que o posaconazol (**8**) possui atividade tanto em modelo *in vitro* quando *in vivo*, chegando a curar 90% dos animais infectados, sendo menos eficaz que o Bnz (**4**). Contudo, apesar do fármaco ter apresentado falhas nos aspectos de segurança clínica, constitui um modelo promissor para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas, além de ser utilizado em farmacoterapias combinadas (FRANCISCO *et al.*, 2015; MOLINA; SALVADOR; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, 2015).

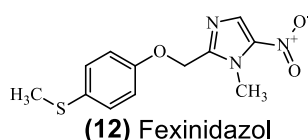
VNI (**9**) constitui o primeiro inibidor da CYP51 não antifúngico, tendo apresentado resultado de cura tanto da fase aguda como na crônica em camundongos infectados com a cepa Tulahuen; contudo, falhou quando a cepas eram Y e Colombian nas duas fases (NAZARÉ CORREIA SOEIRO, DE *et al.*, 2013).

Ravuconazol (**11**) apresentou $CI_{50} = 0,1$ nM, sendo um promissor candidato a fármaco antichagásico, de modo que o pró-fármaco E1224 (**10**) melhora o perfil farmacocinético. Apesar disto, o fármaco apresentou problemas de segurança clínica, sendo então estudado em terapia combinada com Bzn (**4**) (TORRICO *et al.*, 2018).

2.6.1.2 Nitroimidazol fexinidazol

Fexinidazol (**12**), desenvolvido nas décadas de 1970 e 1980 como antibiótico de amplo espectro, foi aprovado para doença do sono em 2018, onde seu mecanismo de ação está relacionado ao metabolismo por nitroreduases parasitárias, formando espécies reativas que inibem a síntese de DNA (Figura 10) (FRANCO, J.; SCARONE; COMINI, 2018; RIBEIRO, V. *et al.*, 2020; VERMELHO; RODRIGUES, G. C.; SUPURAN, 2019).

Figura 10 – Nitroimidazol fexinidazol, promissor candidato a fármaco contra doença de Chagas.



FONTE: AUTOR, 2020.

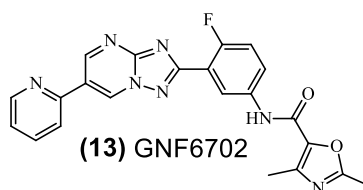
O fármaco está sendo avaliado pelo DNDi, onde estudo de fase II foi concluído em 2019, em cinco locais da Espanha, de modo que os resultados serão divulgados

em 2020. Em caso de eficácia comprovada, este será um novo fármaco para doença de Chagas em mais de 50 anos (DNDI, 2020a; VILLALTA; RACHAKONDA, 2019a).

2.6.1.3 Inibidores de proteassoma

O azabenzoxazol GNF6702 (**13**) corresponde a um inibidor de proteassoma alostérico, não competitivo, não ativo em proteassoma mamífero, embora pouco tóxico em células deste, sendo eficaz em tripanossomíases em camundongos (DC, doença do sono e leishmaniose) (KHARE *et al.*, 2016). Com eficácia oral comparada ao Bzn (**4**), este candidato a fármaco encontra-se em avaliação pré-clínica em estudos de toxicidade (Figura 11) (XIE *et al.*, 2019; ZMUDA *et al.*, 2019).

Figura 11 – Inibidor de proteassoma cinetoplastídeo GNF6702.

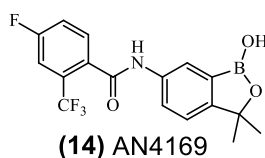


FONTE: AUTOR, 2020.

2.6.1.4 Oxaboróis

O oxaborol AN4169 (**14**) foi desenvolvido pela Anacor pharmaceutical, em que demonstrou atividade curativa de 100% em camundongos infectados com *T. cruzi*, administrada por 40 dias consecutivos. Contudo, quando administrada de forma intermitente, falhou em apresentar cura (Figura 12). Em adição, uma parceria da Anacor, Universidade da Geórgia e DNDi, está estudando o desenvolvimento de um novo lead oxaborol (DNDi-6148), que seja eficaz frente à leishmaniose, DC e doença do sono (BOCXLAER, VAN *et al.*, 2019; DNDI, 2020b).

Figura 12 – Promissor oxaborol AN4169.



FONTE: AUTOR, 2020.

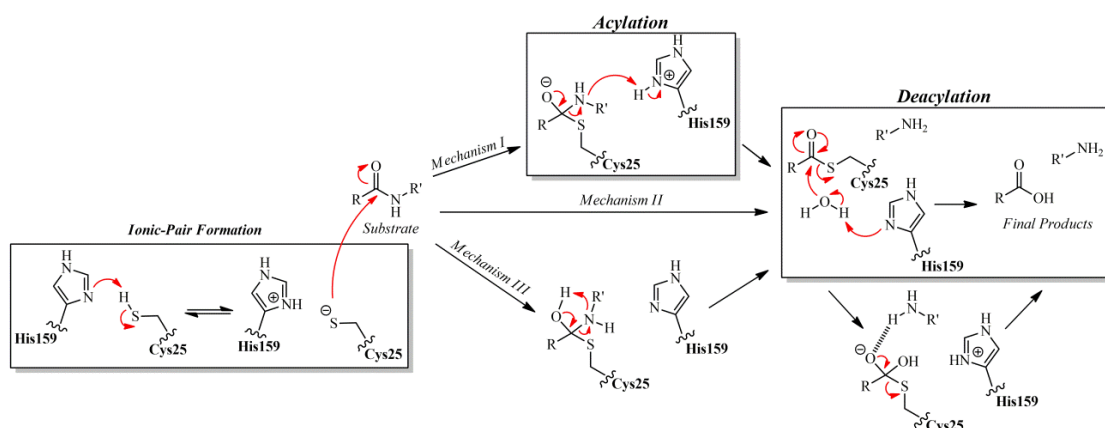
2.6.2 Enzima cruzaina como alvo promissor no desenvolvimento de novos compostos bioativos.

Cisteíno proteases representam um grupo de alvos presentes em vários parasitas associados às DTNs, sendo substancialmente explorados em vários estudos de triagem virtual. Tais enzimas estão presentes em diferentes formas de vida de vários parasitas mediadores de DTN, participando de diversos processos biológicos (PARK, S. Y. *et al.*, 2018; SIKLOS; BENAÏSSA; THATCHER, 2015; WARD *et al.*, 2019).

Em adição, o mecanismo catalítico das cisteíno proteases envolve inicialmente a formação de uma par iônico reativo, a partir dos resíduos de Cys²⁵ e His¹⁵⁹, ocorrendo a transferência de prótons entre eles (Figura 13) (NASCIMENTO, I. *et al.*, 2020). Logo após, ocorre a acilação e desacilação da enzima, bem como a entrada de uma molécula de água e a formação de dois intermediários tetraédricos (FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, Adriano D., 2017b; SILVA-JUNIOR, DA *et al.*, 2017; SILVA, D. G. *et al.*, 2017).

Dentre estas, cruzaina (EC 3.4.22.51) – forma recombinante da enzima cruzipaina, refere-se a uma cisteíno protease lisossomal, expressa em todas as formas evolutivas do *T. cruzi*, estando presente no desempenho de funções como replicação intracelular, interações parasito-hospedeiro, evasão da resposta imune, bem como a diferenciação da forma epimastigota para a forma metacíclica infecciosa (FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, Adriano D., 2017a; SCARIM *et al.*, 2018; SILVA-JUNIOR, DA *et al.*, 2017).

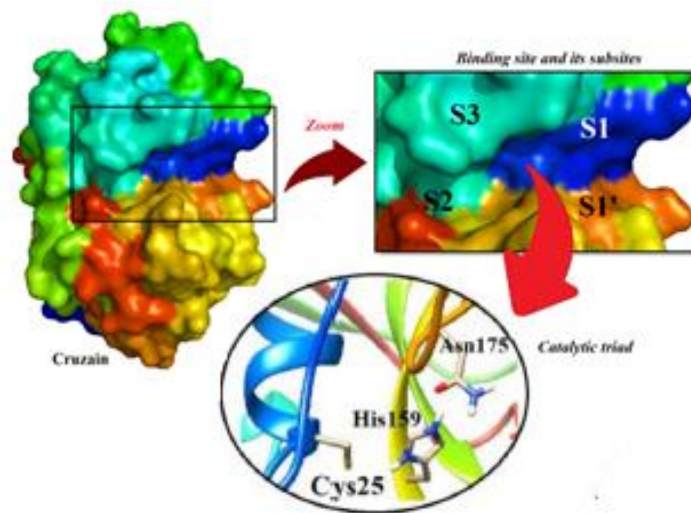
Figura 13 – Mecanismo catalítico de cisteíno proteases.



FONTE: NASCIMENTO, I. *et al.* (2020).

Desta forma, cruzaina constitui o alvo mais estudado em abordagens de SBDD, onde diversos trabalhos são reportados na literatura direcionando compostos bioativos inibidores desta enzima, de modo a interagir com sua tríade catalítica (Figura 14): Cys²⁵, His¹⁵⁹ and Asn¹⁷⁵ (NASCIMENTO *et al.*, 2021) bem como os subsítios S1, S1', S2 e S3 (CIANNI *et al.*, 2018; SILVA-JUNIOR, DA *et al.*, 2017; SILVA, D. G. *et al.*, 2017).

Figura 14 – Tríade catalítica da enzima cruzaina.

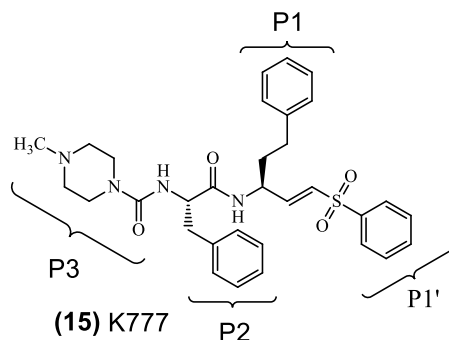


FONTE: NASCIMENTO, I. *et al.* (2020); NASCIMENTO *et al.*, (2021) (ADAPTADO).

Diversos estudos relacionando promissores inibidores da enzima cruzaina estão reportados na literatura, onde o inibidor K777 (**15**) corresponde à vinil sulfona mais potente encontrada na literatura ($CI_{50} = 5$ nM), sendo também eficaz contra as formas amastigotas e epimastigotas, reduzindo a parasitemia sérica em modelo animal (Figura 15) (ALAM, B.; BISWAS, 2019; FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, Adriano D., 2017b; SIKLOS; BENAÏSSA; THATCHER, 2015).

Tal inibidor se liga irreversivelmente ao grupo tiol catalítico do resíduo de Cys²⁵ por meio de uma adição de Michael. No entanto, não avançou em estudos clínicos devido elevada hepatotoxicidade (DNDI, 2014; NDAO *et al.*, 2014; SCARIM *et al.*, 2018).

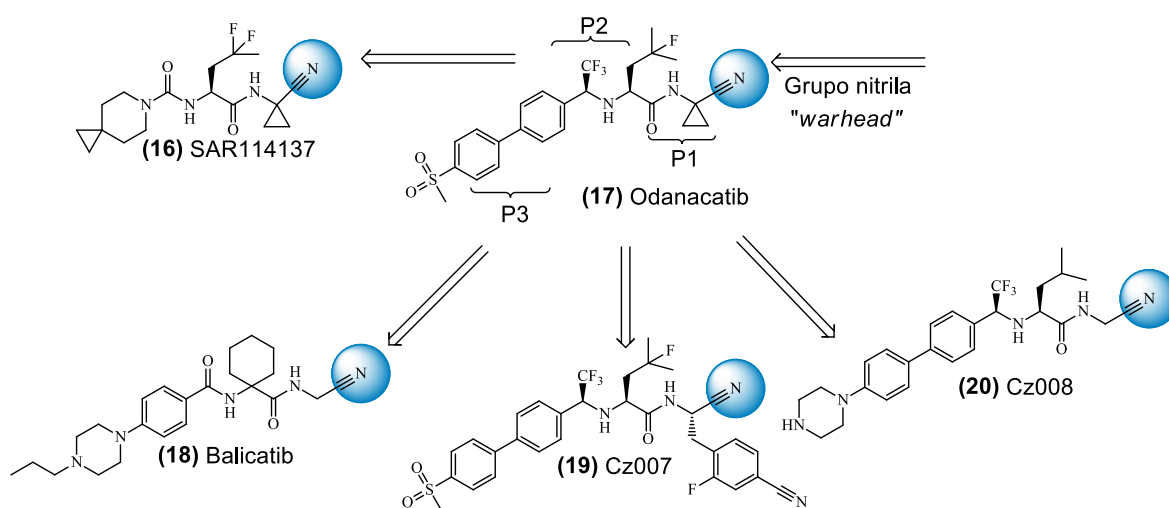
Figura 15 – Inibidor irreversível vinil sulfona mais potente frente à cruzaina.



FONTE: AUTOR, 2020.

Além do K777 (UCSF) **(15)**, alguns compostos desenvolvidos para inibir a cruzaina avançaram às pesquisas clínicas na busca pelo desenvolvimento de novos fármacos contra a DC, de modo a destacar o SAR114137 (Sanofi) **(16)**, além dos inibidores covalente-reversíveis Balicatib (Novartis) **(18)**, Cz007 (Merk) **(19)** e Cz008 (Merk) **(20)** (Figura 16) (CIANNI *et al.*, 2019; VILLALTA; RACHAKONDA, 2019b; YAMILE VARGAS-MÉNDEZ; KOUZNETSOV, 2019).

Figura 16 – Inibidores de catepsina K contendo grupo nitrila *warhead* redirecionados para cruzaina.



FONTE: AUTOR, 2020. Compostos inibidores da cruzaina derivados estruturais do **(17)** Odanacatib em estudos pré-clínicos frente a DC.

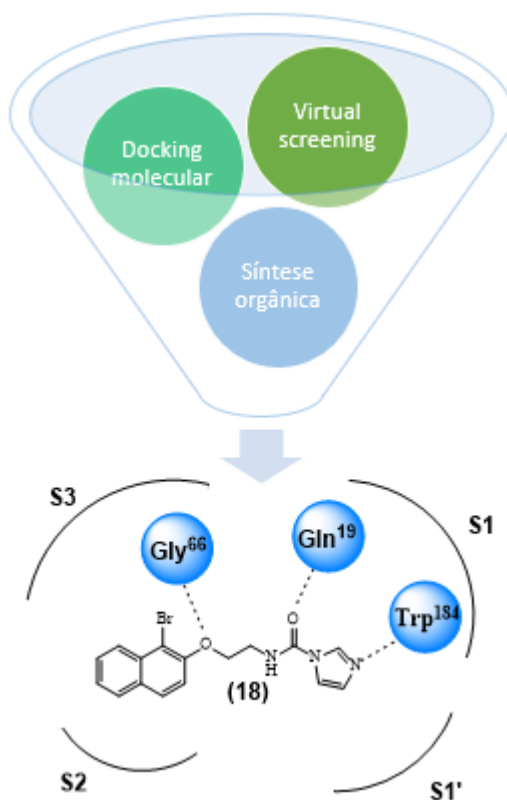
Estas últimas três moléculas foram projetadas a partir do Odanacatib (Merk) **(17)**, um potente inibidor da catepsina K contendo um grupo *warhead* nitrila que foi

retirado da fase III contra osteoporose pós menopausa devido ao risco de acidente vascular encefálico (MULLARD, 2016; SIKLOS; BENAÏSSA; THATCHER, 2015; SIQUEIRA-NETO, Jair L. *et al.*, 2018).

Tal fato se dá devido a semelhança estrutural desta enzima com a cruzaína, de modo que o mecanismo de ação está relacionado à formação de uma ligação covalente reversível, através de um ataque nucleofílico entre o tiolato enzimático (Cys-SH) e C \equiv N, seguido da formação de um aduto tioimidato (CIANNI *et al.*, 2019; MARTINEZ-MAYORGA *et al.*, 2015; NDAO *et al.*, 2014).

Recentemente, Souza, M. L. De *et al.* (2020) reportou um estudo direcionando abordagens computacionais para o desenvolvimento de novos inibidores reversíveis e competitivos da cruzaína, utilizando para isto, *screening* virtual e *docking* molecular para a seleção dos potenciais ligantes e, logo após, sintetizá-los para testar frente a enzima.

Figura 17 – Interações do composto (18) obtido através de *screening* virtual (SBDD).



FONTE: AUTOR, 2020.

Neste sentido, os autores utilizaram a base de dados Zinc, contendo 3409091 compostos e 453539 fragmentos, culminando na síntese de 36 compostos. Assim, **(18)** demonstrou ser o mais promissor, com 100% de inibição enzimática e $CI_{50} = 0,12 \mu\text{M}$, além de $7,5 \mu\text{M}$ frente amastigotas de *T. cruzi*, $> 50 \mu\text{M}$ contra fibroblasto humano e índice de seletividade > 6 (Figura 17).

2.7 Compostos heterocíclicos contendo átomo de enxofre como farmacóforo frente o *Trypanosoma cruzi*.

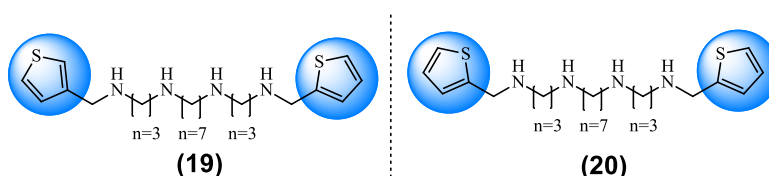
Um dos primeiros estudos relacionando o núcleo de tiofeno planejado em frente ao *T. cruzi*. foi realizado por Majumder; Kierszenbaum, (1993), onde os autores idealizaram a substituição da poliamina nesse heterociclo, uma vez que esse núcleo é amplamente relatado na literatura como um grupo antiparasitário (JAGU; POMEL; DIEZ-MARTINEZ; *et al.*, 2017; JAGU; POMEL; PETHE; *et al.*, 2017; MARTÍN-ESCOLANO, R. *et al.*, 2019).

Entretanto, o desenho dessa classe foi construído para possuir mecanismo de ação de inibição da invasão e multiplicação na célula hospedeira de mamíferos, atuando, para isso, diretamente na inibição da enzima poliamina oxidase.

Assim, 2 compostos foram descritos pelos autores com tal atividade (**19-20**) (Figura 18), após a análise da porcentagem de células infectadas pelo parasita no RHM (mioblastos cardíacos de ratos), 2 e 6,4%, respectivamente (o grupo controle demonstrou 17,7% de infecção).

Além disso, foi demonstrado que após o tratamento com **(19)**, havia 2,3% de parasitas / 100 RHM, enquanto que **(20)** o número era de 6,6% (22,2% para o grupo controle). Estudos cinéticos mostraram que a atividade inibitória desses derivados começa em 15 min, atingindo níveis máximos entre 60-120 min para demonstrar inibição completa da infecção pelos parasitas.

Figura 18 - Derivados de poliamina substituídos por N, N-tiofeno inibem a invasão e a multiplicação intracelular de parasita.



FONTE: AUTOR, 2020.

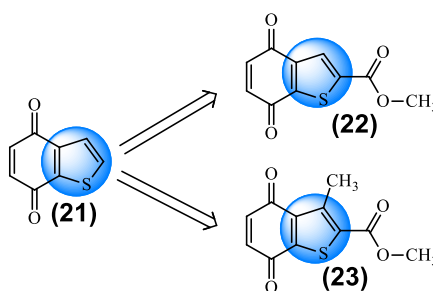
Após este pioneiro estudo, Valderrama, J. A. *et al.* (1999) rela uma nova classe de compostos potenciais anti-tripanosossal: Benzo[*b*]tiofeno-4,7-quinonas. Assim, essa classe foi planejada tendo em vista a atividade antiprotozoária de compostos contendo o núcleo quinona fundido a heterociclos, relatados em vários estudos (LARA *et al.*, 2018; OGINDO *et al.*, 2016; OLÍMPIO DA SILVA *et al.*, 2013). Com isto, os autores promoveram a introdução de duas carbonilas nas posições 4 e 7 do anel benzo[*b*]tiofeno, mimetizando a fusão dos anéis quinona e tiofeno, com o intuito de explorar a atividade antiparasitária desse heterociclo.

Neste contexto, 3 novos compostos (**21-23**) foram sintetizados e analisados quanto à sua atividade tripomastigotas de *T. cruzi* (Figura 19), uma vez que o núcleo da quinona é relatado na literatura como um potencial tripanocida devido à formação de intermediários de radicais aniônicos prejudiciais ao DNA pela bio-redução do sistema das quinonas (GHOSH *et al.*, 2019).

Entre os compostos ativos, (**22**) mostrou-se o mais promissor, apresentando 91% de inibição *in vitro* contra a forma tripomastigota de *T. cruzi*, enquanto os análogos (**21,23**) foram praticamente idênticos, com 85 e 82%, respectivamente.

Finalmente, tendo em vista os resultados acima mencionados, a inserção de um grupo éster metílico na posição 2 do composto (**21**), gerando derivado (**22**), promove um aumento razoável na inibição de tripomastigotas: de 85 para 91%. No entanto, adicionando ao mesmo tempo o substituinte metil na posição 3, de acordo com o análogo (**23**), a porcentagem é praticamente inalterada quando comparada ao composto de partida (**21**), perfazendo uma redução para 82%.

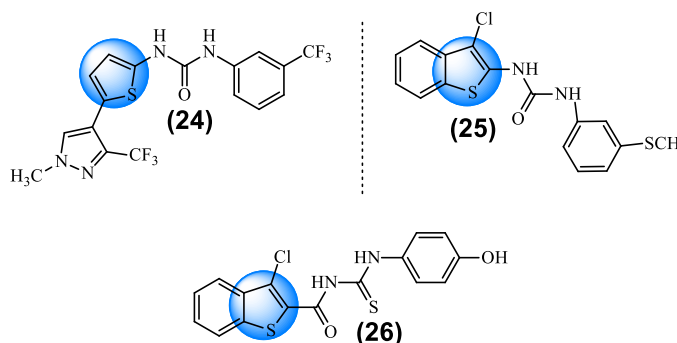
Figura 19 - Compostos anti-tripanosossoma derivados de nafto [2,3-*b*] tiofen-4,9-quinonas.



FONTE: AUTOR, 2020.

Um novo composto antitripanossoma seletivo e potencial foi relatado em 2000 por Du *et al.* (2000), planejado por triagem virtual usando o banco de dados ACD97 por DOCK4.0.1, sendo os derivados ativos obtidos (**24-26**) (Figura 20). Assim, os autores relataram a estrutura tiofen-2-arylureia como potencial inibidor da enzima cruzaina.

Figura 20 - Derivados tiofen-2-arylureia inibidores de cruzaina.



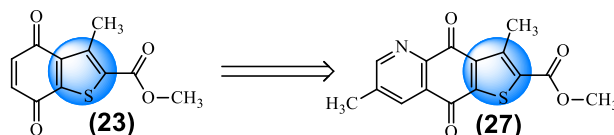
FONTE: AUTOR, 2020.

Entre os derivados sintetizados, a tioureia (**25**) mostrou ser a que apresentou maior potencial de inibidor da cruzaina, com $Cl_{50} = 2,7 \mu\text{M}$, sendo que para os seus análogos ureicos (**24,26**) os valores permaneceram praticamente idênticos: 3 e $3,1 \mu\text{M}$, respectivamente. Além disso, foi demonstrado por ensaios de *docking* que a tioureia (**26**) interage com os resíduos de aminoácidos Gly²³, Cys²⁵, Gly⁶⁵, constituindo a tríade catalítica da enzima estudada pelos autores (DU *et al.*, 2000).

Após os estudos de Valderrama, J. A. *et al.* (1999), conforme discutido acima, Pessoa-Mahana *et al.* (2002), do mesmo grupo de pesquisa, publicou uma continuação deste estudo relacionando a atividade antiprotozoária de quinonas acopladas ao anel de tiofeno.

Dessa forma, o grupo obteve um novo análogo ao composto (**23**) pertencente a essa classe, onde também foi analisado como inibição *in vitro* contra a forma tripomastigota de *T. cruzi*. Com isso, o derivado (**27**) contendo heterociclo de piridina 3-metilada fundido ao anel quinona, em relação ao composto (**23**), mostrou 74% de inibição. No entanto, essa modificação demonstrou uma redução na porcentagem de inibição entre esses derivados (de 82% para 74%), favorecida pela inserção do heterociclo piridina (Figura 21).

Figura 21 - Composto anti-tripanosossoma de quinonas contendo anel de tiofeno.



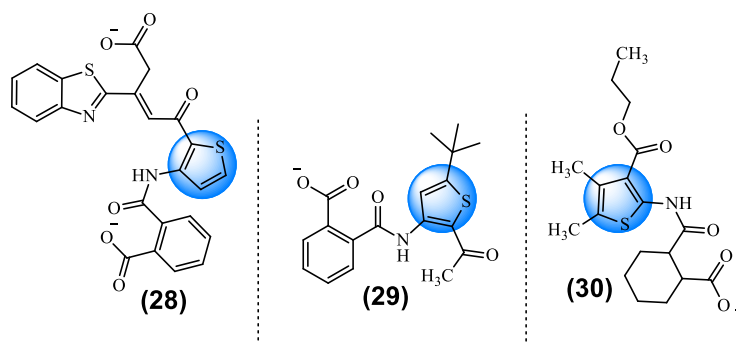
FONTE: AUTOR, 2020.

Após este estudo, apenas 7 anos depois foi relatado um estudo contendo heterociclo de tiofeno com atividade anti-chagas. No entanto, um estudo publicado por Neres *et al.* (2020) utilizou a técnica de descobrimento de drogas bioativas a partir de triagem virtual, idealizando como alvo a enzima *trans-sialidase* do parasita em questão.

Essa enzima foi relatada como alvo porque é de suma importância para o parasita na modulação da resposta imune do hospedeiro, onde a interação de compostos carregados negativamente com a tríade da arginina (Arg³⁵, Arg²⁴⁵ e Arg³¹⁴) culmina na redução da invasão do microrganismo (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2015; GALLANT *et al.*, 2018; NERES *et al.*, 2020).

Com isso, o grupo apresentou 4 novas moléculas (**28-30**), obtidas por essa metodologia, nas quais estas se mostraram potenciais inibidores enzimáticos: 79, 84 e 87%. Em vista desses resultados, pode-se observar que o (**28**) é o único nesta série que possui 2 cargas negativas, o que pode contribuir para uma menor inibição contra a *trans-sialidase*, conforme explicado no parágrafo acima (Figura 22).

Figura 22 - Inibidores da *trans-sialidase* proveniente de *T. cruzi* desenhados por meio de triagem virtual.



FONTE: AUTOR, 2020.

Além disso, o composto **(30)** tem a maior inibição, enquanto é o único que contém um substituinte éster no anel tiofeno. Esse fato pode estar relacionado à hidrólise desse grupo, gerando apenas no meio fisiológico um ácido carboxílico desprotonado, aumentando a carga negativa geral da molécula (Figura 23).

Seguindo a linha de pesquisa de desenvolvimento de compostos inibidores enzimáticos através de estudos *in silico*, Eberle *et al.* (2011) publicou estudo em 2011 relatando um novo alvo promissor para compostos bioativos antiprotozoários, a enzima *tripanotiona redutase* (TR) de *T. cruzi*.

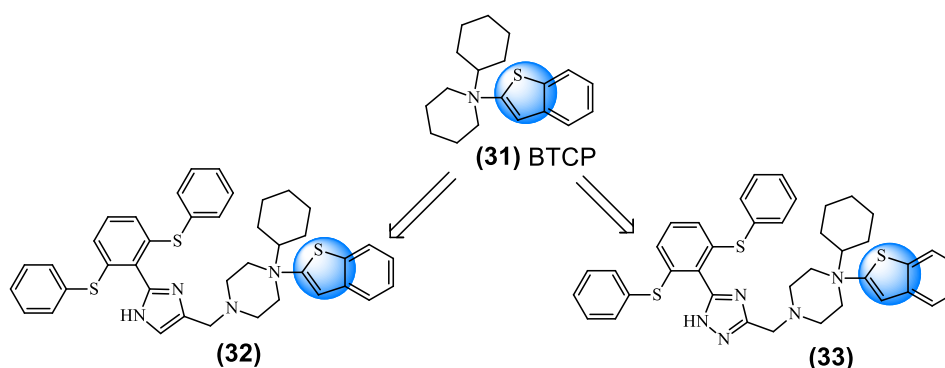
Esse fato se deve ao fato de que a referida enzima é essencial ao parasita *Trypanosomatidae* em relação ao metabolismo redox, além de estar ausente no homem, o que configura seletividade nos compostos (EBERLE *et al.*, 2011; SCARIM *et al.*, 2018).

Dando continuidade, os inibidores da TR foram projetados com base no composto BTCP **(31)** por meio de modelagem molecular utilizando o programa MOLOC, onde os compostos foram submetidos a ensaios de acoplamento na enzima estudada (código PDB: 1BZL), culminando em 2 compostos potenciais (Figura 23): **(32)** e **(33)**.

Segundo os autores mencionados, sugere-se que o heterociclo do benzotiofeno seja essencial para que os análogos resultem no efeito farmacodinâmico inibitório, uma vez que se projeta para o sítio Z da enzima. Além disso, o anel imidazol pode interagir com o resíduo Glu¹⁸, bem como a piperazina protonada interage com Glu⁴⁶⁶.

Com isto, o análogo **(32)** demonstrou $C_{150} = 2,33 \mu\text{M}$ frente à amastigotas do parasito em questão, com $K_{ic} = 0,51 \mu\text{M}$ perante TR, enquanto que para o derivado **(33)**, os valores foram de $52,2 \mu\text{M}$ e $1,1 \mu\text{M}$, respectivamente.

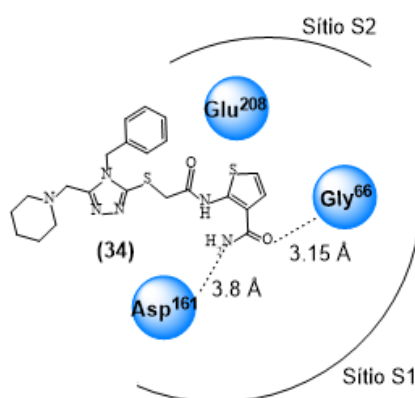
Figura 23 - Inibidores da tripanotiona redutase contendo anel benzotiofeno.



FONTE: AUTOR, 2020.

Os estudos sobre o desenvolvimento de inibidores da enzima cruzaina por meio de derivados de tiofenos só foram retomados após 13 anos de um dos primeiros estudos relatados na literatura (DU *et al.*, 2000), em que Wliggers *et al.* (2013) desenvolveram novos compostos não peptídicos por triagem virtual, resultando no composto **(34)**, sendo potencialmente mais ativo como inibidor em comparação com o fármaco padrão bzn **(4)**: $CI_{50} = 10,6 \mu M$ frente a $64,3 \mu M$, respectivamente (Figura 24).

Figura 24 - Derivado acetamidotiofeno potencialmente inibidor da cruzaina



FONTE: AUTOR, 2020.

Assim, os autores sugerem, por meio de análise REA, que a região derivada do grupo 2-acetamidotiofeno-3-carboxamida **(34)** é essencial para a atividade inibitória, uma vez que realiza 2 interações de hidrogênio: uma com α -N de Gly⁶⁶ (3,15 Å) e outra com α -oxigênio de Asp¹⁶¹ (3,08 Å).

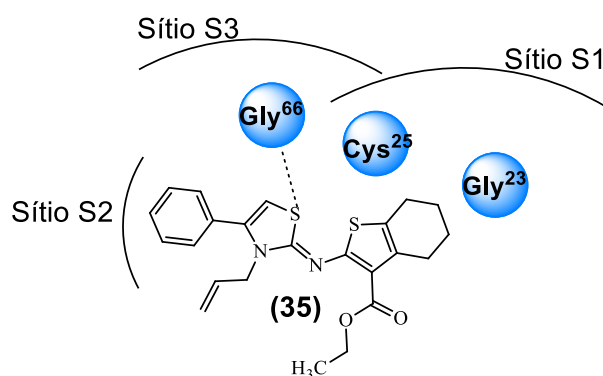
Após 3 anos deste estudo, nosso grupo de pesquisa desenvolveu em 2016 uma nova classe de compostos ativos contra a enzima cruzaina e *T.cruzi* - tiofeno-2-iminotiazolidina, sendo planejada pela técnica de hibridação molecular, onde a hibridação de farmacóforos demonstrou resultados positivos quando utilizados no planejamento de moléculas bioativas contra tripanossomíase (CARDONA-G; YEPES; HERRERA-R, 2018).

Dessa forma, os autores sintetizaram um grupo de moléculas contendo os heterociclos tiofeno e tiazolidina, onde foi sugerido por ensaios de acoplamento molecular que o derivado **(35)** interage com os sítios S1 e S2 simultaneamente: o grupo tetra-hidrobentotiofeno está em S1 (baixa hidrofobicidade) e o anel fenil em S2 (alta hidrofobicidade). Além disso, o átomo de enxofre hibridizado em sp^3 do

heterociclo tiazolidina interage via dipolo-dipolo com o resíduo Gly⁶⁶ em S3, onde o derivado apresentou ligação teórica de energia de $-7,39 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Figura 25).

Finalmente, o referido derivado demonstrou atividade inibitória de $2,4 \mu\text{M}$ e 97% de inibição da cruzaina, enquanto que na forma amastigota foi de $9,7 \mu\text{M}$ e 53,07% de inibição; ainda, para a forma tripomastigota foi inativo. Assim, os fatores fisiológicos inerentes às formas do parasita estudado podem estar relacionados a essas diferenças entre a atividade enzimática e intracelular.

Figura 25 - Inibidor da classe tioen-2-iminotiazolidina com base na hibridação molecular.



FONTE: AUTOR, 2020.

2.7.1.1 Obtenção sintética de tiofenos

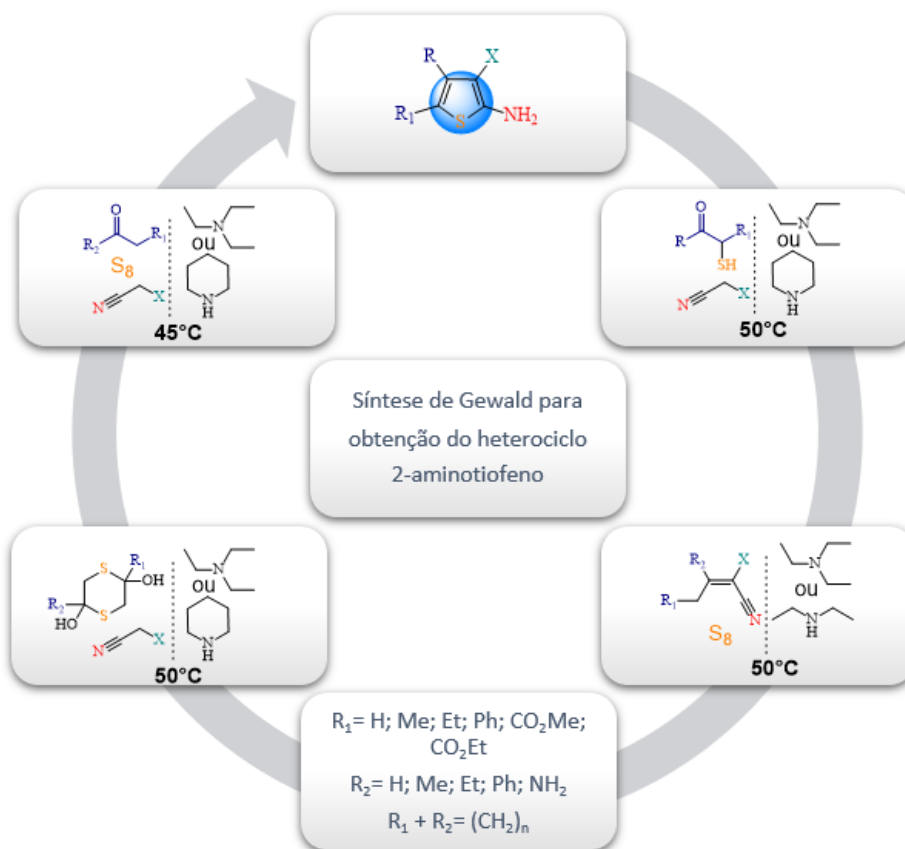
Tiofeno refere-se a um heterociclo de cinco membros, aromático, composto por um átomo de enxofre e quatro carbonos, sendo descoberto em 1882 por Victor Meyer, como um contaminante do benzeno comercial. O nome tiofeno deriva da palavra grega *theion*, que se refere ao enxofre (JI RAM *et al.*, 2019; YANG, Yudong; KADAM; YOU, 2019).

Sinteticamente, este heterociclo pode ser obtido a partir de diferentes abordagens, como proveniente de compostos carbonílicos; alcenos, alcinos, dienos e diinos; ceteno ditioacetais; reações de contração e expansão de anéis (BEL ABED; BLUM, 2018; CHEN, L. *et al.*, 2018; JI RAM *et al.*, 2019).

Dentre estes, a inserção de um grupo amina na posição 2, constituindo o heterociclo 2-aminotiofeno foi sugerido por Gewald em 1960 (GEWALD, K, 1976; GEWALD, Karl; SCHINKE, 1966), de modo que diversas maneiras de sintetizar este

núcleo são reportadas na literatura (Esquema 1) (ABAEE *et al.*, 2017; AVULA *et al.*, 2017; SHAO; KALDAS; YUDIN, 2017; TAYEBEE *et al.*, 2012).

Esquema 1 – Obtenção sintética do núcleo 2-aminotiofeno.

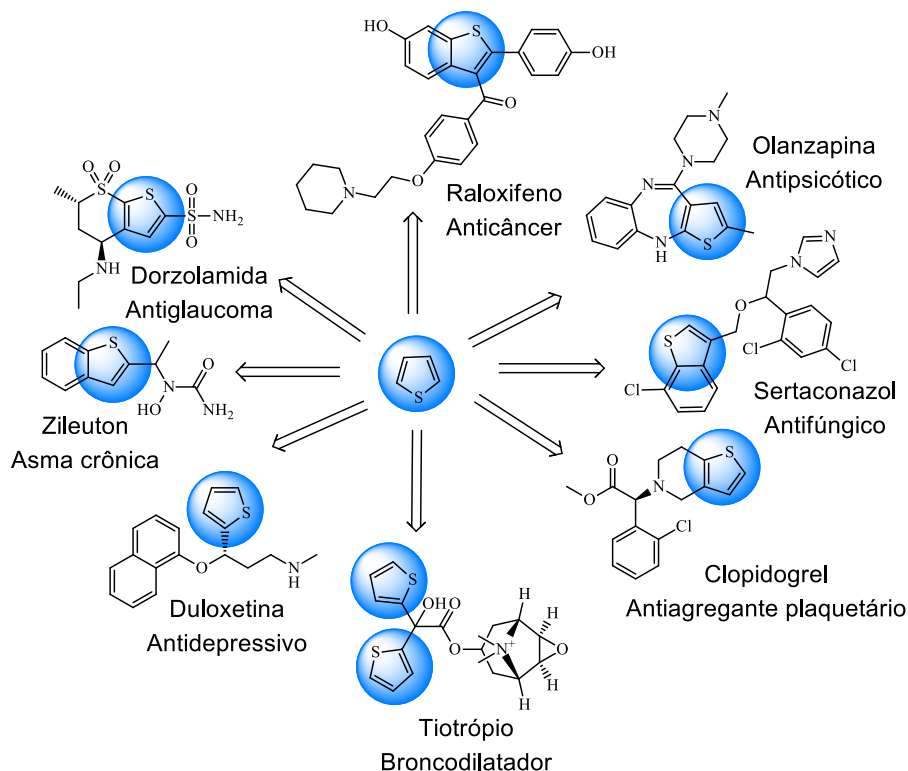


FONTE: AUTOR, 2020.

Neste sentido, tal heterociclo substituído constitui um importante bloco sintético presente em vários compostos bioativos, bem como fármacos disponíveis no mercado atualmente (Figura 27) (ARCHNA; PATHANIA; CHAWLA, 2020; BOZOROV *et al.*, 2017; KERI *et al.*, 2017; PATHANIA; KUMAR, R.; RAWAL, 2019).

Observando sua relevância no âmbito da química medicinal, diversos fármacos disponíveis no mercado foram desenhados contendo o heterociclo tiofeno, para variadas doenças, como câncer, dor e inflamação, fungos, ação a nível central, dentre outros, conforme elencados na figura 26 (BOZOROV *et al.*, 2017; NASCIMENTO, I. *et al.*, 2019).

Figura 26 – Fármacos disponíveis no mercado contendo o núcleo tiofeno.



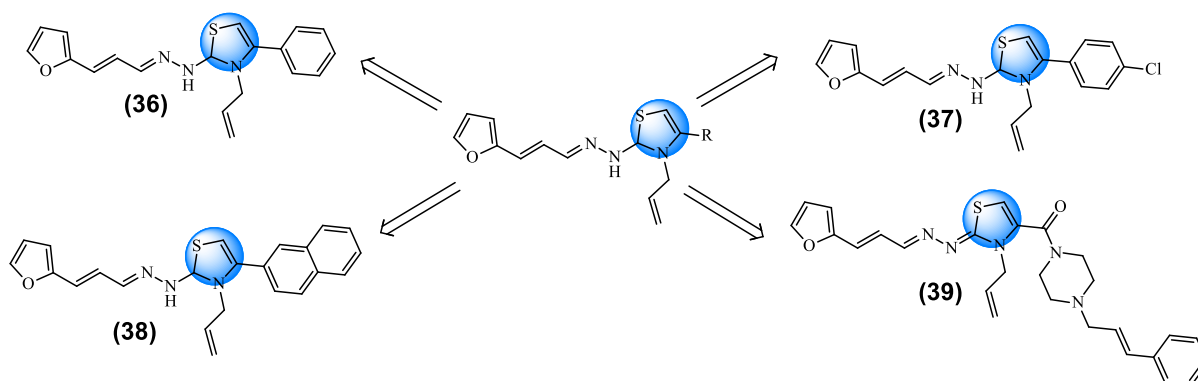
FONTE: AUTOR, 2020.

2.7.2 Compostos bioativos contra *T. cruzi* contendo o heterociclo tiazolidina

Heterociclo tiazolidina tem sido reportado na literatura em diversos trabalhos de grande relevância científica como sendo um importante núcleo presente no desenho de compostos bioativos frente o parasito *T. cruzi* (DAS, D.; SIKDAR; BAIRAGI, 2016; KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2019; PATHANIA; NARANG; RAWAL, 2019; SCARIM *et al.*, 2019; TUNCEL *et al.*, 2019).

Neste contexto, em dois estudos publicados por Álvarez *et al.* (2014, 2015), foram reportadas 4 novas moléculas promissoras contra amastigotas de *T. cruzi* dentre 82 sintetizadas ao total, planejadas a partir da restrição conformacional de tiossemicarbazonas *N*-substituídas. Deste modo, as moléculas apresentaram valores de $Cl_{50} = <0,24 \mu\text{M}$ (**36**), $<0,25 \mu\text{M}$ (**37**), $<0,21 \mu\text{M}$ (**38**), além de $0,7 \mu\text{M}$ (**39**), sendo o composto (**37**) o mais promissor frente às formas amastigotas (Figura 27).

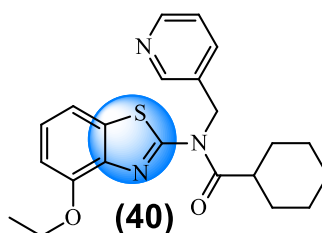
Figura 27 – Tiazolidinas bioativas contra amastigotas de *T. cruzi*.



FONTE: AUTOR, 2020.

Após estes estudos, Kaiser *et al.* (2015) utilizou um conjunto de 400 compostos presentes no projeto *Malaria box*, reposicionando-os para amastigotas de *T. cruzi* (Tulahuen C12). Com isto, foram selecionadas 21 compostos potenciais, de modo que o derivado **(40)** demonstrou ser o mais promissor, com $CI_{50} = 0,16 \mu M$ e índice de seletividade >200 (Figura 28), contribuindo com a busca de novos compostos potenciais que sejam ativos contra a doença de chagas.

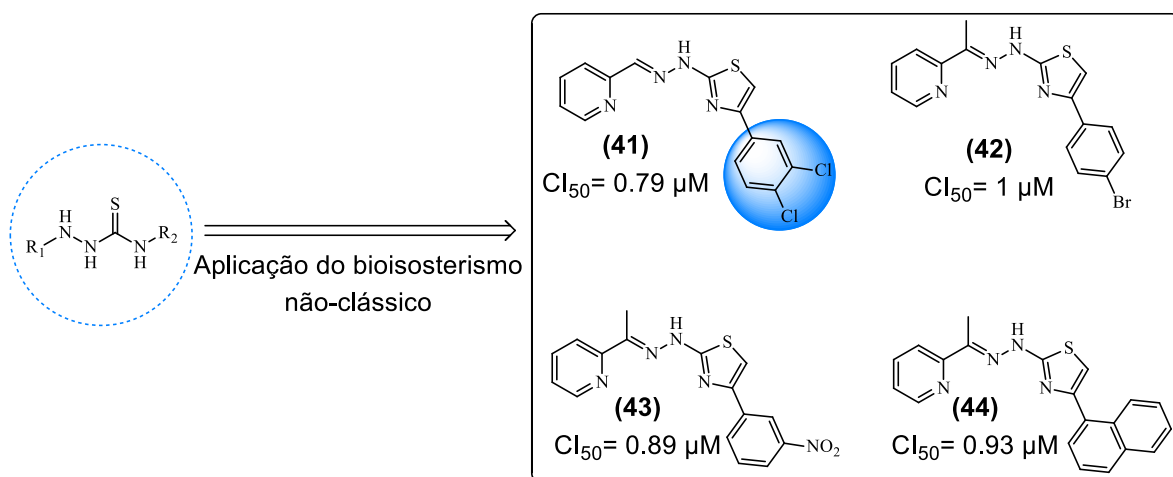
Figura 28 – Composto (40) reposicionado para amastigotas de *T. cruzi*.



FONTE:AUTOR, 2020.

Além deste, outro estudo de grande relevância envolvendo a síntese de tiazolidina antitripanossoma foi reportado por Costa, L. B. *et al.* (2016), de modo que os autores analisaram 50 compostos a partir das técnicas de bioisosterismo não-clássico, triagem de auto-rendimento (HTS), bem como 3D-QSAR (Figura 29).

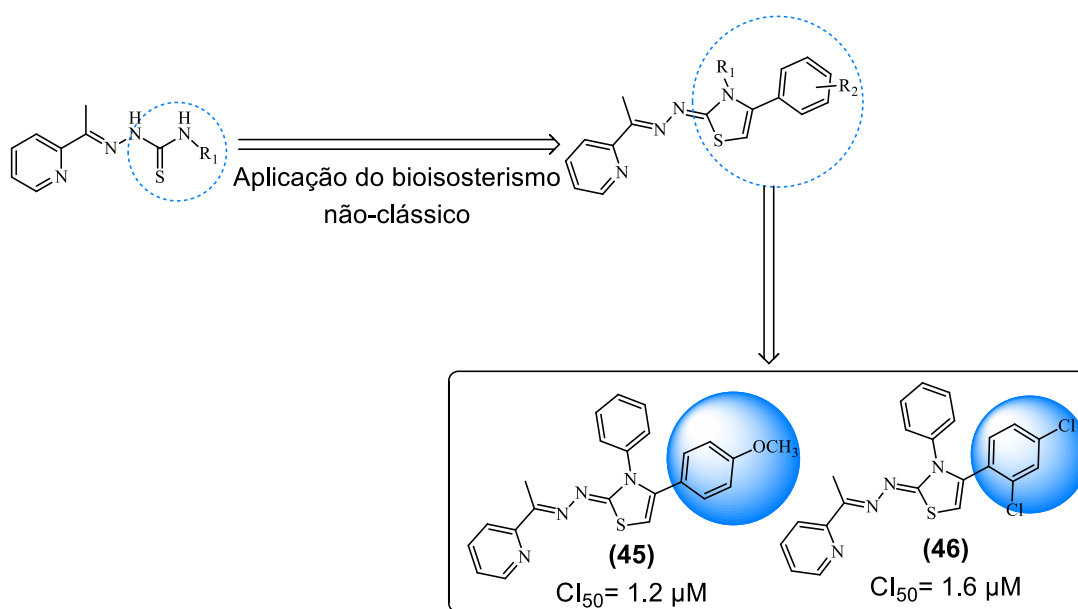
Figura 29 – Derivados planejados a partir do bioisosterismo não-clássico, HTS e 3D-QSAR.



