



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

ROSANA MARIA DA CONCEIÇÃO SILVA

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
E LEISHMANICIDA DE DERIVADOS HETEROCÍCLICOS PENTAGONAIS**

RECIFE

2020

ROSANA MARIA DA CONCEIÇÃO SILVA

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
E LEISHMANICIDA DE DERIVADOS HETEROCÍCLICOS PENTAGONAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Orientadora: Prof^ª Dr^a Maria do Carmo Alves de Lima

RECIFE

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Rosana Maria da Conceição

Obtenção, caracterização estrutural, atividade antioxidante e leishmanicida de derivados heterocíclicos pentagonais / Rosana Maria da Conceição Silva - 2020.

91 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2020.

Inclui referências.

1. Leishmaniose Tegumentar Americana
2. Atividade antioxidante
3. Tiazolidina I. Lima, Maria do Carmo Alves de (Orientadora) II. Título

616.9364 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-357

ROSANA MARIA DA CONCEIÇÃO SILVA

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
E LEISHMANICIDA DE DERIVADOS HETEROCÍCLICOS PENTAGONAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 22/07/2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Jamerson Ferreira da Oliveira (Examinador externo)
Centro Universitário Maurício de Nassau

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, por proporcionar perseverança durante a execução desse projeto, por conceder sabedoria e diligência a todos e todas. Por seu amor à humanidade, entregou seu filho unigênito, Jesus Cristo, na expiação de nossos pecados e nos proporcionar salvação.

Aos meus pais, Israel e Tânia, pelo amor incondicional e pelo incentivo a minha vida acadêmica. Agradeço ao meu irmão Ricardo e seus filhos, Samara e Gabriel, pelos momentos de descontração e por serem uma luz na minha vida.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria do Carmo Alves de Lima (Nena), pelo acolhimento e amizade, por ser uma pessoa sincera, animada e dedicada à ciência brasileira e química medicinal, por ministrar aulas inspiradoras e auxiliar na execução desse projeto.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ Pernambuco, coordenado pelos professores Fábio Brayner e Luiz Alves, pela contribuição na execução dos ensaios biológicos dos compostos sintetizados em macrófagos e cepas de *Leishmania amazonensis*.

Aos coordenadores, funcionários e estagiários do LAC/UFPE, da Central Analítica do DQF/UFPE e do CETENE pelas análises espectroscópicas dos compostos obtidos.

Aos meus colegas do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica, pelos conhecimentos, conselhos e amizade adquiridos durante a graduação e o mestrado. Um agradecimento especial a Jamerson, Cezar, Natanael, Amélia e Paula por auxiliarem diretamente na execução desse projeto.

Aos amigos e amigas que conheço durante a minha vida pelo apoio, passeios, conselhos e parcerias, em especial Iranildo, Laís, Cléber, Marton, Katherine, Daniele, Josiane, Verushka, Manoel Neto, Thales, Rhayssa, Vanussa, Juliana, John e Luiz Eduardo.

À coordenação, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco por sua dedicação ao programa, tornando-o notório no cenário científico nacional e internacional.

À FACEPE, pelo suporte financeiro na execução dessa pesquisa.

“Eu irei e cumprirei as ordens do Senhor, porque sei que o Senhor nunca dá ordens aos filhos dos homens sem antes preparar um caminho pelo qual suas ordens possam ser cumpridas”

1 Néfi 3:7

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) trata-se de uma doença tropical negligenciada que causa lesões na pele e nas mucosas dos indivíduos infectados, podendo causar também deformações na face. Essa doença é causada por protozoários dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, sendo transmitida por flebotomíneos fêmeas. No Brasil, são registrados de 15 a 20 mil casos de LTA anualmente e, no estado de Pernambuco foram registrados 1.855 novos casos dessa doença no período de 2013 a 2018, sendo assim considerada um grave problema de saúde pública. Para o tratamento de LTA, são disponibilizados os fármacos: antimoniato de *N*-metil-meglumina, anfotericina B, pentamidina e miltefosina. Além do alto custo e eficaz moderada contra parasito, esses fármacos possuem graves efeitos adversos e relatos de resistência do parasito. Devido a essa situação, existe uma necessidade de inserção de novos fármacos para o tratamento de LTA, o núcleo heterocíclo pentagonal tiazolidin-2,4-diona, além de sua versatilidade na síntese de novos compostos, é considerado uma estrutura privilegiada na química medicinal e apresenta relatos na literatura de atividade antiparasitária promissora, em especial atividade leishmanicida. A partir dessa premissa, o presente trabalho propõe em realizar a síntese, elucidação estrutural, atividade antioxidante e avaliação leishmanicida de novos compostos heterocíclicos pentagonais. A partir dos mecanismos reacionais de *N*-alquilação, condensação de Knoevenagel e tionação via reação de Wittig foram sintetizados sete novos compostos das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG, através de uma rota de síntese e purificação eficiente, apresentando rendimento reacionais de 63 a 84,99%. As estruturas químicas dos sete novos compostos foram elucidadas através de técnicas convencionais, tais como Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , Espectroscopia de Absorção no Infravermelho e Espectrometria de Massas. Os parâmetros farmacocinéticos *in silico* mostraram que os novos compostos estão de acordo com as regras de Lipinski e Veber e, esses resultados preditivos indicam que os novos compostos podem ter uma boa biodisponibilidade oral. Na avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, os compostos LqIT/MOG-02 e LqIT/MOG-06 destacaram-se, pois apresentaram IC_{50} de 11,2 e 10,1 μM , respectivamente, no ensaio de eliminação de radicais DPPH, demonstrando que a adição do biciclo indol podem contribuir na eliminação de radicais por doação de hidrogênio. Na avaliação *in vitro* de citotoxicidade em macrófagos J774, verificamos que a adição do halogênio bromo (Br) no composto LqIT/LYS-04 e a substituição bioisostérica do oxigênio por enxofre no composto LqIT/MOG-06 contribuíram para a diminuição da citotoxicidade em relação aos demais

compostos estudados. Na dosagem indireta de NO, todos os compostos, exceto o LqIT/MOG-01, apresentaram aumento significativo de nitrito em baixas concentrações. Na avaliação leishmanicida com as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, o composto LqIT/LYS-04 destacou-se por apresentar valor de IC₅₀ de 7,83 µM, demonstrando que a adição do Br contribuiu para o aumento da lipofilicidade desse composto e que, os efeitos eletrônicos promovidos por esse átomo podem ter contribuído para a atividade leishmanicida. O composto LqIT/LYS-04 apresentando um índice de seletividade igual a 3,30, demonstrou assim atividade leishmanicida promissora, sendo escolhido para avaliação leishmanicida em formas evolutivas amastigotas de *L. amazonensis*.

Palavras-chave: leishmaniose tegumentar americana; atividade antioxidante; *Leishmania*; tiazolidina.

ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis (ATL) is a neglected tropical disease that causes lesions on the skin and mucous of infected individuals, and can also cause deformations on the face. This disease is caused by protozoa from the subgenera *Leishmania* and *Viannia*, and is transmitted by female sandflies. In Brazil, 15 to 20 thousand cases of ATL are registered annually and, in the state of Pernambuco, 1,855 new cases of this disease were registered in the period from 2013 to 2018, thus being considered a serious public health problem. For the treatment of ATL, the following drugs are available: *N*-methyl-meglumine antimoniate, amphotericin B, pentamidine and miltefosine. In addition to the high cost and moderate effectiveness against parasites, these drugs have serious adverse effects and reports of parasite resistance. Due to this situation, there is a need for insertion of new drugs for the treatment of ATL, the heterocyclic pentagonal thiazolidin-2,4-dione nucleus, in addition to its versatility in the synthesis of new compounds, is considered a privileged structure in medicinal chemistry and presents reports in the literature of promising antiparasitic activity, especially leishmanicidal activity. Based on this premise, the present work proposes to carry out the synthesis, structural elucidation, antioxidant activity and leishmanicidal evaluation of new pentagonal heterocyclic compounds. From the reaction mechanisms of *N*-alkylation, Knoevenagel condensation and thionation via the Wittig reaction, seven new compounds from the LqIT/LYS and LqIT/MOG series were synthesized, through an efficient synthesis and purification route, with reaction yields from 63 to 84.99%. The chemical structures of the seven new compounds were elucidated through conventional techniques, such as ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance, Infrared Absorption Spectroscopy and Mass Spectrometry. The pharmacokinetic parameters *in silico* showed that the new compounds are in accordance with the rules of Lipinski and Veber, and these predictive results indicate that the new compounds may have a good oral bioavailability. In the evaluation of antioxidant activity *in vitro*, the compounds LqIT/MOG-02 and LqIT/MOG-06 stood out, as they presented IC_{50} of 11.2 and 10.1 μM , respectively, in the DPPH radical scavenging test, demonstrating that the addition of the indole bicycle can contribute to the elimination of radicals by hydrogen donation. In the *in vitro* evaluation of cytotoxicity in J774 macrophages, we found that the addition of halogen bromine (Br) in the compound LqIT/LYS-04 and the bioispheric replacement of oxygen by sulfur in the compound LqIT/MOG-06 contributed to the decrease in cytotoxicity in relation to the other studied compounds. In the indirect measurement of NO, all compounds, except LqIT/MOG-01, showed a significant increase in nitrite at low concentrations. In the leishmanicidal evaluation with the promastigote forms of *Leishmania*

amazonensis, the compound LqIT/LYS-04 stood out for presenting an IC₅₀ value of 7.83 μ M, demonstrating that the addition of Br contributed to the increase in the lipophilicity of this compound and that, electronic effects promoted by this atom may have contributed to leishmanicidal activity. The compound LqIT/LYS-04, with a selectivity index equal to 3.30, thus showed promising leishmanicidal activity, being chosen for leishmanicidal evaluation in evolutionary forms of *L. amazonensis* in works after this one.

Key words: american cutaneous leishmaniasis; antioxidant activity; *Leishmania*; thiazolidine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Notificações de casos de LTA registradas no mundo pela OMS no ano de 2018	23
Figura 2 –	Número de casos de LTA registrados nos municípios pernambucanos no período de 2013 – 2018	24
Figura 3 –	Ciclo biológico da <i>Leishmania spp</i>	26
Figura 4 –	Formas Evolutivas de <i>Leishmania spp</i> . A: formas promastigotas metacíclicas de <i>Leishmania spp</i> ; B: Formas amastigotas intracelular de <i>Leishmania spp</i> no macrófago	26
Figura 5 –	Flebotomíneo fêmea do gênero <i>Lutzomyia spp</i>	27
Figura 6 –	Principais manifestações clínicas de <i>L. amazonensis</i> . A: Leishmaniose cutânea difusa (LCD); B: Leishmaniose cutânea recidiva (LCR)	29
Figura 7 –	Outros tipos de manifestações clínicas de <i>L. amazonensis</i> . A: Leishmaniose mucosa (LM); B: Leishmaniose mucocutânea (LMC); Leishmaniose visceral (LV)	29
Figura 8 –	Exemplo de bioisosterismo clássico	32
Figura 9 –	Diferenças entre o núcleo tiazol e a tiazolidin-2,4-diona	33
Figura 10 –	Reatividade do núcleo TZD	34
Figura 11 –	Estratégia de síntese dos compostos LqIT/LYS	35
Figura 12 –	Rendimento reacional dos compostos indol-tiazolidínicos substituídos (OLIVEIRA et al, 2015)	51
Figura 13 –	Sinais diagnósticos de RMN ¹ H dos compostos da série LqIT/LYS e LqIT/MOG	52
Figura 14 –	Espectroscopia de massas do composto LqIT/MOG-01	53
Figura 15 –	Espectroscopia de massas do composto LqIT/MOG-06	54
Figura 16 –	Deslocamento químico e multiplicidade do N-H indólico dos compostos indol-tiazolidínicos (OLIVEIRA et al, 2015)	54
Figura 17 –	Espectro de RMN ¹ H do composto LqIT/MOG-01	55
Figura 18 –	Espectro de RMN ¹³ C do composto LqIT/MOG-01	57
Figura 19 –	Espectroscopia IV do composto LqIT/MOG-06	60
Figura 20 –	Espectroscopia IV do composto LqIT/MOG-01	61

Figura 21 –	LogS e LogP do composto 4-tiazolidinona substituído (ALMEIDA JÚNIOR et al, 2019)	65
Figura 22 –	LogP do composto quinolina-tiosemicarbozônicos substituído (RIBEIRO et al, 2019)	66
Figura 23 –	Valor de IC ₅₀ do composto indólico-cumarínico com melhor atividade antioxidante (SANGSHETTI et al, 2016)	70
Figura 24 –	Valores de CC ₅₀ de compostos indol-tiazolidin-4-ona substituídos (ALMEIDA JUNIOR et al, 2019)	71
Figura 25 –	Comparação entre os valores de CC ₅₀ do composto LqIT/MOG-01 e LqIT/MOG-06	71
Figura 26 –	Resultados da dosagem indireta de NO produzido por macrófagos J774 tratados com os novos compostos da série LqIT/LYS e LqIT/MOG	72
Figura 27 –	Valores de IC ₅₀ dos compostos LqIT/LYS-04 e LqIT/LYS-14	76
Figura 28 –	Os compostos LqIT/LYS-04 e LqIT/LYS-14	76
Figura 29 –	Derivado indol-tiosemicarbazônicos substituído (SILVA et al, 2020)	77
Figura 30 –	Análogo sintético de chalcona trimetoxilado (BELLO et al, 2011)	77
Figura 31 –	Resultados da dosagem indireto de NO dos compostos LqIT/LYS-04 e LqIT/LYS-14	78
Figura 32 –	Composto indólico-tiazolidínico (OLIVEIRA et al, 2015)	78

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 –	Método clássico de obtenção de TZD	34
Esquema 2 –	Rota sintética dos novos compostos heterocíclicos pentagonais das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG	38
Esquema 3 –	Mecanismo reacional de <i>N</i> -alquilação na tiazolidin-2,4-diona	39
Esquema 4 –	Mecanismo reacional de formação do 3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona	41
Esquema 5 –	Mecanismo reacional de condensação do 1- <i>H</i> -indol-3-carboxaldeído	42
Esquema 6 –	Novos compostos das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG	43
Esquema 7 –	Equação geral de eliminação do radical DPPH	46
Esquema 8 –	Equação geral de eliminação do radical ABTS ^{•+}	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Medicamentos padronizados pelo Ministério da Saúde voltados ao tratamento de LTA	31
Tabela 2 –	Características físico-químicas dos novos compostos heterocíclicos pentagonais	51
Tabela 3 –	Principais deslocamentos químicos (δ) e multiplicidades de RMN ¹ H dos novos compostos da série LqIT/LYS e LqIT/MOG	53
Tabela 4 –	Sinais diagnóstico de RMNC ¹³ encontrados nos compostos da série LqIT/LYS e LqIT/MOG	56
Tabela 5 –	Deslocamentos químicos (δ ppm), multiplicidades e quantidade de Hidrogênio (H) apresentados no RMN ¹ H dos compostos LqIT/LYS	58
Tabela 6 –	Deslocamentos químicos (δ ppm), multiplicidades e quantidade de Hidrogênio (H) apresentados no RMN ¹ H dos compostos LqIT/MOG	59
Tabela 7 –	Dados de IV dos compostos LqIT/LYS expressos em ν/cm^{-1} e intensidade	60
Tabela 8 –	Dados de IV dos compostos LqIT/MOG expressos em ν/cm^{-1}	61
Tabela 9 –	Parâmetros farmacocinéticos <i>in silico</i> dos novos compostos heterocíclicos pentagonais	68
Tabela 10 –	Valores de IC ₅₀ (μM) e taxa de sequestro de radicais DPPH e ABTS (%) dos novos compostos heterocíclicos pentagonais na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$	69
Tabela 11 –	Valores de CC ₅₀ e IC ₅₀ dos novos compostos heterocíclicos pentagonais	75
Tabela 12 –	Índice de seletividade dos compostos LqIT/LYS e LqIT/MOG	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS ^{•+}	Radicais cátions 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AcOEt	Acetato de etila
ADMET	Absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade
AnB	Anfotericina B
AnBL	Anfotericina B Lipossomal
AnBD	Desoxicolato de Anfotericina B
ANG	Antimoniato de <i>N</i> -metilglucamina
CC ₅₀	Concentração capaz de causar a perda de viabilidade celular em 50%
CCD	Cromatografia em camada delgada
CETENE/MCTIC	Centro de Tecnologias e Estratégias do Nordeste do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
CR3	Receptores do sistema complemento tipo 3 presentes em macrófagos
D	Dupleto
DMSO- <i>D</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNTs	Doenças Negligenciadas Tropicais
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DQF/UFPE	Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtOH	Etanol
FcγR	Receptor Fc tipo gama de
HBA	Grupos aceptores de hidrogênio
HBD	Grupos doadores de hidrogênio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HRMS	Espectrometria de Massas
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos

IFN- γ	Interferon tipo gama
IL-2	Interleucina tipo 2
IL-10	Interleucina tipo 10
IS	Índice de seletividade
IV	Espectroscopia de Absorção no Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LAC/UFPE	Laboratório de Análise de Combustível da Universidade Federal de Pernambuco
LCA	Leishmaniose cutânea atípica
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCDM	Leishmaniose cutânea disseminada
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCPC	Leishmaniose cutânea pós-leishmaniose visceral (calazar)
LCR	Leishmaniose cutânea recidiva
LM	Leishmaniose mucosa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LogP	Log do coeficiente de partição octanol-água
LogS	Log da solubilidade em água
LQIT/UFPE	Laboratório de Química e Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
<i>m</i>	Multiplete
MM	Massa molar
MALDI-TOF	Espectrômetro de massas de ionização e dessorção a laser assistida por matriz/ tempo de voo
MHz	Mega Hertz
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina
<i>N</i> -alquilação	Alquilação na posição Nitrogênio-3 da Tiazolidi-2,4-diona
NEQs	Novas entidades químicas
<i>n</i> -hex	<i>n</i> -hexano
NK	Células natural killer
NO	Óxido nítrico

n-ROTB	Número de grupos rotacionais
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PFM	Ponto de fusão médio
PPAR- γ	receptores ativados proliferadores de peroxissomas tipo gama
ppm	Partes por milhão
REA	Relação estrutura-atividade
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RF	Fator de Retenção
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
s	Simpleto
SFB	Soro fetal bovino
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SI	Simpleto largo
SN ₁	Substituição Nucleofílica de 1ª ordem
SN ₂	Substituição Nucleofílica de 2ª ordem
TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺	Linfócitos T citotóxicos
TGF- β	Fator de crescimento transformante tipo beta
Th1	Linfócitos T helper 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral tipo alfa
TPSA	Topografia de área de superfície polar
TZD	Tiazolidin-2,4-diona
VDss	Volume de distribuição em estado estacionário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVO	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	23
3.1.1	Aspectos gerais da leishmaniose tegumentar americana	23
3.1.2	Ciclo biológico da <i>Leishmania spp</i>	25
3.1.3	Aspectos imunológicos e clínicos de LTA causada por <i>Leishmania amazonensis</i>	27
3.1.4	Tratamento quimioterápico voltada a LTA	29
3.2	QUÍMICA MEDICINAL E A CONCEPÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS VOLTADOS AO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	32
3.3	QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS TIAZOLIDIN-2,4-DIONAS	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	ESTUDO QUÍMICO	36
4.1.1	Reagentes	36
4.1.2	Cromatografia e determinação de ponto de fusão	36
4.1.3	Análises espectroscópicas	36
4.1.4	Metodologia	37
4.1.4.1	Obtenção de 3-benzil-tiazolidin-2,4-dionas substituídos (LqIT/LYS e LqIT/MOG)	39
4.1.4.2	Procedimento geral para a obtenção de 3-benzil-tiazolidin-2,4-dionas substituídos	39
4.1.4.3	Obtenção de 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona	40
4.1.4.4	Procedimento geral para obtenção de 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona	41
4.1.4.5	Obtenção dos compostos finais através do mecanismo de condensação de Knoevenagel das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG	41

4.1.4.6	Procedimento geral para obtenção de 5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona substituídos da série LqIT/LYS	43
4.1.4.7	Procedimento geral para obtenção de indol-3-il-metileno-3-benzil-tiazolidina-2,4-diona substituídos e indol-3-il-metileno-3-(4-clorobenzil)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LqIT/MOG)	44
4.2	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS <i>IN SILICO</i> DOS NOVOS COMPOSTOS HETEROCICLICOS PENTAGONAIS	45
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DOS NOVOS COMPOSTOS HETEROCICLICOS PENTAGONAIS	45
4.3.1	Atividade de eliminação de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	45
4.3.1.1	Metodologia	46
4.3.1.2	Procedimento experimental da Atividade de eliminação de radicais DPPH	46
4.3.2	Atividade de eliminação de radicais cátions 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+})	47
4.3.2.1	Metodologia	47
4.3.2.2	Procedimentos experimental da atividade de eliminação de radicais cátions ABTS ^{•+}	47
4.4	ESTUDO BIOLÓGICO	48
4.4.1	Teste <i>in vitro</i> de citotoxicidade dos novos compostos heterocíclicos pentagonais em macrófagos J774	48
4.4.2	Dosagem de óxido nítrico (NO)	49
4.4.3	Cultivo dos Parasitos	49
4.4.4	Avaliação de susceptibilidade <i>in vitro</i> de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e determinação do índice de seletividade dos novos compostos heterociclicos pentagonais	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS NOVOS COMPOSTOS HETEROCÍCLICO PENTAGONAIS	51
5.2	ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DOS NOVOS COMPOSTOS HETEROCÍCLICO PENTAGONAIS	52

5.3	DADOS FÍSICO-QUÍMICOS DOS NOVOS COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS PENTAGONAIS	61
5.4	PARÂMETROS FARMACOCINÉTICO <i>IN SILICO</i> DOS NOVOS COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS PENTAGONAIS	64
5.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DOS NOVOS COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS PENTAGONAIS	69
5.6	ESTUDO BIOLÓGICO	71
5.6.1	Avaliação <i>in vitro</i> de citotoxicidade em linhagens de células de macrófagos J774 dos novos compostos heterocíclicos pentagonais	71
5.6.2	Dosagem de óxido nítrico	72
5.6.3	Avaliação de susceptibilidade <i>in vitro</i> de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> aos novos compostos heterocíclicos pentagonais	74
5.6.4	Índice de seletividade	79
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
7	PERSPECTIVAS	82
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um conjunto de doenças infecto-parasitárias não-contagiosas que podem ser causadas por parasitos intracelulares e extracelulares, acometendo, de forma não exclusiva, populações de baixo poder aquisitivo residentes nas zonas tropical e subtropical do planeta (MOLYNEUX et al, 2017). As DTNs afetam mais um bilhão de pessoas no mundo, além disso, o tratamento dessas doenças consiste em fármacos antigos, com baixa eficácia e alta toxicidade, necessitando assim de novas abordagens terapêuticas (CHAMI; BUNDY, 2019).

Dentre as DNTs, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é um grave problema de saúde pública em países emergentes (SANTOS et al, 2020). No Brasil, a LTA possui uma alta incidência, sendo registrados, anualmente, 15 a 20 mil novos casos (SINAN, 2020). Essa doença é causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania spp* e suas principais manifestações clínicas são lesões na pele e mucosas e pode causar deformações na face dos indivíduos infectados (BURZA et al, 2018).

O tratamento para a LTA apresenta uma limitação terapêutica devido à baixa variedade de fármacos voltados à doença. O Ministério da Saúde brasileiro disponibiliza os seguintes fármacos contra leishmanioses: antimoniato de *N*-metil-meglumina, anfotericina B (desoxicolato ou lipossomal), pentamidina e miltefosina (BRASIL, 2020). Todos os fármacos citados apresentam uma alta toxicidade, complicações durante a administração, longos períodos de tratamento e relatos de cepas resistentes em regiões endêmicas (MENEZES et al, 2015; VAKIL et al, 2015).

Por existir baixa demanda da indústria farmacêutica para DNTs, como a LTA, pesquisas e descoberta de novas entidades químicas (NEQs) tornam-se necessárias para atuar no tratamento quimioterápico dessas doenças. Diante disso, a química medicinal possui papel fundamental nesse contexto, por ser uma ciência multidisciplinar voltada a descoberta, síntese e elucidação de novos candidatos a fármacos (MIKOVSKI et al, 2019).

A principal estratégia da química medicinal na obtenção de novos fármacos são as modificações moleculares em estruturas privilegiadas. Esses *scaffolds* ou fragmentos moleculares podem agir em diferentes receptores biológicos do parasito e possibilita uma diversidade de compostos químicos diferentes (LEITE et al, 2018).

