



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIANA DA SILVA SANTOS

**DETERMINAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE NOVOS DERIVADOS AMINOGUANIDINA
HIDRAZONAS E OUTROS COMPOSTOS RELACIONADOS**

MACEIÓ- AL
2019

MARIANA DA SILVA SANTOS

**DETERMINAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE NOVOS DERIVADOS AMINO Guanidina
HIDRAZONAS E OUTROS COMPOSTOS RELACIONADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do título de doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Magna Suzana
Alexandre Moreira

Coorientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo
Júnior

**MACEIÓ- AL
2019**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

S237d Santos, Mariana da Silva.

Determinação do efeito citotóxico e avaliação do potencial leishmanicida *in vitro* de novos derivados aminoguanidina hidrazonas e outros compostos relacionados / Mariana da Silva Santos. – 2019.

59 f. : il. color.

Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.

Coorientador: João Xavier de Araújo Júnior.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 52-59.

1. Leishmaniose. 2. *Leishmania infantum*. 3. Doenças negligenciadas. I. Título.

CDU: 616.993.161



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Neto, S/N
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-000
E-mail: ppccsb@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Mariana da Silva Santos

Determinação do efeito citotóxico e avaliação do potencial leishmanicida in vitro de novos derivados aminoguanidina hidrazonas e outros compostos relacionados

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 8 de Março de 2019.

Banca Examinadora

Prof.ª Dr.ª Aline Cavalcanti de Queiroz - (UFAL - Arapiraca)

Prof.ª Dr.ª Eliane Aparecida Campesatto - (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Gabriela Muniz de Albuquerque Melo - (CESMAC)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida e saúde, além de todas as oportunidades concedidas;

A minha mãe, Célia, por toda coragem, amor, dedicação e pela educação que me foram dados, além de acreditar em mim, mesmo sem saber exatamente o caminho que eu estava trilhando;

Ao meu marido, Ricardo, por todos esses anos de amor e companheirismo em todos os momentos;

Ao professor Adriano Albert que a 13 anos atrás acreditou no potencial dos alunos da escola estadual Nossa Senhora do Bom Conselho (Maceió-AL), e assim se tornou o estopim da nossa mudança de vida;

A professora Magna Suzana Alexandre Moreira que mudou a minha vida quando me aceitou no laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI-UFAL) a 13 anos atrás, me apresentando o mundo da pesquisa;

A Thays Dias e Aline Cavalcanti minhas grandes amigas de longa data que foram cruciais no meu crescimento pessoal e profissional;

A Anderson Leite, Ana Carolina Vieira, Giani Cavalcante e Ana Rachel Lima por nossa amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório;

A Izadora Izidoro e Mayara Canuto por sermos as meninas superpoderosas desde a graduação;

A todos os meus companheiros de laboratório (LaFI) que tive a oportunidade de conhecer e conviver ao longo destes 13 anos;

A todos os professores que passaram pela minha vida e tornaram ela cada dia mais especial;

Aos professores João Xavier de Araújo Júnior, Thiago Mendonça de Aquino e Jean Jacque Bourguignon pela síntese das substâncias testadas;

Ao aluno Edeílido Ferreira por toda a colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos alunos Paulo França, Igor Nascimento, Paulo Fernando e Pedro Aquino pela colaboração;

A UFAL pela grande oportunidade de desenvolvimento do trabalho;

Aos órgãos de fomento: Capes, CNPQ, Fapeal e INCT-Inofar pelo financiamento do trabalho;

A Banca de defesa por ter aceitado o meu convite.