FONTE: AUTOR, 2020.

Neste sentido, os autores demonstraram 4 compostos promissores frente à amastigotas do parasito em questão, de modo que o derivado **(41)** se destaca como o mais potencialmente ativo, com $Cl_{50} = 0,79 \mu M$ (Figura 30). Em adição, este derivado se diferencia por apresentar 2 átomos de -Cl (grupo eletro-retirador) nas posições *meta* e *para*-fenil, respectivamente.

Figura 30 – Novos derivados tiazolidínicos planejados por bioisosterismo não-clássico.



FONTE: AUTOR, 2020.

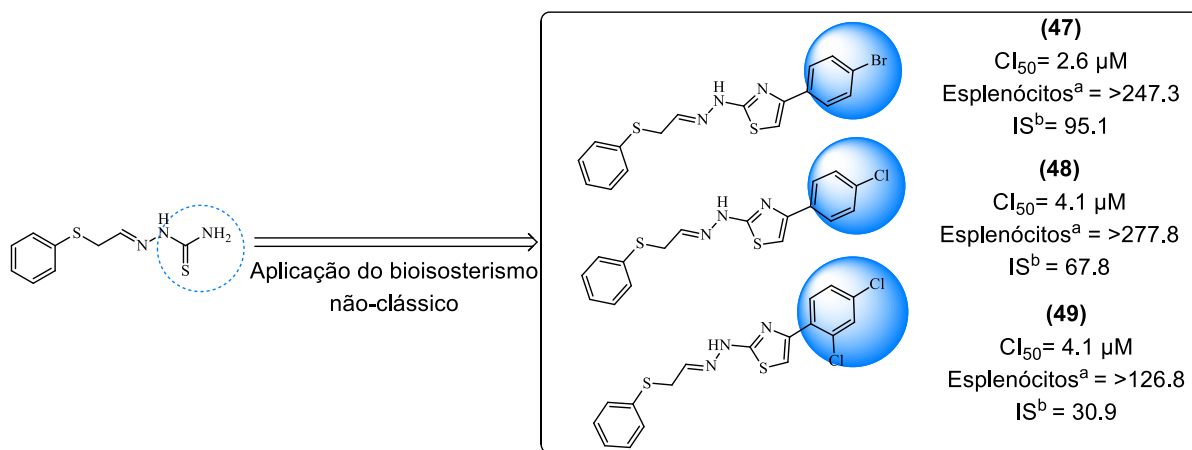
Posteriormente a este estudo, o mesmo grupo de pesquisa promoveu novas modificações a partir da técnica de bioisosterismo não-clássico, onde os autores planejaram e sintetizaram 23 novos análogos, sendo testado frente as formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Figura 31) (BARBOSA *et al.*, 2017).

Sendo assim, os autores chegaram a 2 compostos potencialmente ativos, apresentando CI_{50} = 1,2 μ M (**45**) e 1,6 μ M (**46**). Em adição, foi identificado que os derivados agem através do mecanismo de indução de apoptose do parasito, sem inibir a cruzaina, promovendo novos direcionamentos mecanísticos para derivados tiazolidínicos.

Seguindo este contexto, o mesmo grupo reportou, mais recentemente, uma série de 22 compostos planejados a partir do bioisosterismo não-classico (Figura 32), onde os derivados foram analisados quanto suas atividades perante formas tripomastigotas de *T.cruzi* (CARDOSO, M. V. De O. *et al.*, 2019).

Dentre estes, o composto (**47**) foi o mais promissor, com CI_{50} = 2,6 μ M, onde os demais apresentaram 4,1 μ M, de modo que a citotoxicidade de (**47**) foi pouco maior que o derivado (**48**). Contudo, apesar do derivado (**48**) ter sido o de menor citotoxicidade, o composto (**47**) demonstrou ser o de maior índice de seletividade, com um valor de 95,1, o que sugere maior segurança para compostos que sejam análogos a esta molécula promissora.

Figura 31 – Recentes avanços no desenvolvimento de tiazolidinas frente doença de Chagas.



FONTE: AUTOR, 2020. ^a Toxicidade calculada a partir de esplenócitos de ratos, após 24h de incubação. ^b Índice de seletividade calculado pela razão entre toxicidade em esplenócitos/ CI_{50} frente tripomastigotas.

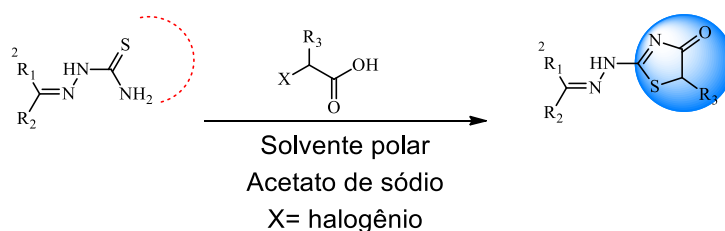
2.7.2.1 Obtenção sintética do heterociclo tiazolidina

No que diz respeito à obtenção sintética do heterociclo tiazolidina, este pode ser produzido a partir de diversos grupamentos, como tiouréias, tiocarbamatos, tiossemicarbazonas, tiocianatos (MORAES, T. De *et al.*, 2016; PATHANIA; KUMAR, R.; RAWAL, 2019; TUNCEL *et al.*, 2019).

Desta forma, consiste num método de importante eficácia e simplicidade a obtenção do heterociclo tiazolidinona 4-substituído, em que se é utilizado como material de partida as tiossemicarbazonas, bem como ácidos α -haloacéticos, em que haverá a ciclização da região tioamida das tiossemicarbazonas através deste agente dieletrofílico (Esquema 2) (CHADHA *et al.*, 2015; HAVRYLYUK *et al.*, 2016).

Contudo, faz-se de suma importância para a eficácia sintética deste núcleo a utilização de solvente polar num pH básico, utilizando-se para isto bases como acetato de sódio anidro ou piridina. Tal fato se dá por conta do grupamento imino formado ser vulnerável a hidrólise ácida (CHADHA *et al.*, 2015; JI RAM *et al.*, 2019; NANJAN *et al.*, 2018).

Esquema 2 - Obtenção de tiazolidinonas a partir da ciclização de tiossemicarbazonas por ácidos α -haloacéticos



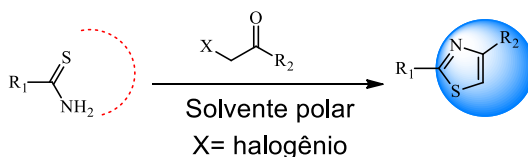
FONTE: AUTOR, 2020.

Além desta, a ciclização de Hantzsch constitui importante metodologia para a obtenção de tiazóis (Esquema 3), onde, a partir da utilização desta via, pode-se obter os produtos idealizados de forma simples, rápida, com rendimentos elevados e pouca formação de subprodutos, favorecendo a purificação da reação (CARDOSO, M. V. De O. *et al.*, 2019; PRAJAPATI, N. P. *et al.*, 2019; SCARIM *et al.*, 2019; TUNCEL *et al.*, 2019).

Desta forma, esta abordagem utiliza como substrato α -bromocetonas, em que estes dieletrofílicos funcionam como agentes ciclizantes de metil ou feniltioamidas, em

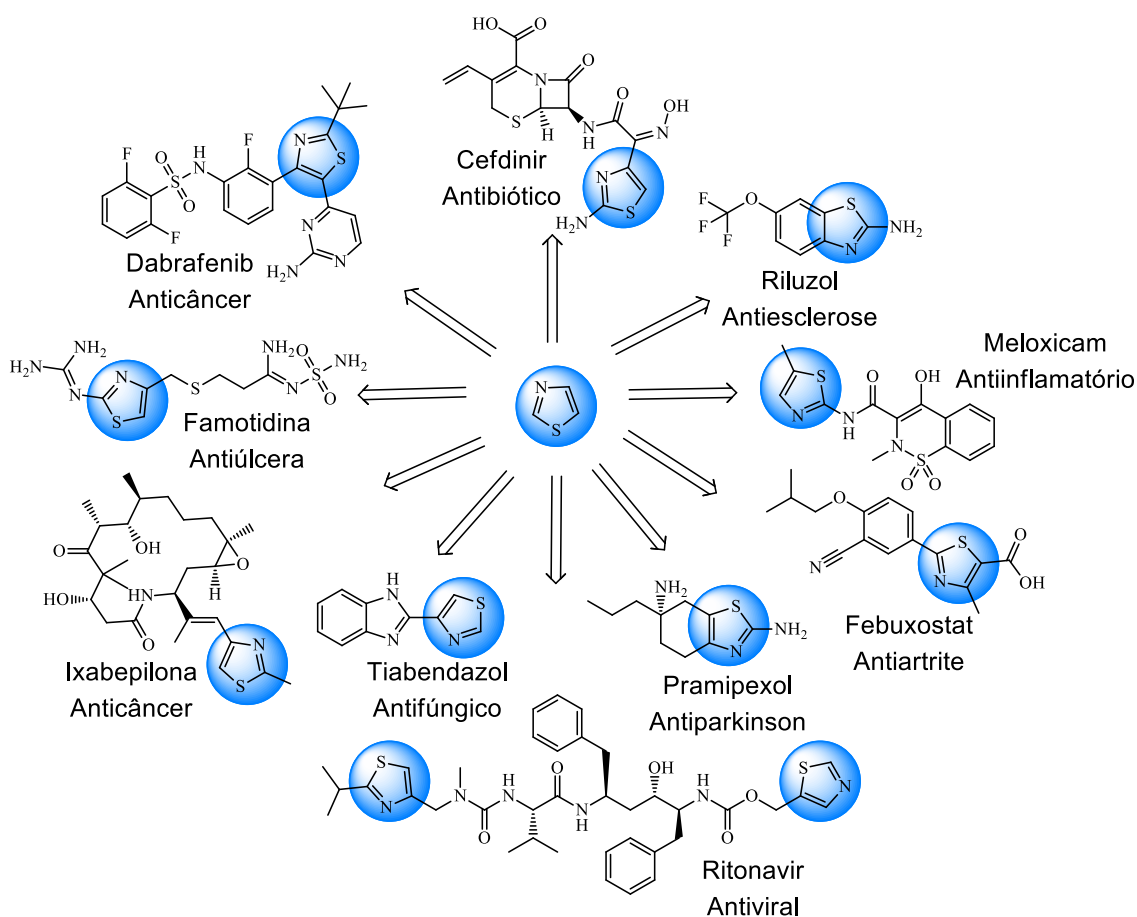
solvente prótico polar (etanol, principalmente), obtendo-se o heterociclo tiazol 3,5-substituído (CARDOSO, M. V. De O. *et al.*, 2019; PRAJAPATI, N. P. *et al.*, 2019; SCARIM *et al.*, 2019; SILVA-JUNIOR, DA *et al.*, 2017; TUNCEL *et al.*, 2019).

Esquema 3 - Ciclização de Hantzsch para obtenção de tiazóis.



FONTE: AUTOR, 2020.

Figura 32 – Fármacos disponíveis no mercado contendo o heterociclo tiazolidina em suas estruturas.



FONTE: AUTOR, 2020.

Desta forma, diversos fármacos são elencados na figura 32 contendo o heterociclo tiazolidina, demonstrando sua grande relevância para a química medicinal

de diversas doenças, como antibióticos, anticâncer, doenças a nível central, antivirais, antifúngico, antiparasitário, dentre outros (KAUR, Ramandeep *et al.*, 2017; KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2019; MORAES, T. De *et al.*, 2016; NANJAN *et al.*, 2018; PATHANIA; NARANG; RAWAL, 2019).

2.8 Ciclo biológico e aspectos patológicos relacionados às leishmanioses

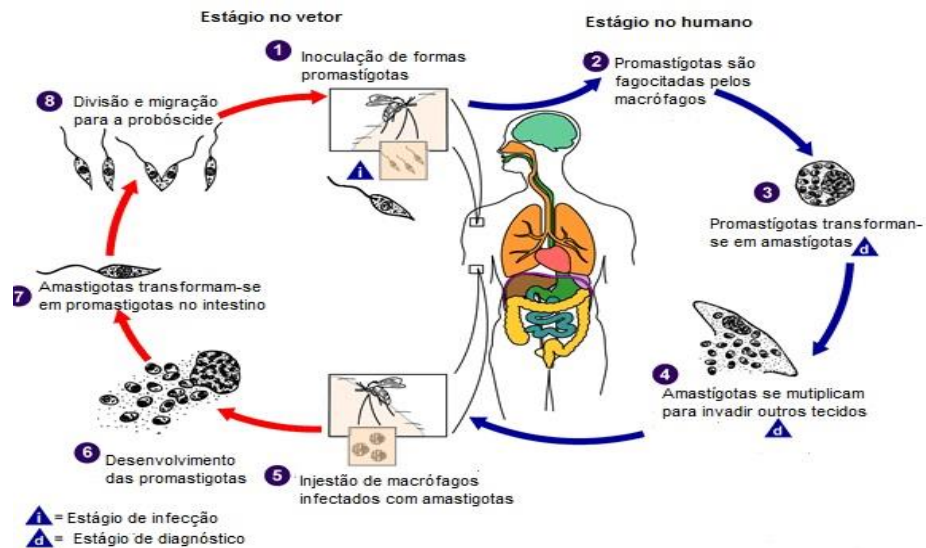
Dentre estas patologias negligenciadas, leishmanioses caracterizadas por serem um complexo de doenças infecciosas causadas por mais de 20 protozoários do gênero *Leishmania spp.*, transmitidas pelo inseto flebotomíneo mosquito-palha (*Lutzomyia spp.*) (ARONSON; JOYA, 2019; ARONSON; MAGILL, 2020; SERAFIM, T. D.; INIGUEZ; OLIVEIRA, F., 2019).

Como manifestações clínicas, podem causar lesões e nódulos na pele e mucosa (Leishmaniose Cutânea – LC, forma mais comum), bem como atingir as vísceras (Leishmaniose Visceral – LV, também conhecida por kala-azar), forma mais grave, causando perda de peso, hepatoesplenomegalia, além de levar a óbito. Ainda, Leishmaniose cutaneomucosa (LCM) corresponde a forma mais debilitante desta doença (CORTES, S. *et al.*, 2020; F. *et al.*, 2018; MATHEW; NEGI, 2019; MUSA *et al.*, 2019).

Desta forma, havendo parasito no sangue periférico, o vetor irá se reinfetar no momento do repasto e logo após, da mesma forma, transmiti-lo a um indivíduo que não esteja infectado. No entanto, vale ressaltar que não existe casos reportados, até os dias atuais, de transmissão de indivíduo-indivíduo de LV (KEVRIC *et al.*, 2015; ROBERTS, 2018; SANTOS-VALLE *et al.*, 2019).

O ciclo infeccioso ocorre no momento do repasto, o vetor ingere macrófagos contendo a forma amastigota (Figura 33) do parasito, sendo então liberadas no intestino deste. Logo após, a forma amastigota multiplica-se sob a forma de promastigotas (Figura 33), que irão infectar o hospedeiro vertebrado no momento em que for picado pelo mosquito. Novamente, as promastigotas infectam os macrófagos, multiplicando-se sob a forma de amastigotas, fazendo com que haja rompimento destes, e, assim, liberando-as (Figura 33) (KEVRIC *et al.*, 2015; ROBERTS, 2018; SANTOS-VALLE *et al.*, 2019).

Figura 33 - Ciclo biológico do parasito *Leishmania spp.*



FONTE: CDC, 2017.

Dentre as manifestações clínicas, ocorre comumente no indivíduo acometido pelo parasito em sua forma inicial: palidez cutânea, febre normalmente por menos de quatro semanas e, principalmente, hepatoesplenomegalia (Figura 34a). No entanto, na fase crônica da infecção, o indivíduo acometido apresenta manifestações clínicas mais severas, ocasionando diversas lesões cutaneomucosas, febre persistente, imunossupressão devida linfadenopatia, podendo levar a óbito (Figura 34b).

Figura 34 - Manifestações clínicas decorrentes da infecção por leishmanioses.



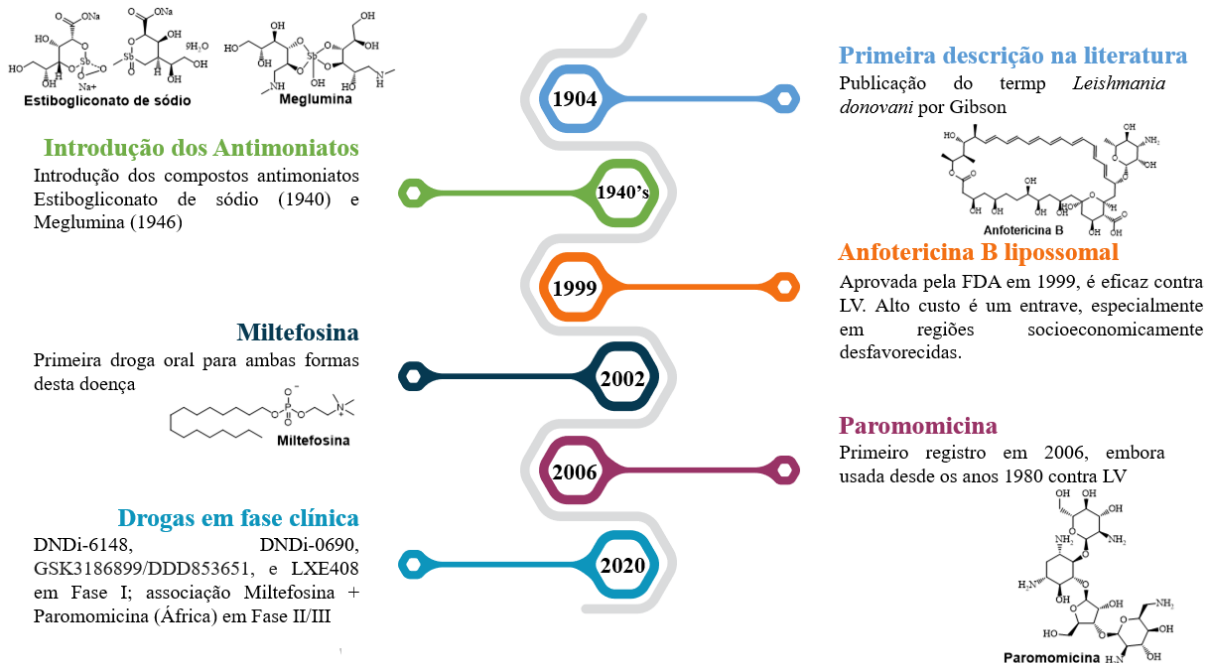
FONTE: KEVRIC *et al.*, 2015; BRASIL, 2019 (ADAPTADO). Em a, manifestações clínicas na fase aguda; em b, lesões cutaneomucosas causadas pela LV.

As leishmanioses afetam cerca de 1 bilhão de pessoas em 92 países e 83 territórios, com ocorrência anual de aproximadamente 700000 a 1 milhão de novos casos. Destes, leishmaniose visceral corresponde a 95% dos casos (entre 50000 a 90000 novos casos anuais), de modo que mais que 95% destes casos foram reportados, em 2018, provenientes de Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2020).

2.8.1 Farmacoterapia atual frente às leishmanioses

Os fármacos de escolha para o tratamento das leishmanioses são antimoniais pentavalentes, como antimoniato de Meglumina e Estibogliconato de sódio. Estas drogas são usadas desde os anos 1940, apresentando importante toxicidade cardiovascular, além já terem sido reportados casos de resistência (listados na Figura 35) (ANSARI, M. Y. *et al.*, 2017; MACHADO, P. De A. *et al.*, 2019; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

Figura 35 - Linha do tempo do descobrimento das drogas antileishmanias.



FONTE: SANTOS-JÚNIOR *et al.*, 2021.

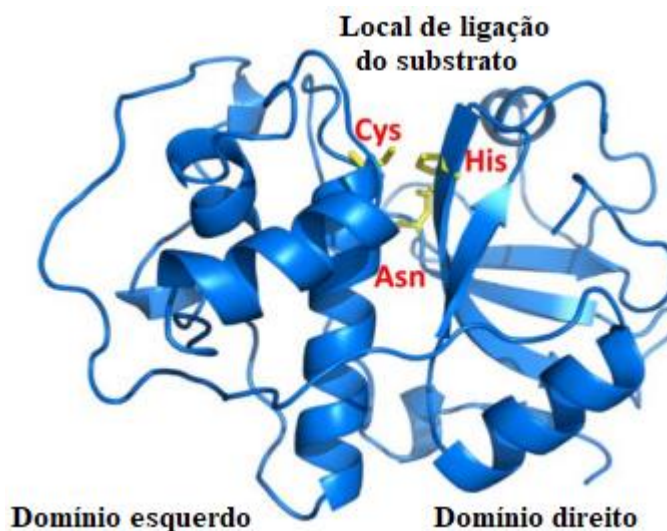
Como tratamento de segunda escolha, observa-se anfotericina B e pentamidina, de modo que o uso deste último é limitado devido sua toxicidade, além da Paromomicina e Miltefosina, em que tais fármacos são administrados, especialmente, em casos de resistência. Porém, assim como os antimoniais, apresentam importante toxicidade em sua administração, além de possuírem baixo índice terapêutico (listados na Figura 36) (BEKHIT, A. A. *et al.*, 2018; CARIDHA *et al.*, 2019; HEFNAWY *et al.*, 2017).

2.8.2 Enzima cisteína protease B (CPB) como alvo promissor no desenvolvimento de candidatos a fármacos leishmanicida

Assim como em outros parasitos (como o *T. cruzi*, por exemplo), cisteína proteases (CPs) encontradas em espécies de *Leishmania spp.* desempenham funções cruciais no processo infeccioso, o que representa importante alvo para o desenvolvimento de moléculas bioativas eficazes (MATOS *et al.*, 2020; RAWAT *et al.*, 2021). Neste sentido, CPs são responsáveis por mais de 90% de toda a atividade de proteases no parasito, sendo as mais caracterizadas CPA, CPB e CPC, pertencentes ao clã CA, família C1 (SIQUEIRA-NETO, Jair L. *et al.*, 2018).

Dentre estas, CPB demonstra suma importância para processos regulatórios no parasito, de modo a alterar a sinalização de macrófagos do hospedeiro (elevando a transcrição de IL-12), bem como regula o fator de virulência GP63 (BRANDT *et al.*, 2016; SIQUEIRA-NETO, Jair L. *et al.*, 2018). Além disso, foi observado que esta enzima também modula os níveis de proteínas do parasito (CASGRAIN *et al.*, 2016), com uma tríade catalítica caracterizada por resíduos de Cys¹⁵³, His²⁸⁹ e Asn³⁰⁹ (LASAKOSVITSCH *et al.*, 2003) (Figura 36).

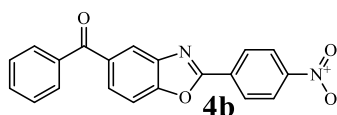
Figura 36 – Modelo estrutural da enzima CPB, demonstrando local de ligação do substrato no sítio ativo.



FONTE: BRANDT *et al.*, 2016 (ADAPTADO).

Neste sentido, esta enzima representa alvo drogável promissor para o desenvolvimento de novos inibidores eficazes. Assim, Folquitto *et al.*, (FOLQUITTO *et al.*, 2017) publicou relevante estudo demonstrando o planejamento de novos derivados benzoxazóis e avaliação em amastigotas de *Leishmania amazonensis*, direcionados a enzima CPB como alvo. Dentre os derivados avaliados, destaca-se composto **4b**, que apresentou inibição enzimática com IC_{50} : 0.0103 μ M, enquanto o inibidor padrão E64 apresentou 1.7821 μ M. Por outro lado, não foi possível determinar o valor de IC_{50} para amastigotas de *L. amazonensis* (Figura 37).

Figura 37 – Derivado benzoxazol ativo frente CPB de *L. amazonensis*.



FONTE: AUTOR, 2021.

2.9 Planejamento de compostos bioativos por meio da modificação molecular

2.9.1 Bioisosterismo

Dentre as estratégias de planejamento de moléculas bioativas, o bioisosterismo corresponde a uma técnica versátil e consagrada, a qual se baseia na permuta de um

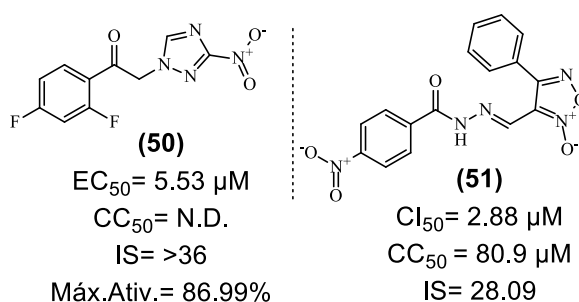
ou mais fragmentos estruturais, como grupos funcionais ou anéis aromáticos, sendo empregada em uma vasta quantidade de compostos ativos e fármacos disponíveis no mercado, como duloxetina (antidepressivo), atenolol (anti-hipertensivo) tenoxicam e isoxicam (anti-inflamatórios) (CHEN, X. *et al.*, 2020; LEITE, F. H. A. *et al.*, 2016; LIMA, L. M.; BARREIRO, 2017; SILVA, Elany Barbosa DA *et al.*, 2017).

Deste modo, as modificações estruturais estão envolvidas na busca por melhoramentos das respostas farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas de um determinado composto bioativo, fornecendo dados importantes quando potenciais grupos a serem estudados, bem como das possíveis interações de um receptor, sobretudo quando não se há informações ou modelos estruturais correspondentes a este (CHEN, X. *et al.*, 2020; LEITE, F. H. A. *et al.*, 2016; LIMA, L. M.; BARREIRO, 2017; SILVA, Elany Barbosa DA *et al.*, 2017).

Neste sentido, diversos trabalhos foram publicados relacionando planejamento por meio desta técnica com compostos promissores frente variadas enfermidades, como HIV (CHEN, X. *et al.*, 2020), dor e inflamação (PARK, S. R. *et al.*, 2018), agentes antibacterianos (SEGRETTI, N. D. *et al.*, 2016).

Além destas abordagens, o planejamento a partir do bioisosterismo também vem sendo aplicado no desenvolvimento de compostos bioativos frente à doença de Chagas (amastigotas de *T. cruzi*), onde citam-se os trabalhos de (SILVA, F. T. *et al.*, 2016), onde os autores sintetizaram o derivado **(50)** e Massarico Serafim *et al.* (2014), culminando no derivado **(51)** (Figura 38).

Figura 38 – Derivados bioativos frente amastigotas de *T. cruzi* planejados por meio da técnica de bioisosterismo.



FONTE: AUTOR, 2020.

2.9.2 Hibridização molecular

A hibridação molecular consiste numa das recentes e mais utilizadas técnicas de obtenção de moléculas advindas da química medicinal, referindo-se numa metodologia de planejamento pela qual une-se numa só molécula duas unidades farmacofórica, com o objetivo de potencializar a ação farmacológica que se deseja (FÉLIX *et al.*, 2016; JACOMINI *et al.*, 2016; MASOOD *et al.*, 2017; SHARMA, R. *et al.*, 2014).

Esta união pode ser feita de algumas formas: unindo dois compostos bioativos (ou mais), bem como fusão destas duas estruturas, sem espaçador; união de dois compostos bioativos por meio de um espaçador flexível ou rígido. Podem ser, ainda, referentes à grupamentos farmacofóricos: a simples união de dois grupos farmacofóricos de 2 fármacos, sem espaçador, ou ainda a união por meio de um espaçador flexível ou rígido (JACOMINI *et al.*, 2016; MASOOD *et al.*, 2017; NEPALI *et al.*, 2014) (JACOMINI *et al.*, 2016; MASOOD *et al.*, 2017; NEPALI *et al.*, 2014).

Desta forma, segundo Nepali *et al.* (2014) as drogas híbridas são, normalmente, planejadas com o intuito de se reduzir possíveis efeitos adversos associados aos fármacos, bem como potencializar o efeito terapêutico num alvo biológico.

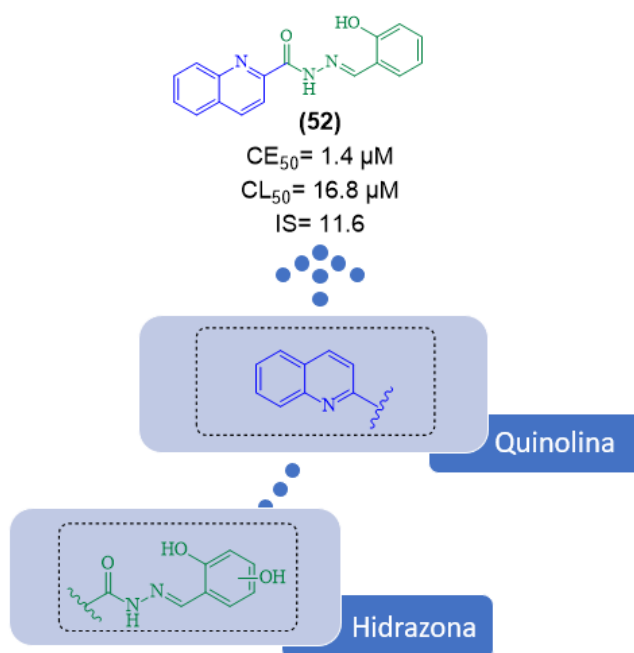
Ainda segundo o autor, a associação híbrida também remete interações em vários alvos com apenas uma molécula, o que reduz as chances de potenciais resistências aos fármacos, além de tornar menores os riscos de interações medicamentosas.

Assim, a hibridação molecular perfaz uma estratégia racional e de obtenção de novos produtos, nas mais diversas classes químicas, consistindo num novo conceito de planejamento e desenvolvimento de produtos eficazes e com um maior direcionamento ao alvo requerido (JACOMINI *et al.*, 2016; KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2019; MASOOD *et al.*, 2017).

Recentemente, diversos trabalhos foram reportados na literatura, demonstrando a efetividade e versatilidade desta técnica no desenho de moléculas bioativas para diferentes doenças, como agentes antibacterianos (NAVEEN *et al.*, 2020), inibidores da enzima urease (WAHID *et al.*, 2020), bem como alzheimer (TRIPATHI, A. *et al.*, 2019) e doença do sono (KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2019).

Relacionado ao desenvolvimento de moléculas antitripanossoma, Coa *et al.* (2015) reportou na literatura um estudo demonstrando a atividade do composto (52) planejado a partir da união dos farmacóforos quinolina e hidrazona, resultando numa atividade promissora contra amastigotas de *T. cruzi*, conforme pode ser observado na figura 39. Além disso, o composto demonstrou concentração citotóxica superior a 11 vezes mais, contribuindo para seu perfil de segurança.

Figura 39 – Composto bioativo frente amastigotas planejado por meio de hibridação molecular.



FONTE:AUTOR,2020.

2.9.3 Rigidificação molecular (restrição conformacional)

Restrição conformacional tem sido utilizada recentemente pela química medicinal como sendo uma potencial alternativa frente o desenvolvimento de novos derivados perante várias doenças, como HIV (SANG *et al.*, 2019), agentes antibacterianos (ARMSTRONG *et al.*, 2020), anticâncer (PAVANA *et al.*, 2018).

Diversos estudos demonstraram que a restrição conformacional de compostos constitui numa virtual estratégia de aumento de suas atividades farmacológicas, haja vista que esta técnica eleva a energia rotacional numa determinada ligação que

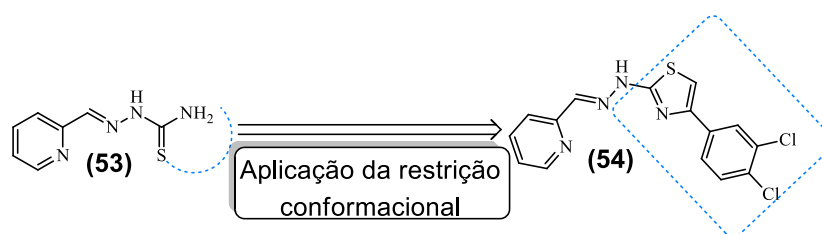
poderia ter rotação livre (PAVANA *et al.*, 2018; RASHID *et al.*, 2016; ZHENG; TICE; SINGH, S. B., 2017).

Desta forma, a restrição promove uma melhor interação farmacodinâmica entre ligante e alvo, uma vez que, restringindo possíveis rotações na molécula, promove maior rigidez na porção farmacofórica que poderia não interagir com grande eficácia com o alvo farmacológico, bem como auxilia na redução da citotoxicidade de tais compostos (FANG, Z. *et al.*, 2014; PAVANA *et al.*, 2018; WIPF; SKODA; MANN, 2015; ZHENG; TICE; SINGH, S. B., 2017).

No que diz respeito ao desenvolvimento de novos derivados antitripanossoma, Moreira *et al.* (2014) publicaram estudo em que foi avaliada a influência da rigidificação da tiossemicarbazona em vários derivados, ciclizando sua região tioamida para obter o heterociclo tiazolidina.

Com isto, foi concluído que tal estratégia elevou a seletividade dos compostos frente ao parasito *T. cruzi*, produzindo compostos mais efetivos e menos tóxicos. Conforme pode-se observar na figura 40 a atividade frente a formas tripomastigota e epimastigota foi elevada de $CI_{50} = 17,3 \mu M$ e $119,5 \mu M$ referente ao composto de conformação livre (53) para $1,2 \mu M$ e $4 \mu M$ para o composto de conformação restrita (54).

Figura 40 – Derivado tiossemicarbazônico de conformação livre e tiazolidínico (conformação restrita).

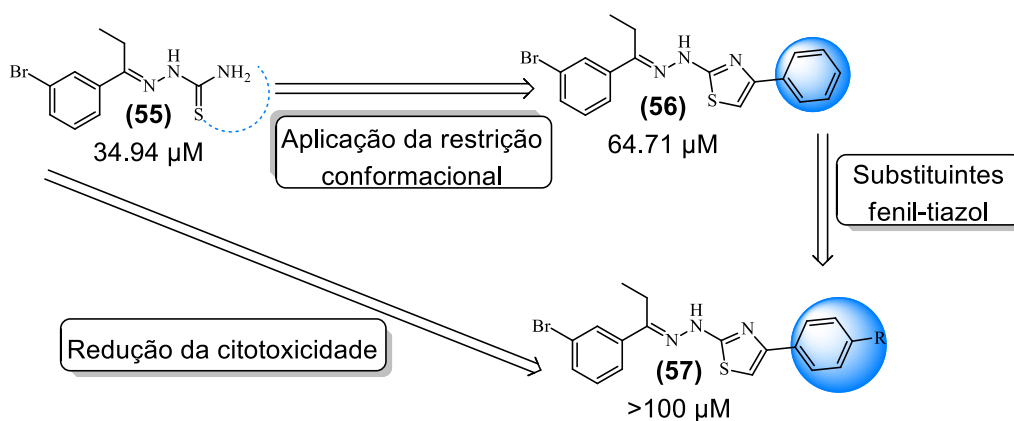


FONTE: AUTOR, 2020.

Seguindo com a aplicação da restrição conformacional, Moraes, T. De *et al.* (2016) demonstraram o aumento da atividade tripanocida de alguns derivados tiossemicarbazônicos, em que estes foram rigidificados em sua região tioamida com vários dieletrófilos, produzindo moléculas com maior seletividade frente *T. cruzi*, além de reduzi a citotoxicidade destes, conforme se observa na figura 41.

Desta forma, foi apresentada, para o composto não-rigidificado (**55**), uma toxicidade de 34,94 μM . No entanto, para os compostos rigidificados (**56,57**), foi elevada a uma concentração $> 100 \mu\text{M}$, tornando-o menos tóxico, o que demonstra o potencial desta estratégia não só no aumento da atividade biológica, mas também da promissora possibilidade de redução de toxicidade de derivados tiossemicarbazônicos e tioamidas.

Figura 41 – Potencial redução da toxicidade dos derivados tiossemicarbazônicos rigidificados.



FONTE: AUTOR, 2020.

2.10 Planejamento de compostos bioativos por meio de modelagem molecular

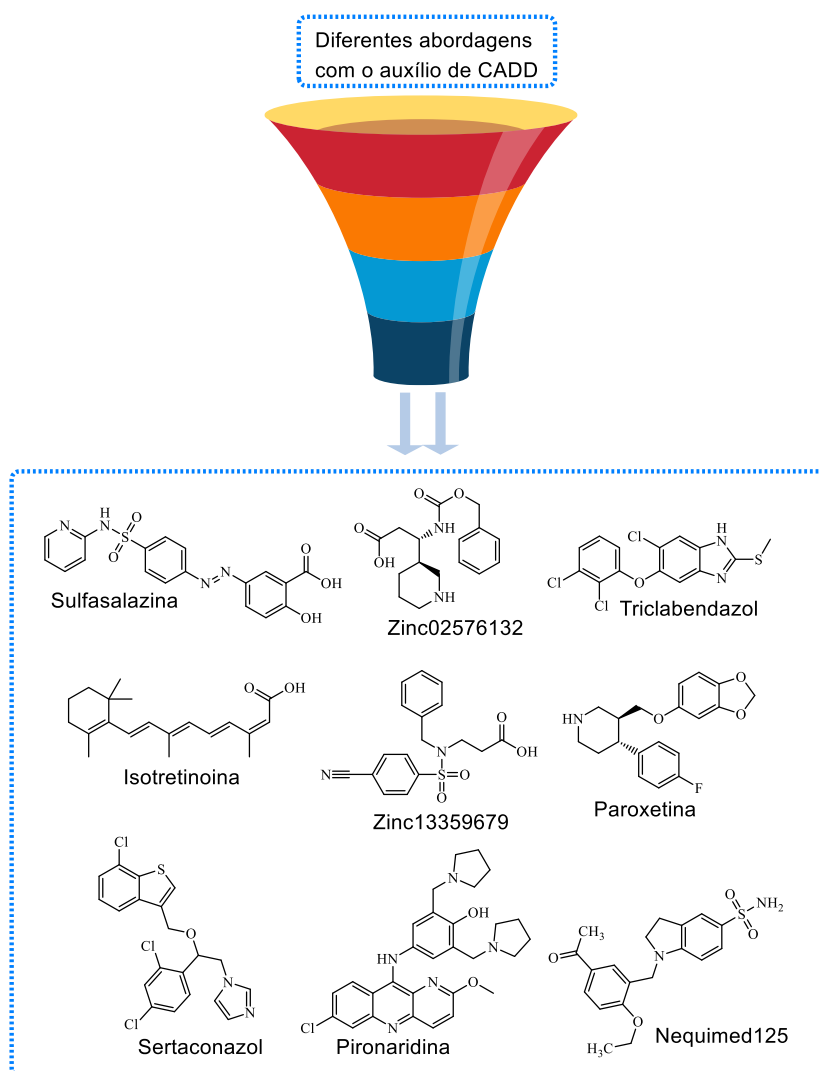
O planejamento de fármacos a partir de estratégias computacionais (CADD) está dividido em duas grandes abordagens: planejamento de fármacos baseado na estrutura dos ligantes (LBDD), quando se possui informações acerca da estrutura dos compostos bioativos, bem como suas atividades biológicas; além do planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD), onde está fundamentado na estrutura do alvo bioquímico em que os compostos estão direcionados (KHANNA; RANGANATHAN; PETROVSKY, 2019; PANTELEEV; GAO, H.; JIA, L., 2018; SANTOS-VALLE *et al.*, 2019).

Estes métodos *in silico*, bem como estudos de química combinatória e de HTS promovem considerável melhoramento na capacidade de descoberta de novos compostos promissores, podendo compreender o mecanismo de ação a nível molecular (BELLERA *et al.*, 2019; BERGSTRÖM; LINDMARK, 2019; PRIETO-MARTÍNEZ *et al.*, 2019). Com isto, tais abordagens auxiliam na diminuição de custos

por reduzir o quantitativo de compostos a serem sintetizados e testados, além de reduzir possíveis falhas devido às propriedades físico-químicas no planejamento, podendo compreender o mecanismo a nível molecular (KATSILA *et al.*, 2016; KHANNA; RANGANATHAN; PETROVSKY, 2019; PRIETO-MARTÍNEZ *et al.*, 2019)

Neste contexto, CADD constitui uma ferramenta essencial para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas frente à DTN, de modo que tal abordagem resultou no planejamento do descobrimento dos fármacos Saquinavir (antiviral), Zanamivir (antiviral), Norfloxacin (antimicrobiano), Dorzolamida (antiglaucoma), bem como Oximorфона (analgésico narcótico em triagem clínica) (Figura 42) (HONGMAO, 2016; PRIETO-MARTÍNEZ *et al.*, 2019; WILTGEN, 2019).

Figura 42 – Promissores hits obtidos ou reposicionados por meio de estratégias de CADD.



FONTE: AUTOR, 2020.

Além destes fármacos, CADD pode ser aplicada no desenvolvimento de novos compostos ativos contra a doença de chagas, frente à diferentes alvos, onde esta abordagem demonstrou ser bastante promissora, onde diversos compostos foram apresentados como potenciais frente esta severa enfermidade (Figura 43) (CORTÉS-RUIZ *et al.*, 2018; LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2020).

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Sintetizar novos derivados 2-iminotiofen-tiazolidínicos planejados com potencial atividade frente ao parasito *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*.

3.1.1 Objetivos específicos

- Sintetizar derivados 2-iminotiofeno-tiazolidínicos com modificações estruturais específicas em torno do composto **LQM83**.
- Avaliar a viabilidade celular (citotoxicidade) através do ensaio de MTT;
- Avaliar, *in vitro*, a atividade antichagásica dos derivados frente a macrófagos infectados com formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*;
- Avaliar, *in vitro*, a atividade dos novos derivados frente à inibição da enzima cruzaina (específica para o parasito);
- Avaliar, *in vitro*, a atividade leishmanicida dos derivados frente a macrófagos infectados com formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- Avaliar, *in vitro*, a atividade dos novos derivados frente à inibição da enzima CPB (específica para o parasito);
- Analisar mecanismo de ação das moléculas mais ativas, através de modelos computacionais de ancoragem molecular (*docking*).

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seção experimental

4.1.1 Cromatografias

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de Sílica Gel 60 F254 (MERCK®) de 0,25 mm de espessura. Para a visualização destas e interpretação dos resultados, fez-se utilização de luz emissora de radiação ultravioleta (UV) no comprimento de onda (λ) de 254 nm. Para cromatografia em coluna clássica, utilizou-se sílica gel 60 (230-400 Mesh, MERCK®), em gradiente isocrático com sistema eluente pré-determinado para respectiva reação.

4.1.2 Pontos de Fusão

Para a determinação dos pontos de fusão, fez-se utilização do equipamento MSTecnopon®, modelo PFMII Digital, em tubos capilares contendo cada uma das amostras individualmente.

4.1.3 Caracterização estrutural por RMN de ^1H e ^{13}C .

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos através do equipamento Brüker®, modelo Avance DRX 600s MHz – UltraShield®, do Núcleo de Análises de Produtos por Ressonância Magnética Nuclearar – IQB/UFAL, direção do Prof. Dr. Edson Bento. Foi utilizado DMSO- d_6 como solvente analítico. Referente aos espectros, os deslocamentos químicos (δ) foram computados em partes por milhão (ppm), onde foi empregado tetrametilsilano (TMS) ou os solventes DMSO- d_6 / CDCl_3 como referência interna. As constantes de acoplamento (J) inerentes aos sinais de RMN de ^1H foram computadas em Hertz (Hz) e as multiplicidades dos sinais foram instituídas da seguinte maneira: singleto (*s*), singleto largo (*sl*), dubleto (*d*), duplo dubleto (*dd*), tripleto (*t*), quarteto (*q*), quinteto (*qi*), sexteto (*sex*), septeto (*sep*), e multipleteo (*m*).

4.1.4 Análise do grau de pureza relativo

A análise do grau de pureza relativo dos respectivos compostos foi feita por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de luz ultravioleta a 254 nm (CLAE/HPLC-UV), utilizando o equipamento Shimadzu[®], modelo SIL-20AHT, além de coluna C-18 Supelco Discovery[®], 25 cm x 4.6 mm, 5 μ M, utilizando como fase móvel isocrática MeOH 100% (grau HPLC) e acetato de etila como diluente (grau HPLC).

4.2 Planejamento racional dos compostos 2-iminotiazolidínicos

Após a análise bibliográfica nas bases literárias que abordam o assunto, optou-se por planejar moléculas com regiões estruturais preditas em diversos estudos relevantes realizados *in silico* e *in vitro*, com o intuito de

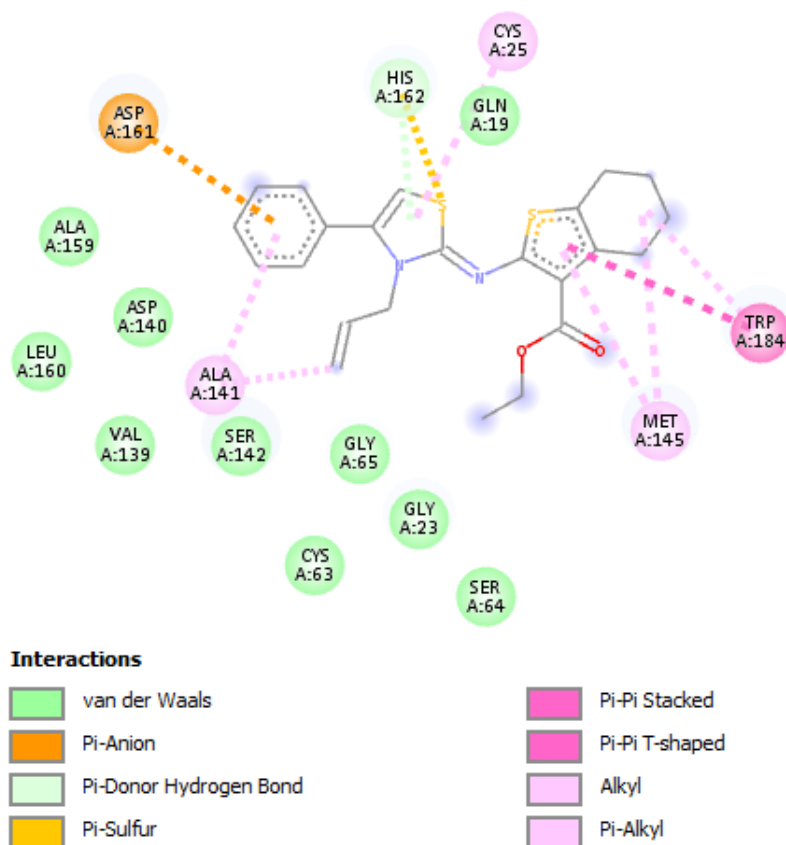
4.2.1 Seleção do composto *hit* **LQM83**

De acordo com os avanços publicados pelo Laboratório de Química Medicinal, Silva-Júnior *et al.* (2016) reportou o planejamento e síntese de 20 novos derivados híbridos tiofeno-tiazolidinas, contendo o grupo espaçador imina aplicando, para isto, a técnica de restrição conformacional na região tioamida.

