



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

NATÁLIA BARBOSA DE MÉLO

**PLANEJAMENTO RACIONAL, SÍNTESE E BIOAVALIAÇÃO DE NOVOS
CANDIDATOS A FÁRMACOS LEISHMANICIDAS BASEADOS EM PROTÓTIPOS
2-AMINOTIOFÊNICOS**

**CAMPINA GRANDE
2022**

NATÁLIA BARBOSA DE MÉLO

**PLANEJAMENTO RACIONAL, SÍNTESE E BIOAVALIAÇÃO DE NOVOS
CANDIDATOS A FÁRMACOS LEISHMANICIDAS BASEADOS EM PROTÓTIPOS
2-AMINOTIOFÊNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento do Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de graduado em Farmácia.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior.

**CAMPINA GRANDE
2022**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

M528p Melo, Natalia Barbosa de.
Planejamento racional, síntese e bioavaliação de novos candidatos a fármacos leishmanicidas baseados em protótipos 2-aminotiofênicos [manuscrito] / Natalia Barbosa de Melo. - 2022.

96 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2022.

"Orientação : Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."

1. Química medicinal. 2. Planejamento de fármacos. 3. Reação de Gewald. 4. Citotoxicidade. I. Título

21. ed. CDD 615.19

NATÁLIA BARBOSA DE MÉLO

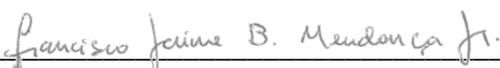
PLANEJAMENTO RACIONAL, SÍNTESE E BIOAVALIAÇÃO DE NOVOS
CANDIDATOS A FÁRMACOS LEISHMANICIDAS BASEADOS EM PROTÓTIPOS 2-
AMINOTIOFÊNICOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Departamento do Curso Farmácia da
Universidade Estadual da Paraíba, como
requisito parcial à obtenção do título de
graduado em farmácia.

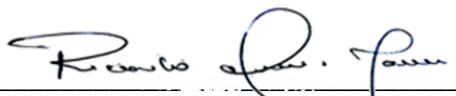
Área de concentração: Doenças Infecciosas e
parasitárias.

Aprovada em: 18/07/2022.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Jesimar dos Santos Medeiros
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Aos meus pais, por todo companheirismo, amor
e incentivo, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por seu cuidado, zelo e proteção em todos os momentos. Desejo sempre ser um instrumento do seu amor.

Aos meus pais Socorro e Antônio, por serem meu alicerce, por todo esforço feito para me proporcionarem a melhor educação, sei de todas as dificuldades que passamos para que eu pudesse chegar onde estou. Obrigada por estarem ao meu lado nos momentos em que mais precisei. Sou extremamente grata por todo amor, carinho e apoio diários, vocês são espelho de Deus na minha vida.

Ao meu irmão Filipe, por toda paciência e carinho que sempre estiveram comigo.

Ao meu noivo, Isaac Emanuel, por sempre estar ao meu lado, me incentivando e não me deixando desistir. Obrigada por me ouvir, me acalmar e por tornar minha vida ainda mais feliz. Sou grata a Deus por ter te escolhido para dividir a vida comigo.

A minha madrinha Livramento, por todo carinho, incentivo e ajuda quando precisei. A senhora é um dos anjos que Deus enviou para a terra para propagar o bem.

As minhas tias Severina Raquel e Maria Raquel (*in memoriam*) e aos meus avós Rita, Antônia, Egídio (*in memoriam*), por me guiarem lá do céu, sinto a presença e o cuidado de vocês todos os dias. Gostaria muito que vocês estivessem aqui nesse momento tão especial.

Ao meu orientador, Prof^o. Dr^o. Francisco Jaime, pelas oportunidades a mim proporcionadas e por todo conhecimento repassado. Sua contribuição foi um peça chave para minha formação acadêmica.

Ao Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos, em especial ao Prof^o. Dr^o. Ricardo Moura, por toda prestatividade, atenção e apoio. Aos demais integrantes, minha gratidão por tornarem o dia a dia na pesquisa mais alegre.

Aos meus colegas de turma, em especial Renally, Sara e Kamilla, gratidão por todo companheirismo, apoio e incentivo que tornaram essa caminhada acadêmica mais leve, vocês são muito especiais para mim.

Aos meus familiares e amigos, por me apoiarem, compreenderem e incentivarem.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que esse sonho se tornasse realidade.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

RESUMO

As doenças infecciosas negligenciadas acometem principalmente as populações de baixa renda, residentes em locais de maior vulnerabilidade. A leishmaniose se enquadra nesse grupo e é causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. Dificuldades como difícil administração e a existência de efeitos despertam na categoria científica um olhar centrado na busca de compostos orgânicos que possuam boa eficácia, fácil acesso, baixa toxicidade e fácil administração. Os derivados 2-aminotiofenos são um grupo de compostos que vem apresentando boa atividade contra as formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania*. Além de serem moléculas com boa atividade biológica e baixa toxicidade, são facilmente obtidas por meio da clássica Reação de Gewald. Estudos anteriores demonstram uma promissora atividade antileishmania *in vitro* para os híbridos tiofeno-indóis, esse ponto foi avaliado a partir de variações no tamanho do anel cicloalquila ligado ao núcleo tiofeno, seguido de variações de substituições no anel indol. Nesse contexto, o presente projeto visou obter sinteticamente novos derivados 2-aminotiofeno-3-carbonitrila candidatos a fármacos leishmanicidas, através da realização da modificação molecular de protótipos 2-aminotiofeno-3-carboxamidas, a fim de verificar a importância do padrão de substituição da posição C-3 do anel tiofênico. No presente estudo foram obtidos 10 novos derivados 2-aminotiofênicos. Os espectros de ^1H e ^{13}C (DEPT) comprovaram a formação dos compostos planejados. Todos os compostos apresentaram bons rendimentos que variaram de 34 a 89%, tendo o composto 6CNP02 apresentado maior porcentagem. Quanto aos testes de atividade, quatro dos dez compostos sintetizados apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento das formas promastigotas das espécies de *Leishmania* analisadas. Sendo eles os compostos 6CNP02, 6CNP03, 6CNP09 e 6CNP10. O composto com menor valor de IC_{50} e de IS foi o 6CNP10 ($\text{IC}_{50} = 2,11 \mu\text{M}$) frente a *Leishmania infantum*, o qual apresenta o anel indol substituído na posição C-6 pelo grupamento ciano. O composto 6CNP10 além de apresentar atividade antileishmania, apresentou também os melhores índices de atividade quando relacionado as drogas de referência também testadas que já vêm sendo utilizadas no tratamento da leishmaniose, indicando assim uma menor citotoxicidade a células do ser humano. Por fim, conclui-se que a modificação bioisostérica realizada nesse estudo não conferiu melhores valores de IC_{50} às moléculas sintetizadas, sendo assim observa-se que a troca do grupamento amida pela nitrila na posição C-3 do anel tiofênico não é tão favorável.

Palavras-Chave: química medicinal; planejamento de fármacos; 2-aminotiofenos; reação de
Gewald.

ABSTRACT

Neglected infectious diseases mainly affect low-income populations living in places of greater vulnerability. Leishmaniasis falls into this group and is caused by protozoa belonging to the genus *Leishmania*. Difficulties such as difficult administration and the existence of effects awakened in the scientific category a look focused on the search for organic compounds that have good efficacy, easy access, low toxicity and easy administration. The 2-aminothiophene derivatives are a group of compounds that have shown good activity against the amastigote and promastigote forms of *Leishmania*. In addition to being molecules with good biological activity and low toxicity, they are easily obtained through the classic Gewald reaction. Previous studies demonstrate promising antileishmanial activity in vitro for thiophene-indole hybrids, this point was evaluated from variations in the size of the cycloalkyl ring attached to the thiophene nucleus, followed by variations in substitutions in the indole ring. In this context, the present project aimed to synthetically obtain new 2-aminothiophene-3-carbonitrile derivatives candidates for leishmanicidal drugs, by carrying out the molecular modification of 2-aminothiophene-3-carboxamide prototypes, in order to verify the importance of the substitution pattern of the C-3 position of the thiophene ring. In the present study, 10 new 2-aminothiophenic derivatives were obtained. The ¹H and ¹³C spectra (DEPT) confirmed the formation of the planned compounds. All compounds showed good yields ranging from 34 to 89%, with the compound 6CNP02 showing the highest percentage. As for the activity tests, four of the ten synthesized compounds showed inhibitory activity on the growth of the promastigote forms of the *Leishmania* species analyzed. These being the compounds 6CNP02, 6CNP03, 6CNP09 and 6CNP10. The compound with the lowest IC₅₀ and IS values was 6CNP10 (IC₅₀ = 2.11 μM) against *Leishmania infantum*, which has the indole ring replaced at the C-6 position by the cyano group. The 6CNP10 compound, in addition to presenting antileishmanial activity, also presented the best activity indexes when related to the reference drugs also tested that have already been used in the treatment of leishmaniasis, thus indicating a lower cytotoxicity to human cells. Finally, it is concluded that the bioisosteric modification performed in this study did not provide better IC₅₀ values to the synthesized molecules, thus, it is observed that the exchange of the amide group for the nitrile in the C-3 position of the thiophenic ring is not so favorable.

Keywords: medicinal chemistry; drug design; 2-aminothiophenes; Gewald reaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Fêmea de flebotomíneo engurgitada.....	20
Figura 2 –	Morfologia da <i>Leishmania</i>	20
Figura 3 –	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	22
Figura 4 –	Casos de Leishmaniose Tegumentar por UF de infecção.....	24
Figura 5 –	Proporção de casos de Leishmaniose Tegumentar de acordo com a forma clínica por região de residência.....	24
Figura 6 –	Casos de Leishmaniose Tegumentar no Brasil de 1980 a 2020.....	25
Figura 7 –	Casos de Leishmaniose Visceral por UF de infecção.....	26
Figura 8 –	Casos de Leishmaniose Visceral no Brasil de 1980 a 2020.....	26
Figura 9 –	Estrutura do antimoniais pentavalentes.....	27
Figura 10 –	Estrutura do TN8-7.....	30
Figura 11 –	Estrutura do 6BOC2.....	30
Figura 12 –	Esquema reacional da reação de Gewald.....	31
Figura 13 –	Obtenção do aduto de Gewald.....	35
Figura 14 –	Reação de obtenção dos derivados tiofênicos contendo o anel indol.....	36
Figura 15 –	Reação de obtenção dos derivados tiofênicos com benzaldeídos.....	36
Figura 16 –	Protótipos utilizados.....	42
Figura 17 –	Mecanismo reacional da reação de Gewald.....	43
Figura 18 –	Aduto 6CNP.....	44
Figura 19 –	Mecanismo reacional de obtenção dos derivados 2-aminotiofênicos.....	45
Figura 20 –	Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) do composto 6CNP04.....	50
Figura 21 –	Expansão do espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) do composto 6CNP04.....	51
Figura 22 –	Espectro de DEPT (150 MHz, DMSO-d ₆) do composto 6CNP04.....	52
Figura 23 –	Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) do composto 6CNP02.....	53
Figura 24 –	Expansão do espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) do composto 6CNP02.....	53
Figura 25 –	Espectro de DEPT (150 MHz, DMSO-d ₆) do composto 6CNP02.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Reagentes utilizados nas sínteses.....	33
Quadro 2 –	Nomenclatura dos compostos sintetizados.....	37
Quadro 3 –	Derivados 2-aminotiofênicos.....	46
Quadro 4 –	Características físico-químicas dos derivados 2-aminotiofênicos contendo radical indol.....	48
Quadro 5 –	Características físico-químicas dos derivados 2-aminotiofênicos contendo radical indol.....	49
Quadro 6 –	Dados dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (DEPT) (δ , DMSO- d_6 , 150 e 600MHz).....	55
Quadro 7 –	Atividade antileishmania frente a formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. major</i> e <i>L. infantum</i> , efeitos citotóxicos contra macrófagos e índices de seletividade (IS) dos derivados 2-aminotiofênicos-3-carbonitrilas e fármacos de referência (valores de IC_{50} e CC_{50} em μM).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
CCD	Cromatografia de camada delgada
DIN	Doenças infecciosas negligenciadas
GTP	Guanosina trifosfato
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LMC	Leishmaniose muco cutânea
LP	Leptonomas promastigotas
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar antroponótica
LTZ	Leishmaniose tegumentar zoonótica
LV	Leishmaniose visceral
MP	Membrana peritrófica
MS	Ministério da Saúde
NAPRMN	Núcleo de Análise e Pesquisa em Ressonância Magnética Nuclear
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
PM	Promastigotas metacíclicas
PN	Promastigotas nectonomas
PR	Promastigotas retroleptonomas
RMN	Ressonância magnética nuclear
Sb ⁺³	Antimônio trivalente de meglumina
Sb ⁺⁵	Antimônio pentavalente de meglumina
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFDPAr	Universidade Federal do Denta do Parnaíba
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
%	Porcentagem
μ	Micro
π	Elétrons pi
α	Alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Leishmanioses	18
2.1.1	<i>Aspectos gerais</i>	18
2.1.2	<i>Manifestações clínicas</i>	18
2.1.3	<i>Transmissão</i>	19
2.1.4	<i>Aspectos epidemiológicos</i>	22
2.1.5	<i>Tratamento</i>	27
2.2	Planejamento de fármacos	28
2.2.1	<i>Derivados tiofênicos</i>	29
2.2.2	<i>Reação de Gewalt</i>	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
4	METODOLOGIA	33
4.1	Local de trabalho	33
4.2	Procedimento geral de síntese	33
4.2.1	<i>Reagentes</i>	33
4.2.2	<i>Solventes</i>	35
4.2.3	<i>Processo reacional</i>	35
4.3	Estudo químico	37
4.3.1	<i>Cromatografia de Camada Delgada (CCD)</i>	37
4.3.2	<i>Faixa de fusão</i>	38
4.3.3	<i>Fator de retenção</i>	38
4.3.4	<i>Rendimento da reação</i>	38
4.3.5	<i>Aparência</i>	38
4.3.6	<i>Nomenclatura das moléculas</i>	39
4.4	Caracterização estrutural	39
4.5	Ensaio Biológicos para Avaliação do Potencial Leishmanicida e Citotóxico 39	
4.5.1	<i>Manutenção de parasitos e macrófagos</i>	39
4.5.2	<i>Preparo de drogas</i>	40
4.5.3	<i>Atividade antipromastigota</i>	40

4.5.4	<i>Citotoxicidade em macrófagos</i>	40
4.5.5	<i>Análise estatística</i>	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
5.1	Síntese dos compostos	42
5.1.1	<i>Obtenção do adulto de <i>Gewald 6CNP</i></i>	42
5.1.2	<i>Obtenção dos derivados 2-aminotiofênicos</i>	44
5.2	Comprovação estrutural	50
5.3	Atividade antipromastigota e citotoxicidade	57
6	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICE A - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) do composto 6CNP01	66
	APÊNDICE B - Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) do composto 6CNP01	67
	APÊNDICE C - Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) do composto 6CNP01	68
	APÊNDICE D - Espectro de DEPT (125 MHz, DMSO-d ₆) do composto 6CNP01.....	69
	APÊNDICE E - Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) do composto 6CNP02.....	70
	APÊNDICE F - Expansão do espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) do composto 6CNP02.....	71
	APÊNDICE G - Espectro de DEPT (150 MHz , DMSO-d ₆) do composto 6CNP02.....	72
	APÊNDICE H - Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) do composto 6CNP03.....	73
	APÊNDICE I - Expansão do espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) do composto 6CNP03.....	74
	APÊNDICE J - Espectro de DEPT (150 MHz , DMSO-d ₆) do composto 6CNP03.....	75
	APÊNDICE K - Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) do composto 6CNP04.....	76

APÊNDICE L - Expansão do espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP04.....	77
APÊNDICE M - Espectro de DEPT (150 MHz Hz, DMSO-d6) do composto 6CNP04.....	78
APÊNDICE N - Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP05.....	79
APÊNDICE O - Expansão do espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP05.....	80
APÊNDICE P - Espectro de DEPT (150 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP05.....	81
APÊNDICE Q - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP06.....	82
APÊNDICE R - Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP06.....	83
APÊNDICE S - Espectro de DEPT (125 MHz , DMSO-d6) do composto 6CNP06.....	84
APÊNDICE T - Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP07.....	85
APÊNDICE U - Expansão do espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP07.....	86
APÊNDICE V - Espectro de DEPT (150 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP07.....	87
APÊNDICE W - Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP08.....	89
APÊNDICE X - Expansão do espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP08.....	89
APÊNDICE Y - Espectro de DEPT (150 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP08.....	90
APÊNDICE Z - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP09.....	91
APÊNDICE AA - Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP09.....	92

APÊNDICE AB - Espectro de DEPT (125 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP09.....	93
APÊNDICE AC - Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP010.....	94
APÊNDICE AD - Expansão do espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP10.....	95
APÊNDICE AE - Espectro de DEPT (150MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP010.....	96

1 INTRODUÇÃO

Dentre as diversas doenças infecciosas negligenciadas que acometem a população com maior vulnerabilidade social e econômica encontra-se a leishmaniose. Atualmente, tal patologia vêm ocupando um lugar importante como alvo de pesquisas na busca por alternativas de tratamento e prevenção. O motivo dessa preocupação da comunidade científica é principalmente pelo tratamento das diversas formas da leishmaniose ser bastante limitado, existindo poucas drogas eficientes contra o parasita.

Além da escassez de medicamentos, os esquemas terapêuticos utilizados e preconizados pelo Ministério da Saúde do Brasil são geralmente muito longos, demandando muitos dias de tratamento, além de sua administração ser por via parenteral. Ambos fatores dificultam o cumprimento da farmacoterapia devido o desconforto causado ao paciente e proporcionam, na maioria das vezes, a formação de parasitas resistentes às drogas convencionalmente usadas. Outro ponto negativo desses medicamentos é o surgimento de diversos efeitos colaterais, podendo variar de leves a graves, fazendo com que o bem estar do paciente não esteja totalmente assegurado.

Em vista disso, diversos pesquisadores estão lançando mão da química medicinal por meio de técnicas de planejamento racional de fármacos. Estudos vêm demonstrando resultados importantes de moléculas modificadas baseadas em protótipos com relação à atividade antileishmania. As modificações moleculares são feitas em grupamentos importantes na interação com o parasita, buscando, além da eficácia, compostos que sejam seguros e que não proporcionem malefícios aos indivíduos que o utilizarem.

Os derivados 2-aminotiofênicos representam uma classe química que vêm se apresentando como alternativa promissora de novos fármacos com atividade antileishmania, com bons valores de eficácia e segurança frente as formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania*. A síntese desses compostos se destaca por ser simples, rápida e por produzir rendimentos relativamente satisfatórios, sendo este um ponto importante, pois facilita a realização de novas pesquisas e gera compostos de baixo custo.

Por conseguinte, o presente trabalho foi realizado visando a obtenção de novos derivados 2-aminotiofênicos contendo grupamentos que, em outros estudos, demonstraram aumento na atividade antileishmania, esperando-se contribuir com dados para pesquisas seguintes na busca pelo desenvolvimento de fármacos ativos e seguros, que possam futuramente restabelecer a saúde das populações necessitadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmanioses

2.1.1 Aspectos gerais

As Doenças Infecciosas Negligenciadas (DINs) são um grupo de doenças geralmente parasitárias, que acometem principalmente as populações de baixa renda, residentes em locais de maior vulnerabilidade e com acesso limitado aos serviços de saúde, sendo elas em sua maioria mulheres, crianças e populações indígenas. Atualmente, 20 doenças são classificadas como DINs, sendo liderança em prevalência ou incidência as geo-helminthíases como ascaridíase, ancilostomíase, tricuriase e estrogiloidíase, seguidas por filariose linfática, esquistossomose, escabiose, leishmaniose, doença de Chagas e dengue (HOTEZ *et al.*, 2020; OPAS, 2022).

2.1.2 Manifestações clínicas

De forma geral, existem três formas principais da doença: leishmaniose tegumentar (LT), leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (WHO, 2016). A forma mais comum, dentre estas, é a LT, conhecida popularmente por “úlceras de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir”, podendo apresentar-se como leishmaniose tegumentar zoonótica (LTZ) ou leishmaniose tegumentar antroponótica (LTA), sendo *L. tropica*, *L. major*, *L. amazonensis* e *L. mexicana* suas principais espécies causadoras. Já LMC, conhecida como “espúndia” é caracterizada por afetar as mucosas, além da pele. As principais espécies causadoras dessa forma da doença são a *L. (Viannia) braziliensis* e a *L. amazonensis*. Como citado anteriormente, existe ainda a LV, que concretiza um grande problema de saúde pública devido à gravidade de suas manifestações, e que se manifesta por infecções causadas pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum* (SILVEIRA *et al.*, 1997).

A LV é uma enfermidade generalizada crônica grave, podendo ser fatal para o homem, cuja letalidade pode chegar a 100% caso não seja tratada. No Brasil, é causada pela *Leishmania infantum chagasi*, semelhante à *Leishmania infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia. A partir de uma visão clínica, a LV caracteriza-se pela presença de febre persistente, astenia, hepatoesplenomegalia, emagrecimento, anemia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia. Em casos mais graves pode levar à caquexia,

edema e óbito. A forma como a doença irá se manifestar dependerá da circunstância em que o indivíduo se apresenta, seja por seu estado nutricional, ou até mesmo pela ausência de tratamento, sendo este último a causa da evolução para o óbito em mais de 90% dos casos. O período de incubação da LV pode variar de 10 dias a 24 meses no ser humano, com média entre 2 e 6 meses. Os grupos mais susceptíveis a essa forma da doença são as crianças, os idosos e os pacientes imunossuprimidos, podendo esse último grupo apresentar quadro de LV muito além do período habitual de incubação (ALVES *et al.*, 2004; ARONSON; MAGILL, 2020; ASSIS *et al.*, 2008; BRASIL, 2016; LAISON; RANGEL, 2005).

Dentre as demais formas da leishmaniose, a LT é a mais frequente e se manifesta por meio de lesões indolores na pele que são iniciadas no local da inoculação das promastigotas infectantes; essas lesões se apresentam com formato arredondado ou ovalado, base eritomatosa, infiltrada e de consistência firme, com bordas bem delimitadas e elevadas, fundo avermelhado e com granulações grosseiras. O período de incubação para essa forma da doença é de em média 2 meses e todos os grupos são susceptíveis à infecção. A LT também pode-se apresentar em sua forma difusa ou mucocutânea (LMC) caracterizada pela presença de lesões destrutivas na mucosa da nasofaringe (ARONSON; MAGILL, 2020; BRASIL, 2016; KAHIME, 2016).

2.1.3 Transmissão

A leishmaniose é uma patologia causada por protozoários pertencentes a mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*. Esses parasitas são transmitidos aos humanos pela picada de um flebotomíneo fêmea do gênero *Lutzomyia*, popularmente conhecido como “mosquito palha” (Figura 1), que esteja infectado. Este inseto mantém-se ativo no período noturno, e transmite os parasitas através do repasto sanguíneo (OPAS, 2016; WHO, 2016, 2017).

A leishmaniose cutânea é fundamentalmente uma enzootia de animais silvestres. Um grande número de mamíferos pode ser reservatório para *Leishmania*. Pode-se encontrar este parasito em roedores, marsupiais, edentados, procionídeos, canídeos, primatas e ungulados. Várias espécies de animais domésticos têm sido encontradas infectadas com frequência, entre elas cavalos, burros e cães. A transmissão entre estes animais ou entre eles e o ser humano ocorre pela picada de um flebotomíneo infectado (NEVES *et al.*, 2012; REY, 2008).

No caso da leishmaniose visceral, o principal reservatório que possibilita a infecção no homem é o cão doméstico (*Canis familiaris*), devido à facilidade do contato do mosquito com ambos, porém, alguns animais silvestres como raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) também podem assumir esse papel, possibilitando a

multiplicação do parasita (FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003; NUNES *et al.*, 1991). Além da transmissão através da picada do flebotomíneo, a leishmaniose visceral também pode ser transmitida de forma congênita, vertical, transplacentária, por relação sexual, transfusões sanguíneas, transplante de órgãos e no uso em comum de agulhas entre usuários de drogas endovenosas (BOEHME *et al.*, 2006; MEINECKE *et al.*, 1999; ORYAN; AKBARI, 2017).

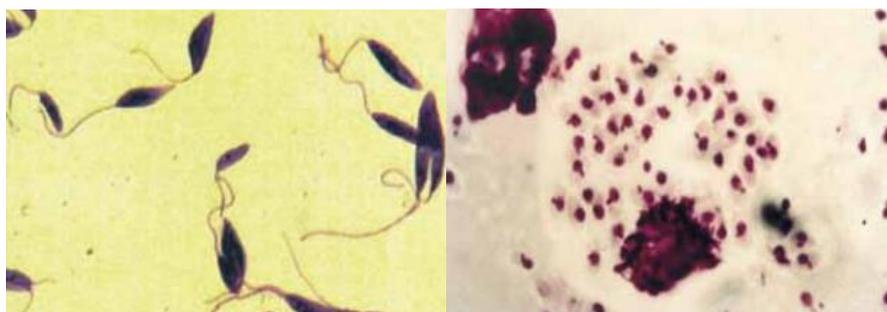
Figura 1 – Fêmea de flebotomíneo ingurgitada



Fonte: Brasil, 2014.

O parasita apresenta duas morfologias distintas no processo de transmissão da doença: amastigota não flageladas e promastigota metacíclicas flageladas (Figura 2) (BANETH *et al.*, 2008). A forma amastigota imóvel tem corpo ovoide, medindo entre 2 - 4 μm , flagelo interno e é intracelular, pode ser encontrada na corrente sanguínea e nos tecidos dos hospedeiros mamíferos. Já a forma promastigota apresenta corpo alongado medindo entre 10 – 15 μm de comprimento por 1,5 a 3,5 μm de largura, flagelo livre e extracelular, presente no intestino do flebotomíneo (BARRAL-NETTO *et al.*, 1986; SERAFIM *et al.*, 2021;).

Figura 2 – Morfologia da *Leishmania*



(a) Promastigotas

(b) Amastigotas

Fonte: Brasil, 2017.

Ao longo dos anos, estudos demonstraram que a saliva de flebotomíneos e o gel secretor produzido por promastigotas são fatores importantes na transmissão vetorial e contribuem para a sobrevivência do parasita. Outro aspecto que torna a transmissão efetiva é a resposta imune do hospedeiro à picada do inseto, visto que os macrófagos recrutados fagocitam os parasitas e permitem que estes se proliferem em seu organismo (ABDELADHIM *et al.*, 2014; PETERS *et al.*, 2008; ROGERS *et al.*, 2002; ROHOUSOVA *et al.*, 2006).

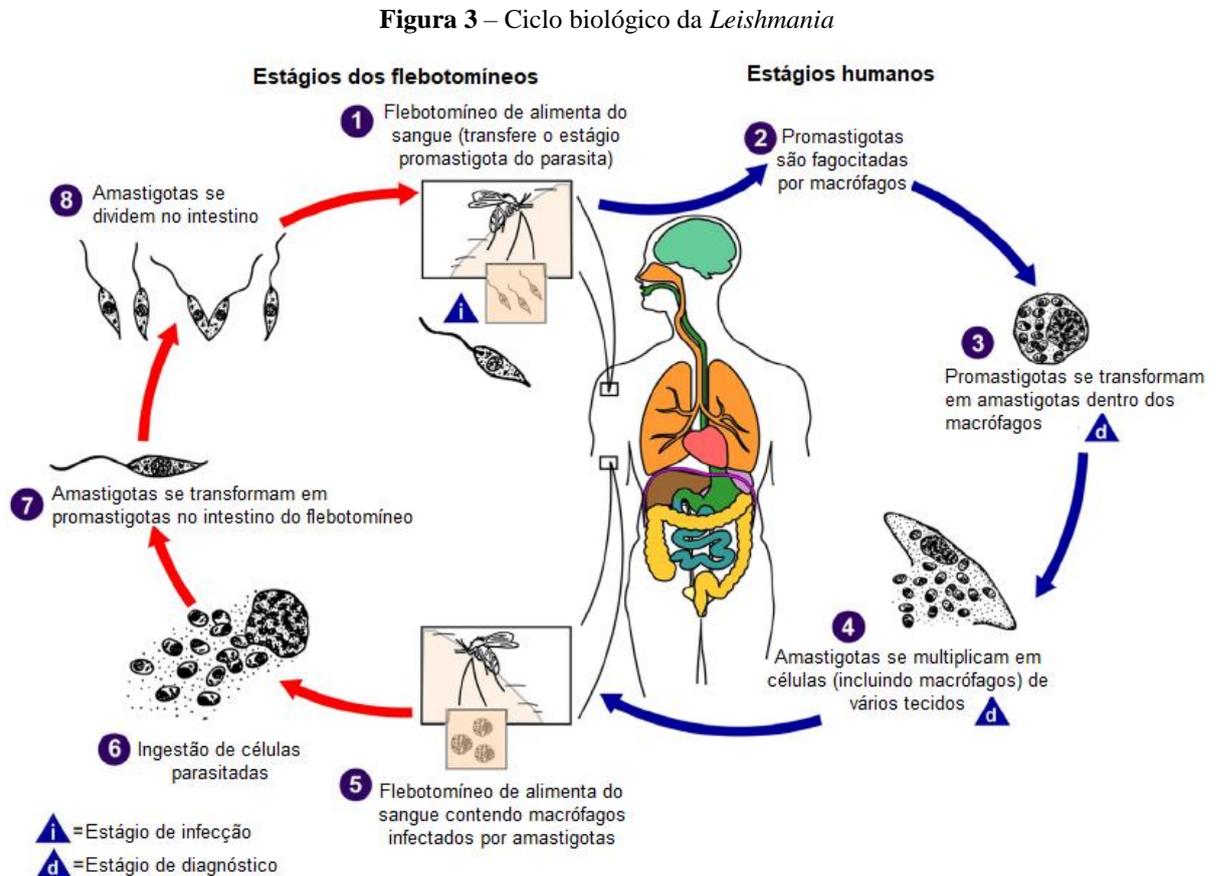
O ciclo biológico do parasito é heteróximo (Figura 3) e pode ser dividido em três estágios que correspondem à digestão sanguínea e à progressão do ciclo gonotrófico, período compreendido entre o repasto sanguíneo e a oviposição, no vetor:

O primeiro estágio ocorre entre 0 a 2 dias e se inicia após o flebotomíneo fazer sua primeira refeição de sangue infectado, após a refeição as amastigotas são liberadas em um bolo de sangue confinado por uma membrana peritrófica (MP) onde ocorre o desenvolvimento do parasito. O processo de transformação das amastigotas ingeridas em promastigotas inicia-se entre 6 a 12 horas após o repasto. Neste período, as amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas; esta forma tem divisão lenta e dá origem a promastigotas nectonomas (PNs) entre 36-48 horas (LAWYER *et al.*, 1987; LAWYER, *et al.*, 1990; FREITAS, 2010; SERAFIM *et al.*, 2021; SECUNDINO *et al.*, 2005).

No segundo estágio, de 2 a 5 dias após o repasto, as PNs saem da MP que se encontra em desintegração e ancoram-se no epitélio do intestino médio do flebotomíneo. Esse processo é marcado pela intensa multiplicação das formas procíclicas e completa transformação em PN, preenchendo o intestino abdominal anterior. Muitas PN ancoram-se através de seus flagelos às microvilosidades do epitélio intestinal, evitando sua expulsão durante a liberação do bolo fecal. PN migram para região anterior do intestino médio e dão origem a promastigotas haptomonas, que se dividem eficientemente e estabelecem a infecção do intestino médio (GOSSAGE *et al.*, 2003; ROGERS; CHANCE; BATES, 2002; ROGERS *et al.*, 2004; SERAFIM *et al.*, 2021).

Por fim, no terceiro estágio, o flebotomíneo faz outra refeição de sangue, o que promove a multiplicação de leptonomas promastigotas (LP), que se diferenciam em promastigotas metacíclicas (PMs), que são extremamente móveis, e se depositam no esôfago e na faringe. Então, quando ocorre um novo repasto sanguíneo, o mosquito transfere através da picada as PM que penetram a pele. O sangue fresco faz com que as PMs que permaneceram no intestino do vetor se diferenciem em promastigotas retroleptomonas (PRs). As PRs representam a maioria dos parasitas do intestino médio nos próximos 3 dias (FREITAS, 2010; SERAFIM *et al.*, 2021). Ao adentrarem a corrente sanguínea, as PMs penetram células como dendríticas, fibroblastos, neutrófilos e principalmente macrófagos, visto que os parasitas são fagocitados.

Após o processo de fagocitose, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária dentro de vacúolos parasitóforos. Após a intensa multiplicação os vacúolos se rompem e as formas amastigotas infectam outras células na corrente sanguínea (KEVRIC *et al.*, 2015; NO, 2016).



