



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

DIOGO CHAVES GAMA AIRES

**DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS E TIAZOLIDINÔNICOS COMO
POSSÍVEIS CANDIDATOS AO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE**

Recife
2017

DIOGO CHAVES GAMA AIRES

**DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS E TIAZOLIDINÔNICOS COMO
POSSÍVEIS CANDIDATOS AO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em ciências farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas – Área de concentração: Síntese e planejamento de fármacos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

RECIFE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

B574s Aires, Diogo Chaves Gama.
Derivados tiossemicarbazônicos e tiazolidinônicos como possíveis
candidatos ao tratamento da leishmaniose / Diogo Chaves Gama Aires. –
2017.
83 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Ricardo Olímpio de Moura.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2017.
Inclui referências.

1. Leishmaniose. 2. Isotiocianato. 3. Tiossemicarbazonas. 4.
Leishmania infantum. 5. Macrófagos. I. Moura, Ricardo Olímpio de
(Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23. ed.) UFPE (CCS 2017-337)

DIOGO CHAVES GAMA AIRES

**DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS E TIAZOLIDINÔNICOS COMO
POSSÍVEIS CANDIDATOS AO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em ciências farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas – Área de concentração: Síntese e planejamento de fármacos.

Aprovada em: 27 / 06 /2017

Defesa de mestrado de Diogo Chaves Gama Aires, em 27 de 06 de 2017 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

Universidade Estadual da Paraíba

Assinatura: _____

Prof. Dr. Tiago Bento de Oliveira

Instituto Federal de Alagoas

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a Anekécia Lauro da Silva

Universidade Federal do Vale do São Francisco

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REITOR:

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas dourado

VICE-REITOR:

Prof^a. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO:

Prof. Ermani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE:

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE:

Prof^a. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS:

Prof. Antônio Rodolfo de Faria

SUB-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS:

Prof^a. Elba Lúcia Cavalcante de Amorim

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS:

Prof. Almir Gonçalves Wanderley

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

Prof. Rafael Matos Ximenes

Dedico esse trabalho à minha família e amigos, pois sem o apoio de todos não teria a força necessária para concluir essa empreitada. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhora tudo o que tenho produzido na vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, a quem recorri nas horas de angústias e tristezas, iluminando meu passos e decisões.

Aos meus pais, Ernandes José Aires Filho (in memorian) e Djardieire Chaves Gama, que me concederam a educação e a vida.

Aos meus avós Audemice de Carvalho Aires e Ernandes José Aires (in memorian), que nunca deixaram que nada me faltasse quando não tinha a quem mais recorrer, sem eles não teria chegado até aqui.

Ao Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura por ter aceito ser meu orientador. A ele sou grato por todo conhecimento transmitido e presteza nas horas de dificuldades.

Em especial, a Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima, por estar do meu lado por todos esses anos de minha vida acadêmica como guia e madrinha científica, mas principalmente como amiga. A ela devo toda minha trajetória científica.

Ao Prof. Dr. Jorge Luiz Neves por conceder o espaço em seu laboratório para realização dos experimentos espectroscópicos.

Aos meus amigos do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica, em especial, Iris Trindade, Mirelly Miranda, Amélia Ribeiro, Kerollainy Santos, Edson Rubens, Luiz Nascimento, Allana Gouveia, Cezar Amorim, Pedro Bomfim, Jamerson de Oliveira e Tiago Bento por toda paciência, colaboração e apoio durante a elaboração desse trabalho.

A minha amiga e companheira Paula Roberta da Silva, pelo desenvolvimento dos estudos biológicos, e principalmente pelo apoio moral e emocional.

À CAPES e CNPq, pelo suporte financeiro.

“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber.”

Confúcio

RESUMO

As Leishmanioses estão entre as doenças tropicais negligenciadas, atingindo milhões de pessoas por ano, principalmente em países subdesenvolvidos. Doença infecciosa, causada por um protozoário do gênero *Leishmania*, da família Trypanosomatidae, a leishmaniose possui tratamento realizado através de fármacos antimoniais pentavalentes. Os fármacos de segunda escolha são a anfotericina B e a pentamidina. Porém o uso desses medicamentos é limitado devido a sua alta taxa de efeitos adversos e ao aparecimento de resistência do protozoário. Dessa forma surge a necessidade da busca de novos fármacos que sejam mais eficazes e específicos para tratamento da doença. Nesse contexto, os derivados tiossemicarbazônicos são importantes compostos na busca dessas alternativas medicamentosas devido às suas propriedades química e biológicas e por possuir via sintética simples e rápida. Suas atividades já foram estudadas e comprovadas, como sua ação antichagásica, antitumoral, antibacteriana e antiprotozoária. Diante disso foram obtidos novos compostos tiossemicarbazônicos e tiazolidinônicos, através de rota sintética linear, partindo da reação de um isotiocianato e um aldeído, com obtenção da tiossemicarbazona e sua posterior ciclização e consecução das 4-tiazolidinonas. A citotoxicidade dos compostos foi avaliada em macrófagos através do método de redução dos sais amarelos de tetrazólio, *in vitro*, que analisa a concentração capaz de inviabilizar 50% das células macrófágicas. Os efeitos dos compostos sobre o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania infantum* foram avaliados com base no estudo *in vitro*, onde se averiguou o valor capaz de inibir metade da concentração da espécie estudada, para que em seguida fosse determinado o índice de seletividade de cada composto. Devido à importância da produção de óxido nítrico no que diz respeito a eliminação de patógenos pelas células fagocitárias, foi avaliada, através do reagente de Griess, o estímulo da produção do ácido pelos macrófagos frente aos compostos sintetizados. Toda série D foi devidamente caracterizada por métodos espectroscópico e espectrométricos. A análise dos dados mostrou que todas as moléculas apresentaram atividade inibitória frente às células promastigotas (fase evolutiva flagelada) da *Leishmania infantum*, com destaque para o composto LQIT/D04 que apresentou a menor concentração inibitória e valor de citotoxicidade inferiores ao controle (anfotericina B). O teste de óxido nítrico em macrófagos apresentou resultados significativos para os compostos LQIT/D01, LQIT/D03 e LQIT/D04, evidenciando o potencial leishmanicida da série. Em relação aos estudos de estrutura/ atividade se verificou que a estratégia de ciclização aumentou a ação das substâncias frente a *Leishmania infantum*, bem como a adição do substituinte ácido propiônico na posição cinco do anel tiazolidínico. Fundamentado nos dados obtidos, a tiossemicarbazona e seus derivados tiazolidinônicos se mostram como fortes candidatos a fármacos no tratamento da leishmaniose.

Palavras chaves: Leishmaniose. Isotiocianato. Tiossemicarbazonas. *Leishmania infantum*. Macrófagos.

ABSTRACT

Leishmaniasis are among the neglected tropical diseases, reaching millions of people per year, especially in underdeveloped countries. An infectious disease caused by a protozoan of the *Leishmania* genus of the family Trypanosomatidae, leishmaniasis is treated by pentavalent antimonial drugs. The drugs of second choice are amphotericin B and pentamidine. However, the use of these drugs is limited because of their high rate of adverse effects and the appearance of protozoan resistance. Thus, the need for the search for new drugs that are more effective and specific for the treatment of the disease arises. In this context, thiosemicarbazonic derivatives are important compounds in the search for these drug alternatives due to their chemical and biological properties and to have a simple and rapid synthetic route. Its activities have already been studied and proven, as its antichagasic, antitumor, antibacterial and antiprotozoal action. In this way, new thiosemicarbazonic and thiazolidinonic compounds were obtained through linear synthetic route, starting from the reaction of an isothiocyanine and an aldehyde, obtaining the thiosemicarbazone and its subsequent cyclization and the achievement of the 4-thiazolinones. The cytotoxicity of the compounds was evaluated in macrophages by the in vitro tetrazolium salts reduction method, which analyzes the concentration capable of impairing 50% of macrophage cells. The effects of the compounds on the growth of promastigotes forms of *Leishmania infantum* were evaluated based on the in vitro study, where the value capable of inhibiting half the concentration of the studied species was investigated, so that the selectivity index of each compound . Due to the importance of the production of nitric oxide in relation to the elimination of pathogens by phagocytic cells, the stimulation of the production of the acid by macrophages against the synthesized compounds was evaluated through Griess reagent. Every D series was suitably characterized by spectroscopic and spectrometric methods. Data analysis showed that all the molecules presented inhibitory activity against the promastigote cells (flagellated evolutionary phase) of *Leishmania infantum*, with emphasis on the compound LQIT / D04 that presented the lowest inhibitory concentration and cytotoxicity value lower than the control (amphotericin B) . The nitric oxide test in macrophages presented significant results for the compounds LQIT / D01, LQIT / D03 and LQIT / D04, evidencing the leishmanicidal potential of the series. In relation to the structure / activity studies, it was verified that the cyclization strategy increased the action of the substances against *Leishmania infantum*, as well as the addition of the propionic acid substituent in the position five of the thiazolidine ring. Based on the data obtained, thiosemicarbazone and its thiazolidinonic derivatives are shown as strong drug candidates in the treatment of leishmaniasis.

Key words: Leishmaniasis. Isothiocyanate. Thiosemicarbazones. *Leishmania infantum*. Macrophages.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Microscopia das formas promastigotas (A) e amastigotas (B) da leishmaniose spp. 23
- Figura 2:** Acumulados de casos da leishmaniose visceral em Pernambuco por município de 2005 – 2014. 25
- Figura 3:** Casos de Leishmaniose Visceral Humana de Pernambuco de acordo com a situação de domicílio (zona urbana, rural), 2005-2014. 26
- Figura 4:** Flebotomíneo fêmea: transmissor da leishmaniose. 27
- Figura 5:** Ciclo biológico da leishmaniose spp. 28
- Figura 6:** Entrada e estabelecimento da *leishmania* spp. dentro do macrófago, diferenciação da forma promastigota em amastigota, formação do vacúolo e estabelecimento do PH no interior da célula. 30
- Figura 7:** Ciclo da *leishmania* spp no interior da célula hospedeira. 31
- Figura 8:** Manifestações clínica da leishmaniose por *L. infantum*: A) extensiva hepatoesplenomegalia; B) lesão cutânea localizada. 32
- Figura 9:** Antimoniais pentavalentes. 34
- Figura 10:** Estrutura química da Anfotericina B. 35
- Figura 11:** Estrutura química da miltefosina. 35
- Figura 12:** Estrutura química da pentamidina. 36
- Figura 13:** Estrutura química da sitamaquina. 37
- Figura 14:** Estrutura química das tiossemicarbazonas e a numeração dos seus átomos segundo a IUPAC. 37
- Figura 15:** Estrutura Química da Tiazolidina. 38
- Figura 16:** Semelhança estrutural da 4-tiazolidinona e tiossemicarbazona. 39
- Figura 17:** Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do composto D01. 52
- Figura 18:** Ampliação do espectro de RMN ¹H do composto D01 evidenciando os hidrogênios azometínicos, aromáticos e hidrazínico. 53
- Figura 19:** Espectro IV da tiossemicarbazona (D01) evidenciando 54

suas principais bandas.

Figura 20: Espectro de RMN de hidrogênio do derivado tiazolidínico D03. 55

Figura 21: Espectro IV da tiazolidinona (D02) evidenciando suas principais bandas. 56

Figura 22: Derivado tiossemicarbazônico (A) e 4- tiazolidinônico (B). 63

Figura 23: Estrutura química dos compostos LQIT/D04 (A), LQIT/D01 (B) e LQIT/D02 (C). 63

Figura 24: Estrutura química dos enantiômeros (R)-LQIT/D04 e (S)-LQIT/D04. 64

Figura 25: Gráficos referentes a produção de óxido nítrico dos derivados tiossemicarbazônicos e tiazolidinônicos em 72 horas. 66

Esquema 1: Formação das tiossemicarbazidas a partir de isotiocianatos na presença de hidrazina. 38

Esquema 2: Procedimento geral para a síntese dos derivados tiossemicarbazônicos e tiazolidínicos. 41

Esquema 3: Mecanismo reacional da tiossemicarbazona (LQIT/D01). 48

Esquema 4. Mecanismo de obtenção da 4-tiazolidinona por condensação com o dietilacetileno-carboxilato (LQIT/D02). 49

Esquema 5. Mecanismo de obtenção da 4-tioazolidina por condensação com cloroacetato de sódio (LQIT/D03). 50

Esquema 6: Obtenção da 4-tiazolidinona por adição com anidrido maleico (LQIT/D04). 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação da citotoxicidade in vitro dos derivados isotiocianatos frente a macrófagos J774. **60**

Tabela 2: Atividade leishmanicida in vitro dos derivados isotiocianatos sobre promastigotas de *L. infantum*. **61**

LISTA DE ABREVIATURAS

C3b	Complemento 3b
C3bi	Complemento 3b inativa
CC ₅₀	Concentração citotóxica cinquenta por cento
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃ -d ₆	Clorofórmio deuterado
CR1	Complement receptor 1
CR3	Complement receptor 3
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Eq.	Equivalente
G1/S	Primeiro gap de síntese proteica
HIV	Human immunodeficiency vírus
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentração inibitória cinquenta por cento
IL12	Interleucina 12
IFN γ	Interferon gama
IS	Índice de seletividade
IUPAC	Internacional Union of Pure and Applied Chemistry
IV	Infravermelho
LC	Leishmaniose cutânea
LPG	Lipophosphoglycan
LPG	Molécula lipofosfoglicana

LQIT	Laboratório de química e inovação terapêutica
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
MHz	Mega-hertz
MTT	(3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
PBS	Tampão fosfato salino
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
PH	Potencial hidrogeniônico
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RMN ¹³ H	Ressonância magnética de carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância magnética de hidrogênio
RR	Ribonucleotídeo redutase
SFB	Soro fetal bovino
Th1	Linfócitos T helper
TNF- α	Alfa tumoral factor necrosis
TSC	Tiossemicarbazona
UV	Ultravioleta
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
gp63	Glicoproteína gp63
m	Mutipleto
s	Singleto
t	Tripleto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2. Objetivo Específico	21
3. REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1. Leishmaniose: características gerais.	23
3.2. Epidemiologia da <i>Leishmaniose spp.</i>	24
3.3. Vetor: características gerais	26
3.4. Ciclo biológico da <i>Leishmania spp.</i>	27
3.5. Manifestações clínicas.....	31
3.6. Diagnóstico e tratamento	33
3.7. Tiosemicarbazonas	37
3.8. Tiazolidinonas.....	38
4. METODOLOGIA	41
4.1. Procedimento geral para a síntese dos derivados tiosemicarbazônicos e tiazolidínicos 41	
4.2. Materiais e Equipamentos.....	42
4.3. Reagentes e solventes	42
4.4. Procedimento químico experimental	42
4.4.1. Síntese da tiosemicarbazida LT-NO ₂	42
4.4.2. Síntese do composto 2-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)-N-(4-nitrofenil)hidrazinacarbotioamida (D01)	43
4.4.3. Síntese do composto Etil2-(4-bromo-2-((metoximetileno)but-3-en-1-ilideno)hidrazona)-3-(4-nitrofenil)-4-oxotiazolidina-5-ilideno)acetato (D02).....	43
4.4.4. Síntese do composto (5-bromo-2-metoxibenzilideno)hidrazona)-3-(4-nitrofenil)tiazolidin-4-ona (D03)	43
4.4.5. Síntese do composto (5-bromo-2-metoxibenzilideno)hidrazona)-3-(4-nitrofenil)-4-oxotiazolidina-5-il)ácido acético (D04).....	44
4.5. Materiais e métodos.....	44
4.6. Estudo da citotoxicidade dos compostos.....	44
4.7. Atividade biológica <i>in-vitro</i> da <i>Leishmania Infantum</i>	45
4.8. Produção de óxido nítrico (NO).....	46
5. RESULTADOS	48

5.1. Resultados Químicos	48
<i>5.1.1. Caracterização estrutural da tiosemicarbazona</i>	51
<i>5.1.2. Caracterização estrutural das tiazolidinonas</i>	54
<i>5.1.3. Dados espectroscópicos e espectrométricos dos compostos tiosemicarbazônicos e tiazolidínicos</i>	57
<i>5.1.4. Resultados biológicos</i>	60
6. CONCLUSÕES	70
6.1. PERSPECTIVAS	71
REFERÊNCIAS	74

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Segundo o ministério da saúde (2010), doenças negligenciadas, termo utilizado para designar doenças prevalentes nas regiões em condições de pobreza ou em desenvolvimento, representam uma forte barreira no progresso de um país e contribui para manutenção da desigualdade social, afetando mais de 1 bilhão de pessoas em todo mundo, o que representa um sexto da população mundial. Devido ao desinteresse das grandes empresas farmacêuticas, a produção de conhecimento científico acerca dessas enfermidades não vem produzindo resultados significativos no que diz respeito a produção de novos medicamentos, pois, a falta de potencial comprador não atrai investimentos na área (SOUZA et. al., 2010).

A leishmaniose, doença negligenciada provocada por diferentes espécies de protozoários flagelados do gênero *leishmania*, afeta doze milhões de pessoas em todo mundo e provoca cerca de oitenta mil mortes anualmente. Tendo a sua forma clínica não-letal a leishmaniose tegumentar (LT) e a letal a leishmaniose visceral (LV), quando não tratada, afetando quinhentas mil pessoas de todo contingente infectado (IQBAL et al., 2016). Na América Latina, umas das áreas endêmicas, possuem pelo menos oito espécies diferentes, cada uma com sua própria patogenicidade e virulência (MONTALVO, et al., 2012). Enquanto no Brasil, que abriga 90% dos casos registrados, as regiões de maior predominância da doença se concentra no norte e nordeste do país, embora atinja todo o território, com uma menor preeminência na região sul do país (FINATEC, 2010).

O tratamento de escolha para essa patologia é limitado, e envolve principalmente antimoniais pentavalentes, como medicamento de primeira escolha, anfotericina B e pentamida, como fármacos de segunda escolha (CROFT, 2011). Contudo, efeitos colaterais no tratamento com antimoniais, como arritmia cardíaca e pancreatite, foram observados, bem como disseminação de resistência a mesma. A alternativa com anfotericina B e pentamidas também não está livre de toxicidade, e somado a teratogenicidade e alto custo de mercado torna seu uso restrito (CROFT, 2011).