Com isto, o composto *hit* **LQM83** demonstrou ser o melhor inibidor planejado pelo grupo de pesquisa frente à enzima cruzaina (SILVA-JUNIOR *et al.*, 2017), interagindo com os resíduos críticos Gly²³, Cys²⁵, Gly⁶⁵, apresentando $CI_{50} = 2,4 \mu\text{M}$ e 97% de inibição desta (Figura 43). Em adição, este derivado promoveu $CI_{50} = 9,7 \mu\text{M}$ frente amastigotas de *T. cruzi*, com 53,07% de inibição, além de não ser ativo perante as formas tripomastigotas do parasito em questão.

Desta forma, o estudo culminou num derivado inédito, com um desenho de hibridação de heterociclos até então não estudados, promovendo um derivado promissor a analisado, de forma a realizar possíveis modificações estruturais com o intuito de se obter novos compostos bioativos frente à amastigotas, tendo a enzima cruzaina como o alvo direcionado para estes.

Figura 43 – Diagrama 2D das interações entre LQM83 e a enzima cruzaina.



FONTE: AUTOR, 2022. Diagrama gerado a partir do programa Discovery Studio Visualizer v20.1.0.19295. PDB utilizado: 1AIM. O derivado apresentou *fitscore* de 57.9720 calculado com a função ChemPLP (software GOLD®).

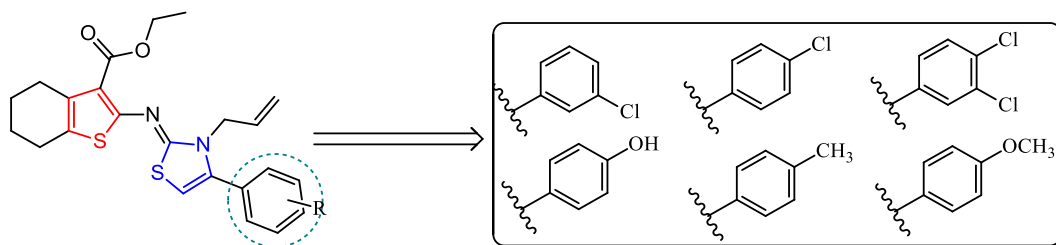
4.2.2 Aplicação das técnicas de bioisosterismo clássico (monovalente e extensão da cadeia alquil) e não clássico (grupos funcionais).

A partir do derivado **LQM83**, diversas modificações foram planejadas com base em diferentes abordagens da técnica de bioisosterismo, com o intuito de produzir novos análogos potencialmente ativos e avaliar interações promissoras com o sítio ativo enzimático (CHEN, X. *et al.*, 2020; LIMA, L. M.; BARREIRO, 2017).

Neste contexto, o bioisosterismo clássico monovalente foi utilizado inicialmente para promover substituições na região do anel fenil, com a finalidade de explorar interações hidrofóbicas, bem como grupos de características básicas neste fragmento

da molécula com o subsítio S2 da cruzaina, inserindo substituintes: 3-Cl, 4-Cl, 3,4-diCl, 4-OH, 4-CH₃, 4-OCH₃ (Figura 44) (NASCIMENTO, I. *et al.*, 2020; SILVA-JÚNIOR, E. F. *et al.*, 2016; SILVA-JUNIOR, DA *et al.*, 2017).

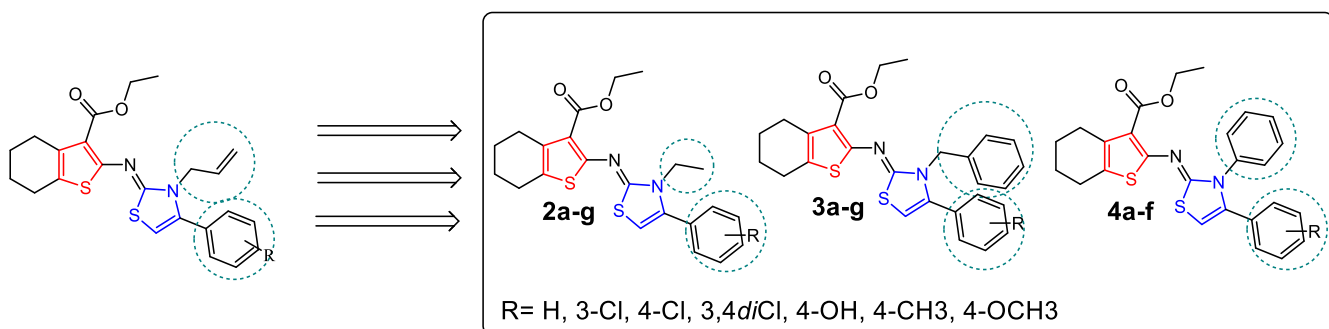
Figura 44 – Aplicação do bioisosterismo monovalente no anel fenil do *hit* LQM83, gerando a série 1a-f.



FONTE:AUTOR, 2020.

Além disto, trabalhos recentes encontrados na literatura têm reportado tais grupamentos substituintes do anel fenil-tiazolidina como sendo potenciais para interações essenciais, em compostos contendo tal fragmento molecular, para a elevação da atividade inibitória frente cruzaina e/ou formas amastigotas do parasito estudado neste trabalho (MORAES, T. De *et al.*, 2016; OLIVEIRA FILHO, DE *et al.*, 2017; ROCHA, D. A. *et al.*, 2018).

Figura 45 – Planejamento das séries 2a, 3a e 4a com base no bioisosterismo monovalente (extensão da cadeia alquil).



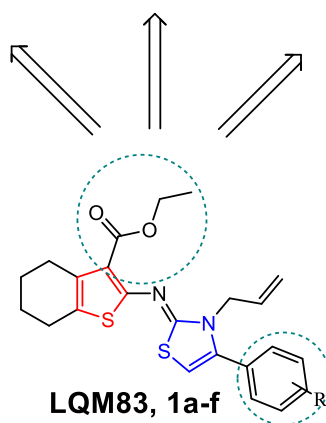
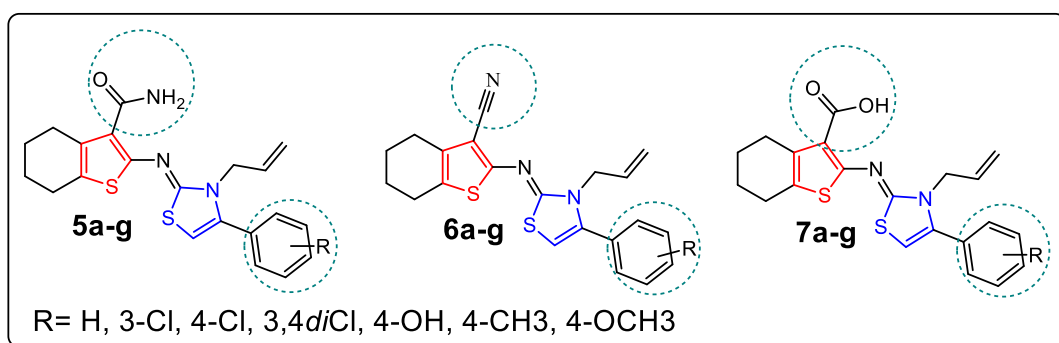
FONTE: AUTOR, 2020.

Logo depois, planejou-se aplicar, com base na série 1a-f, modificações estruturais em torno da região alila, a partir da abordagem de bioisosterismo clássico

monovalente (extensão da cadeia alquil), dando origem a 4 novas séries: 2a-g (benzil), 3a-g (etil), 4a-f (fenil) (Figura 45), com a finalidade de observar potenciais interações hidrofóbicas entre os novos derivados e a enzima em questão.

Tendo-se em vista a abordagem de bioisosterismo não-clássico, visando avaliar a influência dos grupos amida, nitrila e ácido carboxílico em detrimento do grupo éter etílico na posição 3 do anel tiofeno, planejou-se tais modificações em torno das séries 5a, 6a e 7a-g, respectivamente. Para tanto, manteve-se conservada a região alil do composto *hit* **LQM83**.

Figura 46 – Aplicação do bioisosterismo não-clássico para o planejamento das séries 5a, 6a, 7a-g.



FONTE: AUTOR, 2020.

Com isto, o grupo amida na posição 3 do anel tiofeno foi observado em interações de compostos bioativos frente à cruzaina (WIGGERS *et al.*, 2013); o grupo nitrila constitui considerável *warhead* promissor no desenvolvimento de inibidores de cisteína proteases (ÁBRÁNYI-BALOGH *et al.*, 2018; NDAO *et al.*, 2014; OHNISHI *et*

al., 2019; SILVA, D. G. *et al.*, 2017); além do ácido carboxílico ser um derivado da hidrólise do grupo éster intracelularmente junto ao *T. cruzi*, avaliando se os derivados da série 1a-f, bem como **LQM83** poderão ser uma pró-droga e/ou a influência deste grupo perante a enzima cruzaina (Figura 46).

4.3 Procedimentos reacionais

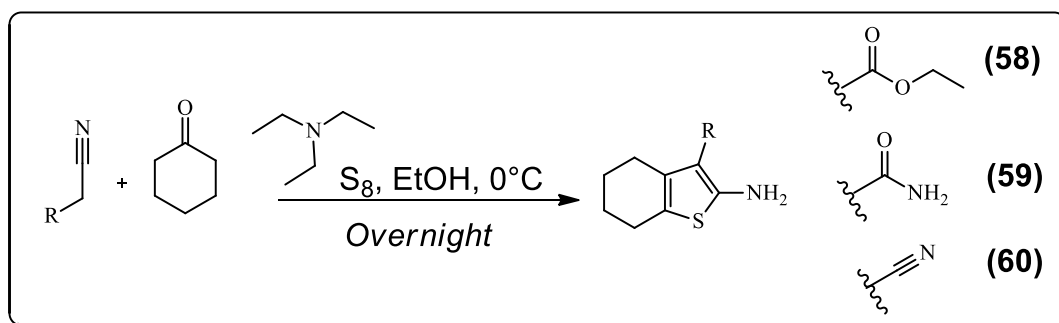
4.3.1 Procedimento geral de síntese dos derivados 3-substituídos-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofen-2-amina.

Os derivados 3-substituídos-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofen-2-amina foram utilizados como compostos de partida para das demais séries, sintetizados a partir da reação de Gewald (ABAEE *et al.*, 2017; BOZOROV *et al.*, 2017; GEWALD, K, 1976; GEWALD, Karl; SCHINKE, 1966).

Com isto, em um balão de fundo redondo, foram adicionados em 20 mL de etanol absoluto, 1mmol do correspondente ciano (cianoacetamida, cianoacetato de etila ou malononitrila), 1mmol de trietilamina, 1mmol de ciclohexanona e 1mmol de enxofre elementar. A mistura reacional foi posta sob agitação a 0 °C por *overnight*, permitindo-se atingir temperatura ambiente, sendo constatado seu término via CCD analítica.

Dando continuidade, a solução foi submetida a uma partição líquido:líquido (acetato de etila:H₂O destilada), evaporada a seco sob vácuo a fase orgânica e, por fim, recristalizada em MeOH:H₂O destilada, produzindo os compostos **(58-60)** (Esquema 4).

Esquema 4 – Obtenção dos compostos (58-60) utilizando a síntese de Gewald.

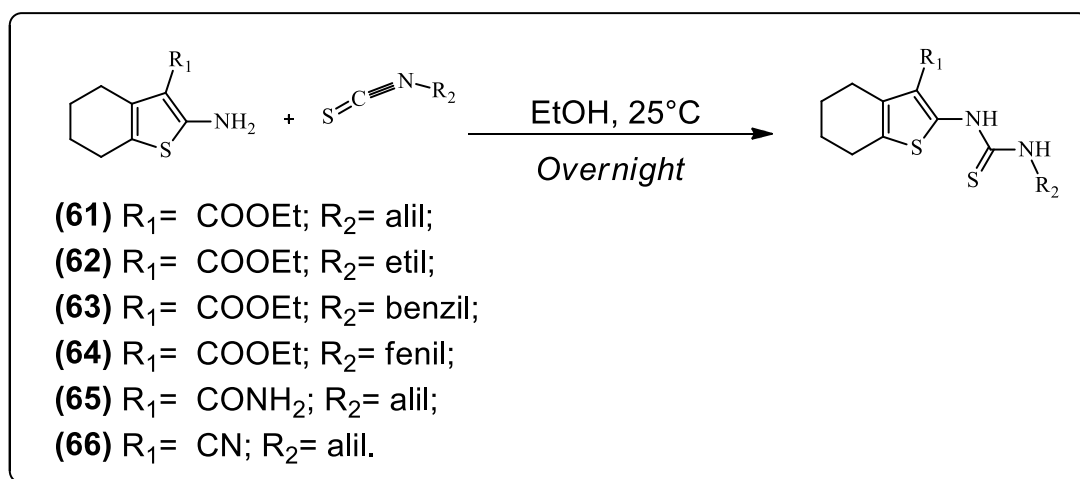


FONTE: AUTOR, 2020.

4.3.2 Procedimento geral de síntese dos derivados N-alkuil-3-substituído-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tíofen-2-amina.

Dando continuidade, em 20 mL de etanol absoluto, foi adicionado 1 mmol de **(58,59** ou **60)**, além de 1,2 mmol do correspondente isotiociano (etil, alil, fenil ou benzil) (Esquema 5). Com isto, a solução foi mantida sob agitação constante a temperatura ambiente, durante *overnight*. Após o fim da reação constatado via CCD analítica, à mistura reacional foi adicionada água destilada, rendendo os derivados (DAS, D.; SIKDAR; BAIRAGI, 2016; SILVA-JÚNIOR, E. F. *et al.*, 2016; TUNCEL *et al.*, 2019).

Esquema 5 – Método de obtenção dos derivados intermediários N-alkuil-3-substituído-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tíofen-2-amina.



FONTE: AUTOR, 2020.

4.3.3 Procedimento geral de síntese dos derivados 2-iminotiofeno-3-tiazolidina (2a-g, 3a-g, 4a-f, 5a-g, 6a-g).

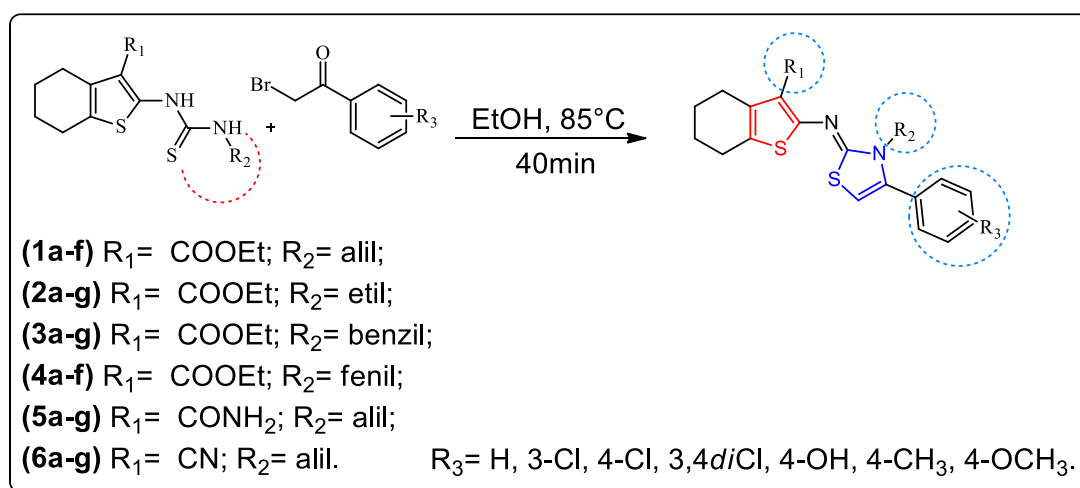
Os derivados híbridos 2-iminotiofeno-3-tiazolidina foram obtidos a partir dos intermediários N-alkuil-3-substituído-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tíofen-2-amina, onde estes foram submetidos à rigidificação conformacional por meio do agente dieletrófilo 2-bromoacetofenona substituídas (CARDOSO, M. V. De O. *et al.*, 2019; DAS, D.;

SIKDAR; BAIRAGI, 2016; KRYSHCHYSHYN *et al.*, 2019; PATHANIA; NARANG; RAWAL, 2019; SCARIM *et al.*, 2019; SILVA-JÚNIOR, E. F. *et al.*, 2016; TUNCEL *et al.*, 2019).

Desta forma, foi adicionado 1 mmol do correspondente intermediário supracitado num tubo selado, contendo 3 mL de etanol absoluto, bem como a 2-bromoacetofenona requerida, onde a solução foi agitada sob 85°C por 40 minutos.

Logo após constatado o término da reação via CCD analítica, foi adicionada água destilada gota-a-gota, de modo a observar turbidez da mistura reacional. Com isto, o tubo foi resfriado a 0°C por overnight, onde o sólido obtido foi então filtrado e seco sob vácuo, rendendo os derivados requeridos 2-iminotiofeno-3-tiazolidínicos (Esquema 6).

Esquema 6 – Procedimento geral para obtenção dos derivados híbridos 2-iminotiofeno-3-tiazolidínicos.



FONTE: AUTOR, 2020.

4.3.4 Procedimento geral de síntese dos derivados 2-iminotiofeno-3-tiazolidina (7a-g).

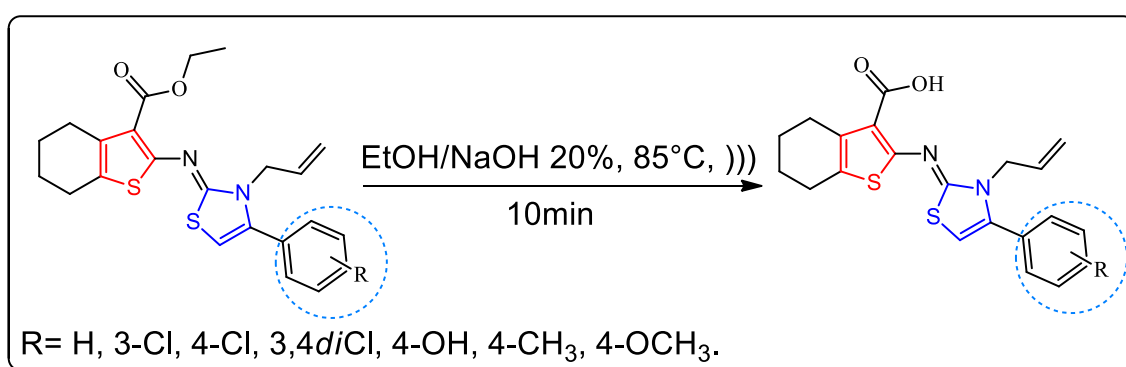
Para obtenção dos ácidos carboxílicos na posição 3 do heterociclo tiofeno, partiu-se da série 1a-g, bem como do *hit* LQM83, de modo estes compostos foram submetidos a uma hidrólise básica do grupamento éster etílico.

Desta forma, com base na metodologia descrita por Flood *et al.* (2017) os derivados a supracitados foram solubilizados em 3mL de etanol absoluto em tubo de microondas de 10 mL, seguido da adição de 1mL de solução de NaOH (P.V. 20 %),

onde a solução foi submetida a irradiação em microondas a 85°C, com potência de 50 watts.

Quando finalizada a reação, constatada via CCDA, foi adicionado gota-a-gota HCl (3M) sob agitação magnética, por 10 minutos, até formar todo o precipitado. Por fim, a solução foi resfriada a 0°C, onde os produtos requeridos foram filtrados e secados à vácuo (Esquema 7).

Esquema 7 – Procedimento geral para obtenção dos derivados ácidos carboxílicos (7a-g) mediante hidrólise básica.



FONTE: AUTOR, 2020.

4.4 Avaliação biológica frente à promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*

4.4.1 Manutenção de parasitos e macrófagos

Parasitos da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), foram mantidos *in vitro* na sua forma promastigota em meio Schneider suplementado [20% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina] (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), pH 7, a 26 ± 1 °C em incubadora *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) (Eletrolab EL202, São Paulo, Brasil) e repicadas semanalmente.

A linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7 foi conservada em frascos de cultura celular de 750 cm² (Corning Glass Workers – New York – USA) em meio DMEM suplementado (10 % de SFB, 1% de antibiótico - 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), pH 7, a 37 °C, 5 % de CO₂ com 80 % de umidade. Os repiques foram realizados após as células atingirem

a confluência, caracterizada pela formação de uma monocamada de células em torno de 48 h a 72 h após o acondicionamento.

4.4.2 Preparo das substâncias avaliadas

Para os testes *in vitro*, foram preparadas soluções-estoque das substâncias nas concentrações de 40 mg/mL em dimetilsulfóxido – (DMSO) (Mallinckrodt Chemicals, St. Louis, EUA). Para cada teste a solução-estoque foi diluída nos meios de cultura apropriados até atingir as concentrações finais desejadas.

4.4.3 Atividade antipromastigota

A inibição do crescimento de formas promastigotas foi avaliada com base em Nunes *et al.* (2021). Formas promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^6 parasitos/poço) contendo 100 μ L de meio Schneider suplementado, em triplicata, contendo concentrações seriadas das substâncias-teste (25 a 1,56 μ M). As placas foram incubadas em BOD a 26 °C por 72 h. Após o período de tratamento, 10 μ L de MTT (5 mg/mL) foram aplicados em cada poço para estabelecer a avaliação colorimétrica da inibição de crescimento. Em seguida a placa foi novamente incubada por mais 4 h, seguidamente recebendo a adição de 50 μ L de solução de dodecil sulfato de sódio (DSS) a 10 % (p/v em água destilada) para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas a 540 nm (modelo Biosystems ELx800, Curitiba, PR, Brasil). O controle negativo foi realizado com meio Schneider suplementado e contendo 0,2 % de DMSO, considerado como 100 % de viabilidade das leishmanias.

4.4.4 Atividade anti-amastigota

Macrófagos, na concentração de 1×10^6 células/mL de meio DMEM completo, foram adicionados a placas de cultura com 24 poços contendo lamínulas estéreis redondas de 13 mm. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 3 h para a adesão celular. Após este período, o meio foi aspirado e um novo meio foi adicionado contendo formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de

crescimento, na proporção de 10 promastigotas para 1 macrófago em cada poço. Após 3 h de incubação a 37°C e 5% de CO₂, o meio foi aspirado para remover macrófagos e promastigotas livres e realizadas três lavagens com PBS pré-aquecido a 37°C. Em seguida, 1 mL de DMEM completo foi adicionado em cada poço contendo concentrações seriadas de 0,78 a 25 µM das substâncias-teste em triplicata. As culturas foram então incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 72 h, ao final do qual as lamínulas foram removidas, fixadas e coradas com Panótico rápido (Laborklin®, Paraná, BRA) e montadas em lâminas permanentes com o uso de Entelan® (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Para cada lamínula, 300 macrófagos e o número de amastigotas em cada macrófago foram quantificados por microscopia óptica com aumento de 1000 x. O controle negativo foi realizado com meio DMEM completo a 0,5% de DMSO.

4.4.5 Citotoxicidade em macrófagos

Em uma placa de 96 poços foram colocados 100 µL de meio DMEM suplementado e 1×10^5 macrófagos RAW 264.7 por poço. Após 4 h de incubação a 37 °C e 5 % de CO₂ para adesão celular foram realizadas três lavagens com PBS estéril. Em seguida, foram adicionados 100 µL de meio DMEM suplementado contendo diferentes concentrações das substâncias (200 a 1,56 µM) e incubados por um período de 72 h. No final do período foi aplicado 10 µL de MTT (5 mg/mL) e incubado por mais de 4 h. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e adicionado 100 µL de DMSO em todos os poços. Após 30 min de agitação, a leitura foi realizada a 540 nm em uma leitora de placa. Meio DMEM suplementado e contendo 0,5 % de DMSO foi usado como controle negativo e considerado como 100 % de viabilidade de macrófagos (NUNES et al., 2021).

4.4.6 Análise estatística

As diferentes concentrações médias sobre formas promastigotas (CI₅₀) e macrófagos (CC₅₀) foram calculadas por regressão não linear. Para comparações entre grupos foram realizadas as análises de variância ANOVA seguida pelo teste de

Tukey através de um programa estatístico, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível máximo de significância estatística.

4.5 Modelagem *in silico*

4.5.1 Dados computacionais

Os estudos de *docking* molecular foram realizados em notebook Dell®, modelo 5000, processador Intel® I5-5200U, CPU 2,2 GHz, memória RAM 4Gb e plataforma operacional Windows 10 pro 64 bits. As simulações de dinâmica molecular relacionadas às enzimas foram realizadas em *workstation* Dell®, modelo T3600 6C, processador Intel® Xeon E5-1660, CPU 3,3 GHz, memória RAM 16Gb e plataforma operacional *Linux*®.

4.5.2 Modelagem por homologia

Pelo fato de não haver estrutura cristalográfica da cisteína protease da *Leishmania amazonensis* (CPLa), optou-se então pela modelagem comparativa e assim a construção do modelo baseado nos estudos de Freitas *et al.* (2018) e Fujii (2018). Inicialmente, a sequência de aminoácidos referentes a requerida cisteína protease foi obtida na base de dados *National Center for Biotechnology Information Search database* (NCBI, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sob o código AAP21894, constituída de 353 aminoácidos. Logo após, foi realizada uma busca de proteínas com identidade estrutural por meio do servidor *Basic local alignment search tool* (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Neste sentido, a busca demonstrou 100 sequências homólogas, de modo que a que apresentava o melhor alinhamento foi com a cruzaina do *T. cruzi* (PDB: 1AIM), utilizando-a como molde. O modelo foi construído por meio do web-software *Swiss-Model* (<https://swissmodel.expasy.org/>) e validado por meio do gráfico de *Ramachandran* gerado pelo web-software *SAVES* (<https://saves.mbi.ucla.edu/>). Por fim, o modelo gerado foi alinhado com o PDB original (1AIM) por meio do software *PyMol* e calculado o valor de *Root Mean Square deviation* (RMSD) para a validação final do modelo.

4.5.2 Simulação de dinâmica molecular da enzima cruzaína

A simulação de dinâmica molecular da cruzaína foi realizado seguindo a metodologia proposta por OLIVEIRA (2018). A estrutura cristalográfica da cruzaína foi obtida através da base de *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank* – RCSB PDB, código 1AIM (<https://www.rcsb.org/structure/3I06>).

A escolha o PDB foi realizada após um protocolo de validação por *re-docking* (sessão 4.5.3). A simulação dinâmica foi realizada através do software *GROMACS*[®] (<http://www.gromacs.org/>), em que foram removidas as moléculas de água co-cristalográficas, e adicionados os átomos de hidrogênio. Utilizou-se então o campo de força CHARMM36, adicionando a enzima em uma caixa cúbica de 1 nm em condições fisiológicas neutras.

Assim, foram adicionadas 9064 moléculas de água e 13 íons de sódio pelo método SPC (Single Point Charge) para a distribuição das moléculas através do sistema. Após o sistema solvatado e montado, é necessário garantir que não ocorram problemas estéricos e nem geometria inadequada, sendo necessária uma minimização da energia do sistema. Logo após a minimização, solvente e íons foram equilibrados ao redor da proteína. Esse equilíbrio foi conduzido em duas fases: NVT (Número de partículas, volume e temperatura constante) e NPT (Número de partículas, pressão e temperatura constante).

Os equilíbrios NVT e NPT foram realizados a uma temperatura de 300K e pressão de 1 bar (para na NPT) a 100 ps. Com o sistema bem equilibrado à temperatura e pressão desejados, realizou-se então a simulação dinâmica à 100 ns. Ao finalizar a simulação, foi gerado o gráfico de RMSD através do software *Xmgrace*[®], sendo comprovada a estabilidade da enzima nas condições propostas pela simulação. Após a simulação da dinâmica molecular, foi realizada uma análise dos *clusters* do arquivo gerado pela dinâmica através do software *Chimera*[®] em que foi escolhido aquele que apresentou maior representatividade. Por fim, realizou-se a validação da dinâmica molecular através da obtenção do gráfico de *Ramachandran* por meio do web-software *SAVES*[®] para comprovação da estabilidade da enzima.

4.5.3 *Docking* molecular

Inicialmente, faz-se necessário validar o protocolo de triagem para a escolha da estrutura cristalográfica e função de pontuação mais adequados. Assim, realizou-se um *re-docking* para o cálculo de RMSD em cada uma das funções de pontuação disponíveis no software *GOLD*® (ChemPLP, GoldScore, ChemScore e ASP) em 26 estruturas cristalográficas da enzima cruzaina disponíveis na base de dados Protein Data Bank (PDB). O PDB id 1AIM foi selecionado do mapa de calor gerado pelo *Microsoft Excel*® usando o algoritmo ChemPLP (RMSD de 0,238) como o procedimento mais apropriado. Este protocolo está seguindo os descritos anteriormente por nosso grupo de pesquisa (NASCIMENTO *et al.*, 2021; NASCIMENTO *et al.*, 2022).

A enzima foi submetida a simulações MD a 100 ns para obtenção da forma nativa (conformação mais estável). Paralelamente, foram geradas 10 conformações para cada ligante por meio do software *MarvinSketch*®, em que a mais estável foi otimizada geometricamente utilizando o software *ArgusLab*® pelo método semi-empírico AM1 (Austin Model 1). Para o docking, hidrogênios foram adicionados e uma região de 6 Å em torno do ligante co-cristalizado foi selecionada usando a eficiência máxima do algoritmo. Assim, 10 poses de ligação foram geradas para cada ligante, e a pose de valor de pontuação de ajuste mais significativo foi escolhida. Por fim, os diagramas 2D das interações realizadas com o sítio catalítico foram gerados através do software *Discovery Studio*® e as figuras das superfícies hidrofóbicas foram geradas pelo software *Chimera*®.

4.5.4 Estudos de farmacocinética *in silico*

Estudos de farmacocinética *in silico* foram realizados para os derivados mais promissores obtidos após os ensaios biológicos frente à promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, bem como ensaios de *docking* molecular frente à enzima cruzaina. Neste sentido, as análises de semelhança de drogas *in silico* foram realizadas usando a ferramenta de web-software Swissadme (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017) (<http://www.swissadme.ch/>), obtendo cálculos de ADMET - abreviação de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, bem como se estes são inibidos pela P- glicoproteína (P-gp). Esses dados correspondem a parâmetros importantes no processo de design e desenvolvimento de medicamentos (FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, Adriano D., 2019b; JIA, C.-Y. *et al.*, 2020).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos compostos de partida (**58-60**) utilizando a síntese de *Gewald*.

Os compostos heterociclos 2-aminotiofenos foram obtidos a partir da síntese de *Gewald*, sem dificuldades nas etapas de síntese e purificação, de modo que os parâmetros reacionais se perfizeram consideravelmente satisfatórios. Contudo, houve troca da base morfolina pela base trietilamina, o que proporcionou uma melhora considerável no rendimento dos produtos requeridos.

Desta forma, os produtos (**58**) e (**60**) foram previamente sintetizados pelo grupo de pesquisa a partir da metodologia de Silva-Júnior, E. F. *et al.* (2016). Com base nisso, o composto (**59**) foi então sintetizado e caracterizado, sendo utilizado como material de partida para este trabalho.

5.1.1 Mecanismos reacionais

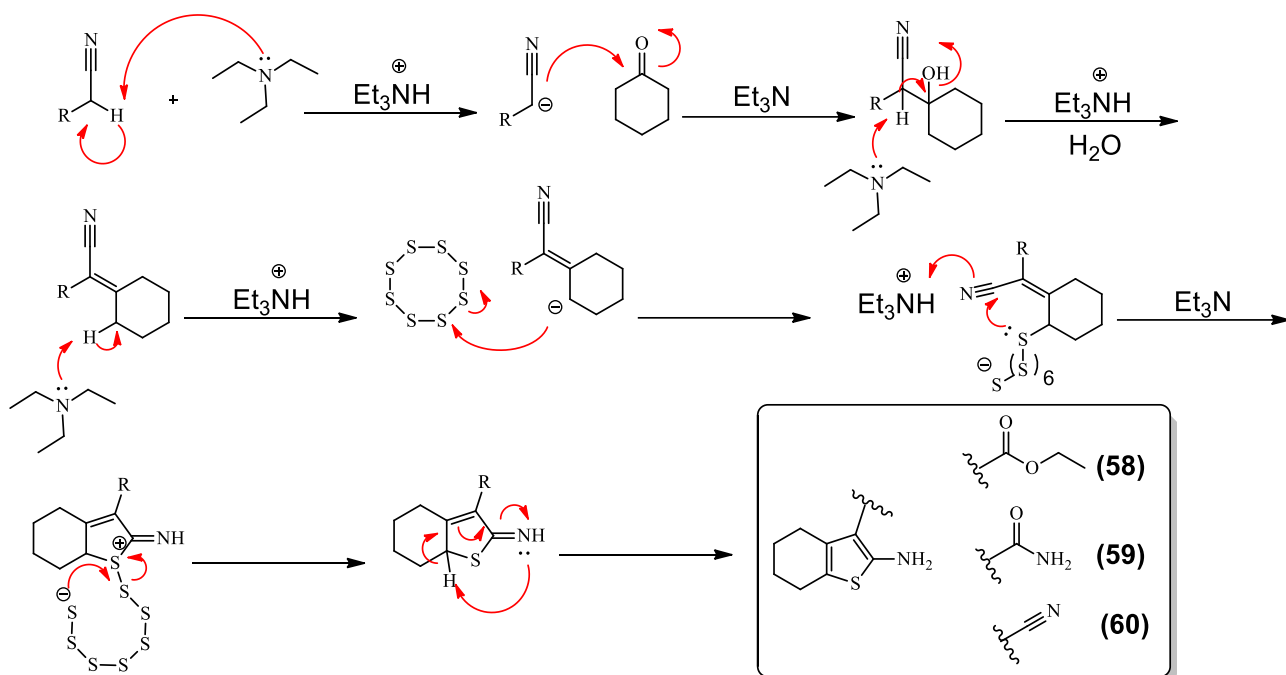
O mecanismo reacional envolvendo a síntese de *Gewald* consiste numa reação *one-pot* contendo três componentes básicos: uma carbonila cetônica (neste caso, a cicloexanona foi utilizada); uma nitrila ativada (cianoacetamida, cianoacetato de etila e malononitrila), além do enxofre elementar.

Inicialmente, ocorre a ativação do componente nitrila a partir da captura de um próton α -ciano, de modo a proporcionar a condensação entre o derivado nitrílico e a carbonila cetônica via *Knoevenagel-Cope*, ocorrendo, logo após, a liberação de uma molécula de água.

Posteriormente, a base trietilamina (neste caso, houve troca da morfolina, presente à grande maioria dos trabalhos reportados na literatura envolvendo a formação de produtos por meio da síntese de *Gewald*, pela trietilamina, presente em alguns trabalhos (ABAEE *et al.*, 2017; BOZOROV *et al.*, 2017)) desprotona o grupo metileno α -nitrila para, em seguida, ocorrer a adição do enxofre (S-nucleófilo).

Finalmente, acontece um ataque intramolecular nucleofílico à nitrila, favorecendo a ocorrência de tautomerismo amino-imínico, dando origem ao anel 2-amino tiofeno (Esquema 8).

Esquema 8 – Proposta de mecanismo simplificado envolvendo a obtenção dos compostos (58-60).



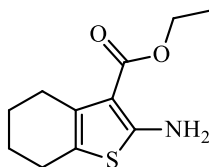
FONTE: AUTOR, 2020.

5.1.2 Caracterização por RMN ^1H e ^{13}C

Após a obtenção dos produtos, observou-se que a caracterização estrutural por meio de ^1H envolve um sinal múltiplo para 4H em torno de 1,65-1,70 ppm, bem como 2 tripletos em torno de 2,44 e 2,57 ppm, referentes aos 4 metilenos do cicloalquil ligado ao anel tiofeno. Ainda, pode-se observar um singlete largo para 2H em aproximadamente 6,90 ppm, referente ao NH_2 dos heterociclos formados.

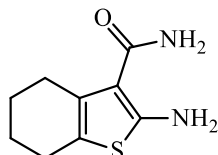
Neste contexto, a caracterização por ^{13}C se deu por conta de 4 sinais entre 22-26 ppm, referentes aos mesmos metilenos supracitados. Em adição, observa-se o carbono ligado ao grupo $-\text{NH}_2$ em torno de 159 ppm.

5.1.2.1 2-amino-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato de etila (58)



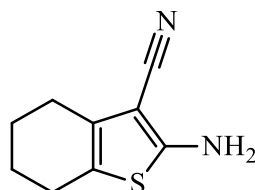
- Aspecto: Amarelo cristalino; MM: 225,08 g/mol; rendimento: 98%; PF: 134-135; Rf: 0,50 (Hex/AcOEt 8:2).
- RMN ^1H e ^{13}C : (SILVA-JÚNIOR, E F *et al.*, 2016).

5.1.2.2 2-amino-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxamida (**59**)



- Aspecto: Sólido amarelo pálido; MM: 196.0607 g/mol; rendimento: 85%; PF: 163-165 °C; Rf: 0,50 (Hex/AcOEt8:2).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.65-1.70 (*m*, 4H, CH₂); 2.44 (*t*, 2H, *J* = 5.92 Hz, CH₂); 2.57 (*t*, 2H, *J* = 5.92 Hz, CH₂); 6.90 (*sl*, 2H, NH₂).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 23.01 (CH₂); 23.20 (CH₂); 24.50 (CH₂); 26.38 (CH₂); 107.99 (Cq); 116.01 (Cq); 130.49 (Cq); 159.43 (C-NH₂); 168.31 (C=O) (Anexo A).

5.1.2.3 2-amino-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (**60**)



- Aspecto: Amarelo cristalino; MM: 178,0565 g/mol; rendimento: 98%; PF: 143-146; Rf: 0,50 (Hex/AcOEt 8:2).
- RMN ^1H e ^{13}C de acordo com Silva-Junior, E F *et al.*, (2016).

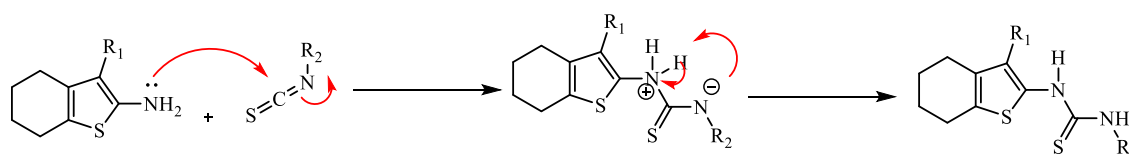
5.2 Obtenção dos derivados N-alkil-3-substituído-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofen-2-amina.

Esta série de compostos intermediários foram obtidos com base na literatura disponível (SILVA-JÚNIOR, E. F. *et al.*, 2016), com rendimentos satisfatórios e sem problemas nas etapas de purificação, adquirindo os compostos (**61-66**).

5.2.1 Mecanismo reacional

O mecanismo para obtenção destes compostos envolve um ataque nucleofílico da amina da posição 2 dos compostos **(58-60)** ao carbono *sp* do requerido isotiocianatos *N*-substituído. Logo após, enxofre *sp*² se comporta como uma carbonila, de forma a restabelecer a ligação dupla, onde a carga negativa irá, então, se deslocar para o nitrogênio vicinal que, por sua vez, irá abstrair o próton do nitrogênio responsável pelo ataque nucleofílico inicial, de forma a estabilizar a molécula formada (Esquema 9).

Esquema 9 – Mecanismos reacionais envolvendo a obtenção dos compostos (61-66).

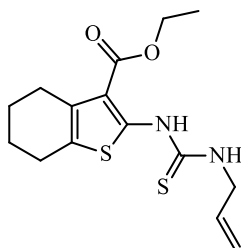


- | |
|---|
| (61) R ₁ = COOEt; R ₂ = alil; |
| (62) R ₁ = COOEt; R ₂ = etil; |
| (63) R ₁ = COOEt; R ₂ = benzil; |
| (64) R ₁ = COOEt; R ₂ = fenil; |
| (65) R ₁ = CONH ₂ ; R ₂ = alil; |
| (66) R ₁ = CN; R ₂ = alil. |

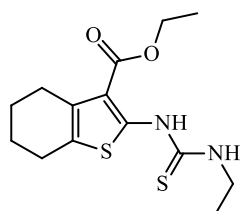
FONTE: AUTOR, 2020.

5.2.2 Caracterização por RMN ¹H e ¹³C

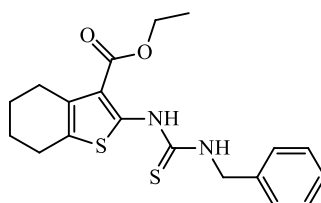
Para a caracterização espectroscópica desta série, observou-se no RMN ¹H o mantimento do padrão de sinais demonstrado na seção 5.1.2, além dos sinais característicos dos substituintes *n*-isotiocianatos. Contudo, um sinal contundente para a formação do requerido produto foi observado no RMN ¹³C, com um sinal em torno de 170 pmm, referente ao carbono C=S da tiourea gerada.

5.2.2.1 2-(3-allyltioureido)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato de etila (**61**)

- Aspecto: Sólido amorfo marrom pálido; MM: 324.10 g/mol; rendimento: 82%; PF: 173-174 °C; RF: 0,50 (Hex/AcOEt 8:2).
- RMN ^1H e ^{13}C de acordo com Silva-Junior, E F *et al.*, (2016).

5.2.2.2 Etil-2-(3-etiltioureido)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**62**)

- Aspecto: Sólido amarelo pálido; MM: 312,0966 g/mol; rendimento: 85%; PF: 182-185 °C; RF: 0,50 (Hex/AcOEt 8:2).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.30 (*t*, 3H, J = 7.55 Hz, CH₃ alquil); 1.30 (*t*, 3H, J = 7.06 Hz, CH₃ éster); 1.70-1.71 (*m*, 4H,CH₂); 2.55-2.56 (*m*, 2H,CH₂); 2.68-2.70 (*m*, 2H,CH₂); 3.41-3.45 (*m*, 2H,CH₂ éster); 4.28 (*q*, 2H,CH₂ alquil); 9.40 (*s*, 1H, NH); 11.47 (*s*, 1H, NH) (Anexo B).

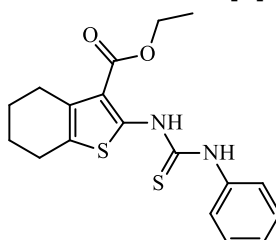
5.2.2.3 Etil 2-(3-benziltioureido)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**63**)

- Aspecto: Sólido amarelo pálido; MM: 374,1123 g/mol; rendimento: 89%; PF: 195-197 °C; RF: 0,50 (Hex/AcOEt 8:2).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.13 (*t*, 3H, J = 7.31, CH₃); 1.69-1.74 (*m*, 4H, CH₂); 2.55-2.57 (*m*, 2H,CH₂); 2.68-2.71 (*m*, 2H,CH₂); 4.27 (*q*, 2H, J =

7.34 Hz, CH₂ éster); 4.68 (*d*, 2H, *J* = 5.14 Hz, CH₂ benzil); 7.25-7.29 (*m*, 1H, Har); 7.32-7.37 (*m*, 4H, Har); 9.88 (*s*, 1H, NH); 11.56 (*s*, 1H, NH).

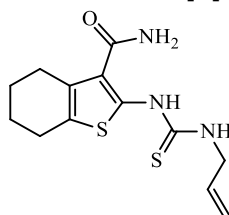
- RMN ¹³C (150 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): 14.57 (CH₃); 22.90 (CH₂); 22.99 (CH₂); 24.05 (CH₂); 26.37 (CH₂); 47.90 (NCH₂); 60.68 (OCH₂); 111.41 (Cq); 125.39 (CH ar); 127.59 (Cq); 128.18 (CH ar); 128.81 (CH ar); 130.19 (Cq); 138.55 (CH ar); 150.88 (Cq); 166.18 (C=O); 178.21 (C=S) (Anexo C).

5.2.2.4 2-(3-feniltioureido)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxilato de etila (**64**)



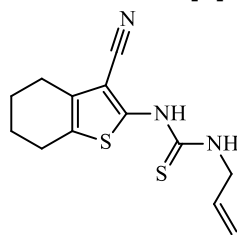
- Aspecto: Sólido amorfo branco; MM: 360.10 g/mol; rendimento: 98%; PF: 199-200 °C; Rf: 0.50 (Hex/AcEOt 8:2);
- RMN ¹H e ¹³C de acordo com Silva-Junior, E F *et al.*, (2016).

5.2.2.5 2-(3-allyltioureido)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carboxamida (**65**)



- Aspecto: Sólido amarelo pálido; MM: 295,0813 g/mol; rendimento: 90%; PF: 177-180°C; RF: 0,50 (Hex/AcOEt 8:2).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ = 1.70-1.73 (*m*, 4H, CH₂); 2.57-2.59 (*m*, 2H, CH₂); 2.64-2.67 (*m*, 2H, CH₂); 4.07 (*s*, 2H, CH₂CH=CH₂); 5.11 (*d*, 1H, *J* = 9.88 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.18 (*d*, 1H, *J* = 16.39 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.82-5.88 (*m*, 1H, CH); 6.95 (*s*, 1H, NH); 7.05 (*s*, 1H, NH); 9.13 (*s*, 1H, NH); 11.56 (*s*, 1H, NH) (Anexo D).

5.2.2.6 2-(3-allylthioureido)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (66)



- Aspecto: Sólido amorfo branco; MM: 277,0707 g/mol; rendimento: 95%; PF: 177-179 °C; RF: 0.50 (Hex/AcEOt 8:2);
- RMN ¹H e ¹³C de acordo com Silva-Junior, E F *et al.*, (2016).

5.3 Obtenção dos derivados híbridos 2-iminotiofeno-3-tiazolidínicos – séries (1a-6a)

Para a obtenção dos híbridos 2-iminotiofeno-3-tiazolidínicos foi aplicada a metodologia até então utilizada, descrita por Silva-Júnior, E. F. *et al.* (2016). Desta forma, para a ciclização da região tioamida pelo dieletrófilo 2-bromoacetofenona substituído, foi-se aplicada uma proporção equimolar, sob 85°C, em banho de óleo, com 15 mL de solvente EtOH por *overnight*.

No entanto, após 24h de reação, a análise por CCD demonstrou, apesar do consumo total do reagente limitante, a formação de vários subprodutos, não sendo possível, assim, a purificação de algum produto para caracterização.

Desta forma, após busca na literatura, observou-se que alguns trabalhos mantinham a proporção equimolar com relação à 2-bromoacetofenona substituída. Contudo, utilizavam o tempo de 2 horas sob irradiação por ultrassom, com 25 mL de isopropanol como solvente (OLIVEIRA FILHO, DE *et al.*, 2017) ou, ainda, 1 hora à temperatura ambiente, utilizando 20 mL do mesmo solvente (MORAES, T. De *et al.*, 2016). No entanto, ambas metodologias não se aplicaram, onde as reações para obtenção dos produtos 2-iminotiofeno-3-tiazolidínicos apresentaram diversos subprodutos, inviabilizando a purificação para caracterização.

Idealizou-se, então, após tentativas sem sucesso de redução de temperatura para 60°C ou ambiente, em consonância com o aumento do tempo reacional, a formação dos produtos requeridos ocorreu de forma otimizada em tubo selado com apenas 3 mL de solvente EtOH, haja vista sua facilidade em solubilizar os reagentes

e, ainda, possuindo menor toxicidade e sendo mais acessível, além de manter a proporção equimolar.

