



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

KARLA RAÍZA CARDOSO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS DE
ISATINA-TIOSSEMICARBAZONAS E ISATINA-HIDRAZONA-TIAZÓIS
SOBRE *Leishmania braziliensis*.**

Recife
2021

KARLA RAÍZA CARDOSO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS DE
ISATINA-TIOSSEMICARBAZONAS E ISATINA-HIDRAZONA-TIAZÓIS
SOBRE *Leishmania braziliensis*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para
obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.
Área de concentração: Medicina Tropical

Orientador: Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Alves

Recife

2021

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

R484e	Ribeiro, Karla Raíza Cardoso Avaliação da atividade biológica de novos derivados de Isatina-tiossemicarbonas e Isatina-hidrazona-tiazóis sobre <i>Leishmania braziliensis</i> / Karla Raíza Cardoso Ribeiro. – 2021. 119 f.; il. Orientador: Fábio André Brayner dos Santos. Coorientador: Luiz Carlos Alves. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Médicas - CCM. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2021. Inclui referências. 1. <i>Leishmania braziliensis</i>. 2. Leishmaniose cutânea. 3. Isatinas. 4. Tiossemicarbonas. 5. Tiazóis. I. Santos, Fábio André Brayner dos (orientador). II. Alves, Luiz Carlos (coorientador). III. Título. 616.988 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2022 - 038)
-------	--



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

KARLA RAÍZA CARDOSO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS DE
ISATINA-TIOSSEMICARBAZONAS E ISATINA-HIDRAZONA-TIAZÓIS
SOBRE *Leishmania braziliensis*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Medicina Tropical da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito para a obtenção do
título de Doutora em Medicina Tropical.
Área de concentração: Medicina Tropical

Aprovado em: 01/03/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Virginia Maria Barros de Lorena (Examinadora Interna)
Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE

Prof^a. Dr^a. Amanda Silva dos Santos Aliança (Examinadora Externa)
Universidade CEUMA

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira (Examinador Externo)
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

Prof^a. Dr^a. Jana Messias Sandes (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda força, sabedoria e amadurecimento adquiridos durante esta etapa de minha vida. Sou muito grata por sempre me guiar, proteger, colocar pessoas especiais em meu caminho, que não mediram esforços para me ajudar na realização deste trabalho.

Aos meus preciosos pais José Carlos e Iserilda pelo amor, confiança, apoio e conselhos mais sábios nos momentos difíceis. Amo vocês!

Ao meu orientador Dr. Fábio Brayner e ao meu coorientador Dr. Luiz Alves meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, confiança, carinho e constante incentivo durante todo o trabalho.

À Dra. Taciana Higino, minha co-orientadora do coração, pela disposição em sempre me ajudar, pelo constante incentivo e pelos conhecimentos compartilhados fundamentais no desenvolvimento deste trabalho. Gratidão por nossa amizade e por todos esses anos de parceria na vida acadêmica! Sou tua fã, Taci!

Ao amigo Jorge Belém que tanto me ajudou diante de tantos “aperreios”, sempre disposto a me ajudar com dúvidas da pós. Obrigada, meu companheiro de aventuras, pelos momentos de descontração e por topar todos: - “Vamos tomar um café?” acompanhados de desabafos e muitas risadas.

Às amigas-irmãs Larissa Oliveira, Aurenice Arruda, Caroline Soares, Larissa Alves e Suellen Feitosa por todo companheirismo e motivação, principalmente nessa fase final. Agradeço a Deus por ter colocado vocês em minha vida! Amo vocês!

Aos demais amigos que conquistei em Recife (Leonardo, Nayalla, Amanda, Neyla, Jana, Lívia, Samara, Laylla e Isabela) e na Uninassau (Jamerson, Antônio Sérgio, Rebeca e Clóvis), que me apoiaram muito durante diferentes trajetórias de minha vida acadêmica. Obrigada por toda torcida, por compreenderem meus aperreios pré-defesa (ausências nos grupos) e por tanto carinho!

A todos que fazem/fizeram parte do Laboratório de Biologia Molecular e Celular: Amanda, Catarina, Camila, Daivy, Everton, Fernanda, Gabriel, Jorge, Lucas, Nairomberg, Thaynara e Rubens pela acolhida, colaboração, conversas e momentos de descontração no laboratório e nos fins de tarde no café do CCSA.

À Dra. Ana Cristina Lima Leite e ao Dr. Paulo André por sintetizarem e disponibilizarem os compostos para a realização desta pesquisa.

À Dra. Jana Sandes pela assistência técnica na aquisição dos dados da microscopia, o laboratório de Microscopia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da UFPE e o Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS) / FIOCRUZ pelo uso de suas instalações.

Ao Dr. Paulo Euzébio e Dra. Adriana Fontes pelo auxílio na aquisição dos dados de citometria de fluxo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, a todos os professores que dele fazem parte pela dedicação e ensinamentos compartilhados durante o curso, e aos secretários Walter e Neemias que sempre atenderam às minhas solicitações com muita simpatia e presteza.

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

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a construção deste trabalho, que pela presença, pela palavra ou pelo sorriso, me proporcionaram coragem e determinação para seguir em busca de meus ideais.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar é uma doença infecciosa negligenciada associada a deformidades físicas e efeitos psicológicos. A busca por novos agentes terapêuticos é necessária e urgente, devido à alta toxicidade dos medicamentos atualmente empregados para tratá-la. Dentre os novos candidatos a fármacos, os compostos derivados de tiossemicarbazonas e tiazóis têm demonstrado atividade significativa contra tripanossomatídeos. Desta forma, nos propomos a avaliar a atividade biológica de novos derivados de isatina-tiossemicarbazonas e isatina-hidrazona-tiazóis sobre *Leishmania braziliensis*. Inicialmente, realizamos a citotoxicidade (CC50) dos compostos contra macrófagos J774 e eritrócitos, por meio das técnicas do MTT e atividade hemolítica, respectivamente. A atividade leishmanicida (IC50) foi avaliada em formas promastigotas. A atividade antioxidante dos compostos também foi avaliada. A partir dos dados de CC50 e IC50 foi determinado o índice de seletividade (IS). Os compostos com melhores valores de IS foram testados quanto a atividade sobre formas amastigotas e efeitos ultraestruturais, por meio de microscopia eletrônica de varredura e transmissão e citometria de fluxo, em promastigotas. Todos os compostos das séries PA-Int e PA-1 foram capazes de inibir o crescimento das formas promastigotas dos parasitos e apresentaram baixa toxicidade em macrófagos J774 e eritrócitos. Considerando que os derivados PA-Int5, PA-Int6, PA-1B e PA-1J apresentaram os melhores índices de seletividade, foram avaliados seus efeitos frente a formas amastigotas. Estes compostos foram capazes de causar efeitos antiproliferativos reduzindo a sobrevivência dos parasitos intracelulares. Estas mesmas moléculas também foram analisadas quanto ao potencial antioxidante, destacando-se PA-1J com melhor atividade. Em relação às alterações ultraestruturais promovidas por estes 4 compostos em formas promastigotas, os derivados da PA-Int5 e PA-Int6 promoveram modificações sugestivas de morte celular por autofagia, como encolhimento do corpo celular, intensa vacuolização citoplasmática e presença de perfis de membranas semelhantes ao retículo endoplasmático circundando organelas. O composto PA-1J causou perda de material citoplasmático e de viabilidade celular. Diante de uma avaliação mais específica destes sobre a mitocôndria dos parasitos, foi possível notar que nenhum dos compostos induziu alterações significativas no potencial de membrana mitocondrial. Dessa forma, pode-se concluir que os novos derivados de tiazóis e tiossemicarbazonas representam protótipos promissores para o tratamento da leishmaniose tegumentar. Nossos dados estimulam a realização de estudos futuros para modificações planejadas nestas moléculas, para que atuem de maneira mais específica contra *L. braziliensis*.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*; Leishmaniose cutânea; Isatinas; Tiosemicarbazonas; Tiazóis.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis is a neglected infectious disease associated with physical deformities and psychological effects. The search for new therapeutic agents is necessary and urgent, due to the high toxicity of the drugs currently available. Among the new drug candidates, compounds derived from thiosemicarbazones and thiazoles have shown significant activity against trypanosomatids. Thus, we evaluated the biological activity of new derivatives of isatin-thiosemicarbazones and isatin-hydrazone-thiazoles on *Leishmania braziliensis*. Initially, we assessed the cytotoxicity (CC50) of the compounds against J774 macrophages and erythrocytes, using the MTT and hemolytic activity techniques, respectively. Leishmanicidal activity (IC50) was evaluated in promastigote forms. The antioxidant activity of the compounds was also evaluated. From the data of CC50 and IC50, the selectivity index (IS) was determined. The compounds with the best IS values were tested for activity on amastigote forms and ultrastructural effects on promastigotes, using scanning and transmission electron microscopy and flow cytometry. All compounds in the PA-Int and PA-1 series were able to inhibit the growth of the parasitic promastigote forms and showed low toxicity in J774 macrophages and erythrocytes. Considering that the derivatives PA-Int5, PA-Int6, PA-1B, and PA-1J presented the best IS, we evaluated their effects against amastigotes. These compounds were able to cause antiproliferative effects, reducing the survival of intracellular parasites. These same molecules were also analyzed for antioxidant potential, with PA-1J standing out with better activity. Regarding the ultrastructural changes promoted by these 4 compounds in promastigote forms, the derivatives of PA-Int5 and PA-Int6 promoted modifications suggestive of cell death by autophagy, such as shrinking of the cell body, intense cytoplasmic vacuolization, and presence of membrane profiles like endoplasmic reticulum surrounding organelles. The compound PA-1J caused the loss of cytoplasmic material and cell viability. Given a more specific evaluation of these on the mitochondria of the parasites, it was possible to notice that none of the compounds induced significant changes in the potential of the mitochondrial membrane. It can be concluded that the new derivatives of thiazoles and thiosemicarbazones represent promising prototypes for the treatment of cutaneous leishmaniasis. Our data encourage future studies for planned modifications to these molecules so that they act more specifically against *L. braziliensis*.

Keywords: *Leishmania braziliensis*; Cutaneous leishmaniasis; Isatins; Thiazoles; Thiosemicarbazones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

Figura 1 -	Distribuição mundial de indivíduos com Leishmaniose Tegumentar	19
Figura 2 -	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp.	20
Figura 3 -	Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar	21
Figura 4 -	Representação esquemática da secção longitudinal das formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp.	22
Figura 5 -	Fenótipos de morte celular em <i>Leishmania</i> spp.	26
Figura 6 -	Estrutura química da isatina	31
Figura 7 -	Estrutura química geral da tiosemicarbazona	32
Figura 8 -	Estrutura química do 1,3 tiazol	33
Figura 9 -	Síntese de novos derivados isatina-tiossemicarbazonas e isatina-hidrazona-tiazóis	37

ARTIGO 1 - NOVOS DERIVADOS DE ISATINA-TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE, ATIVIDADE LEISHMANICIDA E ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL.

Esquema 1 -	Esquema de síntese.	55
Figura 1 -	Efeito de derivados de isatina-tiossemicarbazonas PA-Int5 (A) e PA-Int6 (B) em formas amastigotas intracelulares.	58
Figura 2 -	Eletromicrografia de promastigotas de <i>L.braziliensis</i> não tratadas e tratadas com os compostos PA-Int5 e PA-Int6 observadas pela microscopia eletrônica de transmissão.	59
Figura 3 -	Eletromicrografia de <i>L. braziliensis</i> tratadas e não tratadas com compostos PA-Int5 e PA-Int6 observadas pela microscopia eletrônica de varredura.	61

ARTIGO 2 - SÍNTESE, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E LEISHMANICIDA DE NOVOS DERIVADOS DE ISATINA-HIDRAZONA-TIAZÓIS.

Esuema 1 -	Esquema de síntese.	88
Figura 1 -	Cristalografia da molécula PA-1G.	89

Figura 2 - Eletromicrografia de promastigotas de *L.braziliensis* não tratadas e 93
tratadas com os compostos PA-1B e PA1J observadas pela microscopia
eletrônica de transmissão.

Figura 3 - Eletromicrografia de *L. braziliensis* tratadas e não tratadas com 95
compostos PA-1B e PA-1J observadas pela microscopia eletrônica de
varredura.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1 - NOVOS DERIVADOS DE ISATINA-TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE, ATIVIDADE LEISHMANICIDA E ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL.

Tabela 1 -	Atividades leishmanicida e citotóxica <i>in vitro</i> de derivados de isatina-tiossemicarbazonas.	57
Tabela 2 -	Efeito dos compostos PA-Int5 e PA-Int6 no potencial de membrana mitocondrial.	62

ARTIGO 2 - SÍNTESE, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E LEISHMANICIDA DE NOVOS DERIVADOS DE ISATINA-HIDRAZONA-TIAZÓIS.

Tabela 1-	Atividades leishmanicida e citotóxica <i>in vitro</i> de derivados de isatina-tiazóis.	91
Tabela 2 -	Atividade antioxidante de derivados de isatina-tiazóis.	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
AMB	Anfotericina B
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Hidroxitolueno butilado
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CC ₅₀	Concentração que causa a perda de viabilidade em 50% das células
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNT	Doença tropical negligenciada
DPPH	2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazil
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% do crescimento
ISe	Índice de seletividade
IV	Índice de variação
kDNA	DNA mitocondrial
LC	Leishmaniose cutânea
LD	Leishmaniose disseminada
LM	Leishmaniose mucocutânea
LPQM	Laboratório de Planejamento em Química Medicinal
LT	Leishmaniose tegumentar
MC	Mediana de fluorescência dos parasitos sem tratamento
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MT	Mediana da fluorescência dos parasitos tratados
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina
NaCl	Cloreto de sódio
PBS	Tampão fosfato salino

pH	Potencial hidrogeniônico
Rh 123	Rodamina 123
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, Reactive Oxygen Species)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro Fetal Bovino
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês, World Health Organization)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Leishmaniose Tegumentar.....	18
2.2	Biologia celular da <i>Leishmania</i> spp.....	22
2.2.1	<i>Superfície celular.....</i>	23
2.2.2	<i>Bolsa Flagelar, Flagelo e Citóstoma.....</i>	23
2.2.3	<i>Mitocôndria e Cinetoplasto.....</i>	24
2.2.4	<i>Acidocalcissomas.....</i>	24
2.2.5	<i>Glicossomos.....</i>	25
2.2.6	<i>Megassomos.....</i>	25
2.3	Fenótipos de morte celular da <i>Leishmania</i> spp.....	26
2.4	Quimioterapia da Leishmaniose Tegumentar.....	28
2.5	Derivados de Isatinas,Tiossemicarbazonas e Tiazóis.....	30
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Geral.....	35
3.2	Específicos.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1	Derivados de isatina-tiossemicarbazonas e isatina-hidrazona-tiazóis.....	36
4.2	Cultivo celular.....	37
4.3	Atividade Citotóxica.....	38
4.4	Atividade Hemolítica.....	38
4.5	Atividade Leishmanicida.....	39
4.6	Atividades Antioxidantes.....	39
4.6.1	<i>Atividade de eliminação de DPPH.....</i>	39
4.6.2	<i>Atividade de remoção do ABTS.....</i>	40
4.6.3	<i>Capacidade antioxidante total.....</i>	40
4.7	Estudo ultraestrutural.....	41
4.8	Efeitos sobre o potencial de membrana mitocondrial.....	41
4.9	Análises estatísticas.....	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	ARTIGO 1: NOVOS DERIVADOS DE ISATINA-	43

	TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE, ATIVIDADE LEISHMANICIDA E ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL.....	
5.2	ARTIGO 2: SÍNTESE, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E LEISHMANICIDA DE NOVOS DERIVADOS DE ISATINA- HIDRAZONA-TIAZOL.....	77
6	CONCLUSÕES.....	106
	REFERÊNCIAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um grupo de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) com altos índices de morbidade e mortalidade em regiões tropicais e subtropicais do mundo (LALATSA et al., 2020). Estas infecções são causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* responsáveis por diferentes características clínicas, as quais variam de manifestações tegumentares à viscerais com resultados potencialmente fatais (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é a forma mais comum destas doenças, caracterizada pelo desenvolvimento de lesões ulcerativas limitadas, até nódulos disseminados por todo corpo (BOCXLAER; CROFT, 2021). Estas lesões geralmente são autocuráveis ao longo de um período de meses ou ano (BAILEY et al., 2017). Porém, pacientes com LT, infectados com *Leishmania braziliensis*, podem desenvolver lesões crônicas que muitas vezes não respondem ao tratamento com fármacos antiparasitários (AMORIM et al., 2019).

Os agentes quimioterápicos como os antimoniais pentavalentes são indicados como tratamento de primeira escolha da LT, e em casos de intolerância ou resistência a estes, a anfotericina B, pentamidina e miltefosina podem ser utilizadas como terapia de segunda escolha (ARONSON; JOYA, 2019). Embora sejam amplamente disponíveis, estes fármacos são caros, causam efeitos adversos significativos, tem eficácia limitada, necessitam de monitoramento contínuo e administração em longo prazo (BERBERT et al., 2018). Além disto, o surgimento e a disseminação de cepas resistentes a estes medicamentos e à ausência de uma vacina são fatores que contribuem para que a LT continue a ser um problema de saúde pública para os países endêmicos (SUNDAR; SINGH, 2018).

Novas moléculas provenientes de tiosemicarbazonas e tiazóis representam grande interesse na química medicinal devido à sua viabilidade sintética e importância biológica, pois os mesmos estão presentes em um grande número de compostos biologicamente ativos (HALDYS; LATAJKA, 2013). As estruturas derivadas destes compostos possibilitam a geração de diferentes tipos de derivados através de modificações moleculares que permitem a inibição de múltiplos alvos (FARIAS SANTIAGO et al., 2014). Além do *design* e síntese, a avaliação biológica de novos derivados de tiosemicarbazonas e de tiazóis tem permitido a descoberta de possíveis candidatos a fármacos para o tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos (MORAES GOMES et al., 2016; DA SILVA et al., 2017; DE OLIVEIRA FILHO et al., 2017; QUEIROZ et al., 2020).

Com isso, no presente estudo nos propomos a avaliar os efeitos biológicos e ultraestruturais de novas isatina-tiosemicarbazonas e isatina-hidrazona-tiazóis produzidas dentro de uma visão mais específica contra *L. braziliensis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

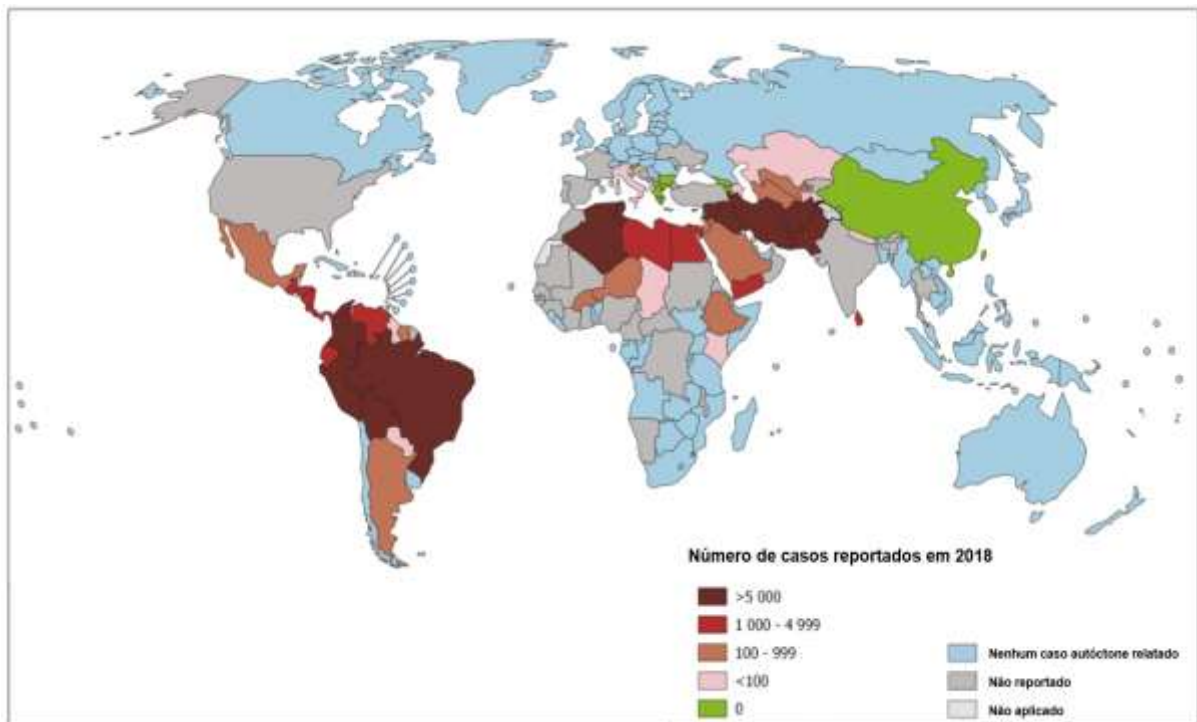
2.1 Leishmaniose Tegumentar

A Leishmaniose é uma doença tropical negligenciada (DTN) causada por protozoários do gênero *Leishmania*. As DTNs compreendem um grupo de 20 diferentes doenças causadas por microrganismos, responsáveis por significativa morbidade e mortalidade em todo o mundo (VARIKUTI et al., 2018). Estima-se que uma a cada cinco pessoas em todo o mundo corre risco de desenvolver uma DTN (WHO, 2018). Muitos fatores conduzem a endemicidade e persistência da transmissão destas doenças, pois as populações afetadas geralmente vivem em infraestruturas inadequadas, com ausência de saneamento adequado, com contato próximo a vetores infecciosos e, muitas vezes, sem acesso a recursos médicos para diagnóstico e tratamento (OKWOR;UZONNA, 2016).

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é a forma de doença mais comum de leishmaniose e se manifesta com lesões na pele e/ou mucosas. Estima-se que aproximadamente mais de 1 milhão de novos casos de LT são notificados anualmente, envolvendo aproximadamente 20 diferentes espécies de *Leishmania*. Cerca de 95% destes casos ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central (WHO, 2018).

Nas Américas, essa doença está presente em 19 países, sendo o Brasil o país mais afetado, respondendo por 96% de todas as notificações. A transmissão da doença é considerada estável em países como Colômbia e Venezuela; enquanto países como Argentina, Brasil e Paraguai apresentam um padrão de transmissão que mostra expansão em novos territórios afetados pela doença (HERRERA-ACEVEDO et al., 2020) (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição mundial de indivíduos com Leishmaniose Tegumentar.



Fonte: Adaptado de Organização Mundial da Saúde (2018).

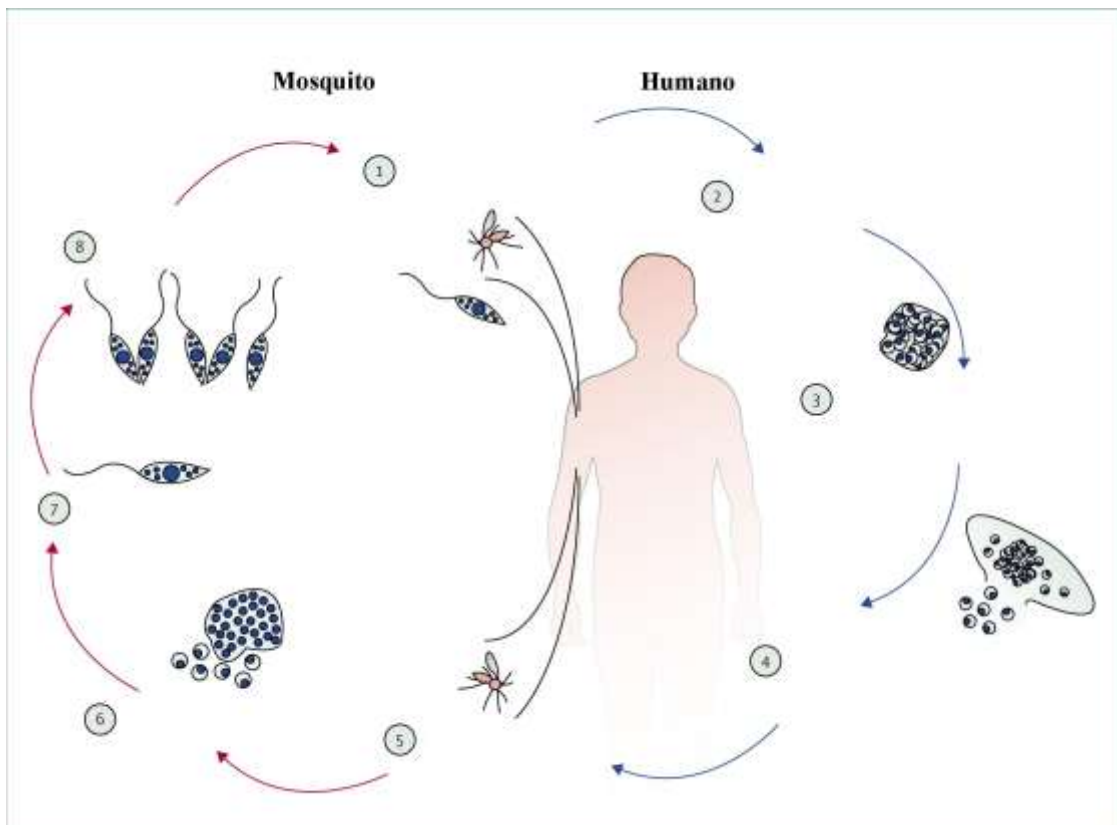
Inicialmente, a LT era restrita às populações de áreas rurais. Todavia, processos como urbanização e desmatamento levaram a adaptação dos ciclos de transmissão para ambientes peridomiciliares, aumentando as áreas de transmissão da doença (VALERO; URIARTE, 2019). Além do mais, o número de casos em áreas não endêmicas tem crescido devido à migração de indivíduos infectados, melhorias do diagnóstico e de notificação de casos, incluindo aumento da detecção da doença associada a infecções oportunistas e o surgimento de resistência dos parasitos aos fármacos usados no tratamento (ANVERSA et al., 2018).

A LT é transmitida por fêmeas de insetos flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Cerca de 700 espécies de flebotomíneos já foram descritas, destes 30 são vetores responsáveis pela transmissão da doença, e mais de 40 são vetores suspeitos. O gênero *Phlebotomus*, responsável pela transmissão no Velho Mundo, é encontrado em ecossistemas desérticos ou semiáridos, como também podem estar situados em locais periurbanos; enquanto *Lutzomyia*, é predominante no Novo Mundo, transmitindo a doença em regiões florestais e locais próximos (ORYAN; AKBARI, 2016).

O ciclo de vida da *Leishmania* spp. envolve diferentes estágios evolutivos que se alternam entre hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (vetor flebotomíneo) (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). A fim de se adaptar aos diferentes microambientes

interiores de seus hospedeiros, os parasitas sofrem transformações biológicas que promovem mudanças estruturais e metabólicas. Estes protozoários possuem duas formas evolutivas, sendo estas: promastigotas, formas móveis extracelulares localizadas no vetor flebotomíneo e na corrente sanguínea do hospedeiro após infecção; e amastigotas, formas intracelulares imóveis encontradas dentro de fagolisossomos dos macrófagos e de outros fagócitos de mamíferos (LIDANI et al., 2017), como mostrado na Figura 2.

Figura 2 - Ciclo de vida da *Leishmania* spp.



Legenda: Durante o repasto sanguíneo, o inseto flebotomíneo infectado regurgita promastigotas de *Leishmania* spp. na pele do hospedeiro (1). Granulócitos e macrófagos são recrutados para a área da picada e fagocitam as promastigotas (2). Em macrófagos, promastigotas são convertidas em amastigotas, que se multiplicam e rompem as células hospedeiras (3). As amastigotas são liberadas para infectar outras células (4). Quando se alimentam de sangue em um hospedeiro infectado (5), o vetor ingere macrófagos infectados com amastigotas (6). Estas formas se transformam em promastigotas no intestino do mosquito (7). Promastigotas se multiplicam e são transformadas em formas metacíclicas e migram para a probóscide do vetor, de onde são injetadas no hospedeiro durante o repasto (8).

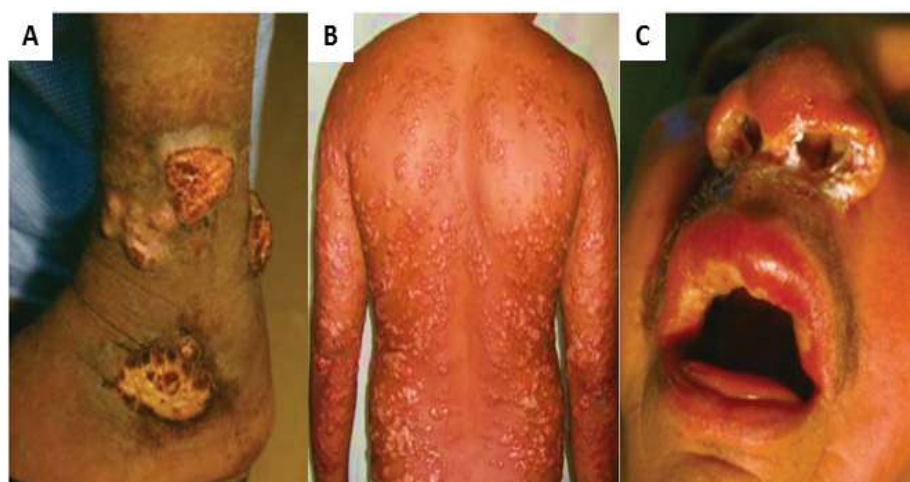
Fonte: Adaptado de Reithinger et al. (2007).

As lesões características da LT desenvolvem-se após um longo período de incubação (2-8 meses), em partes do corpo que estão principalmente expostas, tais como rosto, antebraços e pernas. Estas lesões geralmente se apresentam como uma única pápula

eritematosa acastanhada e indolor, ou como múltiplas lesões grandes e localmente destrutivos (UZUN et al., 2018; BILGIC-TEMEL et al., 2019).

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é responsável pela maioria dos casos de LT, caracterizados por diferentes fenótipos clínicos: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose disseminada (LD) e leishmaniose mucocutânea (LM) (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019) (Figura 3).

Figura 3 – Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar.



Legenda: (A) Leishmaniose Cutânea; (B) Leishmaniose Disseminada, (C) Leishmaniose Mucocutânea.

Fonte: Murbach et al. (2011); McGwire; Satoskar (2014).

A LC é caracterizada por lesões benignas localizadas e autolimitantes; a LD é relacionada ao desenvolvimento de lesões nodulares distribuídas por todo o corpo; e a LM é uma condição potencialmente fatal em 10% dos casos, caracterizada pelo acometimento das mucosas da boca e do nariz, (BURZA et al., 2018). A LM e LD são variantes severas e difíceis de tratar, que podem resultar em destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta, promovendo aos pacientes acometidos alterações tegumentares desfigurantes (SILVA et al., 2017).

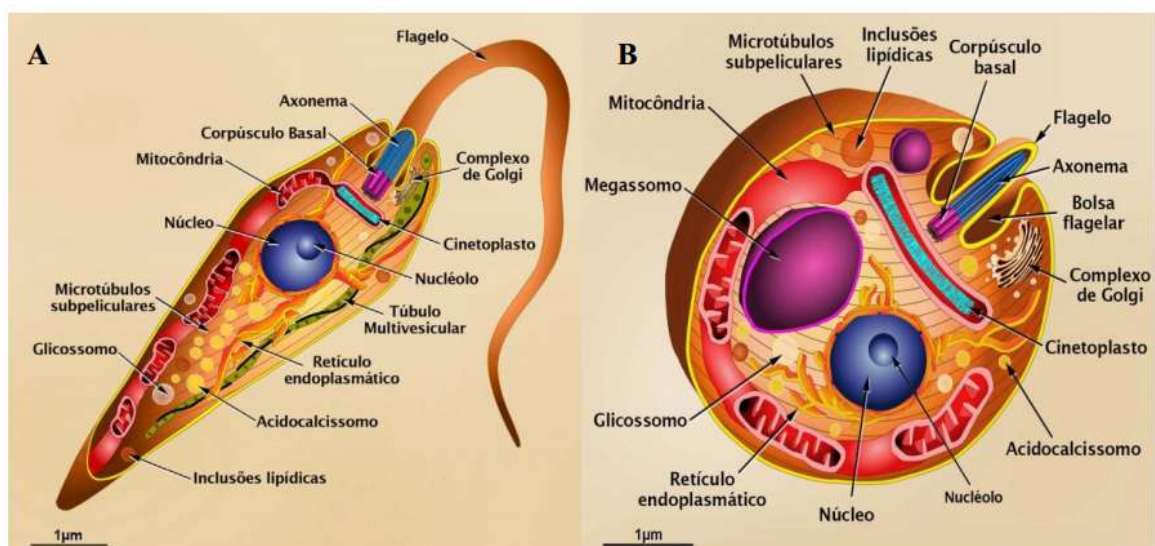
Embora estas lesões sejam autocuráveis na maioria dos casos, o tratamento é útil para acelerar o processo de cicatrização, prevenir complicações, desenvolvimento de disfunções, disseminação e recorrência de lesões (UZUN et al., 2018). As cicatrizes desfigurantes podem perdurar ao longo da vida (BISETEGN et al., 2020) causando quadros de ansiedade, estresse, depressão, e promovendo impactos sociais e econômicos aos pacientes acometidos (BENNIS et al., 2017; TAMIRU et al., 2019).