A estrutura privilegiada escolhida no presente estudo foi o núcleo heterocíclo pentagonal tiazolidin-2,4-diona (TZD), por ser uma classe química com atividades biológicas promissoras a partir de modificações moleculares (NAIM et al, 2017). A literatura descreve

atividade antiparasitária atribuídas a compostos tiazolidínicos, tais como tripanossomicida (OLIVEIRA et al, 2015), esquistossomicida (ALMEIDA JÚNIOR et al, 2019), antiviral (BAHARE et al, 2015), antimalárica (JAIN et al, 2018), em especial, a atividade leishmanicida (KAISER et al, 2015; LEITE et al, 2016; AIRES, 2017; GOUVEIA, 2017; GOUVEIA, 2019).

Tendo em vista a necessidade de novos fármacos para o tratamento da LTA, com melhor resposta terapêutica, baixo custo e menos efeitos adversos, o presente trabalho propõe-se realizar a síntese, caracterização química, avaliar a atividade antioxidante e potencial leishmanicida de novos compostos heterocíclicos pentagonais.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver novos compostos heterocíclicos pentagonais a partir do *scaffold* tiazolidin-2,4-diona e avaliar seu potencial leishmanicida e atividade antioxidante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e determinar as características físico-químicas dos novos compostos heterocíclicos pentagonais pertencentes às séries LqIT/LYS e LqIT/MOG;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* dos novos derivados das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG;
- Verificar parâmetros farmacocinéticos *in silico* dos novos derivados das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG.
- Analisar o potencial citotóxico dos novos derivados e a produção de óxido nítrico das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG em linhagens de células de macrófagos J774;
- Avaliar o efeito leishmanicida *in vitro* dos novos derivados das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG sob as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e estabelecer o Índice de Seletividade dos compostos testados.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

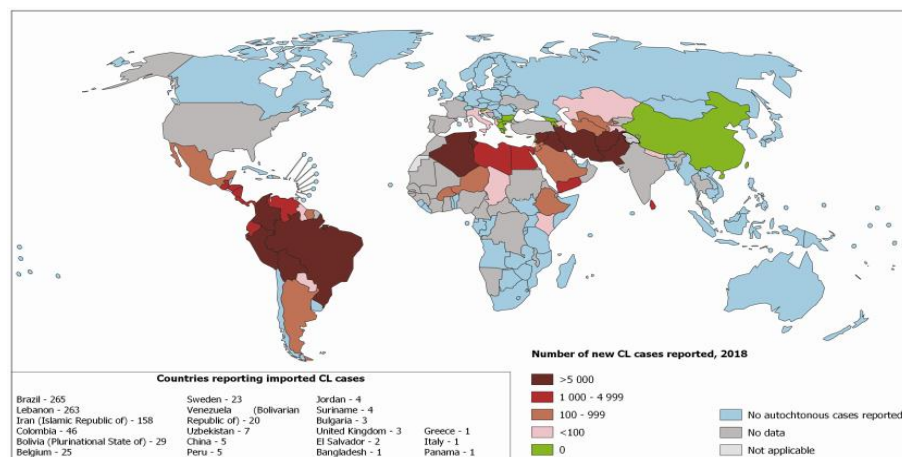
3.1.1 Aspectos gerais da leishmaniose tegumentar americana

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária não-contagiosa causada por protozoários intracelulares pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* que acometem o sistema imunológico inato dos indivíduos infectados e seus principais sintomas clínicos são lesões na pele e nas mucosas. Essa doença é transmitida através de picadas de insetos-vetores fêmeas dos gêneros *Phlebotomus* (velho mundo) e *Lutzomyia* (novo mundo) (HANDLER et al, 2015; TORRES-GUERREIRO et al. 2017; BURZA et al, 2018).

Sobre as manifestações clínicas da doença, a LTA pode se apresentar das seguintes formas: cutânea localizada (LCL), cutânea disseminada (LCDM), cutânea difusa (LCD), cutânea atípica (LCA), mucosa (LM), mucocutânea (LMC), cutânea recidiva (LCR) e cutânea pós-leishmaniose visceral (calazar) (LCPC) (ARONSON et al, 2016; MEIRELES et al, 2017).

A LTA estar incluída na lista de doenças tropicais negligenciadas (DNTs) da Organização Mundial de Saúde (OMS) e estima-se que, anualmente, 0,6 – 1 milhão de pessoas residentes em áreas endêmicas são infectadas por essa doença (RUPALI, 2019; WHO, 2020). Atualmente, 89 países situados na Ásia, África, América e região do mediterrâneo já registraram casos de LTA e, segundo dados mais recente da OMS (Figura 1), em 2018, os países que mais reportaram casos de LTA foram: Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Venezuela, Irã, Iraque, Peru, Paquistão, Síria e Tunísia (WHO, 2020).

Figura 1 – Notificações de casos de LTA registradas no mundo pela OMS no ano de 2018

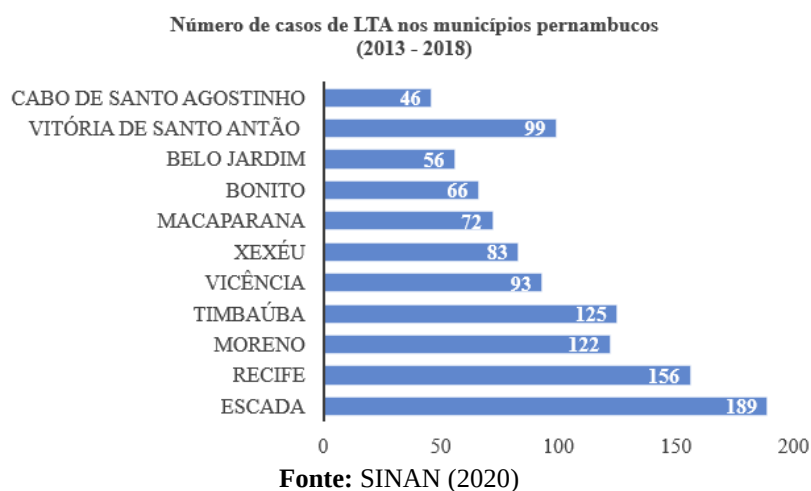


Fonte: WHO, 2020

No Brasil, a LTA trata-se de um grave problema de saúde pública e sanitário e, de acordo com dados estatísticos mais recentes do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), em 2018, foram notificados 17.950 novos casos dessa parasitose no país e as regiões brasileiras com maior incidência foram: norte (8.515 casos) e nordeste (4.415 casos). Wilke et al (2019) apontam que a endemia de LTA, em países como o Brasil, deve-se a urbanização e mudanças climáticas. Esses fenômenos fazem com que os insetos-vetores migrem para áreas periurbanas e rurais, tornando-se assim uma ameaça à saúde pública.

No Estado de Pernambuco foram registrados 1.855 novos casos de LTA no período de 2013 a 2018. Apesar de serem registrados casos por todo estado, existe uma grande incidência desta parasitose nos municípios localizados no litoral e zona da mata pernambucano. Segundo dados do SINAN (2020), os municípios pernambucanos mais incidentes no período de 2013 a 2018 foram: Escada, Recife, Moreno, Timbaúba, Vicência, Xexéu, Macaparana, Bonito, Belo Jardim, Vitória de Santo Antão e Cabo de Santo Agostinho (Figura 2).

Figura 2 – Número de casos de LTA registrados nos municípios pernambucanos no período de 2013 – 2018



Em relação a classificação taxonômica da *Leishmania spp* (Quadro 1), é válido destacar que esse parasito pertence à família trypanossomatidae. Essa família possui grande interesse clínico por conter também os agentes etiológicos causadores das DNTs Doença de Chagas e Doença Africana do Sono, *Trypanossoma cruzi* e *Trypanossoma brucei*, respectivamente (AKHOUNDI et al, 2016; KAUFER et al, 2020). As principais características morfológicas dessa família são o cineplasto, DNA mitocondrial único e um único flagelo (CAETANO, 2019).

Atualmente, já foram descritos na literatura mais de 20 agentes etiológicos relacionados com a patogênese da LTA. No Brasil, as três espécies predominantes são: *L. (L) amazonensis*, *L. (V) braziliensis* e *L. (V) guyanensis*, porém as espécies *L. (V) lainsoni*, *L. (V) naiffi*, *L. (V)*

shawii e *L. (V) lindenbergi* foram reportadas em alguns estados brasileiros, sobretudo nas regiões norte, nordeste e centro-oeste (ZAGHI et al, 2011; AKHOUNDI et al, 2016; BRASIL, 2017; BURZA et al, 2018).

Quadro 1 – Classificação taxonômica da *Leishmania spp*

Classificação taxonômica	
Reino	Protista
Sub-reino	Protozoa
Filo	Sarcomastigophora
Subfilo	Mastigophora
Classe	Zoomastigophorea
Ordem	Kinetoplastida
Subordem	Trypanosomatina
Família	Trypanosomatidae
Subfamília	Leishmaniinae
Gênero	<i>Leishmania</i>
Subgêneros	<i>Leishmania</i> e <i>Viannia</i>

Fonte: KAUFER et al, 2020

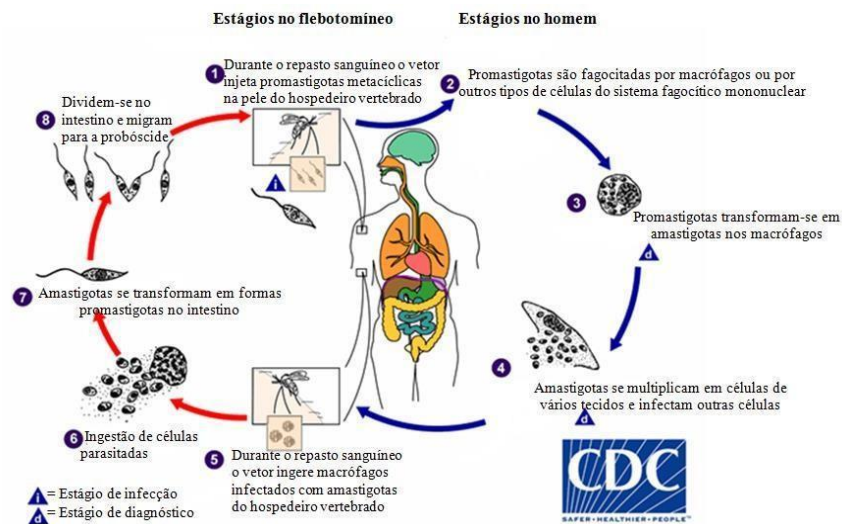
Dentre as espécies do gênero *Leishmania* existentes no Brasil, a espécie escolhida para avaliação leishmanicida dos novos compostos heterocíclicos pentagonais foi a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, devido à sua alta virulência, por gerar lesões crônicas na pele e mucosa e por possuir resistência ao tratamento quimioterápico convencional (SCOTT; NOVAIS, 2016; FIRMINO-CRUZ et al, 2020).

3.1.2 Ciclo biológico da *Leishmania spp*

O ciclo biológico de *Leishmania spp* é classificado como um ciclo heteroxênico, pois, o parasito pode viver alternadamente em hospedeiros vertebrados mamíferos, exemplificado na Figura 3 por seres humanos, e em hospedeiro invertebrados, insetos-vetores fêmeas da subfamília Phlebotominae (KEVRIC et al, 2015; BATES, 2018). As leishmanias apresentam duas formas evolutivas: amastigota intracelular (hospedeiro vertebrado) e promastigota (hospedeiro invertebrado) e sua reprodução ocorre por divisão binária simples ou longitudinal

(BATES, 2018). O ciclo biológico apresentado na figura abaixo (Figura 3) é válido para todos os agentes etiológicos da LTA.

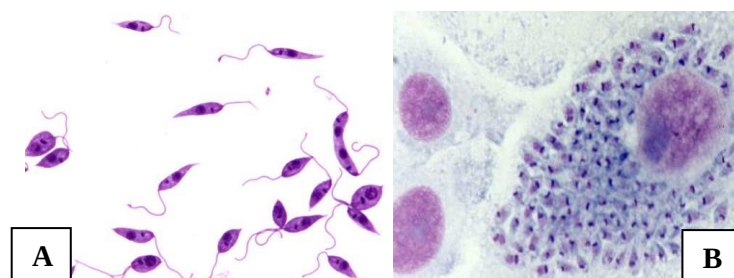
Figura 3 – Ciclo biológico da *Leishmania spp*



Fonte: Extraída e adaptada do Center for Disease Control and Prevention (2017)

O ciclo de transmissão de *Leishmania spp* inicia-se quando dípteros flebotomíneos fêmeas infectadas realizam o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, como o ser humano, injeta promastigotas metacíclicas (Figura 4A) na hipoderme do hospedeiro, sendo a forma infectante da leishmania (KEVRIC et al, 2015; SÉGUIN; DESCOTEAUX, 2016).

Figura 4 – Formas Evolutivas de *Leishmania spp*. A: formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania spp*; B: Formas amastigotas intracelular de *Leishmania spp* no macrófago



Fonte: A e B: Oxford (2018).

Logo, macrófagos e células mononucleares do sistema imune presentes na corrente sanguínea migram para a região da hipoderme para fagocitar as promastigotas e, no fagolisossomo (fusão do vacúolo parasitóforo com lisossomos do macrófago), o parasito assume a forma amastigota para escapar da ação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (EROS e ERNS) e diminuir suas necessidades energéticas, devido a limitação de nutrientes na célula-hospedeira (SÉGUIN; DESCOTEAUX, 2016). De acordo com Podinovskaia e

Descoteaux (2015), as promastigotas também podem infectar macrófagos ativamente, através de interações do flagelo com receptores presentes na superfície do macrófago, como CR3 e FcγR, que não ativem a resposta microbicida dessa célula (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

A forma evolutiva amastigota (Figura 4B) possui mecanismos de resistência que impede de ser destruída pela célula infectada, permitindo multiplicasse no macrófago e resistir ao pH do lisossomo. A reprodução das amastigotas se dar por divisão binária simples. Devido à grande quantidade de amastigotas, o macrófago lisa liberando-as para infectar outras células mononucleares atraídas para sítio de infecção, ocorrendo assim a instalação da infecção pelo parasito (SÉGUIN; DESCOTEAUX, 2016).

No período noturno, durante o repasto sanguíneo, a fêmea do gênero *Lutzomyia spp* (Figura 5) ingere macrófagos infectados com amastigotas. No intestino médio do inseto-vetor, as amastigotas começam a ter uma alta taxa de proliferação e assume a forma promastigota procíclicas (SUNTER; GULL, 2017).

As promastigotas procíclicas migram para as porções anteriores do trato digestivo do inseto fêmea e, através do processo de metaciclogênese, transformam-se em promastigotas metacíclicas (forma infectante). Após alguns dias, as promastigotas metacíclicas migram para a probóscide do inseto-vetor, onde serão inoculados no hospedeiro vertebrado, reiniciando outro ciclo de infecção de *Leishmania spp* (SUNTER; GULL, 2017).

Figura 5 – Flebotomíneo fêmea do gênero *Lutzomyia spp*



Fonte: Rogers et al, 2009

3.1.3 Aspectos imunológicos e clínicos de LTA causada por *Leishmania amazonensis*

O desenvolvimento da infecção por *Leishmania amazonensis* dependerá da resposta e competência imunológica do indivíduo, pois, o paciente pode desenvolver alguma variação

clínica da doença na pele e/ou mucosa ou, em alguns casos, apresentar um quadro de infecção assintomático (ANDRADE-NARVAEZ et al, 2016; CARNEIRO et al, 2020).

Após a inoculação do parasito na hipoderme, a resposta imune inata confrontará as promastigotas metacíclicas através da ação do sistema complemento, macrófagos, neutrófilos e células natural killer (NK) existentes nessa região. Após ativados, devido ao interferon tipo gama ($\text{IFN-}\gamma$), macrófagos e neutrófilos irão produzir EROs e ERNs, além da fagocitose facilitada dos parasitos e citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral tipo alfa ($\text{TNF-}\alpha$) e interleucina tipo 2 (IL-2) (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015; DUQUE; DESCOTEAUX, 2015; LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVAEZ, 2020).

Após a instalação do processo inflamatório, inicia-se a ação da resposta imune adaptativa, através da atuação de linfócitos T helper 1 (Th1) mediado por citocinas pró-inflamatórias, como $\text{IFN-}\gamma$. A presença de linfócitos T citotóxicos (TCD4^+ e TCD8^+) são essenciais para o controle da doença e processo de cicatrização. Nessa fase, também existe participação da resposta imune humoral, com presença de plasmócito no local de infecção (CARNEIRO et al, 2020).

Por sua vez, a *Leishmania* usará mecanismos para evadir das respostas imunológicas e perpetuar a infecção. As promastigotas metacíclicas utilizam a glicoproteína gp63 em receptores não microbicidas, como o receptor CR3, para invadir macrófagos sem serem destruídas (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015), hiperfosforilam componentes do sistema complemento para evitar lise celular (GURUNG; KANNEGANTI, 2015), induzem uma resposta Th2 com objetivo de diminuir recrutamento celular e geração de EROs e ERNs através das citocinas IL-10 e $\text{TGF-}\beta$ (PAUL et al, 2016). Além disso, a transformação em amastigota intracelular torna o parasito resistente ao pH e as enzimas lisossomais (SÉGUIN; DESCOTEAUX, 2016).

Em relação aos sintomas clínicos, por ser uma espécie pouco antropofílica, as infecções por *L. amazonensis* manifestam-se pela forma cutânea difusa (LCD) (Figura 6A). A LCD caracteriza-se por lesões papulares ou nodulares distribuídas ao longo da superfície corporal, essas lesões podem ser deformantes e difíceis de ser tratadas pela terapia convencional e dificilmente, evoluem no sentido de cura, ocorrendo a forma recidiva (LCR) (Figura 6B). As lesões na LCD são diferentes das outras formas, pois, são ricas em parasitos e anérgicas (FIRMINO-CRUZ et al, 2020).

Figura 6 – Principais manifestações clínicas de *L. amazonensis*. A: Leishmaniose cutânea difusa (LCD); B: Leishmaniose cutânea recidiva (LCR).



Fonte: A- Brasil, 2017; B- Handler et al, 2015.

De forma secundária, podem ocorrer a forma mucosa (LM) (Figura 7A) ou mucocutânea (LMC) (Figura 7B). A LM trata-se de uma complicação causada por uma metástase de uma lesão cutânea distante e tratadas (forma pregressa) ou por lesões cutâneas na face (forma contínua). As lesões mucosas são altamente deformantes, causam sequelas funcionais nas regiões afetadas e não evoluem para cura, necessitando de um tratamento mais efetivo (BARRAL et al 1991; CARDOSO et al, 2010; McGWIRE; SATOSKAR, 2014). A leishmaniose visceral (LV) (Figura 7C) por *Leishmania amazonensis* é uma infecção secundária menos comum, mas já foram relatos de casos no Brasil (ALEIXO et al, 2006).

Figura 7 – Outros tipos de manifestações clínicas de *L. amazonensis*. A: Leishmaniose mucosa (LM); B: Leishmaniose mucocutânea (LMC); Leishmaniose visceral (LV)



Fonte: A: Handler et al (2015); B e C: Neuber (2008)

3.1.4 Tratamento quimioterápico voltada a LTA

O tratamento quimioterápico das leishmanioses (LTA e LV) no Brasil procede de acordo com a RENAME 2020, onde quatro fármacos (Tabela 1) são disponibilizados pelo Ministério da Saúde para hospitais e unidades de saúde especializadas, sendo esses fármacos: antimoniato de *N*-metil-meglumina, anfotericina B (formulações lipossomal e desoxicolato), pentamidina e miltefosina (RENAME, 2020).

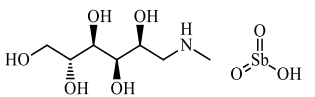
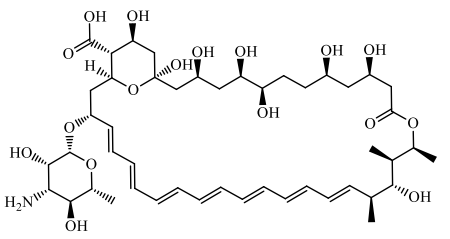
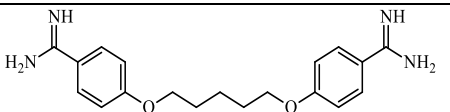
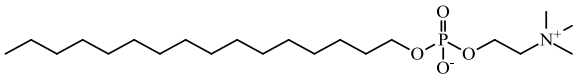
O antimoniato de *N*-metil-meglumina (ANG) é um pró-fármaco utilizado no tratamento de leishmanioses (LTA e LV). Desde 1945, o ANG é o fármaco de primeira escolha no tratamento dessa doença no Brasil e sua dose terapêutica é corresponde a 20 mg/Sb⁵⁺/kg/dia durante 30 dias e pode ser administrado por via intramuscular, endovenosa e intralesional (CARVALHO et al, 2019). Na LM, utiliza-se a combinação de ANG e pentoxifilina (VENTIN et al, 2018). Os principais efeitos adversos dos antimoniatos pentavalentes são: Mialgias, artralgias, cefaleia, anorexia, náuseas, febre, complicações no local de administração, alterações hepáticas, insuficiência renal aguda e alterações no eletrocardiograma (aumento do intervalo QT) (CARVALHO et al, 2019). Existem relatos de resistência do parasito a esse fármaco (YARDLEY et al, 2006; PONTE-SUCRE et al, 2017).

A anfotericina B (AnB) apresenta uma alta eficácia no tratamento contra a LTA e LV. Para o tratamento, o internamento hospitalar é necessário, pois a AnB possui uma infusão lenta (CHAVÉZ-FUMAGALLI et al, 2015). No Brasil, são utilizadas duas apresentações desse fármaco – desoxicolato de anfotericina B (AnBD) e anfotericina B lipossomal (AnBL). A AnBL possui um menor tempo de tratamento e baixa toxicidade em comparação com AnBD, mas, essa formulação possui um alto impacto econômico, pois, cada frasco-ampola pode custar, aproximadamente, 1.365,00 reais (ADLER-MOORE et al, 2016). A resistência a AnB é pouco relatada, mas, pacientes co-infectados com HIV/LTA podem desenvolver a forma recidiva da doença, devido a sua imunocompetência debilitada (KAUR; RAJPUT, 2014).

A pentamidina é utilizada como fármaco de segunda escolha na quimioterapia contra LTA e LV, sendo indicada em casos de resistência a antimoniatos pentavalentes, formas recidivas da doença e falhas terapêuticas (MENEZES et al, 2015; FERREIRA TERCEIRO et al, 2019). Seus efeitos adversos estão associados com complicações no local de aplicação – dor, endurecimento do local e abscessos – e complicações graves com hipoglicemia, pancreatite, miocardite e disfunções renais (CHRISTEN et al, 2018).

A miltefosina trata-se de um fármaco de administração oral para LTA e LV, mas, em caso de cepas multirresistentes, faz necessário a utilização de uma terapia combinada com anfotericina B (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2015). Os principais efeitos adversos de miltefosina são dor de cabeça, dores abdominais, náuseas, vômitos, diarreia, elevação dos níveis sérica das transaminases e creatinina, trombocitopenia, problemas sexuais em homens (dor escrotal e distúrbios relacionados a ejaculação) e síndrome de Steve-Johnson em pessoas hipersensíveis a esse fármaco (VAKIL et al, 2015).

Tabela 1 – Medicamentos padronizados pelo Ministério da Saúde voltados ao tratamento de LTA

Medicamento	Estrutura química	Forma Farmacêutica	Dose e tempo de tratamento	Principais reações adversas
Antimoniato de N-metil-meglumina (ANM)		Solução injetável contendo 81 mg/mL de Sb ⁵⁺ .	20 mg Sb ⁵⁺ /Kg/dia por via intramuscular, intralesional ou endovenosa durante 30 dias	Mialgias, artralgias, cefaleia, anorexia, náuseas, febre, complicações no local de aplicação, alterações hepáticas, insuficiência renal aguda e alterações no eletrocardiograma (aumento no intervalo QT).
Anfotericina B (AnB)		Anfotericina B lipossomal (AnBL): Pó para injetável contendo 50 mg.	ABL: 3 a 5 mg/kg/dia por via endovenosa durante 5 a 7 dias	Febre, cefaleia, náusea, vômitos, tremores, calafrios e dor lombar
		Desoxicolato de Anfotericina B (AnBD): Pó para injetável contendo 50 mg.	ABD: 0,7 a 1mg/kg/dia por via endovenosa durante 14 a 20 dias	Febre, cefaleia, náuseas, vômitos, anorexia, tremores, calafrios, cianose, hipopotassemia, hipomagnessemia e alteração da função renal.
Pentamidina		Pó para solução injetável contendo 300 mg.	3 a 4 mg/kg/dia por via endovenosa em dias alternados	Flebite, abscessos, anorexia, náusea, vômito, hipotensão, nefrotoxicidade, pancreatite, miocardite, leucopenia e hipoglicemia.
Miltefosina		Cápsulas contendo 10 ou 50 mg.	2,5 mg/kg/dia, dose máxima 150 mg/kg/dia, durante 28 dias.	Náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, dor de cabeça, elevação de TGO, TGP e creatinina, trombocitopenia, problemas sexuais em homens (dor escrotal e distúrbios na ejaculação), potencial efeito teratogênico e Síndrome de Steve-Johnson

3.2 QUÍMICA MEDICINAL E A CONCEPÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS VOLTADOS AO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

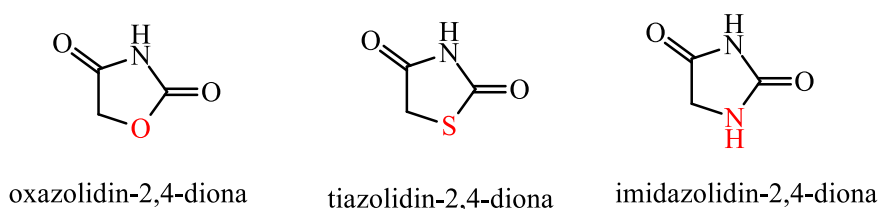
A química medicinal é uma ciência bastante importante na descoberta, criação e planejamento de novos candidatos a fármacos voltados para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas (DNTs), como as leishmanioses. Essa ciência possui um caráter interdisciplinar, englobando conhecimentos das áreas biomédicas, farmacêuticas e computacionais, sendo a química a sua ciência-base (GUIDO et al, 2010; CAMPBELL et al 2018; MIKOVSKI et al, 2019).