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

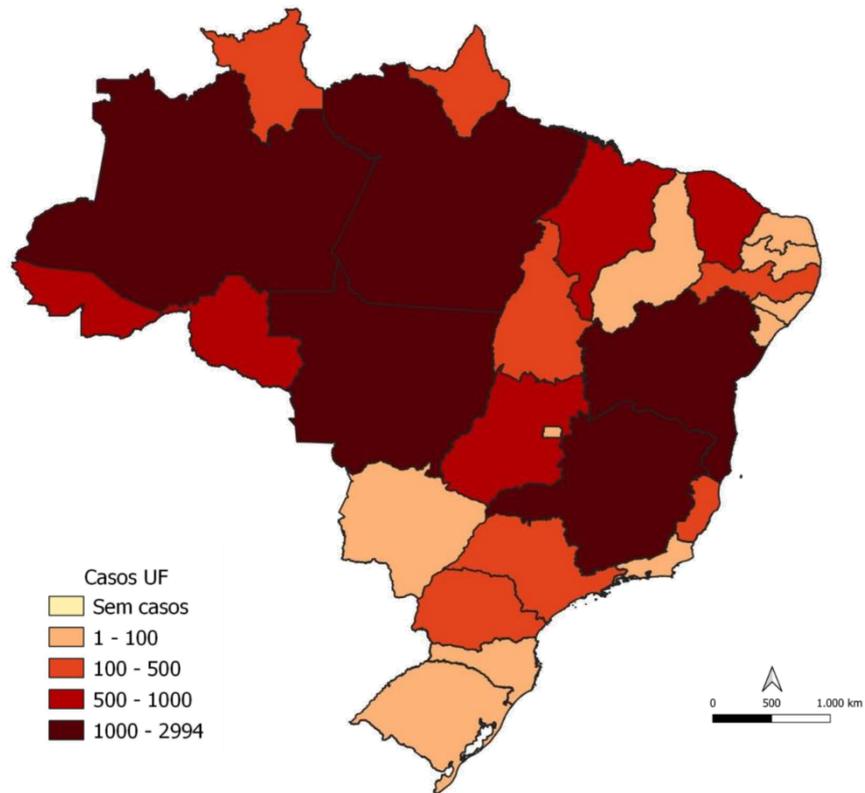
2.1.4 Aspectos epidemiológicos

De acordo com a WHO, atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas residem em áreas endêmicas para leishmaniose e estão susceptíveis à infecção por essa doença. Estima-se que ocorram anualmente 30 mil novos casos de LV e mais de 1 milhão de novos casos de LT. A multifatorialidade e a mortalidade das leishmanioses estão relacionadas principalmente com o constante aumento de resistência dos parasitos aos fármacos disponíveis e à falta de acesso aos mesmos. Além disso, os medicamentos leishmanicidas exigem um período prolongado de tratamento, apresentam diversos efeitos colaterais, alta toxicidade e, em alguns casos, alto

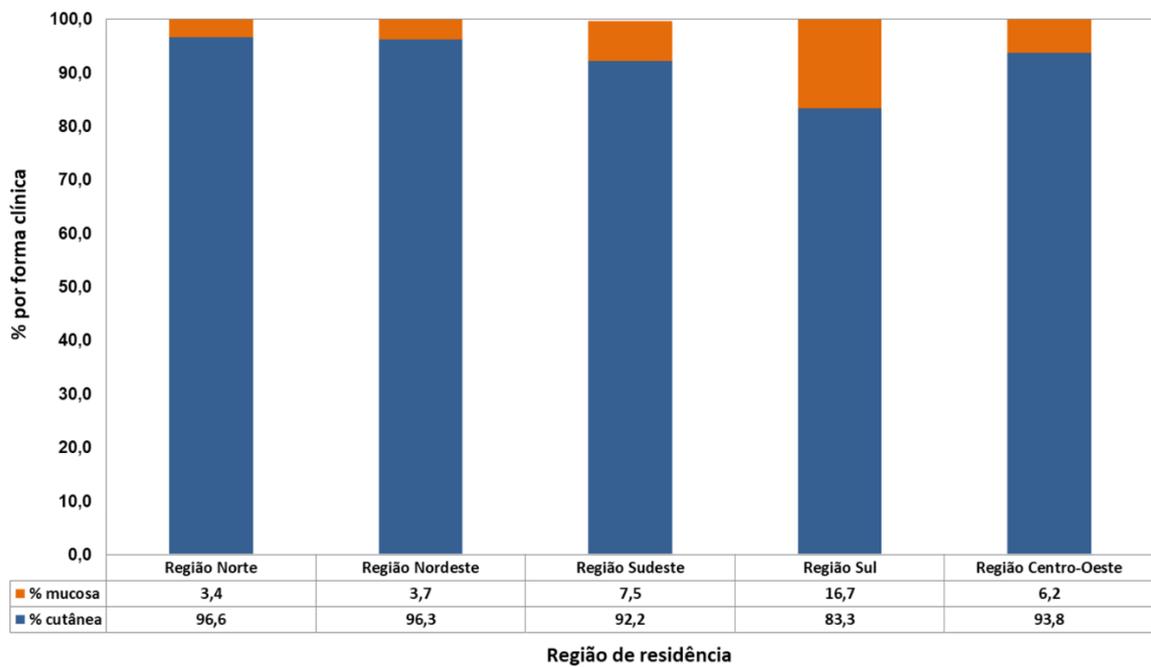
custo. Tal fato justifica a importância do desenvolvimento de novas alternativas para a farmacoterapia que possuam boa eficácia, baixa toxicidade e fácil administração (LAMOTTE *et al.*, 2017; NAGLE *et al.*, 2014; NO, 2016; WHO, 2020).

A LV afeta populações economicamente vulneráveis em mais de 80 países da Ásia, África Oriental, América do Sul e na região do Mediterrâneo, além disso, a falta de controle em áreas remotas torna difícil estimar a sua real incidência e taxa de letalidade. Entre 2001 e 2020 foram notificados cerca de 68 mil novos casos dessa forma de leishmaniose; os 10 países mais afetados são Brasil, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão, representando mais de 90% dos novos casos. Cerca de 87% dos casos de LT ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Líbia, Paquistão, Síria e Tunísia. Mais de 39,7 mil casos de leishmaniose mucocutânea foram registrados em 2020 na América Latina e no Caribe (DNDi, 2018; WASHINGTON, 2021).

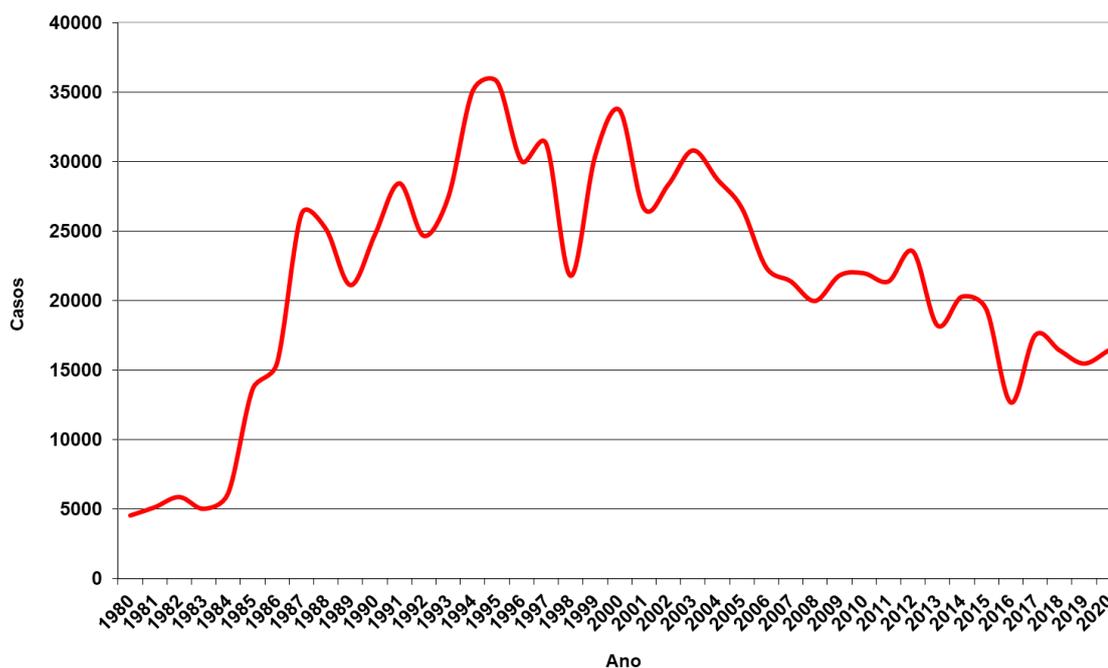
De acordo com o Ministério da Saúde (MS), em 2020 no Brasil, foram notificados 16.432 casos de LT (Figura 4), sendo a Região Norte responsável por 44,5% dos casos (7.312 casos), seguido da Região Nordeste com 17,4% dos casos (2.853 casos), Região Centro-Oeste com 14,8% casos (2.444 casos), Região Sudeste com 13% dos casos (2.148 casos) e Região Sul com 1,16% dos casos (191 casos). Os 9% (1484 casos) restantes não foram inseridos em nenhuma Unidade Federativa de acordo com os dados disponibilizados. O Estado que obteve destaque com o maior número de casos dentre os demais é o Pará (2.997 casos), seguido do estado do Mato Grosso (1.846 casos), Minas Gerais (1.721 casos), Amazonas (1.563 casos) e Bahia (1.122 casos). Ou seja, dois dos estados que apresentaram maior número de casos estão localizados na Região Norte. Além disso, os dados demonstram que a maioria dos casos correspondem à forma cutânea (Figura 5) em todas as regiões do país. Não obstante, é importante ressaltar que, ao se comparar os dados entre os anos de 1980 e 2020 (Figura 6), observa-se uma diminuição no número de casos de LT no Brasil, este fato pode estar ligado principalmente a subnotificação dessa doença.

Figura 4 – Casos de Leishmaniose Tegumentar por UF de infecção

Fonte: Brasil, 2020.

Figura 5 – Proporção de casos de Leishmaniose Tegumentar de acordo com a forma clínica por região de residência

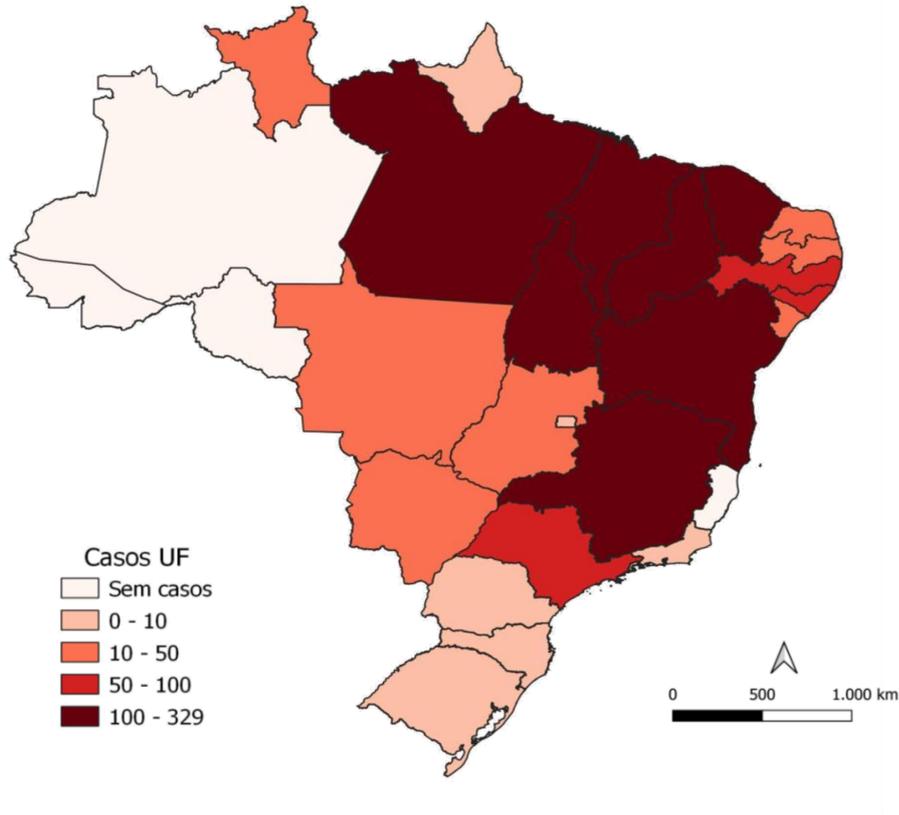
Fonte: Brasil, 2020.

Figura 6 – Casos de Leishmaniose Tegumentar no Brasil de 1980 a 2020

Fonte: Brasil, 2020.

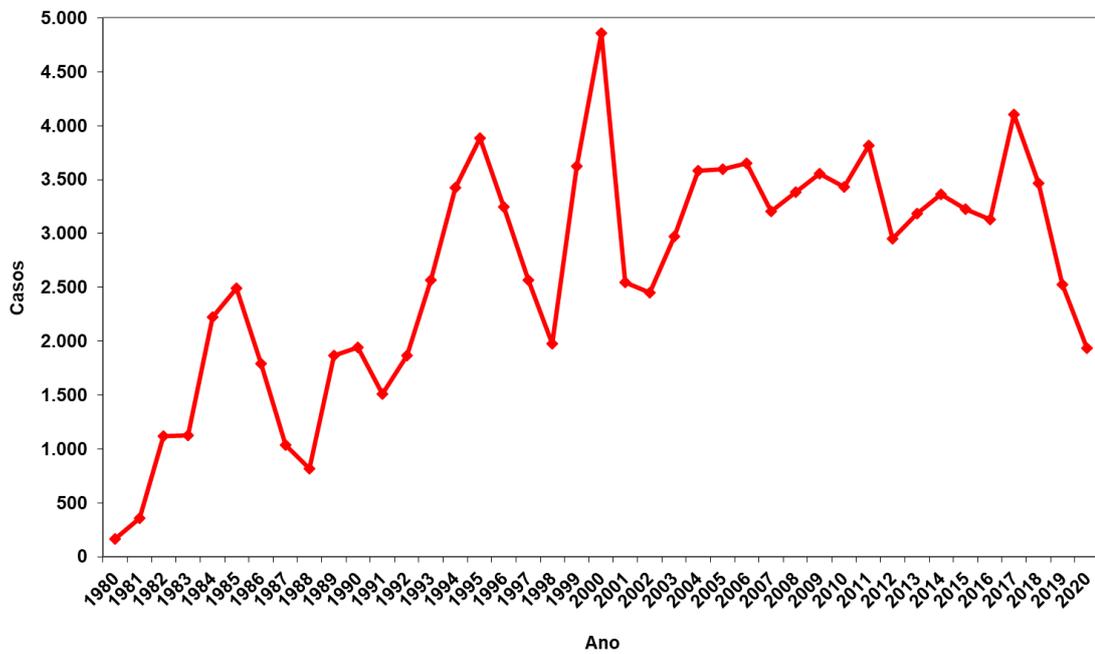
No ano de 2020, também segundo o MS (Figura 7), foram notificados 1.933 casos de LV, estando 48,6% (939 casos) destes localizados na Região Nordeste, 16% (308 casos) na Região Norte, 13,2% (256 casos) na Região Sudeste, 4,7% (90 casos) na Região Centro-Oeste e 0,36% (7 casos) na Região Sul. Os 16,2% (313 casos) restantes não foram inseridos em nenhuma Unidade Federativa, de acordo com os dados disponibilizados. O Estado com maior número de casos dentre os demais é o Maranhão (329 casos), seguido do Estado do Pará (187 casos), Minas Gerais (181 casos), Ceará (177 casos), Bahia (142 casos), Piauí (103 casos) e Tocantins (103 casos). Correlacionando com os dados de LT citados anteriormente, observa-se que alguns Estados lideram com os maiores números de casos notificados para ambas as formas da doença. Além disso, de acordo com os dados informados pelo MS, observa-se que entre os anos de 2017 e 2020 os casos de LV apresentam declínio significativo, como demonstrado na Figura 8.

Figura 7 – Casos de Leishmaniose Visceral por UF de infecção



Fonte: Brasil, 2022.

Figura 8 – Casos de Leishmaniose Visceral no Brasil de 1980 a 2020



Fonte: Brasil, 2022.

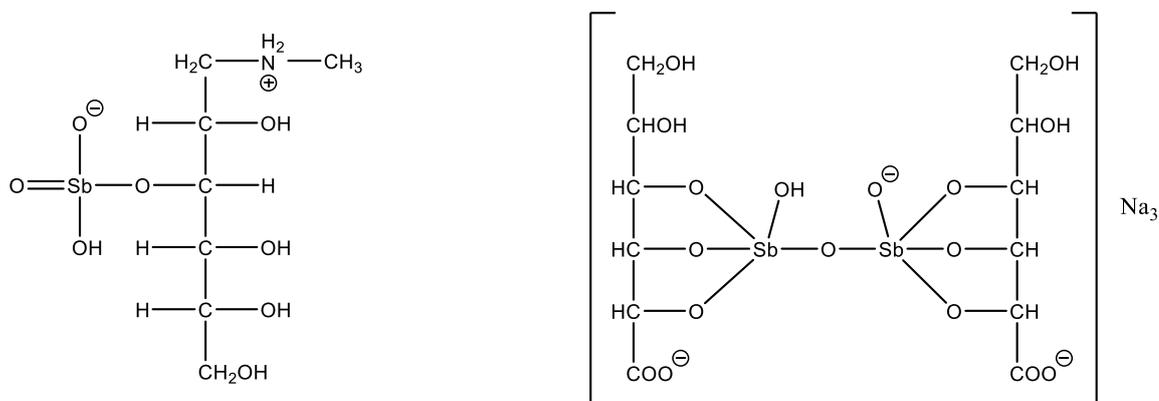
2.1.5 Tratamento

A principal classe de medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose é a dos compostos antimoniais pentavalentes como o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime ®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam ®) (Figura 9). Estas substâncias demonstram-se eficazes no tratamento de LT, LMC e LV, porém, são consideradas drogas de escolha há mais de 50 anos e apresentam efeitos colaterais bastante frequentes, como dores musculoesqueléticas e abdominais, alterações hepáticas, distúrbios cardiológicos e alterações eletrocardiográficas (LIMA *et al.*, 2007; LYRA *et al.*, 2013).

A administração do medicamento é outro ponto a ser discutido, visto que estes necessitam ser administrados pela via parenteral por vários dias, causando desconforto ao paciente e, conseqüentemente, levando a falta de adesão ao tratamento. O não cumprimento da farmacoterapia possibilitou o surgimento de formas resistentes do parasita, sendo este outro obstáculo significativo no tratamento com essa classe de compostos.

Tanto o antimoniato de N-metilglucamina quanto o estibogluconato de sódio agem através da inibição do maquinário energético do ciclo do ácido cítrico e da glicólise, causando diminuição dos níveis de adenosina (ATP) e guanosina trifostato (GTP), ou seja, afetando as reações metabólicas do parasita. Estudos também apontam a possibilidade de uma conversão metabólica no interior do macrófago do Sb^{+5} em Sb^{+3} , sendo este último responsável pela ação do fármaco contra as leishmanias, mas também relacionado à toxicidade ao paciente (KOFF, ROSEN, 1994; SERENO *et al.*, 1997).

Figura 9 – Estrutura do antimoniais pentavalentes



Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime ®)

Estibogluconato de sódio (Pentostam ®)

Fonte: Autoria própria, 2022.

Além dos antimoniais pentavalentes, existem também os medicamentos de segunda linha de tratamento como a anfotericina B e as pentamidinas. Ambas são utilizadas quando não há uma resposta favorável ao tratamento com antimoniais pentavalentes, com a finalidade de diminuir a clínica da doença e solucionar possíveis infecções secundárias que possam vir a agravar o caso. No entanto, assim como os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B é administrada por via parenteral por um longo período de tempo, tem alto custo e desencadeia diversos efeitos colaterais devido à sua toxicidade ao fígado, pulmões e rins, o que novamente corrobora para a falta de adesão à farmacoterapia e, conseqüentemente, para o surgimento de mecanismos de resistência dos parasitas (BALASEGARAM *et al.*, 2012; MACHADO-PINTO *et al.*, 2002; NEVES *et al.*, 2012; PELISSARI *et al.*, 2011).

Outro medicamento que têm se mostrado bastante promissor no tratamento da leishmaniose, principalmente cutânea, é a miltefosina, desenvolvida inicialmente a fim de auxiliar no tratamento de câncer. Diferente dos demais, este fármaco apresenta poucos efeitos colaterais e é administrado por via oral. Entretanto, além dessa substância ter um elevado custo, demonstrou ser potencialmente teratogênica, tornando-se assim contraindicada para mulheres grávidas ou que não estejam usando métodos anticoncepcionais de forma regular (ALMEIDA *et al.*, 2011; SUNDAR *et al.*, 2002).

A paramomicina, um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, vêm demonstrando também bons resultados no tratamento da leishmaniose visceral, podendo ser administrado por via intramuscular ou tópica. O seu mecanismo de ação se dá principalmente por meio da inibição da atividade mitocondrial da *Leishmania* (ALMEIDA *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2007; SUNDAR *et al.*, 2007).

Todos esses quesitos levam a crer que a farmacoterapia da leishmaniose é bastante limitada devido à existência de poucos medicamentos eficazes e com baixa toxicidade. Nesse contexto, mostra-se essencial a descoberta, o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento dessa enfermidade.

2.2 Planejamento de fármacos

É notável que historicamente a química medicinal vem ganhando um importante espaço no planejamento e desenvolvimento de moléculas com atividade anticancerígena, antiproliferativa, antiviral, antimicrobiana, entre outras. A química computacional é o principal instrumento utilizado no planejamento, otimização e criação de novos compostos orgânicos

com atividade biológica; essa investigação é realizada sobretudo a partir do estudo de docking molecular, visando observar a interação com alvos com importância farmacológica. Essa avaliação utiliza protótipos, de origem sintética ou natural obtidos utilizando *Virtual Screening*, que tenham sido previamente estudados e que apresentem resultados promissores. Além disso, a síntese química se destaca devido à existência de reações químicas inovadoras e mais eficientes e metodologias eficazes (ESTRADA, 1996; LIMA, 2007; THIRUMURANGAN, 2017).

2.2.1 Derivados tiofênicos

Dentre os compostos orgânicos de importância biológica destacam-se as moléculas contendo anéis heterocíclicos. Muitas dessas foram isoladas de recursos naturais e suas estruturas foram posteriormente simplificadas e modificadas, sendo consideradas estruturas privilegiadas. Os derivados tiofênicos estão incluídos nesse grupo de substâncias, e apresentam uma ampla gama de atividades biológicas; entre elas pode-se destacar sua ação antituberculose, antifúngica, antitumoral, antibacteriana, anti-helmíntica e antiprotozoária contra as formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania* (CLEGHORN *et al.*, 2018; GUIMARÃES *et al.*, 2014; JAMPILEK, 2019; MASIH, 2022; M.FOUAD, 2018; PRESTON *et al.*, 2018, RODRIGUES *et al.*, 2018; YO *et al.*, 2020).

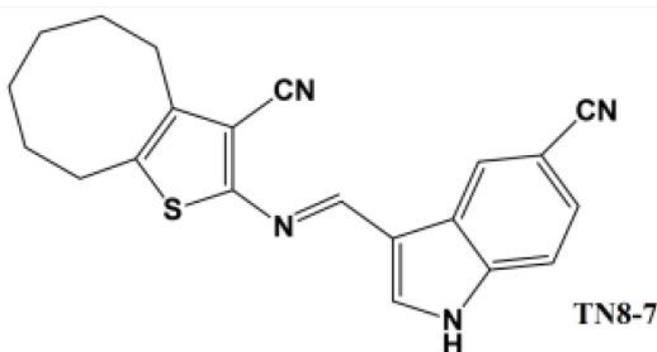
Publicações do nosso grupo de pesquisa demonstram uma promissora atividade antileishmania *in vitro* para os híbridos tiofeno-indóis por meio de variações no tamanho do anel cicloalquila ligado ao núcleo do tiofeno e variações de substituições no anel indol. Não foi possível estabelecer uma relação direta de como as substituições no anel indol afetam a atividade biológica, mas a posição 5 parece ser importante para a atividade, uma vez que a grande maioria dos compostos mais ativos possui substituições nessa posição 5-bromo no anel indol, em especial com o grupo ciclohexa[*b*]tiofenos, apresentando um melhor perfil que os fármacos de referência (antimoniais tri e penta-valente) se mostrando promissores candidatos a fármacos leishmanicidas (FÉLIX *et al.*, 2016; SERAFIM *et al.*, 2018).

A diversidade de atividades biológicas e a fácil obtenção desse grupo de compostos químicos justifica e desperta a grande procura em avaliar possíveis modificações estruturais na busca de melhores perfis farmacológicos e de menor toxicidade.

Um dos estudos do nosso grupo de pesquisa que visava avaliar a atividade antileishmania frente a *L. amazonensis*, de compostos contendo a combinação do núcleo 2-aminotiofeno com núcleos indol, demonstrou que todos os derivados sintetizados e testados

apresentaram menor toxicidade que os medicamentos de referência, mesmo na concentração mais alta avaliada, além disso, nenhum deles apresentou citotoxicidade eritrocitária humana. Os compostos que apresentaram melhor atividade foram TN8-7 (Figura 10), TN6-1 e TN7, com respectivos valores de CI_{50} de 2,1, 2,3 e 3,2 $\mu\text{g/ml}$. Além disso, quando comparados os valores de CI_{50} do composto contendo o núcleo indol não substituído com o CI_{50} dos compostos com a substituição na posição 5 deste anel, observou-se que as moléculas contendo substituições, como o grupamento ciano, apresentavam melhoramento na atividade antipromastigota (FÉLIX *et al.*, 2016).

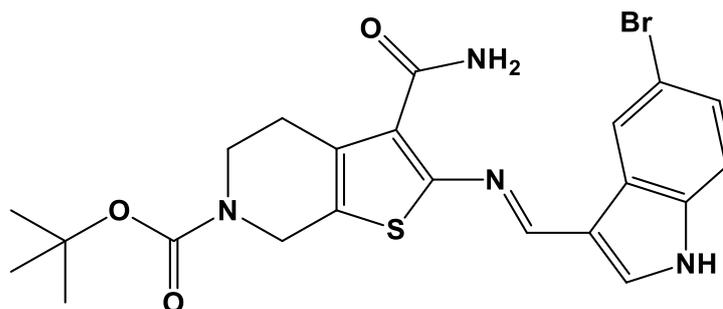
Figura 10 – Estrutura do TN8-7



Fonte: Félix, 2016.

Ferreira (2022) sintetizou e avaliou a atividade de derivados 2-aminotiofênicos apresentando o anel N-Boc-piperidina ligado ao anel tiofênico e núcleo indol frente a formas promastigotas de algumas cepas de *Leishmania*, e observou que todos compostos, principalmente o 6BOC2 ($CI_{50} < 8\mu\text{M}$) (Figura 11), contendo esse grupo protetor, demonstraram melhores valores de CI_{50} do que as demais moléculas que não o continham.

Figura 11 – Estrutura do 6BOC2



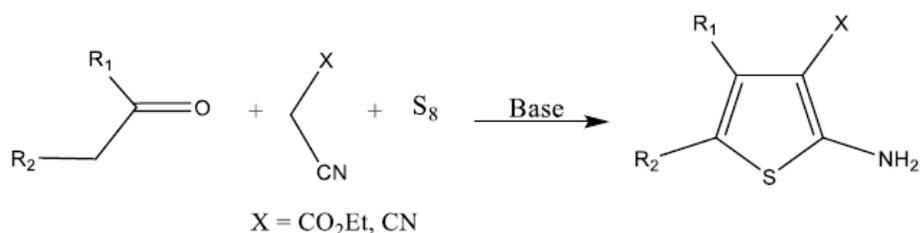
Fonte: Ferreira, 2022.

Portanto, visando o aprimoramento da atividade antileishmania, o presente trabalho uniu as ideias de ambas publicações, ou seja, lançou mão da utilização do anel N-Boc-piperidina juntamente com o núcleo indol substituído em diferentes posições. Ademais, buscou-se modificar o grupamento carboxamida ligado ao anel tiofênico por uma nitrila, a fim de avaliar a importância desse grupamento para a atividade biológica.

2.2.2 Reação de Gewald

Para obtenção desses derivados 2-aminotiofênicos, uma das rotas sintéticas mais utilizadas é a clássica reação de Gewald (Figura 12), que se caracteriza por ser uma reação rápida, de baixo custo, de alta variabilidade química e que resulta em compostos finais em rendimentos satisfatórios. Outra vantagem é o fato de existirem mais de uma dezena de variações metodológicas que podem ser utilizadas, permitindo uma vasta aplicação química. A reação para obtenção dos compostos 2-aminotiofenos substituídos a partir de uma reação de condensação de compostos que apresentam carbonilas (aldeídos e cetonas) em sua estrutura com uma nitrila ativada através da presença de uma base, e enxofre em temperatura ambiente (PUTEROVÁ; KRUTOSIKOVA; VEGH, 2009; SABNIS *et al.*, 1999; SHRIDHAR *et al.*, 2007).

Figura 12 – Esquema reacional da reação de Gewald



Fonte: Autoria própria, 2022.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Sintetizar, caracterizar e comprovar as estruturas de novos derivados 2-aminotiofeno-3-carbonitrilas candidatos a fármacos leishmanicidas, através da realização da modificação molecular de protótipos 2-aminotiofeno-3-carboxamidas a fim de verificar a importância do padrão de substituição da posição C-3 do anel tiofênico.

3.2 Objetivos específicos

- Promover a síntese química de novos derivados 2-aminotiofênicos com o objetivo de avaliar a modificação bioisostérica na posição C-3 do grupo amida pelo grupo ciano.
- Determinar as características físico-químicas dos produtos sintetizados.
- Comprovar as estruturas químicas por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).
- Avaliar o potencial leishmanicida dos candidatos a fármacos sintetizados *in vitro* frente a formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.
- Avaliar a citotoxicidade dos candidatos a fármacos em macrófagos.

4 METODOLOGIA

4.1 Local de trabalho

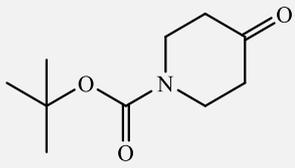
Todos os procedimentos experimentais de síntese dos compostos foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos (UEPB – Campus I) em parceria com o Professor Dr. Ricardo Olímpio de Moura, sob supervisão do Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior. A caracterização dos compostos por Ressonância Magnética Nuclear foi realizada no Núcleo de Análise e Pesquisa em Ressonância Magnética Nuclear (NAPRMN) do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL, sob coordenação do Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino. Os testes de atividade antipromastigota foram realizados no Laboratório de Doenças Infecciosas da UFDPAr, sob coordenação do Prof. Dr. Klinger Antônio de Franca Rodrigues.

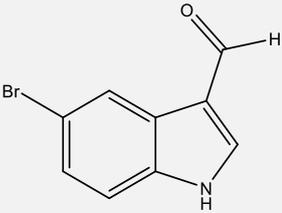
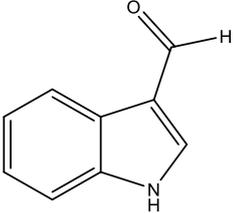
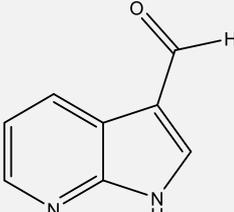
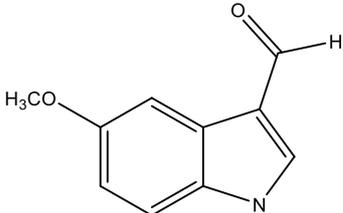
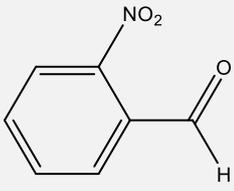
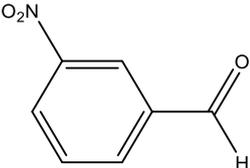
4.2 Procedimento geral de síntese

4.2.1 Reagentes

Todos os reagentes (Quadro 1) foram obtidos comercialmente e utilizados sem purificação prévia.

Quadro 1 – Reagentes utilizados nas sínteses

Nome	Estrutura química	Fórmula molecular
1-Boc-4-piperidona		$C_{10}H_{17}NO_3$
Malononitrila		$CH_2(CN)_2$

5-Bromoindol-3-carboxialdeído		C_9H_6BrNO
Indol-3-carboxialdeído		C_9H_7NO
7-Azaindol-3-carboxialdeído		$C_8H_6N_2O$
5-Metoxindol-3-carboxialdeído		$C_{10}H_9NO_2$
2-Nitrobenzaldeído		$C_7H_5NO_3$
3-Nitrobenzaldeído		$C_7H_5NO_3$
4-Nitrobenzaldeído		$C_7H_5NO_3$

Fonte: Autoria própria, 2022.

