



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

ALLANA LEMOS ANDRADE GOUVEIA

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE NOVOS DERIVADOS
HETEROCÍCLICOS TIAZOLIDÍNICOS E TIOSSEMICARBAZONAS**

Recife
2019

ALLANA LEMOS ANDRADE GOUVEIA

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE NOVOS DERIVADOS
HETEROCÍCLICOS TIAZOLIDÍNICOS E TIOSSEMICARBAZONAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

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

Co-orientador: Prof. Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

G719a Gouveia, Allana Lemos Andrade
Atividade leishmanicida *in vitro* de novos derivados heterocíclicos
tiazolidínicos e tiossemicarbazonas / Allana Lemos Andrade Gouveia.
– 2019.
118 f. : il. fig., tab.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas. Recife, 2019.
Inclui referências.

1. Leishmaniose. 2. Tiazolidina. 3. Tiossemicarbazona. 4. Óxido
nítrico. 5. Microscopia eletrônica I. Lima, Maria do Carmo Alves de
(orientadora). II. Título.

617.6 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2019 - 229)

ALLANA LEMOS ANDRADE GOUVEIA

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE NOVOS DERIVADOS
HETEROCÍCLICOS TIAZOLIDÍNICOS E TIOSSEMICARBAZONAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 29/07/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Alves de Lima (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

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

Prof.^a Dr.^a Anekécia Lauro da Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof.^a Dr.^a Ana Paula Sampaio Feitosa (Examinadora Externa)
Instituto Aggeu Magalhães

Dedico este trabalho a minha mãe Valéria e ao meu pai Rui, por terem acreditado no meu potencial e pelo incentivo que foi essencial para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Ao meu coorientador Prof. Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira por todo auxílio e contribuição desde a fase do mestrado até os dias de hoje.

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

A todos que fazem parte do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica, pela amizade e colaboração durante os experimentos: Amélia, César, Hanna, Íris, Kel, Miguel, Paulinha, Pedro, Rubinho, Suellen, Ariany, Charles, Denise, Luiz, Rosana (Moranguinho), Natanael, Tiago Bento, Cleitinho, Serginho e Anekécia.

A todos que fazem parte Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto Aggeu Magalhães, pelo bom acolhimento, pela cooperação e carinho com que pude contar: Camila, Amandinha, Nairom, Alberon, Jorge, Rubens, Gabriel, Ana Paula, Amanda Aliança, Janderson, Anderson, Flávia, Catarina e Fernanda.

A minha amiga Karla Ribeiro, companheira de forró e de experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica do LIKA, pela colaboração para a realização do processamento e análise das amostras.

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

À secretaria do PPGCF, que sempre atendeu às minhas solicitações com muita simpatia e presteza.

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

Aos amigos do Departamento de Antibióticos, por toda amizade e torcida durante essa trajetória.

Aos amigos Fátima, Marcela, Luiz Carlos e Gláucia, do setor de Microbiologia do DANTI, por todo incentivo durante esses quatro anos.

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

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada!!

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença potencialmente fatal, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Os medicamentos usualmente utilizados para o tratamento da enfermidade apresentam incômoda via de administração, efeitos tóxicos severos e algumas cepas já possuem resistência aos fármacos convencionais. Esse fato faz com que a busca por novas alternativas terapêuticas, mais eficazes e menos tóxicas, seja de grande importância. As tiazolidinas e as tiossemicarbazonas são grupos de moléculas que possuem uma diversa lista de atividades biológicas relatadas na literatura, em especial ação contra diversas parasitoses. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi desenvolver e avaliar o potencial leishmanicida de novos derivados tiazolidínicos e tiossemicarbazonas. Reações como *N*-alquilação, tionação e condensação foram utilizadas para a síntese das moléculas as quais foram caracterizadas e avaliadas quanto a sua citotoxicidade em macrófagos J774 e quanto a sua ação inibitória frente a formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum*. Foram também realizadas análises ultraestruturais e morfológicas, dosagem de óxido nítrico (ON), além da determinação do índice de seletividade. As moléculas testadas apresentaram resultados distintos, com valores de CC₅₀ que variaram de 8,52 ± 1,36 µM a 126,83 ± 8,85 µM e valores de IC₅₀ para promastigotas que variaram de 0,42 ± 0,12 µM a 142,43 ± 1,02 µM e com aumento significativo na produção de ON. O derivado tiazolidínico GQS-90 foi considerado o mais promissor por possuir o melhor índice de seletividade, e apresentou nas análises de microscopia eletrônica, alterações morfológicas que acarretaram a inviabilidade celular. Esse composto mostrou-se também ativo contra formas amastigotas de *L. infantum*, no entanto estudos mais aprofundados são necessários a fim de esclarecer o mecanismo de ação do composto. Assim foi possível concluir que o derivado GQS-90 apresentou a maior eficácia antiparasitária, sendo um possível candidato a fármaco leishmanicida.

Palavras-chave: Leishmaniose. Tiazolidina. Tiossemicarbazona. Citotoxicidade. Óxido nítrico. Microscopia eletrônica.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a life-threatening disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Medicines currently used to treat illness are detected via administration, severe toxic effects and some strains are already subject to environmental damage. This fact makes the search for new, more difficult and less toxic therapeutic alternatives, of great importance. As thiazolidines and thiosemicarbazones are groups of molecules that have a diverse list of biological activities related to the literature, in a special action against various parasites. Thus, the objective of this work was to develop and evaluate the leishmanicidal potential of new thiazolidine derivatives and thiosemicarbazones. Reactions such as N-alkylation, condensation and condensation were used for molecule samples which were characterized and evaluated for their cytotoxicity in J774 macrophages and for their inhibitory action against morphological infantile *Leishmania* promastigotes and amastigotes forms, nitric oxide dosage (ON), in addition to determining the selectivity index. As tested molecules have different results, with CC50 values ranging from $8.52 \pm 1.36 \mu\text{M}$ to $126.83 \pm 8.85 \mu\text{M}$ and IC50 values for promastigotes ranging from $0.42 \pm 0.12 \mu\text{M}$ to $142, 43 \pm 1.02 \mu\text{M}$ and with significant increase in NO production. The thiazolidine derivative GQS-90 was considered or more promising for using the best selectivity index, and exhibited in electron microscopy analyzes, morphological changes that affect cell unfeasibility. This compound was also active against amastigote forms of *L. infantum*, however, further studies are needed for clarification or compound action mechanism. Thus, it was possible to conclude that GQS-90 had the highest antiparasitic effect, being a possible candidate for leishmanicidal drug.

Keywords: Leishmaniasis. Thiazolidine. Thiosemicarbazone. Cytotoxicity Nitric oxide. Electron microscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Mapas de distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral.....	21
Figura 2 –	Casos de leishmaniose visceral, segundo países com maior ocorrência de casos, Américas, 2001-2017.....	22
Figura 3 –	Distribuição dos casos de Leishmaniose visceral nos estados brasileiros entre os anos de 2013 e 2017.....	23
Figura 4 –	Distribuição dos casos de Leishmaniose visceral em Pernambuco entre os anos de 2013 e 2017.....	24
Figura 5 –	Posição taxonômica da espécie <i>Leishmania infantum</i>	26
Figura 6 –	Forma promastigota (A) e amastigota (B) de <i>L. infantum</i>	26
Figura 7 –	Representação esquemática da forma promastigota de <i>L. infantum</i>	27
Figura 8 –	Representação esquemática da forma amastigota de <i>L. infantum</i>	28
Figura 9 –	Fêmea de <i>Lutzomyia longipalpis</i> exercendo hematofagia.....	30
Figura 10 –	A raposa e o cão, hospedeiros da LV.....	32
Figura 11 –	Criança com LV apresentando sintomas da doença.....	33
Quadro 1 –	Resumo do tratamento de LV com antimoniato de N-metil glucamina.....	35
Quadro 2 –	Resumo do tratamento de LV com anfotericina B lipossomal.....	36
Quadro 3 –	Resumo do tratamento de LV com desoxicolato de anfotericina B.....	37
Figura 12 –	Estrutura química do estibogluconato de sódio.....	39
Figura 13 –	Estrutura química do antiomoniato de N-metilglucamina.....	39
Figura 14 –	Estrutura química da anfotericina B.....	41
Figura 15 –	Estrutura química da pentamidina.....	43
Figura 16 –	Estrutura química da mltefosina.....	45
Figura 17 –	Estrutura química da paromomicina.....	46

Quadro 4 –	Novos compostos leishmanicidas descritos na literatura.....	49
Figura 18 –	Esquema de síntese da TZD, a partir da tiouréia e do ácido monocloroacético.....	51
Figura 19 –	Reatividade do núcleo da tiazolidina-2,4-diona.....	51
Quadro 5 –	Atividades biológicas descritas na literatura para as tiazolidinas.....	52
Figura 20 –	Representação geral das tiossemicarbazonas.....	55
Quadro 6 –	Atividades biológicas descritas na literatura para as tiossemicarbazonas.....	56
Figura 21 –	Representação dos compostos tiazolidínicos (GQS e GQ) e da tiossemicarbazona (JF).....	59
Esquema 1 –	Rota sintética para obtenção dos derivados tiazolidínicos (LQIT/GQS e LQIT/GQ).....	63
Esquema 2 –	Rota sintética para a obtenção das tiossemicarbazonas.....	64
Figura 22 –	Nitrocompostos de destaque na terapêutica antiparasitária...	85
Figura 23 –	Inibição causada pelo GQS-90 no crescimento de promastigotas de <i>L. infantum</i> no decorrer das 72 horas de tratamento.....	86
Figura 24 –	Resultado da dosagem de NO de macrófagos tratados com derivados das séries LQIT/GQS e LQIT/GQ.....	91
Figura 25 –	Eletromicrografia de promastigotas de <i>L. infantum</i> não tratadas e tratadas com o derivado GQS-90.....	93
Figura 26 –	Eletromicrografia de promastigotas de <i>L. infantum</i> não tratadas e tratadas com o derivado GQS-90.....	95
Figura 27 –	Índice de sobrevivência de amastigotas de <i>L. infantum</i> em macrófagos após tratamento com GQS-90.....	97
Figura 28 –	Macrófagos J774 infectados com <i>L. infantum</i> não tratados e tratados com o GQS-90.....	99
Figura 29 –	Resultado da dosagem de NO de macrófagos infectados por <i>L. infantum</i> tratados com o compostos GQS-90.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Efeito citotóxico dos derivados sobre macrófagos J774.....	79
Tabela 2 –	Atividade leishmanicida <i>in vitro</i> dos novos derivados sobre promastigotas de <i>L. infantum</i>	81
Tabela 3 –	Resultados obtidos de IC ₅₀ , CC ₅₀ e IS dos derivados das séries GQS, GQ e JF.....	88
Tabela 4 –	Ação citotóxica, leishmanicida e índice de seletividade para forma amastigota de <i>L. infantum</i> tratada com o GQS-90.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amb	Anfotericina B
DMSO	Dimetilsulfóxido
DQF	Departamento de Química Fundamental
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IS	Índice de seletividade
IV	Infra-vermelho
LBCM	Laboratório de Biologia Celular e Molecular
LAVITE	Laboratório de Virologia e Terapia Experimental
LQIT	Laboratório de Química e Inovação Terapêutica
LV	Leishmaniose Visceral
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RMN	Ressonância magnética nuclear

SINAN	Sistema de Informações de Agravos e Notificações
SUS	Sistema Único de Saúde
TSC	Tiossemicarbazona
TZD	Tiazolidina
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivo Geral	18
1.1.2	Objetivos Específicos.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	20
2.2	AGENTE ETIOLÓGICO.....	25
2.3	BIOLOGIA CELULAR DE <i>Leishmania</i> spp.....	27
2.4	VETORES E RESERVATÓRIOS.....	30
2.5	ASPECTOS CLÍNICOS E SINTOMAS.....	32
2.6	TRATAMENTO.....	35
2.6.1	Antimoniais pentavalentes.....	39
2.6.2	Anfotericina B.....	41
2.6.3	Fármacos alternativos.....	42
2.6.3.1	Pentamidina.....	43
2.6.3.2	Miltefosina.....	44
2.6.3.3	Paromomicina.....	45
2.7	NOVOS COMPOSTOS LEISHMANICIDAS.....	47
2.8	IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DAS TIAZOLIDINAS.....	50
2.9	IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DAS TIOSSEMICARBAZONAS.....	55
3	MÉTODOLOGIA.....	59
3.1	ESTUDO QUÍMICO.....	59
3.1.1	Caracterização Estrutural.....	60
3.1.2	Reagentes e Solventes.....	60
3.1.3	Procedimento de síntese do 3-(benzil)-tiazolidina-2,4- diona.....	60
3.1.4	Procedimento de síntese da 3-(benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2- ona.....	61
3.1.5	Síntese dos derivados 5-(indol-3-il-metilano)-4-tioxo-tiazolidin-	

	2-onas.....	61
3.1.6	Síntese dos derivados 5-(indol-3-il-metilano)-tiazolidin-2,4-dionas.....	62
3.1.7	Procedimento para a síntese das tiossemicarbazidas.....	62
3.1.8	Procedimento para síntese das tiossemicarbazonas.....	62
3.1.9	Rota Sintética.....	63
3.2	ESTUDO BIOLÓGICO.....	64
3.2.1	Cultivo dos parasitos.....	64
3.2.2	Atividade biológica em <i>Leishmania infantum</i>	64
3.2.3	Análise da citotoxicidade dos compostos em macrófagos.....	65
3.2.4	Análise da produção de óxido nítrico.....	65
3.2.5	Atividade biológica <i>in vitro</i> sobre as formas amastigotas intracelulares.....	66
3.2.6	Análise ultraestrutural de promastigotas de <i>L. infantum</i>	66
3.2.7	Análise Estatística.....	67
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.1	QUÍMICA.....	68
4.1.1	Moléculas obtidas.....	69
4.1.1.1	Série LQIT/GQS.....	69
4.1.1.2	Série LQIT/GQ.....	72
4.1.1.3	Série LQIT/JF.....	74
4.2	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.....	77
4.2.1	Análise da citotoxicidade dos compostos em macrófagos J774.....	77
4.2.2	Atividade biológica em promastigotas de <i>L. infantum</i>	80
4.2.3	Determinação do índice de seletividade (IS).....	87
4.2.4	Dosagem de óxido nítrico.....	89
4.2.5	Análise morfológica e ultraestrutural.....	92
4.2.6	Atividade biológica em amastigota intracelular de <i>L. infantum</i>	96

5	CONCLUSÕES.....	101
	REFERÊNCIAS.....	102

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma enfermidade que encontra-se inserida no grupo das Doenças Tropicais Negligenciadas, e é considerada uma das prioridades desse grupo para a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma vez que ocorre nos países mais pobres e atinge as populações mais vulneráveis e com difícil acesso aos serviços de saúde (OMS, 2019).

Dentre os diversos tipos de Leishmanioses, destaca-se a Leishmaniose Visceral (LV), doença infecciosa de caráter zoonótico de grande importância para a saúde pública, de ocorrência mundial, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil. É uma doença de caráter crônico, grave, com altas taxas de letalidade quando não tratada (AGUIAR; RODRIGUES, 2017).

No Brasil, o processo de expansão da doença nas últimas décadas intensificou-se face aos fatores ambientais (desflorestamento), socioeconômico e a ocupação desordenada na periferia das cidades. Na última década já foram registrados diversos casos de LV na região metropolitana de várias capitais brasileiras (CARDIM *et al.*, 2016; SILVEIRA *et al.*, 2016).

O leque terapêutico para o tratamento da LV é limitado. A escolha da medicação para o tratamento baseia-se na presença de comorbidades, gravidade clínica e no perfil de efeitos colaterais (AGUIAR; RODRIGUES, 2017). Os fármacos disponibilizados pelo Ministério da Saúde do Brasil para o tratamento da doença são o antimoniato de meglumina e a anfotericina B (desoxicolato e lipossomal) (BRASIL, 2016). Esses medicamentos podem apresentar bons resultados em alguns modelos experimentais, mas ainda existem grandes limitações, tais como dificuldade de administração, duração do tratamento, toxicidade, custo e crescente resistência dos parasitos aos medicamentos (MEDDEB-GARNAQUI *et al.*, 2010; KAUR *et al.*, 2011; ARONSON *et al.*, 2016).

Diante de sua distribuição mundial, importância em Saúde Pública e a ausência de terapêuticas que permitam um tratamento totalmente eficiente e confortável ao paciente, torna-se de extrema importância a pesquisa de novas alternativas terapêuticas, que sejam mais eficazes e menos tóxicas.

As tiazolidinas constituem uma importante classe de compostos cíclicos na química orgânica com amplo espectro de atividades biológicas promissoras já descritas, em especial atividades antiparasitárias como esquistossomicida (SANTIAGO *et al.*, 2014, OLIVEIRA *et al.*, 2015), anti-*T. cruzi* (MOREIRA *et al.*, 2013; CORRÊA *et al.*, 2016) e antimalárica (SOLOMON *et al.*, 2013).

Outra classe de compostos bastante estudada são as tiossemicarbazonas. Na literatura, diversas atividades são associadas a esses compostos, com destaque para a ação inibitória contra tripanossomatídeos das espécies *T. cruzi* e *T. brucei* (K POTIN, *et al.*, 2016; MAIA *et al.*, 2017), *Leishmania amazonensis* (MELOS *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2017) e *Leishmania major* (PERVEZ *et al.*, 2014).

Decorridas várias décadas de estudos relativos a essa parasitose, ainda não existe tratamento realmente eficaz e atóxico. Neste cenário, torna-se importante o desenvolvimento e estudo de novos compostos que possam atuar como drogas contra a LV (MICHELETTI; BEATRIZ, 2012). Considerando o grande potencial biológico antiparasitário das tiazolidinas e das tiossemicarbazonas, o Laboratório de Química e Inovação Terapêutica vem enfatizando seus projetos na busca de novos derivados dessas classes, avaliando o potencial leishmanicida desses compostos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar o potencial leishmanicida de novos derivados tiazolidínicos e tiossemicarbazonas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar os novos derivados heterocíclicos tiazolidínicos e tiossemicarbazonas e caracterizar as estruturas químicas dos compostos;
- Analisar a citotoxicidade dos derivados sobre macrófagos J774 e determinar a CC_{50} de cada composto;

- Avaliar os efeitos dos derivados sobre o crescimento de promastigotas de *L. infantum* e determinar a IC₅₀ de cada composto;
- Estimar o índice de seletividade dos derivados para as formas promastigotas de *L. infantum*;
- Analisar o efeito dos derivados sobre a produção de óxido nítrico de macrófagos J774;
- Descrever as alterações ultraestruturais e morfológicas em promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto mais seletivo;
- Avaliar o efeito do composto mais seletivo sobre o índice de sobrevivência de amastigotas intracelulares de *L. infantum* e estabelecer a IC₅₀ e o índice de seletividade para essa forma.

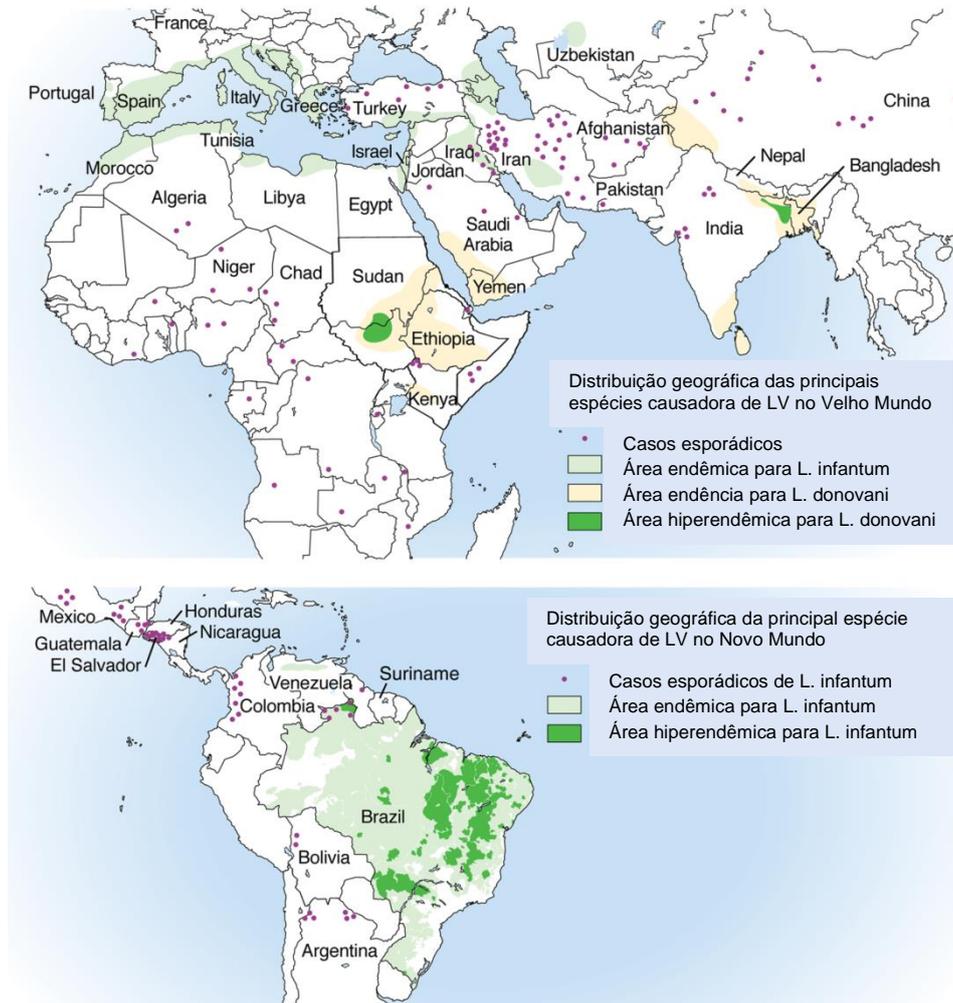
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

No tocante aos aspectos epidemiológicos, a Leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose considerada problema de saúde pública devido a sua magnitude e complexidade clínica, biológica e epidemiológica. A LV afeta predominantemente os mais pobres, sobretudo em países em desenvolvimento, fato que demanda um esforço coletivo e um compromisso compartilhado entre os governos, as organizações, instituições e a sociedade para seu controle (OMS, 2017).

A LV é endêmica em 72 países de áreas tropicais e subtropicais de quatro continentes. Os principais focos de infecção humana estão localizados no sudoeste asiático, no oeste da África e no continente americano (Figura 1). A estimativa da Organização Mundial da Saúde é que surgem 300 mil casos anualmente e que nesse mesmo período, 20 mil pessoas infectadas pela doença venham a óbito. Em 2017, mais de 94% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (OMS, 2019).

Figura 1 - Mapas de distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral

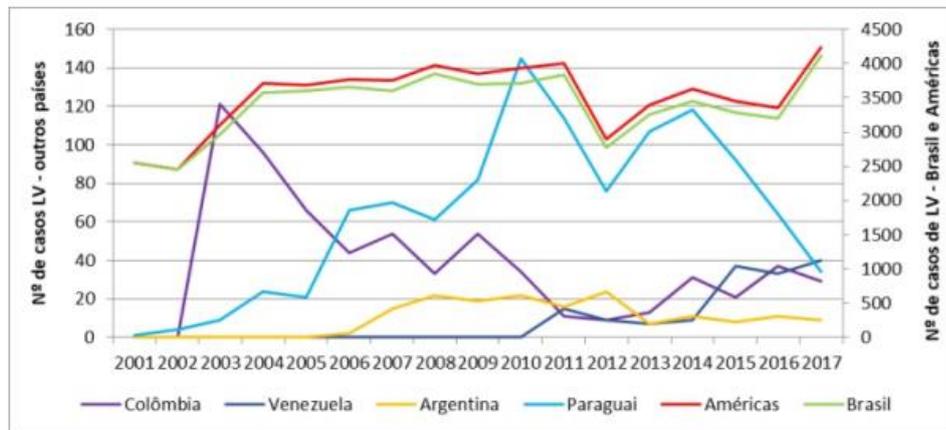


Fonte: Aronson *et al.*, 2016

Nas Américas, os casos humanos de LV estão presentes em 12 países. Em nível regional a LV está classificada em três cenários epidemiológicos: países com transmissão em expansão (Argentina, Brasil e Paraguai), países com transmissão estável ou controlada (Colômbia e Venezuela) e países com transmissão esporádica (Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia, Guiana e México) (OMS, 2017).

No período de 2001 a 2017 foram reportados 59.769 casos de LV humana no continente americano (Figura 2). A grande maior parte dos casos foi reportada no Brasil (96%), no entanto, países localizados ao sul do continente, como Argentina, Colômbia, Paraguai e Venezuela, figuram entre os que tiveram maiores registros de casos (OMS, 2019).

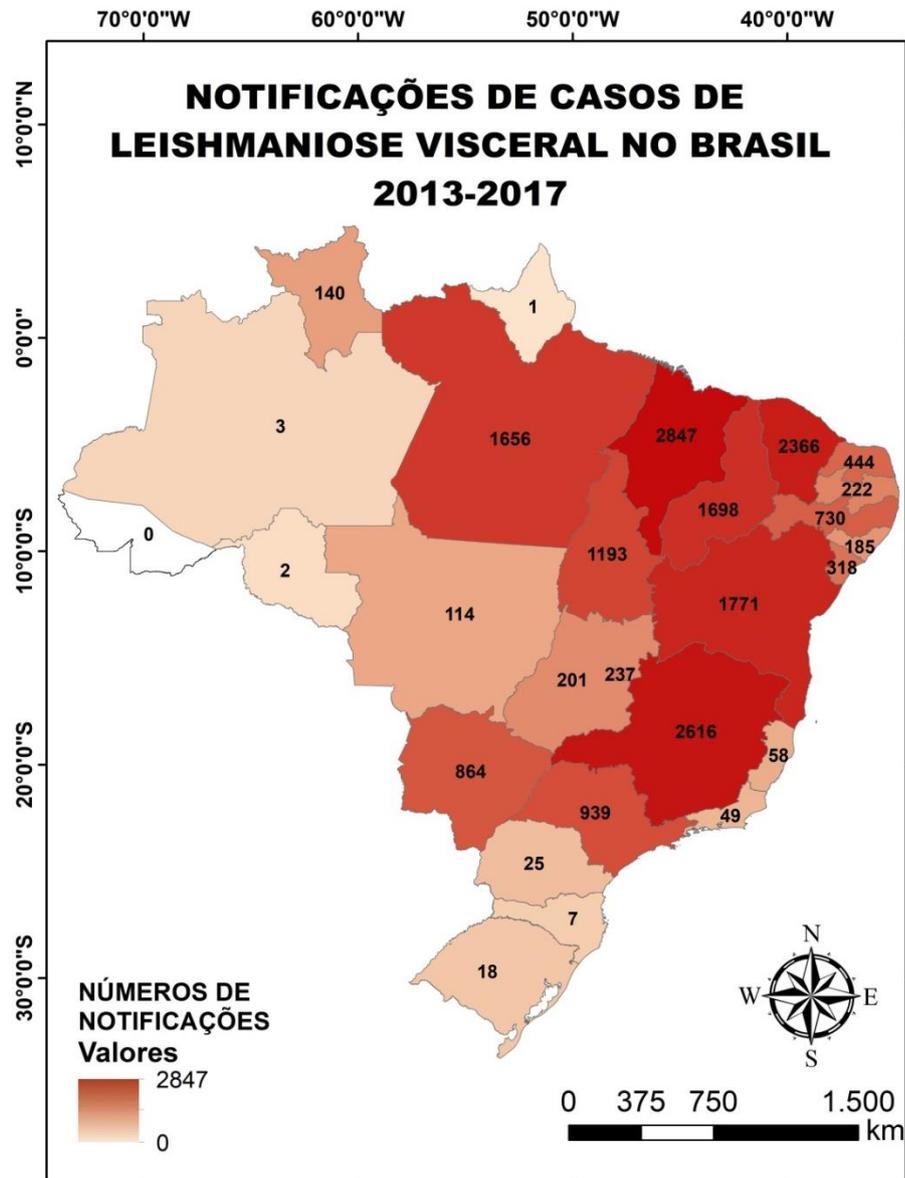
Figura 2 - Casos de leishmaniose visceral, segundo países com maior ocorrência de casos, Américas, 2001-2017



Fonte: OMS, 2019

De acordo com dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde, através do Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN), entre os anos de 2013 a 2017, os estados brasileiros mais afetados pela LV foram: Maranhão, Ceará, Bahia e Minas Gerais (Figura 3).

Figura 3 - Distribuição dos casos de Leishmaniose visceral nos estados brasileiros entre os anos de 2013 e 2017.