Além disto, a infecção por *L. braziliensis* pode promover o desenvolvimento de lesões crônicas, que muitas vezes não respondem às terapias convencionais devido a mecanismos de variações na expressão de genes correlacionados com a carga parasitária em lesões tegumentares (AMORIM et al., 2019). Alguns indivíduos infectados apresentam lesões atípicas que se assemelham a outras condições dermatológicas, tais como micoses subcutâneas e profundas, linfoma cutâneo, pseudolinfoma e carcinoma de células basais e escamosas (MEIRELES et al., 2017), que necessitam de um diagnóstico diferencial e preciso, para evitar tratamentos desnecessários, agravamento do quadro e continuidade da transmissão do parasito (ATYATOLLAHI et al., 2015).

2.2 Biologia celular da *Leishmania* spp.

A *Leishmania* spp. possui uma organização celular significativamente diferente das demais células eucarióticas (TEIXEIRA et al., 2013) (Figura 4). Este protozoário apresenta organelas peculiares, tais como cinetoplasto, reservossomos, acidocalcissomas e glicossomos, além de processos metabólicos únicos, que são potenciais alvos de novos agentes terapêuticos (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014).

Figura 4- Representação esquemática da secção longitudinal das formas evolutivas de *Leishmania* spp.



Legenda: A – Forma promastigota; B- Forma amastigota.
Fonte: Teixeira et al. (2013).

2.2.1 Superfície celular

A membrana plasmática, o glicocálice e o citoesqueleto são as principais estruturas que compõem a superfície celular da *Leishmania spp.* A membrana plasmática deste protozoário, como em todas as células, é composta por uma bicamada lipídica constituída por diferentes lipídeos e proteínas. (SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010). Nos tripanossomatídeos, fenômenos que promovam aumento da rigidez da membrana causada devido peroxidação de lipídeos presentes nesta estrutura e o vazamento de eletrólitos podem levar a morte celular, enquanto efeitos menores nesta rigidez causam diminuição potencial na motilidade do parasita e na sua capacidade de infectar macrófagos (ALONSO et al., 2020).

O glicocálice é constituído por carboidratos associados a proteínas periféricas e lipídeos. É uma estrutura localizada na camada externa da membrana plasmática presente em todos os estágios evolutivos do parasito, responsável pela interação parasito/hospedeiro (SOUZA, 2008). Já os microtúbulos sub-películas são os principais componentes do citoesqueleto do parasito. Essas estruturas são encontradas abaixo da membrana plasmática dispostas por todo o corpo celular, estabelecendo maior rigidez e estabilidade. Estes microtúbulos estão conectados entre si, com a membrana plasmática e o retículo endoplasmático (SOUZA; ATTÍAS; RODRIGUEZ, 2009).

2.2.2 Bolsa Flagelar, Flagelo e Citóstoma

O flagelo da *Leishmania spp.* é composto de nove pares de microtúbulos periféricos dispostos ao longo de um círculo com um par de microtúbulo central, todos imersos em uma matriz citoplasmática revestida por uma membrana celular em toda a sua extensão (SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010). Envolvido em processos como mobilidade celular e adesão do parasito à superfície da célula dos hospedeiros, o flagelo emerge na mesma região onde se localiza uma invaginação da membrana plasmática denominada bolsa flagelar. Esta é uma região de intensa atividade endocítica e exocítica, que difere do flagelo e da membrana do corpo celular quanto a distribuição de partículas intramembranas e a localização de algumas proteínas (HILL, 2003; DURANTE et al., 2015).

Além da bolsa flagelar, uma outra invaginação próxima à esta região forma uma estrutura denominada de citóstoma. Este é um compartimento isolado do meio extracelular encontrado apenas em formas amastigotas, responsável pela captação, através do mecanismo

de endocitose, de macromoléculas essenciais para o metabolismo do parasita (SOUZA et al., 2009).

2.2.3 Mitocôndria e Cinetoplasto

Os tripanossomatídeos possuem uma única mitocôndria que se estende por todo o corpo celular contendo funções e estrutura análogas a das células eucarióticas. Esta organela é uma das principais estruturas nestes protozoários responsável pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e de enzimas responsáveis pela regulação dos níveis destes radicais livres. Sendo relevante a ação destas enzimas antioxidantes, pois conforme o estímulo fisiológico, as ERO's podem desencadear mecanismos de sinalização ou citotoxicidade, que comprometam a sobrevivência do protozoário (TOMÁS; CASTRO, 2013; SALINAS, 2013).

Em uma região específica da mitocôndria está presente uma estrutura complexa formada de DNA, chamada cinetoplasto, que varia sua ultraestrutura de acordo com o estágio evolutivo do parasito (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014). O DNA mitocondrial que forma o cinetoplasto é conhecido como kDNA e representa 30% do material genético total da célula. Ele é composto de moléculas circulares que, juntas e interconectadas, formam uma rede única. Dois tipos de kDNA podem ser encontrados, os minicírculos e os maxicírculos (CAVALCANTI; SOUZA, 2018).

Os minicírculos correspondem a aproximadamente 90% do total da massa de DNA mitocondrial e sua principal função é codificar pequenos RNAs guias que controlam a especificidade de edição do RNA nesta organela (FIDALGO; GILLE, 2011). Os maxicírculos são estruturalmente e funcionalmente homólogos ao DNA mitocondrial de eucariotos superiores, e são responsáveis por codificar RNAs ribossomais para inúmeras proteínas. Muitas destas contribuem para funções vitais da célula, principalmente as envolvidas com os mecanismos de transdução de energia (JENSEN; ENGLUND, 2012).

2.2.4 Acidocalcissomas

Uma característica peculiar de tripanossomatídeos parasitos, quando comparadas às células de mamíferos, é a presença de estruturas citoplasmáticas delimitadas por uma unidade de membrana e que contêm em seu interior um material elétron-denso (DOCAMPO; MORENO, 2013). Estas estruturas denominadas acidocalcissomas, são organelas ácidas que

estocam uma alta concentração de fósforo complexado com cálcio (NIYOGI et al., 2015). Elas também armazenam quantidades consideráveis de magnésio, sódio, potássio e zinco, além de desempenharem um papel importante na resposta ao estresse osmótico e na manutenção do pH intracelular (DOCAMPO; MORENO; ULRICH, 2010).

2.2.5 Glicossomos

Estas organelas são essenciais na sobrevivência dos tripanossomatídeos, por apresentar um grande número de enzimas importantes na via glicolítica destes protozoários, razão pela qual foram denominadas glicossomos (BANERJEE et al., 2019). Os glicossomos compartimentalizam enzimas da β -oxidação de ácidos graxos, síntese de éter-lipídios, esteróis, pirimidinas e enzimas da via de recuperação de purinas (GÜTHER et al., 2014). No entanto, estas estruturas não possuem um genoma e todas as suas proteínas são codificadas por genes nucleares, transcritas em ribossomos livres, e encaminhadas para dentro destas organelas (HANSTRA et al., 2016).

2.2.6 Megassomos

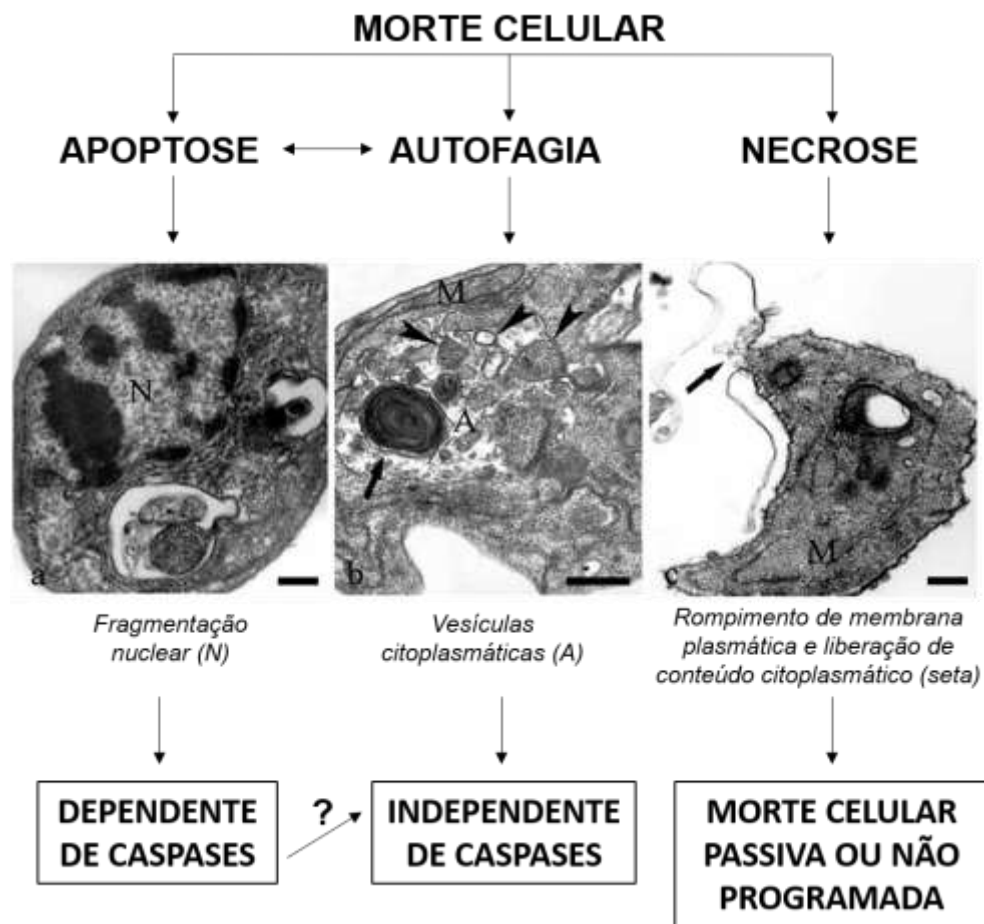
Algumas espécies de *Leishmania* apresentam organelas com atividade lisossomal, denominadas megassomos devido ao seu grande tamanho. Estas estruturas apresentam variações no número e no tamanho conforme a espécie de *Leishmania spp.* Estão presentes em formas amastigotas das espécies de *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. pifanoi*, e em formas promastigotas e amastigotas de *L. chagasi* (ALBERIO et al., 2004; UEDANA-KAMURA; ATTÍAS; SOUZA, 2007), desempenhando papel importante na virulência e favorecem a sobrevivência intracelular do parasito (MCMAHON-PRATT; UEDANA-KAMURA; TRAUB-CSEKO, 2010).

Essas organelas são ricas em cisteíno-proteinases e exibem grandes quantidades de hidrolases lisossomais. Estas enzimas desenvolvem um importante papel durante o processo de endocitose, permitindo que os megassomos sejam capazes de armazenar macromoléculas ingeridas pelos parasitos (SOUZA; ATTÍAS; RODRIGUEZ, 2009).

2.3 Fenótipos de morte celular da *Leishmania* spp.

A compreensão detalhada da biologia celular do parasita, por meio de análises ultraestruturais, pode fornecer informações essenciais para novas abordagens quimioterápicas baseadas nos mecanismos de morte celular (DAS et al., 2021). A apoptose, autofagia e necrose (Figura 5) são fenótipos de morte que ocorrem em *Leishmania* e em outros protozoários parasitos (MIRANDA et al., 2017).

Figura 5 – Fenótipos de morte celular em *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de Fernandes Rodrigues; Souza (2008).

A apoptose é um processo fisiológico essencial que desempenha um papel crítico no desenvolvimento e na homeostase dos tecidos em organismos multicelulares, mas que também é observado em outros microrganismos eucarióticos, como leveduras e protozoários (AWASTHI et al., 2018). Em *Leishmania* spp., este fenótipo permite regular a densidade

celular do parasito no hospedeiro para evitar o hiperparasitismo e modula a imunidade do hospedeiro (BASMACIYAN et al., 2019).

Processos apoptóticos em tripanossomatídeos são caracterizados por alterações morfológicas e bioquímicas, tais como perda de adesão e arredondamento associadas ao encolhimento celular, a presença de bolhas na membrana plasmática, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, alterações na fisiologia mitocondrial (MENNA-BARRETO, 2019). Neste caso, a mitocôndria apresenta um inchaço na sua estrutura acompanhada de perturbações na homeostase do cálcio, na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e despolarização no potencial de membrana (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014).

Sugere-se que estes parasitos apresentem uma morte celular por apoptose bastante primitiva. Nos tripanossomatídeos, este tipo de morte necessita da formação de ERO's e não depende principalmente da ação de proteínas pró-apoptóticas, como ocorre nas células de mamíferos (RODRIGUES et al., 2019). Na morte celular da *Leishmania spp.* há uma estreita relação entre apoptose e autofagia mediada por metacaspases, que desempenham um papel semelhante às caspases, ausentes neste parasita (MARIÑO et al., 2014; BASMACIYAN; CASANOVA, 2019).

Na morte celular autofágica, também chamada de necrose programada, uma via de sinalização celular é regulada por proteínas responsáveis pela degradação e reciclagem de componentes da célula (PEDRA-REZENDE et al., 2020). Dentre as características morfológicas da autofagia destacam-se o aumento no número de inclusões lipídicas e a presença de perfis de retículo endoplasmático envolvendo organelas inteiras e danificadas (BRITTA et al., 2014). Em resposta ao estresse, a autofagia induzida por xenobióticos é uma estratégia de sobrevivência na *Leishmania*. Porém, em condições de estresse contínuo, a própria autofagia promove a morte do parasito (SCARIOT et al., 2017). Bem como, a autofagia exacerbada também pode levar à uma necrose (PROTO et al., 2013).

A necrose, morte celular accidental, envolve a ruptura da membrana plasmática, alterações na homeostase do cálcio, degradação dependente de hidrolases lisossomais e vacuolização citoplasmática. A perda da integridade celular promove a liberação dos componentes intracelulares e induz uma resposta inflamatória (KROEMER et al., 2009; MENNA-BARRETO, 2019). O fenótipo necrótico nesses protozoários está relacionado ao estresse oxidativo, assim como ocorre na apoptose. A diminuição do potencial de membrana mitocondrial ocasionado por modificações nos níveis de ERO's, e consequentemente a falta de funcionalidade desta organela, favorece a morte celular dos parasitos (CORRAL et al., 2016).

2.4 Quimioterapia da Leishmaniose Tegumentar

A quimioterapia é fundamental para o controle e tratamento da leishmaniose tegumentar. A vacinação é uma alternativa atraente e viável porque a proteção de longo prazo é típica em pacientes que se recuperam da doença. Porém, nenhuma vacina humana foi ainda aprovada para uso, mas vários candidatos estão em vários estágios de teste (ZABALA-PEÑAFIEL et al., 2020)

O manejo da doença apresenta várias limitações devido a problemas associados a eficácia, toxicidade e a necessidade de administração diária dos medicamentos disponíveis para o tratamento (OYAMA et al., 2018). Além disso, a resistência das diferentes espécies de *Leishmania spp.* surge devido a mutações genéticas que diminuem a resposta dos parasitos aos fármacos convencionais (PONTE-SUCRE et al., 2017).

Desde 1940, os antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina [Glucantime[®]] e estibogluconato de sódio [Pentostam[®]]) são os principais medicamentos empregados contra as diferentes formas clínicas da LT (BRASIL et al., 2017). O mecanismo de ação dos antimoniais frente às formas evolutivas de *Leishmania* não é totalmente conhecido, e há divergências se o metabólito ativo do antimonial é pentavalente ou trivalente (HUSEINELAHMED et al., 2020). Porém, sugere-se que estes fármacos são capazes de inibir a síntese de ATP do parasito (AN et al., 2019).

Os antimoniais podem causar efeitos adversos comuns como, mialgia, artralgia, fadiga, anorexia, náusea e dor de cabeça; além de efeitos graves e potencialmente fatais, tais como pancreatite, hepatite, arritmias e toxicidade renal (OLIVEIRA et al., 2011; LYRA et al., 2016, RODRIGUES et al., 2020). Falhas no tratamento com estes fármacos de primeira escolha foram relatadas em cerca de 30% dos casos na América Latina (NAVAS et al., 2020). Após conclusão do esquema terapêutico com os antimoniais, os casos de insucesso da cura clínica são considerados falhas no tratamento. Por isso, um fármaco de segunda escolha como a anfotericina B ou pentamidina deverá ser utilizado (VASCONCELOS et al., 2018).

A anfotericina B (AMB) é um antibiótico macrolídeo polieno, derivado do *Streptomyces nodosus*, que apresenta potente atividade antifúngica e leishmanicida. Este fármaco interage com o ergosterol na membrana plasmática da *Leishmania*, desencadeia a perda de componentes intracelulares, e consequentemente a morte do parasito (JAAFARI et al., 2019). Porém, o uso clínico da forma clássica de AMB (Fungizone[®]) tem sido limitado devido causar nefrotoxicidade e cardiotoxicidade, além de ser restrita a ambientes

hospitalares. Por este motivo, a forma lipossomal da AMB (Ambisome[®]) tem apresentado maior sucesso no tratamento da leishmaniose por demonstrar maior eficácia e causar menor toxicidade renal (BERENGUER et al., 2020).

Em comparação ao AMB convencional, uma dose mais elevada da formulação lipídica deve ser administrada para apresentar eficácia no tratamento (SHIRZADI, 2019). No entanto, o principal fator limitante no tratamento com AMB lipossomal é o alto custo. Deste modo, a sua utilização pode ser limitada em países em desenvolvimento ou entre indivíduos que apresentem baixos recursos financeiros para tratamento (NGUYEN et al., 2019). Além disso, a forma lipídica da AMB tem meia-vida de circulação curta e atinge rapidamente altas concentrações no fígado e baço (AKBARI et al., 2017).

Nos casos de resistência e intolerância aos antimoniais, a pentamidina, uma diamidina aromática, pode ser empregada para o tratamento da LT. Sintetizada no início da década de 40, este composto demonstrou atividade frente a *Trypanosoma cruzi* e a *Pneumocystis jirovecii* (GADELHA et al., 2018). A atividade antiparasitária das diaminas despertou o interesse para a sua utilização como um composto hipoglicêmico que poderiam comprometer o metabolismo energético das diferentes espécies de *Leishmania* (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI et al., 2017). Porém, a pentamidina exerce ação nos parasitos se acumulando e bloqueando a replicação do cinetoplasto (YANG et al., 2016).

A pentamidina é utilizada como tratamento de primeira escolha especificamente para infecção por *L. (V.) guyanensis*, necessitando de um menor tempo de tratamento e menor quantidade de doses quando comparado aos antimoniais (GADELHA et al., 2015). Apesar de demonstrar uma eficácia comparável tanto em casos de uso sistêmico quanto intralesional, o tratamento com a pentamidina apresenta uma alta frequência de efeitos tóxicos, como cardiotoxicidade e distúrbios metabólicos (BASILE et al., 2020).

Outro agente de segunda escolha é a miltefosina, primeiro e único medicamento oral aprovado, nos Estados Unidos pela *Food and Drug Administration* (FDA), para o tratamento da leishmaniose (EMILIANO et al., 2018). O mecanismo de ação deste fármaco, inicialmente desenvolvido como um agente antineoplásico, é desconhecido, mas acredita-se que ele interage com lipídios da membrana plasmática e induzem morte celular dos parasitos por apoptose (WARE et al., 2020). O tratamento com a miltefosina induz comumente o surgimento de reações gastrointestinais; e como efeitos raros, incluem-se a hepatotoxicidade, insuficiência renal e teratogenicidade. Outras desvantagens são o alto custo e os potenciais riscos de falha terapêutica (MANN et al., 2020).

A paromomicina, também conhecida como aminosidina, é o mais recente fármaco de segunda linha que tem demonstrado atividade leishmanicida isolada ou em regimes de combinação (SHAW et al., 2019). O mecanismo de ação deste fármaco não foi completamente elucidado, porém é sugerido que ele é capaz de inibir a translocação e a reciclagem de subunidades ribossômicas, promover alterações no potencial de membrana mitocondrial e interferir na síntese proteica do parasita (MATOS et al., 2020). As principais vantagens da paromomicina estão relacionadas a não indução de efeitos teratogênicos ou mutagênicos, além do baixo custo (ESFANDIARI et al., 2019). Porém, necessita do desenvolvimento de formulações injetáveis e tópicas, pois este fármaco apresenta baixa absorção oral e tempo de meia vida curto via administração parenteral, exigindo altas doses múltiplas que promovem ototoxicidade e nefrotoxicidade (SHALEV et al., 2015). Além do mais, a sua utilização no Brasil não é aprovada para o tratamento de espécies de *Leishmania* responsáveis pelo desenvolvimento da LT (COSER et al., 2020).

Diante destas limitações, é urgentemente necessária a busca por novos agentes quimioterápicos com atividade anti-*Leishmania* que sejam seguros, eficazes, acessíveis, administrados por vias não-invasivas, e que apresentem ciclos de duração curtos e bons perfis de segurança (DNDI, 2019). Nos últimos anos, tem sido observado um esforço crescente para que mais compostos leishmanicidas sejam descobertos e estudados utilizando diferentes, incluindo terapia combinada, reposicionamento de fármacos e busca por novas formulações (ALCÂNTARA et al., 2018; SANGENITO et al., 2019).

2.5 Derivados de Isatinas, Tiossemicarbazonas e Tiazóis

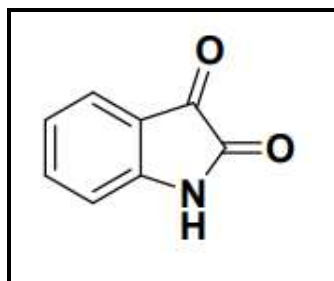
No desenvolvimento de novos fármacos, a hibridização molecular é uma estratégia poderosa que permite o *design* de novos ligantes ou protótipos, com base no reconhecimento de subunidades farmacofóricas na estrutura química de dois ou mais conhecidos derivados bioativos (BÉRUBÉ et al., 2016). A construção dessas moléculas híbridas se dá por meio da combinação de duas ou mais estruturas químicas inteiras usando uma cadeia de ligação, ou por meio da ligação direta de porções de diferentes compostos (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007; FRAGA et al., 2009).

Esta ferramenta tem promovido o desenvolvimento e a modificação estrutural de protótipos com espectro biológico mais amplo, maior eficácia, menor toxicidade e que atuem em múltiplos alvos farmacológicos (GOMES et al., 2017). Dentre os grupos químicos explorados, isatinas, tiossemicarbazonas e tiazolil-hidrazonas são notáveis por apresentarem

uma ampla gama de atividades biológicas, principalmente antiparasitárias (PIZZO et al., 2011; MASOUD et al., 2012; MOREIRA et al., 2012; BANDGAR et al., 2013).

Nos últimos anos, a isatina (indol-2,3-diona) (Figura 6) tem sido amplamente utilizada juntamente com outros grupos farmacofóricos na síntese de uma variedade de compostos orgânicos (GANIN et al., 2019). Por causa da propriedade altamente reativa do grupo carbonila na posição C3, a isatina é essencial nos estudos de síntese orgânica (RAMADAM et al., 2020). As bases de Schiff destas estruturas também são comumente utilizadas devido suas propriedades biológicas (MORADI; ZIARANI; LASHGARI, 2017).

Figura 6 - Estrutura química da isatina.



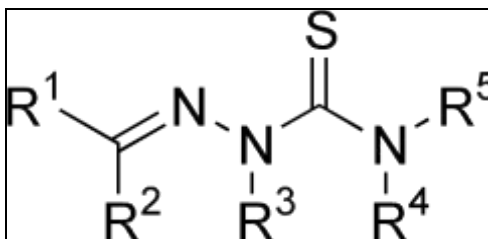
Fonte: SAGNOU et al. (2020).

Este derivado do indol foi obtido pela primeira vez em 1841 por Erdman e Laurent, como um produto da oxidação do corante índigo por meio de ácido nítrico e crômico. A isatina está presente nas plantas do gênero *Isatis*, e *Couroupita guianensis* e na secreção da glândula parótida de sapos Bufo. Além do mais, é um composto endógeno encontrado no cérebro de mamíferos, tecidos periféricos e fluidos corporais (PHOGAT et al., 2015; SAGNOU et al., 2020). Vários estudos sugerem a importância do desenvolvimento de híbridos à base de isatina como agentes antineoplásicos, antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatórios (WANG et al., 2018), anticonvulsivantes, ansiolíticos e antivirais (MEDVEDEV et al., 2018).

As tiossemicarbazonas e os tiazóis também são compostos que tem se destacado devido possuem atividades sob diversos sistemas biológicos, sendo promissores no desenvolvimento de possíveis agentes quimioterápicos (FONSECA et al., 2015). As estruturas destes compostos despertam interesse na química medicinal por possibilitarem a geração de diferentes tipos de derivados através de modificações em suas estruturas, por apresentarem facilidade de síntese e baixo custo associado (CARDOSO, 2014).

As tiossemicarbazonas (Figura 7) são uma classe de compostos derivados da condensação da tiossemicarbazidas com cetonas ou aldeídos adequados (RAMADAN et al., 2020). Estas moléculas geralmente são capazes de se complexar com íons metálicos por meio de seus átomos de enxofre e nitrogênio, sendo seu mecanismo de ação modulado pela estrutura do ligante e pela natureza do metal (SOARES et al., 2017).

Figura 7 - Estrutura química geral da tiossemicarbazona.



Nota: Onde R1, R2, R3, R4 e R5 podem ser H, ou quaisquer substituintes orgânicos.

Fonte: JAMAL et al. (2019).

Estas moléculas conseguem atravessar facilmente membranas biológicas *in vivo* com alta probabilidade de interagir com macromoléculas, tais como o DNA e proteínas (DU et al., 2002; DILOVIC et al., 2008). Diversos estudos já comprovaram que derivados destas moléculas apresentam potencial valor como substâncias biologicamente ativas apresentando atividades antimicrobiana (IBRAHIM et al., 2018), antiproliferativa (BRAGA et al., 2016), antitumoral (SANTOS et al., 2016), antiparasitária (ESPÍNDOLA et al., 2015) e antiviral (MORAES GOMES, 2018) e larvicida (SILVA et al., 2015).

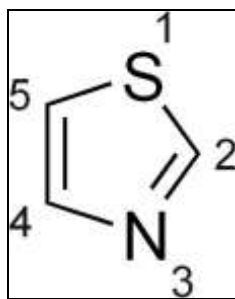
As estruturas derivadas de tiossemicarbazonas possibilitam a geração de diferentes tipos de derivados através de modificações em suas estruturas que permitem a inibição de múltiplos alvos (PRAJAPATI et al., 2019). Por este motivo, estes compostos representam excelentes protótipos para o desenho e desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas (BLAU et al., 2013).

As moléculas derivadas de tiossemicarbazonas são potenciais moléculas antiparasitárias contra *T. cruzi*, *Plasmodium falciparum* e *T. brucei*, os quais atuam através da inibição de cisteíno-proteinases e são capazes de inibir múltiplos alvos desconhecidos (GREENBAUM et al., 2004). Essas moléculas são bons agentes quelantes capazes de inibir ou mimetizar a ação de enzimas, por meio de reações de redox ou complexação de metais endógenos (BERALDO, 2004).

Estes derivados têm demonstrado eficácia na inibição de cisteína proteases de *Leishmania* spp., as quais são essenciais para virulência, viabilidade, manutenção da morfologia deste protozoário e nos mecanismos de evasão frente a resposta imunológica executada pelas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro (SCHRODER et al., 2013; SCHAD et al., 2015).

O tiazol (1,3 tiazol) (Figura 8) é um composto com estrutura química pequena que contém átomos de enxofre e nitrogênio, e ocupa um lugar importante na química medicinal devido seus derivados estarem presentes em diversas moléculas com propriedades biológicas (ABDU-RAHEM et al., 2021).

Figura 8 - Estrutura química do 1,3 tiazol.



Fonte: ABDU-RAHEM et al. (2021).

Novos compostos provenientes de anéis de tiazol têm demonstrado eficácia em tratamentos de doenças fúngicas e parasitárias, devido inibirem a biossíntese de ergosterol (WISASTRA et al., 2011; PAIVA et al., 2014). Esta via metabólica é essencial para a sobrevivência dos tripanossomatídeos, representando desta forma, um alvo de ação atrativo para fármacos leishmanicidas, uma vez que células do hospedeiro não possuem esta via (KESSLER et al., 2013).

Dentre as atividades biológicas já relatadas, os compostos derivados de tiazol incluem-se como agente antineoplásicos (SANTOS et al., 2016), anti-inflamatórios (HELAL et al., 2013; DEB et al., 2013), antivirais (PACCA et al., 2017; SINGH et al., 2020), antimicrobianos (ARORA et al., 2015; MISHRA et al., 2020) e antiparasitários (CARDOSO et al., 2014; FARIAS SANTIAGO et al., 2014; GOMES et al., 2016; DE OLIVEIRA FILHO et al., 2017; OLIVEIRA BARBOSA et al., 2019; FILHO et al., 2020). Além do mais, nosso grupo de pesquisa também demonstrou a atividade leishmanicida de novos derivados tiazólicos que atuam de forma mais seletiva contra *L. infantum* (ALIANÇA et al. 2017; QUEIROZ et al., 2020).

Até o presente momento, nenhum estudo relatou os efeitos de derivados à base de derivados isatinas-tiosemicarbazonas e isatinas-hidrazonas-tiazóis frente à *Leishmania braziliensis*. Nossos resultados visam contribuir para o desenvolvimento de um possível candidato a agente quimioterápico e/ou uma nova abordagem terapêutica contra a leishmaniose tegumentar.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a atividade biológica de novos derivados de isatina-tiossemicarbazonas e isatina-hidrazona-tiazóis sobre *Leishmania braziliensis*.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito citotóxico dos compostos sobre macrófagos J774 e eritrócitos;
- b) Analisar o efeito dos compostos sobre a viabilidade de formas promastigotas de *L. braziliensis*;
- c) Avaliar *in vitro* a ação dos compostos sob o índice e o percentual de infecção de amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* em macrófagos J774;
- d) Analisar o potencial antioxidante dos compostos;
- e) Identificar possíveis alvos intracelulares dos compostos em promastigotas de *L. braziliensis*.

