



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

ALLANA LEMOS ANDRADE GOUVEIA

**SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE NOVAS 5-(INDOL-3-IL-METILENO)-4-
TIOXO-TIAZOLIDIN-2-ONAS**

RECIFE – 2015

ALLANA LEMOS ANDRADE GOUVEIA

**SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE NOVAS 5-(INDOL-3-IL-METILENO)-4-TIOXO-TIAZOLIDIN-2-
ONAS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima

Co-orientadores:

Prof^a. Dr^a. Rosali Maria Ferreira da Silva

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves

Recife – 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

G719s Gouveia, Allana Lemos Andrade.
Síntese, elucidação estrutural e avaliação da atividade biológica de
novas 5-(indol-3-il-metileno)-4- tioxo-tiazolidin-2-onas / Allana Lemos
Andrade Gouveia. – Recife: O autor, 2015.
96 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2015.
Inclui referências.

1. Leishmaniose. 2. Tiazolidina. 3. Indol. 4. Citotoxicidade I. Lima,
Maria do Carmo Alves de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2016-011)

ALLANA LEMOS ANDRADE GOUVEIA

Síntese, elucidação estrutural e avaliação da atividade biológica de novas 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxo-tiazolidin-2-onas

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

Aprovada em: 31/07/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Alves de Lima (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Examinador interno)

Universidade Estadual da Paraíba

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (Examinador externo)

Fundação Oswaldo Cruz

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

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. José Tadeu Pinheiros

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondanni

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof^a. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof^a. Dra. Ana Cristina Lima Leite

Dedico esse trabalho à minha família, que me incentiva e torce por mim em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido que tudo isso acontecesse, pela força, pela sabedoria, por todas as minhas conquistas pessoais e profissionais, e por ter colocado em minha vida pessoas tão especiais, que não mediram esforços em me ajudar durante a realização desse trabalho, para que eu pudesse concluir mais essa etapa da minha jornada.

À minha mãe Valéria Lemos, meu pai Rui Andrade, e meus irmãos André e Rafaela, pelo amor e cobranças de sempre.

À minha orientadora Prof^a. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima, pela oportunidade a mim concedida, pela paciência na orientação, ensinamentos e amizade que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

À Prof^a. Dra. Rosali Maria Ferreira da Silva, pela confiança, disposição e novos conhecimentos.

Aos Profs. Dr. Luiz Carlos Alves e Dr. Fábio Brayner, pela maravilhosa recepção em seu laboratório para a realização dos experimentos biológicos.

A todos que fazem parte do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica, Íris, Rubinho, Amélia, Bruno, César, Keriolaine, Luiz, Miguel, Paula, Pedro, Rodolfo, Wanessa, Tiago, Anekécia, Jamerson, e tantos outros, pela amizade e colaboração durante os experimentos.

Aos novos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pelo bom acolhimento, pela cooperação e carinho com que pude contar.

À Amanda Aliança, pela disposição, assistência, ensinamentos e incentivo que foram fundamentais para a realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco e a todos os professores que dele fazem parte pela dedicação e ensinamentos compartilhados durante o curso.

Às secretárias do PPGCF, Nerilin, Júlia e Bárbara; que sempre atenderam às minhas solicitações com muita simpatia e presteza.

Aos funcionários da Central Analítica do DQF-UFPE, pelas análises espectroscópicas.

A Kleython Monteiro, companheiro de todas as horas, por toda paciência e carinho, e por sempre me apoiar em todas as minhas decisões.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro.

“Todo desejo é manancial de poder. A planta que se eleva para o alto, convertendo a própria energia em fruto que alimenta a vida, é um ser que ansiou por multiplicar-se.”
Francisco Cândido Xavier

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença potencialmente fatal, causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida por insetos flebotomíneos. O Brasil é um dos países mais afetados pela doença, a qual ocorre principalmente em áreas onde os serviços de saúde são limitados. Além disso, os medicamentos usualmente utilizados para o tratamento da enfermidade apresentam incômoda via de administração, efeitos tóxicos severos e algumas cepas já possuem resistência aos fármacos convencionais. Esse fato faz com que a busca por novas alternativas terapêuticas, mais eficazes e menos tóxicas, seja de grande importância. Neste cenário, a química medicinal é imprescindível, pois atua no planejamento e na descoberta de novas moléculas candidatas a fármacos. As tiazolidinas são um grupo de moléculas que possuem uma diversa lista de atividades biológicas relatadas na literatura. Neste trabalho, cinco novos derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxo-tiazolidin-2-onas foram sintetizadas e avaliadas quanto a sua atividade leishmanicida, a partir de testes *in vitro* frente formas promastigotas de *Leishmania infantum*, e o ensaio do MTT para a determinação da citotoxicidade. Os compostos GQS-90, GQS-91 e GQS-93, destacaram-se entre os compostos testados, apresentando valores de IC₅₀ que variaram de 0,42 a 23,96 µM. Esses compostos apresentamrem também valores de CC₅₀ que variam de 8,52 a 54,34 µM. A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que três dos cinco derivados utilizados nesse trabalho apresentaram promissor potencial leishmanicida, com bons índices de seletividade, sendo necessários estudos complementares de microscopia eletrônica e ensaios *in vivo* para melhor elucidar a ação desses compostos.

Palavras-chave: Leishmaniose. Tiazolidina. Indol. Citotoxicidade

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a potentially fatal disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by sandflies. Brazil is one of the most affected countries by this disease, which occurs mainly in areas where health services are limited. Furthermore, the commonly used drugs for the treatment of the disease have a troublesome route of administration, severe toxic effects and already have some strains of resistance to conventional drugs. This fact makes the search for new therapeutic alternatives, more effective and less toxic, of great importance. In this scenario, medicinal chemistry is essential because acts in the design and discovery of new molecules drug candidates. The thiazolidines are a group of molecules which have a different list of biological activities reported in the literature. In this work, five new derivatives 5-(indole-3-yl-methylene)-4-thioxo-thiazolidin-2-one have been synthesized and evaluated for antileishmanial activity with in vitro tests using promastigotes forms of *Leishmania infantum*, and MTT assay for determination of cytotoxicity. The compounds GQS-90, GQS-91 and GQS-93 stood out among the others tested compounds, with IC₅₀ values ranging from 0,42 to 23,96 µM. From the results obtained, we conclude that three of the five derivatives used in this study showed promising leishmanicidal potential with good indices of selectivity, and electron microscopy studies and in vivo assays are required to further elucidate the action of these compounds.

Palavras-chave: Leishmaniasis. Thiazolidine. Indole. Cytotoxicity.

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1 - Síntese da TZD, a partir da tiouréia e do ácido monocloroacético	45
Esquema 2 - Formação da 4-tioxotiazolidina-2-ona .	46
Esquema 3 - Reação de oxidação	46
Esquema 4 - Reação de <i>N</i> -alquilação	47
Esquema 5 - Reação de condensação de Knoevenagel	47
Esquema 6 - Reação de Adição de Michael	48
Esquema 7 - Reação de diazotação	48
Esquema 8 - Reação de Mannich. Formação de <i>N</i> -metil- <i>N,N</i> -bis(2,4-tiazolidinadiona-metil-amina)	49
Esquema 9 - Rota sintética para obtenção dos derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxo-tiazolidin-2-onas(LQIT/GQS)	55

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Representação das principais formas clínicas da Leishmaniose	24
Figura 2 - Status de endemicidade da leishmaniose visceral, 2012	24
Figura 3 - Taxa de incidência de Leishmaniose por país, Américas, 2012	25
Figura 4 - Distribuição dos casos de Leishmaniose visceral nos estados brasileiro entre os anos de 2000 e 2013	26
Figura 5 - Municípios segundo coeficiente de detecção da LV em Pernambuco, 2000 a 2006.	27
Figura 6 - Representação esquemática das formas evolutivas da <i>Leishmania infantum</i> (promastigota flagelada e amastigota, no interior de um macrófago)	28
Figura 7 - Forma promastigota (à esquerda) e amastigota (à direita) de <i>L. infantum</i>	28
Figura 8 - Posição taxonômica do agente etiológico da Leishmaniose visceral	29
Figura 9 - Hospedeiros reservatórios da Leishmaniose	30
Figura 10 - Ciclo de Vida da <i>Leishmania spp.</i>	31
Figura 11 – Imagens representado a hepatoesplenomegalia causada pela leishmaniose visceral	33
Figura 12 - Estrutura química dos antimoniais pentavalentes utilizados no tratamento da leishmaniose	36
Figura 13 - Estruturas químicas da Anfotericina B e Pentamidina	37
Figura 14 - Estrutura química da miltefosine, utilizada no tratamento da leishmaniose	38

Figura 15 - Estágios hierárquicos do processo de descoberta de novos fármacos	40
Figura 16 - Exemplo de bioisosterismo. Tiazolidina (esquerda), Imidazolidina (centro) e Oxazolidina (direita)	41
Figura 17 - Compostos relatados na literatura com potencial leishmanicida	44
Figura 18 - Reatividade do núcleo da tiazolidina-2,4-diona	45
Figura 19 - Efeito de inibição do GQS-90 no crescimento de formas promastigotas de <i>L. infantum</i> após 72 horas de incubação	68
Figura 20 - Compostos descritos na literatura com ação leishmanicida, que apresentam o grupamento nitro	68
Figura 21 - Mecanismo de ação do R-NO ₂ (DIAS, 2009).	70

LISTA DE TABELAS

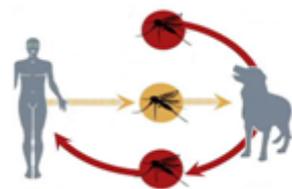
	Pág.
Tabela 1 - Comparativo dos sintomas apresentados durante a evolução da Leishmaniose visceral	34
Tabela 2 - Exemplos de Tiazolidinas e suas aplicações biológicas	50
Tabela 3 - Média do percentual de inibição (%) dos derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxo-tiazolidin-2-onas frente <i>L. Infantum</i> nos tempos de 24, 48 e 72 horas	66
Tabela 4 - Atividade leishmanicida <i>in vitro</i> dos derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxo-tiazolidin-2-onas sobre promastigotas de <i>L. infantum</i>	67
Tabela 5 - Efeito citotóxico dos derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxo-tiazolidin-2-onas sobre macrófagos J774	72
Tabela 6 - Índice de seletividade dos derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxo-tiazolidin-2-onas	73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	21
2.1 Geral	21
2.2 Específicos.....	21
3. REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1 Leishmaniose	23
3.2 Leishmaniose Visceral	24
3.2.1 Agente etiológico	28
3.2.2 Vetor e Reservatórios	29
3.2.3 Ciclo Biológico e Infecção	30
3.2.4 Manifestações clínicas.....	32
3.2.5 Principais fatores de risco	35
3.2.6 Quimioterapia	35
3.3 QUÍMICA MEDICINAL	38
3.3.1 Novos compostos leishmanicidas.....	41
3.3.2 Tiazolidinas.....	45
3.3.3 Importância biológica das tiazolidinas.....	49
4. METODOLOGIA.....	54
4.1 ESTUDO QUÍMICO	54
4.1.1 Material.....	54
4.1.1.1 Equipamentos	54
4.1.1.2 Reagentes e Solventes	54
4.1.2 Métodos	55
4.1.2.1 Procedimento experimental para obtenção dos dos novos derivados 5-(indol-3-il-metilano)-4-tioxo-tiazolidin-2-onas(LQIT/GQS).....	55

4.1.2.2 Procedimento de síntese da Tiazolidina-2,4-diona (TZD)	56
4.1.2.3 Procedimento de síntese do 3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LQIT/GQ-52)	56
4.1.2.4 Procedimento de síntese da 3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-52)	56
4.1.2.5 Síntese dos derivados 3-indolil-2-ciano-acrilatos de etila (LQIT/IP)	57
4.1.2.6 Síntese dos derivados 5-(indol-3-il-metilano)-4-tioxo-tiazolidin-2-onas(LQIT/GQS).....	57
4.2 ESTUDO BIOLÓGICO	57
4.2.1 Materiais e Equipamentos.....	57
4.2.2 Métodos	58
4.2.2.1 Cultivo dos parasitas	58
4.2.2.2 Atividade biológica em <i>Leishmania infantum</i>	58
4.2.2.3 Análise da citotoxicidade dos compostos em células de mamífero	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 ESTUDO QUÍMICO	61
5.2 ESTUDO BIOLÓGICO	65
6. CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	78

Introdução



1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença frequente e que ocorre em escala mundial. A doença é relatada tanto nos países do Novo Mundo (Américas), como no chamado Velho Mundo (Europa, África, Oriente Médio, Ásia Central e subcontinente indiano) (BUFFET, 2011). A enfermidade está inserida no grupo das Doenças Tropicais Negligenciadas, e é considerada como uma das prioridades desse grupo para a Organização Mundial da Saúde.

A leishmaniose é uma infecção essencialmente tropical, causada por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (ROSS, 1903 apud BUFFET, 2011). Essas doenças apresentam diversas manifestações clínicas que vão desde lesões cutâneas ulcerosas simples a formas mucocutâneas desfigurantes, além da forma visceral que pode ser fatal quando não tratada (MURRAY *et al.*, 2005; DAVID & CRAFT, 2009).

Os antimoniais pentavalentes (Sbv), disponíveis comercialmente sob duas formulações: o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®), são os principais medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose há mais de sete décadas (FRÉZARD, DEMICHELI & RIBEIRO, 2009). Nesse contexto, as opções terapêuticas disponíveis atualmente para a leishmaniose são muito limitadas, insuficientes e apresentam problemas sérios como a elevada toxicidade e a emergência de cepas resistentes. Este panorama é sensivelmente agravado pela falta de investimentos e inovação das companhias farmacêuticas, para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos eficazes no tratamento da doença (NWAKA *et al.*, 2009).

Tendo em vista a necessidade da busca de novas medidas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose, faz-se uso da Química Medicinal, que associada a estratégias como o bioisosterismo, tem como objetivo o planejamento e descoberta de novos fármacos, que proporcionem mais eficácia, menos toxicidade e mais conforto aos pacientes (BARREIRO & FRAGA, 2002).

De acordo com a literatura, é possível comprovar que as tiazolidinas possuem uma vasta gama de atividades biológicas promissoras já descritas, como

anticonvulsivante (PANDEY, 2011), antitumoral (RÊGO *et al.*, 2014), anti-inflamatório (KON *et al.*, 2002; SANTIN *et al.*, 2013, SILVA *et al.*, 2015, CÉSAR *et al.*, 2015; GARCIA *et al.*, 2015), antidiabética (MOURÃO *et al.*, 2005), antimicrobiana (GOUVEIA *et al.*, 2009), esquistossomicida (SANTIAGO *et al.*, 2014, OLIVEIRA *et al.*, 2015) e tripanosomicidas (MOREIRA *et al.*, 2013).

Diante dessas informações, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar e avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* de novos derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxo-tiazolidin-2-onas, frente a espécie *Leishmania infantum*.

Objetivos



2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver a síntese de novos derivados 5-(indol-3-il-metilano)-4-tioxi-tiazolidin-2-onas substituídas, potenciais agentes leishmanicidas.

2.2 Específicos

- Sintetizar os novos derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxi-tiazolidin-2-onas;
- Elucidar as estruturas químicas através das análises espectroscópicas tradicionais: ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono treze, infravermelho;
- Avaliar a atividade antileishmania dos derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxi-tiazolidin-2-onas sobre formas promastigotas de *Leishmania infantum*;
- Analisar a citotoxicidade dos derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxi-tiazolidin-2-onas, através da técnica do MTT sobre macrófagos e determinar o índice de seletividade.

Revisão da Literatura



3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Leishmaniose

A leishmaniose é considerada primariamente como uma zoonose podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antropozoonose. Compreendem um espectro de doenças distribuídas mundialmente em regiões tropicais e subtropicais, com a capacidade de se adaptar a diferentes ecossistemas e infectar diferentes espécies de mamíferos. Consitui-se como uma doença infecto-parasitária de grande importância e atualmente, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo. A doença é endêmica em 98 países, especialmente nos continentes africano, asiático e na América do Sul. (NUNES *et al.*, 2010; BRASIL, 2014; WHO, 2015)

A Organização Mundial de Saúde (OMS) caracteriza a leishmaniose como uma das principais doenças tropicais negligenciadas e estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de adquirir alguma forma da doença. A leishmaniose é um problema crescente de saúde pública, dado o número de casos originados a partir da mudança no padrão epidemiológico, pelo aparecimento de novos focos e ao processo de domiciliação e urbanização do ciclo de transmissão (ROMERO, 2014).

As leishmanioses são causadas por protozoários parasitas de mais de 20 espécies de *Leishmania* que são transmitidos aos seres humanos pela picada de flebotomíneos infectados. De acordo com a espécie do parasita a doença pode ter formas clínicas variadas, com respostas terapêuticas distintas aos tratamentos. Existem basicamente, duas formas principais da doença: tegumentar (que se diferencia em cutânea e mucocutânea) e visceral (Figura 1). A leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença e causa úlceras no corpo, levando à desfiguração, cicatrizes e em alguns casos deficiências. A leishmaniose mucocutânea ocasiona a mutilação parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. A leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença e afeta órgãos vitais do corpo (WHO, 2015).

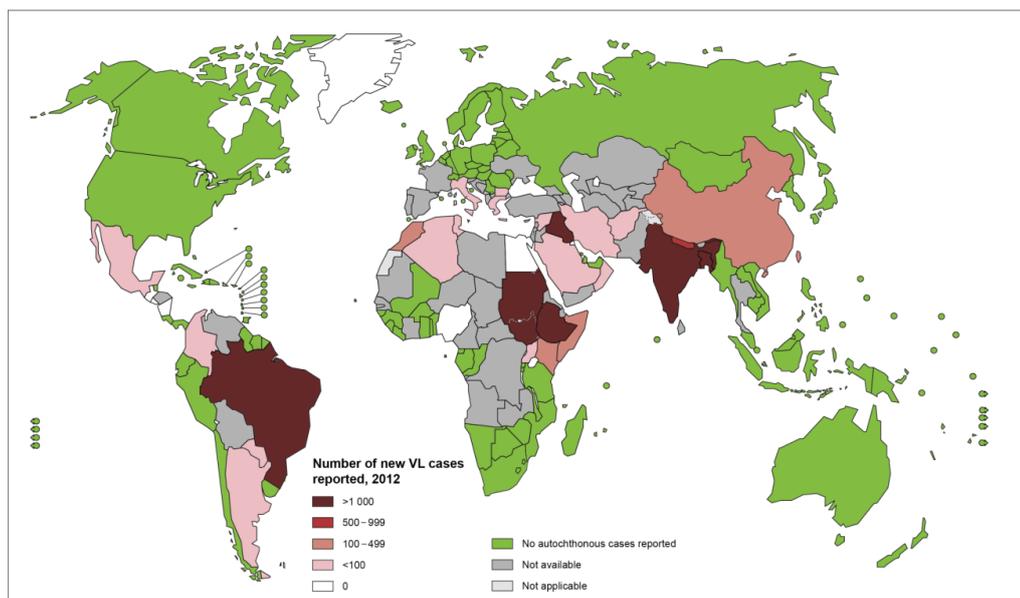
Figura 1: Representação das principais formas clínicas da Leishmaniose (WHO, 2015)



3.2 Leishmaniose Visceral

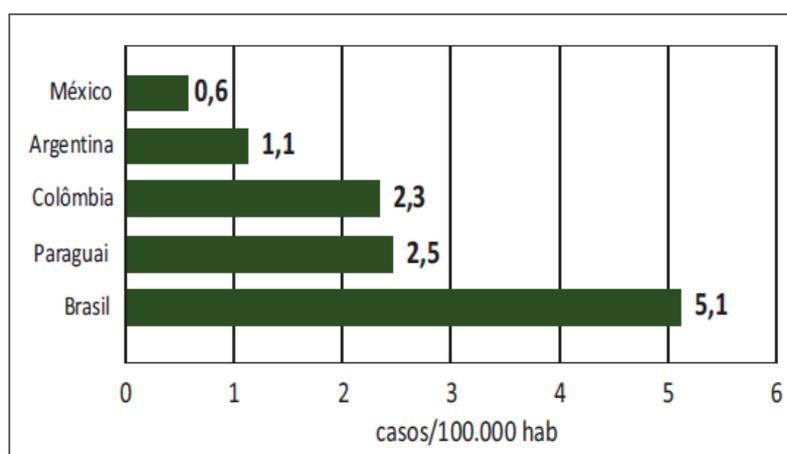
A leishmaniose visceral (LV) é endêmica em 72 países de áreas tropicais e subtropicais de quatro continentes (Figura 2). Os principais focos de infecção humana estão localizados no sudoeste asiático, no oeste da África e no continente americano. A estimativa da população mundial de risco para aquisição da LV atinge 182 milhões de pessoas (OMS, 2006 apud BARBOSA & COSTA, 2013; GOES, MELO & JERALDO, 2012). Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2015).

Figura 2: Status de endemidade da leishmaniose visceral, 2012 (WHO,2015)



No continente americano, o Brasil concentra a maior quantidade de casos reportados de leishmaniose visceral. Em 2012, Brasil concentrou 96,5% dos casos, seguido do Paraguai 2,4%, Argentina 0,7%, Colômbia 0,3% e México 0,1%. Ainda nesse ano, a taxa de incidência da doença na região das Américas foi de 4,8 casos por 100.000 habitantes, variando de 0,6 casos/100.000 hab. no México a 5,1 casos/100.000 hab. no Brasil (Figura 3) (WHO, 2014).