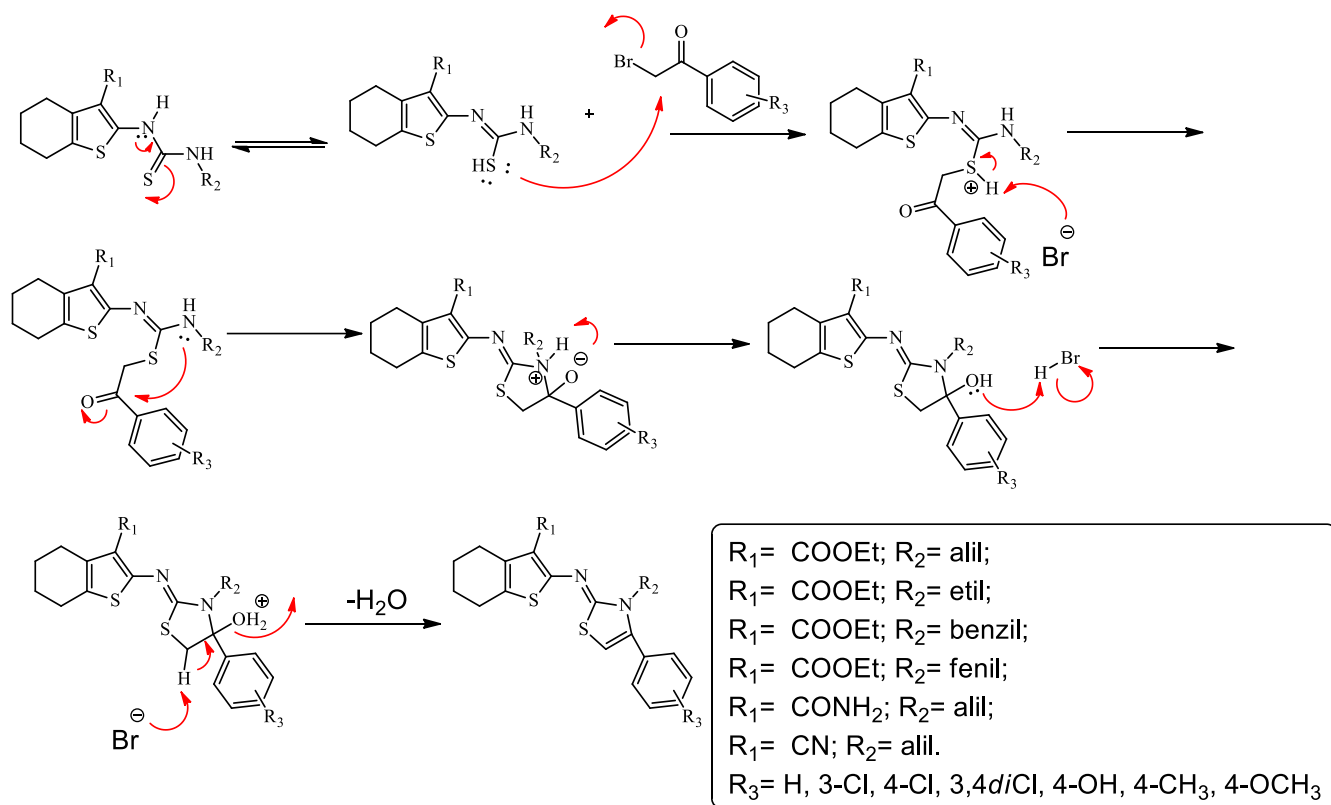
Assim, após 40 minutos de reação, foi analisado por CCD que havia total consumo dos reagentes, concomitantemente com a formação de produto, a metodologia mais adequada para formação desta classe de produtos. Com isto, após adicionar água destilada gota-a-gota no tubo reacional, a solução apresentou-se em turbidez, onde a mesma foi resfriada e, em 2 horas, foi observada a formação dos produtos precipitados, sendo estes então filtrados e secos sob vácuo. Deste modo, a metodologia aplicada apresentou-se eficaz, de baixo custo e toxicidade, além de obter os produtos em rendimentos quantitativos.

5.3.1 Mecanismos reacionais envolvendo a rigidificação promovida pelo dieletrófilo 2-bromoacetofenona

Para a formação do produto idealizado, ocorre, inicialmente, um equilíbrio tautomérico, com formação do tiol em detrimento à tioamida. Sendo assim, o par de elétrons do tiol (mais elétron-disponível) ataca o carbono α -halogenado da bromoacetofenona, ocasionando a saída do grupo abandonador halogenado, em que, posteriormente, o íon brometo abstrai o próton do tiol, de forma a estabilizá-la (Esquema 10).

Seguindo o mecanismo reacional, ocorre um ataque intramolecular do par de elétrons livre da amina à carbonila do dieletrófilo, onde o oxigênio, carregado negativamente, abstrai o próton do nitrogênio positivamente carregado, estabilizando a estrutura formada. O mecanismo culmina com a espécie ácida protonando a hidroxila do anel formado, favorecendo uma β -eliminação por desidratação (Esquema 10).

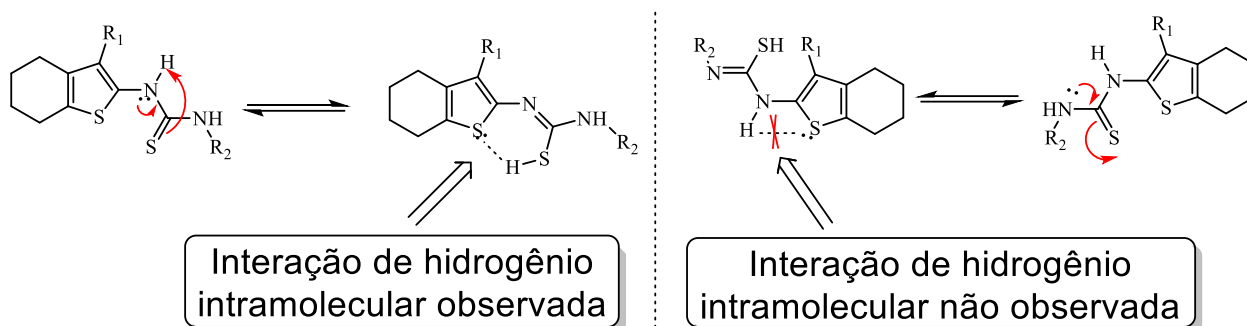
Esquema 10 - Proposta de mecanismo simplificado para a rigidificação envolvendo o dieletrófilo 2-bromoacetofenona.



FONTE: AUTOR, 2020.

Em adição, observa-se que a regioseletividade para formação do produto híbrido requerido se dá conforme observado em Eltsov *et al.* (2004), de modo que o o nitrogênio responsável pelo tautomerismo refere-se ao ligado ao grupo R_2 , onde, após a imina formada entre o C tioureido e o N diretamente ligado ao heterociclo tiofeno, uma ligação de hidrogênio estabiliza o tautômero formado, de modo a proporcionar o mecanismo reacional conforme demonstrado no esquema 10. Ademais, tal formação da ligação de hidrogênio intramolecular não pode ser observada perante o nitrogênio diretamente ligado ao heterociclo, onde, se ocorresse, favoreceria a formação regioseletiva não requerida (Esquema 11).

Esquema 11 – Regiosseletividade da formação do heterociclo tiazolidina direcionada pelo equilíbrio tautomérico.

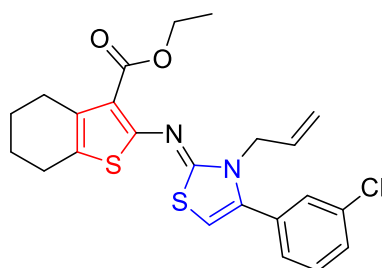


FONTE: AUTOR, 2020.

5.3.2 Caracterização por RMN ^1H e ^{13}C

Para a caracterização dos produtos requeridos através de RMN ^1H , observou-se um singleto em torno de 6.5-6.9 ppm referente ao hidrogênio do grupo -CH, característico da formação do heterociclo tiazolidina. Além disto, observou-se, por meio de RMN ^{13}C , o surgimento de um sinal em torno de 98-100 ppm, o que corrobora com a formação deste heterociclo de acordo com a literatura (OLIVEIRA FILHO, DE *et al.*, 2017; SILVA-JÚNIOR, E F *et al.*, 2016; TUNCEL *et al.*, 2019).

5.3.4.1 (Z)-etil2-((3-alil-4-(3-clorofenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**1a**)

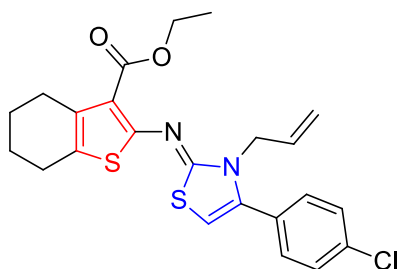


- Sólido amarelo; MM: 458,0889 g/mol; Rendimento: 81%; PF: 215-217°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.21 (*t*, 3H, J = 6.90 Hz, CH_3); 1.69-1.79 (*m*, 4H, CH_2); 2.64 (*q*, 4H, J = 5.72 Hz, CH_2); 4.14 (*q*, 2H, J = 7.19 Hz, CH_2CH_3); 4.51 (*d*, 2H, J = 4.18 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 4.87 (*d*, 1H, J = 17.17 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.09 (*d*, 1H, J = 10.44 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.85 (*ddt*, 1H, J = 4.87, 11.37 e 17.08

Hz, CH₂CH=CH₂); 6.69 (s, 1H, SCH); 7.45 (d, 1H, *J* = 7.60 Hz, CH ar); 7.53 (t, 1H, *J* = 7.90 Hz, CH ar); 7.57 (d, 1H, *J* = 8.51 Hz, CH ar).

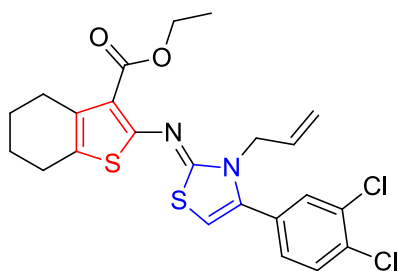
- RMN ¹³C (150 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): 14.70 (CH₃); 22.79 (CH₂); 23.23 (CH₂); 24.99 (CH₂); 26.30 (CH₂); 48.13 (CH₂CH=CH₂); 59.67 (CH₂CH₃); 100.65 (SCH); 117.37 (CH₂CH=CH₂); 117.52 (CH ar); 125.40 (Cq); 128.14 (Cq); 129.16 (CH ar); 129.89 (CH ar); 131.03 (CH ar); 132.96 (CH ar); 133.24 (CH); 133.79 (Cq ar); 133.97 (Cq); 138.66 (Cq); 155.53 (Cq); 159.15 (Cq); 164.03 (C=O) (Anexo E).

5.3.4.2(Z)-etil2-((3-alil-4-(4-clorofenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiefeno-3-carboxilato (**1b**)



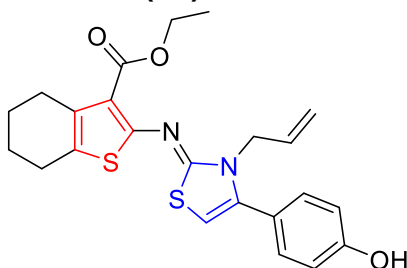
- Sólido amarelo; MM: 458,0889 g/mol; Rendimento: 79%; PF: 221-224°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ = 1.20 (t, 3H, *J* = 7.47 Hz, CH₃); 1.70-1.77 (m, 4H, CH₂); 2.64 (q, 4H, *J* = 5.96 Hz, CH₂); 4.14 (q, 2H, *J* = 7.21 Hz, CH₂CH₃); 4.49 (d, 2H, *J* = 5.68 Hz, CH₂CH=CH₂); 4.85-4.89 (m, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.06-5.09 (m, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.83 (ddt, 1H, *J* = 5.40, 10.79 e 16.37 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.63 (s, 1H, SCH); 7.48-7.51 (m, 2H, CH ar); 7.55-7.58 (m, 2H, CH ar).
- RMN ¹³C (150 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): 14.69 (CH₃); 22.79 (CH₂); 23.22 (CH₂); 24.98 (CH₂); 26.30 (CH₂); 48.01 (CH₂CH=CH₂); 59.65 (CH₂CH₃); 100.19 (SCH); 117.38 (CH₂CH=CH₂); 117.44 (Cq); 125.35 (Cq); 129.25 (Cq); 129.86 (CH ar); 131.26 (CH ar); 133.16 (CH ar); 133.95 (Cq ar); 134.77 (Cq); 138.95 (Cq); 155.60 (Cq); 159.19 (Cq); 164.02 (C=O) (Anexo F).

5.3.4.3(Z)-etil2-((3-alil-4-(3,4-diclorofenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**1c**)



- Sólido amarelo; MM: 492,0500 g/mol; Rendimento: 79%; PF: 227-229°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.30 (*t*, 3H, *J* = 7.53 Hz, CH₃); 1.70-1.77 (*m*, 4H, CH₂); 2.62-2.66 (*m*, 4H, CH₂); 4.14 (*q*, 2H, *J* = 7.95 Hz, CH₂CH₃); 4.51 (*d*, 2H, *J* = 5.51 Hz, CH₂CH=CH₂); 4.87-4.92 (*m*, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.08-5.11 (*m*, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.85 (*ddt*, 1H, *J* = 5.11, 10.11 e 16.27 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.73 (*s*, 1H, SCH); 7.48 (*dd*, 1H, *J* = 2.09 e 8.22 Hz, CH ar); 7.76-7.79 (*m*, 2H, CH ar).
- RMN ¹³C (150 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): 14.70 (CH₃); 22.87 (CH₂); 23.22 (CH₂); 24.98 (CH₂); 26.29 (CH₂); 48.12 (CH₂CH=CH₂); 59.68 (CH₂CH₃); 101.98 (SCH); 117.41 (CH₂CH=CH₂); 117.57 (CH ar); 125.44 (Cq); 129.64 (Cq); 131.31 (CH ar); 131.35 (CH ar); 131.47 (CH ar); 131.93 (CH ar); 132.80 (CH); 133.26 (Cq ar); 133.97 (Cq); 137.69 (Cq); 155.41 (Cq); 159.04 (Cq); 164.45 (C=O) (Anexo G).

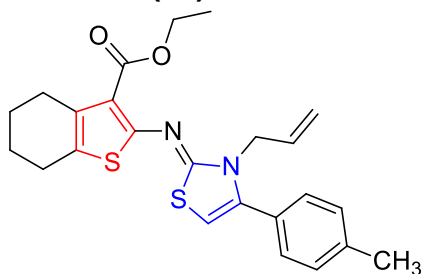
5.3.4.4(Z)-etil2-((3-alil-4-(4-hidroxifenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**1d**)



- Sólido amarelo; MM: 440,1228 g/mol; Rendimento: 90%; PF: 240-242°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).

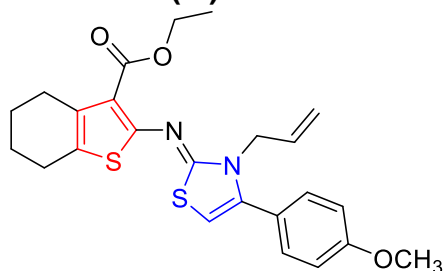
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.20 (t, 3H, J = 7.33 Hz, CH_3); 1.70-1.77 (m, 4H, CH_2); 2.64 (q, 4H, J = 7.79 Hz, CH_2); 4.13 (q, 2H, CH_2CH_3); 4.46 (d, 2H, J = 5.55 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 4.85-4.90 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.06-5.09 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.85 (ddt, 1H, J = 5.31, 10.37 e 17.61 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 6.44 (s, 1H, SCH); 6.84-6.86 (m, 2H, CH ar); 7.24-7.27 (m, 2H, CH ar); 9.85 (s, 1H, OH).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 14.68 (CH_3); 22.80 (CH_2); 23.24 (CH_2); 24.99 (CH_2); 26.31 (CH_2); 47.99 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 59.60 (CH_2CH_3); 98.30 (SCH); 115.87 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 117.19 (Cq); 117.26 (CH ar); 121.50 (Cq); 125.05 (CH ar); 130.91 (CH ar); 133.31 (CH ar); 133.88 (Cq ar); 140.47 (Cq); 155.84 (Cq); 158.92 (Cq); 159.24 (Cq); 164.10 (C=O) (Anexo H).

5.3.4.5(Z)-etil2-((3-alil-4-(4-metilenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**1e**)



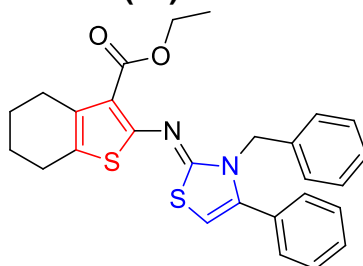
- Sólido amarelo; MM: 438,1436 g/mol; Rendimento: 90%; PF: 235-238°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.20 (t, 3H, J = 7.33 Hz, CH_2CH_3); 1.70-1.77 (m, 4H, CH_2); 2.36 (s, 3H, CH_3); 2.62-2.66 (m, 4H, CH_2); 4.14 (q, 2H, J = 7.05 Hz, CH_2CH_3); 4.48 (d, 2H, J = 6.64 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 4.84-4.89 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.06-5.09 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.84 (ddt, 1H, J = 5.06, 11.37 e 17.01 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 6.52 (s, 1H, SCH); 7.30 (d, 2H, J = 8.47 Hz, CH ar); 7.35 (d, 2H, J =8.19 Hz, CH ar).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 14.67 (CH_3); 21.33 (CH_2); 22.75 (CH_3); 23.19 (CH_2); 24.98 (CH_2); 26.29 (CH_2); 48.11 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 59.74 (CH_2CH_3); 99.75 (SCH); 117.32 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 117.93 (CH ar); 125.90 (Cq); 127.97 (CH ar); 129.36 (Cq); 129.74 (CH ar); 133.05 (Cq ar); 134.00 (CH); 139.65 (Cq); 140.40 (Cq); 154.73 (Cq); 160.05 (Cq); 163.92 (C=O) (Anexo I).

5.3.4.5(Z)-etil2-((3-alil-4-(4-metóxiifenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**1f**)



- Sólido amarelo; MM: 454,1385 g/mol; Rendimento: 90%; PF: 212-215°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.20 (*t*, 3H, *J*= 7.21 Hz, CH₂CH₃); 1.70-1.77 (*m*, 4H, CH₂); 2.62-2.66 (*m*, 4H, CH₂); 3.81 (*s*, 3H, CH₃); 4.13 (*q*, 2H, *J*= 7.44 Hz, CH₂CH₃); 4.47 (*d*, 2H, *J*= 6.38 Hz, CH₂CH=CH₂); 4.85-4.90 (*m*, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.06-5.09 (*m*, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.84 (*ddt*, 1H, *J*= 5.10, 11.43 e 15.71 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.49 (*s*, 1H, SCH); 7.02-7.06 (*m*, 2H, CH ar); 7.37-7.41 (*m*, 2H, CH ar).
- RMN ¹³C (150 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): 14.69 (CH₃); 22.08 (CH₂); 23.24 (CH₂); 24.99 (CH₂); 26.31 (CH₂); 47.99 (CH₃); 55.75 (CH₂CH=CH₂); 59.61 (CH₂CH₃); 99.78 (SCH); 114.58 (CH₂CH=CH₂); 117.24 (CH ar); 117.27 (Cq); 123.17 (CH ar); 125.12 (Cq); 130.90 (CH ar); 133.28 (Cq ar); 133.90 (CH); 140.06 (Cq); 155.78 (Cq); 159.23 (Cq); 160.52 (Cq); 164.08 (C=O) (Anexo J).

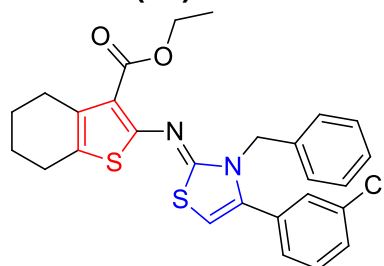
5.3.4.6(Z)-etil2-((3-benzil-4-feniltiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**2a**)



- Sólido amarelo; MM: 474,1436 g/mol; Rendimento: 85%; PF: 278-280°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.09 (*t*, 3H, *J*= 7.41 Hz, CH₂CH₃); 1.70-1.77 (*m*, 4H, CH₂); 2.64 (*t*, 4H, *J*= 5.13 Hz, CH₂); 4.05 (*q*, 2H, *J*= 6.84 Hz, CH₂CH₃); 5.19 (*s*, 2H, NCH₂); 6.62 (*s*, 1H, SCH); 6.94-6.96 (*m*, 2H, CH ar); 7.18-7.23 (*m*, 3H, CH ar); 7.32-7.35 (*m*, 2H, CH ar); 7.40-7.49 (*m*, 3H, CH ar).

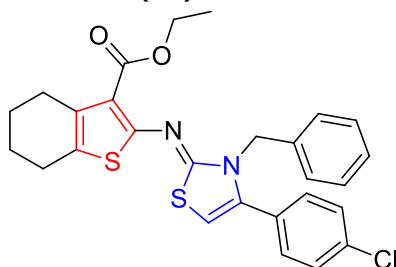
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 14.59 (CH₃); 22.80 (CH₂); 23.25 (CH₂); 25.00 (CH₂); 26.28 (CH₂); 48.68 (NCH₂); 59.62 (CH₂CH₃); 99.91 (SCH); 117.56 (CH ar); 125.39 (Cq); 127.31 (Cq); 127.66 (CH ar); 128.72 (CH ar); 129.11 (CH ar); 129.48 (CH ar); 129.90 (CH ar); 131.05 (CH ar); 133.95 (CH ar); 137.35 (Cq); 140.21 (Cq); 155.26 (Cq); 159.73 (Cq); 164.10 (C=O) (Anexo K).

5.3.4.7(Z)-etil-2-((3-benzil-4-(3-clorofenil)thiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**2b**)



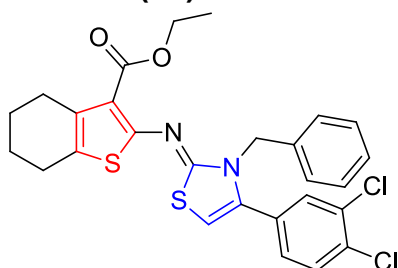
- Sólido amarelo; MM: 508,1046 g/mol; Rendimento: 80%; PF: 265-267°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.07 (*t*, 3H, J = 7.12 Hz, CH₂CH₃); 1.68-1.78 (*m*, 4H, CH₂); 2.63 (*t*, 4H, J = 5.64 Hz, CH₂); 4.04 (*q*, 2H, J = 7.25 Hz, CH₂CH₃); 5.18 (*s*, 2H, NCH₂); 6.70 (*s*, 1H, SCH); 6.96 (*d*, 2H, J = 6.58 Hz CH ar); 7.18-7.23 (*m*, 3H, CH ar); 7.29 (*d*, 1H, J = 7.52 CH ar); 7.34-7.35 (*m*, 1H, CH ar); 7.43 (*t*, 1H, J = 7.71 Hz); 7.51-7.52 (*m*, 1H, CH ar).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 14.58 (CH₃); 22.78 (CH₂); 23.23 (CH₂); 24.99 (CH₂); 26.28 (CH₂); 48.81 (NCH₂); 59.65 (CH₂CH₃); 101.01 (SCH); 117.67 (CH ar); 125.52 (Cq); 127.26 (Cq); 127.74 (CH ar); 128.18 (CH ar); 128.81 (CH ar); 129.23 (CH ar); 129.84 (CH ar); 130.94 (CH ar); 132.91 (CH ar); 133.70 (CH ar); 133.99 (CH ar); 137.27 (Cq); 138.66 (Cq); 155.12 (Cq); 159.66 (Cq); 164.07 (C=O) (Anexo L).

5.3.4.8(Z)-etil-2-((3-benzil-4-(4-clorofenil)thiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**2c**)



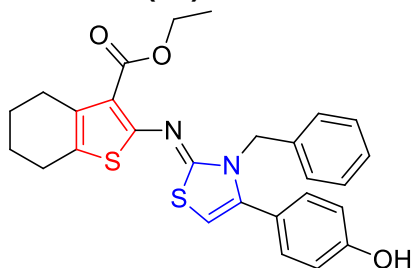
- Sólido amarelo; MM: 508,1046 g/mol; Rendimento: 81%; PF: 281-284°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.08 (*t*, 3H, J = 7.08 Hz, CH_2CH_3); 1.70-1.77 (*m*, 4H, CH_2); 2.64 (*t*, 4H, J = 6.30 Hz, CH_2); 4.05 (*q*, 2H, J = 7.35 Hz, CH_2CH_3); 5.19 (*s*, 2H, NCH_2); 6.68 (*s*, 1H, SCH); 6.95-6.98 (*m*, 2H, CH ar); 7.17-7.24 (*m*, 3H, CH ar); 7.34-7.36 (*m*, 2H, CH ar); 7.4-7.49 (*m*, 2H, CH ar).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 14.59 (CH_3); 22.78 (CH_2); 23.23 (CH_2); 24.99 (CH_2); 26.28 (CH_2); 48.64 (NCH_2); 59.63 (CH_2CH_3); 100.63 (SCH); 117.60 (CH ar); 125.46 (Cq); 127.24 (Cq); 127.72 (CH ar); 128.81 (CH ar); 129.17 (CH ar); 129.86 (CH ar); 131.27 (CH ar); 133.96 (CH ar); 134.73 (CH ar); 137.23 (Cq); 138.94 (Cq); 155.11 (Cq); 159.62 (Cq); 164.06 (C=O) (Anexo M).

5.3.4.9(Z)-etil-2-((3-benzil-4-(3,4-diclorofenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**2d**)



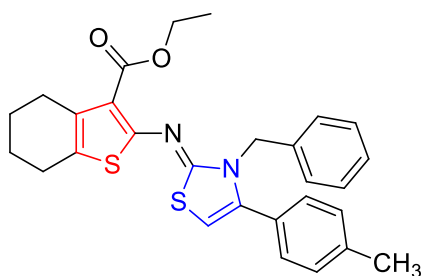
- Sólido amarelo; MM: 542,0646 g/mol; Rendimento: 78%; PF: 274-276 °C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.08 (*t*, 3H, J = 6.63 Hz, CH_2CH_3); 1.71-1.77 (*m*, 4H, CH_2); 2.64 (*t*, 4H, J = 6.63 Hz, CH_2); 4.06 (*q*, 2H, J = 7.33 Hz, CH_2CH_3); 5.19 (*s*, 2H, NCH_2); 6.75 (*s*, 1H, SCH); 6.99 (*d*, 2H, J = 7.19 Hz CH ar); 7.20-7.27 (*m*, 3H, CH ar); 7.32 (*dd*, 1H, J = 2.16 e 8.11 Hz, CH ar); 7.55 (*d*, 1H, J = 1.76 Hz, CH ar); 7.67 (*d*, 1H, J = 8.52 Hz).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 14.59 (CH_3); 22.77 (CH_2); 23.23 (CH_2); 24.99 (CH_2); 26.28 (CH_2); 48.82 (NCH_2); 59.67 (CH_2CH_3); 101.58 (SCH); 117.70 (CH ar); 125.57 (Cq); 127.24 (Cq); 127.79 (CH ar); 128.88 (CH ar); 129.66 (CH ar); 131.25 (CH ar); 131.34 (CH ar); 133.43 (CH ar); 134.82 (CH ar); 132.74 (CH ar); 134.00 (CH ar); 137.24 (Cq); 137.69 (Cq); 155.02 (Cq); 159.57 (Cq); 164.04 (C=O) (Anexo N).

5.3.4.10 (Z)-etil-2-((3-benzil-4-(3,4-diclorofenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**2e**)



- Sólido amarelo; MM: 490,1385 g/mol; Rendimento: 75%; PF: 294-296 °C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.08 (*t*, 3H, *J*= 7.71 Hz, CH₂CH₃); 1.69-1.76 (*m*, 4H, CH₂); 2.61-2.64 (*m*, 4H, CH₂); 4.04 (*q*, 2H, *J*= 6.81 Hz, CH₂CH₃); 5.15 (*s*, 2H, NCH₂); 6.47 (*s*, 1H, SCH); 6.76-6.78 (*m*, 2H, CH ar); 6.96-6.99 (*m*, 2H, CH ar); 6.98 (*dd*, 2H, *J*= 2.13 e 7.91 Hz, CH ar); 7.10-7.13 (*m*, 2H, CH ar); 7.18-7.23 (*m*, 3H, CH ar); 9.83 (*sl*, 1H, OH).
- RMN ¹³C (150 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 14.59 (CH₃); 22.80 (CH₂); 23.24 (CH₂); 24.99 (CH₂); 26.28 (CH₂); 48.59 (NCH₂); 59.59 (CH₂CH₃); 98.77 (SCH); 115.84 (CH ar); 117.36 (Cq); 121.50 (Cq); 125.17 (CH ar); 127.34 (CH ar); 129.62 (CH ar); 128.71 (CH ar); 130.97 (CH ar); 133.90 (CH ar); 137.50 (CH ar); 140.47 (Cq); 155.28 (Cq); 158.86 Cq); 159.63 (Cq); 164.13 (C=O) (Anexo O).

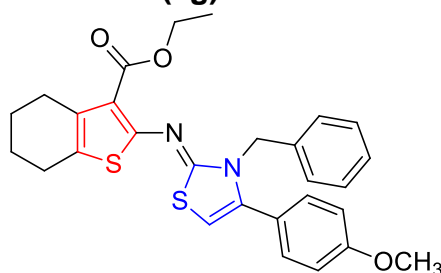
5.3.4.11 (Z)-etil-2-((3-benzil-4-(4-metilfenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**2f**)



- Sólido amarelo; MM: 488,1592 g/mol; Rendimento: 73%; PF: 298-300 °C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.08 (*t*, 3H, *J*= 6.24 Hz, CH₂CH₃); 1.70-1.77 (*m*, 4H, CH₂); 2.33 (*s*, 3H, CH₃); 2.63 (*t*, 4H, *J*= 5.39 Hz, CH₂); 4.04 (*q*, 2H, *J*= 6.81 Hz, CH₂CH₃); 5.17 (*s*, 2H, NCH₂); 6.56 (*s*, 1H, SCH); 6.97-6.99 (*m*, 2H, CH ar); 7.20-7.24 (*m*, 7H, CH ar).

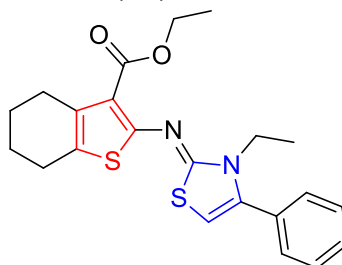
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 14.59 (CH₃); 21.30 (CH₂); 22.79 (CH₃); 23.23 (CH₂); 24.99 (CH₂); 26.28 (CH₂); 48.65 (NCH₂); 59.60 (CH₂CH₃); 99.55 (SCH); 117.46 (Cq); 125.29 (Cq); 127.24 (CH ar); 127.63 (CH ar). 128.15 (CH ar); 128.75 (CH ar); 129.35 (CH ar); 129.68 (CH ar); 133.92 (CH ar); 137.41 (CH ar); 139.54 (CH ar); 140.27 (Cq); 155.25 Cq); 159.65 (Cq); 164.10 (C=O) (Anexo P).

5.3.4.12(Z)-etil-2-((3-benzil-4-(4-metóxi-fenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**2g**)



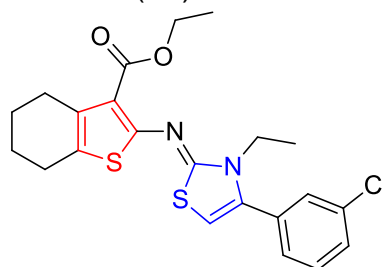
- Sólido amarelo; MM: 504,1541 g/mol; Rendimento: 75%; PF: 294-296 °C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.08 (*t*, 3H, J = 7.46 Hz, CH₂CH₃); 1.70-1.77 (*m*, 4H, CH₂); 2.62-2.65 (*m*, 4H, CH₂); 3.78 (*s*, 3H, OCH₃); 4.05 (*q*, 2H, J = 6.99 Hz, CH₂CH₃); 5.17 (*s*, 2H, NCH₂); 6.53 (*s*, 1H, SCH); 6.95-6.99 (*m*, 4H, CH ar); 7.17-7.27 (*m*, 5H, CH ar).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 14.59 (CH₃); 22.79 (CH₂); 23.24 (CH₂); 24.99 (CH₂); 26.28 (CH₂); 48.59 (NCH₂); 55.74 (OCH₃); 59.59 (CH₂CH₃); 99.23 (SCH); 114.54 (CH ar); 117.42 (Cq); 123.16 (Cq); 125.23 (CH ar); 127.26 (CH ar); 127.64 (CH ar); 128.75 (CH ar); 130.93 (CH ar); 133.91 (CH ar); 137.44 (CH ar); 140.07 (Cq); 155.26 (Cq); 159.59 Cq); 160.48 (Cq); 164.11 (C=O) (Anexo Q).

5.3.4.13(Z)-etil-2-(3-etil-fenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**3a**)



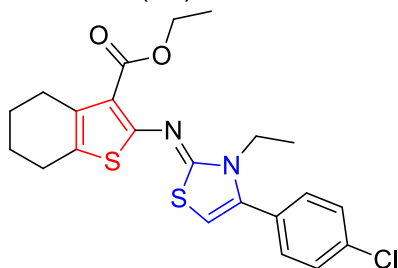
- Sólido amarelo; MM: 412,1279 g/mol; Rendimento: 87%; PF: 232-235°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.12 (*t*, 3H, J = 7.15 Hz, NCH₂CH₃); 1.20 (*t*, 3H, J = 7.15 Hz, OCH₂CH₃); 1.69-1.79 (*m*, 4H, CH₂); 2.62-2.66 (*m*, 4H, CH₂); 3.85 (*q*, 2H, J = 6.84 Hz, NCH₂CH₃); 4.14 (*q*, 2H, J = 6.84 Hz, OCH₂); 6.54 (*s*, 1H, SCH); 7.49-7.51 (*m*, 2H, CH ar); 7.52-7.54 (*m*, 3H, CH ar).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 13.74 (NCH₂CH₃); 14.68 (OCH₂CH₃); 22.80 (CH₂); 23.23 (CH₂); 24.98 (CH₂); 26.34 (CH₂); 41.14 (NCH₂); 59.64 (OCH₂); 99.41 (SCH); 117.12 (Cq); 129.09 (Cq); 129.35 (CH ar); 129.50 (CH ar); 129.96 (CH ar); 131.24 (Cq ar); 133.95 (Cq); 140.10 (Cq); 156.30 (Cq); 159.35 (Cq); 164.06 (C=O) (Anexo R).

5.3.4.14(Z)-etil-2-((4-(3-clorofenil)-3etiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**3b**)



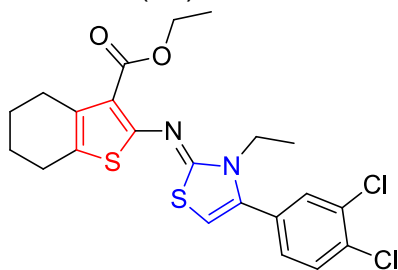
- Sólido amarelo pálido; MM: 446,0889 g/mol; Rendimento: 75%; PF: 241-243°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.12 (*t*, 3H, J = 7.15 Hz, NCH₂CH₃); 1.20 (*t*, 3H, J = 7.15 Hz, OCH₂CH₃); 1.70-1.78 (*m*, 4H, CH₂); 2.62-2.66 (*m*, 4H, CH₂); 3.86 (*q*, 2H, J = 6.93 Hz, NCH₂CH₃); 4.14 (*q*, 2H, J = 6.93 Hz, OCH₂); 6.64 (*s*, 1H, SCH); 7.48-7.49 (*m*, 1H, CH ar); 7.54-7.57 (*m*, 1H, CH ar); 7.59-7.61 (*m*, 2H, CH ar).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 13.73 (NCH₂CH₃); 14.70 (OCH₂CH₃); 22.78 (CH₂); 23.21 (CH₂); 24.97 (CH₂); 26.33 (CH₂); 41.22 (NCH₂); 59.68 (OCH₂); 100.55 (SCH); 117.31 (Cq); 125.26 (Cq); 128.25 (Cq); 129.30 (CH ar); 129.97 (CH ar); 131.20 (CH ar); 133.14 (CH ar); 133.95 (Cq ar); 133.97 (Cq); 138.53 (Cq); 155.97 (Cq); 159.20 (Cq); 164.03 (C=O) (Anexo S).

5.3.4.15(Z)-etil-2-((4-(4-clorofenil)-3etiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**3c**)



- Sólido amarelo pálido; MM: 446,0889 g/mol; Rendimento: 82%; PF: 289-291°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.12 (*t*, 3H, J = 7.03 Hz, NCH₂CH₃); 1.20 (*t*, 3H, J = 7.03 Hz, OCH₂CH₃); 1.70-1.78 (*m*, 4H, CH₂); 2.62-2.66 (*m*, 4H, CH₂); 3.84 (*q*, 2H, J = 6.86 Hz, NCH₂CH₃); 4.14 (*q*, 2H, J = 6.86 Hz; OCH₂); 6.58 (*s*, 1H, SCH); 7.52-7.54 (*m*, 2H, CH ar); 7.58-7.61 (*m*, 2H, CH ar).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 13.75 (NCH₂CH₃); 14.69 (OCH₂CH₃); 22.79 (CH₂); 23.22 (CH₂); 24.97 (CH₂); 26.34 (CH₂); 41.16 (NCH₂); 59.66 (OCH₂); 100.04 (SCH); 117.19 (Cq); 125.17 (Cq); 129.42 (Cq); 130.04 (CH ar); 131.37 (CH ar); 133.96 (Cq ar); 134.80 (Cq); 138.83 (Cq); 156.18 (Cq); 159.23 (Cq); 164.04 (C=O) (Anexo T).

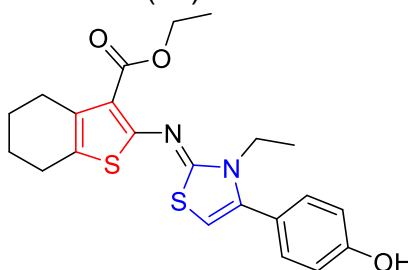
5.3.4.16(Z)-etil-2-((4-(3,4-diclorofenil)-3etiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**3d**)



- Sólido amarelo claro; MM: 480,0500 g/mol; Rendimento: 89%; PF: 222-225°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.11 (*t*, 3H, J = 7.30 Hz, NCH₂CH₃); 1.18-1.21 (*m*, 3H, OCH₂CH₃); 1.68-1.78 (*m*, 4H, CH₂); 2.61-2.65 (*m*, 4H, CH₂); 3.85 (*q*, 2H, J = 7.09 Hz, NCH₂CH₃); 4.13 (*q*, 2H, J = 6.77 Hz; OCH₂); 6.67 (*s*, 1H, SCH); 7.50-7.55 (*m*, 1H, CH ar); 7.79 (*d*, 1H, J = 8.38 Hz; CH ar); 7.38-7.86 (*m*, 1H, CH ar).

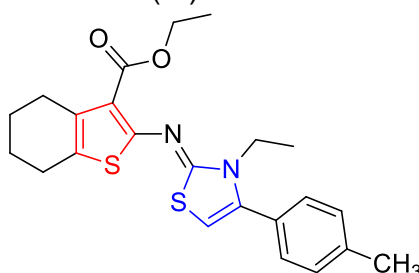
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 13.73 (NCH $_2$ CH $_3$); 14.70 (OCH $_2$ CH $_3$); 22.78 (CH $_2$); 23.21 (CH $_2$); 24.98 (CH $_2$); 26.32 (CH $_2$); 41.27 (NCH $_2$); 59.69 (OCH $_2$); 101.12 (SCH); 117.54 (Cq); 125.43 (Cq); 129.76 (Cq); 131.48 (CH ar); 131.63 (CH ar); 132.12 (CH ar); 132.91 (CH ar); 133.99 (Cq ar); 137.58 (Cq); 155.71 (Cq); 159.24 (Cq); 163.77 (Cq); 164.00 (C=O) (Anexo U).

5.3.4.17(Z)-etil-2-((4-(4-hidroxifenil)-3etiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**3e**)



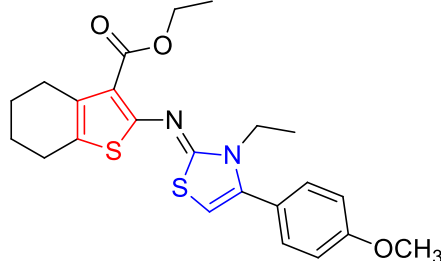
- Sólido amarelo claro; MM: 428,1228 g/mol; Rendimento: 71%; PF: 297-299°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.11 (*t*, 3H, J = 6.53 Hz, NCH $_2$ CH $_3$); 1.19 (*t*, 3H, J = 7.07 Hz, OCH $_2$ CH $_3$); 1.68-1.78 (*m*, 4H, CH $_2$); 2.61-2.65 (*m*, 4H, CH $_2$); 3.83 (*q*, 2H, J = 7.11 Hz, NCH $_2$ CH $_3$); 4.13 (*q*, 2H, J = 7.11 Hz, OCH $_2$); 6.38 (*s*, 1H, SCH); 6.86-6.88 (*m*, 2H, CH ar); 7.26-7.28 (*m*, 2H, CH ar); 9.87 (*s*, 1H, OH).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 13.74 (NCH $_2$ CH $_3$); 14.68 (OCH $_2$ CH $_3$); 22.82 (CH $_2$); 23.25 (CH $_2$); 24.99 (CH $_2$); 26.33 (CH $_2$); 41.03 (NCH $_2$); 59.57 (OCH $_2$); 98.24 (SCH); 116.04 (Cq); 117.04 (Cq); 121.70 (Cq); 124.90 (CH ar); 130.92 (CH ar); 133.90 (Cq ar); 140.38 (Cq); 156.42 (Cq); 158.91 (Cq); 159.32 (Cq); 164.11 (C=O) (Anexo V).

5.3.4.18(Z)-etil-2-((4-(4-metilfenil)-3etiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**3f**)



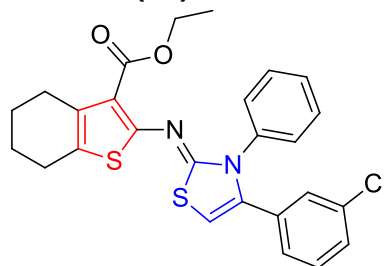
- Sólido amarelo pálido; MM: 426,1436 g/mol; Rendimento: 70%; PF: 214-216°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.11 (*t*, 3H, J = 6.97 Hz, NCH₂CH₃); 1.20 (*t*, 3H, J = 6.97 Hz, OCH₂CH₃); 1.70-1.77 (*m*, 4H, CH₂); 2.38 (*s*, 4H, CH₃); 2.62-2.66 (*m*, 4H, CH₂); 3.84 (*q*, 2H, J = 6.97 Hz, NCH₂CH₃); 4.14 (*q*, 2H, J = 6.97 Hz; OCH₂); 6.49 (*s*, 1H, SCH); 7.35 (*dd*, 4H, J = 8.04 e 18.75 Hz, CH ar).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 13.77 (NCH₂CH₃); 14.69 (OCH₂CH₃); 21.35 (CH₃); 22.80 (CH₂); 23.22 (CH₂); 24.98 (CH₂); 26.35 (CH₂); 41.09 (NCH₂); 59.63 (OCH₂); 99.03 (SCH); 117.05 (Cq); 125.01 (Cq); 128.35 (Cq); 129.40 (CH ar); 129.89 (CH ar); 133.93 (Cq ar); 139.59 (Cq); 140.13 (Cq); 156.33 (Cq); 159.33 (Cq); 164.07 (C=O) (Anexo X).

5.3.4.19(Z)-etil-2-((4-(4-metoxifenil)-3etiltiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**3g**)



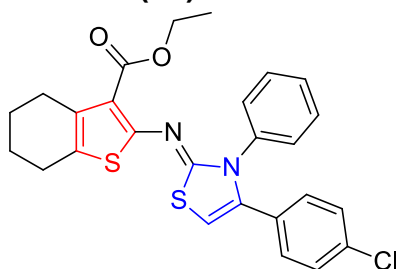
- Sólido branco; MM: 442,1385 g/mol; Rendimento: 72%; PF: 221-223°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.12 (*t*, 3H, J = 7.13 Hz, NCH₂CH₃); 1.20 (*t*, 3H, J = 7.13 Hz, OCH₂CH₃); 1.70-1.79 (*m*, 4H, CH₂); 2.62-2.66 (*m*, 4H, CH₂); 3.82 (*s*, 3H, OCH₃); 3.84-3.86 (*m*, 2H, NCH₂CH₃); 4.14 (*q*, 2H, J = 6.96 Hz; OCH₂CH₃); 6.45 (*s*, 1H, SCH); 7.06-7.08 (*m*, 2H, CH ar); 7.40-7.43 (*m*, 2H, CH ar).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 13.75 (NCH₂CH₃); 14.69 (OCH₂CH₃); 22.82 (CH₂); 23.24 (CH₂); 24.99 (CH₂); 26.34 (CH₂); 41.07 (NCH₂); 55.76 (OCH₃); 59.60 (OCH₂); 98.74 (SCH); 114.73 (Cq); 117.08 (Cq); 123.34 (Cq); 124.97 (CH ar); 130.95 (CH ar); 133.91 (Cq ar); 139.96 (Cq); 156.32 (Cq); 159.29 (Cq Ar); 160.51 (Cq); 164.09 (C=O) (Anexo Z).

5.3.4.20(Z)-etil-2-((4-(3-clorofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilidene)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**4a**)



- Sólido branco; MM: 494,0889 g/mol; Rendimento: 87%; PF: 245-247°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.08 (*t*, 3H, *J*= 7.16 Hz, CH₂CH₃); 1.67-1.76 (*m*, 4H, CH₂); 2.59-2.61 (*m*, 4H, CH₂); 4.03 (*q*, 2H, *J*= 7.16 Hz, CH₂CH₃); 6.85 (*s*, 1H, SCH); 7.05-7.07 (*m*, 1H, CH ar); 7.24-7.29 (*m*, 4H, CH ar); 7.32-7.35 (*m*, 2H, CH ar); 7.38-7.41 (*m*, 2H, CH ar).
- RMN ¹³C (150 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): 14.59 (CH₃); 22.67 (CH₂); 23.14 (CH₂); 24.86 (CH₂); 26.16 (CH₂); 59.71 (CH₂CH₃); 101.58 (SCH); 117.43 (Cq); 126.14 (Cq); 127.52 (Cq); 128.57 (CH ar); 128.58 (CH ar); 128.62 (CH ar); 129.00 (CH ar); 129.32 (CH ar); 130.53 (CH ar); 133.08 (CH ar); 133.36 (CH ar); 134.04 (Cq); 137.49 (Cq); 138.05 (Cq); 156.67 (Cq); 160.91 (Cq); 163.74 (C=O) (Anexo I).

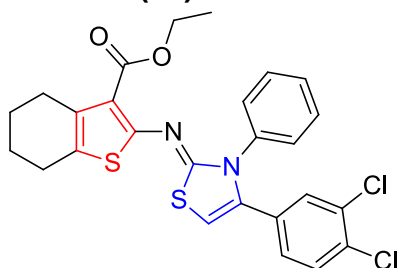
5.3.4.21(Z)-etil-2-((4-(4-clorofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilidene)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**4b**)



- Sólido branco; MM: 494,0889 g/mol; Rendimento: 79%; PF: 254-257°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.08 (*t*, 3H, *J*= 7.16 Hz, CH₂CH₃); 1.67-1.76 (*m*, 4H, CH₂); 2.60 (*sl*, 4H, CH₂); 4.03 (*q*, 2H, *J*= 7.16 Hz, CH₂CH₃); 6.77 (*s*, 1H, SCH); 7.16 (*d*, 2H, *J*= 8.55 Hz, CH ar); 7.26 (*d*, 2H, *J*= 7.33 Hz, CH ar); 7.31-7.34 (*m*, 3H, CH ar); 7.37-7.40 (*m*, 2H, CH ar).