Essa ciência abrange a elucidação estrutural de novas entidades químicas (NEQs), estudos que relacione a estrutura com a atividade biológica (REA) e ensaios experimentais e computacionais baseado em parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos (VEBER et al, 2002; WALTERS, 2012; CAMPBELL et al 2018).

No planejamento de NEQs, o emprego de modificações moleculares faz parte da etapa mais importante na concepção de novos fármacos, pois, nessa fase ocorre a formulação do *design* e síntese de um novo composto ligante (*hits*) e seus congêneres, visando fármacos mais seletivos ao seu alvo terapêutico elencado e com baixa toxicidade (SANGI, 2016). As principais estratégias utilizadas nas modificações moleculares são as técnicas de simplificação molecular, hibridação molecular e bioisosterismo.

No presente trabalho, utilizamos a estratégia de bioisosterismo para obtenção de novos compostos das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG. O bioisosterismo (Figura 8) é descrito como uma técnica de modificação molecular baseada na substituição de um átomo ou fragmento de um composto bioativo por outro átomo (bioisosterismo clássico) ou grupo de átomos (bioisosterismo não clássico) que possuam volume molecular, características físico-química e biológicas semelhantes (GAIKWAD et al, 2012).

Figura 8 – Exemplo de bioisosterismo clássico



Fonte: Autora

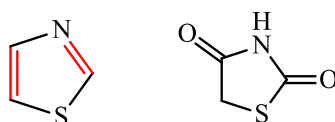
A utilização de estruturas privilegiadas na síntese de novos fármacos voltados a leishmaniose tegumentar americana (LTA) merecem destaque, pois, segundo Evans et al (1988), as estruturas privilegiadas tratam-se de um núcleo heterocíclo ou fragmento que proporciona uma variedade de compostos bioativos através de modificações moleculares (EVANS et al, 1988; LEITE et al, 2017).

Dentre as estruturas privilegiadas, o núcleo tiazolidin-2,4-diona (TZD) e seus derivados mostram-se promissores candidatos contra a LTA (AIRES, 2017; GOUVEIA, 2015; GOUVEIA, 2019). O núcleo TZD vem sendo empregada em pesquisas bem-sucedidas do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LqIT/UFPE) para atividade antiparasitária, tais como esquistossomicida (OLIVEIRA et al, 2015; ALMEIDA JUNIOR et al, 2019), antimicrobiana (PEREIRA et al, 2019), tripanossomicida (OLIVEIRA et al, 2015; ANDRADE et al, 2019) e leishmanicida (GOUVEIA, 2015; GOUVEIA, 2019). Devido a essa importância clínica dessa classe, o núcleo tiazolidin-2,4-diona (TZD) foi empregado como protótipo do presente estudo para síntese de novos compostos leishmanicidas.

3.3 QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS TIAZOLIDIN-2,4-DIONAS

Por ser um *scaffold* versátil, possuir uma boa reatividade e rendimento reacionais que podem ser considerados satisfatórios, o núcleo heterocíclo TZD possui destaque na síntese de novos fármacos. A estrutura química da TZD foi elucidada por Libermann e colaboradores em 1881 (LIMA, 1998; LIESEN et al, 2008), tratando-se de um anel de cinco membros saturado que contém enxofre (S) na posição 1 e nitrogênio (N) na posição 3. Devido a sua saturação, o núcleo TZD torne-se distinto dos compostos tiazólicos (Figura 9).

Figura 9 – Diferenças entre o núcleo tiazol e a tiazolidin-2,4-diona

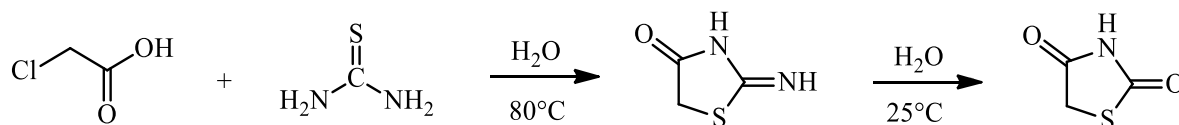


Fonte: Autora

Para a obtenção do núcleo TZD, existem diferentes métodos descritos na literatura. No presente trabalho, utilizamos o método clássico de obtenção, a partir de uma reação de ciclização entre tioureia não substituída e ácido monocloroacético em meio aquoso, sob refluxo e aquecimento (CHADHA et al, 2017), com duração de 12 – 24 horas. Essa reação forma um composto intermediário, denominado 2-imino-tiazolidin-4-ona. Derivados tiazolidínicos, como

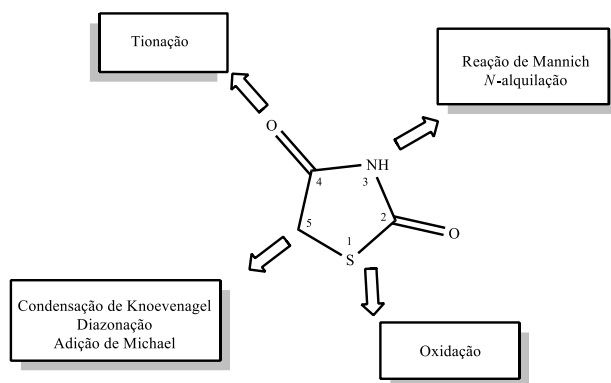
4-tiazolidinona, podem ser obtidos através da ciclização de tiossemicarbazonas tratadas com 2-cloroacetato de etila e acetato de sódio (OLIVEIRA et al, 2017). O esquema abaixo (Esquema 1) demonstra a método clássico de obtenção de TZD.

Esquema 1 – Método clássico de obtenção de TZD



Em relação a reatividade de TZD (Figura 10), existem quatro sítios reativos – as posições 1, 3, 4 e 5 – que, através de reações clássicas, possibilita a obtenção de novos derivados. As principais reações de substituições no núcleo TZD são oxidação, *N*-alquilação, reação de Mannich, tionação, condensação de Knoevenagel, adição de Michael e diazotação (LIESEN et al, 2008; MOHARTY et al, 2014; KUMAR et al, 2018; SLACHTOVÁ; JANOVSÁ; BRULÍKOVÁ, 2019). Kaminsky et al (2017) enfatizam que a condensação de Knoevenagel na formação de derivados 5-ene-tiazolidínicos é uma ferramenta importante na obtenção de compostos bioativos.

Figura 10 – Reatividade do núcleo TZD



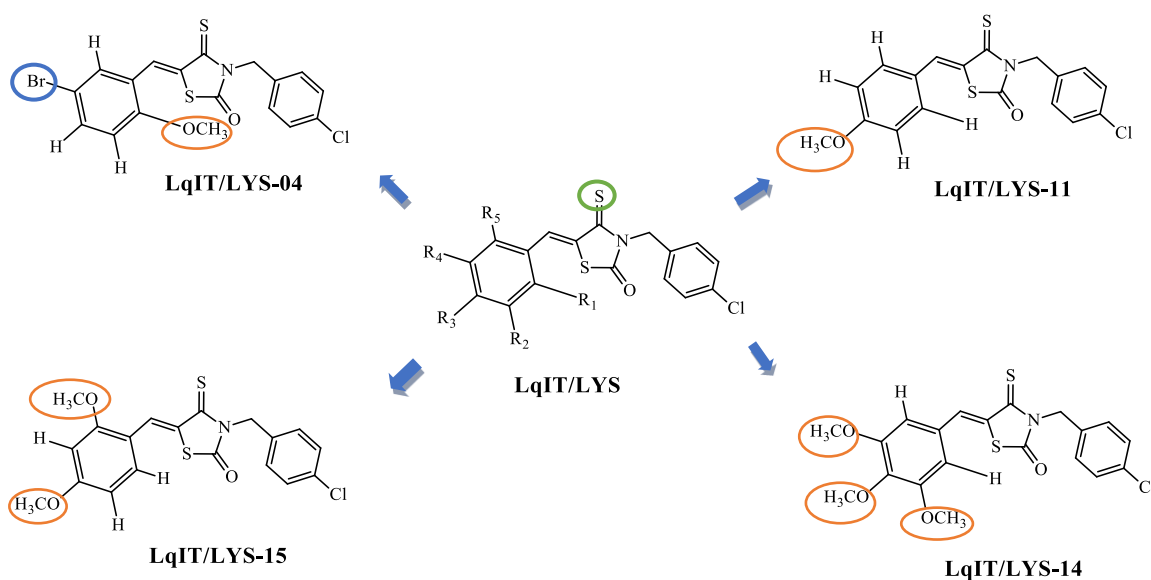
Fonte: Adaptado, Liesen et al (2008)

A síntese dos novos compostos heterocíclicos pentagonais foi realizada através de modificações moleculares no núcleo TZD utilizando o bioisoterismo clássico. Nos compostos LqIT/MOG foi adicionado o heterocíclo biciclo indol não substituído através da condensação de Knoevenagel na posição 5 do núcleo TZD devido a sua vasta aplicação farmacológica (OLIVEIRA et al, 2017; MORAES et al 2018; ANDRADE et al, 2019). O heterocíclo indol

está presente na estrutura de diversas biomoléculas, como serotonina e alcalóides, e em fármacos comerciais, ondansetrona e indometacina (CHADHA et al, 2017; KUMARI et al, 2019). Arelado a isso, Silva et al (2020) obtiveram novos derivados indol-tiosemicarbazônicos substituídos com valores de IC_{50} de 13.61 a 481.52 μ M para *L. amazonensis*, demonstrando assim o potencial leishmanicida do indol.

Enquanto nos compostos LqIT/LYS (Figura 11), foram adicionados benzilidenos substituídos na posição 5 do núcleo TZD. Os grupos substituintes utilizados na porção benzilideno foram o metóxi e o halogênio bromo (Br) no LqIT/LYS-04, devido a contribuição desses compostos para atividade leishmanicida (BELLO et al 2011; SILVA et al 2020).

Figura 11 – Estratégia de síntese dos compostos LqIT/LYS



Fonte: Autora

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESTUDO QUÍMICO

4.1.1 Reagentes

Os reagentes e solventes utilizados para a síntese dos novos compostos heterocíclicos pentagonais das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG foram: tiouréia, ácido monocloroacético, cloreto de 4-clorobenzila, cloreto de 4-metilbenzila, 1-H-indol-3-carboxaldeído, 4-metoxibenzaldeído, 2,4-dimetoxibenzaldeído, 3,4,5-trimetoxibenzaldeído, 5-bromo-2-metoxibenzaldeído, Reagente de Lawesson (1,3-ditio-2,4-difosfatano-2,4-dissulfeto-2,4-bis(4-metóxfenil)), etanol absoluto, água destilada, trietilamina (catalisador básico), hidróxido de sódio, clorofórmio, 1,4-dioxano anidro, gás argônio, acetato de etila, *n*-hexano, dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6). Os reagentes e solventes utilizados são provenientes dos fabricantes das marcas Sigma-Aldrich[®], Vetec[®], Química Moderna[®], Acros Organics[®] e Dinâmica[®].

4.1.2 Cromatografia e determinação de ponto de fusão

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ da Merck[®] de 0,25 mm de espessura, reveladas na câmara reveladora de luz ultravioleta (LqIT/UFPE) em comprimentos de onda (λ) de 254 ou 366 nm. Como sistema de eluição, foram utilizados os solventes *n*-hexano e acetato de etila, da marca Química Moderna[®], em diferentes proporções. A determinação do ponto de fusão médio dos novos compostos obtidos foi realizada em triplicata e medida em graus celsius (°C), com o auxílio do Fusiômetro (LqIT/UFPE), da marca Fisatom[®] Brasil, modelo 431d, e tubos capilares visualizados no sistema óptico com aumento de 4x.

4.1.3 Análises espectroscópicas

A caracterização estrutural dos novos compostos das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG foram realizadas as seguintes análises espectroscópicas: espectroscopia de absorção no infravermelho (IV), espectrometria de massas (HRMS), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN ¹H e ¹³C).

A RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos no equipamento Varian Unity Plus, pertencente a Central Analítica do Departamento de Química Fundamental – DQF/UFPE, utilizando a frequência de 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C , as amostras foram solubilizadas em DMSO- d_6 . Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) indicada em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram denominadas da seguinte forma: simpleto (s), simpleto largo (sl), duplete (d) e multiplete (m).

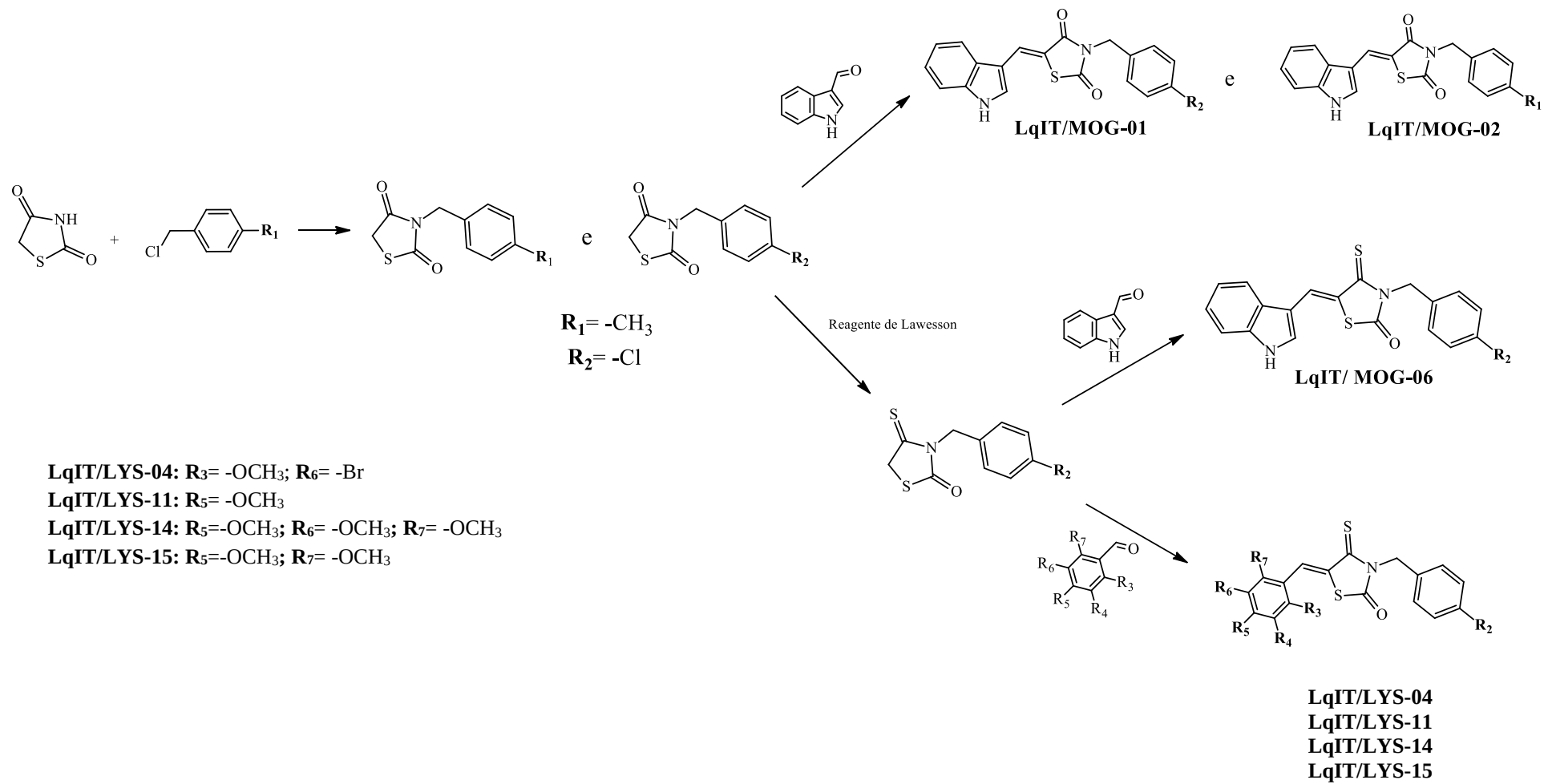
As análises de IV foram realizadas no equipamento PerkinElmer[®] FT-IR Spectrum 400, no Laboratório de Análise de Combustível (LAC/UFPE). E, HRMS foram realizadas no equipamento AutoFlex III Smartbean MALDI-TOF Bruker Daltonics[®] no Centro de Tecnologias Estratégica do Nordeste (CETENE/MCTIC).

4.1.4 Metodologia

A obtenção dos compostos intermediários e compostos finais das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG ocorreram através de modificações moleculares no *scaffold* tiazolidin-2,4-diona (TZD) utilizando os mecanismos reacionais de *N*-alquilação, tionação via reação de Wittig e condensação de Knoevenagel.

A estratégia de síntese empregada na obtenção dos novos derivados heterocíclicos pentagonais foi a técnica de bioisosterismo nas séries LqIT/LYS e LqIT/MOG. Na série LqIT/LYS, foram adicionados na porção benzil, o grupo substituinte metóxi em diferentes posições e quantidades tendo em vista o potencial antiparasitário desses grupos (BELLO et al, 2011), além disso, o halogênio bromo (Br) foi adicionado nessa mesma porção no LqIT/LYS-04, devido seu potencial leishmanicida (SILVA et al, 2020). Nos compostos pertencentes à série LqIT/MOG, ocorreu a adição do biciclo indol não substituído na posição 5 do núcleo tiazolidínico devido seu potencial biológico (CHADHA et al, 2017). No esquema abaixo (Esquema 2) demonstra a rota sintética dos novos derivados das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG.

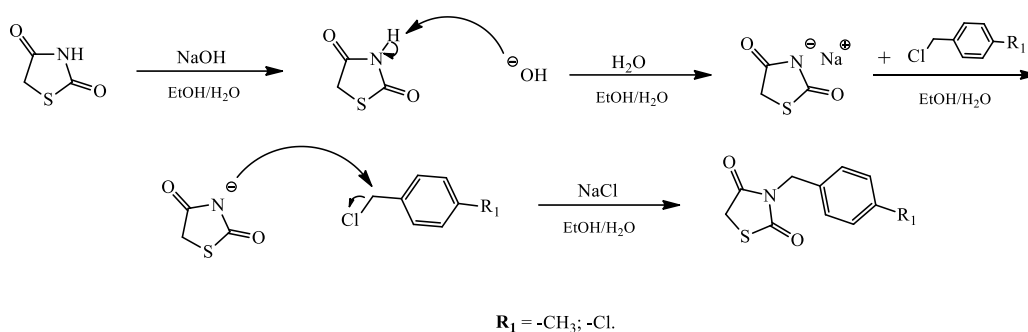
Esquema 2 – Rota sintética dos novos compostos heterocíclicos pentagonais das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG



4.1.4.1 Obtenção de 3-benzil-tiazolidin-2,4-dionas substituídos (LqIT/LYS e LqIT/MOG)

Para obtenção do primeiro intermediário (3-benzil-tiazolidin-2,4-dionas substituídos) comum as séries LqIT/LYS e LqIT/MOG, realizou-se a desprotonação do hidrogênio lábil na posição *N*-3 do núcleo tiazolidínico (TZD) com a adição de uma base inorgânica, resultando no sal em solução hidroalcoólica. Em seguida, com a adição do haleto de benzila, o nucleófilo (ânion amideto) reagiu com o carbono eletrofílico próximo ao grupo abandonador, ocorrendo a finalização da reação de *N*-alquilação e formando o intermediário 3-benzil-tiazolidin-2,4-dionas substituídos. Esta reação é classificada por substituição nucleofílica de segunda ordem ou bimolecular (S_N2), a reação ocorre em uma única etapa, pois a formação do composto final ocorrer de maneira instantânea a eliminação do grupo abandonador (Esquema 3). Porém a reação de *N*-alquilação pode ser classificada como substituição nucleofílica de segunda ordem (S_N1), pois dependerá dos efeitos eletrônicos do grupo associado ao carbono secundário, podendo ser formado o carbocátion.

Esquema 3 – Mecanismo reacional de *N*-alquilação na tiazolidin-2,4-diona



4.1.4.2 Procedimento geral para a obtenção de 3-benzil-tiazolidin-2,4-dionas substituídos

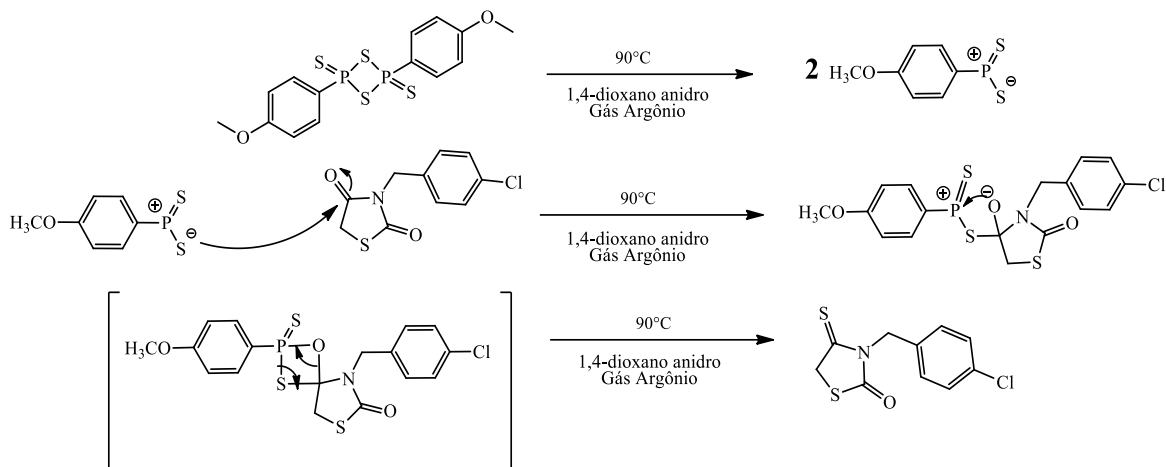
Em um balão volumétrico de fundo redondo, com capacidade de 125 mL, foram adicionados 0,2 g (1,707 mmol) de tiazolidin-2,4-diona e 0,068 g (1,707 mmol) de hidróxido de sódio, previamente solubilizados em uma mistura etanol/água 6:4. Essa mistura permaneceu sob agitação durante 15 minutos a temperatura ambiente, formando o sal de sódio de tiazolidin-2,4-dionas. Após a formação do sal, foram adicionados, gota a gota, quantidades equimolares do haleto de benzila substituído. A reação foi mantida em refluxo por 24 horas e monitorada por CCD. A precipitação ocorreu através da adição de gelo, o precipitado foi filtrado e purificado por cromatografia flash em sílica gel. O eluente utilizado para purificação foi o sistema clorofórmio/etanol 92:08 (ARAÚJO et al, 2016; CAMPOS et al, 2017; RÊGO et al, 2014).

Síntese do composto intermediário 3-(4-metilbenzil)-tiazolidin-2,4-diona do derivado LqIT/MOG-02: a mistura reacional contendo 0,2 g (1,707 mmol) de tiazolidin-2,4-diona, 0,068 g (1,707 mmol) de hidróxido de sódio e 0,2400 g (1,707 mmol) de cloreto de 4-metilbenzila em 20 mL de etanol/água 6:4 foi mantida sob agitação por 24 horas em temperatura ambiente.

Síntese do composto intermediário 3-(4-clorobenzil)-tiazolidin-2,4-diona dos derivados LqIT/LYS, LqIT/MOG-01 e LqIT/MOG-06: a mistura reacional contendo 0,2 g (1,707 mmol) de tiazolidin-2,4-diona, 0,068 g (1,707 mmol) de hidróxido de sódio e 0,2748 g (1,707 mmol) de cloreto de 4-clorobenzila em 20 mL de etanol/água 6:4 foi mantida sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente.