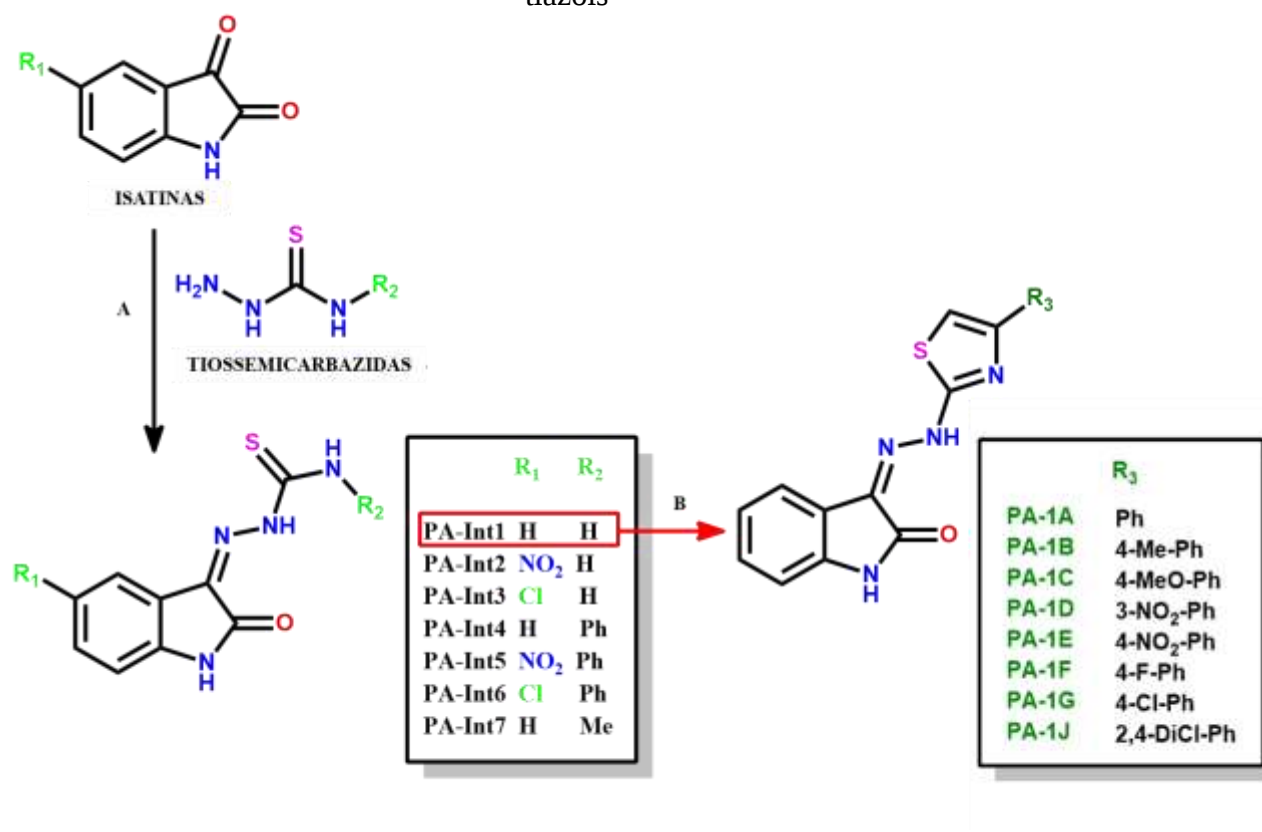
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Derivados de isatina-tiossemicarbazonas e isatina-hidrazona-tiazóis

A síntese e a caracterização química de novas moléculas de isatina-tiossemicarbazonas (PA-Int1 a PA-Int7) e de isatina-hidrazona-tiazóis (PA-1A a PA-1J) foram realizadas pelo grupo de pesquisas da Dr^a Ana Cristina Lima Leite, no Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LPQM), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Os sete compostos da série PA-Int avaliados neste estudo são estruturalmente diferentes em dois aspectos. O primeiro aspecto de diferenciação para os compostos da série são os substituintes encontrado ligado à posição R1 em C-5 da isatina (hidrogênio, nitro ou cloro). A diferença estrutural adicional diz respeito ao padrão de substituição da posição R2 em N-4 da tiossemicarbazona (hidrogênio, fenil ou metil). Em relação aos compostos da série PA-1, a posição R3 do tiazol apresenta como substituintes o anel fenil, metil, metóxi, nitro ou halogênios (flúor e cloro) (Figura 9).

Figura 9 – Síntese de novos derivados isatina-tiossemicarbazonas e isatina-hidrazona-tiazóis



Legenda: (A) Síntese dos compostos da série isatina-tiossemicarbazonas; (B) Síntese dos compostos isatina-hidrazona-tiazóis.

Para a realização dos testes, estes compostos foram diluídos em 1 % DMSO, concentração não tóxica ao parasita inferior a 1%. O preparo da solução de trabalho foi realizado sempre no momento da montagem do experimento para garantir a estabilidade dos compostos.

4.2 Cultivo celular

Formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foram mantidas em meio Schneider (Gibco, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 26 °C foram utilizadas para experimentos na fase log de crescimento (3 dias). Formas amastigotas foram obtidas a partir da infecção de macrófagos J774 (1×10^5 céls / mL) com formas promastigotas de *L. braziliensis* na proporção de 1:10 por 14 horas, mantidas em meio RPMI 1640 a 37 °C e 5% de CO₂ (ALIANÇA et al., 2017).

4.3 Atividade Citotóxica

Macrófagos J774 foram semeados em placas de 96 poços na concentração de $(1 \times 10^5$ céls / mL) contendo meio RPMI com vermelho de fenol suplementado com 10% de SFB e incubados em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas. Em seguida, diferentes concentrações dos compostos (6.25 - 200 µg/mL) foram adicionados a cada poço e as células foram cultivadas por 24 horas a 37°C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Após a incubação, o meio foi retirado e em cada poço foi adicionado 10 µL de MTT (5 mg/mL) (MOSMANN, 1983). A microplaca foi incubada por 3 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO, e a absorbância foi determinada a 540 nm por meio do espectrofotômetro Benchmark plus (Bio-Rad®, California, EUA). A concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) foi calculada por regressão linear. Em seguida, o índice de seletividade (SI), que indica a toxicidade do composto frente ao parasita sem causar danos à viabilidade das células de mamíferos, foi calculado a partir da razão entre os valores de CC₅₀ e IC₅₀. Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata.

4.4 Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica foi investigada por meio da incubação de 100 µL dos compostos diluídos em série em solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM) com 100 µL de suspensão de eritrócitos a 2% (O+ humano) por 3 horas a 37°C em uma microplaca de 96 poços (fundo em formato de U) sob agitação constante. Em seguida, a microplaca foi centrifugada a 1500g por 4 minutos. A lise celular foi então medida espectrofotometricamente a 540 nm. Eritrócitos em solução salina e tratados com 1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) foram utilizados como controle negativo e positivo de hemólise, respectivamente. Os resultados foram determinados pela porcentagem de hemólise em comparação com o controle positivo (100% de hemólise) e controle negativo (0% de hemólise) (QUEIROZ et al., 2020). Os experimentos foram realizados em quadruplicata em dois ensaios independentes.

4.5 Atividade Leishmanicida

Formas promastigotas de *L. braziliensis* cultivadas por 72 horas (fase log) foram ajustadas para uma concentração final de 2×10^6 células/mL em meio Schneider com 10% de SFB. Posteriormente, as células foram adicionadas a uma microplaca de 24 poços contendo concentrações de cada composto teste (6.25 – 100 $\mu\text{g/mL}$) e incubadas a 26°C. Após 24 horas, o número de parasitas viáveis foi estimado por contagem direta em câmara de Neubauer. Cada experimento foi realizado em quadruplicata e os grupos controle (formas promastigotas não tratadas) foram cultivados na presença de DMSO 0.1%.

Para avaliar os efeitos dos compostos frente a formas amastigotas, uma suspensão de macrófagos J774 (1×10^5 células/mL) foi semeada em uma microplaca de 24 poços contendo lamínulas no fundo de cada poço. As células foram cultivadas em RPMI suplementado com 10% de SFB a 37°C por 3 horas até a adesão completa na lamínula. Posteriormente, as formas promastigotas foram adicionadas aos poços na proporção de 1: 10 parasitos / célula hospedeira. Após 14 horas, os parasitos não internalizados foram removidos, e as células infectadas foram incubadas na ausência (grupo controle) e na presença de diferentes concentrações dos compostos (25 – 100 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 . Em seguida, as células foram fixadas com solução de Bouin, coradas com solução de Giemsa, e as lamínulas foram montadas permanentemente com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram realizados 2 ensaios independentes em triplicata. Em cada lamínula foi contado um total de 100 células usando microscópio de luz. A porcentagem de células infectadas e o número de parasitos intracelulares por célula infectada foi estimado. O índice de sobrevivência (porcentagem de células infectadas $\times$ número de amastigotas por célula) e o valor de IC_{50} (concentração inibitória média) também foram determinados (ALIANÇA et al., 2017).

4.6. Atividades antioxidantes

4.6.1 Atividade de eliminação de DPPH

A avaliação da atividade antioxidante dos compostos derivados de tiossemicarbazonas e tiazóis pelo método de sequestro de radical livre foi medida por meio da doação de hidrogênio usando o radical estável DPPH (2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazil) (KOSE et al., 2010). As mensurações foram realizadas em triplicata e as atividades de inibição foram

calculadas baseadas na porcentagem de DPPH removido. Um análogo da vitamina E (Trolox[®]) e o hidroxitolueno butilado (BHT) foram usados como padrões. O percentual de inibição (I%) foi calculado por meio da equação: $I\% = [(Ac-As) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorbância do controle e As é a absorbância da amostra. A IC₅₀ do DPPH foi calculada com base na regressão linear da porcentagem do DPPH remanescente em relação à concentração da amostra.

4.6.2 Atividade de remoção do ABTS

A atividade antioxidante dos compostos pelo ensaio ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) foi baseada na geração do radical cromóforo catiônico obtido a partir da oxidação do ABTS pelo persulfato de potássio (RE et al., 1999). As mensurações foram realizadas em triplicata e as atividades de inibição foram calculadas com base na porcentagem de ABTS removido. Um análogo da vitamina E (Trolox[®]) e hidroxitolueno butilado (BHT) foram usados como padrões. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(Ac-As) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorbância do controle, enquanto As é a absorbância da amostra. O valor de IC₅₀ da atividade de ABTS foi calculado com base na regressão linear da porcentagem de ABTS removido em relação à concentração da amostra.

4.6.3. Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total (CAT) foi determinada pelo método do fosfomolibdênio (PIETRO et al., 1999; COSTA et al., 2011). O ensaio foi baseado na redução de Molibdênio (+6) a Molibdênio (+5) pela amostra e posterior formação de um complexo esverdeado Fosfato / Molibdênio (+5). Tubos contendo as amostras com a solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM) foram incubados a 100°C por 90 min. Posteriormente, as absorbâncias de cada solução foram medidas a 695 nm em relação a um controle (solução contendo 1 mL da solução reagente e 100 µL de metanol). O ácido ascórbico foi usado como referência. A capacidade antioxidante total (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(Ac-As) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorbância do controle e As é a absorbância da amostra. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A IC₅₀ da CAT foi calculada com base na regressão do linear da capacidade antioxidante dos compostos em relação à concentração da amostra.

4.7 Estudo ultraestrutural

Formas promastigotas de *L. braziliensis* não tratadas (grupo controle) ou tratadas com IC_{50} e $2 \times IC_{50}$ por 24 horas foram colhidas por centrifugação a 1500 g, lavadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, e fixadas por 2 horas a 4°C em solução contendo 2,5% glutaraldeído / 4% paraformaldeído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2. Posteriormente, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto de potássio a 0,8% e cloreto de cálcio a 5mM em tampão cacodilato 0,1 M por 1 hora. As células foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona e incluídas em resina PolyBed 812 (PolySciences, Warrington, PA, EUA). Cortes ultrafinos contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) TecNai G2 Spirit. Para a realização de análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), as promastigotas tratadas e não tratadas foram fixadas e pós-fixadas conforme descrito acima, e aderidas em lamínulas revestidas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA). As amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol, secas pelo método do ponto crítico (HCP-2 critical point dryer, Hitachi). Posteriormente, foram revestidas com 20nm ouro-paládio (Fine Coat Íon Sputter JFC-1100, JEOL) e observadas ao MEV JEOL T-200 (DA SILVA et al., 2019).

4.8 Efeitos sobre o potencial de membrana mitocondrial

Para a análise dos possíveis efeitos dos compostos sobre o potencial de membrana mitocondrial foi utilizada a sonda fluorescente rodamina 123 (SigmaAldrich, Co., St. Louis, MO, USA). Formas promastigotas de *L. braziliensis* (1×10^6 células/mL) foram tratadas com IC_{50} e $2 \times IC_{50}$ por 24 horas. Após o tratamento, os parasitos foram incubados com 10 µg/mL de rodamina 123 por 15 minutos a temperatura ambiente (ALIANÇA et al., 2014). As células foram analisadas no equipamento e software BD Accuri C6 (BD Biosciences Califórnia, EUA), e posteriormente, análises foram realizadas no software WinMDI2.8 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Diego, EUA). Foi obtido um total de 20.000 eventos em todas as análises realizadas.

4.9 Análises estatísticas

Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ foram estimados por análise de regressão linear utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences - SPSS v 18.0 para Windows (IMB®, Armok, EUA). Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey realizado no pacote de software Prism v 5.03 para Windows (GraphPad®, San Diego, EUA). Todos os testes estatísticos consideraram $p \leq 0,05$ como valor de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Artigo 1: NOVOS DERIVADOS DE ISATINA-TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE, ATIVIDADE LEISHMANICIDA E ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

Karla Raíza Cardoso Ribeiro^{1,2}; Taciana Mirely Maciel Higino³; Paulo André Teixeira de Moraes Gomes⁴; Ana Cristina Lima Leite⁴; Paulo Euzébio Cabral Filho⁵; Ana Paula Sampaio Feitosa^{1,6}; Luiz Carlos Alves^{1,6}; Fábio André Brayner^{1,2,6}

1 Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife, PE 50670-420, Brasil.

2 Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife, PE 52171-011, Brasil.

3 Departamento de Investigação Científica, Fundação Altino Ventura (FAV), Rua Soledade, 170 – Boa Vista, Recife, PE, 50070-040, Brasil.

4 Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife, PE 50740-520, Brasil.

5. Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife, PE 50740-520, Brasil.

6 Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife, PE 52171-011, Brasil.

Autor correspondente: Karla Raíza Cardoso Ribeiro. E-mail: rcrkarla@yahoo.com.br

Conflito de interesse: Os autores declaram que não possuem interesses financeiros ou pessoais que possam ter influenciado o trabalho relatado neste artigo.

RESUMO

A *Leishmania braziliensis* é responsável pela maioria dos casos de leishmaniose tegumentar na América do Sul. O desenvolvimento de novos agentes terapêuticos continua sendo uma prioridade, uma vez que os medicamentos disponíveis têm eficácia limitada e causam efeitos adversos significativos. Além disso, o surgimento de cepas resistentes e a falta de vacina dificultam o controle da doença. O desenvolvimento da química medicinal tem permitido o aprimoramento da estrutura de novas moléculas de tiossemicarbazonas para que atuem com maior seletividade contra *L. braziliensis*, sem causar danos ao hospedeiro. Neste trabalho, sintetizamos e investigamos o potencial citotóxico e leishmanicida de novos derivados de isantina-tiossemicarbazonas contra *L. braziliensis*. Todos os compostos da série Pa-Int foram capazes de inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. braziliensis*, com valor de IC_{50} variando de 7,24 a 59,5 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de CC_{50} em macrófagos J774 variaram de 70,1 a 130,7 $\mu\text{g/mL}$, e a atividade hemolítica foi superior a 100 $\mu\text{g/mL}$. Os compostos PA-Int5 e PA-Int6 apresentaram melhores índices de seletividade (6,8 e 11, respectivamente). Assim, exploramos a atividade destes compostos frente às formas amastigotas e avaliamos as alterações morfológicas e ultraestruturais nas formas promastigotas. Esses compostos foram capazes de causar efeitos antiproliferativos em amastigotas intracelulares, com valores de IC_{50} de $62,4 \pm 7,6$ e $64,9 \pm 6,6 \mu\text{g/mL}$ para PA-Int5 e PA-Int6, respectivamente. Ambos promoveram alterações morfológicas e ultraestruturais nos parasitas, como encolhimento do corpo celular, intensa vacuolização citoplasmática e perfis de membrana semelhantes ao retículo endoplasmático ao redor das organelas, achados sugestivos de morte celular por autofagia. Assim, os novos compostos isatina-tiossemicarbazonas são promissores, pois apresentam baixa citotoxicidade, baixa atividade hemolítica e atividade leishmanicida.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*; Leishmaniose cutânea; Tiossemicarbazonas; Derivados de isantina; Ultraestrutura.

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente mais de 1 milhão de novos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) são notificados anualmente, e cerca de 95% destes casos ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central [1]. A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é responsável pela maioria dos casos de LTA na América do Sul, ocorrendo às vezes nas formas de leishmaniose cutânea (LC), com lesões benignas autolimitantes, ou por meio do acometimento das mucosas, sendo classificada como leishmaniose mucocutânea (LM). Assim como, esta espécie tem sido associada ao desenvolvimento de leishmaniose disseminada (LD) [2].

As lesões da LTA não são fatais e podem curar espontaneamente ao longo de meses ou anos. No entanto, essas lesões também podem ser graves e de difícil tratamento, o que resulta na destruição parcial ou total das mucosas do nariz, boca e garganta, promovendo cicatrizes desfigurantes aos pacientes [3]. Consequentemente, as deficiências relacionadas à LTA impõem uma alta carga social, econômica e psicológica aos indivíduos afetados [4].

O tratamento da LTA deve atingir dois objetivos: eliminar o parasita e acelerar o processo de cicatrização, prevenindo complicações, desenvolvimento de disfunções, disseminação e recorrência da lesão [5]. Além disso, pacientes infectados com *L. braziliensis* podem desenvolver lesões crônicas, que muitas vezes não respondem às terapias convencionais devido a mecanismos de variações na expressão de genes correlacionados com a carga parasitária nas lesões cutâneas [6].

Os quimioterápicos, como os antimoniais pentavalentes, são indicados como tratamento de primeira linha para a LTA e, nos casos de intolerância ou resistência a estes, a anfotericina B, pentamidina, fluconazol e miltefosina podem ser utilizados como terapia de segunda escolha [7]. Embora sejam amplamente disponíveis, esses medicamentos são caros, têm eficácia limitada, requerem monitoramento contínuo e administração em longo prazo. Além disso, causam efeitos adversos significativos, e até mesmo morte por complicações renais, hepáticas e cardíacas [8].

Devido ao surgimento e disseminação de cepas resistentes a esses medicamentos, ausência de vacina e falhas no controle de vetores, a LTA continua

sendo um problema de saúde pública em países endêmicos [9]. Além disso, com o aumento da migração, há risco significativo de disseminação da LTA para outras áreas, favorecendo o estabelecimento da doença em locais não endêmicos, levando a mutações e ao surgimento de subtipos mais virulentos do patógeno [10,11].

Notadamente, é urgente a busca por novos quimioterápicos com atividade antileishmania que sejam seguros, eficazes, acessíveis e, quando possível, com vias de administração não invasivas, ciclos de curta duração e bons perfis de segurança [12]. Tem havido um esforço crescente para descobrir novos compostos leishmanicidas, pois muitas entidades químicas descobertas na fase *in vitro* falham em ensaios clínicos e *in vivo* [13–15].

Novas entidades químicas das tiossemicarbazonas representam moléculas de grande interesse na química medicinal devido à sua viabilidade sintética e importância biológica, pois estão presentes em um grande número de compostos biologicamente ativos [16]. As estruturas derivadas das tiossemicarbazonas permitem a geração de diferentes tipos de derivados, através de modificações estruturais, capazes de inibir múltiplos alvos [17].

Vários estudos já comprovaram que derivados de tiossemicarbazonas têm valor potencial como substâncias biologicamente ativas apresentando atividades antimicrobianas [18], antiproliferativas [19], antitumorais [20], antiparasitárias [21], antivirais [22] e larvicidas [23].

Esses derivados têm demonstrado eficácia no tratamento de doenças fúngicas e parasitárias via inibição da biossíntese de ergosterol [24]. Esta via metabólica é essencial para a sobrevivência de tripanossomatídeos e está ausente nas células hospedeiras, representando um alvo atraente [25]. Estudos têm demonstrado que as cisteína proteases de *Leishmania* spp. também são alvo de derivados de tiossemicarbazonas, as quais são essenciais para virulência, viabilidade, manutenção da morfologia do protozoário e nas estratégias de evasão imune [26,27].

Derivados de tiossemicarbazonas têm sido classificados como excelentes protótipos para o projeto e desenvolvimento de novos agentes contra tripanossomatídeos. Dentre os grupos químicos explorados, destacam-se isatinas, tiossemicarbazonas e tiazolil-hidrazonas devido a uma ampla gama de atividades biológicas, especialmente antiparasitárias. [28–31]. Nossos estudos anteriores relataram

atividade leishmanicida de derivados de indol-tiossemicarbazonas contra *L. infantum* e *L. amazonensis* e baixa citotoxicidade em células de mamíferos. Neste trabalho, propusemos a síntese e caracterização estrutural, avaliação dos efeitos biológicos e ultraestruturais de novas isatina-tiossemicarbazonas produzidas dentro de uma visão mais específica contra *L. braziliensis*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Síntese química

2.1.1 Equipamentos e reagentes

Os reagentes usados foram como adquiridos de fontes comerciais (Acros Organics, Vetec, Sigma-Aldrich ou Fluka). O progresso da reação foi seguido por análise de cromatografia em camada fina (TLC) (Merck, silica gel 60 F254, folha de alumínio). Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho de ponto de fusão capilar eletrotérmico Fisatom 430D e não foram corrigidos. Os espectros de RMN foram medidos em um Varian UnityPlus 400 MHz (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C) ou em um instrumento Bruker AMX-300 MHz (300 MHz para ^1H e 75.5 MHz for ^{13}C). DMSO- d_6 e D $_2$ O foram adquiridos da CIL ou Sigma-Aldrich e foi usado tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. O número de sinais nos espectros de ^1H RMN foi designado como: s/simpleto; /d duplete, t/triplete, dd/duplo duplete, q/quadruplete, m/múltiplete e as constantes de acoplamento, em hertz, como J. A espectroscopia de infravermelho foi realizada em um instrumento Bruker (modelo IFS 66) usando pellets de KBr. Os experimentos de espectrometria de massa foram realizados em um LC-IT-TOF (Shimadzu). Salvo especificação, a ESI foi conduzida no modo positivo de ionização. As condições típicas foram as seguintes: voltagem capilar de 3 kV, voltagem do cone de 30 V e varredura de pico entre 50 e 1000 m/z.

2.1.2 Preparação geral das tiossemicarbazonas PA-Int1 a PA-Int7:

Em um balão de fundo redondo, a isatina (indolina-2,3-diona; 5-nitroindolina-2,3-diona ou 5-cloroindolina-2,3-diona), a tiosemicabazida (hidrazinacarbotoamida; N-metilhidrazinacarbotoamida) ou N-fenilhidrazinacarbotoamida) (na proporção 1:1), etanol (20mL) e HCl (7 gotas, cat.) foram adicionados. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e refluxo por 3 horas. As reações foram monitoradas por placa cromatográfica de camada fina. O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, obtendo-se o produto puro.

2.1.2.1 PA-Int1: (Z)-2-(2-oxoindolin-3-ylidene) hydrazinacarbothioamide

Rendimento: 62%. Ponto de fusão: 254°C. Fator de Retenção (Rf): 0,53 (Sistema - 6: 4 Tolueno/AcOEt). Infravermelho (KBr): 3235 (NH), 1682 e 3145 (HN-C = O), 1498 e 1137 (C = S) cm^{-1} . RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ 6.92 (d, 1H, J 7.6 Hz, ArH), 7.08 (t, 1H, J 7.6 Hz, ArH), 7.35 (t, 1H, J 7.6 Hz, ArH), 7.65 (d, 1H, J 7.6 Hz, ArH), 8.68 (s, 1H, NH₂), 9.04 (s, 1H, NH₂), 11.2 (s, 1H, NH), 12.47 (s, 1H, NH). RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ 111.0 (CH, Ar), 119.9 (CH, Ar), 120.9 (C-Ar), 122.4 (CH, Ar), 131.2 (CH, Ar), 132.0 (C=N), 142.3 (C-NH, Ar), 162.6 (C=O), 178.7 (C=S). Fórmula molecular: C₉H₈N₄OS. HRMS: 220,04 [M+H]⁺.

2.1.2.2 PA-Int2: (Z)-2-(5-nitro-2-oxoindolin-3-ilideno) hidrazinacarbotoamida

Rendimento: 60%. Ponto de fusão: 280°C. Fator de Retenção (Rf): 0,50 (Sistema - 6:4 Tolueno/AcOEt). Infravermelho (KBr): 3276 (NH), 1697 e 3195 (HN-C = O), 1481 e 1139 (C = S) cm^{-1} . RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.1 (d, 1H, J 8.4 Hz, ArH), 8.25 (d, 1H, J 8.4 Hz, ArH), 8.59 (s, 1H, ArH), 9.02 (s, 1H, NH₂), 9.18 (s, 1H, NH₂), 11.78 (s, 1H, NH), 12.21 (s, 1H, NH). RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ 111.1 (CH, Ar), 116.4 (CH, Ar), 120.9 (C-Ar), 126.9 (CH, Ar), 129.9 (C = N), 142.7 (C-NO₂, Ar), 147.4 (C-NH, Ar), 162.9 (C = O), 178.8 (C = S). Fórmula molecular: C₉H₇N₅O₃S. HRMS: 265.03 [M + H]⁺.

2.1.2.3 PA-Int3: (Z)-2-(5-cloro-2-oxoindolin-3-ilideno) hidrazinacarbotoamida

Rendimento: 90%. Ponto de fusão: 270°C. Fator de Retenção (Rf): 0.66 (Sistema - 6: 4 Tolueno / AcOEt). Infravermelho (KBr): 3219 (NH), 1697 e 3164 (HN-C = O), 1496 and 1143 (C = S) cm^{-1} . RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.05 (d, 1H, J 8.4 Hz, ArH), 7.38 (d, 1H, J 8.4 Hz, ArH), 7.72 (s, 1H, ArH), 8.2 (s, 1H, NH₂), 8.57 (s, 1H, NH₂), 10.2 (s, 1H, NH), 12.62 (s, 1H, NH). RMN de ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 113.3 (2CH, Ar), 121.5 (C-Ar), 123.1 (CH, Ar), 128.4 (C-Cl, Ar), 131.4 (C=N), 141.8 (C-NH, Ar), 163.3 (C=O), 181.2 (C=S). Fórmula molecular: $\text{C}_9\text{H}_7\text{ClN}_4\text{OS}$. HRMS: 254.00 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

2.1.2.4 PA-Int4: (Z) -2-(2-oxoindolin-3-ilideno)-N-fenil-hidrazinacarbotioamida

Rendimento: 65%. Ponto de fusão: 246°C. Fator de Retenção (Rf): 0.77 (Sistema - 6:4 Tolueno/AcOEt). Infravermelho (KBr): 3298 (NH), 1694 (HN-C=O), 1496 e 1148 (C=S) cm^{-1} . RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.04 (d, 1H, J 8.1 Hz, ArH), 7.11 (t, 1H, J 7.2 Hz, ArH), 7.25 (t, 2H, J 7.2 Hz, ArH), 7.4 (m, 3H, ArH), 7.75 (m, 3H, ArH), 10.14 (s, 1H, NH), 10.37 (s, 1H, NH), 12.95 (s, 1H, NH). RMN de ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 111.9 (CH, Ar), 121.2 (C-Ar), 121.9 (CH, Ar), 123.5 (CH, Ar), 125.3 (CH, Ar), 125.4 (CH, Ar), 126.7 (CH, Ar), 129.2 (2CH, Ar), 132.3 (CH, Ar), 132.5 (Ph-C-NH), 139.5 (C=N), 143.4 (C-NH, Ar), 163.6 (C=O), 177.4 (C=S). Fórmula molecular: $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS}$. HRMS: 296.07 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

2.1.2.5 PA-Int5: (Z) -2-(5-nitro-2-oxoindolin-3-ilideno) -N-fenil-hidrazinacarbotioamida

Rendimento: 75%. Ponto de fusão: 249°C. Fator de Retenção (Rf): 0.60 Sistema - 6:4 Tolueno/AcOEt). Infravermelho (KBr): 3303 (NH), 1695 e 3175 (HN-C=O), 1484 e 1148 (C=S) cm^{-1} . RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.1 (d, 1H, J 9 Hz, ArH), 7.3 (t, 1H, J 6 Hz, ArH), 7.45 (t, 2H, J 6 Hz, ArH), 7.6 (d, 2H, J 6 Hz, ArH), 8.25 (d, 1H, J 9 Hz, ArH), 8.66 (s, 1H, ArH), 11.06 (s, 1H, NH), 11.83 (s, 1H, NH), 12.53 (s, 1H, NH). RMN de ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 111.2 (CH, Ar), 116.7 (CH, Ar), 120.9 (C-Ar), 126.0 (CH, Ar), 126.4 (CH, Ar), 127.0 (2CH, Ar), 128.5 (2CH, Ar), 130.2 (Ph-

C-NH), 138.3 (C=N), 142.7 (C-NO₂, Ar), 147.4 (C-NH, Ar), 162.9 (C=O), 176.4 (C=S).
 Fórmula molecular: C₁₅H₁₁N₅O₃S. HRMS: 341.06 [M + H]⁺.

2.1.2.6 PA-Int6: (Z) -2-(5-cloro-2-oxoindolin-3-ilideno) -N-fenil-
 hidrazinacarbotioamida

Rendimento: 79%. Ponto de fusão: 255°C. Fator de Retenção (Rf): 0.68 Sistema - 6:4 Tolueno/AcOEt). Infravermelho (KBr): 3317 (NH), 1691 e 3172 (HN-C=O), 1487 e 1158 (C=S) cm⁻¹. RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.29 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.37 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 7.39 (d, 1H, *J* 2.1 Hz, ArH), 7.44 (t, 2H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.61 (d, 2H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.88 (s, 1H, ArH), 10.88 (s, 1H, NH), 11.33 (s, 1H, NH), 12.61 (s, 1H, NH). RMN de ¹³C (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 112.5 (CH, Ar), 120.9 (CH, Ar), 121.8 (C-Ar), 125.7 (2CH, Ar), 126.6 (CH, Ar), 128.4 (2CH, Ar), 126.2 (C-Cl, Ar), 130.6 (CH, Ar), 131.0 (C = N), 138.27 (Ph-C-NH), 141.1 (C-NH, Ar), 162.4 (C=O), 176.3 (C=S). Fórmula molecular: C₁₅H₁₁ClN₄OS. HRMS: 330.03 [M + H]⁺.

2.1.2.7 PA-Int7: (Z) -N-metil-2-(2-oxoindolin-3-ilideno) hidrazinacarbotioamida

Rendimento: 73%. Ponto de fusão: 252°C. Fator de Retenção (Rf): 0.64 (Sistema - 6:4 Tolueno/AcOEt). Infravermelho (KBr): 3230 (NH), 1708 e 3169 (HN-C=O), 1546 e 1149 (C=S) cm⁻¹. RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 3.08 (d, 3H, *J* 4.8 Hz, CH₃), 6.91 (t, 1H, *J* 7.2 Hz, ArH), 7.09 (t, 1H, *J* 7.2 Hz, ArH), 7.33 (d, 1H, *J* 7.2 Hz, ArH), 7.63 (d, 1H, *J* 7.2 Hz, ArH), 9.23 (q, 1H, *J* 4.8 Hz, NH), 11.19 (s, 1H, NH), 12.59 (s, 1H, NH). RMN de ¹³C (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 31.3 (CH₃), 111.0 (CH, Ar), 120.6 (CH, Ar), 119.9 (CH, Ar), 121.7 (C-Ar), 122.3 (CH, Ar), 132.4 (C=N), 142.2 (C-NH, Ar), 162.6 (C=O), 177.6 (C=S). Fórmula molecular: C₁₀H₁₀N₄OS. HRMS: 234.06 [M + H]⁺.

2.2 Ensaios Biológicos

2.2.1 Cultura de Células

Formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foram mantidas em meio Schneider (Gibco, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 26 °C foram utilizadas para experimentos na fase log de crescimento. Macrófagos J774.A1 foram mantidos em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, USA) suplementado com 10% SFB (Gibco, USA) e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Formas amastigotas foram obtidas a partir da infecção de macrófagos J774 (1×10^5 céls/mL) com formas promastigotas de *L. braziliensis* na proporção de 1:10 por 14 horas.

2.2.2 Atividade Citotóxica

Macrófagos J774.A1 (1×10^5 céls/mL) foram semeados em placas de 96 poços contendo meio RPMI com vermelho de fenol suplementado com 10% de SFB e incubados em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas. Em seguida, diferentes concentrações dos compostos (6.25 - 100 µg/mL) foram adicionados a cada poço e as amostras foram cultivadas por 24 horas a 37°C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Após a incubação, o meio foi retirado e em cada poço foi adicionado 10 µL de MTT (5 mg/mL) [32]. A microplaca foi incubada por 3 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO, e a absorbância foi determinada a 540 nm por meio do espectrofotômetro Benchmark plus (Bio-Rad®, California, EUA). A concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) foi calculada por regressão linear. Em seguida, o índice seletivo (IS) foi calculado a partir da razão entre os valores de CC₅₀ e IC₅₀. Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata.