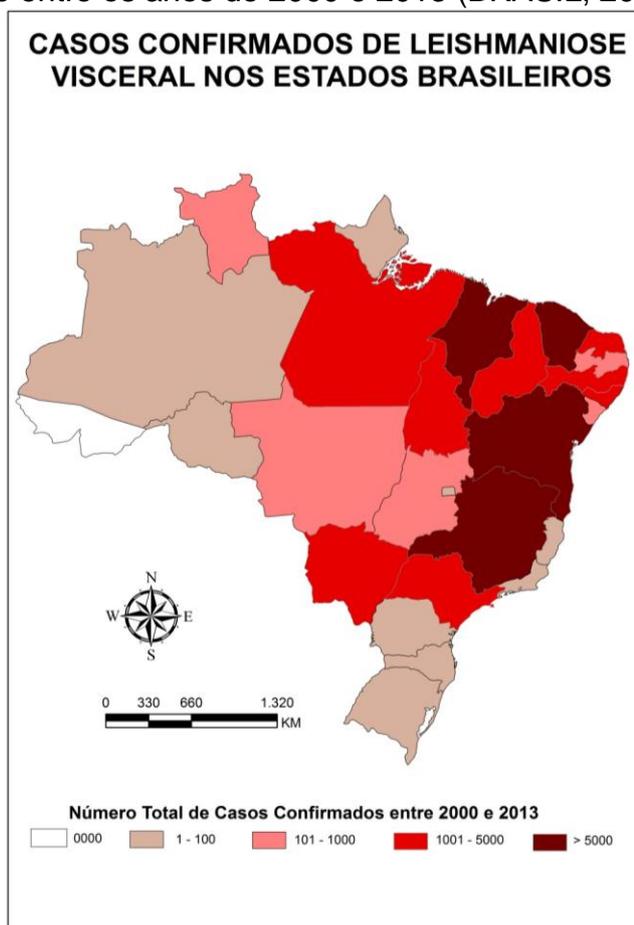
Figura 3: Taxa de incidência de Leishmaniose por país, Américas, 2012 (WHO,2014)



No Brasil, algumas décadas atrás, a LV se comportava como antropozoonose rural, que acometia indivíduos com condições socioeconômicas reduzidas, residentes em áreas rurais ou semiáridas do nordeste, que contava com cerca de 90% dos casos notificados no país. Após a década de 80, observou-se a expansão da LV também para as regiões periurbanas de grandes cidades, alcançando inclusive regiões brasileiras antes indenes. Acredita-se que a urbanização da LV seja resultado das alterações realizadas pelo homem no ambiente e dos fluxos migratórios das populações rurais para as periferias urbanas (GONTIJO & MELO, 2004; MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; ALVAR *et al.*, 2012).

Dados do Ministério da Saúde informam que os estados brasileiros mais afetados pela leishmaniose visceral entre os anos 2000 e 2013 foram Maranhão, Ceará, Bahia e Minas Gerais (Figura 5).

Figura 4: Distribuição dos casos de Leishmaniose visceral nos estados brasileiro entre os anos de 2000 e 2013 (BRASIL, 2014)



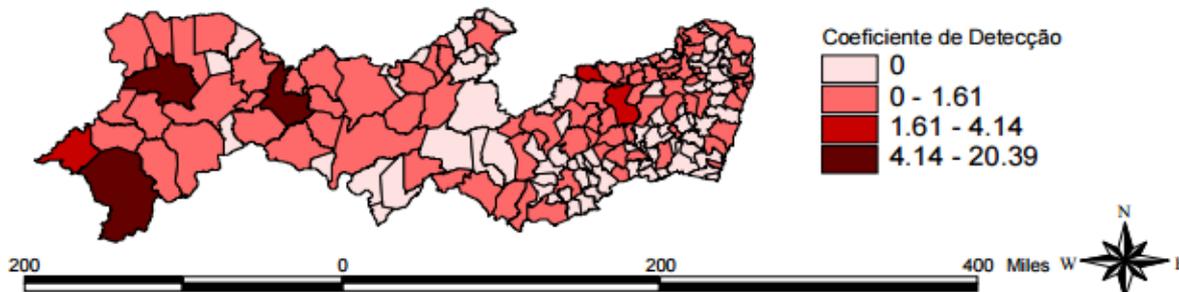
A LV brasileira apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo todas as regiões. Na maioria das áreas endêmicas no Brasil, a LV é mais frequente entre as crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de 5 anos. O sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (60%) (BRASIL, 2014). A razão da maior suscetibilidade da criança está relacionada à maior vulnerabilidade da resposta imune, provocada pela imaturidade da imunidade humoral e celular, e pela imunodepressão induzida pela desnutrição que é comum em áreas endêmicas do Nordeste; além da exposição ao vetor em áreas peridomiciliares (SANTANA *et al.*, 2009). Um fator preocupante é a ocorrência de LV/HIV, que já atinge 8,5% dos pacientes no Brasil (MARCONDES & ROSSI, 2013).

Em Pernambuco, a LV encontra-se distribuída em boa parte do seu território, tendo sido confirmados 1591 casos entre os anos de 2000 e 2013. Um estudo

realizado com dados dos anos de 1990 a 2001 demonstrou uma clara concentração de casos de LV em municípios do Agreste e do Sertão. Entretanto, alguns municípios de outras regiões, tal como Itamaracá na Região Metropolitana do Recife, destacou-se entre aqueles que mais notificaram casos (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006).

Miranda (2008) analisou os casos de LV em Pernambuco no período de 2000 a 2006 (Figura 5). Nesse estudo constatou-se que os maiores coeficientes de detecção estavam distribuídos em todas as regiões do Estado, merecendo destaque o município de Riacho das Almas, no Agreste, com coeficiente de 20,39 casos por 100.000 habitantes. Além disso, observou-se uma concentração dos maiores coeficientes no Agreste e na interseção entre as mesorregiões do São Francisco e Sertão. Observou os maiores coeficientes: a Ilha de Itamaracá (5,77/100.000 hab) na região Metropolitana; Tamandaré (8,64/100.000 hab) na Zona da Mata; Riacho das Almas (20,39/100.000 hab) no Agreste; Betânia (17,65/100.000 hab) no Sertão e Afrânio (15,57/100.000 hab) na mesorregião do São Francisco.

Figura 5: Municípios segundo coeficiente de detecção da LV em Pernambuco, 2000 a 2006 (MIRANDA, 2008)

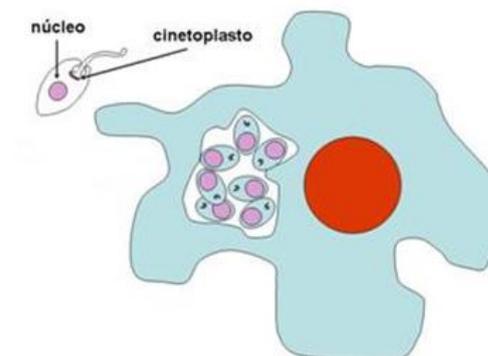


A distribuição geográfica da LV em Pernambuco exemplifica a questão da urbanização da LV e reforça a superação do paradigma da doença tipicamente rural (MIRANDA, 2008). Apesar da predominância em áreas do Agreste e Sertão do estado, encontram-se claramente indícios do estabelecimento da doença em áreas urbanas e periurbanas, como nos municípios de Itamaracá (SANTOS, 2006), Petrolina (MAIA *et al.*, 2014) e Goiana (ANDRADE, 2014).

3.2.1 Agente etiológico

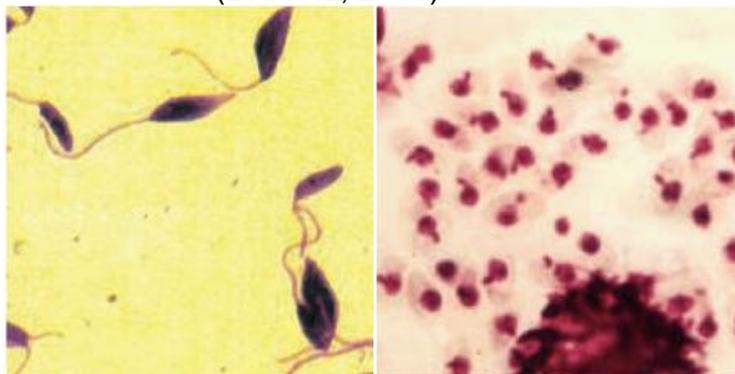
Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* e são parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear. Durante o ciclo biológico, os parasitas sofrem importantes mudanças morfológicas e bioquímicas, mas conservam estrutura típica da espécie: estrutura flagelar proeminente ou reduzida e o cinetoplasto (Figura 6). O cinetoplasto é uma região especializada da mitocôndria constituída de um aglomerado de moléculas de DNA dotadas de um complexo mecanismo de replicação (LIU *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2006).

Figura 6: Representação esquemática das formas evolutivas da *Leishmania infantum* (promastigota flagelada e amastigota, no interior de um macrófago). (ANDRADE *et al.*, 2006).



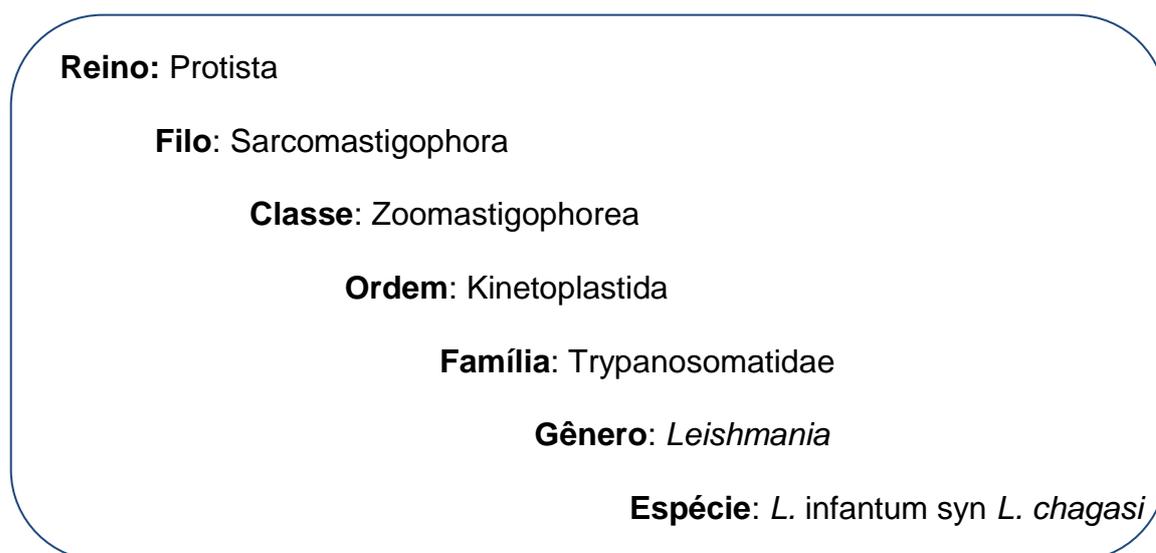
Os parasitas apresentam duas formas evolutivas ao longo do ciclo de vida: a forma promastigota que apresenta um corpo alongado e flagelo livre e a forma amastigota, que possui corpo em formato ovóide e flagelo que nunca excede os limites da bolsa flagelar (Figura 7) (ALIANÇA, 2012; BRASIL, 2014).

Figura 7: Forma promastigota (à esquerda) e amastigota (à direita) de *L. infantum* (BRASIL, 2014)



Nas Américas, a espécie comumente isolada em pacientes com LV é a *Leishmania infantum* (syn *Leishmania chagasi*). Com base nos perfis isoenzimáticos, alguns autores consideram que *Leishmania chagasi* seria igual a *Leishmania infantum* e, por isso, o nome *chagasi* seria sinônimo de *infantum* (Figura 8) (BRASIL, 2014).

Figura 8: Posição taxonômica do agente etiológico da Leishmaniose visceral (BRASIL, 2014)



3.2.2 Vetor e Reservatórios

A leishmaniose apresenta como vetor, insetos hematófagos pertencentes à subfamília Phlebotominae (*Phlebotomus* spp. No Velho Mundo e *Lutzomyia* spp. no Novo Mundo). Esses flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, são insetos pequenos, de um a três milímetros e são duas a três vezes menores do que os mosquitos tipo *Culex*, *Aedes* ou *Anopheles*. Dessa forma, esses mosquitos conseguem passar pelos habituais mosquiteiros impregnados com inseticidas e costumam picar o hospedeiro a partir do pôr do sol. São geralmente encontrados em região peridomiciliar, em áreas com abrigo de animais, lixo e matéria orgânica em decomposição. No mundo, já foram descritas aproximadamente 500 espécies desses insetos, mas apenas em torno de 30 podem transmitir as leishmanias. No Brasil, as duas espécies mais associadas à transmissão da LV são *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (Figura 9) (HERWALDT, 1999; FELICIANGELI, 2004; BAILEY & LOCKWOOD, 2007; BRASIL, 2014).

Algumas espécies de mamíferos sinantrópicos, silvestres e domésticos podem ser acometidas pela leishmaniose e atuarem como hospedeiros reservatórios. No Brasil, em ambientes silvestres, os principais reservatórios são as raposas e os marsupiais. Já em áreas urbanas o cachorro é o principal reservatório para LV, representando uma fonte de infecção para o vetor, precedendo a maioria dos casos no homem e promovendo a dispersão da doença para áreas não-endêmicas (Figura 9). Em muitos lugares a eutanásia de cães infectados tem sido adotada como medida de controle (REY, 2001; FERNANDES *et al.*, 2013; BRASIL, 2014).

Figura 9: Hospedeiros reservatórios da Leishmaniose



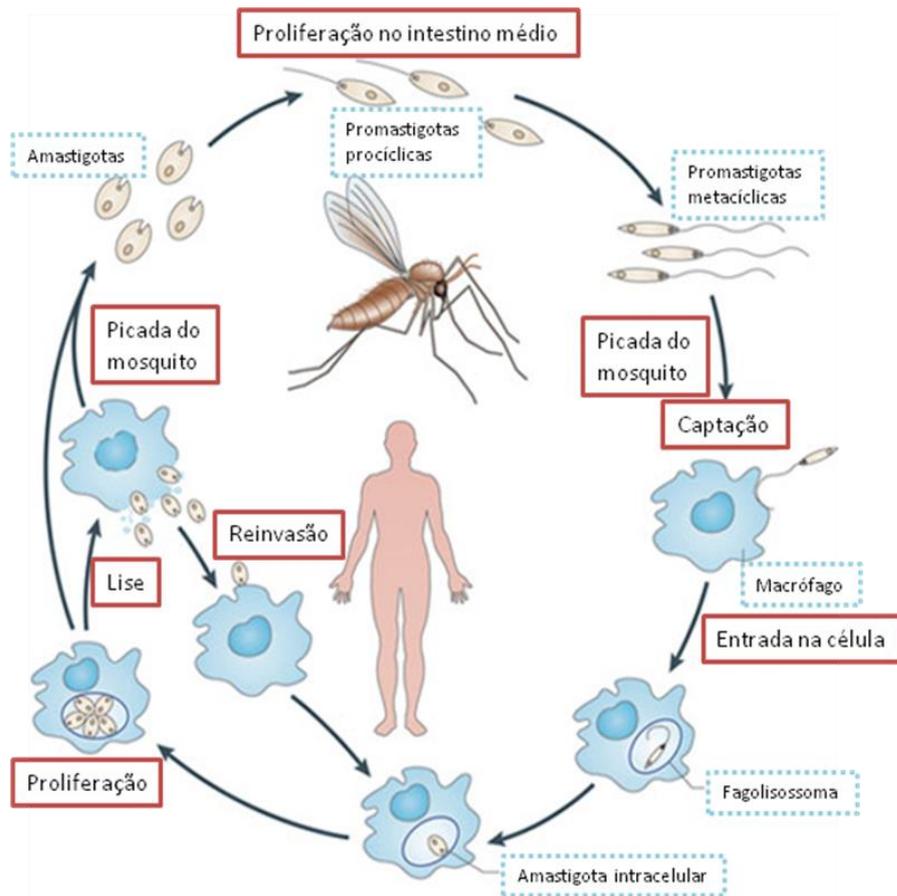
3.2.3 Ciclo Biológico e Infecção

A leishmaniose visceral é uma doença causada por parasitos digenéticos, os quais tem um ciclo de vida que ocorre na presença de dois hospedeiros, um vertebrado (por exemplo, o homem ou o cão) e um invertebrado (inseto flebotomíneo) (Figura 10) (GENARO & REIS, 2005).

O ciclo se inicia quando a fêmea do flebotomíneo pica um mamífero infectado. Juntamente com o sangue, o inseto ingere os macrófagos parasitados por formas amastigotas do parasito. No intestino médio do inseto, as leishmanias se transformam em flagelados pequenos, ovóides e pouco móveis, com alta taxa de divisão celular (procíclicas). Após alguns dias, surgem as formas promastigotas delgadas e longas, as quais se fixam nas vilosidades intestinais do inseto e estabelecem migração para as porções anteriores do todo digestório, enquanto

transformam em promastigotas metacíclicas. A infecção nos mamíferos ocorre quando o inseto vetor infectado pica o hospedeiro vertebrado durante seu repasto sanguíneo, e formas promastigotas são introduzidas no local da picada. Dentre quatro a oito horas, as promastigotas são fagocitadas por macrófagos iniciando a fase de desenvolvimento intracelular do parasito. Dentro do macrófago, as formas promastigotas rapidamente se transformam em amastigotas, adaptando-se ao novo meio fisiológico e resistindo à ação dos lisossomos. As amastigotas se multiplicam dentro das células, esgotando a resistência da membrana à proliferação do protozoário, fazendo com que o macrófago se rompa liberando as amastigotas no tecido. Essas formas amastigotas livres serão novamente fagocitadas e infectarão outras células, iniciando uma reação inflamatória. Eventualmente, as amastigotas livres ou células infectadas podem ser ingeridas por um flebotomíneo não infectado durante o repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo biológico (CAMARGO & BARCINSKI, 2003; KAYE & SCOTT, 2011; COSTA, 2011; CAVALCANTE, 2014).

Figura 10: Ciclo de Vida da *Leishmania* spp.



Alguns autores admitem a hipótese da transmissão entre a população canina através da ingestão de carrapatos infectados e mesmo através de mordeduras, cópula, ingestão de vísceras contaminadas, porém não existem evidências sobre a importância epidemiológica destes mecanismos de transmissão para humanos ou na manutenção da enzootia (BRASIL, 2014).

Apesar da dispersão dos insetos flebotômíneos para quase todas as regiões do Brasil, a ausência do vetor em áreas onde existem casos de LV podem estar relacionados a casos não autóctones da doença ou podem sugerir a existência de outros modos de transmissão da enfermidade (DANTAS-TORRES, 2009 apud MARCONDES & ROSSI, 2013). Carrapatos e pulgas têm sido determinados como possíveis vetores de *L. infantum*, mas essa forma de infecção ainda não está bem elucidada (FERREIRA *et al.*, 2009; PAZ *et al.*, 2010; OTRANTO & DANTAS-TORRES, 2010).

A transmissão transplacentária da *Leishmania* já foi documentada em alguns países. Nesses casos, o tratamento em pacientes que se encontram no período gestacional teria dupla indicação: tratar a paciente e prevenir a transmissão da doença para o feto. Já foram descritas também ocorrência de transmissão venérea e por transfusão sanguínea. Até o momento, estes mecanismos de infecção não foram considerados de importância epidemiológica (FREITAS *et al.*, 2006; NAUCKE; LORENTZ, 2012; BRASIL, 2014).

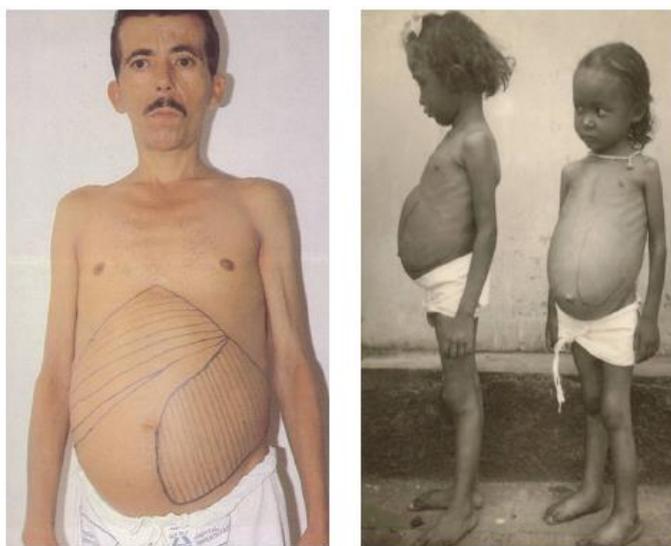
O período de incubação da infecção se inicia com a entrada de formas promastigotas no indivíduo até o aparecimento dos primeiros sinais clínicos. Varia de 10 dias a 24 meses, sendo em média de 2 a 4 meses. O período de transmissibilidade ocorre enquanto persistir o parasitismo no sangue circulante (SANTOS, YOSHIOKA & MIYAGUI, 2008).

3.2.4 Manifestações clínicas

Após a infecção, os parasitos se disseminam pelo organismo, e infectam principalmente o baço, a medula óssea e o fígado, podendo também ocorrer infecção nos rins, pulmão e coração (BACELLAR & CARVALHO, 2005; SANTOS, YOSHIOKA & MIYAGUI, 2008).