4.1.4.3 Obtenção de 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona

O mecanismo de tionação para formação do 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona assemelha-se a reação de Wittig para formação de alcenos a partir de aldeídos e cetonas (WITTIG; SCHÖLLKOPF, 1954). O 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona trata-se de um composto intermediário para os compostos da série LqIT/LYS e LqIT/MOG-06. O ídido de ditiofosfina (íon dipolar) é produzido através da quebra do anel central do Reagente de Lawesson na temperatura de 90°C. O ataque nucleófilo ocorre na carbonila localizada na posição 4 do núcleo tiazolidínico, devido o impedimento estérico existente na carbonila presente na posição 2, e a reação tornou-se sincronizada, com transferência de cargas para o oxigênio e ocorre o ataque intramolecular ao fósforo. Em seguida, formando o anel de quatro membros semelhante ao anel oxafosfetano produzindo na reação de Wittig. O anel é rapidamente desfeito e a ligação C=S (tiocarbonila) na posição 4 é formada (Esquema 4).

Esquema 4 – Mecanismo reacional de formação do 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona

4.1.4.4 Procedimento geral para obtenção de 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona

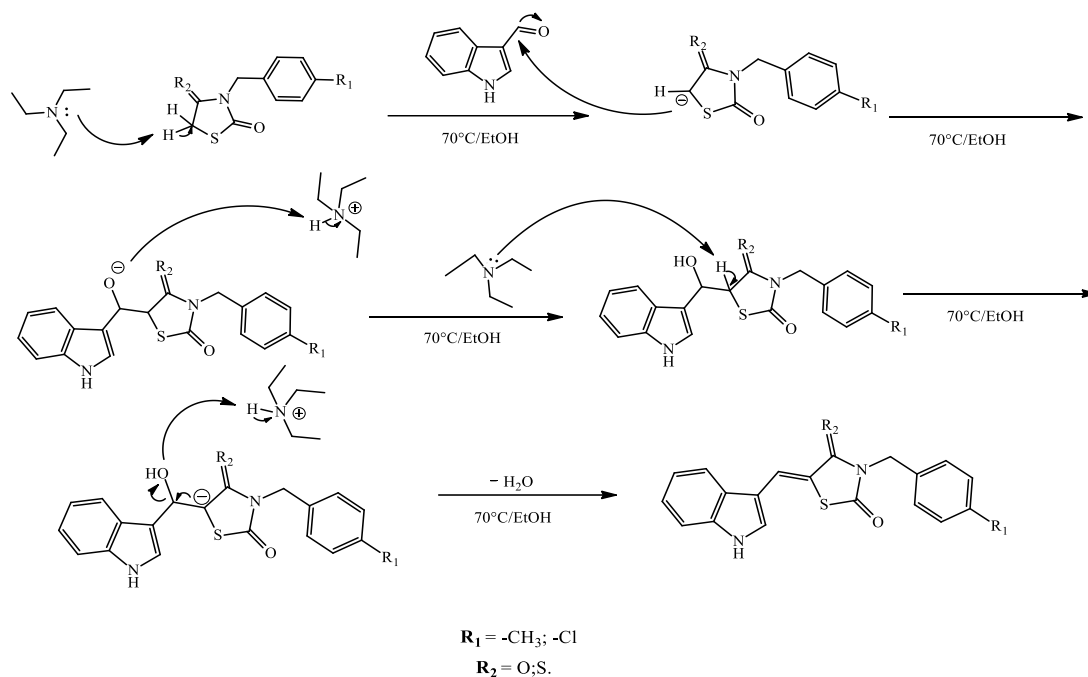
Em um balão volumétrico de fundo redondo, com capacidade de 125 mL, foram adicionados os reagentes, na proporção 3:1, 1 g (3,879 mmol) de 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona, 0,522 g (1,293 mmol) do reagente de Lawesson e 20 mL do solvente 1,4-dioxano anidro. A mistura reacional foi mantida por 24 horas, sob agitação e refluxo com temperatura de 90°C em atmosfera inerte, monitorada por CCD. A utilização da atmosfera inerte, produzida pelo gás argônio, contribuiu para a eliminação do oxigênio da reação. Após o término da reação, a solução foi rotaevaporada e formou uma mistura com aspecto oleoso, em seguida, foi deixado sob refrigeração por 24 horas. No dia seguinte, o produto precipitou através de sucessivas lavagens com *n*-hexano e ocorreu sua filtração. No dia posterior, a purificação foi realizada em sucessivas recristalizações em etanol conduzindo a formação de um produto de cor branca (ARAÚJO et al, 2016; CAMPOS et al, 2017; RÊGO et al, 2014).

4.1.4.5 Obtenção dos compostos finais através do mecanismo de condensação de Knoevenagel das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG

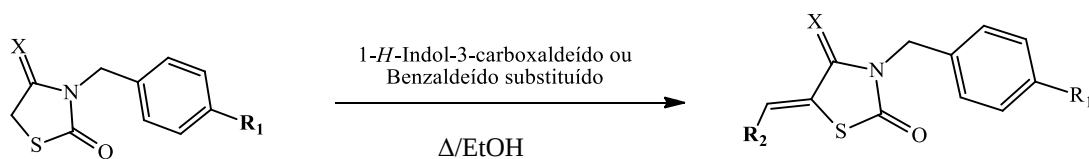
A presença de grupos retiradores de elétrons no núcleo tiazolidínico e tioxo-tiazolidínico, faz com que a posição 5 torna-se um metileno (-CH₂) ativo. Aliado a isso, existe a presença de hidrogênios ácidos nessa posição favorecendo a desprotonação por ataque básico (triethylamina). A reação iniciou-se com a formação um carbânion na posição 5 do núcleo tiazolidínico e tioxo-tiazolidínico. Na próxima etapa, ocorre o ataque nucleofílico a carbonila do 1-*H*-indol-3-carboxaldeído, formando o alcóxido, que irá desprotonar a trietilamina. Após

ser restaurada, a trietilamina desprotona o hidrogênio remanescente do metileno formando o carbânion novamente. A hidroxila restaura o catalisador e após o rearranjo intramolecular, ocorre a reação de desidratação e a ligação C=C é formada. O mecanismo ocorre de forma semelhante com os benzaldeídos substituídos (Esquema 5).

Esquema 5 – Mecanismo reacional de condensação do 1-*H*-indol-3-carboxaldeído



O esquema 6 demonstra os novos compostos das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG e seus respectivos substituintes obtidos através do mecanismo reacional de condensação de Knoevenagel.

Esquema 6 – Novos compostos das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG

Composto	X	R ₁	R ₂
LqIT/LYS-04	S	-Cl	5-bromo-2-metoxifenil
LqIT/LYS-11	S	-Cl	4-metoxifenil
LqIT/LYS-14	S	-Cl	3,4,5-trimetoxifenil
LqIT/LYS-15	S	-Cl	2,4-dimetoxifenil
LqIT/MOG-01	O	-Cl	Indol
LqIT/MOG-02	O	-CH ₃	Indol
LqIT/MOG-06	S	-Cl	Indol

4.1.4.6 Procedimento geral para obtenção de 5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona substituídos da série LqIT/LYS

Em um balão volumétrico de fundo redondo, com capacidade de 125 mL, foram adicionadas quantidades equimolares de 3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona e benzaldeídos substituídos na presença de 0,5 mL de catalisador básico e 10 mL de etanol absoluto como solvente. A mistura reacional foi mantida sob agitação e refluxo por aproximadamente 8 horas sob a temperatura de 90°C. A reação foi acompanhada por CCD (ARAÚJO et al, 2016; CAMPOS et al, 2017; RÊGO et al, 2014). Os produtos foram purificados através de lavagens sucessivas em etanol e apresentavam coloração variada (amarelo e vermelho).

Síntese de 5-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)-3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona (LqIT/LYS-04): A mistura reacional contendo 0,2 g (0,775 mmol) de 3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona, 0,166 g (0,775 mmol) de 5-bromo-2-metoxibenzaldeído, 0,5 do catalizador básico e 10 mL de etanol absoluto foi mantido sob agitação e refluxo por 8 horas à temperatura de 90°C.

Síntese de 5-(4-metoxibenzilideno)-3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona (LqIT/LYS-11): A mistura reacional contendo 0,2 g (0,775 mmol) de 3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-tiazolidin-

2-ona, 0,105 g (0,775 mmol) de 4-metoxibenzaldeído, 0,5 do catalizador básico e 10 mL de etanol absoluto foi mantido sob agitação e refluxo por 8 horas à temperatura de 90°C.

Síntese de 5-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)-3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LqIT/LYS-14): A mistura reacional contendo 0,2 g (0,775 mmol) de 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona, 0,152 g (0,775 mmol) de 3,4,5-trimetoxibenzaldeído, 0,5 do catalizador básico e 10 mL de etanol absoluto foi mantido sob agitação e refluxo por 8 horas à temperatura de 90°C.

Síntese de 5-(2,4-dimetoxibenzil)-3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LqIT/LYS-15): A mistura reacional contendo 0,2 g (0,775 mmol) de 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona, 0,128 g (0,775 mmol) de 2,4-dimetoxibenzaldeído, 0,5 do catalizador básico e 10 mL de etanol absoluto foi mantido sob agitação e refluxo por 8 horas à temperatura de 90°C.

4.1.4.7 Procedimento geral para obtenção de indol-3-il-metileno-3-benzil-tiazolidina-2,4-diona substituídos e indol-3-il-metileno-3-(4-clorobenzil)-4-tioxotiazolidin-2-ona (LqIT/MOG)

Em um balão volumétrico de fundo redondo, com capacidade de 125 mL, foram adicionadas quantidades equimolares de 3-benzil-tiazolidina-2,4-dionas substituídas ou 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona e 3-indol-carboxaldeído na presença de 0,5 mL de catalisador básico e 10 mL de etanol absoluto como solvente. A mistura reacional foi mantida sob agitação e refluxo por aproximadamente 8 horas sob a temperatura aproximada de 60°C. A reação foi acompanhada por CCD (ARAÚJO et al, 2016; CAMPOS et al, 2017; RÊGO et al, 2014). Os produtos foram purificados através de lavagens sucessivas em etanol e apresentaram coloração vermelho.

Síntese do 5-((1-H-indol-3-il)metileno)-3-(4-clorobenzil)tiazolidin-2,4-diona (LqIT/MOG-01): A mistura reacional contendo 0,2 g (0,827 mmol) de 3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona, 0,120 g (0,827 mmol) de 1-H-indol-carboxaldeído, 0,5 do catalizador básico e 10 mL de etanol absoluto foi mantido sob agitação e refluxo por 8 horas à temperatura de 60°C.

Síntese do 5-((1-H-indol-3-il)metileno)-3-(4-metilbenzil)tiazolidin-2,4-diona (LqIT/MOG-02): A mistura reacional contendo 0,2 g (0,903 mmol) de 3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-

diona, 0,131 g (0,903 mmol) de 1-*H*-indol-carboxaldeído, 0,5 do catalizador básico e 10 mL de etanol absoluto foi mantido sob agitação e refluxo por 8 horas à temperatura de 60°C.

Síntese do 5-((1-*H*-indol-3-il)metileno)-3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LqIT/MOG-06): A mistura reacional contendo 0,2 g (0,775 mmol) de 3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona, 0,112 g (0,775 mmol) de 1-*H*-indol-carboxaldeído, 0,5 do catalizador básico e 10 mL de etanol absoluto foi mantido sob agitação e refluxo por 8 horas à temperatura de 60°C.

4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS *IN SILICO* DOS NOVOS COMPOSTOS HETEROCICLICOS PENTAGONAIS

Os principais parâmetros farmacocinéticos foram estimados por metodologias *in silico* através das plataformas Web Swiss ADME (<http://www.swissadme.ch>) (DAINA; ZOETE, 2016) e pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm>) (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). Nessas plataformas, utilizamos como referencial as cinco regras de Lipinski (LIPINSKI et al, 2001) e os principais preditores de parâmetros farmacocinéticos para biodisponibilidade oral (VEBER et al, 2002; LAMBERTUCCI et al, 2018). A importância dessas estimativas deve-se ao fato de que os fármacos leishmanicidas existentes, exceto a miltefosina, são administrados por via parenteral.

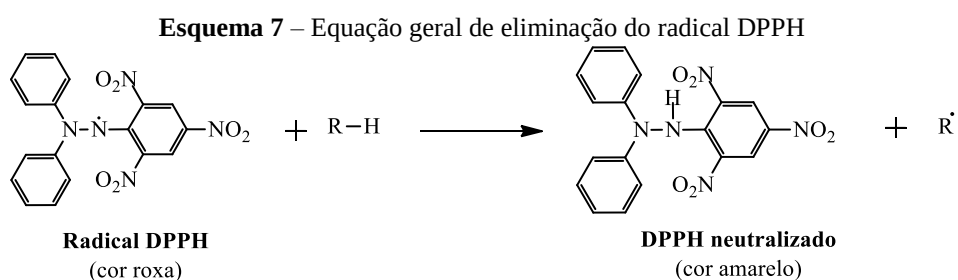
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DOS NOVOS COMPOSTOS HETEROCICLICOS PENTAGONAIS

4.3.1 Atividade de eliminação de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Para verificar o potencial antioxidante *in vitro* dos novos derivados heterocíclicos pentagonais das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG, realizou-se o teste de atividade de eliminação de radicais estáveis 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), como descrito por Bansal et al (2019) e Maltarollo et al. (2019) com modificações. O objetivo desse teste é verificar a contribuição dos novos derivados ao estresse oxidativo causado pelas células de defesa, como macrófagos, para combater a infecção causada por parasitos do gênero *Leishmania*.

4.3.1.1 Metodologia

O teste de eliminação de radicais DPPH trata-se de um teste colorimétrico quantitativo voltados para compostos orgânicos hidrofóbicos, esse teste baseia-se na teoria de que um composto doador de hidrogênio possui caráter antioxidante por estabilizar radicais geradores do estresse oxidativo (BANSAL et al, 2019). O radical estável DPPH possui uma intensa cor roxa e absorbância alta em 517 nm, conforme esse radical recebe hidrogênio, a cor migra para o amarelo e a absorbância decai (BANSAL et al, 2019). O esquema abaixo (Esquema 7) demonstra a equação geral de eliminação do radical DPPH.



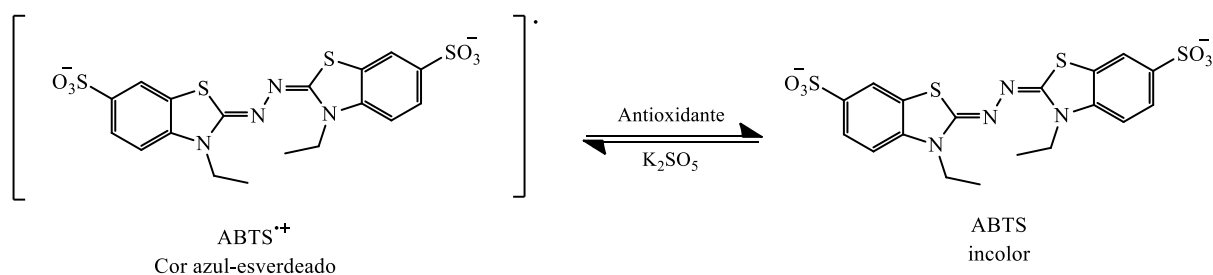
4.3.2 Atividade de eliminação de radicais cátions 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+})

Semelhante ao teste de eliminação de radicais DPPH, a atividade de eliminação de cátions radicais 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}) avaliou o potencial antioxidante *in vitro* dos novos derivados heterocíclicos pentagonais das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG. A atividade foi realizada usando o método relatado por Silva et al (2015) e Maltarollo et al. (2019) com ligeiras modificações.

4.3.2.1 Metodologia

O teste de eliminação de cátions radicais 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}) trata-se de um teste colorimétrico quantitativo e pode ser utilizado para compostos hidrofílicos e hidrofóbicos. Esse teste baseia-se no princípio de que compostos doadores de elétrons possuem caráter antioxidante por estabilizar radicais gerados por estresse oxidativo. A solução contendo o cátion ABTS^{•+} possui cor azul-esverdeado e após sua neutralização do cátion, a solução passou a ter aspecto incolor (SILVA et al, 2015). O esquema abaixo (Esquema 8) demonstra a equação geral de eliminação do radical ABTS^{•+}.

Esquema 8 – Equação geral de eliminação do radical ABTS^{•+}



4.3.2.2 Procedimentos experimental da atividade de eliminação de radicais cátions ABTS^{•+}

Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de ABTS (7 mM) em etanol e uma solução de persulfato de potássio (140 mM). O radical cátion ABTS^{•+} foi preparado a partir da mistura reacional de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida ao abrigo da luz sob temperatura ambiente durante 16 horas. Em seguida, diluiu-se 1 mL desta mistura em álcool etílico para obter uma solução com absorvância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm em espectrofotômetro UV-visível (Hewlett-

Packard, modelo 8453). Para o procedimento experimental foram usados 30 µL de diferentes concentrações dos compostos das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG (500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81 e 3,90 µg/mL) e 3,0 mL de solução etanólica de ABTS e, a absorbância dessa mistura foi medida após 5 minutos de reação. O ácido ascórbico mais solução etanólica de ABTS foi utilizada como controle positivo e a solução-branco foi etanol. A porcentagem de eliminação de cátions ABTS^{•+} foi calculada de acordo com a seguinte equação: Efeito de eliminação de cátions ABTS^{•+} (%) = [(Ac-As) / (Ac)] × 100. Sendo, Ac = Absorbância de solução ABTS sem amostra, As = Absorbância da amostra (SILVA et al, 2015; MALTAROLLO et al, 2019).

4.4 ESTUDO BIOLÓGICO

4.4.1 Teste *in vitro* de citotoxicidade dos novos compostos heterocíclicos pentagonais em macrófagos J774

Dentre os testes de viabilidade celular, o teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina) destaca-se por ser evidenciar e quantificar esse parâmetro através da incorporação de corante a organelas celulares (ROGERO et al, 2003; ALIANÇA et al, 2017). Os macrófagos J774 foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 5x10⁵ células/poço e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Após 24 horas, o sobrenadante foi removido e as células foram incubadas na presença de concentrações variadas dos compostos LqIT/LYS (20; 10; 5; 2,5 e 1,25 µg/mL) e LqIT/MOG (45; 22,5; 11,25; 5,625 e 2,812 µg/mL) por 72 horas. No controle negativo, as células foram incubadas apenas com o meio RPMI e MTT e, no controle positivo, foi adicionado a Anfotericina B.

O teste de MTT trata-se de um teste colorimétrico quantitativo baseado na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Esse tipo de reação forma cristais azuis denominados cristais de formazan, intracelularmente, que são solubilizados e analisados através de espectrofotometria UV/visível (MOSMANN et al, 1983; ALIANÇA et al, 2017). Dessa forma, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico. Após este período, o sobrenadante (Meio RPMI contendo os compostos) foi retirado e adicionado a mesma quantidade de meio RPMI sem vermelho de fenol mais 10 µL de MTT, a uma concentração de 5 mg/ml diluído em tampão fosfato salino (PBS), as células foram incubadas por 3 horas nas mesmas condições de cultivo (ALIANÇA et al, 2017).

Após incubação, o MTT foi retirado cuidadosamente e adicionado 100 µL de DMSO (dimetilsufóxido) por poço para a solubilização dos cristais derivados da redução do MTT, seguido de agitação da placa durante 15 minutos. A leitura da absorbância dos cristais de formazan solubilizados foi realizada utilizando o leitor de ELISA Benchmark Plus Bio-Rad®, Califórnia - EUA, com comprimento de onda de 490 nm, por 15 segundos (ALIANÇA et al, 2017). A porcentagem de células viáveis em relação às células controles foi estimada. A concentração capaz de causar a perda de viabilidade das células em 50% (CC₅₀) das células foi determinada por análise de regressão linear dos dados obtidos pelo software SPSS 8.0 para Windows. Os testes foram realizados em dois experimentos distintos em quadruplicata (ALIANÇA et al, 2017).

4.4.2 Dosagem de óxido nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico (NO) foi estimada a partir do método indireto de Griess (DING; NATHAN; STUEHR, 1988; ALIANÇA et al, 2017), onde a concentração de nitrito, produto estável formado a partir da produção de NO, existente no sobrenadante da cultura de macrófagos J774 tratados por 72 horas com os novos derivados heterocíclicos pentagonais é determinada utilizando o reagente de Griess. Para o procedimento experimental, foram coletados 100 µL do sobrenadante de cada poço contendo cultura de macrófagos J774 tratados com os compostos e incubados com 100 µL do reagente de Griess (1% sulfanilamida/ 0,1% de dicloridrato de *N*-(1-naftil)-etilenediamina/ 2,5% H₂PO₄) à temperatura ambiente por 10 minutos em um agitador de placas. A absorbância foi medida a 540 nm no leitor de ELISA Benchmark Plus Bio-Rad®, Califórnia – EUA. A concentração de nitrito foi determinada através do teste de Tukey no software Prisma versão 5.0 e com auxílio de uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio. Os testes foram realizados em dois experimentos independentes em quadruplicata (DING et al, 1988; ALIANÇA et al, 2017).

4.4.3 Cultivo dos Parasitos

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (Cepa WHOM/00LTB0016), cedidas gentilmente pelos professores doutores Luiz Alves e Fábio Brayner, foram mantidas em meio Schneider (Sigma®) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de estreptomicina, cultivadas em estufa incubadora para BOD – J. Prolab, modelo JP.100 (LBCM/IAM) com temperatura de 26 °C. As formas promastigotas foram utilizados em fase exponencial de crescimento em todas as fases do experimento (ALIANÇA et al, 2017).

4.4.4 Avaliação de susceptibilidade *in vitro* de promastigotas de *Leishmania amazonensis* e determinação do índice de seletividade dos novos compostos heterocíclicos pentagonais

As formas promastigotas *Leishmania amazonensis* foram coletadas, contadas e diluídas em meio Schneider (Sigma®) suplementado com 20% de SFB em uma concentração de 2×10^6 células/mL. Em seguida, as células foram encubadas em diferentes concentrações dos compostos LqIT/LYS (20; 10; 5; 2,5 e 1,25 µg/mL) e LqIT/MOG (100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL) por 72 horas. No controle negativo, as células foram incubadas apenas com o meio Schneider (Sigma®) e no controle positivo, foi adicionado a Anfotericina B no meio. O crescimento da cultura foi acompanhado, através de contagens utilizando a câmara Neubauer. A concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos (IC_{50}) foi o parâmetro utilizado para estimar a inibição do crescimento. A IC_{50} foi determinada após 72 horas de cultivo por análise de regressão linear com o software SPSS 8.0 para Windows. Para cada teste foi realizado 2 experimentos independentes em triplicata. O índice de seletividade (IS) dos compostos para o parasito foi determinado como a razão entre os valores de CC_{50} e IC_{50} obtidos para cada composto (ALIANÇA et al, 2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS NOVOS COMPOSTOS HETEROCÍCLICO PENTAGONAIS

Inicialmente, foram obtidas as principais características físico-químicas apresentadas pelos novos derivados da série LqIT/LYS e LqIT/MOG, sendo essas: o aspecto físico dos compostos, faixa de fusão, rendimento e fator de retenção (RF). Os valores obtidos estão descritos na Tabela 2.

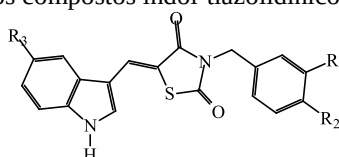
Tabela 2 – Características físico-químicas dos novos compostos heterocíclicos pentagonais

Composto	Aspecto	Faixa de fusão (°C)	Rendimento (%)	RF
LqIT/LYS-04	Sólido vermelho	165 – 166	63,0	0,7 (<i>n</i> -hex/AcOEt 8:2)
LqIT/LYS-11	Sólido vermelho	141 – 142	65,0	0,5 (<i>n</i> -hex/AcOEt 8:2)
LqIT/LYS-14	Sólido vermelho	152 – 154	77,0	0,5 (<i>n</i> -hex/AcOEt 8:2)
LqIT/LYS-15	Sólido vermelho	179 – 180	65,0	0,5 (<i>n</i> -hex/AcOEt 9:1)
LqIT/MOG-01	Sólido amarelo	254 – 256	85	0,6 (<i>n</i> -hex/AcOEt 7:3)
LqIT/MOG-02	Sólido amarelo	239 – 240	74,09	0,5 (<i>n</i> -hex/AcOEt 7:3)
LqIT/MOG-06	Sólido vermelho	152 – 154	70,77	0,6 (<i>n</i> -hex/AcOEt 6:4)

As modificações moleculares no *scaffold* tiazolidínico através das substituições na posição 3 e 5 resultaram em novos derivados heterocíclicos pentagonais com rendimentos reacionais de 63,0 a 85%, que podem ser considerados satisfatórios. A literatura relata que o rendimento reacional para compostos contendo o núcleo tiazolidin-2,4-diona podem variar de 27 a 99% e que, a variação desse valor depende de substituintes adicionados e técnicas utilizadas à síntese (BARROS et al, 2010; ROCHA JUNIOR et al, 2013; OLIVEIRA et al, 2015; SLACHTOVÁ; JANOVSÁ; BRULÍKOVÁ, 2019).