2.2.3 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi investigada por meio da incubação de 100 µL dos compostos diluídos em série em solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM) com 100

μL de suspensão de eritrócitos a 2% (O+ humano) por 3 horas a 37°C em uma microplaca de 96 poços (fundo em formato de U) sob agitação constante. Em seguida, a microplaca foi centrifugada a 1500g por 4 minutos. A lise celular foi então medida espectrofotometricamente a 540 nm. Eritrócitos em solução salina e tratados com 1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) foram utilizados como controle negativo e positivo de hemólise, respectivamente. Os resultados foram determinados pela porcentagem de hemólise em comparação com o controle positivo (100% de hemólise) e controle negativo (0% de hemólise). Os experimentos foram realizados em quadruplicata em dois ensaios independentes [33].

2.2.4 Atividade *Leishmanicida*

Formas promastigotas de *L. braziliensis* (2×10^6 céls/mL) foram incubadas na ausência ou na presença de diferentes concentrações de cada composto teste (6.25 - 100 μg/mL) por 24 horas a 26°C. O número de parasitas viáveis foi estimado por contagem direta em câmara de Neubauer. Cada experimento foi realizado em quadruplicata. Promastigotas não tratadas e tratadas com Anfotericina B foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Para avaliar os efeitos dos compostos frente a formas amastigotas, uma suspensão de macrófagos J774 (1×10^5 células/mL) foi semeada em uma microplaca de 24 poços contendo lamínulas no fundo de cada poço. As células foram cultivadas em RPMI suplementado com 10% de SFB a 37°C por 3 horas até a adesão completa na lamínula. Posteriormente, as formas promastigotas foram adicionadas aos poços na proporção de 1: 10 parasitos / célula hospedeira. Após 14 horas, os parasitas não internalizados foram removidos, e as células infectadas foram incubadas na ausência (grupo controle) e na presença de diferentes concentrações dos compostos (25 – 100 μg/mL) por 24 horas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, as células foram fixadas com solução de Bouin, coradas com solução de Giemsa, e as lamínulas foram montadas permanentemente com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram realizados 2 ensaios independentes em triplicata. Em cada lamínula foi contado um total de 100 células usando microscópio de luz. A porcentagem de células infectadas e o número de parasitas intracelulares por célula infectada foi estimado. O índice de sobrevivência (porcentagem de células infectadas ×

número de amastigotas por célula) e o valor de IC_{50} (concentração inibitória média) também foram determinados [34].

2.2.5 Análise ultraestrutural

Formas promastigotas de *L. braziliensis* não tratadas (grupo controle) ou tratadas com IC_{50} e $2 \times IC_{50}$ por 24 horas foram colhidas por centrifugação a 1500 g, lavadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, e fixadas por 2 horas a 4°C em solução contendo 2,5% glutaraldeído / 4% paraformaldeído em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Posteriormente, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, ferricianeto de potássio a 0,8% e cloreto de cálcio a 5mM em tampão cacodilato 0,1M por 1 hora. As células foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona e incluídas em resina PolyBed 812 (PolySciences, Warrington, PA, EUA). Cortes ultrafinos contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) Zeiss EM109. Para a realização de análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), as promastigotas tratadas e não tratadas foram fixadas e pós-fixadas conforme descrito acima, e aderidas em lamínulas revestidas com poli-L-lisina (Sigma- Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA). As amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol, secas pelo método do ponto crítico (HCP-2 critical point dryer, Hitachi). Posteriormente, foram revestidas com 20nm ouro-paládio (Fine Coat Íon Sputter JFC-1100, JEOL) e observadas ao MEV JEOL T-200 [35].

2.2.6 Citometria de fluxo

Para a análise dos possíveis efeitos dos compostos sobre o potencial da membrana mitocondrial, formas promastigotas de *L. braziliensis* (1×10^6 céls/mL) foram tratadas com IC_{50} e $2 \times IC_{50}$ por 24 horas. Após o tratamento, os parasitos foram incubados com 10 μ g/mL de rodamina 123 (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) por 15 minutos em temperatura ambiente [36]. As células foram analisadas no equipamento e software BD Accuri C6 (BD Biosciences Califórnia, EUA), e posteriormente, análises foram realizadas no software WinMDI2.8 (Joseph Trotter,

Scripps Research Institute, San Diego, EUA). Foi obtido um total de 20.000 eventos em todas as análises realizadas.

2.2.7 Análises estatísticas

Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ foram estimados por análise de regressão linear utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences - SPSS v 18.0 for Windows (IMB[®], Armok, USA). A diferença significativa entre os grupos foi avaliada por análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey realizado no pacote de software Prism v 5.03 para Windows (GraphPad[®], San Diego, USA). Todos os testes estatísticos consideraram $p \leq 0,05$ como valor de significância.

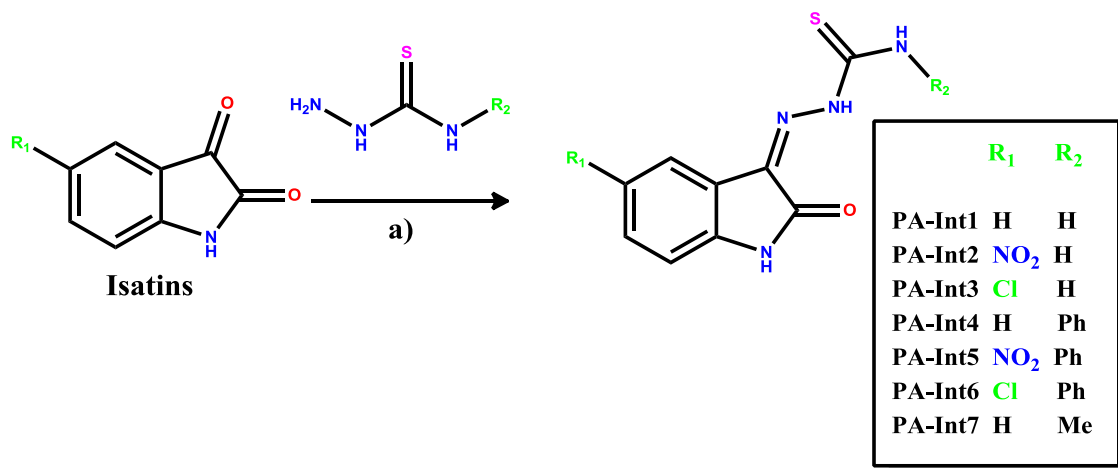
3 RESULTADOS

3.1 Síntese química

Para obter os compostos PA-Int-1-7, uma metodologia semelhante à de Karah foi utilizada, que trabalhou com derivados de isatina em 2002. Karah reagiu derivados de isatina com tiossemicarbazida e obteve tiossemicarbazonas com altos rendimentos. A síntese é realizada em solução etanólica, sob refluxo, na presença de um catalisador ácido [37].

Com base nesta metodologia, as tiossemicarbazonas PA-Int1 a PA-Int7 foram obtidas por meio da reação de diferentes isatinas (isatina, 5-nitroisatina e 5-cloroisatina), obtidas comercialmente, com diferentes tiossemicarbazidas (tiossemicarbazida, fenil-tiossemicarbazida e metil-tiossemicarbazida), também obtidas comercialmente. As reações duraram cerca de três horas e os rendimentos foram de 60 a 85% (Esquema 1).

Esquema 1 - Esquema de síntese.



Reagentes e condições: Etanol, HCl, refluxo, 3h

Todos os compostos sintetizados foram caracterizados por infravermelho (IR), ressonância magnética nuclear (¹H, ¹³C RMN) e espectroscopia de massa (ESI-TOF). Para representar a caracterização dos compostos de tiossemicarbazona PA-Int1 a PA-Int7, o composto PA-Int1 foi escolhido como representante estrutural. Através de análise espectroscópica na região do infravermelho, foi possível verificar a presença das principais bandas de absorção. A banda que aparece em 3235 cm⁻¹ sugere a deformação axial da ligação N-H. Em 1682 e 3145 cm⁻¹, podem ser observadas bandas sugestivas da presença do grupo HN-C = O. Nas frequências de 1498 e 1137 cm⁻¹, o trecho C = S pode ser identificado.

No RMN, ¹H do composto PA-Int1, 6,92-7,65 ppm são picos referentes aos hidrogênios do anel aromático. Em 8,68 e 9,04 ppm há dois singletos dos hidrogênios da amina primária (NH₂). Em 11,2 ppm e 12,47 ppm estão os picos para hidrogênios das duas aminas secundárias (NH).

Em RMN, ¹³C os picos que aparecem em 111,0-131,2 ppm, correspondem aos carbonos aromáticos da molécula. O pico a 132,0 ppm corresponde a C=N. O pico em 142,3 ppm corresponde ao carbono aromático que está ligado ao NH. 162,6 ppm é o pico correspondente ao carbono carbonílico. A 178,7 ppm está o pico característico de C=S.

3.2 Ensaios biológicos

Os sete compostos da série isatina-tiossemicarbazona (Int) avaliados neste estudo são estruturalmente diferentes nos substituintes encontrados ligados à posição R1 da tiossemicarbazona (hidrogênio, nitro ou cloro) e à posição R2 (hidrogênio, fenil ou metil). Todos os compostos derivados dessas modificações moleculares foram avaliados contra macrófagos J774, eritrócitos e formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*.

3.2.1 Atividade Citotóxica

A análise do potencial citotóxico dos derivados de isatinas tiossemicarbazonas em macrófagos J774 permitiu a observação da variação citotóxica entre os compostos testados (70.1 a 130.7 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 1). O composto PA-Int2, substituído na posição R1 por um grupo nitro e na posição R2 por hidrogênio, foi o menos citotóxico da série, com valor de $130,7 \pm 10,3 \mu\text{g/mL}$. No entanto, a substituição na posição R2 da tiossemicarbazona PA-Int5 por um grupo fenil reduziu o valor da CC_{50} para $70,8 \pm 1,8 \mu\text{g/mL}$. A substituição com cloro na posição R1 também apresentou toxicidade aumentada, como observado nos compostos PA-Int3 ($79,2 \pm 8,2 \mu\text{g/mL}$) e PA-Int6 ($80,2 \pm 1,8 \mu\text{g/mL}$). Todos os derivados de isatina-tiossemicarbazona também apresentaram baixa atividade hemolítica com valores de CC_{50} superiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1).

3.2.2 Atividade Leishmanicida

A atividade leishmanicida verificou a eficácia dos derivados de isantina-tiossemicarbazona na diminuição da viabilidade das formas promastigotas de *L. braziliensis*. A substituição do grupo cloro ou nitro na posição R1 da tiossemicarbazona, associada ao grupo fenil na posição R2, proporcionou melhores valores de IC_{50} para os compostos PA-Int5 (7,24 $\mu\text{g/mL}$) e PA-Int6 (10,3 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. No entanto, a substituição em R1 por cloro e não substituinte em R2 (PA-Int3) aumentou a IC_{50} para $38,4 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$. A não substituição de hidrogênio na posição R1 e a substituição na posição R2, sendo hidrogênio (PA-Int1), fenil (PA-Int4) ou metil (PA-Int7), também

diminuiu a atividade leishmanicida com valores de IC_{50} de $46,2 \pm 7,0$, $47,4 \pm 2,6$ e $41,4 \pm 0,1$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A substituição com o grupo nitro na posição R1 e com hidrogênio na posição R2 (PA-Int2) apresentou a menor atividade leishmanicida, cujos valores de IC_{50} foram de $59,5$ $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1).

O índice de seletividade (IS) foi calculado para identificar, dentre os derivados, aqueles com maior seletividade contra *L. braziliensis* do que para células de mamíferos. Os compostos PA-Int5 e PA-Int6 apresentaram melhores resultados, com valores de IS de 6,8 e 11, respectivamente (Tabela 1). Além disso, tanto o PA-Int5 quanto o PA-Int6 exibiram valores de IC_{50} mais baixos. Portanto, eles foram escolhidos para avaliar a atividade contra amastigotas intracelulares e investigar sua ação na ultraestrutura de *L. braziliensis*.

Tabela 1- Atividades leishmanicida e citotóxica *in vitro* de derivados de isatina-tiossemicarbazonas.

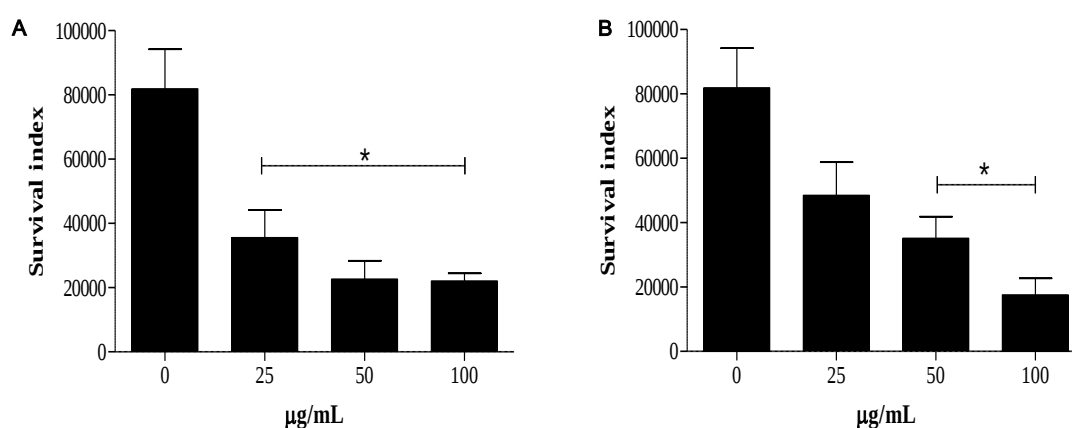
Compostos	J774.A1	Eritrócitos	Promastigotas	Amastigotas	Promastigotas	Amastigotas
	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		IS	
PA-Int1	$87,9 \pm 7,1$	>100	$46,2 \pm 7,0$	-	1,9	-
PA-Int2	$130,7 \pm 10,3$	>100	$59,5 \pm 1,3$	-	2,2	-
PA-Int3	$79,2 \pm 8,2$	>100	$38,4 \pm 0,7$	-	2,1	-
PA-Int4	$81,9 \pm 4,7$	>100	$47,4 \pm 2,6$	-	1,7	-
PA-Int5	$70,8 \pm 1,8$	>100	$10,3 \pm 0,2$	$62,4 \pm 7,6$	6,9	0,9
PA-Int6	$80,2 \pm 1,8$	>100	$7,2 \pm 2,2$	$64,9 \pm 6,6$	11,1	0,8
PA-Int7	$70,1 \pm 5,7$	>100	$41,4 \pm 0,1$	-	1,7	-
AmB	$94,8 \pm 7,6$	-	$0,12 \pm 0,04$	-	79	-

IC_{50} : Concentração que inibe em 50% o crescimento de promastigotas ou amastigotas de *L. braziliensis*; CC_{50} : Concentração capaz de causar efeito citotóxico em 50% dos macrófagos J774A1 ou eritrócitos; IS (Índice de Seletividade): CC_{50} de macrófagos J774A1 / IC_{50} *L. braziliensis*; AmB: Anfotericina B.

Nossos dados demonstraram que os compostos PA-Int5 e PA-Int6 diminuíram o número de parasitas por macrófago J774.A1 (Figura 1). O composto PA-Int5 causou uma redução significativa no índice de sobrevivência de formas amastigotas na concentração mais baixa testada (25 $\mu\text{g/mL}$; $p < 0,05$; Figura 1A). Por outro lado, o composto PA-Int6 causou uma redução significativa em 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,005$; Figura

1B). Essas formas se mostraram mais resistentes ao tratamento quando comparadas às formas promastigotas. A concentração estimada para reduzir o número de formas amastigotas intracelulares em 50% (IC_{50}) em relação ao controle não tratado foi de $62,4 \pm 7,6 \mu\text{g/mL}$ para PA-Int5 e $64,9 \pm 6,6 \mu\text{g/mL}$ para PA-Int6 (Tabela 1).

Figura 1 - Efeito dos derivados de isatina-tiossemicarbazonas PA-Int5 (A) e PA-Int6 (B) em formas amastigotas intracelulares.

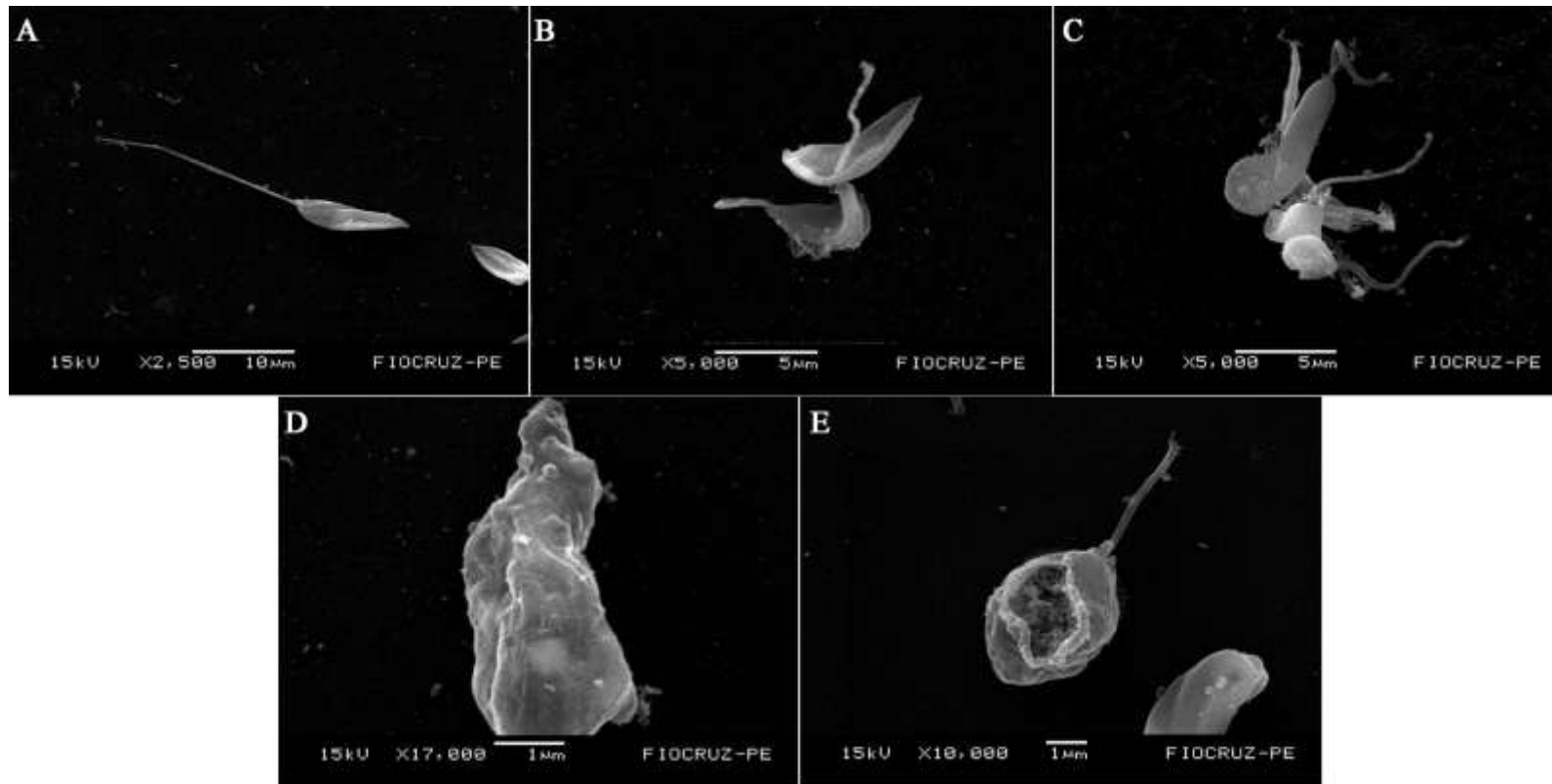


*valor de $p < 0,05$,

3.2.3 Análise ultraestrutural de promastigotas de *L. braziliensis*

Após identificar PA-Int5, com um grupo nitro em R1, e PA-Int6, com um grupo cloro, ambos com fenil em R2, como os compostos mais promissores, avaliamos as alterações morfológicas que esses compostos causaram nas formas promastigotas de *L. braziliensis*. A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou células controle apresentando morfologia fusiforme típica do parasita, com aspecto liso, além de um longo flagelo livre (Figura 2 A). As promastigotas submetidas ao tratamento com o composto PA-Int5 a $10,3 \mu\text{g/mL}$ ($1 \times IC_{50}$) e $20,6 \mu\text{g/mL}$ ($2 \times IC_{50}$), respectivamente, apresentaram encolhimento e deformação do corpo celular e flagelo (Figura 2 B-C). O composto PA-Int6 também alterou a morfologia das promastigotas, em concentrações de $7,2 \mu\text{g/mL}$ ($1 \times IC_{50}$) e $14,4 \mu\text{g/mL}$ ($2 \times IC_{50}$), respectivamente, causando arredondamento do corpo e enrugamento substancial da superfície celular (Figura 2 D-E).

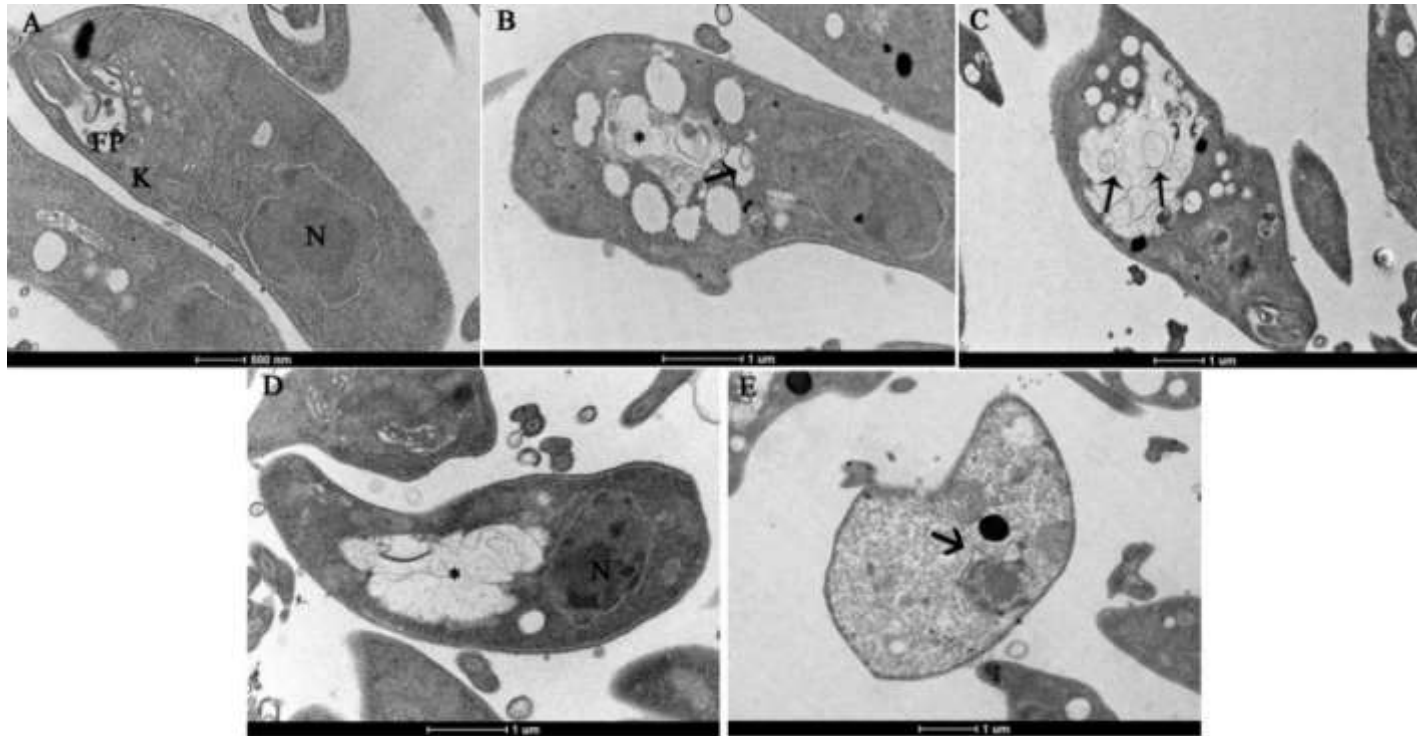
Figura 2 - Eletromicrografia de promastigotas de *L.braziliensis* não tratadas e tratadas com os compostos PA-Int5 e PA-Int6 observadas pela microscopia eletrônica de transmissão.



(A) Controle de promastigotas apresentando corpo celular alongado e membrana integral. (B) Promastigotas tratados com 10,3 e (C) 20,6 µg/mL de composto PA-Int5 mostrando alterações na topologia celular. (D) Promastigotas tratadas com 7,2 e (E) 14,4 µg/mL do composto PA-Int6 apresentando alterações na morfologia, formas arredondadas e enrugamento da membrana.

Também avaliamos o alvo ultraestrutural de PA-Int5 e PA-Int6 por meio de análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET). As células controle apresentaram morfologia e organelas bem preservadas, como núcleo, cinetoplasto e bolsa flagelar (Figura 3A). As células tratadas com 10,3 $\mu\text{g/mL}$ e 20,6 $\mu\text{g/mL}$ do composto PA-Int5 apresentaram vacuolização citoplasmática e perfis de membrana (semelhante ao retículo endoplasmático) em torno das organelas (Figura 3B-C). Essas alterações também foram observadas em promastigotas tratadas com 7,2 $\mu\text{g/mL}$ e 14,4 $\mu\text{g/mL}$ do composto PA-Int6. Além disso, observou-se a presença de um núcleo picnótico com condensação de cromatina aumentada (Figura 3D) em ambas as concentrações testadas, bem como perda de conteúdo citoplasmático levando à destruição celular (Figura 3E).

Figura 3 - Eletromicrografia de *L. braziliensis* tratadas e não tratadas com compostos PA-Int5 e PA-Int6 observadas pela microscopia eletrônica de varredura.



Promastigota não tratada, apresentando estrutura preservada de organelas como núcleo (N), cinetoplasto (K) e bolsa flagelar (FP). (B) Promastigota tratada com 10,3 µg/mL do composto PA-Int5 é possível notar intensa vacuolização do citoplasma, em (C) parasitos tratados com 20,6 µg/mL do composto PA-Int5 mostrando a presença de perfis de membrana (seta). (D) Promastigota tratada com 7,2 µg/mL do composto PA-Int6 mostrando perda de material citoplasmático (*). Observe em (E), promastigota tratada com 14,4 µg/mL do composto PA-Int6, presença de um grande espaço eletroluscente e mostrando perfis de retículo (seta) circundando o núcleo.

As alterações induzidas por PA-Int5 e PA-Int6 na membrana mitocondrial potencial são apresentadas pelo Índice de Variação (IV) na Tabela 2. Promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com concentrações de 10,3 µg/mL (1 x IC₅₀) e 20,6 µg/mL (2 x IC₅₀) de PA-Int5 e 7,2 µg/mL (1 x IC₅₀) e 14,4 µg/mL de PA-Int6 (2 x IC₅₀), por 24 horas, não diminuíram a intensidade de fluorescência da rodamina 123, com valores de I.V. muito próximos do zero. Rho123 não demonstrou alteração $\Delta\Psi_m$ em células tratadas. Esses dados corroboram com a análise ultraestrutural: PA-Int5 e PA-Int6 não prejudicam a fisiologia das mitocôndrias de promastigotas de *L. braziliensis* em nenhuma das condições testadas.

Tabela 2 - Efeito dos compostos PA-Int5 e PA-Int6 no potencial de membrana mitocondrial.

Tratamento	Concentração (µg/mL)	Fluorescência média		Índice de variação		
Controle	0.00	75.508.2	± 7,189.7	0.00	± 0.00	
C ₂ H ₅ OH	99% v/v	11366.4	± 3,594.70	-0.90	± 0.10	
PA-Int5	10.3 (1 x IC ₅₀)	77,909.3	± 3,522.5	-0.04	± 0.02	
	20.6 (2 x IC ₅₀)	76,465.7	± 5,496.0	0.00	± 0.01	
PA-Int6	7.2 (1 x IC ₅₀)	80,789.4	± 8,829.6	-0.01	± 0.02	
	14.4 (2 x IC ₅₀)	69,595.3	± 5,551.3	-0.04	± 0.04	

Índice de Variação = MT-MC/MC, onde MT é a média da intensidade de fluorescência nas células tratadas; MC é a média da intensidade de fluorescência em células não tratadas.

4. DISCUSSÃO

Embora a quimioterapia seja o único tratamento eficaz para leishmaniose tegumentar, os fármacos disponíveis são limitados pela toxicidade, custo, acesso, requerem tratamento em longo prazo, por dificuldades na obtenção de formulações orais e falhas no tratamento [38]. Estas desvantagens demonstram a necessidade da identificação de novos compostos a fim de aumentar o atual arsenal quimioterápico, superar as limitações e combater os parasitas resistentes aos medicamentos, sendo esta a questão mais preocupante [39].

O desenvolvimento de novos compostos com ação leishmanicida requer baixa ou nenhuma toxicidade para células de mamíferos [40]. Todos os compostos inéditos testados neste estudo exibiram baixa toxicidade em relação às células de mamíferos. .

Resultados semelhantes ao de Scariot et al. (2017) que também testaram a citotoxicidade derivados de tiossemicarbazona e observaram baixos valores de toxicidade para macrófagos J774.A1 em comparação com o medicamento de referência anfotericina B [41].

A anfotericina B é conhecida por ter alta taxa de cura, mas o uso de sua formulação convencional é limitado por induzir hemólise e nefrotoxicidade [3]. Outra droga convencional para o tratamento da leishmaniose é a miltefosina, que, assim como a Anfotericina B, causa anemia hemolítica como efeito colateral [42]. Assim, testes para avaliar a atividade hemolítica de um composto inédito são relevantes, pois detectam sua capacidade de causar danos às membranas eritrocitárias, uma vez que a ruptura dessas células é uma barreira para a implantação de ensaios *in vivo* [43]. Os resultados da presente investigação mostraram que todas as isatina-tiossemicarbazonas testadas não induziram hemólise na maior concentração testada. Estes dados corroboram com os achados de Rodrigues et al. (2018) e Queiroz et al. (2020) que também verificaram a ausência de hemólise em eritrócitos humanos após o tratamento com um derivado tiossemicarbazônico.

Conforme demonstrado no presente estudo, os compostos derivados da estrutura das tiossemicarbazonas apresentaram baixa toxicidade em macrófagos e os valores de CC_{50} foram sempre inferiores aos de IC_{50} para promastigotas e amastigotas. A baixa toxicidade dos compostos para macrófagos teve efeito direto sobre os valores do índice de seletividade, que foram mais seletivos para parasitas do que para células de mamíferos.

Compostos que possuem a fração tiossemicarbazona apresentam estruturas privilegiadas e úteis no tratamento de várias doenças, principalmente as doenças tropicais infecciosas. Estes protótipos são atrativos à química medicinal e excelentes candidatos a novos fármacos para o tratamento destas doenças, por serem acessíveis, possuírem baixos custos relativos à reatividade, boas reações de rendimento, além da capacidade de gerar uma série de análogos por meio da otimização de propriedades físico-químicas [45].

Todos os derivados de isatinas-tiossemicarbazonas testados foram capazes de inibir as formas promastigotas de *L. braziliensis*. Essa atividade pode estar relacionada à presença do grupo isatina e às substituições nas posições R_1 e R_2 das tiossemicarbazonas. Isatina é um conhecido grupo farmacofórico bastante pesquisado

em química sintética e medicinal [46]. Ganhou atenção da comunidade científica devido ao seu tamanho único e propriedades eletrônicas privilegiadas que permitem a obtenção de moléculas biologicamente ativas [47]. Este grupo apresenta uma notável e conhecida atividade antiproliferativa contra várias linhagens de células cancerosas. Já as tiosemicarbazonas derivadas de isatina têm demonstrado uma variedade de atividades biológicas, como antimicrobiana, antineoplásica, antiplasmódica, antiviral e leishmanicida [48].