A leishmaniose visceral pode se apresentar de forma assintomática, discreta ou acentuada. Os sintomas irão variar de acordo com o órgão afetado e a carga parasitária no local (LOPEZ-PENA *et al.* 2009). De modo geral, as principais manifestações da doença apresentam um quadro caracterizado por febre, anemia, hepatoesplenomegalia (Figura 11), manifestações hemorrágicas, linfadenomegalia, palidez cutâneo-mucosa, emagrecimento, taquicardia, tosse seca e diarreia (estes dois últimos sintomas menos frequentes). A desnutrição ocorre com a progressão da doença, podendo manifestar-se por edema periférico, queda de cabelos e alterações de pele e das unhas. A perda de peso, o edema e o estado de debilidade progressiva contribuem para a caquexia e o óbito. (PASTORINO *et al.* 2002; PEDROSA & ROCHA, 2004; NUNES, 2008 apud COSTA, 2011).

Figura 11: Imagens representando a hepatoesplenomegalia causada pela leishmaniose visceral (REY, 2001)



Considerando a evolução clínica da leishmaniose visceral, optou-se por dividi-la em três períodos: período inicial, período de estado e período final. A tabela 1 apresenta um comparativo das manifestações clínicas de acordo com a evolução da leishmaniose visceral (BRASIL, 2014).

Tabela 1: Comparativo dos sintomas apresentados durante a evolução da Leishmaniose visceral (BRASIL, 2014).

Manifestações clínicas	Evolução Clínica		
	Período Inicial	Período de Estado	Período Final
Febre	Presente	Presente	Presente
Emagrecimento	Ausente	Moderado	Acentuado
Palidez	Discreta	Moderada	Acentuada
Hepatomegalia	Discreta	Moderada	Acentuada
Esplenomegalia	Discreta	Moderada	Acentuada
Hemorragias	Ausente	Incomum	Frequente

Admite-se ainda a forma oligossintomática da doença. Esta forma é a mais frequente nas áreas endêmicas. O paciente geralmente apresenta sintomatologia inespecífica como febre, tosse seca, diarreia, sudorese, baço geralmente palpável e fígado um pouco aumentado. Esse quadro clínico tem duração de 15 dias a 6 meses e frequentemente evolui para cura espontânea (SÃO PAULO, 2003; BRASIL 2014).

Quando não tratada, a leishmaniose visceral quase sempre evolui para óbito. Segundo Lisboa *et al.* (2014) pacientes que apresentaram sintomas de edema, tem cerca de 3 vezes mais chance de evoluir a óbito comparado a quem não apresenta estes sintomas; indivíduos que apresentaram quadro de hemorragia tem aproximadamente 8 vezes mais chance de falecer comparado aos assintomáticos, enquanto que os pacientes que demonstram aumento do fígado e tem co-infecção com HIV possuem cerca de 3 vezes mais chance de evoluir a óbito se comparado aos que não apresentaram o HIV. Frequentemente os óbitos são causados por complicações infecciosas ou hemorragias.

Embora tenham sido investidos recursos e estabelecidas rotinas para o tratamento específico da doença, o país vem registrando um aumento na letalidade em diversas regiões, o que preocupa as autoridades sanitárias. No país, os casos de óbito por LV aumentou de 3,4%, em 1994, para 5,7%, em 2009. Um dos principais fatores que contribuem para o aumento dessa letalidade é o diagnóstico tardio (BRASIL, 2010).

3.2.5 Principais fatores de risco

Nas últimas décadas, a leishmaniose visceral foi reconhecida como importante doença oportunista para os pacientes imunocomprometidos, incluindo os usuários de terapêutica imunossupressora, em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV) e os pacientes receptores de transplante de órgãos sólidos e/ou tecidos (LAGES *et al.* 2004; MACHADO *et al.*, 2009).

Até o momento 34 países já reportaram casos de co-infecção (WHO, 2015). No Brasil a coinfeção LV/HIV tem sido descrita em pequenas séries de casos, mas as recentes alterações nos perfis epidemiológicos da AIDS e da LV no Brasil, como a interiorização da infecção pelo HIV simultânea à urbanização da LV, apontam para uma maior exposição da população às duas infecções (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; BRASIL 2009; BRASIL 2010). Em indivíduos portadores do vírus HIV com severa imunossupressão, o quadro de leishmaniose visceral costuma ser bastante grave com comprometimento de áreas não usuais como o trato gastrointestinal (BERN, 2008). Sousa-Gomes *et al.* (2011) alertam a respeito da necessidade da integração das vigilâncias de LV e AIDS e o aprimoramento da vigilância de coinfeções. Os autores também enfatizam a importância da oferta de testes sorológicos para HIV ao grupo de pacientes com leishmanioses.

Alves (2012) avaliou os fatores de risco demográficos, socioeconômicos e ambientais para a incidência de infecção por *Leishmania infantum* na cidade de Teresina, Piauí. Constatou-se que a incidência da doença está estreitamente relacionada às intervenções e ações conscientizadoras do governo, estrutura peridomiciliar e o nível de escolaridade dos moradores da região.

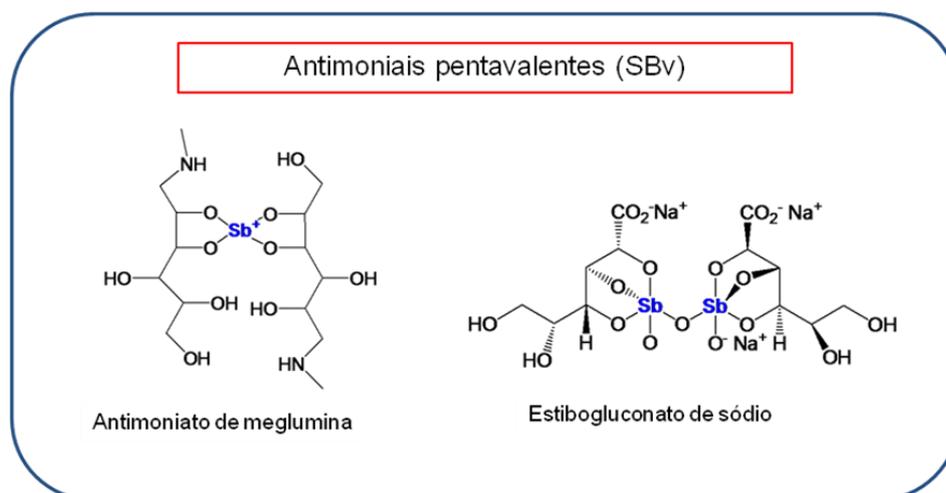
3.2.6 Quimioterapia

Pesquisadores indicam que o tratamento ideal para as leishmanioses seria um medicamento por via oral, 100% eficaz, em dose única, não sujeito ao desenvolvimento de resistência, de baixa toxicidade, baixo custo e que pudesse ser utilizado em populações vulneráveis. Nenhum dos medicamentos até agora utilizados para todas as formas da doença cumprem todos esses critérios. Pelo desinteresse das companhias farmacêuticas, são poucos os fármacos desenvolvidos para o tratamento da leishmaniose. O arsenal terapêutico realmente disponível para

o controle da doença é muito limitado com medicamentos pouco eficazes e de alta toxicidade (MICHELETTI & BEATRIZ, 2012, RODRIGUES, 2012).

Os antimoniais pentavalentes (Sbv) (Figura 12), disponíveis comercialmente sob duas formulações: o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®) são os principais medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose. Esses compostos são utilizados como quimioterápicos há mais de 70 anos e são indicados para o tratamento de todos os tipos de manifestações clínicas da leishmaniose. Embora sejam fármacos de primeira escolha, os antimoniais apresentam eficácia limitada, dolorosa via de administração parenteral, toxicidade e efeitos adversos e o surgimento de cepas resistentes (AMATO *et al*, 2008; FRÉZARD, DEMICHELI & RIBEIRO, 2009). Os antimoniais pentavalentes atuam no tratamento da leishmaniose interferindo na bioenergética das formas amastigotas, inibindo tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, causando a redução na produção de ATP e GTP (BRASIL, 2007).

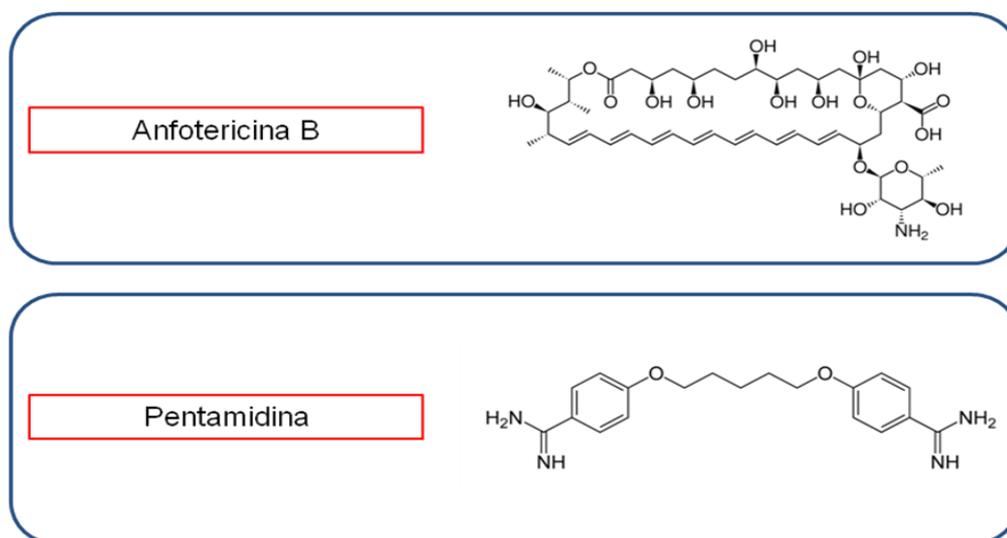
Figura 12: Estrutura química dos antimoniais pentavalentes utilizados no tratamento da leishmaniose (MICHELETTI & BEATRIZ, 2012)



No Brasil, o medicamento antimonial de escolha é o antimoniato de meglumina. O composto é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico e da *N*-metilglucamina, sendo a última obtida previamente a partir da adição de grupamentos amina redutora da glicose em presença de metilamina (PASTORINO *et al*, 2002; RATH *et al*, 2003).

O principal efeito colateral do antimoníato de meglumina é sua ação sobre o aparelho cardiovascular. Outros efeitos adversos são toxicidades hepática, pancreática, renal e do sistema músculo-esquelético. Os pacientes também sofrem frequentemente de efeitos adversos relacionados ao aparelho gastrointestinal, com sintomas que incluem náuseas, anorexia e dor abdominal. Esses efeitos são dose e tempo dependentes. Os antimoniais são contraindicados durante os dois primeiros trimestres de gravidez e em pacientes que fazem uso de β -bloqueadores (principalmente sotalol e propranolol) ou antiarrítmicos, como a amiodarona e quinidina (GONTIJO & MELO, 2004; NEVES *et al*, 2011). Falhas terapêuticas e tratamentos descontínuos levam ao aparecimento de formas resistentes do parasita (RATH *et al.*, 2003). Em casos de pacientes que apresentaram resistência ao tratamento com antimoniais pentavalentes ou que são sensíveis ao composto, utilizam-se drogas de segunda escolha como a anfotericina B e a pentamidina (Figura 13).

Figura 13: Estruturas químicas da Anfotericina B e Pentamidina
(MICHELETTI & BEATRIZ, 2012)

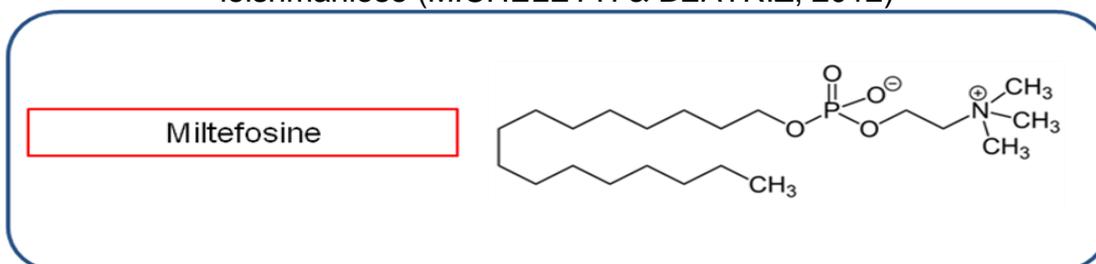


No Brasil, a anfotericina B, um antibiótico antifúngico, é usada extensivamente no caso de falhas no tratamento com compostos antimoniais, sendo utilizada como droga de segunda escolha no tratamento das leishmanioses (BRASIL, 2007). Embora apresente uma boa eficácia para a leishmaniose, o principal fator limitante para o uso desta droga é sua elevada toxicidade, que desencadeia sérios efeitos

colaterais como hipocalcemia grave, miocardite e disfunção renal (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998). Novas associações dessa droga encapsulada em lipossomas reduzem significativamente seu grau de toxicidade, porém, o alto custo de sua formulação é um fator limitante para o seu uso especialmente nos países em desenvolvimento como o Brasil (LIMA *et al.*, 2007). Já a pentamidina é uma diamina que se mostra altamente eficaz especialmente para casos de leishmaniose visceral (RATH *et al.*, 2003). No entanto, também a sua alta toxicidade é fator limitante para seu uso. A pentamidina apresenta efeitos colaterais severos, como toxicidade renal e hepática, hipoglicemia, problemas cardíacos e, até mesmo morte repentina foram descritas com seu uso (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998; MICHELETTI & BEATRIZ, 2012).

O miltefosine (Figura 14) é uma alquil-fosfocolina, utilizada inicialmente no tratamento do câncer de mama. Entretanto, esse composto foi considerado eficaz para o tratamento da leishmania visceral na Índia (BUFFET, 2011). Esta droga, que apresenta a vantagem de ser de uso oral, é altamente efetiva em crianças, mas pode apresentar complicações gastrointestinais e seu uso em mulheres grávidas e nutrízes é limitado devido ao seu potencial teratogênico (PRASAD *et al.*, 2004).

Figura 14: Estrutura química da miltefosine, utilizada no tratamento da leishmaniose (MICHELETTI & BEATRIZ, 2012)



3.3 QUÍMICA MEDICINAL

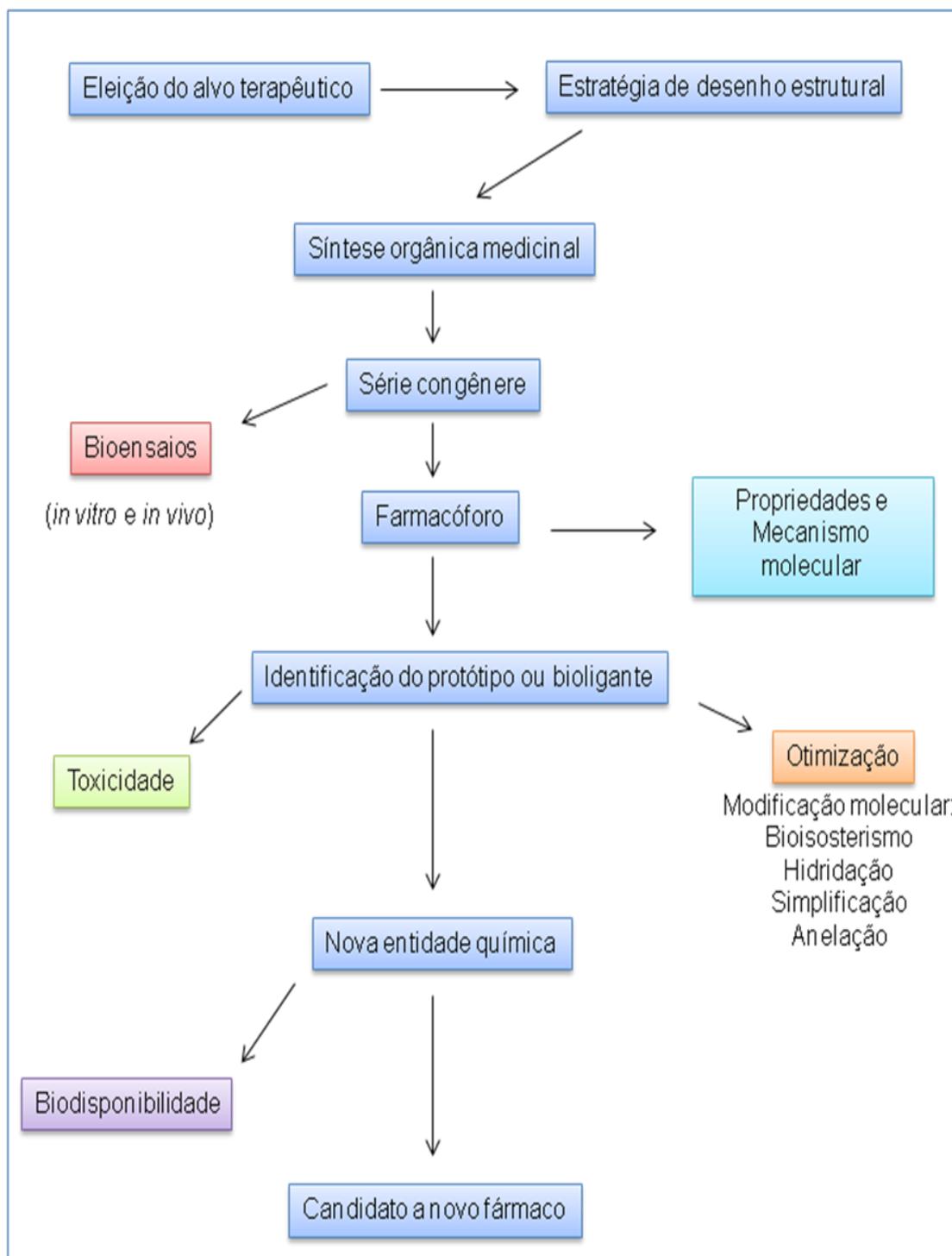
A introdução de novos compostos no mercado farmacêutico é necessária para o aperfeiçoamento do tratamento de doenças já conhecidas ou recém-identificadas. Esse processo atua no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de enfermidades de forma mais segura e eficaz. No final do século XIX, a busca por esses medicamentos resultou na inclusão de substâncias sintéticas na terapêutica e seu uso foi amplamente disseminado no século XX. Nesse contexto, diversas substâncias podem ser obtidas através da síntese de novos compostos ou

por modificações estruturais em moléculas já conhecidas, baseando-se na relação entre a estrutura química e a ação biológica (MIOLO, 2013).

Segundo Montanari (1995), a química medicinal compreende a síntese ou isolamento de compostos com atividade biológica, a elucidação ou confirmação da estrutura, a caracterização das propriedades físico-químicas, a determinação da atividade biológica, a exploração desta atividade ao nível molecular e o estudo das relações entre estrutura química e a atividade biológica, SAR/QSAR.

Com base nesta definição pode-se concluir que a química medicinal é uma ciência que se dedica a estudar as razões moleculares da ação dos fármacos, a relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica, incluindo o planejamento e o desenho estrutural de novas substâncias. Esta tarefa envolve uma multiplicidade de fatores responsáveis pela resposta terapêutica de um fármaco que precisa apresentar elevada eficácia e possuir efeitos tóxicos reduzidos (BARREIRO & FRAGA, 2002). A Figura 15 ilustra os estágios hierárquicos do processo de planejamento e concepção de novos compostos candidatos a novos fármacos.

Figura 15: Estágios hierárquicos do processo de descoberta de novos fármacos (BARREIRO & FRAGA, 2002)

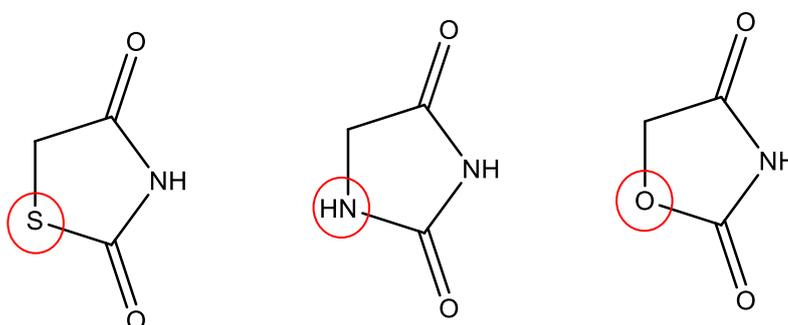


A química medicinal permite a utilização de estratégias que conduzem ao desenho molecular de candidatos a novos fármacos. Estas estratégias são fundamentais na etapa de modificação molecular necessária à sua otimização.

Dentre essas estratégias destacam-se o bioisosterismo e a hibridação molecular (BARREIRO, 2009).

O termo bioisosterismo foi introduzido por Friedman em 1951 para designar aquelas moléculas que além das suas semelhanças físicas e químicas, compartilham algumas propriedades biológicas (PÉREZ, 2004). Bioisostéros são compostos resultantes da substituição de átomos ou grupo de átomos por outros semelhantes quimicamente. Essa substituição bioisostérica produz um novo composto, estruturalmente similar ao original, mas que irá produzir efeitos biológicos diferentes, sendo possível prever esses efeitos a partir de propriedades físico-químicas adquiridas com a substituição (BARREIRO & FRAGA, 2002; KIER & HALL, 2004). Um exemplo do bioisosterismo de anel pode ser observado nos heterociclos tiazolidinadiona, imidazolidinadiona e oxazolidinadiona no qual os respectivos átomos de enxofre (S), nitrogênio (N) e oxigênio (O) possuem distribuição eletrônica semelhante (Figura 16) (SINGH, 1981). Outra estratégia na química medicinal é a hibridação molecular que tem por finalidade a concepção de novos compostos a partir da união de dois grupos farmacofóricos de dois derivados bioativos o qual originará um novo híbrido com as propriedades dos compostos que o originaram (VIEGAS-JUNIOR *et al.*, 2007).