Consonante a isso, utilizando técnicas semelhantes a esse trabalho, Oliveira et al 2015 apresentaram novos compostos indol-tiazolidínicos substituídos (Figura 12) com rendimento entre 40 a 72%, demonstrando assim a eficiência da rota de síntese e técnicas empregadas ao planejamento dos compostos da série LqIT/LYS e LqIT/MOG.

Figura 12 – Rendimento reacional dos compostos indol-tiazolidínicos substituídos (OLIVEIRA et al, 2015)



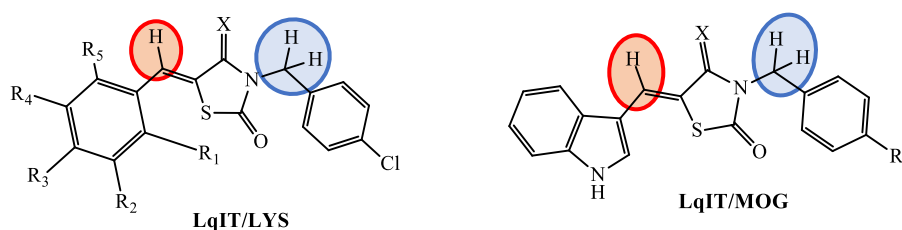
Rendimento: 40 a 72%

Fonte: Oliveira et al, 2015

5.2 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DOS NOVOS COMPOSTOS HETEROCÍCLICO PENTAGONAIS

As análises estruturais dos novos compostos da série LqIT/LYS e LqIT/MOG foram realizadas através de técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN ^1H e ^{13}C), espectroscopia de absorção no infravermelho (IV) e espectrometria de massas (HRMS). Na elucidação dos espectros de RMN ^1H dos novos compostos, elencamos como sinais diagnóstico de hidrogênio àqueles provenientes das ligações covalentes formadas a partir das reações de *N*-alquilação (azul) e condensação de Knoevenagel (vermelho) (Figura 13).

Figura 13 – Sinais diagnósticos de RMN ^1H dos compostos da série LqIT/LYS e LqIT/MOG



Fonte: Autora

Os compostos da série LqIT/LYS apresentaram sinais de hidrogênios pertencentes aos carbonos metilênicos com multiplicidade simpleto (s) e seus deslocamentos químicos variaram de δ 5.27 – 5.29 e, os sinais de hidrogênio ligado ao carbono metínico apresentaram-se como simpletos na região de δ 8.26 – 8.38. Já, nos derivados da série LqIT/MOG, os hidrogênios metilênicos apresentaram-se na região de δ 4.77 – 5.29 (s) e, referente aos hidrogênios metínicos, os sinais foram encontrados na região de δ 8.04 – 8.21 (s). Em seu trabalho, Gouveia (2015) apresentou multiplicidades e deslocamentos químicos semelhantes aos hidrogênios metilênicos dos novos compostos heterocíclicos pentagonais, cujo valores foram δ 4.96 – 4.99 (s). A partir desses dados, conclui-se que os mecanismos reacionais empregados na síntese dos novos compostos foram exitosos. A tabela abaixo (Tabela 3) descreve os principais deslocamentos químicos e multiplicidades dos compostos da série LqIT/LYS e LqIT/MOG.

Tabela 3 – Principais deslocamentos químicos (δ) e multiplicidades de RMN¹H dos novos compostos da série LqIT/LYS e LqIT/MOG

Composto	-CH ₂ -	-CH=
LqIT/LYS-04	5.27 (s)	8.38 (s)
LqIT/LYS-11	5.28 (s)	8.27 (s)
LqIT/LYS-14	5.29 (s)	8.26 (s)
LqIT/LYS-15	5.28 (s)	8.58 (s)
LqIT/MOG-01	4.81 (s)	8.21 (s)
LqIT/MOG-02	4.77 (s)	8.20 (s)
LqIT/MOG-06	5.29 (s)	8.04 (s)

No espectro de RMN¹H foram observados que, os hidrogênios metilênicos do LqIT/MOG-06 apresentaram deslocamento químico de δ 5.29 (Tabela 5), enquanto no composto LqIT/MOG-01, esses hidrogênios apresentam-se δ 4.81. Esse aumento deve-se à influência exercida pela proximidade espacial dos hidrogênios metilênicos ao enxofre. A formação da tiocarbonila foi comprovado através da técnica de HRMS, onde os compostos LqIT/MOG-01 e LqIT/MOG-06 apresentou 368.027 g/mol (Figura 14) e 385,017 g/mol (Figura 15), respectivamente.

Figura 14 – Espectroscopia de massas do composto LqIT/MOG-01

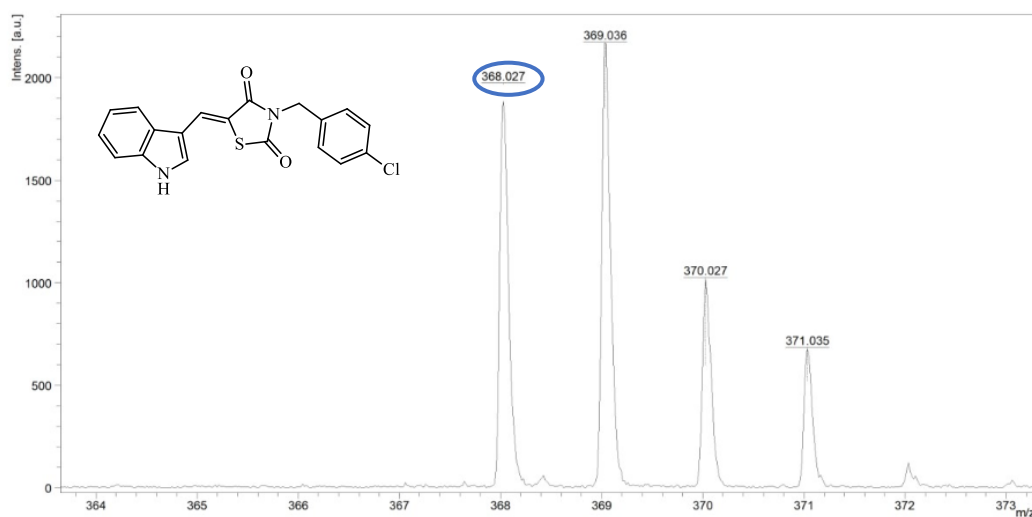
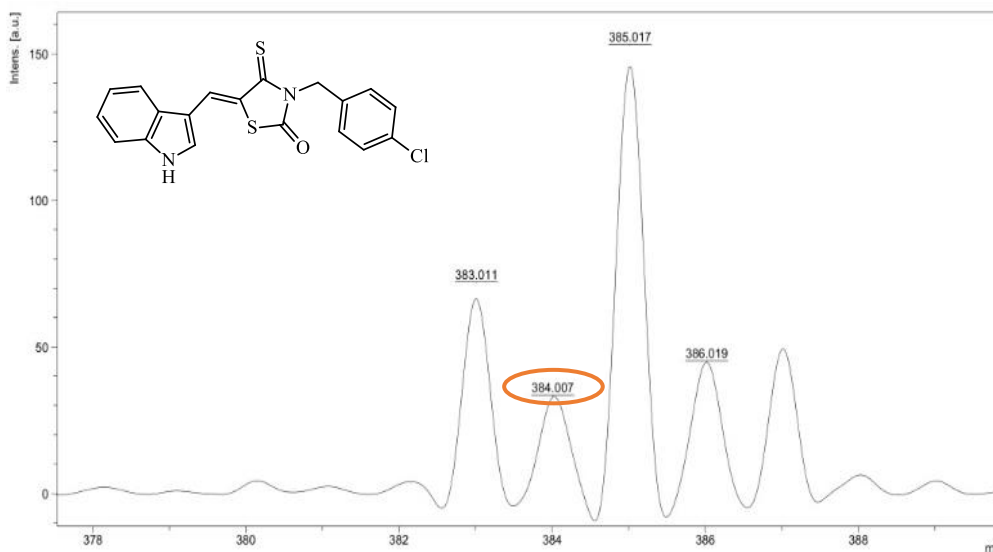
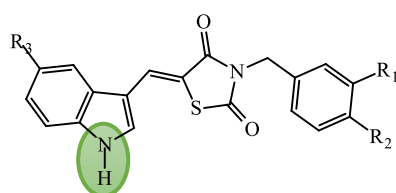


Figura 15 – Espectroscopia de massas do composto LqIT/MOG-06

Outro sinal relevante observado na análise de RMN¹H dos compostos LqIT/MOG-01, LqIT/MOG-02 e LqIT/MOG-06 foram observados deslocamentos químicos de δ 12.19, 12.17 e 12.54, respectivamente, referentes a ligação N-H indólico, caracterizados por um simpleto largo (sl), devido a labilidade do hidrogênio presente nessa ligação. Em seu trabalho com derivados indol-tiazolidínicos (Figura 16), Oliveira et al (2015) apresentaram resultados semelhantes para ligação N-H indólico (verde), apresentando deslocamentos químicos entre 12.03 – 12.31 ppm e multiplicidades semelhantes (s).

Figura 16 – Deslocamento químico e multiplicidade do N-H indólico dos compostos indol-tiazolidínicos (OLIVEIRA et al, 2015)

N-H indólico: 12.03 - 12.31 ppm (s)

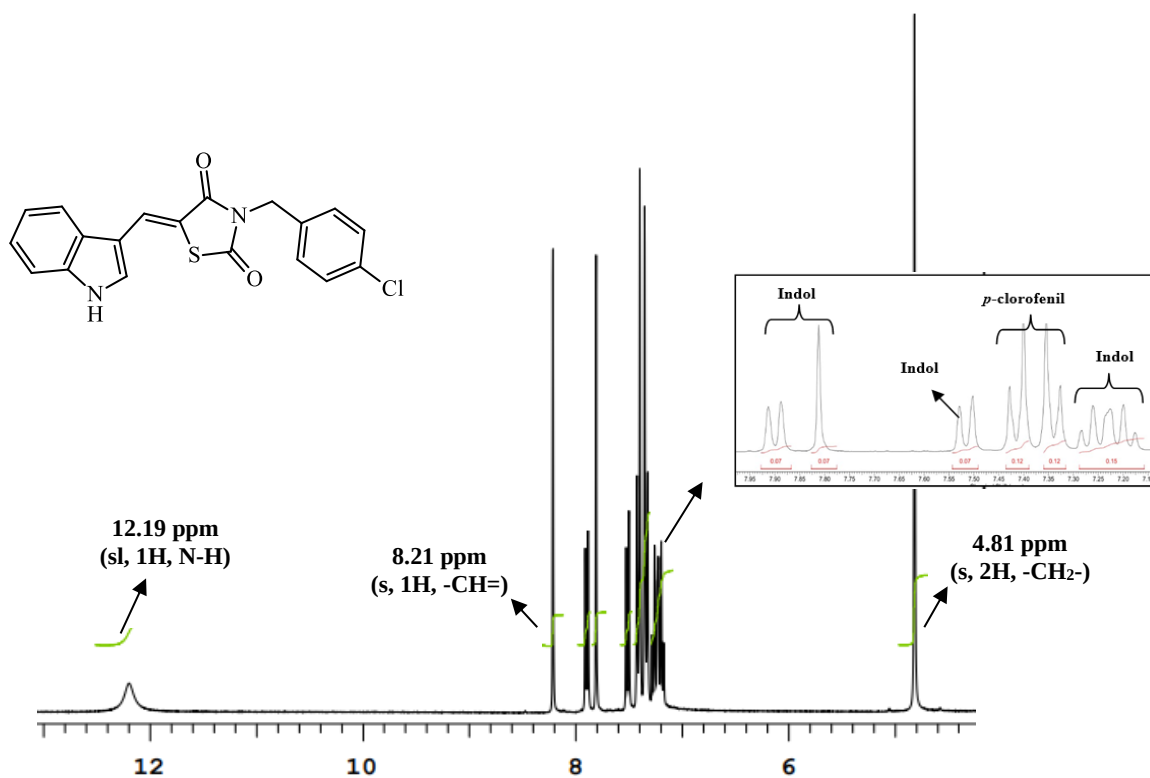
Fonte: Oliveira et al (2015)

Nos compostos da série LqIT/LYS foram observados sinais referentes aos hidrogênios pertencentes aos grupos benzilidenos substituídos e *p*-cloro-benzil, apresentando-se como simpleto (s), duplete (d) e multiplete (m) e, seus deslocamentos químicos, multiplicidade e integração estão expressos de forma detalhada na tabela 6 e demonstram que a técnica de tonação aplicada foi bem-sucedida. Em relação aos hidrogênios pertencentes aos grupos *p*-cloro-benzil, *p*-metil-benzil e indol da série LqIT/MOG, as informações de RMN ¹H estão

expressos na tabela 7. No composto LqIT/MOG-02 observou-se que os hidrogênios da porção *p*-metilbenzil apresentaram-se como multipletos em δ 7.13 – 7.28 devido a sobreposição aos hidrogênios indólicos.

A Figura 17 representa o espectro de RMN¹H (300 MHz) do composto LqIT/MOG-01, os principais deslocamentos químicos foram destacados, sendo esses: δ 4.81 (s) da ligação -CH₂- (metilênico), δ 8.21 (s) da ligação -CH= (metínico) e δ 12.19 (sl) da ligação N-H indólico. Na ampliação da região δ 7.15 – 7.95, pode ser observado as multiplicidades referentes aos hidrogênios indólicos (simpleto, duplete e multiplete) e os dupletos pertencentes aos hidrogênios da porção *p*-clorofenil.

Figura 17 – Espectro de RMN¹H do composto LqIT/MOG-01



Fonte: Autora

Para a ligação dupla exocíclica na posição 5 do núcleo tiazolidínico é evidenciada na literatura a formação de diastereoisômeros com configurações *Z* e *E*, sendo a conformação *Z* considerada mais estável (OLIVEIRA, 2013; SLACHTOVA et al, 2018). Contudo, faz-se necessário uso de técnicas 2D de RMN, como NOESY, para que a isomeria dos novos compostos seja identificada. No tocante ao RMN¹³C, os sinais diagnósticos dos novos derivados LqIT/LYS e LqIT/MOG foram presumidos de acordo com dados da literatura e estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 – Sinais diagnóstico de RMN C^{13} encontrados nos compostos da série LqIT/LYS e LqIT/MOG

Composto	-CH ₂	-OCH ₃	-C=O	-C=S
LqIT/LYS-04	48.0	56.3	192.7	170.4
LqIT/LYS-11	47.9	55.62	192.5	170.6
LqIT/LYS-14	47.9	56.0 e 60.2	192.4	170.6
LqIT/LYS-15	47.8	55.8 e 56.1	192.6	170.8
LqIT/MOG-01	43.7	-	165.3 e 167.0	-
LqIT/MOG-02	44.2	-	165.3 e 167.0	-
LqIT/MOG-06	44.2	-	191.3	170.7

De acordo com trabalhos de Oliveira et al (2015) e Gouveia (2019), os carbonos metilênicos (-CH₂) contendo o núcleo tiazolin-2.4-dionas (TZD) ou 4-tioxo-tiazolidin-2-ona (TXTZD) podem apresentar-se com deslocamentos químicos entre δ 33.3 – 57.0, esses dados coincidem aos carbonos metilênicos ligados a mesma posição nos compostos LqIT/LYS e LqIT/MOG, cujos valores mostrados foram δ 44.2 – 48.0.

Para o carbono pertencentes à função C=S dos compostos LqIT/LYS e LqIT/MOG-06, os valores atribuídos estão entre δ 170.4 – 170.8. Esses valores estão concordantes com os trabalhos de Lafayette et al (2017), Gouveia (2019) e Ribeiro et al (2019), onde o carbono C=S apresentou deslocamento químico a partir 170 ppm, presumindo o êxito da tionação via reação de Wittig e comprovado por HRMS.

A Figura 18 exibe o espectro de RMN ^{13}C do composto LqIT/MOG-01, onde os deslocamentos químicos dos carbonos mais importantes estão destacados. As setas verdes indicam o -CH₂- (metilênico), cujo deslocamento químico é atribuído a δ 43.7, essa ligação demonstra que a reação de *N*-alquilação foi exitosa (OLIVEIRA, 2013). Enquanto, as setas rosas apontam para as ligações C=O do núcleo TZD e deslocamentos químicos são δ 165.3 e 167.0, respectivamente. A ligação C=C, apesar de importante, não foi destacada por existe no composto LqIT/MOG-01 outros carbonos com hidridação sp^2 , necessitando de técnicas de RMN 2D, como NOESY, HSQC e HMBC, para sua identificação precisa.

Figura 18 – Espectro de RMN¹³C do composto LqIT/MOG-01

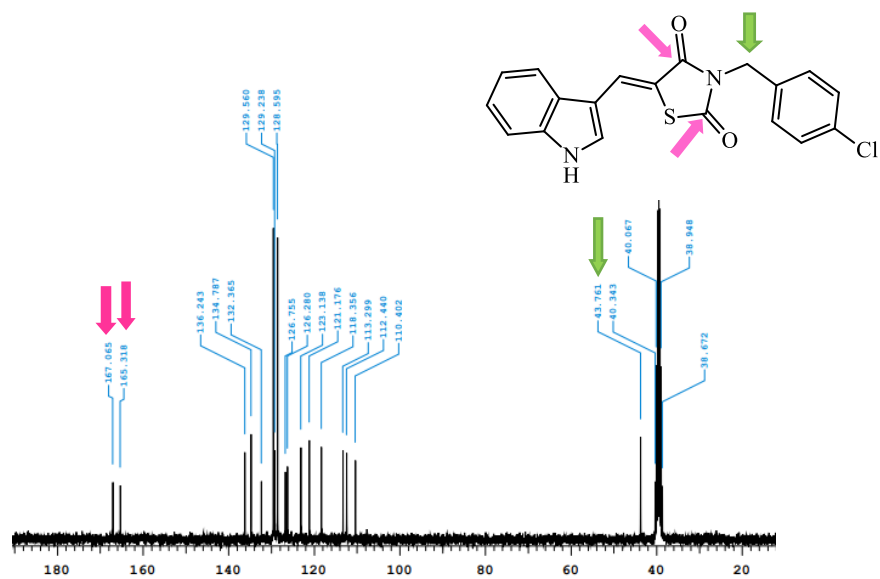
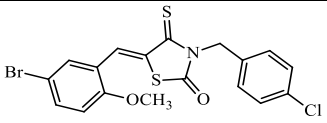
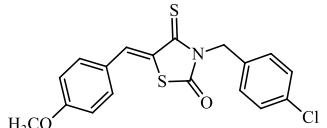
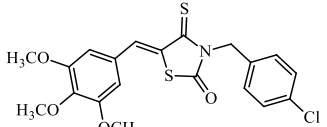
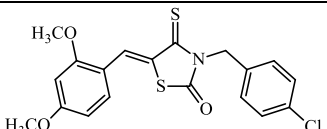
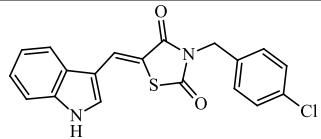
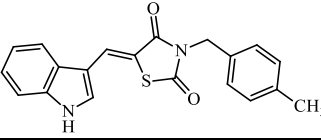
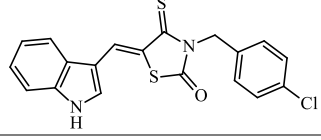


Tabela 5 – Deslocamentos químicos (δ ppm), multiplicidades e quantidade de Hidrogênio (H) apresentados no RMN¹H dos compostos LqIT/LYS

Composto	Estrutura	-CH ₂ -	-CH=	-OCH ₃	<i>p</i> -clorofenil	Aromáticos substituídos
LqIT/LYS-04		5.27 (s, 2H)	8.38 (s, 1H)	3.89 (s, 3H)	7.33 (d, <i>J</i> = 9 Hz, 2H) e 7.41 (d, <i>J</i> = 9 Hz, 2H)	7.15 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H), 7.60 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H) e 7.69 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H)
LqIT/LYS-11		5.28 (s, 2H)	8.27 (s, 1H)	3.85 (s, 3H)	7.33 (d, <i>J</i> = 9 Hz, 2H) e 7.40 (d, <i>J</i> = 9 Hz, 2H)	7.12 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H) e 7.69 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 2H)
LqIT/LYS-14		5.29 (s, 2H)	8.26 (s, 1H)	3.75 (s, 3H) e 3.84 (s, 6H)	7.33 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H) e 7.40 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H)	7.03 (s, 2H)
LqIT/LYS-15		5.28 (s, 2H)	8.58 (s, 1H)	3.87 (s, 3H) e 3.91 (s, 3H)	7.32 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H) e 7.39 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H)	6.69 – 6.74 (m, 2H) e 7.49 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 1H)

Legenda: **s:** multiplicidade simpleto expresso em Hz; **d:** multiplicidade duplete expresso em Hz; **m:** multiplicidade multiplete expresso em Hz; **J:** constante de acoplamento expressa em Hz.

Tabela 6 – Deslocamentos químicos (δ ppm), multiplicidades e quantidade de Hidrogênio (H) apresentados no RMN¹H dos compostos LqIT/MOG

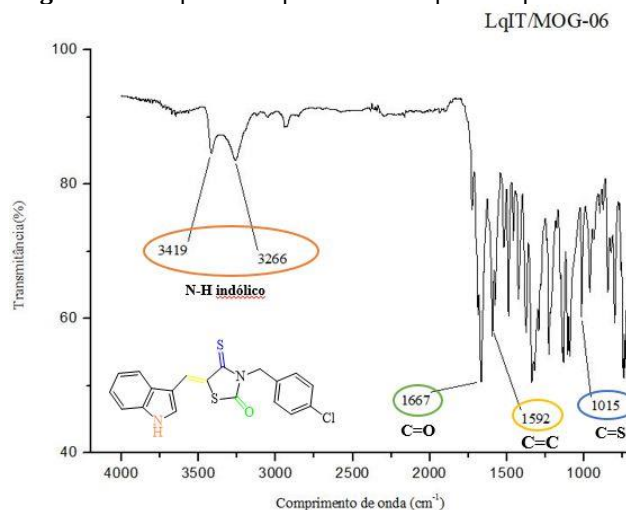
Composto	Estrutura	-CH ₂ -	-CH=	N-H indólico	Indol	Aromáticos substituídos
LqIT/MOG-01		4.81 (s, 2H)	8.21 (s, 1H)	12.19 (sl, 1H)	7.17 – 7.28 (m, 2H), 7.51 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.81 (s, 1H) e 7.90 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H)	7.33 (d, $J = 9$ Hz, 2H) e 7.40 (d, $J = 9$ Hz, 2H)
LqIT/MOG-02		4.77 (s, 2H)	8.20 (s, 1H)	12.17 (sl, 1H)	7.13 – 7.28 (m, 2H), 7.51 (d, $J = 6$ Hz, 1H), 7.80 (s, 1H) e 7.90 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H)	2.26 (s, 3H, p -CH ₃) e 7.13 – 7.28 (m, 4H)
LqIT/MOG-06		5.29 (s, 2H)	8.04 (s, 1H)	12.54 (sl, 1H)	7.25 – 7.28 (m, 2H), 7.56 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H) e 8.67 (s, 1H)	7.36 (d, $J = 12$ Hz, 2H) e 7.41 (d, $J = 12$ Hz, 2H)

Legenda: **s:** multiplicidade simpleto expresso em Hz; **sl:** multiplicidade simpleto largo expresso em Hz; **d:** multiplicidade duplete expresso em Hz; **m:** multiplicidade multiplete expresso em Hz; **J:** constante de acoplamento expressa em Hz.

A espectroscopia de infravermelho foi utilizada com ferramenta adjunta na caracterização dos compostos sintetizados para elucidação das principais funções orgânicas presentes nesses novos candidatos a fármacos. Nos compostos LqIT/LYS, para a função C=O foi observado estiramentos (forte e média intensidade) na faixa de frequência entre ν 1685 – 1705 e, o C=C vinílico, originado da condensação de Knoevenagel, apresentou estiramentos característicos na faixa de frequência de 1567 – 1585 cm^{-1} , corroborando com o que é descrito na literatura (LAFAEYTTTE et al, 2017; ELZAHAR et al, 2019; MOORTHY et al. 2019).

A ligação C=S possui baixa vibração comparada com a ligação C=O, devido ao fato de o átomo de enxofre ser volumoso, seus estiramentos costumam ter intensidades variadas e apresentam-se na faixa de frequência de ν 1000 – 1245, devido a essa peculiaridade, existem divergências em resultados encontrados na literatura (ANBARASAN et al, 2015). Os picos C=S dos compostos LqIT/LYS e LqIT/MOG-06 (Figura 19) possuem intensidades variadas e apresentaram-se entre ν 1015 a 1028. De modo semelhante, Sbei et al (2015) associaram estiramentos na faixa de frequência de 1000 – 1100 a função C=S. A tabela abaixo (Tabela 7) demonstra os principais estiramentos de IV dos compostos LqIT/LYS e sua intensidade, sendo classificada por: F (forte), m (média) e f (fraca).