RESUMO

SANTOS, M. S. **Determinação do efeito citotóxico e avaliação do potencial leishmanicida *in vitro* de novos derivados aminoguanidina hidrazonas e outros compostos relacionados.** Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as Doenças de populações Negligenciadas (DPNs) afetam mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo. Dentre elas, as leishmanioses são responsáveis por acometer mais de 12 milhões de pessoas, sendo esperados em torno de dois milhões de novos casos por ano, nos cinco continentes, representando um grave problema de saúde pública. Até o momento a terapia medicamentosa disponível não é a ideal, tendo em vista que, os fármacos apresentam efeitos adversos significativos, longos regimes terapêuticos, além da maioria deles necessitar de administração parenteral. Neste sentido, a busca por novas alternativas terapêuticas se torna essencial. Assim, esse trabalho teve como objetivo determinar o potencial leishmanicida de novos derivados aminoguanidina hidrazonas e outros compostos relacionados. Inicialmente foram testados noventa derivados, destes sessenta e seis não apresentaram citotoxicidade para a célula hospedeira significativa, no ensaio de viabilidade celular pelo método de redução de MTT, até a máxima concentração testada, 10 μM . Estes, foram então submetidos ao ensaio contra amastigotas de *Leishmania infantum chagasi*, no qual foi possível observar que sete apresentaram atividade leishmanicida acima de 50% e CI_{50} menor que 10 μM , podendo ser comparados com o fármaco-padrão utilizado pentamidina que teve um efeito máximo de 67,3% e CI_{50} de 4,4 μM . Dentre os compostos mais ativos, estão dois derivados aminoguanidina hidrazonas: LQM 19 e LQM 55, um derivado guanilidrazônico heterocíclico aromático: LQM 195 e quatro derivados tiossemicarbazonas: LQM 08.1, LQM 17.1, LQM 95.1 e LQM 106.1. O derivado LQM 19 apresentou efeito máximo (EM) de 63,8% e concentração inibitória de 50% (CI_{50}) de 4,97 μM e o derivado LQM 55 teve EM de 63,5% e CI_{50} de 7,7 μM . Isso também foi visto para o derivado LQM 195 que apresentou um EM de 55,3% e CI_{50} de 0,06 μM . Bem como o derivado LQM 08.1 que teve um EM de 56,9% e uma CI_{50} de 8,73 μM , o mesmo pode ser visto para o derivado LQM 17.1 que teve um EM de 66,38% e uma CI_{50} de 2,2 μM , para o derivado LQM 95.1 que teve um EM de 60,2% e uma CI_{50} de 1,6 μM e também para o derivado LQM 106.1 que teve um EM de 60,4% e uma CI_{50} : 3,2 μM . Diante dos resultados promissores, foi necessário selecionar um derivado para a realização das modificações estruturais e como a classe das tiossemicarbazonas se destacou o derivado LQM 17.1 foi escolhido para a realização de modificações estruturais, na busca de um composto mais ativo, originando mais doze novos compostos, porém, as modificações realizadas não acarretaram em melhora da atividade. Dessa forma, conclui-se que é válido aprofundar os estudos com os sete derivados que se destacaram pela atividade leishmanicida contra amastigotas de *L. infantum chagasi*, através da avaliação dos mecanismos de ação e também a atividade leishmanicida sobre outras espécies de *Leishmania*, buscando aqueles que possam vir a ser futuros protótipos de fármacos.

Palavras-chave: Leishmaniose. *Leishmania chagasi*. Doenças negligenciadas.

ABSTRACT

SANTOS, M. S. **Determination of the cytotoxic effect and evaluation of the *in vitro* leishmanicide potential of new derivatives aminoguanidine hydrazones and other related compounds.** Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.

According to data from the World Health Organization (WHO), Neglected Populations Diseases (NPDs) affect more than one billion people worldwide. Among them, leishmaniasis is responsible for to affect more than 12 million people, being expected average two million new cases per year in the five continents, representing a serious public health problem. Until moment, available drug therapy is not ideal, given that drugs have significant adverse effects, long therapeutic regimens, and most of them require parenteral administration. In this sense, the search for new therapeutic alternatives becomes essential. Thus, this work aimed to determine the cytotoxic and leishmanicidal effect of new derivatives aminoguanidine hydrazones and other related compounds. Initially, ninety derivatives were tested, of which sixty-six not showed significant cytotoxicity in the MTT-reduced cell viability assay, up to the maximum concentration tested, 10 μM . These were then submitted to the amastigote assay of *Leishmania infantum chagasi*, in which it was possible to observe that eight presented leishmanicidal activity above 50% and IC_{50} less than 10 μM , and could be compared with the standard drug used pentamidine that had a maximum effect of the 67.3% e IC_{50} of the 4.4 μM . Among the most active compounds are two aminoguanidine hydrazone derivatives: LQM 19 and LQM 55, one aromatic heterocyclic guanylidrazonic derivative: LQM 195 and four thiosemicarbazones derivatives: LQM 08.1, LQM 17.1, LQM 95.1 and LQM 106.1. The LQM 19 derivative showed maximal effect (ME) of 63.8% and 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of 4.97 μM and LQM 55 derivative had ME of the 63.5% and IC_{50} of 7.7 μM . This was also seen for LQM 195 derivative had EM of 55.3% and an IC_{50} of 0.06 μM . As well as the LQM 08.1 derivative had EM of 56.9% and an IC_{50} of 8.73 μM , the same can be seen for the LQM 17.1 derivative had ME of 66.38% and an IC_{50} of 2.2 μM for the LQM 95.1 derivative had ME of 60.2% and an IC_{50} of the 1.6 μM and also for the LQM 106.1 derivative had ME of 60.4% and an IC_{50} of 3.2 μM . Given the promising results, it was necessary to select a derivative to perform the structural modifications and as the class of thiosemicarbazones stood out the LQM 17.1 derivative was chosen to perform structural modifications, seeking a more active compound, giving rise to twelve new compounds. However, the modifications made did not result in improvement of the activity. Thus, it is concluded that it is valid to deepen the studies with the seven derivatives that stand out for the leishmanicidal activity against amastigotes of *L. infantum chagasi*, through the evaluation of the mechanisms of action and also the leishmanicidal activity on other *Leishmania* species, seeking those that could be future drug prototypes.