Figura 16: Exemplo de bioisosterismo. Tiazolidina (esquerda), Imidazolidina (centro) e Oxazolidina (direita) (SINGH, 1981).



3.3.1 Novos compostos leishmanicidas

De acordo com Micheletti & Beatriz (2012) a grande maioria de compostos orgânicos sintetizados para avaliação da ação antiparasitária, frente espécies do gênero *Leishmania*, são heterociclos.

Os derivados pirazolo[4,3-*d*]pirimidinas 3,7-dissubstituídos (**1**) e derivados purínicos 6,9-dissubstituídos (**2**) (Figura 17) com grupos benzílicos e fenílicos substituídos, adamantila, entre outros, apresentaram moderada atividade sobre o complexo protéico CRK3/CYC6 (IC₅₀ de até 1,8 µM) e citotoxicidade sobre amastigotas de *L. donovani*, com valores de EC₅₀ que variaram de 1,22 a 94,0 µM. A CRK3 é uma proteína quinase essencial para parasitas do gênero *Leishmania*, que regula a transição das fases G2 para mitose do ciclo celular, e, uma vez que as proteínas quinases dos parasitas geralmente apresentam pouca homologia com as enzimas do hospedeiro, podem ser consideradas bons alvos para o desenvolvimento de novos compostos candidatos a fármacos (JORDA *et al.*, 2011).

Uma série de derivados 2,3-dihidroimidazo[1,2-*a*]benzimidazol foram avaliados quanto às suas atividades leishmanicidas contra formas amastigotas de *L. donovani*. O composto 9-(4-*tert*-butil)benzil)-3,9-dihidro-2*H*-benzo[*d*]imidazo[1,2-*a*]imidazol (**3**) (Figura 17) apresentou atividade anti-leishmaniose promissora contra a forma intracelular (3,05 µM), sem citotoxicidade grave para as linhagens celulares de THP-1 e U2OS (OH *et al.*, 2014).

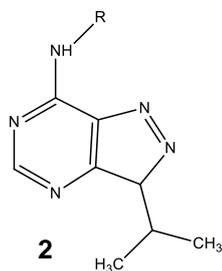
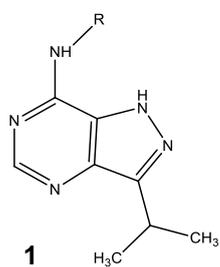
Ramirez-Macias *et al.* (2011) realizaram a síntese de compostos com estruturas baseadas em complexos metálicos de cobre e cobalto envolvendo a classe das pirimidinas como ligantes. Os derivados com ligantes 5-metil-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4*H*)-ona (**4**) (Figura 17) foram avaliados *in vitro* contra *L. infantum* e *L. braziliensis*, e se mostraram tão ativas quanto o fármaco de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose, o antimoniato de meglumina, que foi utilizado como padrão. Nesse experimento a IC₅₀ ficou na faixa dos 25 µM e não foi observado toxicidade sobre macrófagos J774. Os complexos interferiram no metabolismo de energia dos parasitas, causando degradação das membranas e consequente morte celular do parasita.

Loiseau *et al.* (2011) realizaram a síntese de quinolinas e estirilquinolinas. Em teste *in vitro*, um dos derivados desta classe de compostos contendo um grupo 3-nitrofenilmetanona ligado à posição 7 (**5**) (Figura 17), mostrou-se cerca de 10 vezes mais eficaz que a miltefosina, que foi utilizada como padrão. Os autores obtiveram uma IC₅₀ de 1,2 µM contra *L. donovani* e um bom índice de seletividade.

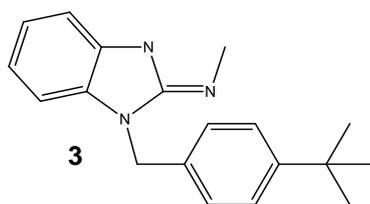
Ghosh *et al.*, (2015) desenvolveram um método simples para a síntese de 29,30-dibromo-28-oxoallobetulin (**6**) (Figura 17). Em testes *in vitro* constatou-se que o composto inibiu o crescimento de promastigotas de *L. donovani* em 63,27%. Nessa mesma concentração o estibuglucotano de sódio apresentou uma inibição de apenas 10,02%. Os autores sugerem que o composto induz a interrupção do ciclo celular, ocasionando a morte da célula.

Novos selenocianatos (**7**) e disselenetos (**8**) (Figura 17) foram sintetizados por Plano *et al.* (2011). Os compostos foram avaliados contra as formas extra e intracelular de *L. infantum*, e se mostraram ativos para as duas formas (IC50 entre 0,96 e 17,8 μM para promastigotas e 0,29 a 9,29 μM para amastigotas) e com bons índices de seletividade, podendo ser considerados como potenciais protótipos de novos fármacos.

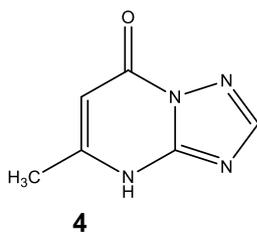
Figura 17: Compostos relacionados na literatura com potencial leishmanicida



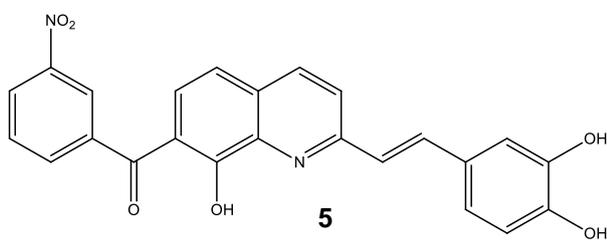
JORDA *et al.*, 2011



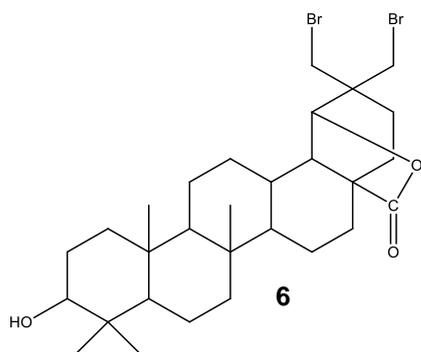
OH *et al.*, 2014



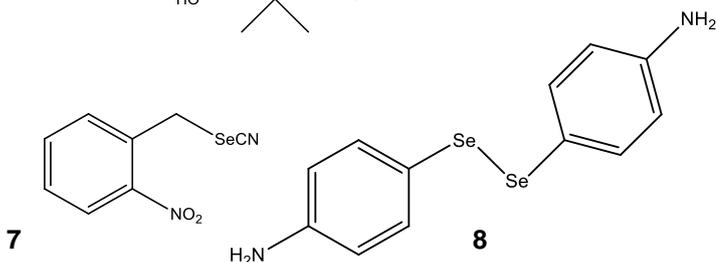
RAMIREZ-GARCIA, *et al.* 2011



LOISEAU *et al.* 2011



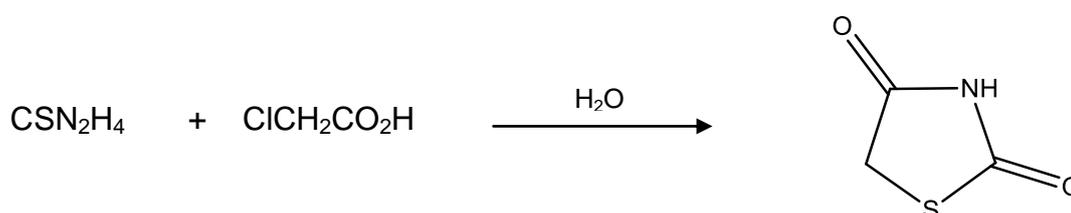
GHOSH *et al.*, 2015



PLANO *et al.* 2011

3.3.2 Tiazolidinas

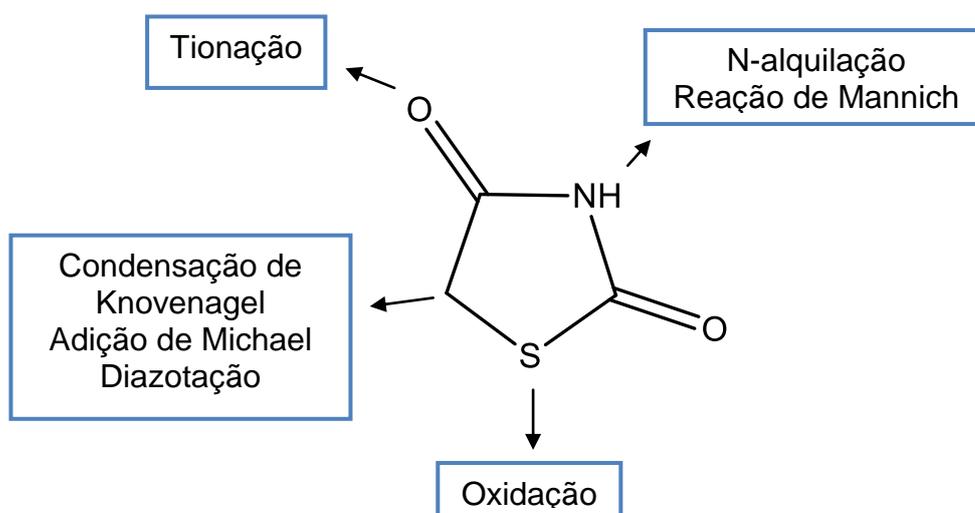
Tiazolidinas (TZDs) são uma classe de compostos orgânicos contendo um anel heterocíclico saturado de 5 membros, com um átomo de enxofre na posição 1 e um grupo amina na posição 3. Entre o importante grupo das tiazolidinas encontram-se as tiazolidinonas com destaque para a tiazolidina-2,4-diona, que teve sua estrutura elucidada por Libermann em 1881. A partir da metodologia de Libermann a tiazolidina-2,4-diona (Esquema 1) pode ser obtida pelo aquecimento da tiouréia e ácido monocloroacético em meio aquoso sob refluxo (LIMA, 1998).



Esquema 1: Síntese da TZD, a partir da tiouréia e do ácido monocloroacético

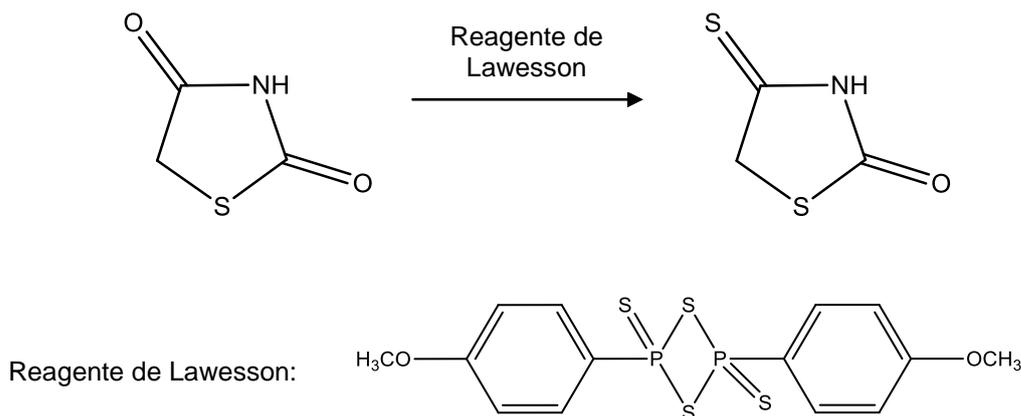
Por ter diversos sítios reativos, a TZD podem sofrer substituições no anel heterocíclico a partir de reações de oxidação, *N*-alquilação, Reação de Mannich, Condensação de Knoevenagel, Adição de Michael e Diazotação (reação com sais de diazônio) (Figura 18) (LIESEN *et al.*, 2008).

Figura 18: Reatividade do núcleo da tiazolidina-2,4-diona (LIESEN *et al.*, 2008).



- Tionação

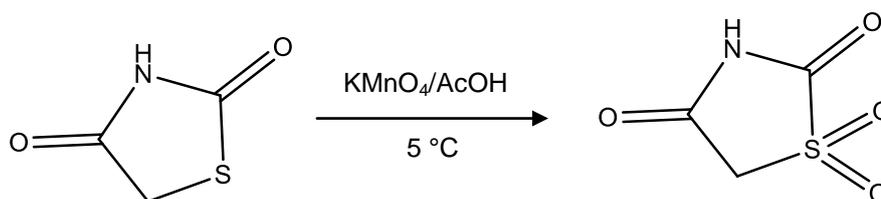
A 4-tioxotiazolidina-2-ona (Esquema 2) é um derivado da TZD com um grupo carbonila na posição 2 e um grupo tiocarbonila na posição 4, obtido a partir da reação de tionação. O tratamento da TZD pelo 2,4-bis-(4-metóxfenil)1,3-ditiadifosfatano-2,4-dissulfeto, conhecido como reagente de Lawesson, em presença do dioxano anidro conduz a formação da 4-tioxotiazolidina-2-ona (ANDRADE, 2002).



Esquema 2: Formação da 4-tioxotiazolidina-2-ona (ANDRADE, 2002).

- Oxidação

Em geral as reações de oxidação no anel tiazolidínico ocorrem na posição 1 do anel e são realizadas, utilizando permanganato de potássio (KMnO₄) em ácido acético aquoso a 5 °C, para a formação de 1,1-dioxo-2,4-tiazolidinadionas (Esquema 3) (LIESEN *et al.*, 2008).

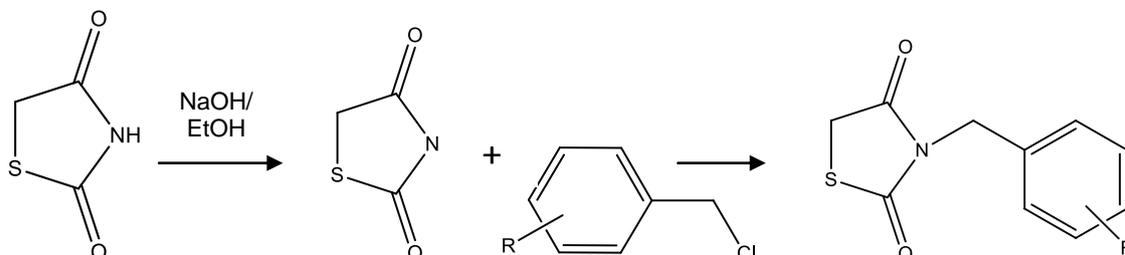


Esquema 3: Reação de oxidação (LIESEN *et al.*, 2008).

- N-alquilação

A reação de N-alquilação (Esquema 4) trata-se de uma reação de substituição nucleofílica de 2ª ordem (S_N2), onde se faz reagir a TZD com haletos de benzila ou haletos de benzoíla substituídos conduzindo a formação de derivados substituídos

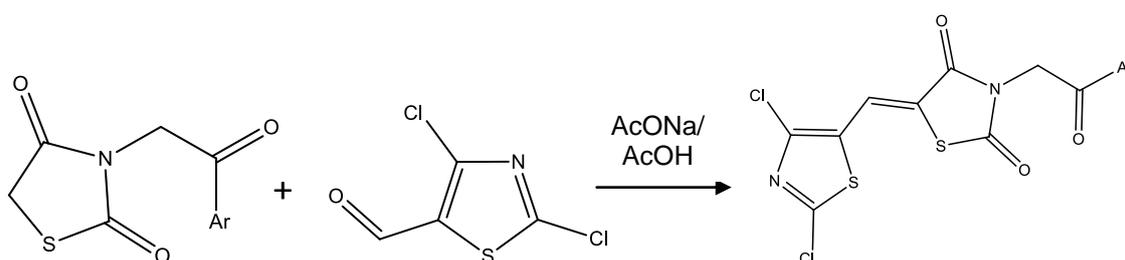
da posição 3 no núcleo. A utilização de uma base dura como o hidróxido de sódio é imprescindível para a formação do ânion amideto, uma vez que 4- tiazolidinonas não substituídas na posição 3 são ácidos fracos (LIMA *et al.*, 1998; BARROS *et al.*, 2010).



Esquema 4: Reação de *N*-alquilação (BARROS *et al.*, 2010)

- Condensação de Knoevenagel

Um dos métodos mais utilizados e explorados para formação de ligações carbono-carbono na química sintética são as reações de condensação de Knoevenagel (Esquema 5). Esse método consiste na reação entre um composto carbonílico (aldeídos ou cetonas) e outro contendo o grupo metileno ativado, resultando na formação do aduto com uma ligação dupla carbono-carbono. O grupo metilênico da posição 5 do núcleo da tiazolidina, devido a sua acidez, possui reatividade característica e condensa com aldeídos ou cetonas em reações de Knoevenagel (LIESEN *et al.*, 2008; CUNHA & SANTANA, 2012).

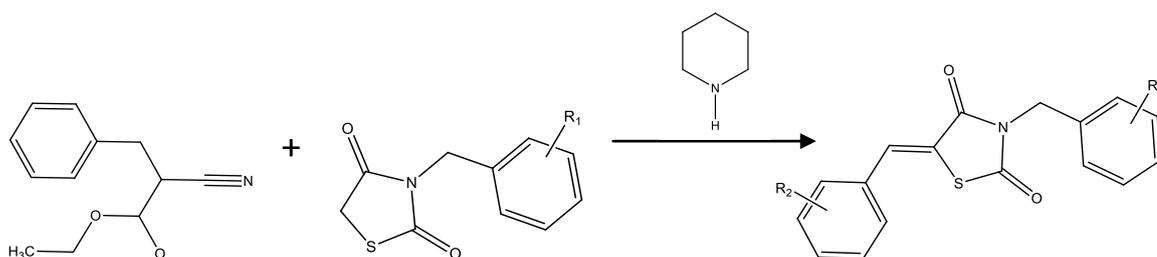


Esquema 5: Reação de condensação de Knoevenagel (CUNHA & SANTANA, 2002)

- Adição de Michael

A reação de adição de Michael (Esquema 6) ocorre das TZDs a partir da inserção do grupo benzilideno na posição 5. São utilizados os ciano-acrilatos de etila formados a partir de benzaldeídos substituídos (SILVA, *et al.*, 2001)

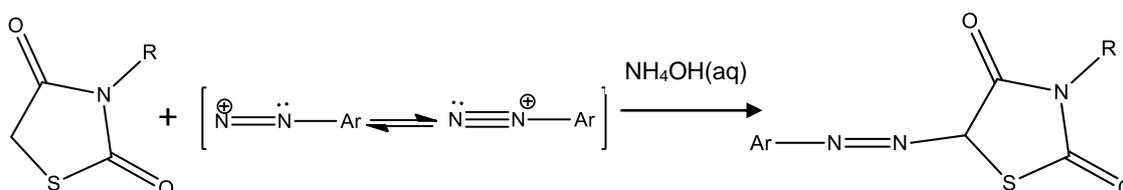
Nessa reação, ciano-acrilatos de etila podem ser inseridos na posição 5 do anel tiazolidínico, utilizando-se a piperidina ou morfolina como catalisador e etanol absoluto por filtração e purificação com etanol absoluto (PEREIRA, 2003).



Esquema 6: Reação de Adição de Michael (PEREIRA, 2003)

- Diazotação

As TZDs podem realizar reações de diazotação, que consiste no acomplamento com sais de diazônio com o objetivo de se produzir uma ligação do tipo C=N. Estas reações, assim como reações de condensação aldólica são realizadas via formação de enolato (Esquema 7) (LIENSEN *et al.*, 2008).

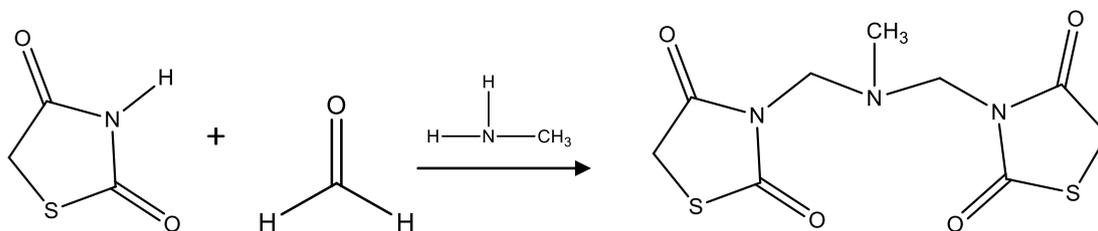


Esquema 7: Reação de diazotação

- Reação de Mannich

De uma forma geral, o aduto de Mannich pode ser preparado através da condensação de compostos contendo um grupo ácido com formaldeído e uma amina, na presença de um ácido forte, para formar uma base de Mannich (FERRAZ & PEREIRA, 2004). As TZDs por possuírem características ácidas fracas e formarem sais básicos, são passíveis de ocorrer à reação de Mannich. A reação

se processa facilmente a 0 °C com morfolina, piperidina e dimetilamina. Em trabalho de 1955 Bombardieri e Taurins reagiram a metilamina com duas moléculas de tiazolidina-2,4-diona, resultando no composto *N*-metil-*N,N*-bis(2,4-tiazolidinadiona-metil-amina).



