



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

PAULA ROBERTA DA SILVA

**SÍNTESE, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
LEISHMANICIDA DE NOVOS DERIVADOS INDÓLICOS-
TIOSEMICARBAZÔNICOS**

Recife
2017

PAULA ROBERTA DA SILVA

**SÍNTESE, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
LEISHMANICIDA DE NOVOS DERIVADOS INDÓLICOS-
TIOSEMICARBAZÔNICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica

Orientador(a): Prof(a). Dra. Maria do Carmo
Alves de Lima

Recife
2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Marylu Souza, CRB-4/1564

Silva, Paula Roberta da

Síntese, determinação estrutural e avaliação da atividade leishmanicida de novos derivados indólicos - tiosemicarbazônicos / Paula Roberta da Silva – Recife: A Autora, 2017.

84 f.: il., mapa

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Mestrado em Inovação Terapêutica, 2017.

Inclui referências

1. Leishmaniose 2. Doenças parasitárias – Pesquisa 3. Medicamentos – Desenvolvimento 4. Tiosemicarbazona I. Lima, Maria do Carmo Alves de II. Título.

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-362

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Recife, 13 de fevereiro de 2017

Dissertação de Mestrado definida **APROVADA** em 13 de fevereiro de 2017,
cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE EXAMINADORA INTERNA: Profa. Dra. Maria do Carmo Alves
de Lima (Departamento de antibióticos - Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

PRIMEIRA EXAMINADORA EXTERNA: Profa. Dra. Livia Bandeira Costa
(Centro Universitário Maurício de Nassau)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Túlio Ricardo Couto de Lima
Souza (Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Yuri Miguel Andrade Tavares, “in memoriam”, que muito cedo nos deixou acometido por uma doença negligenciada, sendo minha fonte de inspiração e força para continuar com o trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

À minha mãe científica e orientadora, professora Maria do Carmo Alves de Lima, por toda sua dedicação, trabalho e amizade.

À minha co-orientadora, Prof.^a Dr.^a. Anekécia Lauro da Silva, pela disposição e ajuda durante o desenvolvimento da dissertação.

Aos Prof. Dr. Luiz Alves e Prof. Dr Fabio Brayner do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Pernambuco, por todo apoio científico e orientação na realização dos testes biológicos. Agradeço também aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, em especial a Amanda Aliança, Camila Queiroz, Karla Ribeiro e Ana Paula por toda paciência e ensinamentos nos testes biológicos.

Agradeço também aos meus amigos do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica da UFPE, em especial a Iris Trindade, Mirelly Miranda, Amélia Ribeiro, Kerollainy Santos, Edson Rubens, Luiz Nascimento, Allana Gouveia, Cezar Amorim, Pedro Bomfim e Jamerson de Oliveira por toda colaboração e empenho no desenvolvimento desse trabalho.

Ao amigo Diogo Aires por compartilharem comigo os momentos mais difíceis e por toda ajuda com o trabalho.

As amigas Iris Trindade e Mirelly Miranda, por suportarem ao meu lado os momentos difíceis, pelos cafés, pelo carinho e por todas as palavras amigas.

Aos meus pais: Deise Maria da Silva e Paulo Roberto da Silva, por todo amor e educação, que serviu como suporte para alcançar meus sonhos, e por toda compreensão nas dificuldades.

À toda minha família e amigos que estiveram sempre intercedendo a Deus por mim em todos os momentos de minha vida, em especial a Tarciane Pires e Maria de Lourdes.

A FACEPE pelo suporte financeiro.

“Lutem com determinação, abracem a vida com paixão, percam com classe e vençam com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.”

Charles Chaplin

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença considerada negligenciada, atingindo bilhões de pessoas por ano, causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, é uma doença grave e sistêmica podendo ser letal na falta de um tratamento adequado. Os fármacos utilizados atualmente no tratamento são antimonialato de meglumina e estibogluconato de sódio, anfotericina B, pentamidina e miltefosina. Porém o uso desses medicamentos é limitado devido ao grande número de efeitos adversos, alto custo e o aparecimento de resistência dos protozoários aos fármacos. Devido a esses fatores, surge a necessidade da busca de novos compostos leishmanicidas que sejam mais eficazes e específicos para o parasito, com redução dos efeitos colaterais, de baixo custo e que não induza a resistência. Nesse contexto, as tiossemicarbazonas são importantes compostos devido às suas propriedades químicas e biológicas, como a atividade antiprotozoária. Diante disso foram desenvolvidas novas tiossemicarbazonas substituídas com núcleo indol, obtidas através de uma rota sintética constituída por duas etapas utilizando reações clássicas de adição de Michael e condensação e avaliados quanto a seu potencial citotóxico e atividade leishmanicida in vitro frente as formas promastigotas de *Leishmania infantum*. Os compostos foram caracterizados através de técnicas espectroscópicas convencionais e obtiveram rendimentos satisfatórios. A atividade leishmanicida mostrou-se promissora, todos os compostos foram capazes de inibir as formas promastigotas do parasito com IC₅₀ que variaram entre 1,81 a 9,37 µM, onde os índices de seletividade das melhores moléculas foram de LQIT/PR-09 de 3,98 e LQIT/PR-09 de 4,91. A microscopia eletrônica de varredura mostraram que os compostos foram capazes de alterar a forma do corpo e o flagelo dos parasitos, mostrando que os compostos são potenciais candidatos a fármacos leishmanicidas.

Palavras chaves: Leishmaniose. Tiossemicarbazona. Negligenciada.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease considered neglected, reaching billions of people per year, caused by the protozoan of the genus *Leishmania*, is a serious and systemic disease and can be lethal in the absence of an adequate treatment. The drugs currently used in the antimonial treatment of meglumine and sodium stibogluconate, amphotericin B, pentamidine and miltefosine. However, the use of these drugs is limited due to the large numbers of adverse effects, high cost and the appearance of resistance of the protozoa to the drugs. Due to these factors, the need arises for the search for new leishmanicidal compounds that are more effective and specific for the parasite, with a reduction of side effects, low cost and that does not induce resistance. In this context, thiosemicarbazones are important compounds due to their chemical and biological properties, such as antiprotozoal activity. In view of this, new thiosemicarbazones substituted with indole nuclei were obtained through a synthetic route consisting of two steps using classical Michael addition and condensation reactions and evaluated for their cytotoxic potential and leishmanicidal activity in vitro against the promastigote forms of *Leishmania infantum*. The compounds were characterized by conventional spectroscopic techniques and yielded satisfactory yields. The leishmanicidal activity was promising, all compounds were able to inhibit promastigote forms of the parasite with IC₅₀ ranging from 1.81 to 9.37 μ M, where the selectivity indices of the best molecules were from LQIT / PR-09 3.98 and LQIT / PR-09 of 4.91. Scanning electron microscopy showed that the compounds were able to change the body shape and flagellum of the parasites, showing that the compounds are potential candidates for leishmanicidal drugs.

Keywords: Leishmaniasis. Thiosemicarbazone. Neglected

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Coeficiente de detecção de leishmaniose visceral por município no período de 2000 a 2006.....	26
Figura 2: Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de <i>Leishmania sp.</i>	27
Figura 3: Inseto fêmea de flebotomíneo.....	28
Figura 4: Manifestações da leishmaniose em hospedeiro reservatório (caninos e felinos).....	29
Figura 5: Ciclo de <i>Leishmania sp.</i>	31
Figura 6: Forma da doença: leishmaniose tegumentar cutânea (A) leishmaniose tegumentar mucocutanêa (B) e leishmaniose visceral (C).....	32
Figura 7: Paciente infectado com leishmaniose visceral.....	33
Figura 8: Antimoniais pentavalentes.....	35
Figura 9: Medicamentos de segunda escolha para o tratamento das Leishmanioses.....	37
Figura 10: Estrutura da mitelfosine.....	38
Figura 11: Estrutura da tiossemicarbazona.....	38
Figura 12: Compostos com atividade antituberculoses (a) 4-acetaminobenzaldeído tiossemicarbazona.....	39
Figura 13: Espectro de infravermelho do composto LQIT/PR-02.....	58
Figura 14: : Espectro de RMN ¹ H do composto LQIT/PR-02.....	57
Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura de formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	64
Esquema 1: Diagrama de síntese dos derivados indólicos-tiossemicarbazonicos.....	44

Esquema 2: Mecanismo de formação dos compostos intermediários.....	56
Esquema 3: Mecanismo de formação dos compostos finais.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados físico-químicos dos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos.....	46
Tabela 2: Atividade leishmanicida <i>in vitro</i> dos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos sobre promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	61
Tabela 3: Análise do Índice de seletividade dos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos frente as formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Países com maior incidência de casos de leishmaniose visceral nas Américas, 2001-2014.....	24
Gráfico 2: Casos confirmados de leishmaniose visceral no Brasil no período de 2000 a 2013.....	25

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

BOD	- DEMANDA DE OXIGÊNIO BIOQUÍMICO
CCD	- CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA
CPqAM	- CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
DMSO	- DIMETILSULFÓXIDO
IC ₅₀	- CONCENTRAÇÃO DE INIBIÇÃO DE 50% DO CRESCIMENTO
IS	- ÍNDICE DE SELETIVIDADE
IV	- INFRAVERMELHO
HCl	- ÁCIDO CLORÍDRICO
LC	- LEISHMANIOSE CUTÂNEA
LV	- LEISHMANIOSE VISCERAL
MTT	- BROMETO DE [3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENILTETRAZÓLIO]
NO	- ÓXIDO NÍTRICO
RMN- ¹³ C	- RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13
RMN- ¹ H	- RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO
RPMI	- MEIO DE CULTURA
RIFI	- TESTE DE ANTICORPOS IMUNOFLUORESCENTE
ELISA	- ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA
TAD	- TESTE DE AGLUTINAÇÃO DIRETA
PCR	- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
DNA	- ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
ATP	- TRIFOSFATO DE ADENOSINA
SBv	- ANTIMONIATOS PENTAVALENTES
OMS	- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE
IUPAC	- UNIÃO INTERNACIONAL DA QUÍMICA PURA E APLICADA
GPIT	- GRUPO DE PESQUISA EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA
LQIT/UFPE	- LABORATÓRIO DE QUÍMICA E INOVAÇÃO TERAPÊUTICA
CC ₅₀	- CONCENTRAÇÃO CITOTÓXICA 50%
CO ₂	- DIÓXIDO DE CARBONO

LBCM	- LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
SFB	- SORO BOVINO FETAL
UV	- ULTRAVIOLETA
UFPE	- UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CP	- CISTEÍNAS PROTEASES
PBS	- SALINA TAMPONADA COM FOSFATO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 Leishmaniose.....	23
3.2 Agente Etiológico.....	26
3.3 Vetor e reservatório.....	27
3.4 Ciclo Biológico.....	29
3.5 Patologia.....	31
3.6 Quimioterapia.....	34
3.7 Tiossemicarbazonas.....	38
4 METODOLOGIA	43
4.1 Materiais e Equipamentos.....	43
4.2 Métodos.....	44
4.2.1 Diagrama de síntese e obtenção dos compostos finais.....	44
4.2.2 Procedimento experimental para obtenção de derivados indólicos-tiossemicarbazonicos.....	44
4.3 Análise espectroscópicas.....	45
4.3.1 2-((7-bromo-5-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenilhidrazina carbotioamina (LQIT/ PR-01).....	49
4.3.2 2-((5-bromo-7-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenilhidrazinacarbotioamina (LQIT/ PR-02).....	49
4.3.3 2-((7-bromo-5-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-(4-metoxifenil)hidrazina carbotioamida (LQIT/ PR-03).....	49
4.3.4 2-((5-bromo-7-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-(4 metoxifenil)hidrazina carbotioamida (LQIT/ PR-04).....	50
4.3.5 2-((5-bromo-7-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-(p-tolil)hidrazina carbotioamida (LQIT/ PR-05).....	50
4.3.6 2-((7-bromo-5-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-(p-tolil)hidrazina carbotioamida (LQIT/ PR-06).....	50

4.3.7 2-((5-bromo-7-metil-1H-indol3il)metileno) hidrazinacarbotioamida (LQIT/PR-07).....	51
4.3.8 2-((7-bromo-5-metil-1H-indol-3il)metileno) hidrazinacarbotioamida (LQIT/PR-08).....	51
4.3.9 2-((5-bromo-7-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-(4- etilfenil) hidrazina carbotioamida (LQIT/ PR-09).....	51
4.3.10 2-((7-bromo-5-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-(4etilfenil)hidrazina carbotioamida (LQIT/ PR-10).....	52
4.4 Manutenção das culturas.....	52
4.4.1 Cultivo dos Parasitos.....	52
4.4.2 Cultivo de células Vero.....	52
4.5 Análise da citotoxicidade dos compostos.....	53
4.6 Atividade biológica em ógica em <i>Leishmania infantum</i>	54
4.7 Processamento para a microscopia eletrônica de varredura.....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 Estudo químico.....	56
5.1.1 Mecanismos reacionais das tiossemicarbazonas.....	56
5.1.2 Caracterização dos compostos das tiossemicarbazonas.....	58
5.2 Estudo biológico.....	60
6 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	68

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são um grupo de doenças causadas por agentes infecciosos e parasitários, sendo endêmicas em populações de menor poder aquisitivo, sobretudo na população de países em desenvolvimento. (DE SOUZA et al., 2010). Essas enfermidades não atraem investimentos da indústria farmacêutica, pois a população que acometem não representa fonte de retorno financeiro, por possuírem em sua maioria baixo poder aquisitivo (DON & CHATELAIN, 2009; PECÓUL & ALVARADO, 2014).

Dentre as doenças negligenciadas encontra-se as leishmanioses, um grupo de doenças parasitárias causadas por diversas espécies de parasitos do gênero *Leishmania*, (ASHFORD, 2000; ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003). A patologia apresenta-se de duas formas: a forma tegumentar e a forma visceral, a ultima é considerada a manifestação mais grave da doença, com cerca de aproximadamente 300.000 casos de leishmaniose visceral (LV) ao ano (LAISON & SHAW, 2005; WHO, 2017).

A terapia utilizada para tratamento das leishmanioses é realizada através dos antimoniais pentavalentes, porém, mesmo estando presentes nas unidades de saúde, seu potencial hepato, cardio e nefrotóxico, associado a via de administração parenteral, dificultam o tratamento (BASANO & CAMARGO, 2004). Além disso, o parasita causador da leishmaniose vem desenvolvendo resistência, inibindo a eficácia do medicamento (ROJAS et al., 2006). Portanto é necessário a busca de novas formulações que sejam de fácil administração, tenham efeitos colaterais reduzidos e com melhor custo-benefício (GARNIER & CROFT, 2002).

As tiossemicarbazonas constituem uma classe de moléculas que tem sido amplamente estudadas na química medicinal, devido ao seu baixo custo de síntese e suas extensivas atividades biológicas, sendo utilizada em atividades anti-inflamatórias, antitumorais, antivirais, antibacterianas (MUTHUKUMAR et al., 2008; GLISONI et al., 2012, 2014; SHAO et al., 2014). Estudos também ressaltam a ação antiprotozoária desses compostos demonstradas sobre *Trypanossoma. cruzi*, *Trypanossoma. brucei*, *Leishmania*

sp., *Plasmodium. falciparum* (CAPUTTO et al., 2011; BRITTA et al., 2012; GLINMA et al., 2014; WALCOURT et al., 2013).