Key words: Leishmaniasis. *Leishmania chagasi*. Neglected diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Individuo portador de Leishmaniose visceral, apresentando hepatoesplenomegalia.....	14
Figura 2 -	Manifestações clínicas da Leishmaniose tegumentar.....	15
Figura 3 -	Vetor da <i>Leishmania</i> : <i>Lutzomyia longipalpis</i>	15
Figura 4 -	Formas promastigotas de <i>Leishmania</i>	16
Figura 5 -	Formas amastigotas de <i>Leishmania</i>	16
Figura 6 -	Ciclo de vida dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	18
Figura 7 -	Distribuição da Leishmaniose Tegumentar, no ano de 2015	19
Figura 8 -	Distribuição da Leishmaniose Visceral, no ano de 2015.....	19
Figura 9 -	Estruturas químicas dos antimoniais pentavalentes.....	23
Figura 10 -	Estrutura química da Anfotericina B.....	24
Figura 11 -	Estrutura química da Pentamidina.....	25
Figura 12 -	Estrutura química da Miltefosina.....	25
Figura 13 -	Estrutura química da paramomicina.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Derivados aminoguanidina hidrazonas.....	33
Tabela 2 - Derivados guanilidrazônicos heterocíclicos aromáticos.....	38
Tabela 3 - Derivados guanilidrazônicos dissustituídos.....	41
Tabela 4 - Derivados tiossemicarbazônicos.....	44
Tabela 5 - Derivados guanilidrazônicos, tiossemicarbazônicos e semicarbazônicos <i>N</i> -substituídos.....	48
Tabela 6 - Derivados guanilidrazônicos e tiossemicarbazônicos ciclizados.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA:	Ácido desoxirribonucleíco
HIV:	Vírus da Imunodeficiência humana
AIDS:	Síndrome da imunodeficiência adquirida
PCR:	Reação em cadeia de polimerase
Sb(III):	Antimônio trivalente
Sb(V):	Antimônio pentavalente
mg:	Miligrama
Kg:	Quilograma
mM:	Milimolar
μ M:	Micromolar
SFB:	Soro fetal bovino
$^{\circ}$ C:	Graus Celsius
BOD:	Demanda Bioquímica de Oxigênio
rpm:	Rotações por minuto
mL:	Mililitro
CO ₂ :	Gás carbônico
μ L:	Microlitro
nM:	Nanometro
CI ₅₀ :	Concentração inibitória de 50%
PBS:	Tampão fosfato-salina
pH:	potencial hidrogeniônico
nd:	Não determinado
na:	Não ativo
nt:	Não tóxico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Leishmanioses.....	13
2.2 Aminoguanidina Hidrazonas (Guanilidrazonas) e outros compostos relacionados.....	25
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4 METODOLOGIA.....	29
4.1 Planejamento das substâncias	29
4.2 Preparação das substâncias	29
4.3 Ensaio farmacológicos <i>in vitro</i>.....	29
4.3.1 Cultura de parasitos.....	29
4.3.2 Manutenção de macrófagos.....	30
4.3.3 Determinação da citotoxicidade para a célula hospedeira.....	30
4.3.4 Ensaio de infecção de macrófagos com <i>Leishmania chagasi</i>	30
4.4 Análise estatística.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

As Doenças de populações Negligenciadas (DPNs) são um grupo de doenças de origem infecciosa, cujo controle enfrenta vários desafios, principalmente relacionados aos recursos humanos e financeiros destinados as mesmas. A maioria delas são incapacitantes, com alto índice de cronicidade e às vezes mortais. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), existem mais de um bilhão de pessoas acometidas por essas doenças e que vários milhões vivem em áreas de risco de adquiri-las, com destaque para as populações da Ásia, África e América Central e do Sul (DEBROY, et al., 2017; WHOa, 2018).