Esquema 8: Reação de Mannich. Formação de *N*-metil-*N,N*-bis(2,4-tiazolidinadiona-metil-amina) (BOMBARDIERI & TAURINS, 1955)

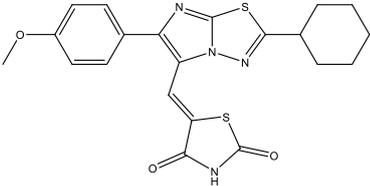
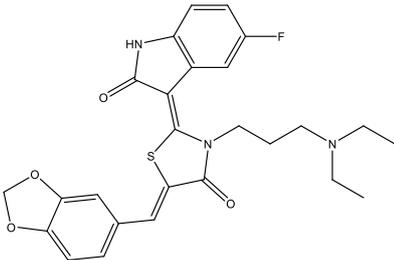
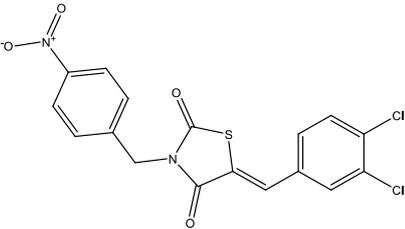
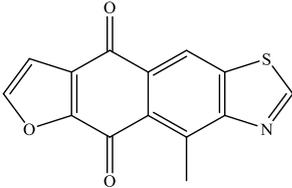
3.3.3 Importância biológica das tiazolidinas

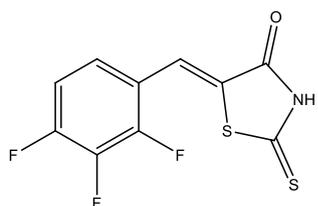
A partir da última década, vários trabalhos de química medicinal tem se voltado para o anel tiazolidínico. A literatura descreve uma série de novos compostos relacionados a esta classe e as atividades farmacológicas destas têm sido estudadas, apresentando bons resultados e menores efeitos adversos (PANDEY *et al.*, 2011; MIOLO, 2013). As TZDs agem principalmente por ligação aos receptores ativados pelos proliferadores de peroxissomas (PPARs), proteínas transdutoras pertencentes a uma classe de receptores nucleares da qual fazem parte também o receptor do ácido retinóico, receptor de hormônios da tireóide e receptores de esteróides. Existem três tipos de PPARs já conhecidos e que têm seus genes codificados, o PPAR α (NR1C1), o PPAR δ/β (NR2C2) e o PPAR γ . Cada isoforma possui ligantes específicos, tendo como finalidade diferentes atividades biológicas (KOTA *et al.*, 2005).

As TZDs têm sido amplamente pesquisadas devido ao seu envolvimento na regulação de diversos processos fisiológicos, como a proliferação celular, angiogênese, inflamação e metabolismo da glicose (BARROS *et al.*, 2010), mostrando atividades significativas, tais como antidiabética (MOURÃO *et al.*, 2005.), esquistossomicida (SANTIAGO *et al.*, 2014, OLIVEIRA *et al.*, 2015), antimicrobiana, anti-*T. cruzi* (DU *et al.*, 2002.; MOREIRA *et al.*, 2013), anti-HIV (RAWAL *et al.*, 2007), anti-inflamatória e autoimunes como a artrite reumatóide (KON *et al.*, 2002, UCHOA

et al., 2009, JUNIOR, 2013, SANTIN *et al.*, 2013, SILVA *et al.*, 2015, CÉSAR *et al.*, 2015; GARCIA *et al.*, 2015), anti-aterosclerótica (SILVA *et al.*, 2013) e antitumoral (CHANDRAPPA *et al.*, 2008; BARROS *et al.*, 2013), antimalárica (SOLOMON *et al.*, 2013). O tabela 2 abaixo apresenta alguns exemplos de TZDs com suas respectivas aplicações biológicas.

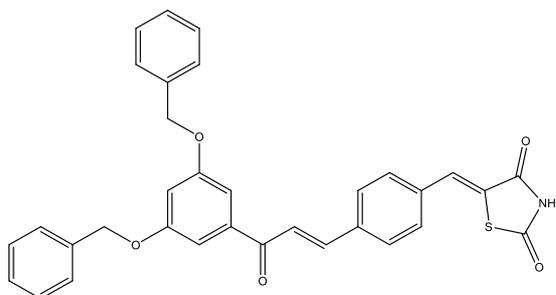
Tabelas 2: Exemplos de TDZs e suas aplicações biológicas

ESTRUTURA QUÍMICA	ATIVIDADE BIOLÓGICA	PESQUISADOR
	<p>Atividade hipoglicemiante agonista do PPARγ</p>	<p>Mohammed <i>et al.</i> 2013</p>
	<p>Atividade antitumoral IC₅₀ = 0,025 μM; 0,075 μM; 0,77 μM contra linhagens das células de HT-29, H460, MDA-MB-231 (Sunitinib)</p>	<p>Wang <i>et al.</i> 2011</p>
	<p>Inibiu o crescimento das formas epimastigota e amastigota, e causou lise na tripomastigota do <i>Trypanossoma cruzi</i></p>	<p>Moreira <i>et al.</i>, 2013</p>
	<p>Atividade leishmanicida IC₅₀= 0,009 μM contra <i>Leishmania donovani</i></p>	<p>Tapia <i>et al.</i>, 2003</p>



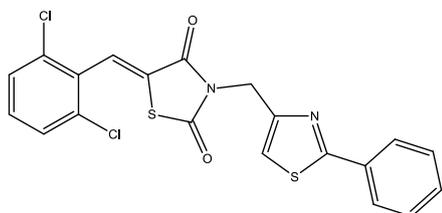
Inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* (0,5 µg/mL) e *Staphylococcus aureus* (32 µg/mL)

Tomasić *et al.*, 2011



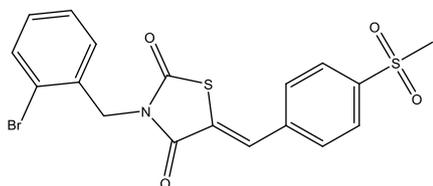
Atividade antimicrobiana e antifúngica
MIC= 16 µg/mL

Avupati *et al.*, 2012



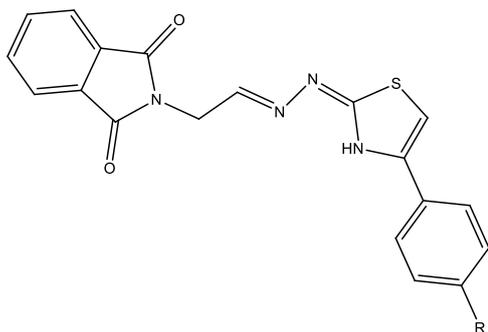
Atividade inibidora do crescimento das cepas de bactérias de *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*

Nastasa *et al.*, 2013



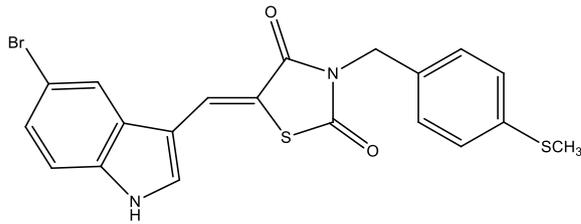
Atividade anti-inflamatória - 73,3%

Barros *et al.*, 2010



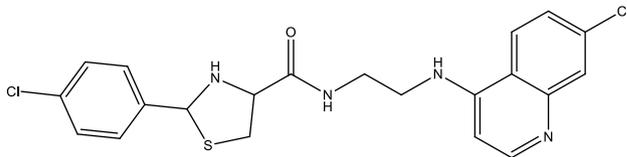
Atividade esquistossomicida - 90% em 120 hs

Santiago *et al.*, 2014



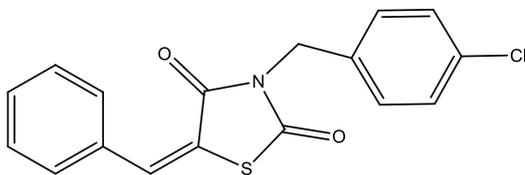
Atividade
esquistossomicida e
anti chagásica

Oliveira *et al.*, 2015



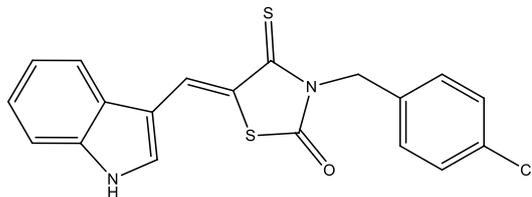
Atividade
antimalárica

Solomon *et al.*, 2013



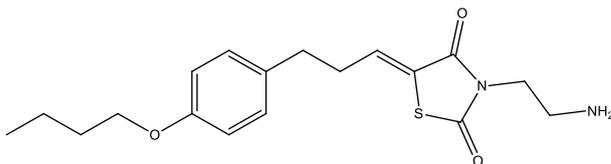
Antimicrobiana

Purohit *et al.*, 2012



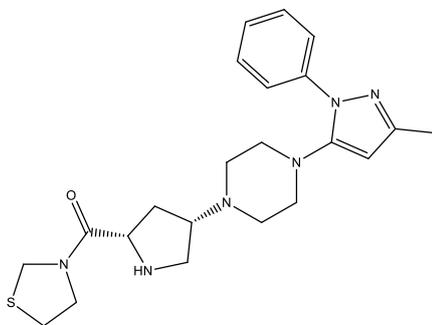
Ant-inflamatória

Santos *et al.*, 2005



Anticâncer

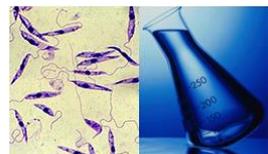
Liu *et al.*, 2013



Antidiabética

Yoshida *et al.*, 2012

Metodologia



SÍNTESE DOS NOVOS DERIVADOS 5-(INDOL-3-IL-METILANO)-4-TIOXO-TIAZOLIDIN-2-ONAS

4.1 ESTUDO QUÍMICO

4.1.1 Material

Para a síntese dos novos derivados 5-(indol-3-il-metilano)-4-tioxo-tiazolidin-2-onas (LQIT/GQS), foram utilizados os seguintes equipamentos, reagentes e solventes:

4.1.1.1 Equipamentos

A elucidação estrutural dos novos derivados 5-(indol-3-il-metilano)-4-tioxo-tiazolidin-2-onas(LQIT/GQS) foram realizadas através da espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV), em espectrofotômetro FTIR Bruker Modelo IFS 66, pastilhas de KBr. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) foram efetuados em espectrofotômetro Varian Modelo Plus 400 MHz. As multiplicidades dos sinais são indicadas pelas seguintes abreviações: simpleto (s), dubleto (d), duplo dubleto (dd), tripleto (t), duplo tripleto (dt), quadrupletto (q), multipletto (m). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e os acoplamentos em Hz. Para determinação dos pontos de fusão foi utilizado aparelho Quimis Modelo 340.27.

4.1.1.2 Reagentes e Solventes

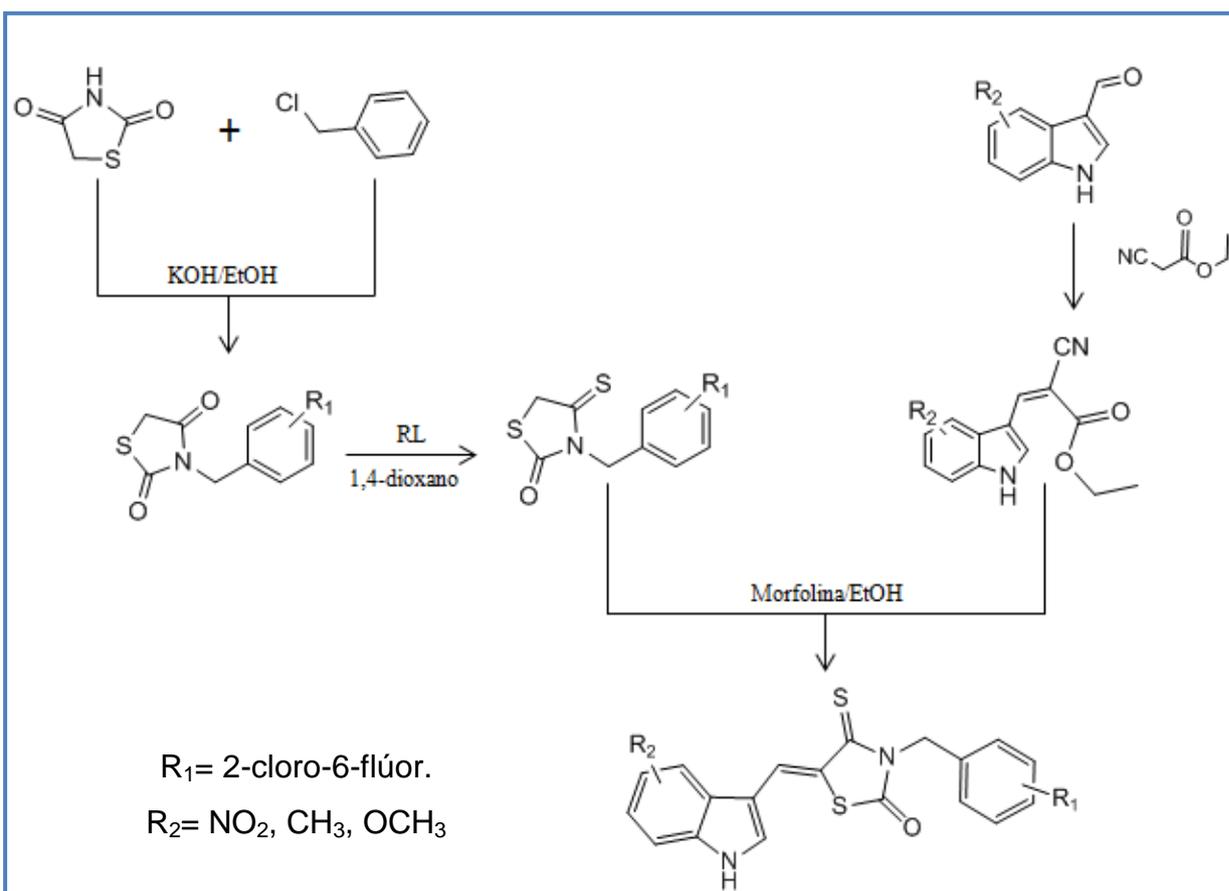
Foram utilizados os seguintes reagentes e solventes: tiazolidin-2,4-diona, aldeídos aromáticos substituídos (5-metilindol-3-carboxaldeído, 4-nitroindol-3-carboxaldeído, 7-metilindol-3-carboxaldeído, 5-metóxi-3-carboxaldeído, 1*H*-benzo(G)indol-3-carboxaldeído), haleto de benzila substituídos (cloreto de 2-cloro-6-flúor-benzil), trietilamina, morfolina, benzeno, *n*-hexano, dioxano anidro, reativo de Lawesson, tiouréia, ácido monocloroacético, etanol absoluto, metanol, acetato de etila, cianoacetato de etila, hidróxido de sódio. Todos os reagentes e solventes

acima mencionados foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, Vetec ou Acros, obedecendo às especificações para PA ou PS. Na cromatografia em camada delgada foram utilizadas placas de sílica gel 60 Merck F254, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 ou 366 nm) ou através de vapores de iodo.

4.1.2 Métodos

4.1.2.1 Procedimento experimental para obtenção dos dos novos derivados 5-(indol-3-il-metilano)-4-tioxi-tiazolidin-2-onas(LQIT/GQS)

A rota sintética empregada para a obtenção dos derivados 5-(indol-3-il-metilano)-4-tioxi-tiazolidin-2-onas(LQIT/GQS) foi uma via plena convergente, onde foram utilizadas propostas mecanísticas de tionação, *N*-alquilação, adição de Michael (Esquema 8).



Esquema 9: Rota sintética para obtenção dos derivados 5-(indol-3-il-metilano)-4-tioxi-tiazolidin-2-onas(LQIT/GQS)

4.1.2.2 Procedimento de síntese da Tiazolidina-2,4-diona (TZD)

Em um balão de 250 mL de fundo redondo, com agitação magnética, adaptado a um condensador sob refluxo, foram adicionados quantidades equimolares de tiouréia e de ácido monocloroacético, previamente dissolvidos em 200 mL de água destilada. A mistura foi aquecida a 80°C e mantida sob agitação por 18 horas e, em seguida, mantida sob refrigeração durante 24 horas. Os cristais foram isolados por filtração e purificados através de sucessivas lavagens com água destilada.

4.1.2.3 Procedimento de síntese do 3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LQIT/GQ-52)

Em um balão de 100 mL, foi adicionado 1 mol de tiazolidina e 40 mL de metanol. Separadamente, foi dissolvido 1 mol de KOH em 10 mL de metanol/água 6:4, essa solução foi adicionada ao balão que permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foi acrescentado 1 mol de cloreto de 2-cloro-6-flúor-benzil. A mistura reacional foi mantida sob agitação a uma temperatura de 78-80 C, por 24 horas. Constatado o término da reação, por cromatografia em camada delgada, o produto formado foi vertido em banho de gelo. Os cristais formados foram purificados por recristalização em metanol/água. O 3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona foi obtido.

4.1.2.4 Procedimento de síntese da 3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-52)

Em balão de duas bocas, previamente seco e sob atmosfera inerte (argônio), foram adicionados 1 mol de 3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona, 0,3 mol de reativo de Lawesson e 20 mL de dioxano anidro. A reação permaneceu sob agitação em temperatura de 90 °C, por 24 horas. Constatado o término da reação, por cromatografia em camada delgada, o volume da solução foi rotaevaporado e reduzido a cerca de um décimo do volume, o restante foi resfriado em geladeira por 24 horas. O precipitado obtido foi filtrado à vácuo e lavado com quantidade mínima de etanol gelado, gerando o 3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona.

4.1.2.5 Síntese dos derivados 3-indolil-2-ciano-acrilatos de etila (LQIT/IP)

Em um balão de fundo redondo, com capacidade de 250 mL foram adicionados quantidades equimolares do aldeído aromático substituído e cianoacetato de etila na presença de 30 gotas de trietilamina como catalisador e 20 mL de benzeno como solvente. O sistema reacional foi acoplado a um Dean-Stark e aquecida a uma temperatura de 110 °C, durante 4 horas. O produto foi rotativo evaporado a securo e purificado através de recristalizações sucessivas em etanol absoluto.

4.1.2.6 Síntese dos derivados 5-(indol-3-il-metilano)-4-tioxi-tiazolidin-2-onas(LQIT/GQS)

Em um balão de fundo redondo, com capacidade de 100 mL foram adicionadas quantidades equimolares de 3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona e 3-indolil-2-ciano-acrilatos de etila na presença de 1 mL de morfina como catalisador e 10 mL de etanol absoluto como solvente. A mistura reacional foi mantida por aproximadamente 3 horas. O produto foi então filtrado e purificado com sucessivas lavagens em etanol absoluto.

4.2 ESTUDO BIOLÓGICO

4.2.1 Materiais e Equipamentos

- Placa de cultivo com 24 poços
- Meio Schneider's Sigma
- Meio RPMI 1640 LGC
- Tubos falcon, eppendorff e ponteiros esterilizados
- Álcool 70%
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Micropipetas
- Câmera de Neubauer
- Câmara de fluxo laminar – Pachane, modelo PA710 (LBCM/CPqAM)
- Microscópio óptico – Medilux – modelo 0000407 (LBCM/CPqAM)
- Estufa incubadora para BOD – J. Prolab, modelo JP. 100 (LBCM/CPqAM)

- Estufa Incubadora de CO₂ – Thermo Scientific Forma Series II Water Jacket (LBCM/CPqAM)
- Leitor de ELISA – Benchmark Plus Bio-Rad (LAVITE/CPqAM)

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Cultivo dos parasitas

Formas promastigotas de *Leishmania infantum* (Cepa BH-466) foram mantidas a 26 °C em meio de Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino, com repiques a cada três dias. Parasitas na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos.

4.2.2.2 Atividade biológica em *Leishmania infantum*

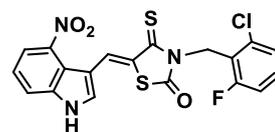
As formas cultivadas de promastigotas de *Leishmania infantum* foram contadas e diluídas em meio de Schneider (Sigma) suplementado com 10% de SFB a uma concentração de 1×10^6 células/mL. Após a diluição, as células foram incubadas na presença de diferentes concentrações (25 – 1,562 µg/mL) dos compostos, por 72 horas. Células incubadas apenas com meio de Schneider foram utilizadas como controle, a anfotericina B foi utilizada como padrão. O crescimento da cultura foi acompanhado através de contagens diárias em câmara de Neubauer. O parâmetro utilizado para estimar a inibição do crescimento foi a IC₅₀, o qual corresponde à concentração do composto capaz de inibir 50% do crescimento dos parasitas. A IC₅₀ foi determinada após 72 horas de cultivo por análise de regressão linear. Cada teste foi feito em 2 experimentos independentes em triplicata.