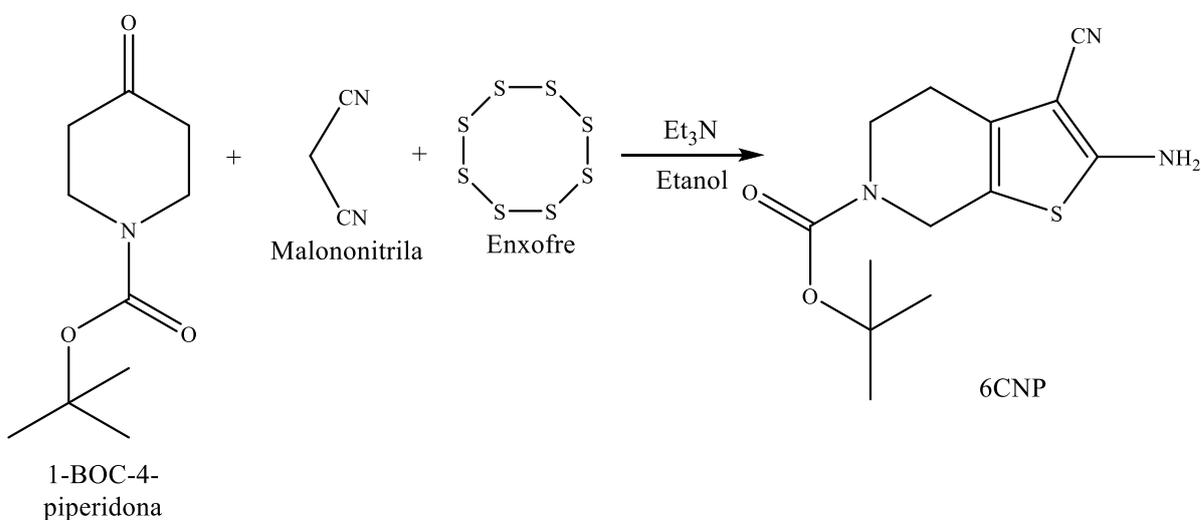
4.2.2 Solventes

Os solventes foram usados para o processo reacional, de purificação e como eluentes. Foram eles: etanol, acetato de etila, hexano e diclorometano. Todos foram obtidos comercialmente, e não foram submetidos a nenhum tipo de purificação.

4.2.3 Processo reacional

- **Reação 1 – Obtenção do 6CNP (2-amino-3-ciano-4,7-dihidrotieno[2,3-*c*]piridina-6(5*H*)-carboxilato de *terc*-butila)**

Figura 13 - Obtenção do aduto de Gewald

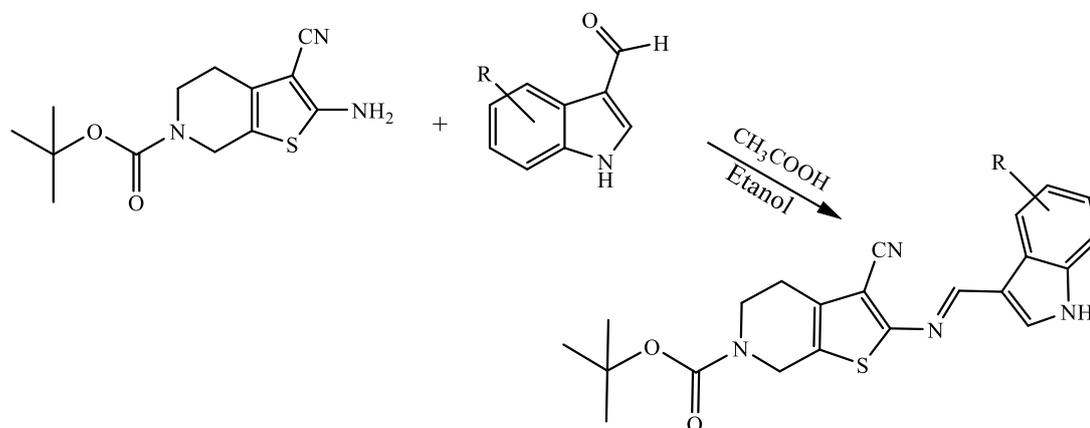


Fonte: Autoria própria, 2022.

O aduto de Gewald foi obtido a partir da reação de condensação em etanol (5 mL) contendo quantidades equimolares (2,5 mmol) de 1-boc-4-piperidona, enxofre e malononitrila, com adição de 0,5 eq de trietilamina sob banho de gelo, com posterior agitação (400 rpm) por 4 h à temperatura ambiente, em balão de fundo redondo. Constatou-se o término do procedimento por meio de CCD em um sistema 7:3 hexano/acetato. O precipitado formado foi submetido à filtragem em papel de filtro e seguida lavado com etanol gelado. Os cristais formados na solução mãe foram submetidos ao mesmo processo de filtragem.

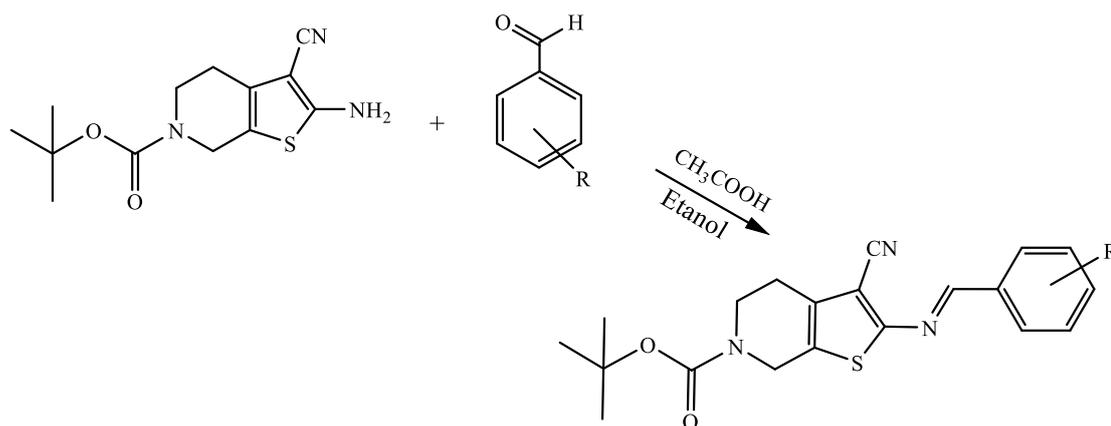
- **Reação 2 – Obtenção dos derivados 2-aminotiofênicos a partir da reação de condensação do composto 6CNP com aldeídos**

Figura 14 - Reação de obtenção dos derivados tiofênicos contendo o anel indol



Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 15 - Reação de obtenção dos derivados tiofênicos com benzaldeídos



Fonte: Autoria própria, 2022.

Para a síntese dos produtos finais, foram adicionadas em um balão de fundo redondo quantidades equimolares (0,18 mmol) do 6CNP e dos reagentes contendo o grupamento R-nitro-benzaldeído ou R-indol-3-carboxialdeído (Figuras 14 e 15), em meio etanólico, tendo como catalizador o ácido acético. Acompanhou-se o processo reacional por meio de CCD e este foi realizado à temperatura ambiente por 24h. Após a confirmação do término, o balão foi colocado no rotaevaporador para a redução do volume e em seguida mantido em temperatura ambiente até a formação dos cristais. Os cristais obtidos foram filtrados com o auxílio de um

papel de filtro e lavados com etanol gelado para evitar a presença de impurezas. Por meio desse processo, foram obtidos os seguintes compostos:

Quadro 2 – Nomenclatura dos compostos sintetizados

Código	Nome (IUPAC)
6CNP01	(<i>E</i>)-2-(((5-bromo-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)amino)-3-ciano-4,7-dihidrotieno[2,3- <i>c</i>]piridino-6(5 <i>H</i>)-carboxilato de <i>terc</i> -butila
6CNP02	(<i>E</i>)-3-ciano-2-((4-nitrobenzilideno)amino)-4,7-dihidrotieno[2,3- <i>c</i>]piridino-6(5 <i>H</i>)- carboxilato de <i>terc</i> -butila
6CNP03	(<i>E</i>)-2-(((1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)amino)-3-ciano-4,7-dihidrotieno[2,3- <i>c</i>]piridino-6(5 <i>H</i>)- carboxilato de <i>terc</i> -butila
6CNP04	(<i>E</i>)-3-ciano-2-(((5-metoxi-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)amino)-4,7-dihidrotieno[2,3- <i>c</i>]piridino-6(5 <i>H</i>)- carboxilato de <i>terc</i> -butila
6CNP05	(<i>E</i>)-2-(((1 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>b</i>]piridin-3-il)metileno)amino)-3-ciano-4,7-dihidrotieno[2,3- <i>c</i>]piridino-6(5 <i>H</i>)-c carboxilato de <i>terc</i> -butila
6CNP06	(<i>E</i>)-3-ciano-2-((2-nitrobenzilideno)amino)-4,7-dihidrotieno[2,3- <i>c</i>]piridino-6(5 <i>H</i>)- carboxilato de <i>terc</i> -butila
6CNP07	(<i>E</i>)-3-ciano-2-((3-nitrobenzilideno)amino)-4,7-dihidrotieno[2,3- <i>c</i>]piridino-6(5 <i>H</i>)- carboxilato de <i>terc</i> -butila
6CNP08	(<i>E</i>)-3-ciano-2-(((5-metil-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)amino)-4,7-dihidrotieno[2,3- <i>c</i>]piridino-6(5 <i>H</i>)- carboxilato de <i>terc</i> -butila
6CNP09	(<i>E</i>)-3-ciano-2-(((5-ciano-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)amino)-4,7-dihidrotieno[2,3- <i>c</i>]piridino-6(5 <i>H</i>)- carboxilato de <i>terc</i> -butila
6CNP10	(<i>E</i>)-3-cyano-2-(((6-ciano-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)amino)-4,7-dihidrotieno[2,3- <i>c</i>]piridino-6(5 <i>H</i>)- carboxilato de <i>terc</i> -butila

Fonte: Autoria própria, 2022.

4.3 Estudo Químico

4.3.1 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Para o acompanhamento monitorado das reações foi utilizada a cromatografia de camada delgada de placas FLUKA sílica gel 60 sobre folha de alumínio, com espessura de 0,20 nm. A leitura das mesmas foi feita através de radiação de ultravioleta (UV) o comprimento de onda (λ) de 254 ou 365 nm.

4.3.2 Faixa de fusão

As faixas de fusão dos compostos sintetizados foram determinadas no equipamento *Fisatom*, Modelo 431, e a visualização foi feita em sistema óptico com aumento de 4x.

4.3.3 Fator de retenção

A determinação do fator de retenção dos compostos sintetizados foi realizada por meio de cromatografia em camada delgada em placas FLUKA Analytical Sílica Gel com espessura de 0,20 mm, através da comparação das medidas obtidas para os compostos com o sistema eluente predeterminado. Para revelar foi utilizada a câmara de emissão de radiação ultravioleta Boitton, em comprimentos de 254 e 365 nm.

4.3.4 Rendimento da reação

A partir da pesagem dos compostos em uma balança analítica pode-se realizar o cálculo do rendimento da reação, com obtenção do valor em gramas e posterior conversão para quantidade de mols (Equação 1). Sendo assim, possibilitou-se relacionar o número de mols do produto e o número de mols do reagente de partida, obtendo-se então o rendimento em porcentagem (Equação 2).

$$\text{(Equação 1) Número de mols}_{\text{produto}} = \frac{m_{\text{produto}}}{MM_{\text{produto}}}$$

$$\text{(Equação 2) } \frac{\text{Número de mols do produto}}{\text{Número de mols do reagente de partida}} \times 100 = \text{Rendimento (\%)}$$

4.3.5 Aparência

A aparência dos compostos foi determinada apenas pela observação visual, a olho nu, do produto.

4.3.6 Nomenclatura das moléculas

Os nomes das novas moléculas foram obtidos pelo programa ChemDraw Ultra 13 da CambridgeSoft, levando em consideração as regras da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

4.4 Caracterização estrutural

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C (DEPT) foram obtidos em um espectrômetro Bruker DXP de 125 e de 600 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) foram indicados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em hertz (Hz). Utilizou-se os picos residuais de (dimetilsulfóxido) DMSO deuterado como referência. Foram empregadas as seguintes abreviaturas: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), t (tripleto) e m (multiplete).

4.5 Ensaio Biológicos para Avaliação do Potencial Leishmanicida e Citotóxico

4.5.1 Manutenção de parasitos e macrófagos

Parasitos das espécies *Leishmania amazonenses* (IFLA/BR/67/PH8), *Leishmania major* (MHOM/BR/1976/JOF), *Leishmania infantum* (HOM/BR/1975/M2903) e *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 replicadas semanalmente.

A linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264,7 foi conservada em frascos de cultura celular de 750 cm^2 (Corning Glass Workers – New York – USA) em meio Eagle's minimal essential medium (DMEM) suplementado [10% de SFB, 1% de antibiótico – 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina] (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), pH 7, a 37 °C, 5% de CO_2 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 48h a 72h após acondicionamento.

4.5.2 Preparo de drogas

Para os testes *in vitro*, preparou-se 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.

4.5.3 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 x 160 parasitos/poço) contendo 100 µL de meio Schneider suplementado, em triplicata, contendo concentrações seriadas das substâncias-teste (50 a 1,56 µM) e controle positivo (miltefosina 200 a 1,56 µM). As placas foram incubadas em câmaras climatizadas BOD a 26 °C por 72 h. Após o período de tratamento, 10 µL 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 µL de solução de dodecil sulfato de sódio (DSS) a 10% (p/v em água destilada) para a solubilização dos cristais de formazan. Realizou-se a leitura 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.

4.5.4 Citotoxicidade em macrófagos

Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio DMEM suplementado e 1 x 10⁵ macrófagos RAW 264.7 por poço. Após 4 h de incubação a 37 °C e 5% de CO₂ para adesão celular realizou-se três lavagens com PBS estéril. Em seguida, foram adicionados 100 µL de meio DMEM suplementado contendo diferentes concentrações das substâncias (400 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 4 h. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e adiciona-se 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. O meio DMEM suplementado e contendo 0,5% de DMSO foi usado como controle negativo e considerado com 100% de viabilidade de macrófagos (NUNES et al, 2021).

4.5.5 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.

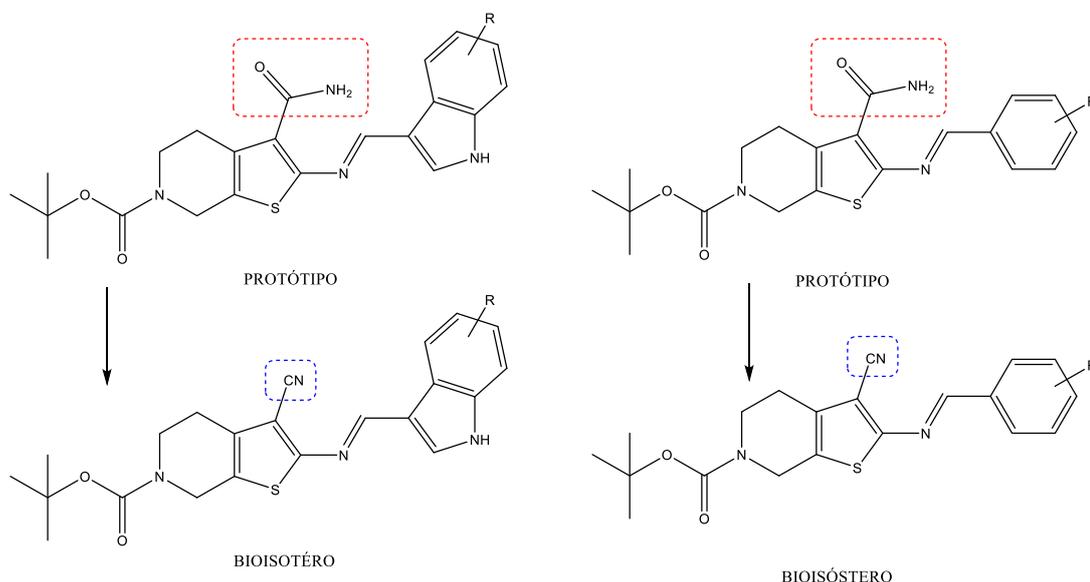
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese dos compostos

5.1.1 Obtenção do Aduto de Gewald 6CNP

A síntese dos novos compostos teve como base estruturas de protótipos 2-aminotiofênicos (Figura 16) já estudados pelo nosso grupo de pesquisa e que demonstraram boa atividade leishmanicida e menor toxicidade que os medicamentos de referências utilizados atualmente (FÉLIX, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2015). A partir de um biosisosterismo não-clássico buscou-se substituir o grupamento amida na posição C-3 do anel tiofêncio pelo grupamento ciano, a fim de avaliar possíveis alterações no padrão de atividade frente as formas promastigotas de *Leishmania*.

Figura 16 – Protótipos utilizados

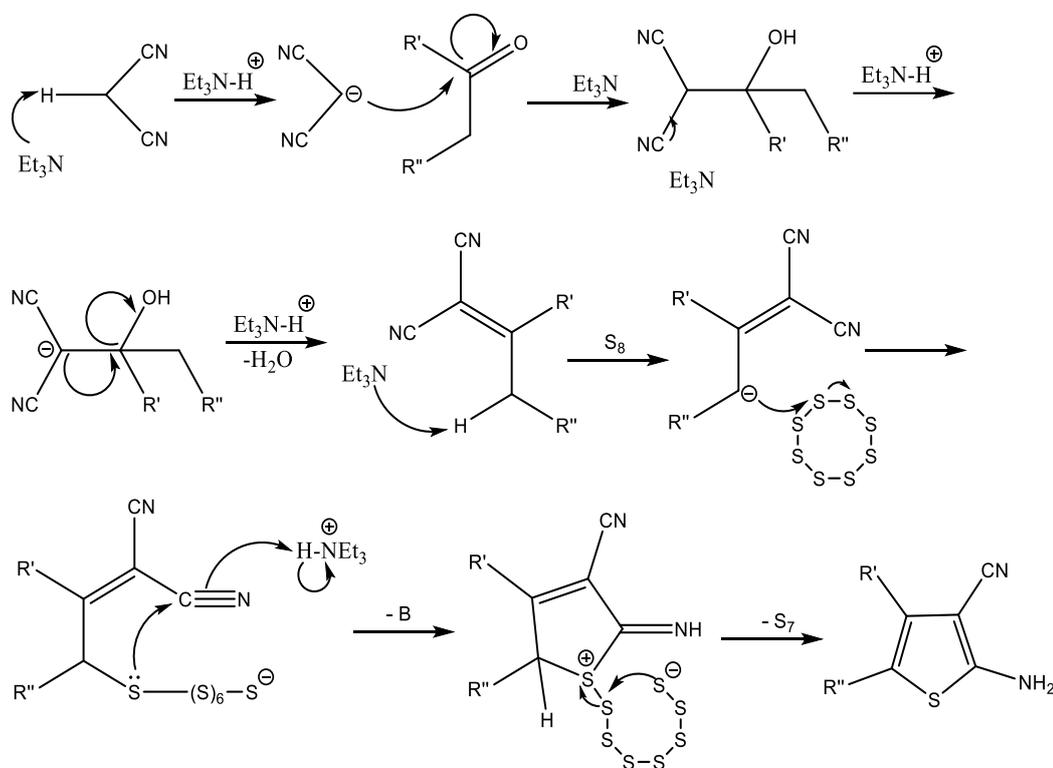


Fonte: Autoria própria, 2022.

Realizou-se a obtenção por meio de rota sintética dividida em duas etapas, sendo obtido na primeira etapa, através da Reação de Gewald, o composto 6CNP já descrito na literatura, e na segunda etapa os dez compostos inéditos por meio de uma reação de condensação do aduto de Gewald com aldeídos indólicos e fenílicos. Esse procedimento foi realizado baseado na metodologia de obtenção dos protótipos já citados.

O mecanismo da reação de Gewald (Figura 17) inicia-se com uma reação de condensação de Knoevenagel entre uma cetona ou um aldeído e um composto metileno ativado. Primeiramente, ocorre o ataque da base trietilamina ao carbono metilênico da malononitrila, retirando um próton do mesmo, formando assim um nucleófilo que ataca a carbonila do 4-oxopiperidina-1-carboxilato de *ter*-butila (reagente de partida). Com isso, ocorre o deslocamento de elétrons π para o oxigênio, tornando-o apto para a captação do próton que estava ligado à trietilamina. Logo após, uma molécula de água é formada e o rearranjo da estrutura faz com que se forme uma dupla ligação, dando origem a uma acrilonitrila. Posteriormente, a trietilamina retirará o próton mais ácido da molécula localizado na posição α à carbonila, formando um carbânion que ataca um dos átomos de enxofre (S_8). Sendo assim, o composto contendo o átomo de enxofre sofre fechamento do anel através do ataque do átomo de enxofre à nitrila. Por fim, o rearranjo prototrópico e a tautomerização fornece os compostos 2-aminotiofênicos (HUANG; DÖMLING, 2010).

Figura 17 – Mecanismo reacional da reação de Gewald



Fonte: Autoria própria, 2022.

Após filtragem, lavagem com etanol gelado e secagem, a pureza do aduto 6CNP foi constatada através da realização de CCD, onde pode-se observar a presença de apenas um

ponto, confirmando a inexistência de outros compostos contaminantes. Sua aparência foi de pó branco amarelado, com rendimento de 50%.

Figura 18 – Aduto 6CNP

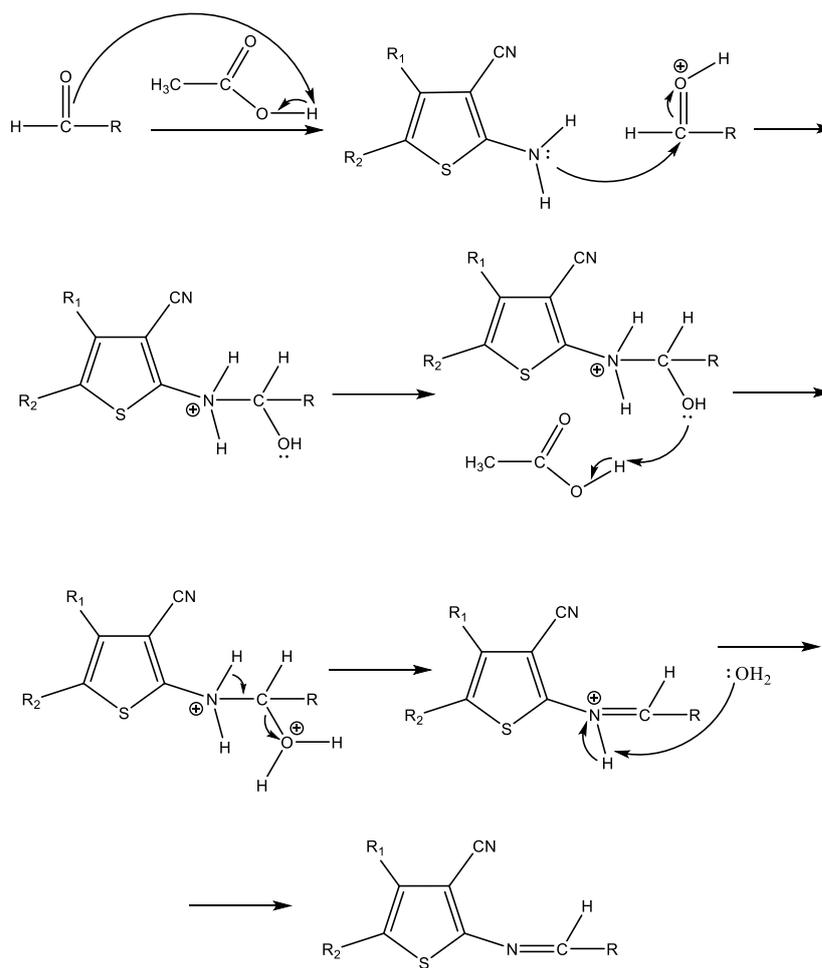


Fonte: Autoria própria, 2022.

5.1.2 Obtenção dos derivados 2-aminotiofênicos

Para obtenção dos derivados 2-aminotiofênicos, seguindo as metodologias de obtenção dos protótipos, foram realizadas reações de condensação do aduto 6CNP com aldeídos fenílicos e indólicos. O mecanismo dessa reação (Figura 19) inicia-se quando o grupamento aldeído se ativa em meio ácido por meio da captação de um hidrogênio. Então, o par de elétrons do nitrogênio presente na amina do derivado aminotiofênico age como nucleófilo e ataca o carbono do aldeído; posteriormente, ocorre o deslocamento dos elétrons da ligação para o oxigênio, que após capturar um próton do meio formará uma molécula de água ligada à estrutura. Com a formação da molécula de água, a estrutura se torna instável fazendo com que ocorra um rearranjo que possibilitará a formação de uma dupla ligação entre o nitrogênio e o carbono, seguida da eliminação da molécula de água. Por fim, a molécula de água retira o próton ligado ao nitrogênio, dando origem a um íon hidrônio e ao derivado 2-aminotiofênico.

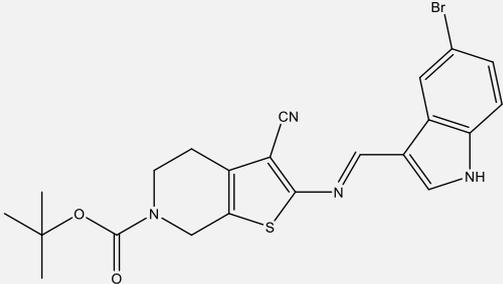
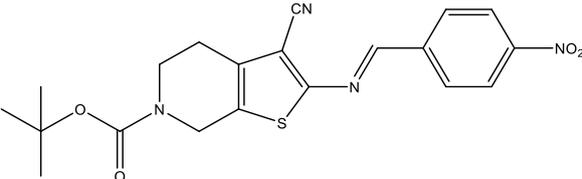
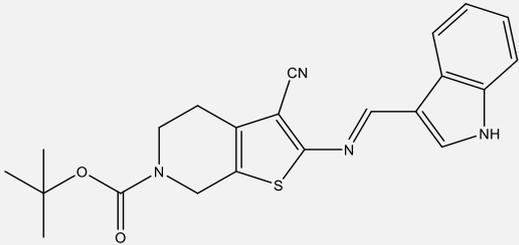
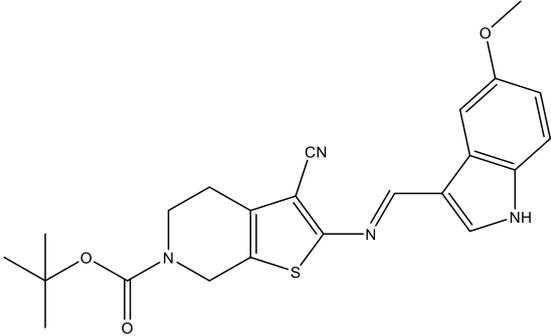
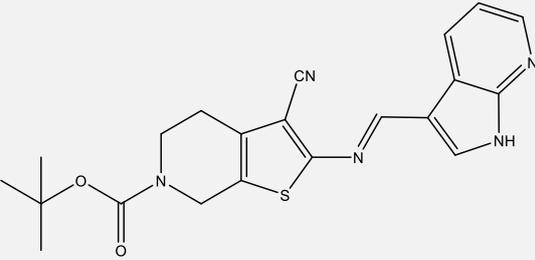
Figura 19 – Mecanismo reacional de obtenção dos derivados 2-aminotiofênicos

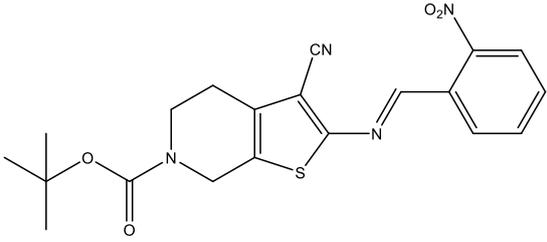
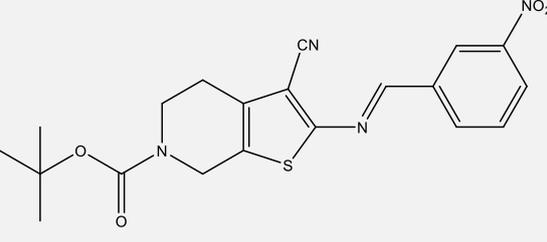
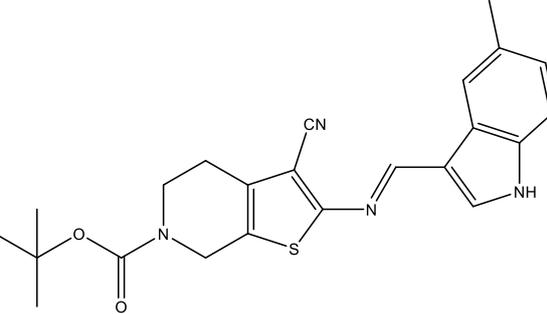
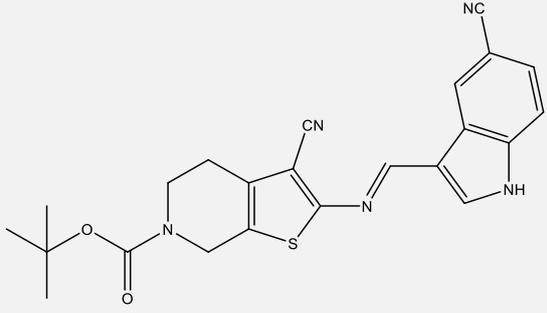
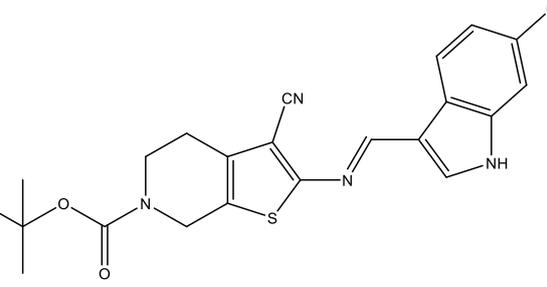


Fonte: Autoria própria, 2022.

A partir desse processo, foram obtidos 10 compostos com diferentes variações em seus radicais, como descrito nos Quadros 3, 4 e 5.

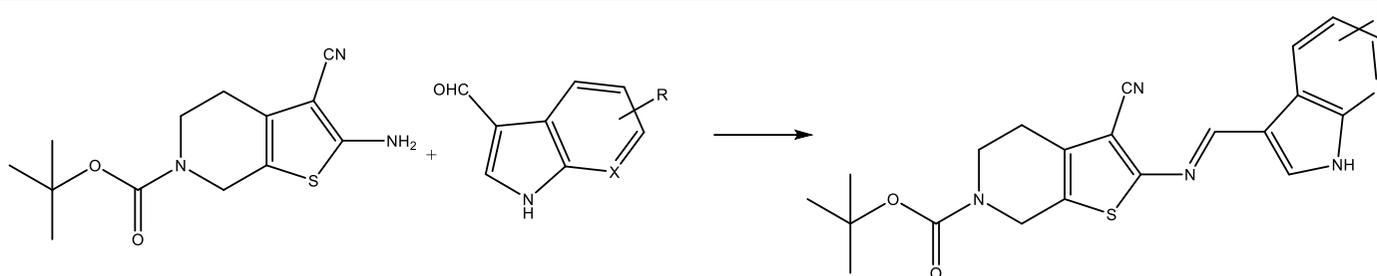
Quadro 3 – Derivados 2-aminotiofênicos sintetizados

CÓDIGO	ESTRUTURA
6CNP01	 <chem>CC(C)(C)OC(=O)N1CCc2sc(C#N)c2N1C=Nc3c[nH]c4cc(Br)cc34</chem>
6CNP02	 <chem>CC(C)(C)OC(=O)N1CCc2sc(C#N)c2N1C=Nc3ccc([N+](=O)[O-])cc3</chem>
6CNP03	 <chem>CC(C)(C)OC(=O)N1CCc2sc(C#N)c2N1C=Nc3c[nH]c4ccccc34</chem>
6CNP04	 <chem>CC(C)(C)OC(=O)N1CCc2sc(C#N)c2N1C=Nc3c[nH]c4cc(OC)cc34</chem>
6CNP05	 <chem>CC(C)(C)OC(=O)N1CCc2sc(C#N)c2N1C=Nc3c[nH]c4cncn34</chem>

6CNP06	 <chem>CC(C)(C)OC(=O)N1CCN(CC1)c2sc(C#N)c2=N/C=C/c3ccc([N+](=O)[O-])cc3</chem>
6CNP07	 <chem>CC(C)(C)OC(=O)N1CCN(CC1)c2sc(C#N)c2=N/C=C/c3ccc([N+](=O)[O-])cc3</chem>
6CNP08	 <chem>CC(C)(C)OC(=O)N1CCN(CC1)c2sc(C#N)c2=N/C=C/c3c[nH]c4cc(C)cc34</chem>
6CNP09	 <chem>CC(C)(C)OC(=O)N1CCN(CC1)c2sc(C#N)c2=N/C=C/c3c[nH]c4cc(C#N)cc34</chem>
6CNP10	 <chem>CC(C)(C)OC(=O)N1CCN(CC1)c2sc(C#N)c2=N/C=C/c3c[nH]c4cc(C#N)cc34</chem>

Fonte: Autoria própria, 2022.