Os compostos avaliados neste estudo (PA-Int1 à PA-Int7) foram obtidos por meio da reação de três diferentes isatinas (isatina, 5-nitroisatina e 5-cloroisatina) com três diferentes tiosemicarbazidas (tiosemicarbazida, fenil- tiosemicarbazida e metil- tiosemicarbazida). As variações observadas na atividade leishmanicida sugerem uma relação estrutura-atividade, devido às trocas de substituintes adicionados nas posições R1 e R2. Os compostos PA-Int5 e PA-Int6 apresentaram os melhores valores de IC_{50} quando testados contra *L. braziliensis*, com valores de 10.3 e 7.2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Esses dois compostos têm um grupo fenil em R2 em comum. De acordo com Silva et al. (2019), a presença do grupo fenil na estrutura de derivados de tiosemicarbazonas propicia uma melhor atividade destes compostos frente as cepas de *L. infantum* e de *L. amazonenses*. Estes resultados corroboram com os nossos, inferindo que a presença desse substituinte é importante para a atividade leishmanicida [49].

Nossos compostos mais promissores diferenciam-se por apresentarem um grupo nitro (NO_2) na posição R1 (PA-Int5) e um halogênio (Cl) nesta mesma posição (PA-Int6). Nitro é um grupo farmacofórico antiparasitário bem conhecido [31]. Sugere-se que a atividade deste grupo funcional está relacionada com o potencial de redução do grupo nitro, um forte aceptor de elétrons, capaz de gerar espécies reativas, e por consequência a indução de efeitos biológicos [50]. Embora moléculas que possuem grupamentos nitro não sejam a primeira escolha para o desenvolvimento de um fármaco, devido à frequência efeitos colaterais indesejáveis, este grupamento se mostra importante para o tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos [51].). Para tal, é necessário o desenvolvimento de testes com novos protótipos com toxicidade seletiva aos parasitos e que não causem prejuízos às células do hospedeiro [52].

O uso de substituintes halogenados, como no composto PA-Int6, permite melhor permeabilidade em membranas biológicas, interação com alvos farmacológicos e estabilidade metabólica e química. Além disso, compostos derivados de

tiossemicarbazonas que contêm substituintes halogenados apresentam melhor atividade biológica contra tripanossomatídeos [31,49,53–56].

Com base nos resultados de triagem dos compostos da série Pa-Int e no índice de seletividade, identificamos PA-Int5 e PA-Int6 como compostos promissores. Assim, buscamos estudar seu efeito contra as amastigotas de *L. braziliensis*. O índice de sobrevivência mostrou que tanto o PA-Int5 quanto o PA-Int6 reduziram significativamente o número de amastigotas por macrófago. Ao comparar nossos resultados com os obtidos por Carvalho e Melo (2018), é possível reforçar que os derivados de tiossemicarbazonas são eficazes na redução da infecção de macrófagos por *Leishmania* spp. Segundo esses autores, compostos dessa classe podem bloquear o desenvolvimento de parasitas intracelulares e eliminá-los sem causar efeitos tóxicos na célula hospedeira [57].

Diante dos resultados promissores de PA-Int5 e PA-Int6 contra as principais formas evolutivas de *L. braziliensis*, aprofundamos nossa investigação a fim de identificar possíveis alterações morfofisiológicas causadas por esses compostos. Estudos de biologia celular por microscopia eletrônica fornecem contribuições importantes para a identificação dos principais alvos de diferentes drogas contra tripanossomatídeos, permitindo algumas deduções sobre os possíveis mecanismos de morte celular [58]. Alterações no volume celular e na estrutura da membrana plasmática do parasita, compatíveis com a perda de viabilidade celular e morte celular, foram observadas por meio de microscopia eletrônica de varredura. Tais mudanças também estiveram presentes no estudo de Britta et al. (2012), que avaliaram compostos químicos derivados de tiossemicarbazonas contra promastigotas de *L. amazonensis* e observaram alterações morfológicas na forma e tamanho da célula, bem como desintegração celular e severos danos às organelas [59].

Neste contexto, Basmaciyan e Casanova (2019), reforçam a necessidade do conhecimento sobre possíveis alterações morfológicas associadas à perda da viabilidade celular e morte da *Leishmania* spp. em comparação a eucariotos superiores, a fim de permitir o desenvolvimento de novos tratamentos, específicos e não citotóxicos [60]. As alterações observadas na morfologia do parasito causadas pelos compostos PA-Int5 e PA-Int6, como intensa vacuolização citoplasmática, perfis de membrana semelhantes ao retículo endoplasmático ao redor das organelas e perda de material citoplasmático também foram descritas em outros estudos.

Britta et al. (2014) observaram que as promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com um derivado tiossemicarbazona de S-limoneno apresentaram intensa vacuolização e presença de estruturas de membrana concêntricas citoplasmáticas [61]. Nossos achados também corroboram com as investigações de Macedo-Silva et al. (2015) que descreveram alterações na morfologia de promastigotas tratadas por 24 horas com amiodarona, um antiarrítmico utilizado no tratamento da doença de Chagas, apresentaram alterações drásticas, destruição do citoplasma, presença de autofagossomos por vezes associados ao perfil do retículo endoplasmático [62]. De Mello et al. (2016) investigaram mudanças ultraestruturais e morfológicas em *L. braziliensis* após tratamento com três chalconas sintéticas e notaram intensa vacuolização, bem como desorganização completa do citoplasma, assim como demonstrado neste estudo após tratamento da mesma espécie com derivados inéditos de tiossemicarbazonas [63].

Segundo Rodrigues e de Souza (2008), dentre os diferentes fenótipos de morte celular descritos em *Leishmania* spp. e em outros protozoários parasitos, a autofagia é caracterizada pela presença de perfis de retículo endoplasmático envolvendo organelas inteiras e danificadas para formar estruturas autofagossômicas [64]. Sabe-se que os tripanossomatídeos diante de condições de estresse, principalmente o tratamento medicamentoso, muitas vezes induzem um fenótipo autofágico com estruturas mielínicas, corpos multivesiculares e aumento do número de autofagossomos [65].

A autofagia é um processo importante na morte celular, porém seu fenótipo em parasitas é pouco descrito [66]. Pouco se sabe também sobre as tiossemicarbazonas que induzem esse mecanismo de morte celular. A morte celular por autofagia também foi sugerida após o tratamento com outras moléculas de tiossemicarbazona contra linhagens de células cancerígenas [67], *T. cruzi* [68] e *L. amazonensis* [41].

Para parasitas do gênero *Leishmania*, o papel desempenhado pela autofagia no contexto da infecção ainda não é bem compreendido [69]. A reciclagem de componentes celulares não funcionais e/ou danificados representa um passo central para a sobrevivência dos tripanossomatídeos, explicando o surgimento de fenótipos autofágicos induzidos por diferentes drogas, pois um parasito tenta sobreviver em condições de estresse degradando estruturas danificadas [41]. A autofagia pode preceder ou mesmo ativar a apoptose, pois provoca a ativação de caspases ou a depleção de inibidores endógenos da apoptose [66,70].

A hipótese de um processo autofágico induzido pelos compostos PA-Int5 e PA-Int6 não pode ser descartada. A intensa vacuolização e a presença de membranas concêntricas no citoplasma semelhantes a perfis de retículo são características desse processo, podendo estar associadas ao acúmulo de lipídios aberrantes que não estão totalmente incorporados à membrana plasmática ou às membranas que revestem as diversas organelas celulares. A autofagia representa uma estratégia parasitária de sobrevivência em situações estressantes, levando à morte celular em condições extremas [71]. Este processo catabólico celular pode induzir apoptose pela degradação de partes da célula após o sequestro em autofagossomos e subsequente degradação dentro dos lisossomos, ou pela ativação da via apoptótica [60]. Esta pode ser outra rota relevante na infecção por *Leishmania* spp., pois promove uma redução no número de células infectadas e minimiza as reações inflamatórias [72]. Novos estudos utilizando marcadores celulares podem elucidar o papel da autofagia no mecanismo de ação das isatina-tiossemicarbazonas.

Em conclusão, nossos resultados suportam a potencial utilidade de novos derivados de isatinas-tiossemicarbazonas como candidatos a agentes quimioterápicos contra *Leishmania braziliensis*. Mais investigações sobre o mecanismo de ação e modelos *in vivo* são necessárias para apoiar a aplicabilidade de tais compostos como novas drogas para o tratamento da leishmaniose cutânea.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Jana Sandes pelo suporte científico e operacional fornecido. Este trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) - Brasil e Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco) - Brasil.

REFERÊNCIAS

- [1] W.H. Organization, Leishmaniasis, Key Facts. (2021) 1–6.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed September 27, 2020).
- [2] J. Chakravarty, S. Sundar, Current and emerging medications for the treatment of

- leishmaniasis, *Expert Opin. Pharmacother.* 20 (2019).
<https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1609940>.
- [3] A.C. da Silva, T.A.R. dos Santos, I.V.B. da Silva, M.V.G. de Oliveira, D.R.M. Moreira, A.C.L. Leite, V.R.A. Pereira, Aryl thiosemicarbazones: In vitro and immunomodulatory activities against *L. amazonensis*, *Exp. Parasitol.* 177 (2017) 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.003>.
- [4] H. Bisetegn, A.J. Zeleke, E. Gadisa, G. Shumie, D. Damte, T. Fenta, S. Behaksra, A.G. Bayih, Clinical, parasitological and molecular profiles of cutaneous leishmaniasis and its associated factors among clinically suspected patients attending borumeda hospital, north-east ethiopia, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008507>.
- [5] S. Uzun, M.S. Gürel, M. Durdu, M. Akyol, B. Fettahlioğlu Karaman, M. Aksoy, S. Aytekin, M. Borlu, E. İnan Doğan, Ç.A. Doğramacı, Y. Kapıcıoğlu, A. Akman-Karakaş, T. Kaya, M.K. Mülâyim, Y. Özbel, S. Özensoy Töz, O. Özgöztaş, Y. Yeşilova, M. Harman, Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey, *Int. J. Dermatol.* 57 (2018) 973–982. <https://doi.org/10.1111/ijd.14002>.
- [6] C.F. Amorim, F.O. Novais, B.T. Nguyen, A.M. Misic, L.P. Carvalho, E.M. Carvalho, D.P. Beiting, P. Scott, Variable gene expression and parasite load predict treatment outcome in cutaneous leishmaniasis, *Sci. Transl. Med.* 11 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax4204>.
- [7] N.E. Aronson, C.A. Joya, Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management, *Infect. Dis. Clin. North Am.* 33 (2019) 101–117.
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.004>.
- [8] T.R.N. Berbert, T.F.P. De Mello, P. Wolf Nassif, C.A. Mota, A.V. Silveira, G.C. Duarte, I.G. Demarchi, S.M.A. Aristides, M.V.C. Lonardoni, J.J. Vieira Teixeira, T.G.V. Silveira, Pentavalent antimonials combined with other therapeutic alternatives for the treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: A systematic review, *Dermatol. Res. Pract.* 2018 (2018).
<https://doi.org/10.1155/2018/9014726>.
- [9] S. Sundar, A. Singh, Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: Present and future developments, *Parasitology.* 145 (2018) 481–489.
<https://doi.org/10.1017/S0031182017002116>.

- [10] N. Salam, W.M. Al-Shaqha, A. Azzi, Leishmaniasis in the Middle East: Incidence and Epidemiology, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (2014).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003208>.
- [11] A. Bilgic-Temel, D.F. Murrell, S. Uzun, Cutaneous leishmaniasis: A neglected disfiguring disease for women, *Int. J. Women's Dermatology.* 5 (2019) 158–165.
<https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2019.01.002>.
- [12] B. Arana, Boletim informativo da redeLEISH-4^a edição, Genebra, 2019.
- [13] L.M. Alcântara, T.C.S. Ferreira, F.R. Gadelha, D.C. Miguel, Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis, *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 8 (2018) 430–439.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.09.006>.
- [14] L.S. Sangenito, V. da Silva Santos, C.M. d'Avila-Levy, M.H. Branquinha, A.L. Souza dos Santos, S.S.C. de Oliveira, Leishmaniasis and Chagas Disease – Neglected Tropical Diseases: Treatment Updates, *Curr. Top. Med. Chem.* 19 (2019) 174–177. <https://doi.org/10.2174/156802661903190328155136>.
- [15] L.M. Alcântara, T.C.S. Ferreira, V. Fontana, E. Chatelain, C.B. Moraes, L.H. Freitas-Junior, A Multi-Species Phenotypic Screening Assay for Leishmaniasis Drug Discovery Shows That Active Compounds Display a High Degree of Species-Specificity, *Molecules.* 25 (2020) 2551.
<https://doi.org/10.3390/molecules25112551>.
- [16] K. Haldys, R. Latajka, Thiosemicarbazones with tyrosinase inhibitory activity, *Medchemcomm.* 10 (2019) 378–389. <https://doi.org/10.1039/C9MD00005D>.
- [17] E. De Farias Santiago, S.A. De Oliveira, G.B. De Oliveira Filho, D.R. Magalhaes Moreira, P.A. Teixeira Gomes, A.L. Da Silva, A.F. De Barros, A.C. Da Silva, T.A. Ramos Dos Santos, V.R. Alves Pereira, G.G. Araújo Gonçalves, F.A. Brayner, L.C. Alves, A.G. Wanderley, A.C. Lima Leite, Evaluation of the anti-Schistosoma mansoni activity of thiosemicarbazones and thiazoles, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 352–363. <https://doi.org/10.1128/AAC.01900-13>.
- [18] A.B.M. Ibrahim, M.K. Farh, P. Mayer, Copper complexes of new thiosemicarbazone ligands: Synthesis, structural studies and antimicrobial activity, *Inorg. Chem. Commun.* 94 (2018) 127–132.
<https://doi.org/10.1016/j.inoche.2018.06.019>.
- [19] S.F.P. Braga, N.C. Fonseca, J.P. Ramos, E.M. de Souza-Fagundes, R.B. de

- Oliveira, Synthesis and cytotoxicity evaluation of thiosemicarbazones and their thiazole derivatives, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 52 (2016) 299–307.
<https://doi.org/10.1590/S1984-82502016000200008>.
- [20] T.A.R. dos Santos, A.C. da Silva, E.B. Silva, P.A.T. de Moraes Gomes, J.W.P. Espíndola, M.V. de Oliveira Cardoso, D.R.M. Moreira, A.C.L. Leite, V.R.A. Pereira, Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells, *Biomed. Pharmacother.* 82 (2016) 555–560. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.038>.
- [21] J.W.P. Espíndola, M.V. De Oliveira Cardoso, G.B. De Oliveira Filho, D.A. Oliveira E Silva, D.R.M. Moreira, T.M. Bastos, C.A. De Simone, M.B.P. Soares, F.S. Villela, R.S. Ferreira, M.C.A.B. De Castro, V.R.A. Pereira, S.M.F. Murta, P.A. Sales Junior, A.J. Romanha, A.C.L. Leite, Synthesis and structure-activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxyl thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain, *Eur. J. Med. Chem.* 101 (2015) 818–835. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.048>.
- [22] L.R.P. de Siqueira, P.A.T. de Moraes Gomes, L.P. de Lima Ferreira, M.J.B. de Melo Rêgo, A.C.L. Leite, Multi-target compounds acting in cancer progression: Focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues, *Eur. J. Med. Chem.* 170 (2019) 237–260. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.024>.
- [23] J.B.P. Da Silva, D.M.D.A.F. Navarro, A.G. Da Silva, G.K.N. Santos, K.A. Dutra, D.R. Moreira, M.N. Ramos, J.W.P. Espíndola, A.D.T. De Oliveira, D.J. Brondani, A.C.L. Leite, M.Z. Hernandez, V.R.A. Pereira, L.F. Da Rocha, M.C.A.B. De Castro, B.C. De Oliveira, Q. Lan, K.M. Merz, Thiosemicarbazones as *Aedes aegypti* larvicidal, *Eur. J. Med. Chem.* 100 (2015) 162–175. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.061>.
- [24] R. de O. Paiva, L.F. Kneipp, C.M. Goular, M.A. Albuquerque, A. Echevarria, Atividade antifúngica de tiosemicarbazonas e semicarbazonas frente a fungos micotoxigênicos, *Cienc. e Agrotecnologia.* 38 (2014) 531–537. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000600001>.
- [25] R.L. Kessler, M.J. Soares, C.M. Probst, M.A. Krieger, *Trypanosoma cruzi* Response to Sterol Biosynthesis Inhibitors: Morphophysiological Alterations Leading to Cell Death, *PLoS One.* 8 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055497>.

- [26] J. Schröder, S. Noack, R.J. Marhöfer, J.C. Mottram, G.H. Coombs, P.M. Selzer, Identification of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Triazine Nitriles as Inhibitors of *Leishmania mexicana* Cysteine Protease CPB, *PLoS One*. 8 (2013) 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077460>.
- [27] C. Schad, U. Baum, B. Frank, U. Dietzel, F. Mattern, C. Gomes, A. Ponte-Sucre, H. Moll, U. Schurigt, T. Schirmeister, Development of a new antileishmanial aziridine-2,3-dicarboxylate-based inhibitor with high selectivity for parasite cysteine proteases, *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (2016) 797–805. <https://doi.org/10.1128/AAC.00426-15>.
- [28] S.S. Gawande, S.C. Warangkar, B.P. Bandgar, C.N. Khobragade, Synthesis of new heterocyclic hybrids based on pyrazole and thiazolidinone scaffolds as potent inhibitors of tyrosinase, *Bioorganic Med. Chem.* 21 (2013) 2772–2777. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.12.053>.
- [29] G.N. Masoud, A.M. Youssef, M.M. Abdel Khalek, A.E. Abdel Wahab, I.M. Labouta, A.A.B. Hazzaa, Design, synthesis, and biological evaluation of new 4-thiazolidinone derivatives substituted with benzimidazole ring as potential chemotherapeutic agents, *Med. Chem. Res.* 22 (2013) 707–725. <https://doi.org/10.1007/s00044-012-0057-3>.
- [30] C. Pizzo, C. Saiz, A. Talevi, L. Gavernet, P. Palestro, C. Bellera, L.B. Blanch, D. Benítez, J.J. Cazzulo, A. Chidichimo, P. Wipf, S.G. Mahler, Synthesis of 2-Hydrazolyl-4-Thiazolidinones Based on Multicomponent Reactions and Biological Evaluation Against *Trypanosoma Cruzi*, *Chem. Biol. Drug Des.* 77 (2011) 166–172. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2010.01071.x>.
- [31] D.R. Magalhaes Moreira, A.D.T. De Oliveira, P.A. Teixeira De Moraes Gomes, C.A. De Simone, F.S. Villela, R.S. Ferreira, A.C. Da Silva, T.A.R. Dos Santos, M.C.A. Brelaz De Castro, V.R.A. Pereira, A.C.L. Leite, Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* compounds which induce apoptotic parasite death, *Eur. J. Med. Chem.* 75 (2014) 467–478. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.001>.
- [32] T. Mosmann, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. <https://doi.org/10.1039/c6ra17788c>.
- [33] C.M. Queiroz, G.B. de Oliveira Filho, J.W.P. Espíndola, A.V. do Nascimento,

- A.S. dos S. Aliança, V.M.B. de Lorena, A.P.S. Feitosa, P.R. da Silva, L.C. Alves, A.C.L. Leite, F.A. Brayner, Thiosemicarbazone and thiazole: in vitro evaluation of leishmanicidal and ultrastructural activity on *Leishmania infantum*, *Med. Chem. Res.* 29 (2020) 2050–2065. <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02619-z>.
- [34] A.S. dos S. Aliança, A.R. Oliveira, A.P.S. Feitosa, K.R.C. Ribeiro, M.C.A.B. de Castro, A.C.L. Leite, L.C. Alves, F.A. Brayner, In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives, *Eur. J. Pharm. Sci.* 105 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.005>.
- [35] P.R. da Silva, J.F. de Oliveira, A.L. da Silva, C.M. Queiroz, A.P.S. Feitosa, D.M.F.A. Duarte, A.C. da Silva, M.C.A.B. de Castro, V.R.A. Pereira, R.M.F. da Silva, L.C. Alves, F.A.B. dos Santos, M. do C.A. de Lima, Novel indol-3-yl-thiosemicarbazone derivatives: Obtaining, evaluation of in vitro leishmanicidal activity and ultrastructural studies, Elsevier B.V., 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108899>.
- [36] A.S. Dos Santos Aliança, K.F.L. Dos Anjos, T.N. De Vasconcelos Reis, T.M.M. Higino, M.C.A. Brelaz-De-Castro, É.M. Bianco, R.C.B.Q. De Figueiredo, The in Vitro biological activity of the Brazilian brown seaweed dictyota mertensii against *Leishmania amazonensis*, *Molecules*. 19 (2014). <https://doi.org/10.3390/molecules190914052>.
- [37] N. Karah, Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new 5-nitroindole-, *Eur. J. Med. Chem.* 37 (2002) 909–918.
- [38] A. Hefnawy, M. Berg, J.-C. Dujardin, G. De Muylder, Exploiting Knowledge on *Leishmania* Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs, *Trends Parasitol.* 33 (2017) 162–174. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.003>.
- [39] S. Kapil, P.K. Singh, O. Silakari, An update on small molecule strategies targeting leishmaniasis, *Eur. J. Med. Chem.* 157 (2018) 339–367. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.012>.
- [40] P. Bhargava, R. Singh, Developments in diagnosis and antileishmanial drugs, *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2012 (2012). <https://doi.org/10.1155/2012/626838>.
- [41] D.B. Scariot, E.A. Britta, A.L. Moreira, H. Falzirolli, C.C. Silva, T. Ueda-Nakamura, B.P. Dias-Filho, C. V. Nakamura, Induction of early autophagic process on *Leishmania amazonensis* by synergistic effect of miltefosine and

- innovative semi-synthetic thiosemicarbazone, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00255>.
- [42] M. V. Zhukova, O. V. Romanenko, V.A. Nikolaevich, M.A. Kisel', Hemolytic properties of miltefosine in liposomes of various lipid compositions, *Pharm. Chem. J.* 44 (2010) 507–509. <https://doi.org/10.1007/s11094-010-0504-8>.
- [43] J. Pietkiewicz, K. Zielińska, J. Saczko, J. Kulbacka, M. Majkowski, K.A. Wilk, New approach to hydrophobic cyanine-type photosensitizer delivery using polymeric oil-cored nanocarriers: Hemolytic activity, in vitro cytotoxicity and localization in cancer cells, *Eur. J. Pharm. Sci.* 39 (2010) 322–335.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.12.012>.
- [44] B. dos Santos Rodrigues, R.I. de Ávila, P.L. Benfica, L.P. Bringel, C.M.A. de Oliveira, F. Vandresen, C.C. da Silva, M.C. Valadares, 4-Fluorobenzaldehyde limonene-based thiosemicarbazone induces apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells, *Life Sci.* 203 (2018) 141–149.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.024>.
- [45] C.B. Scarim, D.H. Jornada, M.G.M. Machado, C.M.R. Ferreira, J.L. dos Santos, M.C. Chung, Thiazole, thio and semicarbazone derivatives against tropical infective diseases: Chagas disease, human African trypanosomiasis (HAT), leishmaniasis, and malaria, *Eur. J. Med. Chem.* 162 (2019) 378–395.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.013>.
- [46] Varun, Sonam, R. Kakkar, Isatin and its derivatives: a survey of recent syntheses, reactions, and applications, *Medchemcomm.* 10 (2019) 351–368.
<https://doi.org/10.1039/c8md00585k>.
- [47] R. Nath, S. Pathania, G. Grover, M.J. Akhtar, Isatin containing heterocycles for different biological activities: Analysis of structure activity relationship, *J. Mol. Struct.* 1222 (2020) 128900. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128900>.
- [48] H. Pervez, N. Manzoor, M. Yaqub, K.M. Khan, 5-Nitroisatin-derived thiosemicarbazones: Potential antileishmanial agents, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 29 (2014) 628–632. <https://doi.org/10.3109/14756366.2013.836641>.
- [49] P.R. da Silva, J.F. de Oliveira, A.L. da Silva, C.M. Queiroz, A.P.S. Feitosa, D.M.F.A. Duarte, A.C. da Silva, M.C.A.B. de Castro, V.R.A. Pereira, R.M.F. da Silva, L.C. Alves, F.A.B. dos Santos, M. do C.A. de Lima, Novel indol-3-yl-thiosemicarbazone derivatives: Obtaining, evaluation of in vitro leishmanicidal

- activity and ultrastructural studies, *Chem. Biol. Interact.* 315 (2020) 108899.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108899>.
- [50] K. Nepali, H.Y. Lee, J.P. Liou, Nitro-Group-Containing Drugs, *J. Med. Chem.* 62 (2019) 2851–2893. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00147>.
- [51] S. Patterson, S. Wyllie, Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects, *Trends Parasitol.* 30 (2014) 289–298.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.003>.
- [52] L.C. Dias, G.M. De Lima, C.B. Pinheiro, B.L. Rodrigues, C.L. Donnici, R.T. Fujiwara, D.C. Bartholomeu, R.A. Ferreira, S.R. Ferreira, T.A.O. Mendes, J.G. Da Silva, M.R.A. Alves, Design, structural and spectroscopic elucidation of new nitroaromatic carboxylic acids and semicarbazones for the in vitro screening of anti-leishmanial activity, *J. Mol. Struct.* 1079 (2015) 298–306.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.08.047>.
- [53] M. Zaldini Hernandez, S.T. Melo Cavalcanti, D.M. Rodrigo Moreira, W. Filgueira de Azevedo Junior, A. Cristina Lima Leite, Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design, *Curr. Drug Targets.* 11 (2010) 303–314.
- [54] E.G. Pinto, I.O. Santos, T.J. Schmidt, S.E.T. Borborema, V.F. Ferreira, D.R. Rocha, A.G. Tempone, Potential of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones against *Leishmania (L.) infantum*: Biological activity and structure-activity relationships, *PLoS One.* 9 (2014).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105127>.
- [55] J.I. Manzano, F. Cochet, B. Boucherle, V. Gómez-Pérez, A. Boumendjel, F. Gamarro, M. Peuchmaur, Arylthiosemicarbazones as antileishmanial agents, *Eur. J. Med. Chem.* 123 (2016) 161–170.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.014>.
- [56] P. Linciano, C.B. Moraes, L.M. Alcantara, C.H. Franco, B. Pascoalino, L.H. Freitas-Junior, S. Macedo, N. Santarem, A. Cordeiro-da-Silva, S. Gul, G. Witt, M. Kuzikov, B. Ellinger, S. Ferrari, R. Luciani, A. Quotadamo, L. Costantino, M.P. Costi, Aryl thiosemicarbazones for the treatment of trypanosomatidic infections, *Eur. J. Med. Chem.* 146 (2018) 423–434.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.043>.
- [57] L.P. de Carvalho, E.J.T. de Melo, The microbicidal defenses involved in

- intracellular *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis* elimination in the presence of semicarbazones, thiosemicarbazones, and thiazolidinones, *World J. Pharm. Res.* 7 (2018) 276–295.
<https://doi.org/10.20959/wjpr201818-13610>.
- [58] C.M. Adade, T. Souto-Padrón, Contributions of ultrastructural studies to the cell biology of trypanosomatids: Targets for anti-parasitic drugs, *Open Parasitol. J.* 4 (2010) 178–187. <https://doi.org/10.2174/1874421401004010178>.
- [59] E.A. Britta, A.P. Barbosa Silva, T. Ueda-Nakamura, B.P. Dias-Filho, C.C. Silva, R.L. Sernaglia, C.V. Nakamura, Benzaldehyde Thiosemicarbazone derived from limonene complexed with copper induced mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*, *PLoS One.* 7 (2012) 1–12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041440>.
- [60] L. Basmacıyan, M. Casanova, Cell death in *Leishmania*, *Parasite.* 26 (2019) 71.
<https://doi.org/10.1051/parasite/2019071>.
- [61] E.A. Britta, D.B. Scariot, H. Falziroli, T. Ueda-Nakamura, C.C. Silva, B.P.D. Filho, R. Borsali, C.V. Nakamura, Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene, *BMC Microbiol.* 14 (2014) 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s12866-014-0236-0>.
- [62] S.T. de Macedo-Silva, T.L.A. de Oliveira Silva, J.A. Urbina, W. de Souza, J.C.F. Rodrigues, Antiproliferative, Ultrastructural, and Physiological Effects of Amiodarone on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*, *Mol. Biol. Int.* 2011 (2011) 1–12. <https://doi.org/10.4061/2011/876021>.
- [63] T.F.P. de Mello, B.M. Cardoso, H.R. Bitencourt, L. Donatti, S.M.A. Aristides, M.V.C. Lonardon, T.G.V. Silveira, Ultrastructural and morphological changes in *Leishmania (Viannia) braziliensis* treated with synthetic chalcones, *Exp. Parasitol.* 160 (2016) 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.11.005>.
- [64] J. Fernandes Rodrigues, W. Souza, Ultrastructural Alterations in Organelles of Parasitic Protozoa Induced by Different Classes of Metabolic Inhibitors, *Curr. Pharm. Des.* 14 (2008) 925–938. <https://doi.org/10.2174/138161208784041033>.
- [65] R.F.S. Menna-Barreto, Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill, *Cell Death Dis.* 10 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1370-2>.

- [66] L. Basmaciyan, L. Berry, J. Gros, N. Azas, M. Casanova, Temporal analysis of the autophagic and apoptotic phenotypes in *Leishmania* parasites, *Microb. Cell.* 5 (2018) 404–417. <https://doi.org/10.15698/mic2018.09.646>.
- [67] M.A. Soares, J.A. Lessa, I.C. Mendes, J.G. Da Silva, R.G. Dos Santos, L.B. Salum, H. Daghestani, A.D. Andricopulo, B.W. Day, A. Vogt, J.L. Pesquero, W.R. Rocha, H. Beraldo, N 4-Phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor cells, structure-activity relationship studies and investigation on the mechanism of action, *Bioorganic Med. Chem.* 20 (2012) 3396–3409. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.027>.
- [68] L.P. de Carvalho, M.A.G.B. Gomes, B.S. Rocha, R.R. de Oliveira, E.J. Maria, E.J.T. de Melo, Anti-Parasite effects of new Thiosemicarbazones and their Products Thiazolidinone including Cellular aspects of Intracellular Elimination of *Trypanosoma Cruzi* in Vitro, *J. Dev. Drugs.* 03 (2014) 100126. <https://doi.org/10.4172/2329-6631.1000126>.
- [69] P.S.T. Veras, J.P.B. de Menezes, B.R.S. Dias, Deciphering the Role Played by Autophagy in *Leishmania* Infection, *Front. Immunol.* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02523>.
- [70] G. Mariño, M. Niso-Santano, E.H. Baehrecke, G. Kroemer, Self-consumption: The interplay of autophagy and apoptosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrm3735>.
- [71] A. Brennand, M. Gualdrón-López, I. Coppens, D.J. Rigden, M.L. Ginger, P.A.M. Michels, Autophagy in parasitic protists: Unique features and drug targets, *Mol. Biochem. Parasitol.* 177 (2011) 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.02.003>.
- [72] M. Aghaei, H. KhanAhmad, S. Aghaei, M. Ali Nilforoushzadeh, M.A. Mohaghegh, S.H. Hejazi, The role of Bax in the apoptosis of *Leishmania*-infected macrophages, *Microb. Pathog.* 139 (2020) 103892. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103892>.

5.2 Artigo 2:

SÍNTESE, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E LEISHMANICIDA DE NOVOS DERIVADOS DE ISATINA-HIDRAZONA-TIAZÓIS

Karla Raíza Cardoso Ribeiro^{1,2}; Taciana Mirely Maciel Higino³; Paulo André Teixeira de Moraes Gomes⁴; Ana Cristina Lima Leite⁴; Bruno Oliveira de Veras²; Márcia Vanusa da Silva⁵; Jana Messias Sandes⁶; Ana Paula Sampaio Feitosa^{1,6}; Luiz Carlos Alves^{1,6}; Fábio André Brayner^{1,2,6}

1 Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife, PE 50670-420, Brasil

2 Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife, PE 52171-011, Brasil

3 Departamento de Investigação Científica, Fundação Altino Ventura (FAV), Rua Soledade, 170 – Boa Vista, Recife, PE, 50070-040, Brasil.