Diante da ampla utilização das tiosemicarbazonas a equipe de pesquisa do Laboratório de Química Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco (LQIT/UFPE) resolveu utilizar esta classe de substâncias para a obtenção de novos derivados tiosemicarbazônicos. Os compostos obtidos foram avaliados com relação a citotoxicidade em células de mamíferos, ao seu potencial na atividade leishmanicida em formas promastigotas e análise ultraestrutural.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade de novos derivados Indólicos-Tiossemicarbazônicos candidatos a fármacos leishmanicida.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar novos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos;
- Elucidar as estruturas químicas através das análises espectroscópicas tradicionais: ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , infravermelho e espectrometria de massas;
- Analisar a citotoxicidade dos compostos;
- Avaliar o efeito dos compostos sobre o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania infantum*, através da determinação da IC_{50} ;
- Estimar o Índice de Seletividade dos compostos frente as formas promastigotas de *Leishmania infantum*;
- Analisar os possíveis efeitos dos compostos relacionados sobre as alterações ultraestruturais em *L. infantum* tratadas com os diferentes compostos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos;

Revisão da Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

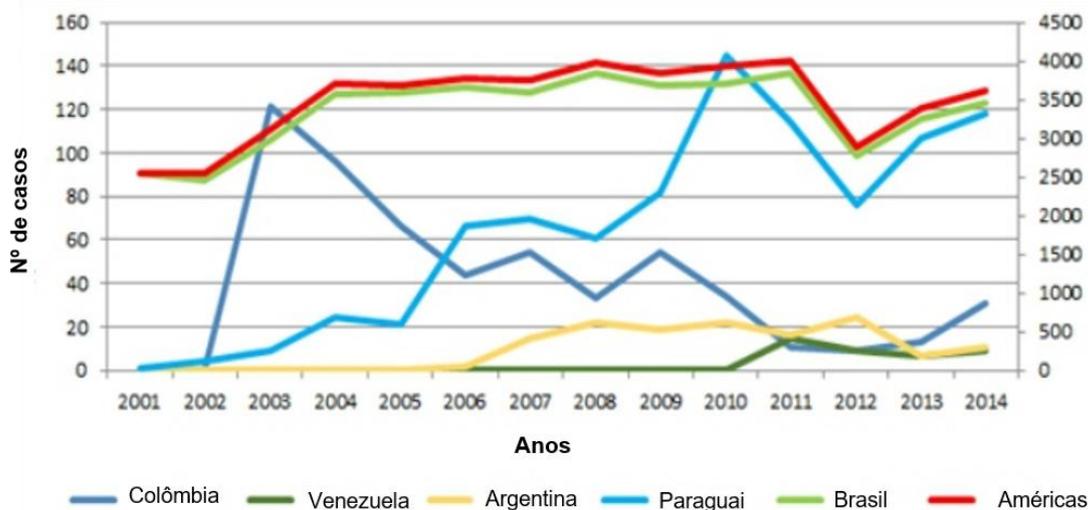
3.1 Leishmaniose

As Leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero leishmania, transmitidas através da picada de insetos flebotomíneos infectados (WHO, 2017). É uma das doenças consideradas negligenciadas no mundo sendo prevalente em regiões tropicais e subtropicais, atingindo principalmente países em desenvolvimento e algumas das regiões mais pobres do planeta (DE SOUZA, 2010). A ocorrência das leishmanioses nessas regiões está relacionada com a desnutrição, deslocamento populacional, aglomeração e condições precárias de habitação, mudanças ambientais devido a urbanização e falta de recursos (DESJEUX, 2004).

Essa patologia é endêmica em 98 países e territórios (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2016), com mais de 1 bilhão de pessoas em risco de infecção. Em 2014, mais de 90% dos novos casos notificados de leishmaniose ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2017). Ocorrendo 300.000 casos estimados, com mais de 20.000 mortes por ano no mundo de leishmanioses visceral e cerca de 0,7 milhão a 1,3 milhão de novos casos anualmente em todo o mundo de leishmaniose tegumentar (WHO, 2016) .

Na América Latina no período de 2001 a 2014 foram relatados 797,849 novos casos de leishmaniose tegumentar com uma média anual de 56.989. No mesmo período foram registrados 48,720 casos de leishmaniose visceral com média anual de 3.480 casos (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2016). A Leishmaniose visceral na América Latina foi relatada em pelo menos 12 países, sendo o Brasil responsável por mais de 90% dos casos registrados, e no cenário epidemiológico o Brasil enquadra-se como país com transmissão em expansão (Gráfico 1) (BRASIL, 2014 a).

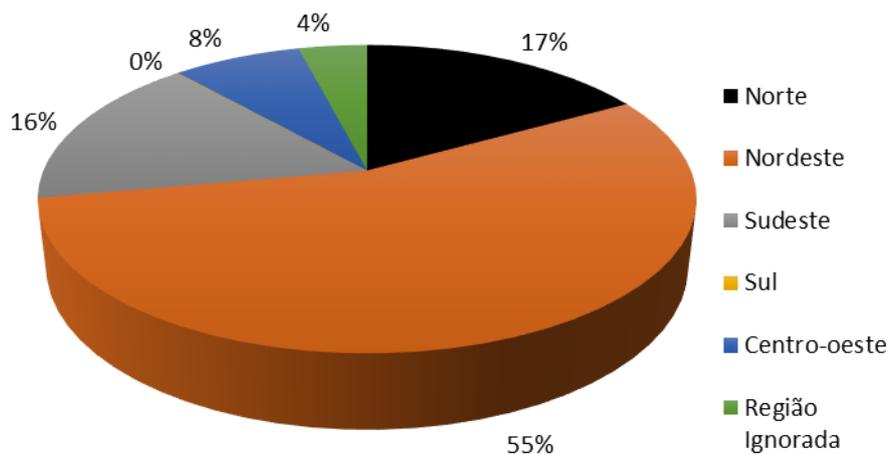
Gráfico 1: Países com maior incidência de casos de leishmaniose visceral nas Américas, 2001-2014.



Fonte: Adaptado de ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2016.

No Brasil são registrados cerca de 3.500 novos casos por ano, ocorrendo em média 2 casos/100.000 habitantes, com a mortalidade aumentando gradativamente ao longo dos anos, sendo a quantidade de casos mais expressivos nas regiões Nordeste (Gráfico 2) (BRASIL, 2014 a; BRASIL, 2014 b). No país a LV acomete pessoas de todas as idades e sexo, em alguns focos urbanos, existe uma tendência de modificação na distribuição dos casos por grupo etário, com ocorrência de altas taxas também no grupo de adultos jovens (SILVA et al., 2001; MIRANDA, 2008; LISBOA, 2014).

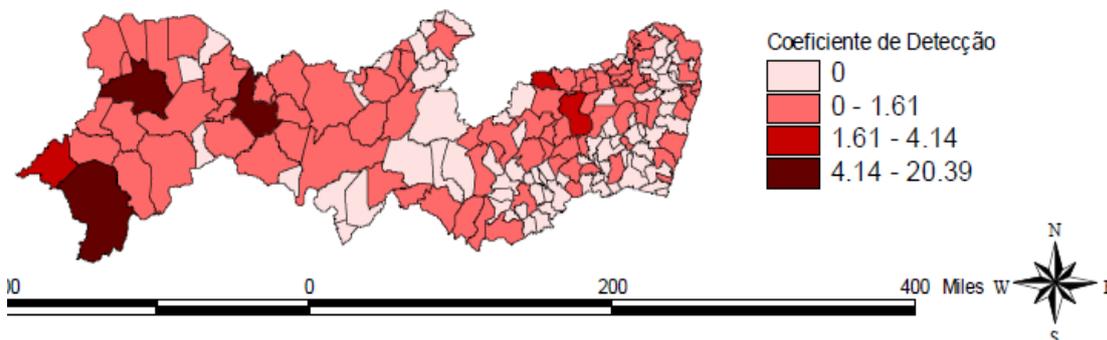
Gráfico 2: Casos confirmados de leishmaniose visceral no Brasil no período de 2000 a 2013.



Fonte: Adaptado de BRASIL (2014 b).

No estado de Pernambuco a LV é distribuída em toda sua extensão, sendo amplamente distribuída na região do agreste e sertão, entretanto regiões como Itamaracá na região metropolitana do Recife também destacam-se pelos altos índices de notificação de casos (TORRES & FILHO, 2006). Foram registrados entre os anos de 1990 a 2001 em Pernambuco, 1.737 casos de leishmaniose visceral (TORRES & FILHO, 2006). Entre os anos de 2000 a 2006, 1.210 casos de LV (Figura 1), sendo a taxa de letalidade para o último período de 5,97% dos casos, onde os maiores coeficiente de casos ocorreram na região metropolitana na Ilha de Itamaracá (5,77/100.000 hab) , na Zona da Mata em Tamandaré (8,64/100.000 hab), no Agreste em Riacho das Almas (20,39/100.000 hab) e no Sertão em Betânia (17,65/100.000 hab) (MIRANDA, 2008).

Figura 1: Coeficiente de detecção de leishmaniose visceral por município, no período de 2000 a 2006.



Fonte: Adaptado de MIRANDA (2008).

Dados recentes da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco (2017) mostram que de 2010 a 2014 foram notificados 1.003 casos de LV, desses 473 casos confirmados com 35 óbitos registrados. A incidência da doença apresentou pouca variação no período de 2010-2013 com média de 0,8 casos/100.000hab, porém em 2014 houve um aumento para 1,9 casos/100.000hab. Nesse período houve uma grande variação na taxa de letalidade atingido seu maior índice em 2010 11,6%.

3.2 Agente Etiológico

Os agentes etiológicos causadores da leishmaniose pertencem ao reino Protista; filo Sarcostigophora; classe Zoomastigophorea; ordem Kinetoplastida; família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania*, sendo os parasitos do complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*, e *Leishmania (Leishmania) infatum* os responsáveis pela transmissão da LV no mundo (NEVES, 2011).

Os protozoários dessa patologia são parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear, são organismos pleomórficos assumindo duas formas: promastigota vivendo no interior do intestino do vetor

e na forma amastigota que residem nos macrófagos multiplicam-se por divisão binária simples (FEITOSA, 2006; SILVA, 2007).

A forma promastigota possui forma alongada com flagelo longo e externo que sempre apresenta medidas iguais ou maiores do que o maior diâmetro do corpo, o núcleo é arredondado e único, o cinetoplasto região especializada da mitocôndria onde está localizado o DNA mitocondrial) localiza-se na região anterior o núcleo. Os amastigotas são as formas arredondadas sem a presença de flagelo externo (flagelo que nunca excede os limites da bolsa flagelar), a forma amastigota pode atingir limites de aproximadamente 1,5 a 3,0 x 3,0 a 6,5 μm , possui único núcleo e cinetoplasto (Figura 2) (GOTO & LINDOSO, 2010).

Figura 2: Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de *Leishmania sp.*



Fonte: Adaptado de ANDRADE et al. (2006).

3.3 Vetor e Reservatório

A transmissão das leishmanioses ocorre através da picada de insetos fêmeas, pois necessitam alimentar-se de sangue para nutrir os ovos em desenvolvimento (ARRUDA, 2010; HARHAY, 2011). Esses insetos são da ordem Díptera, família Psychodidae sub-família *Plebotominae* (REY, 2010; DESJUX, 1996), no qual dois gêneros de vetores são importantes para a transmissão da doença: *Phlebotomus*, responsável pelos transmissores na

África, na Europa e na Ásia; e *Lutzomya*, responsável pela transmissão da leishmaniose nas Américas (WHO, 2017).

Os flebotomíneos são pequenos, atingindo no máximo 0,5 cm (BASANO & CAMARGO, 2004) e de coloração amarelada (Figura 3). No voo e em repouso suas asas são semi-abertas, por isso são conhecidos como mosquito-palha, asa-dura, tatuquiras e birigui (SUCEN, 2001; BRASIL, 2010; RABÊLO, 1999). Os insetos vetores tem atividade crepuscular e noturna, e podem voar centenas de metros. Sua picada pode ser dolorosa, mas pode passar despercebida, confundindo-se com a de mosquito comum (BAILEY & LOCKWOOD, 2007).

Figura 3: Inseto fêmea de flebotomíneo.

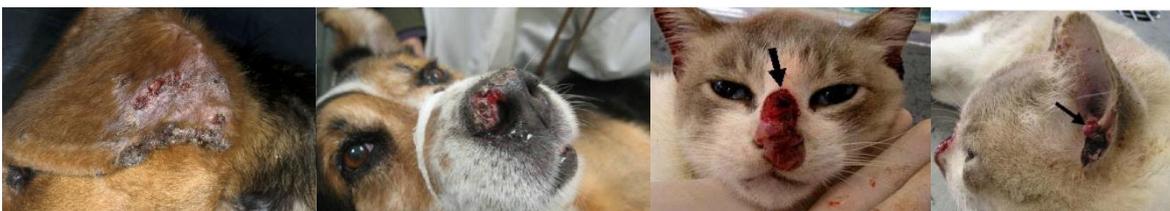


Fonte: Adaptado de BRASIL (2010).

O humano é um hospedeiro acidental da patologia, que tem como hospedeiro principal algumas espécies de animais silvestres e sinantrópicos domésticos (REY, 2010). Os animais domésticos são considerados como reservatórios da leishmaniose, devido a adaptação dos insetos vetores de áreas de mata para regiões rurais e nos anos 80 em áreas urbanas (VIANNIA, 1911). Essa disseminação da doença em áreas urbanas deve-se ao fato do aumento da quantidade de fluxo populacional, devido à urbanização (BRASIL, 2006).

A infecção por leishmaniose em animais domésticos é clinicamente semelhante a infecção em humanos, acometendo as vísceras e mais frequentemente a pele dos animais que desenvolvem os sintomas, atingindo regiões como as mucosas das vias aerodigestivas superiores (Figuras 4) (KRAUSPENHAR et al,2007).

Figura 4: Manifestações da leishmaniose em hospedeiro reservatório (caninos e felinos).



Fonte: Adaptado de SOUZA et al. (2009) e ONLEISH (2015).

3.4 Ciclo biológico

O ciclo da Leishmaniose inicia-se quando a fêmea do flebotomíneo pica um vertebrado mamífero e através do repasto sanguíneo ingere macrófagos contendo a forma amastigota. No intestino médio e anterior do inseto, a forma amastigota tranforma-se em uma forma ovoide com flagelos pequenos e alta divisão celular (promastigostas). Em seguida as formas promastigotas diferenciam-se em uma forma longa que se fixam ao epitélio do vetor através do flagelo pelo hemidesmossomo (paramastigota), essas migram para parte anterior do tubo digestório do inseto e transformam-se em promastigotas alongadas e delgadas (promastigotas metacíclicas), a forma infectiva da leishmania (COSTA et al., 2011; KAYE & SCOTT, 2011).

A transmissão ocorre quando o hospedeiro vertebrado sofre a picada pelo inseto vetor, durante o repasto sanguíneo inoculando as formas metacíclicas, que são fagocitadas pelo sistema mononuclear, diferenciando-se em amastigotas, iniciando assim a fase do desenvolvimento intracelular do parasito (CAMARGO & BARCINSKI, 2003). Na fase inicial da infecção os

neutrófilos, por serem as primeiras células a chegarem no foco da lesão tecidual, fagocitam as formas promastigotas, proporcionam abrigo transitório até a entrada das promastigotas no macrófagos (ONLEISH, 2015).