Figura 19 – Espectroscopia IV do composto LqIT/MOG-06



Fonte: Autora

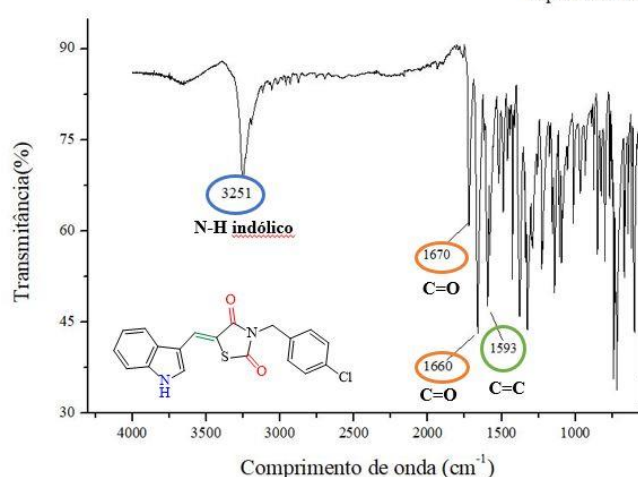
Tabela 7 – Dados de IV dos compostos LqIT/LYS expressos em ν/cm^{-1} e intensidade

Composto	C=O	C=C	C=S
LqIT/LYS-04	1705 (F) e 1685 (F)	1580 (F)	1020 (m)
LqIT/LYS-11	1704 (F)	1585 (F)	1020 (F)
LqIT/LYS-14	1705 (F)	1571 (m)	1023 (f)
LqIT/LYS-15	1688 (m)	1567 (F)	1028 (f)

Legenda: F – forte intensidade; m – média intensidade e f – fraca intensidade

Já os compostos da série LqIT/MOG (Figura 20), identificamos picos característicos da função N-H indólico na região de ν 3251 – 3419, corroborando com o trabalho de Moraes et al (2018) com compostos indol-acilhidrazônicos, onde faixas de frequência para essa função foram entre ν 3145 - 3332. Também foram identificados picos correspondentes as funções C=O, C=C e C=S (LqIT/MOG-06). Na tabela abaixo (Tabela 8) é demonstrado as principais faixas de absorção no IR dos compostos LqIT/MOG e a intensidade do pico.

Figura 20 – Espectroscopia IV do composto LqIT/MOG-01



Fonte: Autora

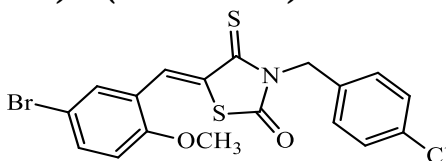
Tabela 8 – Dados de IV dos compostos LqIT/MOG expressos em ν/cm^{-1}

Composto	N-H indolico	C=O	C=C	C=S
LqIT/MOG-01	3251 (m)	1670 (f) e 1660 (F)	1593 (F)	-
LqIT/MOG-02	3403 (m)	1725 (m) e 1658 (F)	1515 (F)	-
LqIT/MOG-06	3419-3266 (f)	1667 (m)	1592 (f)	1015 (f)

Legenda: F – forte intensidade; m – média intensidade e f – fraca intensidade

5.3 DADOS FÍSICO-QUÍMICOS DOS NOVOS COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS PENTAGONAIS

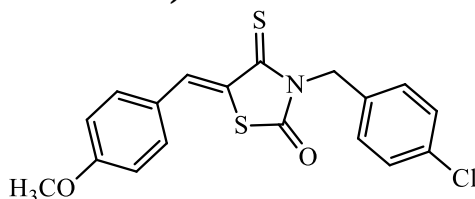
5-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)-3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona (LqIT/LYS-04)



Fórmula: $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{BrClNO}_2\text{S}_2$; Faixa de fusão: 165 – 166 °C; RF: 0,7 (*n*-hex/AcOEt 8:2); Rendimento: 63,0%; RMN¹H (300 MHz - DMSO-*d*₆) δ : 3.89 (s, 3H, -OCH₃), 5.27 (s, 2H, -CH₂), 7.15 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, bromometoxifenil), 7.33 (d, *J* = 9 Hz, 2H, *p*-clorofenil), 7.41 (d,

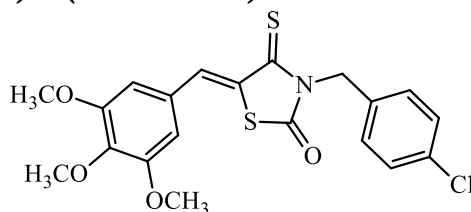
$J = 9$ Hz, 2H, *p*-clorofenil), 7.60 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, bromometoxifenil), 7.69 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, bromometoxifenil), 8.38 (s, 1H, -CH=). RMN¹³C (75 MHz - DMSO-*d*₆) δ : 48.0, 56.3, 112.2, 114.4, 124.3, 128.5, 129.4, 129.6, 130.7, 131.0, 132.3, 133.6, 135.2, 157.6, 170.4, 192.7. IV (direto) ν : 1705 e 1685 (C=O), 1580 (C=C), 1020 (C=S). HRMS (m/z): Massa calculada: 452,926 g/mol; Massa encontrada: 452,899 g/mol; $[M+H]^+$ calculada: 453,929 g/mol; $[M+H]^+$ encontrado: 453,891 g/mol.

5-(4-metoxibenzilideno)-3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LqIT/LYS-11)



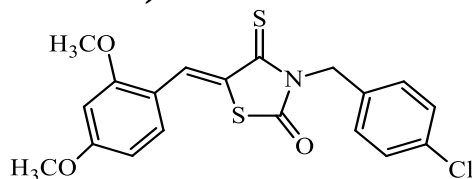
Fórmula: C₁₈H₁₄ClNO₂S₂; Faixa de fusão: 141 – 142 °C; RF: 0,5 (*n*-hex/AcOEt 8:2); Rendimento: 65,0%; RMN¹H (300 MHz – DMSO-*d*₆) δ : 3.85 (s, 3H, -OCH₃), 5.28 (s, 2H, -CH₂), 7.12 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, *p*-metoxifenil), 7.33 (d, $J = 9$ Hz, 2H, *p*-clorofenil), 7.40 (d, $J = 9$ Hz, 2H, *p*-clorofenil), 7.69 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H, *p*-metoxifenil), 8.27 (s, 1H, -CH=). RMN¹³C (75 MHz - DMSO-*d*₆) δ : 47.9, 55.6, 115.1, 124.9, 125.9, 128.5, 129.4, 132.3, 133.1, 133.8, 138.0, 161.7, 170.6, 192.5. IV (direto) ν : 1704 (C=O), 1585 (C=C), 1020 (C=S). HRMS (m/z): Massa calculada: 375,015 g/mol; Massa encontrada: 375,040 g/mol; $[M+H]^+$ calculada: 376,018 g/mol; $[M+H]^+$ encontrada: 376,020 g/mol.

5-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)-3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LqIT/LYS-14)



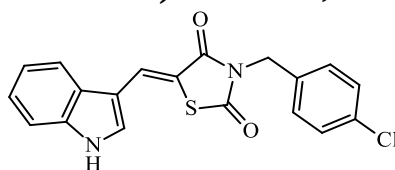
Fórmula: C₂₀H₁₈ClNO₄S₂; Faixa de fusão: 152 – 154 °C; RF: 0,5 (*n*-hex/AcOEt 8:2); Rendimento: 77%; RMN¹H (300 MHz - DMSO-*d*₆) δ : 3.75 (s, 3H, -OCH₃), 3.84 (s, 6H, -OCH₃), 5.29 (s, 2H, -CH₂), 7.03 (s, 2H, trimetoxifenil), 7.33 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, *p*-clorofenil), 7.40 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, *p*-clorofenil); 8.26 (s, 1H, -CH=). RMN¹³C (75 MHz - DMSO-*d*₆) δ : 47.9, 56.0, 60.2, 108.2, 127.0, 128.5, 128.9, 129.4, 132.3, 133.7, 138.0, 140.1, 153.2, 170.6, 192.5. IV (direto) ν : 1705 (C=O), 1571 (C=C), 1023 (C=S). HRMS (m/z): Massa calculada: 435,036 g/mol; Massa encontrada: 435,064 g/mol; $[M+H]^+$ calculada: 436,039 g/mol; $[M+H]^+$ encontrada: 436,072 g/mol.

5-(2,4-dimetoxibenzil)-3-(4-clorobenzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LqIT/LYS-15)



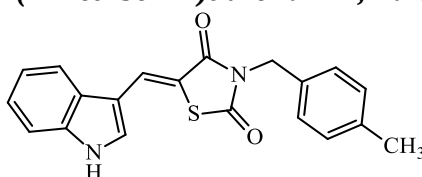
Fórmula: $C_{19}H_{16}ClNO_3S_2$; Faixa de fusão: 179 – 180 °C; RF: 0,5 (*n*-hex/AcOEt 9:1); Rendimento: 65,0% RMN¹H (300 MHz - DMSO-*d*₆) δ : 3.87 (s, 3H, -OCH₃) 3.91 (s, 3H, -OCH₃), 5.28 ppm (s, 2H, -CH₂), 6.69 – 6.74 (m, 2H, dimetoxifenil), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, *p*-clorofenil), 7.39 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, *p*-clorofenil), 7.49 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, dimetoxifenil), 8.58 (s, 1H, -CH=). RMN¹³C (75 MHz - DMSO-*d*₆) δ : 47.8, 55.8, 56.1, 98.7, 107.0, 115.1, 124.5, 128.5, 129.3, 129.5, 130.6, 133.1, 133.9, 160.9, 164.1, 170.8, 192.6. IV (direto) v: 1613 (C=O), 1567 (C=C), 1028 (C=S). HRMS (*m/z*): Massa calculada: 405,026 g/mol; Massa encontrada: 405,024 g/mol; [*M*+H]⁺ calculada: 406,029 g/mol; [*M*+H]⁺ encontrada: 406,022 g/mol.

5-((1-*H*-indol-3-il)metileno)-3-(4-clorobenzil)tiiazolidin-2,4-diona (LqIT/MOG-01)



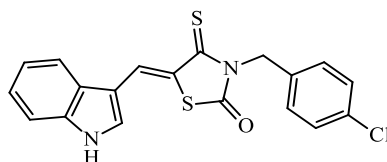
Fórmula: $C_{19}H_{13}ClN_2O_2S$; Faixa de fusão: 254 – 256 °C; RF: 0,6 (*n*-hex/AcOEt 7:3); Rendimento: 85%; RMN¹H (300 MHz - DMSO-*d*₆) δ : 4.81 (s, 2H, -CH₂), 7.17 – 7.28 (m, 2H, indol), 7.33 (d, *J* = 9 Hz, 2H, *p*-clorofenil), 7.40 (d, *J* = 9 Hz, 2H, *p*-clorofenil), 7.51 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, indol), 7.81 (s, 1H, indol), 7.90 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, indol), 8.21 (s, 1H, -CH=), 12.19 (sl, 1H, N-H indólico). RMN¹³C (75 MHz - DMSO-*d*₆) δ : 43.7, 110.4, 112.4, 113.2, 118.3, 121.1, 123.1, 126.2, 126.7, 128.5, 129.2, 129.5, 132.3, 134.7, 136.2, 165.3, 167.0. IV (direto) v: 3251 (N-H indólico), 1670 e 1660 (C=O), 1593 (C=C). HRMS (*m/z*): Massa calculada: 368,038 g/mol; Massa encontrada: 368.056 g/mol; [*M*+H]⁺ calculada: 369,042 g/mol; [*M*+H]⁺ encontrada: 369,067 g/mol.

5-((1-*H*-indol-3-il)metileno)-3-(4-metilbenzil)tiiazolidin-2,4-diona (LqIT/MOG-02)



Fórmula: $C_{20}H_{16}N_2O_2S$; Faixa de fusão: 239 – 240 °C; RF: 0,56 (*n*-hex/AcOEt 7:3); Rendimento: 74,09%; RMN¹H (300 MHz - DMSO-*d*₆) δ : 2.26 (s, 3H, *p*-CH₃), 4.77 (s, 2H, -CH₂), 7.13 – 7.28 (m, 6H, indol e *p*-metilfenil), 7.51 (d, *J* = 6 Hz, 1H, indol), 7.80 (s, 1H, indol), 7.90 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, indol), 8.20 (s, 1H, -CH=), 12,17 (sl, 1H, N-H indólico). RMN¹³C (75 MHz - DMSO-*d*₆) δ : 20.6, 44.2, 110.4, 112.4, 113.4, 118.3, 121.1, 123.1, 126.1, 126.7, 127.6, 129.1, 132.8, 136.2, 136.9, 165.3, 167.0. IV (direto) v: 3403 (N-H indólico), 1725 e 1658 (C=O), 1515 (C=C). HRMS (*m/z*): Massa calculada: 348,093 g/mol; Massa encontrada: 348,070 g/mol; [*M*+H]⁺ calculada: 349,096 g/mol; [*M*+H]⁺ encontrada: 349,084 g/mol.

5-((1-*H*-indol-3-il)metileno)-3-(4-clorobenzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona (LqIT/MOG-06)



Fórmula: $C_{19}H_{13}ClN_2OS_2$; Faixa de fusão: 152 – 154 °C; RF: 0,6 (*n*-hex/AcOEt 8:2); Rendimento: 65,53%; RMN¹H (300 MHz - DMSO-*d*₆) δ : 5.29 (s, 2H, -CH₂), 7.25 – 7.28 (m, 2H, indol), 7.36 (d, *J* = 12 Hz, 2H, clorofenil), 7.41 (d, *J* = 12 Hz, 2H, clorofenil), 7.56 (d, *J* = 6 Hz, 1H, indol), 7.88 (d, *J* = 6 Hz, 1H, indol), 8.04 (s, 1H, -CH=), 8.67 (s, 1H, indol), 12,54 (sl, 1H, N-H indólico). RMN¹³C (75 MHz - DMSO-*d*₆) δ : 44.2, 110.9, 112.7, 113.3, 118.8, 121.6, 124.2, 126.8, 127.1, 129.0, 129.9, 132.7, 134.7, 165.8, 167.5, 170.7, 191.3. IV (direto) v: 3266 e 3419 (N-H indólico), 1667 (C=O), 1592 (C=C) e 1015 (C=S). HRMS (*m/z*): Massa calculada: 384,015 g/mol; Massa encontrada: 384,017 g/mol; [*M*+H]⁺ calculada: 386,012 g/mol; [*M*+H]⁺ encontrada: 386,019 g/mol.

5.4 PARÂMETROS FARMACOCINÉTICO *IN SILICO* DOS NOVOS COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS PENTAGONAIS

A estimação de parâmetros farmacocinéticos *in silico* trata-se de uma ferramenta importante no planejamento e síntese de novas entidades químicas (NEQs). Pois, através dessa ferramenta pode-se estimar aspectos que interferem na interação com a membrana biológica e biodisponibilidade oral dessa NEQs, tais como lipofilicidade, solubilidade em água e preditores de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade (ADMET).

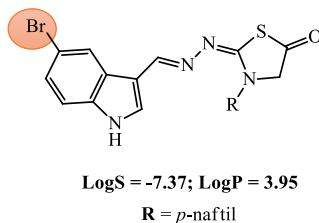
A regra dos cinco de Lipinski (LIPINSKI et al, 2001) trata-se de um dos principais preditores farmacocinéticos, pois, relaciona características do composto orgânico a sua

biodisponibilidade, onde esse composto precisa apresentar: a) Massa molar (MM) ≤ 500 g/mol; b) $\text{LogP} \leq 5$ ou $\text{MLogP} \leq 4.15$; c) Grupos aceptores de hidrogênio (HBA) ≤ 10 ; d) Grupos doadores de hidrogênio (HBD) ≤ 5 e, e) Violação das regras de Lipinski ≤ 1 . Atrelado a isso, Veber et al (2002) ainda cita que NEQ com número de grupos rotacionais (n-ROTB) ≤ 10 e Topografia de área de superfície polar (TPSA) $\leq 140 \text{ \AA}^2$ possuem alta absorção intestinal. A Tabela 9 demonstra os principais parâmetros farmacocinéticos *in silico* dos novos compostos heterocíclicos pentagonais, estimados pelos programas Swiss ADME e pkCSM.

Os compostos da série LqIT/LYS e LqIT/MOG estão de acordo com as regras de Lipinski e Veber, pois, não houve violação das regras e todos os compostos apresentaram MM abaixo de 500 g/mol e n-ROTB abaixo de 10. Devido a mudança do benzilideno pelo biciclo indol, os compostos LqIT/MOG apresentaram HBD igual a 1. Além da presença de outros grupos que contribuem para o HBA, percebe-se que quantidade de metoxilas influenciaram no aumento de HBA dos compostos da série LqIT/LYS, isso pode ser visto no composto trimetoxilado LqIT/LYS-14, onde HBA foi igual a três.

A solubilidade em água é definida pelo LogS, onde os valores são classificados por: insolúveis < -10 < baixa solubilidade < -6 < solubilidade moderada < -4 < solúvel < -2 < bastante solubilidade < 0 < solubilidade altíssima. Os novos compostos heterocíclicos pentagonais apresentam solubilidade baixa e moderada, cujos valores foram de -6.00 a -7.35. Observamos que, o composto LqIT/LYS-04 apresentou LogS igual a -7.35 e LogP igual a 4.08 devido a presença do halogênio bromo (Br). Esse resultado é concordante com o trabalho de Almeida Junior et al (2019), onde o composto 4-tiazolidinona substituídos (Figura 21) contendo Br apresentaram LogS igual a -7.37 e LogP igual a 3.95, mostrando assim que a adição de halogênios favorece ao aumento da lipofilicidade de NEQs.

Figura 21 – LogS e LogP do composto 4-tiazolidinona substituído (ALMEIDA JÚNIOR et al, 2019)

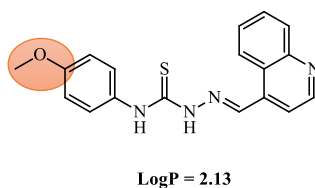


Fonte: Almeida Júnior et al (2019).

O coeficiente de partição octanol-água, expresso em LogP, trata-se de uma medida quantitativa de lipofilicidade importante na triagem de NEQs. A quantidade de metoxilas dos compostos LqIT/LYS e a presença do grupo *p*-metil no composto LqIT/MOG-02 influenciaram

na diminuição da lipofilicidade desses compostos, pois, os LqIT/LYS-14 e LqIT/MOG-02 apresentaram LogP igual a 2.78 e 2.44. Concordante a isso, Ribeiro et al (2019) demonstrou em seu trabalho que, a adição do grupo metóxi em compostos quinolina-tiosemicarbozônicos substituídos (Figura 22) também contribuem para a diminuição do LogP, cujos valor foi igual a 2.13.

Figura 22 – LogP do composto quinolina-tiosemicarbozônicos substituído (RIBEIRO et al, 2019)



Fonte: Ribeiro et al (2019)

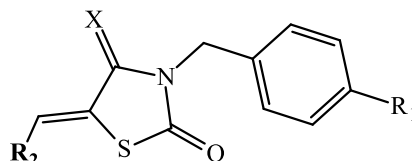
A substituição do oxigênio (O) por enxofre (S) através da técnica de tionação no LqIT/MOG-06 favoreceu no aumento da lipofilicidade desse derivado, cujo valor de LogP foi igual a 3.56, demonstrando a importância da utilização da técnica de tionação na síntese de novos compostos. O TPSA dos novos compostos apresentou-se entre 78.47 – 114.10 Å², demonstrando que os novos derivados podem ter uma alta absorção no trato gastrointestinal e baixa permeabilidade na barreira hematoencefálica (VEBER et al, 2002). Concordante ao TPSA, as taxas preditivas de absorção intestinal apresentaram-se acima de 80% e a permeabilidade em Caco-2 entre 1.227 a 1.372 cm.s⁻¹, esses valores podem pressupor uma boa absorção dos novos compostos por via oral.

A predição do volume de distribuição em estado estacionário (VDss) trata-se de um parâmetro farmacocinético confiável para a distribuição do fármaco-teste entre o plasma e o tecido, Os valores de VDss > 0,45 – alta distribuição nos tecidos e, VDss < 0,15 – baixa distribuição (ZHIVKOVA; DOYTCHINOVA, 2012; LAMBERTUCCI et al, 2018). Os compostos LqIT/LYS-04, LqIT/LYS-11 e LqIT/MOG-06 destacaram-se por apresentaram valores preditivos de VDss de 0,257, 0,22 e 0,31, respectivamente, esses valores indicam uma distribuição intermediária nos tecidos, isso é justificado por esses compostos terem um caráter mais lipofilicidade que os outros derivados, com o valor de LogP de 3.47 – 4.08.

A predição de clearance total de novos compostos é uma ferramenta importante na farmacocinética, pois avalia a tempo de eliminação por via hepática e renal desse composto e, um composto-teste com valor de clearance total elevado pode indicar que ele sofrerá uma rápida excreção no organismo (GUO et al 2016; MORAES et al, 2018; ALMEIDA JUNIOR et al 2019). Contudo, os compostos da série da LqIT/LYS e LqIT/MOG apresentaram valores de

clearance total na faixa de 0.009 – 0.315, isso pode indicar que eles possuem uma boa eliminação por via renal.

Esses resultados preditivos indicam que os novos compostos heterocíclicos pentagonais podem atender os principais parâmetros para uma boa biodisponibilidade oral, o que nos possibilita a continuidade de testes experimentais.

Tabela 9 – Parâmetros farmacocinéticos *in silico* dos novos compostos heterocíclicos pentagonais

Composto	X	R ₁	R ₂	MM (g/mol)	HBA	HBD	LogP	LogS	TPSA (Å ²)	n-ROTB	Permeabilidade em Caco-2 (log Papp; log cm/s)	Absorção intestinal (%)	VDss (log L/kg)	Clearance total (log ml/min/kg)
LqIT/LYS-04	S	-Cl	5-bromo-2- metoxifenil	454.79	2	0	4.08	-7.35	86.93	4	1.254	85.92	0.257	0.009
LqIT/LYS-11	S	-Cl	4-metoxifenil	375.89	2	0	3.47	-6.64	86.93	4	1.291	88.93	0.22	0.037
LqIT/LYS-14	S	-Cl	3,4,5-trimetoxifenil	435.94	4	0	2.78	-6.96	105.39	6	1.255	89.84	-0.22	0.315
LqIT/LYS-15	S	-Cl	2,4-dimetoxifenil	405.92	3	0	3.12	-6.80	114.10	5	1.372	91.13	0.03	0.255
LqIT/MOG-01	O	-Cl	Indol	368.84	2	1	2.70	-6.00	78.47	3	1.240	88.98	0.15	0.054
LqIT/MOG-02	O	-CH ₃	Indol	348.42	2	1	2.44	-5.72	78.47	3	1.242	90.44	0.01	0.128
LqIT/MOG-06	S	-Cl	Indol	384.90	1	1	3.56	-6.94	93.49	3	1.227	87.59	0.31	0.088

Legenda: **MM (Swiss ADME):** massa molecular dos compostos expresso em g/mol; **HBA (Swiss ADME):** grupos aceptores de hidrogênios; **HBD (Swiss ADME):** grupos doadores de hidrogênios; **LogP:** Log do coeficiente de partição octanol-água; **LogS (Swiss ADME):** Log da solubilidade em água; **TPSA:** Topografia da área de superfície polar, expresso em Angstrom² (Å²); **n-ROTB:** Número de grupos rotacionais; **Permeabilidade em Caco-2 (log Papp; log cm/s):** Predição da Permeabilidade em células Caco-2 trata-se de uma estimativa de absorção da mucosa intestinal humana (pkCSM); **Absorção intestinal (%):** Predição da percentagem (%) da absorção intestinal dos compostos (pkCSM); **VDss (log L/kg):** Predição do volume de distribuição em estado estacionário dos novos compostos expresso por log L/kg (pkCSM); **Clearance Total (log ml/min/kg):** Predição do clearance total dos novos compostos (pkCSM).

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DOS NOVOS COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS PENTAGONAIS

No presente trabalho, realizamos a determinação da atividade antioxidante *in vitro* dos novos compostos da série LqIT/LYS e LqIT/MOG utilizando duas metodologias diferentes, o ensaio de eliminação de radicais estáveis DPPH e o ensaio de eliminação de radicais cátions ABTS. Para esses ensaios, utilizamos o ácido ascórbico sintético como controle positivo. Na tabela abaixo (Tabela 10) são demonstrados os valores de IC₅₀ (μM) dos novos compostos e a taxa de sequestro de radicais DPPH e ABTS na concentração de 500 μg/mL.