Diante da dificuldade no tratamento, as tiossemicarbazonas (TBZ) se mostram como fortes candidatos a novos fármacos no tratamento da leishmaniose,

visto a sua ação já descrita na literatura frente a *Leishmania amazonenses*, onde os estudos demonstraram ação antiploriferativa do devido a alterações morfológicas e ultraestrutural do parasita, bem como interferências em diversos processos celulares que acarretaram em mudanças na forma e função mitocondrial, e presença de características celulares constatado em células que sofrem apoptose (BRITTA, 2014).

Ainda, as tiossemicarbazonas podem ser vistas como análogos estruturais das 4-tiazolidinona, obtidas a partir da ciclização das tiossemicarbazonas, que, por sua vez, possuem diversas atividades descritas na literatura tais como, anticâncer, antibacteriana, antiviral, antituberculosa, antimicrobiana, antifúngica e antiparasitária (SANTIAGO, 2014). Outra vantagem está na possibilidade de substituições no anel heterocíclico da tiazolidina nos permitindo realizar um estudo de relação estrutura-atividade (REA), visto que diferentes substituintes podem apresentar efeitos distintos (LEITE, et al. 2016).

Diante deste cenário, o Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT/UFPE) surge com a proposta de sintetizar novos derivados tiossemicarbazonicos e seus análogos substituídos, como potenciais fármacos no tratamento da leishmaniose através de testes *in-vitro*, haja vista a dificuldade de tratamento ante essa afecção.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- ✓ Síntese de novos derivados da tiossemicarbazona e tiazolidinona com potencial atividade leishmanicida.

2.2. Objetivo Específico

- ✓ Síntese e determinação das características físico-químicas dos novos derivados tiossemicarbazônicos e tiazolididínicos;
- ✓ Elucidação estrutural através de técnicas espectroscópicas no infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e espectrometria de massas;
- ✓ Analisar a citotoxicidade dos compostos, através da determinação do CC_{50} .
- ✓ 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*;
- ✓ Avaliação da produção do óxido nítrico (NO).

Revisão de literatura

3. REVISÃO DE LITERATURA

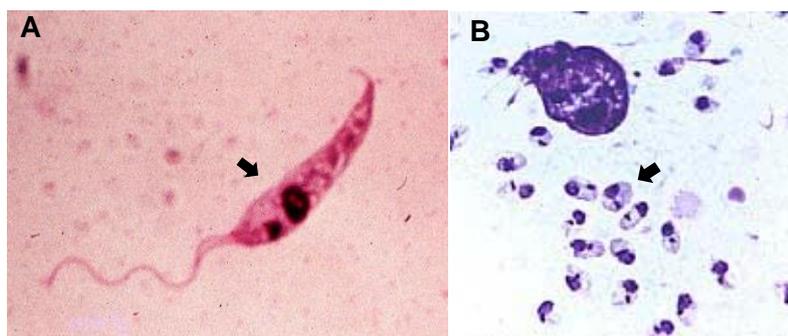
3.1. Leishmaniose: características gerais.

A leishmaniose é um protozoário tripanossomatídeo, pertencente a ordem kinetoplastida, do gênero *Leishmania*, que compreende mais de 20 espécies diferentes. Podem ser divididas de acordo com suas manifestações clínicas em dois grandes grupos: leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, e leishmaniose tegumentar (LT), subdividida em cutânea e muco-cutânea (SUNDAR, 2013; WHO, 2010).

Comumente a LV é causada pela *L. donovani* no subcontinente indiano, Ásia e África, enquanto a *L. infatum* acometem regiões como América do Sul, Mediterrâneo e Ásia central (SILVA, 2008), enquanto a LT atinge principalmente regiões tropicais e subtropicais. Sete diferentes espécies já foram identificadas no Brasil. Com três espécies principais: *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(V.) amazonenses*, e demais espécies *L.(V.) lainsoni*, *L.(V.) naiffi*, *L.(V.) lindenberg* e *L.(V.) shawi* em estados das regiões Norte e Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Tratando-se de parasitas pleomórficos assumem duas fases evolutivas majoritárias: promastigotas, formas flageladas que se desenvolvem no trato gastrointestinal do vetor, e amastigotas, formas não flageladas que se multiplicam dentro de células macrofágicas dos mamíferos (figura 1) (PACE, 2014; FEITOSA, 2016).

Figura 1: Microscopia das formas promastigotas (A) e amastigotas (B) da *leishmania* spp.



Fonte: Modificada de SILVA (2008).

3.2. Epidemiologia da *Leishmaniose spp.*

A epidemiologia da leishmaniose é bastante diversificada. A doença está presente nos subcontinentes indianos e juntos com Brasil e leste da África formam as áreas mais endêmicas. Por volta de 90% dos casos estão presentes em seis países: Brasil, Bangladesh, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do sul. Em todo mundo é estimado cerca de 300.000 novos casos por ano. A região sudeste da África é a única região que possui políticas públicas efetivas (menos de 1 caso a cada 10000 habitantes) no combate a LV como problema de saúde pública, devido a ferramentas modernas de prevenção e vigilância intensa dos casos, reduzindo a mortalidade (WHO, 2015).

São estimados cerca de 0,7 – 1,2 milhões de casos de leishmaniose cutânea (LC), principalmente no litoral mediterrâneo, Américas e oeste da Ásia, cada região contribuindo com cerca de 30% dos casos, embora 75% estejam concentrados no Brasil, Síria e Afeganistão. Por volta de 35.000 casos de leishmaniose muco-cutânea ocorrem anualmente principalmente no Brasil, Peru e Bolívia (WHO, 2012).

No Brasil no ano de 2012 foram registrados 5,1 casos por 100.000 habitantes, atingindo majoritariamente crianças menores de 5 anos e adultos entre 20 – 50 anos, com distribuição geográfica diversificada; sete estados apresentaram as seguintes variações: 196 a 341 casos (Pará, Maranhão, Tocantins, Ceará, Bahia, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul), dois estados, 83 a 195 (Piauí e São Paulo) e quatro estados variaram de 30 a 82 (Rio Grande do Norte, Pernambuco, Sergipe e Mato Grosso) (PAHO-WHO, 2014).

De acordo com o ministério da saúde de 2014, Pernambuco acumulou 299 casos de 2010 – 2013, com quase totalidade concentrada no Agreste e Sertão, representando 2% do total de casos em todo território nacional. Ainda, de 2005 – 2014 aconteceram 732 internações de residentes em Pernambuco tendo como diagnóstico LV, em maior número no ano 2014, seguido de 2006 e 2008, resultando só nestes dois anos 41,3% do total da série histórica. Essas internações representam 0,014% do total de internações de residentes no estado de Pernambuco.

Os dez municípios que apresentaram o maior número de casos em Pernambuco foram: Petrolina (13,7%), Salgueiro (7,2%), Ouricuri (6,6%), Santa Maria da Boa Vista (4,8%), Caruaru (3,7%), Santa Cruz (2,8%), Serra Talhada (2,7%), Goiana (2,6%), Tamandaré (2,4%) e Carnaubeira da Penha (2,1%), que juntos representaram 48,7% (LEITE, 2016). Com base nesses dados, pode-se observar uma discrepante prevalência de casos nas zonas rurais quando comparado com a zona urbana ou periurbanas, como mostra a figura 2.

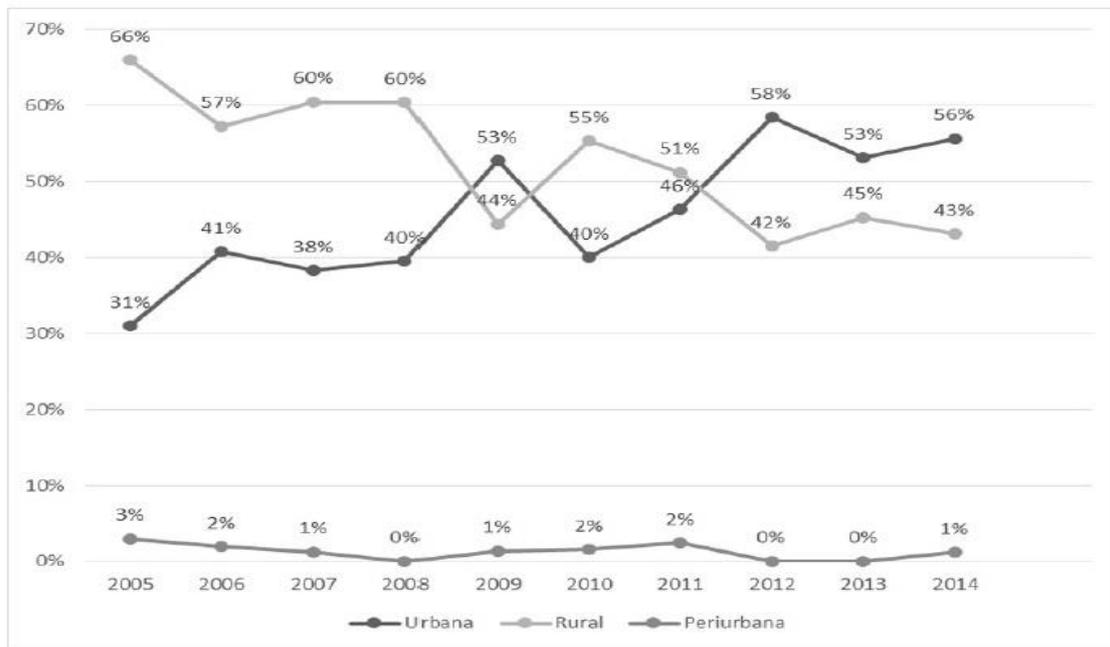
Figura 2: Acumulados de casos da leishmaniose visceral em Pernambuco por município de 2005 – 2014.



Fonte: LEITE, 2016.

A figura 3 apresenta os valores percentuais de acordo com sua situação de domicílio. Nota-se que, no início da série histórica, 66% dos casos residiam nas zonas rurais e 31% em zonas urbanas. Entre 2005 a 2008, houve predomínio dos casos em zona rural. Entre 2009 a 2011 esses valores apresentaram variações dos valores percentuais. E, nos últimos três anos observou-se uma sobrepujança da percentagem de casos na zona urbana em comparação à zona rural (LEITE, 2016).

Figura 3: Casos de Leishmaniose Visceral Humana de Pernambuco de acordo com a situação de domicílio (zona urbana, rural), 2005-2014.



Fonte: LEITE, 2016.

3.3. Vetor: características gerais

O inseto transmissor fêmea, pertencente ao gênero *Phlebotomus*, na Europa, Ásia e África; e *Lutzomyia* na América, é o vetor responsável pela transmissão da Leishmaniose (figura 4). Esse inseto hematófago mede em torno de 2-3 mm, sua coloração varia dentre um contraste do preto ao branco e possui uma característica única que difere de outros dípteros, suas asas e posicionam no ângulo do abdômen (KUILDER, 2016; KILLICK-KENDRICK, 1999).

Possuem hábitos alimentares que varia do crepúsculo ao amanhecer, embora algumas espécies possam agir durante o dia quando dentro das casas, método que dificulta o extermínio por pulverização de inseticidas; tendem a sondar o mesmo hospedeiro o que aumentam a carga de infecção, método adaptativo que aumenta a taxa de infecção. Devido a sua incapacidade de voar em grandes alturas (cerca de 1m), diminuem as chances de pessoas que habitam níveis superiores sejam contaminados (READY, 2013; KILLICK-KENDRICK, 1999; HEWITT, 1998).

Figura 4: Flebotomíneo fêmea: transmissor da leishmaniose.



Fonte: LINDHOLZ, 2015.

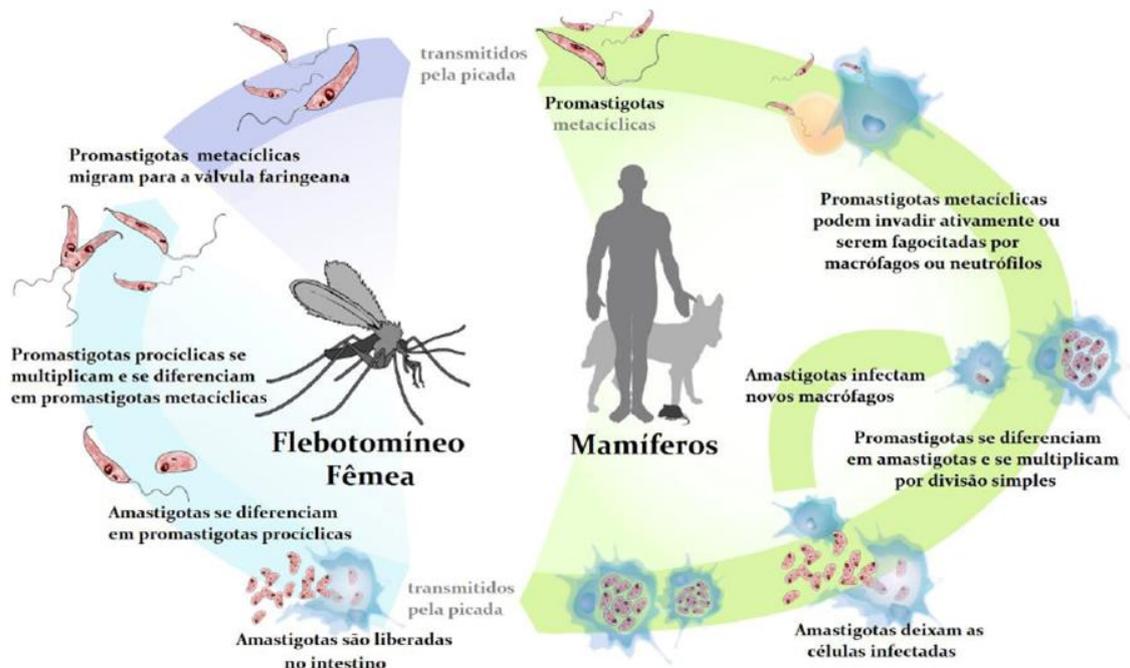
3.4. Ciclo biológico da *Leishmania* spp.

Duas formas majoritárias são identificadas no ciclo de vida para esse protozoário: uma extracelular, forma promastigota, flagelada longa medindo de 15 a 20 μ m, encontradas no trato gastrointestinal do vetor, e outra forma, amastigota, encontrada dentro de células mononucleares fagocitárias (macrófagos e neutrófilos) de hospedeiros mamíferos, medindo de 3 a 5 μ m (PACE, 2014).

A forma promastigota, encontrada no vetor flebotomíneo, reproduz-se extracelularmente no trato alimentar do inseto (figura 5), (CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998). A infecção se inicia a partir da inoculação do parasito das formas infectantes promastigota metacíclica no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (MONTALVO et al., 2011).

As ferramentas de sobrevivência do parasito dependem de diversos fatores no interior do hospedeiro vertebrado, fruto de uma constante evolução adaptativa. Ao atingirem a corrente sanguínea, mecanismo próprios para evitar a lise celular são ativadas pelo sistema complementar da célula. Devido a esse sistema protetor o parasito consegue sobreviver à chegada até o macrófago e penetrá-lo através da manipulação dos receptores (CAMPOS-FONTE et al., 2005).

Figura 5: Ciclo biológico da leishmaniose *spp.*



Fonte: LANE, 2016.

A interação da forma promastigota com a célula hospedeira é essencial para sua virulência. Durante o repasto o inseto inocula uma saliva com potencial de antiagregação plaquetária e vasodilatador: o maxidilan, vasodilatador mais potente que se tem conhecimento, facilitando a fluidez do sangramento e transmissão da forma metacíclica promastigota. Alterações a nível de membrana do macrófago são de extrema importância para uma invasão bem sucedida. Dentre as moléculas presentes na membrana da leishmania duas se destacam para a ocorrência da penetração e seu estabelecimento no interior do vacúolo: a glicoproteína gp63 e a molécula lipofosfoglicana LPG, que interagem com receptores do complemento - CR1 e CR3 - presentes nas membranas do macrófago (MOSSER & ROSENTHAL, 1993).

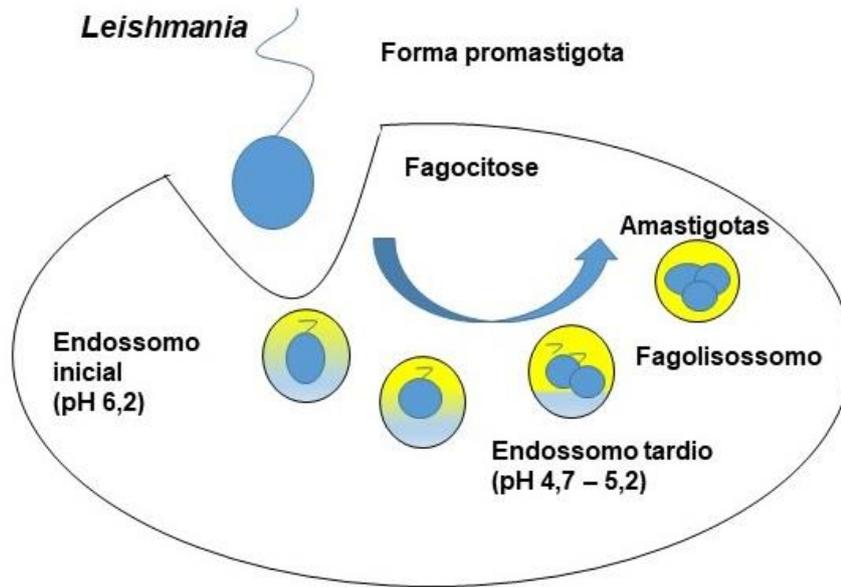
A molécula gp63 está diretamente envolvida na proteção das formas amastigotas à degradação, convertendo o componente C3b em uma forma inativa, C3bi, do sistema complemento por meio de sua clivagem. Dessa forma impedem a opsonização pelo complemento evitando a degradação mediada por esta via. A concentração da gp63 diminui durante a diferenciação entre as formas promastigotas em amastigotas, o que evidencia sua ligação direta no processo de

entrada, manutenção da vida celular e modulação da resposta imune do hospedeiro (Revisado de OLIVER, 2005).