4 Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife, PE 50740-520, Brasil

5. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife, PE 50740-520, Brazil

6 Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife, PE 52171-011, Brasil

Autor correspondente: Karla Raíza Cardoso Ribeiro. E-mail: rcrkarla@yahoo.com.br

Conflito de interesse: Os autores declaram que não possuem interesses financeiros ou pessoais que possam ter influenciado o trabalho relatado neste artigo.

RESUMO

A leishmaniose cutânea é uma doença tropical negligenciada com altos índices de morbimortalidade. Não há vacina disponível e os tratamentos convencionais apresentam efeitos colaterais e eficácia limitada, reforçando a urgência na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Na prospecção de possíveis agentes quimioterápicos, compostos derivados de tiazóis são candidatos promissores e são conhecidos por terem eficácia contra tripanossomatídeos. Neste estudo, investigamos o potencial leishmanicida, citotóxico, antioxidante e as alterações ultraestruturais promovidas por isatina-hidrazona-tiazóis em *Leishmania braziliensis*. Todos os compostos inibiram o crescimento de formas promastigotas de *L. braziliensis* e apresentaram baixa citotoxicidade frente a macrófagos J774 e eritrócitos humanos. Os compostos PA-1B e PA-1J se destacaram por apresentarem maior seletividade aos parasitas, e por isso foram selecionados para análises posteriores. Esses compostos foram capazes de diminuir a taxa de sobrevivência de formas amastigotas. O composto PA-1J é um potente antioxidante. Tanto o PA-1B quanto o PA-1J promoveram alterações ultraestruturais relacionadas à morte celular. Diante desses achados, é possível concluir que os compostos tiazólicos da série PA-1 apresentam atividade *in vitro* contra *L. braziliensis*. Como protótipos promissores, as estruturas do PA-1B e PA-1J podem ser racionalmente modificadas para apresentar maior seletividade aos parasitos juntamente com melhor atividade anti-leishmania

Palavras-chave: Desenvolvimento de medicamentos; *Leishmania braziliensis*; Leishmaniose Cutânea; Tiazóis.

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Cutânea (LC) é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Essa doença se propagou nas últimas décadas, com cerca de 0,6 a 1 milhão de casos anualmente [1]. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a LC é um problema de saúde pública em 10 países: Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Paquistão, República Árabe Síria e Tunísia, onde ocorrem aproximadamente 95% dos casos [2].

No Brasil, a *Leishmania (V.) braziliensis* é o principal agente etiológico da LC, que está associada ao desenvolvimento de lesões cutâneas, principalmente úlceras, em partes expostas do corpo, capazes de produzir deformidades para toda a vida e graves incapacidades ou estigma [3]. Quando não tratadas adequadamente, essas lesões podem se agravar devido a infecções secundárias, ulcerações e resposta inflamatória exacerbada [4–7].

Desde a década de 1940, os antimoniais pentavalentes têm sido os principais fármacos utilizados no tratamento da LC. No entanto, tem-se observado baixa adesão dos pacientes ao tratamento devido ao surgimento de graves efeitos tóxicos. O alto custo, a longa duração do tratamento e a disponibilidade também são fatores importantes que reduzem a adesão ao tratamento em países em desenvolvimento [8]. Essa interrupção do tratamento favorece o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos, dificultando o controle da doença [9].

Considerando que nos últimos 70 anos ainda não foram desenvolvidos novos medicamentos ou vacinas eficazes para LC, a quimioterapia tornou-se a única abordagem prática e eficaz [10]. Portanto, considerando os inconvenientes mencionados, a busca por novas opções terapêuticas é urgente [11]. Os compostos heterocíclicos representam alternativas terapêuticas devido às suas ilimitadas combinações estruturais de variadas atividades físicas, químicas e biológicas, o que os torna atrativos para a química medicinal [12].

Os compostos tiazólicos são protótipos heterocíclicos promissores com grande importância na farmacologia devido à sua presença na maioria dos agentes terapêuticos [13]. A atividade biológica dos compostos derivados do tiazol é ampla, como agentes antineoplásicos [14], anti-inflamatórios [15,16], antivirais [17,18], antimicrobianos [19,20] e antiparasitários. [21–25].

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou a atividade leishmanicida de novos derivados tiazol que atuam de forma mais seletiva contra *Leishmania infantum* [26,27]. Dando continuidade à linha de pesquisa, este trabalho investigou o potencial leishmanicida, citotóxico, antioxidante e alterações ultraestruturais promovidas por derivados de isatina-hidrazona-tiazóis contra *L. braziliensis*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Síntese Química

2.1.1 Equipamentos e reagentes

Os reagentes usados foram adquiridos de kits comerciais (Acros Organics, Vetec, Sigma-Aldrich ou Fluka). A cromatografia em camada fina (TLC) foi usada para monitorar o progresso de uma reação (Merck, sílica gel 60 F254 em folha de alumínio). Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho de ponto de fusão capilar eletrotérmico Fisatom 430D e não foram corrigidos. Os espectros de RMN foram medidos em um instrumento Varian UnityPlus 400 MHz (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C) ou Bruker AMX-300 MHz (300 MHz para ^1H e 75,5 MHz para ^{13}C). DMSO- d_6 e D $_2$ O foram adquiridos da CIL (Cambridge Isotope Laboratories) ou Sigma-Aldrich, e tetrametilsilano (tms) foi usado como padrão interno. O número de sinais nos espectros de ^1H NMR foram designados da seguinte forma: s/singlete; d/duplete, t/triple, dd/duplo duplete, q/quarteto, m/multiplete e as constantes de acoplamento, em hertz, como J. A espectroscopia de infravermelho foi realizada em um instrumento Bruker (modelo IFS 66) usando pastilhas de KBr. Os experimentos de espectrometria de massa foram realizados em um LC-IT-TOF (Shimadzu). A menos que especificado de outra forma, a ESI foi conduzida no modo de íons positivos. As condições típicas foram as seguintes: voltagem capilar de 3 kV, voltagem do cone de 30 V e varredura de pico entre 50 e 1000 m/z.

2.1.3 Preparação geral dos tiazóis (PA 1A-J):

Em um balão de fundo redondo, foi adicionado 2-(2-oxoindolin-3-ilideno) hidrazinacarbotoamida (PA-Int1), uma das dez α -halo-cetonas e isopropanol (20 mL). A mistura reaccional foi mantida sob refluxo durante 2 horas. As reações foram monitoradas por placa cromatográfica de camada fina. O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado e recristalizado em THF, obtendo-se o produto puro.

2.1.2.1 PA-1A: (Z)-3-[2-(4-feniltiazol-2-il)-hidrazona]indolin-2-ona

Ponto de fusão: 259-260 °C. Infravermelho (KBr): 3140 (NH), 1708 (HN-C=O). RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.02 (d, 2H, ArH), 7.46 (m, 6H, ArH), 7.88 (s, 1H, ArH), 8.41 (d, 1H, ArH), 11.22 (s, 1H, NH), 13.25 (s, 1H, NH). RMN de ¹³C (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 106.7 (CH, Ar), 110.9 (CH, Ar), 119.7 (CH, Ar), 119.7 (C-Ar), 122.3 (CH, Ar), 125.6 (2CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 128.6 (2CH, Ar), 130.4 (CH, Ar), 132.1 (C-Ph), 133.8 (C=N), 141.2 (C-NH, Ar), 150.8 (CN, Ar), 163.1 (C=O), 166.0 (N=CS). Molecular formula: C₁₇H₁₂N₄OS. HRMS: 320.07 [M + H]⁺.

2.1.2.2 PA-1B: (Z)-3-[2-(4-toluiltiazol-2-il)-hidrazona]indolin-2-ona

Ponto de fusão: 261-263 °C. Infravermelho (KBr): 3330 (NH), 1711 (HN-C=O). RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2.32 (s, 3H, CH₃), 6.95 (m, 8H, ArH), 7.77 (s, 1H, ArH), 11.21 (s, 1H, NH), 13.26 (s, 1H, NH). RMN de ¹³C (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 20.7 (CH₃), 105.8 (CH, Ar), 110.9 (CH, Ar), 119.7 (CH, Ar), 119.7 (C-Ar), 122.3 (CH, Ar), 125.6 (2CH, Ar), 129.1 (2CH, Ar), 130.4 (CH, Ar), 131.1 (CH, Ar), 132.0 (C-Ph), 137.2 (C=N), 141.2 (C-NH, Ar), 150.8 (CN, Ar), 163.1 (C=O), 165.9 (N=CS). Fórmula molecular: C₁₈H₁₄N₄OS. HRMS: 334.09 [M + H]⁺.

2.1.2.3 PA-1C: (Z)-3-{2-[4-(4-metoxifenil)tiazol-2-il]-hidrazona}indolin-2-ona

Ponto de fusão: 268 °C. Infravermelho (KBr): 3171 (NH), 1689 (HN-C=O). RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 3.8 (s, 3H, CH₃), 6.97 (d, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 6.98 (d, 2H, *J* 8.7 Hz, ArH), 7.09 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.34 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.43 (s, 1H, ArH), 7.54 (d, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.83 (d, 2H, *J* 8.7 Hz, ArH), 11.2 (s, 1H, NH), 13.32 (s, 1H, NH). RMN de ¹³C (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 55.07 (CH₃), 104.5 (CH, Ar), 110.9 (CH, Ar), 113.9 (2CH, Ar), 119.7 (CH, Ar), 119.7 (C-Ar), 122.3 (CH, Ar), 126.8 (C-Ph), 127.0 (2CH, Ar), 130.3 (CH, Ar), 131.8 (C=N), 141.2 (C-NH, Ar), 150.9 (CN, Ar), 159.0 (CO, Ar), 163.1 (C=O), 165.8 (N=CS). Fórmula molecular: C₁₈H₁₄N₄O₂S. HRMS: 350.08 [M + H]⁺.

2.1.2.4 PA-1D: (Z)-3-{2-[4-(3-nitrofenil)thiazol-2-il]-hidrazona}indolin-2-ona

Ponto de fusão: 278-279 °C. Infravermelho (KBr): 3381 (NH), 1698 e 3181 (HN-C=O). RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 6.97 (d, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.1 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.36 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.55 (d, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.73 (t, 1H, *J* 7.8 Hz, ArH), 7.94 (s, 1H, ArH), 8.18 (d, 1H, *J* 7.8 Hz, ArH), 8.35 (d, 1H, *J* 7.8 Hz, ArH), 8.68 (s, 1H, ArH), 11.22 (s, 1H, NH), 13.37 (s, 1H, NH). RMN de ¹³C (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 105.0 (CH, Thiazole), 119.2 (CH, Ar), 120.7 (CH-Ar), 123.0 (CH, Ar), 124.2 (CH, Ar), 125.6 (CH, Ar), 126.3 (CH, Ar), 128.9 (CH, Ar), 133.1 (CH, Ar), 134.2 (C=N), 139.0 (C, Ar), 141.3 (C-NH, Ar), 150.0 (CN, Thiazole), 148.2 (C-NO₂, Ar), 169.1 (C=O), 170.5 (N=CS, Thiazole). Fórmula molecular: C₁₇H₁₁N₅O₃S. HRMS: 365.06 [M + H]⁺.

2.1.2.5 PA-1E: (Z)-3-{2-[4-(4-nitrofenil)thiazol-2-il]-hidrazona}indolin-2-ona

Ponto de fusão: 273 °C. Infravermelho (KBr): 3169 (NH), 1692 (HN-C=O). RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 6.96 (d, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.09 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.34 (t, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.53 (d, 1H, *J* 7.5 Hz, ArH), 7.96 (s, 1H, ArH), 8.15 (d, 2H, *J* 9 Hz, ArH), 8.26 (d, 2H, *J* 9 Hz, ArH), 11.21 (s, 1H, NH), 13.36 (s, 1H, NH). RMN de ¹³C (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 110.9 (CH, Ar), 111.2 (CH, Ar), 115.6 (CH, Ar), 119.8 (C-Ar), 122.3 (CH, Ar), 123.9 (2CH, Ar), 126.5 (2CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 136.4 (C=N), 139.8 (C-Ph), 141.3 (C-NH, Ar), 146.5 (C-NO₂, Ar), 148.8 (CN, Ar), 163.0 (C=O), 166.5 (N=CS). Fórmula molecular: C₁₇H₁₁N₅O₃S. HRMS: 365.06 [M + H]⁺.

2.1.2.6 PA-1F: (Z)-3-{2-[4-(4-fluorofenil)thiazol-2-il]-hidrazona}indolin-2-ona

Ponto de fusão: 265-267 °C. Infravermelho (KBr): 3243 (NH), 1675 (HN-C=O). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 6.95 (d, 1H, *J* 7.6 Hz, ArH), 7.07 (t, 1H, *J* 7.6 Hz, ArH), 7.22 (d, 1H, *J* 8.8 Hz, ArH), 7.24 (d, 1H, *J* 8.8 Hz, ArH), 7.32 (t, 1H, *J* 7.6 Hz, ArH), 7.51 (d, 1H, *J* 7.6 Hz, ArH), 7.57 (s, 1H, ArH), 7.91 (d, 1H, *J* 8.8 Hz, ArH), 7.93 (d, 1H, *J* 8.8 Hz, ArH), 11.2 (s, 1H, NH), 13.32 (s, 1H, NH). RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆): δ 106.5 (CH, Ar), 111.0 (CH, Ar), 115.4 (CH, Ar), 115.6 (CH, Ar),

119.7 (C-Ar), 119.8 (CH, Ar), 122.4 (CH, Ar), 127.7 (CH, Ar), 127.8 (CH, Ar), 130.4 (CH, Ar), 130.6 (C-Ph), 132.1 (C=N), 141.3 (C-NH, Ar), 150.0 (CN, Ar), 160.6 (CF, Ar), 163.2 (C=O), 166.1 (N=CS). Fórmula molecular: $C_{17}H_{11}FN_4OS$. HRMS: 338.06 $[M + H]^+$.

2.1.2.7 PA-1G: (Z)-3-{2-[4-(4-clorofenil)tiazol-2-il]-hidrazona}indolin-2-ona

Ponto de fusão: 279-280 °C. Infravermelho (KBr): 3260 (NH), 1693 (HN-C=O). RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ 6.95 (d, 1H, J 7.2 Hz, ArH), 7.08 (t, 1H, J 7.2 Hz, ArH), 7.33 (t, 1H, J 7.2 Hz, ArH), 7.46 (d, 2H, J 8.8 Hz, ArH), 7.52 (d, 1H, J 7.2 Hz, ArH), 7.67 (s, 1H, ArH), 7.90 (d, 2H, J 8.8 Hz, ArH), 11.23 (s, 1H, NH), 13.33 (s, 1H, NH). RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ 107.5 (CH, Ar), 111.0 (CH, Ar), 119.7 (C-Ar), 119.8 (CH, Ar), 122.4 (CH, Ar), 127.4 (2CH, Ar), 128.7 (2CH, Ar), 130.5 (CH, Ar), 132.2 (C-Ph), 132.4 (C=N), 132.8 (C-Cl, Ar), 141.3 (C-NH, Ar), 149.8 (CN, Ar), 163.2 (C=O), 166.2 (N=CS). Fórmula molecular: $C_{17}H_{11}ClN_4OS$. HRMS: 354.03 $[M + H]^+$.

2.1.2.8 PA-1J: (Z)-3-{2-[4-(2,4-diclorofenil)tiazol-2-il]-hidrazona}indolin-2-ona

Ponto de fusão: 285-286 °C. Infrared (KBr): 3447 (NH), 1698 and 3264 (HN-C=O). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 6.97 (d, 1H, J 7.6 Hz, ArH), 7.1 (t, 1H, J 7.6 Hz, ArH), 7.35 (t, 1H, J 7.6 Hz, ArH), 7.51 (d, 1H, J 8.8 Hz, ArH), 7.55 (d, 1H, J 7.6 Hz, ArH), 7.69 (s, 1H, ArH), 7.7 (s, 1H, ArH), 7.94 (d, 1H, J 8.8 Hz, ArH), 11.2 (s, 1H, NH), 13.32 (s, 1H, NH). RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ 110.9 (CH, Ar), 112.2 (CH, Ar), 119.8 (CH, Ar), 119.8 (C-Ar), 122.3 (CH, Ar), 127.4 (2CH, Ar), 129.7 (CH, Ar), 130.5 (CH, Ar), 131.4 (C-Ph), 131.4 (C = N), 132.3 (2CH, Ar), 132.8 (C-Cl, Ar), 141.2 (C -NH, Ar), 163.0 (C = O). Fórmula molecular: $C_{17}H_{10}Cl_2N_4OS$. HRMS: 388.00 $[M + H]^+$.

2.2 Ensaios Biológicos

2.2.1 Cultivo celular

Formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foram mantidas em meio Schneider (Gibco, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), a 26°C e utilizadas para experimentos na fase exponencial de crescimento. Os macrófagos J774.A1 foram mantidos em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, USA) suplementado com 10% de SFB (Gibco, USA) e incubados a 37°C e 5% de CO₂. As formas amastigotas foram obtidas de macrófagos J774.A1 (1x10⁵ céls/mL) infectadas com as formas promastigotas do parasita, na proporção de 1:10, por 14 horas.

2.2.2 Atividade leishmanicida

Formas promastigotas de *L. braziliensis* (2x10⁶ céls/mL) foram incubadas na ausência ou presença de diferentes concentrações de cada composto (6,25 - 100 µg/mL) por 24 horas a 26 °C. O número de parasitas viáveis foi estimado por contagem direta em câmara de Neubauer. Cada experimento foi realizado em quadruplicata e os grupos controle (formas promastigotas não tratadas) foram cultivados na presença de 0,1% de DMSO.

Para avaliar os efeitos dos compostos contra formas amastigotas, macrófagos J774.A1 (1x10⁵ céls/mL) foram semeados em uma microplaca de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm no fundo de cada poço. As células foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com 10% SFB a 37°C por 3 horas até a adesão completa. Posteriormente, formas promastigotas foram adicionadas aos poços na proporção de 1:10 parasitas/célula hospedeira. Após 14 horas, os parasitas não internalizados foram removidos e as células infectadas foram incubadas na ausência (grupo controle) ou na presença de diferentes concentrações dos compostos (25 - 100 µg/mL) por 24 horas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, as células foram fixadas com solução de Bouin, coradas com solução de Giemsa e as lamínulas foram montadas permanentemente com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Dois testes independentes foram realizados em triplicata. Em cada lamínula, um total de 100 células foi contado usando um microscópio óptico. A porcentagem de células infectadas e o número de parasitas intracelulares por célula infectada foram estimados. O índice de sobrevivência (porcentagem de células infectadas × número de amastigotas por célula) e o valor de IC₅₀ (concentração inibitória média) também foram determinados [28].

2.2.3 Atividade citotóxica

Macrófagos J774 (1×10^5 céls/mL) foram semeados em placas de 96 poços, contendo meio RPMI com vermelho de fenol suplementado com 10% SFB, e incubados em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas. Em seguida, diferentes concentrações dos compostos (6,25 - 100 µg/mL) foram adicionados a cada poço e as células foram cultivadas por 24 horas a 37°C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Após a incubação, o meio foi removido e 10 µL de MTT (5 mg/mL) foi adicionado a cada poço. A microplaca foi incubada por 3 horas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO, e a absorbância foi determinada em 540 nm usando o Benchmark plus espectrofotômetro (Bio-Rad®, California, USA). A concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) foi calculada por regressão linear. Em seguida, o índice seletivo (IS) foi calculado como a razão entre os valores de CC₅₀ e IC₅₀. Dois experimentos independentes em quadruplicata foram realizados [26].

2.2.4 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi avaliada por meio da incubação 100 µL dos compostos diluídos em série em solução salina (0,85% NaCl + 10 mM CaCl₂) com 100 µL de suspensão de eritrócitos humanos a 2% (grupo sanguíneo O +) por 3 horas a 37°C em uma microplaca de 96 poços (fundo em forma de U) sob agitação constante. Em seguida, a microplaca foi centrifugada a 1500g por 4 minutos, e a lise celular foi então medida espectrofotometricamente a 540 nm. Eritrócitos com solução salina ou tratados com 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) foram usados como controle negativo e positivo da hemólise, respectivamente [27]. Os resultados foram determinados pela porcentagem de hemólise em relação ao controle positivo (100% hemólise) e ao controle negativo (0% hemólise). Os experimentos foram realizados em quadruplicata em dois testes independentes.

2.2.5 Atividade antioxidante

2.2.5.1 Atividade de eliminação de DPPH

A avaliação da atividade antioxidante de diferentes compostos tiazólicos pelo método de sequestro de radicais livres foi medida por meio de doação de hidrogênio utilizando o radical estável DPPH [29]. As medições foram realizadas em triplicata e as atividades de inibição foram calculadas com base na porcentagem de DPPH removido. Um análogo da vitamina E (Trolox®) e Hidroxitolueno (BHT) butilado foram usados como padrões. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(Ac - As) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorbância do controle e As é a absorbância da amostra. A IC₅₀ da atividade de DPPH foi calculada com base na regressão linear da porcentagem de DPPH restante em relação à concentração da amostra. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.5.2 Atividade de eliminação de ABTS

A atividade antioxidante dos derivados tiazol pelo ensaio de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) foi baseada na geração do radical cromóforo catiônico obtido a partir da oxidação de ABTS por persulfato de potássio [30]. As medições foram realizadas em triplicata e as atividades de inibição foram calculadas com base na porcentagem de ABTS removido. Um análogo da vitamina E (Trolox®) e Hidroxitolueno (BHT) butilado foram usados como padrões. O percentual de inibição (I%) foi calculado usando a seguinte equação: $I\% = [(Ac - As) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorbância do controle e As é a absorbância da amostra. A IC₅₀ da atividade de ABTS foi calculada com base na regressão linear da porcentagem de ABTS restante em relação à concentração da amostra.

2.2.5.3 Capacidade antioxidante total (CAT)

A Capacidade Antioxidante Total foi determinada pelo método de fosfomolibdênio [31,32]. O ensaio foi baseado na redução de Molibdênio⁺⁶ a Molibdênio⁺⁵ pela amostra e posterior formação de um complexo Fosfato/Molibdênio⁺⁵ esverdeado. Os tubos contendo as amostras e reagentes (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM) foram incubados a 100°C por 90 min. Subsequentemente, as absorbâncias de cada solução foram medidas a 695 nm contra o

branco. O ácido ascórbico foi usado como referência. A capacidade antioxidante total (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(Ac - As) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorbância do controle e As é a absorbância da amostra. A IC₅₀ de CAT foi calculada com base na atividade de regressão do linear em relação à concentração da amostra. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.6 Análise ultraestrutural

Formas promastigotas de *L. braziliensis* não tratadas (grupo controle) ou tratadas com IC₅₀ e $2 \times IC_{50}$ por 24 horas foram coletadas por centrifugação a 1500 g, lavadas em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2, e fixadas por 2 horas a 4°C em um solução contendo 2,5% de glutaraldeído / 4% de paraformaldeído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2. Posteriormente, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5mM em tampão cacodilato 0,1 M, por 1 hora. As células foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona e incluídas em resina PolyBed 812 (PolySciences, Warrington, PA, USA). Cortes ultrafinos contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo foram observados usando o microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM109 (MET). Para análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), promastigotas tratadas e não tratadas foram fixadas e pós-fixadas conforme descrito acima e aderidas a lamínulas revestidas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, Co., St Louis, MO, USA). As amostras foram desidratadas em série crescente de etanol, secas pelo método do ponto crítico (HCP-2 critical point dryer, Hitachi). Posteriormente, foram revestidas com ouro-paládio 20nm (Fine Coat Ion Sputter JFC-1100, JEOL) e observadas no MEV JEOL T-200 [33].

2.2.7 Análise estatística

Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ foram estimados por análise de regressão linear utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences - SPSS v 18.0 para Windows (IMB®, Armok, USA). A diferença significativa entre os grupos foi avaliada por análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey realizado no software Prism v

5.03 para Windows (GraphPad®, San Diego, USA). Todos os testes estatísticos consideraram $p \leq 0,05$ como valor de significância.

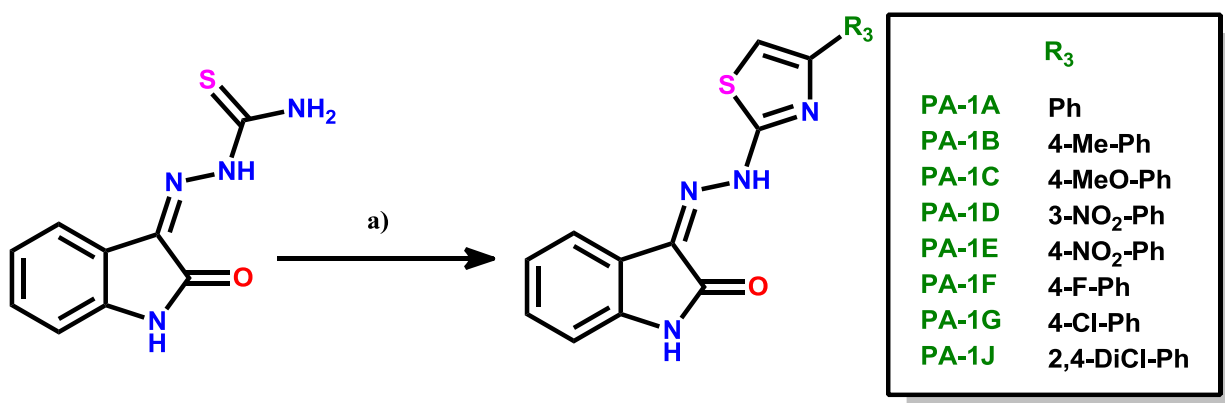
3 RESULTADOS

3.1 Síntese química

Todos os compostos da série PA01A-J foram obtidos por meio de uma metodologia simples de duas etapas. Para obter os compostos intermediários, a isatina reagiu com tiossemicarbazida, obtendo-se tiossemicarbazona com altos rendimentos. A síntese foi realizada em solução etanólica, sob refluxo, na presença de um catalisador ácido [34].

A segunda etapa da síntese aqui proposta foi a obtenção de tiazóis inéditos que compõem a série PA01A-J. Para tanto, foi escolhida a tiossemicarbazona sem substituintes na posição N4, PA-Int1. Este intermediário foi condensado com diferentes α -halo-cetonas, seguindo a metodologia desenvolvida por Hantzsch em 1887 [35]. Nesta metodologia as reações são realizadas sob agitação magnética sob refluxo (Esquema 1).

Esquema 1- Esquema de síntese.



Reagentes e condições: Etanol, HCl, refluxo, 3h.

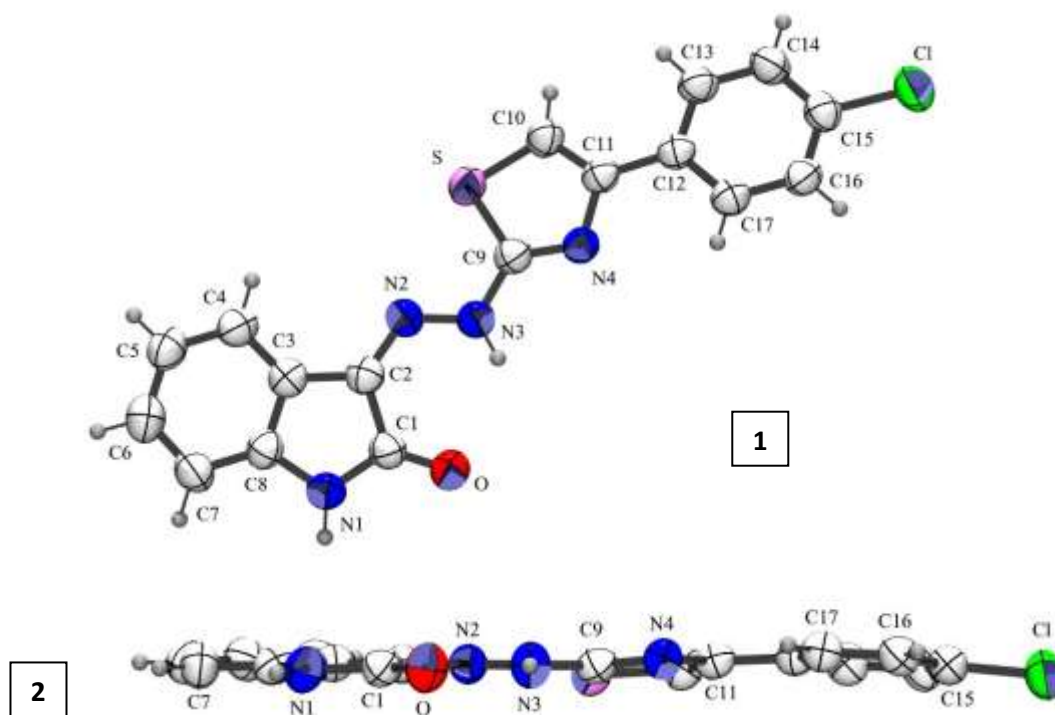
Para representar a caracterização dos compostos PA01A-J, o composto PA01G foi escolhido como exemplo. Através da análise espectroscópica na região do infravermelho, foi possível verificar as principais bandas de absorção. A banda de 3260 cm^{-1} sugere deformação axial N-H. A banda em 1693 cm^{-1} corresponde a HN-C=O.

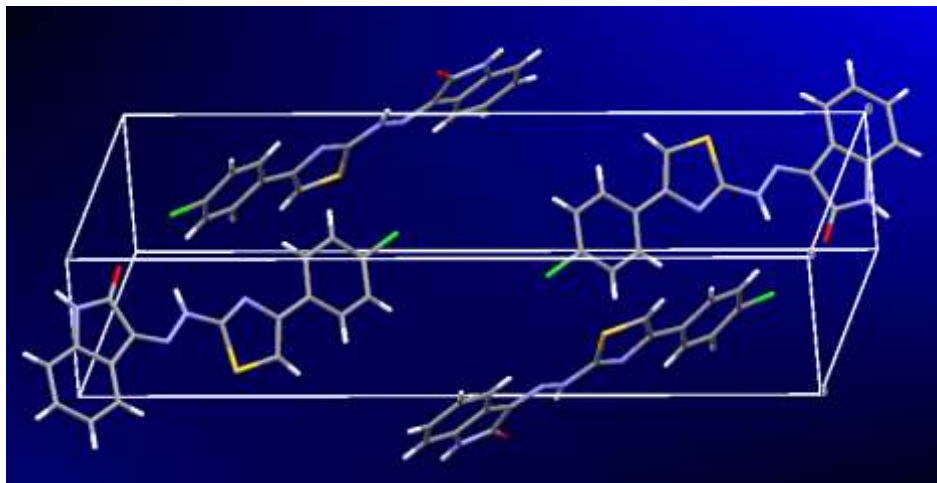
No RMN1H do composto PA01G, observou-se a presença de picos de 6,95-7,90 ppm para hidrogênios do anel aromático. Em 7,67 ppm há um singlete integrando para um hidrogênio aromático, um sinal característico para indicar a formação do anel tiazol. Em 11,23 e 13,33 ppm, aparecem dois singletos referentes aos dois hidrogênios das duas aminas secundárias (NH).

No ^{13}C RMN de PA01G, os picos em 107,5, 111,0, 119,8, 122,4, 130,5 e 127,4 ppm correspondem a carbonos aromáticos. O pico em 119,7 ppm corresponde a um carbono aromático quaternário. O pico a 132,4 ppm corresponde a $\text{C} = \text{N}$. A 132,8 ppm observa-se carbono quaternário aromático ligado ao cloro. A 163,2 ppm está o carbono carbonílico ($\text{C} = \text{O}$). Finalmente, o pico em 166,2 ppm corresponde ao carbono ligado ao nitrogênio e ao enxofre ($\text{N} = \text{C}-\text{S}$).

Além das análises descritas acima, também foi possível realizar uma análise cristalográfica, utilizando um cristal obtido a partir do composto PA-1G. Com esta técnica foi possível confirmar a estrutura dos compostos obtidos. Assim como, foi possível confirmar a planaridade da molécula (Figura 1).

Figura 1 - Cristalografia da molécula PA-1G.





(1) Resolução estrutural da molécula PA01G por difração de raios X; (2) Projeção paralela aos anéis para visualização da planaridade da molécula; (3) Arranjo das 4 moléculas na célula unitária gerada pela simetria do grupo espacial P21/c.