Quadro 4 – Características físico-químicas dos derivados 2-aminotiofênicos contendo radical indol



Código	R	X	Fórmula molecular	PM (g/mol)	Aparência	Faixa de Fusão (°C)	Rf*	Rendimento (%)
6CNP01	Br	CH	C ₂₂ H ₂₁ BrN ₄ O ₂ S	485,40	Amarelo	223 – 236	0,40	34
6CNP03	-	CH	C ₂₂ H ₂₂ N ₄ O ₂ S	406,50	Amarelo	231 – 235	0,41	44
6CNP04	OCH ₃	CH	C ₂₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S	436,53	Amarelo	253 – 255	0,44	36
6CNP05	-	N	C ₂₁ H ₂₁ N ₅ O ₂ S	407,49	Amarelo escuro	242 – 259	0,24	46
6CNP08	CH ₃	CH	C ₂₃ H ₂₄ N ₄ O ₂ S	420,53	Amarelo	232 – 240	0,43	67
6CNP09	CN	CH	C ₂₃ H ₂₁ N ₅ O ₂ S	431,51	Amarelo	278 – 285	0,23	55
6CNP10	CN	CH	C ₂₃ H ₂₁ N ₅ O ₂ S	431,51	Amarelo	241 – 245	0,3	65

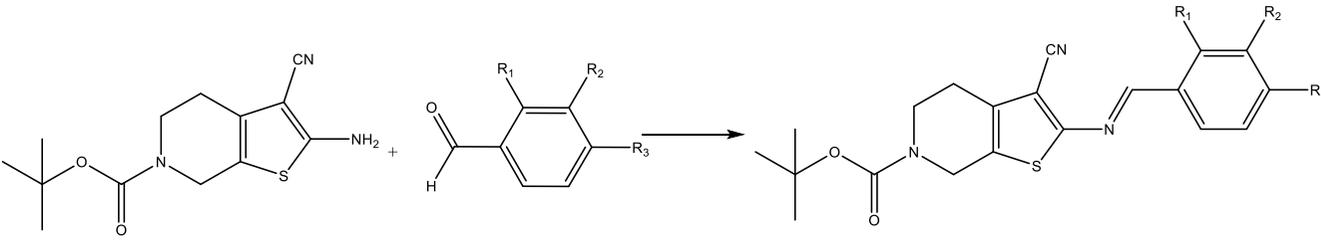
* Hex/AcOEt (6:4)

Fonte: Autoria própria, 2022.

Nenhum dos derivados 2-aminotiofênicos sintetizados necessitou de purificação após o processo reacional. Os compostos contendo o grupamento indol apresentaram aparência de pó amarelo como descrito na literatura, com exceção do composto 6CNP05, que se apresentou na

forma de cristal amarelo escuro. Os rendimentos desse grupo de moléculas variaram entre 34 – 67%, sendo os compostos 6CNP08 (67%), 6CNP10 (65%), 6CNP09 (55%) e 6CNP05 (46%) com melhores porcentagens.

Quadro 5 – Características físico-químicas dos derivados 2-aminotiofênicos contendo radical benzílico



CÓDIGO	R ₁	R ₂	R ₃	Fórmula molecular	PM (g/mol)	Aparência	Faixa de fusão (°C)	Rf*	Rend. (%)
6CNP02	H	H	NO ₂	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₄ S	412,46	Amarelo escuro	222 – 228	0,32	89
6CNP06	NO ₂	H	H	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₄ S	412,46	Amarelo escuro	214 – 219	0,58	44
6CNP07	H	NO ₂	H	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₄ S	412,46	Amarelo escuro	212 – 217	0,6	46

* Hex/AcOEt (6:4)

Fonte: A autoria própria, 2022.

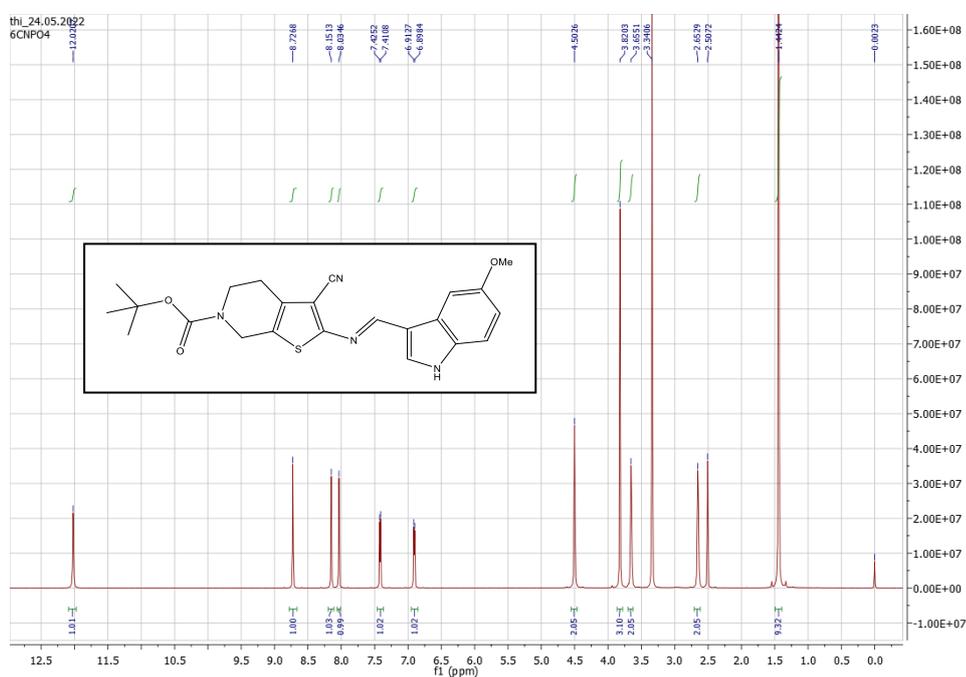
Já os compostos contendo o radical benzílico se apresentaram na forma de cristal amarelo escuro, e demonstraram rendimentos de 89% (6CNP02), 44% (6CNP06) e 46% (6CNP07), mantendo-se próximos dos compostos contendo o radical indol.

5.2 Comprovação estrutural

Os compostos obtidos foram caracterizados através da técnica de RMN ^1H e RMN ^{13}C (DEPT) a fim de comprovar sua estrutura química. Neste trabalho os RMNs de ^1H e RMNs ^{13}C (DEPT) dos compostos 6CNP04 e 6CNP02, sendo o primeiro uma molécula com contendo o radical indol e o segundo o radical benzil, foram interpretados e detalhados, respectivamente. Os dados dos demais compostos sintetizados podem ser observados no Quadro 6.

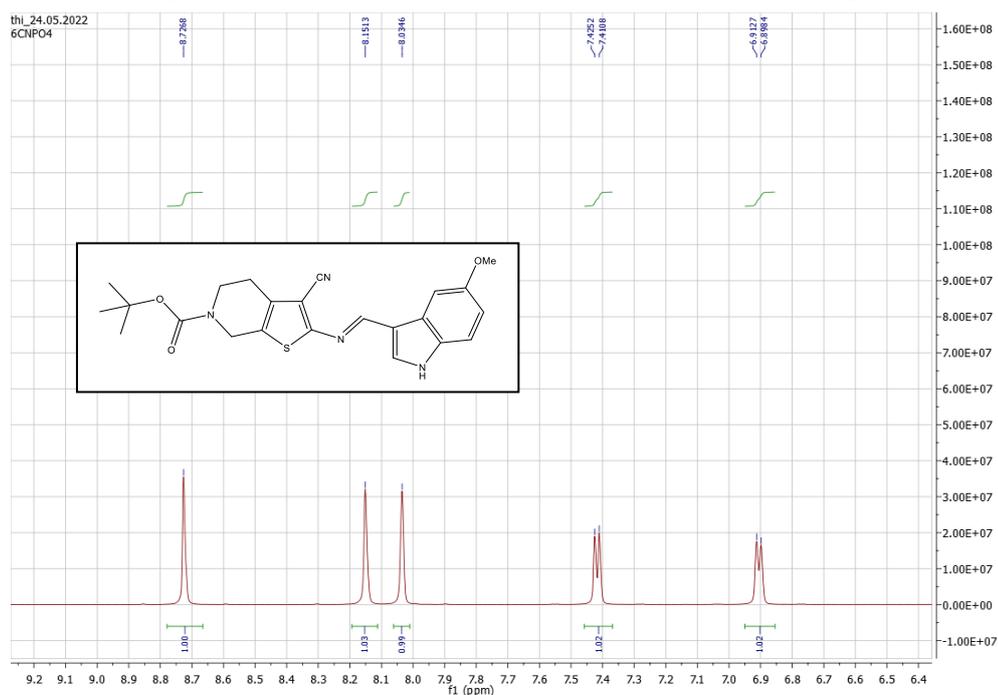
No espectro de RMN ^1H do composto 6CNP04 (Figuras 21 e 22) foi possível observar um simpleto com integral para 9H em 1,44 ppm indicando as 3 metilas homotópicas da porção *terc*-butila, assim como um simpleto em 3,82 ppm com integral para 3H referente aos hidrogênios da metoxila ligada ao anel indol. Observou-se também um singleto em 3,65 ppm, um multipletto em 2,65 ppm e um singleto em 4,50 ppm, todos com integral para 2H, correspondentes aos hidrogênios do anel piperidina. Além disso, os dupletos em 6,90 ppm e em 7,41 ppm, e os singletos em 8,03 ppm e em 8,15 ppm, todos com integral para 1H, junto com o sinal em 12,02 ppm em simpleto largo com integral para 1H referente ao hidrogênio (NH) confirmam a presença do anel indol. Por fim, é possível observar um simpleto em 8,72 ppm com integral para 1H referente ao hidrogênio da imina, sendo este um sinal diagnóstico que confirma a condensação do aduto de Gewald e do aldeído, devido a ligação das duas moléculas através do átomo de nitrogênio.

Figura 20 – Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do composto 6CNP04



Fonte: Autoria própria, 2022.

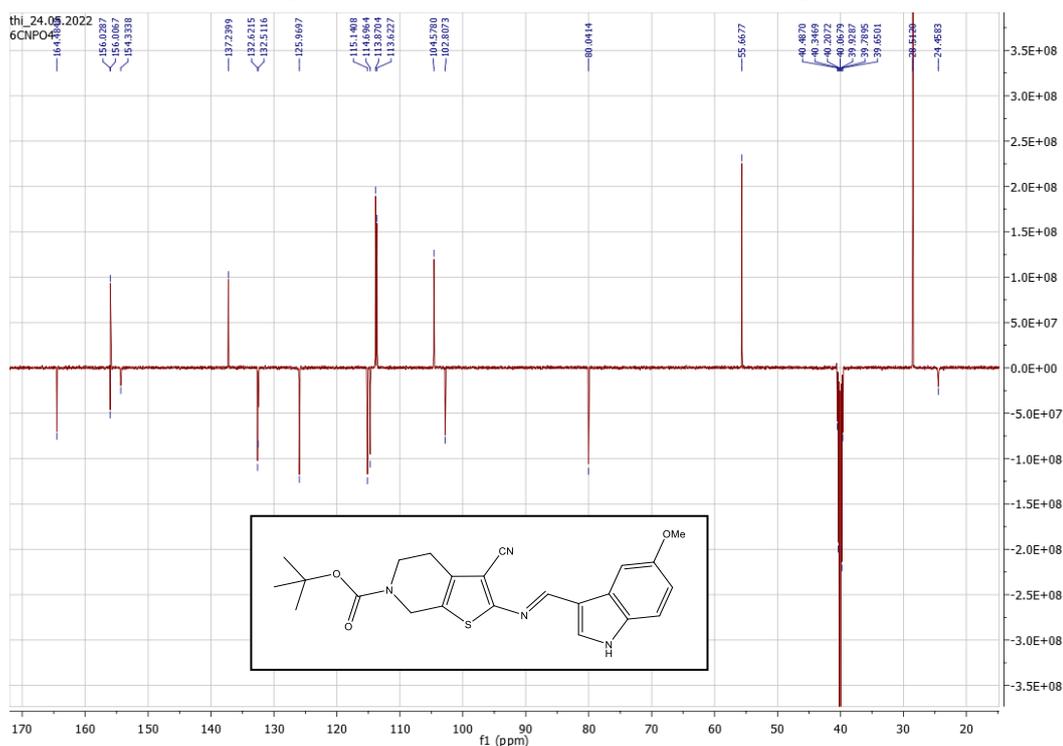
Figura 21 – Expansão do espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO-d₆) do composto 6CNP04



Fonte: Autoria própria, 2022.

No espectro de RMN ^{13}C (DEPT) do composto 6CNP04 (Figura 23) foi possível observar 18 sinais, isso ocorre devido à presença de carbonos homotópicos, visto que a molécula possui 23 carbonos. Sendo 8 sinais de carbonos não hidrogenados (C), 5 sinais de carbonos metínicos (CH), 3 sinais de carbonos metilênicos (CH_2) e 2 sinais de carbono metílico (CH_3). Observou-se também sinais característicos da molécula como os sinais em 80,04 ppm correspondente ao carbono da porção *tert*-butila ligado ao átomo de oxigênio, em 55,66 ppm referente à metoxila ligada ao anel indol e em 28,51 ppm que confirma a presença das 3 metilas homotópicas da porção *tert*-butila. Ademais, no sinal em 154,33 ppm confirmou-se a presença da carbonila do grupo protetor N-Boc, demonstrando a existência de uma blindagem devido à presença dos heteroátomos oxigênio e nitrogênio.

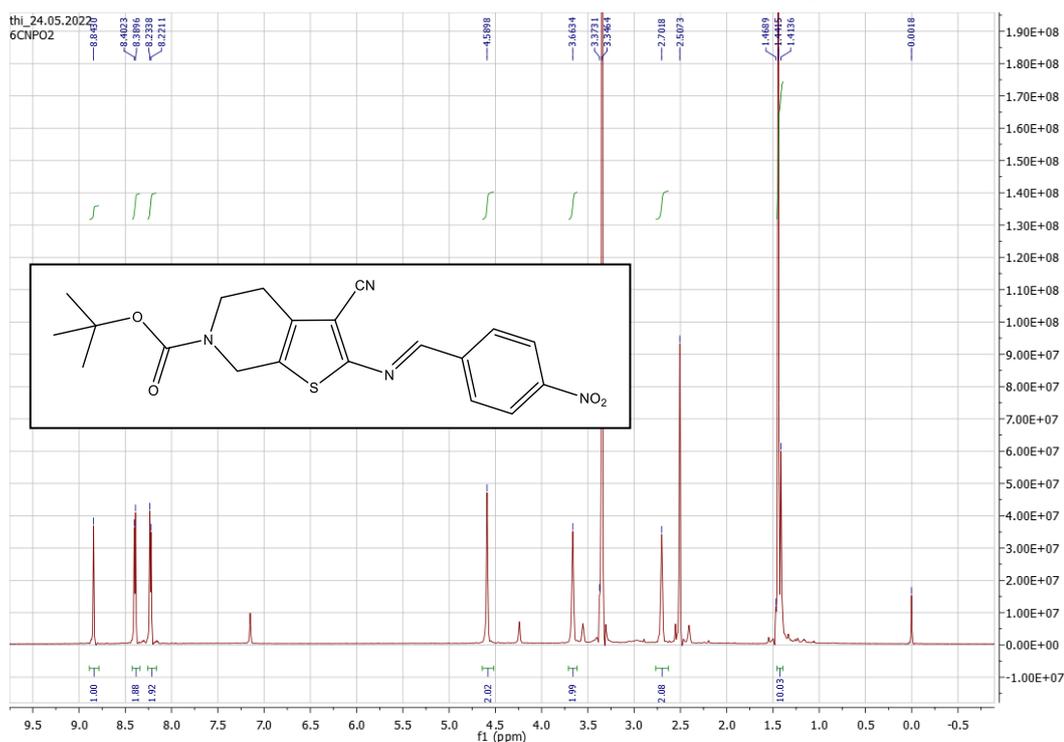
Figura 22 – Espectro de DEPT (150 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP04



Fonte: Autoria própria, 2022.

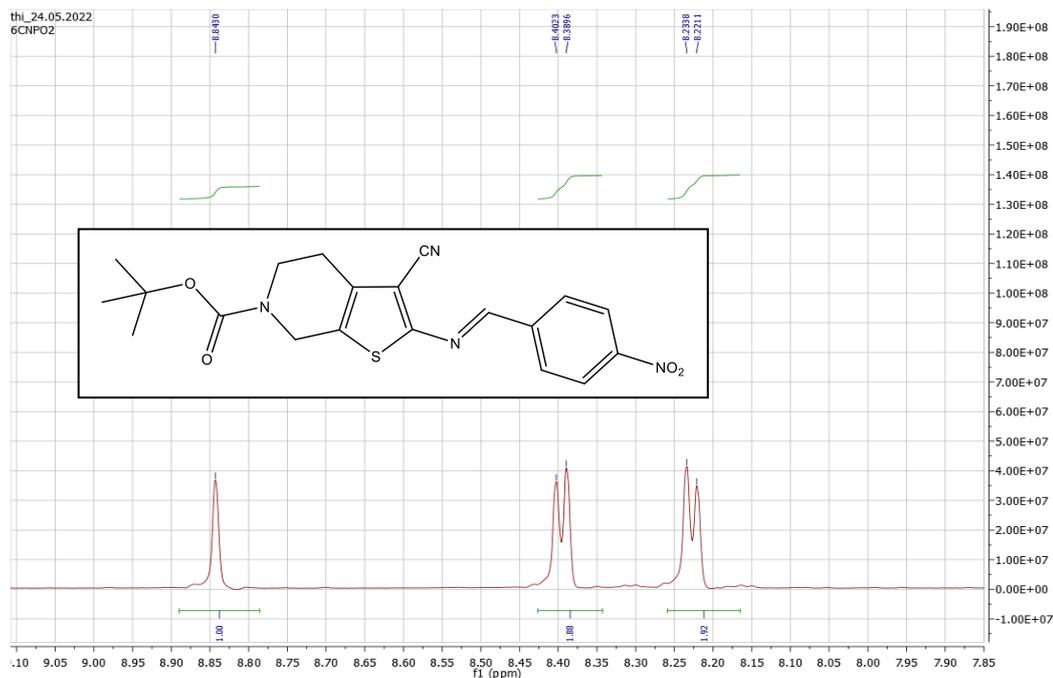
No espectro de RMN ^1H do composto 6CNP02 (Figura 24 e 25) observou-se em 1,44 ppm um sigleto com integral para 9H referente as 3 metilas homotópicas da proção *terc*-butila. A presença do anel piperidina foi confirmada através dos sinais em 2,70 ppm em multipeto, 3,66 ppm em sigleto e 4,58 ppm também em sigleto, tendo estes integrais para 2H. Como também os sinais em 8,22 ppm e 8,39 ppm em dubletos, com constante de acoplamento $J = 7,62$ Hz, e integral para 2H, indicam a presença do anel benzênico *para*-substituído. Ainda é possível observar um sigleto em 8,84 ppm com integral para 1H referente ao hidrogênio da imina, confirmando a condensação do aduto de Gewald e do aldeído, da mesma forma que o sinal discutido anteriormente para o 6CNP04.

Figura 23 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO-d₆) do composto 6CNP02



Fonte: Autoria própria, 2022.

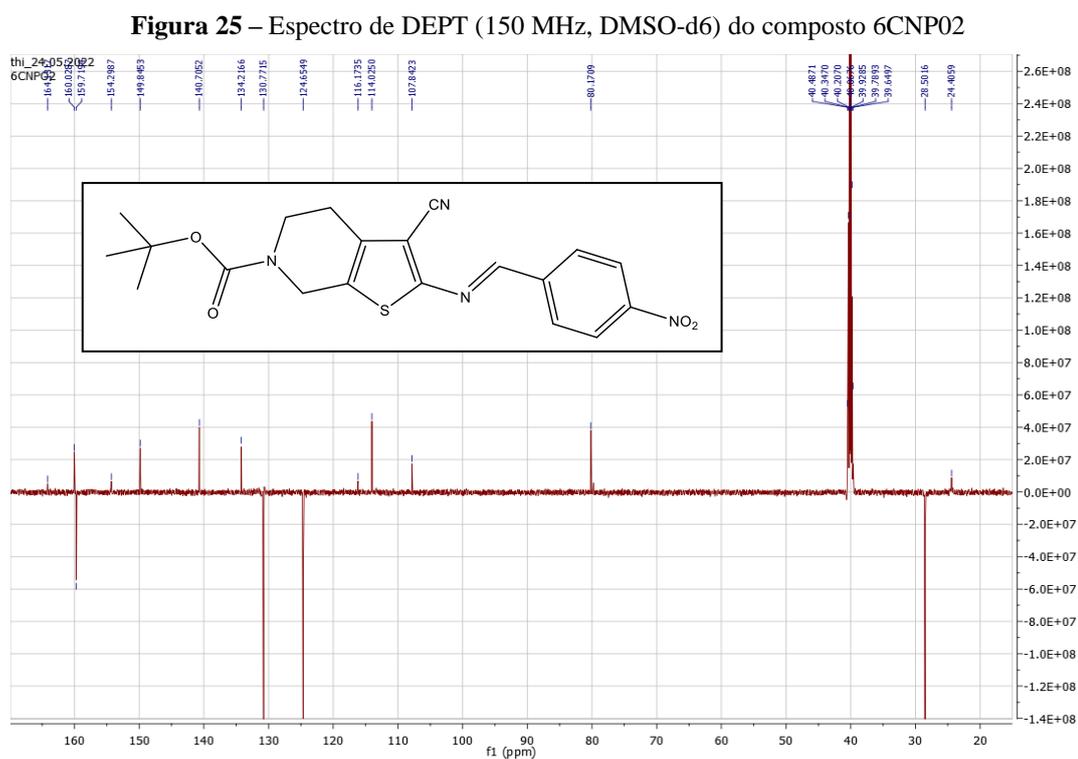
Figura 24 – Expansão do espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO-d₆) do composto 6CNP02



Fonte: Autoria própria, 2022.

No espectro de RMN ^{13}C (DEPT) do composto 6CNP02 (Figura 26) foi possível observar 15 sinais. Isso ocorre devido à presença de carbonos homotópicos, visto que a

molécula possui 23 carbonos. Foram 8 sinais de carbonos não hydrogenados (C), 3 sinais de carbonos metínicos (CH), 3 sinais de carbonos metilênicos (CH₂) e 1 sinal de carbono metílico (CH₃). Observou-se também sinais característicos da molécula como os sinais em 80,17 ppm correspondente ao carbono da porção *tert*-butila ligado ao átomo de oxigênio e em 28,50 ppm que confirma a presença das 3 metilas homotópicas da porção *tert*-butila. O radical benzílico foi confirmado por meio dos sinais em 124,65 ppm e 130,77 ppm que correspondem aos carbonos homotópicos deste anel, assim como o sinal em 149,84 ppm referente ao carbono ligado ao grupo nitro. Por fim, o sinal em 154,29 ppm, semelhante ao encontrado no espectro de RMN ¹³C do composto 6CNP04, confirma a presença da carbonila do grupo protetor N-Boc.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Quadro 6 – Dados dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (DEPT) (δ , DMSO-d₆, 125MHz e 600MHz)

CÓDIGO	DESLOCAMENTO (ppm)
6CNP01	<p>RMN ^1H (400 MHz, DMSO d₆) δ 12,29 (sl, 1H, NH); 8,73 (s, 1H); 8,56 (d, 1H, $J = 1,84$ Hz) 8,26 (s, 1H); 7,50 (d, 1H, $J = 8,6$Hz); 7,41 (dd, 1H, $J = 8,6, 2,0$ Hz); 4,50 (s, 2H); 3,65 (t, 2H, $J = 5,56$ Hz); 2,65 (m, 2H); 1,43 (s, 9H); DEPT (125 MHz, DMSO d₆) δ 164,40; 156,19; 154,38; 138,30; 136,66; 132,78; 126,75; 126,60; 124,83; 115,08; 114,98; 114,93; 114,16; 103,09; 80,04; 28,48; 24,42.</p>
6CNP02	<p>RMN ^1H (600 MHz, DMSO d₆) δ 8,84 (s, 1H); 8,39 (d, 2H, $J = 7,62$ Hz) 8,22 (d, 2H, $J = 7,62$ Hz); 4,58 (s, 2H); 3,66 (s, 2H); 2,70 (m, 2H); 1,44 (s, 9H); DEPT (150 MHz, DMSO d₆) δ 164,13; 160,02; 159,71; 154,29, 149,84; 140,70; 134,21; 130,77, 124,65; 116,17; 114,02; 107,84; 80,17; 28,50; 24,40.</p>
6CNP03	<p>RMN ^1H (600 MHz, DMSO d₆) δ 12,15 (sl, 1H, NH); 8,74 (s, 1H); 8,38 (d, 1H, $J = 7,26$ Hz) 8,23 (s, 1H); 7,53 (d, 1H, $J = 3,24$ Hz); 7,29 (m, 1H); 4,50 (s, 2H); 3,65 (s, 2H); 2,65 (m, 2H); 1,44 (s, 9H); DEPT (150 MHz, DMSO d₆) δ 164,66; 156,56; 154,33; 138,00; 137,58; 132,75; 126,10; 125,05; 124,10; 122,50; 122,39; 115,05; 114,82; 112,95; 102,47; 80,04; 28,51; 24,46.</p>
6CNP04	<p>RMN ^1H (600 MHz, DMSO d₆) δ 12,02 (sl, 1H, NH); 8,72 (s, 1H); 8,15 (s, 1H); 8,03 (s, 1H); 7,41 (d, 1H, $J = 8,64$ Hz); 6,90 (d, 1H, $J = 8,58$ Hz); 4,50 (s, 2H); 3,82 (s, 3H); 3,65 (s, 2H); 2,65 (m, 2H); 1,44 (s, 9H); DEPT (150 MHz, DMSO d₆) δ 164,48; 156,02; 156,00; 154,33; 137,23; 132,62; 132,51; 125,96; 115,14; 114,46; 113,87; 113,62; 104,57; 102,80; 80,04; 55,66; 28,51; 24,45.</p>
6CNP05	<p>RMN ^1H (600 MHz, DMSO d₆) δ 12,65 (sl, 1H, NH); 8,72 (s, 1H); 8,64 (d, 1H, $J = 7,80$ Hz); 8,38 (d, 1H, $J = 4,36$ Hz); 8,36 (s, 1H); 7,33 (dd, 1H, $J = 7,56, 4,80$ Hz); 4,51 (s, 2H); 3,54 (s, 2H); 2,65 (m, 2H); 1,44 (s, 9H); DEPT (150 MHz, DMSO d₆) δ 163,91; 156,46; 154,32; 150,32; 145,32; 137,45; 132,87; 130,56; 118,55; 117,51; 114,86; 113,43; 103,30; 80,04; 28,51; 24,43.</p>

6CNP06	RMN ¹H (400 MHz, DMSO d6) δ 8,96 (s, 1H); 8,21 (dd, 1H, <i>J</i> = 7,60, 1,20 Hz); 8.16 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,08, 0,96 Hz); 7,92 (t, 1H, <i>J</i> = 7,40 Hz); 7,92 (dt, 1H, <i>J</i> = 7,92, 1,40 Hz); 4,58 (s, 2H); 3,65 (t, 2H, <i>J</i> = 5,36 Hz); 2,69 (m, 2H); 1,43 (s, 9H); DEPT (125 MHz, DMSO d6) δ 160,09; 158,07; 154,22; 149,78; 134,53; 134,21; 133,36; 131,34; 129,98; 129,33; 125,43; 113,95; 107,47; 80,13; 28,47; 24,40.
6CNP07	RMN ¹H (600 MHz, DMSO d6) δ 8,89 (s, 1H); 8,79 (s, 1H); 8,41 (t, 1H, <i>J</i> = 7,56 Hz); 7,86 (t, 1H, <i>J</i> = 7,86 Hz); 4,58 (s, 2H); 3,66 (s, 2H); 2,70 (m, 2H); 1,44 (s, 9H); DEPT (150 MHz, DMSO d6) δ 160,14; 159,93; 154,30; 148,79; 136,78; 135,34; 134,03; 131,22; 127,11; 124,08; 114,07; 107,30; 80,16; 28,50; 24,40.
6CNP08	RMN ¹H (600 MHz, DMSO d6) δ 12,03 (sl, 1H, NH); 8,70 (s, 1H); 8,23 (s, 1H); 8,16 (s, 1H); 7,40 (d, 1H, <i>J</i> = 8,04 Hz); 7,11 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,16 Hz); 4,50 (s, 2H); 3,65 (s, 2H); 2,65 (s, 2H); 2,43 (s, 3H); 1,44 (s, 9H); DEPT (150 MHz, DMSO d6) δ 164,73; 156,41; 154,33; 137,41; 136,29; 132,67; 131,22; 125,96; 125,45; 125,38; 122,49; 115,07; 114,50; 112,55; 102,38; 80,03; 56,51; 28,51; 24,47; 21,89.
6CNP09	RMN ¹H (400 MHz, DMSO d6) δ 12,54 (sl, 1H, NH); 8,77 (s, 1H); 8,74 (m, 1H); 8,39 (s, 1H); 7,70 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,40, 0,44 Hz); 7,65 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,40, 1,56 Hz); 4,50 (s, 2H); 3,65 (t, 2H, <i>J</i> = 5,52 Hz); 2,65 (s, 2H); 1,44 (s, 9H); DEPT (125 MHz, DMSO d6) δ 163,58; 155,91; 154,28; 139,74; 139,05; 132,84; 127,40; 127,14; 126,87; 124,87; 120,61; 114,89; 114,85; 114,42; 104,46; 103,75; 80,06; 28,48; 24,41.
6CNP10	RMN ¹H (600 MHz, DMSO d6) δ 12,56 (sl, 1H, NH); 8,49 (d, 1H, <i>J</i> = 7,98 Hz); 8,45 (s, 1H); 8,04 (s, 1H); 7,63 (d, 1H, <i>J</i> = 8,41, Hz); 4,51 (s, 2H); 3,65 (s, 2H); 2,65 (s, 2H); 1,43 (s, 9H); DEPT (150 MHz, DMSO d6) δ 163,80; 156,26; 154,32; 140,23; 136,88; 132,95; 128,18; 126,96; 125,15; 123,18; 120,34; 117,85; 116,16; 114,86; 114,82; 105,64; 103,39; 80,07; 28,51; 24,44.

Fonte: Autoria própria, 2022.

5.3 Atividade antipromastigota e citotoxicidade

No Quadro 7 estão apresentados os resultados da avaliação da atividade antileishmania dos derivados 2-aminotiofênicos-3-carbonitrilas e das drogas de referência Anfotericina B e Miltefosina frente as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *leishmania braziliensis*, *leishmania major* e *Leishmania infantum*. Estão descritos também os dados de citotoxicidade frente à macrófagos RAW 264.7.

Quadro 7 - Atividade antileishmania frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. major* e *L. infantum*, efeitos citotóxicos contra macrófagos e índices de seletividade (IS) dos derivados 2-aminotiofênicos-3-carbonitrilas e fármacos de referência (valores de IC₅₀ e CC₅₀ em µM).

Molécula	IC ₅₀ e IS								CC ₅₀
	LLA	IS	LLI	IS	LVB	IS	LLM	IS	MΦ
6CNP01	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	284,47
6CNP02	14,52	15,6	9,27	24,4	9,62	23,5	11,83	19,1	225,95
6CNP03	6,28	60,2	5,53	68,4	4,79	78,9	6,1	62,0	378,27
6CNP04	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	398,2
6CNP05	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	346,84
6CNP06	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	287,83
6CNP07	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	301,62
6CNP08	>10	-	>10	-	>10	-	>10	-	264,33
6CNP09	9,38	29,7	6,93	40,3	7,95	35,1	6,5	42,9	279,05
6CNP10	4,73	58,1	2,11	130,2	2,78	98,8	3,64	75,5	274,7
Anfotericina B	0,33	1,27	0,35	1,2	0,25	1,68	0,48	0,87	0,42
Miltefosina	16,94	16,1	15,47	17,6	15,4	17,7	17,8	15,4	273,3

LLA – *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

LVB – *Leishmania (Viannia) braziliensis*

LLI – *Leishmania (Leishmania) infantum*

LLM – *Leishmania (Leishmania) major*

MΦ – Macrófagos RAW 264.7

IS = CC₅₀ / IC₅₀

Fonte: Autoria própria, 2022.

Apenas quatro compostos apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento das formas promastigotas das cepas de *Leishmania* analisadas, sendo eles os compostos 6CNP02, 6CNP03, 6CNP09, 6CNP10. O derivado 6CNP10 apresentou os melhores valores de IC₅₀ (IC₅₀= 2,11 – 4,73) e de IS (58,1 – 130,2) para todas as espécies de *Leishmania*. Estes resultados corroboram com os estudos de Rodrigues et al., os quais comprovaram que compostos contendo a porção indólica em sua estrutura apresentam importante atividade antileishmania..

Um composto contendo a porção benzílica, o 6CNP02, também apresentou valores de IC₅₀ consideráveis nessa análise. Essa molécula apresenta em sua estrutura o radical nitro (-NO₂) assim como os compostos 6CNP06 e 6CNP07, porém, esses últimos possuem esse

grupamento ligado nas posições *orto* e *meta* no anel benzênico, e o 6CNP02 na posição *para*. Isso leva a crer que esta posição pode ser importante para a atividade frente as formas promastigotas dessas espécies de *Leishmania*.

Os compostos mais promissores foram aqueles que apresentaram o radical indol não substituído (6CNP03) e os substituídos com o grupamento ciano (CN) nas posições 5 e 6 (6CNP09 e 6CNP10, respectivamente) em suas estruturas. O composto 6CNP10 que apresenta o anel indol substituído na posição 6 apresentou os melhores valores de IC₅₀ para todas as espécies de *Leishmania*, sendo a cepa de *Leishmania infantum* a que se demonstrou mais sensível a esse produto (IC₅₀= 2,11 µM).