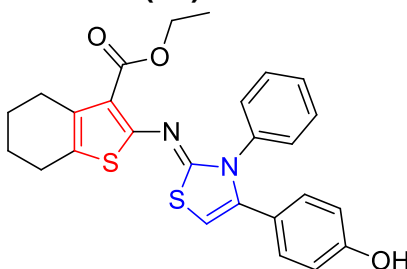
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 14.58 (CH_3); 22.68 (CH_2); 23.16 (CH_2); 24.87 (CH_2); 26.16 (CH_2); 59.69 (CH_2CH_3); 100.99 (SCH); 117.44 (Cq); 126.12 (Cq); 128.50 (Cq); 128.82 (CH ar); 129.29 (CH ar); 129.31 (CH ar); 130.06 (CH ar); 130.64 (CH ar); 133.87 (Cq); 134.03 (Cq); 137.53 (Cq); 138.40 (Cq); 156.74 (Cq); 160.99 (Cq); 163.74 (C=O) (Anexo II).

5.3.4.22(Z)-etil-2-((4-(3,4-diclorofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilidene)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**4c**)



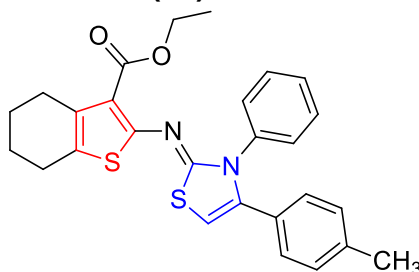
- Sólido branco; MM: 528,0500 g/mol; Rendimento: 87%; PF: 288-290°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.07 (*t*, 3H, J = 7.22 Hz, CH_2CH_3); 1.66-1.76 (*m*, 4H, CH_2); 2.60 (*t*, 4H, J = 5.84 Hz, CH_2); 4.02 (*q*, 2H, J = 7.01 Hz, CH_2CH_3); 6.89 (*s*, 1H, SCH); 7.06 (*dd*, 1H, J = 2.14 e 8.45 Hz, CH ar); 7.28-7.30 (*m*, 2H, CH ar); 7.32-7.35 (*m*, 1H, CH ar); 7.39-7.42 (*m*, 2H, CH ar); 7.44 (*d*, 1H, J = 2.05 Hz, CH ar); 7.05 (*d*, 1H, J = 8.55 Hz, CH ar).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 14.59 (CH_3); 22.67 (CH_2); 23.15 (CH_2); 24.86 (CH_2); 26.15 (CH_2); 59.71 (CH_2CH_3); 102.16 (SCH); 117.58 (Cq); 126.19 (Cq); 128.67 (Cq); 128.96 (CH ar); 129.33 (CH ar); 129.38 (CH ar); 130.74 (CH ar); 130.84 (CH ar); 131.51 (CH ar); 131.60 (CH ar); 131.82 (CH ar); 134.04 (Cq); 137.06 (Cq); 137.36 (Cq); 156.47 (Cq); 160.71 (Cq); 163.74 (C=O) (Anexo III).

5.3.4.23(Z)-etil-2-((4-(4-hidroxifenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilidene)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**4d**)



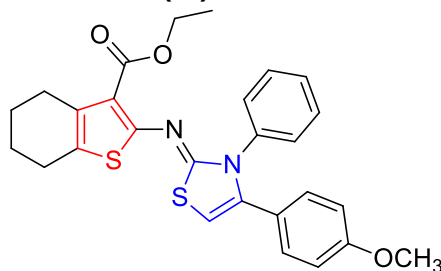
- Sólido branco; MM: 476,1218 g/mol g/mol; Rendimento: 79%; PF: 298-301°C; RF: 0,4 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.08 (*t*, 3H, *J*= 7.52 Hz, CH₂CH₃); 1.66-1.75 (*m*, 4H,CH₂); 2.59 (*q*, 4H, *J*= 5.49 Hz, CH₂); 4.02 (*q*, 2H, *J*= 7.18 Hz, CH₂CH₃); 6.52 (*s*, 1H, SCH); 6.59 (*d*, 2H, *J*= 8.70 Hz, CH ar); 6.92 (*d*, 2H, *J*= 8.70 Hz, CH ar); 7.21 (*d*, 2H, *J*= 7.46 Hz, CH ar); 7.29 (*t*, 1H, *J*= 7.46 Hz, CH ar); 7.36 (*t*, 2H, *J*= 7.46 Hz, CH ar); 9.68 (*s*, 1H, OH).
- RMN ¹³C (150 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): 14.57 (CH₃); 22.70 (CH₂); 23.16 (CH₂); 24.86 (CH₂); 26.17 (CH₂); 59.65 (CH₂CH₃); 98.43 (SCH); 115.53 (Cq); 117.17 (Cq); 121.87 (Cq); 125.87 (CH ar); 128.25 (CH ar); 129.12 (CH ar); 129.39 (CH ar); 130.34 (CH ar); 133.98 (Cq); 137.89 (Cq); 139.92 (Cq); 157.11 (Cq); 158.15 (Cq); 161.30 (Cq); 163.80 (C=O) (Anexo IV).

5.3.4.24(Z)-etil-2-((4-(4-metilfenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilidene)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**4e**)



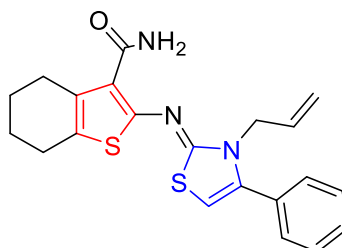
- Sólido branco; MM: 474,1436 g/mol; Rendimento: 71%; PF: 212-215°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.09 (*t*, 3H, *J*= 7.12 Hz, CH₂CH₃); 1.67-1.76 (*m*, 4H,CH₂); 2.22 (*s*, 3H, CH₃); 2.59-2.62 (*m*, 4H, CH₂); 4.03 (*q*, 2H, *J*= 7.12 Hz, CH₂CH₃); 6.64 (*s*, 1H, SCH); 7.03 (*dd*, 4H, *J*= 8.00 e 11.56 Hz, CH ar); 7.22-7.25 (*m*, 2H, CH ar); 7.29-7.31 (*m*, 1H, CH ar); 7.35-7.38 (*m*, 2H, CH ar).
- RMN ¹³C (150 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): 14.57 (CH₃); 21.15 (CH₂); 22.69 (CH₃); 23.16 (CH₂); 24.86 (CH₂); 26.17 (CH₂); 59.67 (CH₂CH₃); 99.69 (SCH); 117.25 (Cq); 125.98 (Cq); 128.36 (Cq); 128.71 (CH ar); 129.20 (CH ar); 129.20 (CH ar); 129.32 (CH ar); 129.33 (CH ar); 134.01 (Cq); 137.79 (Cq); 138.63 (Cq); 139.69 (Cq); 157.03 (Cq); 161.29 (Cq); 163.77 (C=O) (Anexo V).

5.3.4.25(Z)-etil-2-((4-(4-metoxifenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilidene)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxilato (**4f**)



- Sólido branco; MM: 490,1385 g/mol; Rendimento: 72%; PF: 221-225°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.09 (*t*, 3H, *J*= 7.09 Hz, CH₂CH₃); 1.67-1.76 (*m*, 4H, CH₂); 2.59-2.61 (*m*, 4H, CH₂); 3.69 (*s*, 3H, OCH₃); 4.03 (*q*, 2H, *J*= 7.09 Hz, CH₂CH₃); 6.60 (*s*, 1H, SCH); 6.78-6.81 (*m*, 2H, CH ar); 7.05-7.07 (*m*, 2H, CH ar); 7.23-7.25 (*m*, 2H, CH ar); 7.29-7.32 (*m*, 1H, CH ar); 7.35-7.39 (*m*, 2H, CH ar).
- RMN ¹³C (150 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): 14.10 (CH₃); 22.21 (CH₂); 22.68 (CH₂); 24.38 (CH₂); 25.71 (CH₂); 55.12 (OCH₃); 59.20 (CH₂CH₃); 98.60 (SCH); 113.70 (Cq); 116.70 (Cq); 122.99 (Cq); 125.46 (CH ar); 127.89 (CH ar); 128.73 (CH ar); 128.91 (CH ar); 129.81 (CH ar); 133.53 (Cq); 137.32 (Cq); 139.01 (Cq); 156.60 (Cq); 159.31 (Cq); 160.82 (Cq); 163.31 (C=O) (Anexo VI).

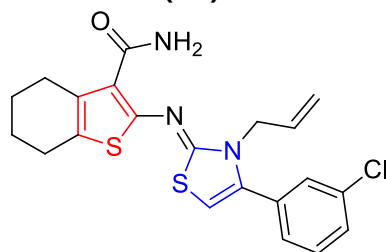
5.3.4.26(Z)-2-((3-álil-4-feniltiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxamida (**5a**)



- Sólido amarelo claro; MM: 395,1126 g/mol; Rendimento: 68%; PF: 186-188°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.67-1.78 (*m*, 4H, CH₂); 2.66 (*t*, 2H, *J*= 6.12 Hz, CH₂); 2.81 (*t*, 2H, *J*= 6.12 Hz, CH₂); 4.42-4.44 (*m*, 2H, CH₂CH=CH₂); 4.91-4.94 (*m*, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.15-5.18 (*m*, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.84 (*ddt*, 1H, *J*= 5.13, 11.70 e 15.86 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.78 (*s*, 1H, SCH); 7.06-7.07 (*m*, 1H, NH); 7.48-7.53 (*m*, 5H, CH ar); 8.11-8.12 (*m*, 1H, NH).

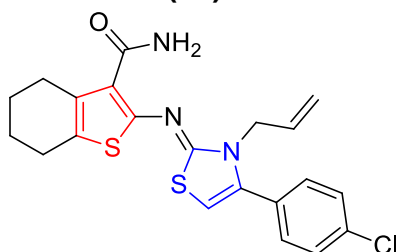
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 22.97 (CH $_2$); 23.33 (CH $_2$); 25.11 (CH $_2$); 27.24 (CH $_2$); 48.73 (CH $_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 100.44 (SCH); 117.05 (CH $_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 120.76 (Cq); 124.32 (Cq); 129.29 (CH ar); 129.49 (CH ar); 130.17 (CH ar); 133.73 (Cq ar); 132.53 (Cq); 135.50 (Cq); 140.53 (Cq); 150.64 (Cq); 158.70 (Cq); 166.00 (C=O) (Anexo VII).

5.3.4.27(Z)-2-((3-allyl-4-(3-clorofenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxamida (**5b**)



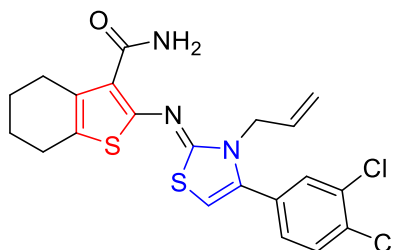
- Sólido amarelo escuro; MM: 429,0706 g/mol; Rendimento: 58%; PF: 88-90°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.67-1.77 (*m*, 4H, CH $_2$); 2.66 (*t*, 2H, *J*= 6.14 Hz, CH $_2$); 2.80 (*t*, 2H, *J*= 6.14 Hz, CH $_2$); 4.42-4.44 (*m*, 2H, CH $_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 4.92-4.96 (*m*, 1H, CH $_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.16-5.19 (*m*, 1H, CH $_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.85 (*ddt*, 1H, *J*= 5.19, 10.38 e 14.23 Hz, CH $_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 6.87 (*s*, 1H, SCH); 7.09 (*sl*, 1H, NH); 7.46-7.48 (*m*, 1H, CH ar); 7.53-7.56 (*m*, 1H, CH ar); 7.59-7.61 (*m*, 2H, CH ar); 8.07 (*sl*, 1H, NH).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 22.95 (CH $_2$); 23.32 (CH $_2$); 25.10 (CH $_2$); 27.21 (CH $_2$); 48.81 (CH $_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 101.49 (SCH); 117.12 (CH $_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 120.92 (Cq); 124.46 (Cq); 128.20 (CH ar); 129.28 (CH ar); 130.13 (CH ar); 131.14 (Cq ar); 132.53 (Cq); 132.64 (Cq); 133.86 (Cq); 135.52 (CH ar); 138.96 (CH ar); 150.46 (Cq); 158.58 (Cq); 165.96 (C=O) (Anexo VIII).

5.3.4.28(Z)-2-((3-allyl-4-(3-clorofenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxamida (**5c**)



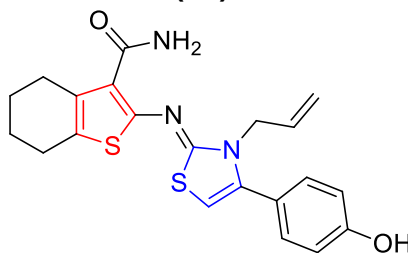
- Sólido marrom claro; MM: 429,0706 g/mol; Rendimento: 58%; PF: 225-227°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.68-1.75 (*m*, 4H, CH₂); 2.65 (*t*, 2H, *J*= 4.77 Hz, CH₂); 2.80 (*t*, 2H, *J*= 4.77 Hz, CH₂); 4.42 (*sl*, 2H, CH₂CH=CH₂); 4.93 (*d*, 1H, *J*= 16.35 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.16 (*d*, 1H, *J*= 10.22 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.84 (*ddt*, 1H, *J*= 5.03, 10.78 e 14.02 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.81 (*s*, 1H, SCH); 7.07 (*sl*, 1H, NH); 7.46-7.48 (*m*, 1H, CH ar); 7.51 (*d*, 2H, *J*= 8.14 Hz, CH ar); 7.59 (*d*, 2H, *J*= 8.14 Hz, CH ar); 8.09 (*sl*, 1H, NH).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 22.96 (CH₂); 23.33 (CH₂); 25.10 (CH₂); 27.22 (CH₂); 48.71 (CH₂CH=CH₂); 101.04 (SCH); 117.09 (CH₂CH=CH₂); 120.87 (Cq); 124.43 (Cq); 129.36 (CH ar); 129.54 (CH ar); 131.34 (Cq ar); 132.49 (Cq ar); 135.05 (Cq); 135.51 (Cq); 139.28 (Cq); 150.51 (Cq); 158.63 (Cq); 165.98 (C=O) (Anexo IX).

5.3.4.29(Z)-2-((3-allyl-4-(3,4-diclorofenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxamida (**5d**)



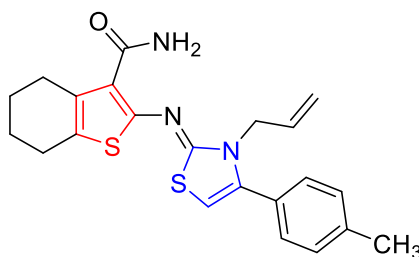
- Sólido marrom claro; MM: 463,0347 g/mol; Rendimento: 61%; PF: 220-223°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.66-1.76 (*m*, 4H, CH₂); 2.64-2.66 (*m*, 2H, CH₂); 2.79-2.81 (*m*, 2H, CH₂); 4.43-4.44 (*m*, 2H, CH₂CH=CH₂); 4.93-4.96 (*m*, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.17 (*d*, *J*= 10.12 Hz, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.83-5.88 (*m*, 1H, CH₂CH=CH₂); 6.89 (*s*, 1H, SCH); 7.09 (*sl*, 1H, NH); 7.49 (*d*, 1H, *J*= 7.57 Hz, CH ar); 7.78-7.80 (*m*, 2H, CH ar); 8.06 (*sl*, 1H, NH).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 22.94 (CH₂); 23.31 (CH₂); 25.09 (CH₂); 27.20 (CH₂); 48.81 (CH₂CH=CH₂); 101.97 (SCH); 117.15 (CH₂CH=CH₂); 120.98 (Cq); 124.54 (Cq); 129.69 (CH ar); 129.70 (CH ar); 131.15 (CH ar); 131.44 (Cq ar); 132.01 (Cq); 132.54 (Cq); 133.08 (Cq); 135.52 (CH ar); 137.99 (CH ar); 150.39 (Cq); 158.54 (Cq); 165.96 (C=O) (Anexo X).

5.3.4.30(Z)-2-((3-allyl-4-(4-hidroxifenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxamida (**5e**)



- Sólido amarelo; MM: 411,1075 g/mol; Rendimento: 90%; PF: 257-260°C; RF: 0,3 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.65-1.81 (*m*, 4H, CH₂); 2.65 (*t*, 2H, CH₂); 2.81 (*t*, 2H, CH₂); 4.43 (*d*, 2H, CH₂CH=CH₂); 4.93 (*d*, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.17 (*d*, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.85 (*ddt*, 1H, CH₂CH=CH₂); 6.82 (*s*, 1H, SCH); 7.09 (*sl*, 1H, NH); 7.83 (*dd*, 2H, CH ar); 7.58 (*dd*, 2H, CH ar); 8.11 (*sl*, 1H, OH).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 22.99 (CH₂); 23.35 (CH₂); 25.13 (CH₂); 27.25 (CH₂); 48.74 (CH₂CH=CH₂); 101.07 (SCH); 117.10 (CH₂CH=CH₂); 129.36 (Cq); 129.59 (CH ar); 131.38 (Cq); 135.05 (CH ar); 135.54 (CH ar); 139.28 (CH ar); 133.88 (Cq ar); 140.47 (Cq); 155.84 (Cq); 150.50 (Cq); 158.60 (Cq); 165.90 (C=O) (Anexo XI).

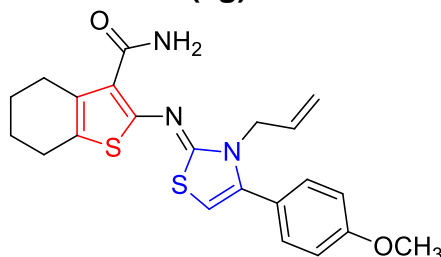
5.3.4.31(Z)-2-((3-allyl-4-(4-hidroxifenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxamida (**5f**)



- Sólido amarelo claro; MM: 409,1283 g/mol; Rendimento: 61%; PF: 233-235°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.68-1.75 (*m*, 4H, CH₂); 2.36 (*s*, 3H, CH₃); 2.64-2.66 (*m*, 2H, CH₂); 2.80-2.82 (*m*, 2H, CH₂); 4.41 (*sl*, 2H, CH₂CH=CH₂); 4.92 (*d*, 1H, *J*= 17.21 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.16 (*d*, 1H, *J*= 10.44 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.83 (*ddt*, 1H, *J*= 5.03, 10.44 e 14.12 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.72 (*s*, 1H, SCH); 7.06 (*sl*, 1H, NH); 7.31 (*d*, 2H, *J*= 7.85 Hz, CH ar); 7.37 (*d*, 2H, *J*= 7.85 Hz, CH ar); 8.13 (*sl*, 1H, NH).

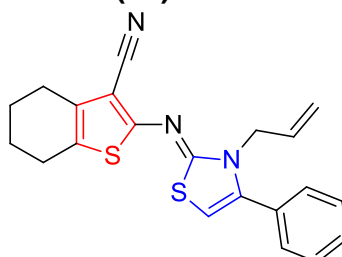
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 21.33 (CH₃); 22.97 (CH₂); 23.33 (CH₂); 25.10 (CH₂); 27.24 (CH₂); 48.69 (CH₂CH=CH₂); 100.07 (SCH); 116.98 (CH₂CH=CH₂); 124.27 (CH ar); 128.86 (Cq); 129.37 (CH ar); 129.83 (Cq); 132.55 (CH ar); 135.48 (Cq ar); 139.86 (CH); 140.59 (Cq); 150.70 (Cq); 156.60 (Cq); 158.73 (Cq); 166.02 (C=O) (Anexo XII).

5.3.4.32(Z)-2-((3-allyl-4-(4-hidroxifenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxamida (**5g**)



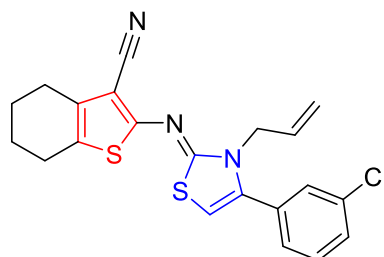
- Sólido marrom escuro; MM: 425,1232 g/mol; Rendimento: 86%; PF: 187-189°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.66-1.76 (*m*, 4H, CH₂); 2.64-2.66 (*m*, 2H, CH₂); 2.80-2.82 (*m*, 2H, CH₂); 3.81 (*s*, 3H, CH₃); 4.41 (*sl*, 2H, CH₂CH=CH₂); 4.92 (*d*, 1H, *J*= 17.27 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.16 (*d*, 1H, *J*= 10.36 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.81-5.86 (*m*, 1H, CH₂CH=CH₂); 6.69 (*s*, 1H, SCH); 7.05 (*d*, 2H, *J*= 5.91 Hz, CH ar); 7.41 (*d*, 2H, *J*= 7.88 Hz, CH ar); 8.15 (*sl*, 1H, NH).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 22.98 (CH₂); 23.33 (CH₂); 25.10 (CH₂); 27.25 (CH₂); 48.71 (CH₂CH=CH₂); 55.79 (OCH₃); 99.75 (SCH); 114.70 (CH₂CH=CH₂); 116.97 (Cq); 120.59 (Cq); 122.80 (CH ar); 124.21 (CH ar); 130.95 (Cq ar); 132.59 (Cq ar); 135.48 (Cq); 140.40 (Cq); 150.75 (Cq); 158.69 (Cq); 160.69 (Cq); 166.04 (C=O) (Anexo XIII).

5.3.4.33(Z)-2-((3-allyl-4-feniltiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (**6a**)



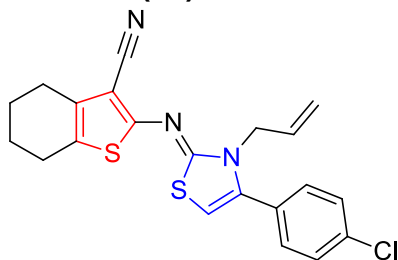
- Sólido amarelo claro; MM: 377,1010 g/mol; Rendimento: 88%; PF: 190-192°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.76-1.81 (*m*, 4H,CH₂); 2.51-2.54 (*m*, 2H, CH₂); 2.66 (*t*, 2H, *J*= 5.40 Hz, CH₂); 4.54 (*d*, 2H, *J*= 5.18 Hz, CH₂CH=CH₂); 4.92 (*dd*, 1H, *J*= 1.33 e 17.22 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.11 (*dd*, 1H, *J*= 1.33 e 10.42 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.80 (*ddt*, 1H, *J*= 5.15, 11.19 e 15.98 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.83 (*s*, 1H, SCH); 7.49-7.54 (*m*, 5H, CH ar).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 22.28 (CH₂); 23.39 (CH₂); 24.40 (CH₂); 24.74 (CH₂); 48.45 (CH₂CH=CH₂); 97.47 (SCH); 101.16 (CN); 116.32 (CH₂CH=CH₂); 118.01 (Cq); 125.65 (Cq); 129.25 (CH ar); 129.67 (CH ar); 130.19 (CH ar); 133.62 (Cq ar); 132.45 (Cq); 132.72 (Cq); 140.61 (Cq); 158.88 (Cq); 159.55 (Cq) (Anexo XIV).

5.3.4.34(Z)-2-((3-alil-4-(3-clorofenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tíofeno-3-carbonitrila (**6b**)



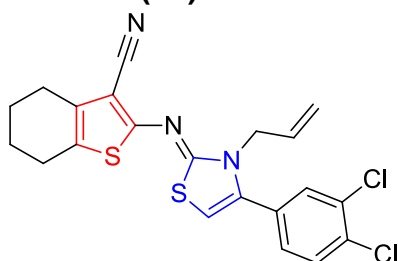
- Sólido amarelo claro; MM: 411,0631 g/mol; Rendimento: 85%; PF: 115-118°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.76-1.82 (*m*, 4H,CH₂); 3.41-3.47 (*m*, 4H, CH₂); 4.55 (*d*, 2H, *J*= 5.25 Hz, CH₂CH=CH₂); 4.90-4.95 (*m*, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.11-5.14 (*m*, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.82 (*ddt*, 1H, *J*= 5.24, 11.24 e 13.48 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.93 (*s*, 1H, SCH); 7.49 (*dt*, 1H, *J*= 1.55 e 7.44 Hz, CH ar); 7.55 (*td*, 1H, *J*= 1.38 e 7.57 Hz, CH ar); 7.59-7.64 (*m*, 2H, CH ar).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 22.27 (CH₂); 23.37 (CH₂); 24.39 (CH₂); 24.74 (CH₂); 56.48 (CH₂CH=CH₂); 97.64 (SCH); 102.19 (CN); 116.24 (CH₂CH=CH₂); 117.98 (Cq); 125.82 (Cq); 128.42 (CH ar); 129.45 (CH ar); 130.16 (CH ar); 131.10 (Cq ar); 132.50 (Cq); 132.55 (Cq); 132.78 (Cq); 133.83 (CH ar); 139.06 (CH ar); 158.78 (Cq); 159.51 (Cq) (Anexo XV).

5.3.4.35(Z)-2-((3-allyl-4-(4-clorofenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (**6c**)



- Sólido amarelo claro; MM: 411,0631 g/mol; Rendimento: 85%; PF: 199-201°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.76-1.81 (*m*, 4H, CH₂); 2.51-2.54 (*m*, 2H, CH₂); 2.66 (*t*, 2H, *J*= 5.82 Hz, CH₂); 4.54 (*d*, 2H, *J*= 5.91 Hz, CH₂CH=CH₂); 4.93 (*dd*, 1H, *J*= 1.36 e 17.21 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.12 (*dd*, 1H, *J*= 1.53 e 10.22 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.80 (*ddt*, 1H, *J*= 5.19, 11.26 e 13.58 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.88 (*s*, 1H, SCH); 7.52-7.55 (*m*, 2H, CH ar); 7.58-7.6' (*m*, 2H, CH ar).
- RMN ¹³C (150 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): 22.27 (CH₂); 23.38 (CH₂); 24.39 (CH₂); 24.73 (CH₂); 48.41 (CH₂CH=CH₂); 97.57 (SCH); 101.77 (CN); 116.27 (CH₂CH=CH₂); 118.01 (Cq); 125.76 (Cq); 129.32 (CH ar); 129.44 (CH ar); 131.53 (Cq); 132.44 (Cq ar); 132.74 (Cq); 135.07 (Cq); 139.37 (Cq); 158.78 (Cq); 159.50 (Cq) (Anexo XVI).

5.3.4.36(Z)-2-((3-allyl-4-(3,4-diclorofenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (**6d**)

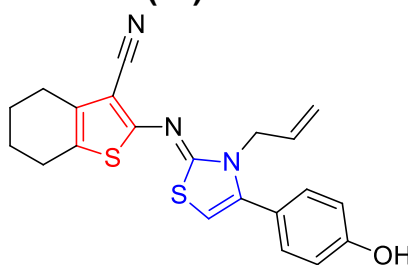


- Sólido marrom claro; MM: 445,0241 g/mol; Rendimento: 79%; PF: 215-217°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.76-1.81 (*m*, 4H, CH₂); 2.51-2.55 (*m*, 2H, CH₂); 2.66 (*t*, 2H, *J*= 5.97 Hz, CH₂); 4.55 (*d*, 2H, *J*= 4.92 Hz, CH₂CH=CH₂); 4.94 (*dd*, 1H, *J*= 1.30 e 16.81 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.13 (*dd*, *J*= 1.30 e 10.44 Hz, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.82 (*ddt*, 1H, *J*= 5.10, 11.48 e 13.67 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.95

(s, 1H, SCH); 7.52 (dd, 1H, $J = 2.04$ e 8.31 Hz, CH ar); 7.79 (d, 1H, $J = 8.40$ Hz, CH ar); 7.83 (d, 1H, $J = 2.03$ Hz, CH ar).

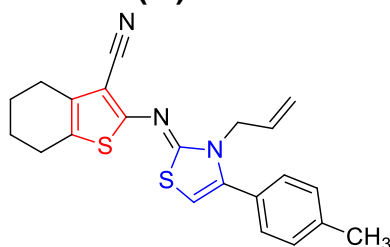
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 22.26 (CH₂); 23.37 (CH₂); 24.39 (CH₂); 24.75 (CH₂); 48.50 (CH₂CH=CH₂); 97.73 (SCH); 102.66 (CN); 116.20 (CH₂CH=CH₂); 118.02 (Cq); 125.89 (Cq); 129.91 (CH ar); 131.06 (CH ar); 131.41 (CH ar); 131.62 (Cq ar); 131.99 (Cq); 132.53 (Cq); 132.79 (Cq); 133.12 (CH ar); 138.09 (CH ar); 158.71 (Cq); 159.44 (Cq) (Anexo XVII).

5.3.4.37(Z)-2-((3-alil-4-(4-hidroxifenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (**6e**)



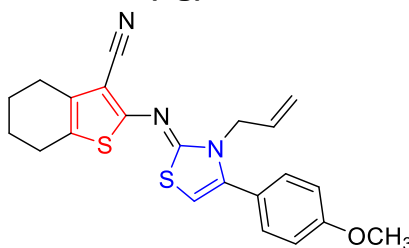
- Sólido amarelo claro; MM: 393,0970 g/mol; Rendimento: 90%; PF: 215-218°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): $\delta = 1.75$ -1.81 (*m*, 4H, CH₂); 2.51-2.53 (*m*, 2H, CH₂); 2.65 (*t*, 2H, $J = 5.76$ Hz, CH₂); 4.51 (*d*, 2H, $J = 5.13$ Hz, CH₂CH=CH₂); 4.94 (*dd*, 1H, $J = 1.36$ e 17.10 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.12 (*dd*, 1H, $J = 1.36$ e 10.59 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.81 (*ddt*, 1H, $J = 5.30$, 11.20 e 13.75 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.70 (s, 1H, SCH); 6.85-6.89 (*m*, 2H, CH ar); 7.27-7.31' (*m*, 2H, CH ar); 9.91 (*sl*, 1H, OH).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 22.29 (CH₂); 23.39 (CH₂); 24.39 (CH₂); 24.74 (CH₂); 48.40 (CH₂CH=CH₂); 97.24 (SCH); 100.04 (CN); 115.95 (CH₂CH=CH₂); 116.38 (Cq); 117.99 (Cq); 121.01 (CH ar); 125.44 (CH ar); 131.13 (Cq); 132.54 (Cq ar); 132.65 (Cq); 140.92 (Cq); 158.99 (Cq); 159.13 (Cq); 159.53 (Cq) (Anexo XVIII).

5.3.4.38(Z)-2-((3-alil-4-(4-metilfenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (**6f**)



- Sólido amarelo escuro; MM: 391,1177 g/mol; Rendimento: 91%; PF: 222-224°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.78-1.81 (*m*, 4H,CH₂); 2.37 (*s*, 3H, CH₃); 2.51-2.53 (*m*, 2H, CH₂); 2.65 (*t*, 2H, *J*= 5.86 Hz, CH₂); 4.53 (*d*, 2H, *J*= 4.98 Hz, CH₂CH=CH₂); 4.93 (*dd*, 1H, *J*= 1.39 e 17.24 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.12 (*dd*, 1H, *J*= 1.39 e 10.52 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.80 (*ddt*, 1H, *J*= 5.20, 11.14 e 13.73 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.77 (*s*, 1H, SCH); 7.32 (*d*, 2H, *J*= 8.19 Hz, CH ar); 7.38 (*d*, 2H, *J*= 8.19 Hz, CH ar).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 21.34 (CH₃); 22.28 (CH₂); 23.39 (CH₂); 24.39 (CH₂); 24.74 (CH₂); 48.41 (CH₂CH=CH₂); 97.39 (SCH); 100.78 (CN); 116.34 (CH₂CH=CH₂); 117.95 (Cq); 125.58 (Cq); 127.72 (CH ar); 129.54 (CH ar); 129.79 (Cq); 132.49 (Cq ar); 132.69 (Cq); 139.86 (Cq); 140.67 (Cq); 158.92 (Cq); 159.55 (Cq) (Anexo XIX).

5.3.4.39(Z)-2-((3-alil-4-(4-metoxifenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiefeno-3-carbonitrila (**6g**)



- Sólido amarelo escuro; MM: 407,1126 g/mol; Rendimento: 90%; PF: 231-234°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.75-1.81 (*m*, 4H,CH₂); 2.51-2.53 (*m*, 2H, CH₂); 2.65 (*t*, 2H, *J*= 5.81 Hz, CH₂); 3.82 (*s*, 3H, CH₃); 4.52 (*d*, 2H, *J*= 5.20 Hz, CH₂CH=CH₂); 4.93 (*dd*, 1H, *J*= 1.31 e 17.08 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.12 (*dd*, 1H, *J*= 1.31 e 10.51 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.81 (*ddt*, 1H, *J*= 5.16, 11.02 e 13.83 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.75 (*s*, 1H, SCH); 7.04-7.08 (*m*, 2H, CH ar); 7.41-7.44 (*m*, 2H, CH ar).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 22.28 (CH₂); 23.39 (CH₂); 24.39 (CH₂); 24.74 (CH₂); 48.40 (CH₂CH=CH₂); 55.78 (CH₃); 97.33 (SCH); 100.48 (CN); 114.65 (CH₂CH=CH₂); 116.35 (Cq); 117.93 (Cq); 122.69 (CH ar); 125.52 (CH ar); 131.13 (Cq); 132.53 (Cq ar); 132.67 (Cq); 140.50 (Cq); 158.95 (Cq); 159.52 (Cq); 160.69 (Cq) (Anexo XX).

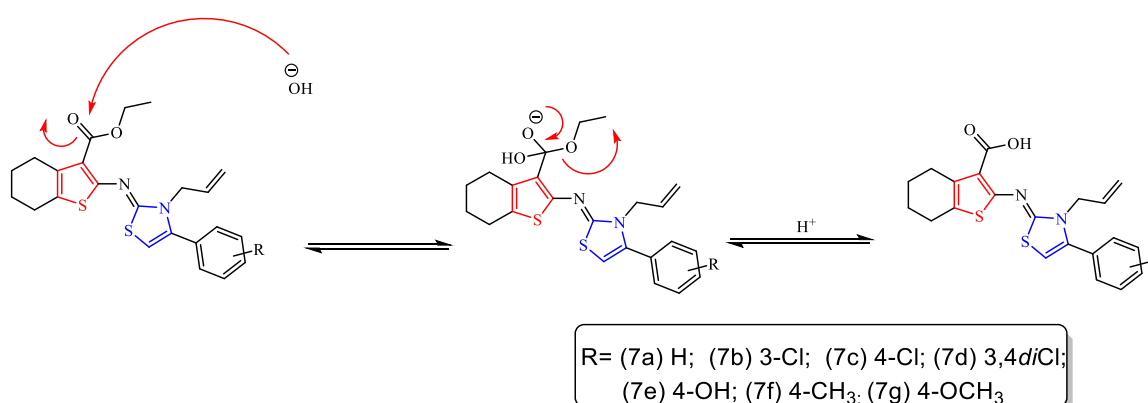
5.4 Obtenção derivados ácidos carboxílicos

A hidrólise básica dos ésteres foi realizada em Micro-ondas (MW), a 85 °C, potência de 50 Watts e tempo reacional de 15 minutos. O respectivo método revelou-se eficaz, por meio da potencialização da transferência de calor, haja vista que reduziu o período reacional de 24 horas, quando comparado à metodologia convencional, de modo que os produtos finais foram obtidos com rendimentos entre 57 a 66%.

5.4.1 Mecanismo reacional

O mecanismo se dá de maneira consagrada na literatura, onde a espécie básica OH^- promove um ataque nucleofílico na carbonila do éster, gerando o grupo de saída íon etóxido. Desta forma, após a adição de H^+ no meio reacional, o grupo ácido carboxílico é então gerado em solução (Esquema 12) (BANERJEE, 2017; BOZOROV *et al.*, 2017; FRECENTESE *et al.*, 2016).

Esquema 12 – Mecanismo reacional de hidrólise básica.

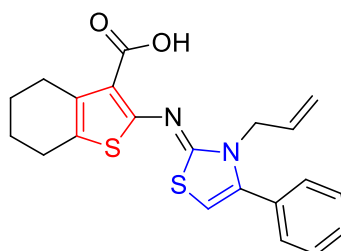


FONTE: AUTOR, 2020.

5.4.2 Caracterização estrutural por RMN ^1H e ^{13}C

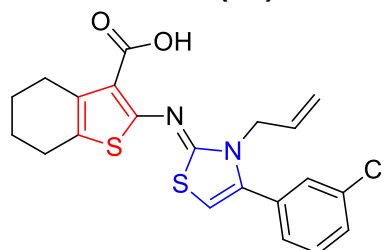
A partir da caracterização por RMN ^1H , pode-se observar, mediante hidrólise, a supressão dos sinais do éster etílico (triplete, 3H, ~1.20 ppm; quarteto, 2H, ~4.12 ppm), bem como o surgimento do sinal de $-\text{COOH}$ (singleto largo, 1H, ~13.10 ppm). Observa-se, ainda, que os sinais dos hidrogênios aromáticos, incluindo a fenila 3,4-substituída e heterociclo o tiazolidina, permanecem inalterados, demonstrando que a metodologia não promoveu quebra de quaisquer destes (Anexos XXI a XXVII).

5.4.2.1 (Z)-2-((3-*alil*-4-feniltiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-ácido carboxílico (**7a**)



- Sólido marrom claro; MM: 396,0996 g/mol; Rendimento: 66%; PF: 195-198°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.80-1.88 (*m*, 4H, CH₂); 2.74 (*t*, 2H, *J*= 5.92 Hz, CH₂); 3.00 (*t*, 2H, *J*= 5.92 Hz, CH₂); 4.49-4.50 (*m*, 2H, CH₂CH=CH₂); 5.09 (*d*, 1H, *J*= 16.94 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.31 (*d*, 1H, *J*= 10.22 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.90 (*ddt*, 1H, *J*= 4.84, 11.56 e 13.72 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.39 (*s*, 1H, SCH); 7.42 (*d*, 1H, *J*= 6.72 Hz, CH ar); 7.48-7.54 (*m*, 3H, CH ar); 13.33 (*sl*, 1H, OH).
- RMN ¹³C (150 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): 22.76 (CH₂); 23.47 (CH₂); 25.34 (CH₂); 27.60 (CH₂); 49.16 (CH₂CH=CH₂); 100.30 (SCH); 117.44 (CH₂CH=CH₂); 118.16 (Cq); 126.11 (Cq); 129.14 (CH ar); 129.28 (CH ar); 130.03 (CH ar); 130.34 (Cq ar); 130.44 (Cq); 135.82 (Cq); 141.45 (Cq); 153.87 (Cq); 159.51 (Cq); 164.71 (C=O) (Anexo XXI).

5.4.2.2 (Z)-2-((3-*alil*-4-(3-clorofenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofeno-3-ácido carboxílico (**7b**)

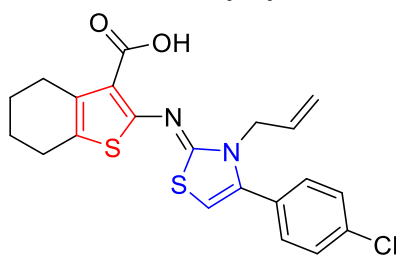


- Sólido amarelo claro; MM: 430,0576 g/mol; Rendimento: 59%; PF: 220-224°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.79-1.86 (*m*, 4H, CH₂); 2.72 (*t*, *J*= 5.77 Hz, 2H, CH₂); 2.97 (*t*, *J*= 5.77 Hz, CH₂); 4.46-4.47 (*m*, 2H, CH₂CH=CH₂); 5.08 (*d*, 1H, *J*= 17.26 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.32 (*d*, 1H, *J*= 10.44 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.89 (*ddt*, 1H, *J*= 5.62, 10.84 e 13.65 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.40 (*s*, 1H, SCH); 7.31

(*d*, 1H, $J = 7.85$ Hz, CH ar); 7.40-7.43 (*m*, 2H, CH ar); 7.49 (*d*, $J = 7.85$ Hz, 2H, CH ar); 13.20 (*sl*, 1H, OH).

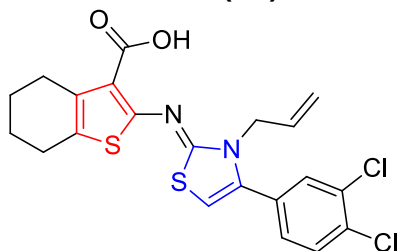
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 22.75 (CH₂); 23.46 (CH₂); 25.35 (CH₂); 26.70 (CH₂); 49.25 (CH₂CH=CH₂); 101.09 (SCH); 117.73 (CH₂CH=CH₂); 118.35 (Cq); 126.39 (Cq); 127.33 (CH ar); 129.38 (CH ar); 130.30 (CH ar); 130.43 (Cq ar); 130.54 (Cq); 131.65 (Cq); 135.21 (Cq); 135.92 (CH ar); 139.94 (CH ar); 153.55 (Cq); 159.26 (Cq); 164.57 (C=O) (Anexo XXII).

5.4.2.3 (Z)-2-((3-allyl-4-(3-clorofenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-ácido carboxílico (**7c**)



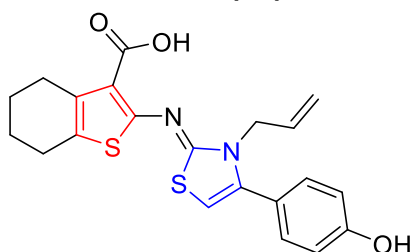
- Sólido amarelo claro; MM: 430,0576 g/mol; Rendimento: 57%; PF: 221-224°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): $\delta = 1.77$ - 1.87 (*m*, 4H, CH₂); 2.70-2.72 (*m*, 2H, CH₂); 2.96-2.99 (*m*, 2H, CH₂); 4.44-4.46 (*m*, 2H, CH₂CH=CH₂); 5.06 (*d*, 1H, $J = 17.43$ Hz, CH₂CH=CH₂); 5.30 (*d*, 1H, $J = 17.43$ Hz, CH₂CH=CH₂); 5.88 (*ddt*, 1H, $J = 5.14, 11.31$ e 13.57 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.37 (*s*, 1H, SCH); 7.35-7.37 (*m*, 2H, CH ar); 7.44-7.46 (*m*, 2H, CH ar), 13.22 (*sl*, 1H, OH).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 22.74 (CH₂); 23.45 (CH₂); 25.34 (CH₂); 26.69 (CH₂); 49.17 (CH₂CH=CH₂); 100.76 (SCH); 117.63 (CH₂CH=CH₂); 118.22 (Cq); 126.33 (Cq); 128.39 (Cq); 129.49 (CH ar); 130.35 (CH ar); 130.55 (Cq); 135.87 (Cq ar); 136.72 (Cq); 140.22 (Cq); 153.61 (Cq); 159.31 (Cq); 164.61 (C=O) (Anexo XXIII).

5.4.2.4 (Z)-2-((3-allyl-4-(3,4-diclorofenil)thiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-ácido carboxílico (**7d**)



- Sólido amarelo ouro; MM: 464,0187 g/mol; Rendimento: 58%; PF: 225-229°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.80-1.88 (*m*, 4H, CH₂); 2.74 (*t*, 2H, *J*= 6.34 Hz, CH₂); 2.99 (*t*, 2H, *J*= 6.34 Hz, CH₂); 4.48-4.49 (*m* 2H, CH₂CH=CH₂); 5.11 (*d*, 1H, *J*= 17.18 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.36 (*d*, *J*= 10.40 Hz, 1H, CH₂CH=CH₂); 5.93 (*ddt*, 1H, *J*= 4.87, 11.73 e 13.95 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.44 (*s*, 1H, SCH); 7.30 (*dd*, 1H, *J*= 2.44 e 7.97 Hz, CH ar); 7.57-7.59 (*m*, 2H, CH ar); 13.17 (*sl*, 1H, OH).
- RMN ¹³C (150 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): 22.74 (CH₂); 23.45 (CH₂); 25.36 (CH₂); 26.70 (CH₂); 49.28 (CH₂CH=CH₂); 101.45 (SCH); 117.89 (CH₂CH=CH₂); 118.40 (Cq); 126.57 (Cq); 128.30 (CH ar); 129.75 (CH ar); 130.29 (CH ar); 131.10 (Cq ar); 131.23 (Cq); 133.69 (Cq); 135.09 (Cq); 135.96 (CH ar); 138.98 (CH ar); 153.37 (Cq); 159.12 (Cq); 164.48 (C=O) (Anexo XXIV).

5.4.2.5 (Z)-2-((3-allyl-4-(4-hidroxifenil)thiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-ácido carboxílico (**7e**)

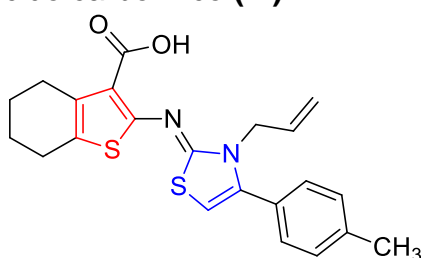


- Sólido amarelo pálido; MM: 412,0915 g/mol; Rendimento: 68%; PF: 210-213°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ= 1.69-1.80 (*m*, 4H, CH₂); 2.68 (*t*, 2H, *J*= 6.07 Hz, CH₂); 2.79 (*t*, 2H, *J*= 6.07 Hz, CH₂); 4.44-4.45 (*m*, 2H, CH₂CH=CH₂); 4.93 (*d*, 1H, *J*= 16.67 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.20 (*d*, 1H, *J*= 10.42 Hz, CH₂CH=CH₂); 5.88 (*ddt*, 1H, *J*= 5.69, 11.69 e 16.45 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.86 (*s*, 1H, SCH); 6.88

(*d*, 2H, $J = 7.54$ Hz, CH ar); 7.30 (*d*, 2H, $J = 7.54$ CH ar); 9.97 (*s*, 1H, OH); 13.17 (*s*, 1H, OH).

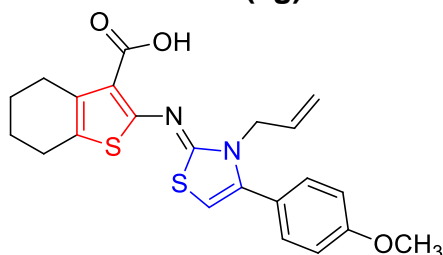
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 22.63 (CH₂); 23.29 (CH₂); 24.91 (CH₂); 26.67 (CH₂); 49.06 (CH₂CH=CH₂); 101.32 (SCH); 116.07 (CH₂CH=CH₂); 116.18 (Cq); 117.29 (CH ar); 120.52 (Cq); 125.29 (CH ar); 131.13 (CH ar); 131.75 (CH ar); 134.81 (Cq ar); 141.36 (Cq); 154.45 (Cq); 159.38 (Cq); 160.40 (Cq); 163.93 (C=O) (Anexo XXV).

5.4.2.6 (Z)-2-((3-alil-4-(4-metilfenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tíofeno-3-ácido carboxílico (**7f**)



- Sólido amarelo pálido; MM: 410,1126 g/mol; Rendimento: 53%; PF: 190-194°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): $\delta = 1.77$ -1.87 (*m*, 4H, CH₂); 2.42 (*s*, 3H, CH₃); 2.71 (*t*, 2H, $J = 6.15$ Hz, CH₂); 2.98 (*t*, 2H, $J = 6.15$ Hz, CH₂); 4.46-4.47 (*m*, 2H, CH₂CH=CH₂); 5.07 (*d*, 1H, $J = 16.90$ Hz, CH₂CH=CH₂); 5.28 (*d*, 1H, $J = 10.36$ Hz, CH₂CH=CH₂); 5.87 (*ddt*, 1H, $J = 5.30, 11.77$ e 13.79 Hz, CH₂CH=CH₂); 6.33 (*s*, 1H, SCH); 7.27-7.29 (*m*, 4H, CH ar); 13.34 (*sl*, 1H, OH).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 21.51 (CH₃); 22.78 (CH₂); 23.49 (CH₂); 25.35 (CH₂); 26.71 (CH₂); 49.13 (CH₂CH=CH₂); 99.95 (SCH); 117.34 (CH₂CH=CH₂); 118.11 (Cq); 126.01 (Cq); 127.09 (Cq); 129.18 (CH ar); 129.81 (CH ar); 130.51 (Cq); 135.80 (Cq ar); 140.61 (Cq); 141.57 (Cq); 153.98 (Cq); 159.57 (Cq); 164.79 (C=O) (Anexo XXVI).