Igualmente importante no estabelecimento da forma promastigota e diferenciação em amastigota é a molécula LPG. Sendo a estrutura mais abundante na superfície na membrana da célula promastigota, age de forma sinérgica junto a gp63 afetando uma série de mecanismos desencadeados pelo hospedeiro, como a degradação do conteúdo vacuolar. A molécula é transportada para a membrana vacuolar, impedindo a fusão do lisossomo com a membrana do vacúolo parasitóforo. Isso pode ser evidenciado pela a abundância de LPG na membrana do parasito, formando um glicocálix que protege a célula, reduzindo sua expressão à medida que vai se diferenciando da forma metacíclica em amastigota, permitindo que enfim ocorra a fusão do lisossomo com o vacúolo parasitóforo (GRUENBERG & VAN DER GOOT, 2006).

Após a invasão do parasito à célula hospedeira, o vacúolo é formado devido a maturação e fusão de organelas da via endocítica e torna-se acidificado (PH entre 4,7 a 5,2) após 30 minutos pós formação, com o intento de matar a célula invasora. Porém, as formas amastigotas superam e sobrevivem mantendo o PH intracelular em torno de 7,0. Isso devido a um gradiente de prótons presente na membrana celular, que regula a acidez do meio, mantendo dessa forma a sobrevivência da mesma (figura 6) (BURCHMORE & BARRET, 2001).

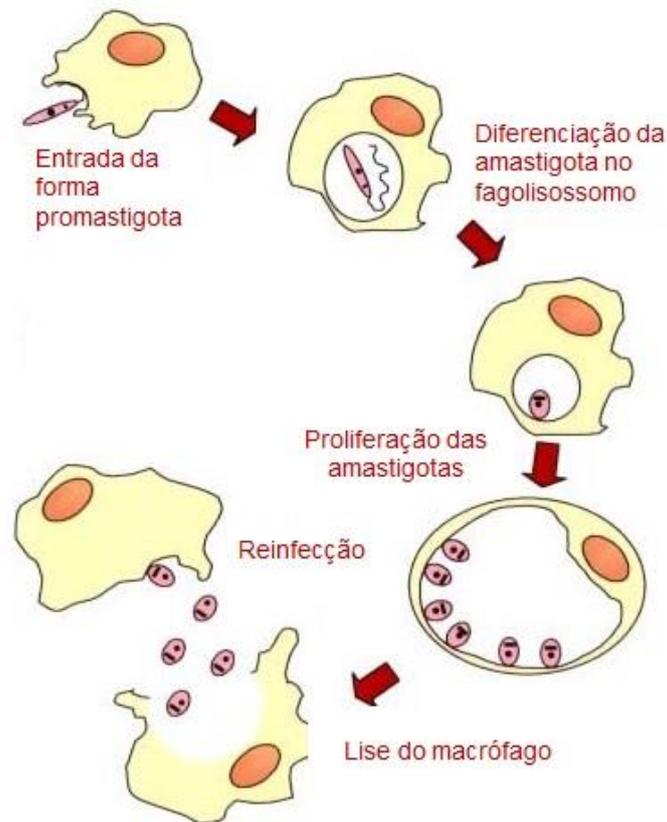
Figura 6: Entrada e estabelecimento da *leishmania* spp. dentro do macrófago, diferenciação da forma promastigota em amastigota, formação do vacúolo e estabelecimento do PH no interior da célula.



Fonte: Próprio autor.

Após diferenciação do protozoário no interior do hospedeiro e estabelecimento do PH, há uma proliferação de amastigotas no interior do vacúolo com posterior lise do macrófago infectado, o que leva a infecção de outras células fagocitárias e consequente infecção do hospedeiro vertebrado (figura 7).

Figura 7: Ciclo da leishmania spp no interior da célula hospedeira.



Fonte: Modificado de VANNIER-SANTOS, 2002.

3.5. Manifestações clínicas

As formas clínicas variam do organismo infetante (espécie e linhagem), resposta imunológica do hospedeiro em questão, espécie do mamífero, idade, estado nutricional, co-infecções com HIV e ainda de acordo com a região geográfica. Todos esses fatores alteram significativamente as manifestações clínicas da doença (WHO, 2017).

Descoberta por Charles Nicolle em 1908, a *Leishmania infantum*, espécie estudada no presente trabalho, é o agente etiológico causador da LV no Brasil, forma agressiva da doença que, quando não tratada, pode levar o indivíduo a óbito. Em casos esporádicos a *L. infantum* pode se manifestar como LT, causando lesões cutâneas localizadas (figura 8). Embora outras partes do corpo possam ser afetadas, provocando múltiplas lesões (WHO, 2017).

A LV é a condição clínica mais grave da doença. As formas amastigotas se instalam em células reticulares do endotélio de vísceras, como baço, intestino e linfonodos, podendo permanecer assintomática durante os primeiros meses ou até anos, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro. Após o período de incubação sintomas tais como, febre baixa diária, anemia, prostração geral, protrusão abdominal devido ao inchaço no baço e fígado (Figura 8), tosse, linfadenopatia e emagrecimento, podem aparecer variando para cada indivíduo. Ainda, indivíduos com a forma assintomática do calazar pode evoluir para forma subclínica e um posterior quadro chamado calazar clássico, forma crônica da doença (WHO, 2017; MURRAY, 2005; CASSILHAS, 2004).

LT é a manifestação clínica da leishmaniose que acomete a pele e mucosas de indivíduos infectados. Embora não seja letal, causa significativa morbidade, dores intensas, manifestações dermatológicas secundárias e sarcoidoses; acompanhada de forte estigma social e psicológico, devido as desfiguração e degenerações de face, nariz, testa e membros inferiores (IQBAL, 2016). Representa 75% de todos novos casos da doença afetando cerca de 1,5 milhões de pessoas por ano (IQBAL, 2016; MARKLE & MAKHOUL, 2004).

Figura 8: Manifestações clínica da leishmaniose por *L. infantum*: A) extensiva hepatoesplenomegalia; B) lesão cutânea localizada.



Fonte: Modificada de WHO, 2017.

3.6. Diagnóstico e tratamento

Diferentes técnicas podem ser utilizadas no diagnóstico da leishmaniose; avanços vem ocorrendo no que diz respeito a detecção da doença, porém, a despeito da gama de testes, não existe nenhum que garanta cem por cento de sensibilidade e especificidade, sendo necessário a associação dos mesmos para um diagnóstico definitivo (GONTINJO & CARVALHO, 2003).

A investigação é feita com base em parâmetros epidemiológicos, fatores clínicos e testes laboratoriais (GOTO & LINDOSO, 2010). Se tratando da epidemiologia, a área em que o indivíduo se encontra, ou se o mesmo viajou para regiões endêmicas, é de extrema importância para um diagnóstico (LEDERMAN, 2008). Clinicamente a doença pode se manifestar mais tardiamente ou não, isso irá depender do paciente em questão. Como já foi dito anteriormente, fatores como condição nutricional, estado imunológico, infecção secundária, dentre outros, pode tornar o período de incubação curto, fomentando a fase aguda da doença (WHO, 2014).

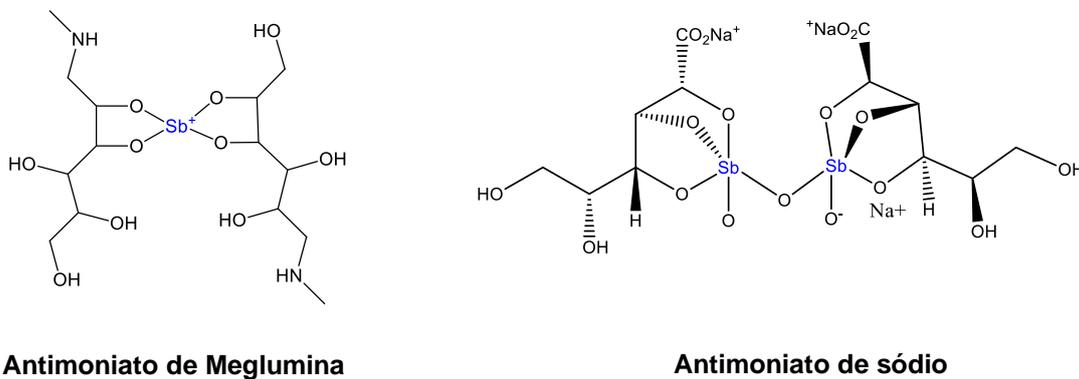
A confirmação parasitológica pode ser feita em material obtido a partir de escarificação (quando LT), biópsia e/ou punção aspirativa da lesão cutânea ou visceral (PORFIRIO-PASSOS, et al., 2012); se tratando da LV a punção aspirativa é realizada no baço, fígado, medula óssea ou linfonodos; o material recolhido em seguida é tratado para impressão em lâminas, inoculação em animais de laboratório, isolamento em meio de cultura, histopatologia e confecção de esfregaço (GONTIJO & MELO, 2004).

No Brasil, os testes laboratoriais mais utilizados para o exame sorológico são o de reação de imunoflorescência indireta (RIFI) e o de ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay, ELISA), que utilizam antígenos brutos e são limitados em termos de especificidade e reprodutibilidade, resultando na ocorrência de reações cruzadas com outras parasitoses e alto custo de reprodutibilidade em larga escala, respectivamente. Embora o RIFI seja um teste mais específico o teste de ELISA ainda é o mais utilizado por ser mais rápido, barato e um pouco mais sensível. Em ambos os testes são utilizados quase sempre promastigotas de cultura, parasitas intactos ou moléculas solúveis e por

apresentarem reações cruzadas são necessário diagnóstico diferencial com outra doença (SUNDAR & RAI, 2002).

A abordagem inicial no tratamento é feita com a base em antimoniais pentavalentes (figura 9), tais como estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina. Todavia, o uso dessas drogas é limitado, e vem acompanhado de perigosos efeitos colaterais, alto custo, variabilidade de resultados em doses idênticas e surgimento de resistência (SERENO, et al., 2000). Alternativamente anfotericina B, miltefosina, pentamidina e paromicina, vêm sendo utilizadas (IQBAL, et al., 2016).

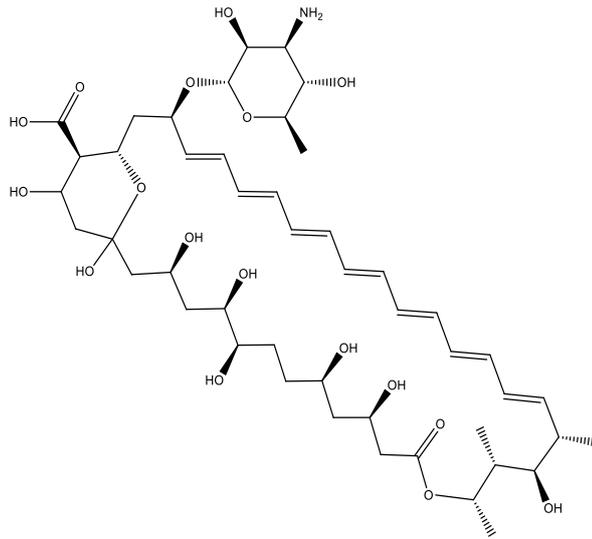
Figura 9: Antimoniais pentavalentes



Fonte: Adaptado de NAGLE, 2014.

A anfotericina B (figura 10) é um agente antifúngico e a droga de segunda escolha no tratamento de todas as formas de leishmanioses, que foi descoberta da bactéria *Streptomyces nodosus* (SINGH & SIVAKUMAR, 2004). Seu mecanismo de ação está associado a seletividade na porção ergosterol da membrana plasmática do parasito criando poros polares, o que aumenta sua permeabilidade, fazendo com que íons de diversas moléculas saiam da célula, a levando a morte. Contudo, além do alto custo possui efeitos colaterais severos e muito perigosos, como febre acompanhada de tremor e rigor; tromboflebites, hipocalcemia severa, alterações no miocárdio e até mesmo a morte (MISHRA, et al., 2007). Mais recentemente a toxicidade e eficácia foi amplamente melhorada devido ao incremento de formulações lipídicas à droga original, incrementando a concentração da droga no local da infecção, reduzindo a toxicidade sistêmica, tempo de cura e custo (SUNDAR, 2010).

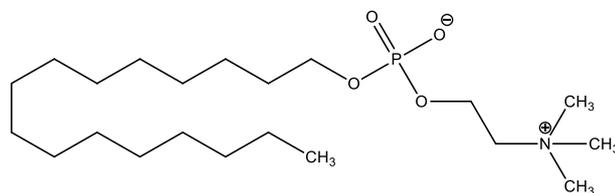
Figura 10: Estrutura química da Anfotericina B



Fonte: Próprio autor.

A miltefosina (Figura 11), um análogo alquilfosfocolina, foi inicialmente desenvolvida para o tratamento de neoplasias, sendo mais tarde evidenciados seus efeitos no tratamento de LV em pacientes imunodeficientes, porém seu mecanismo de ação extrapolou a terapêutica provocando modulações em células mamárias e outras vias mitogênicas. Seus efeitos colaterais incluem distúrbios gastrointestinais, nefrotoxicidade e teratogenicidade (SUNDAR & CHATTERJEE, 2006).

Figura 11: Estrutura química da miltefosina

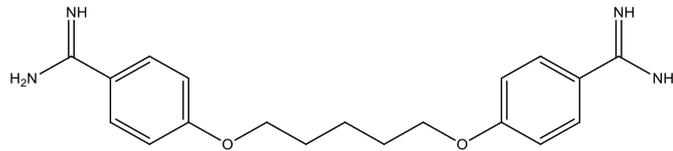


Fonte: Próprio autor.

A pentamidina (figura 12) trata-se de um derivado aromático quimicamente definido por 4-[5-(4-carbamimidoil-fenoxi)pentoxi]benzenocarboximidamida, que inicialmente seria utilizada como droga hipoglicêmica, que mais tarde veio demonstrar seus efeitos na LV. Porém também com efeitos adversos severos como sensação de queimação, fígado de formato anormal, disfunção renal, náuseas e raramente *diabetes Mellitus* (SUNDAR & CHATTERJEE, 2006). Seu mecanismo de

ação não está bem estabelecido, no entanto, estudos sugerem que o fármaco atua na inibição da enzima S-adenosil-L-metionina descarboxilase, interferindo com síntese de poliaminas e diminuindo o potencial de membrana da mitocôndria (KAUR & RAJPUT, 2014).

Figura 12: Estrutura química da pentamidina

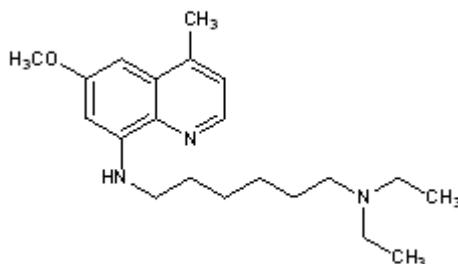


Fonte: Próprio autor.

A paromicina é uma droga efetiva frente a diversas bactérias, protozoários e *Leishmania spp.* (TRACY & WEBSTER, 2001), cujo o mecanismo de ação de ação está associado a indução de dissociação e disfunção respiratória nos modelos experimentais. Seus efeitos adversos estão associados a disfunção hepática, ototoxicidade, rachaduras na pele e prurido local (SUNDAR, et al., 2007). Ainda não se têm estudos que elucidem os possíveis mecanismos de ação, pois estudos voltados para esse fim estão voltados para fungos e bactérias, principalmente (BANDHARI et al., 2014).

A sitamaquine é um 8-aminoquinolina (figura 13) é um forte candidato a fármaco no tratamento da LV por via oral. Sua eficácia terapêutica foi verificada em modelos animais. A vantagem desse medicamento está na velocidade de eliminação, pois possui tempo de meia-vida curta, impedindo o desenvolvimento de resistência. Seu mecanismo de ação está associado à sua capacidade de provocar um rápido colapso no potencial elétrico da membrana plasmática mitocondrial da *Leishmania*. Os principais efeitos colaterais observados foram: nefrotoxicidade, glomerulonefrite e necrose tubular (MESQUITA, 2013; LOISEAU et al., 2011).

Figura 13: Estrutura química da sitamaquine.



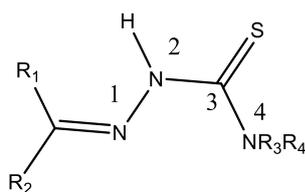
Fonte: LOISEAU et al., 2011.

3.7. Tiossemicarbazonas

Na química medicinal as tiossemicarbazonas se mostram como moléculas de grande interesse devido a sua versatilidade química e biológica, tais como atividades antitumorais, anti-inflamatórias, antibacteriana, antiprotozoárias, dentre outras (SANTIAGO, 2014; TENÓRIO et al., 2005).

São compostos que possuem estrutura básica, $C=N-NH-CS-NH_2$ (FIGURA 14). Há duas formas de se obtê-las, a dita como obtenção direta, que ocorre através da reação quimiosseletiva de aldeídos e/ou cetonas, e indireta, através da preparação prévia das tiossemicarbazidas (TENÓRIO et al., 2005). As tiossemicarbazidas podem ser obtidas comercialmente, ou sinteticamente por reações de condensação entre hidrato de hidrazina e ácido tiocarbamoilglicólico, ditiocarbamatos, dissulfeto de carbono ou ainda isotiocianatos.

Figura 14: Estrutura química das tiossemicarbazonas e a numeração dos seus átomos segundo a IUPAC (PANICO, 1993).



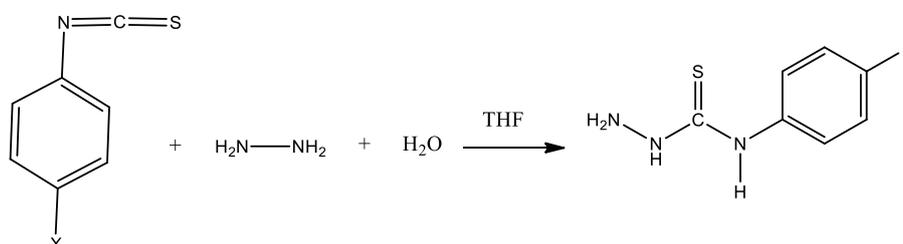
$R_{1,2,3,4}$:H, Alquil, Aril

Fonte: AQUINO, 2008.

A utilização dos isotiocianatos são mais corriqueiras, normalmente as reações são rápidas e apresentam bons rendimentos variando de 70- 90% (Esquema 1)

(OLIVEIRA, 2013). As tiossemicarbazonas podem ser utilizadas ainda como intermediários de muitos núcleos importantes como o tiazol (DU, 2002).