Além disso, os compostos 6CNP01 e 6CNP04, contendo os radicais 5-bromo e 5-metoxi, respectivamente, ligados ao grupamento indol se apresentaram como compostos inativos. Correlacionando estes resultados com o estudo realizado por Ferreira (2022) que demonstrou a ausência de atividade leishmanicida de compostos contendo o grupamento amida ligado ao anel tiofênico, juntamente com o grupamento indol substituído na posição 5 pelos radicais bromo e metoxi, observa-se que não existe um aumento ou perda da atividade, até a concentração de IC₅₀< 10 µM, ao substituir-se o radical 3-carboxiamida pelo 3-nitrila.

Ao relacionar os dados de IC₅₀ dos novos compostos sintetizados com os dados da Anfotericina B, fármaco de primeira escolha no tratamento da leishmaniose, pode-se observar que este fármaco é efetivamente ativo contra todas as espécies de *Leishmania* avaliadas, apresentando os menores valores (IC₅₀= 0,25 – 0,48 µM). Porém, apesar dos bons resultados de atividade, ela apresentou os menores índices de seletividade (0,87 – 1,68), confirmando seu grande potencial citotóxico, o que dificulta o seu uso.

Quando comparados os valores de IC₅₀ dos novos compostos obtidos com outro fármaco de referência, a miltefosina, observa-se que os quatro derivados 2-aminotiofênicos ativos apresentaram valores menores, o que indica sua melhor atividade antileishmania. Além disso, a miltefosina demonstrou ser menos seletiva que os compostos sintetizados ativos (IS = 15,4 – 17,7), e mais seletiva que a Anfotericina B.

Sendo assim, conclui-se que a substituição do grupamento 3-carboxiamida pelo grupamento 3-nitrila não confere melhoramento na atividade antileishmania, ao mesmo tempo que não reduz esse parâmetro. Também é possível considerar a importância do radical ciano nas moléculas contendo o grupamento indol, contribuindo assim para o aumento da atividade. Além da importância da posição *para*, para compostos contendo o grupamento benzílico.

6 CONCLUSÃO

A leishmaniose consiste em importante problema de saúde pública em todo o mundo, principalmente em populações em estado de vulnerabilidade. Apesar de ser uma patologia muitas vezes mortal, as alternativas de tratamento são escassas e causar prejuízos ao paciente. Por esse motivo, o desenvolvimento de novas alternativas que possam ser utilizadas na farmacoterapia das leishmanioses torna-se um assunto relevante entre a comunidade científica.

No presente estudo, o procedimento de síntese e caracterização físico-química foram realizados com sucesso, possibilitando a obtenção e comprovação de 10 novos derivados 2-aminotiofênicos. Os espectros de ^1H e ^{13}C evidenciaram a formação dos compostos, tendo os sinais corroborado efetivamente para cada uma das moléculas.

Os rendimentos apresentaram valores na faixa de 34 - 89%, sendo o composto 6CNP01 responsável pelo menor e o composto 6CNP02 pelo maior. Todos os produtos apresentaram coloração amarela, variando de amarelo forte para amarelo escuro.

Além disso, conclui-se que quatro dos 10 novos compostos sintetizados apresentaram—se ativos frente o crescimento das formas promastigotas das espécies de *Leishmania* analisadas. Sendo eles os compostos 6CNP02, 6CNP03, 6CNP09 e 6CNP10. Apenas um composto contendo o radical benzílico apresentou valores de $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$, sendo ele substituído na posição *para* pelo o grupamento nitro.

O composto com melhor valor de IC_{50} foi aquele contendo o radical indol substituído na posição 6 deste anel pelo grupamento ciano. Além de apresentar atividade antileishmania, apresentou também os melhores índices de atividade quando relacionado as drogas de referência também testadas que já vêm sendo utilizadas no tratamento da leishmaniose, indicando assim uma menor toxicidade.

Portanto, espera-se posteriormente comprovar essas estruturas através da técnica de espectrometria de massas, além da realização de ensaios de atividade antileishmania com os compostos ativos a fim de avaliar sua ação frente as formas amastigotas. Busca-se também elucidar possíveis alvos biológicos, através de estudos computacionais, que possam estar relacionados a atividade destes compostos.

REFERÊNCIAS

- ABDELADHIM, M.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infection Genetics and Evolution**, v. 28, p. 691–703, 2014.
- ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 497-506, 2011.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993 – 1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.
- ARONSON, N. E.; MAGILL, A. J. 104 – Leishmaniasis. *In*: Ryan, E. T. et al. (Orgs.). **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases**, 10. ed. London: Content Repository, p. 776-798, 2020.
- ASSIS, T. S. M. et.al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT LEISH® para diagnóstico de leishmaniose visceral humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 2, p. 107-116, 2008.
- BALASEGARAM, M.; RITMEIJER, K.; LIMA, M. A.; BURZA, S.; GENOVESE, G. O.; MILANI, B.; GASPANI, S.; POTET, J.; CHAPPUIS, F. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 17, n. 4, p. 493-510, 2012.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–330, 2008.
- BARRAL-NETTO, M; BADARÓ, R.; BARRAL, A. C. Imunologia da leishmaniose tegumentar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 19, n.3, p. 173-191, 1986.
- BOEHME, C. C.; HAIN, U.; NOVOSEL, A.; EICHENLAUB, S.; FLEISCHMANN, E.; LÖSCHER, T. Congenital visceral leishmaniasis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 359-360, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde, 1ª edição [versão eletrônica]**. Brasília, Distrito Federal, 2016. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_1ed_atual.pdf. Acesso em: 9 de junho de 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral, 2022. Disponível em < <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 08 de julho de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose Tegumentar, 2020. Disponível em < <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-tegumentar>>. Acesso em: 08 de julho de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]**. Brasília, Distrito Federal, 2017. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 12 de junho de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Epidemiológica. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]**. Brasília, Distrito Federal, 2014. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer al_1edicao.pdf. Acesso em: 12 de junho de 2022.

CLEGHORN, L. A. T.; RAY, P.; ODINGO, J.; KUMAR, A.; WESCOTT, H.; KORKEGIAN, A. ; MASQUELIN, T.; MOURE, A. L.; WILSON, C.; DAVIS, S. H.; HUGGETT, M. J.; TURNER, P. A., SMITH, A. R. C.; EPEMOLU, O.; ZUCCOTTO, F.; RILEY, J.; SCULLION, P.; SHISHIKURA, Y.; FERGUSON, L.; RULLAS, J.; GUIJARRO, L.; READ, K. D., GREEN, S. R.; HIPSKIND, P. A.; PARISH, T.; WYATT, P. G. Identification of Morpholino Thiophenes as Novel Mycobacterium tuberculosis Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 15, p. 6592- 6608, 2018.

Doenças Infecciosas Negligenciadas. **Organização Pan-Americana da Saúde**, 2022. Disponível em < https://bvssalud.org/vitrinas/post_vitrines/doencas-negligenciadas/>. Acesso em 28 de fevereiro de 2022.

ESTRADA, E. Spectral moments of the edge adjacency matrix in molecular graphs. 1. Definition and applications to the prediction of physical properties of alkanes. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 36, n. 4, p. 844-849, 1996.

FÉLIX, M. B.; DE SOUZA, E. R.; DE LIMA, M. C. A.; FRADE, D. K. G.; SERAFIM, V. L.; RODRIGUES, K. A. F.; NÉRIS, P. L. N.; RIBEIRO, F. F.; SCOTTI, L.; ACOTTI, M. T.; AQUINO, T. M.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. B.; DE OLIVEIRA, M. R. Antileishmanial activity of new Thiophene-indole Hybrids: Design, Synthesis, Biological and Cytotoxic Evaluation, and Chemometric Studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 3972-3977, 2016.

FERREIRA, M. M. D. Planejamento, síntese e avaliação do potencial leishmanicida de novos -ainotiofenos-3-carboxiamidas obtidas por modificação molecular. Dissertação de Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba/Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa, 2022.

FOUAD, M. M.; EL-BENDARY, E. R.; SUDDEK, G. M.; SHEHATA, I. A.; EL-KERDAWY, M. M. Synthesis and in vitro antitumor evaluation of some new thiophenes and thieno[2,3-d]pyrimidine derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 81, p. 587-598, 2018.

FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, G. L.; DA COSTA, C. A.; MAYRINK, W. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in

the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 2-3, p. 161-73, 2003.

FREITAS, V. C. O processo de interação de *Leishmania (Leishmania) chagasi* com *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* e a importância do lipofosfoglicano (LPG). Tese de Doutorado em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, 2010.

GOSSAGE, S.M.; ROGERS, M. E., BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027-34, 2003.

GUIMARÃES, G. P.; REIS, M. Y. F. A.; SILVA, D. T. C.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; CONVERTI, A.; PESSOA JR, A.; DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A. Antifungal activity of topical microemulsion containing a thiophene derivative. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 545-550, 2014.

HOTEZ, P. J.; AKSOY, S.; BRINDLEY, P. J.; KAMHAWI, S.; DAVIES, S. J. World Neglected Tropical Diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, 2020.

HUANG, Y.; DÖMLING, A. The Gewald multicomponent reaction. **Springer Science**, v. 15, n. 1, p. 3–33, 2010.

JAMPILEK, J. Heterocycles in Medicinal Chemistry. **Molecules**, v. 24, n. 21, 3839, 2019.

KAHIME, K.; BOUSSAA, S.; LAAMRANI-EL IDRISSE, A.; NHAMMI, H.; BOUMEZZOUGH, A. Epidemiological study on acute cutaneous leishmaniasis in Morocco. **Journal of Acute Disease**, v. 5, n. 1, p. 41-45, 2016.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections - A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KOFF, A. B.; ROSEN, T. Treatment of cutaneous leishmaniasis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 31, p. 693-708, 1994.

LAMOTTE, S.; SPÄTH, G.F.; RACHIDI, N.; PRINA, E. The enemy within: targeting host–parasite interaction for antileishmanial drug discovery. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, 2017.

LAWYER, P. G.; NGUMBI, P. M.; ANJILI, C. O.; ODONGO, S. O.; MEBRAHTU, Y. B.; GITHURE, J. I.; KOECH, D. K.; ROBERTS, C. R. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). **Am J Trop Med Hyg**, v. 43, n. 1, p. 31-43, 1990.

LAWYER, P. G.; YOUNG, D. G.; BUTLER, J. F.; AKIN, D. E. Developmental of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 24, n. 3, p. 347-355, 1987.

Leishmanioses. **Drugs for Neglected Diseases initiative**, 2018. Disponível em <<https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/>>. Acesso em: 01 de março de 2022.

LIMA, E. B.; PORTO, C.; MOTTA, J. C. O.; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.

LYRA, M. R. Ensaio Clínico Fase III para Leishmaniose Tegumentar Americana forma cutânea. Equivalência entre esquemas da alta e da baixa dose de Antimoniato de Megumina. Tese de Doutorado em Doenças Infecciosas. Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas - IPEC/Fiocruz, Rio de Janeiro, 2013.

MACHADO-PINTO, J.; PINTO, J.; DA COSTA, C. A.; GENARO, O.; MARQUES, M. J.; MOBABBER, F.; et al. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. **International Journal of Dermatology**, v. 41, n. 2, p. 73-78, 2002.

MASIH, P. J.; KESHARWANI, T.; RODRIGUEZ, E.; VERTUDEZ, M. A.; MOTAKHAVERI, M. L.; LE, T. K.; TRAN, M. K. T.; CLOYD, M. R.; KORNMAN, C. T.; PHILLIPS, A. M. Synthesis and Evaluation of 3-Halobenzo[b]thiophenes as Potential Antibacterial and Antifungal Agents. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 1, 39, 2022.

MEINECKE, C.K; SCHOTTELIUS J.; OSKAM, L.; FLEISCHER, B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala-azar) from an asymptomatic mother to her child. **Pediatrics**, v. 104, n. 5, 1999.

NAGLE, A. S. *et al.* Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis. **Chemical reviews**, v. 114, n. 22, p. 11305-11347, 2014.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O. et al. *Parasitologia Humana*. 12^a ed. São Paulo: **Atheneu**, 2012.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, v. 155, p. 113–123, 2016.

NUNES, M. P.; JACKSON, J. M.; CARVALHO, R. W.; FURTADO, N. J.; COUTINHO, S. G. Serological survey for canine cutaneous and visceral leishmaniasis in area for transmission in Rio de Janeiro where prophylactic measures had been adapted. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 4, p. 411-7, 1991.

NUNES, T. A. L. et al. Curzerene antileishmania activity: Effects on *Leishmania amazonensis* and possible action mechanisms. **International Immunopharmacology**, v. 100, n.1, p. 108-130, 2021.

Organización Panamericana de la Salud. Enfermedades infecciosas desatendidas em las Américas: Historias de éxito e innovación para llegar a los más necesitados. Washington, DC, 2016.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. **Acta Tropica**, v. 172, p. 86-90, 2017.

PELLISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUSA-GOMES, M. L.; LIMA JÚNIOR, F. E. F. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2008.

PRESTON, S.; LUO, J.; ZHANG, Y.; JABBAR, A.; CRAWFORD, S.; BAELL, J.; HOFMANN, A.; HU, M.; ZHOU, H.; GASSER, R. B. Selenophene and thiophene-core estrogen receptor ligands that inhibit motility and development of parasitic stages of *Haemonchus contortus*. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, 346, 2016.

PUTEROVÁ, Z.; KRUTOSIKOVA, A.; VEGH, D. Applications substituted 2-aminothiophenes in drug design, **Nova Biotechnologica**. v. 9, n. 2, p. 167- 173, 2009.

REY, L. **Parasitologia**: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África. 4. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2008.

RODRIGUES, K. A. F.; DIAS, C. N. S.; NÉRIS, P. L. N.; ROCHA, J. C.; SCOTTI, M. T.; SCOTTI, L.; MASCARENHAS, S. R.; VERAS, R. C.; DE MEDEIROS, I. A.; KEESENA, T. S. L.; DE OLIVEIRA, T. B.; DE LIMA, M. C. A; BALLIANOF, T. L.; DE AQUINO, F. T. M.; DE MOURA, R. L.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; OLIVEIRA, M. R. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 106, p. 1-14, 2015.

RODRIGUES, K. A. F.; SILVA, D. K. F.; SERAFIM, V. L.; ANDRADE, P. N.; ALVES, A. F.; TAFURI, W.L.; BATISTA, T. M.; MANGUEIRA, V. M.; SOBRAL, M. V.; MOURA, R. O.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; OLIVEIRA, M. R. SB-83, a 2-Amino-thiophene derivative orally bioavailable candidate for the leishmaniasis treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1670-1678, 2018.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, p. 498-507, 2002.

ROGERS, M. E.; ILG, T.; NIKOLAEV, A. V.; FERGUSON, M. A. J.; BATES, P. A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, p. 463-467, 2004.

ROHOUSOVA, I.; VOLF, P. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. **Folia Parasitol.**, v. 53, n. 3, p. 161–171, 2006.

SABNIS, R. W.; RANGNEKAR, D. W.; SONAWANE, N. D. 2-Aminothiophene by the Gewald reaction. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 36, p. 333, 1999.

SECUNDINO, N. F. C.; EGER-MANGRICH, I.; BRAGA, E. M.; SANTORO, M. M.; PIMENTA, P. F. P. *Lutzomyia longipalpis* Peritrophic matrix: formation, structure and chemical composition. **J Med Entomol.**, v. 42, p. 928-938, 2005.

SERAFIM, T. D.; COUTINHO-ABREU; I. V.; DEY, R.; KISSINGER, R.; VALENZUELA, J. G.; OLIVEIRA, F.; KAMHAWI, S. Leishmaniasis: the act of transmission. **Trends in Parasitology**, 2021.

SERAFIM, V. L.; FÉLIX, M. B.; FRADE, D. K. G.; RODRIGUES, K. A. F.; NÉRIS, P. L. N.; VITALINO, S. M.; DOS SANTOS, A. S.; DE OLIVEIRA, J. F.; DE LIMA, M. C. A.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; SCOTTI, M. T.; OLIVEIRA, M. R.; DE MOURA, R. O. New thiophene–acridine compounds: Synthesis, antileishmanial activity, DNA binding, chemometric, and molecular docking studies. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 91, n. 6, 1141–1155.

SERENO, D.; LEMESRE, J. L. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 41, n. 5, p. 972-976, 1997.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; BRITO, A. C.; OLIVEIRA, M. R. F.; PAES, M. G.; SOUZA, A. A. A.; SILVA, B. M. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão RNQ. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**. Belém: Editora CEJUP; 1997.

SUNDAR, S. et al. Injectable paromycin for visceral leishmaniasis in Indian. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 25, p. 2574-2581, 2007.

SUNDAR, S. et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 22, p. 1739-1746, 2002.

THIRUMURUGAN, P.; JOZWIAK, K. Click Chemistry in Medicinal Chemistry. **Comprehensive Medicinal Chemistry III**, Elsevier Ltd, v. 1, p. 296-325, 2017.

VALVERDE, R. Doenças Negligenciadas. **Agência FIOCRUZ de Notícias**, 2013. Disponível em < <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2022.

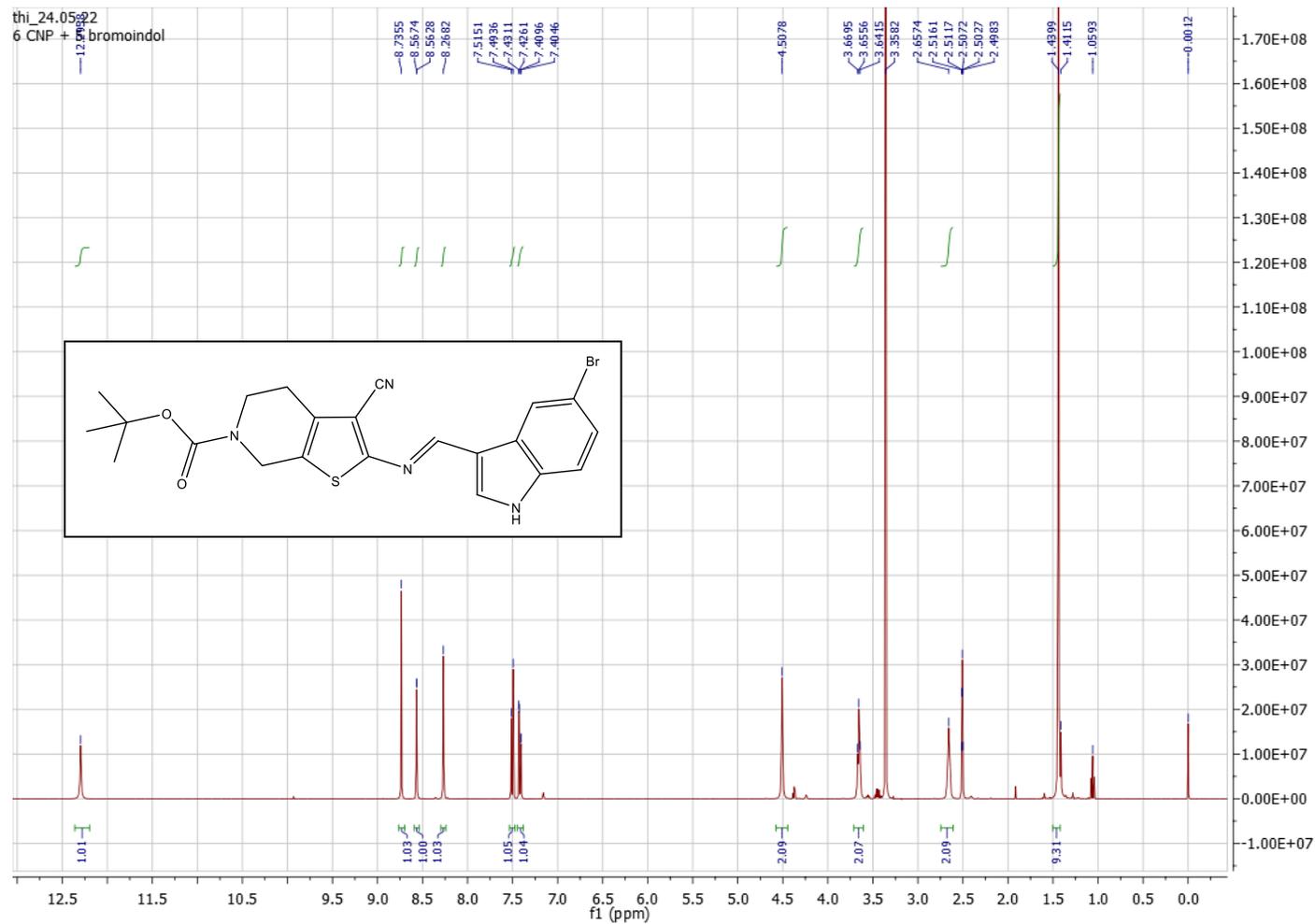
WASHINGTON, D. C. Doenças tropicais negligenciadas: OPAS pede fim dos atrasos no tratamento nas Américas. **Organização Pan-Americana da Saúde**, 2021. Disponível em < <https://www.paho.org/pt/noticias/28-1-2022-doencas-tropicais-negligenciadas-opas-pede-fim-dos-atrasos-no-tratamento-nas>>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2022.

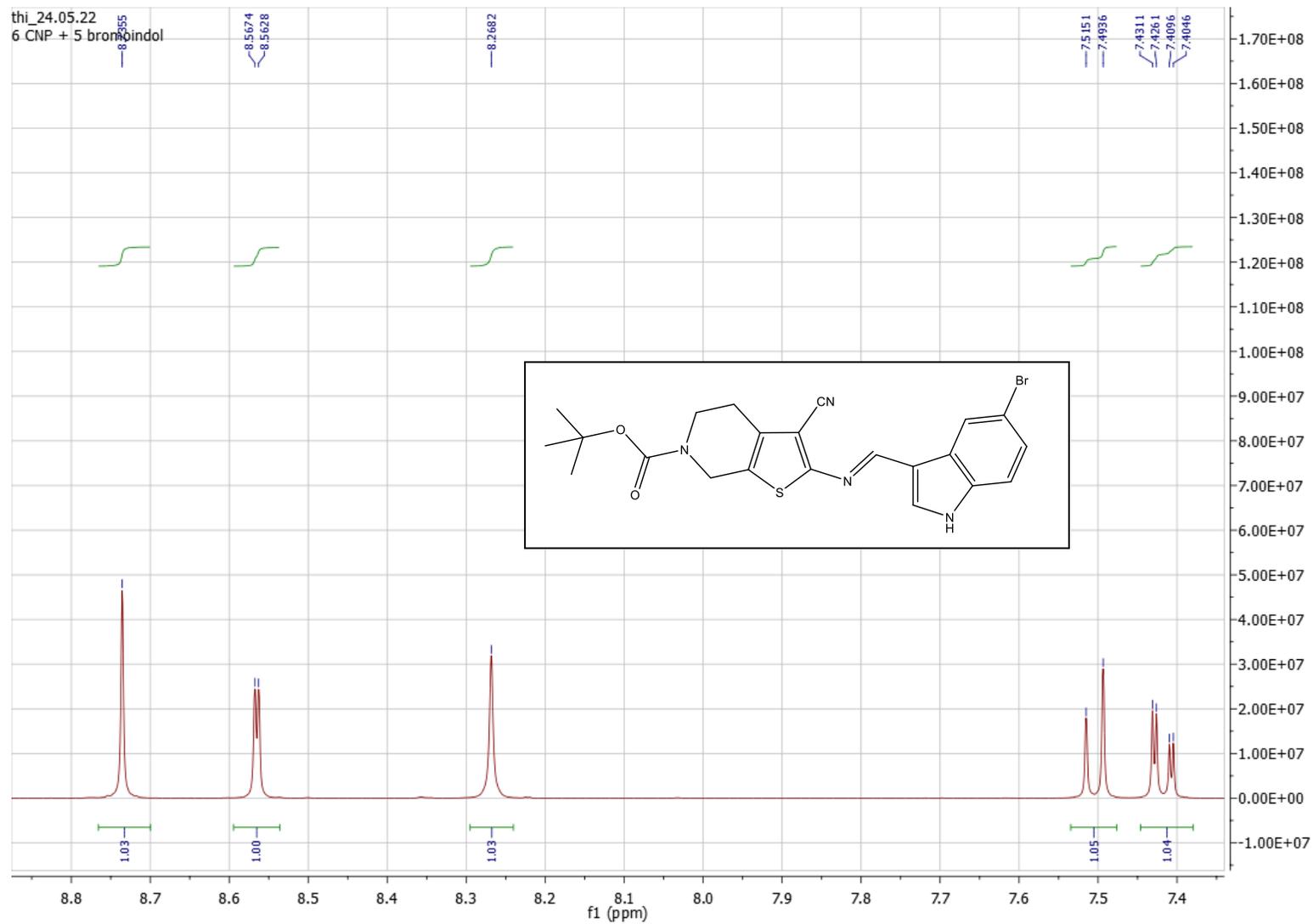
WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014, **World Health Organization**, v. 91, n. 22, 2016.

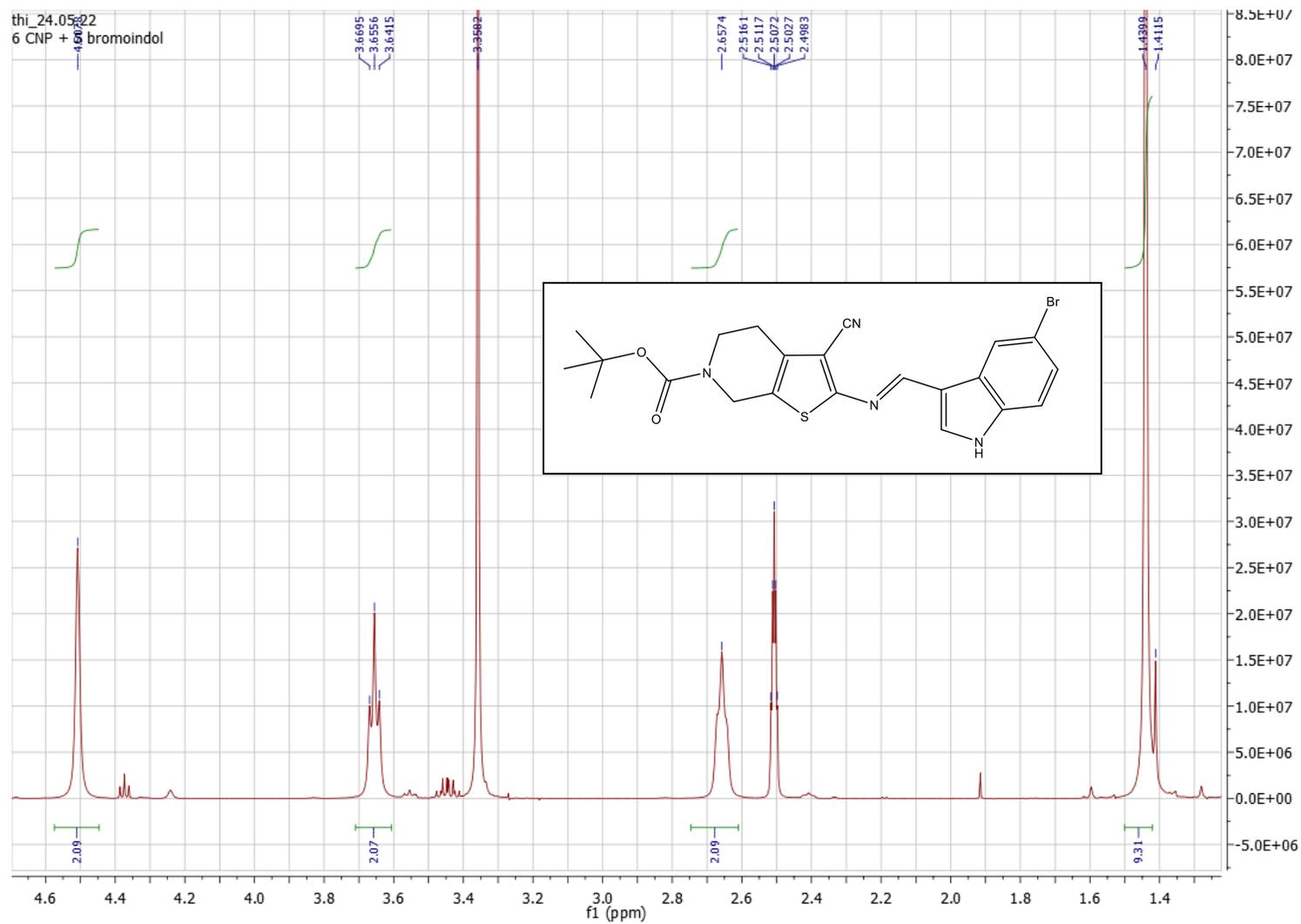
WHO. Leishmaniasis. **World Health Organization (WHO)**, 2020. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2022.

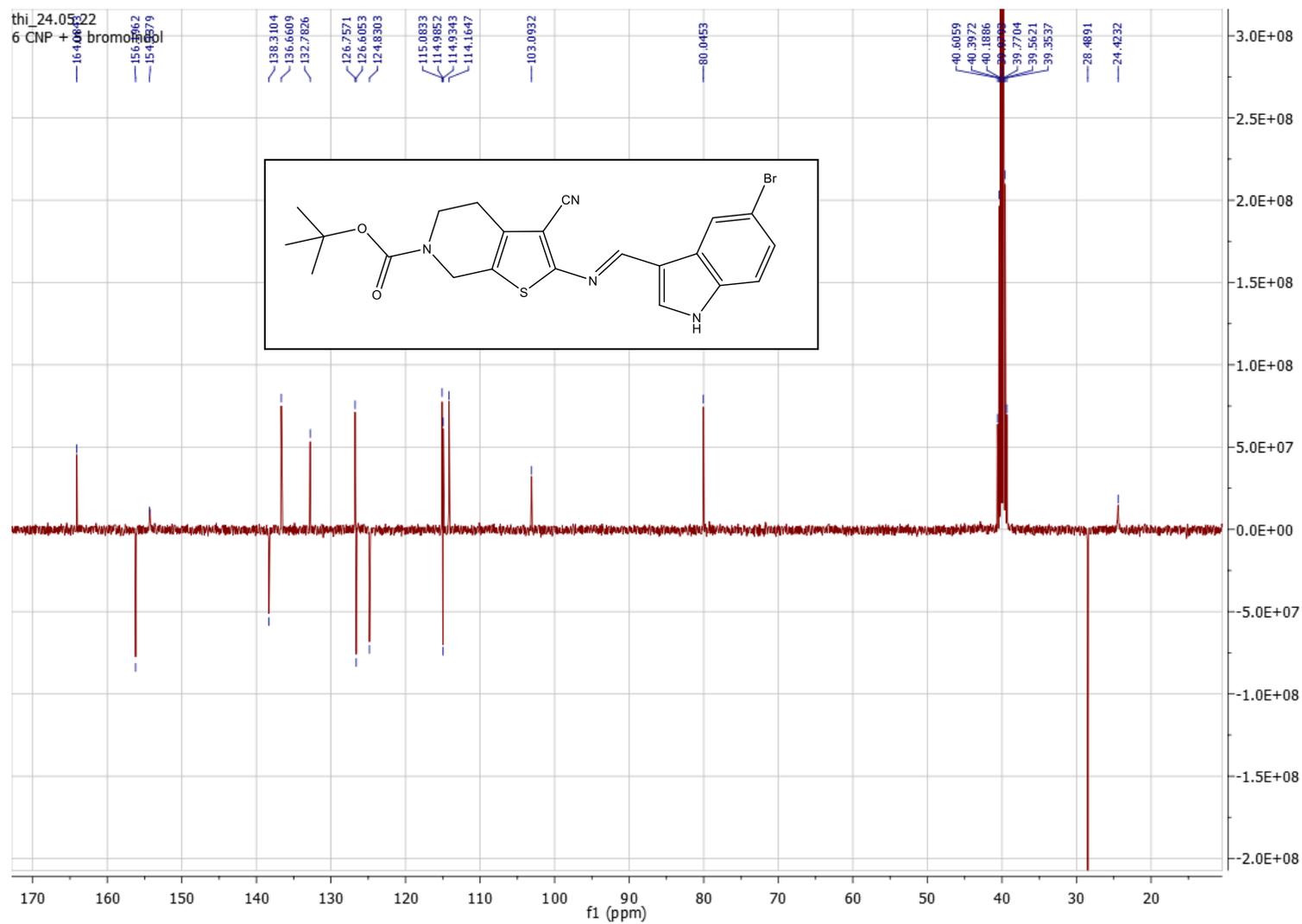
YU, S.; YU, J.; HE, F.; BAO, J.; ZHANG, J.; WANG, Y.; ZHANG, H. New antibacterial thiophenes from *Eclipta prostrata*. **Fitoterapia**, v. 142, 104471, 2020.