Dentre as DPNs, destacam-se as leishmanioses, doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que podem se apresentar sob duas formas principais: tegumentar e visceral, sendo esta última a mais preocupante, uma vez que pode ser letal, por afetar órgãos como baço, fígado e medula óssea (CARVALHO, et al., 2017; FEASEY et al., 2010).

Segundo a OMS, é uma doença endêmica em 98 países e afeta mais de 12 milhões de pessoas. Nas Américas são registrados em torno de 56.000 casos de leishmaniose tegumentar e 3.800 casos de leishmaniose visceral anualmente. No Brasil, em 2016 foram registrados 336 casos de leishmaniose visceral e 12.886 casos de leishmaniose tegumentar (PAHO, 2019). Devido ao seu relevante impacto é tida como um grave problema de saúde pública.

A OMS recomenda algumas estratégias para prevenção e controle das leishmanioses: combate ao inseto vetor, diagnóstico precoce e tratamento dos humanos infectados (PAHO, 2018a; PAHO, 2018b). Os fármacos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes, no entanto, se o paciente não for responsivo ou apresentar alguma restrição a utilização dos antimoniais existem disponíveis os medicamentos de segunda linha, como a anfotericina B, a pentamidina, a miltefosina e a paromomicina (PAHO, 2018a).

Porém, apesar da sua importância, a terapia medicamentosa disponível é limitada e longe de ser satisfatória, pois apresenta sérios efeitos adversos, necessidade de administração parenteral e crescente frequência de resistência do parasito ao tratamento (MORAIS-TEIXEIRA, 2011).

Segundo a OMS, nos últimos 20 anos foram realizados avanços científicos em tratamento e diagnóstico, o que facilitou a implementação de programas de

monitoramento e controle regionais e nacionais sustentáveis (WHOa, 2018). No entanto, esses esforços ainda são insuficientes e o investimento para o desenvolvimento de novas estratégias é necessário.

Dentro deste panorama, o acesso a medicamentos mais eficazes, com efeitos adversos menores e formas farmacêuticas mais acessíveis é uma das formas de melhorar à saúde das populações menos favorecidas. Tornando assim, a pesquisa por novas alternativas para o tratamento da leishmaniose necessária frente ao panorama exposto.

Nesse sentido, as guanilidrazonas exibem propriedades biológicas importantes, tais como atividade antifúngica (AJDAC'IC' et al., 2016) tripanocida (SANTOS-FILHO; FIGUEROA-VILLAR; ARAÚJO, 1997) e atividade leishmanicida, reportada em vários trabalhos (AHMED et al., 2012; KAUR et al., 2011).

Além dessa classe química, a literatura também reporta várias atividades biológicas para outros compostos relacionados, como as tiossemicarbazonas: atividades antitumorais (PALANIMUTHU et al., 2013), antirretrovirais (PELOSI et al., 2010), antifúngicas (DEGOLA, 2015), antimaláricas (ADAMS et al., 2013), tripanocidas (GONÇALVES et al., 2017) e leishmanicida frente a diferentes espécies de *Leishmania* (BRITTA et al., 2014, 2016; SCHRÖDER et al., 2013).

Aliado a isto, alguns trabalhos trazem que compostos guanilidrazônicos podem atuar através da inibição da síntese de poliaminas (MARQUES et al., 2007). Além disso, foi observado que alguns compostos tiossemicarbazônicos são capazes de causar disfunção mitocondrial e danos devido ao estresse oxidativo, além de inibir cisteíno proteases (BRITTA et al., 2014; SCHRÖDER et al., 2013).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo determinar o potencial leishmanicida de derivados aminoguanidina hidrazonas e outros compostos relacionados *in vitro*, na busca de novos protótipos de fármacos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias infecciosas. São causadas por protozoários da família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania* que podem pertencer a mais de vinte espécies. A doença pode se manifestar sob duas formas clínicas principais, tegumentar e visceral, sendo a forma visceral a mais perigosa, pois caso não tratada, o paciente pode vir a óbito (BAIOCCO et al., 2009; CARVALHO, et al., 2017; FEASEY et al., 2010; WHO, 2017).

A leishmaniose visceral também conhecida como Calazar (Figura 1), é uma doença sistêmica crônica que pode se apresentar sob diversos aspectos, desde manifestações clínicas leves (oligossintomáticas) até moderadas e graves. O período de incubação pode variar entre 10 dias a 24 meses e afeta principalmente crianças com menos de dez anos de idade. As espécies responsáveis pelo desenvolvimento dessa forma clínica são: *L. donovani* (velho mundo) e *L. infantum chagasi* (novo mundo) (PAHO, 2017).