A infecção do hospedeiro vertebrado é favorecida por componentes presentes na saliva do inseto vetor como anticoagulantes, vasodilatadores, anti agregador plaquetário e substância com ação quimiotática e imunorreguladora que atuam interagindo com macrófagos, aumentando sua proliferação e impedindo a ação efetora dessa célula contra o parasito. O maxadilan, presente na saliva de algumas espécies de *Lutzomyia* é um exemplo de substância vasodilatadora, além disso é responsável pela ação imunomodulatória na célula hospedeira durante a transmissão do parasito (NEVES, 2011).

Após a infecção as formas amastigotas multiplicam-se dentro dos macrófagos, chegando a rompê-los e espalhando-se pelo sistema sanguíneo, reinfectando outras células. Ocasionalmente algumas amastigotas livres ou células infectadas são ingeridas pelos flebotomíneos durante o repasto sanguíneo e transformam-se em promastigotas, reiniciando o ciclo biológico (Figura 5). (CAVALCANTE, 2014, KAYE & SCOTT, 2011).

Figura 6: Forma da doença: leishmaniose tegumentar cutânea (A) leishmaniose tegumentar mucocutanêa (B) e leishmaniose visceral (C).



Fonte: Adaptado de VELOSO (2006) e WHO (2017).

A leishmaniose visceral, é a forma mais severa da parasitose e pode ocasionar a morte dos pacientes quando não são tratados. Também conhecida popularmente como calazar, a LV é uma patologia sistêmica muito grave, com migração dos parasitos para o fígado, baço e medula óssea, podendo levar o paciente a morte (CARVALHO, ARRIBAS & FERREIRA, 2000; HANDMAN, 2000).

As infecções da LV, são dependentes da interação parasito-hospedeiro, resultando em diferentes tipos de manifestações clínicas que irão depender da resposta do organismo infectado. O período de incubação da patologia em seres humanos é bastante variável de 10 dias a 24 meses, sendo em média de 2 a 6 meses (BRASIL, 2014 a).

As manifestações clínicas da LV dividem-se em forma assintomática, forma aguda, forma crônica e dermica pós-calazar (SANTOS & YOSHIOKA, 2008; NEVES, 2011). Sua evolução pode ser crônica, sistêmica e fatal se não tratada, apresentando sinais inespecíficos como febre irregular, anemia, perda de peso progressiva e caquexia (FEITOSA et al., 2000).

A maioria das infecções são assintomáticas, desenvolvendo sintomas pouco específicos, que se manifestam por febre baixa recorrente, tosse seca, diarreia, sudorese e debilidade física. Os indivíduos com a manifestação dessa forma da doença podem apresentar a cura espontânea ou mantêm o parasito por toda vida sem apresentar evolução clínica (REY, 2010; NEVES, 2011).

O período inicial é a fase da patologia denominada por alguns autores de forma aguda, os sintomas são febre alta, palidez, tosse seca e diarreia, em alguns casos pode haver alterações hematológicas e hepatoesplenomegalia discreta. O quadro clínico pode ser confundido com outras parasitoses e doenças febris. Nessa fase é muito frequente o contraste entre cílios e cabelos, o primeiro apresenta-se longo e sedoso, enquanto o segundo apresenta-se seco e quebradiço.(BRASIL,2014a; SANTOS & YOSHIOKA,2008; PEDROSA & ROCHA, 2004).

A forma crônica é caracterizada pela febre irregular, emagrecimento progressivo levando a um quadro de caquexia, associado a dificuldades de andar, palidez, cabelos secos, edema das mãos e pés e o aumento da hepatoesplenomegalia (Figura 7), de modo que o abdômen atinge diversos tamanhos. Pode se ter ainda um quadro de retardo da puberdade e amenorreia.(BACELLAR & CARVALHO, 2005; BRASIL,2014 a; SANTOS, YOSHIOKA & MIYAGUI, 2008;PEDROSA & ROCHA; 2004).

Figura 7: Paciente infectado com leishmaniose visceral no período de estado.



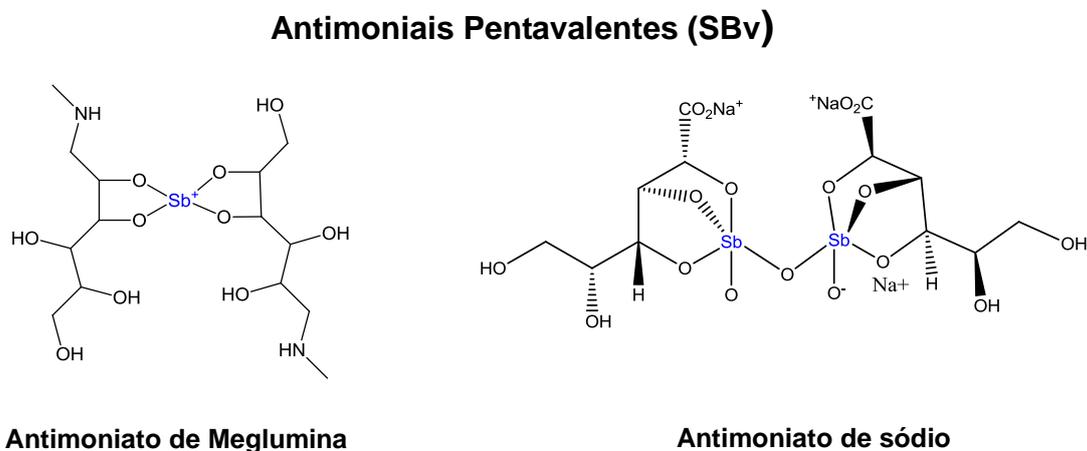
Fonte: Adaptado de TEIXEIRA (2013).

Com a falta de tratamento a doença evolui para o período final, com comprometimento do estado geral do paciente. A desnutrição, evolução dos edemas e hemorragias são agravantes nessa fase, além disso é comum a presença dispnéia de esforço, sopro sistólico plurifocal e insuficiência cardíaca. A pancitopenia periférica com globulinas elevadas é sempre frequente. Nessa fase os pacientes não respondem ao tratamento chegando ao óbito (LISBOA et al., 2014; PASTORINO et al., 2002).

Desnutrição, pacientes imunocomprometidos, a infecção pelo HIV e pacientes receptores de transplante de órgãos sólidos e/ou tecidos são fatores de riscos para infecção da LV e predispõem à doença clínica (WHO, 2010; LAGES et al., 2004; MACHADO et al., 2009).

3.6 Quimioterapia

Os medicamentos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes, comercialmente sob duas formulações: o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®) (Figura 8). Esses compostos são utilizados desde a década de 40 para os tratamentos de todas as formas de leishmaniose, apesar da sua toxicidade, efeitos adversos e via de administração parenteral. (AMATO et al., 2008; BRASIL, 2010; FRÉZARD, DEMICHELI & RIBEIRO, 2009). Os antimoniatos atuam interferindo na bioenergética das formas amastigotas, inibindo a glicólise e oxidação dos ácidos graxos, provocando a redução na produção de ATP e GTP (BRASIL, 2007).

Figura 8: Antimoniais pentavalentes.

Fonte: Adaptado de NAGLE (2014).

No Brasil utiliza-se o antimoniato de meglumina, fármaco obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico e da N-metil-glucamina, essa última é obtida a partir da aminaçãõ redutora da glicose em presença de metilamina, esse medicamento é solúvel em água e pouco solúvel em solventes orgânicos (PASTORINO et al., 2002; RATH et al., 2003). Com o objetivo de padronizar o esquema terapêutico, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose deste antimonial seja calculada em mg/Kg/dia/Sb+5. (BRASIL, 2010; WHO, 2010).

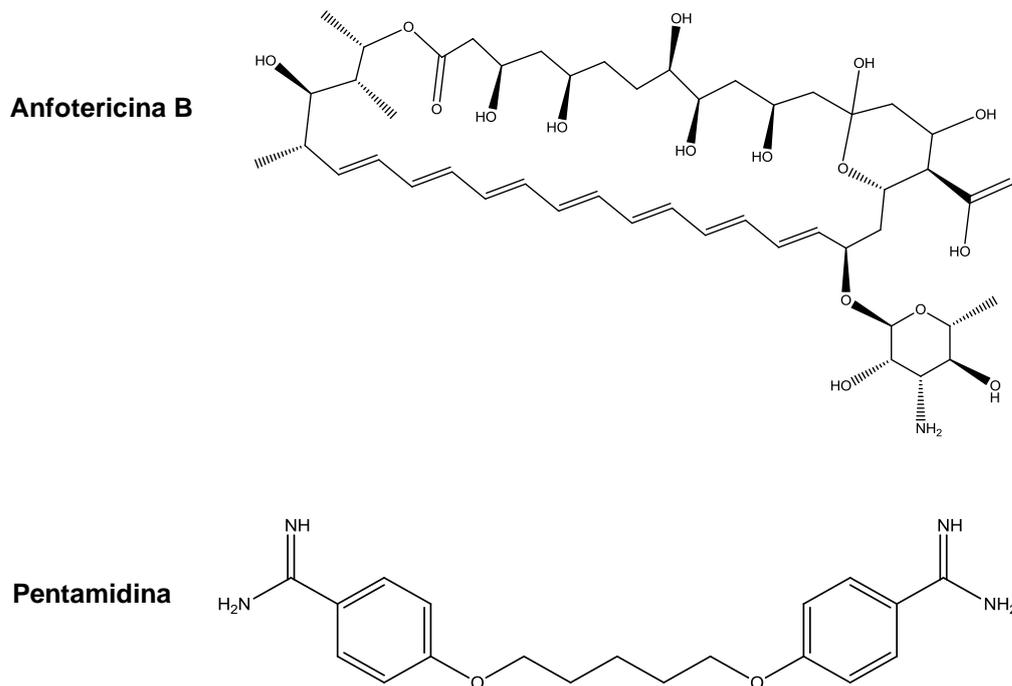
O antimoniato de meglumina é eficiente ao tratamento das formas visceral, cutânea e mucocutânea de leishmaniose, quando administrado de forma contínua e posologicamente adequada. Porém, apesar de sua eficiência pode ocorrer um ou mais efeitos adversos que são: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastria, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda (WHO, 2010). O antimonial pode atingir seu limiar de toxicidade, levando a alterações cardíacas, pancreáticas ou renais que obriguem a suspensão do tratamento (BRASIL, 2010).

Recomenda-se o tratamento da LV com a dose de 20mg Sb+5/kg/dia, por no mínimo 20 dias e no máximo 40 dias, por via endovenosa ou intramuscular (BRASIL, 2014 a). Falhas terapêuticas e tratamentos descontínuos levam ao aparecimento de formas resistentes do parasito (RATH et al., 2003). Nesses casos de resistência ao tratamento com antimoniais pentavalentes ou de pacientes que são sensíveis a esse fármaco, utilizam-se drogas de segunda escolha como a anfotericina B e a pentamidina (NAGLE, 2014) (Figura 9).

A anfotericina B apresenta uma boa eficácia para a leishmaniose. Porém, tem como fator limitante para seu uso a elevada toxicidade, que desencadeia sérios efeitos colaterais como hipocalcemia grave, miocardite e disfunção renal (BALAÑA-FOUCE et al., 1998; WHO, 2010). A anfotericina lipossomal, uma nova formulação da anfotericina B, tem uma redução significativa de seu grau de toxicidade. No entanto, temos como fatores limitantes o alto custo dessa formulação especialmente nos países em desenvolvimento, além de não ser eficaz sobre todas as manifestações clínicas (LIMA et al., 2007, MICHELETTI & BEATRIZ, 2012).

A pentamidina é uma diamina que se mostra altamente eficaz especialmente para casos de leishmaniose visceral (RATH et al., 2003). No entanto, como fator limitante temos a sua alta toxicidade, apresenta efeitos colaterais severos, como toxicidade renal e hepática, hipoglicemia grave, problemas cardíacos (BALAÑA-FOUCE et al., 1998; MICHELETTI & BEATRIZ, 2012).

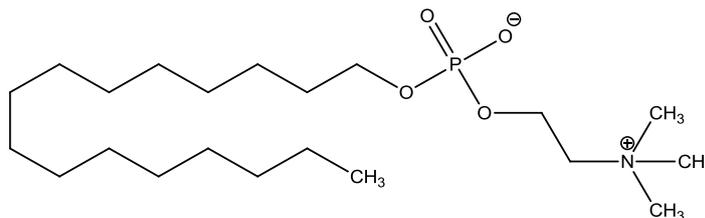
Figura 9: Medicamentos de segunda escolha para o tratamento das Leishmanioses



Fonte: Adaptado de NAGLE (2014).

O miltefosina (Figura 10) foi inicialmente desenvolvido como agente antitumoral, mas estudos demonstram a atividade leishmanicida desse fármaco. A Índia foi o país que primeiramente aprovou o uso desse medicamento para tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral (SUNDAR & CHATTERJEE, 2006). Recentemente o miltefosina foi adicionado a à lista de medicamentos essenciais da OMS, sendo a dose recomendada atualmente de como monoterapia das LT e LV é de 2,5 mg/kg/dia durante o total de 28 dias, sendo utilizado em diversos países (DORLO et al., 2012; PALADIN LABS INC, 2015; WHO, 2015). Por ser de uso oral, é facilmente aceito para o tratamento de crianças, porém, possui como efeitos tóxicos existem complicações gastrointestinais e a contraindicação para mulheres grávidas em idade fértil devido ao seu potencial teratogênico (SUNDAR, 2002).

Figura 10: Estrutura da miltefosina.

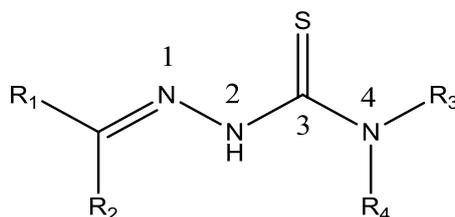


Fonte: Adaptado de NAGLE (2014)

3.7 Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas constituem uma importante classe de compostos amplamente estudada na química medicinal, devido as suas propriedades químicas e ao seu amplo perfil farmacológico. A estrutura química das tiossemicarbazonas e a respectiva numeração dos átomos da cadeia principal segundo a IUPAC (PANICO, POWELL & RICHER,1993) estão representados na Figura 11.

Figura 11: Estrutura da tiossemicarbazona.



Fonte: Adaptado de TENÓRIO et al. (2005).

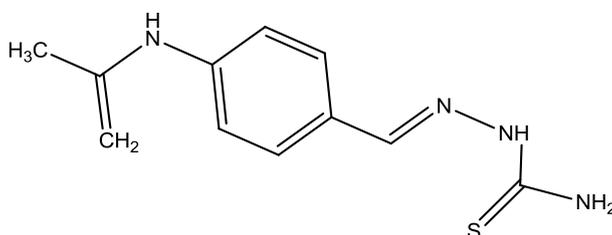
Os compostos de tiossemicarbazonas são vastamente explorados na síntese orgânica, e podem ser adquiridos comercialmente. Para obtenção desses compostos duas estratégias podem ser realizadas: a obtenção direta através da reação de condensação de tiossemicarbazidas com aldeídos ou cetonas, sendo comumente necessária a utilização de catálise ácida

(CASAS,GARCÍA & SORDO, 2000) ou através da forma indireta preparando previamente a tiossemicarbazida utilizando a hidrazina ($\text{NH}_2\text{-NH}_2$) e distintos reagentes, seguida de condensação com o derivado carbonilado específico (TENÓRIO et al., 2005).

Sob a perspectiva sintética as tiossemicarbazonas tem como característica principal a variabilidade de formas de obtenção, assim como uma ampla aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes (DU et al, 2002). Além de apresentarem baixo custo de síntese; grande economia de átomos, visto que, todo os átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final, com exceção da água que é liberada, e rapidez de síntese obtendo altos rendimentos. (HANG & BERTOZZI, 2001; BENBROOK et al, 1997).