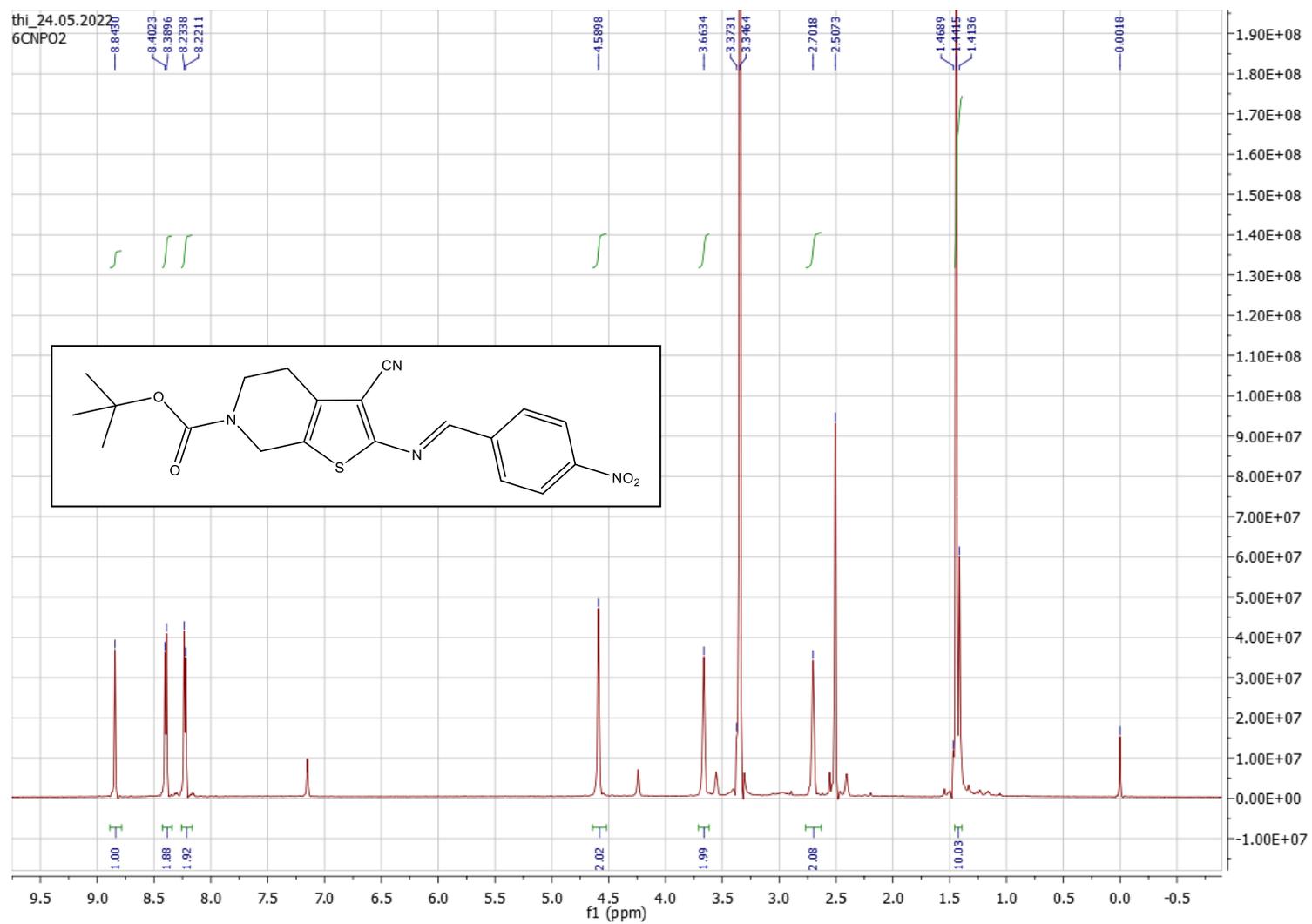
APÊNDICES

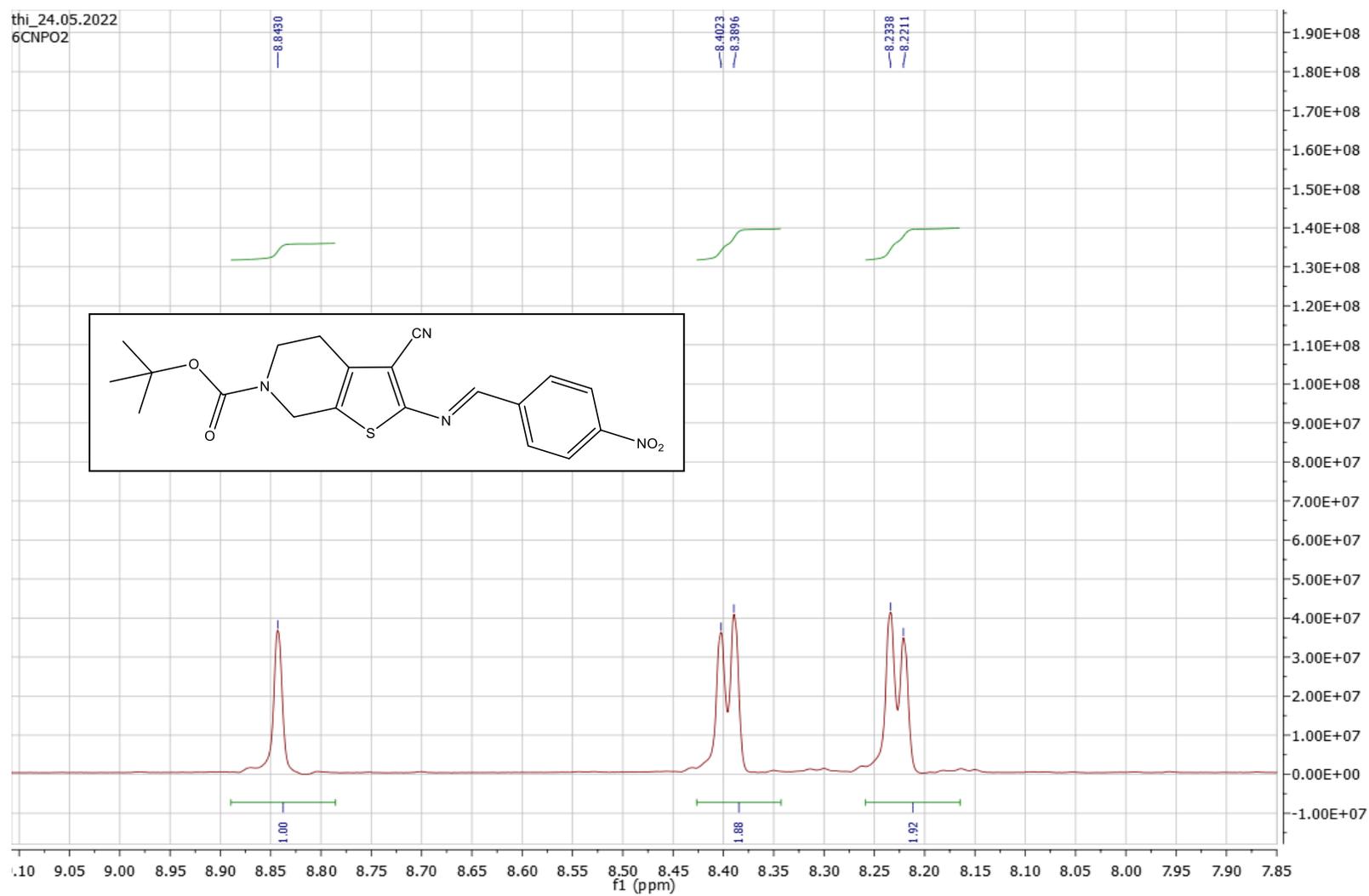
APÊNDICE A - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d $_6$) do composto 6CNP01

APÊNDICE B - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 6CNP01

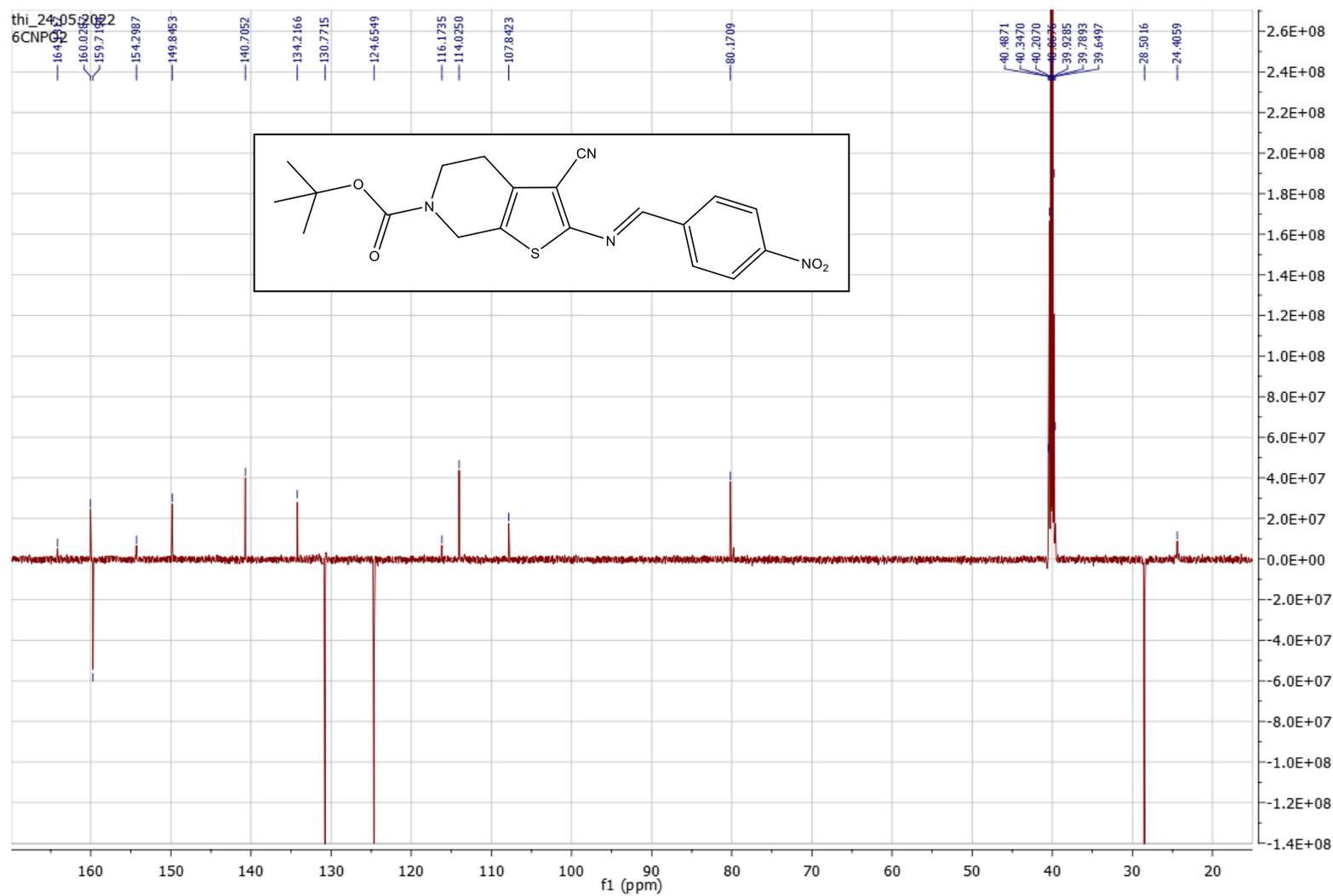
APÊNDICE C - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 6CNP01

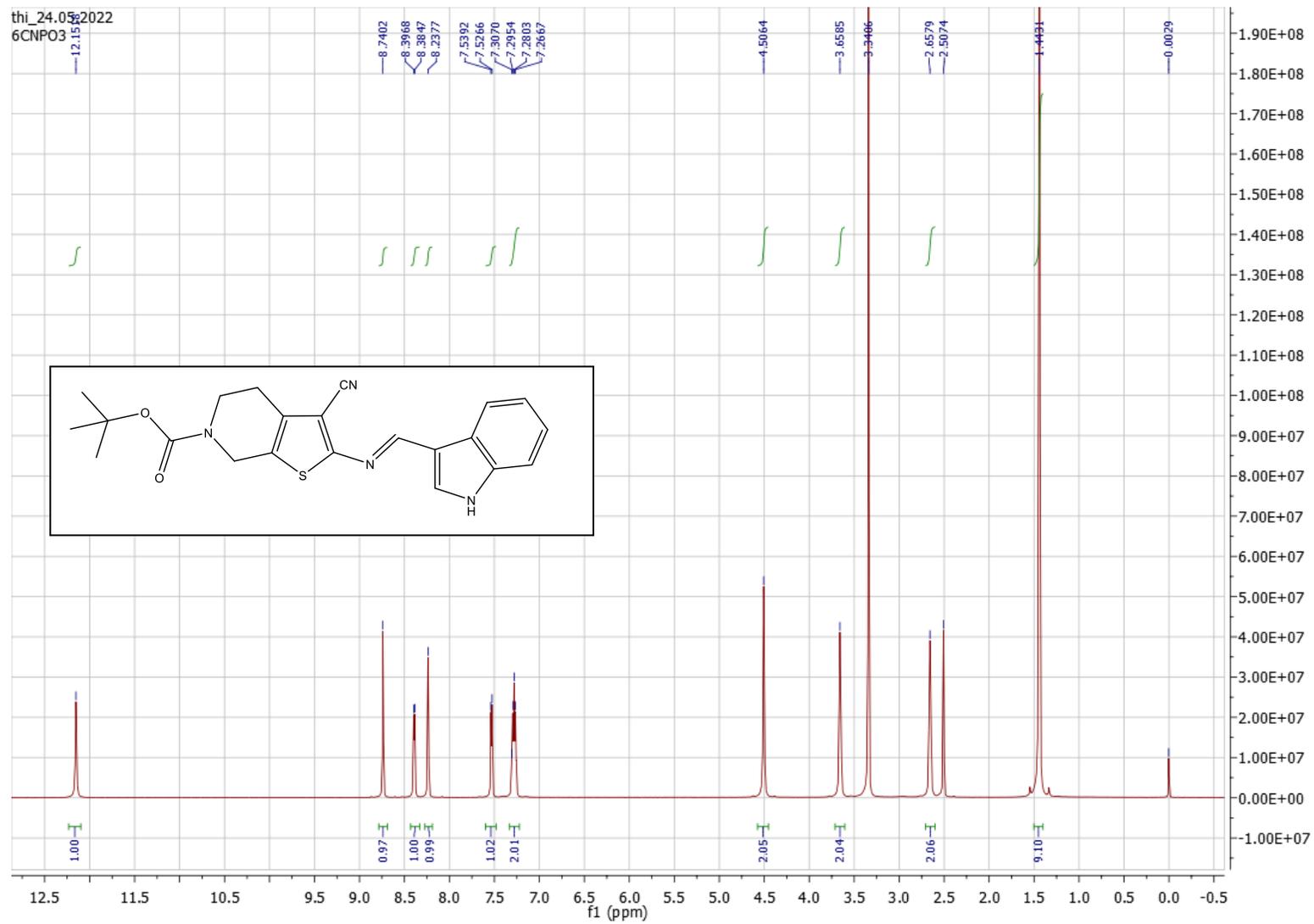
APÊNDICE D - Espectro de DEPT (125 MHz, DMSO-d₆) do composto 6CNP01

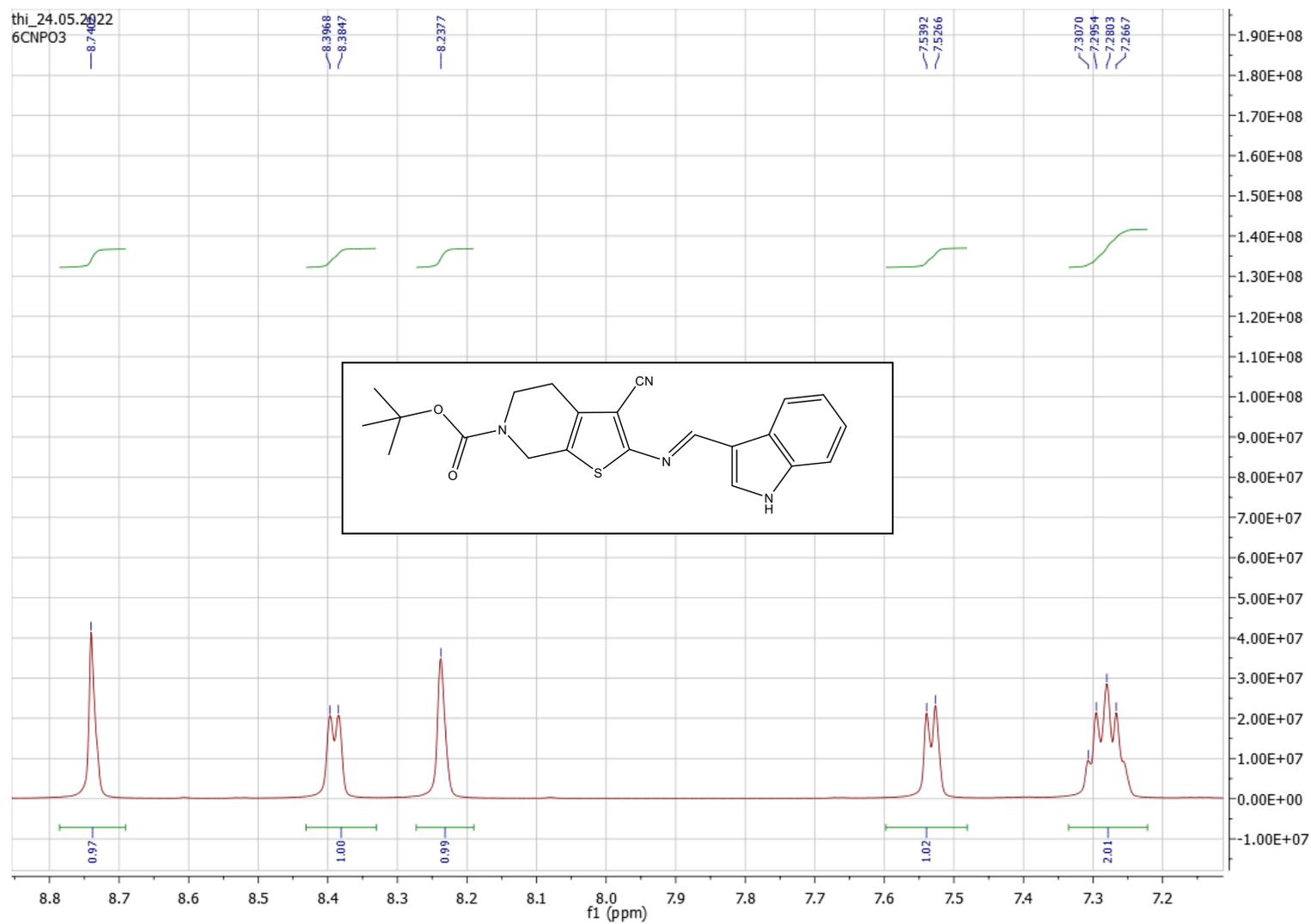
APÊNDICE E - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do composto 6CNP02

APÊNDICE F - Expansão do espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do composto 6CNP02

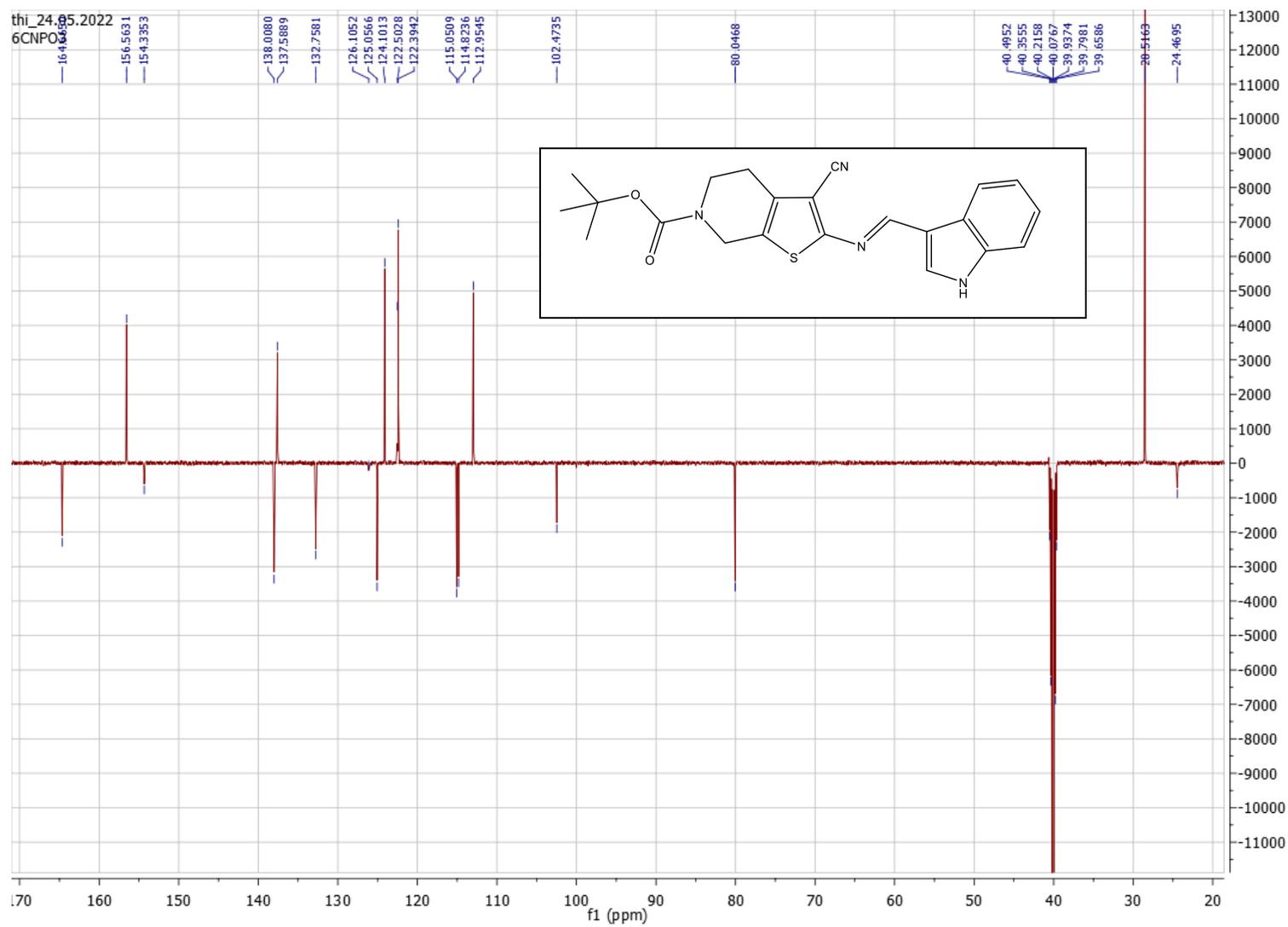
APÊNDICE G - Espectro de DEPT (150 MHz , DMSO-d6) do composto 6CNP02

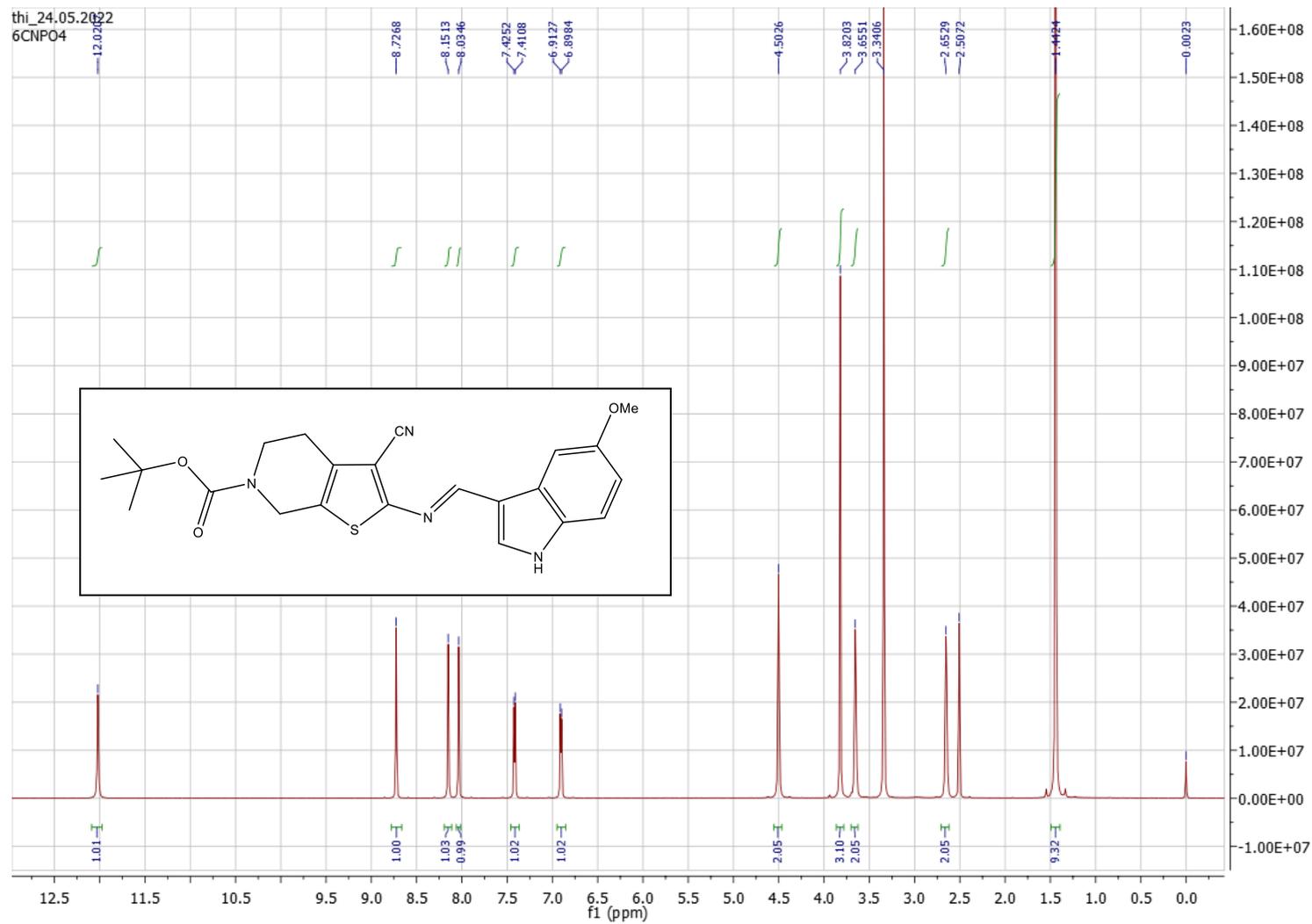


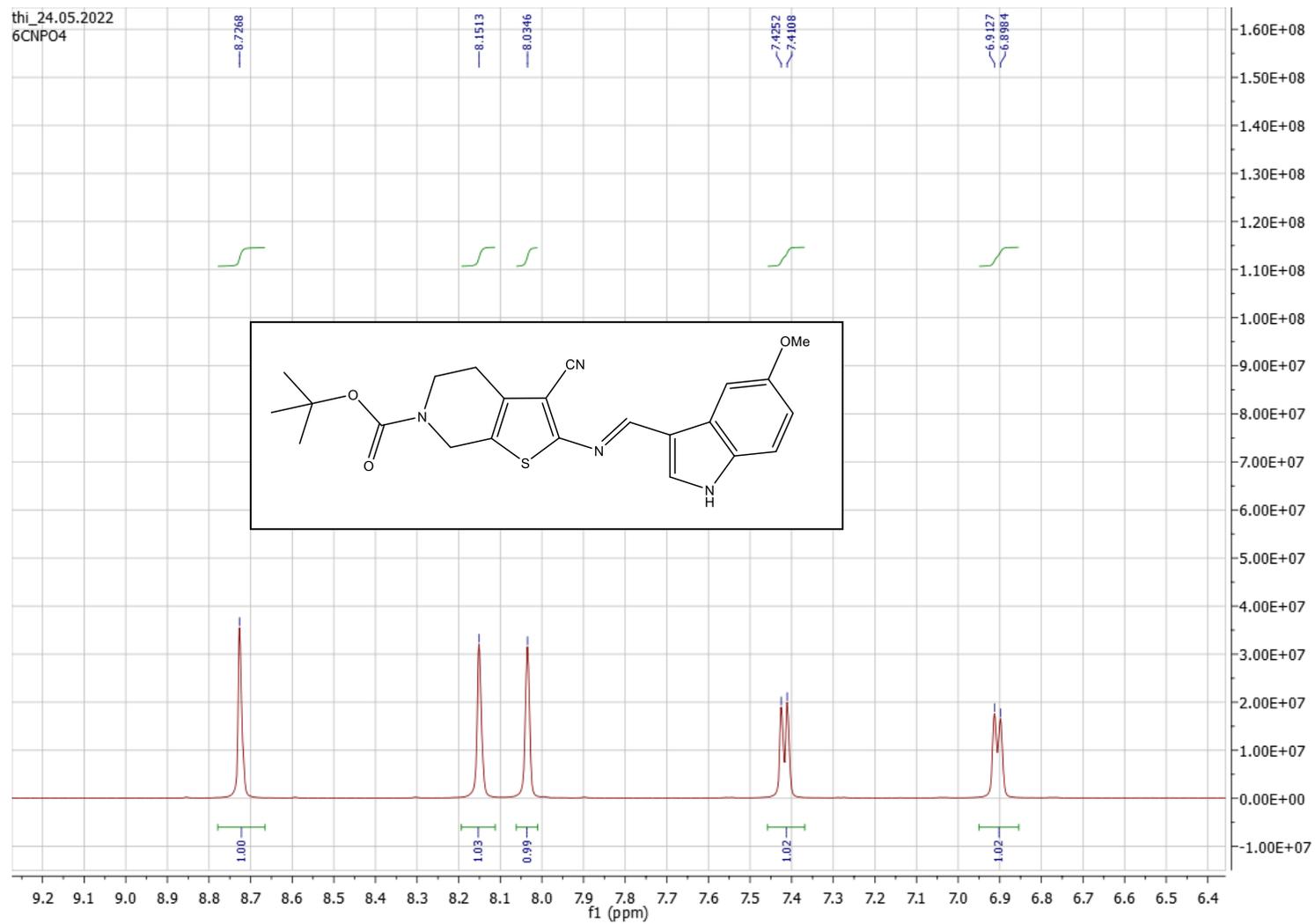
APÊNDICE H - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do composto 6CNP03

APÊNDICE I - Expansão do espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO-d $_6$) do composto 6CNP03

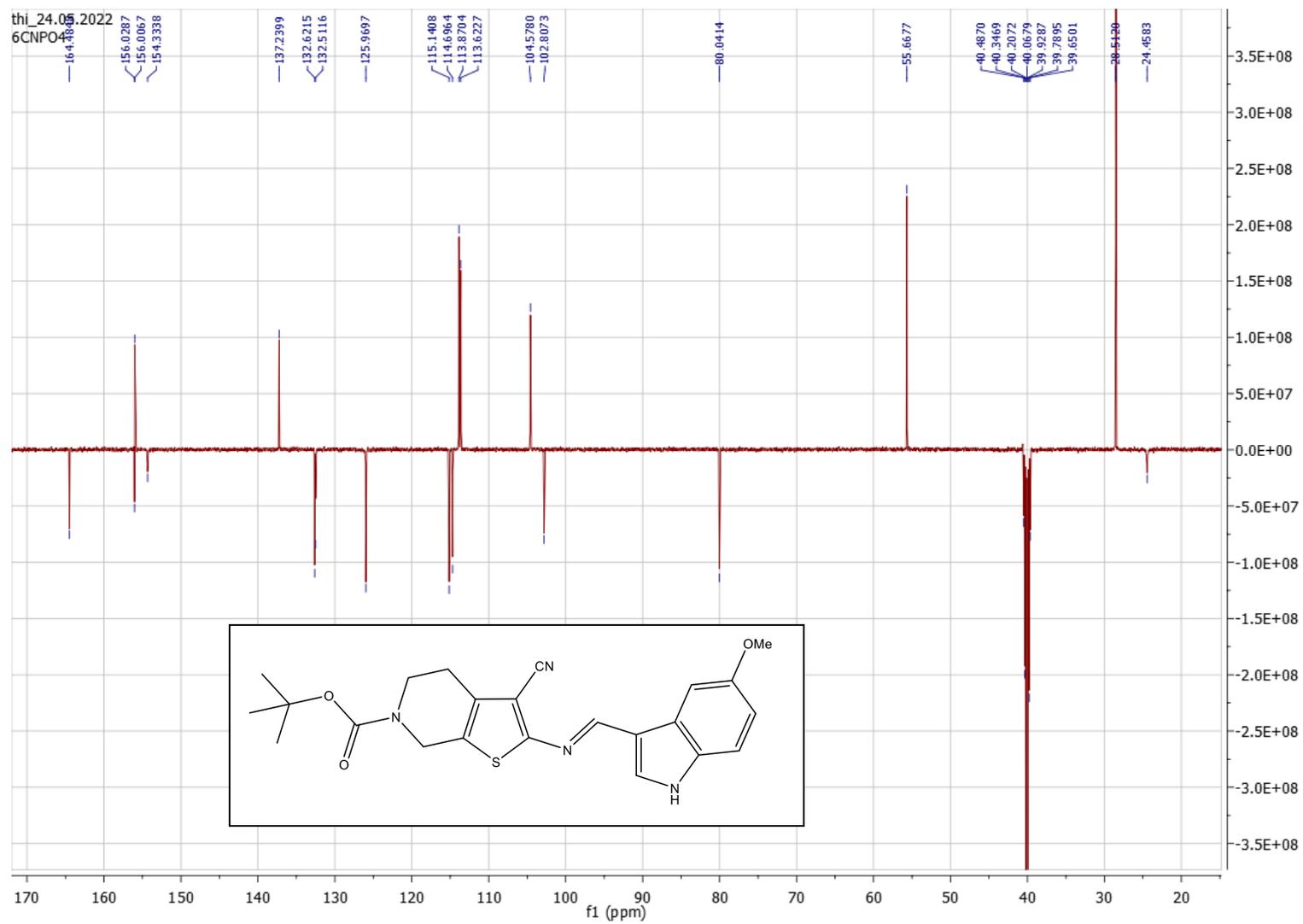
APÊNDICE J - Espectro de DEPT (150 MHz , DMSO-d6) do composto 6CNP03