Fonte: a autora

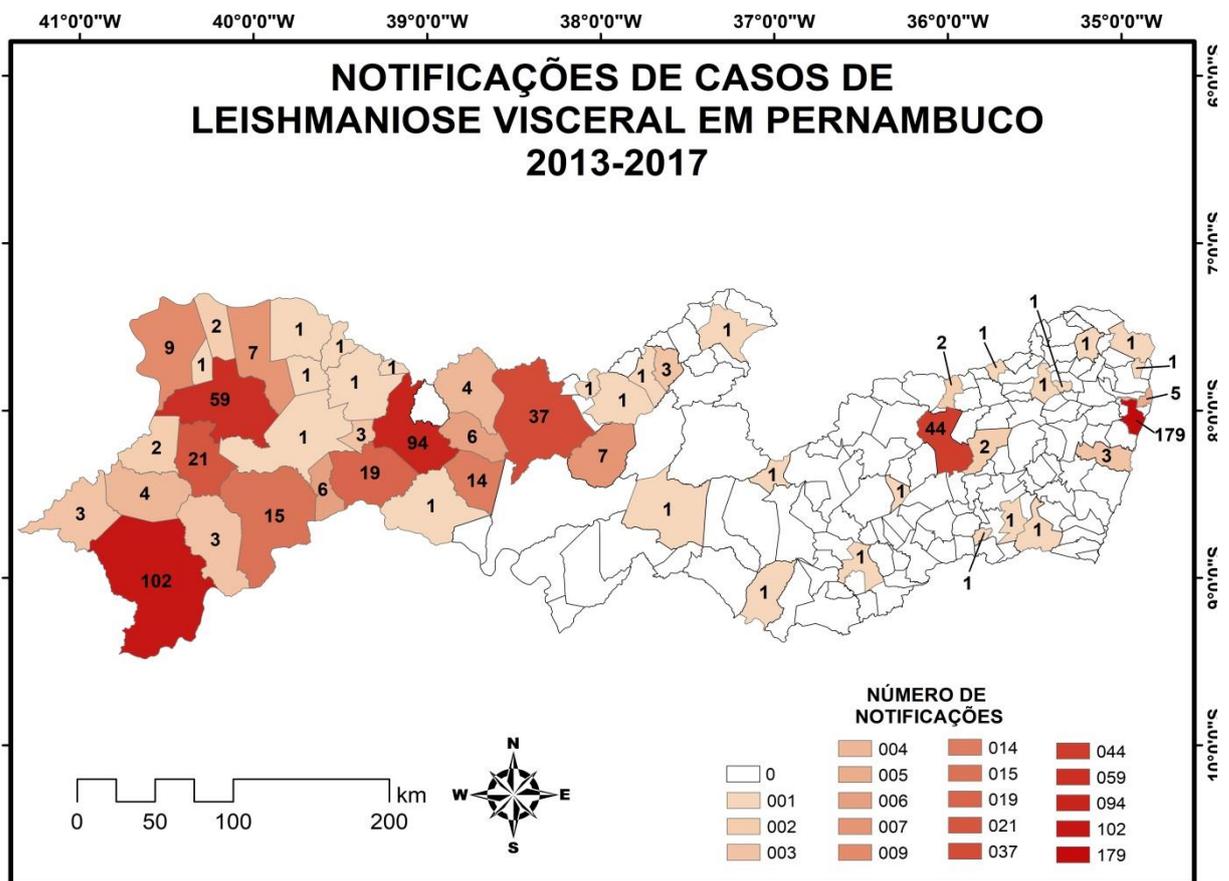
A alta incidência de LV atualmente tem sido relacionada com a urbanização da doença, observada a partir da década de 80. Essa expansão encontra-se intimamente ligada ao êxodo rural, expansão das favelas, gerando péssimas condições de saneamento básico associado às características socioeconômicas, conscientização da população exposta, deficiência no controle dos vetores e da

população canina errante (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; RONDON NETO *et al.*, 2011).

Um aspecto preocupante é a co-infecção LV-HIV, a qual pode ser considerada um problema emergente no Brasil, devido à distribuição geográfica crescente da doença, dificuldades no diagnóstico e tratamento e altos índices de mortalidade (MARTINS-MELO *et al.*, 2014).

A Figura 4 apresenta o mapa com o acumulado de casos de LV na série histórica de 2013 a 2017 nos municípios do estado de Pernambuco.

Figura 4 - Distribuição dos casos de Leishmaniose visceral em Pernambuco entre os anos de 2013 e 2017.



Fonte: a autora

Com os dados obtidos pelo SINAN (2019) percebe-se que a LV se apresenta amplamente distribuída em todas as mesorregiões do estado, com destaque para municípios do sertão pernambucano, como Petrolina, Salgueiro, bem como para o

município de Caruaru, no Agreste do estado. É possível observar também a expansão da doença para a região metropolitana do estado, uma vez que a capital, Recife, registrou o maior número de casos acumulados no período analisado.

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

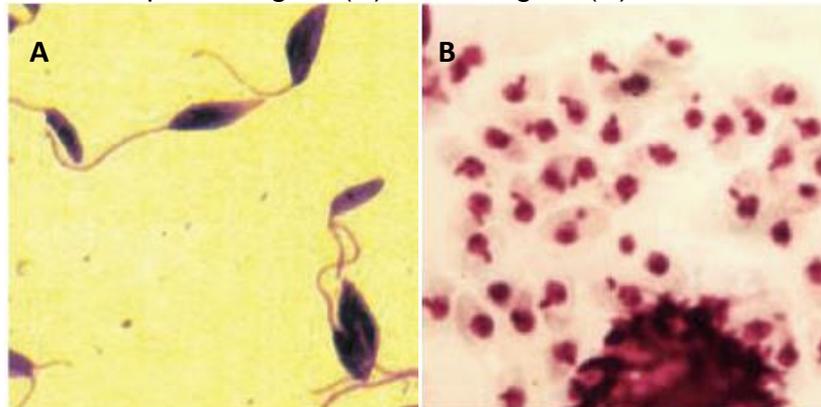
A leishmaniose é causada por protozoários heteroxênico, da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (COLOMBO *et al.*, 2011). Existem cerca de 300 espécies de *Leishmania* spp., sendo que desse total cerca de 20 espécies estão relacionadas com doenças parasitárias. Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem muitas semelhanças estruturais, o que impede a identificação das espécies com base nas suas características morfológicas. Dessa forma, as espécies de *Leishmania* podem ser diferenciadas, por dados epidemiológicos, manifestações clínicas e também com base nos perfis isoenzimáticos (ROBERTS; JANOVY, 2009; SEIXAS *et al.*, 2011).

As espécies mais importantes do ponto de vista epidemiológico e clínico são: *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (ROBERTS; JANOVY, 2009). Nas Américas, a espécie comumente isolada em pacientes com LV é a *Leishmania infantum*, cuja posição taxonômica está representada na figura 5 (BRASIL, 2017).

Figura 5 - Posição taxonômica da espécie *Leishmania infantum*.**Reino:** Protista**Filo:** Sarcomastigophora**Classe:** Zoomastigophorea**Ordem:** Kinetoplastida**Família:** Trypanosomatidae**Gênero:** *Leishmania***Espécie:** *Leishmania infantum*

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2014

Estes parasitos apresentam formas evolutivas distintas ao longo do seu ciclo de vida, sendo as formas promastigota e amastigotas as de maior interesse. A forma promastigota (Figura 6), encontrada no hospedeiro invertebrado, corresponde ao estágio extracelular; e possui forma losangular adelgada, variam de 10 a 15 μm de comprimento e possuem um longo flagelo móvel na extremidade. Já a forma amastigota (Figura 6) corresponde ao estágio intracelular do parasito, que se reproduzem dentro do sistema fagocítico mononuclear dos mamíferos suscetíveis. A forma amastigota é esférica/ovoide, mede em média de 3 a 6 μm de diâmetro e possui um flagelo interno pouco desenvolvido (TANAKA *et al.*, 2007).

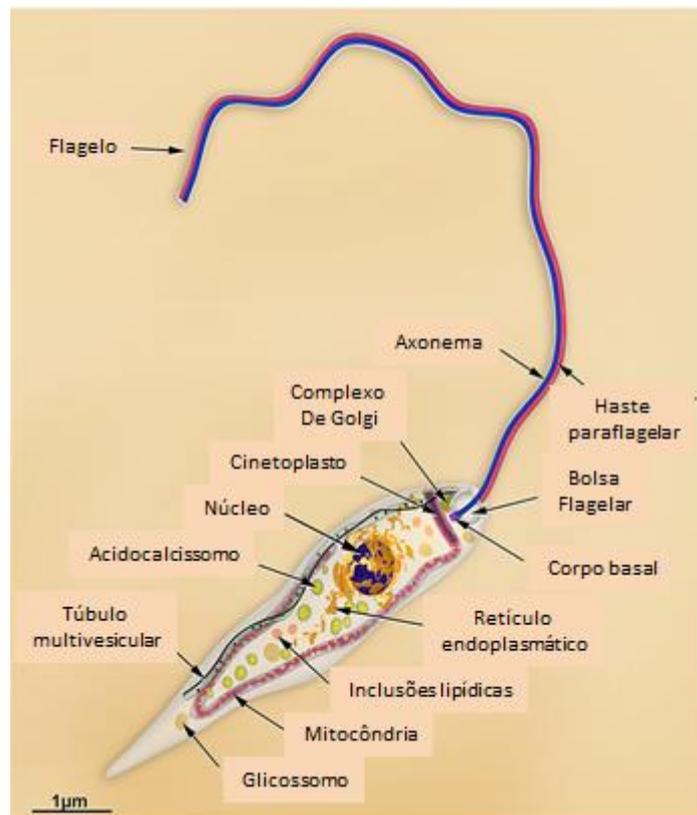
Figura 6 - Forma promastigota (A) e amastigota (B) de *L. infantum*

Fonte: BRASIL, 2014

2.3 BIOLOGIA CELULAR DE *Leishmania* spp.

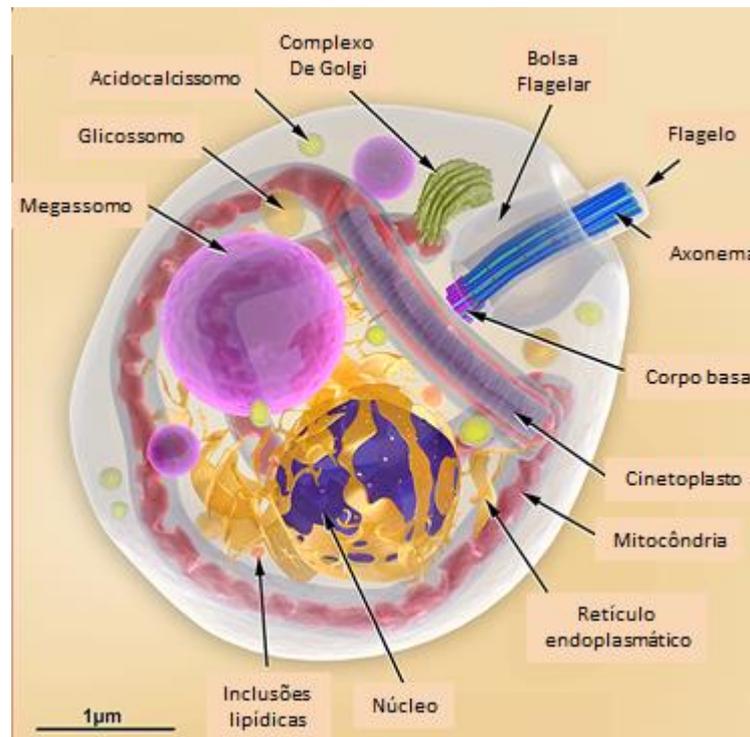
Tanto a forma promastigota (Figura 7), quanto a forma amastigota (Figura 8) apresentam estruturas que são específicas de protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, como o cinetoplasto e o acidocalcissomo e o glicossomo (DE SOUZA, 2008). Nessas organelas são encontradas vias metabólicas únicas que podem ser alvos para o desenvolvimento de novas drogas mais eficazes e seletivas (FIDALGO; GILLE, 2011).

Figura 7 - Representação esquemática da forma promastigota de *L. infantum*.



Fonte: TEIXEIRA *et al.*, 2013

Figura 8 - Representação esquemática da forma amastigota de *L. infantum*.



Fonte: TEIXEIRA *et al.*, 2013

Uma característica importante é que os tripanosomatídeos como o *Trypanosoma cruzi* e as diversas espécies de *Leishmania* possuem uma mitocôndria única, sendo esta responsável por toda geração de energia para manter a célula viva (FIDALGO; GILLE, 2011). Justamente pelo fato de ser uma estrutura unitária, o bom funcionamento desta é de extrema importância para a sobrevivência dos parasitos (MEHTA; SHAHA, 2004).

O cinetoplasto é uma região especializada da mitocôndria, constituída de um aglomerado de moléculas de DNA mitocondrial (k-DNA) dotadas de um complexo mecanismo de replicação (LIU *et al.*, 2005; LAINSON; RANGEL, 2005). O DNA mitocondrial corresponde a 30% do material genético da célula, e é formado por uma rede de moléculas concatenadas entre si: os maxicírculos e os minicírculos. Estima-se que 50 maxicírculos e 10.000 minicírculos estejam arranjados entre si formando uma única rede com a matriz do cinetoplasto (SHAPIRO; ENGLUND, 1995)

Os maxicírculos são semelhantes ao DNA mitocondrial dos demais eucariontes, pois codificam RNAs ribossomais e diversas proteínas da cadeia respiratória, as quais estão relacionadas a mecanismos fundamentais para a

manutenção da viabilidade celular, como a transdução de energia. Os minicírculos caracterizam-se por transcreever pequenos RNAs guia, responsáveis pela especificidade da edição dos mRNAs codificados pelos maxicírculos. (SHAPIRO; ENGLUND, 1995; SCHNEIDER, 2001; GLUENZ *et al.*, 2007; SOUZA, 2008; CAVALCANTI *et al.*, 2009).

Os glicossomos estão relacionados a muitos processos celulares, como a beta-oxidação de ácidos graxos, a síntese de éter lipídico e a glicólise, sendo esta última a principal função desta organela (PARSONS *et al.*, 2001; OPPERDOES; COOMBS, 2007). Os acidocalcissomos são organelas ácidas que estocam cálcio, cátions e fósforo, e estão envolvidas em diversos processos biológicos, tais como adaptação dos tripanosomatídeos a condições de estresse ambiental, manutenção da homeostase, manutenção do pH e osmorregulação (DOCAMPO *et al.*, 2005).

A bolsa flagelar surge como uma invaginação da membrana plasmática. Evidências morfológicas e citoquímicas apontam que a bolsa flagelar é uma região de intensa atividade endocítica e exocítica (LANGOUSIS; HILL, 2014). A partir da bolsa flagelar, emerge o flagelo, estrutura característica de todos os membros desse grupo, o qual encontra-se presente em todas as formas evolutivas dos tripanossomatídeos (FRANSOZO; NEGREIROS-FRANSOZO, 2016). O flagelo está envolvido não só na motilidade celular, mas também na interação do parasito com os hospedeios, uma vez que a invasão das células dos hospedeiros, bem como a adesão a superfície de tecidos, são dependentes de interação via flagelo (BASTIN *et al.*, 2000). Além disso, o flagelo participa do processo de divisão celular dos parasitos (ZHOU, HU; LI, 2014).

O flagelo apresenta uma estrutura básica semelhante a outros flagelos, sendo envolvido por uma membrana flagelar e contendo um axonema típico, que apresenta um padrão de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central. Associado ao flagelo deste parasito é encontrado um complexo arranjo de filamentos protéicos, denominado de haste paraflagelar, uma estrutura cristalina que é única dos protistas (ROTUREUA *et al.*, 2009)..

Organelas como o núcleo, retículos endoplasmáticos e complexo de Golgi também estão presentes em *Leishmania*. Esses protozoários possuem ainda membrana plasmática constituída de lipídios, ergosterol, carboidratos e proteínas.

Algumas proteínas de superfície como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína 63 (GP63) conferem proteção ao parasito contra a resposta imune do hospedeiro (SOUZA, 2008).

2.4 VETORES E RESERVATÓRIOS

A leishmaniose apresenta como vetor insetos hematófagos pertencentes à subfamília Phlebotominae (*Phlebotomus* spp. no Velho Mundo e *Lutzomyia* spp. no Novo Mundo) (OMS, 2010). Esses flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, são insetos pequenos, de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, com pernas longas e delgadas e o corpo revestido por pelos. São facilmente reconhecíveis pelo seu comportamento, ao voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas. Geralmente, possuem cor parda, sendo as fêmeas responsáveis pela transmissão da LV (CAMARGO; BARCINSKI, 2003).

A espécie *Lutzomyia longipalpis* (Figura 9) é o principal vetor da LV nas Américas. Essa espécie adapta-se facilmente ao peridomicílio e a variadas temperaturas: pode ser encontrada no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos. A atividade desses insetos é crepuscular e noturna. No intra e peridomicílio, a *L. longipalpis* é encontrada, principalmente, próxima a uma fonte de alimento. Durante o dia, esses insetos costumam manter-se em repouso, em lugares sombreados e úmidos, protegidos do vento e de predadores naturais. Essa espécie é popularmente conhecida como mosquito-palha, tatuquira, birigui, entre outros, dependendo da região geográfica, onde é encontrada (BRASIL, 2017).

Figura 9 - Fêmea de *Lutzomyia longipalpis* exercendo hematofagia



Fonte: SILVEIRA *et al.*, 2016

Em publicações recentes outras espécies de flebotomíneos foram consideradas como possíveis vetores de *L. infantum*, como *Lutzomyia cruzi*, *Lutzomyia evansi* e *Lutzomyia migonei* (RANGEL *et al.*, 2018; MEJÍA *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018). No entanto, ainda são necessários mais estudos a fim de estabelecer a competência vetorial dessas espécies.

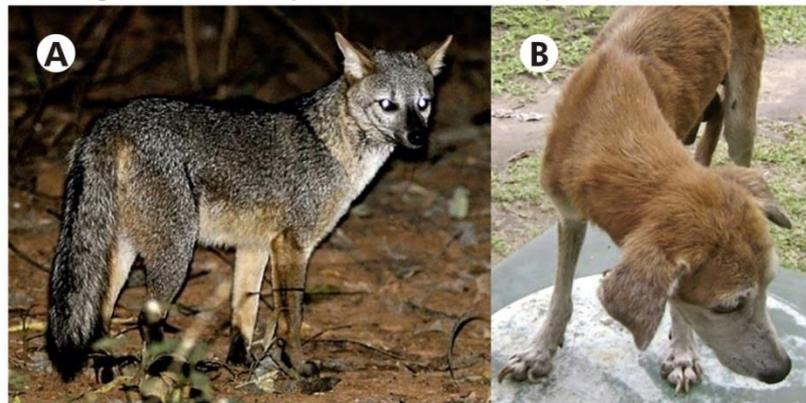
Estudos evidenciam que a expansão da leishmaniose visceral humana no Brasil, seguiu a mesma rota de dispersão de *L. longipalpis* (VIANNA *et al.*, 2016). Nas últimas décadas, verificou-se a expansão e urbanização desse vetor, a partir da adaptação deste aos ambientes urbanos e periurbanos, podendo ser encontrados no peridomicílio, em galinheiros, chiqueiro, canil, paiol, entre outros ambientes e também no intradomicílio (BRASIL, 2014).

Os reservatórios naturais são necessários à manutenção da LV nos ambientes rural e urbano. O cão doméstico (*Canis familiaris*) desempenha grande importância na epidemiologia da LV em áreas endêmicas, pois é principal reservatório doméstico da LV; precedendo a maioria dos casos no homem e promovendo a dispersão da doença para áreas não-endêmicas. Em regiões de mata o principal reservatório da doença são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) (FERNANDES *et al.*, 2013; BRASIL, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2016).

A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente que no homem, sendo considerado um grave problema de saúde pública no país (BRASIL, 2017). As atividades de vigilância e controle da LV são geralmente direcionadas para a eutanásia de cães soropositivos, no entanto, estudos sugerem que essas ações como estratégia de controle são ineficazes para a interrupção da transmissão da leishmaniose em cães, em razão da alta taxa de substituição de cães eliminados por outros cães suscetíveis (ABRANTES *et al.*, 2018).

Na Figura 10 é possível observar a raposa (*Cerdocyon thous*), reservatório silvestre de *L. infantum* na natureza, sem apresentar nenhum sinal clínico que evidencie sofrimento pela infecção (A). O cão doméstico (*Canis familiaris*), hospedeiro de *L. infantum*, apresentando vários sinais clínicos que evidenciam sofrimento pela infecção: emagrecimento, onicogribose, descamação e lesões ulcerativas de pele (B) (SILVEIRA *et al.*, 2016).

Figura 10 - A raposa e o cão, hospedeiros da LV



Fonte: SILVEIRA *et al.*, 2016

2.5 ASPECTOS CLÍNICOS E SINTOMAS

A infecção humana por *L. infantum* é uma doença espectral, manifestando-se de três formas clínicas distintas: forma assintomática, forma oligossintomática e forma clássica (LOPEZ-PENA *et al.* 2009).

Nas áreas endêmicas, a forma oligossintomática da doença é a de maior representação e se caracteriza por sintomatologia inespecífica como febre, tosse seca, diarreia, sudorese, baço geralmente palpável e fígado um pouco aumentado. Esse quadro clínico tem duração de 15 dias a 6 meses e frequentemente evolui para cura espontânea (SÃO PAULO, 2003; BRASIL 2014).

Considera-se infectado assintomático o indivíduo residente em área endêmica sem manifestações clínicas que apresentava positividade para os testes diagnósticos para *L. infantum*. Muitas vezes a forma assintomática evolui em alguns meses para a forma clássica (CAVALCANTE *et al.*, 2013).

Com relação a forma clássica da doença, os sintomas irão variar de acordo com o órgão afetado e a carga parasitária no local (LOPEZ-PENA *et al.* 2009). O tropismo que os parasitos apresentam principalmente pelo fígado, baço e medula óssea, e que pode ocorrer também nos rins, pulmão e coração é o responsável pelo aparecimento dos sinais e sintomas que caracterizam a LV (BACELLAR; CARVALHO, 2005; SANTOS, YOSHIOKA; MIYAGUI, 2008).

Febre tipicamente noturna, taquicardia, diarreia, tosse, perda de apetite e de peso são os sinais clínicos iniciais. Após o terceiro mês, surgem outros sintomas, como o aumento do tamanho do fígado e do baço (hepatoesplenomegalia), devido

ao intenso parasitismo e a ocorrência de manifestações hemorrágicas (Figura 12). É frequente também o comprometimento pulmonar na LV, com quadro histopatológico típico de pneumonite intersticial. Os linfonodos, em geral, não aumentam de tamanho, no entanto, exames microscópicos podem evidenciar reatividade dos seios (marginais, intermediários e medulares), com hipertrofia, hiperplasia e parasitismo das células macrófagas. É possível a ocorrência de anormalidades da função renal e um exame macroscópico dos rins revela um aumento de volume e congestão desses órgãos. A desnutrição ocorre com a progressão da doença, podendo manifestar-se por edema periférico, queda de cabelos e alterações de pele e das unhas. A perda de peso, o edema e o estado de debilidade progressiva contribuem para a caquexia e o óbito (PASTORINO *et al.* 2002; PEDROSA; ROCHA, 2004; CHAPPUIS *et al.*, 2007; AGUIAR; RODRIGUES, 2017).

Figura 11 - Criança com LV apresentando sintomas da doença.



Fonte: SILVEIRA *et al.*, 2013

Quando não tratada, a LV quase sempre evolui para óbito. Frequentemente os óbitos são causados por complicações infecciosas ou hemorrágicas. Deve ser considerado grave todo paciente de LV com idade inferior a 6 meses ou superior a 65 anos, desnutrição grave, co-morbidades ou uma das seguintes manifestações clínicas: icterícia, fenômenos hemorrágicos (exceto epistaxe), edema generalizado, sinais de toxemia (letargia, má perfusão, cianose, taquicardia ou bradicardia, hipoventilação ou hiperventilação e instabilidade hemodinâmica). Em pacientes imunossuprimidos, e, pacientes que possuem com-infecção com o HIV, são descritas manifestações clínicas não usuais, ocorrendo comprometimento de trato

gastrointestinal, pulmão e pleura. Porém, nesses casos os sintomas mais comuns são pancitopenia, hepatomegalia e esplenomegalia. Casos de co-infecção de *L. infantum* e HIV apresentam maior taxa de recidiva e maior letalidade (ALVAR *et al.*, 1997; MACHADO *et al.*, 2009; LISBOA *et al.*, 2014; AGUIAR; RODRIGUES, 2017).

2.6 TRATAMENTO

O tratamento da LV deve ser iniciado assim que é estabelecido o diagnóstico. Os severos sintomas e a possibilidade de morte iminente em doentes com manifestações desta parasitose tornam de máxima importância a formulação e utilização de terapias eficazes, e de ação rápida (BRASIL, 2014).

O tratamento da LV engloba terapêutica específica e medidas adicionais, como hidratação, antitérmicos, antibióticos, hemoterapia e suporte nutricional, além do acompanhamento de exames laboratoriais e eletrocardiográficos (BRASIL, 2017).

O Ministério da Saúde disponibiliza o tratamento através do Sistema Único de Saúde (SUS). Recomenda-se o antimoniato de N-metil glucamina como fármaco de primeira escolha para o tratamento da LV, exceto em algumas situações, nas quais a anfotericina B, especialmente em sua formulação lipossomal, é apresentada como fármaco de primeira linha (BRASIL, 2016).

Em novembro de 2013, o Ministério da Saúde definiu e ampliou os critérios de indicação da anfotericina B lipossomal para o tratamento de pacientes com leishmaniose visceral. Essa ampliação foi uma mudança necessária, visando garantir uma maior segurança no tratamento dos pacientes de LV dos grupos com maior risco de morte. A lista de indicações para utilização da anfotericina B lipossomal inclui pacientes que atendam a pelo menos um dos critérios a seguir: idade menor que 1 ano; idade maior que 50 anos; insuficiência renal; insuficiência hepática; insuficiência cardíaca; hipersensibilidade ao antimonial pentavalente; infecção pelo HIV; comorbidades que comprometem a imunidade; uso de medicação que compromete a imunidade; falha terapêutica ao antimonial pentavalente; gestantes. Nas situações em que o paciente apresente falha terapêutica ao antimonial pentavalente e não se enquadre em nenhum dos critérios de indicação

para utilização da anfotericina B lipossomal, poderá ser adotado como alternativa terapêutica o desoxicolato da anfotericina B (BRASIL, 2016).

Os quadros 1, 2 e 3 trazem o resumo do tratamento de leishmaniose visceral com antimoniato de N-metil glucamina, com a anfotericina B lipossomal e com o desoxicolato de anfotericina B, respectivamente.

Quadro 1 - Resumo do tratamento de LV com antimoniato de N-metil glucamina

Apresentação	Ampolas de 5 mL contendo 1500 mg (300 mg/mL) de antimoniato de N-metil glucamina, equivalentes a 405 mg (81 mg/mL de antimônio pentavalente (Sb +5))
Dose e via de aplicação	20mg/Sb+5/kg/dia, por via endovenosa ou intramuscular, uma vez ao dia, por no mínimo 20 e no máximo 40 dias. A dose prescrita refere-se ao antimônio pentavalente (Sb+5). Dose máxima de 3 ampolas ao dia
Administração	Endovenosa ou intramuscular. Administrar preferencialmente por via endovenosa lenta. A dose poderá ser diluída em soro glicosado a 5% (100mL) para facilitar a infusão endovenosa
Eventos adversos	Artralgias, mialgias, inapetência, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, dor no local da aplicação, febre, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e pancreatite
Recomendações	Monitorar enzimas hepáticas, função renal, amilase e lipase sérica Em pacientes com idade maior que 40 anos ou que tenham antecedentes familiares de cardiopatia, deve-se realizar eletrocardiograma no início, durante (semanalmente) e ao final do tratamento para monitorar o intervalo QT corrigido, arritmias e achatamento da onda T

Fonte: BRASIL, 2016

Quadro 2 - Resumo do tratamento de LV com anfotericina B lipossomal

Apresentação	Frasco/ampola com 50mg de anfotericina B lipossomal liofilizada
Dose e via de aplicação	3mg/kg/dia, durante 7 dias, ou 4mg/kg/dia, durante 5 dias em infusão venosa, em uma dose diária
Diluição	Reconstituir o pó em 12mL de água estéril para injeção, agitando vigorosamente o frasco por 15 segundos, a fim de dispersar completamente a anfotericina B lipossomal. Obtém-se uma solução contendo 4mg/mL de anfotericina B lipossomal. Essa solução pode ser guardada por até 24 horas à temperatura de 2°C a 8°C. Rediluir a dose calculada na proporção de 1mL (4mg) de anfotericina B lipossomal para 1mL a 19mL de soro glicosado a 5%. A concentração final será de 2mg a 0,2mg de anfotericina B lipossomal/mL. A infusão deverá ser iniciada em, no máximo, 6 horas após a diluição final
Tempo de infusão	30 a 60 minutos
Eventos adversos mais frequentes	Febre, cefaleia, náusea, vômitos, tremores, calafrios e dor lombar
Recomendações	A anfotericina B lipossomal deve ser mantida sob refrigeração (temperatura de 2°C a 8°C) e protegida contra a exposição à luz. Esses cuidados não são necessários durante o período de infusão. Monitorar função renal, potássio e magnésio séricos. Repor potássio, quando indicado. Seguir as orientações quanto à diluição e ao tempo de infusão. Em caso de eventos adversos durante a infusão do medicamento, administrar antitérmicos ou anti-histamínicos meia hora antes da

	infusão, evitando o uso de ácido acetilsalicílico Na disfunção renal, com níveis de creatinina duas vezes acima do maior valor de referência, o tratamento deverá ser suspenso por 2 a 5 dias e reiniciado em dias alternados, quando os níveis de creatinina diminuïrem
--	--

Fonte: BRASIL, 2016

Quadro 3 - Resumo do tratamento de LV com desoxicolato de anfotericina B.