Esquema 1: Formação das tiossemicarbazidas a partir de isotiocianatos na presença de hidrazina.

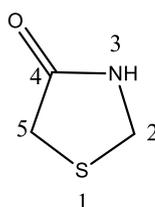


Diante da versatilidade química e biológica amplamente descritas na literatura, assim como sua atividade leishmanicida (BRITTA, 2014), vê-se a necessidade do desenvolvimento de novos compostos tiossemicarbazônicos e de seus derivados no estudo de sua atividade frente a outras parasitoses, tal como a leishmaniose.

3.8. Tiazolidinonas

As 4-tiazolidinonas são compostos derivados das tiazolidinas grupo de heterocíclicos importante na química (AQUINO et al., 2008). A sua estrutura química encontra-se formada por um anel de cinco membros, contendo dois heteroátomos, enxofre (S) e nitrogênio (N), e um grupo carbonila na posição 4 (figura 15).

Figura 15: Estrutura Química da Tiazolidina.



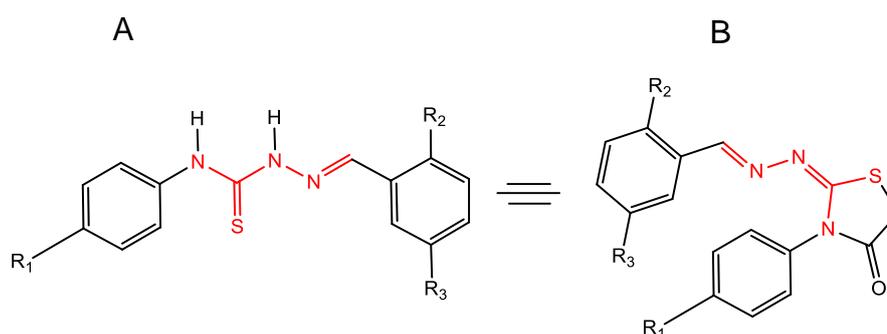
Fonte: AQUINO, 2008.

Os carbonos do ciclo podem ser substituídos por outros grupos químicos. Quando condensados com as tiossemicarbazonas apresentam o grupo hidrazona condensado na posição 2 (BROWN, 1961).

As tiazolidinas junto com seus análogos são utilizados constantemente na área de síntese medicinal por ter ações biológicas amplamente relatadas na literatura, tais como anti-inflamatória (MACCARI, 2014), anticonvulsivante (SHIRADKAR, 2007), antitumoral (KOBYLINSKA, 2015), hipoglicemiante (KAPOOR, 2016), antidiabético (KHOT, 2014), antiviral (NISCHÉ, 2013) e antiparasitária (ZHONG, 2009).

Ainda, a ação biológica das tiossemicarbazonas está relacionada com sua ação quelante, nesse sentido a função azometina (CH=N) e o enxofre são de extrema significância. Logo, como se nota na figura abaixo, a semelhança estrutural das tiazolidinonas mantém uma relação com as tiossemicarbazonas. Portanto, pode-se sugerir que as características químicas-biológicas se mantiveram no heterociclo (figura 16) (TENÓRIO, 2005).

Figura 16: Semelhança estrutural da tiossemicarbazona (A) e 4-tiazolidinona (B).



Fonte: Próprio autor.

Essas estruturas são scaffold de grande importância no desenvolvimento de possíveis fármacos de interesses biológicos, devido a possibilidade de modificações estruturais, o que despertou no nosso grupo de pesquisa a propensão no desenvolvimento de novos protótipos candidatos a fármacos, visto a importância dos compostos cíclicos (tiazolidinonas) e acíclico (tiossemicarbazona) para ação biológica.

Metodologia

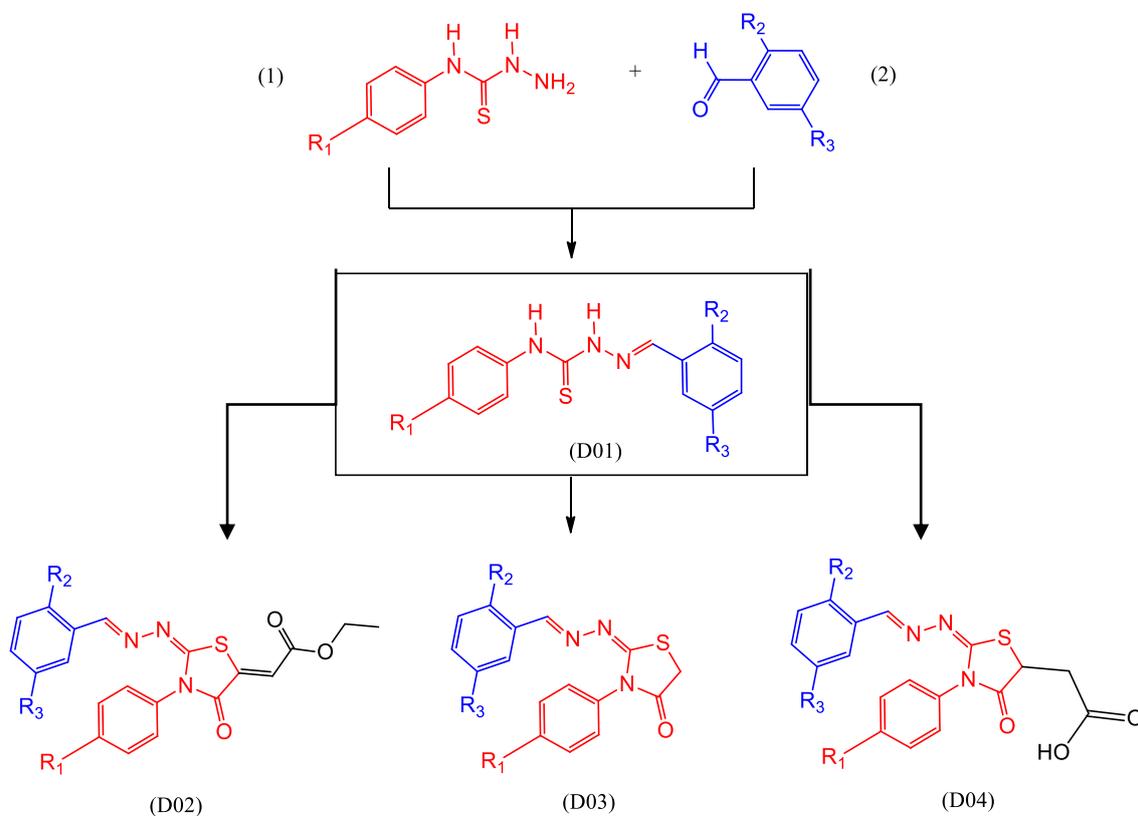
4. METODOLOGIA

Metodologia Química

4.1. Procedimento geral para a síntese dos derivados tiossemicarbazônicos e tiazolidínicos

A síntese dos novos derivados tiossemicarbazônicos e tiazolidínicos segue uma via plena e convergente ilustrada no Esquema 2. Partindo-se da reação entre tiossemicarbazidas (1) e benzaldeído substituído (2), foi obtido primeiramente o composto tiossemicarbazônico (D01), a partir deste, através de reações de ciclização, foram obtidos os compostos tiazolidínicos (D02, D03 e D04).

Esquema 2:



R ₁	R ₂	R ₃
NO ₂	OCH ₃	Br

4.2. Materiais e Equipamentos

Na cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de sílica gel 60 Merck F254, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 nm).

A caracterização estrutural dos compostos foi realizada através dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), efetuados em espectrofotômetro Varian Modelo Plus 400 MHz. A determinação dos pontos de fusão foi realizada em aparelho Quimis Modelo 340.27. A multiplicidade dos sinais está representada por: simpleto (s), duplete (d), duplo duplete (dd), tripleto (t) e multiplete (m) e as constantes de acoplamento (J) estão expressas em Hz (Hertz).

A espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV) foi realizada em espectrofotômetro FTIR BUCKER modelo IFS 66, patilha de KBr.

4.3. Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados são: 5-bromo-2-metoxi-benzaldeído, hidrato de hidrazina, dietil acetilenodicarboxilato, isotiocianato substituído (4-nitro-isotiocianato), acetato de sódio, cloroacetato de etila, anidrido maleico, dietil-acetileno-carboxilato, etanol absoluto, metanol, diclorometano, n-hexano e ácido acético glacial. Os reagentes e solventes utilizados na síntese dos compostos e para suas análises pertencem às marcas Sigma, Aldrich, Acros, Merck, Vetec ou Quimis.

4.4. Procedimento químico experimental

4.4.1. Síntese da tiossemicarbazida LT-NO₂

Em um balão de fundo redondo de 250ml foi adicionado 5,5 mmol do 1-isotiocianato-4-nitrobenzeno em 20ml de diclorometano e a mistura deixada sob agitação a temperatura ambiente até solubilização. Em seguida foram adicionados 11,1 mmol (0,5mL) de hidrato de hidrazina. A mistura foi mantida sob agitação por 1h sendo após o tempo decorrido filtrada e lavada com n-hexano. Os equivalentes-mol reagem entre si na proporção de 1:2.

4.4.2. Síntese do composto 2-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)-N-(4-nitrofenil)hidrazinacarbotioamida (D01)

Em um balão de fundo redondo de 250mL foram adicionados 2,33 mmol de 5-bromo-2-metoxibenzaldeído em 20mL de etanol. À solução etanólica foi adicionado ácido acético glacial em quantidade catalítica, e a mesma deixada sob agitação magnética até solubilização. Em seguida foram adicionadas quantidades equimolares da tiossemicarbazida correspondente, e a mistura reacional mantida sob agitação à temperatura ambiente por 1 hora. Ao término do referido tempo, a mistura foi filtrada e obtido um sólido amarelo amorfo.

4.4.3. Síntese do composto Etil2-(4-bromo-2-((metoximetileno)but-3-en-1-ilideno)hidrazona)-3-(4-nitrofenil)-4-oxotiazolidina-5-ilideno)acetato (D02)

Em um balão de fundo redondo de 250mL foi adicionado 0,49 mmol de tiossemicarbazona correspondente em 10 ml de etanol reacional. A mistura foi submetida à agitação magnética em sistema de refluxo (75°C) até solubilização. Em seguida foi adicionado em quantidade equimolar o dietil actilenodicarboxilato e a mistura reacional mantida sob agitação e refluxo por 2 horas, sendo a progressão reacional acompanhada por CCD. Após o tempo decorrido a mistura foi filtrada e um sólido amarelo foi obtido.

4.4.4. Síntese do composto (5-bromo-2-metoxibenzilideno)hidrazona)-3-(4-nitrofenil)tiazolidin-4-ona (D03)

Em um balão de fundo redondo de 250mL foram adicionados 0,49 mmol da tiossemicarbazona (D01) 0,49 mmol (0,05ml) de cloroacetato de etila e 1,9 mmol (4 eq.) de acetato de sódio anidro em 25 mL de etanol reacional. A mistura foi agitada nas mesmas condições de temperatura de refluxo (75 °C) por 24 horas, sendo a progressão acompanhada por CCD. Após decorrido o tempo, o produto final foi filtrado e lavado com etanol quente. Um sólido amarelo claro amorfo foi obtido.

4.4.5. Síntese do composto (5-bromo-2-metoxibenzilideno)hidrazona)-3-(4-nitrofenil)-4-oxotiazolidina-5-il)ácido acético (D04)

Em um balão de fundo redondo de 250mL foram adicionados 0,39 mmol do composto D01 e quantidades equimolares de anidrido maleico em 15mL de ácido acético reacional. A reação foi agitada e aquecida a uma temperatura de 110°C sob refluxo por 8 horas, sendo a progressão acompanhada por CDD. Ao término do tempo reacional, o produto final foi filtrado e lavado com ácido acético. Um sólido amarelo escuro amorfo foi obtido.

Metodologia Biológica

4.5. Materiais e métodos

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

O cultivo das células macrofágicas (J774), 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.

O cultivo das 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 a 26° C. As formas promastigotas foram utilizadas em fase exponencial de crescimento no decorrer de todas as fases do experimento.

4.6. Estudo da citotoxicidade dos compostos

O teste de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) fundamenta-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas, levando a formação de cristais azulados, 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 macrofágicas 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 da série D (50; 25; 12,5; 6,25 e 3,13µg/mL) por 72 horas. Após este período, o sobrenadante (Meio RPMI contendo os compostos) foi removido 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 (dimetilsufóxido) 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.

4.7. Atividade biológica *in-vitro* da *Leishmania Infantum*

Para realização dos testes *in vitro* da tiossemicarbazona e das tiazolidinonas, 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 formas promastigotas foram encubadas em diferentes concentrações dos compostos (50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12µg/mL), por 72 horas. No controle foram incubadas as pormastigotas, 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 parasitos-IC₅₀ foi o parâmetro utilizado para estimar a inibição do crescimento. A IC₅₀ foi determinada após 72 horas de cultivo por análise de regressão linear com o software SPSS 8.0 para Windows. O índice de seletividade

(IS) foi determinado como a razão entre os valores de CC_{50} e IC_{50} obtidos para cada composto.

4.8. Produção de óxido nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico (NO) foi estimada a partir da dosagem de nitrito, produto estável da decomposição do NO, em sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados com os derivados tiossemicarbazônicos e tiazolidinônicos da concentração do CC_{50} durante um período de 72h. O meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado e o branco como controle positivo. Os níveis de nitrito foram quantificado pelo método indireto de Griess (DING et al., 1988), utilizando 50 μ L de cada sobrenadante e igual volume de reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina, 2,5% de ácido fosfórico). Após a mistura, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por dez minutos e a absorbância foi medida a 540 nm (Multiskan FC; Thermo Scientific) sendo os níveis de nitrito em cada tempo determinado por extrapolação de uma curva padrão previamente preparada.

Resultados e discussões

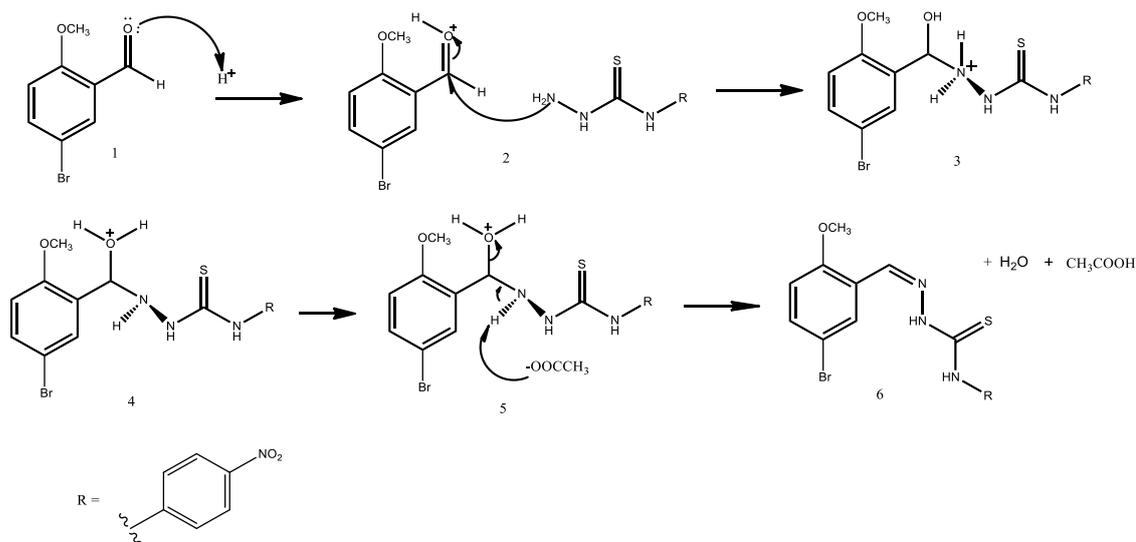
5. RESULTADOS

5.1. Resultados Químicos

Mecanismos reacionais

A primeira etapa consiste na síntese de tiossemicarbazidas pela reação de isotiocyanatos com hidrato de hidrazina através de uma reação de adição nucleofílica, como mostra o esquema 2. A etapa seguinte, para obtenção das tiossemicarbazonas, caracteriza-se por uma reação onde ocorre a protonação do oxigênio da carbonila para formar o intermediário íon oxônio (Esquema 2). Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico do nitrogênio da tiossemicarbazida, através de um processo bimolecular, gerando o intermediário hemiaminal N-protonado correspondente. Enfim, uma transferência de próton do nitrogênio para o oxigênio (prototropismo), acompanhada de uma desidratação e seguida neutralização, desloca o equilíbrio para a formação da imina (Esquema 3).

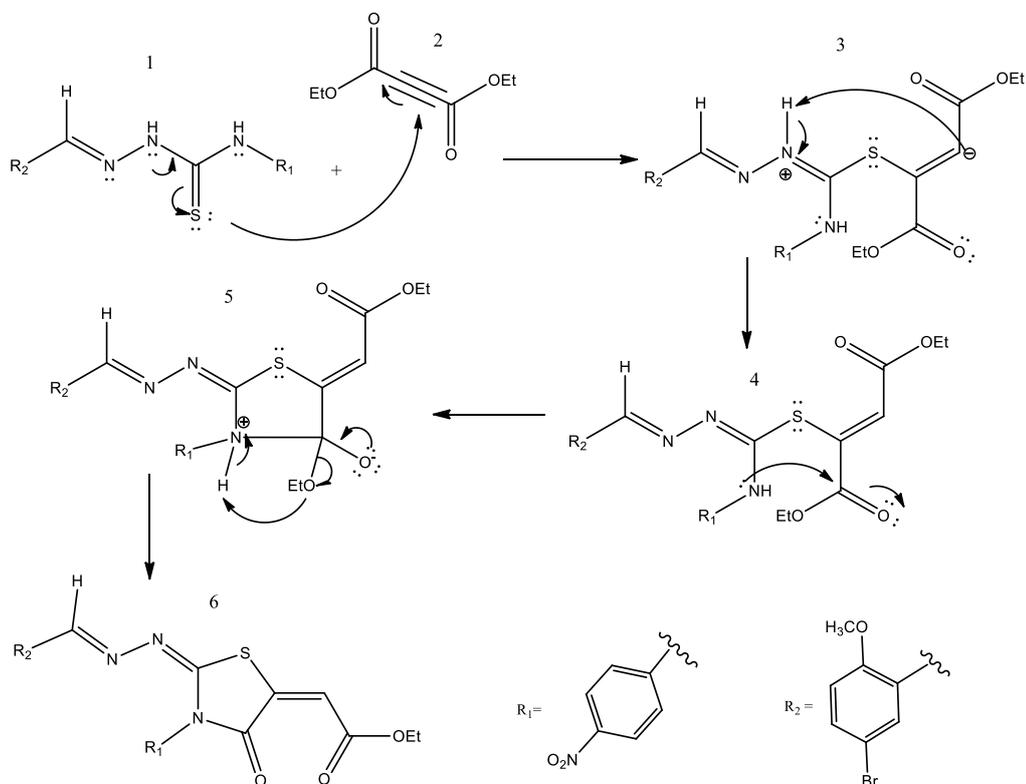
Esquema 3: Mecanismo reacional da tiossemicarbazona (LQIT/D01).