Atualmente, da classe das tiossemicarbazonas o único composto empregado clinicamente é o 4-acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona, comercialmente conhecida como tioacetazona (Figura 12), utilizado para o tratamento da tuberculose (BERALDO, 2004). Entretanto, a presença de efeitos colaterais limitam sua utilização como a indução de diabetes nos indivíduos tratados (MANETTI et al., 2000)

Figura 12: Compostos com atividade antituberculosas (a) 4-acetaminobenzaldeído tiossemicarbazona.



Fonte: Adaptado de NAGLE (2014)

As tiossemicarbazonas, do ponto de vista biológico, são amplamente estudadas devido as suas importantes aplicações na pesquisa de novos fármacos. Podemos citar suas atividades antitumoral (Li et al., 1998), antibacteriana (JOSEPH et al., 2006 e Pavan et al., 2010), antifúngica

(NOMIYA et al., 2010), antiviral (GENOVA et al., 2004) e antiprotozoária (SILES et al., 2006).

Na atividades antiprotozoária das tiosemicarbazonas destacamos a atividade leishmanicida. Estudos biológicos realizados com diversos derivados dessas moléculas demonstram o grande potencial desses compostos contra formas promastigotas e amastigotas de espécies de *Leishmania* (MANZANO, 2016; PERVEZ, 2014).

A atividade dessa classe de compostos pode ser evidenciada em trabalho de Mellos 2015, que mostra a atividade de tiosemicarbazonas sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonenses*, onde existe uma possível atuação dessas moléculas na diminuição significativa da enzima NO sintase.

Derivados de tiosemicarbazonas também inibiram o crescimento de *Leishmania amazonenses* (formas promastigotas e amastigotas), possuindo como mecanismo de ação a morte do parasito por apoptose e necrose das células tratadas com compostos, além disso, algumas moléculas foram capazes de estimular nos macrófagos mecanismos de proteção dessa célula (SILVA, 2013).

Tiosemicarbazonas também vem mostrando atividade nas cisteínas proteases (CPs) da *Leishmania*. As CPs são enzimas diretamente relacionadas a nutrição, ao processo de invasão do parasito, evasão dos mecanismos da resposta imune e replicação, além de ter um papel fundamental na diferenciação de promastigotas para amastigotas (BOCEDI et al., 2004; HUSSAIN et al., 2014; RAJASEKARAN & CHEN, 2015). Estudos recentes de triagem por docking com cisteína protease recombinante de *Leishmania mexicana*, sugeriram que inibidores derivados de tiosemicarbazonas seriam seletivos com cisteína protease recombinante de *Leishmania mexicana* (SCHRÖDER et al., 2013).

Estudos com tiosemicarbazona derivada do limoneno mostraram atividade inibindo as formas promastigotas e reduzindo o número de amastigotas presentes nos macrófagos, além de observar alterações na

mitocôndria do parasito, onde a ação do composto nessa organela atuou na despolarização da membrana dessa organela (BRITTA et al., 2012) .

Metodologia

4 Metodologia

4.1 Materiais e Equipamentos

- Placas cromatográficas Merck sílica gel 60 F254, de 0,25 mm de espessura.
- Luz ultravioleta (254 ou 366 nm) .
- Espectrofotômetro de Absorção no Infravermelho - FTIR Bruker Modelo IFS 66 (DQF/UFPE).
- Espectrômetro de RMN - espectrômetro Varian Modelo Plus 400 MHz (DQF/UFPE).
- Espectrômetro de Massa MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Laser Nd:YAG, 355 nm. Freq. laser: 200 Hz
- Determinação dos pontos de fusão – FISATAM Mod. 431D- Brasil (LQIT).
- Lâmpada de Ultravioleta – Philco (LQIT).
- Rota evaporador – Fisatom (LQIT).
- Aldeídos aromáticos substituídos (5-metil-7-bromo-indolcarboxaldeído; 7-metil-5-bromo-indolcarboxaldeído).
- Tiossemicarbazidas substituídas (H; 4-metil;4-etil;4-metóxi).
- Etanol absoluto.
- Acetato de etila.
- Ácido clorídrico.

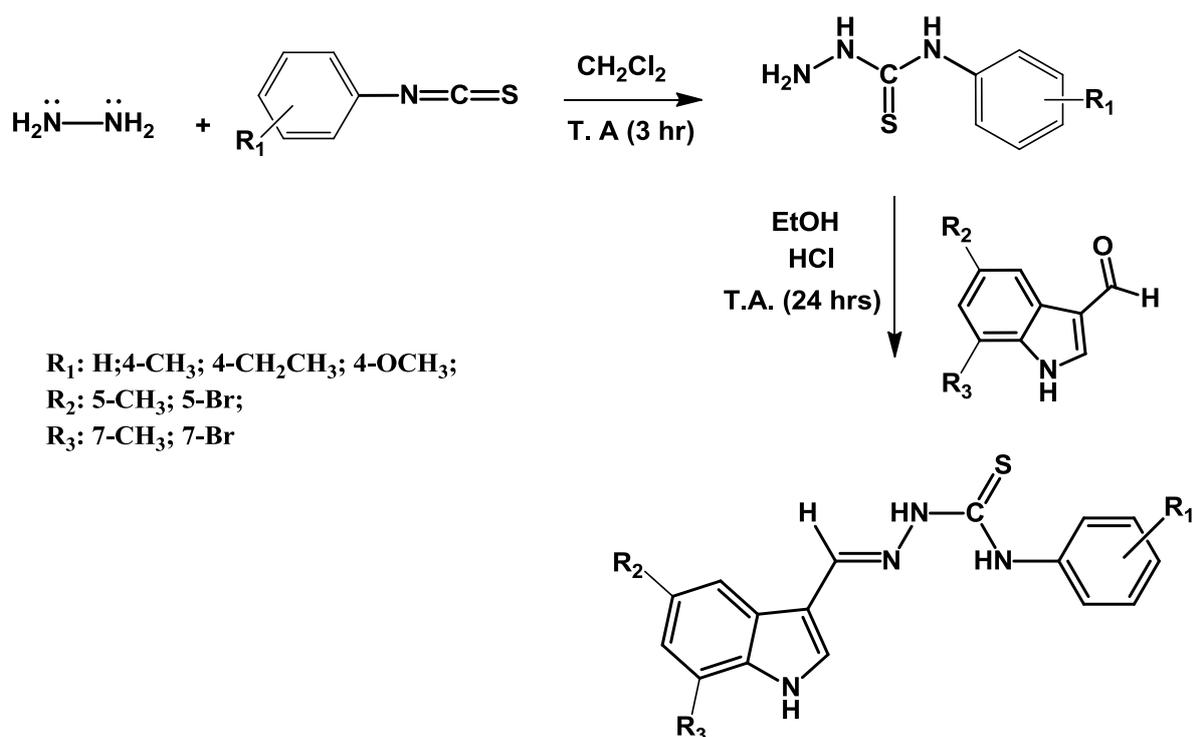
Os reagentes e solventes utilizados na síntese dos compostos ou para suas análises pertencem às marcas Sigma-Aldrich, Acros, Merck, Vetec ou Quimis e foram utilizados sem purificação.

4.2 Métodos

4.2.1 Diagrama de síntese para obtenção dos compostos finais

A rota sintética empregada para a obtenção dos derivados indólicos-tiossemicarbazonicos; onde foram utilizadas propostas mecanísticas de condensação e adição nucleofílica (Esquema 1).

Esquema 1: Diagrama de síntese dos derivados indólicos-tiossemicarbazonicos.



4.2.2 Procedimento experimental para obtenção dos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos

a) Síntese dos compostos intermediários (LT/ LQIT)

Em um balão de fundo redondo, com capacidade para 250 mL, foram adicionados quantidades equimolares de isotiocianato substituído, e 20 mL de diclorometano e deixado sob agitação por 15 minutos, em temperatura ambiente. Após adicionou-se gota-a-gota quantidades equimolares da

hidrazina. A reação foi mantida em refluxo por 3 horas, o produto foi retirado e lavado com diclorometano.

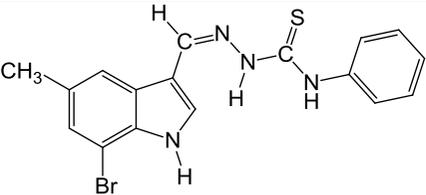
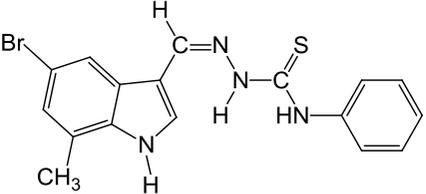
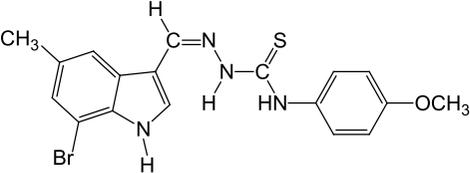
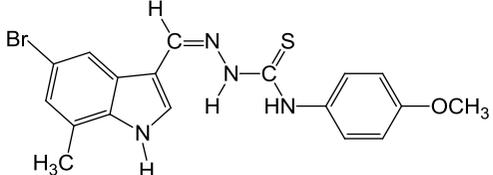
b) Síntese dos compostos finais (PR/ LQIT)

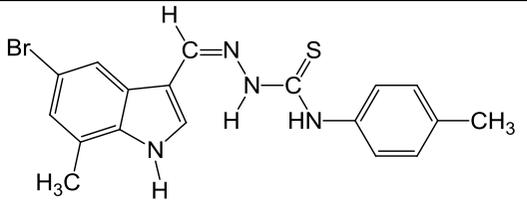
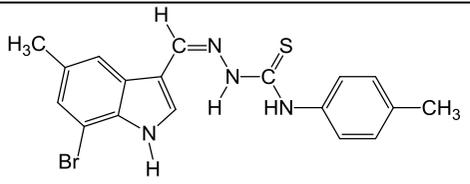
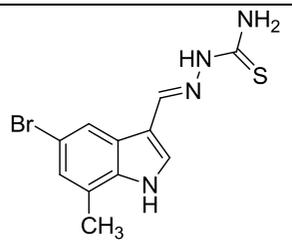
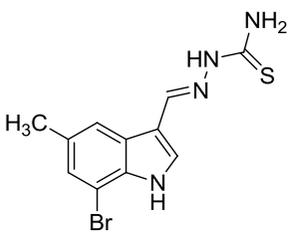
Em um balão de fundo redondo com capacidade para 100 mL, foram adicionados quantidades equimolares dos aldeídos aromáticos substituídos, com 15 mL de álcool etílico como solvente e ácido clorídrico como catalisador. Após 20 minutos foram adicionados quantidades equimolares dos derivados LQIT/LT-01 - LQIT/LT-38 - LQIT/LT-45 - LQIT/LT-44. A reação foi mantida em refluxo durante 24 h, o produto foi retirado e purificado através de sucessivas lavagens com álcool etílico.

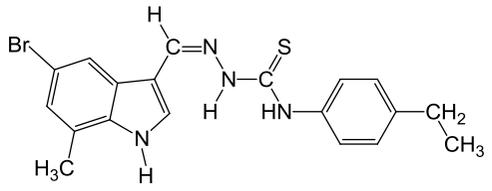
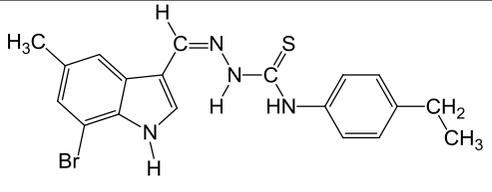
4.3 Análise espectroscópicas

Para a caracterização das moléculas foram realizadas análises de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , Infravermelho e espectrometria de massa, além da análise dos dados físico-químicos de cada molécula.

Tabela 1: Dados físico-químicos dos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos.

#	Estrutura	FM	MM (g/mol)	Sistema/RF	PF	Rend.(%)
PR-01		$C_{17}H_{15}N_4SBr$	387,2962	Hex/Acet 4:6	174° C	94,64%
PR-02		$C_{17}H_{15}N_4SBr$	387,2962	Acet /Hex 7:3	199°C	35,72%
PR-03		$C_{18}H_{17}N_4SBrO$	417,3221	Hex/Acet 5:5	206°C	53,97%
PR-04		$C_{18}H_{17}N_4SBrO$	417,3227	Acet /Hex 7:3	192°C	71,31%

PR-05		$C_{18}H_{17}N_4SBr$	401,3227	0,45 Hex/Acet 6:4	195°C	40,34%
PR-06		$C_{18}H_{17}N_4SBr$	401,3227	0,6 Hex/Acet 5:5	195°C	32,09%
PR-07		$C_{11}H_{10}N_4SBr$	309,9888	0,46 Hex/Acet 1:1	239,3 °C	37,54%
PR-08		$C_{11}H_{10}N_4SBr$	309,9888	0,47 Hex/Acet 6:4	234,8 °C	7,05%

PR-09		$C_{19}H_{19}N_4SBr$	415,3492	0,6 Hex/Acet 7:3	95°C	87,79%
PR-10		$C_{19}H_{19}N_4SBr$	415,3492	0,52 Hex/Acet 5:5	210 °C	59,17%

Legenda: FM: fórmula molecular; MM: massa molar; RF: razão de frente; PF: ponto de fusão e Rend.(%): rendimento em porcentagem.

4.3.1 2-((7-bromo-5-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N fenilhidrazina carbotioamina (LQIT/ PR-01)

RMN ^1H (DMSO, d_6 , 400MHz) δ : 2.41 (s, 3H, CH_3), 7.18 (t, 1H, $J=7.2\text{Hz}$, benzil), 7.27 (s, 1H, indol), 7.37 (t, 2H, $J+8\text{Hz}$, benzil), 7.69 (d, 2H, $J=7.2\text{Hz}$, benzil), 7.96 (d, 1H, $J=2.8\text{Hz}$, indol), 7.97 (s, 1H, indol), 8.38 (s, 1H, =CH-), 9.69 (s, 1H, NH), 11.64 (s, 1H, NH), 11.79 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (DMSO, d_6 , 100MHz) δ : 20.85, 104.02, 111.60, 120.72, 124.55, 124.78, 125.98, 126.42, 128.13, 128.13, 131.40, 131.78, 133.69, 139.25, 140.43, 174.46. IV (KBr, cm^{-1}): C=N (1595), N-H (3326.4).

4.3.2 2-((5-bromo-7-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenilhidrazina carbotioamina (LQIT/ PR-02)

RMN ^1H (DMSO, d_6 , 400MHz) δ : 2.48 (s, 3H, CH_3), 7.17 (s, 1H, benzil), 7.19 (s, 1H, indol), 7.37 (t, 2H, $J=8\text{Hz}$, benzil), 7.71 (d, 2H, $J=8\text{Hz}$, benzil), 7.98 (s, 1H, indol), 8.17 (s, 1H, indol), 8.38 (s, 1H, =CH-), 9.73 (s, 1H, NH), 11.62 (s, 1H, NH), 11.80 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (DMSO, d_6 , 100MHz) δ : 16.35, 110.99, 113.38, 121.25, 123.76, 124.22, 124.72, 125.34, 125.48, 128.18, 131.88, 135.33, 139.28, 140.50, 174.37. IV (KBr, cm^{-1}): C=S (1196,22), C=N (1595.6), N-H (3410.7). MS m/z (ES^+): 387.0142 $[\text{M}]^+$.