Tabela 10 – Valores de IC₅₀ (μM) e taxa de sequestro de radicais DPPH e ABTS (%) dos novos compostos heterocíclicos pentagonais na concentração de 500 μg/mL

Compostos	DPPH - IC ₅₀ (μM)	DPPH (% em 500 μg/mL)	ABTS - IC ₅₀ (μM)	ABTS (% em 500 μg/mL)
LqIT/LYS-04	17.1 ± 0,1	33.69 ± 2,0	122.0 ± 0,1	48.6 ± 1,6
LqIT/LYS-11	20.7 ± 0,1	19.8 ± 0,1	125.5 ± 1,1	53.1 ± 1,0
LqIT/LYS-14	17.9 ± 0,1	17.7 ± 2,6	105.4 ± 1,3	54.5 ± 1,6
LqIT/LYS-15	19.2 ± 0,1	-	126.2 ± 0,2	48.9 ± 1,0
LqIT/MOG-01	42.3 ± 0,1	33.9 ± 3,5	154.0 ± 0,8	44.1 ± 2,6
LqIT/MOG-02	11.2 ± 0,1	14.3 ± 2,5	165.4 ± 1,5	43.4 ± 3,1
LqIT/MOG-06	10.1 ± 0,1	-	115.2 ± 1,0	56.5 ± 1,6
Ácido ascórbico	-	90.0 ± 0,1	-	94.0 ± 0,1

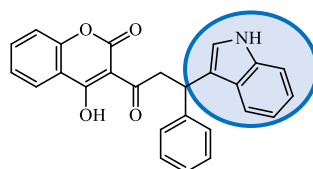
Legenda: IC₅₀: Concentração do composto capaz de sequestrar 50% dos radicais; **DPPH**: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; **ABTS**: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico); ácido ascórbico: controle positivo; (-): Não determinado.

Através da análise dos resultados obtidos, podemos verificar que os novos compostos heterocíclicos pentagonais apresentaram menores concentrações de IC₅₀ (10,1 – 42,3 μM) no ensaio de eliminação de radicais DPPH. Enquanto no ensaio de eliminação de radicais cátions ABTS, os valores de IC₅₀ foram >100 μM para todos os compostos testados. Mas quando calculamos o percentual de sequestro de radicais na concentração de 500 μg/mL, observamos que os compostos da série LqIT/MOG e LqIT/LYS apresentaram melhores performances no ensaio de ABTS, os valores de IC₅₀ ficam em torno de 43,4 – 56,5 %. Isso demonstra que os novos compostos podem apresentar os dois mecanismos de atividade antioxidante.

Os compostos LqIT/MOG-02 e LqIT/MOG-06 apresentaram no ensaio de eliminação de radicais DPPH valores de IC₅₀ de 11,2 e 10,1 μM, respectivamente. Percebemos que o composto LqIT/MOG-01, cujo estrutura também possui o grupo indol não substituído e HBD igual 1, apresentou o valor de IC₅₀ de 42.3 ± 0,1 μM. Podemos sugerir que, assim como os

demaís compostos, os derivados da série LqIT/MOG podem apresentar mecanismos mistos, tanto doadores de elétrons quanto doadores de hidrogênio, pois na concentração de 500 µg/mL no ensaio de eliminação de radicais cátions ABTS, apresentaram percentual de sequestro entre 43,4 – 56,5 %. Apesar de haver na literatura poucos trabalhos sobre atividade antioxidante em compostos sintéticos ou semissintéticos, encontramos no trabalho de Sangshetti et al (2016) a demonstração da importância da presença do grupo indol não substituído, pois, em compostos sintéticos indólicos-cumarínicos, a presença desse grupo favoreceu a atividade antioxidante no ensaio de eliminação de radicais DPPH, obtendo valor de IC₅₀ igual a 12.40 µg/mL para o composto de melhor performance (Figura 23).

Figura 23 – Valor de IC₅₀ do composto indólico-cumarínico com melhor atividade antioxidante (SANGSHETTI et al, 2016)



IC₅₀ = 12.40 µg/mL

Fonte: Sangshetti et al (2016)

5.6 ESTUDO BIOLÓGICO

5.6.1 Avaliação *in vitro* de citotoxicidade em linhagens de células de macrófagos J774 dos novos compostos heterocíclicos pentagonais

Os ensaios *in vitro* de viabilidade celular trata-se de um importante parâmetro na avaliação preliminar da segurança e toxicidade de novos candidatos a fármacos, sendo realizado, preferencialmente, em células de mamíferos (ROGERO et al, 2003; BAHUGUNA et al, 2017). Na seleção de novos fármacos antiparasitários, esse ensaio auxilia na determinação da seletividade do composto orgânico ao parasito.

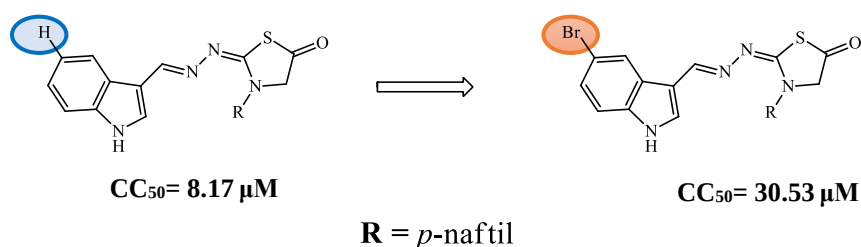
Dado a importância desse teste, realizamos inicialmente a avaliação o potencial citotóxico dos novos compostos LqIT/LYS e LqIT/MOG em células de linhagem de macrófagos J774 utilizado a técnica de MTT. A tabela 11 apresenta os valores de CC₅₀ dos novos derivados heterocíclicos pentagonais.

Os novos compostos das séries LqIT/LYS e LqIT/MOG foram capazes de induzir algum grau de toxicidade aos macrófagos J774 e apresentaram citotoxicidade acima do controle positivo, anfotericina B, cujo valor de CC₅₀ foi de 37.61 µM. O composto LqIT/MOG-02

apresentou-se como o composto menos tóxico, com valor de CC_{50} de 34.78 μM , enquanto o composto LqIT/LYS-14 apresentou-se mais tóxico, com valor de CC_{50} de 13.86 μM .

Na série LqIT/LYS, podemos observar que o composto LqIT/LYS-04 apresentou menor toxicidade aos macrófagos J774, com CC_{50} de 25,85 μM . Isso mostra que, a adição do halogênio Br no núcleo benzilideno contribuiu para a diminuição da toxicidade desse composto. Almeida Junior et al (2019) evidenciou em trabalho com compostos indol-tiazolidin-4-ona substituídos (Figura 24) que a adição do halogênio Br (vermelho) na cadeia lateral pode contribuir na diminuição da citotoxicidade em macrófagos J774A.1, onde o valor de CC_{50} mudou de 8.17 para 30.53 μM .

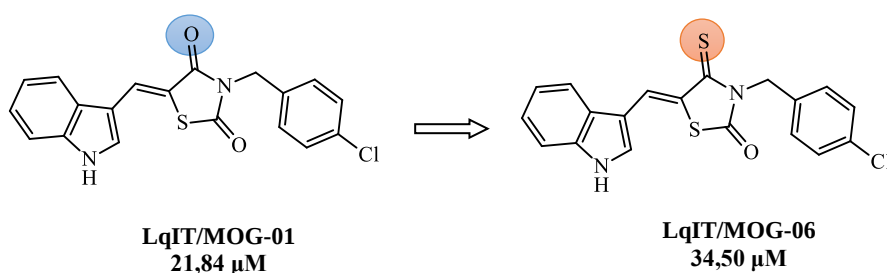
Figura 24 – Valores de CC_{50} de compostos indol-tiazolidin-4-ona substituídos (ALMEIDA JUNIOR et al, 2019)



Fonte: Almeida Junior et al (2019)

Já na série LqIT/MOG, O composto LqIT/MOG-02 possui perfil de citotoxicidade próximo ao controle positivo, anfotericina B, com valor de CC_{50} de 34,78 μM . Apesar de diminuir a lipofilicidade (LogP), a substituição do cloro por grupo metil pode contribuir para diminuição da toxicidade desse composto. Verificamos também que a substituição bioisostérica clássica do oxigênio (azul) por enxofre (vermelho) no composto LqIT/MOG-06 (Figura 26) trouxe benefícios ao perfil de citotoxicidade em macrófagos J774, apresentando o valor de CC_{50} de 34,50 μM , enquanto o composto não tionado LqIT/MOG-01 (Figura 25) apresentou o valor de CC_{50} de 21,84 μM .

Figura 25 – Comparação entre os valores de CC_{50} do composto LqIT/MOG-01 e LqIT/MOG-06



Fonte: Autora

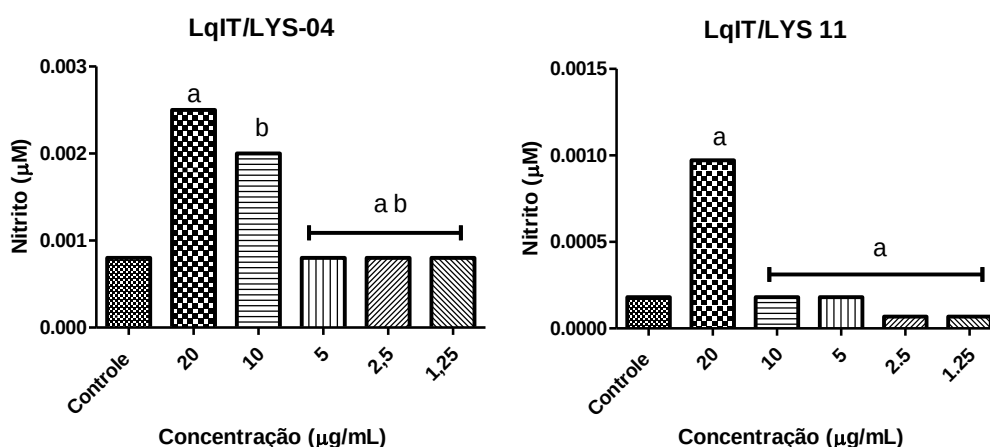
Contudo, a literatura relata que os resultados do ensaio de citotoxicidade *in vitro* podem não repercutir em ensaios de toxicidade *in vivo* (OLIVEIRA et al, 2015), fazendo-se necessário a realização de teste de toxicidade aguda dos compostos LqIT/LYS e LqIT/MOG.

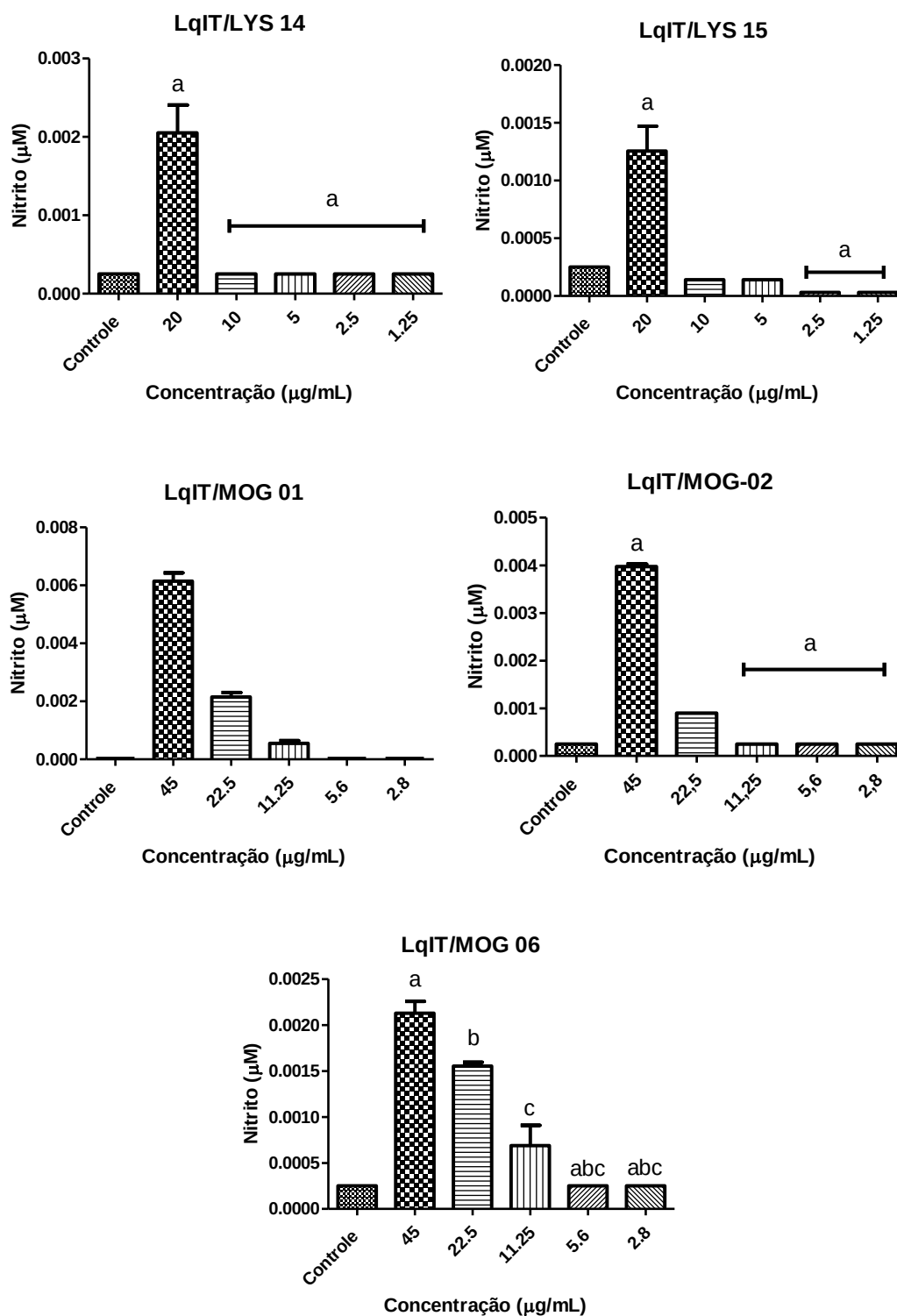
5.6.2 Dosagem de óxido nítrico

A dosagem de óxido nítrico (NO) foi realizada juntamente com o ensaio de citotoxicidade em macrófagos J774 utilizando a técnica indireta de Griess. O NO e ERNs, produzido por macrófagos e neutrófilos, possui papel importante no controle da infecção por *Leishmania spp* e morte das amastigotas intracelular (HORTA et al, 2012; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). Com isso, o objetivo desse teste foi verificar a capacidade dos novos derivados em induzir a produção de NO por células de macrófago J774.

Na Figura 26 traz os resultados da dosagem indireto de NO a partir do sobrenadante de células de macrófagos tratadas com os novos compostos da série LqIT/LYS e LqIT/MOG. Todos os compostos estudados, exceto o LqIT/MOG-01, foram capazes de promover um aumento significativo ($p < 0.05$) de nitrito.

Figura 26 – Resultados da dosagem indireta de NO produzido por macrófagos J774 tratados com os novos compostos da série LqIT/LYS e LqIT/MOG





Legenda: Os valores de concentrações de nitrito foram obtidos através de dois experimentos independentes em quadruplicata; os resultados com as letras a, b, c, ab e abc, respectivamente, apresentaram valores de significativa $p < 0.05$.

Fonte: Autora

De acordo com os resultados obtidos nesse ensaio, todos os compostos testados, exceto o composto LqIT/MOG-01, produziram o aumento significativo na produção de NO por

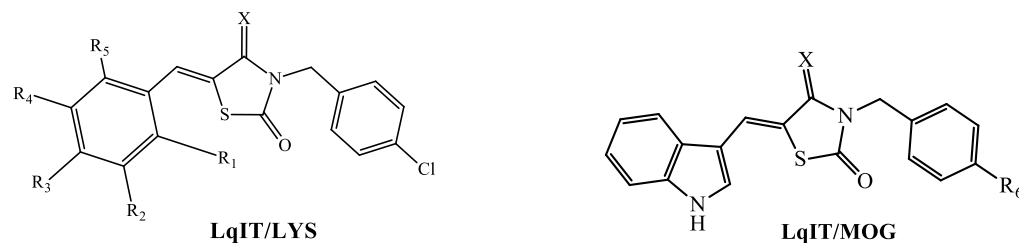
macrófagos J774 não infectados nas concentrações mais alta (45 e 20 $\mu\text{g/mL}$) e nas concentrações mais baixas (2.8, 2.5 e 1.25 $\mu\text{g/mL}$). Esses resultados podem indicar uma atividade leishmanicida promissora dos novos compostos por contribuírem na produção de NO em baixas concentrações. Sign et al (2012) cita que a produção de NO e radicais livres contribui na ação leishmanicida e pode auxiliar na depleção do sistema autoredox do parasito.

Os resultados apresentados na dosagem indireta de NO podem justificar a alta citotoxicidade apresentada pelos novos compostos no ensaio com macrófagos J774, pois, a quantidade exacerbada de radicais livres pode causar danos a células saudáveis do hospedeiro vertebrado (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Apesar disso, os novos compostos demonstraram atividade antioxidante nos ensaios de DPPH e ABTS, podendo colaborar na diminuição na produção de radicais livres *in vivo*, pois os radicais livres provenientes do processo de inflamação contribuem para a formação de lesões nas formas da leishmaniose mucosa e visceral.

5.6.3 Avaliação de susceptibilidade *in vitro* de promastigotas de *Leishmania amazonensis* aos novos compostos heterocíclicos pentagonais

Paralelo ao ensaio de citotoxicidade em macrófagos J774, realizamos a triagem dos compostos LqIT/LYS e LqIT/MOG através do teste de susceptibilidade *in vitro* de promastigotas metacíclicas de *L. amazonenses*, com a finalidade de calcular o IC_{50} (concentração capaz de inibir o crescimento de 50% dos parasitos) dessas moléculas. Assim como no teste de avaliação do potencial citotóxico *in vitro*, a anfotericina B foi utilizado como controle positivo. A tabela abaixo (Tabela 11) demonstra os valores de IC_{50} dos novos compostos heterocíclicos pentagonais.

Devido a imprevistos relacionados a pandemia de COVID-19, o ensaio com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* do composto LqIT/MOG-06 não foi realizado, o teste e o cálculo do índice de seletividade (IS) desse composto serão realizados posterior a esse trabalho. Apesar de, em hospedeiros vertebrados, a forma amastigota intracelular de *Leishmania spp* ser predominante, não exclui a importância do *screening* de novos candidatos a fármacos na forma evolutiva promastigota do parasito, pois a forma amastigota intracelular trata-se de uma forma adaptativa do parasito para se evadir do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado e contém todos os elementos celulares da forma promastigotas, exceto o flagelo, pois na forma amastigota, o flagelo encontra-se internalizado (SÉGUIN; DESCOTEAUX, 2016).

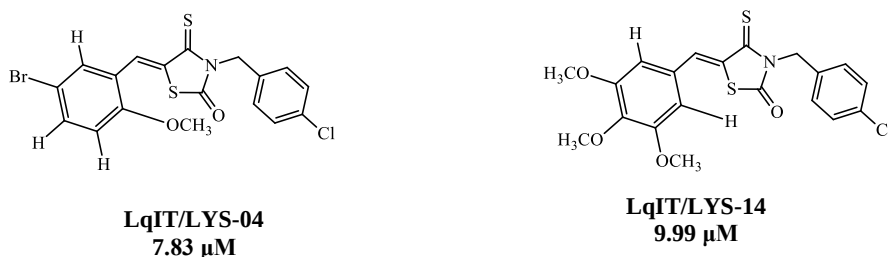
Tabela 11 – Valores de CC₅₀ e IC₅₀ dos novos compostos heterocíclicos pentagonais

COMPOSTO	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	X	CC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
LqIT/LYS-04	-OCH ₃	-H	-H	-Br	-H	-	S	25,85 ± 0,66	7,83 ± 0,6
LqIT/LYS-11	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	-	S	18,69 ± 1,26	23,54 ± 0,6
LqIT/LYS-14	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-	S	13,86 ± 0,02	9,99 ± 0,1
LqIT/LYS-15	-H	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-	S	20,93 ± 0,93	35,72 ± 1,4
LqIT/MOG-01	-	-	-	-	-	-Cl	O	21,84 ± 2,71	89,93 ± 2,6
LqIT/MOG-02	-	-	-	-	-	-CH ₃	O	34,78 ± 0,63	133,92 ± 2,6
LqIT/MOG-06	-	-	-	-	-	-Cl	S	34,50 ± 0,30	ND
Anfotericina B	-	-	-	-	-	-	-	37,61 ± 0,01	0,15 ± 0,002

Legenda: CC₅₀: Concentração capaz de causar a perda da viabilidade em 50% das células de mamífero; IC₅₀: Concentração capaz de inibir 50% do crescimento das promastigotas de *L. amazonensis*; **ND**: Não determinado, o ensaio será realizado posterior a esse trabalho.

Conforme ilustrado na Tabela 11, os novos compostos LqIT/LYS e LqIT/MOG, exceto LqIT/MOG-06, apresentaram valores de IC_{50} de 7,83 – 133,92 frente a promastigotas *Leishmania amazonensis*, porém os compostos LqIT/LYS-04 e LqIT/LYS-14 (Figura 27) destacaram-se por apresentar melhores resultados nesse ensaio, com valores de IC_{50} de 7.83 e 9.99, respectivamente.

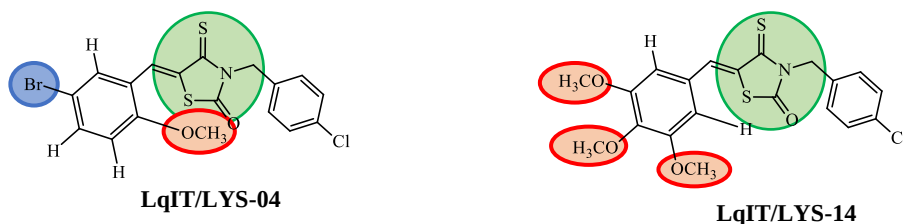
Figura 27 – Valores de IC_{50} dos compostos LqIT/LYS-04 e LqIT/LYS-14



Fonte: Autora

Os compostos LqIT/LYS-04 e LqIT/LYS-14 (Figura 28) apresentam em suas estruturas o núcleo 4-tioxo-tiazolidin-2-ona (verde), obtido através da substituição através da técnica de tionação via reação de Wittig do oxigênio pelo enxofre na posição 4 do núcleo tiazolidin-2,4-diona, e adição do grupo substituinte metóxi (vermelho) na posição 2 (LqIT/LYS-04) e nas posições 3, 4 e 5 (LqIT/LYS-14) na porção benzilideno. Além do grupo metóxi, foi adicionado o halogênio Br (azul) no composto LqIT/LYS-04. De acordo com a literatura, a adição de halogênios e metóxi podem contribuir na ação antiparasitária (HERNANDES et al, 2010; BELLO et al, 2011; OLIVEIRA et al, 2015; SILVA et al, 2020).

Figura 28 – Os compostos LqIT/LYS-04 e LqIT/LYS-14

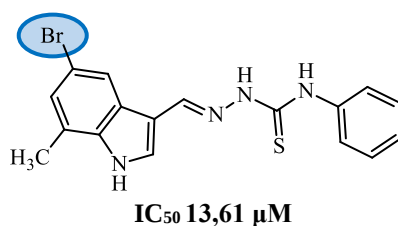


Fonte: Autora

O composto LqIT/LYS-04 (Figura 28) apresentou valor de IC_{50} de 7.83, demonstrando melhor resultado frente a promastigotas de *L. amazonensis* em comparação aos outros derivados estudados. Analisando sua estrutura química, além do grupo metóxi, foi adicionado o halogênio bromo (Br) como substituinte na posição 5 do benzilideno. Essa adição favoreceu a lipofilicidade desse composto, cujo valor de LogP foi igual a 4.08. Segundo Hernandez et al (2010) e Almeida Junior et al (2019), o átomo de Br apresenta efeito indutivo negativo e efeitos

mesoméricos positivos, além disso, por ter um raio atômico volumoso, esse átomo contribui para efeito estérico. Esses efeitos citados podem ter contribuído na atividade leishmanicida do composto LqIT/LYS-04. Arelado a isso, Silva et al (2020) potencializaram a ação leishmanicida em seus compostos ao adicionar o Br como substituinte na porção indol, obtivendo valores de IC_{50} que variaram de 13,61 μM em promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (Figura 29).