As manifestações subclínicas da doença envolvem sintomatologia inespecífica como: febre baixa, diarreia e sudorese. A forma aguda da doença é caracterizada pelo aparecimento de diarreia intensa, febre alta, tosse e o surgimento de hepatoesplenomegalia discreta. Já a forma sintomática ou clássica é aquela que ocorre a presença de edema generalizado e abdome aumentado, devido a hepatoesplenomegalia, caquexia acentuada, cefaleia, sangramento no nariz ou na boca, icterícia, dores musculares, problemas respiratórios e digestivos e evolução ao óbito, caso não tratada em 90% dos casos (PAHO, 2018a).

Durante o desenvolvimento da doença o sistema fagocítico mononuclear está cada vez mais comprometido, devido ao parasitismo. Além disso, é observada a participação do interstício de alguns órgãos, como fígado, baço, linfonodos, pulmões, rins e medula óssea, com alterações de seus componentes celulares, fibrilares e infiltrado de células mononucleares, conjuntamente com a congestão e dilatação das veias causando hiperplasia e hipertrofia, levando ao aumento do volume e do peso dos mesmos (LAURENTI, 2010).

Figura 1- Indivíduo portador de Leishmaniose visceral, apresentando hepatoesplenomegalia.



Fonte: BRASIL, 2010.

Já a leishmaniose tegumentar é caracterizada pelo comprometimento da pele. Pode se apresentar sob três formas distintas: cutânea, mucocutânea e cutânea difusa. A forma cutânea é conhecida pela presença das chamadas úlceras leishmanióticas, que são crônicas e podem ser localizadas ou difusas (Figura 2A). A forma mucocutânea se caracteriza pela presença das úlceras crônicas, encontradas também na forma cutânea, mas que tendem a reaparecer mesmo após a cicatrização, em mucosas do nariz e da boca, na maioria das vezes associadas a infecções secundárias levando a destruição do tecido mucoso (Figura 2B). A forma cutânea difusa é conhecida pela formação de pápulas, que se difundem principalmente nos membros superiores e inferiores (Figura 2C) (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017; ORYAN; AKBARI, 2016). As principais espécies relacionadas ao desenvolvimento dessa forma são: *Leishmania major* e *L. tropica* (velho mundo) e *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, no novo mundo (SHIRIAN et al., 2014; SOUZA et al., 2011).

Figura 2- Manifestações clínicas da Leishmaniose tegumentar.



Fonte: TEIXEIRA et al., 2013.

A- Leishmaniose cutânea; B- Leishmaniose mucocutânea e C- Leishmaniose cutânea difusa.

Os parasitos causadores da leishmaniose apresentam um ciclo de vida heteroxênico, caracterizado por duas formas distintas de desenvolvimento: promastigota, e amastigota e também dois hospedeiros: inseto vetor (Figura 3) e mamíferos (BAIOCCO et al., 2009).

Figura 3- Vetor da leishmaniose visceral *Lutzomyia longipalpis*



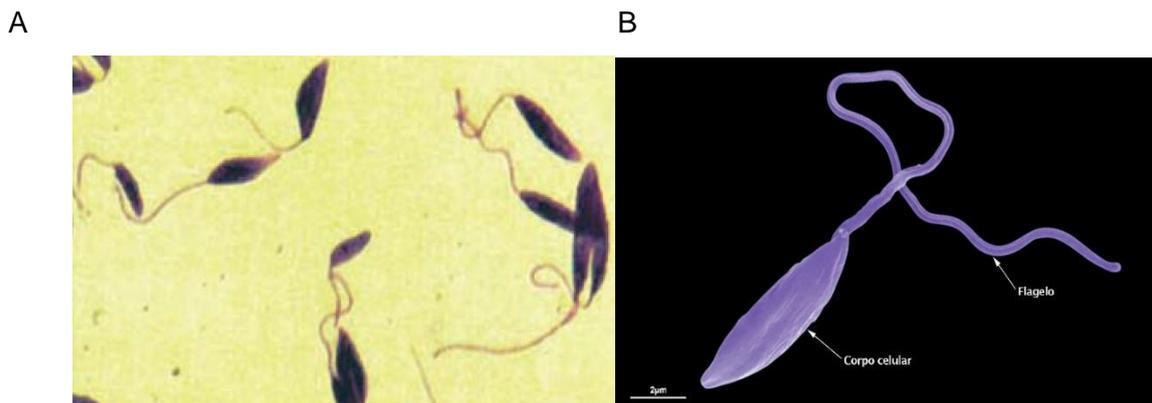
Fonte: WHO, 2018b.