4.3.3 2-((7-bromo-5-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-(4-metoxifenil)hidrazina carbotioamida (LQIT/ PR-03)

RMN ^1H (DMSO, d_6 , 400MHz) δ : 2.41 (s, 3H, CH_3), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 6.93 (d, 2H, $J=8.8\text{Hz}$, benzil), 7.26 (s, 1H, indol), 7.51 (d, 2H, $J=8.8\text{Hz}$, benzil), 7.94 (d, 1H, $J=2.8\text{Hz}$, indol), 7.97 (s, 1H, indol), 8.37 (s, 1H, =CH-), 9.56 (s, 1H, NH), 11.53 (s, 1H, NH), 11.77 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (DMSO, d_6 , 100MHz) δ : 20.87, 55.23, 104.01, 111.68, 113.32, 120.74, 126.00, 126.41, 126.77, 126.77, 131.38, 131.62, 132.22, 133.69, 140.23, 156.70, 174.99. IV

(KBr, cm^{-1}): C=N (1598.9), N-H (3149.1), N-H (3300.6), N-H (3439.2). MS m/z (ES⁺): 418.9989 [M]⁺.

4.3.4 2-((5-bromo-7-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-(4 metoxifenil)hidrazina carbotioamida (LQIT/ PR-04)

RMN ¹H (DMSO, d₆, 400MHz) δ : 2.47 (s, 3H, CH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 6.94 (d, 2H, J= 8.4 Hz, benzil), 7.16 (s, 1H, indol), 7.52 (d, 2H, J= 8.8 Hz, benzil), 7.96 (s, 1H, indol), 8.16 (s, 1H, indol), 8.37 (s, 1H, =CH-), 9.60 (s, 1H, NH), 11.51 (s, 1H, NH), 11.86 (s, 1H, NH). RMN ¹³C (DMSO, d₆, 100MHz) δ : 16.40, 55.26, 111.08, 113.38, 121.28, 123.74, 125.37, 125.51, 126.55, 131.76, 132.26, 135.35, 140.37, 156.68, 174.91. IV (KBr, cm^{-1}): C=S (1198.78), C=N (1599.2), N-H (3311.5). MS m/z (ES⁺): 419.0001 [M]⁺.

4.3.5 2-((5-bromo-7-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-(p-tolil)hidrazina carbotioamida (LQIT/ PR-05)

RMN ¹H (DMSO, d₆, 400MHz) δ : 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.48 (s, 3H, CH₃), 7.17 (d, 2H, J= 8.4 Hz, benzil), 7.23 (s, 1H, indol), 7.57 (d, 2H, J= 8.4 Hz, benzil), 8.05 (s, 1H, indol), 8.06 (s, 1H, indol), 8.34 (s, 1H, =CH-), 9.93 (s, 1H, NH), 9.93 (s, 1H, NH), 12.35 (s, 1H, NH). RMN ¹³C (DMSO, d₆, 100MHz) δ : 16.33, 20.51, 113.35, 117.79, 120.40, 121.23, 124.31, 124.47, 125.35, 126.30, 128.64, 135.33, 136.71, 138.77, 140.35, 174.45, 185.11. IV (KBr, cm^{-1}): C=N (1589.7), N-H (3107.3), N-H (3171.7). MS m/z (ES⁺): 401.0279 [M]⁺.

4.3.6 2-((7-bromo-5-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-(p-tolil) hidrazina carbotioamida (LQIT/ PR-06)

RMN ¹H (DMSO, d₆, 400MHz) δ : 2.40 (s, 3H, CH₃), 3.36 (s, 3H, CH₃), 7.16 (d, 2H, J= 8 Hz, benzil), 7.32 (s, 1H, indol), 7.54 (d, 2H, J= 8 Hz, benzil), 7.90 (s, 1H, indol), 8.28 (s, 1H, indol), 8.29 (s, 1H, =CH-), 9.93 (s, 1H, NH), 11.59 (s, 1H, NH), 12.26 (s, 1H, NH). RMN ¹³C (DMSO, d₆, 100MHz) δ : 20.85,

40.12, 104.32, 111.65, 118.51, 120.05, 124.62, 125.89, 125.99, 126.40, 127.24, 128.60, 131.38, 133.20, 133.79, 136.69, 139.11, 185.28. IV (KBr, cm^{-1}): C=S (1076.6), C=N (1595), N-H (3105.8).

4.3.7 2-((5-bromo-7-metil-1H-indol-3il)metileno)hidrazina carbotioamida(LQIT/PR-07)

RMN ^1H (DMSO, d_6 , 400 MHz, ppm): δ 2,47 (s, 3H, CH_3); δ 7,16 (s, 1H, indol); δ 7,49 (s, 1H, NH_2); δ 7,885 (s, 1H, indol); δ 8,01 (s, 1H, NH_2); δ 8,12 (s, 1H, indol); δ 8,26 (s, 1H, indol); δ 11,18 (s, 1H, NH, indol); δ 11,82 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (DMSO, d_6 , 100 MHz, ppm): δ 16,35; 111,09; 113,39; 121,27; 123,58; 125,13; 125,53; 131,78; 135,34; 140,39; 176,63.

4.3.8 2-((7-bromo-5-metil-1H-indol-3il)metileno)hidrazina carbotioamida (LQIT/PR-08)

RMN ^1H (DMSO, d_6 , 400 MHz, ppm): δ 2,43 (s, 3H, CH_3); δ 7,26 (s, 1H, indol); δ (s, 1H, NH_2); δ 7,825 (s, 1H, indol); δ 7,98 (s, 1H, indol); δ 8,03 (s, 1H, NH_2); δ 8,26 (s, 1H, CH); δ 11,19 (s, 1H, NH, indol); δ 11,71 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (DMSO, d_6 , 100 MHz, ppm): δ 20,71; 103,87; 111,79; 121,05; 125,75; 126,47; 131,79; 133,71; 140,39; 176,61.

4.3.9 2-((5-bromo-7-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-(4- etilfenil) hidrazina carbotioamida (LQIT/PR-09)

RMN ^1H (DMSO, d_6 , 400MHz) δ : 1.20 (t, 3H, $J= 7.2$ Hz, CH_3), 2.50 (s, 3H, CH_3), 2.61 (q, 2H, $J= 7.2$ Hz, CH_2), 7.17 (s, 1H, indol), 7.21 (d, 2H, $J= 8$ Hz, benzil), 7.59 (d, 2H, $J= 8$ Hz, benzil), 7.98 (s, 1H, indol), 8.17 (s, 1H, indol), 8.38 (s, 1H, =CH-), 9.65 (s, 1H, NH), 11.60 (s, 1H, NH), 11.86 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (DMSO, d_6 , 100MHz) δ : 15.69, 16.37, 27.68, 111.02, 113.37, 121.25, 123.76, 124.37, 125.34, 125.47, 125.47, 127.46, 127.46, 131.83, 135.34, 136.90,

140.33, 140.38, 174.42. IV (KBr, cm^{-1}): C=N (1593.4), N-H (3258.7), N-H (3623).

4.3.10 2-((7-bromo-5-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-(4etilfenil)hidrazinacarbotioamida (LQIT/ PR-10)

RMN ^1H (DMSO, d_6 , 400MHz) δ : 1.19 (t, 3H, $J= 7.6$ Hz, CH_3), 2.41 (s, 3H, CH_3), 2.61 (q, 2H, $J= 7.6$ Hz, CH_2), 7.20 (d, 2H, $J= 8.4$ Hz, benzil), 7.27 (s, 1H, indol), 7.57 (d, 2H, $J= 8$ Hz, benzil), 7.95 (s, 1H, indol), 7.97 (s, 1H, indol), 8.38 (s, 1H, =CH-), 9.62 (s, 1H, NH), 11.60 (s, 1H, NH), 11.78 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (DMSO, d_6 , 100MHz) δ : 15.69, 20.85, 27.68, 104.03, 111.64, 120.72, 124.67, 125.97, 126.40, 127.41, 131.38, 131.73, 133.70, 136.88, 140.29, 140.37, 174.53. IV (KBr, cm^{-1}): C=N (1499.3), N-H (3170), N-H (3294.2). MS m/z (ES^+): 415.0548 $[\text{M}]^+$.

4.4 Manutenção das culturas

Os parasitos e linhagens celulares foram cedidos gentilmente pelo Prof. Luiz Carlos Alves do Departamento de Parasitologia do CPqAM/ FIOCRUZ.

4.4.1 Cultivo dos Parasitos

Formas promastigotas de *Leishmania infantum* (Cepa MHOM/BR/70/BH46), foram mantidas em meio Schneider (Sigma) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de estreptomicina, cultivadas em estufa incubadora para BOD – J. Prolab, modelo JP. 100 (LBCM/CPqAM) com temperatura de 26° C. As formas promastigotas foram utilizados em fase exponencial de crescimento em todas as fases do experimento.

4.4.2 Cultivo de Células Vero

Células Vero, foram cultivadas em garrafa de culturas, contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, conservadas em estufa

incubadora de CO₂ – Thermo Scientific Forma Series II Water Jacket (LBCM/CPqAM) a 5% de CO₂ a 37°C, sendo o meio de cultura trocado duas vezes por semana.

4.5 Análise da citotoxicidade dos compostos

O teste de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é baseado na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Formando cristais azuis, intracelularmente, que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria UV/visível. Dessa forma, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico.

Células Vero foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 6×10^5 células/poço e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas, o sobrenadante foi removido e as células foram incubadas na presença de várias concentrações dos compostos (25; 12,5; 6,25; 3,13 e 1,56) por 72 horas. Após este período, o sobrenadante (Meio RPMI contendo os compostos) foi retirado e adicionado a mesma quantidade de meio RPMI sem vermelho de fenol mais 10 µL de MTT, a uma concentração de 5 mg/ml diluído em Tampão fosfato salino (PBS), as células foram incubadas por 3 horas nas mesmas condições de cultivo. Após incubação, o MTT foi retirado cuidadosamente e adicionado 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) 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 Benchmark Plus (Bio-Rad), Califórnia, EUA com comprimento de onda de 490 nm, por 15 segundos. A porcentagem de células viáveis em relação às células controles foi estimada. A concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% (CC₅₀) das células foi determinada por análise de regressão linear dos dados obtidos pelo software SPSS 8.0 para Windows. Foram realizado dois experimentos distintos em quadruplicata.

4.6 Atividade biológica em *Leishmania infantum*

Para realização dos testes *in vitro* dos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos. As formas promastigotas *Leishmania infantum* foram coletadas, contadas e diluídas em meio Schneider (Sigma) suplementado com 20% de SFB em uma concentração de 1×10^6 células/ml. Em seguida, as células foram encubadas em diferentes concentrações dos compostos (25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 $\mu\text{g/ml}$), por 72 horas. No controle foram incubadas as células, apenas com o meio Schneider. O crescimento da cultura foi acompanhado a cada 24 horas, através de contagens utilizando a câmara Neubauer. A concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitas- IC_{50} foi o parâmetro utilizado para estimar a inibição do crescimento. A IC_{50} foi determinada após 72 horas de cultivo por análise de regressão linear com o software SPSS 8.0 para Windows. Cada teste foi feito em 2 experimentos independentes em triplicata. . O índice de seletividade (IS) foi determinado como a razão entre os valores de CC_{50} e IC_{50} obtidos para cada composto.

4.7 Processamento para a microscopia eletrônica de varredura

Formas promastigotas *L. infantum* controles e tratadas com concentrações da IC_{50} e $2 \times \text{IC}_{50}$ dos compostos LQIT/PR-02 e LQIT/PR-09 por 72 horas, foram lavadas e fixadas por 60 minutos em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) colocadas para aderir em lamínulas previamente revestidas com poly-lysina. Após 20 minutos as lamínulas foram lavadas com PBS para retirada das células não aderidas e pós-fixada por uma hora em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4), 0,8% ferricianeto de potássio, 5 mM CaCl_2 em tampão cacodilato 0,1M. Em seguida, as células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, desidratadas em séries crescentes de etanol e submetidas à secagem através do ponto crítico no Critical Point dryer HCP-2 (Hitachi), metalizadas com 20 nm de ouro no metalizador JFC-1100 (Jeol) e visualizadas através do microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200.

5 Resultados e Discussão

5.1 Estudo Químico

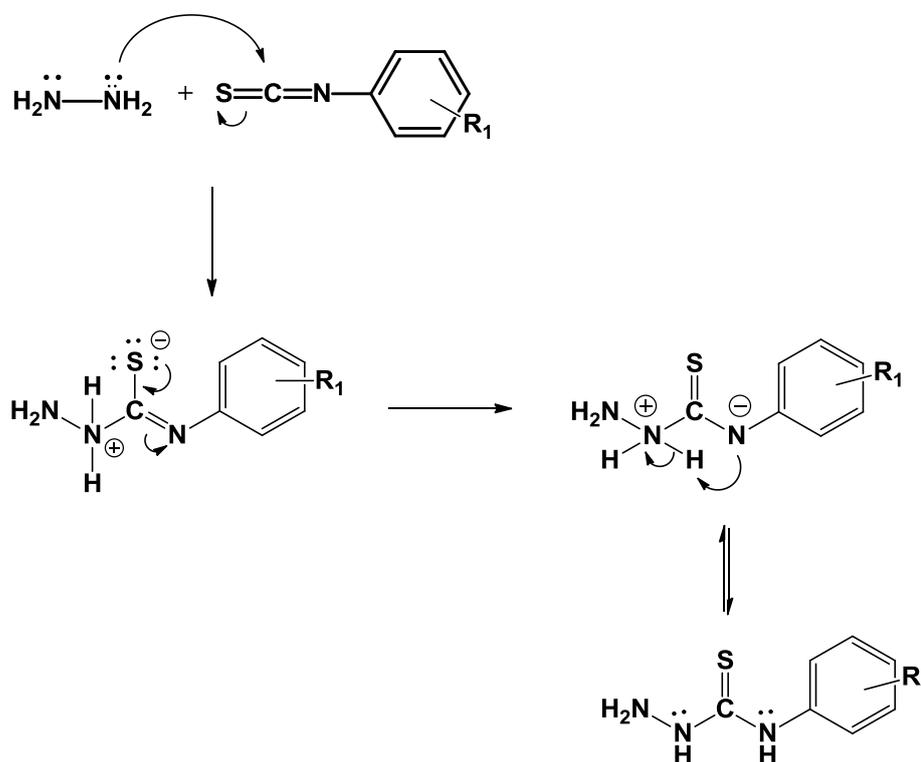
5.1.1 Mecanismos reacionais das tiossemicarbazonas

O mecanismo reacional para obtenção das tiossemicarbazonas ocorre em duas etapas distintas: a) uma reação de adição de Michael e b) uma reação de condensação.

a) Reação de adição nucleofílica e formação das tiossemicarbazidas – 1ª Etapa

O mecanismo geral a seguir representa a formação dos compostos intermediários, ou seja, das tiossemicarbazidas substituídas. Caracteriza-se por um ataque simultâneo do nitrogênio do hidrato de hidrazina ao carbono da tiocarbonila, e deslocalização dos elétrons para o nitrogênio vizinho, conduzindo aos derivados tiossemicarbazônicos LQIT/LT-01, LQIT/LT-38, LQIT/LT-45 e LQIT/LT-44 (Esquema 2) (TENÓRIO et al., 2005).

Esquema 2: Mecanismo de formação dos compostos intermediários.