A segunda síntese envolve um mecanismo pela condensação do enxofre com o dietil acetileno carboxilato através carbono *sp* na posição 4 no qual sofre um ataque nucleofílico. Após um rearranjo eletrônico, ocorre um ataque nucleofílico

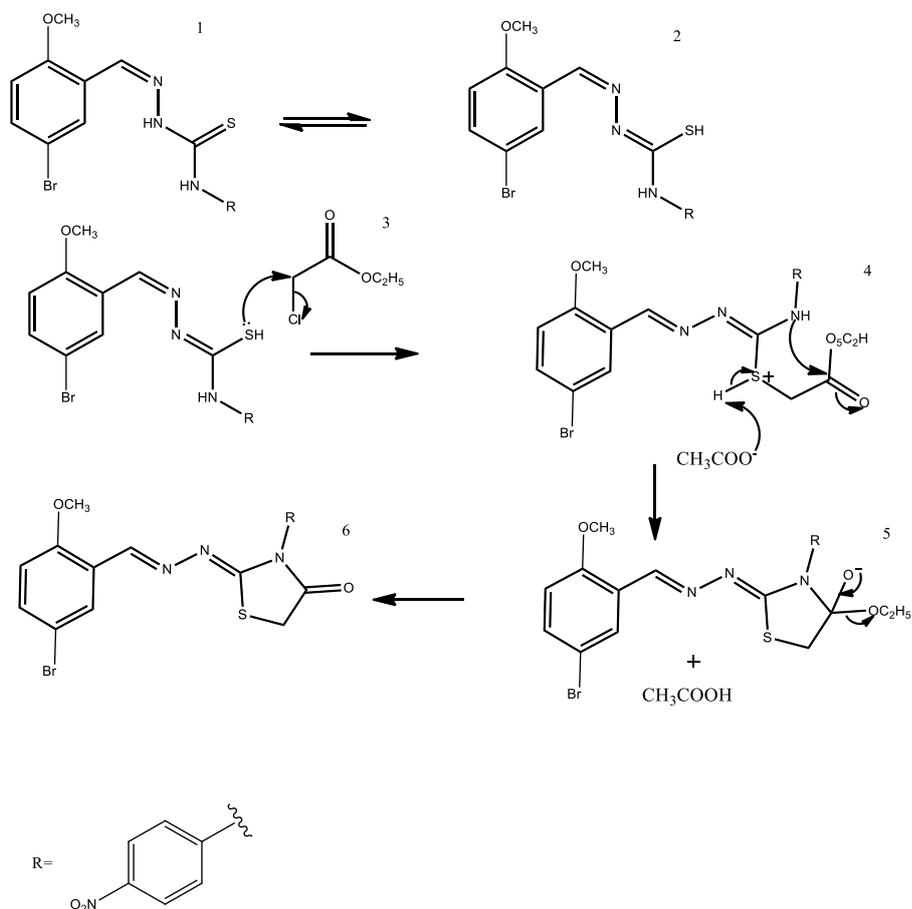
intramolecular pelo par de elétrons do nitrogênio 3 a carbonila da função ester, e saída do grupo etóxi para formação da 4- tiazolidinona 5-substituída (Esquema 4).

Esquema 4. Mecanismo de obtenção da 4-tiazolidinona por condensação com o dietilacetilenocarboxilato (**LQIT/D02**).



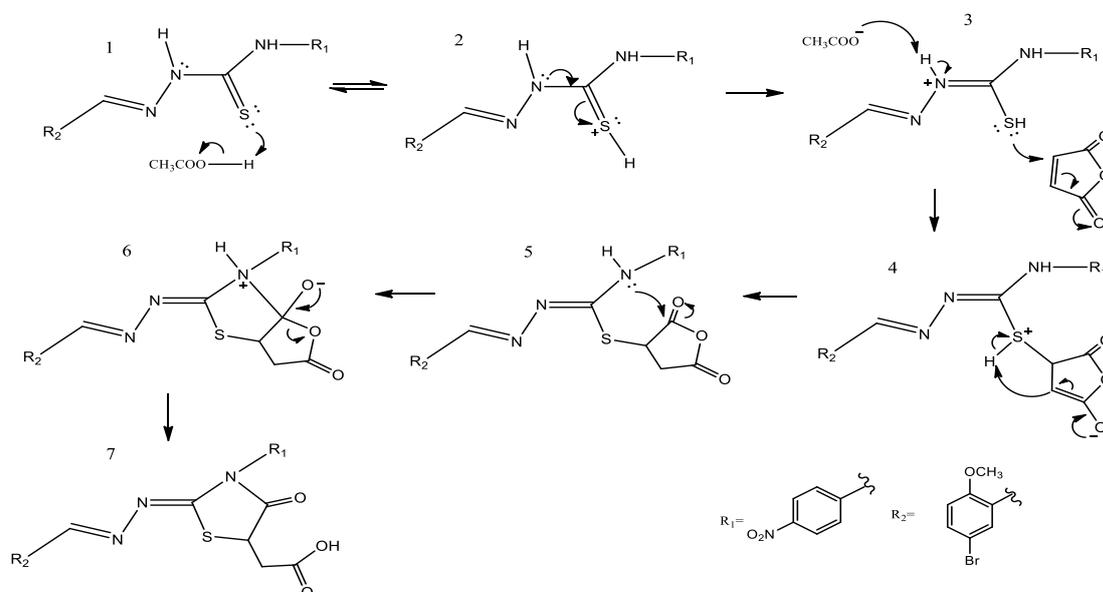
A obtenção do composto D03 consiste na síntese das espécies 4-tiazolidinona. A consecução se desenvolveu a partir da condensação do cloroacetato de etila com o átomo de enxofre. Em seguida, ocorre um ataque intramolecular por parte do par de elétrons livre do nitrogênio na carbonila da função éster, seguido de perda de etanol, o qual leva a formação do heterociclo não substituído na posição C-5 (Esquema 5).

Esquema 5. Mecanismo de obtenção da 4-tioazolidina por condensação com cloroacetato de sódio (**LQIT/D03**).



A última reação pode ocorrer de duas formas uma adição tia-michael em um dos carbonos $\text{C}=\text{C}$ seguida de uma aminólise da carbonila adjacente ou iniciar por uma aminólise em uma das carbonilas seguida de uma adição tia-michael no carbono α (BALASUBRAMANIYAN ET AL., 1990).

Esquema 6: Obtenção da 4-tiazolidinona por adição com anidrido maleico (LQIT/D04)

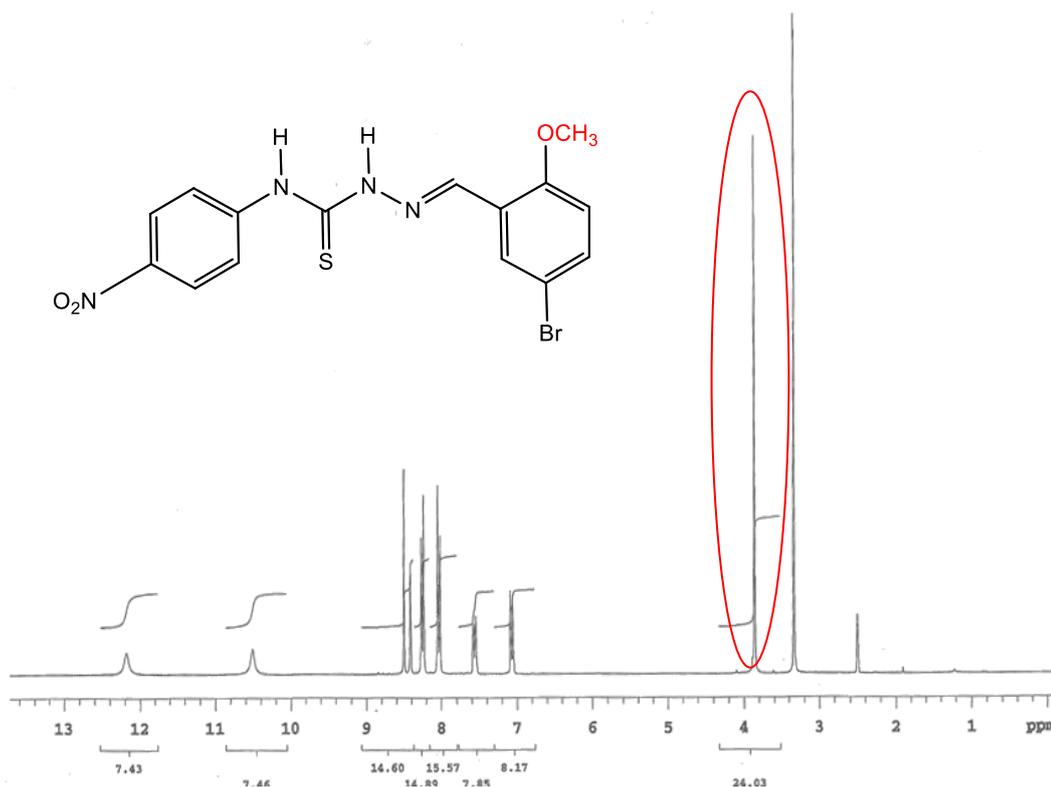


No esquema 6 é evidenciado o primeiro mecanismo, começando com a adição. A reação foi realizada com ácido acético agindo sinérgicamente como catalizador e solvente, onde ocorre a formação da tioimina. Em seguida ocorre um ataque do par de elétrons do enxofre do grupo tiol a qualquer um dos carbonos α,β -insaturados do anidrido maléico, formando o íon enolato com posterior aminólise, que leva a ciclização formando a 4-tiazolidinona com uma função acetil.

5.1.1. Caracterização estrutural da tiossemicarbazona

A análise estrutural dos hidrogênios dos compostos sintetizados foi realizada por espectroscopia de RMN ^1H permitiu-nos elucidar estruturalmente os diferentes hidrogênios presentes nos derivados tiossemicarbazônico (D01) e tiazolidínicos (D02/03/04) (Figura 17).

Figura 17: Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do composto D01

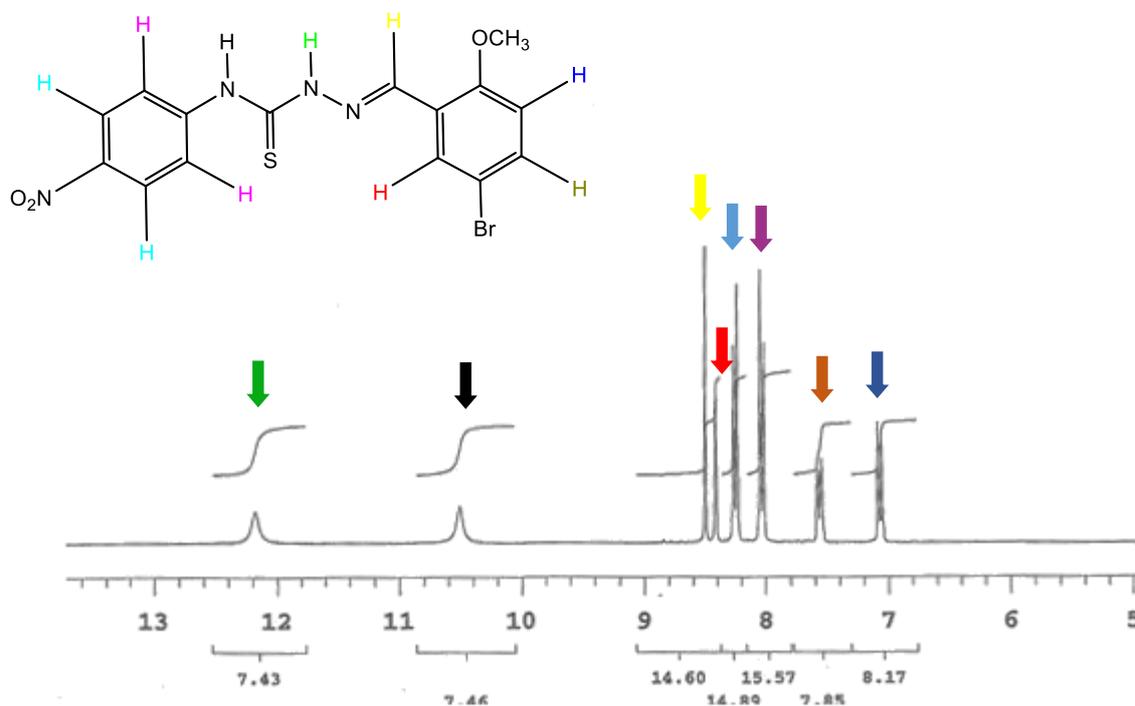


Fonte: Próprio Autor.

O espectro de RMN ^1H observado na figura 15, corresponde ao composto D01 onde se observa um singlete em 3,86 ppm correspondente aos hidrogênios do grupo metóxi.

Os sinais em 7.07 e 7.56 correspondem ao deslocamento de hidrogênios benzílicos. A confirmação da formação das tiossemicarbazonas é observada pelo sinal em 8,5 ppm correspondente a ligação $-\text{HC}=\text{N}-$, em razão do efeito de desblindagem dos átomos eletronegativos próximos. Singletos relativos aos hidrogênios do "NH" estão presentes na faixa de 10.5 e 12.18 ppm com suas respectivas integrações. O espectro de RMN ^1H do composto D01 apresenta sinais e valores de constante de acoplamento semelhantes para os compostos 4-tiazolidinona, conforme a figura 18.

Figura 18: Ampliação do espectro de RMN 1H do composto D01 evidenciando os hidrogênios azometínicos, aromáticos e hidrazínico.

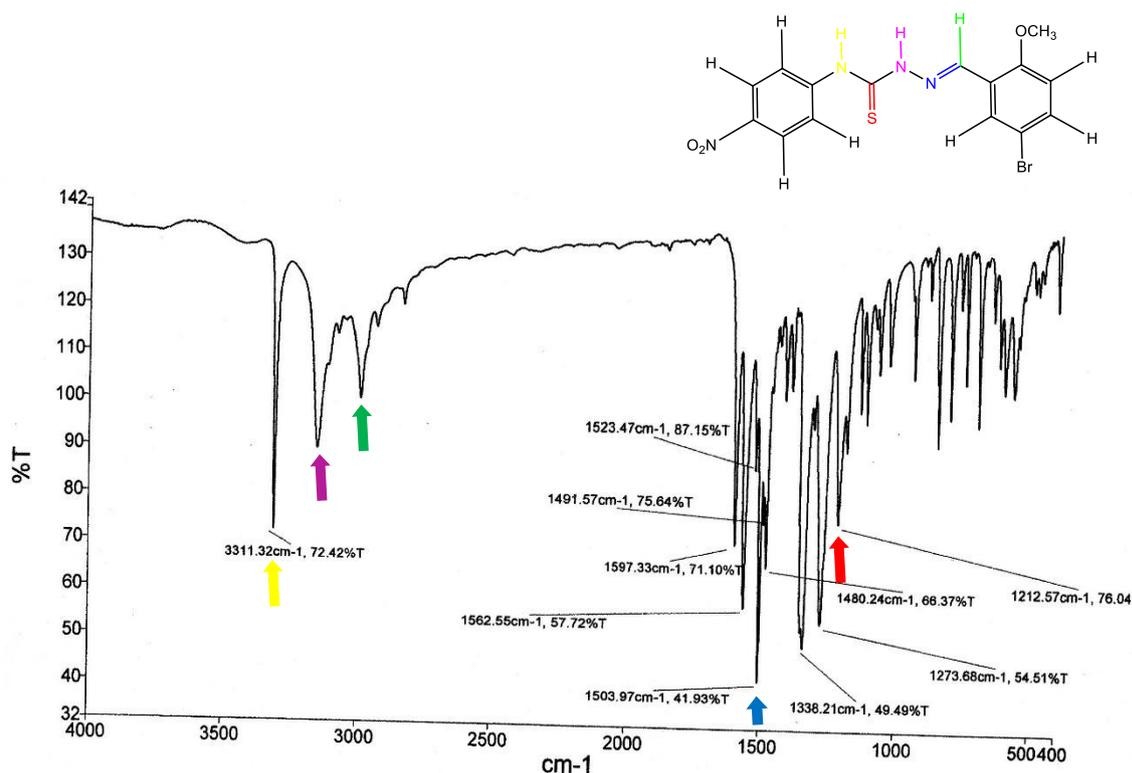


Fonte: Próprio Autor.

Na espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV) para as tiossemicarbazona monossustituída (figura 19), nota-se a presença de duas bandas assinaladas para o estiramento de N-H, uma para ligação hidrazínica entre 3141 a 3148cm⁻¹, e outra para ligação R₁N-H terminal entre 3343 a 3375cm⁻¹.

Uma banda típica de C-H alifático pode ser visualizada no IV do composto D01 entre 2950 a 3095cm⁻¹, caracterizando sua formação, enquanto uma banda forte aparece entre 1509 a 1540cm⁻¹ referente ao estiramento C=N superposta por uma banda larga C=C (1480,24cm⁻¹). De fato, todas as tiossemicarbazonas apresentam bandas largas nessa região, devido principalmente ao acúmulo dessas ligações C=C.

Figura 19: Espectro IV da tiossemicarbazona (D01) evidenciando suas principais bandas.



Fonte: Próprio Autor.