A forma promastigota é alongada, possui flagelo (Figura 4) e está presente no trato digestivo do inseto vetor (dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes ao gênero *Lutzomyia* no novo mundo, e ao gênero *Phlebotomus* no velho mundo), sendo estes os responsáveis pela transmissão do parasito aos hospedeiros mamíferos, durante o repasto sanguíneo de fêmeas infectadas (Figura 3) (BAIOCCO et al., 2009).

Ademais, Slama et al., (2014), demonstraram que o DNA de *L. infantum chagasi* também foi encontrado em *Culicoides spp.* podendo o mesmo também ser um vetor desse parasito. Também foi visto, que além da forma convencional de transmissão ocorreu a notificação de transmissão congênita e parenteral (através da partilha de agulhas entre toxicodependentes) para essa doença (PAHO, 2017).

Já a forma amastigota é arredondada, sem flagelo e é encontrada no interior de células do sistema fagocítico mononuclear, sendo responsável pelas manifestações clínicas da leishmaniose nos hospedeiros mamíferos (roedores, edentados, canídeos, primatas e o homem) (Figura 5) (BAIOCCO et al., 2009; CARVALHO et al., 2017; DE ALMEIDA et al., 2003).

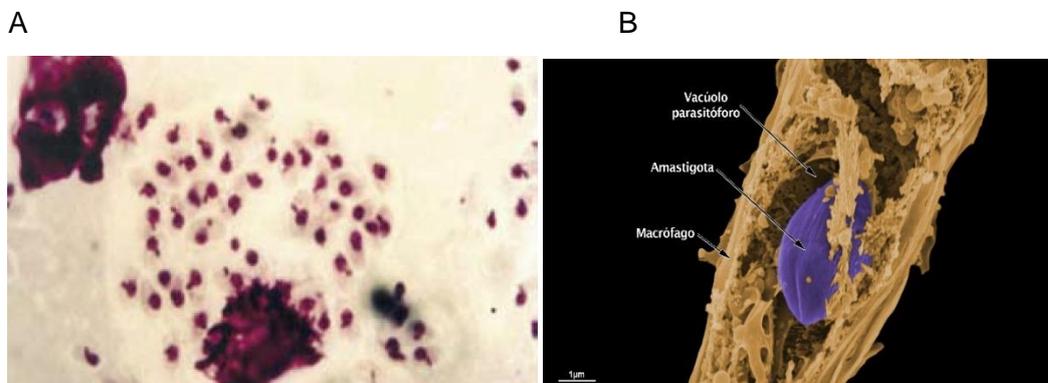
Figura 4- Formas promastigotas de *Leishmania*.



Fonte: BRASIL, 2007; TEIXEIRA et al., 2013.

A- Foto de microscopia ocular (100X); B- Foto de microscopia eletrônica de varredura de *Leishmania amazonensis*.

Figura 5- Formas amastigotas de *Leishmania*.



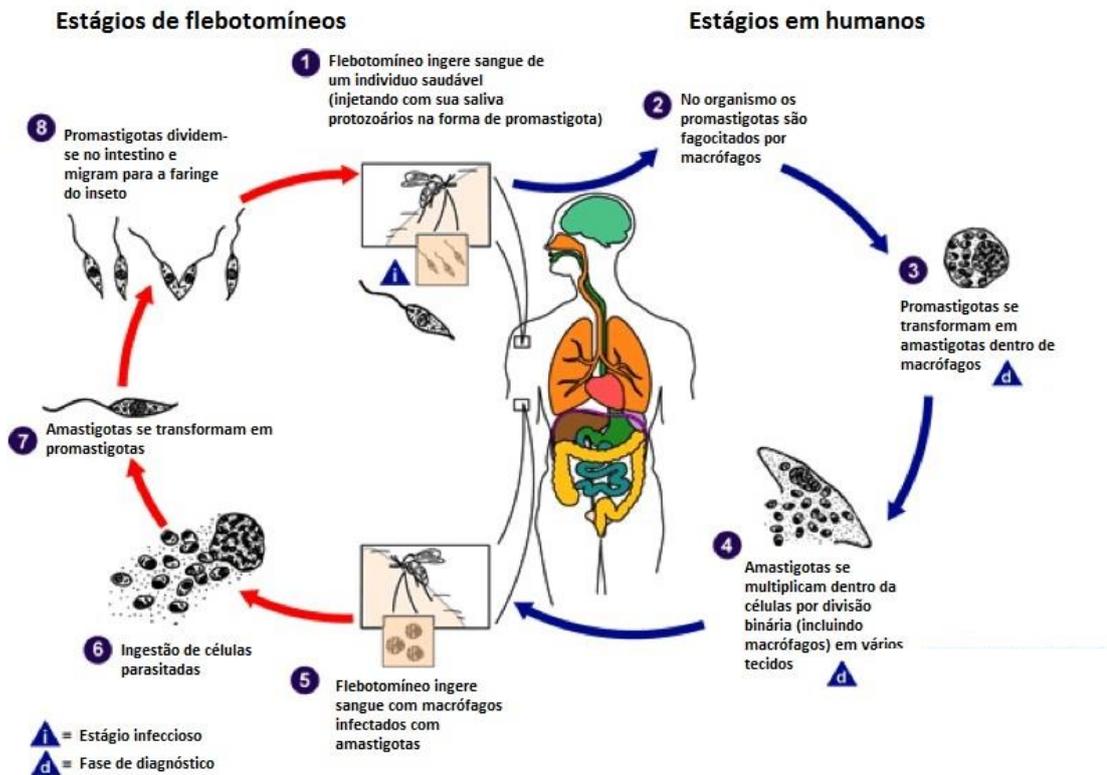
Fonte: BRASIL, 2007; TEIXEIRA et al., 2013.