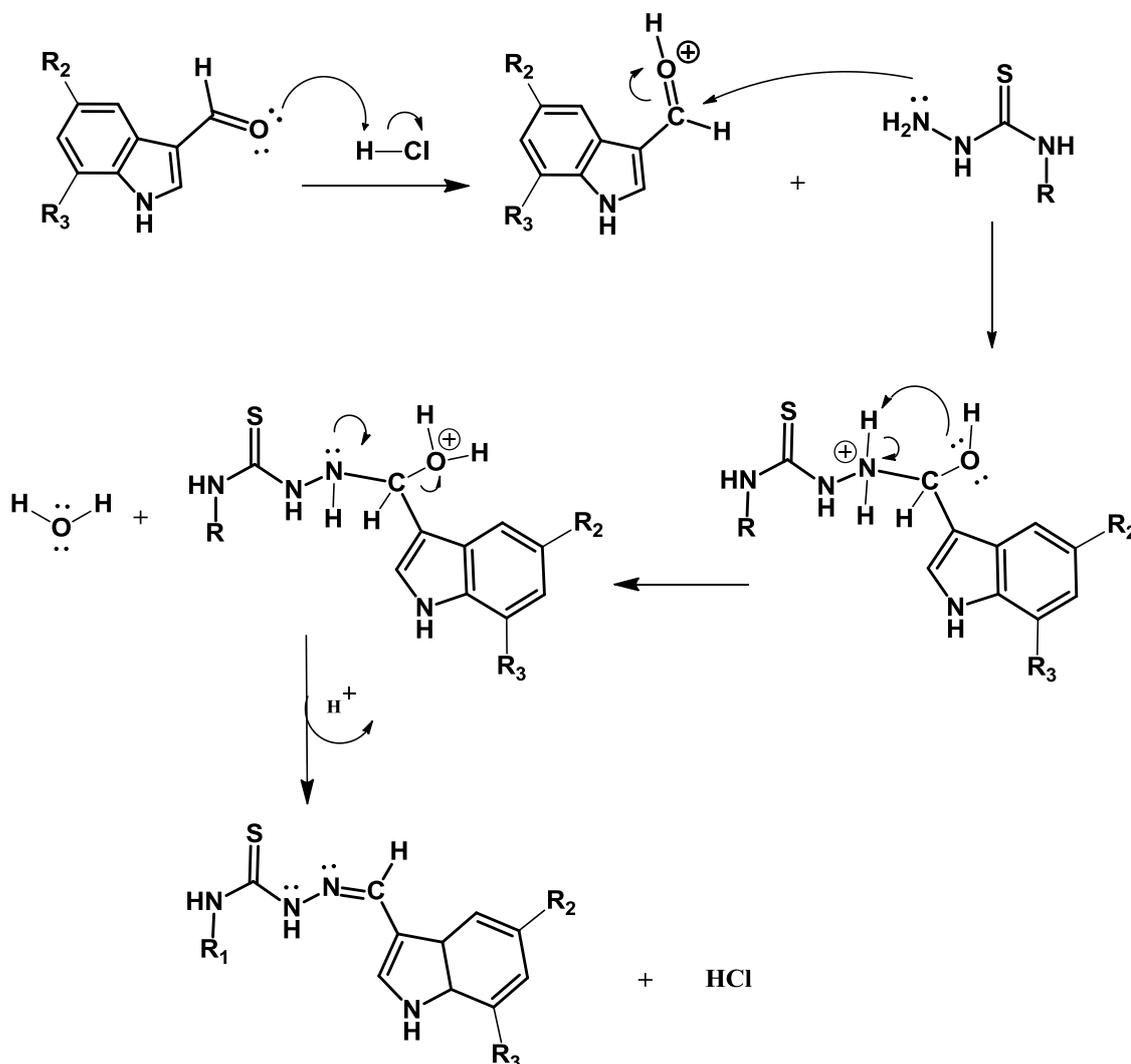


R_1 : H; 4-CH₃; 4-CH₂CH₃; 4-OCH₃

b) Reação de condensação e formação das tiosemicarbazonas – 2ª Etapa

A etapa da síntese para obtenção dos compostos finais caracteriza-se por uma reação de condensação. Ocorre uma ativação, por meio de um ácido, da função aldeído do composto aromático de escolha. O par de elétrons livres, presente no nitrogênio da hidrazina, ataca o carbono positivo. Assim, ocorre a deslocalização dos elétrons com formação e posterior eliminação de água. O nitrogênio que está positivo protona a água e finalmente forma-se o composto final, esquematizado abaixo (Esquema 3) (MENDONÇA, 2007).

Esquema 3: Mecanismo de formação dos compostos finais.



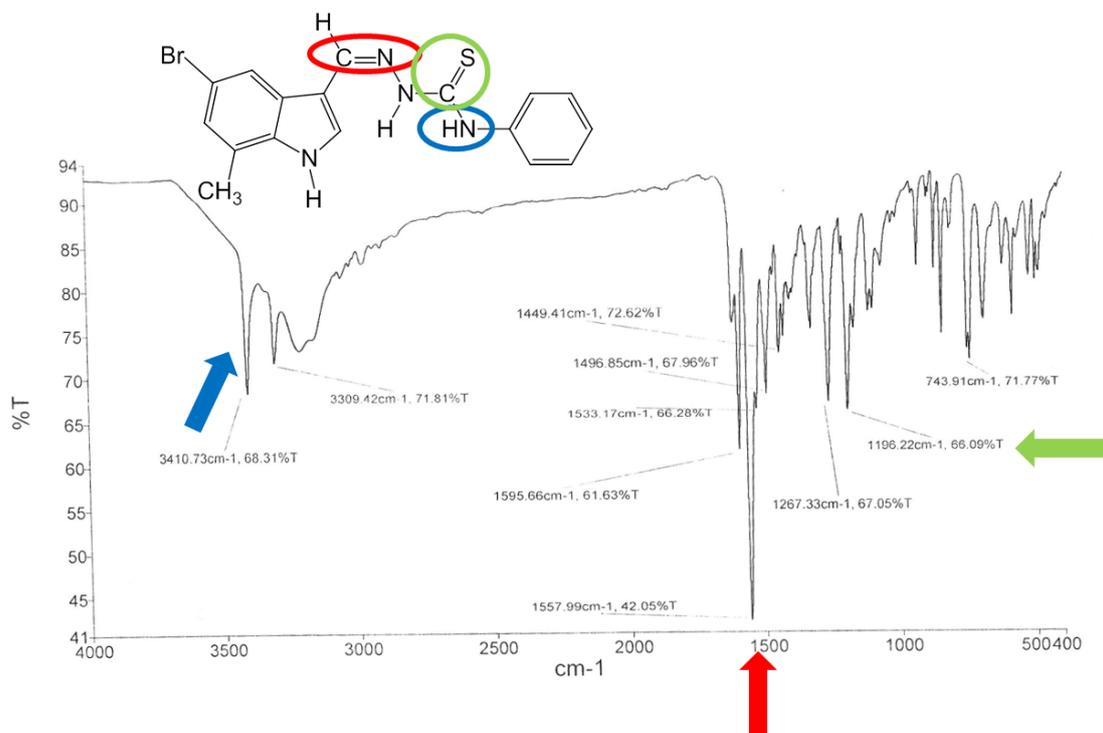
R₁: H; 4-CH₃; 4-CH₂CH₃; 4-OCH₃
 R₂: 5-CH₃; 5-Br
 R₃: 7-CH₃; 7-Br

5.1.2 Caracterização dos compostos das Tiossemicarbazonas

A elucidação dos compostos foi realizada através da ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , infravermelho e espectrometria de massas.

Analisando os resultados do infravermelho (Figura 13), observamos que a ligação (C=S) aparece na região de (1076.62-1198.78) cm^{-1} , a banda (C=N) foi encontrada na região de (1499.36-1599.36) cm^{-1} o que corrobora com os dados da literatura onde em geral a função azometina aparece entre 1556-1630 cm^{-1} e a banda (N-H) na região de (3410.7-3105.8). Foi excluída a possibilidade do tautomerismo tiona-tiol devido à ausência de bandas na região de 2500-2600 cm^{-1} (TENÓRIO et al., 2005).

Figura 13: Espectro de infravermelho do composto LQIT/PR-02.

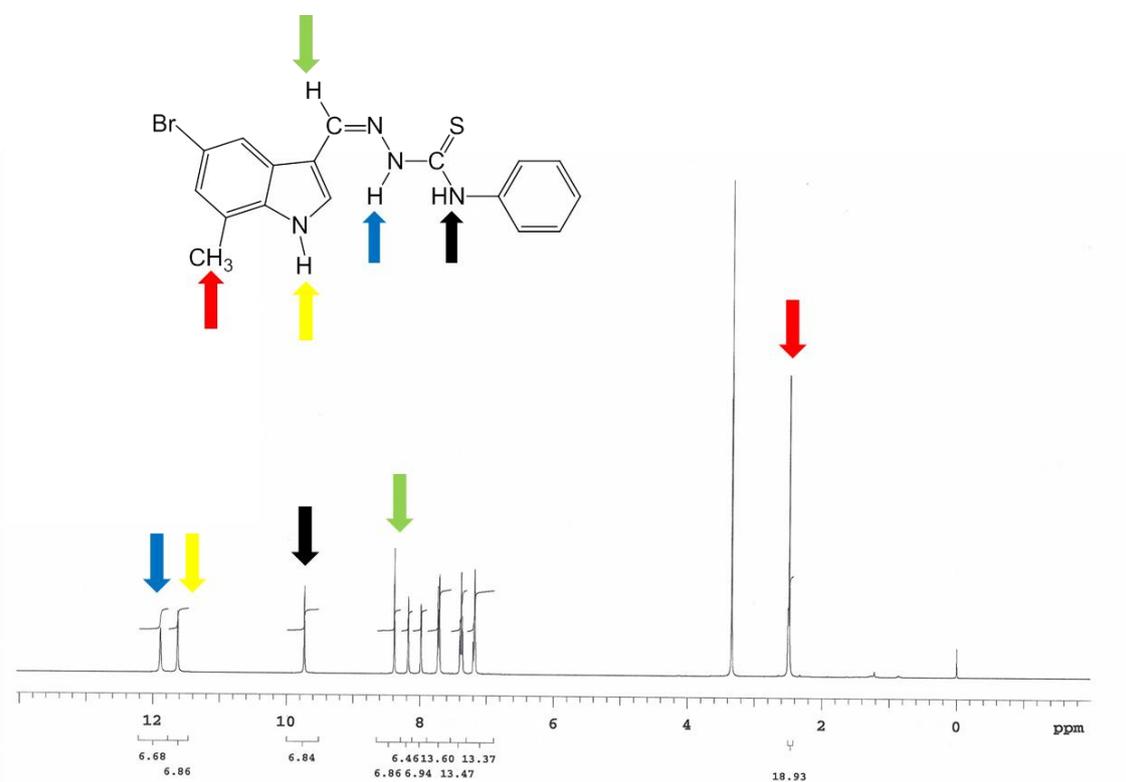


Fonte: Próprio autor.

Na elucidação estrutural dos derivados de tiossemicarbazonas, podemos observar no espectro de RMN ^1H a presença do sinal do hidrogênio da ligação

(H-C=N-), apresentando-se como um singlete entre 8,29-8,38 ppm. Foi possível observar também os sinais referentes aos hidrogênios das ligações CH₃ do indol entre 2,41-2,50 ppm. Além disso, os sinais entre 11,22–11,64 e 11,18-12,35 ppm foram atribuídos aos hidrogênios dos grupos NH hidrazínico e NH indólico, respectivamente, como observar na figura 14. O sinal referente ao NH aromático aparece entre 8,01-9,69 ppm. Este sinal aparece mais blindado quando em comparação com demais sinais de NH devido ao efeito de ressonância possível de acontecer entre o nitrogênio e o carbono da tiocarbonila (-NH-C=S; -N=C-SH)(OLIVEIRA et al., 2015).

Figura 14: : Espectro de RMN¹H do composto LQIT/PR-02.



Fonte: Próprio autor.

5.2 Estudo Biológico

A literatura mostra que as tiossemicarbazonas apresentam atividade leishmanicida (SCHÖDER et al., 2013; MELLO, 2015; BRITTA ET al., 2012). No presente trabalho realizada uma triagem da atividade biológica de 10 produtos sintéticos, derivados da estrutura da tiossemicarbazona sobre células vero e sobre as formas promastigotas de *L. infantum*.

A realização do teste de potencial citotóxico dos derivados-tiossemicarbazônicos feito através da técnica de MTT, sendo um dos principais parâmetros que deve ser estudado e considerado no desenvolvimento de uma nova molécula com atividade biológica, pois a molécula deve ser mais seletiva ao parasito do que as células do hospedeiro (LIÑARES et al., 2006).

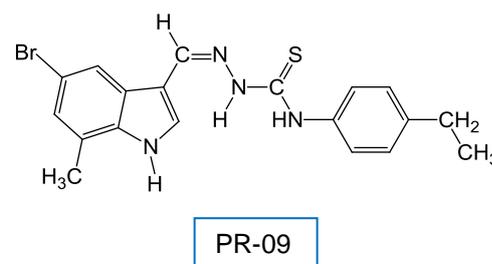
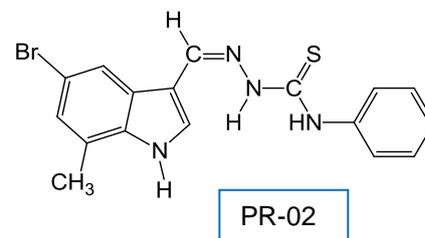
Os derivados foram capazes de induzir alguma toxicidade nas células vero, havendo uma variação entre os compostos testados, sendo o composto LQIT/PR-10 o mais tóxico com a CC_{50} de 17,06 μM e o composto menos tóxico foi o LQIT/PR-05 com CC_{50} de 59,90 μM . Os demais compostos apresentaram CC_{50} entre 17,33 e 46,38. A anfotericina B foi o fármaco padrão utilizado e apresentou CC_{50} de 97,63 μM .

Os novos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos foram utilizados para realizar o ensaio *in vitro*, com o objetivo de identificar os compostos mais promissores. Testes com modelos animais são de fundamental importância na investigação para o desenvolvimento de medicamentos eficazes, mas novos compostos candidatos a fármacos necessitam de uma seleção prévia através de ensaios *in vitro* (DRUILHE et al., 2002).

Analisando os resultados os compostos LQIT/PR foram capazes de inibir as formas promastigotas, com valores de IC_{50} que variam de 4,36 a 23,25 μM , sendo os resultados mais significativos contra as formas de *L. infantum* as moléculas LQIT/PR-02 e LQIT/PR-09 com valores de IC_{50} de 5,60 μM e 4,36 μM , respectivamente (Tabela 1). Foi observado que o derivado LQIT/PR-09 obteve uma inibição de 100% das formas promastigotas nas concentrações de 60,19; 28, 89 e 15,16 μM após 48 e 72 horas.

Tabela 2: Atividade leishmanicida *in vitro* dos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos sobre promastigotas de *L. infantum*.