4.2.2.3 Análise da citotoxicidade dos compostos em macrófagos

Macrófagos J774 foram semeados em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 células/poço e incubados em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas, o meio foi removido e as células foram incubadas na presença dos compostos (50 – 3,125 µg/mL) por 48 h. Após este período, o meio foi novamente retirado e adicionado a mesma quantidade de meio RPMI sem vermelho de fenol mais 10 µL de MTT, a uma concentração de 5mg / mL diluído em PBS, as células foram incubadas por mais 3 horas nas mesmas condições de cultivo. Após

incubação, o MTT foi retirado cuidadosamente e adicionado 100 μ L de DMSO por poço para a solubilização dos cristais derivados da redução do MTT, seguido de agitação da placa durante 15 minutos. A leitura da absorbância dos cristais de formazan solubilizados foi realizada utilizando o leitor de ELISA com comprimento de onda de 540 nm. A porcentagem de células viáveis em relação às células controles foi estimada. A concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% (CC_{50}) das células foi determinada por análise de regressão logarítmica. O índice de seletividade (IS) foi determinado como a razão entre os valores de CC_{50} e IC_{50} obtidos para cada composto. Cada experimento foi realizado em dois experimentos distintos em quadruplicata.

Resultados e Discussão



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo Químico

As moléculas objetivo deste estudo foram obtidas a partir de uma rota plena e convergente, baseada na modificação estrutural de compostos anteriormente relatados na literatura com a finalidade de obtenção de novos protótipos a fármacos leishmanicidas. Reações como *N*-alquilação, tionação e adição de Michael foram utilizadas neste trabalho.

A caracterização de novos compostos obtidos por síntese química pode ser realizada por técnicas espectroscópicas e espectrométricas onde se pode destacar a Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono Treze (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e também espectroscopia de absorção no infravermelho (IV). Tais técnicas foram utilizadas na caracterização dos compostos sintetizados.

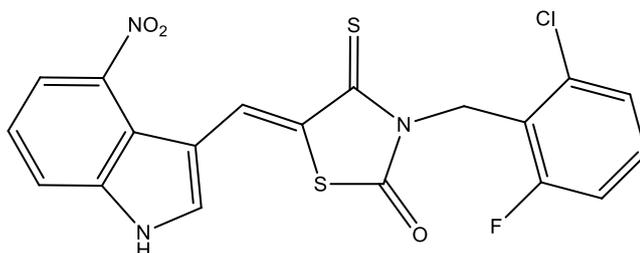
No IV, é possível realizar a identificação de bandas e estiramentos característicos de grupos funcionais presentes na estrutura de compostos. Os novos derivados da série 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxo-tiazolidin-2-onas possuem como grupos funcionais característicos a presença do grupamento NH o qual apareceu em uma faixa de frequência que variou entre $3278\text{-}3307\text{ cm}^{-1}$, indicando a presença do núcleo indol na estrutura desses derivados. A carbonila (C=O) e a tiocarbonila (C=S) também podem ser consideradas grupos característicos na estrutura dos nossos compostos. O espectro de IV revelou a presença de estiramentos na faixa de $1668\text{-}1726\text{ cm}^{-1}$ (carbonila) e $1510\text{-}1605\text{ cm}^{-1}$ (tiocarbonila) evidenciando o núcleo tiazolidínico substituído por esses grupos funcionais e também a reação de tionação que ocorreu neste heterociclo. Por fim, outro grupamento importante é C=C, a qual foi observada em uma frequência que variou entre $1600\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$.

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio tem por objetivo caracterizar todos os hidrogênios presentes no esqueleto químico de novos derivados. Os hidrogênios mais característicos dos compostos obtidos nesta série serão descritos a seguir. O hidrogênio da ligação N-H do indol foi observado entre $12.05\text{-}13.05\text{ ppm}$ na forma de singlete, o que confirma a presença do núcleo heterociclo em todos os compostos sintetizados. Outro ponto importante é a

presença da ligação =C-H o que confirma o sucesso da reação de adição de Michael entre as tiazolidinas *N*-alquiladas e os ésteres de Cope. Este hidrogênio arilidênico foi visualizado na faixa de 7.70-8.25 ppm. Por fim, os hidrogênios do –CH₂ (benzil) foram identificados como singletos na faixa de 4.96-4.99 ppm, onde foi possível inferir que a reação de *N*-alquilação também ocorreu com êxito entre a tiazolidina-2,4-diona e o haleto de benzila.

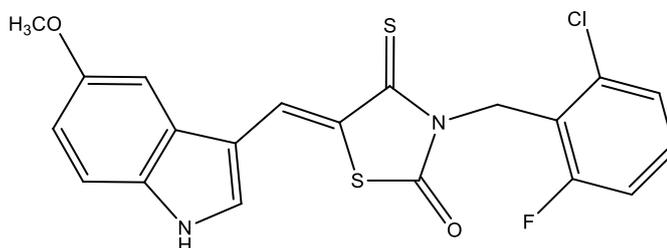
A dupla ligação exocíclica presente na posição 5 no núcleo tiazolidínico, evidencia a possibilidade da formação de distereoisômeros (*Z* ou *E*). No entanto, a literatura revela através de estudos de cristalografia de raio-X e através de RMN ¹³C, a preferência pela configuração *Z* de derivados 5-arylideno-tiazolidina-2,4-diona (KAROLAK-WOJCIECHOWSKA *et al.*, 2009; HANDZLIK *et al.*, 2012).

(*Z*)-3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-5-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-90)



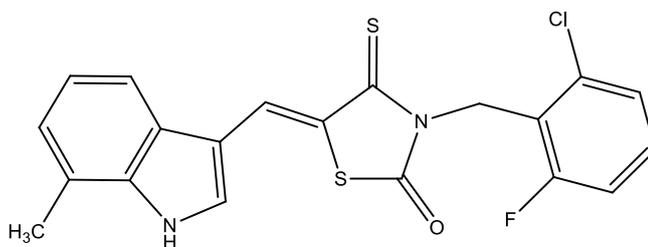
C₁₉H₁₁ClFN₃O₃S₂. Massa molar: 446,9914 g/mol. Rendimento: 57,21%. Ponto de Fusão: 208-210 °C. Razão de frente: 0,47 (sistema *n*-hexano/acetato de etila 7:3). RMN ¹H (400MHZ) δ: 4.97 (s, 2H, CH₂), 7.18 (d, 1H, J= 8 Hz, benzil), 7.41 (d, 1H, J= 8Hz, indol), 7.42 (t, 1H, J=8Hz, benzil), 7.46 (d, 1H, J=8Hz, indol), 7.96 (d, 1H, J=8Hz, benzil), 8.09 (s, 1H, indol), 8.26 (s, 1H, -CH=), 8.79 (s, 1H, indol), 12.92 (s, 1H, NH). RMN ¹³C (100MHZ) δ: 110.53, 118.06, 119.09, 119.43, 120.37, 120.77, 122.57, 125.73, 128.53, 130.21, 130.61, 133.18, 134.22, 139.13, 142.44, 160.17, 164.75, 170.07. IV (KBr) cm⁻¹: 3284.5 (NH), 1713.6 (C=O), 1680.9 (C=C), 1510.4 (C=S).

(Z)-3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-5-((5-metoxi-1H-indol-3-il)metileno)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-91)



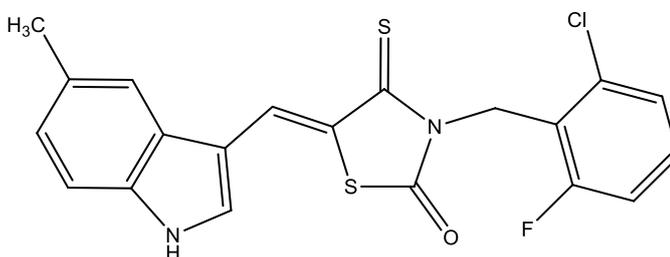
$C_{20}H_{14}ClFN_2O_2S_2$. Massa molar: 432,0169 g/mol. Rendimento: 22,82%. Ponto de Fusão: 177-179 °C. Razão de frente: 0,50 (sistema *n*-hexano/acetato de etila 7:3). RMN 1H (400MHZ) δ : 3.81 (s, 3H, OCH₃), 4.96 (s, 2H, CH₂), 6.86 (d, 1H, J= 8.8Hz, benzil), 7.22 (t, 1H, J= 8.8Hz, benzil), 7.31 (d, 1H, J= 8.0Hz, indol), 7.37 (d, 1H, J= 6.0Hz, indol), 7.38 (d, 1H, J= 8.4Hz, benzil), 7.42 (d, 1H, J= 8.0Hz, indol), 7.70 (s, 1H, -CH=), 8,20 (s, 1H, indol), 12.07 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (100MHZ) δ : 37.01, 55.40, 100.11, 110.43, 112.22, 1113.19, 113.41, 114.42, 120.94, 125.58, 126.51, 127.69, 129.16, 130.44, 130.54, 131.00, 134.17, 155.04, 162.70, 166.34. IV (KBr cm^{-1}) γ : 3307.0 (NH), 1726.0 (C=O), 1670.0 (C=C), 1605.1 (C=S).

(Z)-3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-5-((7-metil-1H-indol-3-il)metileno)-4-tioxotiazolin-2-ona (LQIT/GQS-92)



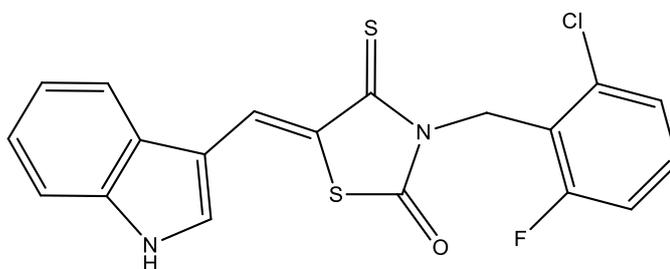
$C_{20}H_{14}ClFN_2OS_2$. Massa molar: 416,0220 g/mol. Rendimento: 43,35%. Ponto de Fusão: 252-254 °C. Razão de frente: 0,42 (sistema *n*-hexano/acetato de etila 7:3). RMN 1H (400MHZ) δ : 2.51 (s, 3H, CH₃), 4.96 (s, 2H, CH₂), 7.09 (d, 1H, J= 10.8Hz, benzil), 7.23 (t, 1H, J= 9.6Hz, benzil), 7.38 (d, 1H, J= 8.0Hz, indol), 7.65 (d, 1H, J= 8.0Hz, indol), 7.70 (d, 1H, J= 10.4Hz, benzil), 7.92 (d, 1H, indol), 8.13 (s, 1H, -CH=), 8,55 (s, 1H, indol), 12.2 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (100MHZ) δ : 16.62, 110.80, 113.17, 114.59, 115.84, 120.73, 120.88, 122.01, 123.69, 125.70, 126.07, 128.57, 130.23, 134.20, 135.67, 160.19, 162.68, 164.77, 169.75, 190.22. IV (KBr cm^{-1}) γ : 3287.7 (NH), 1662.9 (C=O), 1603.5 (C=C), 1573.4 (C=S).

(Z)-3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-5-((5-metil-1H-indol-3-il)metileno)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-93)



$C_{20}H_{14}ClFN_2OS_2$. Massa molar: 416,0220 g/mol. Rendimento: 29,61%. Ponto de Fusão: 226-228 °C. Razão de frente: 0,45 (sistema *n*-hexano/acetato de etila 7:3). RMN 1H (400MHZ) δ : 2.41 (s, 3H, CH_3), 4.96 (s, 2H, CH_2), 7.07 (d, 1H, $J= 8.4Hz$, benzil), 7.23 (t, 1H, $J= 9.2Hz$, benzil), 7.32 (d, 1H, $J=8.0Hz$, indol), 7.38 (d, 1H, $J= 8.0Hz$, indol), 7.39 (d, 1H, $J= 8.4Hz$, benzil), 7.66 (d, 1H, indol), 7.72 (s, 1H, $-CH=$), 8,13 (s, 1H, indol), 12.05 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (100MHZ) δ : 18.53, 56.01, 109.95, 112.10, 112.63, 114.45, 117.93, 120.91, 124.68, 125.61, 126.03, 127.06, 129.04, 130.12, 130.46, 134.20, 134.51, 160.19, 164.80, 190.22. IV (KBr cm^{-1}) γ : 3307.0 (NH), 1668.4 (C=O), 1600.7 (C=C), 1520.0 (C=S).

(Z)-5-((1H-indol-3-il)metileno)-3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-94)



$C_{19}H_{12}ClFN_2OS_2$. Massa molar: 402,0064 g/mol. Rendimento: 47,21%. Ponto de Fusão: 282-284 °C. Razão de frente: 0,48 (sistema *n*-hexano/acetato de etila 7:3). RMN 1H (400MHZ) δ : 4.99 (s, 2H, CH_2), 7.23 (d, 1H, $J= 8.4Hz$, benzil), 7.34 (d, 1H, $J=8.0Hz$, indol), 7.39 (t, 1H, $J= 8.4Hz$, benzil), 7.49 (t, 1H, $J= 7.2Hz$, indol), 7.64 (d, 1H, $J= 8.4Hz$, benzil), 7.58-7.60 (m, 1H, indol), 7.99 (d, 1H, $J= 8.8Hz$, indol), 8.25 (s, 1H, $-CH=$), 8,45 (d, 1H, $J= 8.4Hz$, indol), 13.05 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (100MHZ) δ : 37.06, 112.09, 114.45, 118.06, 120.81, 121.91, 123.03, 124.61, 125.99, 128.45,

130.42, 130.59, 131.12, 134.21, 160.20, 162.68, 164.77, 166.33, 190.22. IV (KBr cm^{-1}) γ : 3278.0 (NH), 1722.5 (C=O), 1662.8 (C=C), 1599.0 (C=S).

5.2 ESTUDO BIOLÓGICO

Com a finalidade de avaliar a ação dos 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxi-tiazolidin-2-onas sobre formas promastigotas de *L. infantum*, foram realizados os ensaios de avaliação da susceptibilidade *in vitro* e o ensaio de citotoxicidade através do método do MTT.

De acordo com a análise dos resultados na Tabela 3, verifica-se que, ao longo do tratamento com os derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxi-tiazolidin-2-onas (LQIT/GQS), que possuem o átomo de cloro e flúor nas posições 2 e 6 do anel benzil e no grupamento indólico o grupo nitro, metil, metóxi e o não substituído, mostraram-se ativos frente ao parasito em cultura em comparação ao grupo não tratado (controle). Entretanto, os compostos apresentaram respostas biológicas diferentes. Esta diferença observada entre os compostos testados frente formas promastigotas de *L. infantum*, se deve possivelmente às modificações dos radicais, realizadas na estrutura química das moléculas. Substituintes variados foram incorporados a um esqueleto estrutural indólico-tioxi-tiazolidínico, o que resultou numa variação da resposta biológica.

Os derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxi-tiazolidin-2-onas foram inicialmente avaliados nas concentrações de 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,562 $\mu\text{g/mL}$ frente *L. infantum*. O composto LQIT/GQS-90 teve uma diminuição expressiva da quantidade de parasitos e apresentou uma taxa de mortalidade que variou de 73,83 a 97,99% nas primeiras 24 horas, 96,5 a 99,46% após 48 horas e 97,64 a 99,5% após 72 horas.

Tabela 3: Média do percentual de inibição (%) dos derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxo-tiazolidin-2-onas frente *L. Infantum* nos tempos de 24, 48 e 72 horas

	24 h					48 h					72 h				
	25	12,5	6,25	3,125	1,562	25	12,5	6,25	3,125	1,562	25	12,5	6,25	3,125	1,562
GQS-90	97,51	97,99	98,41	85,41	73,83	97,76	99,46	99,46	98,41	96,56	98,07	99,01	99,50	99,00	97,64
GQS-91	67,21	54,25	36,43	23,43	18,31	94,79	92,08	79,85	55,38	18,10	93,58	93,10	80,58	31,10	18,41
GQS-92	66,60	51,94	27,77	9,25	0	81,43	69,57	42,37	33,44	24,69	10,13	22,16	10,76	16,80	15,31
GQS-93	64,60	63,63	46,22	21,45	11,24	93,93	92,43	79,07	41,83	25,35	91,17	88,59	26,38	11,8	15,08
GQS-94	9,33	17,10	8,78	4,05	7,52	22,29	8,51	7,67	6,17	7,84	18,87	15,28	15,13	15,50	19,93

Tendo em vista a alta reatividade do composto substituído pelo grupo nitro, fez-se necessário a realização de novos testes nas concentrações de 2; 1; 0,5; 0,25, 0,125 µg/mL para a determinação da IC₅₀ (Tabela 4). Esse composto destacou-se por apresentar a atividade leishmanicida mais promissora dentre os derivados testados, apresentando uma IC₅₀ 0,42 ± 0,15 µM. Esse resultado foi o que mais se aproximou do efeito da Anfotericina B, medicamento comercialmente vendido para o tratamento da leishmaniose e que nesse trabalho foi utilizado como padrão.

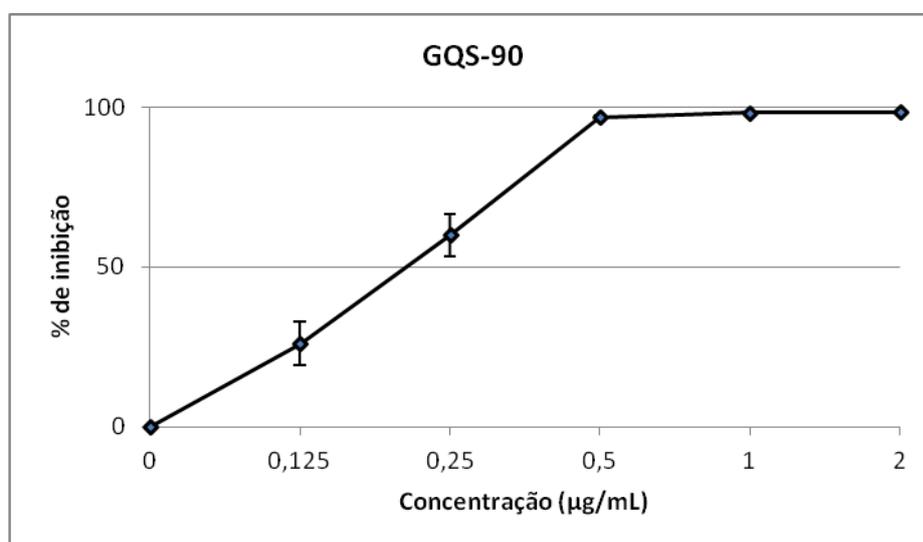
Tabela 4: Atividade leishmanicida *in vitro* dos derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxi-tiazolidin-2-onas sobre promastigotas de *L. infantum*

Compostos	IC ₅₀	
	µg / mL	µM
GQS-90	0,19 ± 0,07	0,42 ± 0,15
GQS-91	5,837 ± 1,14	13,51 ± 2,63
GQS-92	>25	>60
GQS-93	9,97 ± 0,6	23,96 ± 1,44
GQS-94	>25	>60
Anfotericina B	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,02

Legenda: IC₅₀ – concentração que inibe 50% do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum*

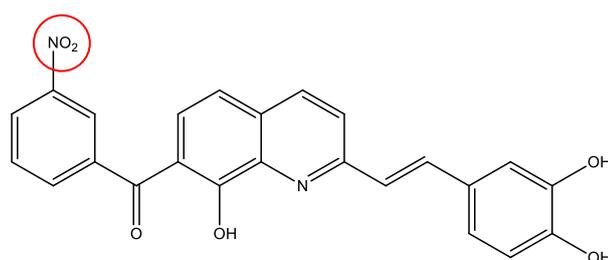
O efeito leishmanicida do composto LQIT/GQS-90 pode ser melhor analisado no Gráfico 1. Os resultados apresentados nesse gráfico confirmam o promissor potencial leishmanicida dessa essa molécula, com uma inibição próxima a 100% nas concentrações de 0,5; 1 e 2 µg/mL.

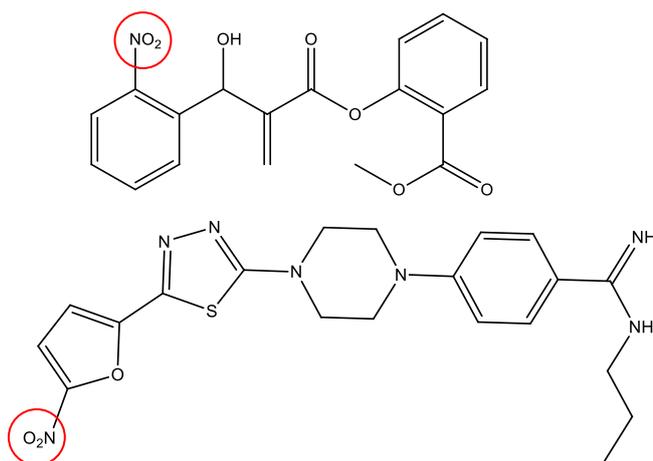
Figura 19: Efeito de inibição do GQS-90 no crescimento de formas promastigotas de *L. infantum* após 72 horas de incubação



A adição do radical nitro na posição 4 do anel indol contribuiu de forma positiva para a ação leishmanicida. Alguns trabalhos relatam uma maior eficiência antiparasitária em moléculas que possuam o grupamento NO_2 (NARVÁEZ, 1983; TENÓRIO, 2005). O grupo nitro presente nesses compostos é chamado de parasitofórico, por ser de extrema importância à ação antiparasitária, apresentando-se como uma excelente escolha para estudo e desenvolvimento de futuros candidatos a fármacos antiparasitários, inclusive leishmanicidas (PAULA, 2007). Diversos compostos descritos na literatura com ação anti-leishmania apresentam esse grupamento (MICHELETTI & BEATRIZ, 2011) (Figura 20).