Ainda, a ausência da banda S-H observada entre 2500 a 2600cm⁻¹ e a presença da banda em 1212,57cm⁻¹ evidencia a estrutura da tiossemicarbazona em sua forma tiona (LIESEN, 2010).

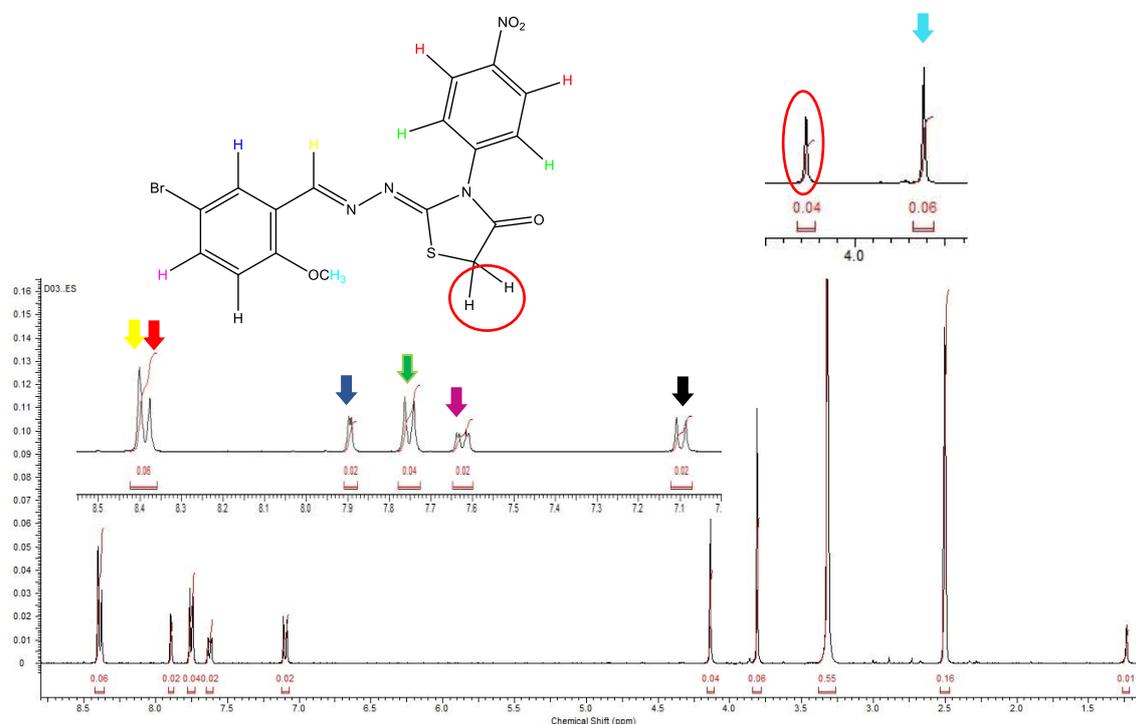
5.1.2. Caracterização estrutural das tiazolidinonas

A figura 20 esquematiza os deslocamentos químicos de RMN ¹H, referente 4-tiazolidinona obtida a partir da ciclicização da tiossemicarbazona. A formação do heterociclo foi confirmada pelo aparecimento do deslocamento característico para o carbono quaternário (C5) adjacente ao átomo de enxofre em 4,14ppm, e pelo desaparecimento dos sinais em 10,5 e 12,2ppm do R¹NH terminal e NH hidrazínico respectivamente, antes evidenciados.

Ainda, sinais entre 7,09 e 7,9 ppm, bem como valores de constante de acoplamento entre 8,38 - 8,4 caracterizam hidrogênios benzílicos e benzilidênicos.

Os do anel benzílico apresentam como dupletos com integração para dois hidrogênios, uma vez que substituição na posição *para* confere simetria molecular e por consequência equivalência química.

Figura 20: Espectro de RMN de hidrogênio do derivado tiazolidínico D03.



Fonte: Próprio Autor.

Ademais, nota-se no deslocamento 8,4ppm uma superposição do singlete referente ao hidrogênio azometínico e um dubleto benzilidênico, engendrando um sinal semelhante a um dubleto assimétrico. Diante dos dados obtidos da ressonância magnética nuclear de hidrogênio, no qual o hidrogênio hidrazínico aparece em deslocamento alto em DMSO deuterado, indicando a sua alta acidez, supõe-se que a presença de umidade tenha provocado essa superposição (TENÓRIO, 2005).

A substância D04 foi a única que apresentou um sistema típico de acoplamento de spin de padrão ABX, característico da porção CH-CH₂. Entretanto, devido a problemas de homogeneidade de campo, a molécula apresentou uma distorção no sinal, sendo atribuído como multipletos nesse caso específico, uma

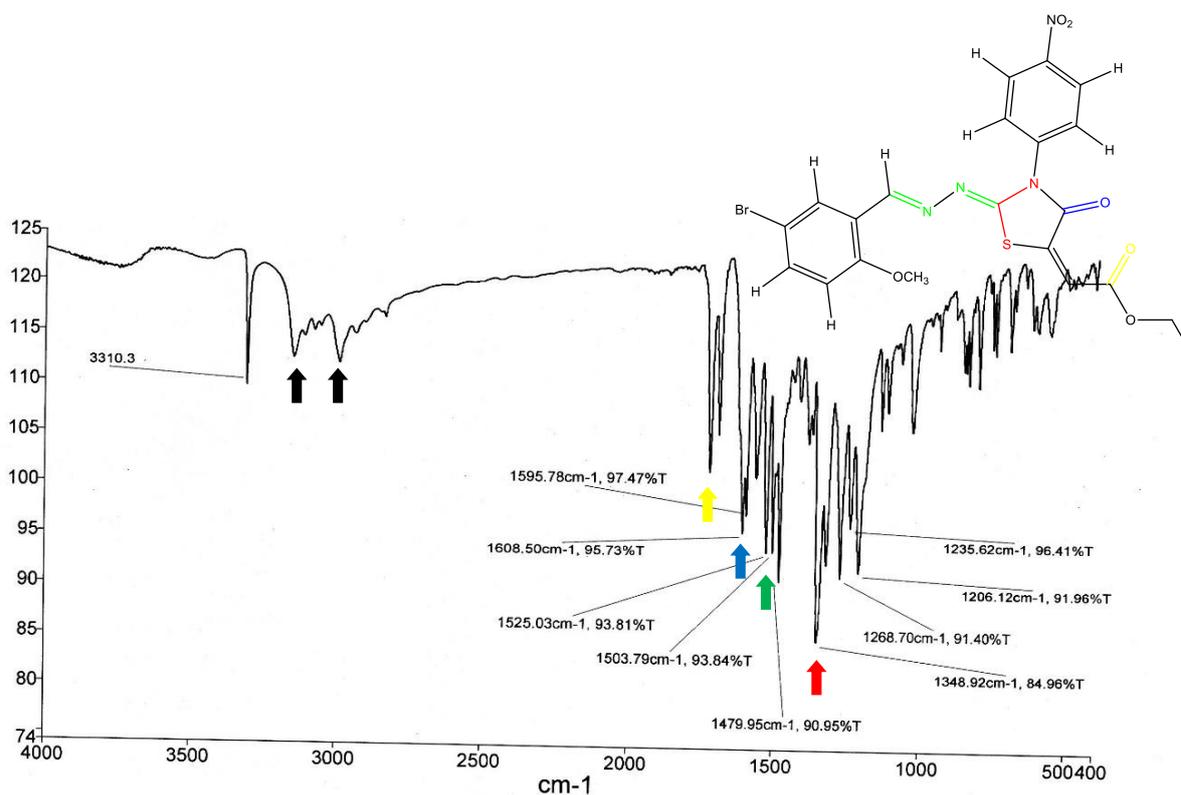
coincidência acidental no padrão ABX. Por outro lado, os dados experimentais de RMN ^{13}C confirmou, inequivocamente, toda estrutura.

No espectro de IV (figura 21) uma banda entre 1709 a 1737 cm^{-1} referente ao estiramento da função C=O do éster foi evidenciada. Em adição, a banda de C(=O)N da lactama também foi detectada, conforme mostrado na figura 19, confirmando a formação do heterociclo.

No IV de todas as 4-tiazolidinonas, uma banda forte na região de 1341 a 1362 cm^{-1} é evidenciada devido a formação angular do grupo funcional NCS, segundo El-gendy et al. (1990). As bandas de estiramentos dos CH alifáticos apareceram na faixa de 2854 a 3090 cm^{-1} .

Duas bandas, uma na região de 1503,79 cm^{-1} e outra na região de 1525,03 cm^{-1} atribuídas às vibrações de estiramento das funções C=N, azometínica e exocíclica, respectivamente, para todas substâncias obtidas. Foram observadas bandas de estiramento de CH aromáticos entre 3060 a 3081 cm^{-1} , para as estruturas estudadas.

Figura 21: Espectro IV da tiazolidinona (D02) evidenciando suas principais bandas.

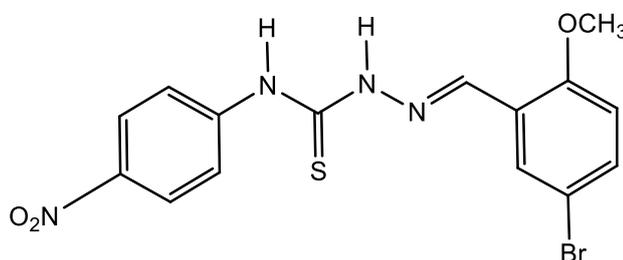


Fonte: Próprio Autor.

Duas bandas, uma na região de $1503,79\text{cm}^{-1}$ e outra na região de $1525,03\text{cm}^{-1}$ atribuídas às vibrações de estiramento das funções C=N, azometínica e exocíclica, respectivamente, para todas substâncias obtidas. Foram observadas bandas de estiramento de CH aromáticos entre 3060 a 3081cm^{-1} , para as estruturas estudadas.

5.1.3. *Dados espectroscópicos e espectrométricos dos compostos tiossemicarbazônicos e tiazolidínicos.*

2-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)-N-(4-nitrofenil)hidrazinacarbotoioamida (LQIT/D01)



$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrN}_4\text{O}_3\text{S}$; Rendimento: 89,8039; precipitado amarelo claro; Ponto de fusão: $209,5^\circ\text{C}$; massa exata: $407,99$ g/mol; M^+ : $409,99$ (98.3%).

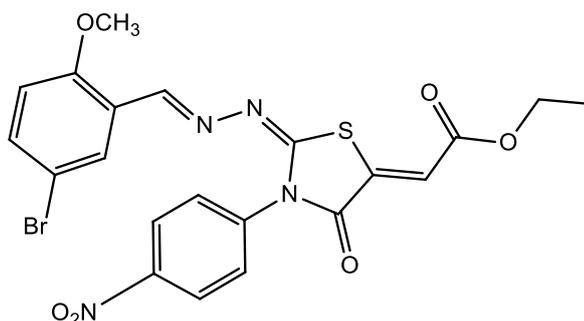
RMN ^1H (DMSO d_6 , 300 MHz, ppm): δ 3,86 (s, 3H, OCH_3); δ 7,07 (d, 1H, $J=12\text{Hz}$, Ar); δ 7,56 (d, 1H, $J=12\text{Hz}$, Ar); δ 8,02 (d, 2H, Ar, $J=12\text{Hz}$); δ 8,25 (d, 2H, $J=12\text{Hz}$, Ar); δ 8,41 (s, 1H, Ar); δ 8,5 (s, 1H, CH); δ 10,5 (s, 1H, NH); δ 12,18 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (DMSO d_6 , 100 MHz, ppm): δ 56,130; 112,747; 114,141; 123,644 (2C Ar); 123,874; 125,008 (2C, Ar); 128,349; 133,959; 138,143; 143,584; 145,408; 157,194; 175,433.

IV (ν cm^{-1} KBr): N-H exocíclico (3311,32); C=N (1503,97); C=S (1212,57).

MS m/z (ES $^+$): 408,992 $[\text{M}]^+$.

Etil2-(4-bromo-2-((metoximetileno)but-3-en-1-ilideno)hidrazona)-3-(4-nitrofenil)-4-oxotiazolidina-5-ilideno)acetato (LQIT/D02)



C₂₁H₁₇BrN₄O₆S; rendimento: 75,4615%; ponto de fusão: T°C > 300°C, massa exata: 508,01 g/mol; M+1: 508.01 (98.2%).

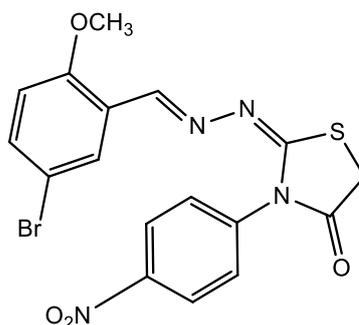
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, ppm): δ 1,38 (t, 3H, J= 8, CH₃); δ 3,81 (s, 3H, OCH₃); δ 4,365 (q, 2H, CH₂); δ 6,79 (d, 1H, J= 8, Ar); δ 7,0 (s, 1H, CH); δ 7,495 (dd, 1H, J= 8Hz, j= 4Hz, Ar); δ 7,68 (d, 2H, J= 8, Ar); δ 8,145 (d, 1H, J= 4, Ar); δ 8,39 (d, 2H, J= 8, Ar); δ 8,66 (s, 1H, =CH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, ppm): δ 14,2; 55,8; 61,4; 110,2; 113,1; 119,1; 124,1 (2C, Ar); 129,2 (2C, Ar); 131,6; 133,2; 134,9; 138,12; 138,81; 143,52; 156,6; 157,3; 158,3; 166,5; 166,9.

IV (ν cm⁻¹ KBr): C=O lactama (1608,5); C=N azometínico (1525,03); C=N (1503,79); NCS (1348,92).

MS m/z (ES⁺): 432,840 [M]⁺.

**(5-bromo-2-metoxibenzilideno)hidrazona)-3-(4-nitrofenil)tiiazolidin-4-ona
(LQIT/D03)**



C₁₇H₁₃BrN₄O₄S; rendimento: 69,2041%; precipitado amarelo claro floculado; ponto de fusão: 268,75°C, massa exata: 447,98g/mol; M⁺: 447.98 (98.0%)

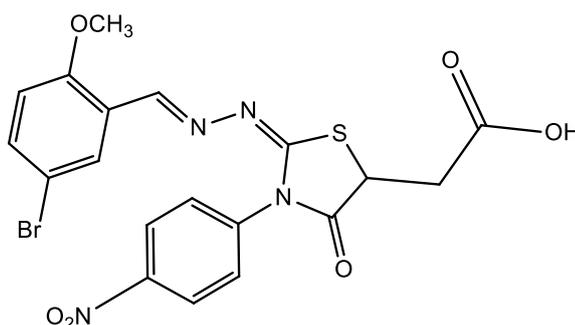
RMN ¹H (DMSO d₆, 400 MHz, ppm) δ 3,81 (s, 3H, OCH₃) δ 4,14 (s, 2H, -CH) δ 7,1 (d, 1H, J= 8, Ar) δ 7,62 (dd, 1H, J= 8Hz, j=4 Hz Ar) δ 7,75 (d, 2H, J= 8, Ar) δ 7,895 (d, 1H, j=4Hz Ar) δ 8,38 (s, 1H, =CH) δ 8,4 (s, 2H, Ar).

RMN ¹³C (DMSO d₆, 100 MHz, ppm): δ 32,616; 56,130; 112,329; 114,636; 123,821; 124,238 (2C Ar); 127,957; 129,688 (2C Ar); 134,705; 140,352; 147,039; 151,753; 157,385; 165,400; 171,587.

IV (ν cm⁻¹ KBr): C=O (1723,18); C=O lactama (1619,93); NCS (1339,93).

MS m/z (ES⁺): 448,923 [M]⁺.

(5-bromo-2-metoxibenzilideno)hidrazona)-3-(4-nitrofenil)-4-oxotiazolidina-5-il)ácido acético (LQIT/D04)



C₁₉H₁₅BrN₄O₆S; rendimento: 21,169%; ponto de fusão: 237,5°C; massa exata: 505,99 g/mol; M⁺: 505.99 (96.6%).

RMN ¹H (400 MHz, ppm, DMSO): δ 3,83 – 3,90 (m, 2H, CH₂); δ 3,99 (s, 3H, OCH₃); δ 4,57 – 4,60 (m, 1H, CH); δ 7,7 (d, 1H, J= 8, Ar); δ 7,6 (dd, 1H, J= 8Hz, j=4Hz, Ar); δ 7,71 (d, 2H, J= 8, Ar); δ 7,865 (d, 1H, J= 4, Ar); δ 8,4 (s, 1H, CH=N); δ 8,39 (d, 2H, J= 8, Ar); δ 12,18 (s, 1H, OH).

RMN ¹³C (DMSO d₆, 100 MHz, ppm): δ 36,585; 42,847; 56,130; 112,352; 114,621; 123,798; 124,322 (2C, Ar); 127,950; 129,582 (2C, Ar); 134,720; 140,451; 147,093; 151,753; 157,393; 164,710; 171,791; 173,408.

5.1.4. Resultados biológicos

Avaliação da citotoxicidade frente a macrófago J774

Com a intenção de avaliar a citotoxicidade frente a células macrofágicas J774 foi realizado o estudo *in vitro* tendo em vista o cálculo da concentração capaz de causar a perda da viabilidade em 50% das células (CC₅₀). Os resultados são descritos na tabela 1.

Tabela 1: Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos derivados tiossemicarbazônicos e tiazolidinônicos frente a macrófagos J774.

Compostos	CC ₅₀		CC ₅₀
	µg/mL	µM	
LQIT/D01	11,7± 0,72	28,70	0 – con cent raç ão
LQIT/D02	--	--	
LQIT/D03	25,89±0,47	57,79	
LQIT/D04	9,86±0,78	19,47	
Anfotericina B*	34,75±1,4	37,61	

capaz de causar a perda da viabilidade em 50% das células Macrófago. *Fármaco usado como referência nos testes *in vitro*.

De acordo com os resultados o composto de LQIT/D03 apresentou o melhor resultado frente aos macrófagos de estudo, sendo considerado o composto menos citotóxico, mesmo quando comparado com a anfotericina B, um dos fármacos

padrão utilizado no tratamento da leishmaniose. Entretanto os demais compostos apresentaram maior caráter citotóxico, exceto o composto LQIT/D02, que devido a problemas de solubilidade não apresentou resultados confiáveis para o teste supracitado.