Composto	IC ₅₀	
	µg/mL	µM
LQIT/PR-01	2,37±0,2	6,12
LQIT/PR-02	2,17±0,3	5,60
LQIT/PR-03	3,52±0	8,43
LQIT/PR-04	3,73±0,1	8,93
LQIT/PR-05	9,37±0,4	23,35
LQIT/PR-06	4,60±0,6	11,46
LQIT/PR-07	5,18±0,1	16,70
LQIT/PR-08	4,19±0,1	13,51
LQIT/PR-09	1,81±0	4,36
LQIT/PR-10	4,97±0,4	11,97
Anfotericina B*	0,043±0,03	0,05



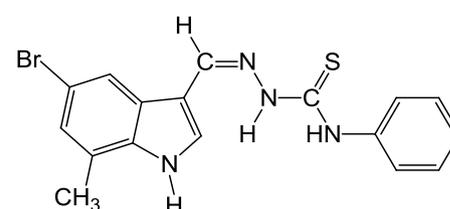
Legenda: IC₅₀ – concentração que inibe 50% do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum*

*Fármaco usado como referência nos testes *in vitro*.

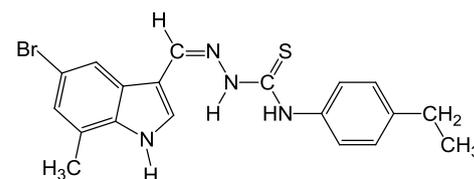
Na avaliação leishmanicida foi verificado a eficácia dos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos sobre as formas promastigotas de *L. infantum*. Através da razão entre a CC₅₀ e a IC₅₀ foi possível determinar o índice de seletividade (IS). Os compostos que apresentaram ser mais seletivos ao parasito do que as células de mamíferos, foram os mesmos que apresentaram a melhor valor de IC₅₀, os derivados LQIT/PR-02 e LQIT/PR-09 apresentando IS de 4,91 e 3,98 respectivamente, entretanto outros compostos destacamos também o LQIT/PR-01 que apresentou valor de IS de 3,08 .

Tabela 3: Análise do Índice de seletividade dos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos.

Composto	μM		
	IC_{50}	CC_{50}	IS
LQIT/PR-01	6,12	18,84	3,08
LQIT/PR-02	5,60	27,52	4,91
LQIT/PR-03	8,43	27,86	3,30
LQIT/PR-04	8,93	21,44	2,40
LQIT/PR-05	23,35	59,90	2,56
LQIT/PR-06	11,46	26,04	2,27
LQIT/PR-07	16,70	31,42	1,88
LQIT/PR-08	13,51	46,38	3,43
LQIT/PR-09	4,36	17,33	3,98
LQIT/PR-10	11,97	17,06	1,43
Anfotericina B	0,05	105,7	2114



PR-02



PR-09

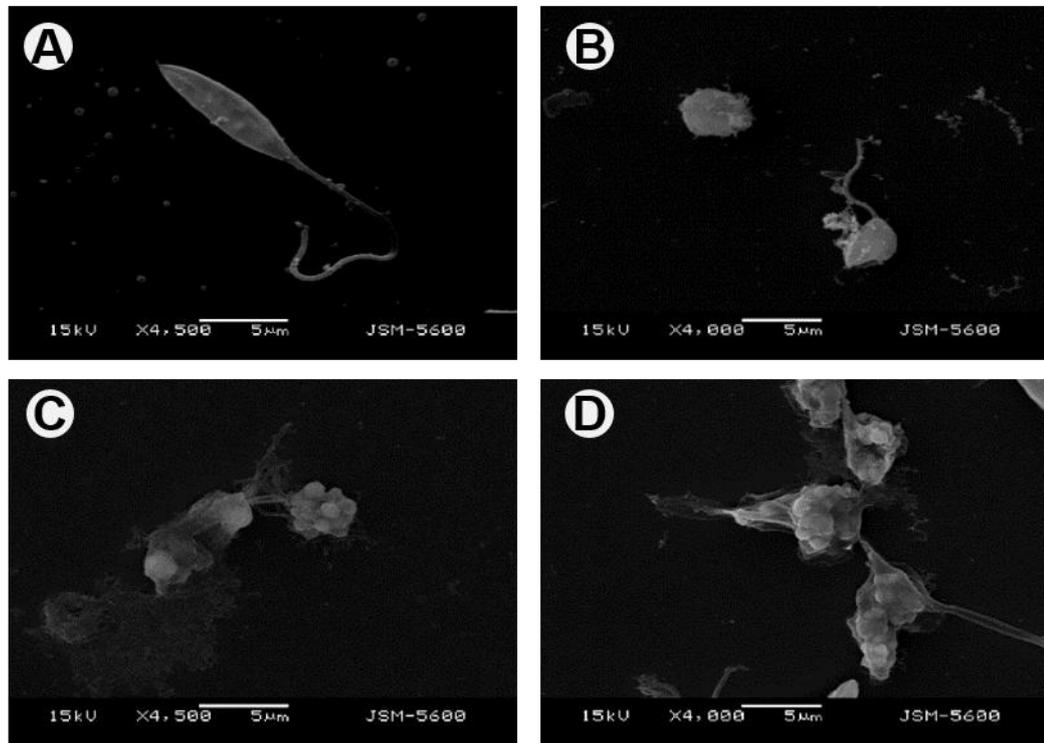
Legenda: IC_{50} – concentração que inibe 50% do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum*; CC_{50} – concentração capaz de causar a perda da viabilidade em 50% das células Vero; IS (Índice de seletividade) – $\text{CC}_{50} \text{ Vero} / \text{IC}_{50} \text{ Promastigotas}$

Os compostos avaliados neste estudo possuem como diferença estrutural a presença do núcleo indol substituído (5- CH_3 /7-Br; 5-Br/7- CH_3) e a substituição presente no N^4 da tiossemicarbazona. Foi possível observar que a ordem do posicionamento dos grupos metil e bromo ligados ao indol não repercutem diretamente na atividade leishmanicida como observado na tabela 2, sendo o efeito da atividade biológica atribuída ao substituinte do N^4 .

Em relação ao R₁, a presença dos substituintes fenil (LQIT/PR-01 e LQIT/PR-02), metóxi-fenil (LQIT/PR-03 e LQIT/PR-04) e etil-fenil (LQIT/PR-09) ligados ao N⁴ da tiossemicarbazona demonstram a importância desses grupos químicos para o aumento da atividade leishmanicidas MELLOS et al. (2015) demonstraram em seu trabalho que tiossemicarbazonas não substituídas no N⁴ (NH₂) não obtiveram bons resultados na atividade leishmanicida ressaltando assim a importância da substituição com grupo aromático nessa porção da molécula, assim como evidenciado em nosso estudo, onde os compostos PR-07 e PR-08 foram fracamente ativos contra formas promastigotas de *L. infantum*. Estudos de MANZANO et al. (2016), demonstram também que tiossemicarbazona substituídas com compostos aromáticos são mais ativas nas atividades biológicas.

Os compostos LQIT/PR-09 e LQIT/PR-02 foram utilizados para realização da microscopia eletrônica de varredura com o objetivo de avaliar ação do composto sobre a morfologia e membrana das formas promastigotas de *L. infantum*. As moléculas foram incubadas em presença dos compostos nas concentrações correspondentes a 1 e 2x IC₅₀ por 72 horas e então processadas como de rotina para microscopia eletrônica de varredura. Nas células sem tratamento a microscopia mostrou as promastigota com forma e tamanho característicos (corpo celular alongado e flagelo grande). A anfotericina B foi capaz de causar destruição maciça de todas as formas promastigotas, causando desintegração dos parasitos. Para os compostos de interesse deste estudo, foi evidenciado que em ambas as concentrações adotadas para esse experimento, os compostos foram capazes de causar danos à membrana das formas evolutivas promastigotas de *L. infantum*. O LQIT/PR-09 causou perda e /ou diminuição do flagelo além de causar arredondamento do corpo celular. O LQIT/PR-02, além dos danos causados pelo PR-09, este também foi capaz de causar destruição do corpo celular das formas promastigotas de *L. infantum*. (Figura 15)

Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura de formas promastigotas de *L. infantum*.



Legenda: a- Células não tratadas; b- parasito tratado com 1x IC₅₀ do composto PR-09; c- parasito tratado com 1x IC₅₀ do composto PR-02; d- Controle tratado com a Anfotericina B (fármaco padrão).

Alterações morfológicas no parasito também foram evidenciadas no trabalho de Britta et al. (2015), onde as formas promastigotas tratadas com derivados tiossemicarbazônicos mostram alterações na forma, tamanho e desintegração celular em parasitos, assim como foi observado nesse trabalho

Conclusão

6 CONCLUSÕES

- Os derivados indólicos-tiossemicarbazônicos sintetizados, obtiveram metodologia satisfatória, síntese acessível e bons rendimentos. Além disso os compostos tiveram suas estruturas elucidadas e a triagem farmacológica realizada, fornecendo resultados em relação a estrutura atividade.
- Os estudos da citotoxicidade mostraram que os derivados indólicos-tiossemicarbazônicos foram pouco citotóxicos, onde os compostos LQIT/PR-05 apresentou valor de CC_{50} de 59,90 μM , os demais compostos apresentou valores de CC_{50} entre 17,06 μM e 46,38 μM ;
- O resultado da atividade biológica dos derivados sobre as formas promastigotas, mostrou que todos apresentaram potencial leishmanicida, sendo o LQIT/PR-02 e LQIT/PR-09 as moléculas com os melhores resultados com respectivo IC_{50} de 5,60 e 4,36 μM , mostrando que essas moléculas possuem atividade biológica promissora.
- Para corroborar com esses resultados promissores, na microscopia eletrônica de varredura foi observado a mudança na morfologia do corpo e alterações no flagelo dos parasitos tratados com os compostos o LQIT/PR-02 e LQIT/PR-09, possibilitando uma futura investigação do mecanismo de ação dessas moléculas.

Referências

REFERÊNCIAS

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J.; MARZOCHI, M. C. A.; MOREIRA, J. S.; SHUBACHI, A. O.; MARZOCH, K. B. F. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, v. 10, n. 3, 2003.

AMATO, V. S.; TUON, F. F.; BACHA, H. A.; NETO, V. A.; NICODEMO, A. C. Mucosal leishmaniasis: current scenario and prospects for treatment. *Acta tropica*, v. 105, n. 1, p. 1-9, 2008.

ANDRADE, C. R.; KIDO, E. A.; LUNA, L.K.S.; MELO, M.A.; BALBINO, V.Q. LEISHMANIOSE Manual *on-line*. Universidade Federal da Pernambuco, 2006. Em: <https://www.ufpe.br/biolmol/LeishmaniosesApostila_on_line/origem_classificacao.htm> 17 de novembro de 2015.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 12-13, p. 1262-81, 2000.

ASSIS, T. S. M. D.; BRAGA, A. S. D. C.; PEDRAS, M. J.; BARRAL, A. M. P.; SIQUEIRA, I. C. D.; COSTA, C. H. N.; ...CALDAS, A. D. J. M. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 17, n. 2, p. 107-116, 2008.

ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerging infectious diseases*, v. 2, n. 2, p. 145, 1996.

ARRUDA, M.M. Leishmanioses. Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Manual de Zoonoses-Programa de Zoonoses Região Sul, v. 1, n. 2, p. 68-90, 2010.

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.

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

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev. bras. epidemiol*, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BENBROOK, D. M.; MADLER, M. M.; SPRUCE, L. W.; BIRCKBICHLER, P. J.; NELSON, E. C.; SUBRAMANIAN, S.; ... & WANG, W. Biologically active heteroarotinoids exhibiting anticancer activity and decreased toxicity. *Journal of medicinal chemistry*, v. 40, n. 22, p. 3567-3583, 1997.

BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Química Nova*, v. 27, n. 3, p. 461-471, 2004.

BLACKWELL, J. M. Leishmaniasis epidemiology: all down to the DNA. *Parasitology*, London, v. 104, p. S19–S34, 1992.

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

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 b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2 ed., 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. Brasília, 2006.

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

BRITTA, E.A.; SILVA, A.P.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; SILVA, C.C.; SERNAGLIA, R.L.; NAKAMURA, C.V. Benzaldehyde thiosemicarbazone derived from limonene complexed with copper induced mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*. PloS one, v. 7, n. 8, p.41440, 2012.

BRITTA, E. A., SCARIOT, D. B., FALZIROLLI, H., UEDA-NAKAMURA, T., SILVA, C. C., DIAS FILHO, B. P., NAKAMURA, C. V. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. *BMC microbiology*, , 236, 2015.

BOCEDI, A.; GRADONI, L.; MENEGATTI, E.; ASCENZI, P. Kinetics of parasite cysteine proteinase inactivation by NO-donors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 35, p. 710-718, 2004.

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

CAPUTTO, M.E.; FABIAN, L.E.; BENÍTEZ, D.; MERLINO, A.; RÍOS, N.; CERECETTO, H.; MOLTRASIO, G.Y.; MOGLIONI A.G.; GONZÁLEZ, M.; FINKIELSZTEIN L.M. Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new

anti-Trypanosoma cruzi agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 19, n. 22, p. 6818-6826, 2011.

CARVALHO, P.B; ARRIBAS, M.A.G.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? *Revista brasileira de ciências farmacêuticas*, São Paulo, v. 36, p. 69- 96, 2000.

CASAS, J. S., GARCIA-TASENDE, M. S., & SORDO, J. Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 209, n. 1, p. 197-261, 2000.

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.

CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in Leishmania. *Journal of Parasitic Diseases*, v. 34, n. 1, p. 1-13, 2010.

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.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. *Nature reviews microbiology*, London, v. 2, n.9, p. 692 - 693, 2004.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinics in dermatology*, v. 14, n. 5, p. 417-423, 1996.

DE OLIVEIRA, J. F., DA SILVA, A. L., VENDRAMINI-COSTA, D. B., DA CRUZ AMORIM, C. A., CAMPOS, J. F., RIBEIRO, A. G., DE LIMA, M. D. C. A. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. *European journal of medicinal chemistry*, 104, 148-156, 2015.

DODD, R.H.; OUANNES, C.; ROBERT-GERO, M.; POTIER, P. Hybrid molecules: Growth inhibition of leishmania donovani promastigotes by thiosemicarbazones of 3-carboxy- β -carboline. *Journal of medicinal chemistry*, v. 32, n. 6, p. 1272-1276, 1989.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. The acidocalcisome as a target for chemotherapeutic agents in protozoan parasites. *Current Pharmaceutical Design*, Shipho, v.14, n.9, p.882-888, 2008.

DON, R.; CHATELAIN, E. Drug discovery for neglected diseases: view of a public-private partnership. *Antiparasitic and antibacterial drug discovery: from molecular targets to drug candidates*, p. 33-43, 2009.

DORLO, T. P. C.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H.; DEVRIES, P. J. "MILTEFOSINE: A review of its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Leishmaniasis," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 67, no. 11, pp.2576-2597, 2012.

DRUILHE, P.; HAGAN, P.; ROOK, G. A.W. The importance of models of infection in the study of disease resistance. *Trends in microbiology*, v. 10, n. 10, p. s38-s46, 2002.

DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P.S.; CAFFREY, C.R.; HOLLER, T.P.; MCKERROW, J.H.; 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, p. 2695-2707, 2002.

ESTADOS UNIDOS DA AMERICA - EUA. Departamento de Saúde e Serviços Humanos. Institutos Nacionais de Saúde EUA. Instituto nacional de alergia e doenças infecciosas. 2008. Em <<http://www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis/pages/lifecycle.aspx> > 17 de Novembro de 2015.

FEITOSA, M. M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. Anais do Primeiro Fórum sobre Leishmaniose Visceral Canina. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, p. 6-9, 2006.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). *Clinica Veterinária*, São Paulo, ano 5, v. 28, p. 36–44. 2000.

FISA, R.; RIERA, C., GALLEGU, M.; MANUBENS, J.; PORTUS, M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary parasitology*, v. 99, n. 2, p. 105-111, 2001.