5.4.2.7 (Z)-2-((3-alil-4-(4-metoxifenil)tiazol-2(3H)-ilideno)amino)-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tíofeno-3-ácido carboxílico (**7g**)



- Sólido amarelo escuro; MM: 426,1072 g/mol; Rendimento: 57%; PF: 100-103°C; RF: 0,5 (Hexano/AcOEt 9:1).
- RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.77-1.87 (*m*, 4H, CH_2); 2.71 (*t*, 2H, J = 6.53 Hz, CH_2); 2.98 (*t*, 2H, J = 6.53 Hz, CH_2); 3.86 (*s*, 3H, CH_3); 4.45-4.47 (*m*, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.07 (*d*, 1H, J = 17.12 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.28 (*d*, 1H, J = 10.56 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.88 (*ddt*, 1H, J = 5.14, 12.27 e 13.70 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 6.31 (*s*, 1H, SCH); 6.97 (*d*, 2H, J = 8.70 Hz, CH ar); 7.33 (*d*, 2H, J = 8.70 Hz, CH ar); 13.34 (*sl*, 1H, OH).
- RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): 22.78 (CH_2); 23.49 (CH_2); 25.34 (CH_2); 26.70 (CH_2); 49.11 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 55.58 (CH_3); 99.75 (SCH); 114.53 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 117.32 (Cq); 118.06 (Cq); 122.12 (Cq); 125.98 (CH ar); 130.70 (CH ar); 135.79 (Cq); 141.32 (Cq ar); 153.97 (Cq); 159.52 (Cq); 161.15 (Cq); 164.77 (C=O) (Anexo XXVII).

5.5 Análise do grau de pureza relativo por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC-UV)

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de luz ultravioleta constitui importante ferramenta na análise físico-química de diversas substâncias, onde se utiliza um sistema de solventes como fase móvel, que será eluído por meio de uma bomba de alta pressão perante uma coluna cromatográfica, configurando uma fase móvel (COLLINS et al., 2006; RUGGENTHALER et al., 2017).

Desta maneira, logo após a obtenção, todos os derivados foram analisados quanto seus respectivos graus de pureza, através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector de luz ultravioleta visível (Tabela 3). Com isto, foi utilizado como fase móvel o sistema de solventes MeOH 100%, de modo que todos os compostos foram solubilizados em acetato de etila (grau espectroscópico) (GARCIA et al., 2016; RUGGENTHALER et al., 2017).

Tabela 3 - Análise do grau de pureza relativo dos compostos híbridos tiofeno-2-iminotiazolidinas.

| CÓDIGO | TEMPO DE RETENÇÃO (MIN) | GRAU DE PUREZA (%) | FASE MÓVEL | ANEXO |
|---------------|------------------------------------|-------------------------------|-------------------|--------------|
| 59 | 3.78 | 99 | MeOH 100% | A |
| 62 | 4.74 | 99 | MeOH 100% | B |
| 63 | 10.39 | 99 | MeOH 100% | C |
| 65 | 5.19 | 99 | MeOH 100% | D |
| 1A | 6.73 | 99 | MeOH 100% | E |
| 1B | 4.18 | 99 | MeOH 100% | F |
| 1C | 5.33 | 99 | MeOH 100% | G |
| 1D | 4.00 | 99 | MeOH 100% | H |
| 1E | 5.19 | 99 | MeOH 100% | I |
| 1F | 5.09 | 99 | MeOH 100% | J |
| 2A | 5.29 | 99 | MeOH 100% | K |
| 2B | 5.21 | 99 | MeOH 100% | L |
| 2C | 4.77 | 99 | MeOH 100% | M |
| 2D | 4.46 | 99 | MeOH 100% | N |
| 2E | 4.27 | 99 | MeOH 100% | O |
| 2F | 3.66 | 99 | MeOH 100% | P |
| 2G | 6.44 | 99 | MeOH 100% | Q |
| 3A | 3.23 | 99 | MeOH 100% | R |
| 3B | 3.70 | 99 | MeOH 100% | S |
| 3C | 4.14 | 99 | MeOH 100% | T |
| 3D | 5.67 | 99 | MeOH 100% | U |
| 3E | 3.99 | 99 | MeOH 100% | V |
| 3F | 4.38 | 99 | MeOH 100% | X |
| 3G | 3.54 | 99 | MeOH 100% | Z |

| | | | | |
|-----------|------|----|-----------|-------|
| 4A | 4.46 | 99 | MeOH 100% | I |
| 4B | 4.49 | 99 | MeOH 100% | II |
| 4C | 4.18 | 99 | MeOH 100% | III |
| 4D | 5.29 | 99 | MeOH 100% | IV |
| 4E | 4.57 | 99 | MeOH 100% | V |
| 4F | 4.21 | 99 | MeOH 100% | VI |
| 5A | 4.11 | 99 | MeOH 100% | VII |
| 5B | 3.70 | 99 | MeOH 100% | VIII |
| 5C | 4.21 | 99 | MeOH 100% | IX |
| 5D | 4.54 | 99 | MeOH 100% | X |
| 5E | 4.57 | 99 | MeOH 100% | XI |
| 5F | 4.47 | 99 | MeOH 100% | XII |
| 5G | 4.13 | 99 | MeOH 100% | XIII |
| 6A | 5.19 | 99 | MeOH 100% | XIV |
| 6B | 4.22 | 99 | MeOH 100% | XV |
| 6C | 4.98 | 99 | MeOH 100% | XVI |
| 6D | 4.60 | 99 | MeOH 100% | XVII |
| 6E | 9.41 | 99 | MeOH 100% | XVIII |
| 6F | 4.59 | 99 | MeOH 100% | XIX |
| 6G | 4.74 | 99 | MeOH 100% | XX |
| 7A | 4.18 | 99 | MeOH 100% | XXI |
| 7B | 4.32 | 99 | MeOH 100% | XXII |
| 7C | 4.24 | 99 | MeOH 100% | XXIII |
| 7D | 4.59 | 99 | MeOH 100% | XXIV |
| 7E | 3.54 | 99 | MeOH 100% | XXV |
| 7F | 4.55 | 99 | MeOH 100% | XXVI |
| 7G | 4.26 | 99 | MeOH 100% | XXVII |

FONTE: AUTOR, 2020

Desta forma, observa-se conforme tabela supracitada que todos os derivados foram obtidos mediante grau de pureza satisfatório, em torno de 99%, o que corrobora com a caracterização satisfatória mediante espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C .

5.6 Avaliação biológica frente à promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*

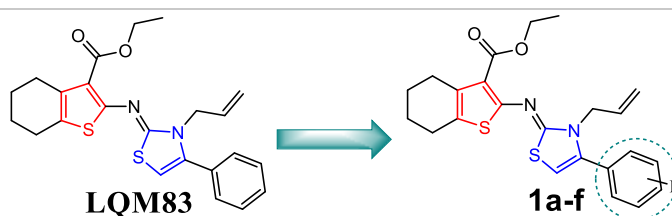
Após a obtenção sintética de todos os 47 novos derivados planejados contra *Leishmania amazonensis* (alvo – CPLa) e *Trypanosoma cruzi* (alvo – cruzaina), estes foram enviados inicialmente para avaliação das atividades biológicas frente às formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis*, além de amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Estes ensaios estão sendo realizados no Laboratório de Doenças Infecciosas (LADIC – Grupo de Pesquisas Avançadas em Doenças Tropicais – Universidade Federal do Delta do Parnaíba), cuja direção está a cargo do Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues.

No entanto, devido à pandemia do novo coronavírus, iniciada em março de 2020, os resultados frente à amastigotas e tripomastigotas ainda estão em andamento. Para esta tese, os resultados frente à amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* foram obtidos e serão objetos de discussão a seguir.

Assim, os derivados foram testados em uma concentração fixa de 10 μM , sendo determinados os valores de CI_{50} para os compostos com inibição $\geq 50\%$ contra amastigotas. Os resultados obtidos estão elencados nas tabelas 4 a 10, agrupadas por séries, sendo analisadas e discutidas em torno da relação estrutura-atividade (REA) para cada composto.

5.6.1 Avaliação biológica e análise da relação estrutura-atividade da série 1a-f

Tabela 4 – Avaliação biológica série 1a-f frente à promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*



| Composto | % Inibição de Crescimento Promastigotas (10 μ M) | % Inibição de Crescimento de Amastigotas (10 μ M) | CI ₅₀ Amastigotas intramacrofágicas (μ M) | CC ₅₀ Macrófagos RAW 264.7 (μ M) | Índice de Seletividade (IS) CC ₅₀ /CI ₅₀ |
|--------------------------|--|---|---|--|--|
| LQM83 | 36,57 | - | - | - | - |
| 1a (3-Cl) | 4,82 | - | - | - | - |
| 1b (4-Cl) | 0 | - | - | - | - |
| 1c (3,4-Cl) | 2,63 | - | - | - | - |
| 1d (4-OH) | 87,38 | 84,19 | 8,81 | 131,94 | 14,98 |
| 1e (4-CH ₃) | 0 | - | - | - | - |
| 1f (4-OCH ₃) | 23,57 | - | - | - | - |
| Antimoniato de meglumina | | | 763,6 | 16433 | 21,5 |
| Anfotericina B | | | 0,32 | 0,38 | 1,18 |

FONTE: AUTOR, 2022.

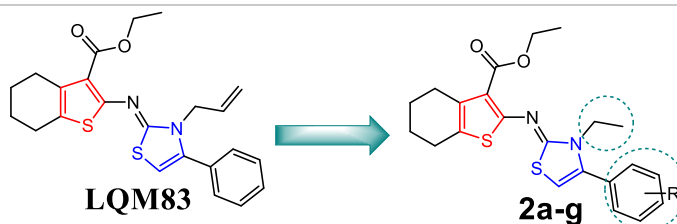
De acordo com os dados obtidos para as modificações estruturais da série 1a-f, demonstrados na tabela 4, observa-se que apenas o composto **1d** apresentou inibição frente à promastigotas de 87,38%, bem como 84,19 % frente à amastigotas. Todos os outros variaram entre 0 e 36,57 % a inibição frente à promastigotas, não prosseguindo análise contra amastigotas (por apresentarem inibição < 50%).

Neste sentido, somente este derivado teve calculado o valor de CI₅₀ contra amastigotas intramacrofágicas, com 8,81 μ M. Apesar de menos potente que os fármacos-padrão (Antimoniato de meglumina e Anfotericina B), este composto foi menos tóxico e mais seletivo que Anfotericina B.

Assim, analisa-se por meio da REA para esta série que, de modo geral, inserção de grupos fracos retiradores e/ou doadores de elétrons (halogênios em **1a**, **1b** e **1c**; alquil em **1e**, respectivamente) resultou em compostos inativos para promastigotas (e conseqüentemente para amastigotas). Em paralelo, inserção de grupo alcóxila (grupo forte doador em **1f**), também resultou em composto inativo. Por fim, a inserção de grupo hidroxila na posição 4 resultou no composto mais ativo da série (**1d**), constituindo a substituição mais promissora desta série. Em comparação, o composto inicial (**LQM83**, sem substituinte no anel fenil) não apresentou atividade.

5.6.2 Avaliação biológica e análise da relação estrutura-atividade da série 2a-g

Tabela 5 – Avaliação biológica série 2a-g frente à promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*



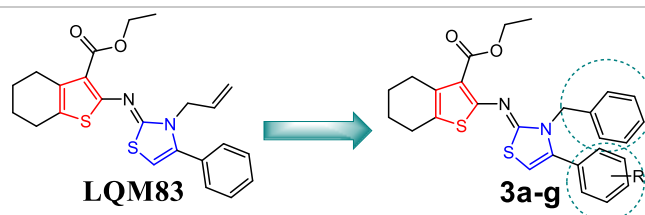
| Composto | % Inibição de Crescimento Promastigotas (10 μ M) | % Inibição de Crescimento Amastigotas (10 μ M) | CI ₅₀ Amastigotas intramacrofágicas (μ M) | CC ₅₀ Macrófagos RAW 264.7 (μ M) | Índice de Seletividade (IS) CC ₅₀ /CI ₅₀ |
|--------------------------|--|--|---|--|--|
| 2a (H) | 0 | - | - | - | - |
| 2b (3-Cl) | 2,17 | - | - | - | - |
| 2c (4-Cl) | 0 | - | - | - | - |
| 2d (3,4-Cl) | 4,79 | - | - | - | - |
| 2e (4-OH) | 0 | - | - | - | - |
| 2f (4-CH ₃) | 0 | - | - | - | - |
| 2g (4-OCH ₃) | 9,24 | - | - | - | - |
| Antimoniato de meglumina | | | | | 21,5 |
| Anfotericina B | | | 763,6 | 16433 | 1,18 |
| | | | 0,32 | 0,38 | |

FONTE: AUTOR, 2022.

De modo geral, a redução da extensão da cadeia alquil a partir do grupo alil (**LQM83**) resultando no grupo etil (série **2a-g**) não se apresentou de modo favorável tanto em relação à inibição do crescimento de promastigotas (0 a 9,24 %), não sendo possível avaliar frente às amastigotas (mesmo mantendo as substituições em torno do anel fenil). Desta maneira, percebe-se que o grupo alil é crucial para atividade, tendo em vista o composto ativo **1d**, conforme dados apresentados na tabela 4.

5.6.3 Avaliação biológica e análise da relação estrutura-atividade da série 3a-g

Tabela 6 – Avaliação biológica série 3a-g frente à promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*



| Composto | % Inibição de Crescimento Promastigotas (10µM) | % Inibição de Crescimento Amastigotas (10µM) | CI ₅₀ Amastigotas intramacrofágicas (µM) | CC ₅₀ Macrófagos RAW 264.7 (µM) | Índice de Seletividade (IS) CC ₅₀ /CI ₅₀ |
|---------------------------------|--|--|---|--|--|
| 3a (H) | 7,12 | - | - | - | - |
| 3b (3-Cl) | 32,73 | - | - | - | - |
| 3c (4-Cl) | 8,11 | - | - | - | - |
| 3d (3,4-Cl) | 0 | - | - | - | - |
| 3e (4-OH) | 74,4 | 56,82 | 16,7 | 221,57 | 13,27 |
| 3f (4-CH₃) | 2,16 | - | - | - | - |
| 3g (4-OCH₃) | 1,93 | - | - | - | - |
| Antimoniato de meglumina | | | | | 21,5 |
| Anfotericina B | | | 763,6 | 16433 | 1,18 |
| | | | 0,32 | 0,38 | |

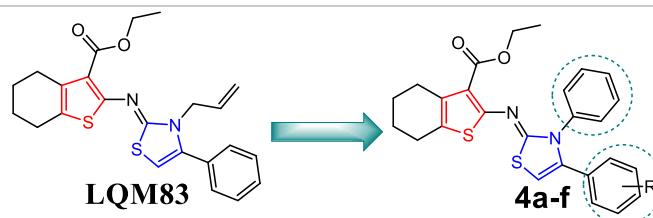
FONTE: AUTOR, 2022.

De acordo com os dados presentes na tabela 6, o aumento do volume da cadeia alquil, em relação ao composto de partida **LQM83**, não se apresentou de forma benéfica em relação a atividade frente às formas promastigotas e amastigotas. Neste sentido, apenas o derivado **3e** demonstrou atividade, com CI₅₀ de 16,7 µM contra amastigotas. Comparativamente com os fármacos do controle positivo, este foi menos citotóxico e mais seletivo em relação à Anfotericina B, embora bem menos potente.

Curiosamente, **3e** também apresentou a mesma substituição que o único composto ativo da série **1a-f** (**1d**), corroborando que o grupo -OH é benéfico para a atividade leishmanicida frente ambas formas amastigotas e promastigotas – embora o aumento do volume da cadeia alquil de **1d** (alil) para **3e** (benzil) reduziu à metade a atividade (de 8,81 µM a 16,7 µM, respectivamente). Em adição, **3e** foi menos tóxico e praticamente manteve a seletividade em comparação com **1d**.

5.6.4 Avaliação biológica e análise da relação estrutura-atividade da série 4a-f

Tabela 7 – Avaliação biológica série 4a-f frente à promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*



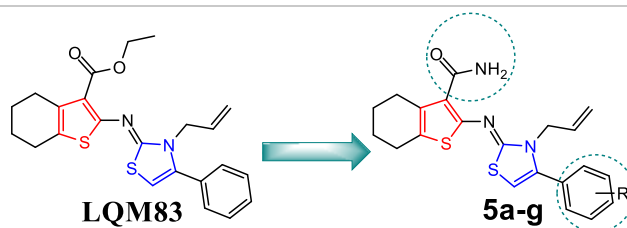
| Composto | % Inibição de Crescimento Promastigotas (10 μ M) | % Inibição de Crescimento Amastigotas (10 μ M) | CI ₅₀ Amastigotas intramacrofágicas (μ M) | CC ₅₀ Macrófagos RAW 264.7 (μ M) | Índice de Seletividade (IS) CC ₅₀ /CI ₅₀ |
|--------------------------|--|--|---|--|--|
| LQM82 (H) | 22,47 | - | - | - | - |
| 4a (3-Cl) | 8,26 | - | - | - | - |
| 4b (4-Cl) | 2,47 | - | - | - | - |
| 4c (3,4-Cl) | 13,47 | - | - | - | - |
| 4d (4-OH) | 16,26 | - | - | - | - |
| 4e (4-CH ₃) | 25,54 | - | - | - | - |
| 4f (4-OCH ₃) | 5,7 | - | - | - | - |
| Antimoniato de meglumina | | | | | 21,5 |
| Anfotericina B | | | 763,6 | 16433 | 1,18 |
| | | | 0,32 | 0,38 | |

FONTE: AUTOR, 2022.

De modo geral, a inserção de grupo mais volumoso e rígido (fenil) planejado para a série **4a-f** em detrimento ao grupo alil (**LQM83**) não se apresentou de maneira favorável à atividade frente ambas as formas promastigotas e amastigotas, não sendo possível calcular valores de CI₅₀, CC₅₀ e IS. Tal resultado também corrobora para enfatizar a importância determinante dos grupos mais flexíveis alil (**1d**) e benzil (**3e**).

5.6.5 Avaliação biológica e análise da relação estrutura-atividade da série 5a-g

Tabela 8 – Avaliação biológica série 5a-g frente à promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*



| Composto | % Inibição de Crescimento Promastigotas (10 μ M) | % Inibição de Crescimento Amastigotas (10 μ M) | CI ₅₀ Amastigotas intramacrofágicas (μ M) | CC ₅₀ Macrófagos RAW 264.7 (μ M) | Índice de Seletividade (IS) CC ₅₀ /CI ₅₀ |
|--------------------------|--|--|---|--|--|
| 5a (H) | 69,77 | 78,25 | 8,2 | 168,73 | 20,58 |
| 5b (3-Cl) | 68,1 | 69,17 | 12,87 | 152,15 | 11,82 |
| 5c (4-Cl) | 76,5 | 82,48 | 8,61 | 126,83 | 14,73 |
| 5d (3,4-Cl) | 75,92 | 80,6 | 6,4 | 113,73 | 17,77 |
| 5e (4-OH) | 89,04 | 92,38 | 6,19 | 124,84 | 20,17 |
| 5f (4-CH ₃) | 90,19 | 97,83 | 3,22 | 96,28 | 29,90 |
| 5g (4-OCH ₃) | 91,3 | 94,58 | 4,5 | 63,95 | 14,21 |
| Antimoniato de meglumina | | | 763,6 | 16433 | 21,5 |
| Anfotericina B | | | 0,32 | 0,38 | 1,18 |

FONTE: AUTOR, 2022.

A série planejada **5a-f** apresentou os melhores resultados leishmanicida dentre todos os compostos avaliados, tendo, ainda, o mais promissor deste trabalho (**5f**). Assim, inserção do grupo amida primária, em detrimento ao éster etílico proveniente do composto de partida (**LQM83**) constitui fundamental para a atividade leishmanicida.

Não obstante, todos os compostos que contém este grupo (**5a-f**) apresentou inibição frente à promastigotas variando entre 68,1 e 91,3 %, bem como 69,17 e 97,83 % contra amastigotas. Neste sentido, foi possível calcular os valores de CI₅₀ para todos os compostos desta série, variando na faixa entre 3,22-12,87 μ M – em que todos foram mais ativos que o fármaco-padrão Antimoniato de meglumina. Em adição, toda a série foi menos tóxica (63,95-168,73 μ M) e mais seletiva (11,82-29,90) que Anfotericina B.

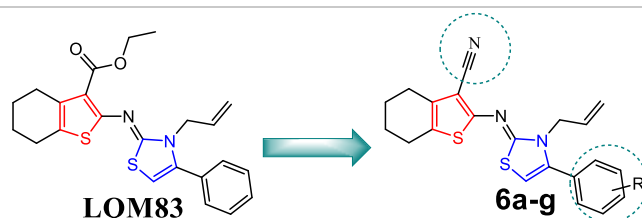
Por outro lado, composto **5f** foi, ainda, mais ativo e seletivo frente à amastigotas comparativamente ao fármaco-padrão Antimoniato de meglumina, além de ser menos tóxico e também mais seletivo em contraste à Anfotericina B, constituindo o derivado mais promissor avaliado neste trabalho.

Neste sentido, a partir da análise da REA para esta série, observa-se que a simples inserção do grupo amida (**5a**) conferiu atividade de 8,2 μM frente às formas amastigotas, em detrimento ao éster etílico do composto de partida (**LQM83**), que não apresentou qualquer atividade (mantendo o grupo alil).

Substituintes fracos retiradores halogenados (**5b**, **5c**, **5d**) apresentaram atividade moderada dentre os resultados para esta série, onde, dentre estes três compostos halogenados, inserção do substituinte 3,4-Cl em **5d** foi a de melhor atividade, enquanto substituinte -OH em **5e** conferiu atividade semelhante que este. Finalmente, substituinte fraco doador (-CH₃ em **5f**) e forte doador (-OCH₃ em **5g**) demonstraram ser as mais promissoras modificações desta série, sendo fundamentais para a atividade.

5.6.6 Avaliação biológica e análise da relação estrutura-atividade da série 6a-g

Tabela 9 – Avaliação biológica série 6a-g frente à promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*



| Composto | % Inibição de Crescimento Promastigotas (10 μM) | % Inibição de Crescimento Amastigotas (10 μM) | CI ₅₀ Amastigotas intramacrofágicas (μM) | CC ₅₀ Macrófagos RAW 264.7 (μM) | Índice de Seletividade (IS) CC ₅₀ /CI ₅₀ |
|---------------------------------|---|---|--|---|--|
| 6a (H) | 51,25 | 65,14 | 10,5 | 127,64 | 12,16 |
| 6b (3-Cl) | 39,42 | - | - | - | - |
| 6c (4-Cl) | 80,9 | 84,93 | 7,13 | 127,94 | 17,94 |
| 6d (3,4-Cl) | 13,2 | - | - | - | - |
| 6e (4-OH) | 53,8 | 76,8 | 7,02 | 158,58 | 22,59 |
| 6f (4-CH₃) | 14,08 | - | - | - | - |
| 6g (4-OCH₃) | 6,59 | - | - | - | - |
| Antimoniato de meglumina | | | | | 21,5 |
| | | | 763,6 | 16433 | |
| Anfotericina B | | | | | 1,18 |
| | | | 0,32 | 0,38 | |

FONTE: AUTOR, 2022.

A partir dos resultados dispostos na tabela 9, observa-se modificações em torno do grupo éster etílico, mantendo o grupo alil (**LQM83**), inserindo uma nitrila (série **6a-**

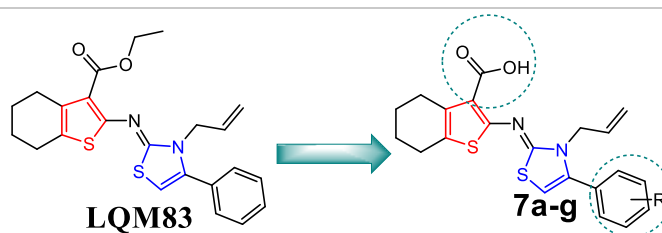
g). Assim, apenas a modificação nesta região, partindo do composto **LQM83** (inativo), derivado **6a** apresentou atividade de 10,5 μM frente às formas amastigotas, além de ser menos citotóxico e mais seletivo que o fármaco-padrão Anfotericina B.

Por outro lado, dentre os substituintes halogenados, apenas substituinte fraco retirador 4-Cl (**6c**) apresentou atividade, sendo também menos citotóxico e mais seletivo em comparação com o derivado supracitado. Em contraste, grupos fraco e forte doador (-CH₃ e -OCH₃ em **6f** e **6g**, respectivamente), não demonstraram ser interessantes, pois ambos foram inativos.

Substituinte -OH (**6e**) apresentou atividade mais potente dentre os compostos desta série, assim como foram ativos os derivados **1d**, **3e**, **5e**, evidenciando a importância deste grupo na posição 4 do anel fenil (mantendo grupo alquil flexível: alil, benzil e alil, respectivamente). Ainda, este foi menos citotóxico que Anfotericina B e mais seletivo que ambos fármacos-padrão.

5.6.7 Avaliação biológica e análise da relação estrutura-atividade da série 7a-f

Tabela 10 – Avaliação biológica série 7a-f frente à promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*



| Composto | % Inibição de Crescimento Promastigotas (10 μM) | % Inibição de Crescimento Amastigotas (10 μM) | CI ₅₀ Amastigotas intramacrofágicas (μM) | CC ₅₀ Macrófagos RAW 264.7 (μM) | Índice de Seletividade (IS) CC ₅₀ /CI ₅₀ |
|-------------------------------|---|---|--|---|--|
| 7a (H) | 3,57 | - | - | - | - |
| 7b (3-Cl) | 6,2 | - | - | - | - |
| 7c (4-Cl) | 94,5 | 96,2 | 3,39 | 61,6 | 18,17 |
| 7d (3,4-Cl) | 86,03 | 92,48 | 5,2 | 84,74 | 16,30 |
| 7e (4-OH) | 14,85 | - | - | - | - |
| 7f (4-CH₃) | 7,684 | - | - | - | - |
| 7g (4-OCH₃) | 89,5 | 90,6 | 8,9 | 98,5 | 11,07 |
| Antimoniato de meglumina | | | | | 21,5 |
| | | | 763,6 | 16433 | |
| Anfotericina B | | | | | 1,18 |

0,32

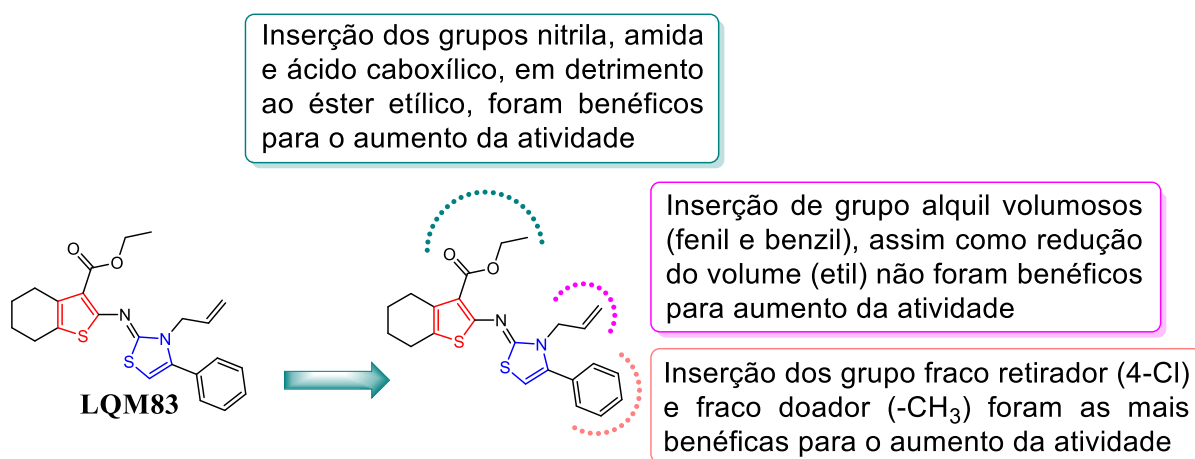
0,38

FONTE: AUTOR, 2022.

Para a série **7a-g**, foi planejada a inserção do grupo ácido carboxílico em detrimento a éster etílico proveniente do composto de partida **LQM83**. Assim, somente esta modificação (**7a**) não surtiu efeito, uma vez que este derivado permaneceu inativo. Por outro lado, inserção de grupos substituinte halogenado fraco retirador (4-Cl para **7c**; 3,4-Cl para **7d**) apresentou os mais promissores derivados desta série, onde ambos compostos foram mais ativos que o fármaco-padrão Antimoniato de meglumina, bem como mais seletivo que Anfotericina B. No entanto, inserção na posição 3 (**7b**) não demonstrou qualquer atividade.

Ainda, grupos -OH e -CH₃ na posição 4 também não demonstrou atividade, enquanto inserção do grupo forte doador -OCH₃ na posição 4 (**7g**) conferiu maior potência e menor citotoxicidade em comparação com Antimoniato de meglumina. Por outro lado, o mesmo derivado foi menos citotóxico e mais seletivo que Anfotericina B. Por fim, a figura 47 sintetiza todas as modificações estruturais em torno do composto de partida **LQM83** em torno da análise de REA para os compostos planejados.

Figura 47 – Análise da REA para os compostos planejados frente amastigotas de *L. amazonensis*



FONTE: AUTOR, 2022.

5.7 Estudos de *docking* molecular

Através da versão atualizada do programa de modelagem molecular, GOLD 5.8.1, foi-se executado o *docking* molecular, o qual é um método eficiente de ancoragem molecular, que mostra as conformações mais favoráveis do ligante ancorado em um determinado alvo específico, mostrando a afinidade, o modo e energia de ligação do ligante no sitio ativo da macromolécula.

Dessa forma, foi calculado o *fitscore* de cada composto final, sugerindo assim, qual desses apresentaria maior afinidade com a enzima cruzaina disponível no PDB (*Protein Data Bank* – 1AIM) de acordo com a região de ancoragem aplicada, conforme pode-se observar em detalhes nas tabelas subsequentes referentes a cada série planejada neste trabalho.

Ainda, todos os derivados planejados foram comparados ao *hit* **LQM83** onde, por sua vez apresentou um valor de *fitscore* de 54,9146 para a enzima cruzaina (PDB 1AIM). Vale ressaltar, ainda, que o mesmo derivado apresentou um valor de $CI_{50} = 2,4 \mu\text{M}$ onde, apesar do *docking* ser um método *in silico*, o mesmo sugere possíveis interações mais promissoras entre o complexo macromolécula-ligante.

5.7.1 Validação do protocolo de *docking* contra cruzaina: Escolha do PDB e algoritmo

O processo de validação do protocolo de *docking* molecular foi realizado a partir da obtenção de 26 estruturas da cruzaina complexadas com inibidores disponibilizadas no website (<https://www.rcsb.org/>) para a escolha da estrutura cristalográfica mais adequada às simulações.

Logo após, simulações de *redocking* molecular foram realizadas usando para a escolha da função de pontuação mais adequada (ChemPLP, GoldScore, ChemScore e ASP), do software GOLD[®]. Os valores de RMSD foram calculados variando entre 0,238 e 4,839 Å (Tabela 11).

A partir dos resultados obtidos, observa-se que valores adequados são menores que 2 Å, enquanto valores entre 2 – 3 Å podem ser aceitáveis e acima de 3 pouco adequados (Silva *et al.*, 2021). Com os valores obtidos, a função de pontuação ChemPLP com a estrutura codificada como 1AIM demonstrou-se a mais adequada (RMSD = 0,238), sendo utilizados nos protocolos de dinâmica e *docking* molecular apresentados nos próximos tópicos.

Tabela 11 – Valores de RMSD obtidos por *redocking* para as quatro funções de pontuação

| PDB | CHEMLP | GOLDScore | CHEMScore | ASP |
|-------------|---------------|------------------|------------------|------------|
| 1AIM | 0,238 | 0,344 | 0,909 | 0,361 |
| 1EWL | 1,374 | 2,520 | 2,114 | 2,551 |
| 1EWM | 2,662 | 0,277 | 2,704 | 2,433 |
| 1EWO | 0,684 | 0,441 | 2,485 | 0,662 |
| 1EWP | 0,502 | 0,270 | 0,720 | 2,100 |
| 1F2A | 4,367 | 1,831 | 1,862 | 1,862 |
| 1F2B | 2,655 | 0,710 | 2,712 | 3,241 |
| 1F2C | 4,206 | 4,427 | 2,762 | 3,472 |
| 1F29 | 2,597 | 0,734 | 2,134 | 3,138 |
| 1ME3 | 0,242 | 0,388 | 1,677 | 1,832 |
| 1ME4 | 0,413 | 0,341 | 0,542 | 2,937 |
| 1U9Q | 1,972 | 1,042 | 3,683 | 1,049 |
| 2AIM | 2,904 | 3,030 | 2,433 | 1,452 |
| 2OZ2 | 2,252 | 1,238 | 1,066 | 4,839 |
| 3HD3 | 1,097 | 0,267 | 1,596 | 0,401 |
| 3I06 | 1,882 | 1,783 | 0,733 | 0,523 |
| 3IUT | 2,712 | 0,207 | 1,990 | 2,160 |
| 3KKU | 2,097 | 3,523 | 1,711 | 1,728 |
| 3LXS | 0,996 | 1,884 | 1,921 | 3,076 |
| 4KLB | 2,379 | 1,522 | 1,399 | 2,317 |
| 4PI3 | 0,754 | 3,457 | 1,482 | 2,106 |
| 4QH6 | 1,642 | 1,036 | 1,852 | 2,351 |
| 4W5B | 0,347 | 1,655 | 0,212 | 1,714 |
| 4W5C | 1,286 | 1,048 | 1,041 | 0,705 |
| 4XUI | 4,087 | 2,086 | 2,549 | 4,057 |

FONTE: AUTOR, 2022.

5.7.2 Construção do modelo de homologia entre cruzaina e cisteína protease de *Leishmania amazonensis* (CPLa)

A partir do molde da estrutura cristalográfica da enzima cruzaina de *T. cruzi* (PDB ID: 1AIM), foi possível construir o modelo da cisteína protease da *Leishmania amazonensis* (CPLa). A obtenção deste modelo demonstrou alinhamento global de 59,91% de identidade (Figura 48), onde valores acima de 30% pressupõe a homologia entre as proteínas (CAVASOTTO *et al.*, 2009). Observe que o modelo gerado apresentou resultados de *GMQE* e *QMEAN* satisfatórios (0.52 e -0.36, respectivamente), mostrando que o modelo apresenta alto índice de confiabilidade, haja vista que o valor de *GMQE* foi próximo de 1, e alto grau de natalidade entre as

proteínas, revelado pelo valor de *QMEAN* em torno de zero (WATERHOUSE *et al.*, 2018).

Figura 48 – Alinhamento global da enzima CPLa com cruzaina (PDB ID: 1AIM)

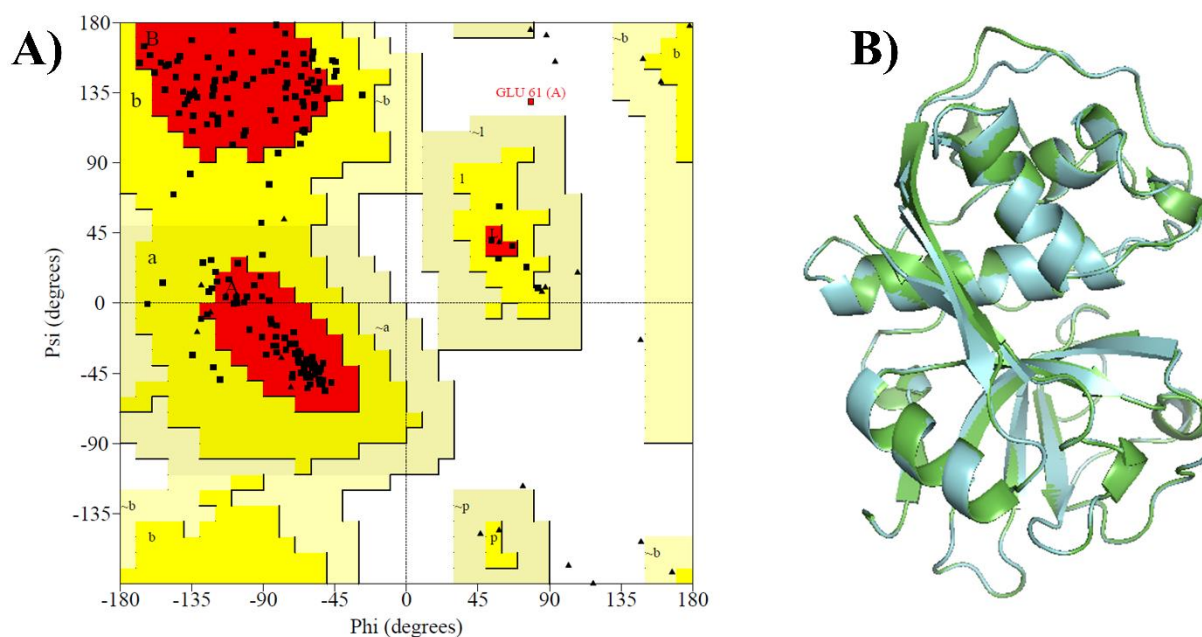
| | |
|----------|--|
| CPLa | MARRNPLLFAIVVTLFVVCYGSALIAQTPPAVDNFVASAHYGSFKKRHSKAFGGDAEEGHRFNAFKQNMQTAYFLNTQN |
| Cruzaína | ----- |
| CPLa | PHAHYDVSGKFADLTPQEFAKLYLNPDYYSHLKDHKEDVHVDDSAPSGVMVSDWRDKGAVTPVKNQGLCGS C WAFSAIG |
| Cruzaína | -----APAAVDWRARGAVTAVKDQGG C WAFSAIG |
| CPLa | NIEGQWAASGHSLVSLSEQMLVSCDNVDEGCNGLMDQAMNWIMQSHNGSV-FTEASYPYTSGGTRPPCHDEGE-VGAK |
| Cruzaína | NVECQWFLAGHPLTNLSEQMLVSCDKTDSGCSGGLMNAFEWIVQE-NNGAVYTEDSYPYASGEGISPPCTTSGHTVGAT |
| CPLa | ITGFLLSLPHDEERIADWVEKRGPVAVAVDATTWQLYFGGVVSLCLAWSLN H GVLIVGFNKNAPPPYWI V KN S WGSSWGEK |
| Cruzaína | ITGHVELPQDEAQIAAWLAVNGPVAVAVDASSWMTYTGGVMTSCVSEAL D HGVLVGYNDSAAPYWI I KN S WTTQWGEE |
| CPLa | GYIRLAMGSNQCMKKNYPVSATVESPHTPHVPTTTA |
| Cruzaína | GYIRIAKGSNQCLVKEEASSAVV----- |

FONTE: AUTOR, 2022 (Dados gerados a partir do servidor *Swiss-model*).

Neste sentido, a validação do modelo por meio do gráfico de *Ramachandran* (Figura 49A) demonstrou que 85,9% dos resíduos estão em regiões favoráveis, 13,6% em regiões adicionais permitidas, 0,0 % em regiões generosamente permitidas e apenas 0,6 % em regiões não permitidas. Assim, o resíduo que se encontra em região não permitida é um glutamato, o que não interfere na região catalítica da enzima, corroborando a validade do modelo.

Por outro lado, também foi feita a realização do alinhamento entre CPLa e cruzaina para validação a partir do cálculo de RMSD, além da inspeção visual da superposição das estruturas. Conforme demonstrado na figura 49B, foi obtido um RMSD de 0.1, de modo que não ocorre mudanças nas posições dos resíduos de aminoácidos, especialmente na região catalítica, o que novamente corrobora a validade do modelo e sua homologia com a cruzaina do *T. cruzi*.

Figura 49 – Gráfico de *Ramachandran* para a enzima CPLa (a) e superposição da cruzaína e CPLA (b).



FORNE: AUTOR, 2022.

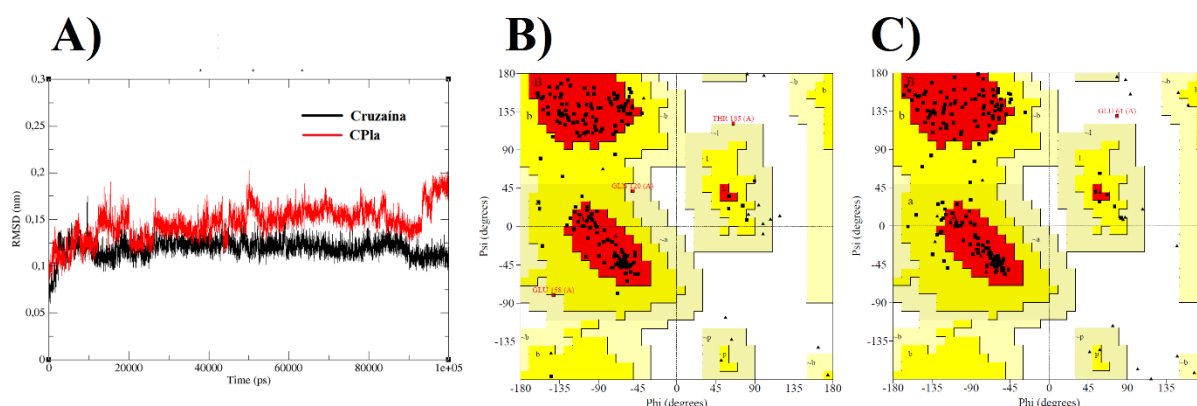
5.7.3 Simulações de dinâmica molecular (DM)

Para simulações de dinâmica molecular, um protocolo em 100 ns foi realizado e o resultado de RMSD de C_{α} mostrado na figura 50A. Neste sentido, ambas foram estáveis durante todo o tempo de simulação, com valores de RMSD entre 0,05 – 2 nm. Para a cruzaína, a estabilidade foi observada em torno de 20 ns, permanecendo até 100 ns. No entanto, para a CPLa, a melhor estabilidade foi em torno de 30 ns.

Ainda, os gráficos de *Ramachandran* para ambas as estruturas mais estáveis (Figura 50B e C) demonstraram a qualidade estereoquímica e ângulos diedros ψ e ϕ dos resíduos. Para a enzima cruzaína, 88 % dos resíduos encontram-se em regiões permitidas, 10,4 % em regiões permitidas adicionais, 1,1 % em regiões generosamente permitidas, e 0,5 % em regiões não-permitidas.

Por outro lado, para enzima CPLa, observou-se 85,9 % em regiões permitidas, 13,6 % em regiões permitidas adicionais, 0 % em regiões generosamente permitidas e 0,6 % em regiões não-permitidas. Adicionalmente, foi comprovada a qualidade das estruturas, sendo então utilizadas nas simulações de *docking* molecular.

Figura 50 – Gráficos de RMSD para a cruzaina (linha preta) e CPLa (linha vermelha) após uma simulação de dinâmica molecular de 100 ns (a) e gráficos de *Ramachandran* para cruzaina (b) e CPLa (c).



FONTE: AUTOR, 2022

5.8 Docking molecular dos mais ativos contra CPLa.

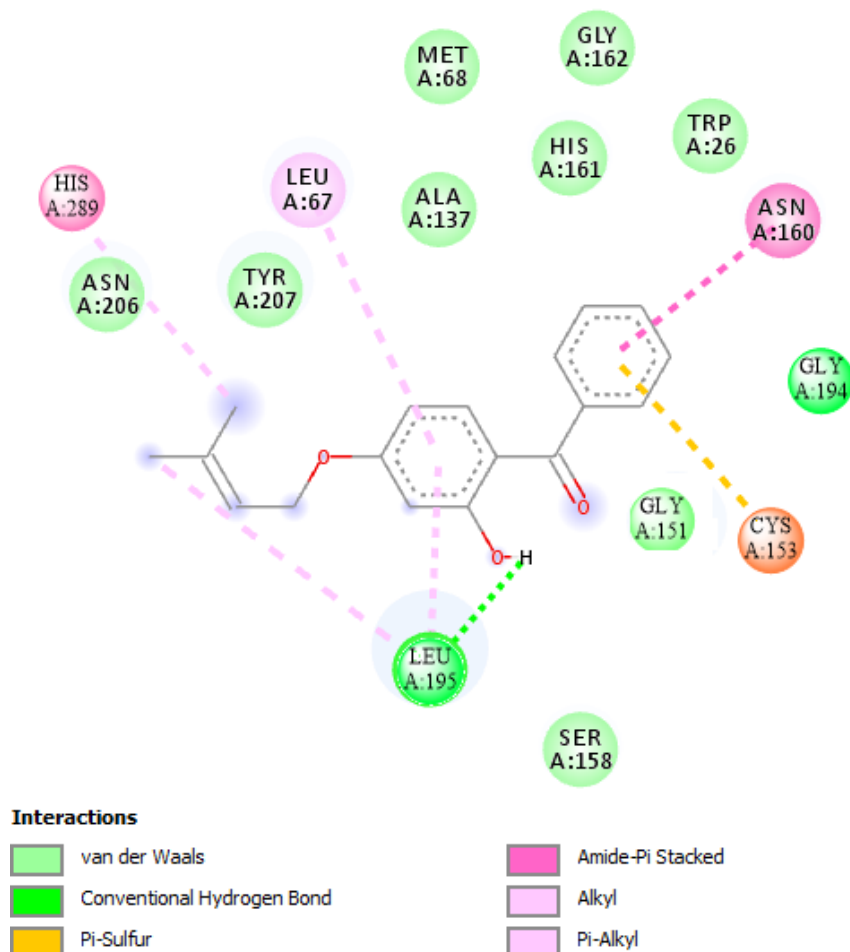
De acordo com os resultados demonstrados nas tabelas 4-10, os compostos mais ativos foram analisados por meio de ensaios de *docking* molecular frente ao alvo CPLa, de modo a sugerir interações com resíduos críticos que possam auxiliar no entendimento a nível molecular do mecanismo de ação destes derivados.

5.8.1 Análise das interações entre os compostos mais ativos **5f** e **7c** contra amastigotas de *L. amazonensis* frente à enzima CPLa como alvo proposto

Após os resultados obtidos em relação à avaliação frente amastigotas de *L. amazonensis*, ensaios de *docking* molecular foram realizados para os compostos mais ativos **5f** e **7c**, sendo comparados com o inibidor (**67**) encontrado na literatura para a enzima CPLa (ALMEIDA *et al.*, 2015).

Assim, o inibidor supracitado apresentou resultado calculado de *fitscore* de 55.4095, enquanto para os derivados **5f** e **7c** foi de 48.5896 e 52.8529, respectivamente. Em relação às interações, observa-se na figura 51 que o inibidor (**67**) possui interação π -enxofre com o resíduo de Cys¹⁵³ e π -alquil com His²⁸⁹ (tríade catalítica). Em adição, apresentou uma ligação de hidrogênio com Leu¹⁹⁵ e empilhamento π -amida com Ans¹⁶⁰.