Avaliação da atividade leishmanicida dos derivados tiossemicarbazônicos e tiazolidinônicos.

O screening farmacológico *in vitro* é um estudo de grande importância na avaliação de novos candidatos a fármacos, pois tem como característica descobrir se os mesmos possuem potencial atividade frente ao alvo proposto. Com essa linha de pensamento foram realizados o citado estudo frente a células promastigotas de *Leishmania infantum*. Os resultados obtidos se encontram na tabela 2.

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

Compostos	μM			Legenda:
	IC ₅₀	CC ₅₀	IS	
LQIT/D01	97,28	28,70	0,30	IC ₅₀ – conc entra ção
LQIT/D02	69,33	--	--	
LQIT/D03	54,58	57,79	1,06	
LQIT/D04	24,29	19,47	0,8	
Anfotericina B*	0,05	37,61	752,2	

que inibe 50% do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum*; CC₅₀ – concentração capaz de causar a perda da viabilidade em 50% das células Macrófágicas; IS (Índice de seletividade) – CC50 Macrófago/IC50 Promastigotas.

Os compostos avaliados apresentaram inibição das formas promastigotas em todas as concentrações testadas no intervalo de 72 horas. As concentrações variaram entre 24,29 a 97,28 μM . Como se pode observar o composto LQIT/D-01 apresentou o valor mais alto de IC₅₀ frente as cepas testadas, em contrapartida LQIT/D-04 foi o mais promissor da série testada.

Os valores de índice de seletividade mostram que todas as moléculas testadas apresentam elevada citotoxicidade frente as células macrófagos J774. Entretanto de acordo com Oliveira et al. (2015), para a avaliação da toxicidade, faz-

se necessário a realização de testes *in vivo* para verificar os efeitos sistêmicos de novos candidatos a fármacos. Visto que, testes *in vitro* representa um ambiente fechado e controlado de um laboratório, o que não representa completamente o comportamento de compostos em organismos vivos e seus fenômenos dinâmicos.

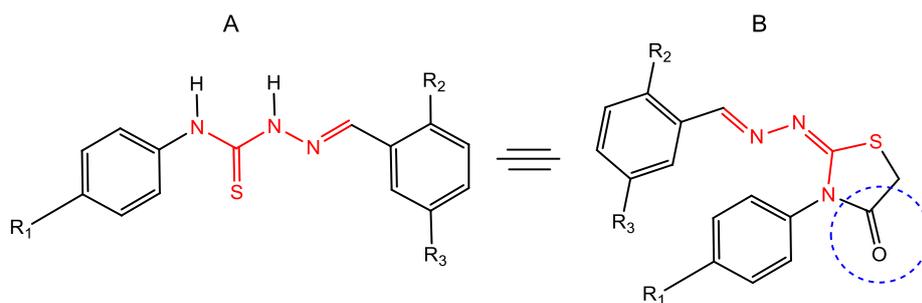
Estudo da relação estrutura/atividade biológica da série LQIT/D

O estudo de relação estrutura/atividade é uma ferramenta importante utilizada na química medicinal, visando identificar características estruturais importantes para um determinado alvo biológico (YADAV, 2015).

A escolha do *scaffold* tiossemicarbazônico se justifica partindo de relatos na literatura indicando a sua potencialidade antiparasitária. Os substituintes foram selecionados mediante resultados positivos obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, onde o R1 (-NO₂) já conhecido por sua ação antiparasitária, tem se destacado em um grande número de compostos descritos em trabalhos anteriores (PAULAI, 2009 et al.; NASCENTE, 2009). Já os radicais R2 e R3 (-OCH₃, -Br, respectivamente) também tem se destacado como importantes substituintes para a ação pretendida, aumentando a atividade dos fármacos (AQUINO, 2008).

Partindo dessa premissa surgiu a ideia de avaliar o potencial leishmanicida do derivado tiossemicarbazônico em seguida a sua ciclização conduzindo ao derivado tiazolidinônico e a influência da mesma na atividade biológica (figura 22).

Figura 22: Derivado tiossemicarbazônico (A) e 4- tiazolidinônico (B).

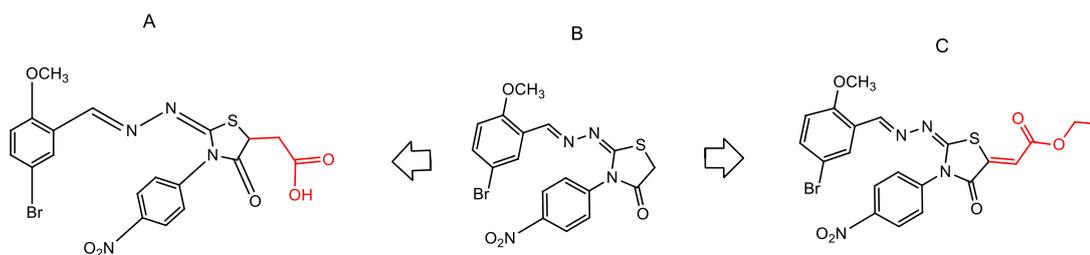


Fonte: Próprio Autor.

Como observado nos estudos *in vitro*, os compostos ciclizados mostraram melhores resultados frente as células estudadas, possivelmente devido à restrição conformacional sofrida pela molécula na formação do anel tiazolidínico, evidenciando que a ciclização como estratégia de síntese foi uma ferramenta útil na obtenção de novos candidatos antiparasitários. Isso pode ser observado quando comparamos os compostos LQIT/D01 e LQIT/D03, além disso, acreditamos que a presença da carbonila pode ter contribuído de forma positiva para a atividade biológica, através de interações eletrostáticas adicionais com o alvo.

Já quando comparamos as estruturas LQIT/D02 e LQIT/D04, observamos que as substituições na posição 5 do anel tiazolidínico, referente a porção etil acrilato e do ácido propiônico, respectivamente (figura 23), alteram os valores de atividade nos estudos *in vitro*.

Figura 23: Estrutura química dos compostos LQIT/D04 (A), LQIT/D01 (B) e LQIT/D02 (C).

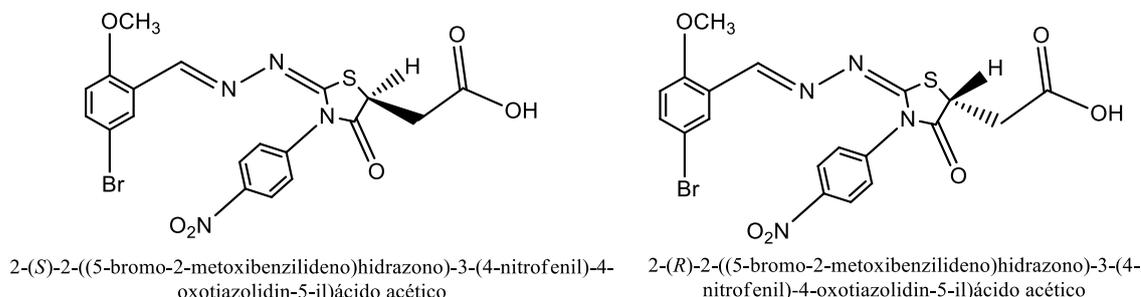


Fonte: Próprio Autor.

Nota-se que, em comparação com a estrutura química do substituinte do composto LQIT/D04 em relação ao composto LQIT/D02, apresenta uma porção etil acrilato que modifica a hibridização do carbono sp^3 tetraédrico do anel tiazolidínico para a forma sp^2 assumindo uma conformação trigonal planar devido a dupla, e assim, podendo causar um impedimento estérico que pode inferir uma grande restrição espacial do ligante, o que pode justificar a menor atividade da mesma. Além disso, observa-se que a presença do resíduo ácido livre parece favorecer a atividade por ser um grupo com características aceptoras e doadoras de ligação de hidrogênio.

O composto LQIT/D04, apesar de possuir um IC_{50} acima de $20\mu M$ foi o composto mais ativo da série testada. Entretanto, trata-se de um composto que contém um centro assimétrico, podendo apresentar dois possíveis enantiômeros, o (R)-LQIT/D04 e (S)-LQIT/D04 (figura 24).

Figura 24: Estrutura química dos enantiômeros (R)-LQIT/D04 e (S)-LQIT/D04



Fonte: Próprio Autor.

Muitos compostos contendo carbonos quirais apresentam suas atividades e/ou toxicidade atribuídas a apenas um dos enantiômeros. Estudos realizados por Abdul-Ghani et al. (2009) com praziquantel, fármaco que contém carbono quiral com atividade esquistossomicida, observou que pacientes tratados com $20mg/Kg/peso$ do R-praziquantel, enantiômero ativo, apresentaram a mesma taxa de cura e menos efeitos colaterais quando comparado com pacientes tratados com $40mg/Kg/peso$ da mistura racêmica. Outro fármaco descrito na literatura, o oxamniquine, foi estudada por Taylor e colaboradores (2015), onde, através de ferramentas de modelagem molecular sugerem que o enantiômero S é responsável pela maior atividade esquistossomicida, enquanto o enantiômero R apresenta atividade moderada em altas concentrações.

Mediante os relatos da literatura podemos sugerir que o composto LQIT/D04 possa ter seus valores de IC_{50} reduzidos ou menores efeitos tóxicos frente a um dos seus isômeros isolados, levando em consideração a possibilidade de uma mistura racêmica esses valores podem ser reduzidos em até 50%.

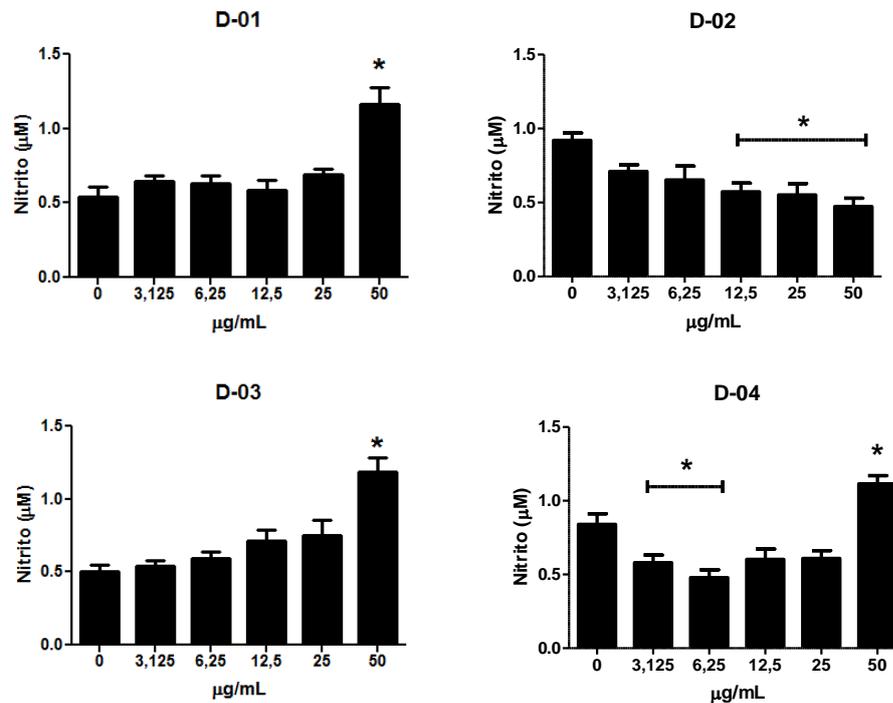
Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

A dosagem de NO nos sobrenadantes de cultura foi realizada de forma indireta por meio da reação de Griess, que acusa a presença de subprodutos estáveis oriundos da síntese de NO, como o nitrito (NO^-2) (SOUZA, 2010). A finalidade desse teste visa qualificar e quantificar a concentração desses subprodutos, investigando a influência dos compostos sintetizados na série D acerca do estímulo da produção de NO pelas células macrofágicas.

A figura 25 apresenta os gráficos contendo os resultados obtidos a partir da avaliação da produção de óxido nítrico dos quatro derivados isotiocianatos nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em 72 horas.

Os compostos LQIT/D01, LQIT/D03 e LQIT/D04 apresentaram resultados significativos, na produção de óxido nítrico, comparados com o grupo controle quando testados em sua maior dosagem (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O composto LQIT/D02, não apresentou resultados conclusivos, isso pode ser devido a problemas com sua solubilidade como já mencionados nos testes de CC_{50} realizados em macrófagos.

Figura 25: Gráficos referentes a produção de óxido nítrico dos derivados tiossemicarbazônicos e tiazolidinônicos em 72 horas.



Fonte: Próprio Autor.

Os macrófagos são células imunológicas efetoras de imensa importância contra a *Leishmania*. Dependendo de qual citocinas ao qual são expostas podem ativar vias imunológicas distintas, reproduzindo a via clássica ou a via alternativa.

Os linfócitos T CD4+ quando ativados secretam citocinas que estimulam a diferenciação, crescimento e funções do macrófago. Dois subgrupos desses linfócitos são definidos a partir das citocinas que secretam: Th1, responsável pela via imológica clássica, e Th2 responsável pela via imunológica alternativa. Até o momento de se diferenciarem elas permanecem em estado de repouso, sendo denominado de Th *naive*; produzindo a interleucina IL-2 e expressando receptores para as mesmas, até alcançarem a circulação passando a designar-se Th0. Estimulados pelo aumento da produção de IL-12 o linfócito Th0 se diferencia em Th1, ativando a via imunológica clássica, que junto com as células natural killer, passam a produzir IFN γ (interferon gama), responsável pelo primeiro estímulo para a ativação do macrófago. O desenvolvimento de uma resposta imune capaz de combater a *Leishmania* está diretamente relacionado com a produção de IFN γ ,

principalmente devido a indução da síntese de NO, o qual aumenta a resposta microbicida.

Outra substância de extrema importância é o TNF α (fator de necrose tumoral), produto da síntese de citocinas do macrófago, que age autocrinamente na regulação da cascata imunológica na fase inicial. Junto ao IFN γ , o TNF α faz com que as células macrofágicas se tornem efectoras com alta capacidade microbicida. Essas substâncias por sua vez são responsáveis pelo estímulo da célula na produção das citocinas IL-1, IL-6, IL-23 e IL-12, que produzem níveis elevados de óxido nítrico sintetase, aumentando a síntese de óxido de nítrico e seus subprodutos.

Em estudos realizados por Rodrigues e colaboradores (2015), com derivados tiofênicos indólicos foi observado que o efeito anti-amastigota está associado com o aumento na produção de TNF α , IL-12 e NO. Dados da literatura tem reportado que o sucesso de eliminação do parasito do gênero *Leishmania* tem sido dependente da estimulação do sistema imunológico via ativação de resposta imune dominada por Th1 com produção de citocinas protetoras (IFN γ , TNF α e IL-12) (GUPTA et al., 2015). Outros trabalhos demonstraram que o controle *in vitro* e *in vivo* de *L. Amazonensis* está associado com uma combinação de óxido nítrico e ânion superóxido resultando na produção de peroxinitrito (ONOO $^-$), um poderoso oxidante altamente reativo que atua como leishmanicida, em contrapartida outras espécies de leishmania tais como, *L. Major* (HORTA et al., 2012).

/Diante de tais informações podemos observar que os derivados tiossemicarbazônicos estudados apresentaram significativa produção de NO pelo macrófago, e que apesar dos testes serem realizados em forma promastigotas, acreditamos que o aumento da concentração do óxido nítrico possa vir a ser uma das causas pela morte do mesmo, uma vez que os parasitas se diferenciam da forma promastigota para a forma amastigota dentro do macrófago, entretanto precisará ser realizados futuros testes em forma amastigota para conclusões mais precisas.

Com isso observamos que os derivados tiossemicarbazônicos e tiazolidinônicos podem apresentar uma potencial atividade leishmanicida,

principalmente o composto LQIT/D04 que apresentou o melhor resultado da série, mesmo apresentando um centro assimétrico, porém o isolamento de enantiômeros ou a síntese enantioseletiva do composto referido pode ser uma alternativa para melhora da atividade. Outros fatores também podem ter influenciado na resposta desses derivados, entretanto um dos mais observados pode estar relacionado com sua solubilidade e que futuras propostas utilizando a tecnologia farmacêuticas na produção de formulações, possam contornar essa problemática.

Conclusões e perspectivas

6. CONCLUSÕES

As substâncias estudadas foram obtidas a partir de metodologia de simples aplicação e robustez nas mesmas condições de realização, apresentando ao término do trabalho, rendimentos satisfatórios. Destacando que foram obtidos rendimentos acima de 70% da tiossemicarbazona e tiazolidinona.

Foram sintetizados 4 novos derivados tiossemicarbazônicos e tiazolidinônicos, sendo um deles, uma tiossemicarbazona, a 2-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)-N-(4-nitrofenil)hidrazinacarbotioamida (LQIT/D01), e três 4-tiazolidinonas, um éster, etil2-(4-bromo-2-((metoximetileno)but-3-en-1-ilideno)hidrazona)-3-(4-nitrofenil)-4-oxotiazolidina-5-ilideno)acetato (LQIT/D02), uma 4-tiazolidinona, a (5-bromo-2-metoxibenzilideno)hidrazona)-3-(4-nitrofenil)tiazolidin-4-ona (LQIT/D03), e um ácido, o (5-bromo-2-metoxibenzilideno)hidrazona)-3-(4-nitrofenil)-4-oxotiazolidina-5-il)ácido acético (LQIT/D04).

As substâncias foram devidamente caracterizadas baseados em dados da ressonância magnética nuclear, infravermelho e espectrometria de massa. Todos os compostos foram assinalados com base na literatura.

No estudo biológico se constatou que a tiossemicarbazona e as tiazolidinonas mostraram atividade frente a leishmaniose, demonstrando que essas estruturas se posicionam como possíveis candidatos a fármacos, destacando-se entre elas o composto LQIT/D04 que apresentou menores resultados de IC₅₀ e resultados significativos no estudo de produção de NO.