Figura 20: Compostos descritos na literatura com ação leishmanicida, que apresentam o grupamento nitro (MICHELETTI & BEATRIZ, 2012).





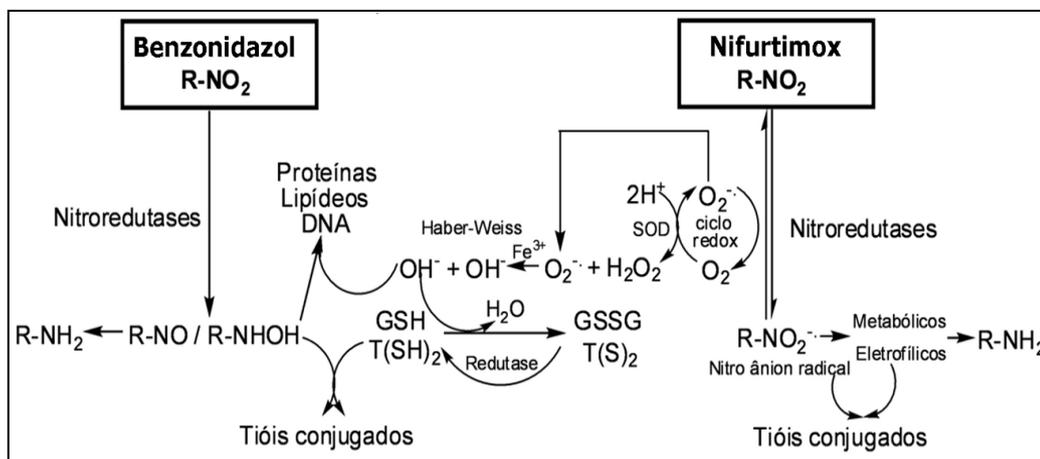
A atividade biológica dos nitrocompostos é dependente da presença do grupo nitro ligado à molécula e resulta, basicamente, de mudanças na estabilidade do mesmo, ocorrendo então, as interações entre o nitrocomposto e o seu alvo na biofase. Em nível molecular estas mudanças ocorrem devido ao fato do grupo nitro ser facilmente reduzido, característica resultante de seu caráter fortemente aceptor de elétrons, bem como pelo efeito de ressonância entre o átomo de nitrogênio e os dois átomos de oxigênio presentes em sua estrutura (PAULA, SERRANO & TAVARES, 2009).

Muitos nitrocompostos destacam-se na terapêutica antiparasitária, o que ressalta a importância desta classe de compostos. Antiparasitários comercialmente vendidos, tais como o metronidazol, o tinidazol, o benzonidazol e o nirfurtimox, apresentam o processo de biorredução enzimática do grupo nitro como possível mecanismo de ação, resultando na formação de radicais livres com toxicidade prioritária para as células bacterianas e parasitárias (TOCHER, 1997; PAULA, SERRANO & TAVARES, 2009).

O possível mecanismo de ação do grupamento nitro está esquematizado na figura 21. Neste mecanismo também estão envolvidas a NADPH citocromo P450 redutase encarregada pela formação de um radical nitro intermediário com subsequente formação de hidroxilamina (R-NHOH). Em seguida, o oxigênio molecular (O_2) é reduzido ocasionando a formação do íon superóxido (O_2^-) e regenerando o grupo NO_2 num processo conhecido como ciclo redox. (MAYA, 2007). Após sua formação, o íon superóxido é captado pela enzima superóxido dismutase gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, através da reação de Haber-Weiss na

presença de íons FeIII, forma o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), sendo este altamente tóxico para o parasito (DIAS, 2009).

Figura 21: Mecanismo de ação do R-NO₂ (DIAS, 2009).



O derivado tiazolidínico LQIT/GQS-91, que tem como substituinte na estrutura do indol, o metóxi, teve um percentual de inibição de 18,31 a 67,21% após 24 horas, 18,10 a 94,79% após 48 horas e 18,41 a 93,58 depois de decorridas 72 horas do experimento. Esse composto apresentou o segundo maior potencial leishmanicida, obtendo-se uma IC₅₀ no valor de 13,51 μM . Em estudo utilizando-se o grupo indol e o radical metóxi, o composto (2-metoxi-4-(6-metoxi-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-*l*)fenol), destacou-se por exibir propriedades antioxidantes (GOH, *et al.* 2015). Estudos recentes têm sugerido que os radicais livres desempenham o papel de causar dor e inflamação, associadas à carcinogênese, doenças coronárias entre outras enfermidades (DOMINIQUE *et al.*, 2009). Para combater os efeitos danosos dos radicais livres, antioxidantes tem sido frequentemente recomendados, de forma a auxiliar na proteção do organismo contra o estresse oxidativo e atuar na prevenção de doenças associadas ao envelhecimento e o desencadeamento de processos inflamatórios (POLJSK, SUPUT, & MILISAV, 2013). Essa ação anti-inflamatória pode ser um fator benéfico, especialmente para os pacientes em estágios mais avançados da leishmaniose (CARVALHO, PASSOS & JESUS, 2005).

O LQIT/GQS-92 no tempo de 24 horas na concentração de 1,562 $\mu\text{g/mL}$ não causou a morte do parasita, porém as demais concentrações apresentaram inibições

que variaram de 9,25 a 66,60% nesse mesmo tempo de incubação. Essa molécula apresentou ainda taxa de mortalidade de 24,69 a 81,43% na leitura após 48 horas. No entanto, esse efeito caiu drasticamente e no último dia de avaliação a inibição variou de 10,13 a 22,16%. Esses dados apontam que o composto possui propriedades leishmanicidas que se expressaram apenas durante as primeiras 48 horas do experimento. No tempo de 72 horas, o derivado apresentou uma baixa eficácia com relação à taxa de inibição contra as formas promastigotas de *L. infantum*, não sendo possível realizar o cálculo da IC₅₀ a partir das concentrações utilizadas nesse ensaio. Por outro lado, o composto LQIT/GQS-93 resultou numa inibição de 11,24 a 64,60% no tempo de 24 horas, 25,35 a 93,93 % em 48 horas e 11,8 e 91,17% após 72 horas de incubação, obtendo nesse período uma IC₅₀ de 23,96 ±1,44 µM. Os compostos GQS-92 e GQS-93 apresentam o mesmo radical metil, no entanto, em posições diferentes do anel indol, e exibiram respostas biológicas bastante diferenciadas no ensaio *in vitro*. Com essa análise é possível perceber que a utilização de radicais na posição 5 do anel, pode ser um fator determinante para aumento da reatividade destes compostos com relação à sua eficácia de inibição do crescimento de *L. infantum*.

A molécula LQIT/GQS-94 causou inibição no crescimento parasitário, no entanto, não ultrapassou a taxa de 22,29% de mortalidade. As inibições variam de 4,05 a 17,10, 6,17 a 22,29 e 15,13 a 19,93% nas concentrações de 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Pode-se inferir a partir desses resultados, que a inibição ocasionada por esse composto não apresentou um caráter concentração dependente. Também não foi possível determinar a IC₅₀ para esse composto a partir das concentrações utilizadas, devido a pouca atividade frente *L. infantum*. Oliveira *et al.* (2015) realizaram a avaliação esquistossomicida e tripanocida de derivados indólicos-tiazolidínicos, e constataram que os compostos não substituídos no indol obtiveram resultados menos expressivos frente *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi*. Esses resultados ressaltam a importância da utilização de substituintes no anel indol, a fim de elevar a atividade antiparasitária de derivados tiazolidínicos.

Os ensaios de avaliação da citotoxicidade permitem averiguar os efeitos tóxicos de amostras analisadas em culturas celulares. São de extrema importância

durante o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e constituem-se como um importante critério na prospecção de novos compostos com ação leishmanicida (ALIANÇA, 2012). Um dos objetivos da química medicinal é desenvolver compostos que não sejam tóxicos às células de mamíferos. Dessa forma, nesse trabalho foi considerado também o potencial citotóxico dos compostos sintetizados que apresentaram os melhores resultados frente *L. infantum*, sobre macrófagos J774 através do método do MTT. Os resultados do ensaio citotóxico são apresentados na Tabela 5. Os derivados LQIT/GQS-90, LQIT/GQS-91 e LQIT/GQS-93 se mostraram citotóxicos para a linhagem de macrófagos J774, apresentando um CC₅₀ de 8,52 ± 1,36 µM; 15,80 ± 0,20 µM e 54,34 ± 2,86 µM, respectivamente.

Tabela 5: Efeito citotóxico dos derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxi-tiazolidin-2-onas sobre macrófagos J774

Compostos	CC ₅₀	
	µg / mL	µM
GQS-90	3,81 ± 0,61	8,52 ± 1,36
GQS-91	6,83 ± 0,09	15,80 ± 0,20
GQS-92	ND	ND
GQS-93	22,61 ± 1,19	54,34 ± 2,86
GQS-94	ND	ND

Legenda: CC₅₀ – concentração capaz de causar a perda da viabilidade em 50% dos macrófagos
 ND – não determinado

Os valores obtidos nos ensaios da citotoxicidade (CC₅₀) foram comparados aos valores de IC₅₀ obtidos no ensaio *in vitro* das formas promastigotas, permitindo a determinação do índice de seletividade (IS), que informa o quanto a molécula é seletiva para o parasito em relação às células de mamífero. Para Bézivin e colaboradores (2003), o índice de seletividade é considerado significativo para valores maiores que 3. Davanço *et al.* (2011) considera que valores maiores que 10 podem ser indicativos de alta seletividade.

A análise do índice de seletividade demonstrou que o composto LQIT/GQS-90 além de ser o mais eficaz na inibição do parasita, foi também o mais seletivo, exibindo um IS bastante significativo de 20,28. Esse dado reflete a alta seletividade desta molécula com relação à linhagem de células normais, demonstrando que o composto testado é mais citotóxico para a linhagem de células de *L. infantum*. A molécula LQIT/GQS-91 apresentou uma CC₅₀ reduzida e conseqüentemente resultou numa baixa seletividade, expressando um IS no valor de 1,16. Por fim, o derivado LQIT/GQS-93, apresentou a maior CC₅₀, entretanto, devido a sua IC alcançou um IS de 2,26. Este valor indica que o composto é cerca de duas vezes mais ativo na linhagem de células de *L. infantum* do que em células macrofágicas.

Tabela 6: Índice de seletividade dos derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxi-tiazolidin-2-onas

Compostos	µM		IS
	IC ₅₀	CC ₅₀	
GQS-90	0,42 ± 0,15	8,52 ± 1,36	20,28
GQS-91	13,51 ± 2,63	15,80 ± 0,20	1,16
GQS-93	23,96 ± 1,44	54,34 ± 2,86	2,26

Legenda: IC₅₀ – concentração que inibe 50% do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum*

CC₅₀ – concentração capaz de causar a perda da viabilidade em 50% dos macrófagos

ISe (Índice de seletividade) – CC₅₀ Macrófagos/IC₅₀ Promastigotas

O mecanismo de ação pelo qual atuam os derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxi-tiazolidin-2-onas *in vitro* ainda é incerto. Estudos mais aprofundados utilizando técnicas de microscopia eletrônica são necessários, para a verificação de possíveis alvos intracelulares de ação dos compostos. Na literatura relata-se que compostos com potencial anti-leishmania podem causar alterações morfológicas da mitocôndria, desorganização celular, alterações nucleares significativas, esvaziamento do citoplasma, enrugamento e comprometimento da membrana celular e diminuição do flagelo (ALIANÇA *et al.*, 2014; ROTTINI, *et al.*, 2015). Todos estes efeitos indicam a perda da viabilidade e conseqüentemente a morte celular (MENNA-BARRETO,

2009). Os tripanosomatídeos como o *Trypanosoma cruzi* e as diversas espécies de *Leishmania* possuem uma mitocôndria única com características bastante divergentes em relação às células de mamíferos, e que são de extrema importância para a movimentação e multiplicação do parasita. (FIDALGO & GILLE, 2011). Por esse fato, estas organelas tornam-se importantes alvos biológicos para a ação de quimioterápicos leishmanicidas. Alterações na mitocôndria de tripanosomatídeos causadas por drogas são comumente descritas na literatura, mostrando que esta organela é particularmente sensível a ação de quimioterápicos (SANTARITA *et al.*, 2006).

Conclusões



6. CONCLUSÕES

- Os compostos sintetizados tiveram suas estruturas evidenciadas e comprovadas pelas técnicas de análises espectrofotométricas no infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono treze
- Os compostos empregados quanto à avaliação leishmanicida *in vitro* frente às formas promastigotas de *L. infantum* mostraram resultados promissores sendo necessários ensaios mais aprofundados com o objetivo de confirmar a atividade *in vitro* do LQIT/GQS-90, melhor composto avaliado nesse estudo, assim como determinar o mecanismo de ação do derivado frente à cepa utilizada.
- O ensaio de citotoxicidade dos compostos GQS-90, GQS-91 e GQS-93 em macrófagos mostraram valores de CC_{50} que variaram de 8,52 a 54,34 μM .
- Os derivados testados mostraram-se seletivos em relação às formas promastigotas de *L. infantum* e as células de macrófagos, sendo que o composto LQIT/GQS-90 demonstrou ser mais o seletivo visto seu alto potencial frente ao parasito.

Referências



REFERÊNCIAS

ALIANÇA, A. S. S. Estudo da atividade biológica de produtos naturais de macroalgas do litoral nordestino sobre *Leishmania amazonensis*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação de em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz. 2012.

ALIANÇA, A. S. S.; ANJOS, K. F.; REIS, T. N. V.; HIGINO, T. M.; BRELAS-DE-CASTRO, M. C.; BIANCO, E. M.; FIGUEIREDO, R. C. The in vitro biological activity of the Brazilian brown seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. *Molecules*, v. 19, n. 9, p. 14052-14065, 2014.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M.; WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.

ALVES, E. B. Fatores de risco para inciência de infecção por *Leishmania infantum* na cidade de Teresina, Piauí. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, UFRJ. 2012.

AMATO, V. S. et. al. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. *Acta tropica*, v. 105, n. 1, p. 1-9, 2008.

ANDRADE, A. M. C.; LIMA, W. T.; ROCHA, M. P. A.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; BARBOSA FILHO, J. M.; GÓES, A. J. S.; PITTA, I. R. Synthesis and structural study os substituted thioxothiazolidinones and thioxoimidazolidinones. *Bollettino chimico farmaceutico*, v. 141, n. 6, p.428-433, 2002.

ANDRADE, C. R.; KIDO, E. A.; LUNA, L. K. S.; MELO, M. A.; ANDRADE, P. P.; BALBINO, V. Q. Manual de Leishmaniose, Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

ANDRADE, T. A. S. Soroprevalência, fatores e aspectos clínicos associados à leishmaniose visceral canina em Goiana, Estado de Pernambuco, Brasil. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, 2014.

BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. *Gazeta Médica da Bahia*. V. 75, n.1, p.24-34. 2005.

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*, v. 25, n. 2, p.203-211. 2007.

BALANÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R.M; CUBRÍA, J.C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. *General Pharmacology*, v.30, n.4, p. 435-443. 1998.

BARBOSA, I. R.; COSTA, I. C. C. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Scientia Medica (Porto Alegre)*, v. 23, n. 1, p. 5-11. 2013.

BARREIRO, E. J. A química medicinal e o paradigma de composto-protótipo. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 1, p. 26-34, 2009.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. Arimed Editora, 1ed. 243p. 2002.

BARROS, C.D.; AMATO, A.A.; OLIVEIRA, T.B.; IANNINI, K.B.R.; SILVA, A.L.; SILVA, T.G.; LEITE, E.S.; HERNANDES, M.Z.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; NEVES, F.A.R.; PITTA, I.R. Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR γ ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.18, p. 3805-3811, 2010.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.2, n.10, p.313. 2008.

BÉZIVIN, C.; TOMASI, F.; LOHÉZIE-LE, D.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine.*; v.10, p. 499-503, 2003.

BOMBARDIERI, C. C.; TAURINS, A. The mannich condensation of compounds containing acidic imino groups. *Canadian Journal of Chemistry*, v.33, p.923-928, 1955.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2 ed., 2007

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. AIDS 2009: versão preliminar. *Boletim Epidemiológico: AIDS/DST*, 6(1):3-68 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. AIDS 2010. *Boletim Epidemiológico*. 8(1):3-24. 2010.

BRASIL, Ministérios da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1 ed. Brasília: Ministérios da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

BUFFET, P. Leishmaniose: Informações sobre o tratamento. Le Group Serge Lasky. 1ª Ed. 2011.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, Feridas bravas e Kalazar. *Ciência e Cultura, Endemias/Artigos*, São Paulo 55(1): 34-37, 2003.

CARVALHO, L. P.; PASSOS, S. P.; JESUS, A. R. Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 75, n. 1, p. 57-65, 2005.

CAVALCANTE, I. J. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral no Brasil de 2011 a 2011, no estado do Ceará de 2007 a 2011 e perfil da adenosina desaminase em pacientes acometidos pela doença. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, UFCE. 2014.

CÉSAR, F. A.; RUDNICKI, M.; DE LAS HERAS, B.; BOSCÁ, L.; Lima, M. C.A.; PITTA, I. R.; ABDALLA, D. S.P. New indole-thiazolidine attenuates atherosclerosis in LDLr^{-/-} mice. *Vascular Pharmacology*, v. 15, p. 1538-1891, 2015.

CHANDRAPPA, S.; BENAKA PRASAD, S. B.; VINAYA, K.; KUMAR ANANDA, C. S.; THIMMEGOWDA, N. R.; RANGAPPA, K. S. Synthesis and in vitro proliferative activity against human câncer cell lines of novel 5-(4-methylbenzylidene)-thiazolidine-2,4-diones. *Invest New Drug*, v. 26, p. 437-444, 2008.

COSTA, D. L.; CARREGARO, V.; LIMA-JÚNIOR, D. S.; SILVA, N. M.; MILANEZI, C. M.; CARDOSO, C. R.; GIUDICE, A.; JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P.; SILVA, J. S.. BALB/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of *Leishmania braziliensis* present severe lesions due to IL-4 production. *PloS Neglected Tropical Diseases*, v.5, n. 3, p. 965, 2011.

COSTA, L. B. Avaliação in vitro da atividade leishmanicida de *Dioclea grandiflora* (Fabaceae) do nordeste brasileiro. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Patologia, UFPE. 2011.

CUNHA, S.; SANTANA, L.L.B. Condensação de Knoevenagel de aldeídos aromáticos com o ácido de meldrum em água: uma aula experimental de química orgânica verde. *Química Nova*, v. 35, n.3, p. 642-647, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão Geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.39, n.4, p.352-356, 2006.

DAVANÇO, M. G.; AGUIAR, A. C. C. ; DOS SANTOS, L.; PADILHA, E. C.; CAMPOS, M. L.; DE ANDRADE, C. R.; DA FONSECA, L. M.; DOS SANTOS, J. L.; CHIN, C. M. KRETTLI, A. U. ; PECCININI, R. G.. Evaluation of Antimalarial Activity and Toxicity of a New Primaquine Prodrug. *Plos One*, v. 9, p. e105217, 2014.

DAVID, C.V.; CRAFT, N. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*, v. 22, p. 491-502. 2009.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N., THIEMANN, O. H., OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos *Química Nova*, v. 32, n.9, p. 1-14, 2009.

DOMINIQUE, B.; LAMY, S.; LORD-DOFOUR, S.; JACKSON, J.; BEAULIEU, E.; COTE, M.; MOGHRABI, A.; BARRETTE, S.; GINGRAS, D.; BELIVEAU, R. Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study. *Food Chemistry*, v. 112, n. 5, p. 374-380, 2009.

DU, X.; GUO, C.; HANSSEL, E.; DOYLE, P.; CAFFREY, C.; HOLLER, T.; MCKERROW, J.; COHEN, F. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 13, p. 2695-2707, 2002.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 18, n. 1, p. 71- 80, 2004.

FERNANDES, A. P.; ANDRADE, H. M.; MELO, M. N.; COELHO, E. A. F.; AVELAR, D.; GAZZINELLI, R. T. Leishmaniose visceral canina: novos antígenos para diagnósticos e vacinas. *Revista de Saúde Pública do SUS/MG*, v. 1, p. 71-72, 2013.

FERRAZ, H. M. C.; PEREIRA, F. L. C. Síntese de enaminonas. *Química Nova*, v. 27, n.1, p.89-95, 2004.

FERREIRA, M. G. P. A.; FATTORI, K. R.; SOUZA, F.; LIMA, V. M. F. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Veterinary Parasitology*, v. 165, n. 1-2, p. 150-154, 2009.

FREITAS, E.; MELO, M. N.; COSTA-VAL, A. P.; MICHALICK, M. S. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, v. 137, n. 1-2, p. 159-167, 2006.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R.R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules*, 14, p. 2317-2336. 2009.

FIDALGO, L.M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharmaceutical Research*, v. 28, n.11, p. 2758-2770, 2011.

GARCIA, G. M.; OLIVEIRA, L. T.; PITTA, I. R. ; LIMA, M. C. A.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; ABDALLA, D. S. P.; MOSQUEIRA, V. C. F.. Improved nonclinical pharmacokinetics and biodistribution of a new PPAR pan-agonist and COX inhibitor in nanocapsule formulation. *Journal of Controlled Release*, v. 209, p. 207-218, 2015.