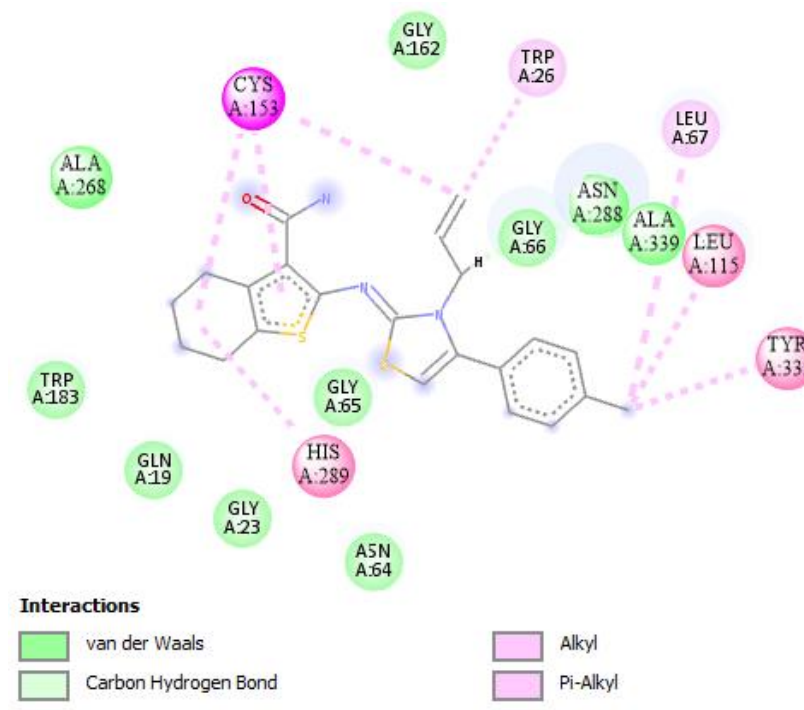
Figura 51 – Diagrama 2D de interações entre o inibidor da literatura (67) e a enzima CPB.



FONTE: AUTOR, 2022. Diagrama gerado através do *software* Discovery Studio 2020.

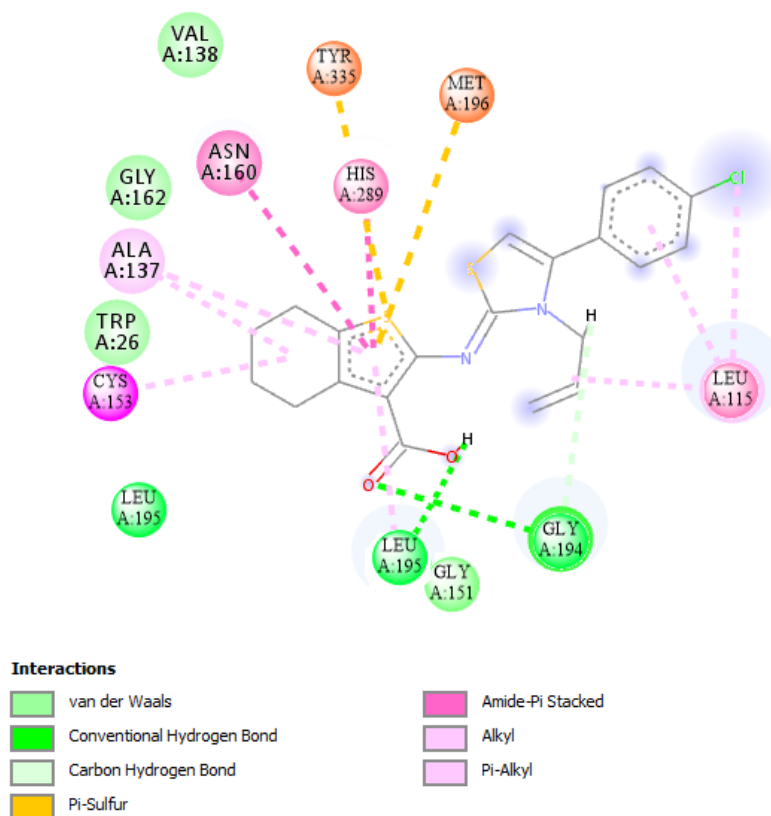
Por outro lado, o composto **5f** apresentou empilhamento π -alquílica com os resíduos de Cys¹⁵³ e His²⁸⁹ (Figura 52), assim como **7c** (Figura 53). Por outro lado, **7c** apresentou, além da ligação de hidrogênio com Leu¹⁹⁵, assim como o inibidor da literatura, uma ligação de hidrogênio com o resíduo de Gly¹⁹⁴, o que pode estar contribuindo para a atividade inibitória. No entanto, ensaios *in vitro* frente a enzima CPB de *L. amazonensis* são necessários para investigar tais predições *in silico*.

Figura 52 – Diagrama 2D de interações entre o composto 5f e a enzima CPB.



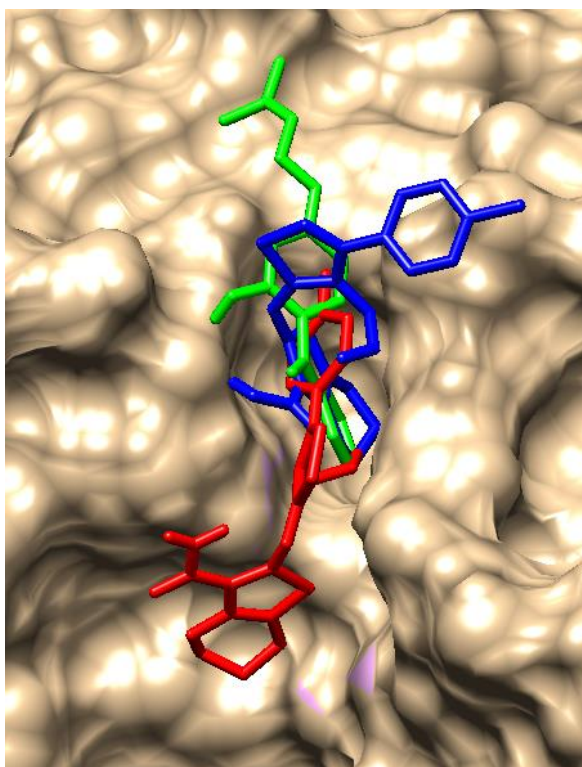
FONTE: AUTOR, 2022. Diagrama gerado através do *software* Discovery Studio 2020.

Figura 53 – Diagrama 2D de interações entre o composto 7c e a enzima CPB.



FONTE: AUTOR, 2022. Diagrama gerado através do *software* Discovery Studio 2020.

Figura 54 – Visualização do *Cluster* para as moléculas mais ativas 5f e 7c.



FONTE: AUTOR, 2022. Figura elaborada por meio do *software* Chimera® v1.14. Em vermelho: **5f**; azul: **7c**; verde: inibidor da literatura (**67**).

5.9 *Docking* molecular dos compostos contra cruzaina

Após todas as simulações de DM, *docking* molecular dos compostos idealizados nesta tese de doutorado foram realizados frente à enzima cruzaina, de modo a analisar interações com resíduos de aminoácidos que possam demonstrar a drogabilidade deste alvo. Assim, os maiores valores de *fitscore* calculados são apresentados na tabela 12, onde o *cluster* demonstrando a ancoragem de todos estes derivados, juntamente com o protótipo **LQM83**, é demonstrado na figura 55.

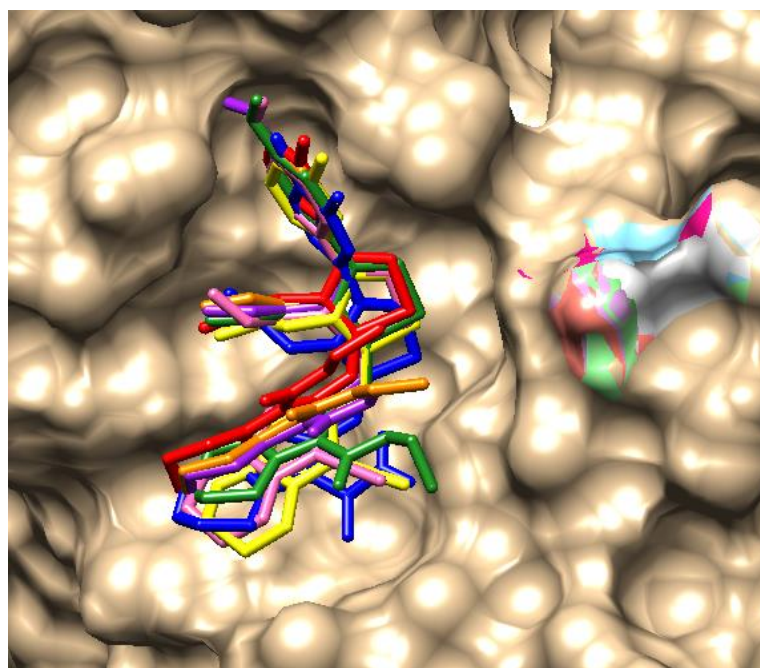
Tabela 12 – Resultados calculados dos compostos com maior valor de *fitscore* em comparação com o protótipo LQM83 por meio de *docking* molecular

| Composto | FitScore |
|----------|----------|
| LQM83 | 57.9720 |
| 1a | 59.3940 |

| | |
|-----------|---------|
| 1f | 61.1488 |
| 5d | 58.0011 |
| 6b | 58.0046 |
| 6g | 58.2207 |
| 7e | 59.5095 |

FONTE: AUTOR, 2022. Valores calculados com base no software GOLD 5.8.1. PDB ID: 1AIM.

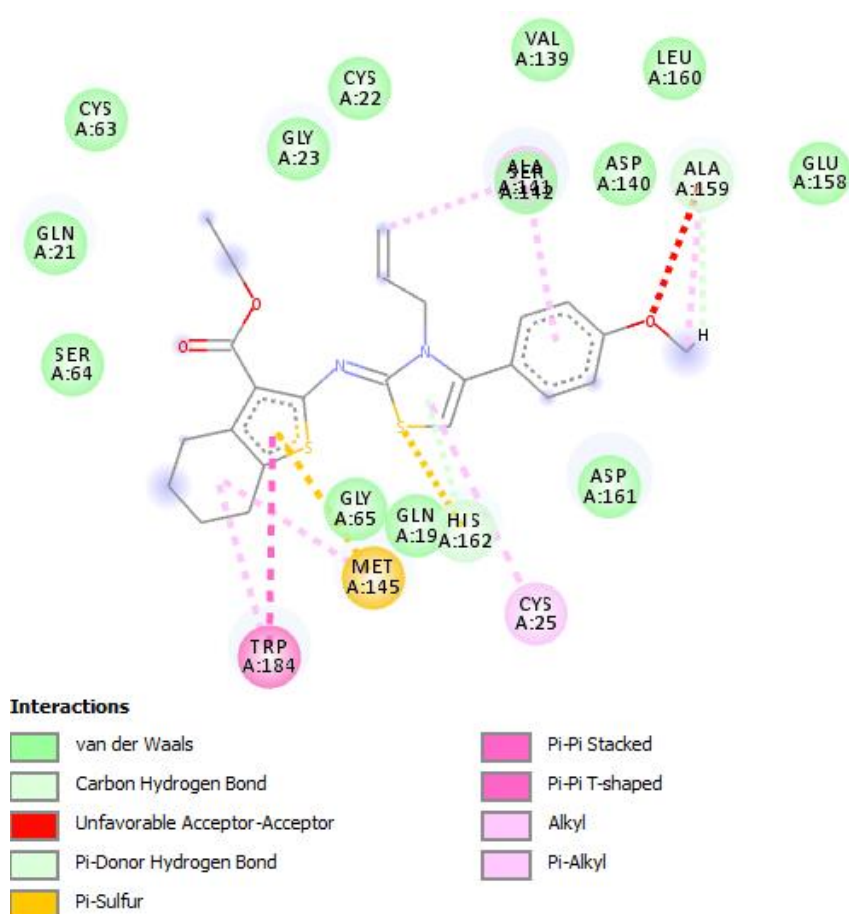
Figura 55 – Visualização do *Cluster* para as moléculas de maior *fitscore* e LQM83.



FONTE: AUTOR, 2022. Figura elaborada por meio do *software* Chimera® v1.14. Em vermelho: **1a**; verde: **1f**; azul: **5d**; amarelo: **6b**; rosa: **6g**; púrpura: **7e**; laranja: **LQM83**. PDB ID: 1AIM.

Para os compostos em questão, observa-se que o derivado **1f** apresentou o maior valor de *fitscore* calculado dentre todas as moléculas deste trabalho, de modo que suas interações com o alvo proposto (enzima cruzaina) são demonstradas na figura 56.

Figura 56 – Diagrama 2D de interações entre o composto **1f** e a enzima cruzaina.



FONTE: AUTOR, 2022. Diagrama gerado através do *software* Discovery Studio 2020.

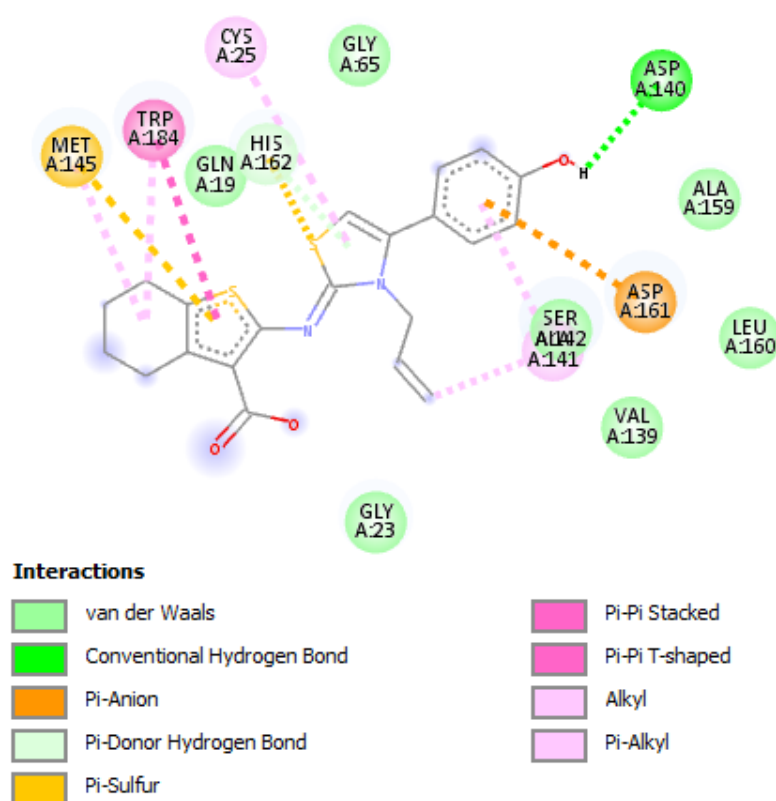
A partir do diagrama acima, observa-se que o composto **1f** mantém as interações π -alquil com resíduo de Cys²⁵, bem como ligação de hidrogênio doador π com His¹⁶² assim como o protótipo **LQM83**. Além disso, a interação de van der Waals com o resíduo crítico Gly²³, descrito por Silva-Junior *et al* (2016) para o protótipo em questão, também permanece.

Por outro lado, destaca-se que a inserção do substituinte 4-OCH₃ em **1f** acaba perfazendo uma interação com Ala¹⁵⁹ do tipo carbono-hidrogênio, assim com π -alquil com este mesmo resíduo, de modo que interações com este resíduo de aminoácido não era visível para **LQM83** (Figura 43), o que pode contribuir para o aumento da atividade antichagásica – embora esta análise necessite dos ensaios biológicos para confirmação (em andamento).

Neste sentido, a molécula **7e** apresentou o segundo maior valor de *fitscore* calculado nos ensaios de *docking* molecular (Tabela 12), também permanecendo as interações π -alquil com resíduo de Cys²⁵, além de ligação de hidrogênio doador π

com His¹⁶² e interação de van der Waals com Gly²³ em comparação com **LQM83** (Figura 43). Em paralelo, o surgimento de uma ligação convencional de hidrogênio com resíduo de Asp¹⁴⁰, a partir da inserção do grupo 4-OH em **7e** (Figura 57), de modo que o protótipo em questão não apresentou quaisquer interações deste tipo (Figura 51). Tal interação pode ser a chave para o desencadeamento de um aumento da potência da atividade inibitória enzimática – o que será possível analisar ao fim dos ensaios biológicos.

Figura 57 – Diagrama 2D de interações entre o composto 7e e a enzima cruzaina.



FONTE: AUTOR, 2022. Diagrama gerado através do *software* Discovery Studio 2020.

5.10 Análise *in silico* do perfil farmacocinético para os compostos mais promissores apresentados neste trabalho

Os compostos mais promissores como inibidores de amastigotas de *L. amazonensis* **5f** e **7c**, bem como os de maior resultado de *fitscore* frente à enzima cruzaina **1f** e **7e** foram submetidos a estudos de ADMET *in silico* para predição de suas propriedades farmacocinéticas. Tais estudos são essenciais para evitar que os

candidatos a medicamentos falhem, especialmente no estágio final de desenvolvimento, devido às propriedades farmacocinéticas e toxicidade (FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, Adriano D., 2019b; JIA, C.-Y. *et al.*, 2020).

Neste sentido, todos os compostos enquadram-se em parâmetros físico-químicos para biodisponibilidade oral: peso molecular $\leq 500 \text{ g mol}^{-1}$, doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 , aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 , ligações rotacionáveis ≤ 10 , coeficiente de partição em água/óleo ≤ 5 , além de área de superfície polar topológica $< 140 \text{ \AA}^2$, com exceção do composto **7c** que apresentou LOGP $> 4,15$ (4,23). Ainda assim, todos os compostos estão enquadrados em parâmetros considerados aceitáveis de acordo com a regra de Lipinski (CARIDHA *et al.*, 2019; FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, Adriano D., 2019b; YAMILE VARGAS-MÉNDEZ; KOUZNETSOV, 2019).

Dentre os parâmetros de distribuição farmacocinética, todos os compostos possuem absorção oral e não são permeáveis à barreira hematoencefálica. Em adição, relacionado a inibição pela glicoproteína-P (gp-P), apenas o composto **1f** foi sugerido como substrato desta.

Neste contexto, gp-P está envolvida em múltiplos processos de resistência a medicamentos (inclusive entre os protozoários da família *Trypanosomatidae*) (CAPELA; MOREIRA; LOPES, 2019; PRADINES, 2013), desempenhando um papel fundamental no transporte de compostos bioativos para os órgãos, estando diretamente relacionada às propriedades farmacocinéticas e biodisponibilidade (GANESAN *et al.*, 2021; ROBINSON; TIRIVEEDHI, 2020).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

DTNs provenientes da família *Trypanosomatidae* (doença de Chagas e Leishmanioses), tem causado importante representatividade enquanto grande

problema de saúde pública, onde, além do elevado número de casos, os custos para diagnóstico, tratamento, manutenção e transplantes (quando cabível), tem sido bastante oneroso aos países atingidos direta ou indiretamente.

Paradoxalmente, os investimentos para descobrimento de drogas frente estas doenças, somados a biotecnologia, vacinas e diagnóstico, tem sido de apenas 4% do total gasto com DTN globalmente. Diante destes fatos, investimentos e ônus tem andado em caminhos bastante opostos.

Assim, foram obtidos ao término deste trabalho 8 compostos de caráter intermediário, além de 43 compostos finais inéditos híbridos moleculares tiofeno-2-tiazolidinas via estratégia de rigidificação molecular, sendo todos os finais inéditos na literatura.

A metodologia sintética apresentou-se satisfatória para os compostos híbridos moleculares, obtendo-se rendimento quantitativo entre 58-95%, bem como tempo reacional de 40 min (em detrimento a 24 h ou *overnight*, conforme demonstrado na literatura).

Da mesma forma, a metodologia sintética via irradiação por micro-ondas demonstrou-se de maneira satisfatória, com rendimentos entre 53-66%, de modo que foi possível obter os compostos ácidos carboxílicos em 20 minutos, em detrimento a 24h por meio da metodologia convencional.

Os compostos foram caracterizados por meio de espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C e PF, onde foi possível evidenciar os referidos sinais e deslocamentos químicos que caracterizam especificamente a formação de cada composto idealizado.

Ainda com relação à caracterização e confirmação da regioselectividade, foram obtidos, 2 cristais dos derivados finais, onde os mesmos serão submetidos a ensaios de cristalografia para obter a estrutura das mesmas.

Todos os compostos foram analisados quanto ao grau de pureza via HPLC-UV, em que apresentaram pureza satisfatória em torno de 99%, corroborando com a eficácia dos métodos sintéticos e de purificação dos compostos.

Avaliação frente promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* evidenciou a obtenção de dois compostos mais promissores – **5f** e **7c**, que apresentaram maior potência frente às formas amastigotas que o fármaco-padrão Antimoniato de meglumina, além de menos citotóxico que o fármaco-padrão Anfotericina B. Ainda, **5f** foi mais seletivo que ambas as drogas, de modo que **7c** foi mais seletivo que esta última.

Adicionalmente, foram realizados estudos *in silico*, a partir da modelagem molecular, que evidenciou as interações em torno destes compostos mais ativos frente ao alvo proposto para *L. amazonensis* (enzima CPB). Tais interações foram evidenciadas pelos compostos mais ativos **5f** e **7c** com os resíduos da tríade catalítica Cys¹⁵³ e His²⁸⁹, assim como o inibidor (**67**) encontrado na literatura.

Em relação à enzima cruzaina, os estudos de *docking* molecular evidenciaram os compostos **1f** e **7e** com maiores valores calculados de *fitscore*, de modo que ambos mantêm interações π -alquil com resíduo de Cys²⁵, ligação de hidrogênio doador π com His¹⁶², além de interação de van der Waals com o resíduo crítico Gly²³, assim como o protótipo **LQM83**. No entanto, substituinte 4-OCH₃ em **1f** demonstrou interações do tipo carbono-hidrogênio e π -alquil com Ala¹⁵⁹, o que não foi observado no protótipo **LQM83**. Neste sentido, uma ligação convencional de hidrogênio com resíduo de Asp¹⁴⁰, a partir da inserção do grupo 4-OH em **7e** também foi evidenciada, diferentemente do protótipo em questão. Estas interações podem ser a chave para o desencadeamento de um aumento da potência da atividade inibitória enzimática – embora sejam necessários os resultados dos ensaios biológicos destes derivados para corroborar tais informações.

Todos os derivados promissores contra *L. amazonensis* (**5f**, **7c**) e cruzaina (**1f**, **7e**) demonstraram em estudos de predição *in silico* que se enquadram em parâmetros de perfis farmacocinéticos aceitáveis, possuindo absorção oral e não sendo permeáveis à barreira hematoencefálica. Apenas o **1f** foi sugerido como substrato da gp-G.

Avaliação frente às formas tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi* estão em andamento no LADIC, cuja supervisão está a cargo do Prof. Dr. Klinger Rodrigues. Ao final, os compostos mais promissores serão submetidos a análise de inibição enzimática *in vitro* frente à enzima cruzaina, assim como os melhores derivados leishmanicida frente à enzima CPB, para que proponham possíveis mecanismos inibitórios em conjunto com os resultados *in silico* de *docking* molecular.

Por fim, os estudos envolvendo o *design* e obtenção dos compostos promissores contribuem para o desenvolvimento de novos derivados eficazes, de baixo custo e toxicidade, de modo a proporcionar fomento na busca de um tratamento para estas severas doenças negligenciadas (leishmaniose e doença de Chagas), sobretudo para a população mais desassistida.

REFERÊNCIAS

ABAE, M. S. *et al.* Exploring the scope of the Gewald reaction: Expansion to a four-component process. **Tetrahedron Letters**, 5 abr. 2017. v. 58, n. 14, p. 1408–1412.

ÁBRÁNYI-BALOGH, P. *et al.* A road map for prioritizing warheads for cysteine

targeting covalent inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2018. v. 160, p. 94–107. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.010>>.

ALAM, B.; BISWAS, S. Inhibition of Plasmodium falciparum cysteine protease falcipain-2 by a human cross-class inhibitor serpinB3: A mechanistic insight. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, 2019. v. 1867, n. 9, p. 854–865. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.06.012>>.

ALMEIDA, Letícia DE *et al.* Benzophenone derivatives as cysteine protease inhibitors and biological activity against Leishmania(L.) amazonensis amastigotes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, out. 2015. v. 75, p. 93–99. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332215002152>>.

ÁLVAREZ, G. *et al.* Optimization of antitrypanosomatid agents: Identification of nonmutagenic drug candidates with in vivo activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, 22 maio. 2014. v. 57, n. 10, p. 3984–3999. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm500018m>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

_____ *et al.* Identification of a new amide-containing thiazole as a drug candidate for treatment of chagas' disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1 mar. 2015. v. 59, n. 3, p. 1398–1404. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25761/>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

ANSARI, M. Y. *et al.* Recent advancement and treatment of leishmaniasis based on pharmacoinformatics approach: Current and future outlook. **Gene Reports**, 2017. v. 9, n. September, p. 86–97. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.genrep.2017.09.003>>.

ARAUJO-JORGE, T.; TELLERIA, J.; DALENZ, J. R. **History of the discovery of the American Trypanosomiasis (Chagas disease)**. Second Edi ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2017.

ARCHNA; PATHANIA, S.; CHAWLA, P. A. **Thiophene-based derivatives as anticancer agents: An overview on decade's work**. **Bioorganic Chemistry**. Academic Press Inc. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206820313237>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

ARMSTRONG, I. *et al.* RNA Drug discovery: Conformational restriction enhances specific modulation of the T-Box riboswitch function. **Bioorganic & Medicinal**

Chemistry, 6 ago. 2020. p. 115696.

ARONSON, N. E.; JOYA, C. A. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. **Infectious Disease Clinics of North America**, 2019. v. 33, n. 1, p. 101–117. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.004>>.

ARONSON, N. E.; MAGILL, A. J. Leishmaniasis : General Principles. **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases (Tenth Edition)**, 2020. p. 776–798. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323555128001046>>.

AVULA, V. K. R. *et al.* A Green Synthesis of 2-Amino-4-(9 *H*-carbazole-3-yl)thiophene-3-carbonitriles by a Step-wise and One-pot Three-component Gewald Reaction. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, 1 jul. 2017. v. 54, n. 4, p. 2471–2482. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jhet.2847>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

BAILEY, F. *et al.* Neglected Tropical Diseases and Mental Health: Progress, Partnerships, and Integration. **Trends in Parasitology**, 2019. v. 35, n. 1, p. 23–31. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.001>>.

BALOUZ, V.; AGÜERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. **Advances in Parasitology**, 2017. v. 97, p. 1–45.

BANERJEE, B. Recent developments on ultrasound-assisted one-pot multicomponent synthesis of biologically relevant heterocycles. **Ultrasonics Sonochemistry**, 2017. v. 35, p. 15–35. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.10.010>>.

BARBOSA, E. *et al.* Design and synthesis of potent anti - Trypanosoma cruzi agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death Diogo Rodrigo Magalhães. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017. v. 130, p. 39–50.

BEKHIT, A. A. *et al.* Leishmania treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2018. v. 160, p. 229–244. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.022>>.

BEL ABED, H.; BLUM, S. A. Transition-Metal-Free Synthesis of Borylated Thiophenes via Formal Thioboration. **Organic Letters**, 2 nov. 2018. v. 20, n. 21, p.

6673–6677. Disponível em:

<<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.orglett.8b02727>>. Acesso em: 20 ago. 2020.

BELLERA, C. L. *et al.* In Silico Modeling of FDA-Approved Drugs for Discovery of Therapies Against Neglected Diseases: A Drug Repurposing Approach. **In Silico Drug Design**, 2019. p. 625–648.

BENZIGER, C. P.; CARMO, G. A. L. DO; RIBEIRO, A. L. P. Chagas Cardiomyopathy: Clinical Presentation and Management in the Americas.

Cardiology Clinics, 2017. v. 35, n. 1, p. 31–47. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccl.2016.08.013>>.

BERGLUND, J. Combating Neglected Tropical Diseases. **IEEE Pulse**, 2019. v. 10, n. 1, p. 10–14.

BERGSTRÖM, F.; LINDMARK, B. Accelerated drug discovery by rapid candidate drug identification. **Drug Discovery Today**, 2019. v. 24, n. 6, p. 1237–1241.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.03.026>>.

BHATTACHARYA, A. *et al.* Of drugs and trypanosomatids: New tools and knowledge to reduce bottlenecks in drug discovery. **Genes**, 2020. v. 11, n. 7, p. 1–24.

BIVONA, A. E. *et al.* Chagas disease vaccine design: the search for an efficient *Trypanosoma cruzi* immune-mediated control. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, 2020. v. 1866, n. 5.

BOCXLAER, K. VAN *et al.* Novel benzoxaborole, nitroimidazole and aminopyrazoles with activity against experimental cutaneous leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 1 dez. 2019. v. 11, p. 129–138.

BOZOROV, K. *et al.* 2-Aminothiophene scaffolds: Diverse biological and pharmacological attributes in medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017. v. 140, p. 465–493. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.039>>.

BRAHMACHARI, G. Therapeutics from natural products against neglected tropical diseases: An overview. **Discovery and Development of Therapeutics from Natural Products Against Neglected Tropical Diseases**, 2019. p. 1–6.

BRANDT, A. M. L. *et al.* Exploring the unbinding of *L. eishmania* (*L.*) *amazonensis*

CPB derived-epitopes from H2 MHC class I proteins. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, abr. 2016. v. 84, n. 4, p. 473–487. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.24994>>.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, 15 set. 2018. v. 392, n. 10151, p. 951–970. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S0140673618312042/fulltext>>. Acesso em: 21 abr. 2021.

CAPELA; MOREIRA; LOPES. An Overview of Drug Resistance in Protozoal Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, 15 nov. 2019. v. 20, n. 22, p. 5748. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/22/5748>>.

CARDONA-G, W.; YEPES, A. F.; HERRERA-R, A. Hybrid Molecules: Promising Compounds for the Development of New Treatments Against Leishmaniasis and Chagas Disease. 2018. p. 3637–3679.

CARDOSO, M. V. De O. *et al.* 2-(phenylthio)ethylidene derivatives as anti-Trypanosoma cruzi compounds: Structural design, synthesis and antiparasitic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2019. v. 180, p. 191–203.

CARIDHA, D. *et al.* Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for cutaneous leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 2019. v. 11, n. May, p. 106–117. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.06.003>>.

CASGRAIN, P.-A. *et al.* Cysteine Peptidase B Regulates Leishmania mexicana Virulence through the Modulation of GP63 Expression. **PLOS Pathogens**, 18 maio. 2016. v. 12, n. 5, p. e1005658. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005658>>.

CHADHA, N. *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Thiazolidine-2, 4-dione derivatives : Programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2015. v. 23, n. 13, p. 2953–2974. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.071>>.

CHAN, H. C. S. *et al.* Advancing Drug Discovery via Artificial Intelligence. **Trends in Pharmacological Sciences**, 2019. v. 40, n. 8, p. 592–604.

CHAO, C.; LEONE, J. L.; VIGLIANO, C. A. BBA - Molecular Basis of Disease

Chagas disease : Historic perspective ☆. 2020. v. 1866, n. January.

CHEN, L. *et al.* **Transition-Metal-Free Sulfuration/Annulation of Alkenes: Economical Access to Thiophenes Enabled by the Cleavage of Multiple C-H Bonds.** *Organic Letters*. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30460854/>>. Acesso em: 20 ago. 2020.

CHEN, X. *et al.* Bioisosterism-based design and enantiomeric profiling of chiral hydroxyl-substituted biphenyl-diarylpyrimidine nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 15 set. 2020. v. 202, p. 112549.

CIANNI, L. *et al.* Leveraging the cruzain S3 subsite to increase affinity for reversible covalent inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, 2018. v. 79, n. April, p. 285–292. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.04.006>>.

_____ *et al.* Can Cysteine Protease Cross-Class Inhibitors Achieve Selectivity? **Journal of Medicinal Chemistry**, 2019. v. 62, n. 23, p. 10497–10525.

COA J. C., CASTRILLÓN W., CARDONA W., CARDA M., OSPINA V., MUÑOZ J. A., V. I. D.; M., R. S. Synthesis, leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activity of quinoline-hydrazone hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2015. v. 101, p. 746–753. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.07.018>>.

CORTÉS-RUIZ, E. M. *et al.* Computational Methods to Discover Compounds for the Treatment of Chagas Disease. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, 2018. v. 113, p. 119–142.

CORTES-SERRA, N. *et al.* State-of-the-art in host-derived biomarkers of Chagas disease prognosis and early evaluation of anti-Trypanosoma cruzi treatment response. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, 2020. v. 1866, n. 7.

CORTES, S. *et al.* Potential of the natural products against leishmaniasis in Old World - a review of in-vitro studies. **Pathogens and Global Health**, 2020. v. 114, n. 4, p. 170–182. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1754655>>.

COSTA, L. B. *et al.* Compound profiling and 3D-QSAR studies of hydrazone derivatives with activity against intracellular Trypanosoma cruzi. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 15 abr. 2016. v. 24, n. 8, p. 1608–1618. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26964673/>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

CRISTOVÃO-SILVA, A. C. *et al.* Chagas Disease Treatment and Rational Drug Discovery: A Challenge That Remains. **Frontiers in Pharmacology**, 2019. v. 10, n. JULY, p. 1–6.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, 3 maio. 2017. v. 7, n. 1, p. 42717. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep42717>>.

DAS, D.; SIKDAR, P.; BAIRAGI, M. Recent developments of 2-aminothiazoles in medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2016. v. 109, p. 89–98.

DAUDA, M. *et al.* Journal of Infection and Public Health Scientometric analysis of global trypanosomiasis research : 1988 – 2017. **Journal of Infection and Public Health**, 2020. v. 13, n. 4, p. 514–520. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.10.006>>.

DIAS, J. The beginning of Chagas Disease control (homage to Dr. Emmanuel Dias, the pioneer of Chagas Disease control, in the year of his birth centenary). 2011. p. 12–18.

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J. **Social and medical aspects on Chagas disease management and control**. Second Edi ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2017.

DNDI. K777 (Chagas) | DNDi. 2014. Disponível em: <<https://dndi.org/research-development/portfolio/k777/>>. Acesso em: 18 ago. 2020.

_____. Fexinidazole for Chagas | DNDi. 2020a. Disponível em: <<https://dndi.org/research-development/portfolio/fexinidazole-chagas/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

_____. DNDI-6148 | DNDi. 2020b. Disponível em: <<https://dndi.org/research-development/portfolio/dndi-6148/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. **Biochemistry of Trypanosoma cruzi**. Second Edi ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2017.

DU, X. *et al.* Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents. **Chemistry and Biology**, 2000. v. 7, n. 9, p. 733–742.

EBERLE, C. *et al.* Improved Inhibitors of Trypanothione Reductase by Combination of Motifs : Synthesis , Inhibitory Potency , Binding Mode , and Antiprotozoal Activities. 2011. p. 292–301.

ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, C. A. A m e r i c a n T r y p a n o s o m i a s i s (Chagas Disease) Chagas disease Cardiomyopathy Heart failure Trypanosomiasis Parasitology. 2019a. v. 33, p. 119–134.

_____; _____. A m e r i c a n T r y p a n o s o m i a s i s (Chagas Disease) Chagas disease Cardiomyopathy Heart failure Trypanosomiasis Parasitology.

Infectious Disease Clinics of NA, 2019b. v. 33, n. 1, p. 119–134. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.015>>.

ELTSOV, O. S.; MOKRUSHIN, V. S.; TKACHEV, A. V. Synthesis of novel derivatives of 2-(azolylimino)thiazoline. **Russian Chemical Bulletin**, 2004. v. 53, n. 10, p. 2293–2302.

F., A. *et al.* Recent Development of Visceral Leishmaniasis Treatments: Successes, Pitfalls, and Perspectives. **Clinical microbiology reviews**, 2018. v. 31, n. 4, p. 1–30. Disponível em:

<<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L625481358%0Ahttp://dx.doi.org/10.1128/CMR.00048-18>>.

FANG, Z. *et al.* **Conformational restriction: An effective tactic in 'follow-on'-based drug discovery. Future Medicinal Chemistry**. Future Science. Disponível em: <<http://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc.14.50>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

FÉLIX, M. B. *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Antileishmanial activity of new thiophene – indole hybrids : Design , synthesis , biological and cytotoxic evaluation , and chemometric studies. 2016. v. 24, p. 3972–3977.

FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, Adriano D. Targeting cysteine proteases in trypanosomatid disease drug discovery. **Pharmacology and Therapeutics**, 2017a. v. 180, p. 49–61. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.06.004>>.

_____; _____. Targeting cysteine proteases in trypanosomatid disease drug discovery. **Pharmacology and Therapeutics**, 2017b. v. 180, p. 49–61. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.06.004>>.

FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, Adriano D. Pharmacology & Therapeutics Targeting cysteine proteases in trypanosomatid disease drug discovery.

Pharmacology and Therapeutics, 2017. v. 180, p. 49–61. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.06.004>>.

FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, Adriano D. Drugs and vaccines in the 21st century for neglected diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, 2019a. v. 19, n. 2, p. 125–127.

_____; _____. ADMET modeling approaches in drug discovery. **Drug Discovery Today**, maio. 2019b. v. 24, n. 5, p. 1157–1165. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644618303301>>.

FIELD, M. C. *et al.* Anti-trypanosomatid drug discovery: An ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology**, 2017. v. 15, n. 4, p. 217–231.

FIGUEIREDO DINIZ, L. DE *et al.* Outcome of E1224-Benznidazole combination treatment for infection with a multidrug-resistant trypanosoma cruzi strain in mice.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1 jun. 2018. v. 62, n. 6. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

FLOOD, A. *et al.* Thiophene/thiazole-benzene replacement on guanidine derivatives targeting a 2-Adrenoceptors. 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.008>>. Acesso em: 23 ago. 2020.

FOLQUITTO, L. R. S. *et al.* Synthesis, protease inhibition, and antileishmanial activity of new benzoxazoles derived from acetophenone or benzophenone and synthetic precursors. **Medicinal Chemistry Research**, 10 jun. 2017. v. 26, n. 6, p. 1149–1159.

Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00044-017-1824-y>>.

FRANCISCO, A. F. *et al.* Limited ability of posaconazole to cure both acute and chronic Trypanosoma cruzi infections revealed by highly sensitive in vivo imaging.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1 ago. 2015. v. 59, n. 8, p. 4653–4661.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26014936/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

FRANCO, J.; SCARONE, L.; COMINI, M. A. **Drugs and Drug Resistance in African and American Trypanosomiasis**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2018. V. 51.

FRECENTESE, F. *et al.* Microwave Assisted Organic Synthesis of Heterocycles in

Aqueous Media : Recent Advances in Medicinal Chemistry. 2016. p. 1–13.

FREIRE-DE-LIMA, L. *et al.* The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three decades of studies. **Glycobiology**, 2015. v. 25, n. 11, p. 1142–1149.

FUJITA, D. M.; NASCIMENTO, M. S.; ANDRADE JÚNIOR, H. F. DE. The oral transmission of chagas disease in Brazil: New food supplies and travel experience. **Acta Tropica**, 2019. v. 197, n. November 2018, p. 2018–2019.

GALLANT, J. P. *et al.* The role of natural selection in shaping genetic variation in a promising Chagas disease drug target: *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Infection, Genetics and Evolution**, 2018. v. 62, p. 151–159.

GANESAN, M. *et al.* Phytochemicals reverse P-glycoprotein mediated multidrug resistance via signal transduction pathways. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 1 jul. 2021. v. 139, p. 111632.

GEWALD, K. **METHODS FOR THE SYNTHESIS OF 2-AMINOTHIOPHENES AND THEIR REACTIONS (REVIEW)**. [S.l.]: [s.n.], 1976.

GEWALD, Karl; SCHINKE, E. Heterocyclen aus CH-aciden Nitrilen, X. Notiz zur Reaktion von Aceton mit Cyanessigester und Schwefel. **Chemische Berichte**, 1 ago. 1966. v. 99, n. 8, p. 2712–2715. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cber.19660990846>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

GHOSH, S. *et al.* **Oxidative stress in schistosomiasis, echinococcosis, and trypanosomiasis: a therapeutic approach**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2019. V. 2013.

GODOY, A. S. De *et al.* ScienceDirect Structural and mechanistic insight from antiviral and antiparasitic enzyme drug targets for tropical infectious diseases. 2019. p. 65–72.

GOMES, C. *et al.* American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission. **International Journal of Infectious Diseases**, 2019. v. 81, p. 81–84.

GUARNER, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Seminars in Diagnostic Pathology**, 2019. v. 36, n. 3, p. 164–169.

GUHL, F. **Geographical distribution of Chagas disease**. Second Edi ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2017.

HAVRYLYUK, D. *et al.* European Journal of Medicinal Chemistry Synthetic

approaches , structure activity relationship and biological applications for pharmacologically attractive pyrazole / pyrazoline e thiazolidine-based hybrids.

European Journal of Medicinal Chemistry, 2016. v. 113, p. 145–166. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.030>>.

HEFNAWY, A. *et al.* Exploiting Knowledge on Leishmania Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs. **Trends in Parasitology**, 2017. v. 33, n. 3, p. 162–174. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.003>>.

HONGMAO, S. **Homology Modeling and Ligand-Based Molecule Design**. [S.I.]: Elsevier Ltd., 2016.

HOTEZ, P. J. The rise or fall of neglected tropical diseases in East Asia Pacific. **Acta Tropica**, 2020. v. 202, n. February 2019.

_____; LO, N. C. **Neglected Tropical Diseases: Public Health Control Programs and Mass Drug Administration**. Tenth Edit ed. [S.I.]: Elsevier Inc., 2020.

JACOMINI, A. P. *et al.* European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis and evaluation against Leishmania amazonensis of novel pyrazolo [3 , 4- d] pyridazinone- N -acylhydrazone- (bi) thiophene hybrids. 2016. v. 124, p. 340–349.

JAGU, E.; POMEL, S.; PETHE, S.; *et al.* Polyamine-based analogs and conjugates as antikinoplastid agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017. v. 139, p. 982–1015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.014>>.

_____; _____; DIEZ-MARTINEZ, A.; *et al.* Synthesis and in vitro antikinoplastid activity of polyamine–hydroxybenzotriazole conjugates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2017. v. 25, n. 1, p. 84–90. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.10.013>>.

JI RAM, V. *et al.* Five-Membered Heterocycles. **The Chemistry of Heterocycles**. [S.I.]: Elsevier, 2019, p. 149–478.

JIA, C.-Y. *et al.* A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug discovery. **Drug Discovery Today**, jan. 2020. v. 25, n. 1, p. 248–258. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644619304180>>.

JUDICE, W. A. S. *et al.* Cysteine proteases as potential targets for anti-trypanosomatid drug discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, set. 2021. v. 46, p. 116365. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089621003734>>.

KAISER, M. *et al.* Repurposing of the open access malaria box for kinetoplastid diseases identifies novel active scaffolds against trypanosomatids. **Journal of Biomolecular Screening**, 4 jun. 2015. v. 20, n. 5, p. 634–645.

KATSILA, T. *et al.* Computational approaches in target identification and drug discovery. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2016. v. 14, p. 177–184. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2016.04.004>>.

KAUR, Ramandeep *et al.* Synthetic and medicinal perspective of thiazolidinones: A review. **Bioorganic Chemistry**, 2017. v. 75, p. 406–423. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.10.014>>.

KERI, R. S. *et al.* An overview of benzo[b]thiophene-based medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017. v. 138, p. 1002–1033. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.038>>.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, 2015. v. 33, n. 3, p. 579–593. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2015.03.018>>.

KHANNA, V.; RANGANATHAN, S.; PETROVSKY, N. **Rational Structure-Based Drug Design**. [S.l.]: Elsevier Ltd., 2019.

KHARE, S. *et al.* Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. **Nature**, 8 ago. 2016. v. 537, n. 7619, p. 229–233. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27501246/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

KLUG, D. M.; GELB, M. H.; POLLASTRI, M. P. Repurposing strategies for tropical disease drug discovery. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2016. v. 26, n. 11, p. 2569–2576. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.103>>.

KRATZ, J. M. Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. **Acta Tropica**, 2019. v. 198, n. April.

KRYSHCHYSHYN, A. *et al.* Thiazolidinone/thiazole based hybrids – New class of antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2019. v. 174, p. 292–308.

LANA, M. DE; MENEZES MACHADO, E. M. DE. **Biology of Trypanosoma cruzi**

and biological diversity. Second Edi ed. [S.I.]: Elsevier Inc., 2017.

LARA, L. S. *et al.* Efficacy of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinone derivatives against different *Trypanosoma cruzi* discrete type units: Identification of a promising hit compound. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2018. v. 144, n. 2018, p. 572–581. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.052>>.

LASAKOSVITSCH, F. *et al.* Cloning and characterisation of a cysteine proteinase gene expressed in amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis*. **International Journal for Parasitology**, abr. 2003. v. 33, n. 4, p. 445–454. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751903000109>>.

LEE, B. Y. *et al.* Global economic burden of Chagas disease: A computational simulation model. **The Lancet Infectious Diseases**, 2013. v. 13, n. 4, p. 342–348.

LEITE, F. H. A. *et al.* Structure-guided discovery of thiazolidine-2,4-dione derivatives as a novel class of *Leishmania major* pteridine reductase 1 inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2016. v. 123, p. 639–648.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Beyond Bioisosterism: New Concepts in Drug Discovery. **Comprehensive Medicinal Chemistry III**. [S.I.]: Elsevier Inc., 2017, V. 1–8, p. 186–210.

LIU, Xiong; THOMAS, C. E.; FELDER, C. C. The impact of external innovation on new drug approvals: A retrospective analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, 2019. v. 563, n. August 2018, p. 273–281. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.093>>.

LÓPEZ-LÓPEZ, E. *et al.* In silico tools to study molecular targets of neglected diseases: inhibition of TcSir2rp3, an epigenetic enzyme of *Trypanosoma cruzi*. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876162320300481>>. Acesso em: 22 ago. 2020.

LÓPEZ-VÉLEZ, R.; NORMAN, F. F.; BERN, C. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *In*: RYAN, E. T. *et al.* (Org.). **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease**. Tenth Edit ed. Edingurgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney: Elsevier Inc., 2020, p. 762–775.

LUQUETTI, A. O.; SCHMUÑIS, G. A. **Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection**.

[S.l.]: [s.n.], 2017.

MACHADO, P. De A. *et al.* Leishmanicidal therapy targeted to parasite proteases. **Life Sciences**, 2019. v. 219, n. October 2018, p. 163–181. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.01.015>>.

MAGALHAES MOREIRA, D. R. *et al.* Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* compounds which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2014. v. 75, p. 467–478.

MAJUMDER, S.; KIERSZENBAUM, K. N , N ' -Thiophene-substituted polyamine analogs inhibit mammalian host cell invasion and intracellular multiplication of *Trypanosoma cruzi* 2 . NH .(O 7 . NH .(OH. 1993. v. 60, p. 231–239.

MARTÍN-ESCOLANO, R. *et al.* New polyamine drugs as more effective antichagas agents than benznidazole in both the acute and chronic phases. **European journal of medicinal chemistry**, 2019. v. 164, p. 27–46. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30583247>>.

MARTINEZ-MAYORGA, K. *et al.* Cruzain inhibitors: efforts made, current leads and a structural outlook of new hits. **Drug Discovery Today**, 2015. v. 20, n. 7, p. 890–898.

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* The burden of Neglected Tropical Diseases in Brazil, 1990-2016: A subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2018. v. 12, n. 6, p. 1–24.

MASOOD, M. M. *et al.* Anti-leishmanial and cytotoxic activities of amino acid-triazole hybrids: Synthesis, biological evaluation, molecular docking and in silico physico-chemical properties. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2017. v. 27, n. 9, p. 1886–1891. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.03.049>>.

MASSARICO SERAFIM, R. A. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of hybrid bioisoster derivatives of N-acylhydrazone and furoxan groups with potential and selective anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 23 jul. 2014. v. 82, p. 418–425.

MATHEW, N. S.; NEGI, P. S. **Plant-derived compounds against protozoan neglected diseases: toward sustainable drug development**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2019.

MATOS, T. K. B. *et al.* Synthesis and matched molecular pair analysis of covalent reversible inhibitors of the cysteine protease CPB. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, set. 2020. v. 30, n. 18, p. 127439. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X20305503>>.

MILES, M. A. **Chagas Disease (American Trypanosomiasis)**. Fourth Edi ed. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2017.