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

GARNIER T.; CROFT S. L. Topical treatment for cutaneous *Leishmaniasis*. *Current Opinion in Investigational Drugs*, v.3, n.4, 2002.

GENOVA, P.; VARADINOVA, T.; MATESANZ, A. I.; MARINOVA, D.; SOUZA, P. Toxic effects of bis (thiosemicarbazone) compounds and its palladium (II) complexes on herpes simplex virus growth. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 197, n. 2, p. 107-112, 2004.

GLINMA, B.; KPOVIESSI, S.D.; GBAGUIDI, F.A.; KAPANDA, C.N.; BERO, J.; QUETIN-LECLERCQ, J.; MOUDACHIROU, M.; POUPAERT, J.; ACCROMBESSI, G.C.; GACHOMO, E.W.; BABA-MOUSSA, L.; KOTCHONI, S.O. Trypanocidal and cytotoxic evaluation of synthesized thiosemicarbazones as potential drug leads against sleeping sickness. *Molecular biology reports*, v. 41, n. 3, p. 1617-1622, 2014.

GLISONI, R. J., CUESTAS, M. L., MATHET, V. L.; OUBIÑA, J. R.; MOGLIONI, A. G.; SOSNIK, A. Antiviral activity against the hepatitis C virus (HCV) of 1-indanone thiosemicarbazones and their inclusion complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 47, n. 3, p. 596-603, 2012.

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.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous *Leishmaniasis*. *Expert Review of Anti Infective Therapy*. v.8, n.4, p.419-433, 2010.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology*, London, v.44, p.1-39, 2000.

HANG, H. C.; BERTOZZI, C. R. Chemoselective approaches to glycoprotein assembly. *Accounts of chemical research*, v. 34, n. 9, p. 727-736, 2001.

HARHAY, M. O. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in parasitology*, Oxford, v. 27, n.9, p. 403-409, 2011.

HERNANDES, M. Z. et al. Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Oxford, v. 18, p. 7826–7835, 2010.

HUSSAIN, H.; AL-HARRASI, A.; AL-RAWAHI, A.; GREEN, I. R.; GIBBONS, S. Fuitful decade for antileishmanial compounds from 2002 to late 2011. *Chemical Reviews*, v. 114, p. 10369-10428, 2014.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; & GORGOULIS, V. G. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Veterinary Parasitology*, v. 113, n. 2, p. 99-113, 2003.

JOSEPH, M.; KURIAKOSE, M.; KURUP, M. P.; SURESH, E.; KISHORE, A.; BHAT, S. G. Structural, antimicrobial and spectral studies of copper (II) complexes of 2-benzoylpyridine N (4)-phenyl thiosemicarbazone. *Polyhedron*, v. 25, n. 1, p. 61-70, 2006.

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

KHAN, S. A.; ASIRI, A. M.; AL-AMRY, K.; MALIK, M. A. Synthesis, Characterization, Electrochemical Studies, and In Vitro Antibacterial Activity of Novel Thiosemicarbazone and Its Cu (II), Ni (II), and Co (II) Complexes. *The Scientific World Journal*, v. 2014, 2014.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A. A. D.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do sul, Brasil. *Ciênc. rural*, v. 37, n. 3, p. 907-910, 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. NEW WORLD LEISHMANIASIS. *TOPLEY AND WILSON'S MICROBIOLOGY AND MICROBIAL INFECTIONS*, 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.

LEONTIDES, L. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A. F.; GALATOS, A. D.; MYLONAKIS, M. E. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Veterinary parasitology*, v. 109, n. 1, p. 19-27, 2002.

LI, J.; LUO, X.; WANG, Q.; ZHENG, L. M.; KING, I.; DOYLE, T. W.; CHEN, S. H. Synthesis and biological evaluation of a water soluble phosphate prodrug of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP). *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 8, n. 22, p. 3159-3164, 1998.

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.

LIÑARES, G. E. G.; RAVASCHINO, E. L.; RODRIGUEZ, J. B. Progresses in the Field of Drug Design to Combat Tropical Protozoan Parasitic Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, Schiphol, v. 13, p. 335-360, 2006.

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.

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.

MANZANO, J. I., COCHET, F., BOUCHERLE, B., GÓMEZ-PÉREZ, V., BOUMENDJEL, A., GAMARRO, F., & PEUCHMAUR, M. Arylthiosemicarbazones as antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 123, p. 161-170, 2016.

MENDONÇA, T. A. (2007). Síntese e avaliação das atividades anti-Toxoplasma gondi e antimicrobiana de benzaldeído 4-fenil-3-tiossemicarbazonas e derivados 2 [(fenilmetileno) hidrazono]-3-fenil-4-tiazolidinona-5-substituídos,2007.

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.

MANETTI, F.; CORELLI, F.; BIAVA, M.; FIORAVANTI, R.; PORRETTA, G. C.; BOTTA, M. Building a pharmacophore model for a novel class of antitubercular compounds. *Il Farmaco*, v. 55, n. 6, p. 484-491, 2000.

MELOS, J. L. R.; TORRES-SANTOS, E. C.; FAIÕES, V. D. S.; DEL CISTIA, C. D. N.; SANT'ANNA, C. M. R.; RODRIGUES-SANTOS, C. E.; ECHEVARRIA, A. Novel 3, 4-methylenedioxyde-6-X-benzaldehyde-thiosemicarbazones: Synthesis and antileishmanial effects against *Leishmania amazonensis*. *European journal of medicinal chemistry*, v. 103, p. 409-417, 2015.

MIRANDA, G. M. D. Leishmaniose visceral em Pernambuco: a influência da urbanização e da desigualdade social. 2008.

MINODIER, P., & PAROLA, P. (2007). Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel medicine and infectious disease*, 5(3), 150-158.

MONTEIRO, E.M.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R.T.; COSTA, D.C.; BARATA, R.A.; PAULA, E.V.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; ROCHA, M.F.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G.H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Current opinion in microbiology*, v. 7, n. 4, p. 375-381, 2004.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

MUTHUKUMAR, V. A.; GEORGE, S.; VAIDHYALINGAM, V. Synthesis and Pharmacological Evaluation of 1-(1-((Substituted) methyl)-5-methyl-2-oxoindolin-3-ylidene)-4-(substituted pyridin-2-yl) thiosemicarbazide. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 31, n. 7, p. 1461-1464, 2008.

NAGLE, A. S., KHARE, S., KUMAR, A. B., SUPEK, F., BUCHYNSKY, A., MATHISON, C. J., MOLTENI, V. (2014). Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis. *Chemical reviews*, 114(22), 11305-11347.

NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. 12 ed. São Paulo, Atheneu. 2011.

NOMIYA, K.; SEKINO, K.; ISHIKAWA, M.; HONDA, A.; YOKOYAMA, M.; KASUGA, N. C.; ...ONODERA, K. Syntheses, crystal structures and antimicrobial activities of monomeric 8-coordinate, and dimeric and monomeric 7-coordinate bismuth (III) complexes with tridentate and pentadentate thiosemicarbazones and pentadentate semicarbazone ligands. *Journal of inorganic biochemistry*, v. 98, n. 4, p. 601-615, 2004.

NUNES, C.M.; DIAS, A.K.; GOTTARDI, F.P.; PAULA, H.B.; AZEVEDO, M.A.; LIMA, V.M.; GARCIA, J.F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.16, n.1, p. 5-9, 2007.

OBSERVATÓRIO NACIONAL DAS LEISHMANIOSES (ONLEISH).2015 Em <<http://www.onleish.org/index.php?article=27&visual=3>> 17 de novembro de 2015.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS/OMS). *Leishmaniasis: Informe epidemiológico de las Américas*, 2016.

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.

PECÓUL, B.; ALVARADO, J. *Enfermedades de la pobreza, enfermedades tropicales desatendidas*. v. 7, p. 75-84, 2014.

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.

PERVEZ, H., MANZOOR, N., YAQUB, M., & KHAN, K. M. 5-Nitroisatin-derived thiosemicarbazones: potential antileishmanial agents. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 29(5), p. 628-632. 2014.

PAIVA, B. R.; PASSOS, L. N.; FALQUETO, A.; MALAFRONTA, R. D. S.; ANDRADE JR, H. F. D. Single step polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania* (*Viannia*) subgenus. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 46, n. 6, p. 335-338, 2004.

PANICO, R.; POWELL, W. H.; RICHER, J. C.; eds.; *IUPAC – Nomenclature of organic compounds*; Blackwell: London, 1993.

PALADIN LABS INC. "Application for Inclusion of Miltefosine on WHO Model List of Essential Medicines.", 2010. EM <http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/18/applications/Milt efosine_application.pdf> Acesso: 03 de setembro de 2015;

PAVAN, F. R.; MAIA, P. I. D. S.; LEITE, S. R.; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A.; SATO, D. N.; ... LEITE, C. Q. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti-Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity. *European journal of medicinal chemistry*, v. 45, n. 5, p. 1898-1905, 2010.

PASSOS, S.; CARVALHO, L. P.; ORGE, G.; JERONIMO, S. M.; BEZERRA, G.; SOTO, M.; ... CARVALHO, E. M. Recombinant Leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 12, n. 10, p. 1164-1167, 2005.

QUEIROZ, M.J.; ALVES, J.G.; CORREIA, J.B. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. *Journal of Pediatrics*, v.80, n.2, 141-146, 2004.

RABÊLO, J. M. M. Flebótomos vetores das leishmanioses (Manual para técnicos e profissionais de saúde). São Luís: Universidade Federal do Maranhão, 1999.

RAJASEKARAN, R.; CHEN, Y.P. P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. *Drug discovery today*, v. 20, n. 8, p. 958-968, 2015.

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.

REY, L. *Parasitologia*. 3 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan 2010.

ROBERTSON, C. D.; COOMBS, G.H. Cathepsin B-like cysteine proteases of *Leishmania mexicana*. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 62, n. 2, p. 271-279, 1993.

ROJAS, R., VALDERRAMA, L., VALDERRAMA, M., VARONA, M. X., OUELLETTE, M., & SARAIVA, N. G. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (Viannia) infection. *Journal of Infectious Diseases*, v.193, p.1375–1383, 2006.

SCHNEIDER, P. BORDIER C., ETGES, R. "Membrane Proteins and Enzymes of *Leishmania*." *Subcell. Biochem.*, vol. 18, pp. 39–72, 1992.

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

SCHRÖDER, J.; NOACK, S.; MARHÖFER, R.J.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H.; SELZER, P.M. Identification of semicarbazones, thiosemicarbazones and triazine nitriles as inhibitors of *Leishmania mexicana* cysteine protease CPB. *Plos one*, v. 8, n. 10, 2013.

SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE DE PERNAMBUCO. Disponível em <<http://portal.saude.pe.gov.br/programa/secretaria-executiva-de-vigilancia-em-saude/programa-sanar-doencas-negligenciadas>> Acesso em 06 janeiro 2017.

SELZER, P.M. Identification of semicarbazones, thiosemicarbazones and triazine nitriles as inhibitors of *Leishmania mexicana* cysteine protease CPB. *Plos one*, v. 8, n. 10, 2013.

SILES R, CHEN SE, ZHOU M, PINNEY KG, TRAWICK ML. Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease. *Bioorg Med Chem Lett* 2006.

SILVA, A. C. D. Análise in vitro do potencial imunomodulatório e leishmanicida de derivados de tiossemicarbazona e ftalimida, 2013.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Rev Trop: Ci Agr Biol*, v. 1, p. 20-31, 2007.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Protease de *Leishmania*: Novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Química Nova*, v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.

SILVA, E. S.,; GONTIJO, C. M.; PACHECO, R. S.; FIUZA, V. O.; BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.

SHAO, J.; MA, Z. Y.; LI, A.; LIU, Y. H.; XIE, C. Z.; QIANG, Z. Y.; XU, J. Y. Thiosemicarbazone Cu (II) and Zn (II) complexes as potential anticancer agents: Syntheses, crystal structure, DNA cleavage, cytotoxicity and apoptosis induction activity. *Journal of inorganic biochemistry*, v. 136, p. 13-23, 2014.

SOARES, R. O. A.. Avaliação da atividade e toxicidade de derivados de tiossemicarbazonas e semicarbazonas contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania (L.) amazonensis* in vitro. 2007. Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz.

SOUZA, W.; KRITSKI, A. L.; MOREL, C. M. ; LEMOS, E. R. S.; GARCIA, E.; CAMARGO, E. P.; GUIMARÃES, J.; COURA, J. R.; NETO, M. B.; MORAES, M. VASCONCELOS, O ; ROZENTAL, P; FRACALANZA, S. Doenças Negligenciadas. Academia Brasileira de Ciências. Rio de Janeiro, p.7-11, 2010.

SOUZA, A. D.; NUNES, V. L. B.; BORRALHO, V. M.; & ISHIKAWA, E. A. Y. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul state, Brazil: a case report. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 15, n. 2, p. 359-365, 2009.

SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v.103, n.4, p.313-325, 2008.

SUCEN. São Paulo- Superintendência de Controle de Endemias. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria do Estado de Saúde de São Paulo. *Leishmaniose Visceral Americana*. São Paulo: Sucen. 2011.

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; ENGEL, J.; SINDERMAN, H.; FISCHER, C.; ... BERMAN, J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*, v. 347, n. 22, p. 1739-1746, 2002.

SUNDAR, S. CHATTERJEE, M. "Visceral Leishmaniasis – Current Therapeutic Modalities.," *Indian J. Med. Res.*, vol. 123, no. 3, pp. 345–352, 2006.

SURUNDU, N.; PALNE, S.; CHAUHAN, P. M. S.; GUPTA, S. Synthesis and antileishmanial activity of novel 2,4,6-trisubstituted pyrimidines and 1,3,5-triazines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.44,n.16, p. 2473-2481. 2009.

TENÓRIO, R. P.; GÓES, A. J.; DE LIMA, J. G.; DE FARIA, A. R.; ALVES, A. J.; AQUINO, T. M. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. *Química Nova*, v. 28, n. 6, p. 1030, 2005.

TORRES, D. FILHO, F. B. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.

TEIXEIRA, D. E.; BECHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P.H.; PIMENTA, P. F. P., DE SOUZA, W. Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*. Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, Rio de Janeiro, 1 ed., 2013.

VALVERDE, R. Doenças negligenciadas. FIOCRUZ Em: <<http://www.agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>>. Acesso em 23 setembro 2015.

VELOZO, D.; CABRAL, A.; RIBEIRO, M. C. M.; DA MOTTA, J. D. O. C.; COSTA, I. M. C.; SAMPAIO, R. N. R. Leishmaniose mucosa fatal em criança Fatal mucosal leishmaniasis in a child. An Bras Dermatol, v. 81, n. 3, p. 255-9, 2006.

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (nota preliminar). Brasil medico, v. 25, p. 411, 1911.

WALCOURT, A.; KURANTSIN-MILLS, J.; KWAGYAN, J.; ADENUGA, B.B.; KALINOWSKI, D.S.; LOVEJOY, D.B.; LANE, D.J.; RICHARDSON, D.R; Anti-plasmodial activity of aroylhydrazone and thiosemicarbazone iron chelators: Effect on erythrocyte membrane integrity, parasite development and the intracellular labile iron pool. Journal of inorganic biochemistry, v. 129, p. 43-51, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em 06 janeiro 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO. Control of the leishmaniasis. World Health Organization Technical Report Series, n. 949, p. xii, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO "WHO Model List of Essential Medicines -17th List." 2011. Em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95053_eng.pdf> Acesso: 25 de novembro de 2015