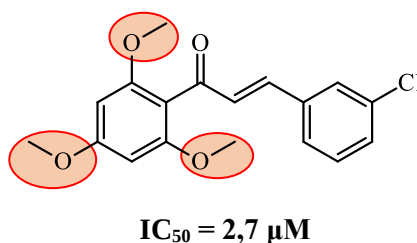
Figura 29 – Derivado indol-tiosemicarbazônicos substituído (SILVA et al, 2020)



Fonte: Silva et al, 2020

No composto LqIT/LYS-14 (Figura 28), a adição do grupo substituinte metóxi nas posições 3, 4 e 5 no núcleo benzilideno proporcionaram à molécula um caráter mais hidrofílico, LogP de 2.78, além disso, o composto apresenta HBA igual a 4, podendo realizar interações moleculares do tipo ligações de hidrogênio com o receptor-alvo, essas características físico-químicas do composto LqIT/LYS-14 podem ter favorecido a sua atividade leishmanicida. De acordo com o trabalho de Bello et al (2011) com análogos sintéticos de chalconas (Figura 30), a adição do grupo metóxi contribuiu na atividade leishmanicida dos seus compostos frente a forma promastigota de *Leishmania braziliensis*, obtendo valores de $IC_{50} < 10 \mu M$.

Figura 30 – Análogo sintético de chalcona trimetoxilado (BELLO et al, 2011)

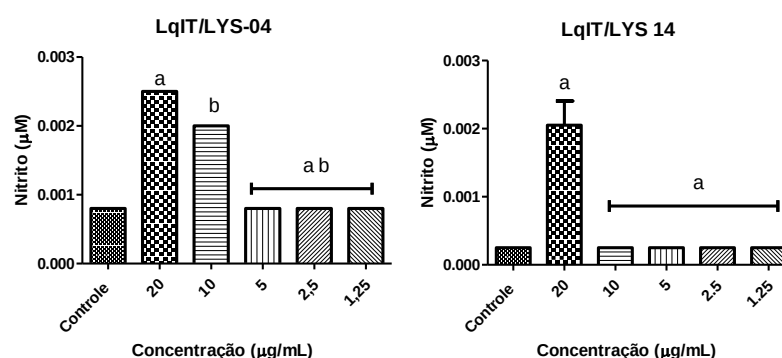


Fonte: Bello et al (2011)

Além das características físico-químicas citadas, os compostos LqIT/LYS-04 e LqIT/LYS-14 foram capazes de induzir a produção de NO por macrófagos J774 em baixas concentrações (Figura 31), esse dado favorece o potencial leishmanicida desses compostos, pois, a capacidade de induzir a produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio por

macrófagos é uma característica importante em fármacos leishmanicida, pois contribui para depleção do sistema redox do parasito mediado pelas enzimas tripanotona redutase e triparedoxina peroxidase (FONSECA, 2017; SIGN et al, 2012). Além disso, os compostos LqIT/LYS-04 e LqIT/LYS-14 apresentaram valores de IC_{50} de 17.1 e 17.9 (ensaio de DPPH) e >100 (ensaio de ABTS) no ensaio de atividade antioxidante, demonstrando novamente a contribuição desses compostos na produção de radicais livres no combate a infecção causada por *Leishmania amazonensis*.

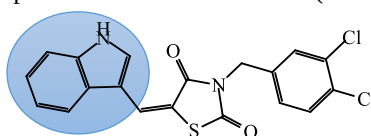
Figura 31 – Resultados da dosagem indireto de NO dos compostos LqIT/LYS-04 e LqIT/LYS-14



Fonte: Autora

Já os compostos LqIT/MOG-01 e LqIT/MOG-02 apresentaram atividade leishmanicida menos expressivos comparado aos demais compostos estudados, pois, apresentaram valores de IC_{50} de 89,93 μ M e 133,92 μ M, respectivamente. Com isso, podemos inferir que, a adição de grupos substituintes na cadeia lateral, como halogênios, auxiliou no potencial leishmanicida de compostos sintetizados nesse trabalho. Consonante a esse resultado, na avaliação do potencial antiparasitário de compostos indólicos-tiazolidínicos (Figura 32) frente a epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, parasito de interesse clínico pertencente à mesma família da *Leishmania amazonensis* (Trypanosomatidae), Oliveira et al (2015) obtiveram resultados menos expressivos com compostos contendo indol não substituído. Reforçando assim, a importância de substituintes na cadeia lateral.

Figura 32 – Composto indólico-tiazolidínico (OLIVEIRA et al, 2015)



$IC_{50} = 27.7 \mu\text{g/mL}$

Fonte: Oliveira et al (2015)

5.6.4 Índice de seletividade

Após a obtenção dos valores de CC_{50} e IC_{50} , foi realizado o cálculo do índice de seletividade (IS), razão entre o valor de CC_{50} e IC_{50} , dos novos compostos heterocíclicos pentagonais. Através do valor de IS pode-se estimar a seletividade do composto ao parasito em relação a célula de mamífero e determinar quais compostos irão para o ensaio com amastigota. A tabela abaixo (Tabela 12) demonstra os valores obtidos de CC_{50} , IC_{50} e IS.

Tabela 12 – Índice de seletividade dos compostos LqIT/LYS e LqIT/MOG

COMPOSTO	CC_{50} (μ M)	IC_{50} (μ M)	IS
LqIT/LYS-04	25,85	7,83	3,30
LqIT/LYS-11	18,69	23,54	NS
LqIT/LYS-14	13,86	9,99	1,38
LqIT/LYS-15	20,93	35,72	NS
LqIT/MOG-01	21,84	89,93	NS
LqIT/MOG-02	34,78	133,92	NS
LqIT/MOG-06	34,50	ND	ND
Anfotericina B	37,61	0,15	250,73

Legenda: CC_{50} : Concentração capaz de causar a perda da viabilidade em 50% das células de mamífero; IC_{50} : Concentração capaz de inibir 50% do crescimento das promastigotas de *L. amazonensis*; **IS**: Índice de seletividade dos novos derivados; **NS**: Composto não seletivo para promastigotas de *L. amazonensis*; **ND**: Não determinado, o ensaio será realizado posterior a esse trabalho.

Após a avaliação dos valores de IS, o composto LqIT/LYS-04 destacou-se em relação aos demais compostos estudados, pois, apresentou valor de IS de 3,30 e IC_{50} 7,83 μ M. Valores de índice de seletividade acima de 3 podem ser considerados significativos na atividade parasitária de compostos sintéticos (BÉZIVIN et al, 2003). Esse resultado demonstra que a adição de halogênios e metóxi na porção benzilideno podem ter contribuído à atividade leishmanicida desse composto.

O valor de IS do composto LqIT/LYS-04 demonstra que esse composto pode possuir mecanismo de ação diferente do controle, anfotericina B. A literatura relata que compostos tiazolidínicos podem possuir mecanismo de ação atrelado a proteínas transdutoras nucleares, como o receptor PPAR- γ (PATIL et al, 2010; SHAHNAZ; BHAI, 2013). Fazendo-se necessário estudos adicionais para presumir o mecanismo de ação desse composto em *Leishmania amazonensis*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Os sete novos compostos heterocíclicos pentagonais pertencentes às séries LqIT/LYS e LqIT/MOG foram sintetizados através de uma rota sintética e de purificação já utilizadas por nosso grupo, obtendo rendimentos reacionais que podem ser considerados satisfatórios e tendo suas estruturas químicas elucidadas com sucesso através de técnicas de análises espectroscópicas de RMN¹H, RMN¹³C, IV e EM.
- ✓ Através da determinação dos parâmetros farmacocinéticos *in silico*, constatamos que os sete novos compostos atendem as regras de Lipinski e Veber. Os resultados de testes farmacocinéticos preditivos indicam que os novos compostos podem possuir uma boa biodisponibilidade oral.
- ✓ Na avaliação *in vitro* do potencial antioxidante, os compostos LqIT/MOG-02 e LqIT/MOG-06 destacaram-se por possuírem atividade mista por eliminar radicais DPPH e cátions ABTS. Fazendo necessário aprimoramento do teste utilizando substâncias lipofílicas como controle positivo.
- ✓ No ensaio *in vitro* de citotoxicidade em macrófagos J774, o composto LqIT/LYS-04 destacou-se mostrando que a adição do halogênio bromo contribui para a diminuição da citotoxicidade em macrófagos J774. Já nos compostos LqIT/MOG, observamos que a substituição bioisostérica clássica do oxigênio por enxofre no composto LqIT/MOG-06 trouxe benefícios a diminuição da citotoxicidade em macrófagos J774, assim como substituição do cloro por metil no composto LqIT/MOG-02.
- ✓ Todos compostos, exceto LqIT/MOG-01, apresentaram aumento significativo na produção de óxido nítrico em baixas concentrações, demonstrando que podem contribuir na atividade leishmanicida.
- ✓ Na avaliação leishmanicida frente as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. O composto LqIT/LYS-04 destacou-se por apresentar menor valor de IC₅₀, IC₅₀ de 7,83 µM, demonstrando que a adição do halogênio bromo pode favorecer a ação antiparasitária devido a suas contribuições ao aumento da lipofilicidade, como também aos efeitos eletrônicos gerados por esse átomo.

- ✓ O composto LqIT/LYS-04 apresentou Índice de Seletividade igual a 3,30 frente a promastigotas de *Leishmania amazonensis*, demonstrando assim um potencial leishmanicida promissor.

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Sintetizar e avaliar a atividade leishmanicida de compostos sintetizados não substituídos;
- ✓ Avaliar a atividade leishmanicida em formas evolutivas promastigotas de *Leishmania amazonensis* do composto LqIT/MOG-06;
- ✓ Avaliar a atividade leishmanicida dos compostos heterocíclicos pentagonais em formas evolutivas amastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- ✓ Realizar a microscopia eletrônica de transmissão (MET) das formas evolutivas promastigotas tratadas com o composto LqIT/LYS-04.

REFERÊNCIAS

- ADLER-MOORE, J. P. et al. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. **Medical Mycology**, v. 54, n. 3, p. 1–9, 2016.
- AIRES, D. C. G. **Derivados tiosemicarbazônicos e tiazolidinônicos como possíveis candidatos ao tratamento da leishmaniose**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1-40, 2016.
- ALEIXO, J. A. et al. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 1, p. 79–82, 2006.
- ALIANÇA, A. S. d. S. et al. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 1-10, jul/2017.
- ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, p. 86, n. 3, p. 497-506, 2011.
- ALMEIDA, V. L. de et al. Estudos de relações estrutura-atividade quantitativas (QSAR) de bis-benzamidinas com atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1482-1489, 2010.
- ALMEIDA JÚNIOR et al. *In vitro* activity, ultrastructural studies and *in silico* pharmacokinetic properties of indol-3-yl-thiosemicarbazones derivatives and analogues against juvenile and adult worms of *S. mansoni*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 138, p. 1-13, 2019.
- ANBARASAN, R et al. Synthesis and spectroscopical study of rhodanine derivative using DFT approaches. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 146, p. 261-272, jul/2015.
- ANDRADE-NARVAEZ, F. J. et al. Asymptomatic infection with American cutaneous leishmaniasis: epidemiological and immunological studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 10, p. 599-604, 2016.
- ARAÚJO, S et al, Effects of the new thiazolidine derivative LPSF/GQ-02 on hepatic lipid metabolism pathways in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **European Journal of Pharmacology**, n. 788, p. 306-314, 2016.
- 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, n. 12, p. 202–264, 2016.

BAHARE, R. S. et al. Synthesis, HIV-1 RT inhibitory, antibacterial, antifungal and binding mode studies of some novel N-substituted 5-benzylidene-2,4-thiazolidinediones. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 6, p. 1-15, 2015.

BANSAL, G et al. Synthesis and biological evaluation of thiazolidine-2,4-dione-pyrazole conjugates as antidiabetic, anti-inflammatory and antioxidant agentes. **Bioorganic Chemistry**, v. 92, p. 1-16, 2019.

BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, p. 536-546, 1991.

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.

BATES, P. A. Revising Leishmania's life cycle. **Nature Microbiology**, v. 3, p. 529-530, 2018.

BELLO, M. L. et al. Trimethoxy-Chalcone derivatives inhibit growth of *Leishmania braziliensis*: Synthesis, Biological Evaluation, Molecular Modeling and Structure Activity Relationship (SAR). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 5046-5052, 2011.

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

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. 2^a ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. **RENAME 2020 – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**. 2020. Disponível em: < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/24/Rename-2020-final.pdf> >. Acesso em 20 jan 2020.

BURZA, S. et al. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, p. 951-970, 2018.

CAETANO, A. R. **Análise filogenética da subfamília leishmaniinae e identificação taxonômica de isolados de lepidoptera pertencentes a família trypanosomatidae**. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

CAMPBELL, I. B. et al. Medicinal chemistry in drug discovery in big pharma: past, present and future. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 2, p. 219-234, 2018.

CAMPOS, J F et al, Synthesis and in vitro anticâncer activity of new 2-thioxo-oxazolidin-4-one derivatives. **Pharmacological Reports**, n. 69, p. 633-641, 2017.

CARDOSO, F. O. et al. Immunopathological Studies of *Leishmania amazonensis* Infection in Resistant and in Susceptible Mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 12, p. 1933-1940, 2010.

CARNEIRO, M. B. et al. Th1-Th2 Cross-Regulation Controls Early Leishmania Infection in the Skin by Modulating the Size of the Permissive Monocytic Host Cell Reservoir. **Cell Host Microbe**, v. 27, n. 5, p. 752-768, 2020.

CARVALHO, S. H. et al. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine and International Health**, v. 24, n. 4, p. 380–391, 2019.

CDC. **Leishmaniasis**. 2017. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> >. Acesso em 02 set 2019.

CHADHA, N. et al. Thiazolidine-2,4-dione derivatives: Programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 13, p. 2953–2974, 2017.

CHAMI, G. F.; BUNDY, D. A. P. More medicines alone cannot ensure the treatment of neglected tropical diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 9, p. 330-336, 2019

CHAVÉZ-FUMAGALLI, M. A. et al. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 235-242, 2015.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, v. 11, n. 11, p. 1117-21, 2016.

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

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means. **Current Opinion in Microbiology**, v. 26, p. 32–40, 2015.

ELZAHHAR, P. A. et al. Shooting three inflammatory targets with a single bullet: Novel multi-targeting anti-inflammatory glitazones, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 167, p. 562-582, 2019.

EVANS, B. E. et al. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 12, p. 2235-2246, 1988.

FERREIRA, E. I. Planejamento de Fármacos na Área de Doença de Chagas: Avanços e Desafios. **Revista Virtual Química**, v. 4, n. 3, p. 225-246, 2012.

FERREIRA TERCEIRO, B. R. et al. Good response to pentamidine isethionate in a case of Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* that was difficult to treat: Case Report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1-4, 2019.

FIRMINO-CRUZ, L. et al. B-1 lymphocytes are able to produce IL-10, but is not pathogenic during Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. **Immunobiology**, v. 225, p. 1-8, 2020.

GAIKWAD, P. L et al. The Use of Bioisosterism in Drug Design and Molecular Modification. **American Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 4, p. 23-49, 2012.

GOUVEIA, A. L. A. **Síntese, elucidação estrutural e avaliação da atividade biológica de novas 5-(indol-3-il-metileno)-4- tioxo-tiazolidin-2-onas**. 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

GOUVEIA, A. L. A. **Atividade leishmanicida in vitro de novos derivados heterocíclicos tiazolidínicos e tiossemicarbazonas**. 2019. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

GUIDO, R. V. C. et al. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. D. Innate immunity against Leishmania infections. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1286–1294, 2015.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 897-908, 2015.

HERNANDES, M. Z. et al. Studies toward the structural optimization of novel thiazolylylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 22, p. 7826-7835, 2010.

JAIN, S. et al. Novel arylidene derivatives of quinoline based thiazolidinones: Synthesis, *in vitro*, *in vivo* and *in silico* study as antimalarials. **Experimental Parasitology**, v. 185, p. 107-114, 2018.

KAISER, M. et al. Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning. **PLoS One**, v. 10, n. 8, 2015.

KAMINSKY, D. et al. 5-Ene-4-thiazolidinones – An efficient tool in medicinal chemistry. **European journal of medicinal chemistry**, v. 140, p. 542-594, 2017.

KAUFER, A. et al. A review of the systematics, species identification and diagnostics of the Trypanosomatidae using the maxicircle kinetoplast DNA: from past to present. **International Journal for Parasitology**, v. 50, n. 6-7, p. 449-460, 2020.

KAUR, G.; RAJPUT, B. Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine Resistance in Leishmania. **Journal of Parasitology Research**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

KEVRIC, I. et al. New World and Old World Leishmania Infections A Practical Review. **Dermatologics Clinics**, v. 33, p. 579-593, 2015.

- KUMAR, K. S.; RAO, A. L.; RAO, M. V. B. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel 3-substituted-5-[(indol-3-yl)methylene]-thiazolidine-2,4-dione derivatives. **Heliyon**, v. 4, n. 9, p. 1-26, 2018.
- LAFAYETTE, E. A. et al. Synthesis of novel indole derivatives as promising DNA-binding agents and evaluation of antitumor and antitopoisomerase I activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 136, p. 511-522, 2017
- LAMBERTUCCI, C. et al. New potent and selective A₁ adenosine receptor antagonists as potential tools for the treatment of gastrointestinal diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 199-213, 2018
- LEITE, F. H. 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.
- LEITE, A. C. L. et al. Privileged structures in the design of potential drug candidates for neglected diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 1-30, 2018
- LIESEN, A. P., et al. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-tiazolidinonas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 369-376, jan. 2008.
- LIMA, J. G. Alguns aspectos químicos do anel tiazolidina-2,4-dionas. **Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 18/20, n. 1/2, p. 1-8, 1998.
- LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.
- LIPINSKI C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.
- LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVAEZ, F. The role of monocytes/macrophages in *Leishmania* infection: A glance at the human response. **Acta Tropica**, v. 207, p. 1-6, 2020.
- MAHAPATRA, M. K. et al. Synthesis, biological evaluation and *in silico* studies of 5-(3-methoxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dione analogues as PTP1B inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, n. 17, p. 1-9, 2017.
- MALTAROLLO, V. G. et al. *In vitro* and *in silico* studies of antioxidant activity of 2-thiazolyldrazones derivatives. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 86, p. 106-112, 2019.
- McGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.
- MEIRELES, C. B. et al. Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. **Acta Tropica**, v. 172, p. 240-254, 2017.

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

MIKOVSKI, D et al. Química medicinal e a sua importância no desenvolvimento de novos fármacos. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 12, n. 13, p. 29-43, 2019.

MOHANTY, S. et al. Acetic anhydride-promoted one-pot condensation of 2,4-thiazolidinedione with bisulfite adducts of aldehydes. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 33, p. 4585–4589, 2014.

MOLYNEUX, D. H. et al. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. **The Lancet**, v. 389, p. 312-325, 2017.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Miltefosine for Visceral and Cutaneous Leishmaniasis: Drug Characteristics and Evidence-Based Treatment Recommendations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p.1398-1404, 2015.

MONZOTE, L. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. **The Open Antimicrobial Agents Journal** , v. 1, p. 9-19, 2009.

MOORTHY, P et al. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of imidazolyl thiazolidinedione derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 413-419, mar/2019.

MORAES, A. D. T. d. O. et al. Synthesis *in vitro* and in vivo biological evaluation, COX-1/2 inhibition and molecular docking study of indole-N-acylhydrazones derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 20, p. 5388–5396, nov/2018.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTA, L. A. A.; MIRANDA, R. R. Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, v. 15, n. 3, p. 376-381, 2011.

NAIM, M. J. et al. Therapeutic journey of 2,4-thiazolidinediones as a versatile scaffold: An insight into structure activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 129, p. 218-250, 2017.

NEVES, L. O. et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092-1101, 2011.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **JDDG Journal of the German Society of Dermatology**, v. 9, p. 754–765, 2008.

OLIVEIRA, J. F. **Síntese e avaliação da atividade esquistossomicida de novos derivados indólicos-tiazolidínicos-3,5-dissubstituídos**. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013

OLIVEIRA, J. F. 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.

OLIVEIRA, J. F. et al. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their *in vitro* and *in vivo* antitumor activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 104, p. 148-156, 2015.

ORYAN, A; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 925–932, out/2016.

OXFORD. **Imagem de promastigotas metacíclicas e amastigotas (*Leishmania spp*)**. 2018. Disponível em: < <https://nanoporetech.com/sites/default/files/s3/Leishmania.jpg> >. Acesso em 02 set 2019.

PATHANIA, S. et al. Role of sulphur-heterocycles in medicinal chemistry: An update. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 180, p. 486-508, 2019.

PAUL, C. et al. Mast cells have no impact on cutaneous leishmaniasis severity and related Th2 differentiation in resistant and susceptible mice. **European Journal of Immunology**, v. 46, p. 114–121, 2016.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, 2015.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1-24, 2017.

PURKAIT, B et al. Mechanism of Amphotericin B Resistance in Clinical Isolates of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p.1031-1041, 2012.

REITHINGER, R et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**. v. 7, n. 9, p. 581–96, set/2007.

RÊGO, M J B M et al. Synthesis, *in vitro* anticâncer activity and *in silico* study of new disubstituted thiazolidinedione derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, n.23, p. 3220-3226, jan/2014.

RIBEIRO, A. G. et al. Novel 4-quinoline-thiosemicarbazone derivatives: Synthesis, antiproliferative activity, *in vitro* and *in silico* biomacromolecule interaction studies and topoisomerase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. 182, p. 1-16, 2019.

ROCHA JUNIOR, L. F. et al. Synthesis of a Novel Thiazolidinedione and Evaluation of Its Modulatory Effect on IFN- γ , IL-6, IL-17A, and IL-22 Production in PBMCs from Rheumatoid Arthritis Patients. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

ROGERO, S. O et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROGERS, M et al. Proteophosphoglycans Regurgitated by *Leishmania*-Infected Sand Flies Target the L-Arginine Metabolism of Host Macrophages to Promote Parasite Survival. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, 2009.

ROMÃO, P. R. T. et al. Leishmaniose: resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape. **Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2007.

SANGI, D. P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 995-1006, 2016.

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, S. S. et al. Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, p. 1-23, 2020

SBEI, N et al. A convenient synthesis of new biological active 5-imino-4-thioxo-2-imidazolidinones involving acetonitrile electrogenerated base. **Tetrahedron**, v. 71, n. 40, p. 7654–7657, out/2015.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews – Immunology**, v. 16, p. 581-592, 2016.

SÉGUIN, O.; DESCOTEAUX, A. Leishmania, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 1-6, 2016.

SILVA, P. R. et al. Novel indol-3-yl-thiosemicarbazone derivatives: Obtaining, evaluation of *in vitro* leishmanicidal activity and ultrastructural studies. **Chemico-Biological Interactions**, v. 315, 2020.

SILVA, T. L. et al. New thioureas based on thiazolidines with antioxidant potential. **Tetrahedron Letters**, v. 56, p. 6674-6680, 2015.

SINAN. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Brasil 2018. 2020. Disponível em: < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltabr.def> >. Acesso 02 jul 2020.

SLACHTOVÁ, V.; JANOVSÁ, L.; BRULÍKOVÁ, L. Solid phase synthesis of new thiazolidinedione-pyrimidine conjugates and their antibacterial properties. **Journal of Molecular Structure**, n.1183, p. 182-189, 2019.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, p. 1-13 2017.

TAVARES, G. S. V. et al. A Pluronic® F127-based polymeric micelle system containing an antileishmanial molecule is immunotherapeutic and effective in the treatment against Leishmania amazonensis infection. **Parasitology International**, v. 68, n.1, p. 63-72, 2019.

TORRES-GUERRERO, E et al. Leishmaniasis: a review [version 1]. **F1000 Research**, v. 6, 2017.

VAKIL, N. H. et al. Pharmacotherapy for Leishmaniasis in the United States: Focus on Miltefosine. **Pharmacotherapy**, v. 35, p. 536-545, 2015.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

VENTIN, F. et al. Safety and efficacy of miltefosine monotherapy and pentoxifylline associated with pentavalent antimony in treating mucosal leishmaniasis, **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 16, n. 3, p. 219-225, 2018.

WALTERS, W. P. Going further than Lipinski's rule in drug design. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 2, p. 99–107, 2012.

WILKE, A. B. B. et al. Complexity of the relationship between global warming and urbanization – an obscure future for predicting increases in vector-borne infectious diseases. **Current Opinion in Insect Science**, v. 35, p. 1–9, 2019.

WITTIG, G.; SCHÖLLKOPF, U. Über Triphenyl-phosphin-methylene als olefinbildende Reagenzien I. Mitteil. **Chemische Berichte**, v. 87, n. 9, p. 1318-1330, 1954.

WHO. **Leishmaniasis: Epidemiological situation**. 2018. Disponível em: < <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> >. Acesso em 02 jul 2020.

WHO. **Neglected Diseases**. 2019. Disponível em: < https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/ >. Acesso 02 jul 2020

WHO. **Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide**. 2018. Disponível em: < https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2016_with_imported_cases.pdf?ua=1 >. Acesso em 02 jul 2020.

YARDLEY, V. et al. American Tegumentary Leishmaniasis: Is Antimonial Treatment Outcome Related to Parasite Drug Susceptibility? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 8, p. 1168–1175, 2006.

ZAGHI, D. et al. New World cutaneous leishmaniasis: Current challenges in diagnosis and parenteral treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 64, n. 3, p. 587-592, 2011.