Apresentação	Frasco com 50mg de desoxicolato sódico de anfotericina B liofilizada
Dose e via de aplicação	1mg/kg/dia por infusão venosa, durante 14 a 20 dias A decisão quanto à duração do tratamento deve ser baseada na evolução clínica, considerando a velocidade da resposta e a presença de comorbidades Dose máxima diária de 50 mg
Diluição	Reconstituir o pó em 10mL de água destilada para injeção. Agitar o frasco imediatamente até que a solução se torne límpida. Essa diluição inicial tem 5mg de anfotericina B/mL e pode ser conservada à temperatura de 2°C a 8°C e protegida da exposição luminosa por, no máximo, uma semana, com perda mínima de potência e limpidez. Para preparar a solução para infusão, é necessária uma nova diluição. Diluir cada 1mg (0,2mL) de anfotericina B da solução anterior em 10mL de soro glicosado a 5% A concentração final será de 0,1mg/mL de anfotericina B
Tempo de infusão	2 a 6 horas
Eventos adversos mais frequentes	Febre, cefaleia, náuseas, vômitos, hiporexia, tremores, calafrios, flebite, cianose, hipotensão, hipopotassemia, hipomagnesemia e alteração da função renal
Recomendações	A anfotericina B deve ser mantida sob refrigeração

	<p>(temperatura de 2°C a 8°C) e protegida da exposição à luz. Esses cuidados não são necessários durante o período de infusão (GR-A) Monitorar função renal, potássio e magnésio séricos (GR-A) Repor potássio quando indicado. Seguir as orientações quanto à diluição e ao tempo de infusão Em caso de eventos adversos durante a infusão do medicamento, administrar antitérmicos ou antihistamínicos meia hora antes da infusão, evitando o uso de ácido acetilsalicílico Na disfunção renal, com níveis de creatinina acima de duas vezes o maior valor de referência, o tratamento deverá ser suspenso por 2 a 5 dias e reiniciado em dias alternados, quando os níveis de creatinina reduzirem</p>
--	---

Fonte: BRASIL, 2016

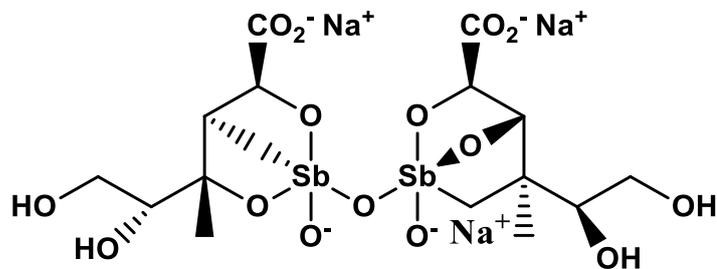
As opções de tratamento disponíveis para essa doença têm problemas relacionados à eficácia, alta toxicidade, dolorosa via de administração e custos; tornando o tratamento uma questão complexa. Também já se verificam problemas de resistência. O surgimento de cepas resistentes aos medicamentos comumente utilizados é o maior desafio para o manejo da LV, nas áreas nas quais esses parasitos se apresentam de forma endêmica (VERONICA *et al.*, 2019)

O tratamento ideal para LV seria um medicamento administrado por via oral, 100% eficaz, em dose única, não sujeito ao desenvolvimento de resistência, de excelente potencial leishmanicida, baixa toxicidade, sem efeitos colaterais e com baixo custo e que pudesse ser utilizado em populações vulneráveis, em especial pacientes imunodeprimidos. Nenhum dos medicamentos até agora utilizados cumprem todos esses critérios. Pelo desinteresse das companhias farmacêuticas, são poucos os fármacos desenvolvidos para o tratamento das doenças negligenciadas, e em especial da leishmaniose. Face ao exposto, verifica-se que a LV visceral conta com um limitado leque de opções terapêuticas (MICHELETTI; BEATRIZ, 2012; ARONSON *et al.*, 2016, VERONICA *et al.*, 2019).

2.6.1 Antimoniais Pentavalentes

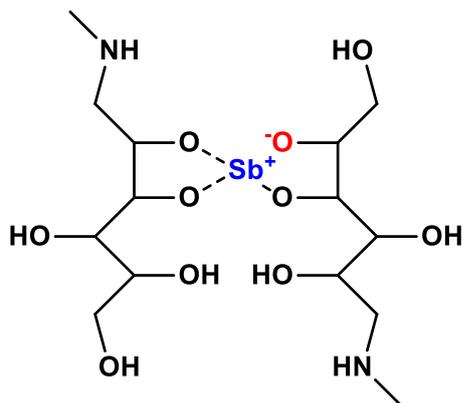
As terapêuticas baseadas em antimônio pentavalente passaram a constituir o tratamento padrão para a leishmaniose visceral a partir de 1945. Os antimoniais para o tratamento da LV são encontrados comercialmente como o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) (Figura 12) utilizado nos EUA e na Europa e o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime[®]) (Figura 13), este último mais comumente prescrito na África e América Latina, incluindo o Brasil (LIMA *et al.*, 2007; BRASIL, 2014).

Figura 12 - Estrutura química do estibogluconato de sódio



Fonte: LIMA *et al.*, 2017

Figura 13 - Estrutura química do antimoniato de N-metilglucamina



Fonte: LIMA *et al.*, 2017

Apesar de possuírem boa eficácia contra o parasito, os antimoniais pentavalentes causam muitos efeitos adversos e apresentam dolorosa via de administração. Eles têm fraca absorção oral e são administrados por meio de

injeções intramusculares ou intravenosas, em um tratamento que tem duração de 20 a 30 dias (MOORE; LOCKWOOD, 2010; AGUIAR; RODRIGUES, 2017).

Dentre os efeitos colaterais que podem surgir durante o tratamento estão: artralgia, mialgia, perda de peso, náuseas, vômitos, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, hepatite, pancreatite e alta cardiotoxicidade (FREITAS-JÚNIOR *et al.* 2012; CONTI; PINTO-JÚNIOR, 2015)

Há esforços para reduzir a toxicidade e melhorar a biodistribuição desses fármacos, a partir do desenvolvimento de novas formulações fazendo uso de lipossomas e ciclodextrinas (DEMICHELI *et al.*, 2004; SCHETTINI *et al.*, 2006). No entanto, essas formulações ainda são encontradas comercialmente, o que pode estar relacionado à dificuldade em desenvolver uma formulação estável (ROZO; PÉREZ, 2013; BASTOS *et al.*, 2016).

Apesar do tratamento com antimônio permanecer como a base terapêutica na maioria das regiões do globo, as suas limitações com relação à toxicidade e desenvolvimento de cepas resistentes, resultam no uso de medicamentos alternativos, tais como anfotericina B e os seus derivados lipossomais (FRÉZARD *et al.*, 2009; OMS, 2013).

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não foi totalmente esclarecido, e algumas hipóteses são descritas na literatura. Uma dessas hipóteses defende que molécula pentavalente (Sb+5) atua como uma pró-droga que, ao ser convertida em antimonial trivalente (Sb+3), passa a ser ativa e adquire maior toxicidade contra o parasito, interferindo na bioenergética de *Leishmania* sp. (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; BRASIL, 2014).

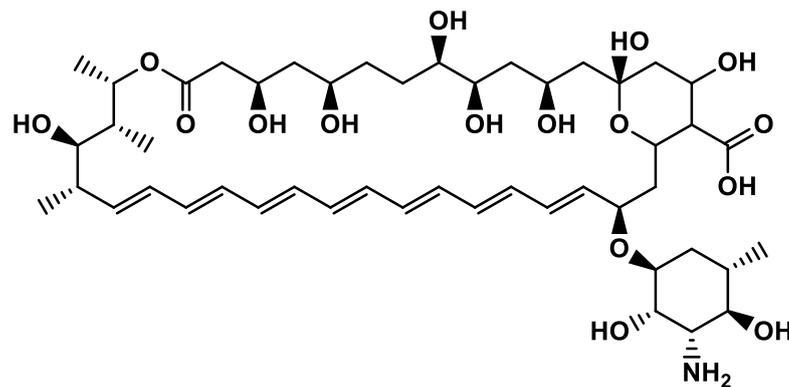
Raychaudhury e colaboradores (2005) descrevem que os antimoniais pentavalentes são capazes de promover a inibição da enzima superóxido dismutase, resultando no aumento do nível de radicais superóxido, e conseqüentemente a morte do parasito. Outros trabalhos relatam que os antimoniais também atuam no nível de DNA, induzindo danos ao DNA in vivo (LIMA *et al.*, 2010). Neste caso, ocorreria uma interferência no metabolismo, através da inibição da topoisomerase do parasito em decorrência da formação de complexos entre o Sb e alguns

nucleotídeos (DEMICHELI *et al.*, 2002). Há possibilidade de que mais de um mecanismo seja responsável pela ativação da droga (LIMA *et al.*, 2007).

2.6.2 Anfotericina B

A anfotericina B (AmB) (Figura 14) é um antimicrobiano da classe dos polienos, isolado pela primeira vez em 1955 de culturas de *Streptomyces nodosus*, a partir de amostras de solo do Rio Orinoco da Venezuela (ARRUDA *et al.*, 2016). Além de ser amplamente utilizado tratamento das infecções fúngicas, é também um antimicrobiano importante para o tratamento da leishmaniose, especialmente em casos de resistência aos antimoniais (RODRIGO *et al.*, 2018).

Figura 14 - Estrutura química da anfotericina B



Fonte: ARRUDA *et al.*, 2016

A baixa solubilidade é uma característica dos antimicrobianos polienos e a AmB é, via de regra, administrada por via intravenosa, misturada com um agente solubilizante como o deoxicolato de sódio. Essa combinação de AmB com deoxicolato de sódio consiste numa formulação bastante utilizada na prática clínica para o tratamento de infecções fúngicas e LV (FALCI; PASQUALOTTO, 2015).

Mesmo considerando a sua eficácia, o tratamento com AmB convencional possui diversos inconvenientes, uma vez que o tratamento obriga à internação do paciente, aumentando os custos do tratamento (SUNDAR; AGARWAL, 2018). A administração ocorre por perfusão e são frequentes os efeitos adversos, como febre e calafrios, devido à própria perfusão; nefrotoxicidade, entre outros (MANSUETO *et al.*, 2014).

Novas associações dessa droga encapsulada em lipossomas foram desenvolvidas para melhorar sua biodisponibilidade e propriedades farmacocinéticas, reduzindo significativamente seu grau de toxicidade. A AmB em lipossoma é incorporada pelo macrófago, praticamente não reagindo com a célula hospedeira, aumentando a eficácia e tolerabilidade da droga (ROBERTS *et al.*, 2003; FREITAS-JÚNIOR *et al.*, 2012). No entanto, a via de administração e o alto custo de formulação deste composto são fatores limitantes para o seu uso, especialmente nos países em desenvolvimento como o Brasil (LIMA *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação da AmB ainda não está completamente elucidado, mas acredita-se que esteja relacionado a efeitos diretos sobre a membrana celular e efeitos intracelulares de indução de estresse oxidativo (MESA-ARANGO *et al.*, 2012).

O efeito na membrana baseia-se numa interação específica com o ergosterol, esteroide constituinte da parede celular fúngica, presente também na membrana celular de alguns protozoários, incluindo os do gênero *Leishmania*. A estrutura poliênica da molécula forma complexos com o ergosterol, causando a formação de poros na membrana, que resultam na perda da integridade dessa estrutura a partir da formação de canais transmembrânicos por onde ocorre rápido extravasamento de potássio e outros íons, ocasionando a morte celular. (LEMKE *et al.*, 2005; CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011; FREITAS-JÚNIOR *et al.*, 2012)

Embora a AmB possua maior afinidade pelo ergosterol, são relatados na literatura efeitos tóxicos produzidos como efeito da ligação do composto ao colesterol e outros constituintes da membrana celular de mamíferos (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

A indução do estresse oxidativo é outro mecanismo de ação importante da AmB e também responsável pelo seu efeito antifúngico e leishmanicida. Estudos demonstram que anfotericina induz o estresse oxidativo celular e o aumento na formação de radicais livres, por vias de ação ainda não completamente conhecidas (MESA-ARANGO *et al.*, 2012).

2.6.3 Fármacos alternativos

Alguns outros fármacos, como a pentamidina, a miltefosina e a paromomicina foram desenvolvidos nas últimas décadas e possuem indicação para o tratamento

da leishmaniose visceral e são utilizadas em outros países, especialmente na Índia e em países africanos e europeus (ARONSON *et al.*, 2016; BASTOS *et al.*, 2016).

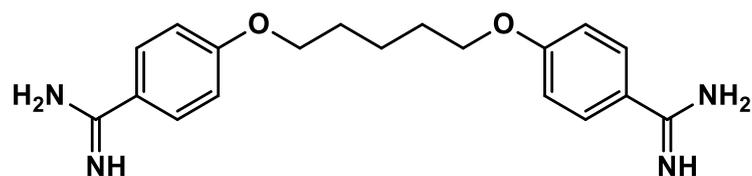
No Brasil, o uso destes fármacos alternativos ainda não é autorizado para o tratamento de LV. No entanto, a terapia combinada para LV tem sido defendida por muitos autores como uma boa alternativa, uma vez que apresenta diversas vantagens em relação à monoterapia, incluindo a redução do tempo de tratamento, resultando na minimização dos efeitos tóxicos; a melhoria da adesão ao tratamento e a diminuição dos custos diretos e indiretos para o sistema de saúde (CONTI; PINTO-JÚNIOR, 2015; BASTOS *et al.*, 2016). Sundar e Agarwal (2018) defendem ainda que a monoterapia não seria o esquema terapêutico ideal, visto que pode aumentar as chances de desenvolvimento de resistência aos fármacos.

Dentre as combinações terapêuticas descritas na literatura estão: antimoniato de meglumina e paromomicina, estibogluconato de sódio e paromomicina, miltefosina e paromomicina, anfotericina B e miltefosina e anfotericina B e paromomicina (MORAIS-TEIXEIRA *et al.*, 2015; RAHMAN *et al.*, 2017; KIMUTAI, *et al.*, 2017 PANDEY *et al.*, 2018).

2.6.3.1 Pentamidina

A pentamidina (Figura 15) é uma diamina que tem sido usada no tratamento da leishmaniose principalmente na Europa e África (BRASIL, 2014). O isotionato de pentamidina, utilizado frequentemente no tratamento e na profilaxia da pneumocistose em pacientes soropositivos para o HIV, foi introduzido como alternativa aos fármacos de primeira linha no tratamento da LV em casos em que os pacientes apresentavam hipersensibilidade, resistência ou falha terapêutica (CONTI; PINTO-JÚNIOR, 2015).

Figura 15 - Estrutura química da pentamidina.



Fonte: MICHELETTI; BEATRIZ, 2012

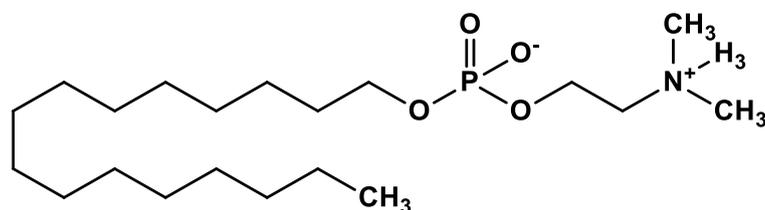
Esse fármaco apresenta boa eficácia, no entanto sua alta toxicidade e suas vias de administração são fatores limitantes para seu uso. A pentamidina pode ser administrada por via parenteral, intramuscular ou intravenosa e apresenta efeitos colaterais severos, como toxicidade renal e hepática, hipoglicemia, problemas cardíacos, pancreatite que pode levar ao aparecimento de diabetes mellitus e, até mesmo morte repentina foram descritas com seu uso (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998; MICHELETTI; BEATRIZ, 2012; BASTOS *et al.*, 2016).

Seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado, mas está possivelmente relacionado a sua atuação sobre o genoma do parasito, dificultando a replicação e transcrição mitocondrial (MISHRA, SAXENA; SINGH, 2007). Basselin e colaboradores (2000) descrevem outra hipótese, na qual é sugerido que este fármaco interfira sobre sistemas de transporte de poliaminas e de importantes biomoléculas envolvidas em vários processos bioquímicos da fisiologia celular.

2.6.3.2 Miltefosina

A miltefosina (Figura 16) é uma alquilfosfocolina que foi desenvolvida e utilizada inicialmente no tratamento do câncer de mama. Entretanto, esse composto foi considerado eficaz também para o tratamento da leishmaniose visceral na Índia (BUFFET, 2011). Em 2002, a miltefosina, foi licenciada na Índia como o primeiro tratamento oral para leishmaniose visceral, incluindo para a infecção por parasitos resistentes aos antimoniais pentavalentes (DORLO *et al.*, 2012).

Figura 16 - Estrutura química da miltefosina



Fonte: BUFFET, 2011

A introdução da miltefosina representa um avanço com relação à terapêutica da leishmaniose, uma vez que todos os outros tratamentos implicavam em

hospitalização ou administração por via parenteral. O fato de esse fármaco possuir biodisponibilidade oral, torna-o uma boa opção para doentes co-infetados pelo HIV, tendo em conta as possíveis complicações que os pacientes infectados pelo vírus podem apresentar, tais como interações medicamentosas (MOORE; LOCKWOOD, 2010; DORLO *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação da miltefosina ainda não é bem compreendido, mas os dados da literatura apontam algumas possibilidades. Khademvatan e colaboradores (2011) apontam que a ação desse fármaco se deva a danos na membrana flagelar do parasito. Em estudo publicado também em 2011, Marinho e colaboradores evidenciaram a miltefosina atuando na indução de apoptose, com externalização de fosfatidilserina e fragmentação de DNA. A miltefosina também mostrou-se atuante na célula hospedeira estimulando a produção de óxido nítrico-sintetase induzível (i-NOS) que catalisa a geração de óxido nítrico (NO) para promover a morte do parasito (WADHONE *et al.*, 2009).

Apesar de todas as vantagens apresentadas acerca do uso da miltefosina, ela é contraindicada em grávidas e nutrízes, devido à sua alta teratogenicidade e poder abortivo. Por esse mesmo motivo, precisa ser usado com precaução em mulheres em idade reprodutiva. Ademais, a utilização desse medicamento pode resultar em complicações gastrointestinais, como diarreia, vômitos e náusea (BASTOS *et al.*, 2016). Acredita-se que esses efeitos adversos se apresentem em decorrência do tempo de meia-vida prolongado que o fármaco apresenta, fato que favorece a formação de cepas de *Leishmania* resistentes (CANUTO *et al.*, 2014)

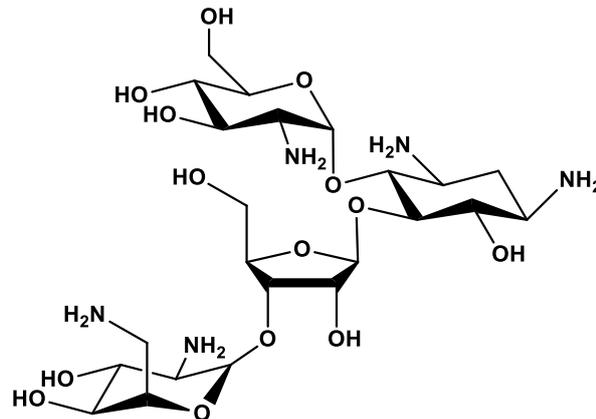
A miltefosina tem sido cada vez mais usada de forma combinada com outros fármacos, como segundo agente, de modo a aumentar a eficácia terapêutica e diminuir resistências (WASUNNA *et al.*, 2016).

2.6.3.3 Paromomicina

A paromomicina (Figura 17) é um aminoglicosídeo com um amplo espectro de atividade contra bactérias gram negativas, algumas bactérias gram positivas, micobactérias, alguns cestodas e protozoários parasitos do gênero *Leishmania* (MOORE; LOCKWOOD, 2010). Dessa forma, é considerada uma alternativa

terapêutica para o tratamento da LV, sobretudo em regimes de combinação com outros fármacos (DORLO *et al.*, 2012).

Figura 17 - Estrutura química da paromomicina



Fonte: MOORE; LOCKWOOD, 2010

Evidências experimentais apontam que a paromomicina altera o potencial da membrana mitocondrial, inibe a síntese protéica através de modificações ribossomais e leva à disfunção respiratória. Também altera a fluidez da membrana e o metabolismo lipídico (JHINGRAN *et al.*, 2009).

A paromomicina possui uma baixa biodisponibilidade quando administrada por via oral. Porém, quando administrada por via intramuscular, é rapidamente absorvida, atingindo níveis plasmáticos máximos dentro de uma hora (FALLAH *et al.*, 2008). Assim, deve ser administrado por injeções intramusculares. Os principais efeitos colaterais incluem ototoxicidade, dor no local da injeção, nefrotoxicidade e disfunção hepática e enzimas hepáticas elevadas (MOORE; LOCKWOOD, 2010; MENEZES *et al.*, 2015).

Uma das maiores vantagens do uso da paromomicina para o tratamento da leishmaniose é o seu baixo custo (ARONSON, *et al.*, 2016). Outra grande vantagem é o amplo espectro de atividades contra outros agentes patógenos (SUNDAR; JHA; THARKUR, 2007). Por outro lado, a necessidade de administração parenteral pode representar uma dificuldade para a sua adoção em países pobres e em desenvolvimento, e pode contribuir para o abandono do tratamento por alguns

pacientes, facilitando o desenvolvimento de cepas resistentes (BASTOS *et al*, 2016). Alguns trabalhos já apontaram casos de resistência da paromomicina com a *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* (HENDRICKX *et al.*, 2015; HENDRICKX *et al.*, 2016).

2.7 NOVOS COMPOSTOS LEISHMANICIDAS

A introdução de novos compostos no mercado farmacêutico é necessária para o aperfeiçoamento do tratamento de doenças já conhecidas ou recém-identificadas. Esse processo atua no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de enfermidades de forma mais segura e eficaz. No final do século XIX, a busca por esses fármacos resultou na inclusão de substâncias sintéticas na terapêutica e seu uso foi amplamente disseminado no século XX. Nesse contexto, diversas substâncias podem ser obtidas através da síntese de novos compostos ou por modificações estruturais em moléculas já conhecidas, baseando-se na relação entre a estrutura química e a ação biológica (MIOLO, 2013).

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

Antinarelli e colaboradores (2016) investigaram a atividade leishmanicida de dez derivados de 7-cloro-4-quinolinilhidrazona. Dentre estes, o composto 2 A (1) (Quadro 4) obteve resultados de destaque, apresentando IC₅₀ de 21,1 µM para forma promastigota e IC₅₀ de 8,1 µM para forma amastigota de *L. amazonensis*. Esse composto apresentou baixa citotoxicidade, além de induzir um desequilíbrio oxidativo nas formas promastigotas, refletido por um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e uma redução do potencial de membrana mitocondrial.

Novos selenoderivados foram avaliados *in vitro* para sua ação leishmanicida em amastigotas de *L. infantum* e para sua ação citotóxica em células humanas THP-1. Dentre os derivados avaliados nesse estudo, o de maior destaque foi o 3g (2) (Quadro 4), o qual mostrou sua atividade na faixa de IC₅₀ 0,80 µM e índice de seletividade maior que 30. Esses resultados foram bem superiores, quando

comparados aos da miltefosina que foi usada como controle nesse trabalho (AL-TAMIMI et al., 2019).

Serna e colaboradores (2015) relataram a eficácia da 14-hidroxiunularina, um composto natural isolado da espécie vegetal *Ricciocarpos natans*. Os experimentos foram realizados *in vivo*, utilizando camundongos BALB/c, os quais foram experimentalmente infectados por formas promastigotas de *L. infantum*, e posteriormente tratados com o composto por via oral e subcutânea por 10 dias em doses de 10 e 25 mg/Kg. Em órgãos especialmente afetados pela doença, como o fígado e o baço, o composto avaliado mostrou redução do parasito em até 90%, por ambas as vias de administração, sendo a via oral a mais efetiva nas duas doses avaliadas.

Em estudo de 2017, Aliança e colaboradores comprovaram o potencial leishmanicida de compostos resultantes da hibridização de ftalimida e 1,3-triazol. Os derivados 2j (3) e 2m (4) foram os mais potentes dentre os testados, apresentando alterações ultraestruturais severas nos parasitos da espécie *L. infantum*. Os dados desse trabalho mostram que estes compostos reduziram a sobrevivência de amastigotas intracelulares e apresentaram baixa toxicidade para células de mamífero, de linhagens como Vero e macrófagos J774 (ALIANÇA et al., 2017).

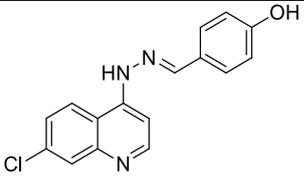
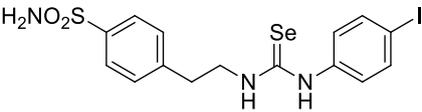
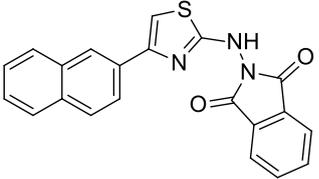
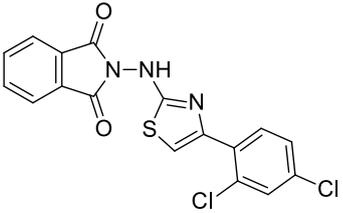
Uma nova série de trinta e um derivados N—substituídos de ureia, tioureia e selenoureia foram sintetizados e avaliados para suas ações leishmanicidas e citotóxica *in vitro*. A atividade biológica foi testada frente formas amastigotas axênicas de *L. infantum* e também em células humanas THP-1. Treze compostos apresentaram ação antileishmania significativa, quando comparados com o medicamento de referência usado no estudo, que foi a miltefosina. O composto 11 (5) (Quadro 4), um derivado com uma cadeia de ciclohexil, exibiu a maior atividade contra as formas amastigotas (DÍAZ et al., 2019).

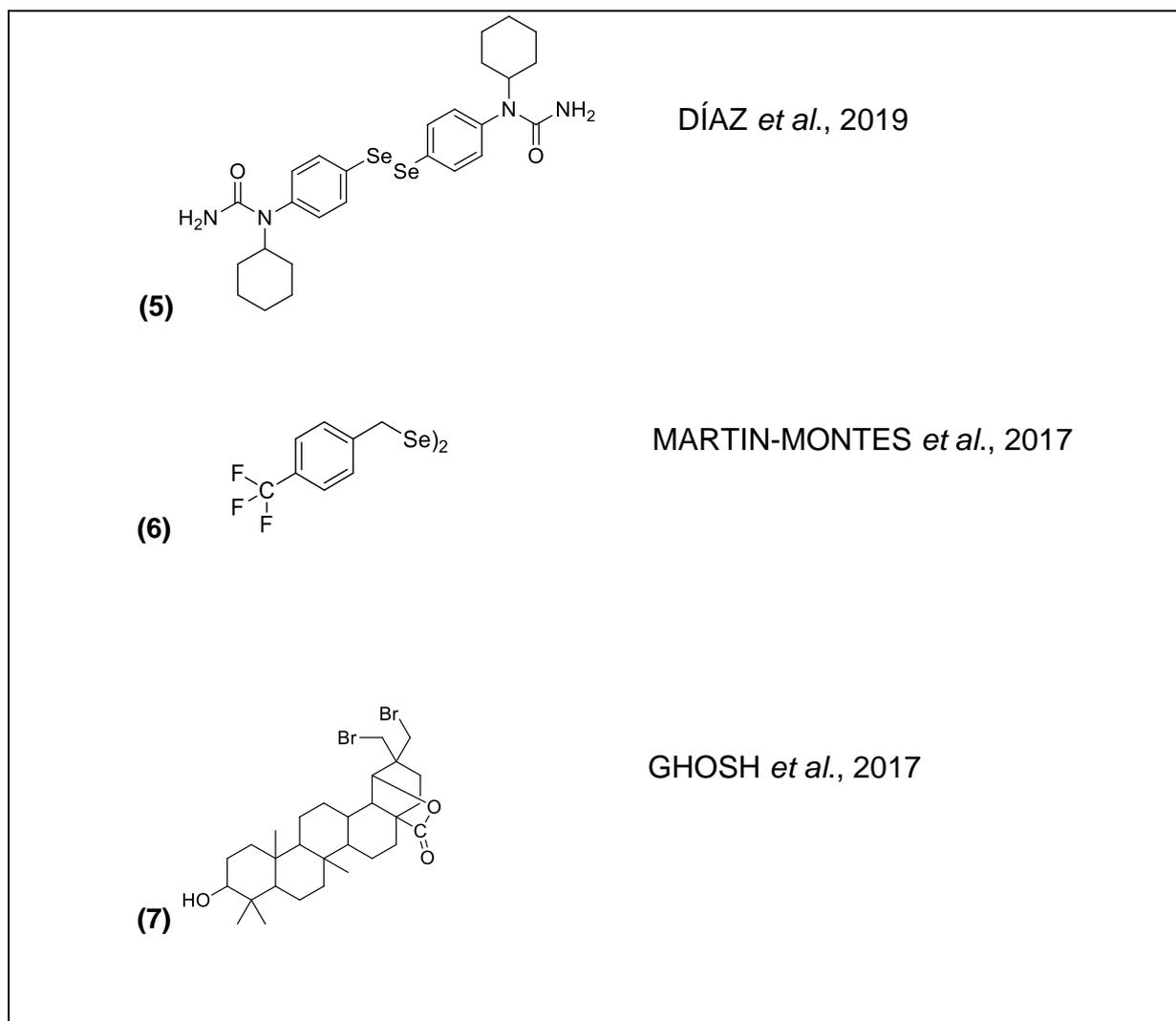
A atividade leishmanicida *in vitro* foi avaliada para uma série de 48 derivados de selênio foi avaliada em cepas de *L. infantum* e *L. braziliensis*. A citotoxicidade também foi analisada, observando-se o a concentração inibitória em macrófagos J774. Dos 48 derivados, seis tiveram índices superiores quando comparados ao controle com glucantime, para as duas espécies de Leishmania. O composto 8 (6) (Quadro 4), foi o de maior potencial para a espécie causadora da LV, obtendo o

melhor índice de seletividade tanto para a forma promastigota, quanto para a forma amastigota do parasito (MARTIN-MONTÉS *et al.*, 2017).