3.2 Atividade Biológica

Todos os compostos tiazólicos (PA-1A a PA-1J) foram capazes de inibir o crescimento de promastigotas de *L. braziliensis* em 24 horas de tratamento. Os valores da concentração inibitória máxima (IC_{50}) variaram de 33,6 a 89,33 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1). Os compostos mais eficazes foram PA-1B ($33,6 \pm 5,1 \mu\text{g/mL}$) e PA-1J ($39,9 \pm 2 \mu\text{g/mL}$).

Quando testados contra macrófagos J774.A1, a concentração que reduziu a viabilidade celular em 50% (CC_{50}) variou de 40 a 54,1 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1). Alguns compostos apresentaram efeito citotóxico em concentrações de CC_{50} próximas aos valores de IC_{50} determinados para promastigotas de *L. braziliensis*. No entanto, através dos valores do índice de seletividade, foi possível verificar que os compostos são mais seletivos contra o parasita do que para as células de mamíferos. Dentre os compostos que apresentaram o melhor índice de seletividade, destacam-se PA-1B ($IS = 1,4$) e PA-1J ($IS = 1,1$). Com relação à atividade hemolítica, estimou-se que todos os compostos da série PA-1, com exceção do composto PA-1E ($CC_{50} = 59,8 \mu\text{g/mL}$), promoveram 50% de lise da membrana plasmática dos eritrócitos em concentrações superiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1).

Considerando que PA-1B e PA-1J foram os derivados que apresentaram as melhores atividades, realizamos outros experimentos para avaliar seus efeitos nas formas amastigotas intracelulares, atividade antioxidante, bem como investigar os possíveis alvos intracelulares desses compostos por meio de análise ultraestrutural.

Semelhante às formas promastigotas, os derivados mais promissores, PA-1B e PA-1J, foram capazes de induzir ação leishmanicida nas formas intracelulares de *L. braziliensis*. As concentrações capazes de reduzir em 50% o número de formas amastigotas intracelulares (IC₅₀) estimadas para esses compostos foram 36,8 ± 1,5 µg/mL (PA-1B) e 41,7 ± 2,3 µg/mL (PA-1J) (Tabela 1).

Tabela 1- Atividades leishmanicida e citotóxica *in vitro* de derivados de isatina-tiazóis.

Composto	Promastigota IC ₅₀	J774A1 CC ₅₀	Amastigota IC ₅₀	Eritrócito CC ₅₀	Promastigota	Amastigota
	µg/mL				IS	
PA-1A	80,92 ± 12	54,1 ± 4,1	-	> 100	0,7	-
PA-1B	33,6 ± 5,1	48,3 ± 12,2	36,8 ± 1,5	> 100	1,4	1,3
PA-1C	54,3 ± 8,2	45,5 ± 12,1	-	> 100	0,8	-
PA-1D	59,24 ± 9	42,0 ± 5,7	-	> 100	0,7	-
PA-1E	67,2 ± 3,2	42,6 ± 6,3	-	59,8 ± 12,7	0,6	-
PA-1F	46,1 ± 2,8	49,9 ± 5,9	-	> 100	1,0	-
PA-1G	89,33 ± 3,2	44,8 ± 5,4	-	> 100	0,5	-
PA-1J	39,9 ± 2,4	43,0 ± 2,8	41,7 ± 2,3	> 100	1,1	1

IC₅₀: Concentração que inibe em 50% o crescimento de promastigotas ou amastigotas de *L. braziliensis*;
 CC₅₀: Concentração capaz de causar efeito citotóxico em 50% dos macrófagos ou eritrócitos J774A1;
 IS (Índice de Seletividade): CC₅₀ de macrófagos J774A1 / IC₅₀ *L. braziliensis*.

Os compostos PA-1B e PA-1J também foram submetidos a três testes de atividade antioxidante a fim de avaliar se os mesmos possuem propriedades redutoras efetivas na prevenção ou minimização do dano oxidativo às células vivas. As concentrações necessárias para reduzir o estágio inicial e a propagação do processo oxidativo dos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH⁺) e ABTS⁺, e referentes à capacidade total de oxidação dos compostos testados são demonstradas na Tabela 2.

Observa-se que o composto PA-1B apresentou maiores valores de IC₅₀ quando comparado aos controles positivos (trolox, BHT e ácido ascórbico), demonstrando ser menos ativo que os antioxidantes padrões, nos três testes antioxidantes realizados. Enquanto o derivado PA-1J mostrou-se um antioxidante mais eficaz, com atividade semelhante ao Trolox controle em dois dos testes realizados (DPPH⁺ e ABTS⁺) (Tabela 2).

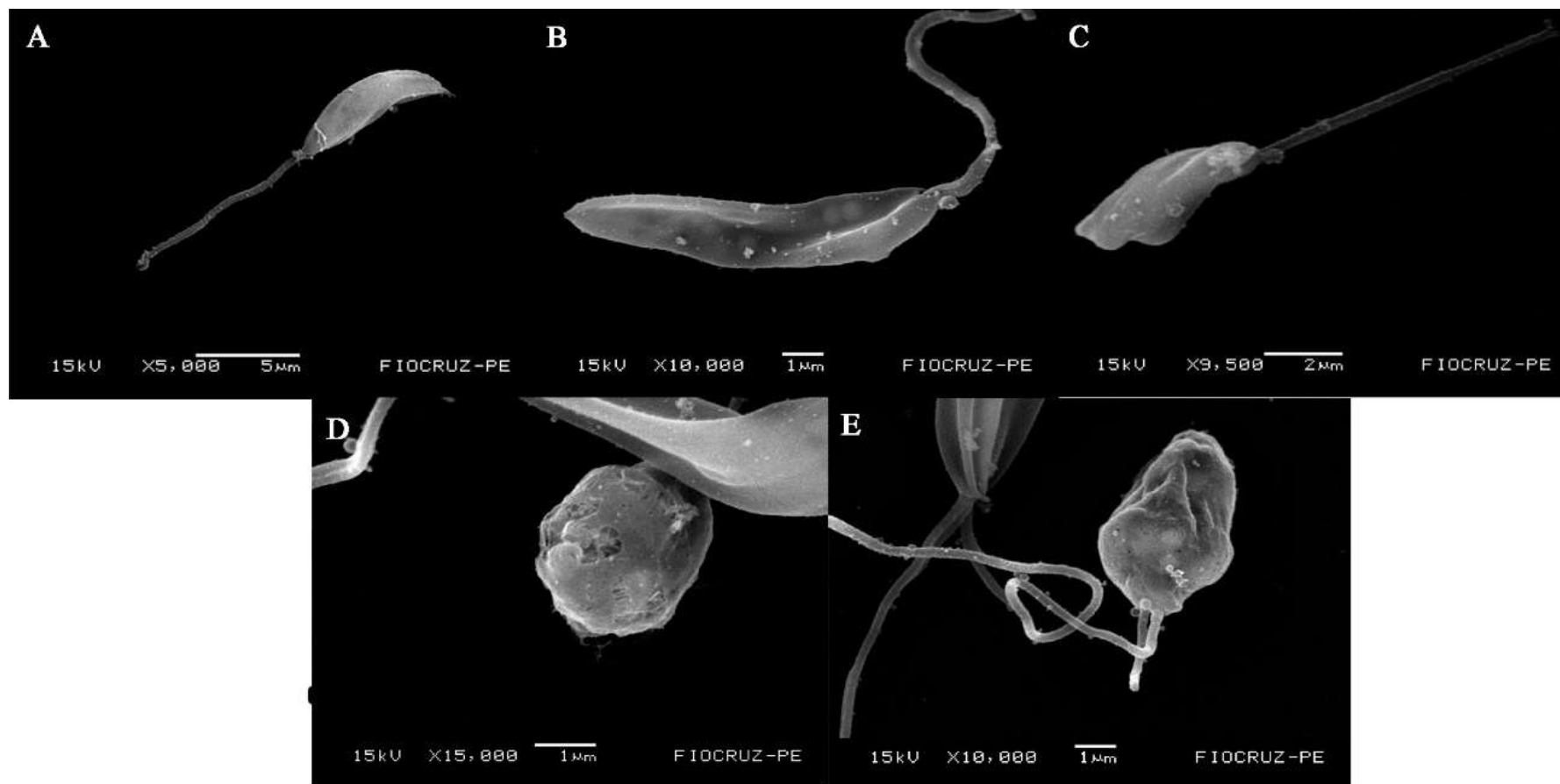
Tabela 2 - Atividade antioxidante de derivados de isatina-tiazóis.

Amostra	DPPH ⁺	ABTS ⁺	TAC
	IC ₅₀ (µg/mL)		
Trolox	45.08 ± 0.1	166.1 ± 0.0	N.D.
Ácido ascórbico	N.D.	N.D.	500.00 ± 0.0
BHT	312.34 ± 0.5	724.89 ± 0.1	772.14 ± 0.1
PA-1B	433.8 ± 0.2	1.668.87 ± 0.1	1.325.87 ± 1.1
PA-1J	48.94 ± 0.0	186.67 ± 0.2	1.755.37 ± 2.1

Valores descritos em média ± desvio padrão (n = 3). DPPH: Radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil; ABTS: Radical 2'.2-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato); TAC: Capacidade antioxidante total; BHT: Hidroxitolueno Butilado; N.D. - Não determinado.

Considerando que PA-1B e PA-1J foram os derivados que apresentaram o melhor índice de seletividade contra as formas promastigotas, uma análise ultraestrutural foi realizada para identificar as principais alterações e as possíveis organelas alvo da ação desses compostos. As células não tratadas apresentaram um corpo celular alongado e a membrana plasmática intacta (Figura 2A). O tratamento com 33,6 µg/mL e 67,2 µg/mL de PA-1B (Figuras 2B e 2C, respectivamente) revelou diminuição do volume celular e enrugamento substancial da superfície celular, compatível com morte celular. As células tratadas com 39,9 µg/mL e 79,8 µg/mL do composto PA-1J (Figuras 2D e 2E, respectivamente) apresentaram arredondamento e intenso enrugamento do corpo celular, além de alterações sugestivas de ruptura da membrana e enrugamento substancial da superfície celular.

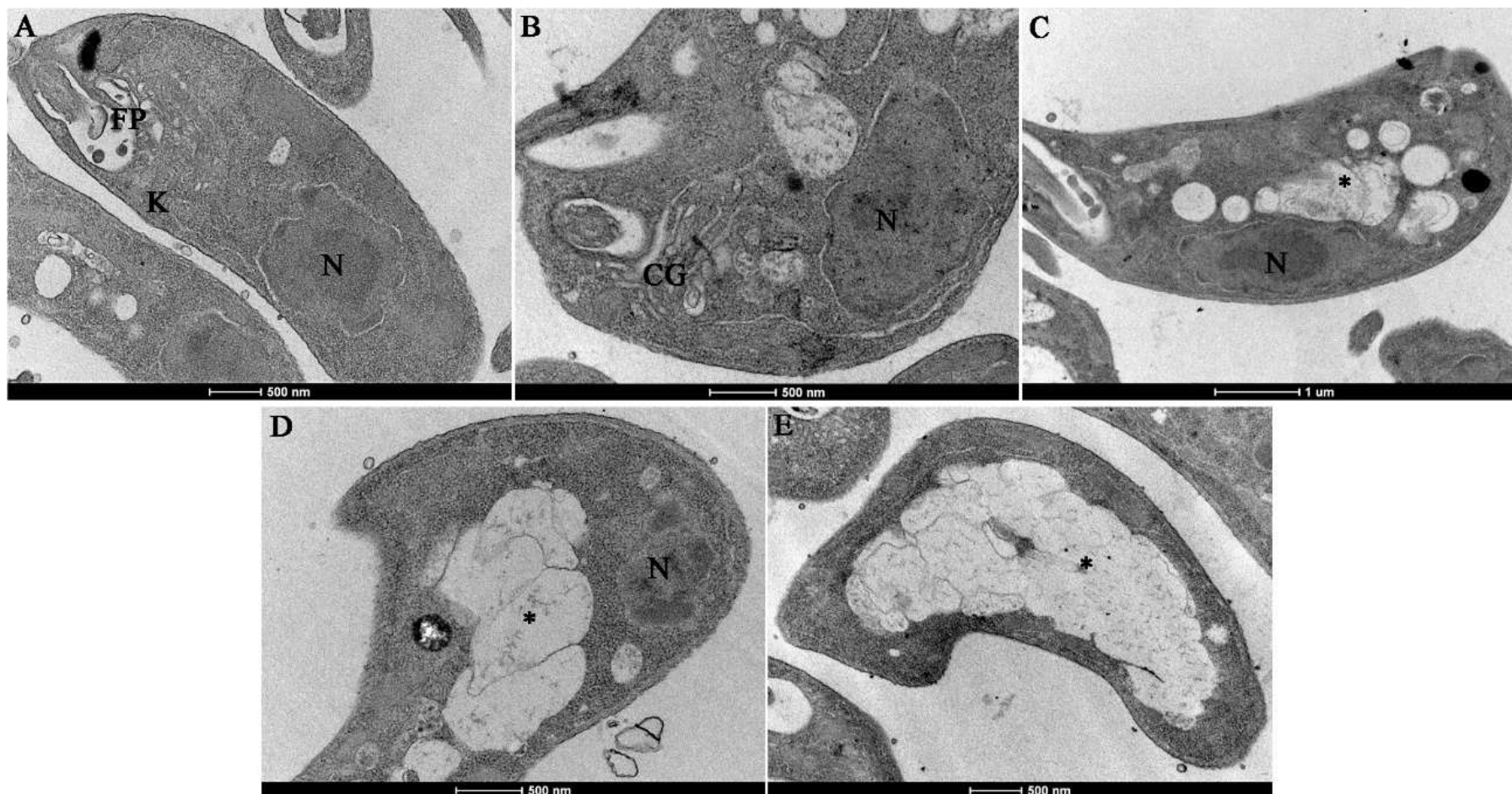
Figura 2 - Eletromicrografia de promastigotas de *L.braziliensis* não tratadas e tratadas com os compostos PA-1B e PA1J observadas pela microscopia eletrônica de transmissão.



(A) Promastigotas não tratadas mostrando forma fusiforme e comprimento do flagelo normal. (B) Promastigotas tratadas com 33,6 µg/mL e (C) 67,2 µg/mL do composto PA-1B apresentando alterações na morfologia. (D) Promastigotas tratadas com 39,9 µg/mL e (E) 79,8 µg/mL do composto PA-1J apresentando alterações na topologia e encolhimento do corpo celular.

Por meio da MET, verificou-se que as promastigotas de *L. braziliensis* não tratadas apresentavam estruturas celulares tipicamente preservadas (Figura 3A). Alterações ultraestruturais também foram detectadas nas células tratadas com 33,6 µg/mL de PA-1B, que apresentaram membranas concêntricas semelhantes a perfis de retículo endoplasmático e complexo de Golgi (Figura 3B). Enquanto a concentração de 67,2 µg/mL de PA-1B foi capaz de promover perda de material e vacuolização citoplasmática (Figura 3C). Enquanto as formas promastigotas tratadas com o composto PA-1J foram mais drasticamente afetadas quando comparadas às tratadas com PA-1B. Não foi possível observar a presença de dano aparente à membrana celular, porém, há intensa perda de material citoplasmático nas células tratadas com diferentes concentrações de PA-1J (Figuras 3D e E).

Figura 3 - Eletromicrografia de *L. braziliensis* tratadas e não tratadas com compostos PA-1B e PA-1J observadas pela microscopia eletrônica de varredura.



(A) Promastigotas não tratadas mostrando organelas e morfologia preservadas. (B) Promastigota tratada com 39,9 µg/mL do composto PA-1J é possível observar perda de material citoplasmático (*). (C) Parasitos tratados com 79,8 µg/mL do composto PA-1J mostrando a presença de um grande espaço eletroluscente. (D) Promastigota tratada com 33,6 µg/mL do composto PA-1B mostrando perfis de retículo e complexo de golgi. (E) Promastigota tratada com 67,2 µg/mL do composto PA-1B apresentando espaço eletroluscente entre a membrana plasmática e o núcleo e intensa vacuolização do citoplasma. (N) núcleo, (K) cinetoplasto, (FP) bolsa flagelar (FP) e complexo de Golgi (CG).

4 DISCUSSÃO

Para avaliar o potencial leishmanicida de derivados de tiazol, realizamos uma triagem da atividade de oito derivados de isatina-hidrazona-tiazol contra promastigotas de *L. braziliensis*. Todos os compostos derivados de tiazol investigados possuem um anel fenil (Ph) na estrutura química e foram capazes de inibir o crescimento dos parasitos. Os derivados PA-1B (4-metil-fenil) e PA-1J (2,4-diclorofenil) foram considerado o mais eficazes, pois apresentaram valores menores de IC₅₀ para promastigotas quando comparados aos demais compostos.

Estudos com derivados tiazol demonstram a importância do substituinte metil na estrutura de compostos com atividade contra tripanossomatídeos. Corroborando com nossos resultados, Aliança et al. (2017) demonstraram que os compostos tiazólicos com maior ação contra *L. infantum* possuíam anel fenil (Ph), destacando-se o derivado com duplas substituições de cloro (2,4-dicloro) como mais efetivo [26]. Estas di-substituições com átomos de cloro forneceram também maior eficácia para derivados de tiazóis contra formas tripomastigotas de *Trypanossoma cruzi* [36].

De acordo com Pinto et al. (2014), a presença de substituintes halogênicos no anel fenil concede ao composto maiores estabilidades, metabólica e química, em suas ligações [37]. Estes grupamentos estabilizam a permeabilidade da membrana celular promovendo ação leishmanicida eficaz. Segundo Hernandez et al. (2010), grupamentos halogenados causam alterações conformacionais e volumétricas na estrutura química do composto, permitindo interações favoráveis com o seu sítio alvo e uma diferenciação na sua atividade [38].

Outros compostos derivados da estrutura dos tiazóis apresentaram baixa citotoxicidade em macrófagos J774.A1 [14,24,25], assim como demonstrado no nosso estudo. Com relação à atividade hemolítica dos compostos da série PA-1, com exceção do PA-1E, é possível sugerir uma possível viabilidade para sua administração intravenosa em organismos vivos, sem causar danos aos eritrócitos. A baixa toxicidade de compostos tiazólicos nestas células sanguíneas também foi relatada nos estudos de De Sá et al (2017) e Queiroz et al. (2020), fornecendo mais evidências de que os tiazóis apresentam menor toxicidade em diversas linhagens de células de mamíferos [27,39].

Esses resultados nos encorajaram a continuar com estudos visando entender a atividade leishmanicida nas formas intracelulares de *L. braziliensis*, o efeito antioxidante e aspectos ultraestruturais na biologia celular deste parasito. Os compostos

PA-1B e PA-1J foram selecionados para estas investigações, pois se destacaram na série PA-01 por apresentarem maiores índices de seletividade aos parasitos do que para células de mamíferos.

O principal desafio na terapia da leishmaniose é o fato de os macrófagos servirem como reservatórios críticos para a replicação de formas intracelulares. Por esta razão, os compostos leishmanicidas têm dificuldades em permear a membrana plasmática dos macrófagos e, assim, inibir a sobrevivência do parasita [40]. Foi possível verificar que PA-1B e PA-1J apresentaram efeitos antiproliferativos em amastigotas com concentrações próximas àsquelas contra promastigotas. Conforme demonstrado em nosso estudo, os naftotiazóis testados por Toledo et al. (2013) reduziram a taxa de sobrevivência de amastigotas de *L. braziliensis*, sem afetar a viabilidade da célula hospedeira [41]. A presença do radical metil na estrutura química aumenta a lipossolubilidade do composto, o que facilita sua passagem pelas membranas biológicas e promove maior biodisponibilidade do composto [21,42]. De acordo com Hu e cols. (2020), a adição de grupos halogenados também favorece a lipossolubilidade, proporcionando maior eficácia na taxa de transporte e absorção dos protótipos [43].

Compostos derivados de tiazol possuem um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo o sequestro de espécies reativas para manter a homeostase do organismo [44]. Jaishree et al. (2012) e Kaddouri et al. (2020) demonstraram que estruturas de compostos derivados de tiazol são potentes antioxidantes [45,46]. De acordo com esses achados, o composto PA-1J demonstrou atividade antioxidante significativa em comparação com o ácido ascórbico, que é o antioxidante padrão. Esta semelhança de resultados sugere um bom potencial farmacológico deste composto, uma vez que a atividade antioxidante permite a redução de radicais livres impedindo que a resposta imune seja potencializada [47].

Estudos sobre a modulação de mecanismos de estresse oxidativo podem subsidiar estratégias alternativas para o desenvolvimento de novas drogas contra tripanossomatídeos [47]. A propriedade de doar elétrons, característica dos antioxidantes, permite a modulação do processo oxidativo no organismo [48]. Por esse motivo, as terapias antioxidantes podem prevenir o aparecimento de lesões causadas pela ação dos radicais livres, que podem danificar as proteínas e lipídios da membrana, além dos ácidos nucleicos das células hospedeiras [49].

Nossa análise ultraestrutural confirmou a atividade de PA-1B e PA-1J nas formas promastigotas de *L. braziliensis*. Os tratamentos induziram mudanças notáveis

na morfologia do parasita, como arredondamento celular. Aliança et al. (2017) e De Oliveira et al. (2020) também demonstraram alterações como perda de volume celular e enrugamento intenso da membrana celular de *L. infantum* causados por derivados de tiazol, mas nenhum dano aparente à membrana celular foi detectado nesses estudos [26,42]. O acúmulo de grandes gotículas lipídicas e a perda do conteúdo citoplasmático foram observados em ambos tratamentos. Essas alterações são compatíveis com a perda de viabilidade celular [50].

Diante desses achados, é possível sugerir que devido à lipossolubilidade do grupo metila e à di-substituição de átomos de cloro no grupo fenil na estrutura do tiazol (PA-1B e PA-1J, respectivamente) houve uma maior permeabilidade dos mesmos na membrana plasmática do parasita e que esses compostos prejudicaram a via de biossíntese do ergosterol. Segundo De Medeiros (2011), infere-se que o acúmulo de lipídios e o rompimento da membrana plasmática podem ser causados por interferências no metabolismo lipídico do parasito [51]. Entretanto, é necessária a realização de ensaios com marcadores para análises de fenótipos de morte celular, bem como estudos de docking molecular para o melhoramento da estrutura destes protótipos.

A triagem de novas moléculas com o potencial de identificar novas entidades visando novos alvos para a leishmaniose tem várias vantagens, incluindo a diferenciação entre a atividade contra o parasita ou a célula hospedeira, avaliações fenotípicas e a possibilidade de identificar eventos celulares únicos que podem orientar pesquisas sobre o modo de ação do xenobiótico [52].

Deste modo, nossos resultados contribuem para o desenvolvimento de outros estudos para subsidiar estratégias sintéticas alternativas, como novos *designs* e/ou combinações desses compostos com os fármacos convencionais, e análises das propriedades biológicas visando estruturas celulares e moleculares específicas de *L. braziliensis*. Esses protótipos têm grandes possibilidades de serem usados como potenciais candidatos a drogas leishmanicidas no futuro.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) e à Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco) - Brasil.

REFERÊNCIAS

- [1] N.E. Aronson, C.A. Joya, Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management, *Infect. Dis. Clin. North Am.* 33 (2019) 101–117.
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.004>.
- [2] W.H. Organization, Leishmaniasis, Key Facts. (2021) 1–6.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed September 27, 2020).
- [3] F. Bailey, K. Mondragon-Shem, P. Hotez, J.A. Ruiz-Postigo, W. Al-Salem, Á. Acosta-Serrano, D.H. Molyneux, A new perspective on cutaneous leishmaniasis—Implications for global prevalence and burden of disease estimates, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2017) 2–6.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005739>.
- [4] P. de A. Machado, M.P.D. Carneiro, A. de J. Sousa-Batista, F.J.P. Lopes, A.P.C. de A. Lima, S.P. Chaves, A.C.R. Sodero, H.L. de Matos Guedes, Leishmanicidal therapy targeted to parasite proteases, *Life Sci.* 219 (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.01.015>.
- [5] P.R.L. Machado, F.V.O. Prates, V. Boaventura, T. Lago, L.H. Guimarães, A. Schriefer, T.W.F. Corte, G. Penna, A. Barral, M. Barral-Netto, E.M. Carvalho, A Double-blind, Randomized Trial to Evaluate Miltefosine and Topical Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil, *Clin. Infect. Dis.* (2020) 1–5. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1337>.
- [6] R.S. Costa, L.P. Carvalho, T.M. Campos, A.S. Magalhães, S.T. Passos, A. Schriefer, J.A. Silva, E. Lago, C.S. Paixão, P. Machado, P. Scott, E.M. Carvalho, Early Cutaneous Leishmaniasis Patients Infected With *Leishmania braziliensis* Express Increased Inflammatory Responses After Antimony Therapy, *J. Infect. Dis.* 217 (2018) 840–850. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix627>.
- [7] M.G. Saldanha, C. Pagliari, A. Queiroz, P.R.L. Machado, L. Carvalho, P. Scott, E.M. Carvalho, S. Arruda, Tissue Damage in Human Cutaneous Leishmaniasis: Correlations Between Inflammatory Cells and Molecule Expression, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10 (2020) 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00355>.
- [8] M. Ghorbani, R. Farhoudi, Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy?, *Drug Des. Devel. Ther.* 12 (2018) 25–40.

- <https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521>.
- [9] B.M. Roatt, J.M. de Oliveira Cardoso, R.C.F. De Brito, W. Coura-Vital, R.D. de Oliveira Aguiar-Soares, A.B. Reis, Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104 (2020) 8965–8977. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10856-w>.
- [10] A.S. Surur, A. Fekadu, E. Makonnen, A. Hailu, Challenges and Opportunities for Drug Discovery in Developing Countries: The Example of Cutaneous Leishmaniasis, *ACS Med. Chem. Lett.* 11 (2020) 2058–2062. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00446>.
- [11] S.S. Santos, R.V. de Araújo, J. Giarolla, O. El Seoud, E.I. Ferreira, Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 55 (2020) 105906. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105906>.
- [12] N.K. Kaushik, N. Kaushik, P. Attri, N. Kumar, C.H. Kim, A.K. Verma, E.H. Choi, Biomedical importance of indoles, *Molecules.* 18 (2013) 6620–6662. <https://doi.org/10.3390/molecules18066620>.
- [13] S.H. Ali, A.R. Sayed, Review of the synthesis and biological activity of thiazoles, *Synth. Commun.* 0 (2020) 1–31. <https://doi.org/10.1080/00397911.2020.1854787>.
- [14] T.A.R. dos Santos, A.C. da Silva, E.B. Silva, P.A.T. de Moraes Gomes, J.W.P. Espíndola, M.V. de Oliveira Cardoso, D.R.M. Moreira, A.C.L. Leite, V.R.A. Pereira, Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells, *Biomed. Pharmacother.* 82 (2016) 555–560. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.038>.
- [15] M.H.M. Helal, M.A. Salem, M.S.A. El-Gaby, M. Aljahdali, Synthesis and biological evaluation of some novel thiazole compounds as potential anti-inflammatory agents, *Eur. J. Med. Chem.* 65 (2013) 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.04.005>.
- [16] P.K. Deb, R. Kaur, B. Chandrasekaran, M. Bala, D. Gill, V.R. Kaki, R.R. Akkinapalli, R. Mailavaram, Synthesis, anti-inflammatory evaluation, and docking studies of some new thiazole derivatives, *Med. Chem. Res.* 23 (2014) 2780–2792. <https://doi.org/10.1007/s00044-013-0861-4>.
- [17] C.C. Pacca, R.E. Marques, J.W.P. Espindola, G.B.O.O. Filho, A.C.L. Leite, M.M. Teixeira, M.L. Nogueira, Thiosemicarbazones and Phthalyl-Thiazoles

- compounds exert antiviral activity against yellow fever virus and Saint Louis encephalitis virus, *Biomed. Pharmacother.* 87 (2017) 381–387.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.112>.
- [18] I.P. Singh, S. Gupta, S. Kumar, Thiazole Compounds as Antiviral Agents: An Update, *Med. Chem. (Los. Angeles)*. 16 (2020) 4–23.
<https://doi.org/10.2174/1573406415666190614101253>.
- [19] P. Arora, R. Narang, S. Bhatia, S.K. Nayak, S.K. Singh, B. Narasimhan, Synthesis, molecular docking and QSAR studies of 2, 4-disubstituted thiazoles as antimicrobial agents, *J. Appl. Pharm. Sci.* 5 (2015) 028–042.
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50206>.
- [20] I. Mishra, R. Mishra, S. Mujwar, P. Chandra, N. Sachan, A retrospect on antimicrobial potential of thiazole scaffold, *J. Heterocycl. Chem.* 57 (2020) 2304–2329. <https://doi.org/10.1002/jhet.3970>.
- [21] M.V.D.O. Cardoso, L.R.P. De Siqueira, E.B. Da Silva, L.B. Costa, M.Z. Hernandez, M.M. Rabello, R.S. Ferreira, L.F. Da Cruz, D.R. Magalhães Moreira, V.R.A. Pereira, M.C.A.B. De Castro, P. V. Bernhardt, A.C.L. Leite, 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation, *Eur. J. Med. Chem.* 86 (2014) 48–59.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.012>.
- [22] E. De Farias Santiago, S.A. De Oliveira, G.B. De Oliveira Filho, D.R. Magalhaes Moreira, P.A. Teixeira Gomes, A.L. Da Silva, A.F. De Barros, A.C. Da Silva, T.A. Ramos Dos Santos, V.R. Alves Pereira, G.G. Araújo Gonçalves, F.A. Brayner, L.C. Alves, A.G. Wanderley, A.C. Lima Leite, Evaluation of the anti-*Schistosoma mansoni* activity of thiosemicarbazones and thiazoles, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 352–363. <https://doi.org/10.1128/AAC.01900-13>.
- [23] P.A.T. De Moraes Gomes, A.R. Oliveira, M.V. De Oliveira Cardoso, E. De Farias Santiago, M. De Oliveira Barbosa, L.R.P. De Siqueira, D.R.M. Moreira, T.M. Bastos, F.A. Brayner, M.B.P. Soares, A.P. De Oliveira Mendes, M.C.A.B. De Castro, V.R.A. Pereira, A.C.L. Leite, Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*, *Eur. J. Med. Chem.* 111 (2016) 46–57.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.010>.
- [24] G.B. de Oliveira Filho, M.V. de O. Cardoso, J.W.P. Espíndola, D.A. Oliveira e Silva, R.S. Ferreira, P.L. Coelho, P.S. dos Anjos, E. de S. Santos, C.S. Meira,

- D.R.M. Moreira, M.B.P. Soares, A.C.L. Leite, Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of thiazoles against *Trypanosoma cruzi*, *Eur. J. Med. Chem.* 141 (2017) 346–361. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.047>.
- [25] M. de Oliveira Barbosa, S.A. de Oliveira, C.A.L.M. Filho, A.R. Oliveira, C.J.B. Fernandes, J.P. Lucena, F.A. de Sousa, M.C.H. de Barros Dias, F.A. Brayner, L.C. Alves, A.C.L. Leite, Schistosomicidal and prophylactic activities of phthalimido-thiazoles derivatives on schistosomula and adult worms, *Eur. J. Pharm. Sci.* 133 (2019) 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.03.008>.
- [26] A.S. dos S. Aliança, A.R. Oliveira, A.P.S. Feitosa, K.R.C. Ribeiro, M.C.A.B. de Castro, A.C.L. Leite, L.C. Alves, F.A. Brayner, In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives, *Eur. J. Pharm. Sci.* 105 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.005>.
- [27] C.M. Queiroz, G.B. de Oliveira Filho, J.W.P. Espíndola, A.V. do Nascimento, A.S. dos S. Aliança, V.M.B. de Lorena, A.P.S. Feitosa, P.R. da Silva, L.C. Alves, A.C.L. Leite, F.A. Brayner, Thiosemicarbazone and thiazole: in vitro evaluation of leishmanicidal and ultrastructural activity on *Leishmania infantum*, *Med. Chem. Res.* 29 (2020) 2050–2065. <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02619-z>.
- [28] A.S. Dos Santos Aliança, K.F.L. Dos Anjos, T.N. De Vasconcelos Reis, T.M.M. Higino, M.C.A. Brelaz-De-Castro, É.M. Bianco, R.C.B.Q. De Figueiredo, The in Vitro biological activity of the Brazilian brown seaweed dictyota mertensii against *Leishmania amazonensis*, *Molecules*. 19 (2014) 14052–14065. <https://doi.org/10.3390/molecules190914052>.
- [29] E.O. Köse, I.G. Deniz, C. Sarikürkçü, Ö. Aktaş, M. Yavuz, Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Sideritis erythrantha* Boiss. and Heldr. (var. *erythrantha* and var. *cedretorum* P.H. Davis) endemic in Turkey, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 2960–2965. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.033>.
- [30] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- [31] P. Prieto, M. Pineda, M. Aguilar, Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E, *Anal. Biochem.* 269 (1999) 337–341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>.