Em relação a estrutura dos compostos testados, os resultados demonstraram que a estratégia de ciclização aumentou significativamente a atividade. A substituição na posição 5 do anel tiazolidínico alterou os valores dos testes de formas distintas para cada composto. Posto isto, a adição de instauração diretamente ligada nesta posição diminuiu de forma contundente a atividade, como observado nos valores do composto LQIT/D02, em contrapartida, a substituição do substituinte ácido propiônico na posição 5 aumenta atividade de forma sign

6.1. PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar o incremento da solubilidade dos compostos testados;
- ✓ Realização de testes nas formas amastigotas;
- ✓ Realização de microscopia eletrônica de transmissão e varredura;
- ✓ Síntese enantioseletiva do composto LQIT/D04 com o auxílio de condutores quirais;
- ✓ Realização de testes de toxicidade;
- ✓ Realização de testes *in vivo*;
- ✓ Procurar mecanismos para tentar elucidar possíveis mecanismos de ação dos derivados isotiocianatos.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABDUL-GHANI, R., LOUTFY, N., EL SAHN, A., & HASSAN, A. Current chemotherapy arsenal for schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges. *Parasitology research*, v. 104, n. 5, p. 955-965, 2009.
- ALVAR, J., V_ELEZ, I.D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- BHANDARI, V., SUNDAR, S., DUJARDIN, J. C., & SALOTRA, P. Elucidation of cellular mechanisms involved in experimental paromomycin resistance in *Leishmania donovani*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 58, n. 5, p. 2580-2585, 2014.
- BOYKO N., KLYUCHYVSKAYA, L.I., HAVRYLIUK, D.Y., RIABTSEVA, A.A., MITIN, N.E., LESIK, R.B., KOBILYNSKAYA, L. A. I. Vitality and morphology of tumor cells treated with 4-tiazolidinone derivatives immobilized on nanoscale polymer carrier. *Biotechnologia acta*, v. 8, n. 1, 2015.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. *Rev Saúde Pública*, v. 44, n. 1, p. 200-2, 2010.
- CAMARGO-NEVES, V. A leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo: situação atual. *BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista*, v. 4, n. 48, p. 12-14, 2007.
- CAMPOS-PONCE, M., PONCE, C., PONCE, E., & MAINGON, R. D. C. *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on *Leishmania* tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. *Experimental parasitology*, v. 109, n. 4, p. 209-219, 2005.
- CASSILHAS, A. P. P. Análise genômica e pós-genômica de proteínas de *Leishmania chagasi*. 2004.
- CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. *Clinical microbiology and infection*, v. 17, n. 10, p. 1478-1483, 2011.

CYSNE-FINKELSTEIN, et al. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Experimental parasitology*, v. 89, n. 1, p. 58-62, 1998.

DAVIES, C. R., KAYE, P., CROFT, S. L., & SUNDAR, S. CLIVE R. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *Bmj*, v. 326, n. 7385, p. 377-382, 2003.

DEVINYAK, O., HAVRYLYUK, D., ZIMENKOVSKY, B., & LESYK, R. Computational Search for Possible Mechanisms of 4-Thiazolidinones Anticancer Activity: The Power of Visualization. *Molecular Informatics*, v. 33, n. 3, p. 216-229, 2014.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *The Journal of Immunology*, v. 141, n. 7, p. 2407-2412, 1988.

DONALD, J. A. *Burger's medicinal chemistry and drug discovery*. Wiley-VCH, New York, 2003.

EL-FEKY, S. A. Synthesis and anticonvulsant properties of some novel quinazolinone thiazolidine and 4-thiazolidone derivatives. *Die Pharmazie*, v. 48, n. 12, p. 894-896, 1993.

EL-GENDY, Z., ABDEL-RAHMAN, R. M., FAWZY, M. M., & MAHMOUD, M. B. Biologically Active Thiazolidinone. Part 2. Synthesis and Fungitoxicities of Isolated and Fused Thiazolidinones Derived from Thiosemicarbazones. *ChemInform*, v. 23, n. 8, 1992.

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.

FINATEC. FUNDAÇÃO DE EMPREENDIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO. Avancos no tratamento da leishmaniose no Brasil. Disponível em: <http://www.finatec.org.br/>. Acesso em 29/01/2017.

FRANCA, R. K. A., SOUSA DIAS, C. N., NASCIMENTO, N. P. L., CÂMARA R., J., SCOTTI, M. T., SCOTTI, L., OLIVEIRA, T. B., LIMA, M. C. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. *European journal of medicinal chemistry*, v. 106, p. 1-14, 2015.

FREITAS, V. C. O processo de interação de *Leishmania (Leishmania) chagasi* com *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* e a importância do lipofosfoglicano (LPG). 2010.

GONTIJO, B, CARVALHO, M. American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, C. M. F., MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev bras epidemiol*, 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.

GRIMALDI, G., TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical microbiology reviews*, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

GRUENBERG, J. & VAN DER GOOT, F.G. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 7, n. 7, p. 495-504, 2006.

GUERIN, P., OLLIARO, J. P., SUNDER, S., BOELAERT, M., CROFT, S. L., DESJEUX, P., WASUNNA, M. K., BRYCESON, A. D. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *The Lancet infectious diseases*, v. 2, n. 9, p. 564-573, 2002.

GUPTA, S., YARDLEY, V., VISHWAKARMA, P., SHIVAHARE, R., SHARMA, B., LAUNAY, D., PURI, S. K. Nitroimidazo-oxazole compound DNDI-VL-2098: an orally effective preclinical drug candidate for the treatment of visceral leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 2, p. 518-527, 2015.

GWILT, P. R., TRACEWELL, W. G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydroxyurea. *Clinical pharmacokinetics*, v. 34, n. 5, p. 347-358, 1998.

H. NAKAI, H. WADA, N.T. MEGURO, H. YABANA, N-Substituted-2-[2-[2-(4-phenylpiper-azine-1-yl)ethoxy]phenyl]-thiazolidine-3-carboxamides Useful as Cardiotonic Agent, U.S.Patent, n_ 4,689,327, 1987.

HEWITT, S., REYBURN, H., ASHFORD, R., & ROWLAND, M. Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan: vertical distribution of cases in apartment blocks. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 92, n. 3, p. 273-274, 1998.

HORTA, M. F., MENDES, B. P., ROMA, E. H., NORONHA, F. S. M., MACÊDO, J. P., OLIVEIRA, L. S., VIEIRA, L. Q. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *Journal of parasitology research*, v. 2012, 2012.

IQBAL, H.; ISHFAQ, M.; WAHAB, A.; ABBAS, M. N.; AHMAD, I.; REHMAN, A.; ZAKIR, M. Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2016.

KAPOOR, G., PATHAK, D., BHUTANI, P. R., & KANT, R. Thiazolidinone as a pharmacologically active molecule. *J Chem Pharm Res*, v. 8, n. 4, p. 151-168, 2016.

KAUR, G., RAJPUT, B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in leishmania. *Journal of parasitology research*, v. 2014.

KHOT, S. S., DHONGADE, S. R. Microwave assisted multicomponent synthesis of excellent antidiabetic (type 2) active thiazolidinone derivatives. In: *Proceedings of the National Conference on Drug Designing and Discovery DDD2013*. Devchand College, Arjunnagar, India. 2014. p. 77-80.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology*, v. 17, n. 3, p. 279-289, 1999.

KOBYLINSKA, L. I., BOIKO, N. M., PANCHUK, R. R., GRYTSYNA, I. I., BILETSKA, L. P., LESYK, R. B., STOIKA, R. S. Putative anticancer potential of novel 4-

thiazolidinone derivatives: cytotoxicity toward rat C6 glioma in vitro and correlation of general toxicity with the balance of free radical oxidation in rats. *Croatian medical journal*, v. 57, n. 2, p. 151-163, 2016.

KOYAMA, H., BOUERES, J. K., HAN, W., METZGER, E. J., BERGMAN, J. P., GRATALE, D. F., DOEBBER, T. W. 5-Aryl thiazolidine-2, 4-diones as selective PPAR γ agonists. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 13, n. 10, p. 1801-1804, 2003.

KUILDER, J. S., WISMANS, P. J., BAERVELDT, E. M., VAN HELLEMOND, J. J., DE MENDONÇA MELO, M., VAN GENDEREN, P. J. Leishmania major Cutaneous Leishmaniasis in 3 Travelers Returning from Israel to the Netherlands. *Emerging infectious diseases*, v. 22, n. 11, p. 2022, 2016.

LEDERMAN, E. R., WELD, L. H., ELYAZAR, I. R., VON SONNENBURG, F., LOUTAN, L., SCHWARTZ, E., & KEYSTONE, J. S. Dermatologic conditions of the ill returned traveler: an analysis from the GeoSentinel Surveillance Network. *Int. J. Infect. Dis.* 12, 593–602, 2008.

LEITE, C. E. A. Leishmaniose visceral humana em Pernambuco: epidemiologia e gastos com internações hospitalares, 2016.

LEITE, F. H. A., SILVA SANTIAGO, P. B. G., FROES, T. Q., SILVA FILHO, J., SILVA, S. G., XIMENES, R. M., CASTILHO, M. S. Structure-guided discovery of thiazolidine-2, 4-dione derivatives as a novel class of Leishmania major pteridine reductase 1 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 123, p. 639-648, 2016.

LESYK, R., ZIMENKOVSKY, B., ATAMANYUK, D., JENSEN, F., KIEĆ-KONONOWICZ, K., & GZELLA, A. Anticancer thiopyrano [2, 3-d][1, 3] thiazol-2-ones with norbornane moiety. Synthesis, cytotoxicity, physico-chemical properties, and computational studies. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 14, n. 15, p. 5230-5240, 2006.

LI, J.; CHEN, S.; LI, X.; NIU, C.; DOYLE, T. W. Efficient Synthesis of Ribonucleotide Reductase Inhibitors 3-Aminopyridine-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazone (3-AP) and 3-Amino-4-methylpyridine-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazone (3-AMP) Via

Palladium Mediated Cross-Coupling Reactions. *Tetrahedron*, v. 54, p. 393-400, 1998.

LIESEN, A. P., DE AQUINO, T. M., CARVALHO, C. S., LIMA, V. T., DE ARAÚJO, J. M., DE LIMA, J. G., ALVES, A. Q. Synthesis and evaluation of anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-thiazolidinones and 1, 3, 4-thiadiazoles. *European journal of medicinal chemistry*, v. 45, n. 9, p. 3685-3691, 2010.

LOISEAU, P. M., COJEAN, S., SCHRÉVEL, J. Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance. *Parasite: journal de la Société Française de Parasitologie*, v. 18, n. 2, p. 115, 2011.

MACCARI, R., OTTANÀ, R., CIURLEO, R., VIGORITA, M. G., RAKOWITZ, D., STEINDL, T., LANGER, T. R. Evaluation of in vitro aldose reductase inhibitory activity of 5-arylidene-2, 4-thiazolidinediones. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 17, n. 14, p. 3886-3893, 2007.

MACCARI, R., VITALE, R. M., OTTANÀ, R., ROCCHICCIOLI, M., MARRAZZO, A., CARDILE, V., DEL CORSO, A. Structure–activity relationships and molecular modelling of new 5-arylidene-4-thiazolidinone derivatives as aldose reductase inhibitors and potential anti-inflammatory agents. *European journal of medicinal chemistry*, v. 81, p. 1-14, 2014.

MARKLE, W. H.; MAKHOUL, K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *American family physician*, v. 69, n. 6, p. 1455-1464, 2004.

MELO, E. J. T.; BEIRAL, H. J. Effect of hydroxyurea on the intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian journal of medical and biological research*, v. 36, n. 1, p. 65-69, 2003.

MESQUITA, J. T. Mecanismo de ação de fármacos sintéticos e associações terapêuticas em *Leishmania (L) infantum*. 2013. Tese de Doutorado. São Paulo (Estado) Secretaria da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Programa de Pós-Graduação em Ciências.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Guia de vigilância em saúde. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana /Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Editora do Ministério da Saúde, 2ª Edição, 182 p., 2007. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf. Acessado em: 15/04/2017.

MISHRA, J., SAXENA, A., SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Current medicinal chemistry*, v. 14, n. 10, p. 1153-1169, 2007.

MONTALVO, A. M., FRAGA, J., MONZOTE, L., GARCÍA, M., FONSECA, L. Leishmaniasis diagnosis: going from microscopic observation of parasite to DNA detection. *Revista cubana de medicina tropical*, v. 64, n. 2, p. 108-131, 2012.

MOSSER, D. M.; ROSENTHAL, L. A. Leishmania-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. In: *Seminars in cell biology*. Academic Press, p. 315-322, 1993.

MURRAY, H.W., BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R., SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, v. 366, p. 1561-77, 2005.

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

NASCENTE, L. D. C. Síntese e avaliação citotóxica de nitroderivados planejados a partir do Safrol. 2009.

NITSCHKE, C., SCHREIER, V. N., BEHNAM, M. A., KUMAR, A., BARTENSCHLAGER, R., & KLEIN, C. D. Thiazolidinone-peptide hybrids as dengue virus protease inhibitors with antiviral activity in cell culture. *Journal of medicinal chemistry*, v. 56, n. 21, p. 8389-8403, 2013.

NYALWIDHE J, MAIER UG, LINGELBACH K. Intracellular parasitism: cell biological adaptations of parasitic protozoa to a life inside cells. *Zoology*, v. 106, n. 4, p. 341-348, 2003.

OLIVEIRA, J., SILVA, A., ALMEIDA-JUNIOR, A. S. A., SANTIAGO, E., OLIVEIRA, S., SILVA, V., LIMA, M. Synthesis and Evaluation of the Schistosomicidal and Trypanocidal Properties of Thioxo-Imidazolidines and Thiazolidin-2, 4-Diones. *British Journal of Pharmaceutical Research*, v. 7, n. 6, p. 386-400, 2015.

OLIVIER, M., GREGORY, D.J. & FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical microbiology reviews*, v. 18, n. 2, p. 293-305, 2005.

OTTANA, R., MACCARI, R., BARRECA, M. L., BRUNO, G., ROTONDO, A., ROSSI, A., VIGORITA, M. G. 5-Arylidene-2-imino-4-thiazolidinones: design and synthesis of novel anti-inflammatory agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 13, n. 13, p. 4243-4252, 2005.

PACE, D. Leishmaniasis. *Journal of infection*, v. 69, p. S10-S18, 2014.

PAHO-WHO. Leishmaniasis. Epidemiological Report of the Americas. Report Leishmaniasis nº 2. 2014. Acesso em 27 de abril de 2017. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=27080&Itemid=>>. Citado 4 vezes nas páginas 13, 17, 18 e 39.

PORFIRIO-PASSOS, G, SILVA, P. M. A., ALMEIDA, S. L. H., PORFIRIO, L. C., ZANINI, N. S. Métodos para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana – Revisão, *enciclopédia biosfera*, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p 1232, 2012.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*, v. 58, p. 227-250, 2013.

REITHINGER, R., DUJARDIN, J.-C., LOUZIR, H., PIRMEZ, C., ALEXANDER, B., BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

SERENO, D., HOLZMULLER, P., LEMESRE, J. L. Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta tropica*, v. 74, n. 1, p. 25-31, 2000.

SHIRADKAR, M. R., GHODAKE, M., BOTHARA, K. G., BHANDARI, S. V., NIKALJE, A., AKULA, K. C., BURANGE, P. J. Synthesis and anticonvulsant activity of clubbed thiazolidinone–barbituric acid and thiazolidinone–triazole derivatives. *Arkivoc*, v. 14, p. 58-74, 2007.

SILVA, D. G. Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas. 2008.

SILVA, I. M., SILVA, F. J., SANTIAGO, P. B. G. D. S., EGITO, M. S., SOUZA, C. A., GOUVEIA, F. L., ALBUQUERQUE, J. F. C. Synthesis and antimicrobial activities of 5-arylidene-thiazolidine-2, 4-dione derivatives. *BioMed research international*, v. 2014, 2014.

SINGH, S., SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of infection and chemotherapy*, v. 10, n. 6, p. 307-315, 2004.

SOUZA, M. D. A. Avaliação da produção in vitro de citocinas e de óxido nítrico na leishmaniose tegumentar americana ativa e após cura clínica. 2010.

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.

SUNDAR S., CHAKRAVARTY J., LEISHMANIASIS: an update of current pharmacotherapy, Expert Opinion, Banaras Hindu University, Institute of Medical Sciences, Department of Medicine, Varanasi, India, 2013.

SUNDAR, S., CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis-current therapeutic modalities. *Indian Journal of Medical Research*, v. 123, n. 3, p. 345, 2006.

SUNDAR, S., JHA, T. K., THAKUR, C. P., SINHA, P., BHATTACHARYA S. K. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *New England Journal of Medicine*, v. 356, n. 25, p. 2571-2581, 2007.

SUNDAR, S., RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TAYLOR, A. B., PICA-MATTOCCIA, L., POLCARO, C. M., DONATI, E., CAO, X., BASSO, A., HART, P. J. Structural and functional characterization of the enantiomers of the antischistosomal drug oxamniquine. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 9, n. 10, p. e0004132, 2015.

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

TOMAŠIĆ, T., PETERLIN, M. L. Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 14, n. 1, p. 130-151, 2014.

TRACY, J. W., WEBSTER, L. T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. *The pharmacological basis of therapeutics*, v. 9, p. 80-808, 1996.

VANNIER-SANTOS, M. A., MARTINY, A., SOUZA, W. de. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Current pharmaceutical design*, v. 8, n. 4, p. 297-318, 2002.

VICINI, P., GERONIKAKI, A., ANASTASIA, K., INCERTI, M., ZANI, F. Synthesis and antimicrobial activity of novel 2-thiazolylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 14, n. 11, p. 3859-3864, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the Leishmaniases. *World Health Organ Tech Rep*, pp. 22e26, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Visceral leishmaniasis: WHO publishes validation document as countries approach elimination. 2015. Acessado em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acessado em 22 de março de 2017.

YADAV, G., GANGULY, S. Structure activity relationship (SAR) study of benzimidazole scaffold for different biological activities: A mini-review. *European journal of medicinal chemistry*, v. 97, p. 419-443, 2015.

YARDLEY, V., CROFT, S. L. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 41, n. 4, p. 752-756, 1997.

ZHANG, X., LI, X., LI, D., QU, G., WANG, J., LOISEAU, P. M., & FAN, X. Ionic liquid mediated and promoted eco-friendly preparation of thiazolidinone and pyrimidine nucleoside–thiazolidinone hybrids and their antiparasitic activities. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 19, n. 22, p. 6280-6283, 2009.