GENARO, O.; REIS, A. B. Leishmaniose tegumentar americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARD, P. M.; VITOR, R. W. A. Parasitologia Humana. 11 ed. São Paulo: Atheneu, Cap. 8, p. 47-64. 2005.

GHOSH, P.; MANDAL, A.; DEY, S.; PAL, C. Synthesis and in vitro Screening of 29, 30-Dibromo-28-oxoallobetulin against Parasitic Protozoans, Leishmania donovani and Leishmania Major. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 77, n.2, p. 202-207, 2015.

GOES, M. A. O.; MELO, C. M.; JERALDO, V. L.S. Time series of visceral leishmaniasis in Aracaju, state of Sergipe, Brazil (1999 to 2008): human and canine aspects. Revista Brasileira de Epidemiologia, v.15 p.298-307, 2012.

GOH, T. B.; KOH, R. Y.; YAM, M. F.; AZHAR, M. E.; MORDI, M. N.; MANSOR, S. M. 5-Methoxytryptamine reacts with natural food flavour to produce 6-methoxy tetrahydro-b-carbolines: In vitro investigation of their antioxidant and cytotoxicity properties. Food Chemistry, v. 183, p. 208-216, 2015.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GOUVEIA, F.L.; OLIVEIRA, R. M. B; OLIVEIRA, T.B.; SILVA, I.M.; NASCIMENTO, S.C.; SENA, K.; ALBUQUERQUE, J. F. C. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of some 5-arylidene-4-thioxo-thiazolidine-2-ones. Eur J Med Chem, v. 44, p. 2038-2043, 2009.

HANDZLIK, J.; SZYMANSKA, E.; WOJCIK, R.; DELA, A.; JASTRZEBSKA-WIESEK, M.; KAROLAK-WOJCIECHOWSKA, J.; FRUZINSKI, A.; SIWEK, A.; FILIPEK, B.; KIEC-KONONOWICZ, K. Synthesis and SAR-study for novel arylpiperazine derivatives of 5-arylidenehydantoin with α_1 -adrenoceptor antagonistic properties. Bioorganic & Medicinal Chemistry, p. 4245–4247, v. 20, 2012.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet*. 354(9185): p. 1191-1199. 1999.

JORDA, R.; SACERDOTI-SIERRA, N.; VOLER, J.; HAVLÍČEK, L.; KRÁCALÍKOVÁ, K.; NOWICKI, M. W.; NASEREDDIN, A.; KRYSTOF, V.; STRNAD, M.; WALKINSHAW, M. D.; JAFFE, C. L. Anti-leishmanial activity of disubstituted purines and related pyrazolo[4,3-d]pyrimidines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.21, n. 14, p. 4233-4237, 2011.

KAROLAK-WOJCIECHOWSKA, J.; SZYMANSKA, E.; MROZEK, A.; KIEC-KONONOWICZ, K. Crystallographic and spectroscopic studies of 5-arylidene-2-amino-imidazol-4-ones. *Journal of Molecular Structure*, p. 126–134, v. 930, 2009.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, London, v. 11, n. 9, p.604-615, 2011.

KIER, L. B.; HALL, L. H. Bioisosterism: Quantitation of Structure and Property Effects. *Chemistry & Biodiversity*, v. 1, n. 1, p.138-15, 2004.

KON K, IKEJIMA K, HIROSE M, YOSHIKAWA M, ENOMOTO N, KITAMURA T, TAKEI Y, SATO N. Pioglitazone prevents early-phase hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 291, n. 1, p. 55-61, 2002.

KOTA, B. P.; HUANG, T. H.; ROUFOGALIS, B. D. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*, v. 51, n. 2, p. 85-94, 2005.

LAGES, R. C.; CASTRO, J. A. F.; MONTE, S. J. H.; MONTE NETO, J. T.; ANDRADE, H. M. Leishmaniose visceral e transplante renal: relato de caso, estudo prospectivo de doadores e receptores e proposta de diagnóstico precoce da infecção em área endêmica. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 26, p. 51-56, 2004.

LIESEN, A. P.; AQUINO, T.M.; GÓES, A J. S.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; ALVES, A. J. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-tiazolidinonas. *Quimica Nova*, v. 31, n. 2, p.369-376, 2008.

LIMA, E.B.; MOTTA, J.O.C.; PORTO, C.; SAMPAIO, R.M.R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.82, n.2, p. 111-124. 2007.

LIMA, J.G. Alguns Aspectos Químicos do Anel Tiazolidina-2,4-diona. *Revista da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Série Ciências Exatas da Terra*, v. 18, p.1-8, 1998.

LISBOA, J. L. C.; COSTA, G. S.; RAMOS, E. M. L. S.; ARAÚJO, A. R.; SOUZA, V. M. P. Determinantes letais contribuintes para óbitos por leishmaniose visceral. *Revista Estatística, UFOP*, V. 3, p. 358-363. 2014.

LIU, B.; LIU, B.; MOTYKA, A. S.; AGBO, E. E.; ENGLUND, P. T. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends in Parasitology*, 21(8):363-368, 2005.

LIU, K.; GUO, T. L.; HAIT, N. C.; ALLEGOOD, J.; PARIKH, H. I.; XU, W.; KELLOGG, G. E.; GRANT, S.; SPIEGEL, S.; ZHANG, S. Biological Characterization of 3-(2-amino-ethyl)-5-[3-(4-butoxyl-phenyl)-propylidene]-thiazolidine-2,4-dione (K145) as a Selective Sphingosine Kinase-2 Inhibitor and Anticancer Agent. *PLoS One*, v. 8, n. 2, p. 1-13, 2013.

LOISEAU, P. M.; GUPTA, S.; VERMA, A.; SRIVASTAVA, S.; PURI, S. K.; SLIMAN, F.; NORMAND-BAYLE, M.; DESMAELE, D. In vitro activities of new 2-substituted quinolines against *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, n. 4, p. 1777-1780, 2011.

LÓPEZ-PEÑA, M.; ALEMAÑ, N.; MUÑOZ, F.; FONDEVILA, D.; SUÁREZ, M. L.; GOICOA, A. Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. *Acta Veterinaria Scandinava*, v. 51, n.20, p. 20-23, 2009.

MACHADO, C. M.; MARTINS, T. C.; COLTURATO, I.; LEITE, M. S.; SIMIONE, A. J.; SOUZA, M. P.; MAUAD, M. S.; COLTURATO, V. R. Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of a brazilian HSCT Center. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.51, n.6, p.309-324, 2009.

MAIA, C. S.; PIMENTEL, D. S.; SANTANA, M. A.; OLIVEIRA, G. M.; PEDROSA, N. A.; NASCIMENTO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. Análise espacial da leishmaniose visceral americana no município de Petrolina, Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*, v.10, n.18,p.167 – 176. 2014.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, n.12, p.2941-2947. 2008.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A., *Comp. Biochem. Phys. Part A*, 146: 601, 2007.

MENNA- BARRETO, R. F.; SALOMÃO, K.; DANTAS, A. P.; SANTA-RITA, R. M.; SOARES, M. J.; BARBOSA, H. S.; CASTRO, S. L.. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron*, Oxford, v. 40, n. 2, p. 157-168, 2009.

MICHELETTI, A. C.; BEATRIZ, A. Progressos recentes na pesquisa de compostos orgânicos com potencial atividade leishmanicida. *Revista Virtual de Química*, v. 4, n. 3, p. 268-286. 2012.

MIOLO, L. M. F. Síntese de tiazolidina-2-tio-hidantoína e seus derivados e estudo de suas propriedades farmacológicas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

MIRANDA, G. M. D. Leishmaniose visceral em Pernambuco: a influência da urbanização e da desigualdade social. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, 2008.

MONTANARI, C. A. Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. *Química Nova*, v.18, n. 1, p. 56-64, 1995.

MOREIRA, T. L.B.; BARBOSA, A. F. S.; SANTOS, P. V.; HENRIQUES, C.; PONS, A. R.; GALDINO, S. L.; LIMA, M. C. A.; PITTA, I. R.; SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U. Effect of thiazolidine LPSF SF29 on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. *Internacional Journal of Antimicrobial Agents*, v. 41, p.183-187, 2013.

MOREIRA, T. L. B.; BARBOSA, A. F. S.; SANTOS, P. V. et al. Effect of thiazolidine LPSF SF29 on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 41, n.2, p. 183-187, 2013.

MOURÃO, R. H.; SILVA, T. G.; SOARES, A. L. M.; VIEIRA, E. S.; SANTOS, J. N.; LIMA, M. C. A.; LIMA, V. L. M.; GALDINO, S. L.; BARBE, J.; PITTA, I. R. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 40, p. 1129-1133, 2005..

MURRAY, H.W; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; Saravia, N.G. Advances in Leishmaniasis. *Lancet*, 366, p. 1561 – 1577. 2005.

NARVÁEZ, A. J. R. Relação entre estrutura química e atividade biológica nos fármacos esquistossomicidas. *Química Nova*, v.6, n.4 p.134-140.

NAUCKE, T. J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasites & Vectors*, v. 5, p. 67, 2012.

NEVES, L. O.; TALHARI, A. C.; GADELHA, E. P. N.; SILVA JÚNIOR, R. M.; GUERRA, J. A. O.; FERREIRA, L. C. L.; TALHARI, S. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 6, p. 1092-1101, 2011.

NUNES, W. S.; ARAUJO, S. R.; CALHEIROS, C. M. L.. Epidemiological profile of leishmaniasis at a reference service in the state of Alagoas, Brazil, from january 2000 to september 2008. *Braz J Infect Dis*, v. 14, n. 4, p. 342-345, 2010.

NWAKA, S.; RAMIREZ, B.; BRUN, R.; MAES, L.; DOUGLAS, F.; RIDLEY, R. Advancing drug innovation for neglected diseases - criteria for lead progression. *PLoS Negl. Trop. Dis.* v. 3, n. 8, p. e440, 2009.

OH, S.; KIM, S.; KONG, S.; YANG, G.; LEE, N.; HAN, D.; GOO, J.; SIQUEIRA-NETO, J. L.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; SONG, R. Synthesis and biological evaluation of 2,3-dihydroimidazo[1,2-a]benzimidazole derivatives against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 84, p. 395-403. 2014.

OLIVEIRA, J.; SILVA, A.; JUNIOR, A.; SANTIAGO, E.; OLIVEIRA, S.; SILVA, V.; SILVA, A.; BARROS, A.; PEREIRA, V.; PITTA, I.; LIMA, M. C. A. Synthesis and Evaluation of the Schistosomicidal and Trypanocidal Properties of Thioxo-

Imidazolidines and Thiazolidin-2,4-Diones. *British Journal of Pharmaceutical Research*, v. 7, p. 386-400, 2015.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. Fleas and ticks as vectors of *Leishmania* spp. to dogs: caution is needed. *Veterinary Parasitology*, v. 168, n. 102, p. 173-174, 2010.

PANDEY, Y.; SHARMA, P. K.; KUMAR, N.; SINGH, A. Biological Activities of thiazolidine – A Review, *International Journal of PharmTech Research*, v. 3, n.2, p. 980-985, 2011.

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M .A.; OSELKA, G. W. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *Journal of Pediatrics*, v. 78, n.2, p.120-127. 2002.

PAULA, F. R. QSPR/SAR em derivados 5-nitro-heterocíclicos com atividades antichagásica. Estudo das relações entre o potencial de redução do grupo nitro e propriedades físico-químicas. Doutorado em Tecnologia Químico-Farmacêutica, 2007.

PAULA, F.R.; SERRANO, S.H.P.; TAVARES, L.C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p.1013-1020, 2009.

PAZ, G. F.; RIBEIRO, M. F.; MICHALSKY, E. M.; LIMA, A. C. V. M. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; BARATA, R. A.; FORTESDIAS, C. L.; DIAS, E. S. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*, v. 106, n. 2, p. 523-528, 2010.

PEDROSA, C. M.; ROCHA, E. M. Clinical and epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in children up to 15 years of age in Alagoas, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v.37, n.4.p.300-304. 2004.

PEREIRA, D. T. M. Síntese, caracterização estrutural e atividade antiinflamatória de derivados tiazolidínicos e imidazolidínicos. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, UFPE. 2003.

PERÉZ, J. A. G. Panorama actual de La química farmacêutica. Universidad de Sevilla, Secretariado de Publicaciones, 2 ed, 384p. 2004.

PLANO, D.; BAQUEDANO, Y.; MORENO-MATEOS, D.; FONT, M.; JIMENEZ-RUIZ, A.; PALOP, J. A.; SANMARTIN, C. Selenocyanates and diselenides: a new class of potent antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 8, p. 3315-3323. 2011.

POLJSAK, B.; SUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetics antioxidants. *Oxidative Medicinal and Cellular Longevity*, p. 1-11, 2013.

PRASAD R, KUMAR R, JAISWAL BP, SINGH UK. Miltefosine: An oral drug for Visceral Leishmaniasis. *Indian Journal of Pediatrics*, v.71, p.143-4, 2004.

PUROHIT, S. S.; ALMAN, A.; SHEWALE, J. Synthesis & antimicrobial activity of a new series of 3, 5-disubstituted thiazolidine-2, 4-diones. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 4, n.3, p. 273-276, 2012.

RAMIREZ-MACIAS, I.; MARÍN, C.; SALAS, J. M.; CABALLERO, A.; VILLEGAS, N.; RODRÍGUEZ-DIEGUEZ, A.; BAREA, A.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Biological activity of three novel complexes with the ligand 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one against *Leishmania* spp.. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, n.4, p.813-819, 2011.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESUS, M. N.; MARZAL, P. C.; ANDRADE JUNIOR, H. F.; TEMPONE, A. G. Antimoniais

empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. Química nova, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RAWAL, R. K. TRIPATHI, R.; KATTI, S. B.; PANNECOUQUE, C.; DE CLERQ, E. Design, synthesis, and evaluation of 2-aryl-3-heteroaryl-1, 3-thiazolidin-4-ones as anti-HIV agents. Bioorganic Medicinal Chemistry. V. 15, n. 4, p. 1725-1731

RÊGO, M. J. B. M.; GALDINO-PITTA, M. R.; PEREIRA, D. T. M.; SILVA, J. C.; RABELLO, M. M.; LIMA, M. C. A. ; HERNANDES, M. Z.; PITTA, I. R. ; GALDINO, S. L.; ROCHA PITTA, M. G. . Synthesis, in vitro anticancer activity and in silico study of new disubstituted thiazolidinedione derivatives. Medicinal Chemistry Research (Print), v. 1, p. 1-9, 2014.

REY, L. Parasitologia. 3 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2001.

RODRIGUES, L. F. Avaliação da atividade in vivo do antimoniato de meglumina e de sua associação com o tratamento tópico sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2012.

ROMERO, S. E. G. Informe del evento leishmaniasis, hasta el período epidemiológico doce, Colombia, 2014. Instituto Nacional de Salud, Vigilancia y Analisis Del riesgo em Salud Publica, v. 2, p. 1-27. 2014.

ROTTINI, M. M.; AMARAL, A. C. F.; FERREIRA, J. L.; SILVA, J. R. A.; TANIWAKI, N. N.; SOUZA, C. S. F.; D'ESCOFFIER, L. N.; ALMEIDA-SOUZA, F.; HARDOIM, D. J.; COSTA, S. C. G.; CALABRESE, K. S. *In vitro* evaluation of (-) α -bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*. Experimental Parasitology, v. 148, p. 66-72, 2015.

SANTA-RITA, R. M.; HENRIQUES-PONS, A.; BARBOSA, H. S.; CASTRO, S. L. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54, n. 4, p.704-710, 2004.

SANTANA, J.S.; SILVA, A. R.; CAVALCANTE, M. N.S.; SILVA, B. T. F.; MACHADO, S. P.; GONÇALVES, E. G. R. Condições socioeconômicas, estado nutricional e consumo alimentar de crianças com Leishmaniose visceral atendidas em serviço público de saúde da cidade de São Luís, Maranhão, Brasil. *Cadernos de Pesquisa*, v.16, n. 2., p. 16-55, 2009.

SANTIAGO, E.F.; OLIVEIRA, S. A.; FILHO, G. B. O.; MOREIRA, D. R. M.; GOMES, P. A. T.; SILVA, A. L.; BARROS, A. F.; SILVA, A. C.; SANTOS, T. A. R.; PEREIRA, V. R. A.; GONÇALVES, G. G. A.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C., WANDERLEY, A. G.; LEITE, A. C. L. Evaluation of the anti-*Schistosoma mansoni* activity of thiosemicarbazones and thiazoles. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 58, n. 1, p. 352, 2014.

SANTIN, J. R., UCHÔA, F. D.; LIMA, M. C.; RABELLO, M. M.; MACHADO, I. D.; HERNANDES, M. Z.; AMATO, A. A.; MILTON, F. A.; WEBB, P.; NEVES, F. D. E. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; FARSKY, S. H. Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor. *European Journal of Pharmaceutical Science*, v. 48, n. 5, p. 689-697, 2013.

SANTOS, C. A. C. Percepção, epidemiologia e aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina em área urbana do estado de Pernambuco. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2006.

SANTOS, L. C.; UCHOA, F. T.; CANAS, A. R. P. A.; SOUSA, I. A.; MOURA, R. O.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; BARBE, J. Synthesis and

antiinflammatory activity of new thiazolidine-2,4-dione, 4-thioxothiazolidinones and thioxoimidazolidinones. *Heterocyclic Communications*, v. 11, n. 2, p.121-128, 2005.

SANTOS, T. A. B.; YOSHIOKA, M. K.; MIYAGUI, M. L. Leishmaniose visceral. *Publicações em medicina veterinária e zootecnia*, 2(25): 260. 2008.

SÃO PAULO. Secretaria de estado da saúde do estado de São Paulo. II Informe técnico: Leishmaniose Visceral Americana. São Paulo, 2003.

SILVA FILHO, J. Estudo químico e biológico de derivados da tiazolidina-2,4-diona e 4-tioxo-tiazolidina-2-ona. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, UFPE. 2004.

SILVA, A. K. S. E. ; TORRES, D. O. C. ; GOMES, F. O. S. ; SILVA, B. S. ; RIBEIRO, E. L. ; OLIVEIRA, A. C. ; SANTOS, L. A. M. ; LIMA, M. C. A.; PITTA, I. R.; PEIXOTO, C. A. . LPSF/GQ-02 Inhibits the Development of Hepatic Steatosis and Inflammation in a Mouse Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Plos One*, v. 10, p. 123-787, 2015.

SILVA, T. G.; BARBOSA, F. S. V.; BRANDÃO, S. S. F.; LIMA, M. C. S.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; BARBE, J. Synthesis and structural elucidation of new benzylidene imidazolidines and acridinylidene thiazolidines. *Heterocyclic Communications*, v.7, p.523-528, 2001.

SINGH, S. P. Chemistry and biological activity of thiazolidinones. *Chemical Reviews*, v. 81, n. 2, p. 175-203, 1981.

SOLOMON, V. R.; HAG, W.; SRIVASTAVA, K.; PURI, S. K.; KATTI, S. B. Design, synthesis of 4-aminoquinoline-derived thiazolidines and their antimalarial activity and heme polymerization inhibition studies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v.28, n.3, p.619-626, 2013.

SOUSA-GOMES, M. L.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; PELISSARI, D. M.; LIMA JÚNIOR, F. E. F.; SENA, J. M.; CECHINEL, M. P. Coinfecção Leishmania-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 20, n. 4, p. 519-526. 2011.

SOUZA, M. A.; NUNES, R. F. F.; VIANA, T. C.; MARINHO, M. J. M.; MOREIRA, P. V. S. Q.; PEREIRA, W. O. Leishmaniose visceral humana: do diagnóstico ao tratamento. *Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança*. v. 10, n. 2, p. 61-69. 2012.

TENÓRIO, R. P. Síntese de tiossemicarbazonas substituídas e derivados de 4-tioxotiazolidinonas e avaliação in vitro contra *Toxoplasma gondii*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos – UFPE. 2005.

TOCHER, J. H. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. *General Pharmacology: The vascular system*, v. 28, n. 4, p. 485-487, 1997.

TOMASIC, T.; KOVAC, A.; SIMCIC, M.; BLANOT, D.; GRDADOLNIK, S.G.; GOBEC, S.; KIKELJ, D.; MASIC, L.P. Novel 2-thioxothiazolidin-4-one inhibitors of bacterial MurD ligase targeting D-Glu- and diphosphate-binding sites. *European Journal of Medicinal Chemistry*, p. 3964-3975, v. 46, 2011.

UCHÔA, F. T.; SILVA, T. G.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; COSTA, T. D. Preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of thiazolidinone PG15: na anti-inflammatory candidate. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 61, p.339-345, 2009.

VIEGAS-JUNIOR, C.; DANUELLO, A.; SILVA, V. B.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. S. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Current medicinal chemistry*. v. 14, n. 17, p. 1829-1852, 2007

WANG, S. ET AL. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-thiazolidinones containing indolin-2-one moiety as potential antitumor agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, p. 3509-3518, 2011.

WHO. Informe epidemiológico das Américas, Informe Leishmanioses. 2014.

WHO. Leishmaniasis. Em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em 09 maio 2015.

YOSHIDA, T.; AKAHOSHI, F.; SAKASHITA, H. et al. Discovery and preclinical profile of teneligliptin (3-[(2S,4S)-4-[4-(3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-yl)piperazin-1-yl]pyrrolidin-2-ylcarbonyl]thiazolidine): A highly potent, selective, long-lasting and orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 19, p. 5705-5719, 2012.