Ghosh *et al.*, (2015) desenvolveram um método simples para a síntese de 29,30-dibromo-28-oxoallobetulin (**7**) (Quadro 4). Em testes *in vitro* constatou-se que o composto inibiu o crescimento de promastigotas de *L. donovani* em 63,27%. Nessa mesma concentração o estibuglucotano de sódio apresentou uma inibição de apenas 10,02%. Os autores sugerem que o composto induz a interrupção do ciclo celular, ocasionando a morte da célula.

Quadro 4 - Novos compostos leishmanicidas descritos na literatura

(1)		ANTINARELLI <i>et al.</i> , 2016
(2)		AL-TAMIMI <i>et al.</i> , 2019
(3)		ALIANÇA <i>et al.</i> , 2017
(4)		ALIANÇA <i>et al.</i> , 2017

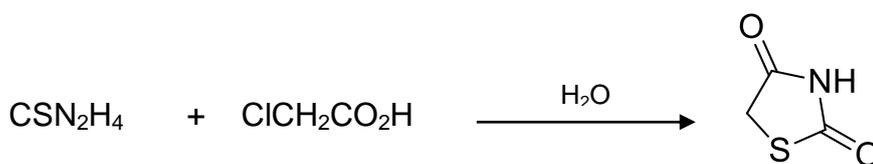


Fonte: a autora

2.9 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DAS TIAZOLIDINAS

Tiazolidinas (TZDs) são uma classe de compostos orgânicos contendo um anel heterocíclico saturado de 5 membros, com um átomo de enxofre na posição 1 e um grupo amina na posição 3. Entre o importante grupo das tiazolidinas encontram-se as tiazolidinonas com destaque para a tiazolidina-2,4-diona, que teve sua estrutura elucidada por Libermann em 1881. A partir da metodologia de Libermann a tiazolidina-2,4-diona (Figura 18) pode ser obtida pelo aquecimento da tiouréia e ácido monocloroacético em meio aquoso sob refluxo (LIMA, 1998).

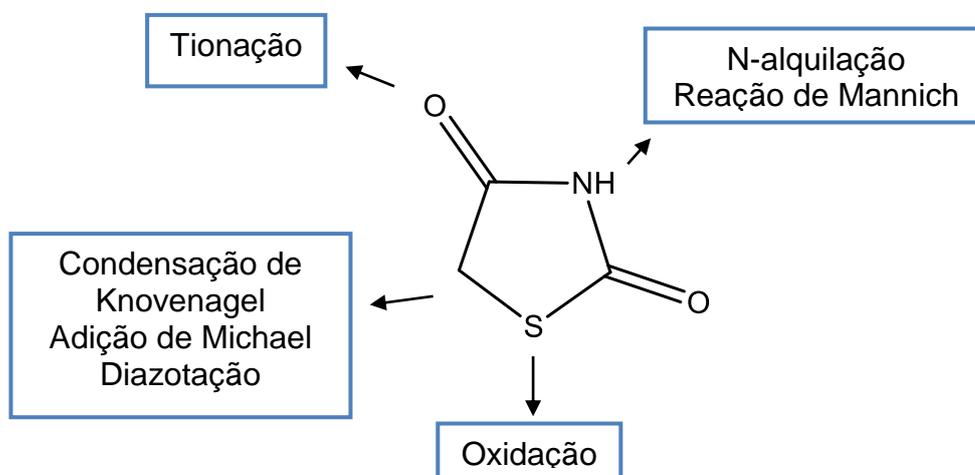
Figura 18 - Esquema de síntese da TZD, a partir da tiouréia e do ácido monocloroacético



Fonte: LIMA, 1998

Por ter diversos sítios reativos, a TZD podem sofrer substituições no anel heterocíclico a partir de reações de oxidação, *N*-alquilação, Reação de Mannich, Condensação de Knoevenagel, Adição de Michael e Diazotação (reação com sais de diazônio) (Figura 19) (LIESEN *et al.*, 2008).

Figura 19 - Reatividade do núcleo da tiazolidina-2,4-diona

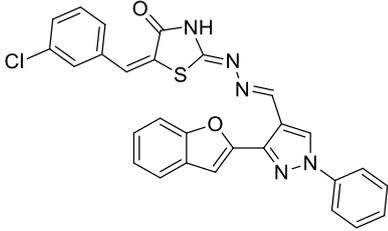
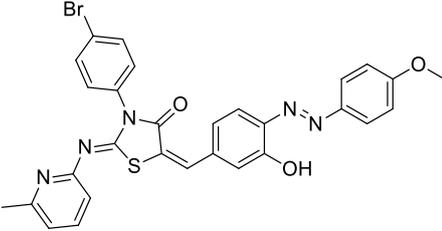
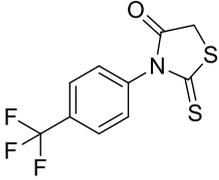


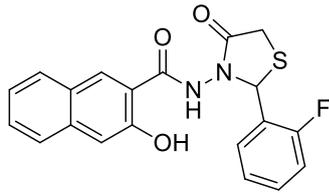
Fonte: LIESEN *et al.*, 2008

A partir da última década, vários trabalhos de química medicinal tem se voltado para o anel tiazolidínico. A literatura descreve uma série de novos compostos relacionados a esta classe e as atividades farmacológicas (Quadro 5) destas têm sido estudadas, apresentando bons resultados e menores efeitos adversos (MANJAL *et al.*, 2017).

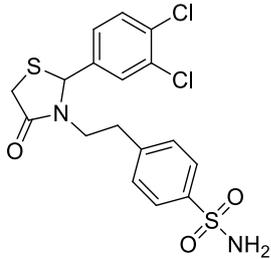
As TZDs têm sido amplamente pesquisadas devido ao seu envolvimento na regulação de diversos processos fisiológicos, como a proliferação celular, inflamação e metabolismo da glicose (TROTSKO *et al.*, 2017; MENDES *et al.*, 2018), mostrando atividades significativas, tais como anticâncer (BHAT *et al.*, 2017; POPIOLEK *et al.*, 2018; ABBAS; EL-KARIM, 2019), antifúngica (MARC *et al.*, 2018; METWALLY *et al.*, 2019), antioxidante e antibacteriana (CHITRE *et al.*, 2016; BRHMBHATT *et al.*, 2018), leishmanicida (LEITE *et al.*, 2016), esquistossomicida (OLIVEIRA *et al.*, 2015), anti-*T. cruzi* (MOREIRA *et al.*, 2013; SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2016), anti-inflamatória (ABDELLATIF *et al.*, 2016), e cicatrizante (PIAO *et al.*, 2015).

Quadro 5 - Atividades biológicas descritas na literatura para as tiazolidinas

ESTRUTURA QUÍMICA	ATIVIDADE BIOLÓGICA	PESQUISADOR
	<p>Inibição de células de câncer cervical mais significativa que o medicamento de referência Erlonitibe, a partir do processo de apoptose.</p>	<p>Abbas e El-Karim, 2019</p>
	<p>Atividade antifúngica sob a espécie de interesse fitopatológico <i>Alternaria solani</i></p>	<p>Metwally <i>et al.</i>, 2019</p>
	<p>Apresentou atividade contra <i>Escherichia coli</i> (3,125 µg/mL) e <i>Staphylococcus aureus</i> (0,097 µg/mL), além de potente ação antioxidante (95% DPPH)</p>	<p>Brahmbhatt <i>et al.</i>, 2018</p>
	<p>Alta citotoxicidade e seletividade para células de</p>	<p>Popiolek <i>et al.</i>, 2018</p>

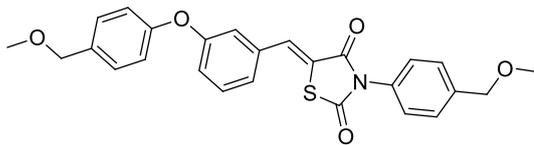


adenocarcinoma renal humano (769-P), sem afetar o crescimento de células normais (H9c2, GMK)



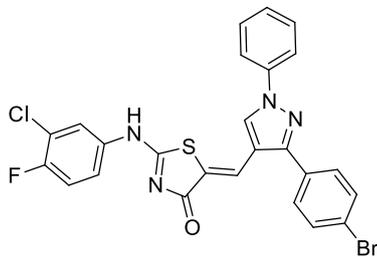
Exibiu índice insulínogênico e perfil de secreção de insulina capaz de manter a homeostase da glicose, em ensaios realizado in vitro.

Mendes *et al.*, 2018



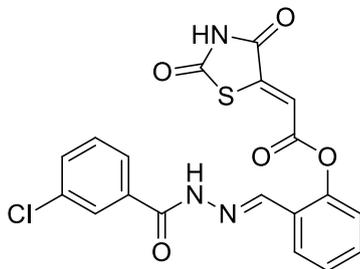
Atividade antifúngica contra *Candida albicans* (ATCC10231), *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida krusei* (ATCC 6528) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019)

Marc *et al.*, 2018



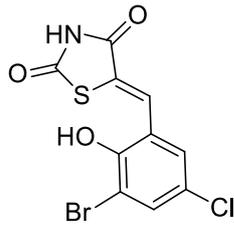
Potente atividade anticâncer em carcinoma ascítico de Erlich, com menor toxicidade para células fibroblásticas humanas.

Bhat *et al.*, 2017



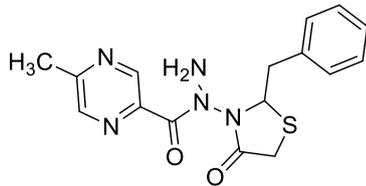
Apresentou atividade antiproliferativa contra células humanas de câncer de pulmão, mama e fígado e valores de índice de seletividade relativamente altos

Trotsko *et al.*, 2017



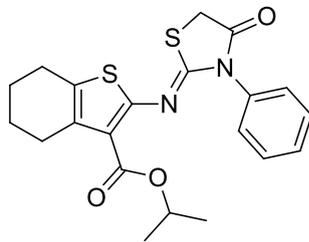
Atuou como inibidores de Pteridina Redutase 1 em *Leishmania major*

Leite *et al.*, 2016



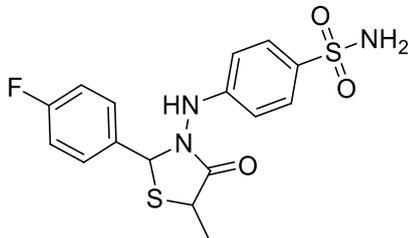
Composto mostrou-se ativo frente *Mycobacterium tuberculosis* com baixa toxicidade em diversas linhagens celulares normais.

Chitre *et al.*, 2016



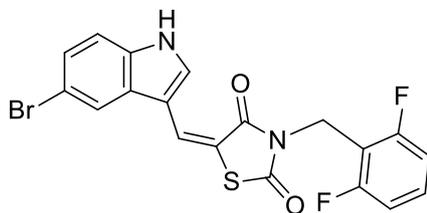
Atividade anti-*T. cruzi* com IC₅₀ de 6,96 μ M em formas amastigotas intracelulares

Silva-Júnior *et al.*, 2016



Atividade anti-inflamatória observada em ensaio *in vivo* de edema de pata por carragenina em camundongos com inibição de 67% em 3h

Abdellatif *et al.*, 2016

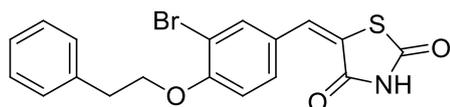


Ação esquistossomicida com alta mortalidade nas primeiras 24h e efetiva atividade tripanocida contra formas epi e tripomastigotas de *T. cruzi*

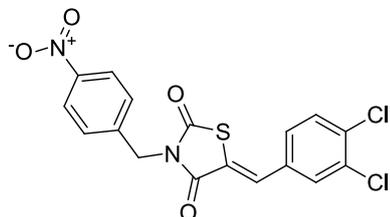
Oliveira *et al.*, 2015

Composto apresentou

Piao *et al.*, 2015



promissora
atividade
cicatrizante



Inibiu o crescimento
das formas
epimastigota e
amastigota, e
causou lise na
tripomastigota do
Trypanosoma cruzi

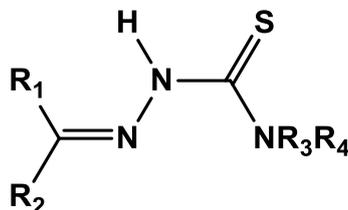
Moreira *et al.*, 2013

Fonte: a autora

2.9 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DAS TIOSSEMICARBAZONAS

As tiossemicarbazonas (Figura 20) constituem uma classe de moléculas que possuem grande destaque no ramo da Química Medicinal, uma vez que suas propriedades biológicas têm sido extensivamente estudadas.

Figura 20 - Representação geral das tiossemicarbazonas



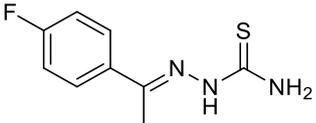
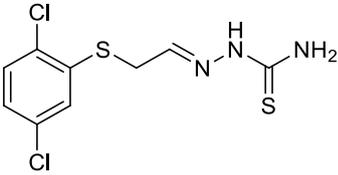
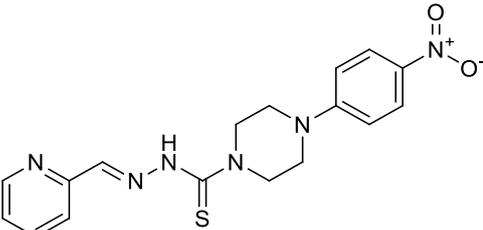
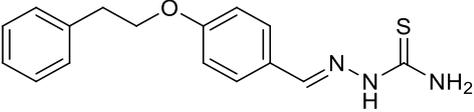
Fonte: GOES, 2005

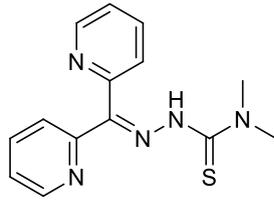
Do ponto de vista sintético, as tiossemicarbazonas apresentam como características principais sua versatilidade de obtenção, elevados rendimentos e alta estabilidade em diferentes condições reacionais; assim como sua ampla aplicabilidade como intermediários de muitos núcleos importantes. Geralmente, estes compostos possuem baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada na sua síntese, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final (DU *et al.*, 2002; TENÓRIO; GÓES, 2005).

Dados da literatura (Quadro 6) mostram que elas apresentam um amplo perfil farmacológico, incluindo atividades antimalárica (MATSA *et al.*, 2019), antibacteriana e antifúngica (KAPLANCIKLI *et al.*, 2016; ARAÚJO NETO *et al.*, 2017; VOLYNETS *et al.*, 2019), antiviral (SANTACRUZ *et al.*, 2017), antitumoral (MROZEK-WILCZKIEWICZ *et al.*, 2019, anti-inflamatória e antinociceptiva (OLIVEIRA *et al.*, 2016 ; NAM *et al.*, 2017)

Além disso, a atividade seletiva de derivados de tiossemicarbazonas também já foi demonstrada sobre os tripanosomatídeos como *Trypanosoma cruzi* (CARDOSO *et al.*, 2019) e *Leishmania amazonensis* (SCARIOT *et al.*, 2017).

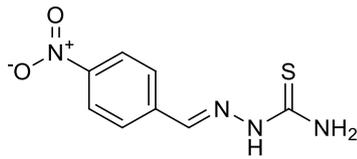
Quadro 6 - Atividades biológicas descritas na literatura para as tiossemicarbazonas

ESTRUTURA QUÍMICA	ATIVIDADE BIOLÓGICA	PESQUISADOR
	<p>Notável atividade antimalárica com ensaios realizados in vitro contra cepa 3D7 de Plasmodium falciparum, com EC₅₀ de 13,54 µM.</p>	<p>Matsa <i>et al.</i>, 2019</p>
	<p>Atividade tripanocida em formas tripomastigotas e epimastigotas em ensaios com <i>T. cruzi</i></p>	<p>Cardoso <i>et al.</i>, 2019</p>
	<p>Atividade antitumoral em ensaio com células de linhagem de glioma (Hs683)</p>	<p>Mrozek-Wilczkiewicz <i>et al.</i>, 2019</p>
	<p>Atividade antimicrobacteriana contra <i>M. tuberculosis</i> com MIC de 0,68 M e baixa toxicidade para células hepáticas humanas (HepG2)</p>	<p>Volynets <i>et al.</i>, 2019</p>



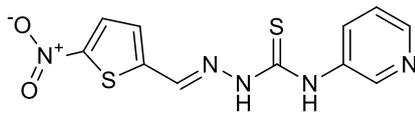
Resultados indicam que o compostos tem efeito anti-inflamatório e pode ser de importância terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias mediadas por mastócitos.

Nam *et al.*, 2017



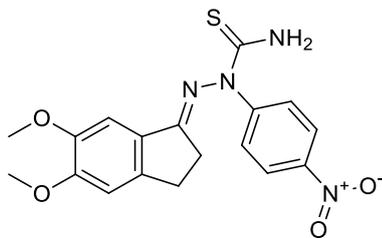
O estudo avaliou *in vitro* a combinação entre a TSC e a miltefosina, apresentando efeito sinérgico contra formas amastigotas *L. amazonensis* com baixa toxicidade para macrófagos J774.A1

Scariot *et al.*, 2017



Atividade antifúngica promissora, especialmente contra *C. neoformans* (MIC = 0,06 µg / mL e moderada citotoxicidade

Araújo Neto *et al.*, 2017

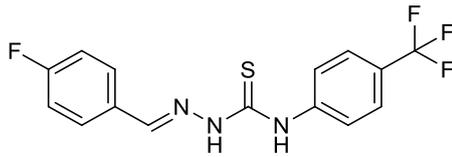


Derivado atuou como inibidor da replicação do vírus da diarreia viral bovina (BVD)

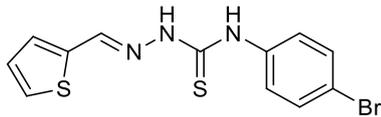
Santa-Cruz *et al.*, 2017

Atividade antimicrobiana efetiva contra

Kaplancikli *et al.*, 2016



Enterococcus faecalis,
Staphylococcus aureus e *Candida glabrata*.



Estudo sugere que o composto exerce efeitos de antinocicepção, além de atuar como anti-inflamatório em ensaio de edema por carreagenina

Oliveira *et al.*, 2016

Fonte: a autora

O vasto espectro de atividades terapêuticas das tiossemicarbazonas se deve ao fato desses compostos agirem como inibidores de enzimas, por interações com o DNA ou inibição de sua síntese. Acredita-se que as tiossemicarbazonas atuem como potentes inibidores da enzima ribonucleotídeo redutase (RR). Esta enzima pode ser encontrada em todas as células e apresenta a função de catalisar a formação de deoxirribonucleotídeos a partir de ribonucleotídeos. A ação das tiossemicarbazonas seria, portanto, um fator limitante para a síntese de DNA. Assim, RR vem sendo relacionada como um alvo biológico promissor na terapia de doenças parasitárias (MELO *et al.*, 2000; FINCH *et al.*, 2000; TENÓRIO; GÓES, 2005).

3 METODOLOGIA

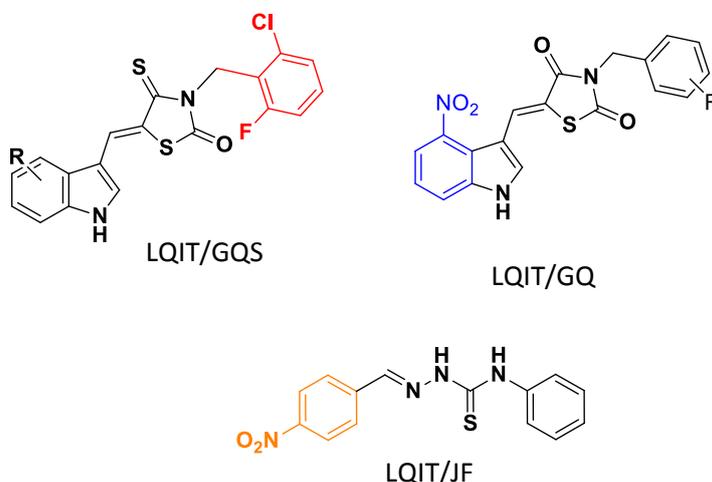
3.1 ESTUDO QUÍMICO

Os compostos de interesse desse estudo pertencem a duas classes distintas de moléculas: tiazolidinas e tiossemicarbazonas. Diante da importância biológica destes compostos, decidimos propor modificações moleculares onde estas se deram da seguinte forma: em relação às tiazolidinas, as moléculas possuem um anel indol-substituído conectado na posição 5 e na posição 3, um núcleo benzil substituído em todos os derivados. Adicionalmente, os compostos podem ter uma substituição isostérica na posição 4 modificando uma carbonila por uma tiocarbonila.

Em relação às tiossemicarbazonas, a presença de um grupo p-nitro-fenil ligado ao carbono imínico faz parte de uma porção fixa em todos os compostos. Adicionalmente, as variações podem ser observadas da posição N-4 do esqueleto desses compostos com o intuito de se observar como tais variações estruturais refletem na atividade biológica.

No estudo químico apresentaremos a síntese de três séries de compostos descritos como derivados 5-(indol-3-il-metileno)-4-tioxi-tiazolidin-2-onas (LQIT/GQS – 5 compostos), derivados 5-(indol-3-il-metileno)-tiazolidina-2,4-dionas (LQIT/GQ – 5 compostos) e derivados 4-nitro-benzilideno-tiossemicarbazonas (LQIT/JF – 6 compostos) (Figura 21). Obtivemos ao total, portanto, 16 compostos.

Figura 21 - Representação dos compostos tiazolidínicos (GQS e GQ) e da tiossemicarbazona (JF)



Fonte: a autora

3.1.1 Caracterização Estrutural

A caracterização estrutural dos compostos foi realizada através da espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV), em espectrofotômetro FTIR Bruker Modelo IFS 66, pastilhas de KBr. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e carbono 13 (RMN¹³C), foram efetuados em espectrofotômetro Varian Modelo Plus de 300 MHz e 400 MHz (¹H) e 75 MHz e 100 MHz (¹³C).

Na cromatografia em camada delgada foram utilizadas placas de sílica gel 60 Merck F254, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 ou 366 nm). A determinação dos pontos de fusão foi realizada em aparelho FISATOM Modelo 431D.

3.1.2 Reagentes e Solventes

Para a síntese dos compostos foram utilizados os seguintes reagentes e solventes: aldeídos aromáticos substituídos (5-metilindol-3-carboxaldeído, 4-nitroindol-3-carboxaldeído, 7-metilindol-3-carboxaldeído, 5-metóxi-3-carboxaldeído, 1*H*-benzo(G)indol-3-carboxaldeído), haleto de benzila substituídos (cloreto de 2-cloro-6-flúor-benzil, cloreto de 4-nitro-benzil), aldeídos aromáticos substituídos 4-nitroindol-3-carboxaldeído, haletos de benzila substituídos, isotiocianatos substituídos (fenilisotiocianato, *p*-metilfenil-isotiocianato, *p*-metoxifenil-isotiocianato, *p*-etilfenil-isotiocianato, 2-feniletil-isotiocianato, 1-naftil-isotiocianato, 3-piridil-isotiocianato), morfolina, benzeno, *n*-hexano, dioxano anidro, reativo de Lawesson, tiouréia, ácido monocloroacético, etanol absoluto, metanol, acetato de etila, cianoacetato de etila, hidróxido de sódio. Todos os reagentes e solventes acima mencionados foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, Vetec ou Acros, obedecendo às especificações para PA ou PS.

3.1.3 Procedimento de síntese do 3-(benzil)-tiazolidina-2,4-diona

Em um balão de 100 mL, foi adicionado 1 mol de tiazolidina (previamente preparada de acordo com a metodologia descrita por Miranada *et al.*, 2004) de e 20

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

3.1.4 Procedimento de síntese da 3-(benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona

Em balão de duas bocas, previamente seco e sob atmosfera inerte (argônio), foram adicionados 1 mol de 3-(benzil)-tiazolidina-2,4-diona, 0,3 mol de reativo de Lawesson e 20 mL de dioxano anidro. A reação permaneceu sob agitação em temperatura de 90 °C, por 24 horas. Constatado o término da reação, por cromatografia em camada delgada, o volume da solução foi rotaevaporado e reduzido a cerca de um décimo do volume, o restante foi resfriado em geladeira por 12 horas. O precipitado obtido foi filtrado à vácuo e lavado com quantidade mínima de etanol gelado, gerando o 3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona.

3.1.5 Síntese dos derivados 5-(indol-3-il-metilano)-4-tioxo-tiazolidin-2-onas

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

3.1.6 Síntese dos derivados 5-(indol-3-il-metilano)-tiazolidin-2,4-dionas

Em um balão de fundo redondo, com capacidade de 100 mL foram adicionadas quantidades equimolares de 3-(benzil)-tiazolidina-2,4-diona e aldeídos substituídos na presença de 1 mL de morfolina como catalisador e 10 mL de etanol absoluto como solvente. A mistura reacional foi mantida por aproximadamente 3 horas. O produto foi então filtrado e purificado com sucessivas lavagens em etanol absoluto.

3.1.7 Procedimento para a síntese das tiossemicarbazidas

Em um balão de fundo redondo foi adicionado 4,6 mmol do isotiocianato substituído em 30 mL de diclorometano, temperatura ambiente e sob agitação, até solubilização. Em seguida foram adicionados 9,2 mmol de hidrato de hidrazina e a mistura reacional foi mantida sob agitação por 1h. A maioria das tiossemicarbazidas precipitaram durante a reação, às reações que não precipitaram foi adicionado n-hexano. O precipitado foi então filtrado, lavado com diclorometano e seco em dessecador para utilização na etapa posterior.

3.1.8 Procedimento para síntese das tiossemicarbazonas

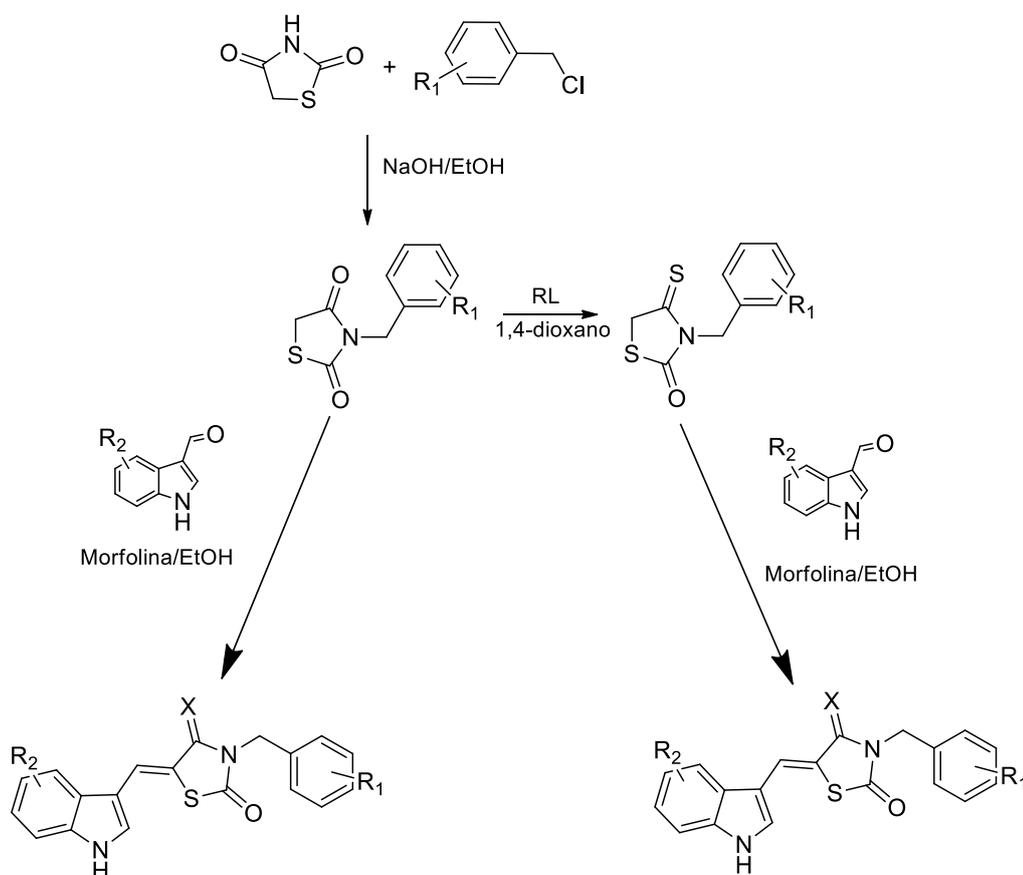
A uma solução de paranitrobenzaldeído (0,1 mmol) em etanol absoluto (10 mL) foram adicionadas as tiossemicarbazidas substituídas, previamente sintetizadas (0,1 mmol), e 5-10 gotas de ácido acético glacial. A reação permaneceu sob agitação magnética por 2 horas. O precipitado (tiossemicarbazona) foi então filtrado, lavado com etanol e seco em dessecador para posterior caracterização estrutural e avaliação biológica.

3.1.9 Rota sintética

A rota sintética empregada para a obtenção dos derivados tiazolidínicos (Esquema 1) foi uma via plena convergente, onde foram utilizadas propostas mecanísticas de tionação, *N*-alquilação, condensação de Knoevenagel.