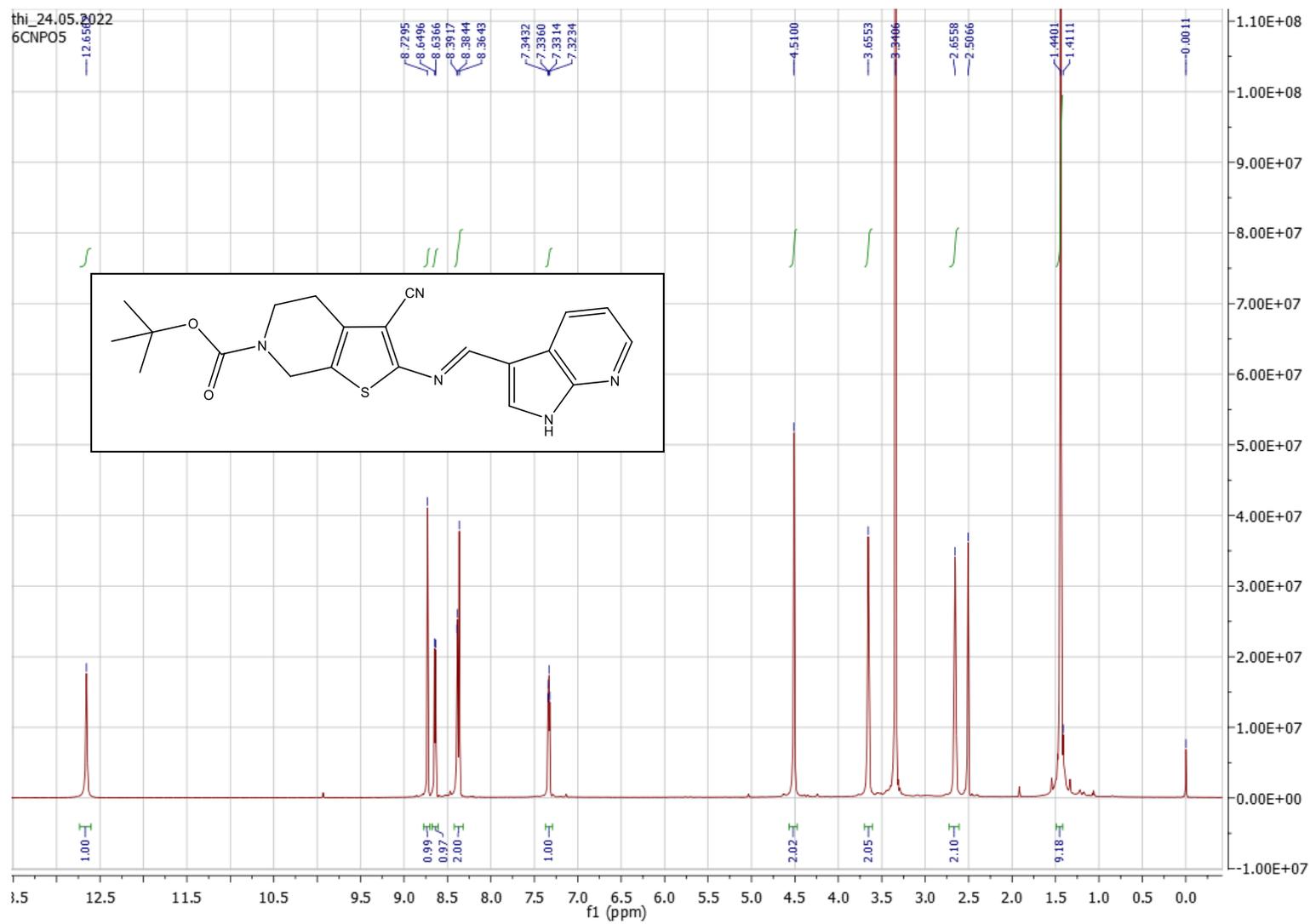


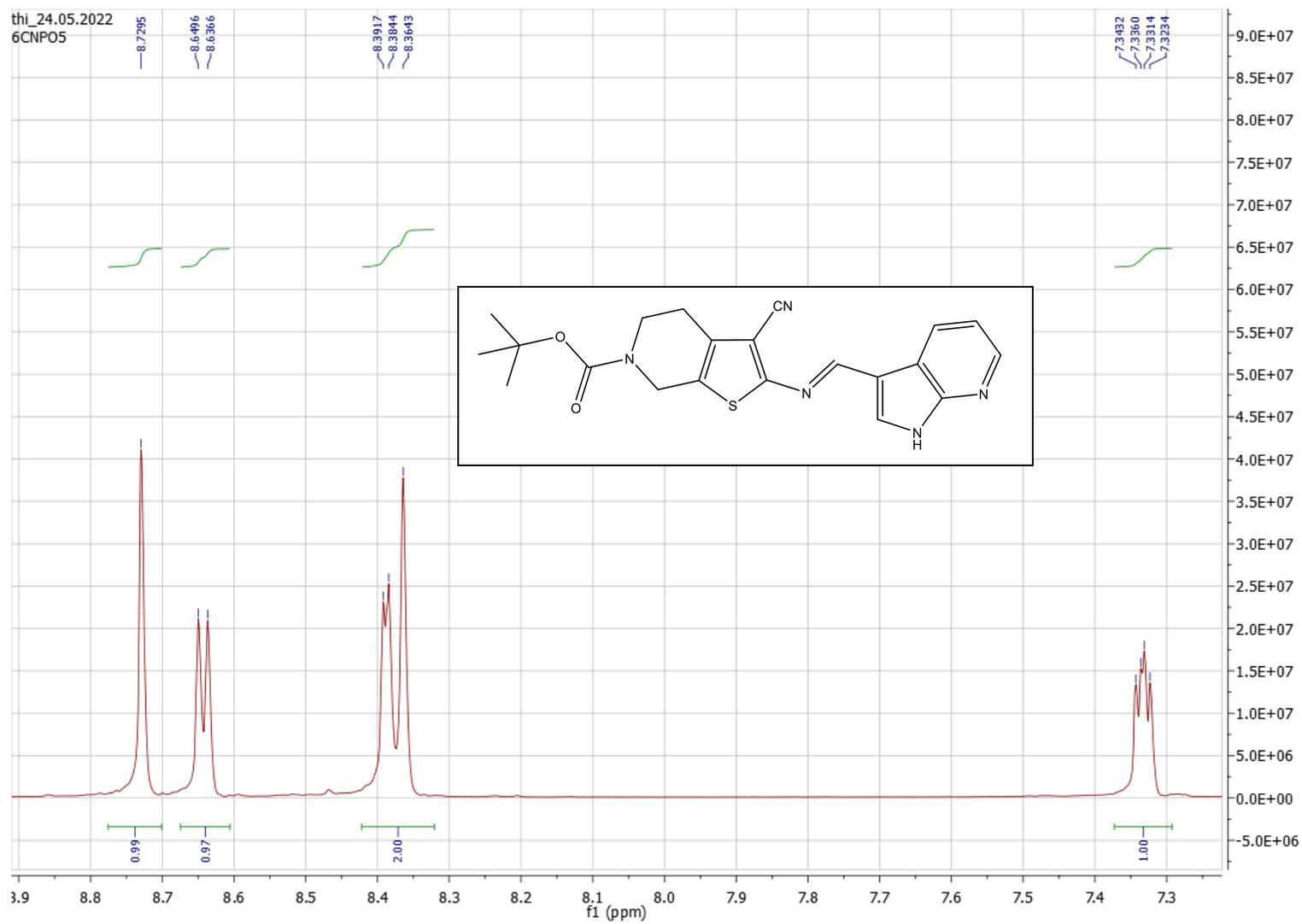
APÊNDICE K - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do composto 6CNP04

APÊNDICE L - Expansão do espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do composto 6CNP04

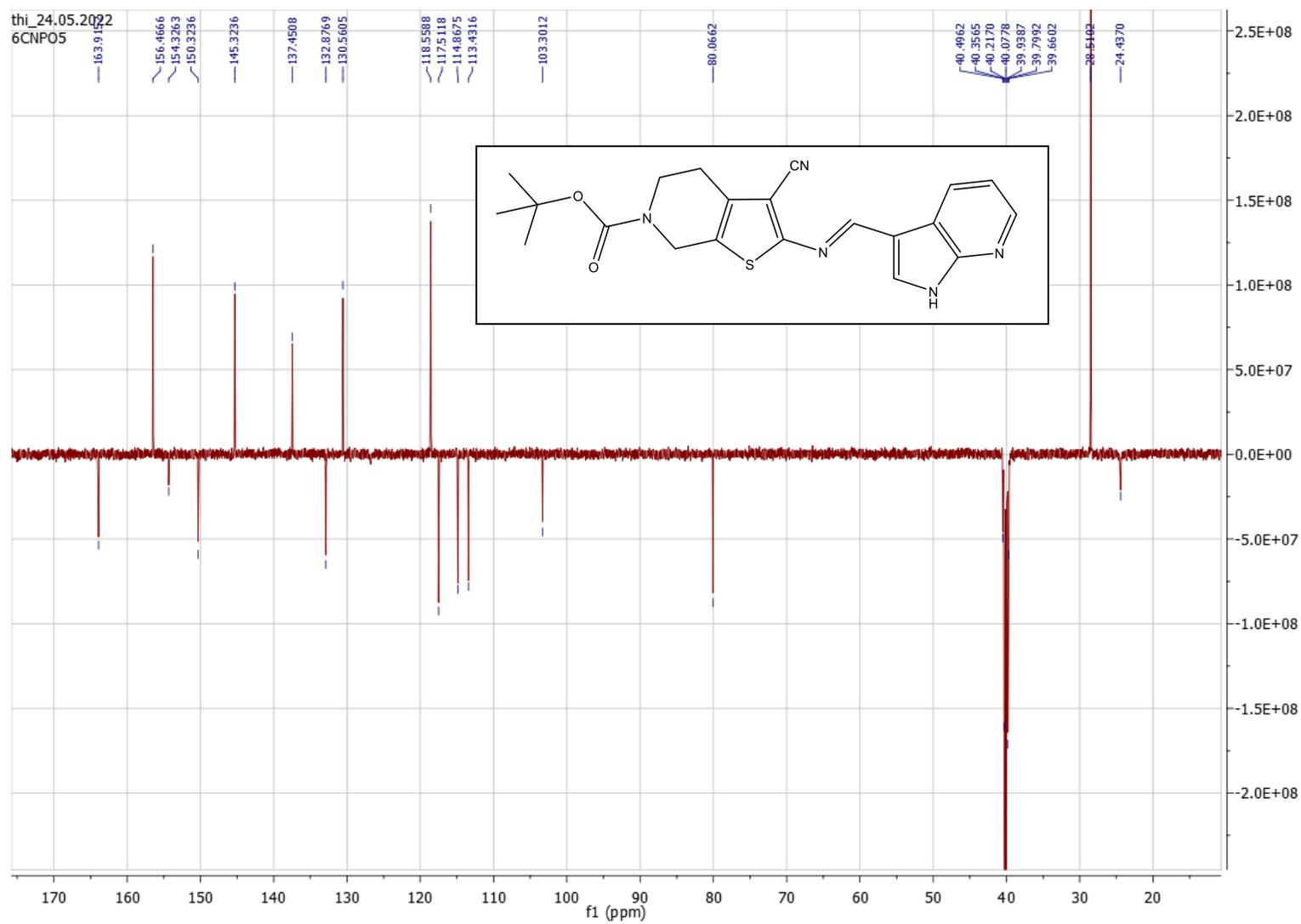
APÊNDICE M - Espectro de DEPT (150 MHz Hz, DMSO-d6) do composto 6CNP04

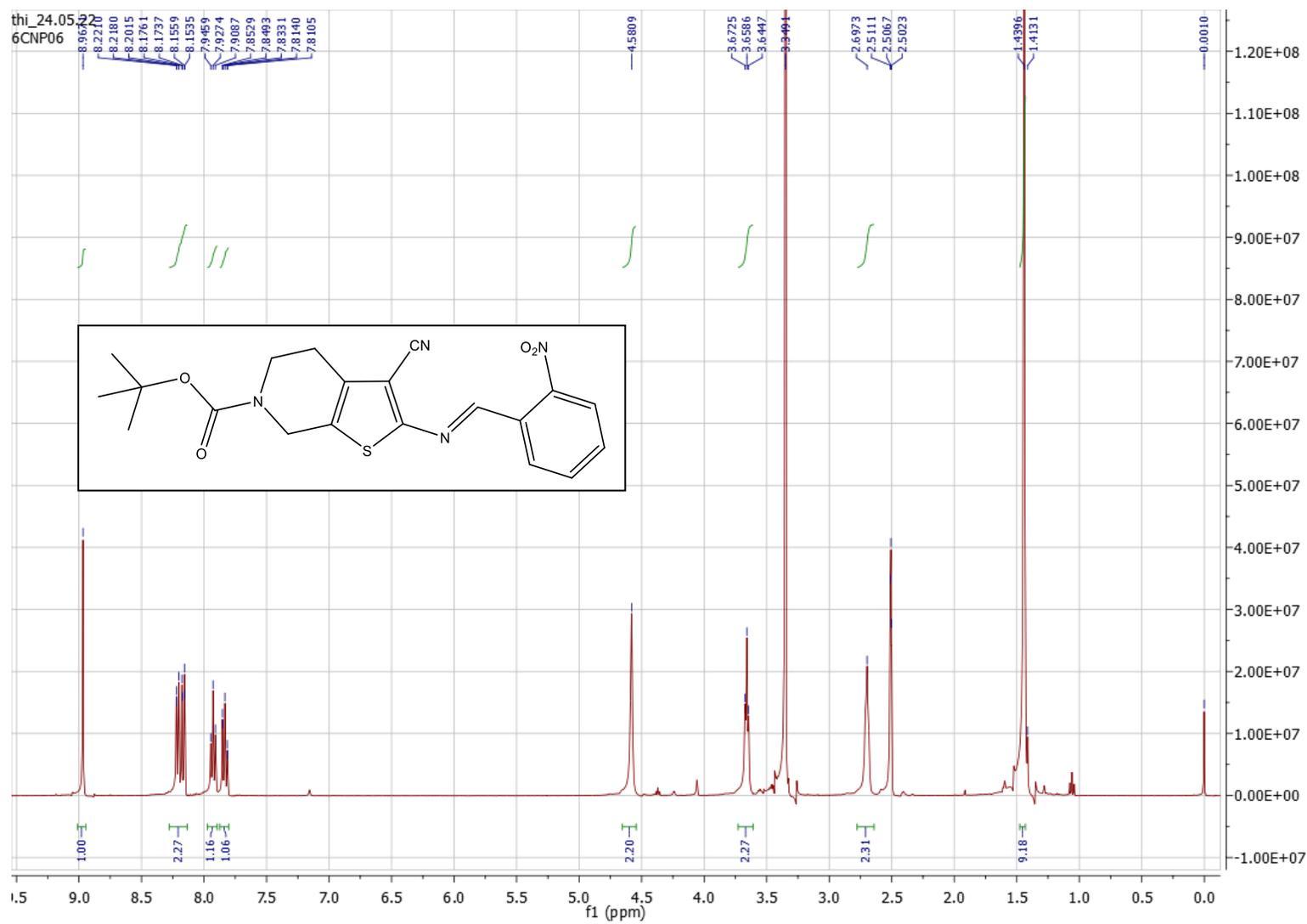


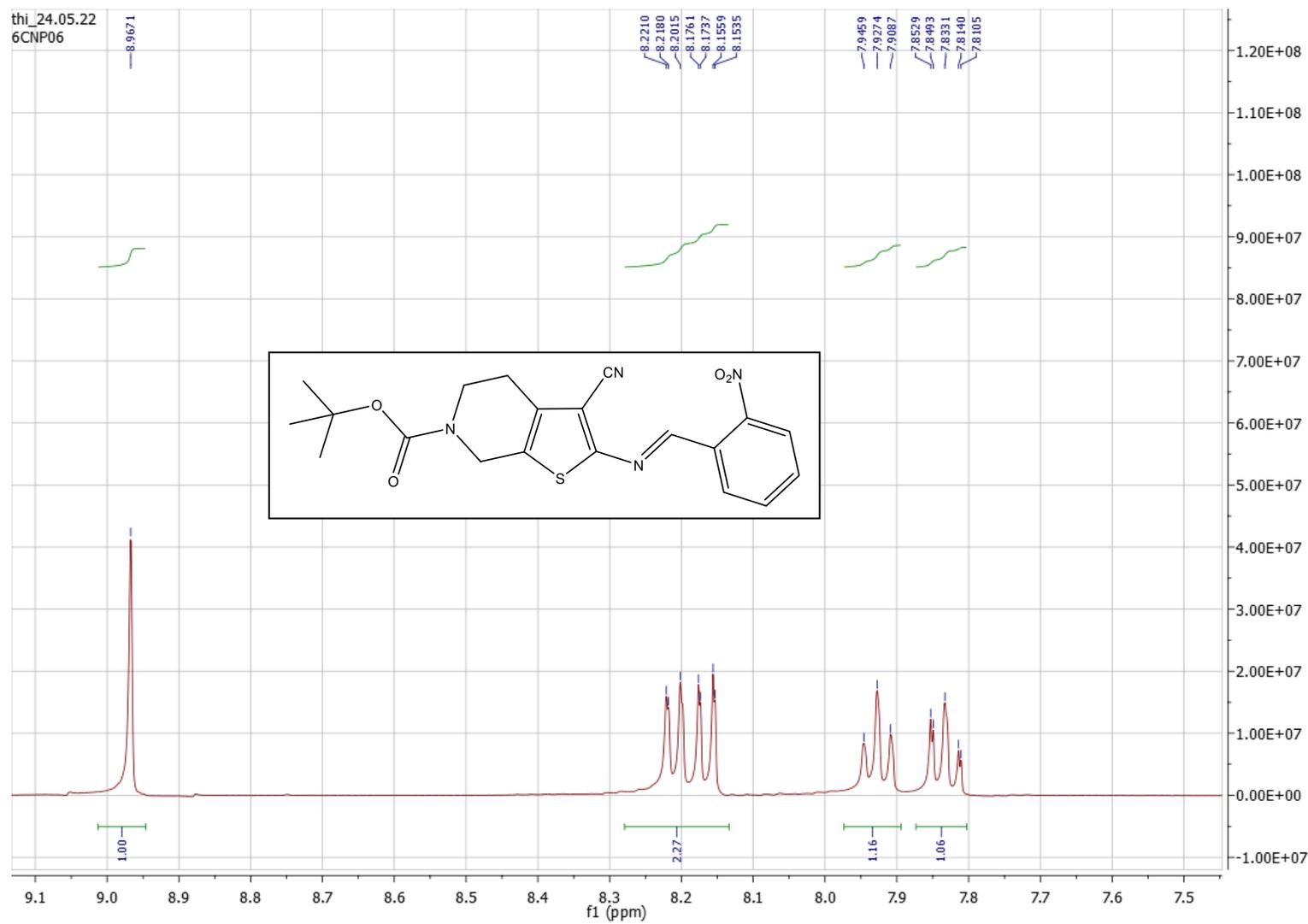
APÊNDICE N - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do composto 6CNP05

APÊNDICE O - Expansão do espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO-d $_6$) do composto 6CNP05

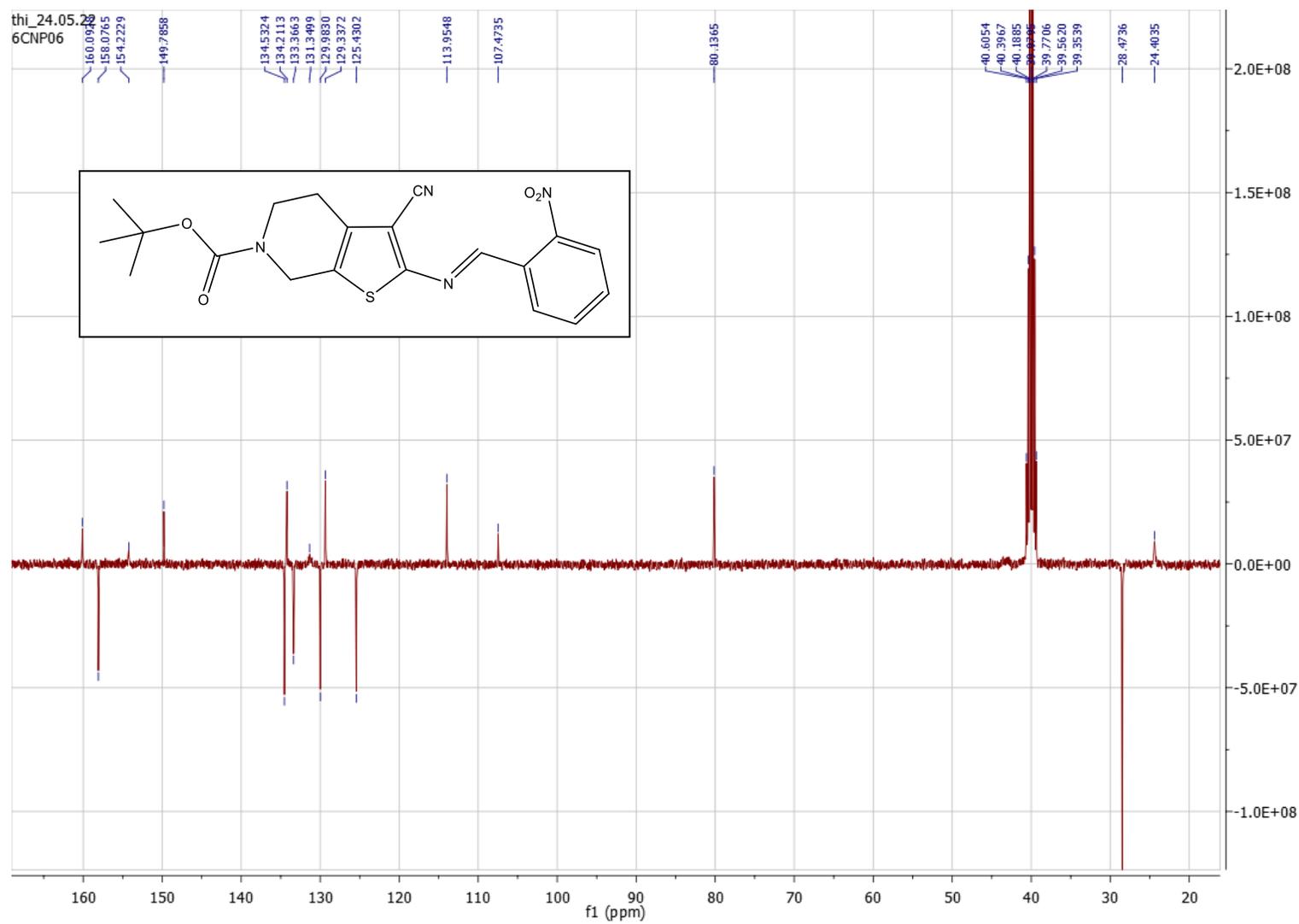
APÊNDICE P - Espectro de DEPT (150 MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP05

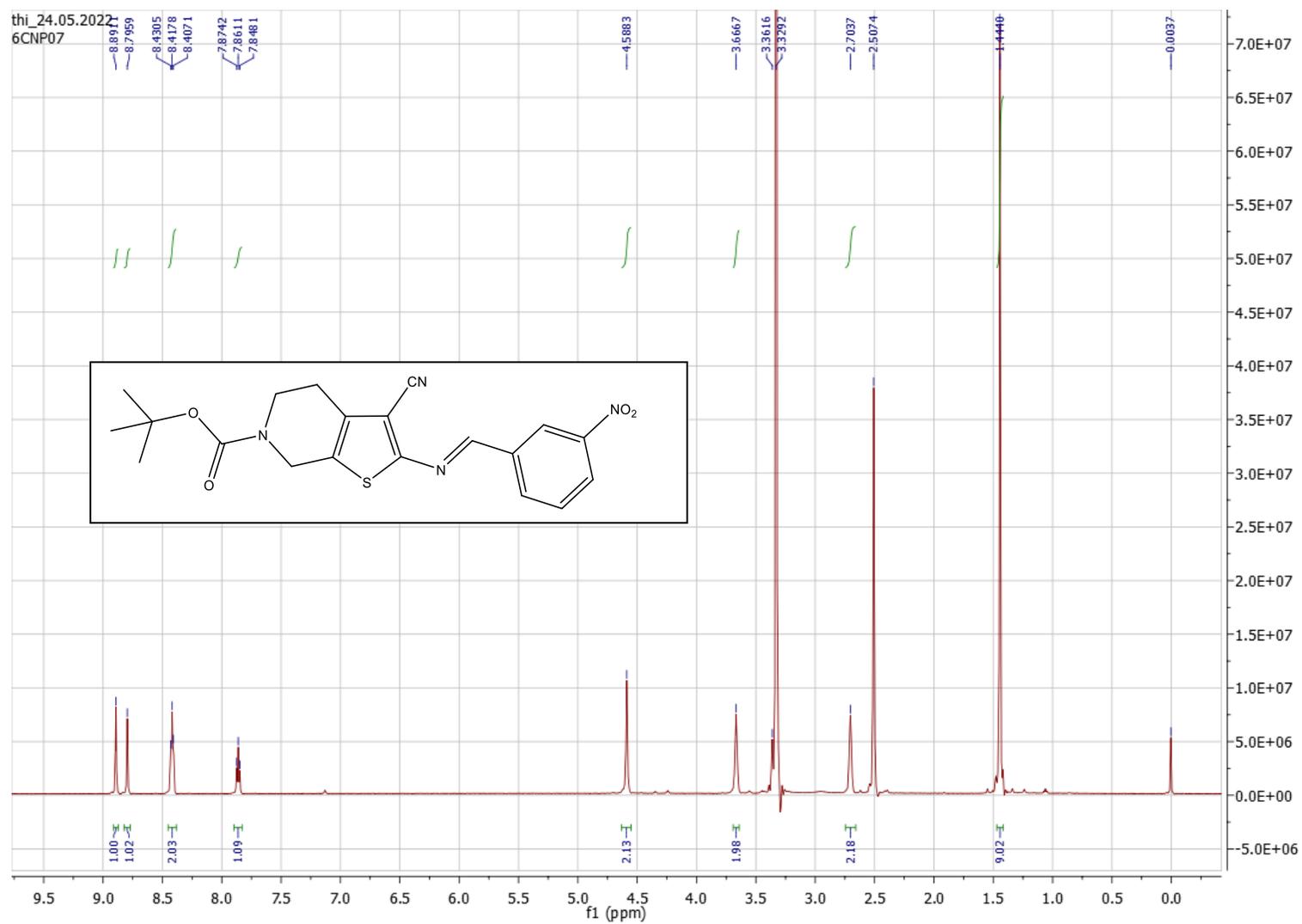


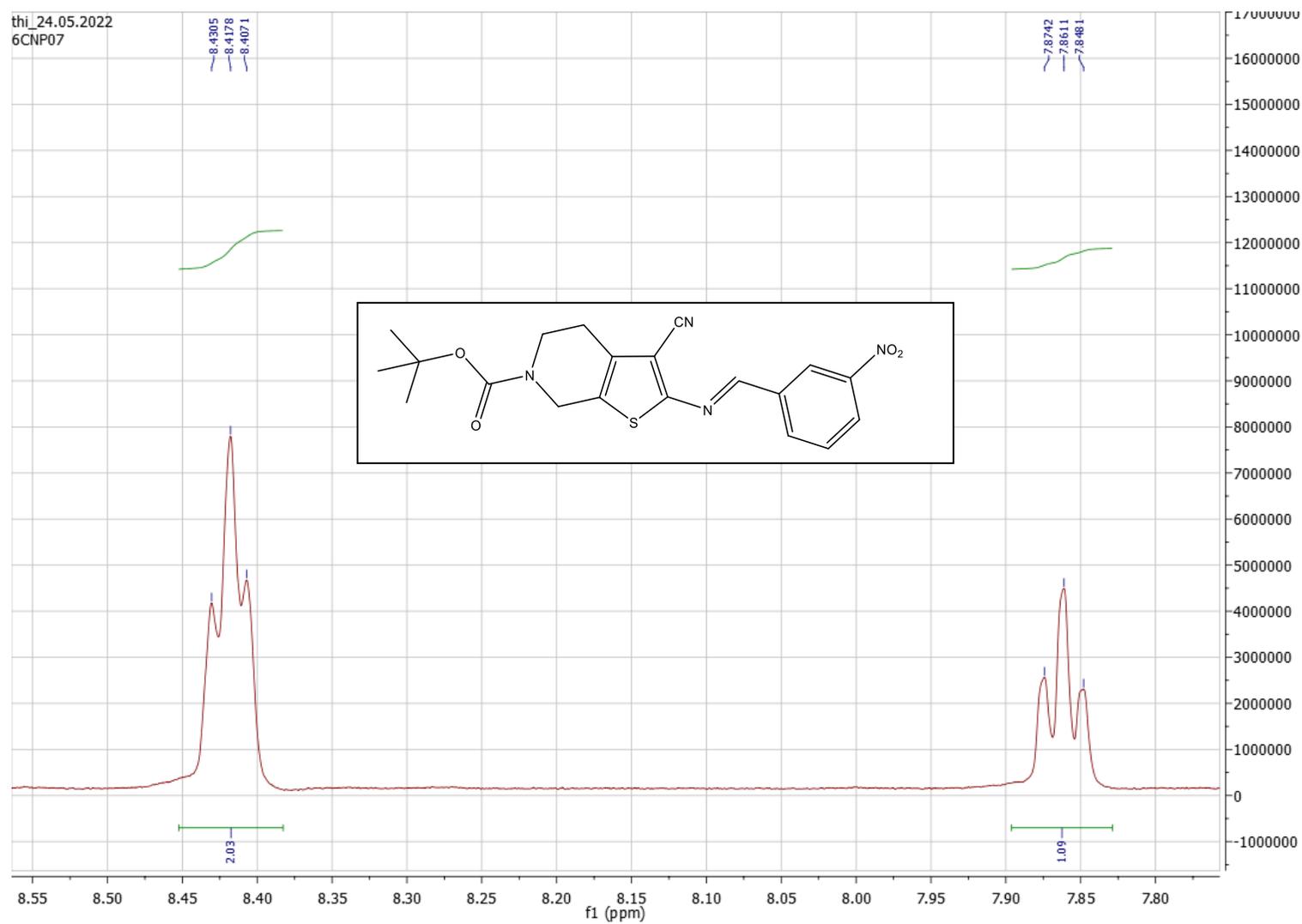
APÊNDICE Q - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 6CNP06