A- Foto de microscopia ocular (100X); B- Foto de microscopia eletrônica de transmissão de forma amastigota dentro de um vacúolo parasitóforo no interior de um macrófago.

O ciclo de vida do parasito tem início no hospedeiro mamífero, quando são inoculadas formas promastigotas metacíclicas (formas infectantes) durante o repasto sanguíneo do inseto vetor (fêmea infectada), que são fagocitadas por células mononucleares fagocíticas, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (PATIL, 2012). Dentro da célula, as formas promastigotas se alojam nos vacúolos parasitóforos, que se fundem com os lisossomas secundários, resultando no fagolisossoma, na tentativa de destruir os parasitos, porém os mesmos se transformam em formas amastigotas como forma de sobrevivência e se multiplicam por divisão binária. Posteriormente esta célula se rompe e libera formas amastigotas que serão fagocitadas por outras células do sistema imunológico, aumentando assim a infecção (Figura 6) (ASSIS, 2012; BAIOTTO et al., 2009).

No inseto vetor, o ciclo se inicia quando este ingere formas amastigotas durante um repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado. Quando as formas amastigotas ingeridas se transformam em formas promastigotas no tubo digestivo do vetor. Posteriormente, essas promastigotas irão se multiplicar e sofrer o processo de metaciclogênese para se tornarem infectantes, então elas migram para o esôfago e chegam às glândulas salivares do vetor, que durante a realização de um repasto sanguíneo, irá regurgita-las como promastigotas metacíclicas para os hospedeiros mamíferos, reiniciando o ciclo de vida da *Leishmania* (Figura 6) (ASSIS, 2012).

Figura 6- Ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania*.