Esquema 1 - Rota sintética para obtenção dos derivados tiazolidínicos (LQIT/GQS e

LQIT/GQ)



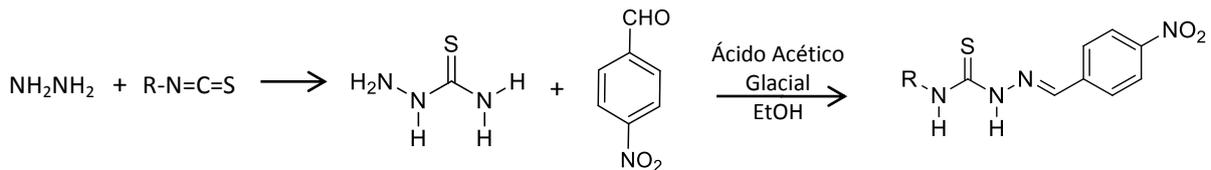
X	R1	R2	Derivados
S	2-Cl-6-F	4-NO ₂	GQS-90
S	2-Cl-6-F	5-OCH ₃	GQS-91
S	2-Cl-6-F	7-CH ₃	GQS-92
S	2-Cl-6-F	5-CH ₃	GQS-93
S	2-Cl-6-F	H	GQS-94

X	R1	R2	Derivados
O	4-NO ₂	4-Br	GQ-403
O	4-NO ₂	4-NO ₂	GQ-404
O	4-NO ₂	4-CH ₃	GQ-405
O	4-NO ₂	H	GQ-406
O	4-NO ₂	4-Cl	GQ-407

Fonte: a autora

Partindo-se da reação entre tiossemicarbazidas, inicialmente sintetizadas a partir de isotiocianatos substituídos e hidrazina hidratada, e *p*-nitrobenzaldeído, foram obtidos primeiramente os derivados tiossemicarbazônicos (Esquema 2).

Esquema 2 - Rota sintética para a obtenção das tiossemicarbazonas



R	Derivados
Fenil	JF-43
3-Piridil	JF-47
4-OCH ₃ -Fenil	JF-48
Etil-Fenil	JF-49
4-Etil-Fenil	JF-50
4-CH ₃ -Fenil	JF-51

Fonte: a autora

3.2 ESTUDO BIOLÓGICO

3.2.1 Cultivo dos parasitos

Formas promastigotas de *Leishmania infantum* (Cepa BH-466) foram mantidas a 26 °C em meio de Schneider (Sigma®) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, com repiques a cada três dias. Parasitos na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos.

3.2.2 Atividade biológica em *Leishmania infantum*

As formas cultivadas de promastigotas de *Leishmania infantum* foram contadas e diluídas em meio de Schneider suplementado a uma concentração de 1×10^6 células/mL. Após a diluição, as células foram incubadas na presença de diferentes concentrações (100 µg/mL a 0,5 µg/mL) dos compostos por 72 horas.

Células incubadas apenas com meio de Schneider foram utilizadas como controle negativo, a anfotericina B foi utilizada como controle positivo. O crescimento da cultura foi acompanhado através de contagens diárias em câmara de Neubauer. O parâmetro utilizado para estimar a inibição do crescimento foi a IC_{50} , a qual corresponde à concentração do composto capaz de inibir 50% do crescimento dos parasitos. A IC_{50} foi determinada após 72 horas de cultivo por análise de regressão linear. Cada teste foi feito em duplicata biológica e triplicata técnica.

3.2.3 Análise da citotoxicidade dos compostos em macrófagos

As análises de citotoxicidade foram realizadas através da técnica do MTT, descrita por Mosmann (1983), utilizando macrófagos da linhagem J774. Para tal, as células foram semeadas em placas de 96 poços contendo meio RPMI com vermelho de fenol suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico e incubadas em uma atmosfera a 5% de CO_2 e 37 °C. Após 24 horas, o meio foi removido e as células foram incubadas na presença de várias concentrações dos compostos (100 $\mu g/mL$ a 2,5 $\mu g/mL$) por 72 horas. Após este período, foi adicionado 10 μL de MTT (5 mg/mL) e incubados por 3 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 . Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados em dimetilfulsóxido (DMSO) e sua absorbância foi determinada por espectrofotometria a 540 nm. Poços contendo meio RPMI e MTT foram utilizados como controle da reação. Cada teste foi feito em duplicata biológica e quadruplicata técnica.

3.2.4 Análise da produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico pelos macrófagos J774 tratados com os compostos por 72 horas foi testada através do método reagente de Griess (MOORCROFT *et al.*, 2001). Para medir a concentração de nitrito, 100 μL do sobrenadante da cultura de macrófagos de cada poço foi incubado com 100 μL do reagente Griess (1% sulfanilamida/ 0,1% N-(1-naftil)-etilenodiamina dihidroclorato/2,5% H_3PO_4) à temperatura ambiente por 10 minutos em um agitador de placa. A absorbância foi medida a 540 nm no leitor de ELISA Benchmark plus

(Bio-Rad®, Califórnia, EUA). A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio. Cada teste foi feito em duplicata biológica e quadruplicata técnica.

3.2.5 Atividade biológica *in vitro* sobre as formas amastigotas intracelulares

Macrófagos J774 foram semeados em placas de cultivo de 24 poços, a uma concentração de 3×10^5 células/mL, contendo uma lamínula de vidro, e mantidas a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. Após um dia de cultivo, as culturas foram lavadas com meio RPMI1640 (Sigma®) e infectadas, por três horas com formas promastigotas, na proporção de 10:1 promastigotas/macrófago. Em seguida, os parasitos não internalizados foram retirados por lavagem em meio RPMI e incubadas em meio fresco na presença ou ausência de diferentes concentrações dos compostos. Após 24 horas de tratamento as lamínulas foram retiradas e foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada por contagem de 100 células em triplicata. A IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos) foi determinada após 24 horas de cultivo por análise de regressão linear. O índice de sobrevivência foi determinado multiplicando a porcentagem de macrófagos infectados pelo número de parasitos por célula infectada. A IC₅₀ (concentração que inibe em 50% a infecção dos macrófagos) foi determinada através da contagem direta das células infectadas e das amastigotas intracelulares em microscópio óptico convencional. O índice de sobrevivência (SI) foi obtido multiplicando a porcentagem de células infectadas pelo número de amastigotas/ macrófago.

3.2.6 Análise ultraestrutural de promastigotas de *L. infantum*

Formas promastigotas *L. infantum* controles e tratadas nas concentrações de 0,42 µM e 0,84 µM do composto GQS-90, foram lavadas em tampão fosfato-salina e fixadas overnight em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) e processadas para Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET).

Para MEV, promastigotas fixadas foram colocadas para aderir em lamínulas previamente revestidas com poly-L-lysina (Sigma®). Após 20 minutos as lamínulas foram lavadas no mesmo tampão para retirada das células não aderidas e pós-fixada por uma hora em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄) em tampão cacodilato de sódio. Em seguida as células foram desidratadas em séries crescentes de etanol e submetidas à secagem através do ponto crítico no Critical Point Dryer HCP-2 (Hitachi, Tokyo, Japan), 42 cobertas com 20 nm de ouro no metalizador JFC-1100 (Jeol, Tokyo, Japan) e visualizadas através do microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200 (Jeol, Tokyo, Japan).

Para MET, os parasitos fixados foram lavados e pós-fixados por uma hora em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄), 0,8% ferricianeto de potássio, 5 mM CaCl₂ em tampão cacodilato de sódio. Após esta etapa, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, infiltradas e incluídas em EPON (Sigma® Aldrich, St. Louis, USA). Cortes ultrafinos de aproximadamente 70 nm de espessura, obtidos em ultramicrotomo Leica EMUC6 (Leica, Wetzlar, Germany), foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados através do microscópio de transmissão TecNai G2 Spirit TEM (FEI, Hillsboro, USA).

3.2.7 Análise estatística

As análises de regressão linear foram realizadas no programa SPSS 18.0 (IBM Co., Nova Iorque, EUA) para Windows. As análises de significância, considerado significativo valores $p < 0.05$, foram realizadas através do teste ANOVA e o pós-teste de Tukey no programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA) para Windows.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 QUÍMICA

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

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

No IV, é possível realizar a identificação de bandas e estiramentos característicos de grupos funcionais presentes na estrutura de compostos. Os novos derivados das séries tiazolídínicas possuem como grupos funcionais característicos a presença do grupamento NH o qual apareceu em uma faixa de frequência que variou entre 3278-3343 cm^{-1} , indicando a presença do núcleo indol na estrutura desses derivados. A carbonila (C=O) e a tiocarbonila (C=S) também podem ser consideradas grupos característicos na estrutura dos nossos compostos. O espectro de IV revelou a presença de estiramentos na faixa de 1668-1733 cm^{-1} (carbonila) e 1510-1605 cm^{-1} (tiocarbonila) evidenciando o núcleo tiazolidínico substituído por esses grupos funcionais e também a reação de tionação que ocorreu neste heterociclo. Por fim, outro grupamento importante é C=C, a qual foi observada em uma frequência que variou entre 1580-1680 cm^{-1} .

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

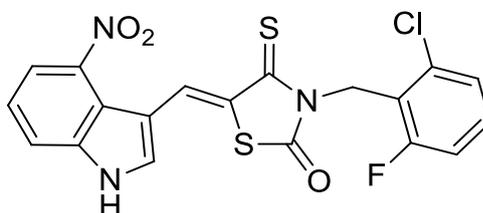
presença da ligação =C-H o que confirma o sucesso da condensação de Knoevenagel. Este hidrogênio arilidênico foi visualizado na faixa de 7.70-8.25 ppm. Por fim, os hidrogênios do -CH₂ (benzil) foram identificados como simpletos na faixa de 4.76-4.99 ppm, onde foi possível inferir que a reação de *N*-alquilação também ocorreu com êxito entre a tiazolidina-2,4-diona e o haleto de benzila.

Também se procedeu a caracterização estrutural das tiossemicarbazonas. Na análise do infravermelho foi possível observar a banda de absorção entre 3211 a 3332 cm⁻¹ atribuídas aos grupos NH presentes na estrutura dos nossos compostos. Além disso, um estiramento que variou de 1516 a 1595 cm⁻¹ foi evidenciado e atribuído à ligação C=N. Por fim, outro estiramento característico nas tiossemicarbazonas é o referente a ligação tiocarbonila C=S, que apareceu variando de 1023 a 1194 cm⁻¹. Pontos importantes para a caracterização das tiossemicarbazonas também foram encontrados a partir da análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H). As faixas que variaram 8.13-8.23;; e 10.25-10.43; e 11.81-12.23 correspondem aos hidrogênios CH azometínicos, NH aromático e NH hidrazínico.

4.1.1 Moléculas obtidas

4.1.1.1 Série LQIT/GQS

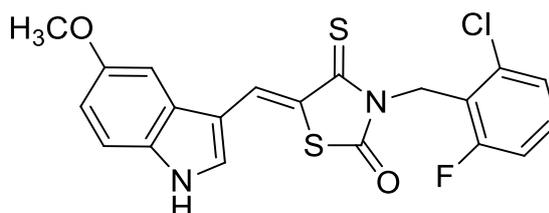
- **3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-5-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LQIT/GQS-90)**



C₁₉H₁₁ClFN₃O₃S₂. Massa molar: 446,9914 g/mol. Rdt: 67,97%. P.F.: 208-210 °C. Rf: 0,47 (sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 7:3). RMN ¹H (400MHZ) δ: 4.97 (s, 2H, CH₂), 7.18 (d, 1H, J= 8 Hz, benzil), 7.41 (d, 1H, J= 8Hz, indol), 7.42 (t, 1H, J=8Hz, benzil), 7.46 (d, 1H, J=8Hz, indol), 7.96 (d, 1H, J=8Hz, benzil), 8.09 (, 1H, indol), 8.26

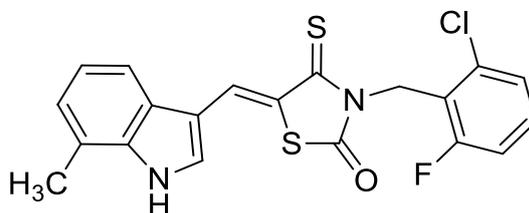
(s, 1H, -CH=), 8.79 (s, 1H, indol), 12.92 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (100MHZ) δ : 110.53, 118.06, 119.09, 119.43, 120.37, 120.77, 122.57, 125.73, 128.53, 130.21, 130.61, 133.18, 134.22, 139.13, 142.44, 160.17, 164.75, 170.07. IV (KBr) cm^{-1} : 3284.5 (NH), 1713.6 (C=O), 1680.9 (C=C), 1510.4 (C=S).

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



$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{ClFN}_2\text{O}_2\text{S}_2$. Massa molar: 432,0169 g/mol. Rdt: 72,62%. P.F.: 177-179 °C. Rf: 0,50 (sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 7:3). RMN ^1H (400MHZ) δ : 3.81 (s, 3H, OCH_3), 4.96 (s, 2H, CH_2), 6.86 (d, 1H, $J= 8.8\text{Hz}$, benzil), 7.22 (t, 1H, $J= 8.8\text{Hz}$, benzil), 7.31 (d, 1H, $J= 8.0\text{Hz}$, indol), 7.37 (d, 1H, $J= 6.0\text{Hz}$, indol), 7.38 (d, 1H, $J= 8.4\text{Hz}$, benzil), 7.42 (d, 1H, $J= 8.0\text{Hz}$, indol), 7.70 (s, 1H, -CH=), 8,20 (s, 1H, indol), 12.07 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (100MHZ) δ : 37.01, 55.40, 100.11, 110.43, 112.22, 1113.19, 113.41, 114.42, 120.94, 125.58, 126.51, 127.69, 129.16, 130.44, 130.54, 131.00, 134.17, 155.04, 162.70, 166.34. IV (KBr cm^{-1}) γ : 3307.0 (NH), 1726.0 (C=O), 1670.0 (C=C), 1605.1 (C=S).

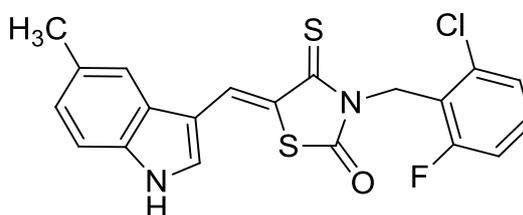
- **3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-5-((7-metil-1H-indol-3-il)metileno)-4-tioxotiazolin-2-ona (LQIT/GQS-92)**



$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{ClFN}_2\text{OS}_2$. Massa molar: 416,0220 g/mol. Rdt: 73,95%. P.F.: 252-254 °C. Rf: 0,42 (sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 7:3). RMN ^1H (400MHZ) δ : 2.51 (s, 3H, CH_3), 4.96 (s, 2H, CH_2), 7.09 (d, 1H, $J= 10.8\text{Hz}$, benzil), 7.23 (t, 1H, $J= 9.6\text{Hz}$,

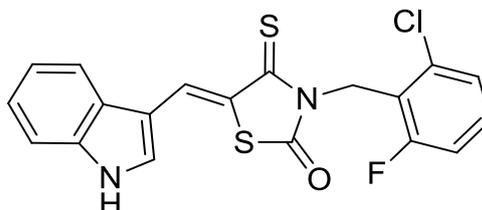
benzil), 7.38 (d, 1H, J= 8.0Hz, indol), 7.65 (d, 1H, J= 8.0Hz, indol), 7.70 (d, 1H, J= 10.4Hz, benzil), 7.92 (d, 1H, indol), 8.13 (s, 1H, -CH=), 8,55 (s, 1H, indol), 12.2 (s, 1H, NH). RMN ¹³C (100MHZ) δ: 16.62, 110.80, 113.17, 114.59, 115.84, 120.73, 120.88, 122.01, 123.69, 125.70, 126.07, 128.57, 130.23, 134.20, 135.67, 160.19, 162.68, 164.77, 169.75, 190.22. IV (KBr cm⁻¹) γ: 3287.7 (NH), 1662.9 (C=O), 1603.5 (C=C), 1573.4 (C=S).

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



C₂₀H₁₄ClFN₂OS₂. Massa molar: 416,0220 g/mol. Rdt: 69,64%. P.F.: 226-228 °C. Rf: 0,45 (sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 7:3). RMN ¹H (400MHZ) δ: 2.41 (s, 3H, CH₃), 4.96 (s, 2H, CH₂), 7.07 (d, 1H, J= 8.4Hz, benzil), 7.23 (t, 1H, J= 9.2Hz, benzil), 7.32 (d, 1H, J=8.0Hz, indol), 7.38 (d, 1H, J= 8.0Hz, indol), 7.39 (d, 1H, J= 8.4Hz, benzil), 7.66 (d, 1H, indol), 7.72 (s, 1H, -CH=), 8,13 (s, 1H, indol), 12.05 (s, 1H, NH). RMN ¹³C (100MHZ) δ: 18.53, 56.01, 109.95, 112.10, 112.63, 114.45, 117.93, 120.91, 124.68, 125.61, 126.03, 127.06, 129.04, 130.12, 130.46, 134.20, 134.51, 160.19, 164.80, 190.22. IV (KBr cm⁻¹) γ: 3307.0 (NH), 1668.4 (C=O), 1600.7 (C=C), 1520.0 (C=S).

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

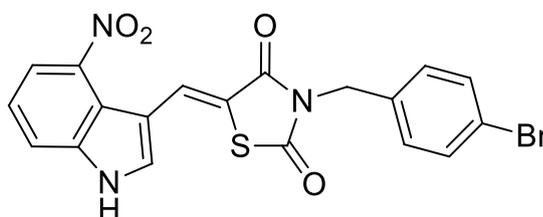


C₁₉H₁₂ClFN₂OS₂. Massa molar: 402,0064 g/mol. Rdt: 67,30%. P.F.: 282-284 °C. Rf: 0,48 (sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 7:3). RMN ¹H (400MHZ) δ: 4.99 (s, 2H,

CH₂), 7.23 (d, 1H, J= 8.4Hz, benzil), 7.34 (d, 1H, J=8.0Hz, indol), 7.39 (t, 1H, J= 8.4Hz, benzil), 7.49 (t, 1H, J= 7.2Hz, indol), 7.64 (d, 1H, J= 8.4Hz, benzil), 7.58-7.60 (m, 1H, indol), 7.99 (d, 1H, J= 8.8Hz, indol), 8.25 (s, 1H, -CH=), 8,45 (d, 1H, J= 8.4Hz, indol), 13.05 (s, 1H, NH). RMN ¹³C (100MHZ) δ: 37.06, 112.09, 114.45, 118.06, 120.81, 121.91, 123.03, 124.61, 125.99, 128.45, 130.42, 130.59, 131.12, 134.21, 160.20, 162.68, 164.77, 166.33, 190.22. IV (KBr cm⁻¹) γ: 3278.0 (NH), 1722.5 (C=O), 1662.8 (C=C), 1599.0 (C=S).

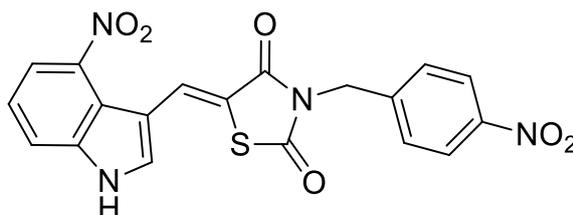
4.1.1.2 Série LQIT/GQ

- **3-(4-bromobenzil)-5-((4-nitro-1H-indol-3-il)metileno)-tiazolidina-2,4-dione (LQIT/GQ- 403)**



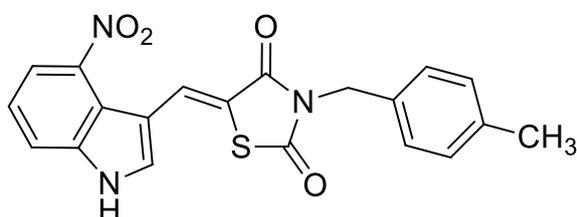
C₁₉H₁₂BrN₃O₄S. Massa molar: 458,29 g/mol. Rdt: 80,85%. P.F.: com decomposição. Rf: 0,56 (sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 1:1). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 12.92 (s, 1H) 8.34 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.94 (t, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.55 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.41 (t, 1H, , *J* = 8.0 Hz), 7.28 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 4.79 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 43.87; 109.01; 115.44; 117.61; 119.12; 119.44; 120.94 122.32; 128.91; 129.96; 131.54; 132.75; 135.08; 138.97; 142.23; 165.26; 167.36. IV (KBr) cm⁻¹: 3281 (NH), 1733 (C=O), 1658 (C=O), 1588 (C=C).

- **5-((4-nitro-1H-indol-3-il)metileno)-3-(4-nitrobenzil)-tiazolidina-2,4-diona (LQIT/GQ-404)**



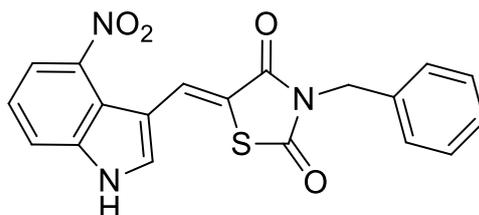
$C_{19}H_{12}N_4O_6S$. Massa molar: 424,39 g/mol. Rdt: 83,78%. P.F.: com decomposição. Rf: 0,60 (sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 1:1). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 12.90 (s, 1H) 8.36 (s, 1H), 8.21 (d, 2H $J = 9.2$ Hz), 8.09 (s, 1H), 7.94 (t, 2H $J = 7.2$ e 7.6 Hz), 7.58 (d, 2H $J = 8.4$ Hz), 7.41 (t, 1H $J = 8.0$ Hz), 4.96 (s, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 43.90; 109.0; 115.34; 117.62; 119.15; 119.46; 122.35; 123.78; 128.74; 129.06; 132.86; 139.0; 142.22; 143.16; 146.98; 165.25; 167.43. IV (KBr) cm^{-1} : 3343 (NH), 1720 (C=O), 1667 (C=O), 1580 (C=C).

- **3-(4-metilbenzil)-5-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)-tiazolidina-2,4-diona (LQIT/GQ-405)**



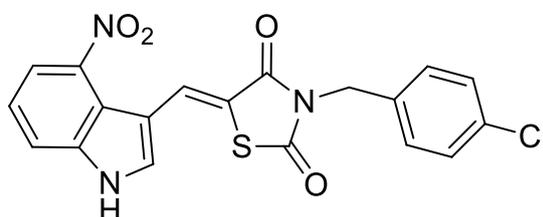
$C_{20}H_{15}N_3O_4S$. Massa molar: 393,42 g/mol. Rdt: 83,78%. P.F.: com decomposição. Rf: 0,59 (sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 1:1). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 12.88 (s, 1H). 8.32 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.93 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 7.39 (t, 1H $J = 7.6$ e 8.0 Hz), 7.20 (d, 2H $J = 8.4$ Hz), 7.14 (d, 2H $J = 8.0$ Hz), 4.76 (s, 2H), 2.26 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 20.64; 44.26; 109.04; 115.36; 117.68; 119.08; 119.50; 122.22; 127.74; 128.81; 129.15; 132.73; 132.96; 137.05; 139.17; 142.20; 165.30; 167.32. IV (KBr) cm^{-1} : 3311 (NH), 1721 (C=O), 1661 (C=O), 1595 (C=C).

- **3-benzil-5-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)-tiazolidina-2,4-diona (LQIT/GQ-406)**



$C_{19}H_{13}N_3O_4S$. Massa molar: 379,39 g/mol. Rdt: 94,09%. P.F.: com decomposição. Rf: 0,56 (sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 1:1). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 12.92 (s, 1H) 8.35 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.95 (d, 1H), 7.93 (d, 1H), 7.34 (m, 6H), 4.82 (s, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 44.48; 109.03; 115.07; 117.78; 119.06; 119.64; 122.14; 127.66; 127.74; 128.64; 128.96; 133.32; 135.73; 139.47; 142.17; 165.33; 167.40. IV (KBr) cm^{-1} : 3315 (NH), 1728 (C=O), 1658 (C=O), 1595 (C=C).

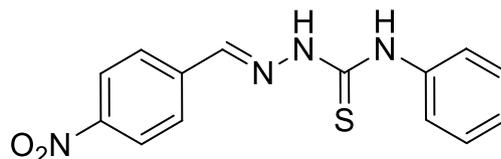
- **3-(4-clorobenzil)-5-((4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno)-tiazolidina-2,4-diona (LQIT/GQ-407)**



$C_{19}H_{12}ClN_3O_4S$. Massa molar: 413,83 g/mol. Rdt: 71,78%. P.F.: com decomposição. Rf: 0,50 (sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 1:1). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 12.95 (s, 1H) 8.34 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.94 (t, 2H), 7.40 (m, 3H), 7.35 (d, 2H), 4.81 (s, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 43.81 (CH₂); 109.02 (Cq); 115.38 (Cq); 117.64 (Cq); 119.12 (CH); 119.46 (CH); 128.61 (CH); 128.91 (CH); 129.64 (CH); 132.43 (Cq); 132.86 (CH); 134.67 (Cq); 139.04 (Cq); 142.21 (Cq); 165.27 (Cq); 167.37 (Cq). IV (KBr) cm^{-1} : 3295 (NH), 1731 (C=O), 1661 (C=O), 1590 (C=C).

4.1.1.3 Série LQIT/JF

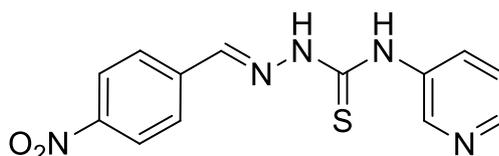
- **2-(4-nitro-benzilideno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-43)**



$C_{14}H_{12}N_4O_2S$. Massa molar: 300,34 g/mol. Rdt: 71,78%. P.F.: 179-180 °C. Rf: 0,50 (sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 1:1). RMN 1H (300 MHz, ppm, DMSO): δ 7,15

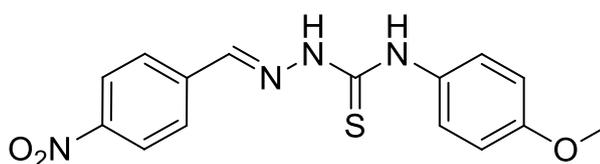
(t, 1H, J= 7,8Hz) δ 7,23 (dd, 1H, J= 7,2Hz) δ 7,33 (d, 1H, J= 7,8Hz) δ 7,41 (d, 2H, J= 7,2Hz) δ 7,55 (d, 2H, J= 9,9Hz) δ 8,20 (d, 2H, J= 9,3Hz) δ 8,23 (s, 1H, -C=N) δ 10,32 (s, 1H, NH) δ 12,09 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C : δ 120-140 (C=C); δ 147,7 (C=N); 176,5 (C=S). IV (ν cm^{-1} KBr): 3211 (NH) 1546 (C=N) 1510-1550 (O=N-O $^-$) 1337 (C=C) 1194 (C=S).

- **2-(4-nitro-benzilideno)-N-(piridin-3-il)-hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-47)**



$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$. Massa molar: 301,32 g/mol. Rdt: 96,56%. P.F.: 230-231 $^\circ\text{C}$. Rf: 0,50 (sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 1:1). RMN ^1H (300 MHz, ppm, DMSO): δ 7,44 (dd, 1H, J= 5.4Hz e 4.8Hz, piridil) δ 7,98 (d, 1H, J =5.7Hz, piridil) δ 8,20 (d, 2H, J = 8.7Hz, benzilidênico) δ 8,25 (s, 1H, N=CH-) δ 8,27 (d, 2H, J= 8.7Hz benzilidênico) δ 8,43 (d, 1H, J= 4,5Hz, piridil) δ 8,68 (s, 1H, piridil) δ 10,43 (s, 1H, -NH) δ 12,23 (s,1H, -NH). RMN ^{13}C : δ 123-140 (C=C piridil); δ 147,8 (C=N); 176,5 (C=S). IV (ν cm^{-1} KBr) 3274 (NH) 1516 (C=N) 1510-1550 (O=N-O $^-$) 1489 (C=C) 1029 (C=S).

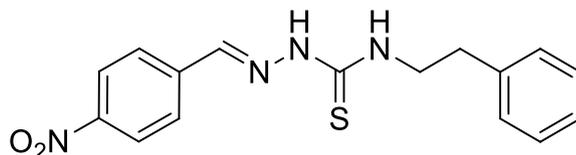
- **2-(4-nitro-benzilideno)-N-(4-metoxifenil)-hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-48)**



$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$. Massa molar: 301,32 g/mol. Rdt: 73,15%. P.F.: 215-216 $^\circ\text{C}$. Rf: 0,69 (sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 6:4). RMN ^1H (300 MHz, ppm, DMSO): δ 3,77 (s, 3H, -OCH $_3$) δ 7,44 (d, 2H, J = 2.4) δ 7,59 (d, 2H, J = 3.9) δ 8,18 (d, 2H, J = 9) δ 8,25 (d, 2H, J = 9) δ 8,34 (s, 1H, N=CH-) δ 10,34 (s, 1H, -NH) δ 12,16 (s, 1H, -NH). RMN ^{13}C : δ 55,2 (O-CH $_3$) δ 113-157 (C=C); δ 147,6 (C=N); 176,8 (C=S). IV (ν cm^{-1}

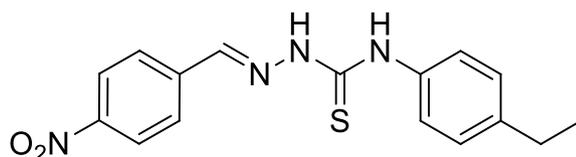
KBr) 3332 (NH) 1540 (C=N) 1510-1550 (O=N-O⁻) 1337 (C=C) 1191 (C-O) 1030 (C=S).