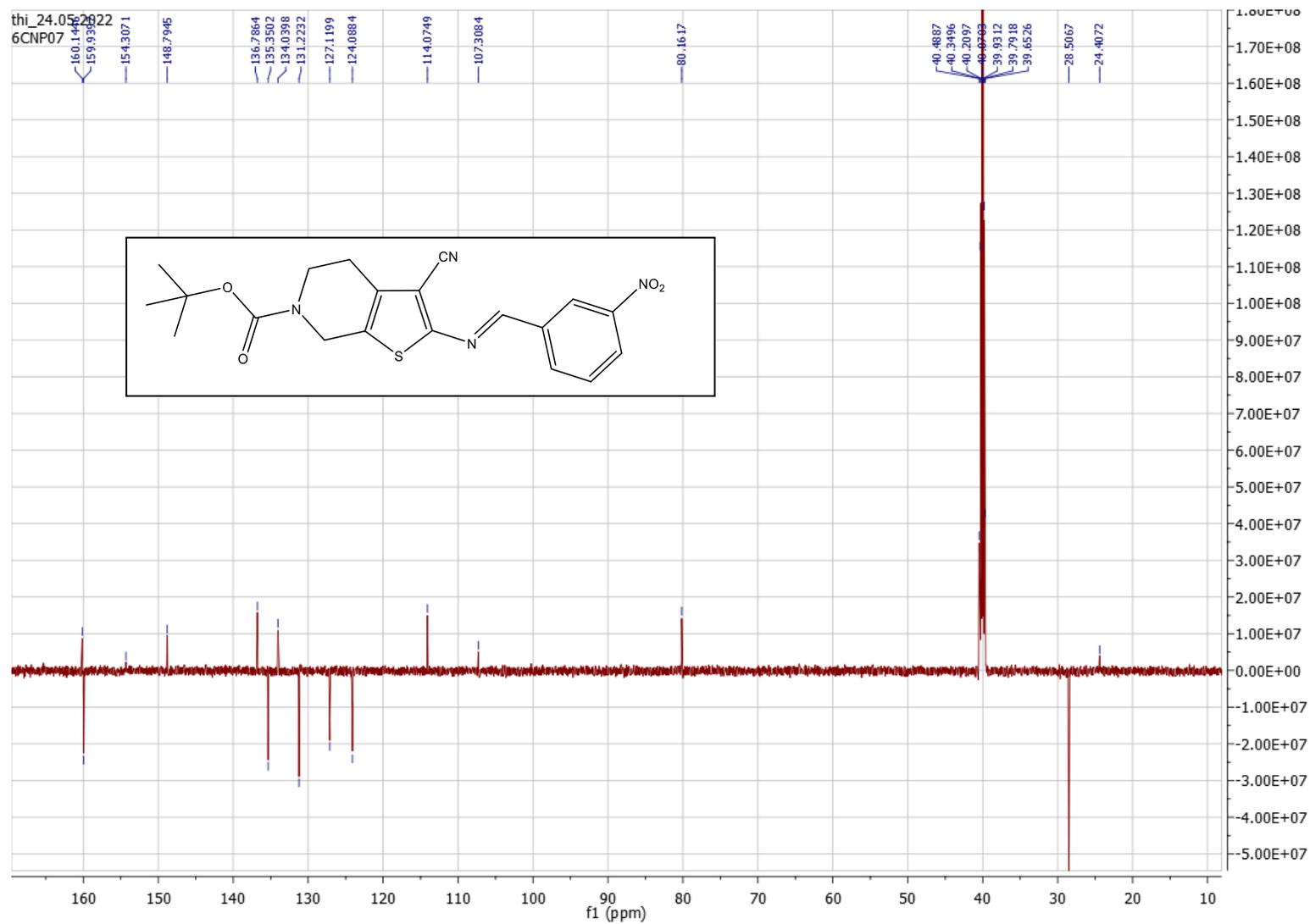
APÊNDICE R - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d₆) do composto 6CNP06

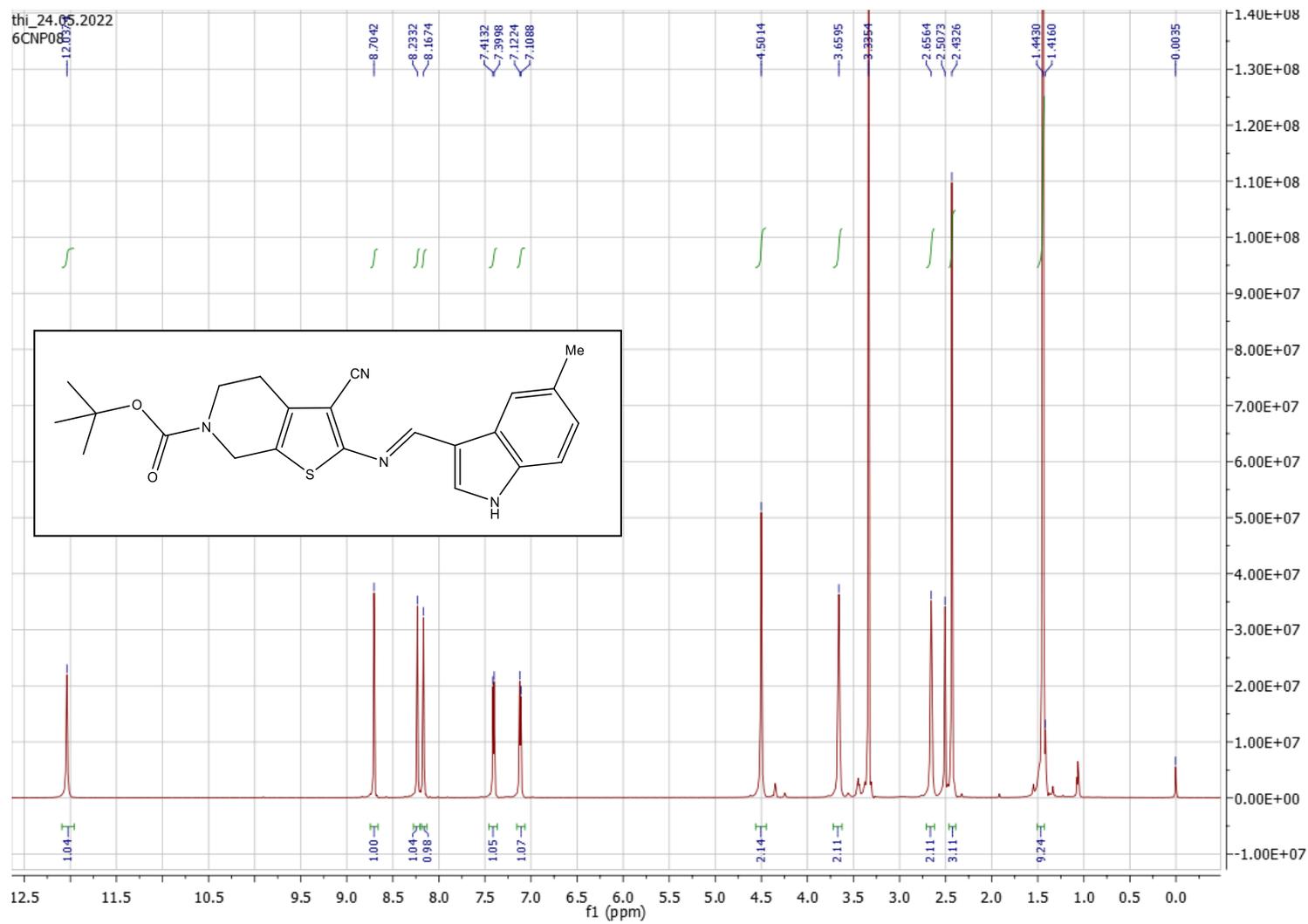
APÊNDICE S - Espectro de DEPT (125 MHz , DMSO-d6) do composto 6CNP06

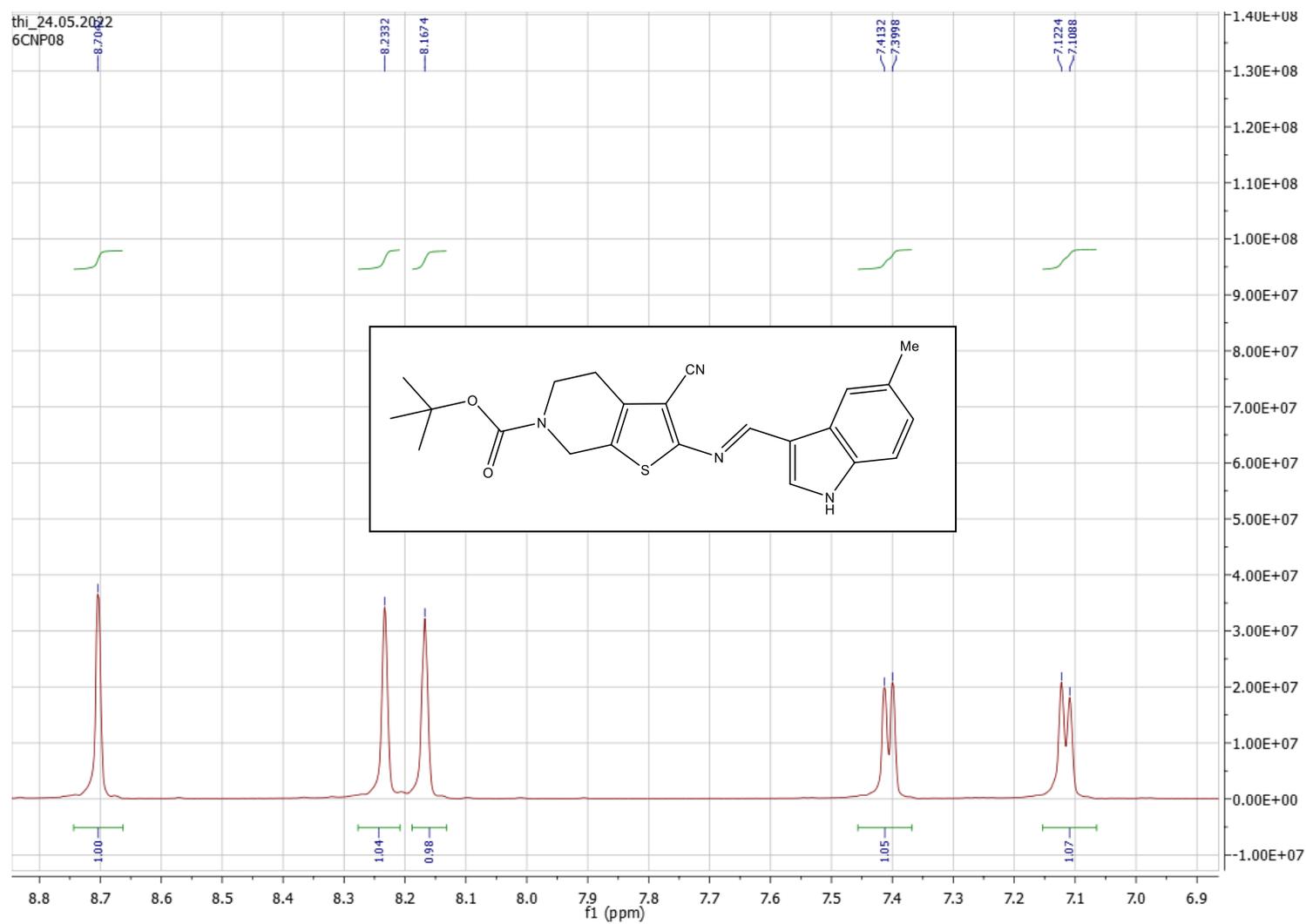


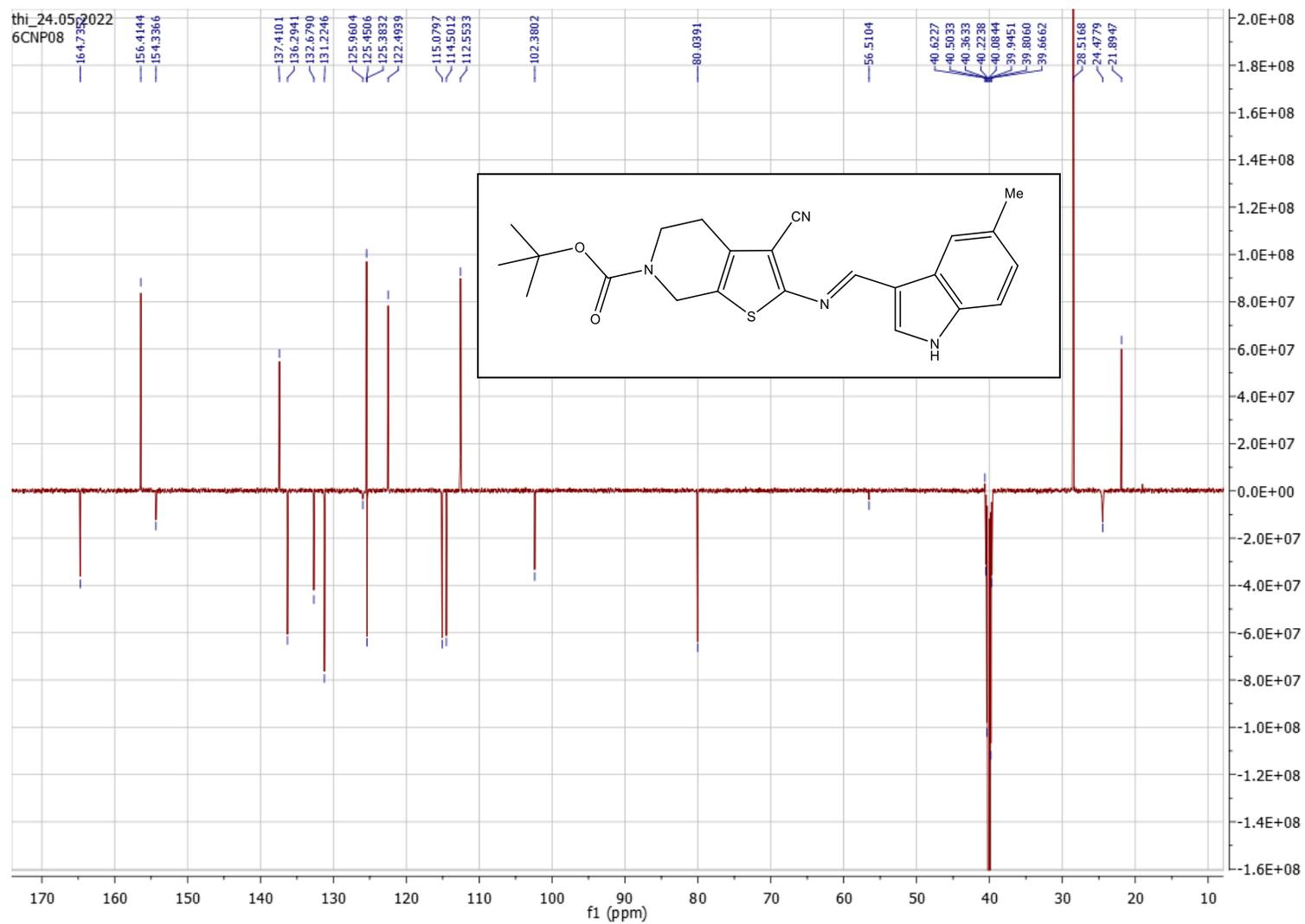
APÊNDICE T - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do composto 6CNP07

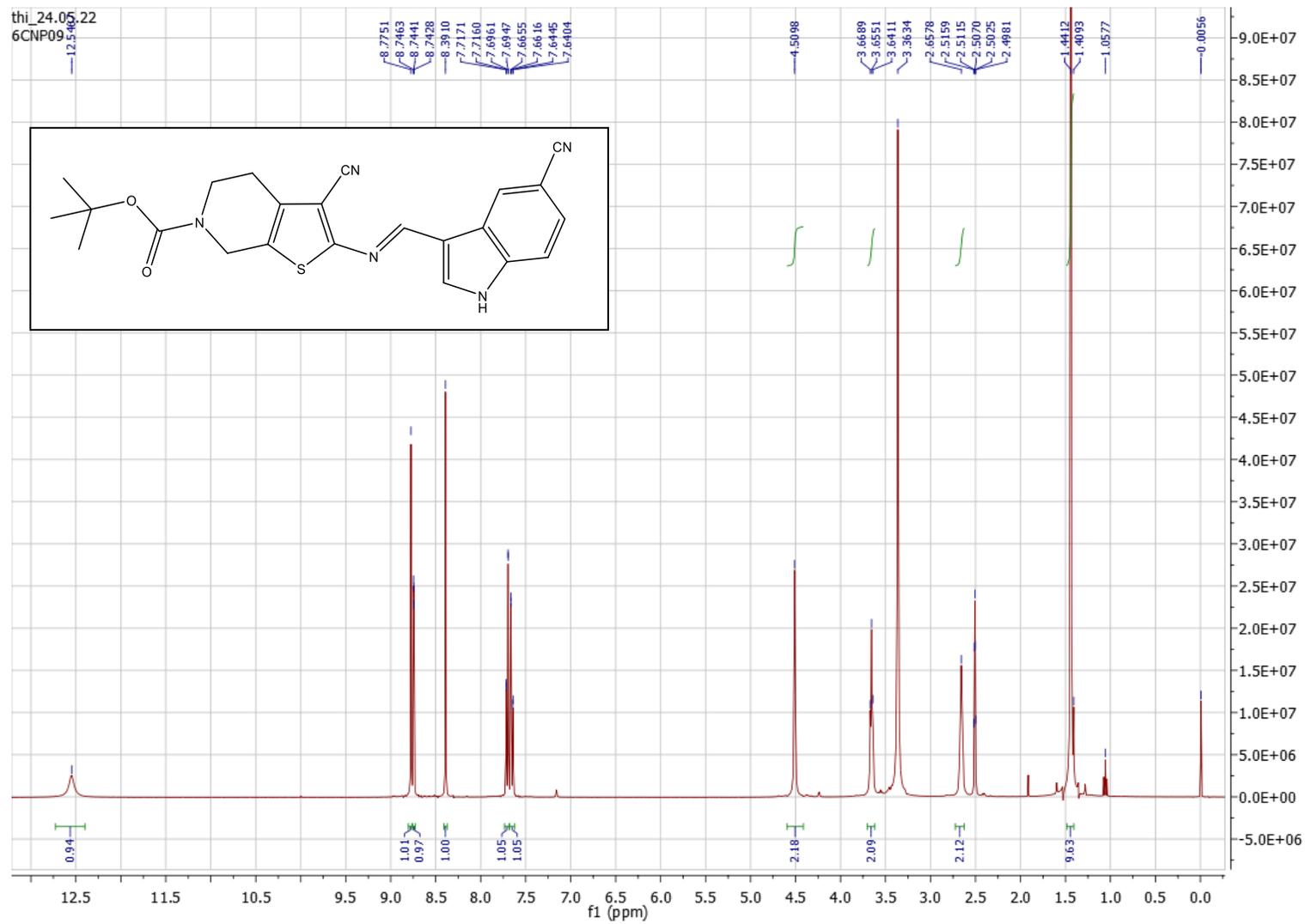
APÊNDICE U - Expansão do espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do composto 6CNP07

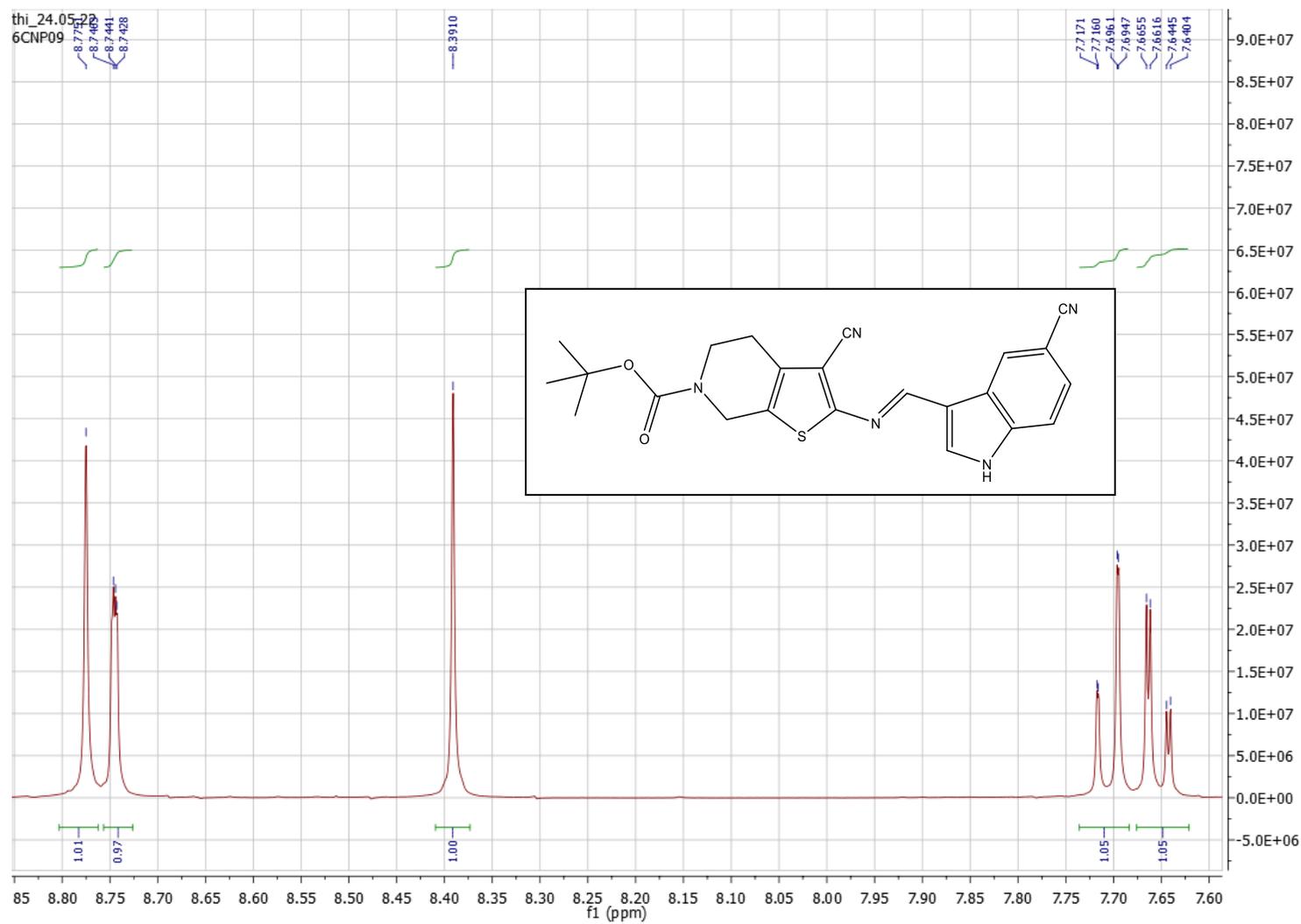
APÊNDICE V - Espectro de DEPT (150 MHz, DMSO-d₆) do composto 6CNP07

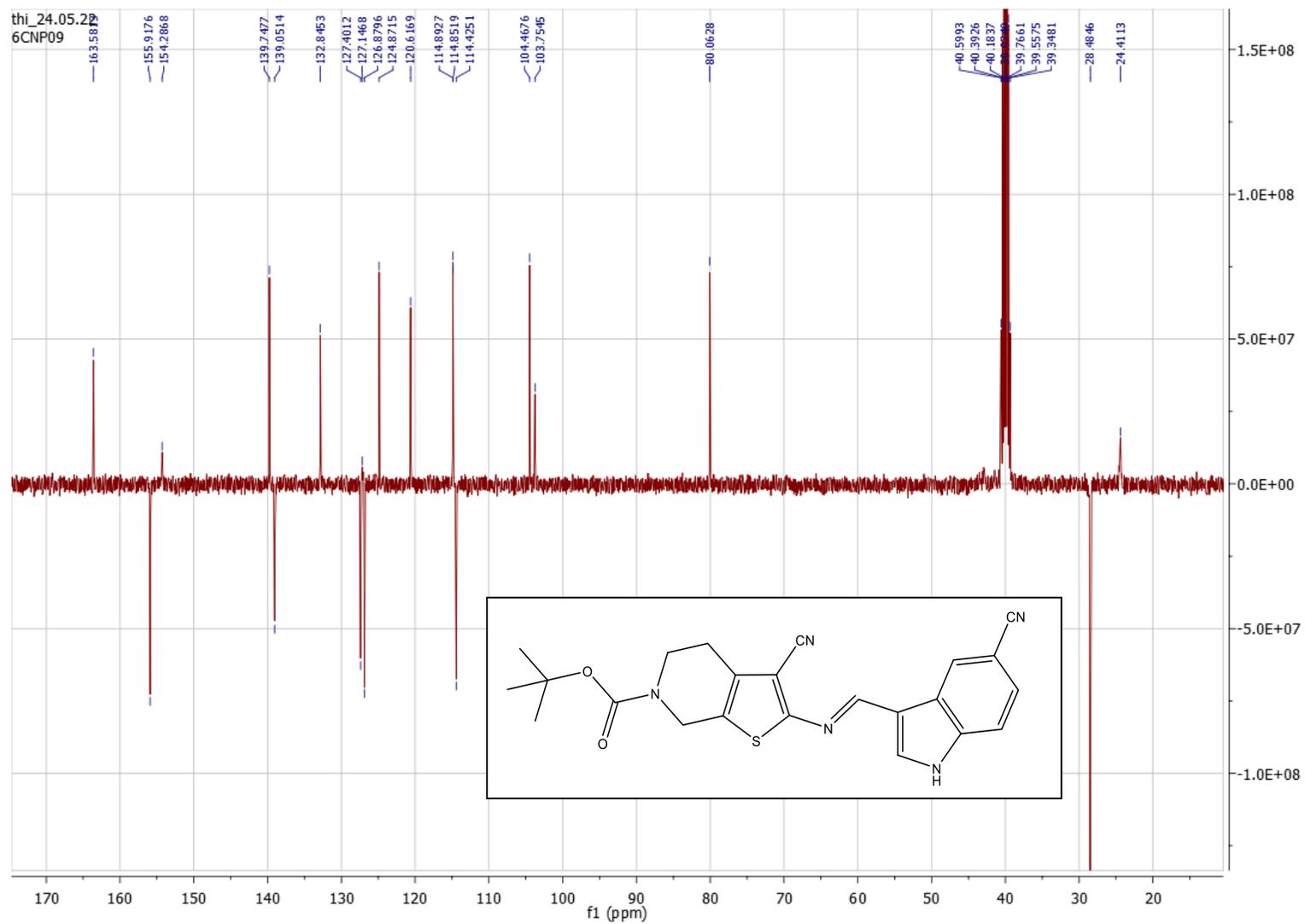
APÊNDICE W - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO-d₆) do composto 6CNP08

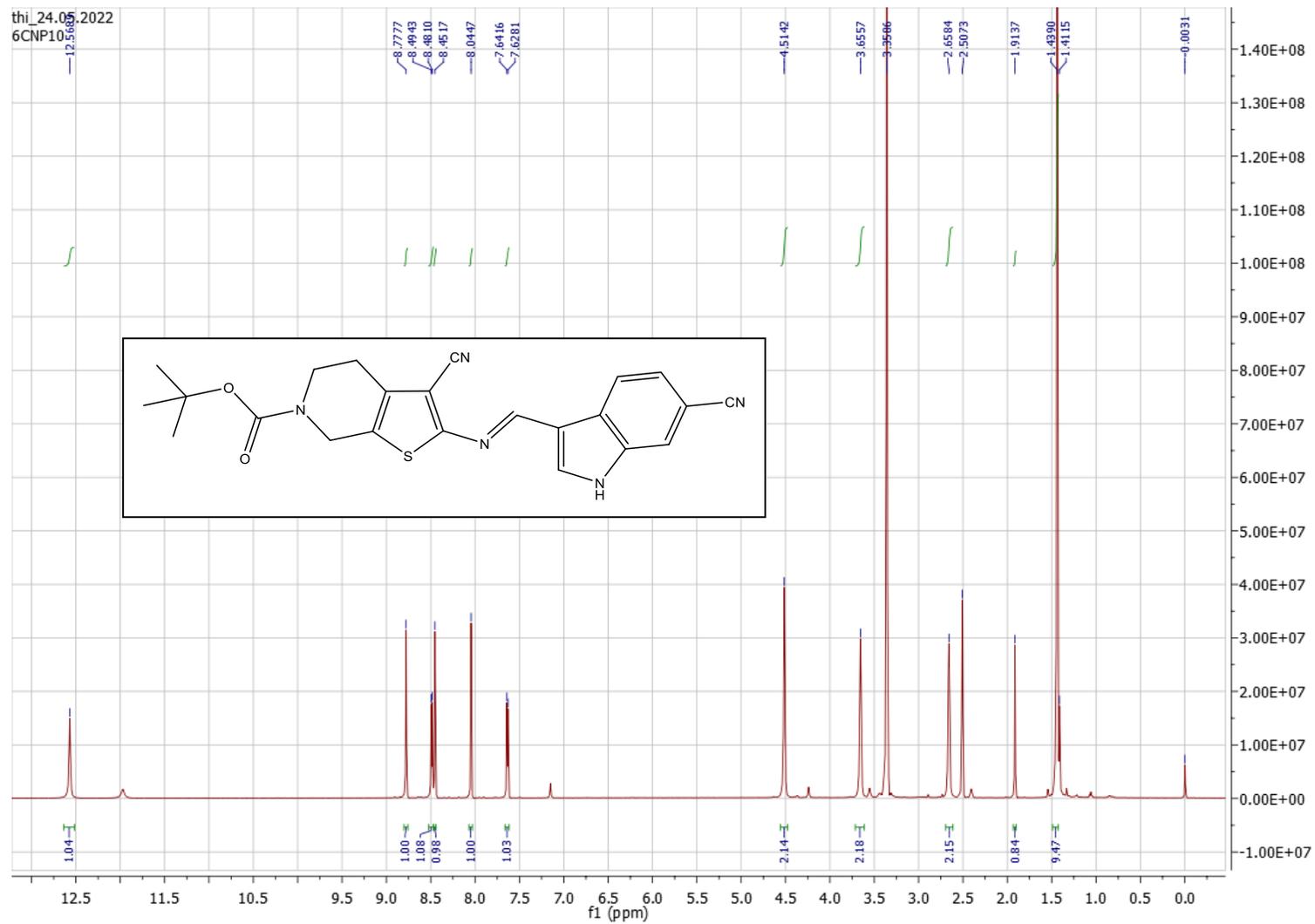
APÊNDICE X - Expansão do espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do composto 6CNP08

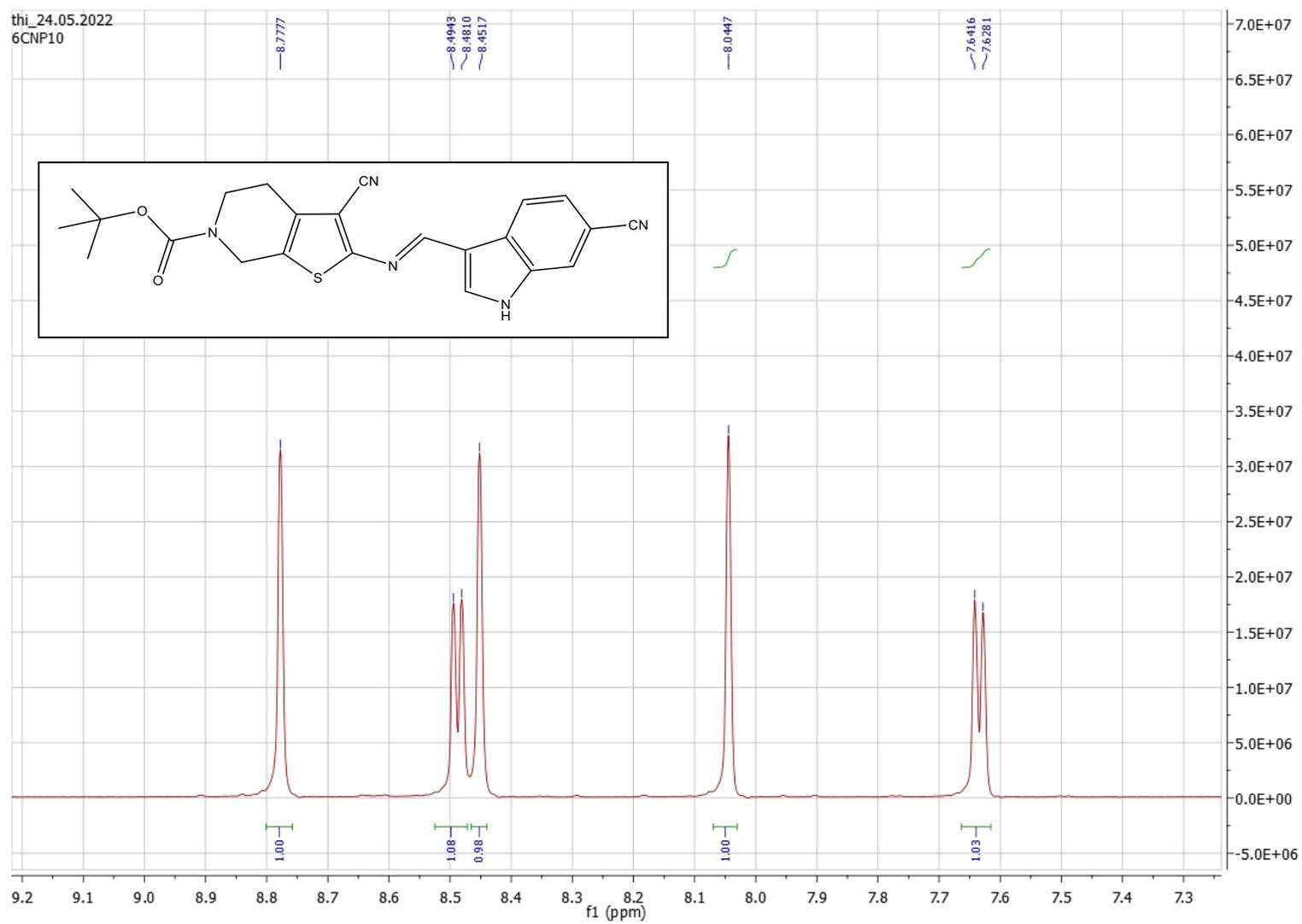
APÊNDICE Y - Espectro de DEPT (150 MHz, DMSO-d₆) do composto 6CNP08

APÊNDICE Z - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 6CNP09

APÊNDICE AA - Expansão do espectro de RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) do composto 6CNP09

APÊNDICE AB - Espectro de DEPT (125 MHz, DMSO-d₆) do composto 6CNP09

APÊNDICE AC - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do composto 6CNP010

APÊNDICE AD - Expansão do espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) do composto 6CNP10

APÊNDICE AE - Espectro de DEPT (150MHz, DMSO-d6) do composto 6CNP010