- [32] L.S. Costa, G.P. Fidelis, C.B.S. Telles, N. Dantas-Santos, R.B.G. Camara, S.L. Cordeiro, M.S.S.P. Costa, J. Almeida-Lima, R.F. Melo-Silveira, R.M. Oliveira, I.R.L. Albuquerque, G.P.V. Andrade, H.A.O. Rocha, Antioxidant and antiproliferative activities of heterofucans from the seaweed *Sargassum filipendula*, *Mar. Drugs*. 9 (2011) 952–966. <https://doi.org/10.3390/md9060952>.
- [33] P.R. da Silva, J.F. de Oliveira, A.L. da Silva, C.M. Queiroz, A.P.S. Feitosa, D.M.F.A. Duarte, A.C. da Silva, M.C.A.B. de Castro, V.R.A. Pereira, R.M.F. da Silva, L.C. Alves, F.A.B. dos Santos, M. do C.A. de Lima, Novel indol-3-yl-thiosemicarbazone derivatives: Obtaining, evaluation of in vitro leishmanicidal activity and ultrastructural studies, *Chem. Biol. Interact.* 315 (2020) 108899. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108899>.
- [34] N. Karah, Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new 5-nitroindole-, *Eur. J. Med. Chem.* 37 (2002) 909–918.
- [35] M.V.N. De Souza, S.B. Ferreira, J.S. Mendonça, M. Costa, F.R. Rebello, Métodos de obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos, *Quim. Nova*. 28 (2005) 77–84. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422005000100016>.
- [36] A.C. da Silva, T.A.R. dos Santos, I.V.B. da Silva, M.V.G. de Oliveira, D.R.M. Moreira, A.C.L. Leite, V.R.A. Pereira, Aryl thiosemicarbazones: In vitro and immunomodulatory activities against *L. amazonensis*, *Exp. Parasitol.* 177 (2017) 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.003>.
- [37] E.G. Pinto, I.O. Santos, T.J. Schmidt, S.E.T. Borborema, V.F. Ferreira, D.R. Rocha, A.G. Tempone, Potential of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones against *Leishmania (L.) infantum*: Biological activity and structure-activity relationships, *PLoS One*. 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105127>.
- [38] M. Zaldini Hernandez, S.T. Melo Cavalcanti, D.M. Rodrigo Moreira, W. Filgueira de Azevedo Junior, A. Cristina Lima Leite, Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design, *Curr. Drug Targets*. 11 (2010) 303–314.
- [39] N.P. De Sá, C.M. De Lima, C.I. Lino, P.J.S. Barbeira, L. de M. Baltazar, D.A. Santos, R.B. De Oliveira, E. Mylonakis, B.B. Fuchs, S. Johann, Heterocycle thiazole compounds exhibit antifungal activity through increase in the production of reactive oxygen species in the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii*

- species complex, *Antimicrob. Agents Chemother.* 61 (2017) 1–27.
<https://doi.org/10.1128/AAC.02700-16>.
- [40] G. Shahnaz, B.J. Edagwa, J. McMillan, S. Akhtar, A. Raza, N.A. Qureshi, M. Yasinzaï, H.E. Gendelman, Development of mannose-anchored thiolated amphotericin B nanocarriers for treatment of visceral leishmaniasis, *Nanomedicine*. 12 (2017) 99–115. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0325>.
- [41] J.S. de Toledo, P.E.S. Junior, V. Manfrim, C.F. Pinzan, A.S. de Araujo, A.K. Cruz, F.S. Emery, Synthesis, cytotoxicity and in vitro antileishmanial activity of naphthothiazoles, *Chem. Biol. Drug Des.* 81 (2013) 749–756.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.12123>.
- [42] V.V.G. de Oliveira, M.A. Aranda de Souza, R.R.M. Cavalcanti, M.V. de Oliveira Cardoso, A.C.L. Leite, V.A. da Silva Junior, R.C.B.Q. de Figueiredo, Study of in vitro biological activity of thiazoles on *Leishmania (Leishmania) infantum*, *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 22 (2020) 414–421.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.028>.
- [43] Y.Y. Hu, J. Wang, T.J. Li, R.R. Yadav Bheemanaboina, M.F. Ansari, Y. Cheng, C.H. Zhou, An unexpected discovery toward novel membrane active sulfonyl thiazoles as potential MRSA DNA intercalators, *Future Med. Chem.* 12 (2020) 1709–1727. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0303>.
- [44] M. Djukic, M. Fesatidou, I. Xenikakis, A. Geronikaki, V.T. Angelova, V. Savic, M. Pasic, B. Krilovic, D. Djukic, B. Gobeljic, M. Pavlica, A. Djuric, I. Stanojevic, D. Vojvodic, L. Saso, In vitro antioxidant activity of thiazolidinone derivatives of 1,3-thiazole and 1,3,4-thiadiazole, *Chem. Biol. Interact.* 286 (2018) 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.03.013>.
- [45] V. Jaishree, N. Ramdas, J. Sachin, B. Ramesh, In vitro antioxidant properties of new thiazole derivatives, *J. Saudi Chem. Soc.* 16 (2012) 371–376.
<https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.02.007>.
- [46] Y. Kaddouri, F. Abrigach, E.B. Yousfi, M. El Kodadi, R. Touzani, New thiazole, pyridine and pyrazole derivatives as antioxidant candidates: synthesis, DFT calculations and molecular docking study, *Heliyon*. 6 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03185>.
- [47] S. Kim, D.G. Lee, *Oxidative Stress in Microbial Diseases*, 1st ed., Springer Singapore, Singapore, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-8763-0>.
- [48] H. Sies, C. Berndt, D.P. Jones, *Oxidative Stress*, *Annu. Rev.* 86 (2017) 715–748.

- <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>.
- [49] O. Firuzi, R. Miri, M. Tavakkoli, L. Saso, Antioxidant Therapy: Current Status and Future Prospects, *Curr. Med. Chem.* 18 (2012) 3871–3888.
<https://doi.org/10.2174/092986711803414368>.
- [50] R.F.S. Menna-Barreto, Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill, *Cell Death Dis.* 10 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1370-2>.
- [51] M. das G.F. de Medeiros, A.C. da Silva, A.M. das G.L. Citó, A.R. Borges, S.G. de Lima, J.A.D. Lopes, R.C.B.Q. Figueiredo, In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham, *Parasitol. Int.* 60 (2011) 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.03.004>.
- [52] S.R.B. Uliana, C.T. Trinconi, A.C. Coelho, Chemotherapy of leishmaniasis: Present challenges, *Parasitology*. 145 (2018) 464–480.
<https://doi.org/10.1017/S0031182016002523>.

6 CONCLUSÕES

- a) Todos os compostos derivados de isatina-tiossemicarbazonas e isatina-hidrazona-tiazóis demonstraram atividade frente à formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e baixa toxicidade em células de mamífero;
- b) Os compostos da classe tiossemicarbazona (PA-Int5 e PA-Int6) foram mais promissores contra *L.braziliensis* quando comparados aos tiazólicos (PA-1B e PA-1J), por apresentarem maior seletividade aos parasitas do que para células de mamífero;
- c) Os protótipos PA-Int5, PA-Int6, PA-1B e PA-1J apresentaram efeitos antiproliferativos em amastigotas de *L. braziliensis*;
- d) O composto PA-1J demonstrou potencial antioxidante superior aos demais compostos estudados (PA-1B, PA-Int5 e PA-Int6), equiparando-se aos padrões antioxidantes sintéticos;
- e) As mudanças ultraestruturais induzidas pelo tratamento com PA-Int5 e PA-Int6 apontam a autofagia como um dos possíveis mecanismos de morte celular em formas promastigotas de *L. braziliensis*, enquanto para PA-1B e PA-1J não foi possível elucidar o processo que causou perda de viabilidade celular destes parasitas;
- f) PA-Int5, PA-Int6, PA-1B e PA-1J não induziram alterações significativas no potencial de membrana mitocondrial, demonstrando que a mitocôndria não é uma organela alvo destes compostos;
- g) Nossos dados embasam estudos futuros acerca da otimização dos compostos PA-Int5, PA-Int6, PA-1B e PA-1J, a fim de que apresentem maior seletividade aos parasitas e permaneçam sem causar danos às células hospedeiras.

REFERÊNCIAS

- ABDU-RAHEM, L. R.; AHMAD, A. K.; ABACHI, F. T. Synthesis And Medicinal Attributes Of Thiazole Derivatives: A Review Synthesis And Medicinal Attributes Of Thiazole Derivatives: A Review, n. January, 2021.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. **Acta Tropica**, v. 172, n. January, p. 86–90, 2017.
- ALBERIO, S. O. *et al.* Ultrastructural and cytochemical identification of megasome in *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Parasitology Research**, v. 92, n. 3, p. 246–254, 2004.
- ALCÂNTARA, L. M. *et al.* Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 430–439, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.09.006>>.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, p. 1–6, 2017.
- ALIANÇA, A. S. S. *et al.* The in Vitro biological activity of the Brazilian brown seaweed dictyota mertensii against *Leishmania amazonensis*. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14052–14065, 2014.
- ALIANÇA, A. S. 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, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.005>>.
- ALONSO, L. *et al.* Membrane dynamics in *Leishmania amazonensis* and antileishmanial activities of β -carboline derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1863, n. 1, p. 183473, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183473>>.
- AMORIM, C. F. *et al.* Variable gene expression and parasite load predict treatment outcome in cutaneous leishmaniasis. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 519, p. 1–10, 2019.
- AN, I. *et al.* The effect of pentavalent antimonial compounds used in the treatment of cutaneous leishmaniasis on hemogram and biochemical parameters. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 294–297, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15569527.2019.1610887>>.
- ANVERSA, L. S. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associacao Medica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.
- ARONSON, N. E.; JOYA, C. A. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 101–117, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.004>>.

ARORA, P. *et al.* Synthesis, molecular docking and QSAR studies of 2, 4-disubstituted thiazoles as antimicrobial agents. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 2, p. 028–042, 2015.

ATYATOLLAHI, J.; BAFGHI, A. F.; SHAHCHERAGHI, S. H. Chronic zoster-form: A rare variant of cutaneous leishmaniasis. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 114–115, 2015.

AWASTHI, B. P.; MITRA, K. In vitro leishmanicidal effects of the anti-fungal drug natamycin are mediated through disruption of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction. **Apoptosis**, v. 23, n. 7–8, p. 420–435, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10495-018-1468-5>>.

BAILEY, F. *et al.* A new perspective on cutaneous leishmaniasis—Implications for global prevalence and burden of disease estimates. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, p. 2–6, 2017.

BANDGAR, B.P. *et al.* Synthesis of new heterocyclic hybrids based on pyrazole and thiazolidinone scaffolds as potent inhibitors of tyrosinase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n.10, p. 2772–2777, 2013.

BANERJEE, H.; KNOBLACH, B.; RACHUBINSKI, R. A. The early-acting glycosome biogenic protein Pex3 is essential for trypanosome viability. **Life Science Alliance**, v. 2, n. 4, p. 1–9, 2019.

BASILE, G. *et al.* Refractory mucocutaneous leishmaniasis resolved with combination treatment based on intravenous pentamidine, oral azole, aerosolized liposomal amphotericin B, and intralesional meglumine antimoniate. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 97, p. 204–207, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.003>>.

BASMACIYAN, L. *et al.* (De)glutamylation and cell death in Leishmania parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, p. 1–18, 2019.

BASMACIYAN, L. *et al.* Temporal analysis of the autophagic and apoptotic phenotypes in Leishmania parasites. **Microbial Cell**, v. 5, n. 9, p. 404–417, 2018.

BASMACIYAN, L.; CASANOVA, M. Experimental Parasitology. **Parasite**, v. 26, p. 71, 2019.

BENNIS, I. *et al.* Psychosocial impact of scars due to cutaneous leishmaniasis on high school students in Errachidia province, Morocco. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2017.

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

BERBERT, T. R. N. *et al.* Pentavalent antimonials combined with other therapeutic alternatives for the treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: A systematic review. **Dermatology Research and Practice**, v. 2018, 2018.

BERENGUER, D. *et al.* Topical amphotericin B semisolid dosage form for cutaneous leishmaniasis: Physicochemical characterization, ex vivo skin permeation and biological activity. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 1–16, 2020.

BÉRUBÉ, G. An overview of molecular hybrids in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 11, n. 3, p. 281–305, 2016.

BILGIC-TEMEL, A.; MURRELL, D. F.; UZUN, S. Cutaneous leishmaniasis: A neglected disfiguring disease for women. **International Journal of Women's Dermatology**, v. 5, n. 3, p. 158–165, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2019.01.002>>.

BISETEGN, H. *et al.* Clinical, parasitological and molecular profiles of cutaneous leishmaniasis and its associated factors among clinically suspected patients attending borumeda hospital, north-east ethiopia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1–13, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008507>>.

BLAU, L. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazone as antichagasic candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, p. 142–151, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.04.022>>.

BOCXLAER, K. VAN; CROFT, S. L. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in the treatment of cutaneous leishmaniasis – challenges and opportunities. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 0, 2021.

BRAGA, S. F. P. *et al.* Synthesis and cytotoxicity evaluation of thiosemicarbazones and their thiazole derivatives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 2, p. 299–307, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. [S.l.]: [s.n.], 2017.

BRITTA, E. A. *et al.* Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2014.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CARDOSO, M.V.O. *et al.* 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*T. cruzi* agents: Structural design, synthesis and Pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 1-18, 2014.

CAVALCANTI, D. P.; SOUZA, W. DE. The kinetoplast of trypanosomatids: From early studies of electron microscopy to recent advances in atomic force microscopy. **Scanning**, v. 2018, 2018.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251–1265, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1609940>>.

COMANDOLLI- GANIM, M. A. *et al.* Analysis of DNA protection, interaction and antimicrobial activity of isatin derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 1271–1278, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.084>>.

CORRAL, M. J. *et al.* Allicin Induces Calcium and Mitochondrial Dysregulation Causing Necrotic Death in Leishmania. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–22, 2016.

COSER, E. M. *et al.* Activity of paromomycin against Leishmania amazonensis: Direct correlation between susceptibility in vitro and the treatment outcome in vivo. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 14, n. August, p. 91–98, 2020.

COSTA, L.S.F. *et al.* Antioxidant and antiproliferative activities of heterofucans from the seaweed Sargassum filipendula. **Marine Drugs**, v.9, n. 6, p. 952–966, 2011.

DAS, P.; SAHA, S.; BOSEDASGUPTA, S. The ultimate fate determinants of drug induced cell-death mechanisms in trypanosomatids. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 15, n. December 2020, p. 81–91, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.01.003>>.

DEB, P. K. *et al.* Synthesis, anti-inflammatory evaluation, and docking studies of some new thiazole derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 6, p. 2780–2792, 2014.

DOCAMPO, R. *et al.* **New insights into roles of acidocalcisomes and contractile vacuole complex in osmoregulation in protists**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., v. 305, 2013

DOCAMPO, R.; ULRICH, P.; MORENO, S. N. J. Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1541, p. 775–784, 2010.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES AND INITIATIVE (DNDi). **Boletim informativo da redeLEISH-4^a edição**. p. 1–12, 2019. Disponível em: https://dndi.org/wp-content/uploads/2019/08/2019InformativoRedeLEISH_POR.pdf. Acesso em: 02 jan.2021.

DU, X. *et al.* Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal**

Medicine Chemistry, v.45, p.2695-2707, 2002.

DURANTE, I. M.; CÁMARA, M. D. L. M.; BUSCAGLIA, C. A. A novel Trypanosoma cruzi protein associated to the flagellar pocket of replicative stages and involved in parasite growth. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–28, 2015.

EMILIANO, Y. S. S.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Efficacy of Apigenin and Miltefosine Combination Therapy against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 8, p. 1910–1913, 2018.

ESFANDIARI, F. *et al.* Erratum: Paromomycin-loaded mannosylated chitosan nanoparticles: Synthesis, characterization and targeted drug delivery against leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 197, n. July, p. 105072, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105072>>.

ESPÍNDOLA, J. W. P. *et al.* Synthesis and structure-activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxyl thiosemicarbazones inhibiting Trypanosoma cruzi cruzain. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 818–835, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.048>>.

FARIAS SANTIAGO, E. DE *et al.* Evaluation of the anti-Schistosoma mansoni activity of thiosemicarbazones and thiazoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 352–363, 2014.

FERNANDES RODRIGUES, J.; SOUZA, W. Ultrastructural Alterations in Organelles of Parasitic Protozoa Induced by Different Classes of Metabolic Inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 9, p. 925–938, 2008.

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

FILHO, C. A. L. M. *et al.* In vitro and in vivo activities of multi-target phtalimido-thiazoles on Schistosomiasis mansoni. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 146, n. January, p. 105236, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105236>>.

FONSECA, N. C. *et al.* Synthesis of a sugar-based thiosemicarbazone series and structure-activity relationship versus the parasite cysteine proteases rhodesain, cruzain, and Schistosoma mansoni cathepsin B1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2666–2677, 2015.

FRAGA, C. A. M. Drug hybridization strategies: Before or after lead identification? **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 4, n. 6, p. 605–609, 2009.

GADELHA, E. P. N. *et al.* An open label randomized clinical trial comparing the safety and effectiveness of one, two or three weekly pentamidine isethionate doses (seven milligrams per kilogram) in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the Amazon Region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1–13, 2018.

GADELHA, E. P. N. *et al.* Efficacy and safety of a single dose pentamidine (7mg/kg) for patients with cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis*: A pilot study. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 6, p. 807–813, 2015.

GANIM, M. A. *et al.* Analysis of DNA protection, interaction and antimicrobial activity of isatin derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 1271–1278, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.084>>.

GOMES, M. N. *et al.* Chalcone derivatives: Promising starting points for drug design. **Molecules**, v. 22, n. 8, 2017.

GREENBAUM, D. C. *et al.* Synthesis and Structure - Activity Relationships of Parasitocidal Thiosemicarbazone Cysteine Protease Inhibitors against *Plasmodium falciparum*. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 3212–3219, 2004.

GÜTHER, M. L. S. *et al.* High-confidence glycosome proteome for procyclic form *trypanosoma brucei* by epitope-tag organelle enrichment and SILAC proteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 6, p. 2796–2806, 2014.

HAANSTRA, J. R. *et al.* Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 5, p. 1038–1048, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.015>>.

HAŁDYS, K.; LATAJKA, R. Thiosemicarbazones with tyrosinase inhibitory activity. **MedChemComm**, v. 10, n. 3, p. 378–389, 2019.

HELAL, M. H. M. *et al.* Synthesis and biological evaluation of some novel thiazole compounds as potential anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, p. 517–526, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.04.005>>.

HERRERA-ACEVEDO, C. *et al.* Discovery of Alternative Chemotherapy Options for Leishmaniasis via Computational Studies of Asteraceae. **ChemMedChem**, 2020.

HILL, K. L. Biology and mechanism of trypanosome cell motility. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 2, p. 200–208, 2003.

HUSEIN-ELAHMED, H.; GIELER, U.; STEINHOFF, M. Evidence supporting the enhanced efficacy of pentavalent antimonials with adjuvant therapy for cutaneous leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 34, n. 10, p. 2216–2228, 2020.

IBRAHIM, A. B. M.; FARH, M. K.; MAYER, P. Copper complexes of new thiosemicarbazone ligands: Synthesis, structural studies and antimicrobial activity. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 94, p. 127–132, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.inoche.2018.06.019>>.

JAAFARI, M. R. *et al.* Development of a topical liposomal formulation of Amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **International Journal**

for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v. 11, n. September, p. 156–165, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.09.004>>.

JAMAL, E.S. *et al.* Thiosemicarbazone Complexes as Versatile Medicinal Chemistry Agents: A Review, v. 9, n. 3, p. 689–703, 2019.

JENSEN, R. E.; ENGLUND, P. T. Network news: The replication of kinetoplast DNA. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, p. 473–491, 2012.

KESSLER, R.L. Response to Sterol Biosynthesis Inhibitors: Morphophysiological Alterations Leading to Cell Death. **PLoS ONE**, v.8, n.1, p. 55497, 2013.

KOSE, E.O.; AKTAS, O.; DENIZ, I.G.; SARIKURKCU, C. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of endemic *Ferula lycia* Boiss. **Journal of Medicinal Plants Research**, 4:1698–1703, 2010.

KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 2009.

LALATSA, A. *et al.* Topical buparvaquone nano-enabled hydrogels for cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 588, p. 119734, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119734>>.

LIDANI, K. C. F. *et al.* Visceral Leishmaniasis and Natural Infection Rates of *Leishmania* in *Lutzomyia longipalpis* in Latin America. **The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis**, 2017.

LUKEŠ, J. *et al.* Structures and Organelles in Pathogenic Protists. **Structures and Organelles in Pathogenic Protists**, v. 17, n. September, p. 228–252, 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-12863-9%5Cnhttp://link.springer.com/10.1007/978-3-642-12863-9>>.

LYRA, M. R.; PASSOS, S. R. L.; PIMENTEL, M. I. F. Pancreatic Toxicity As an Adverse Effect Induced By Meglumine Antimoniate. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 5, 2016.

MCMAHON-PRATT, D.; UEDA-NAKAMURA, T.; TRAUB-CSEKO, Y.M. Megasomes in *Leishmania*. **Structures and Organelles in Pathogenic Protists, Microbiology Monographs**, v.17, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-642-12863-9_6.

MANN, S. *et al.* Case Report: Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* in Two Travelers Successfully Treated with Miltefosine. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 3, p. 1081–1084, 2020.

MARIÑO, G. *et al.* Self-consumption: The interplay of autophagy and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 81–94, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3735>>.

MASOUD, G.N. *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of new 4thiazolidinone derivatives substituted with benzimidazole ring as potential chemotherapeutic agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, p. 707–725, 2012.

MATOS, A. P. S. *et al.* A review of current treatments strategies based on paromomycin for leishmaniasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, n. March, 2020.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MEDVEDEV, A. *et al.* Isatin, an endogenous nonpeptide biofactor: A review of its molecular targets, mechanisms of actions, and their biomedical implications. **BioFactors**, v. 44, n. 2, p. 95–108, 2018.

MEIRELES, C. B. *et al.* Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. **Acta Tropica**, v. 172, n. March, p. 240–254, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.05.022>>.

MENNA-BARRETO, R. F. S. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 2, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-1370-2>>.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; CASTRO, S. L. DE. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: The pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

MIRANDA, N. *et al.* The photodynamic action of pheophorbide a induces cell death through oxidative stress in *Leishmania amazonensis*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 174, p. 342–354, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.08.016>>.

MISHRA, I. *et al.* A retrospect on antimicrobial potential of thiazole scaffold. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2304–2329, 2020.

MORADI, R.; ZIARANI, G. M.; LASHGARI, N. Recent applications of isatin in the synthesis of organic compounds. **Arkivoc**, v. 2017, n. 1, p. 148–201, 2017.

MORAES GOMES, P. A. T. DE *et al.* Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 111, p. 46–57, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.010>>.

MOREIRA, D.R. *et al.* Structural investigation of anti-*Trypanosoma cruzi* 2-iminothiazolidin-4-ones allows the investigation of agents with efficacy in infected mice. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 10918–10936, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, n. 65, p. 55-63, 1983.

MURBACK, N. D. N. *et al.* American cutaneous leishmaniasis: clinical, epidemiological and laboratory studies conducted at a university teaching. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 55-63, 2011.

NAVAS, A., *et al.* Profiles of local and systemic inflammation in the outcome of treatment of human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **Infection and Immunity**, v. 88, n.3, p. e00764-19, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.00764-19>.

NGUYEN, A. K. *et al.* Microneedle-Based Delivery of Amphotericin B for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Biomedical Microdevices**, v. 21, n. 1, 2019.

NIYOGI, S. *et al.* Rab32 is essential for maintaining functional acidocalcisomes, and for growth and infectivity of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 12, p. 2363–2373, 2015.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and economic burden of human leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 489–493, 2016.

OLIVEIRA BARBOSA, M. DE *et al.* Schistosomicidal and prophylactic activities of phthalimido-thiazoles derivatives on schistosomula and adult worms. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 133, p. 15–27, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.03.008>.

OLIVEIRA FILHO, G. B. DE *et al.* Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of thiazoles against *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 141, p. 346–361, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.047>.

OLIVEIRA, L. F. *et al.* Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87–96, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.007>.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 925–932, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.06.021>.

OYAMA, J. *et al.* American tegumentary leishmaniasis: diagnostic and treatment challenges in a clinical case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v.60, n.3, 2018.

PACCA, C. C. *et al.* Thiosemicarbazones and Phthalyl-Thiazoles compounds exert antiviral activity against yellow fever virus and Saint Louis encephalitis virus. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 87, p. 381–387, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.112>.

PAIVA, R. De O. *et al.* Atividade antifúngica de tiosemicarbazonas e semicarbazonas frente a fungos micotoxigênicos. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 38, n. 6, p. 531–537, 2014.

PEDRA-REZENDE, Y. *et al.* Starvation and pH stress conditions induced mitochondrial dysfunction, ROS production and autophagy in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1867, n. 2, p. 166028, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.166028>>.

PHOGAT, P.; SINGH, P. A Mini Review on Central Nervous System Potential of Isatin Derivatives. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 28–31, 2015.

PIETRO, P. *et al.* Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337–341, 1999.

PIZZO, C. *et al.* Synthesis of 2-hydrazolyl-4-thiazolidinones based on multicomponent reactions and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 77, p. 166–172, 2011.

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.

PRAJAPATI, N. P.; PATEL, H. D. Novel thiosemicarbazone derivatives and their metal complexes: Recent development. **Synthetic Communications**, v. 49, n. 21, p. 2767–2804, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00397911.2019.1649432>>.

PROTO, W. R.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Cell death in parasitic protozoa: Regulated or incidental? **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 58–66, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2929>>.

QUEIROZ, C. M. *et al.* Thiosemicarbazone and thiazole: in vitro evaluation of leishmanicidal and ultrastructural activity on *Leishmania infantum*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, n. 11, p. 2050–2065, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00044-020-02619-z>>.

RAMADAN, M. A. G. *et al.* Evaluation of biological activity of 5-fluoro-isatin thiosemicarbazone derivatives. **Journal of Nanostructures**, v. 10, n. 3, p. 509–517, 2020.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet**, v.7, 2007.

RODRIGUES, B. C. *et al.* A retrospective cohort study of the effectiveness and adverse events of intralesional pentavalent antimonials in the treatment of cutaneous

leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 14, n. November, p. 257–263, 2020.

SAGNOU, M. *et al.* Novel Isatin Thiosemicarbazone Derivatives as Potent Inhibitors of β -Amyloid Peptide Aggregation and Toxicity. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 11, n. 15, p. 2266–2276, 2020.

SALINAS, G. Forum Issue Editorial An Update on Redox Biology of Parasites. **Metabolism Clinical And Experimental**, [s.d.]. p. 1–12, 2013.

SANGENITO, L. S. *et al.* Leishmaniasis and Chagas Disease – Neglected Tropical Diseases: Treatment Updates. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 174–177, 2019.

SANTOS RODRIGUES, B. DOS *et al.* 4-Fluorobenzaldehyde limonene-based thiosemicarbazone induces apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. **Life Sciences**, v. 203, n. 2017, p. 141–149, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.024>>.

SANTOS, T. A. R. DOS *et al.* Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 82, p. 555–560, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.038>>.

SCARIOT, D. B. *et al.* Induction of early autophagic process on *Leishmania amazonensis* by synergistic effect of miltefosine and innovative semi-synthetic thiosemicarbazone. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, p. 1–16, 2017.

SHALEV, M. *et al.* Structural basis for selective targeting of leishmanial ribosomes: Aminoglycoside derivatives as promising therapeutics. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 17, p. 8601–8613, 2015.

SHAW, C. D. *et al.* Genomic and Metabolomic Polymorphism among Experimentally Selected Paromomycin-Resistant *Leishmania donovani* Strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 1, p. 1–14, 2020.

SHIRZADI, M. R. <p>Liposomal amphotericin B: a review of its properties, function, and use for treatment of cutaneous leishmaniasis</p>. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 10, p. 11–18, 2019.

SILVA, E. B. DA *et al.* Design and synthesis of potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 130, p. 39–50, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.02.026>>.

SILVA, J. B. P. DA *et al.* Thiosemicarbazones as *Aedes aegypti* larvicidal. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 100, p. 162–175, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.061>>.

SILVA, J. *et al.* Dynamics of American tegumentary leishmaniasis in a highly endemic region for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in northeast Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1–14, 2017.

SILVA, P. R. DA *et al.* Novel indol-3-yl-thiosemicarbazone derivatives: Obtaining, evaluation of in vitro leishmanicidal activity and ultrastructural studies. [S.l.]: **Elsevier B.V.**, v. 315, 2020.

SINGH, I. P.; GUPTA, S.; KUMAR, S. Thiazole Compounds as Antiviral Agents: An Update. **Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 4–23, 2020.

SOARES, M. A. *et al.* Thiosemicarbazones as inhibitors of tyrosinase enzyme. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 15, p. 3546–3550, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.057>>.

SOUZA, W. DE. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 313–325, 2008.

SOUZA, W. DE; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. F. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, n. 10, p. 2069–2080, 2009.

SOUZA, W. DE; CARVALHO, T. M. U. DE; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.

SUNDAR, S.; SINGH, A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: Present and future developments. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 481–489, 2018.

TAMIRU, H. F. *et al.* Cutaneous leishmaniasis a neglected tropical disease: Community knowledge, attitude and practices in an endemic area, Northwest Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2019.

TEIXEIRA, D.E. *et al.* **Atlas didático: Ciclo de vida da Leishmania**. [S.l.]: [s.n.], 2013.

TOMÁS, A. M., & CASTRO, H. Redox Metabolism in Mitochondria of *Trypanosomatids*. **Antioxidants & Redox Signaling**, 19(7), 696–707, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/ars.2012.4948>>.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, v. 6, p. 1–15, 2017.

UEDA-NAKAMURA, T.; ATTIAS, M.; SOUZA, W. DE. Comparative analysis of megasomes in members of the *Leishmania mexicana* complex. **Research in Microbiology**, v. 158, n. 5, p. 456–462, 2007.

UZUN, S. *et al.* Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey. **International Journal of Dermatology**, v. 57, n. 8, p. 973–982, 2018.

VALERO, N. N. H.; URIARTE, M. Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology Research**, v. 119, n. 2, p. 365–384, 2020.

VARIKUTI, S. *et al.* Host-directed drug therapies for neglected tropical diseases caused by protozoan parasites. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. NOV, p. 1–18, 2018.

VASCONCELOS, J. M. *et al.* American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, 2018.

VIEGAS-JUNIOR, C.; ELIEZER J. BARREIRO; CARLOS ALBERTO MANSSOUR FRAGA. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 17, p. 1829–1852, 2007.

WANG, J. *et al.* Design, synthesis and QSAR study of novel isatin analogues inspired Michael acceptor as potential anticancer compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, n. 2018, p. 493–503, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.043>>.

WARE, J. M. *et al.* Efficacy and Tolerability of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, p. 1–6, 2020.

WISASTRA, R. *et al.* Isothiazolones; Thiol-reactive inhibitors of cysteine protease cathepsin B and histone acetyltransferase PCAF. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 6, p. 1817–1822, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2018**. Disponível em: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/GHO_CL_2018.pdf?ua=1. Acesso em: 02 jan. 2021.

YANG, G.; CHOI, G.; NO, J. H. Antileishmanial mechanism of diamidines involves targeting kinetoplasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6828–6836, 2016.

ZABALA-PENAFIEL, A. *et al.* The potential of live attenuated vaccines against Cutaneous Leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 210, n. February, p. 107849, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107849>>.