- **2-(4-nitro-benzilideno)-*N*-feniletil-hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-49)**



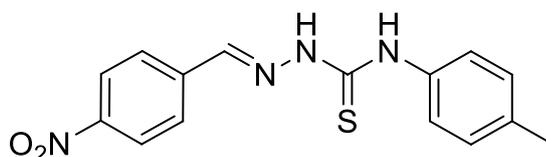
C₁₆H₁₆N₄O₂S. Massa molar: 328,39 g/mol. Rdt: 69,71%. P.F.: 203-204 °C. Rf: 0,52 (sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 7:3). RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO): δ 3,78 (t, 2H B-CH₂-) δ 3,81 (q, 2H, N-CH₂-) δ 7,20-7,35 (m, 5H) δ 8,06 (d, 2H, J= 9.0Hz) δ 8,13 (s, 1H, -HC=N,) δ 8,26 (d, 2H, J= 8.7Hz) δ 8,82 (t, 1H, J= 5.7Hz, NH) δ 11,81 (s, 1H, NH). RMN ¹³C: δ 34,7 (feniletil), δ 45,1 (feniletil) δ 123-147,5 (C=C aromáticos); δ 140,6 (C=N); 177,2 (C=S). IV (ν cm⁻¹ KBr) 3315 (NH) 1518 (C=N) 1510-1550 (O=N-O⁻) 1489 (C=C) 1107 (C=S).

- **2-(4-nitro-benzilideno)-*N*-(4-etilfenil)-hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-50)**



C₁₆H₁₆N₄O₂S. Massa molar: 328,39 g/mol. Rdt: 64,94%. P.F.: 222-223 °C. Rf: 0,45 (sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 7:3). RMN ¹H (300 MHz, ppm, DMSO): δ 1,19 (t, 3H, J= 7,5Hz, CH₃ B) δ 2,63 (q, 2H, J= 7,8Hz, -CH₂-) δ 7,23 (d, 2H, J= 8.1Hz, Aromático B) δ 7,44 (d, 2H, J= 8.1Hz, Aromático B) δ 8,19 (d, 2H, J= 9.0Hz, Aromático A) δ 8,22 (s, 1H, -HC=N,) δ 8,25 (d, 2H, J= 9.3Hz, Aromático A) δ 10,25 (s, 1H, NH) δ 12,05 (s, 1H, NH). RMN ¹³C: δ 15,6 (CH₃) δ 27,7 (CH₂), δ 123-147,5 (C=C aromáticos); δ 140,6 (C=N); 177,2 (C=S). IV (ν cm⁻¹ KBr) 3315 (NH) 1518 (C=N) 1510-1550 (O=N-O⁻) 1489 (C=C) 1107 (C=S).

- **2-(4-nitro-benzilideno)-N-(4-metilfenil)-hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-51)**



$C_{15}H_{14}N_4O_2S$. Massa molar: 314,08 g/mol. Rdt: 71,78%. P.F.: 220-221 °C. Rf: 0,57 (sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 7:3). RMN 1H (300 MHz, ppm, DMSO): δ 2,32 (s, 3H, CH₃) δ 7,20 (d, 2H, J= 8.4Hz) δ 7,41 (d, 2H, J= 8.1Hz) δ 8,20 (d, 2H, J= 9.0Hz) δ 8,22 (s, 1H, -HC=N,) δ 8,25 (d, 2H, J= 9.3Hz) δ 10,25 (s, 1H, NH) δ 12,04 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C : δ 20,6 (4-metil) δ 123-147,5 (C=C aromáticos); δ 140,6 (C=N); 177,2 (C=S). IV (v cm⁻¹ KBr) 3308 (NH) 1595 (C=N) 1510-1550 (O=N-O⁻) 1413 (C=C) 1023 (C=S).

4.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

4.2.1 Análise da citotoxicidade dos compostos em macrófagos J774

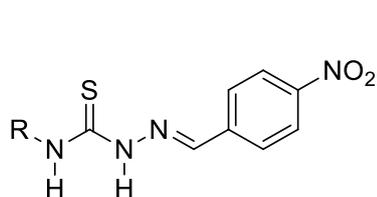
Os agentes quimioterápicos para o tratamento da LV disponíveis atualmente têm problemas relacionados ao desenvolvimento de cepas resistentes, severos efeitos colaterais e longa duração do tratamento com dolorosa via de administração. Decorridas várias décadas de estudos relativos a essa parasitose, ainda não existe tratamento realmente eficaz e atóxico. Neste cenário, torna-se importante o desenvolvimento e estudo de novos compostos que possam atuar como drogas leishmanicidas (MICHELETTI; BEATRIZ, 2012).

Um importante critério na prospecção de novos compostos sintéticos com atividade biológica é que eles não sejam tóxicos às células de mamíferos. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* deve ser o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos farmacológicos. Diversos métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de compostos, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes consistem em colocar o material a ser analisado direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos,

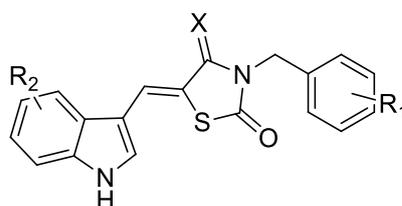
verificando-se, através de diferentes metodologias, alterações que podem resultar na inviabilidade celular (ROGERO *et al.*, 2003).

Portanto, inicialmente foi analisado o efeito citotóxico dos compostos sobre macrófagos da linhagem J774 através do método do MTT, e os resultados encontram-se apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Efeito citotóxico dos derivados sobre macrófagos J774



JF-43 – JF-51



GQS-90 – GQS94

GQ-403 – GQ-407

Compostos	R1	R2	X	CC ₅₀	
				µg/mL	µM
JF-43	Fenil	-	-	7,89 ± 0,68	26,27 ± 2,26
JF-47	3-Piridil	-	-	7,53 ± 1,36	24,99 ± 4,51
JF-48	4-OCH ₃ -Fenil	-	-	13,10 ± 0,59	43,47 ± 1,95
JF-49	Etil-Fenil	-	-	12,65 ± 0,87	38,52 ± 2,64
JF-50	4-Etil-Fenil	-	-	10,63 ± 1,06	32,37 ± 3,22
JF-51	4-CH ₃ -Fenil	-	-	8,49 ± 0,85	27,03 ± 2,70
GQS-90	2-Cl-6-F	4-NO ₂	S	3,81 ± 0,61	8,52 ± 1,36
GQS-91	2-Cl-6-F	5-OCH ₃	S	6,83 ± 0,09	15,80 ± 0,20
GQS-92	2-Cl-6-F	7-CH ₃	S	26,21 ± 0,87	63,00 ± 2,09
GQS-93	2-Cl-6-F	5-CH ₃	S	22,61 ± 1,19	54,34 ± 2,86
GQS-94	2-Cl-6-F	H	S	50,99 ± 3,56	126,83 ± 8,85
GQ-403	4-Br	4-NO ₂	O	27,78 ± 5,07	60,61 ± 11,06
GQ-404	4-NO ₂	4-NO ₂	O	13,44 ± 0,97	31,66 ± 2,28
GQ-405	4-CH ₃	4-NO ₂	O	46,75 ± 3,83	118,82 ± 9,73
GQ-406	H	4-NO ₂	O	42,66 ± 6,34	112,44 ± 16,71
GQ-407	4-Cl	4-NO ₂	O	10,63 ± 1,06	32,37 ± 3,22
AmB				12,40 ± 3,67	13,41 ± 3,97

Legenda: CC₅₀ – concentração capaz de causar a perda da viabilidade em 50% das células
 Fonte: a autora

Os compostos apresentaram resultados citotóxicos distintos. Dos 16 derivados analisados, 15 se mostraram menos tóxicos que a AmB.

Na série LQIT/JF, as tiossemicarbazonas, apresentaram uma variação citotóxica que foi de $24,99 \pm 4,51$ a $43,47 \pm 1,95$ μM . A média de toxicidade para essa série foi de $32,10$ μM evidenciado que essa foi a série mais tóxica dentre as três que foram analisadas nesse trabalho.

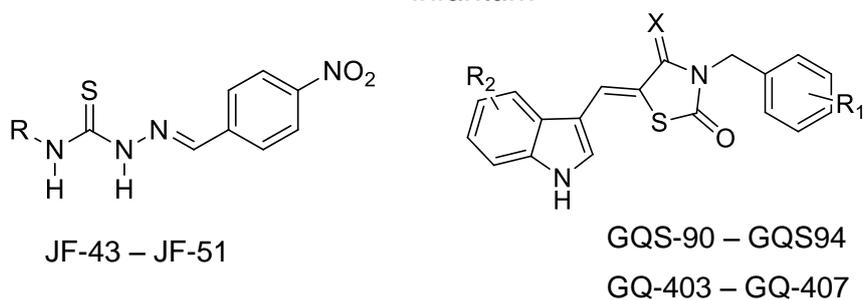
Dentre os compostos da série GQS, encontramos o composto mais tóxico e o composto menos tóxico de todo o estudo. O derivado GQS-90, mostrou-se o mais tóxico com CC_{50} de $8,52 \pm 1,36$ μM . O derivado GQS-94, por outro lado, mostrou-se de menor toxicidade alcançando uma CC_{50} de $126,83 \pm 8,85$ μM . A série apresentou uma média de citotoxicidade de $53,69$ μM

Na série GQ, as moléculas apresentaram um perfil tóxico com valores de CC_{50} que variaram de $31,66 \pm 2,28$ μM a $118,82 \pm 9,73$ μM . Obteve-se ao final média de citotoxicidade para a série de $71,18$ μM .

4.2.2 Atividade biológica em promastigotas de *L. infantum*

Paralelamente ao teste de citotoxicidade, foi realizada a investigação da atividade leishmanicida dos compostos sobre formas promastigotas de *L. infantum*. Diversos trabalhos na literatura utilizam formas promastigotas como modelo de *screening*, a fim de selecionar as moléculas mais promissoras para os testes subsequentes (SANCHEZ-MORENO *et al.*, 2011; ALIANÇA *et al.*, 2016). Os resultados desse ensaio encontram-se na Tabela 2.

Com a análise da Tabela 2, verifica-se que, ao final do tratamento, os parasitos mostraram-se menos sensíveis aos derivados da série JF (tiossemicarbazonas). Essa tendência pode observada em todos os representantes dessa série, uma vez que os valores de IC_{50} ficaram entre $95,67 \pm 2,83$ e $127,75 \pm 5,22$ μM . Dessa forma, é possível afirmar que em comparação às outras séries, as tiossemicarbazonas foram as moléculas que exibiram, no geral, ação leishmanicida menos expressiva.

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

Compostos	R1	R2	X	IC ₅₀	
				µg/mL	µM
JF-43	Fenil	-	-	38,37 ± 1,57	127,75 ± 5,22
JF-47	3-Piridil	-	-	29,25 ± 0,62	97,07 ± 2,05
JF-48	4-OCH ₃ -Fenil	-	-	36,73 ± 2,38	121,87 ± 7,89
JF-49	Etil-Fenil	-	-	33,87 ± 1,26	103,13 ± 3,83
JF-50	4-Etil-Fenil	-	-	33,80 ± 0,20	102,92 ± 0,60
JF-51	4-CH ₃ -Fenil	-	-	30,05 ± 0,89	95,67 ± 2,83
GQS-90	2-Cl-6-F	4-NO ₂	S	0,19 ± 0,07	0,42 ± 0,15
GQS-91	2-Cl-6-F	5-OCH ₃	S	5,83 ± 1,14	13,51 ± 2,63
GQS-92	2-Cl-6-F	7-CH ₃	S	35,52 ± 0,81	85,38 ± 1,94
GQS-93	2-Cl-6-F	5-CH ₃	S	9,97 ± 0,6	23,96 ± 1,44
GQS-94	2-Cl-6-F	H	S	31,15 ± 2,95	77,48 ± 7,33
GQ-403	4-Br	4-NO ₂	O	21,48 ± 0,05	46,86 ± 0,10
GQ-404	4-NO ₂	4-NO ₂	O	19,17 ± 0,89	45,17 ± 2,09
GQ-405	4-CH ₃	4-NO ₂	O	15,92 ± 0,28	40,46 ± 0,71
GQ-406	H	4-NO ₂	O	52,04 ± 0,39	142,43 ± 1,02
GQ-407	4-Cl	4-NO ₂	O	17,15 ± 0,37	41,44 ± 0,91
AmB				0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,02

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

Vários trabalhos na literatura relatam acerca das atividades biológicas das tiossemicarbazonas, em especial a expressiva ação contra tripanossomatídeos do gênero *Trypanosoma* como *T. cruzi* (ARCE *et al.*, 2017; SALSI *et al.*, 2018) e *T. brucei* (K POTIN *et al.*, 2016), e também do gênero *Leishmania*, em especial as espécies *L. major* (PERVEZ *et al.*, 2014) e *L. amazonensis* (MELOS *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2017). É válido ressaltar que as espécies de *Leishmania* utilizadas nos estudos anteriormente citados, são diferentes de *L. infantum*, e se expressam clinicamente na forma de leishmaniose tegumentar, encontrada no Velho e no Novo mundo, respectivamente.

Linciano e colaboradores (2018) avaliaram a ação de uma série de tiossemicarbazonas no tratamento de infecções por tripanossomatídeos das espécies *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. infantum*. O potencial antiparasitário dessa série foi representado pela porcentagem de inibição do crescimento de parasitos a 50 μM . Dos 28 compostos avaliados nesse estudo, 8 produziram atividade antiparasitária contra *T. brucei* e *T. cruzi* maior que 80%. Apesar da promissora atividade anti-*Trypanosoma*, os autores relataram que os compostos testados apresentaram baixa eficácia contra a forma amastigota intracelular de *L. infantum*, com porcentagem de inibição de crescimento celular não ultrapassando 40%. Esses dados corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho. Dessa forma, é possível então, que a falta de ação antiparasitária dos compostos testados, esteja associada às substituições realizadas que não exerceram efeito positivo na inibição da espécie de *Leishmania* estudada.

Analisando os resultados da Tabela 2 para os compostos tiazolidínicos LQIT/GQS e LQIT/GQ é possível observar que estes derivados exibiram, de forma geral, ação leishmanicida mais pronunciada, com destaque para a série LQIT/GQS.

Nota-se que dentro de suas respectivas séries, os derivados tiazolidínicos apresentaram respostas biológicas diferentes, as quais estão possivelmente associadas às modificações dos grupos substituintes, realizadas na estrutura química das moléculas de cada série. Ou seja, substituintes variados foram incorporados a um esqueleto estrutural, com o intuito de avaliar a influência destes grupos químicos com seus diferentes efeitos na resposta farmacológica.

O derivado GQS-91, que tem como substituinte na estrutura do indol, o radical metóxi, apresentou o segundo maior potencial leishmanicida, obtendo-se uma IC_{50} no valor de $13,51 \pm 2,63 \mu\text{M}$. Haavikko e colaboradores (2014) descreveram um novo conjunto de derivados heterocíclicos derivados do triterpenoide betulina e elegeram o derivado composto pelo 5-metoxi indol, como o mais ativo contra *L. donovani*. Derivados com substituição 5-metoxindol também foram destaque em estudo de novos compostos esquistossomicidas (MARTÍN, *et al.* 2015)

Os compostos GQS-92 e GQS-93 apresentam o mesmo grupo substituinte metil, no entanto, em posições diferentes do anel indol, e exibiram respostas biológicas bastante diferentes no ensaio *in vitro*. O GQS-93 apresentou IC_{50} de $23,96 \pm 1,44 \mu\text{M}$. Por outro lado, composto GQS-92 apresentou-se menos efetivo, com IC_{50} de $85,38 \pm 1,94$. Com essa análise é possível perceber que a utilização de substituintes na posição 5 do anel indol, pode ser um fator contributivo para o aumento da reatividade destes compostos com relação à sua eficácia de inibição do crescimento de *L. infantum*. Em alguns casos, a alteração das propriedades físico-químicas decorrentes de modificações estruturais de um composto pode alterar seu mecanismo de interação com a biofase, resultando em respostas biológicas distintas (FRAGA, 2011), como as observadas para o GQS-92 e GQS-93.

Das moléculas da série GQ, o composto GQ-405, possui o grupamento metil em sua estrutura, no entanto adicionado ao seu anel fenil. Esse derivado obteve uma IC_{50} de $40,46 \pm 0,71 \mu\text{M}$, sendo este o melhor resultado dentre os compostos desta série, indicando que a adição do grupamento metil ao anel fenil foi determinante pra atividade antiparasitária. A presença de um grupamento metil acarreta um aumento da lipofilicidade do composto, promovendo melhor permeação do mesmo através das membranas celulares (CONGIU; ONNIS, 2013).

Com os resultados obtidos, foi possível observar também que os compostos GQS-94 e GQ-406, os únicos dentre os testados que não possuem substituintes no indol e no fenil, respectivamente, obtiveram os resultados menos expressivos de suas respectivas séries, reforçando a importância da utilização de substituintes na molécula, a fim de elevar a atividade antiparasitária de derivados tiazolidínicos. Oliveira *et al.* (2015) realizaram a avaliação antiparasitária de derivados indólicos-tiazolidínicos, e constataram que os compostos não substituídos obtiveram

resultados menos expressivos frente a outro representante da família *Tripanossomatidae*. Dessa forma, é possível inferir que a utilização de radicais no anel indol e no anel fenil, é um fator que confere um aumento da atividade antiparasitária de derivados tiazolidínicos.

Nos derivados GQ-403 e GQ-407, os substituintes presentes em suas estruturas químicas são o bromo e o cloro. Essas moléculas apresentaram resultados contra *L. infantum* intermediários, obtendo resultados de IC₅₀ de 46,86 ± 0,10 µM e 41,44 ± 0,91 µM, mostrando-se mais ativas que o derivado sem substituição GQ-406. A literatura evidencia a importância da substituição por átomos de halogênios em estruturas químicas a fim de incrementar a atividade biológica, resultando em efeitos positivos à resposta farmacológica (THOMAS, 2003). Segundo Hernandez e colaboradores (2010), a utilização de substituintes halogenados contribui para a estabilidade da ligação fármaco-receptor.

Os derivados GQ-404 e GQS-90 possuem a semelhança de terem como substituinte o grupamento nitro (-NO₂), o que conferiu a essas moléculas um efetivo potencial antiparasitário, obtendo-se IC₅₀ de 45,17 ± 2,09 µM e 0,42 ± 0,15 µM, respectivamente.

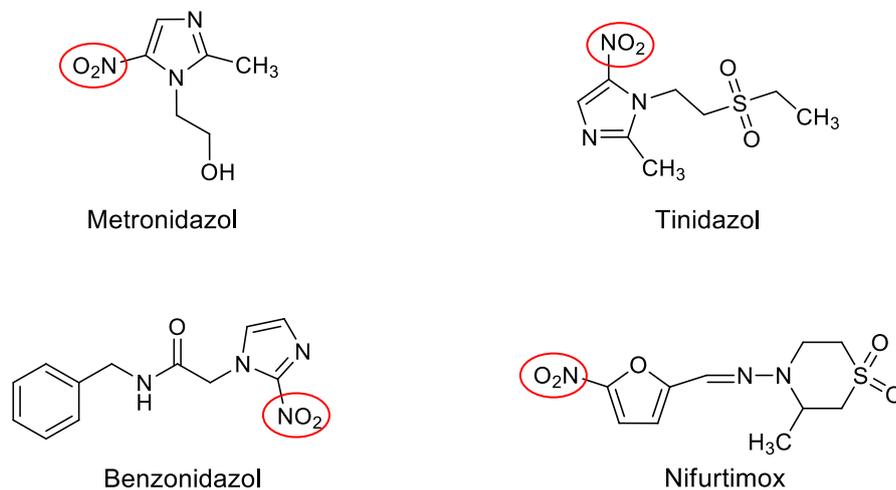
A adição do substituinte nitro (-NO₂) do núcleo indol a essas moléculas contribuiu de forma positiva para a ação leishmanicida. Alguns trabalhos relatam uma maior eficiência antiparasitária em moléculas que possuam o grupamento NO₂ (NARVÁEZ, 1983; TENÓRIO, 2005). O grupo nitro presente nesses compostos é chamado de parasitóforo, por ser de extrema importância à ação antiparasitária, apresentando-se como uma excelente escolha para estudo e desenvolvimento de futuros candidatos a fármacos antiparasitários, inclusive leishmanicidas (PAULA, SERRANO; TAVARES, 2009).

Diversos trabalhos descrevem a ação leishmanicida de nitrocompostos (MICHELETTI; BEATRIZ, 2012; BRITA *et al.*, 2014). Petri e Silva (2016) analisaram derivados nitro-heterocíclicos como uma nova alternativa contra *Leishmania*. A atividade foi medida em promastigotas e em amastigotas intracelulares de *L. infantum*, alcançando resultados promissores para ambas as formas evolutivas do parasito. Em estudo recente promastigotas foram expostas a derivados nitroheterocíclicos, com substituintes na posição 4 do anel fenil, incluindo o

grupamento nitro e metil e obtiveram resultados positivos frente a espécie *L. amazonensis* (MENDONÇA et al., 2019).

Muitos nitrocompostos destacam-se na terapêutica antiparasitária, o que ressalta a importância desta classe de compostos. Antiparasitários comercialmente vendidos (Figura 22), tais como o metronidazol, o tinidazol, o benzonidazol e o nifurtimox, apresentam o processo de biorredução enzimática do grupo nitro como possível mecanismo de ação, resultando na formação de radicais livres com toxicidade prioritária para as células bacterianas e parasitárias (TOCHER, 1997; PAULA, SERRANO; TAVARES, 2009).

Figura 22 - Nitrocompostos de destaque na terapêutica antiparasitária

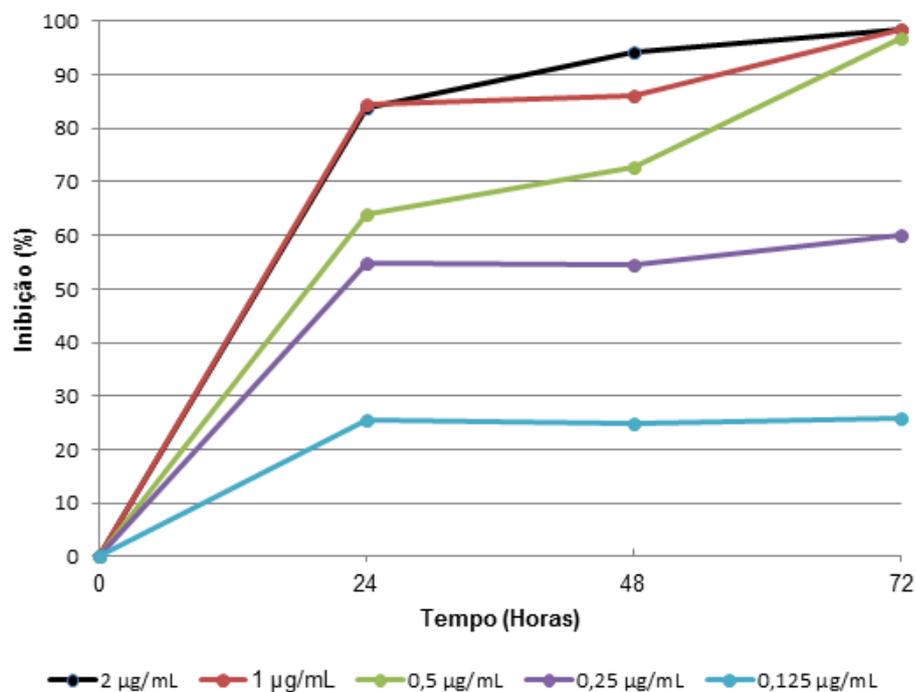


Fonte: TOCHER, 1997

No possível mecanismo de ação do grupamento nitro está envolvida a NADPH citocromo P450 redutase encarregada pela formação de um radical nitro intermediário com subsequente formação de hidroxilamina (R-NHOH). Em seguida, o oxigênio molecular (O₂) é reduzido ocasionando a formação do íon superóxido (O₂⁻) e regenerando o grupo NO₂ num processo conhecido como ciclo redox. (MAYA et al., 2007). Após sua formação, o íon superóxido é captado pela enzima superóxido dismutase gerando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que, através da reação de Haber-Weiss, forma o radical hidroxila (·OH), sendo este altamente tóxico para o parasito (DIAS et al., 2009).

O derivado GQS-90 foi o que mais se destacou nesse estudo, por apresentar a atividade leishmanicida mais promissora dentre os derivados testados, com o resultado que mais se aproximou do efeito da Anfotericina B, medicamento comercialmente vendido para o tratamento da leishmaniose e que nesse trabalho foi utilizado como controle. Na Figura 23, é possível analisar o efeito leishmanicida dessa molécula no decorrer do período de tratamento.

Figura 23 - Inibição causada pelo GQS-90 no crescimento de promastigotas de *L. infantum* no decorrer das 72 horas de tratamento

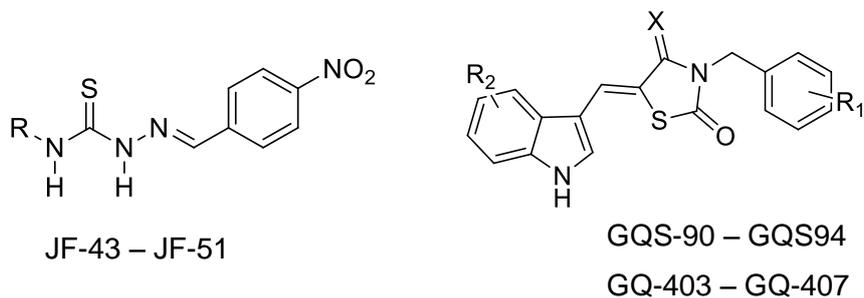


Fonte: a autora

O derivado GQS-90 apresenta, desde as primeiras 24h de tratamento, uma ação leishmanicida expressiva, uma vez que já nesse tempo, quatro das cinco concentrações testadas apresentam mais de 50% de inibição. A inibição da concentração de 0,125 µg/mL, a menor para essa análise, obteve um resultado que pouco variou durante as 72 h de experimento, mantendo o crescimento das leishmanias de forma estática. As concentrações de 2, 1 e 0,5 µg/mL, ao final do experimento, exibiram percentuais de inibição muito semelhantes, sugerindo que um platô de concentração farmacológica tenha sido atingido (MOREIRA, 2015).

4.2.3 Determinação do índice de seletividade (IS)

Os valores obtidos nos ensaios da citotoxicidade (CC_{50}) foram comparados aos valores de IC_{50} obtidos no ensaio *in vitro* das formas promastigotas, permitindo a determinação do índice de seletividade (IS), que informa o quanto a molécula é seletiva para o parasito em relação às células de mamífero. A análise desses dados e a indicação de seletividade dos compostos estudados são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados obtidos de IC₅₀, CC₅₀ e IS dos derivados das séries GQS, GQ e JF

Compostos	R1	R2	X	CC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IS
JF-43	Fenil	-	-	26,27 ± 2,26	127,75 ± 5,22	NS
JF-47	3-Piridil	-	-	24,99 ± 4,51	97,07 ± 2,05	NS
JF-48	4-OCH ₃ -Fenil	-	-	43,47 ± 1,95	121,87 ± 7,89	NS
JF-49	Etil-Fenil	-	-	38,52 ± 2,64	103,13 ± 3,83	NS
JF-50	4-Etil-Fenil	-	-	32,37 ± 3,22	102,92 ± 0,60	NS
JF-51	4-CH ₃ -Fenil	-	-	27,03 ± 2,70	95,67 ± 2,83	NS
GQS-90	2-Cl-6-F	4-NO ₂	S	8,52 ± 1,36	0,42 ± 0,15	20,28
GQS-91	2-Cl-6-F	5-OCH ₃	S	15,80 ± 0,20	13,51 ± 2,63	1,16
GQS-92	2-Cl-6-F	7-CH ₃	S	63,00 ± 2,09	85,38 ± 1,94	NS
GQS-93	2-Cl-6-F	5-CH ₃	S	54,34 ± 2,86	23,96 ± 1,44	2,26
GQS-94	2-Cl-6-F	H	S	126,83 ± 8,85	77,48 ± 7,33	1,63
GQ-403	4-Br	4-NO ₂	O	60,61 ± 11,06	46,86 ± 0,10	1,29
GQ-404	4-NO ₂	4-NO ₂	O	31,66 ± 2,28	45,17 ± 2,09	NS
GQ-405	4-CH ₃	4-NO ₂	O	118,82 ± 9,73	40,46 ± 0,71	2,93
GQ-406	H	4-NO ₂	O	112,44 ± 16,71	142,43 ± 1,02	NS
GQ-407	4-Cl	4-NO ₂	O	32,37 ± 3,22	41,44 ± 0,91	NS
AmB				13,41 ± 3,97	0,13 ± 0,02	103,15

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

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

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

NS – não seletivo

Fonte: a autora

Dos 16 compostos avaliados, 6 tiveram seu índice de seletividade calculado, a maioria deles pertencentes à série LQIT/GQS. Os demais não se mostraram seletivos, em decorrência dos resultados de alta toxicidade e/ou inexpressiva ação leishmanicida.

Os compostos GQS-91, GQS-93, GQS-94, GQ-403 e GQ-405 apresentaram índices de seletividade que variaram de 1,16 a 2,93. Para Bézivin e colaboradores (2003), o índice de seletividade é considerado significativo para valores maiores que 3. Dessa forma, é possível afirmar que essas moléculas foram seletivas para o parasito em relação à célula de mamífero, mas não de forma significativa.

Apesar de não ficar próximo do alto índice de seletividade apresentado pela Amb que foi de 103,15; o composto QQS-90 foi o de maior relevância, pois além de ser o mais eficaz na inibição do parasito, foi também o mais seletivo desse estudo, exibindo um IS de 20,28. Davanço *et al.* (2011) consideram que valores maiores que 10 podem ser indicativos de alta seletividade, e nesse nível pode-se enquadrar o derivado GQS-90. Esse dado reflete a alta seletividade desta molécula com relação à linhagem de células de mamífero, demonstrando que o composto testado é mais citotóxico para a linhagem de células de *L. infantum*.