MILLS, R. M. Chagas Disease. Epidemiology and Barriers to Treatment. **The American Journal of Medicine**, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. **Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico**, 2019. v. 50, p. 10. Disponível em:

<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/23/2018-025.pdf>>.

MINISTERIO DA SAÚDE DO BRASIL. Boletim Epidemiológico: Panorama da doença de Chagas no Brasil. **Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde**, 2019. v. 50, n. 36, p. 1–14.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL; SAÚDE, S. De V. Em. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. *Bol Epidemiol.* 2020. v. 51, p. 1–43.

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A. **The use of posaconazole against Chagas disease. Current Opinion in Infectious Diseases**. Lippincott Williams and Wilkins. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26203852/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

MONCAYO; SILVEIRA, A. C. **Current epidemiological trends of Chagas disease in Latin America and future challenges: Epidemiology, surveillance, and health policies**. Second Edi ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2017.

MORAES, T. De *et al.* European Journal of Medicinal Chemistry New 1 , 3-thiazole derivatives and their biological and ultrastructural effects on *Trypanosoma cruzi* Paulo Andr e Diogo Rodrigo Magalh a Brayner dos Santosd d , Gla e. 2016. v. 121.

MORETTI, N. S.; MORTARA, R. A.; SCHENKMAN, S. *Trypanosoma cruzi* Trends in Parasitology | Parasite of the Month. **Trends in Parasitology**, 2019a. v. xx, n. xx, p. 10–11. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.002>>.

_____; _____. *Trypanosoma cruzi* Trends in Parasitology | Parasite of the

Month. **Trends in Parasitology**, 2019b. v. xx, n. xx, p. 10–11. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.002>>.

MULLARD, A. **Merck & Co. drops osteoporosis drug odanacatib. Nature reviews. Drug discovery.**

MUSA, M. A. *et al.* Lymphocytes influence *Leishmania major* pathogenesis in a strain-dependent manner. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2019. v. 13, n. 11, p. 1–15.

NANJAN, M. J. *et al.* Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. **Bioorganic Chemistry**, 2018. v. 77, p. 548–567. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.02.009>>.

NASCIMENTO, I. *et al.* The Role of Thiophene Core in Medicinal Chemistry of Neglected Tropical Diseases. *In*: SILVA-JÚNIOR, Edeildo Ferreira (Org.). **Advances in Medicinal Chemistry Research**. 1. ed. New York: Nova Science, 2019, p. 127–180.

_____ *et al.* Molecular Modeling Applied to Design of Cysteine Protease Inhibitors – A Powerful Tool for the Identification of Hit Compounds Against Neglected Tropical Diseases. **Frontiers in computational chemistry**. [S.l.]: [s.n.], 2020, V. 5, p. 1–48.

NAVEEN *et al.* Design, synthesis, biological activity, molecular docking and computational studies on novel 1,4-disubstituted-1,2,3-Triazole-Thiosemicarbazone hybrid molecules. **Journal of Molecular Structure**, 5 jun. 2020. v. 1209, p. 127951.

NAZARÉ CORREIA SOEIRO, M. DE *et al.* In vitro and in vivo studies of the antiparasitic activity of sterol 14 α -demethylase (CYP51) INHIBITOR VNI against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, set. 2013. v. 57, n. 9, p. 4151–4163. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23774435/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

NDAO, M. *et al.* Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a chagas disease cure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, fev. 2014. v. 58, n. 2, p. 1167–1178. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3910870/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23774435/)>. Acesso em: 18 ago. 2020.

NEPALI, K. *et al.* Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. **European Journal of**

Medicinal Chemistry, 2014. v. 77, p. 422–487. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.018>>.

NERES, J. *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Discovery of novel inhibitors of Trypanosoma cruzi trans -sialidase from in silico screening. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2020. v. 19, n. 3, p. 589–596. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.12.065>>.

NUNES, T. A. De L. *et al.* Curzerene antileishmania activity: Effects on Leishmania amazonensis and possible action mechanisms. **International**

Immunopharmacology, nov. 2021. v. 100, p. 108130. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576921007669>>.

OGINDO, C. O. *et al.* Novel drug design for Chagas disease via targeting Trypanosoma cruzi tubulin: Homology modeling and binding pocket prediction on Trypanosoma cruzi tubulin polymerization inhibition by naphthoquinone derivatives.

Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2016. v. 24, n. 16, p. 3849–3855. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.06.031>>.

OHNISHI, K. *et al.* Evaluation of a non-prime site substituent and warheads combined with a decahydroisoquinolin scaffold as a SARS 3CL protease inhibitor.

Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2019. v. 27, n. 2, p. 425–435.

OLÍMPIO DA SILVA, A. *et al.* Synthesis and biological activity against Trypanosoma cruzi of substituted 1,4-naphthoquinones. **European Journal of Medicinal**

Chemistry, 2013. v. 60, p. 51–56. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.11.034>>.

OLIVEIRA FILHO, G. B. DE *et al.* Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of thiazoles against Trypanosoma cruzi. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017. v. 141, p. 346–361.

PADILLA, A. M.; BRANDAN, C. P.; BASOMBRÍO, M. A. Vaccine development for Chagas disease. **American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition**, 2017. p. 773–796.

PANTELEEV, J.; GAO, H.; JIA, L. Recent applications of machine learning in medicinal chemistry. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2018. v. 28, n. 17, p. 2807–2815.

PARK, S. R. *et al.* 2-Methylacrylamide as a bioisoster of thiourea group for 1,3-dibenzylthioureido TRPV1 receptor antagonists. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 15 jun. 2018. v. 28, n. 11, p. 2080–2083.

PARK, S. Y. *et al.* Structural basis of the cystein protease inhibitor Clonorchis sinensis Stefin-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2018. v. 498, n. 1, p. 9–17. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.196>>.

PATHANIA, S.; KUMAR, R.; RAWAL, R. K. European Journal of Medicinal Chemistry Role of sulphur-heterocycles in medicinal chemistry : An update. 2019. v. 180, p. 486–508.

_____; NARANG, R. K.; RAWAL, R. K. Role of sulphur-heterocycles in medicinal chemistry: An update. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2019. v. 180, p. 486–508. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.07.043>>.

PAVANA, R. K. *et al.* Sterically induced conformational restriction: Discovery and preclinical evaluation of novel pyrrolo[3,2-d]pyrimidines as microtubule targeting agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 1 nov. 2018. v. 26, n. 20, p. 5470–5478.

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

PESSOA-MAHANA, C. D. *et al.* STUDIES ON QUINONES . PART 36 . ' SYNTHESIS AND TRYPANOCIDAL ACTIVITY OF. **Heterocyclic communications**, 2002. v. 8, n. 2, p. 135–140.

PRADINES, B. P-glycoprotein-like Transporters in Leishmania: A Search for Reversal Agents. **Drug Resistance in Leishmania Parasites**. Vienna: Springer Vienna, 2013, p. 381–404.

PRAJAPATI, N. P. *et al.* Thiazole fused thiosemicarbazones: Microwave-assisted synthesis, biological evaluation and molecular docking study. **Journal of Molecular Structure**, 2019. v. 1179, p. 401–410.

PRAMANIK, P. K. *et al.* Drug Resistance in Protozoan Parasites: An Incessant Wrestle for Survival. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.023>>.

PRIETO-MARTÍNEZ, F. D. *et al.* Computational Drug Design Methods—Current and Future Perspectives. In **Silico Drug Design**, 2019. n. 3, p. 19–44.

RASHID, U. *et al.* Structure based medicinal chemistry-driven strategy to design substituted dihydropyrimidines as potential antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2016. v. 115, p. 230–244. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.022>>.

RASSI, A. *et al.* **Clinical phases and forms of Chagas disease**. Second Edi ed. [S.I.]: Elsevier Inc., 2017.

RAWAT, A. *et al.* Cysteine proteases: Battling pathogenic parasitic protozoans with omnipresent enzymes. **Microbiological Research**, ago. 2021. v. 249, p. 126784. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501321000902>>.

RIBEIRO, V. *et al.* Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 2020. v. 12, n. December 2019, p. 7–17. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.11.004>>.

ROBERTS, D. J. **Hematologic Aspects of Parasitic Diseases**. Seventh Ed ed. [S.I.]: Elsevier Inc., 2018.

ROBINSON, K.; TIRIVEEDHI, V. Perplexing Role of P-Glycoprotein in Tumor Microenvironment. **Frontiers in Oncology**, 5 mar. 2020. v. 10, p. 265. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.00265/full>>.

ROCHA, D. A. *et al.* Synthesis and structure-activity relationship studies of cruzain and rhodesain inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2018. v. 157, p. 1426–1459.

ROQUERO, I. *et al.* Novel chemical starting points for drug discovery in leishmaniasis and Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 2019. v. 10, n. October 2018, p. 58–68.

ROSE, E.; CARVALHO, J. L.; HECHT, M. Mechanisms of DNA repair in *Trypanosoma cruzi*: What do we know so far? **DNA Repair**, 2020. v. 91–92, n. May.

SÁNCHEZ-VEGA, J. T. *et al.* A case report of Chagas disease in acute phase diagnosed by xenodiagnosis. **Parasitology International**, 2020. v. 77, n. 3000, p. 2019–2020.

- SANG, Y. *et al.* Conformational restriction design of thiophene-biphenyl-DAPY HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 15 nov. 2019. v. 182, p. 111603.
- SANTOS-VALLE, A. B. C. *et al.* Nanomedicine strategies for addressing major needs in neglected tropical diseases. **Annual Reviews in Control**, 2019. n. xxxx. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.arcontrol.2019.08.001>>.
- SANTOS, É.; MENEZES FALCÃO, L. Chagas cardiomyopathy and heart failure: From epidemiology to treatment. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, 2020. v. 39, n. 5.
- SANTOS NASCIMENTO, I. J. DOS; AQUINO, Thiago Mendonça DE; SILVA-JÚNIOR, Edeildo Ferreira DA. Cruzain and Rhodesain Inhibitors: Last Decade of Advances in Seeking for New Compounds Against American and African Trypanosomiasis. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, ago. 2021. v. 21, n. 21, p. 1871–1899. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/192561/article>>.
- SCARIM, C. B. *et al.* Current advances in drug discovery for Chagas disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2018. v. 155, p. 824–838.
- _____ *et al.* Thiazole, thio and semicarbazone derivatives against tropical infective diseases: Chagas disease, human African trypanosomiasis (HAT), leishmaniasis, and malaria. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2019. v. 162, p. 378–395.
- SCHIJMAN, A. G. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, 2018. v. 184, n. February, p. 59–66. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.019>>.
- SEGRETTI, N. D. *et al.* New antibacterial agents: Hybrid bioisoster derivatives as potential *E. coli* FabH inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 15 ago. 2016. v. 26, n. 16, p. 3988–3993.
- SERAFIM, T. D.; INIGUEZ, E.; OLIVEIRA, F. *Leishmania infantum*. **Trends in Parasitology**, 2019. v. xx, n. xx, p. 6–7. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.006>>.
- SHAO, W.; KALDAS, S. J.; YUDIN, A. K. 3-Cyanoallyl boronates are versatile building blocks in the synthesis of polysubstituted thiophenes. **Chemical Science**, 30 maio. 2017. v. 8, n. 6, p. 4431–4436. Disponível em:

<<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/sc/c7sc00831g>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

SHARMA, R. *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Triazino indole – quinoline hybrid : A novel approach to antileishmanial agents. 2014. v. 24, p. 298–301.

SIKLOS, M.; BENAÏSSA, M.; THATCHER, G. R. J. Cysteine proteases as therapeutic targets: Does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2015. v. 5, n. 6, p. 506–519. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2015.08.001>>.

SILVA-JÚNIOR, E. F. *et al.* Design, synthesis, molecular docking and biological evaluation of thiophen-2-iminothiazolidine derivatives for use against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2016. v. 24, n. 18, p. 4228–4240.

SILVA-JUNIOR, E. F. DA *et al.* Molecular Docking Studies Applied to a Dataset of Cruzain Inhibitors. **Current Computer-Aided Drug Design**, 2017. v. 14, n. 1, p. 68–78.

SILVA-JÚNIOR, E F *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Design , synthesis , molecular docking and biological evaluation of thiophen-2-iminothiazolidine derivatives for use against *Trypanosoma cruzi*. 2016. v. 24, p. 4228–4240.

SILVA-JÚNIOR, Edeildo F.; SCHIRMEISTER, T.; ARAÚJO-JÚNIOR, João X. DE. **Promising trypanocidal heterocyclic compounds of natural origin and their synthetic analogs**. [S.l.]: [s.n.], 2019.

SILVA, D. G. *et al.* A comparative study of warheads for design of cysteine protease inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2017. v. 27, n. 22, p. 5031–5035. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.10.002>>.

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

SILVA, F. T. *et al.* Design, synthesis and antitrypanosomal activity of some nitrofurazone 1,2,4-triazolic bioisosteric analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 4 out. 2016. v. 121, p. 553–560. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27318979/>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

SILVA SANTOS-JÚNIOR, P. F. DA *et al.* Sterol 14 α -Demethylase from Trypanosomatidae Parasites as a Promising Target for Designing New Antiparasitic Agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 3 mar. 2021. v. 21, p. 1–22. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/192033/article>>.

SIQUEIRA-NETO, Jair L. *et al.* **Cysteine proteases in protozoan parasites. PLoS Neglected Tropical Diseases**. Public Library of Science. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6107107/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34811117/)>. Acesso em: 19 ago. 2020.

SOUZA, M. L. DE *et al.* Discovery of Potent, Reversible, and Competitive Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity: A Structure-Based Drug Design Approach. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 24 fev. 2020. v. 60, n. 2, p. 1028–1041. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.9b00802>>. Acesso em: 20 ago. 2020.

SwissADME. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.swissadme.ch/>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

TAYEBEE, R. *et al.* Commercial zinc oxide: A facile, efficient, and eco-friendly catalyst for the one-pot three-component synthesis of multisubstituted 2-aminothiophenes via the Gewald reaction. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, 7 nov. 2012. v. 51, n. 44, p. 14577–14582. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie301737h>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **Journal of Parasitic Diseases**, 16 jun. 2020. v. 44, n. 2, p. 253–272. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12639-020-01212-w>>.

THOMPSON, A. B.; CAMACHO-GONZALEZ, A. F. **Trypanosoma Species (Trypanosomiasis)**. Fifth Edit ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2018.

TORRICO, F. *et al.* Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, 1 abr. 2018. v. 18, n. 4, p. 419–430. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29352704/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

TRIPATHI, A. *et al.* Design and development of molecular hybrids of 2-pyridylpiperazine and 5-phenyl-1,3,4-oxadiazoles as potential multifunctional agents

to treat Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 1 dez. 2019. v. 183, p. 111707.

TUNCEL, S. T. *et al.* Thioureas and their cyclized derivatives: Synthesis, conformational analysis and antimicrobial evaluation. **Journal of Molecular Structure**, 2019. v. 1179, p. 40–56.

TZIZIK, D. M.; BORCHARDT, R. A. Chagas disease. **Journal of the American Academy of Physician Assistants**, 2018. v. 31, n. 12, p. 30–33.

VALDERRAMA, J. A. *et al.* Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of thiophene ring-containing quinones. **Chem. Pharm. Bull**, 1999. v. 47, n. 9, p. 1221–1226.

VERMELHO, A. B.; RODRIGUES, G. C.; SUPURAN, C. T. Why hasn't there been more progress in new Chagas disease drug discovery? **Expert Opinion on Drug Discovery**, 2019. v. 00, n. 00, p. 1–14. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1681394>>.

VILLALTA, F.; RACHAKONDA, G. Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, 2019a. v. 14, n. 11, p. 1161–1174. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1652593>>.

_____; _____. **Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. Expert Opinion on Drug Discovery**. Taylor and Francis Ltd. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32779130/>>. Acesso em: 19 ago. 2020b.

WAHID, S. *et al.* Atenolol thiourea hybrid as potent urease inhibitors: Design, biology-oriented drug synthesis, inhibitory activity screening, and molecular docking studies. **Bioorganic Chemistry**, 1 jan. 2020. v. 94, p. 103359.

WARD, D. J. *et al.* Highly tunable thiosulfonates as a novel class of cysteine protease inhibitors with anti-parasitic activity against *Schistosoma mansoni*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2019. v. 27, n. 13, p. 2857–2870. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.05.014>>.

WHO | World Health Organization. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 14 nov. 2020.

WHO, W. H. O. Leishmaniasis. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 15 nov. 2020.

WIGGERS, H. J. *et al.* Non-peptidic Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity

Discovered by Virtual Screening and In Vitro Assay. 2013. v. 7, n. 8.

WILTGEN, M. **Algorithms for Structure Comparison and Analysis: Homology Modelling of Proteins**. [S.l.]: Elsevier Ltd., 2019. V. 1.

WIPF, P.; SKODA, E. M.; MANN, A. Conformational Restriction and Steric Hindrance in Medicinal Chemistry. **The Practice of Medicinal Chemistry: Fourth Edition**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2015, p. 279–299.

WOOD, J. D. Chagas ' Disease. 2019. n. May, p. 293–294.

_____; OHIO, T.; STATES, U. Chagas ' Disease. 2019. n. May, p. 293–294.

XIE, S. C. *et al.* The proteasome as a target for protozoan parasites The proteasome as a target for protozoan parasites. 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iet20>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

YAMILE VARGAS-MÉNDEZ, L.; KOUZNETSOV, V. V. Cruzain Inhibitors as Prominent Molecules with The Potential to become Drug Candidates against Chagas Disease. **Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Research**, 2019. v. 2, n. 3, p. 1–7.

YANG, Yudong; KADAM, V. D.; YOU, J. Thiophenes and Their Benzo Derivatives: Reactivity. **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. [S.l.]: Elsevier, 2019.

ZHENG, Y.; TICE, C. M.; SINGH, S. B. **Conformational control in structure-based drug design**. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. Elsevier Ltd.

ZMUDA, F. *et al.* Identification of novel trypanosoma cruzi proteasome inhibitors using a luminescence-based high-throughput screening assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1 set. 2019. v. 63, n. 9. Disponível em: <<http://aac.asm.org/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, 2017. v. 22, n. 10, p. 1516–1531. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.004>>.

APÊNDICES

Apêndice A – Publicação do capítulo de livro “The role of thiophene core in medicinal chemistry of neglected tropical disease” baseado na revisão escrita nesta tese de doutorado.

In: *Advances in Medicinal Chemistry* ... ISBN: 978-1-53616-368-1
Editor: E. Ferreira da Silva-Júnior © 2019 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 3

**THE ROLE OF THIOPHENE CORE
IN MEDICINAL CHEMISTRY OF
NEGLECTED TROPICAL DISEASES**

*Igor José dos Santos Nascimento¹, PhD,
Paulo Fernando da Silva Santos Júnior², PhD,
Rodrigo Santos Aquino de Araújo², PhD,
Francisco Jaime B. Mendonça-Junior², PhD
and Thiago Mendonça de Aquino^{2*}, PhD*

¹Laboratory of Medicinal Chemistry,
Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil

²Laboratory of Synthesis and Drug Delivery,
State University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

ABSTRACT

Thiophene scaffold and its derivatives 2-aminothiophene, nitrothiophene, and benzo[*b*]thiophene are privileged structures in drug

* Corresponding Author's E-mail: thiago.aquino@iqb.ufpb.br.

Apêndice B – Publicação do capítulo de livro “Molecular modeling applied to design of cysteine protease inhibitors – a powerful tool for the identification of hit compounds against neglected tropical disease” baseado na revisão escrita nesta tese de doutorado.

Frontiers in Computational Chemistry, 2020, Vol. 5, 1-00

1

CHAPTER 3

Molecular Modeling Applied to Design of Cysteine Protease Inhibitors – A Powerful Tool for the Identification of Hit Compounds Against Neglected Tropical Diseases

Igor José dos Santos Nascimento¹, Thiago Mendonça de Aquino¹, Paulo Fernando da Silva Santos-Júnior¹, João Xavier de Araújo-Júnior² and Edeildo Ferreira da Silva-Júnior^{1,2*}

¹ *Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil*

² *Laboratory of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil*

Abstract: Cysteine proteases play numerous and extremely important roles in the life cycle of parasitic organisms with medicinal importance. From general catabolic functions and protein processing, cysteine proteases may be key to parasite immunoevasion, excystment/encystment, and cell and tissue invasion. Parasite cysteine proteases are unusually immunogenic and have been exploited as serodiagnostic markers and vaccine targets. The research focused on the development of new drugs active toward this macromolecular target is an important task, where the rational design is considered as a critical step on it. The discovery of new drugs is a complex and multidisciplinary process, which includes an in-depth knowledge of organic chemistry, pharmacology, biochemistry, computer sciences, and others. This process involves high costs and several scientific fields, leading to the necessity to develop new processes that involve optimization of molecular modeling applied to the identification of bioactive molecules. These techniques could increase the probability of obtaining a rational-designed compound, with high activity and safety, which could be considered as a potential drug in the future. Thus, the use of computational techniques has become increasingly common in medical chemistry laboratories due to their low costs and high correlation with experimental results from assays. A broadly used technique in the rational design of active compounds is molecular docking of small ligand at the active site from the biological targets. In this chapter, we will demonstrate in detail different molecular modeling techniques applied to the development of new inhibitors against cruzain (*Trypanosoma cruzi*); falcipain (*Plasmodium falciparum*); SmHDAC8 (*Schistosoma mansoni*); nsP2 (Chikungunya virus) enzymes; and others, such as cathepsin family; caspase family, 3C^{pro} (Enterovirus 71) and 3CL^{pro} (Coronavirus).

* Corresponding author Edeildo Ferreira da Silva-Júnior: Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil; Tel: (+55)879-9610-8311; E-mail: edeildo.junior@oesufar.ufal.br

Zaheer Ul-Haq and Angela K. Wilson (Eds.)
All rights reserved. © 2020 Bentham Science Publishers

Apêndice C – Publicação do capítulo de livro “Drug Discovery Strategies Against Emerging Coronaviruses: A Global Threat” ao longo do doutorado.

Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery, 2020, Vol. 8, 1-56

1

CHAPTER 8

Drug Discovery Strategies Against Emerging Coronaviruses: A Global Threat

Paulo Fernando da Silva Santos-Júnior¹, Igor José dos Santos Nascimento¹, Thiago Mendonça de Aquino¹, João Xavier de Araújo-Júnior² and Edeildo Ferreira da Silva-Júnior^{1,2,*}

¹ *Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil*

² *Laboratory of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil*

Abstract: After the discovery of the infectious bronchitis virus (IBV) in 1932, *Coronaviridae* emerged as a family of viruses constituted of a positive-sense single-stranded RNA ((+)ssRNA) genome. Recently, the Coronavirus disease-2019 (COVID-19), which is caused by a new virus called SARS-CoV-2 (provisionally titled 2019-nCoV), was declared pandemic since it reached global levels of infection. In comparison, this disease spread globally more quickly than previously reported SARS- and MERS-CoV outbreaks. The impacts on global health systems (as well as the world economy, estimated to cost US\$ 1 trillion) highlighted the urgent need to search for efficient pharmacotherapy targeting potential macromolecules from SARS-CoV-2 since there are no licensed vaccines or approved drugs until today. In this chapter, we will demonstrate all strategies that have been used to discover and design bioactive molecules against this viral infection, compiling from classical to computer-aided drug design, including also the drug repurposing. This last, it is based on analogs produced for past outbreaks related to SARS- and MERS-CoV. Finally, we aim to provide valuable information that could be applied for designing new safe, low cost, and selective lead-compounds against these emerging viruses.

Keywords: Drug Design, Coronaviruses, MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV.

1.0. INTRODUCTION

Coronaviridae term refers to the viruses family known as Coronavirus (CoV), which is potentially contagious to humans and causes severe infection in the res-

* **Corresponding author Edeildo Ferreira da Silva-Júnior:** Chemistry and Biotechnology Institute, Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil; Tel: (+55)-87-9-9610-8311; E-mail: edeildo.junior@esenfar.ufal.br

Apêndice D – Publicação do capítulo de livro “Brief Introduction and Therapeutic Strategies Against the Measles Virus” ao longo do doutorado.

Brief Introduction of Measles Virus and Its Therapeutic Strategies



Igor José dos Santos Nascimento,
Paulo Fernando da Silva Santos-Júnior,
and Edeildo Ferreira da Silva-Júnior

Abstract Measles virus (MV) is an infectious disease related to thousands of deaths in previous outbreaks. Health agencies estimated that approximately 42% of countries would have the eradication of this pathogen. However, the virus remains as a challenging health problem for countries' economies. This pathogen is highly transmissible via the respiratory droplets of infected individuals, which remain in the air and surfaces for several hours, increasing its rate of transmission. Prophylactic vaccination is the most effective strategy in controlling this infection. In recent years, political-economic factors and the anti-vaccine movement have contributed to its reemergence. Despite apparently being a controlled disease, these factors contributed to the increase in the number of cases, including fatalities. Also, there is still no drug used in the disease's clinical management, justifying the investment in new alternatives. This chapter will be addressed to the main advances in new therapies against MV, highlighting *hit* compounds, focusing on non- and nucleoside, peptide, quinoline, retinoid analogs, and other derivatives. Besides the main advances in biological approaches such as glycosaminoglycan and interferon; also immunological approaches exist such as plant-and peptide-based vaccines. Nucleoside and non-nucleoside analogs are the most explored chemical agents, resulting in several promising molecules. Also, natural products could be effective in controlling MV. Finally, advances in immunological strategies, such as discovering new vaccines show that (despite a vaccine's existence) it is necessary to find another more effective and accepted by the population, leading to the definitive eradication of this disease.

Keywords Measles virus · Drug discovery · Viral disease · Vaccines · Rinderpest virus

I. J. dos S. Nascimento · P. F. da S. Santos-Júnior · E. F. da Silva-Júnior (✉)
Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, AL, Brazil
e-mail: edeildo.junior@iqh.ufal.br

E. F. da Silva-Júnior
Laboratory of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Institute,
Federal University of Alagoas, Maceió, AL, Brazil

© The Author(s), under exclusive license to Springer Nature Switzerland AG 2021 503
S. I. Ahmad (ed.), *Human Viruses: Diseases, Treatments and Vaccines*, https://doi.org/10.1007/978-3-030-71165-8_23

Apêndice E – Capítulo de livro aceito para publicação “Peptidomimetic and peptide-derived against 3CL^{pro} from coronaviruses” ao longo do doutorado.

CHAPTER 5

Peptidomimetic and Peptide-Derived Against 3CL^{pro} from Coronaviruses

Paulo Fernando da Silva Santos-Júnior,^a João Xavier de Araújo-Júnior,^b and Edeildo Ferreira da Silva-Júnior*^{a,b}

^a Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil.

^b Laboratory of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil.

*Corresponding author — telephone: (+55)-87-9-9610-8311; email: edeildo.junior@iqb.ufal.br

Apêndice F – Capítulo de livro aceito para publicação “Design of antimalarial compounds on quinoline scaffold: from plant to drug” ao longo do doutorado.

Chapter 23

Design of Antimalarial Compounds on Quinoline Scaffold: From Plant to Drug

Paulo F. S. Santos-Júnior,^a Igor J. S. Nascimento,^a Geraldo J. S. Neto,^c Rafael J. M. Omena,^c Thiago M. Aquino,^{a,b} João X. Araújo-Júnior,^{a,b} Mario R. Meneghetti,^{a,c} and Edeildo F. Silva-Júnior^{*,a,b}

^a Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil.

^b Laboratory of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil.

^c Group of Catalysis and Chemical Reactivity, Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil.

*Corresponding author: Edeildo F. Silva-Júnior Ph.D, Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil. E-mail: edeildo.junior@iqb.ufal.br

Abstract

Plasmodium species are responsible for a high incidence of cases and resistance, even with several approved drugs. Quinoline derivatives are recognized as a source of active compounds, where tafenoquine has been recently approved. Cases of resistance and the indiscriminate use of antimalarials against COVID-19 have negatively contributed to eradicating this disease. In this context, modifications at 2- or 4-amino positions from the quinoline scaffold or even its metal-complexes have shown promising advances in the field, especially against resistant strains such as 3D7, W2, D10, Dd2, K₁, and FCR-3. In this chapter, we discussed all aspects involving such compounds, presenting their results based on SAR analysis and recent contributions/advances involving this classic scaffold arising from nature.

Keywords: Drug discovery, quinoline-based, *Plasmodium* spp, SAR analysis.

Apêndice G – Publicação do artigo “Sterol 14 α -Demethylase from *Trypanosomatidae* Parasites as a Promising Targets for Designing New Antiparasitic Agents” baseado na revisão escrita nesta tese de doutorado.

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Current Topics in Medicinal Chemistry, 2021, 21, 1-22

1

REVIEW ARTICLE

Sterol 14 α -Demethylase from *Trypanosomatidae* Parasites as a Promising Target for Designing New Antiparasitic Agents

Paulo Fernando da Silva Santos-Júnior¹, Martine Schmitt², João Xavier de Araújo-Júnior^{1,3} and Edeildo Ferreira da Silva-Júnior^{1,*}

¹Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió57072-970, Brazil; ²Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Faculté de Pharmacie, UMR7200, CNRS, Université de Strasbourg, Illkirch, France; ³Laboratory of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Institute, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió57072-970, Brazil

Abstract: *Trypanosomatidae* family belongs to the *Kinetoplastida* order, which consists of obligatory parasites that affect plants and all classes of vertebrates, especially humans and insects. Among the heteroxenic parasites, *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* are protozoa of most significant interest for medicinal chemistry, being etiological agents of Leishmaniasis, Chagas, and Sleep Sickness diseases, respectively. Currently, inefficient pharmacotherapy, especially in chronic phases and low selectivity towards parasite/host cells, justifies the need to discover new drugs to treat them effectively. Among other targets, the sterol 14 α -demethylase (CYP51), an enzyme responsible for ergosterol's biosynthesis in *Trypanosomatidae* parasites, has received more attention in the development of new bioactive compounds. In this context, antifungal ravuconazole proved to be the most promising drug among this class against *T. cruzi*, being used in combined therapy with Buz in clinic trials. Non-antifungal inhibitors, such as VFV and VNF, have shown promising results against *T. cruzi* and *T. brucei*, respectively, being tested in Buz-combined therapies. Among the experimental studies involving azoles, compound (**15**) was found to be the most promising derivative, displaying an IC₅₀ value of 0.002 μ M against amastigotes from *T. cruzi*, in addition to being non-toxic and highly selective towards TcCYP51 (< 25 nM). Interestingly, imidazole analog (**16**) was active against infectious forms of these three parasites, demonstrating *Ki* values of 0.17, 0.02, and 0.36 nM for CYP51 from *T. cruzi*, *T. brucei*, and *L. infantum*. Finally, this review will address promising inhibitors targeting sterol 14 α -demethylase (CYP51) from *Trypanosomatidae* parasites, highlighting SAR studies, interactions with this target, and recent contributions and advances in the field, as well.

ARTICLE HISTORY

Received: December 01, 2020
Revised: January 22, 2021
Accepted: February 09, 2021

DOI:
10.2174/156802662166621030314448

Keywords: Drug discovery, Sterol 14 α -demethylase, *Trypanosomatidae*, Leishmaniasis, HAT, Trypanosomiasis.

Apêndice H – Publicação do artigo “Druggable Targets from Coronaviruses for Designing New Antiviral Drugs” ao longo do doutorado.

Bioorganic & Medicinal Chemistry 28 (2020) 115745



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Bioorganic & Medicinal Chemistry

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc



Druggable targets from coronaviruses for designing new antiviral drugs

Leandro Rocha Silva^{a,b}, Paulo Fernando da Silva Santos-Júnior^a, Júlia de Andrade Brandão^c,
Letícia Anderson^{c,d}, Ênio José Bassi^c, João Xavier de Araújo-Júnior^{a,e}, Sílvia Helena Cardoso^b,
Edeildo Ferreira da Silva-Júnior^{a,e,*}



^a Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil

^b Laboratory of Organic and Medicinal Synthesis, Federal University of Alagoas, Campus Arapiraca, Manoel Severino Barbosa Avenue, Arapiraca 57309-005, Brazil

^c IMUNOREG – Immunoregulation Research Group, Laboratory of Research in Virology and Immunology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Campus AC. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil

^d CESMAC University Center, Cônego Machado Street, Maceió 57051-160, Brazil

^e Laboratory of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Institute, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

SARS-CoV
SARS-CoV-2
MERS-CoV
Medicinal chemistry
Molecular modeling

ABSTRACT

Severe respiratory infections were highlighted in the SARS-CoV outbreak in 2002, as well as MERS-CoV, in 2012. Recently, the novel CoV (COVID-19) has led to severe respiratory damage to humans and deaths in Asia, Europe, and Americas, which allowed the WHO to declare the pandemic state. Notwithstanding all impacts caused by Coronaviruses, it is evident that the development of new antiviral agents is an unmet need. In this review, we provide a complete compilation of all potential antiviral agents targeting macromolecular structures from these Coronaviruses (*Coronaviridae*), providing a medicinal chemistry viewpoint that could be useful for designing new therapeutic agents.

Apêndice I – Publicação do artigo “*In vitro* and *in vivo* evaluation of dialkylphosphorylhydrazones against *Leishmania chagasi* promastigotes and amastigotes” ao longo do doutorado.

NJC



PAPER

[View Article Online](#)
[View Journal](#)


Cite this: DOI: 10.1039/d1nj03694g

In vitro and *in vivo* evaluation of dialkylphosphorylhydrazones against *Leishmania chagasi* promastigotes and amastigotes

Carolina Barbosa Brito da Matta,^a Paulo Fernando da Silva Santos-Júnior,^b Vinícius Tomaz Gonçalves,^c Morgana Vital de Araújo,^a Aline Cavalcanti de Queiroz,^{id}^a João Kaycke Sarmiento Silva,^a João Flávio Monteiro da Silva,^a Rafael José Ribeiro Padilha,^d Luiz Carlos Alves,^e Fábio André Brayner dos Santos,^e Lucas Tricarico Barcellos,^f Edeildo Ferreira da Silva-Júnior,^{id}^f João Xavier de Araújo-Júnior,^{fg} João Batista Neves da Costa,^f Carlos Mauricio R. Sant'Anna^f and Magna Suzana Alexandre-Moreira^{*,a}

In our previous study, two new dialkylphosphorylhydrazones (DAPHs) have been designed targeting antileishmanial activity against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* parasites, and their mechanism of action, as well as their leishmanicidal activity against *Leishmania chagasi*, was evaluated. The present work aimed to evaluate the *in vitro* and *in vivo* activities of DAPHs against *L. chagasi*, in addition to proposing a mechanism of action based on ultrastructural alterations and *in silico* studies. Then, the *in vitro* activity of DAPHs against promastigotes and amastigotes from *L. chagasi*, as well as *in vivo* results in a golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) animal model, was determined in this study. A mechanism of action was proposed considering observations verified by scanning electron microscopy (SEM) and molecular docking simulations using the GOLD[®] software. DAPHs **4m** and **4n** were not cytotoxic on macrophages at the concentrations tested, among which analog **4n** exhibited a maximum effect of 84.3% against *L. chagasi* amastigotes, which is greater than that for miltefosine (66.2%). Further analyses demonstrated that it causes morphological changes in promastigote forms compatible with induced apoptosis. In addition, no significant *in vivo* alterations were observed for both DAPH compounds. Still, our molecular modeling protocol was able to predict a tridimensional structure for hexokinase protein from *L. infantum chagasi* (LcHK), in which subsequent docking studies demonstrated that **4m** and **4n** are capable of interacting with this target in a more efficient binding mode than its endogenous ligand, **G6P**. The novel DAPHs **4m** and **4n** could serve as potent hit compounds for designing new leishmanicidal agents.

Received 2nd August 2021,
 Accepted 4th November 2021

DOI: 10.1039/d1nj03694g

rsc.li/njc

Apêndice J – Publicação do artigo “Insights on Dengue and Zika NS5 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitors” ao longo do doutorado.

European Journal of Medicinal Chemistry 224 (2021) 113698



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Insights on Dengue and Zika NS5 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitors



Igor José dos Santos Nascimento^a, Paulo Fernando da Silva Santos-Júnior^a,
Thiago Mendonça de Aquino^a, João Xavier de Araújo-Júnior^b,
Edeildo Ferreira da Silva-Júnior^{a,*}

^a Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil

^b Laboratory of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2021

Received in revised form

9 July 2021

Accepted 10 July 2021

Available online 13 July 2021

Keywords:

Dengue virus

Zika virus

RdRp

Molecular modeling

Drug repurposing

SBDD

ABSTRACT

Over recent years, many outbreaks caused by (re)emerging RNA viruses have been reported worldwide, including life-threatening Flaviviruses, such as Dengue (DENV) and Zika (ZIKV). Currently, there is only one licensed vaccine against Dengue, Dengvaxia®. However, its administration is not recommended for children under nine years. Still, there are no specific inhibitors available to treat these infectious diseases. Among the flaviviral proteins, NS5 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) is a metalloenzyme essential for viral replication, suggesting that it is a promising macromolecular target since it has no human homolog. Nowadays, several NS5 RdRp inhibitors have been reported, while none inhibitors are currently in clinical development. In this context, this review constitutes a comprehensive work focused on RdRp inhibitors from natural, synthetic, and even repurposing sources. Furthermore, their main aspects associated with the structure-activity relationship (SAR), proposed mechanisms of action, computational studies, and other topics will be discussed in detail.

© 2021 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Apêndice K – Publicação do artigo “Synthesis of hybrids thiazole–quinoline, thiazole–indole and their analogs: *in vitro* anti-proliferative effects on cancer cell lines, DNA binding properties and molecular modeling” ao longo do doutorado.

NJC



PAPER

[View Article Online](#)
[View Journal](#) | [View Issue](#)


Cite this: *New J. Chem.*, 2021, 45, 13847

Synthesis of hybrids thiazole–quinoline, thiazole–indole and their analogs: *in vitro* anti-proliferative effects on cancer cell lines, DNA binding properties and molecular modeling†

Paulo Fernando da S. Santos-Junior,[‡] Igor José dos S. Nascimento,[‡] Edjan Carlos D. da Silva,[‡] Kadja Luana C. Monteiro,[‡] Johnnatan D. de Freitas,^b Samaysa de Lima Lins,^c Thamilla Maria S. Maciel,^d Bruno C. Cavalcanti,^e José de Brito V. Neto,^e Fabiane C. de Abreu,^c Isis M. Figueiredo,^d Josué Carinhanha C. Santos,[‡] Claudia do Ó Pessoa,^e Edeildo F. da Silva-Júnior,^a João X. de Araújo-Júnior^a and Thiago M. de Aquino[‡] *^a

A convenient synthesis under ultrasound (US) irradiation of 4-thiazolidinone, thiazole, dihydrothiazole, and thiazine hybrid compounds containing quinoline and indole nucleus is described. All the title compounds were characterized by NMR and HRMS. The synthetic protocol affords highly selective conversions, short reaction times, simple work-up procedures, and good yields compared with conventional methods. All the synthesized compounds were tested for *in vitro* cytotoxic activity against glioblastoma (SF-295), leukemia (HL-60), and prostate cancer (PC-3) cell lines. Three compounds (**4c–e**) presented moderate to high activity against all cancer cell lines evaluated. Compound **4c** stood out with its promising cytotoxicity activity against the HL-60 cell line with an IC_{50} value of 2.41 μ M and an SI of 10.5. The electrochemical behavior of **4c** was studied using differential pulse voltammetry (DPV) on a glassy carbon electrode modified with dsDNA and with ssDNA in the solution. As a result, the pre-concentration of the compound on the dsDNA biosensor surface and modification of the oxidation currents of guanosine and adenosine bases in ssDNA experiments demonstrated an interaction between **4c** and DNA. The affinity of **4c** was evaluated against ctDNA by exploring spectroscopic techniques, showing that this compound acts preferentially as a groove binder. Molecular docking and dynamics simulations proposed that **4c** interacts via groove binding and intercalation, corroborating the experimental results. The dominating interactions were conventional hydrogen bonds and van der Waals forces. Finally, our findings suggest the **4c** derivative to be a potential anticancer prototype against HL-60.

Received 29th April 2021,
Accepted 9th June 2021

DOI: 10.1039/d1nj02105b

rsc.li/njc

Apêndice L – Publicação do artigo “Synthesis, Antileishmanial Activity and *in silico* Studies of Aminoguanidine Hydrazones (AGH) and Thiosemicarbazones (TSC) Against *Leishmania chagasi* Amastigotes” ao longo do doutorado.

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Medicinal Chemistry, 2021, 18, 151-169

1

ARTICLE TYPE

Synthesis, Antileishmanial Activity and *in silico* Studies of Aminoguanidine Hydrazones (AGH) and Thiosemicarbazones (TSC) Against *Leishmania chagasi* Amastigotes

Thiago M. de Aquino^{1,2,*}, Paulo H. B. França¹, Érica E. E. S. Rodrigues¹, Igor, J. S. Nascimento¹, Paulo F. S. Santos-Júnior¹, Pedro G. V. Aquino³, Mariana S. Santos³, Aline C. Queiroz^{4,5}, Morgana V. Araújo⁴, Magna S. Alexandre-Moreira⁴, Raiza R. L. Rodrigues⁶, Klinger A. F. Rodrigues⁶, Johnnatan D. Freitas⁷, Jacques Bricard⁸, Mario R. Meneghetti², Jean-Jacques Bourguignon⁸, Martine Schmitt⁸, Edeildo F. da Silva-Júnior^{1,2,*} and João X. de Araújo-Júnior¹

¹Laboratory of Medicinal Chemistry, Institute of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alagoas, 57072-900, Maceió-AL, Brazil; ²Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, 57072-900, Maceió-AL, Brazil; ³Federal Rural University of Pernambuco, Garanhuns-PE, 55292-270, Brazil; ⁴Laboratory of Pharmacology and Immunology, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Alagoas, 57072-900, Maceió-AL, Brazil; ⁵Laboratory of Microbiology, Immunology and Parasitology, Medical Science Center, Campus Arapiraca, Federal University of Alagoas, 57309-005, Arapiraca-AL, Brazil; ⁶Laboratory of Infectious Diseases, Federal University of Parnaíba Delta, 64202-020, Parnaíba-PI, Brazil; ⁷Instrumental Analysis Laboratory, Federal Institute of Alagoas, Campus Maceió, Ferroviário Avenue, 57020-600, Maceió-AL, Brazil; ⁸Laboratoire d'Innovation thérapeutique, UMR 7200, Labex Medalis, CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, BP 60024, 67401 Illkirch, France

ARTICLE HISTORY

Received:

Revised:

Accepted:

DOI: 10.2174/157340641766210216154428

Abstract: *Background:* Leishmaniasis is a worldwide health problem, highly endemic in developing countries. Among the four main clinical forms of the disease, visceral leishmaniasis is the most severe, fatal in 95% of cases. The undesired side-effects from first-line chemotherapy and the reported drug resistance search for effective drugs that can replace or supplement those currently used an urgent need. Aminoguanidine hydrazones (AGH's) have been explored for exhibiting a diverse spectrum of biological activities, in particular the antileishmanial activity of MGBG. The bioisosteres thiosemicarbazones (TSC's) offer a similar biological activity diversity, including antiprotozoal effects against *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*. *Objective:* Considering the impact of leishmaniasis worldwide, this work aimed to design, synthesize, and perform a screening upon *L. chagasi* amastigotes and for the cytotoxicity of the small "in-house" library of both AGH and TSC derivatives and their structurally-related compounds. *Method:* A set of AGH's (3-7), TSC's (9, 10), and semicarbazones (11) were initially synthesized. Subsequently, different semi-constrained analogs were designed and also prepared, including thiazolidines (12), dihydrothiazines (13), imidazolines (15), pyrimidines (16, 18) azines (19, 20), and benzotriazepinones (23-25). All intermediates and target compounds were obtained with satisfactory yields and exhibited spectral data consistent with their structures. All final

Apêndice M – Aceite para publicação do artigo “Inhibitors targeting Hepatitis C virus (HCV) entry” ao longo do doutorado.

Inhibitors targeting Hepatitis C virus (HCV) entry

Paulo Fernando da Silva Santos-Júnior ^a, João Xavier de Araújo-Júnior ^{a,b}, Edeildo Ferreira da Silva-Júnior ^{a*}

^a Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió, zip code: 57072-970, Brazil

^b Laboratory of Medicinal Chemistry, Institute of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió, zip code: 57072-970, Brazil

* Corresponding author: edeildo.junior@iqb.ufal.br; Tel.: (+55)879-9610-8311.

Apêndice N – Aceite para publicação do artigo “Strategies in Medicinal Chemistry to Discovery New *Hits* Compounds Against Ebola and Marburg Virus: Challenges and Perspectives in Drug Discovery” ao longo do doutorado.

Strategies in Medicinal Chemistry to Discovery New *Hits* Compounds Against Ebola and Marburg Virus: Challenges and Perspectives in Drug Discovery

Igor José dos Santos Nascimento¹ Paulo Fernando da Silva Santos Júnior¹, Edeildo Ferreira da Silva Júnior^{1,2*}

¹ Laboratory of Synthesis and Research in Medicinal Chemistry, Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil.

² Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil.

*Corresponding author: edeildo.junior@iqb.ufal.br; Tel.: (+55)879-9610-8311.

Apêndice O – Aceite para publicação do artigo “*In vitro* antitumor activity of 2-*N,N'*-dialkylamine-1,4-naphthoquinones on human glioblastoma multiforme cells” ao longo do doutorado.

Page 3 of 19

PLN New Journal of Chemistry

ARTICLE

Received 00th January
20xx,Accepted 00th January
20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

In vitro antitumor activity of 2-*N,N'*-dialkylamine-1,4-naphthoquinones on human glioblastoma multiforme cells

José Clementino-Neto^{a,b}, João Kayke Sarmiento da Silva^a, Cibelle de Melo Bastos Cavalcante^{a,b}, Paulo Fernando da Silva-Júnior^c, Cibelle Cabral David^d, Morgana Vital Araújo^a, Carmelita Bastos Mendes^b, Aline Cavalcanti de Queiroz^{a,e}, Elaine Cristina Oliveira da Silva^f, Samuel Teixeira de Souza^f, Eduardo Jorge da Silva Fonseca^f, Tânia Maria Sarmiento da Silva^d, Celso de Amorim Camara^d, Vivaldo Moura-Neto^g, João Xavier de Araújo-Júnior^h, Edeildo Ferreira da Silva-Júnior^c, Adriana Ximenes-da-Silva^b, Magna Suzana Alexandre-Moreira^{1*}

In this study, was evaluated the *in vitro* antitumor activity of 2-*N,N'*-dialkylamino-1,4-naphthoquinones (**1a-n**) against human glioblastoma multiforme cells (GBM02). All derivatives inhibited GBM02 cell viability except for compounds **1a**, **1b**, and **1c**. In contrast, compounds **1d**, **1e**, **1f**, **1g**, **1h**, **1k**, and **1n** were the most effective ones. Among them, compound **1e** was found to be the most promising analog (IC_{50} : $14.9 \pm 4.6 \mu\text{M}$). Compounds **1a**, **1i**, and **1n** weren't toxic upon monocytes and lymphocytes, while compounds **1e**, **1f**, and **1g** presented low cytotoxicity. Moreover, compounds **1e**, **1f**, **1g**, **1k**, and **1n** were more selective for GBM02 cells than for monocytes and lymphocytes. Still, compounds **1e** and **1n** promoted changes in the morphology of tumor cells, apoptosis-induced in GBM02 cells, and cell cycle arrest in the *S* and *G₂/G₁* phases. Compounds **1e** and **1n** were more effective against GBM02 than Temozolomide (TMZ). Furthermore, *in silico* studies suggest that these compounds have good oral bioavailability after intestinal absorption, permeability to the blood-brain barrier, and are not inhibited by P-glycoprotein, remaining in the brain environment. In this sense, these two derivatives are effective antitumor agents and should be subjected to new experimental protocols in the antitumor drugs development chain to become future therapeutic options for this disease of poor prognosis and, until nowadays, without a cure.