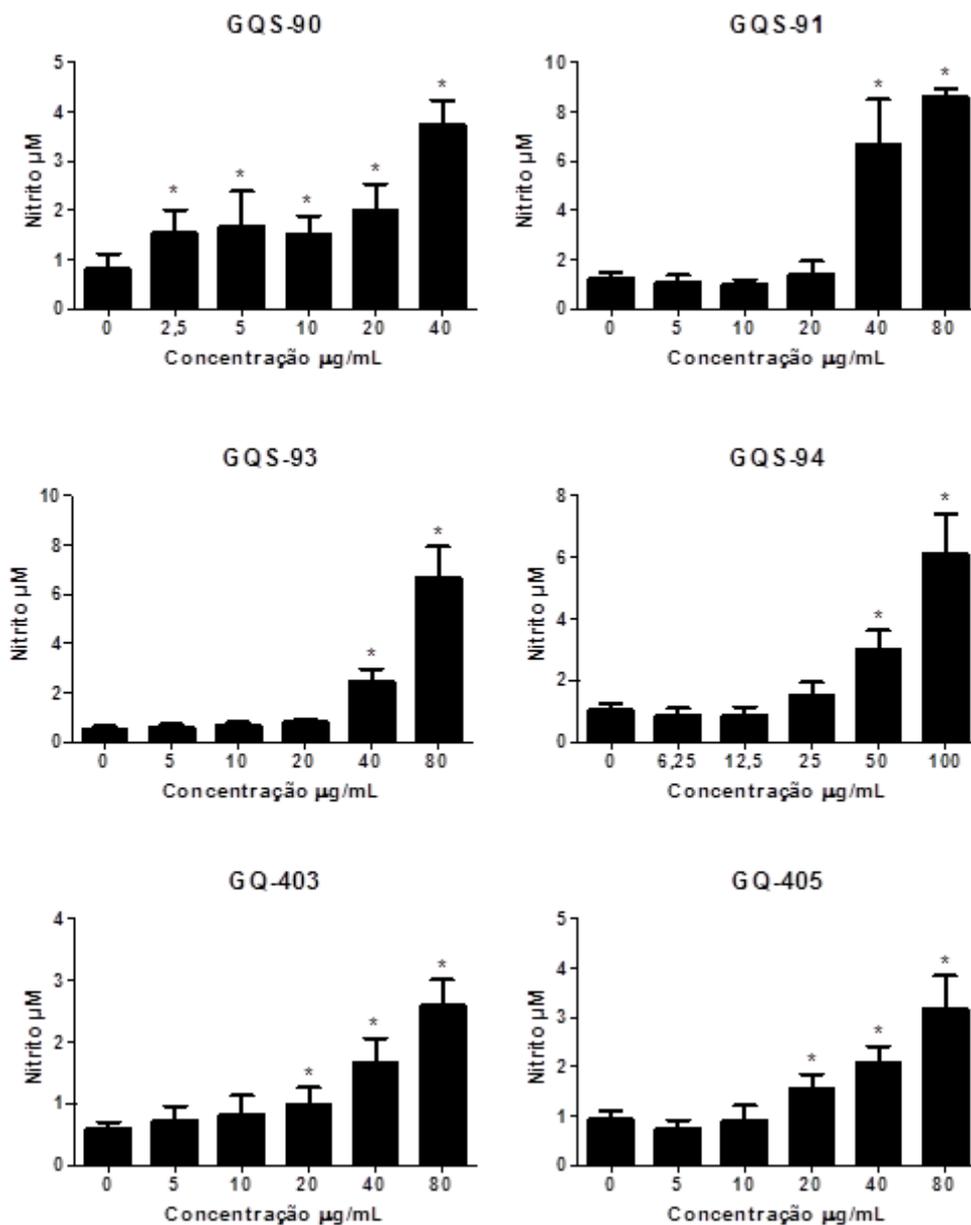
4.2.4 Dosagem de óxido nítrico

Em conjunto ao teste de citotoxicidade, foi realizada a dosagem do sobrenadante das células, utilizando o reagente de Griess, com o objetivo de avaliar se os compostos testados foram capazes de induzir um aumento na produção de óxido nítrico (NO). O óxido nítrico apresenta um importante papel na resposta imune contra os tripanossomatídeos uma vez que é um dos principais mecanismos responsáveis pela eliminação da forma amastigota (intracelular) destes parasitos. Em culturas de células, o NO liberado pelas células é rapidamente convertido em derivados de nitrogênio, dentre estes o nitrito é o mais estável e pode ser mensurado (PINHO *et al.*, 2011).

Em estudo publicado em 2013, Ghosh e colaboradores destacaram a produção de NO a partir de macrófagos tratados com os fármacos Miltefosina, Anfotericina B e Paromicina, como de extrema importância para a atividade leishmanicida desses fármacos.

A Figura 24 traz os resultados da dosagem de NO para as culturas de células tratadas com os compostos com índice de seletividade positivo. Todos os compostos avaliados promoveram aumento significativo ($p < 0,05$) na produção de óxido nítrico por macrófagos J774, em especial nas maiores concentrações de cada experimento, 40 e 80 $\mu\text{g/mL}$ para o GQS-91 e GQS-93; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ para o GQS-94; 20, 40 e 80 $\mu\text{g/mL}$ para o GQS-403 e GQS-405.

Figura 24 - Resultado da dosagem de NO de macrófagos tratados com derivados das séries LQIT/GQS e LQIT/GQ



Legenda: Os valores apresentam a média de dos experimentos realizados em duplicata biológica e quadruplicata técnica \pm desvio padrão. * Corresponde a valores significativos $p < 0,05$.

Fonte: a autora

Nessa investigação o derivado GQS-90 se destacou por promover estímulo da produção de NO, apresentando resultado significativo em todas as concentrações testadas. É importante levar em consideração também que uma produção exacerbada deste radical pode também ser danosa para as células

do hospedeiro, o que pode ser causa da citotoxicidade e do baixo valor de CC_{50} apresentado por este composto (BILITEWSKI, 2008). O GQS-90 pode ter atuado como uma molécula doadora de radicais NO. Dessa forma, o aumento na produção de NO observado poderia ser resultado, tanto da estimulação dos macrófagos para a produção de NO, quanto da própria introdução destes radicais ao sistema. Neste caso, seria de se esperar que mesmo em baixas concentrações da molécula, já fossem observadas alterações significativas nos níveis de nitrito nos sobrenadantes testes (SCHÖNAFINGER, 1999; DOS SANTOS *et al.*, 2011).

4.2.5 Análise morfológica e ultraestrutural

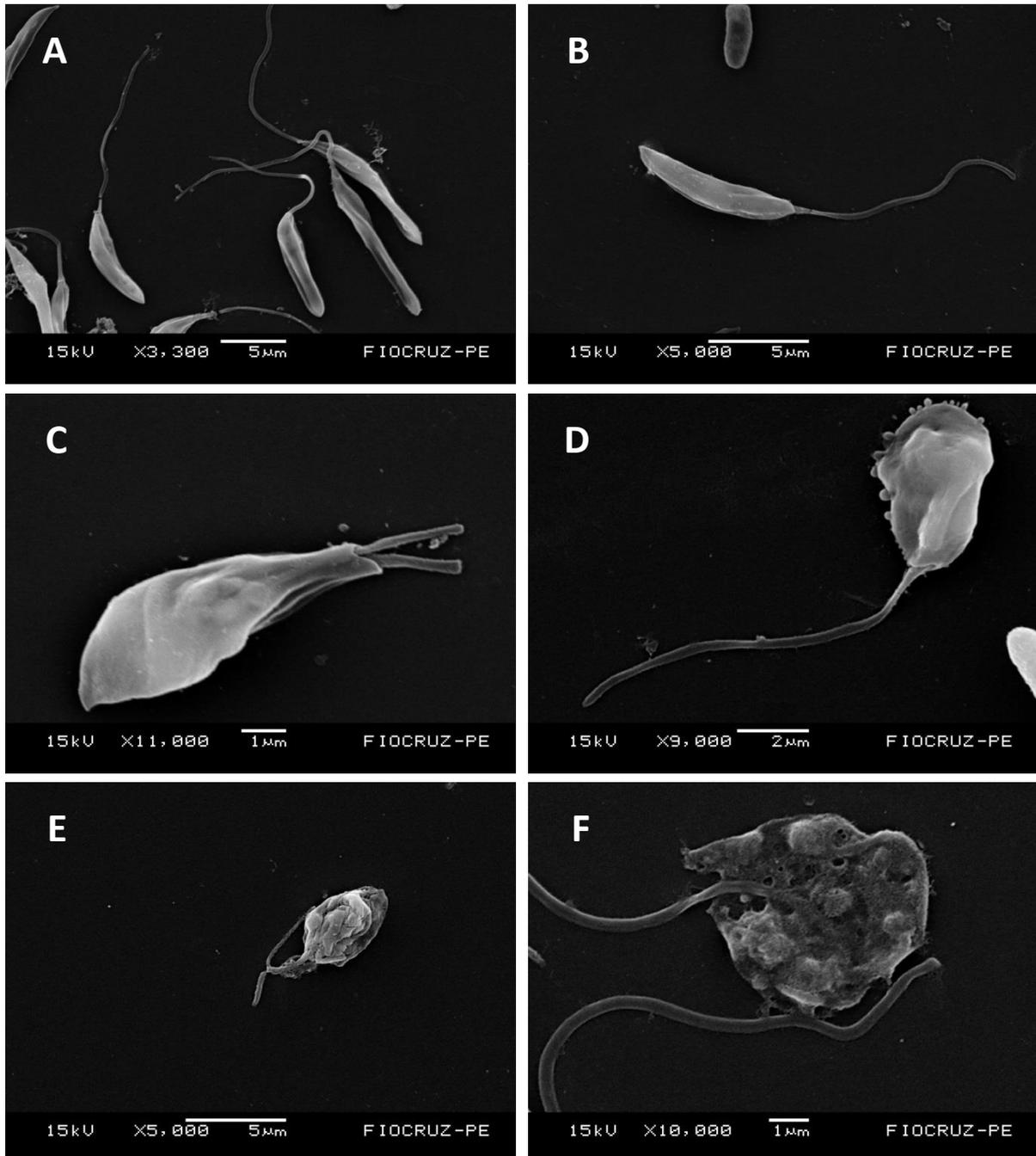
Após a análise dos resultados dos testes anteriormente descritos, a molécula com potencial leishmanicida mais promissor foi selecionada para a análise morfológica e ultraestrutural. Promastigotas de *L. infantum* não tratadas e tratadas com o composto GQS-90 foram analisadas por microscopia eletrônica para identificar possíveis alterações celulares.

Nas análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV), as células não tratadas apresentaram morfologia do corpo fusiforme com topologia das superfícies normais e longo flagelo preservado, características comuns para esse parasito (Figura 25, A e B). Por outro lado, nas células tratadas com o GQS-90, nas concentrações de 0,42 e 0,84 μM , foi possível ver alterações na morfologia do protozoário. As células apresentaram-se mais arredondadas, inchadas, com redução flagelar significativa (Figura 25, C e E). Também foi possível constatar, alterações da topologia como presença de ondulações na superfície celular (Figura 25, D e F).

Além da função de movimentação do parasito, o flagelo e especialmente a bolsa flagelar está envolvida em outras atividades, uma vez que há evidências morfológicas e citoquímicas de que essa é uma região de intensa atividade endocítica e exocítica (SOUZA, 2002). A membrana plasmática desempenha função de adesão do parasito às células do intestino do inseto vetor e permite sua sobrevivência e diferenciação, além de estar envolvida no processo de interação entre o parasito e o hospedeiro (SOUZA, 2008; SOUZA;

CARVALHO; BARRIAS, 2010). Dessa maneira, é possível ressaltar a importância dessas estruturas para a viabilidade celular.

Figura 25 - Eletromicrografia de promastigotas de *L. infantum* não tratadas e tratadas com o derivado GQS-90



Legenda: (A e B) Promastigotas controle (não tratadas) apresentando forma fusiforme e comprimento do flagelo normal. (C e D) Promastigotas tratadas com $0,42 \mu\text{M}$ ($1x \text{IC}_{50}$) do composto GQS-90 mostrando encurtamento do flagelo e alterações na morfologia celular. (E e F) Promastigotas tratadas com $0,84 \mu\text{M}$ ($2x \text{IC}_{50}$) do composto GQS-90 mostrando encurtamento do flagelo e alterações na morfologia celular.

Fonte: a autora

Na literatura encontramos trabalhos, nos quais os compostos avaliados causam alterações celulares semelhantes às causadas pelo GQS-90, no entanto, em concentrações mais elevadas. Britta *et al.*, 2014 encontraram alterações na forma e tamanho e desintegração celular, utilizando promastigotas de *L. amazonensis* após tratamento com nitrocomposto na concentração de 3,8 μM . Achados similares aos nossos, para a mesma cepa de *L. infantum* utilizada nesse trabalho, foram descritos após 72 h de tratamento com derivados ftalimido-tiazóis em concentrações que variaram de 9,81 a 27,74 μM (ALIANÇA *et al.* 2017).

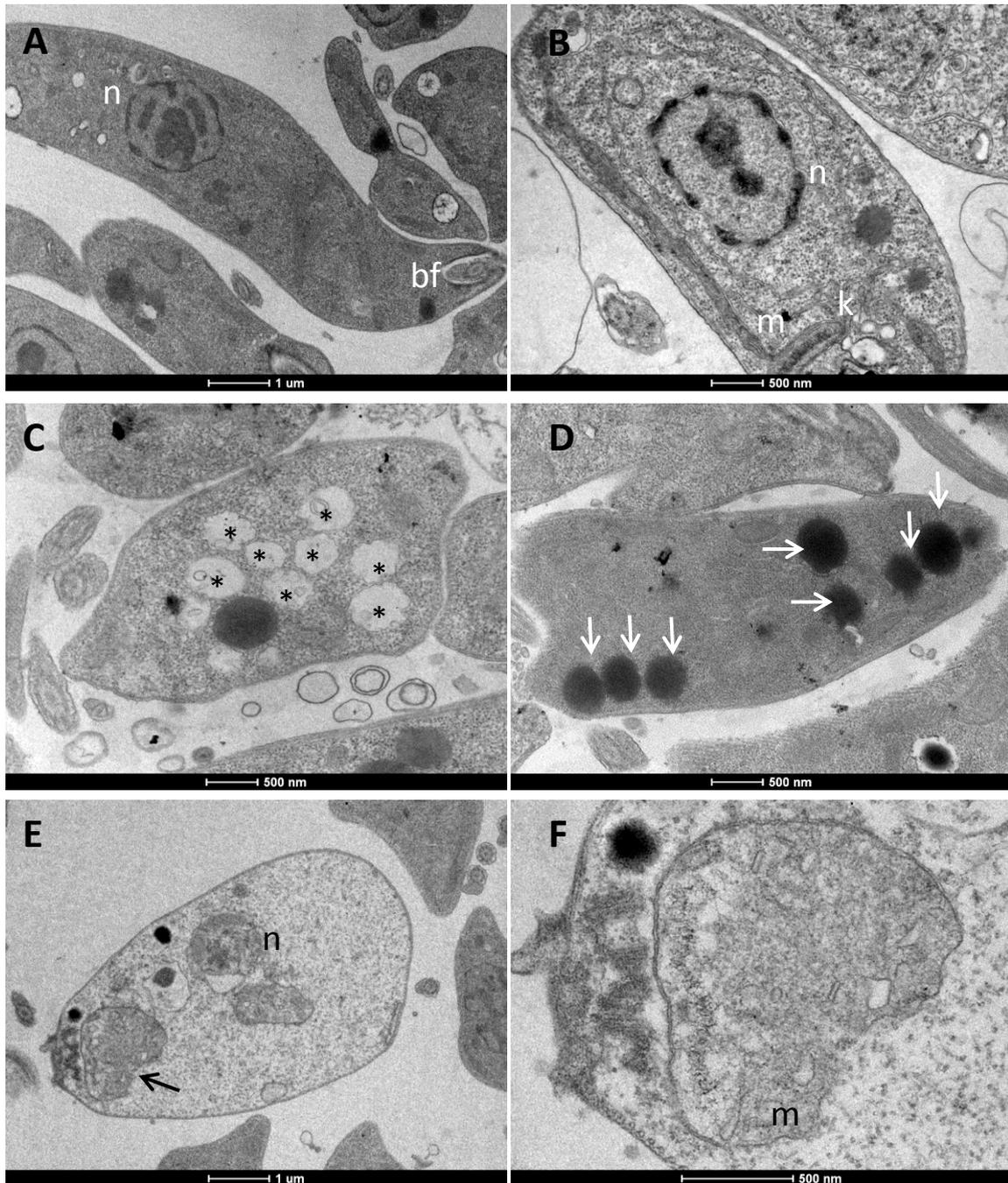
A microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) constitui-se como excelente ensaio para a avaliação de alterações morfológicas dos parasitos (BRITTA *et al.*, 2014). Geralmente as promastigotas apresentam morfologia fusiforme alongada com núcleo e cinetoplasto altamente definidos. No entanto, no presente estudo, os parasitos tratados por 72h com o composto GQS-90, sofreram alterações morfológicas, como encolhimento dos parasitos, vacuolização do citoplasma, aparecimento de grande quantidade de inclusões eletrondensas, inchaço da mitocôndria, desfiguração do núcleo e rarefação celular (Figura 26).

Resultados semelhantes foram relatados por Mendonça e colaboradores (2019), que investigaram a ação leishmanicida de compostos nitro-heterocíclicos em *L. amazonensis*, e obtiveram os melhores resultados na concentração de 1,56 μM . Nesse estudo também foi realizado o ensaio de citometria de fluxo para detecção da expressão da fosfatidilserina, e os autores indicaram a apoptose como processo de morte celular dos parasitos após 48h de tratamento com os nitro-derivados.

Kaczanowski *et al.* (2011) descreveram alterações da morfologia celular e vacuolizações do citoplasma como características de morte celular por apoptose, em organismos eucariotos, semelhante ao que foi encontrado no presente estudo. De acordo com Lee e colaboradores (2002), protozoários parasitos passam por um processo de morte celular programada semelhante a apoptose no final da fase estacionária ou quando sofrem a ação de alguma droga antiproliferativa. Um processo de morte celular programada semelhante

a apoptose pode ter ocorrido com as nossas células após o tratamento com o derivado testado.

Figura 26 - Eletromicrografia de promastigotas de *L. infantum* não tratadas e tratadas com o derivado GQS-90



Legenda: (A e B) Promastigotas não tratadas com forma fusiforme, estrutura normal do núcleo (n), bolsa flagelar (bf) e cinetoplasto (k). (C e D) Promastigotas tratadas com 0,42 μM ($1\times \text{IC}_{50}$) do composto GQS-90, apresentando vários espaços eletrólucos (*) e presença de corpos eletrondensos (seta). (E e F) Promastigotas tratadas com 0,84 μM ($2\times \text{IC}_{50}$) do composto GQS-90 mostrando rarefação celular, inchaço mitocondrial (m) e alterações no núcleo (n).

Fonte: a autora

Uma das características da morte celular programada por apoptose é a disfunção mitocondrial, uma vez que alterações na permeabilidade ou no potencial de membrana desta organela estão envolvidas na sinalização e liberação de vários fatores que disparam este processo de morte celular (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007).

Alguns trabalhos utilizando medicamentos de referência para o tratamento da leishmaniose tem demonstrado a indução de morte celular por apoptose como ação principal sobre parasitos. No trabalho realizado por Paris e colaboradores (2004) foi relatada a atividade da miltefosina sobre promastigotas de *L. donovani* através de um processo de morte celular com numerosas alterações citoplasmáticas, nucleares e de membrana, característica de apoptose em metazoários, incluindo retração celular, fragmentação de DNA e exposição da fosfatidilserina. Achados semelhantes foram encontrados por Marinho *et al.* (2011) que analisaram a atividade da miltefosina em promastigotas de *L. amazonensis* e por Khademvatan *et al.* (2011) os quais trabalharam com as espécies *L. major* e *L. tropica*. Um estudo mais recente, elucidou o mecanismo de morte celular pela KalsomeTM10, uma nova anfotericina lipossomal, a qual também apresentou indução de morte por apoptose para promastigotas de *L. donovani* (SHADAB *et al.* 2017).

No presente trabalho não podemos confirmar a morte celular programada, uma vez que não foram utilizados marcadores específicos para apoptose. São necessários estudos mais detalhados, utilizando marcadores apropriados para diferentes alvos celulares, principalmente aqueles envolvidos no ciclo celular, a fim de estabelecer de forma mais exata o alvo celular onde o composto pode estar agindo e resultando na inviabilidade celular.

4.2.6 Atividade biológica em amastigota intracelular de *L. infantum*

O alto valor de índice de seletividade foi o parâmetro utilizado para selecionar o composto GQS-90 para os testes biológicos com as forma amastigota intracelular. Nas pesquisas de novos medicamentos com atividade leishmanicida, além de avaliar a citotoxicidade sobre células de mamíferos, são importantes os estudos com as amastigotas intracelulares, uma vez que essa é

a forma evolutiva mais relevante, que está presente no hospedeiro vertebrado e que é responsável pelas manifestações clínicas da doença (KIMA, 2007).

Os resultados (Tabela 4) demonstram que o derivado GQS-90 foi eficaz na diminuição da carga parasitária no interior dos macrófagos e no índice de sobrevivência (Figura 27) destas formas no interior da célula, obtendo-se um IC_{50} de $0,64 \pm 0,09 \mu M$. O índice de seletividade foi de 13,31. Comparando os grupos tratados e não tratado, o número médio de parasitos por macrófagos, diminuiu no tratamento com o derivado tiazolidínico de forma significativa nas concentrações de 0,42 e 0,84 μM

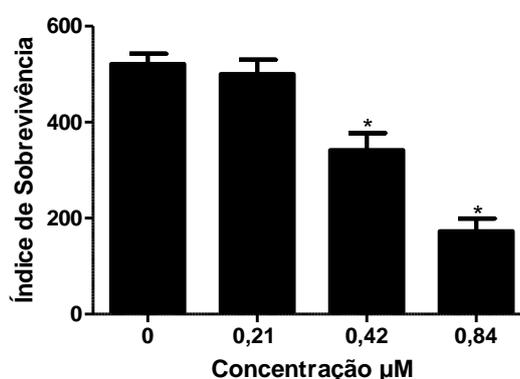
Tabela 4 - Ação citotóxica, leishmanicida e Índice de seletividade para forma amastigota de *L. infantum* tratada com GQS-90

Composto	Macrófago J774	Amastigota Intracelular	IS
	CC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	
GQS-90	$8,52 \pm 1,36$	$0,64 \pm 0,09$	13,31

Legenda: IC_{50} – concentração que inibe 50% do crescimento das formas amastigotas de *L. infantum*. CC_{50} – concentração capaz de causar a perda da viabilidade em 50% dos macrófagos. IS (Índice de seletividade) – CC_{50} Macrófagos/ IC_{50} Amastigotas

Fonte: a autora

Figura 27 - Índice de sobrevivência de amastigotas de *L. infantum* em macrófagos após tratamento com GQS-90

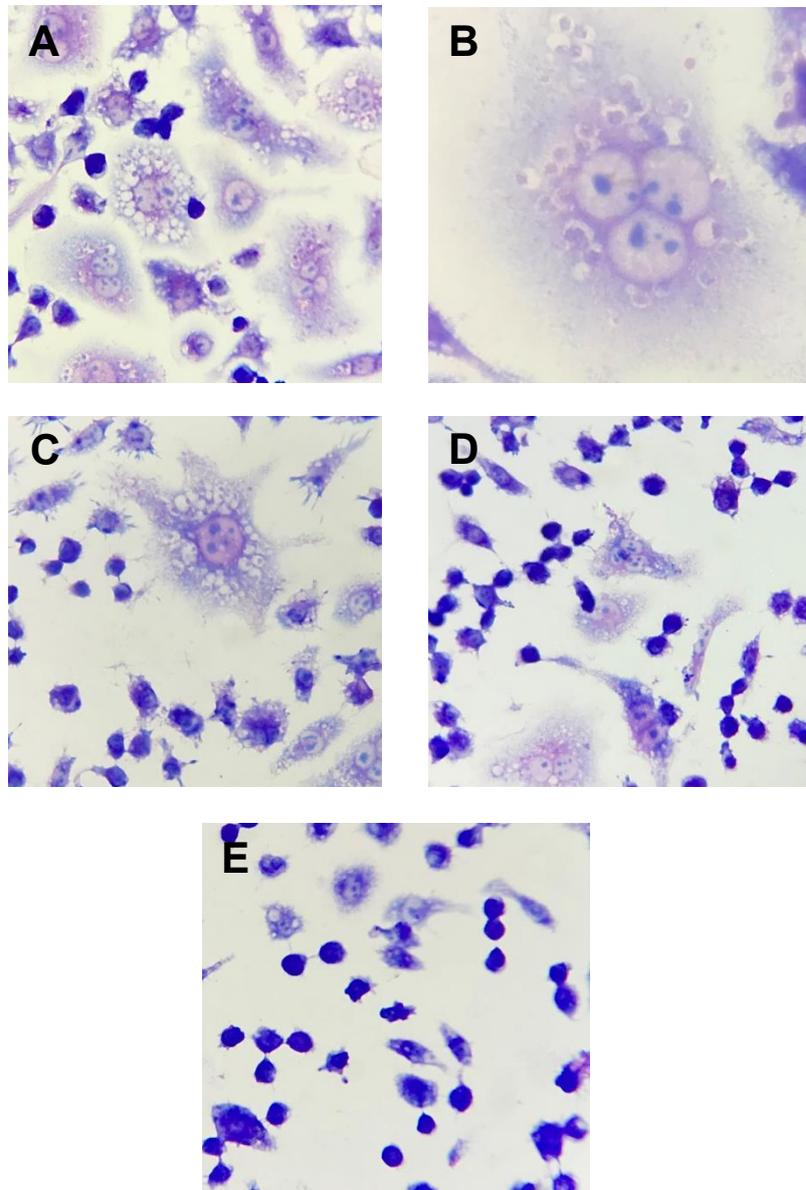


Legenda: Os valores apresentam a média de dos experimentos realizados em duplicata biológica e triplicata técnica \pm desvio padrão. * Corresponde a valores significativos $p < 0,05$.
Fonte: a autora

O valor de IC_{50} e o índice de seletividade obtido para a forma amastigota foram menos efetivos que para as promastigotas, demonstrando assim uma maior eficácia dos compostos para esta última. É importante levar em conta que a ação sobre a forma amastigota é dificultada pela necessidade de permeação do composto através da membrana do macrófago antes de chegar ao parasito no interior da célula, podendo assim, haver perda de efetividade do composto para essa forma evolutiva (MACIEL-REZENDE *et al.*, 2013). Uma maior efetividade de inibição das formas promastigotas em relação às amastigotas já era esperada e foi também observada nos estudos de Shokri e colaboradores (2017) e Khalili e colaboradores (2019).

Também é possível analisar a atividade anti-amastigota do GQS-90 pela Figura 28, na qual é possível observar a inibição da forma amastigota nas três concentrações testadas: 0,21 μM (C), 0,42 μM (D) e 0,84 μM (E).

Figura 28 - Macrófagos J774 infectados com *L. infantum* não tratados e tratados com o GQS-90

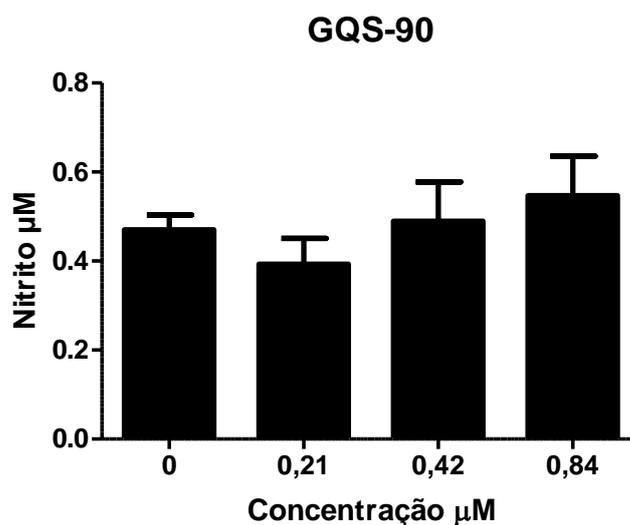


Legenda: Imagens de microscopia óptica das lâminas com macrófagos J774 infectados por amastigotas intracelulares de *L. infantum* por 24h. (A) Células não tratadas. (B) Macrófago infectado não tratado em destaque. (C) Células tratadas com 0,21 μM do GQS-90 ($0,5 \times \text{IC}_{50}$). (D) Células tratadas com 0,42 μM do GQS-90 ($1 \times \text{IC}_{50}$). (E) Células tratadas com 0,84 μM do GQS-90 ($2 \times \text{IC}_{50}$).

Fonte: a autora

Ao final, também foi realizada a dosagem de NO do sobrenadante dos macrófagos infectados. O resultado encontra-se na Figura 29.

Figura 29 - Resultado da dosagem de NO de macrófagos infectados por *L. infantum* tratados com o composto GQS-90



Legenda: Os valores apresentam a média de dos experimentos realizados em duplicata biológica e triplicata técnica \pm desvio padrão.

Fonte: a autora

Apesar de este ser um dos principais mecanismos responsáveis pela eliminação da forma amastigota destes parasitos; em nosso estudo não foi observado aumento de NO de forma significativa nas concentrações testadas em ensaio utilizando-se essa forma evolutiva. É válido lembrar que no ensaio de citotoxicidade, observamos aumento significativo de NO em todas concentrações testadas, no entanto, essas concentrações foram bem maiores do que as utilizadas para o ensaio com amastigotas. Esses dados sugerem que a molécula GQS-90 atue por outro mecanismo contra parasitos de *L. infantum*. Estudos mais aprofundados são necessários para elucidar o possível efeito imunomodular do composto, pois a produção de NO não constitui-se como a única via que os macrófagos utilizam para a inibição parasitária. Outros recursos, como espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, produção de várias citocinas Th1, lisozimas e outras moléculas microbicidas podem ser utilizadas para destruição do parasito no interior da célula (SINGH *et al.*, 2012).

5 CONCLUSÕES

Os compostos das séries GQS, GQ e JF foram sintetizados com êxito através de uma rota sintética que se mostrou adequada e de rápida obtenção dos derivados os quais apresentaram rendimentos reacionais satisfatórios. Adicionalmente, todos os compostos sintetizados tiveram suas estruturas comprovadas pelas técnicas de análises espectrofotométricas no infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono treze.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado em macrófagos J774 para todos os compostos sintetizados, obtendo-se valores de CC_{50} que variaram de 126,83 μM a 8,52 μM . Dos 16 compostos avaliados, 15 mostraram-se menos tóxicos que a AmB. Os compostos empregados quanto à avaliação leishmanicida *in vitro* frente às formas promastigotas de *L. infantum* mostraram resultados distintos à depender da série analisada em questão. Os valores de IC_{50} variaram de 142,43 μM a 0,42 μM .

Dos 16 compostos avaliados, 6 tiveram seu índice de seletividade calculado. Nesta análise o composto GQS-90 mostrou-se o mais promissor, e foi, portanto, escolhido para as avaliações posteriores.

Todos os compostos avaliados promoveram aumento significativo ($p < 0,05$) na produção de óxido nítrico, em especial nas maiores concentrações de cada experimento.

Na análise por MEV e MET as células tratadas com o GQS-90 apresentaram alterações na morfologia do protozoário, causadoras da morte do parasito, possivelmente pelo processo de apoptose.

O derivado GQS-90 foi eficaz na diminuição da carga parasitária de amastigotas intracelulares. No entanto, não foi observado aumento da produção de NO de forma significativa neste ensaio, indicando que o composto atue por outro mecanismo.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H. A. S.; EL-KARIM, S. S. Design, synthesis and anticervical câncer activity of new benzofuran-pyrazol-hydrazon-thiazolidin-4-one hybrids as potential EGFR inhibitors and apoptosis inducing agentes. **Bioorganic Chemistry**, v. 89, 2019.
- ABDELLATIF, K. R. A. *et al.* Design, synthesis and biological screening of new 4-thiazolidinone derivatives with promising COX-2 selectivity, anti-inflammatory activity and gastric safety profile. **Bioorganic Chemistry**, v. 64, p.1-12, 2016.
- ABRANTES, T. R. *et al.* Fatores ambientais associados à ocorrência de leishmaniose visceral canina em uma área de recente introdução da doença no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, 2018.
- AGUIAR, P. F.; RODRIGUES, R. K. Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. **Revista Unimontes Científica**, v. 19, n.1, p. 191- 204, 2017.
- AL-TAMIMI, A. M. S. *et al.* Discovery of new organoselenium compounds as antileishmanial agentes. **Bioorganic Chemistry**, v. 86, p. 339-345, 2019.
- ALIANÇA, A. S.S. *et al.* In vitro evaluation of citotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 15, p.1-10, 2017.
- ALMEIDA, S. V. M. *et al.* Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 13023-13042, 2015.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clinical Microbiology Reviews.**, v.10, n.2, p.298-319, 1997.
- ALVAR, J. *et al.* WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.
- ANDRADE, A. M. C *et al.* Synthesis and structural study os substituted thioxothiazolidinones and thioxoimidazolidinones. **Bollettino chimico farmaceutico**, v. 141, n. 6, p.428-433, 2002.
- ANTINARELLI, L. M. R. *et al.* Aminoquinoline compounds: Effect of 7-chloro-4-quinolinylhydrazone derivatives against Leishmania amazonensis. **Experimental Parasitology**, v. 171, p. 10-16, 2016.
- ARAÚJO NETO, L. N. *et al.*, Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophene-thiosemicarbazones derivatives. **Chemico-Biological Interactions**, v'272, n. 25, p. 172-181, 2017.

ARCE, E. R. *et al.* Rhenium(I) tricarbonyl compounds of biactive thiosemicarbazones: Synthesis, characterization and activity against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 170, p. 125-133, 2017.

ARONSON, N. *et al.* Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, p. 202-264, 2016.

ARRUDA, J. B. G. *et al.* Estratégias tecnológicas para formulações de anfotericina B em sistemas lipídicos disponíveis no mercado farmacêutico e outros promissores sistemas de administração. **Infarma**, v. 28, n. 2, p. 59-67, 2016.

AVILA-GARCIA, M. *et al.* Transplacental transmission of cutaneous *Leishmania mexicana* Strain in Balb/c mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 2, p. 354-358, 2013.

AYLESO, A. *et al.* Hybrid compounds from thiosemicarbazones and triazole as antidiabetic agents and their antioxidant potentials. **Biomedical Research**, v. 28, n. 1, p. 411-420, 2017.

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

BALAÑA-FOUCE, R. *et al.* The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**, v.30, n.4, p. 435-443. 1998.

BARROS, C.D. *et al.* Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR γ ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p. 3805-3811, 2010.

BASSELIN, M.; COOMBS, G. H.; BARRETT, M. P. Putrescine and spermidine transport in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 109, n. 1, p. 37-46, 2000.

BASTOS, M. M. *et al.* Quimioterapia Antileishmania: Uma revisão da literatura. **Revista Virtual de Química**, v.8, n.6, p.2072-2104, 2016.

BÉZIVIN, C. *et al.* Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**. v.10, p. 499-503, 2003.

BHAT, M. *et al.* Synthesis and evaluation of thiazolidinone-pyrazole conjugates as anticancer and antimicrobial agents. **Future Medicine Chemistry**, v. 10, n. 9, p.1017-1036, 2017.

BILITEWSKI, U. Determination of immunomodulatory effects: focus on functional analysis of phagocytes as representatives of the innate immune system. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1545-1554, 2008.

BRAHMBHATT, H. *et al.* Synthesis, Characterization, Antibacterial and Antioxidant Potency of N-Substituted-2-Sulfanylidene-1,3-Thiazolidin-4-one Derivatives and QSAR Study. **Medicinal Chemistry**, v. 1, p. 1-15 2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância em Saúde**, 1ª ed. 2016.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância em Saúde**, 1ª ed, Vol. 3 2017.

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

BRITTA, E. A. *et al.* Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonenses* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **BMC Microbiology**, v. 14, 2014.

BRITTA, E. A. *et al.* Generating nanoparticles containing a new 4-nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone compound with antileishmanial activity. **Materials Science and Engineering**, v. 69, p. 1159-1166, 2016.

CAMARGO, L. M.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência Cultura**, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003.

CANUTO, G. A.B. *et al.* Multi-analytical platform metabolomic approach to study miltefosine mechanism of action and resistance in *Leishmania*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 14, p.3459-3476, 2014.

CARDIM, M. F. M. *et al.* Leishmaniose visceral no estado de São Paulo, Brasil: análise espacial e espaço temporal. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, 2016.

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

CAVALCANTE, M. N. *et al.* Estudo prospectivo da infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* em assintomáticos de áreas endêmicas de raposa, Maranhão, 2006-2008. **Revista de Pesquisa em Saúde**, v. 14, n.4, p. 31-35, 2013.

CAVALCANTI, D. P. *et al.* Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiology**, v. 83 12, p. 1–12, 2009.

CÉSAR, F. A.; *et al.* New indole-thiazolidine attenuates atherosclerosis in LDLr^{-/-} mice. **Vascular Pharmacology**, v. 15, p. 1538-1891, 2015.

CHANDRAPPA, S *et al.* Synthesis and in vitro proliferative activity against human cancer cell lines of novel 5-(4-methylbenzylidene)-thiazolidine-2,4-diones. **Invest New Drug**, v. 26, p. 437-444, 2008.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews**, v. 5, p. 873-882, 2007.

CHATTOPADHYAY, A.; JAFURULLA, M. A Novel Mechanism for an Old Drug: Amphotericin B in the Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 416, p. 7-12, 2011.

CHITRE, T. S. Synthesis and docking studies of pyrazine-thiazolidinone hybrid scaffold targeting dormant tuberculosis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 26, n.9, p. 2224-2228, 2016.

COLOMBO, F. A. *et al.* Detection of Leishmania (Leishmania) infantum RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v. 109, n.2 p. 267-274, 2011.

CONGIU, C.; ONNIS, V. Synthesis and biological evaluation of novel acylhydrazones derivatives as potential antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 6592-6599, 2013.

CONTI, R. V.; PINTO-JÚNIOR, V. L. Abordagem terapêutica da leishmaniose visceral no Brasil – revisão para clínicos. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 4, n. 2, p. 240-249, 2015.

CORRÊA, *et al.* Ruthenium(II) complexes of 1,3-thiazolidine-2-thione: cytotoxicity against tumor cells and anti-Trypanosoma cruzi activity enhanced upon combination with benznidazole. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.156, p. 153-163, 2016.

DAVANÇO, M. G *et al.* Evaluation of Antimalarial Activity and Toxicity of a New Primaquine Prodrug. **Plos One**, v. 9, 2014.

DE SOUZA, W. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n.9, p. 822-838, 2008.

DEMICHELI, C. *et al.* Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1570, p. 192-198, 2002.

DIAS, L. C. *et al.* Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n.9, p. 1-14, 2009.

DÍAZ, M. *et al.* Synthesis and leishmanicidal activity of novel urea, thiourea, and selenourea derivatives of diselenides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 5, 2019.

DIVATIA, S. M. *et al.* Novel thiosemicarbazone derivatives containing benzimidazole moiety: Green synthesis and anti-malarial activity. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 2014.

DORLO, T. P *et al.* Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, 2012.

DOCAMPO, R. *et al.* Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 251-261, 2005.

DOS SANTOS, R.A. *et al.* Leishmanicidal effect of *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) and its isolated alkaloid skimmianine occurs by a nitric oxide dependent mechanism. **Parasitology**, v. 138, n. 10, p. 1224-1233, 2011.

DU; X. *et al.* Synthesis and structure activity relationship study of potente trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 13, p. 2695-2707, 2002.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical & Biomedical Research**, v. 35, n. 2, p. 65-82, 2015.

FALLAH, M. *et al.* Seroepidemiology of Toxoplasmosis in Primigravida Women in Hamadan, Islamic Republic of Iran, 2004. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 14, n. 1, p. 163-171, 2008.

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

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

FINCH, *et al.* Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A potente inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 8, p. 983-991, 2000.

FRAGA, C. A. M. Razões da atividade biológica: Interações micro e biomacromoléculas. **Cadernos Temáticos de Química Nova**, v.1 n.3, 2001.

FRANSOZO, A.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L. **Zoologia dos Invertebrados**, 1ª Edição. Roca-São Paulo-Brasil, 2016.

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

GARCIA, G. M *et al.* Improved nonclinical pharmacokinetics and biodistribution of a new PPAR pan-agonist and COX inhibitor in nanocapsule formulation. **Journal of Controlled Release**, v. 209, n.1, p. 207-218, 2015.

GHOSH, P., *et al.* Synthesis and in vitro Screening of 29, 30-Dibromo-28-oxoallobetulin against Parasitic Protozoans, Leishmania donovani and Leishmania Major. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, n.2, p. 202-207, 2015.

GLUENZ, E. *et al.* Structural asymmetry and discrete nucleic acid subdomains in the Trypanosoma brucei kinetoplast. **Molecular Microbiology**, v.64, n. 6, p. 1529-1539, 2007.

GOU, Y. *et al.* α -N-heterocyclic thiosemicarbazone Fe(III) complexes: Characterization of its antitumor activity and identification of anticancer mechanism. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 354-364, 2016.

HENDRICKS, S. *et al.* Evidence of a drug-specific impact of experimentally selected paromomycin and miltefosine resistance on parasite fitness in Leishmania infantum. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n.7, p. 1914-1921, 2016.

HENDRICKS, S. *et al.* In vivo selection of paromomycin and miltefosine resistance in Leishmania donovani and L. infantum in a Syrian hamster model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4714-4718, 2015.

HERNANDES, M. Z. *et al.* Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design. **Current Drug Targets**, v. 11, p. 303-314, 2010.

JERICÓ, M. M. *et al.* **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos** 1a ed. Rio de Janeiro. Editora Roca, 2015

JHINGRAN, A. Paromomycin: uptake and resistance in Leishmania donovani. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 164, n. 2, p.111-117, 2009.

KAPLANCIKLI, Z. A. *et al.* Synthesis and In Vitro Evaluation of New Thiosemicarbazone Derivatives as Potential Antimicrobial Agents. **Journal of Chemistry**, v. 1, p.1-7, 2016.

KAUR, T.; SOBTI, R.C.; KAUR, S. Cocktail of gp63 and Hsp70 induces protection against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, v.33,p. 95-103, 2011.

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

KHADEM VATAN, S.; GHARAVI, M. J.; SAKI, J. Miltefosine Induces Metacaspase and PARP Genes Expression in *Leishmania Infantum*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 442-448, 2011.

KHALILI, S. *et al.* Investigation of the antimicrobial activity of a short cationic peptide against promastigote and amastigote forms of *Leishmania major*(MHRO/IR/75/ER): An *in vitro* study. **Experimental Parasitology**, v.196, p.48-54, 2019.

KIMA, P. E. *et al.* The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal of Parasitology**, v.37, n.10, p. 1087-1096, 2007.

KIMUTAI, R *et al.*, Safety and Effectiveness of Sodium Stibogluconate and Paromomycin Combination for the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Eastern Africa: Results from a Pharmacovigilance Programme. **Clinical Drug Investigation**, v. 37, n.3, p. 259–272, 2017.

KON, K, *et al.*. Pioglitazone prevents early-phase hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 291, n. 1, p. 55-61, 2002.

KPOTIN, G. *et al.* A Quantum-chemical study of the relationships between electronic structure and trypanocidal activity against *Trypanosoma Brucei Brucei* of a series of thiosemicarbazone derivatives. **Der Pharmacia Lettre**, v. 8, n. 17, p. 215-222, 2016.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 99-163, 2007.

KUMAR, S. *et al.* Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes of acenaphthoquinone 3-(4-benzylpiperidyl)thiosemicarbazone: Synthesis, structural, electrochemical and bacterial studies. **Polyhedron**, v. 134, n. 25, p. 11-21, 2017.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LANGOUSIS, G.; HILL, K. L. Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 505–518, 2014.

LEE, N., *et al.*. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, n. 1, p. 53-64, 2002.

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

LEMKE, A. *et al.* Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 151-162, 2005.

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

LIMA, E. B. *et al.* Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.82, n. 2, p.111-124, 2007.

LIMA, M.I. *et al.* Genotoxic effects of the antileishmanial drug Glucantime. **Archives of Toxicology**, v. 84, n. 3, p. 227-232, 2010.

LINCIANO, P. *et al.* Aryl thiosemicarbazone for the treatment of trypanosomatidic infections. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 146, p. 423-434, 2018.

LISBOA, J. L. C. *et al.* Determinantes letais contribuintes para óbitos por leishmaniose visceral. **Revista Estatística**, v. 3, p. 358-363. 2014.

LIU, B. *et al.* Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 8, p. 363-368, 2005.

LÓPEZ-PEÑA, M. *et al.* Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. **Acta Veterinaria Scandinava**, v. 51, n.20, p. 20-23, 2009.

MACIEL-REZENDE, C. M. *et al.* Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania amazonenses* vaccine plus antimonial. **International Journal of Dermatology**, v. 41, p.73-78, 2002.

MACHADO, C. M. *et al.* Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of a brazilian HSCT Center. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.51, n.6, p.309-324, 2009.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S., *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n.12, p.2941-2947. 2008.

MANJAL, S. K. *et al.* Synthetic and medicinal perspective of thiazolidinones: A review. **Bioorganic Chemistry**, v. 75, p. 406-423, 2017.

MANSUETO, P., *et al.* Leishmaniasis in Travelers: A Literature Review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, n. 6, p. 563-581, 2014.

MANZANO, J. I.; *et al.* Arylthiosemicarbazones as antileishmanial agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 161-170, 2016.

MARC, G. *et al.* 3,5-Disubstituted Thiazolidine-2,4-Diones: Design, Microwave-Assisted Synthesis, Antifungal Activity, and ADMET Screening. **SLAS Discovery: Advancing Life Sciences**, v. 23, n. 8, p.807-814, 2018.

MARINHO, F. A. *et al.* Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 507-509, 2011.

MARTÍN-MONTES, A.; *et al.* Library of seleno-compounds na novel agentes against *Leishmania* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, 2017.

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* Epidemiological patterns of mortality due to visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection in Brazil, 2000–2011. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 6, p. 338 – 347, 2014.

MATSA R. *et al.* Thiosemicarbazone derivatives: Design, synthesis and in vitro antimalarial activity studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.137, p. 1-43, 2019.

MEDDEB-GARNAOUI, A. *et al.* Cellular and humoral responses induced by *Leishmania* histone H2B and its divergent and conserved parts in cutaneous and visceral leishmaniasis patients, respectively. **Vaccine**, v.28, p.1881-1886, 2010.

MEHTA, A.; SHAHA, C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 12, p.798-813, 2004

MELO, E. J. T. Hydroxyurea inhibits intracelular *Toxoplasma gondii* multiplication. **Microbiology Letters**, v. 185, n. 1, p. 79-82, 2000.

MELOS, J. L. R. *et al.* Novel 3,4-methylenedioxyde-6-X-benzaldehyde-thiosemicarbazones: Synthesis and antileishmanial effects against *Leishmania amazonenses*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 103, p. 409-417, 2015.

MENDES *et al.* Insulin stimulus-secretion coupling is triggered by a novel thiazolidinedione /sulfonylurea hybrid in rat pancreatic islets. **Journal of Cell Physiology**, v. 234, n.1, p.509-520, 2018.

MENDONÇA, D. B. D. *et al.* Nitro-heterocyclic compounds induce apoptosis-like effects in *Leishmania amazonenses* promastigotes. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical diseases**, v. 25, 2019.

MENEZES, J. P. B. *et al.* VERAS, P. S. T. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. **BioMed Research International** , v. 2, p. 1-11 2015.

MESA-ARANGO, A. C. *et al.* It only takes one to do many Jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-10, 2012.

METWALLY, N. H. Design, synthesis, DNA assessment and molecular docking study of novel 2- (pyridin-2-ylimino)thiazolidin-4-one derivatives as potent antifungal agentes. **Bioorganic Chemistry**, v. 84, p. 456-467, 2019.

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

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

MOORE E. M.; LOCKWOOD, D. N. Treatment of visceral leishmaniasis, **Journal of Global Infectious Diseases**, v.2, p. 151-158, 2010.

MOORCROFT, M.J. *et al.* Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, v. 54, p. 785-803, 2001.

MORAIS-TEIXEIRA, *et al.* Combined suboptimal of topical paromomycin, meglumine antimoniate and miltefosine to treat experimental infection caused by *Leishmania (Vianna) braziliensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n.12, p.3283-3290, 2015.

MOREIRA, W. *et al.* Proteomic analysis of metacyclogenesis in *Leishmania infantum* wild-type and PTR1 null mutante. **Open Proteomics**, v. 4, p. 171-183, 2014.

MOREIRA, D. R. M. *et al.* Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potente and selective anti-trypanosoma cruzi compounds which

induce apoptic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 467-478, 2014.

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

MOURÃO, R. H *et al.* Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 1129-1133, 2005..

MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. Calcium regulation in protozoan parasites. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 359-364, 2003.

MORIBE, K.; MARUYAMA, K. Pharmaceutical design of the liposomal antimicrobial agents for infectious disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 6, p. 441-154, 2002.

MOSMANN, T. *et al.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MROZEK-WILCZKIEWICZ, A. *et al.* Anticancer activity of the thiosemicarbazones that are based on di-2-pyridine ketone and quinoline moiety. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.1, n. 171, p. 180-194, 2019.

NAM, S. *et al.* Di-2-pyridylketone 4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT), an anticancer agent, exerts an anti-inflammatory effect in activated human mast cells. **Inflammation Research**, v. 66, n.10, p.871-879, 2017.

NARVÁEZ, A. J. R. Relação entre estrutura química e atividade biológica nos fármacos esquistossomicidas. **Química Nova**, v.6, n.4 p.134-140, 1983.

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

OLIVEIRA, J. F. Synthesis and Evaluation of the Schistosomicidal and Trypanocidal Properties of Thioxolimidazolidines and Thiazolidin-2, 4-Diones. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n.6, p. 386-400, 2015.

OLIVEIRA, J. F. *et al.* Evaluation of anti-inflammatory effect of derivative (E)-N-(4-bromophenyl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiossemicarbazone. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 80, p. 388-392, 2016.

OLIVEIRA, J. F. *et al.* Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 136, n. 18, p. 305-314. 2017.

OLIVEIRA, J. *et al.* Synthesis and Evaluation of the Schistosomicidal and Trypanocidal Properties of Thioxo-Imidazolidines and Thiazolidin-2,4-Diones. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, p. 386-400, 2015.

OLLIARO, P. L. Drug combinations for visceral leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, p. 595-602, 2010.

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Leishmaniasis em las Américas: Recomendaciones para el tratamiento**. 2013.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Leishmaniasis**. Em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em 13 junho 2019.

OMS. Control of Leishmaniasis, WHO **Technical Report series**, 2010.

OMS. **Leishmaniose: Informe epidemiológico das Américas**. 2017.

OMS. **Leishmaniose: Informe epidemiológico das Américas**. 2019.

OMS. WHO **Technical Report Series: Control of Leishmaniasis**. 2010.

OPPERDOES, F.R.; COOMBS, G. Metabolism of Leishmania: proven and predicted. **Trends in Parasitology**, 23, n. 4, p. 149-158, 2007.

PAIVA, R. O. *et al.* Antifungal activities of thiosemicarbazones and semicarbazone against mycooxygenic fungi. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 6, p. 531-537, 2014.

PANDEY, K *et al.* PKDL Development after combination treatment with miltefosine and paromomycin in a case of visceral leishmaniasis: first ever case report. **Journal of Medical Microbiology and Immunology**, v. 2, n. 1:4, 2018.

PARIS, C. *et al.*, Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 852-859.

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

PARSONS, M. *et al.* Biogenesis and function os peroxissomes and glycosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 19-28, 2001.

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

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

PERVEZ, H. *et al.* 5-Nitroisatin-derived thiosemicarbazones: potential antileishmanial agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 5, p. 628-632, 2014.

PIAO, Y. L. *et al.* Cell-based biological evaluations of 5-(3-bromo-4-phenethoxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dione as promising wound healing agente. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n.9, p. 2098-2103, 2015.

PINHO, B. R. *et al.* Is nitric oxide decrease observed with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property? **PLoS One**, v. 6, n.8, p. 24-48, 2011.

POPIOLEK, L. *et al.* New hydrazide-hydrazones and 1,3-thiazolidin-4-ones with 3-hydroxy-2- naphthoic moiety: Synthesis, in vitro and in vivo studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p.1337-1347, 2018.

RAHMAN, R. *et al.* Safety and efficacy of short course combination regimens with AmBisome, miltefosina and paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) in Bangladesh. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p1-15, 2017.

RAYCHAUDHURY, B; *et al.* Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. **Acta Tropica**, v. 95, n.1, p. 1-8, 2005.

RAWAL, R. K. *et al.* Design, synthesis, and evaluation of 2-aryl-3-heteroaryl-1, 3-thiazolidin-4-ones as anti-HIV agents. **Bioorganic Medicinal Chemistry**. V. 15, n. 4, p. 1725-1731, 2007.

REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 581–596, 2007.

ROBERTS, C. W. *et al.* Fatty acid and sterol metabolismo: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.126, n. 2, p. 129-142, 2003.

ROBERTS, L.; JANOVY, J. **Foundations of Parasitology**. 8ª Edição, 2009.

RODRIGO, C. *et al.* Amphotericin B for treatment of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of prospective comparative clinical studies including dose-ranging studies. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 6, p. 591-598, 2018.

ROSDON NETO, E. *et al.* Detecção de Infecção Natural em flebotomíneos capturados em área urbana de Campo Grande. **Anuário de Produção de Iniciação Científica Discente**, v. 14, n. 24, 2011.

ROTUREAU, B. *et al.* The flagellum-mitogenactivated protein kinase connection in Trypanosomatids: a key sensory role in parasite signalling and development? **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 710-718, 2009.

ROZO, A. M.; PÉREZ, O. G. Leishmaniasis: nuevos tratamientos, mecanismos de acción y sus implicaciones. **Revista INBIOM**, v. 1, n.1, p. 22-30, 2013.

SALSI, F. *et al.* Thiosemicarbazone and thiadiazines derived from fluorinated benzoylthioureas: synthesis, Crystal structure and anti-Trypanosoma cruzi activity. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 215, p. 52-61, 2018.

Sánchez-Moreno M. *et al.* In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine 76 derivatives against Leishmania infantum and Leishmania braziliensis species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 387-397, 2011.

SANTACRUZ, M. C. S. *et al.* Synthesis, antiviral evaluation and molecular docking studies of N4-aryl substituted/unsubstituted thiosemicarbazones derived from 1-indanones as potente bovine viral diarrhoea virus agente. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 15, p.4055-4063, 2017.

SANTIAGO, E.F. *et al.* Evaluation of the anti-*Schistosoma mansoni* activity of thiosemicarbazones and thiazoles. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 352, 2014.

SANTIN, J. R. *et al.* Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 48, n. 5, p. 689-697, 2013.

SANTOS, J. S. *et al.* Synthesis, anti-Trypanosoma cruzi activity and quantitative structure relationships of some fluorinated thiosemicarbazones. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 195, p. 31-36, 2017.

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

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

SCHETTINI D.A. *et al.* Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. *International Journal of Pharmaceuticals*, v. 315, p. 140–147, 2006.

SCHNEIDER, A. Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. *International Journal of Parasitology*, v. 31, n. 13, p. 1403-15, 2001.

SCHÖNAFINGER, K. Heterocyclic NO prodrugs. *Farmaco*, v. 54, n. 5, p. 316-320, 1999.

SEIXAS, R. *et al.* Doenças caninas de transmissão vectorial: uma picada com muitas consequências! *Veterinary Medicine*, v.13, p. 23-46, 2011.

SERNA, M. E *et al.* Finding of leishmanicidal activity of 14-hydroxylunularin in mice experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Parasitology International*, v. 64, n. 5, p. 295-298, 2015.

SHADAB, M. D. *et al.* Apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani* treated with KalsomeTM10, a new liposomal amphotericin B. *PlosOne*, p. 1-31, 2017.

SHAPIRO, T. A. & ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology*, v. 49, p.117-143, 1995.

SILVA, A. C. *et al.* Aryl thiosemicarbazones: In vitro and immunomodulatory activities against *L. amazonensis*. *Experimental Parasitology*, v. 177, p. 57-65, 2017.

SILVA, F. L *et al.* Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 160, p. 55–59, 2009.

SILVA, A. K. S. E. *et al.* LPSF/GQ-02 Inhibits the Development of Hepatic Steatosis and Inflammation in a Mouse Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Plos One*, v. 10, p. 123-787, 2015.

SILVA, F. L. *et al.* Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*, v. 151, p. 86–90, 2008.

SILVA-JÚNIOR, E. F. *et al.* Design, synthesis, molecular docking and biological evaluation of thiophen-2- iminothiazolidine derivatives for use against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.24, n.18, p.4228-4240, 2016.

SILVEIRA, F. T. Revendo a trajetória da leishmaniose visceral americana na Amazônia, Brasil: de Evandro Chagas aos dias atuais. **Resvita Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 1, p.15-22, 2016.

SINGH, N. *et al.* Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, p. 485-497, 2012.

SOLOMON, V. R.; *et al.* Design, synthesis of 4-aminoquinoline-derived thiazolidines and their antimalarial activity and heme polymerization inhibition studies. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.28, n.3, p.619-626, 2013.

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

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

SUNDAR, S. AGARWAL, D. Visceral Leishmaniasis – Optimum treatment options in children. **Pediatric Infection Disease Journal**, v. 37, n. 5, p. 492-494, 2018.

TANAKA, A. *et al.* Role of Leishmania (Leishmania) amazonensis Amastigote Glycosphingolipids in Macrophage Infectivity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 799-806, 2007.

TEIXEIRA, D. *et al.* The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 10, 2013.

TENÓRIO, R. P.; GÓES, A. J. S. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.

THOMAS, G. **Química medicinal uma introdução**, 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 413p.

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

TROTSKO, N. *et al.* Synthesis and in vitro antiproliferative and antibacterial activity of new thiazolidine-2,4-dione derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 33, p.17-24, 2017.

UCHÔA, F. T *et al.* Preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of thiazolidinone PG15: na anti-inflammatory candidate. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p.339-345, 2009.

VERONICA, J. *et al.* Iron superoxide dismutase contributes to miltefosine resistance in *Leishmania donovani*, **The Febs Journal**, v. 286, n. 17, 2019.

VIANNA, E. N. *et al.* Abundance of *Lutzomyia longipalpis* in urban households as risk factor of transmission of visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 302-310, 2016.

VOLYNETS *et al.* Benzaldehyde thiosemicarbazone derivatives against replicating and nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Antibiotics**, v. 72, p. 218-224, 2019.

WADHONE, P. *et al.* Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 11, p. 7146-7154, 2009.

WASUNNA, M. Efficacy and safety of AmBisome in combination with sodium stibogluconate or miltefosine and miltefosine monotherapy for african visceral leishmaniasis: Phase II randomized trial. **PLoS: Neglected tropical diseases**, v. 10, n. 9, 2016.

ZHOU, Q.; HU, H.; LI, Z. New insights into the molecular mechanisms of mitosis and cytokinesis in Trypanosomes. **International Review Cell and Molecular Biology**, v. 308, p. 127–166, 2014.