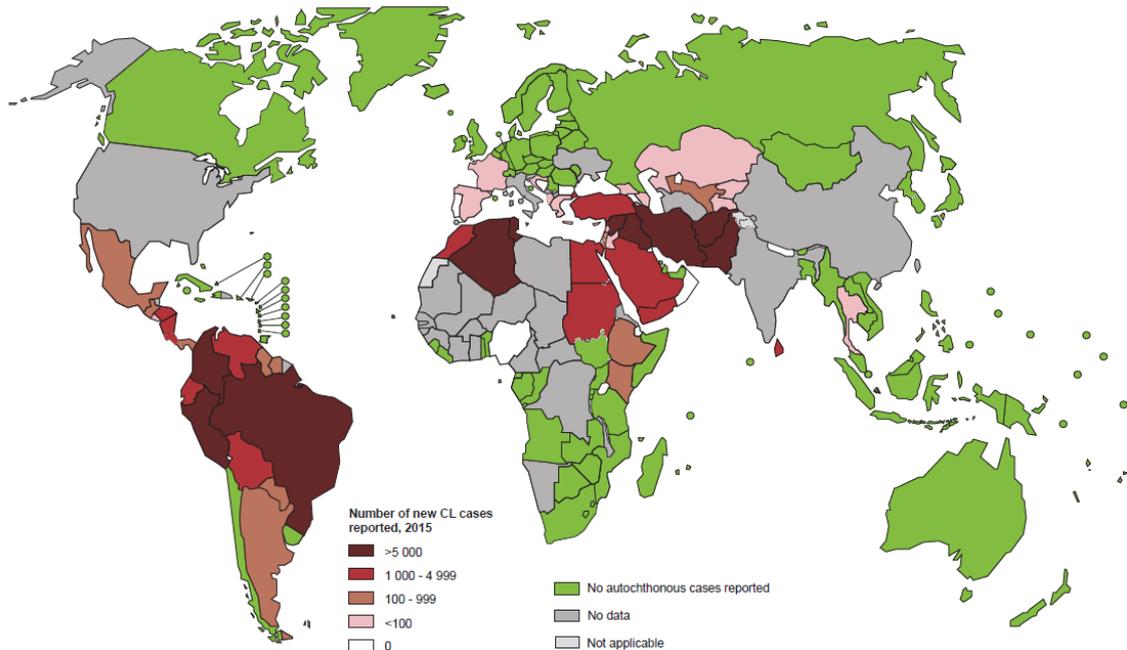


Fonte: CDC, 2017.

A leishmaniose é um grave problema de saúde pública, segundo a OMS pois é uma doença endêmica em mais de 98 países, nos cinco continentes. Afeta mais de 12 milhões de pessoas e existem em média 350 milhões de pessoas em risco de infecção. Estima-se que aproximadamente 300.000 novos casos de leishmaniose visceral (Figura 7) e entre 0,7 - 1,2 milhões novos casos de leishmaniose tegumentar ocorrem em todo o mundo a cada ano (Figura 8) (CARVALHO et al., 2017; PAHO, 2017; PAHO, 2018b).

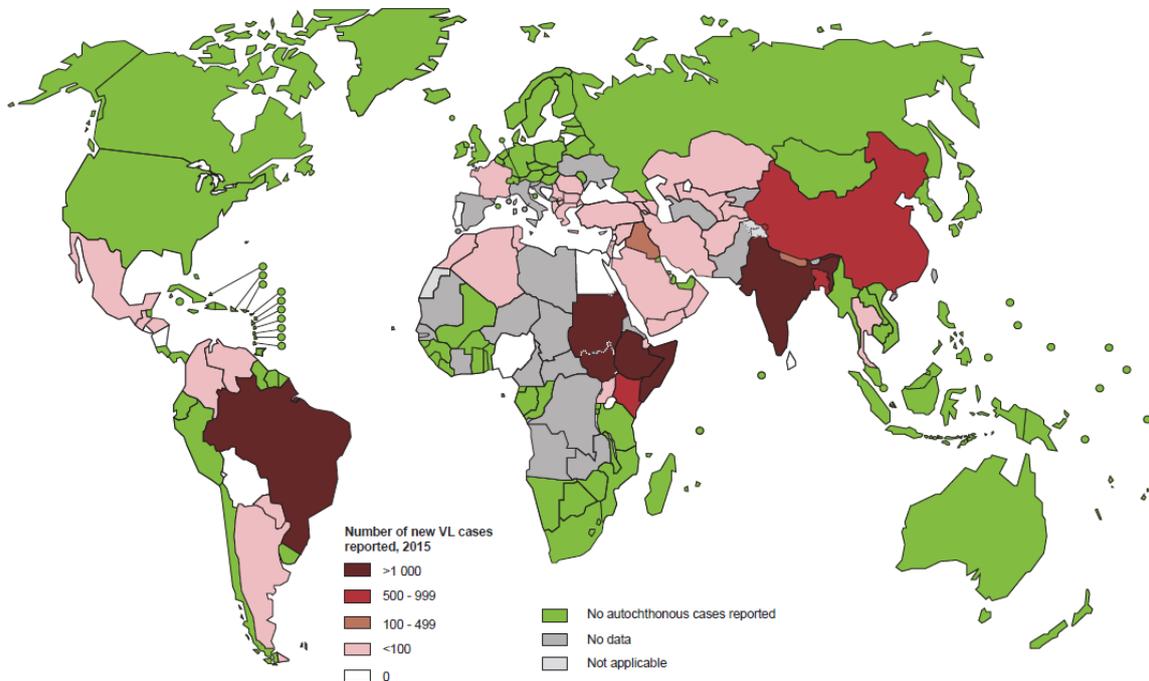
Mais de 90% dos casos globais de leishmaniose visceral ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. Já os dez países com maior número de casos de leishmaniose tegumentar são: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Irã, Nicarágua, Peru, Sudão e Síria, que juntos representam entre 70 e 75% da incidência global estimada (WHO, 2018a; PAHO, 2018b).

Figura 7- Distribuição da Leishmaniose Tegumentar, no ano de 2015.



Fonte: WHO, 2018a.

Figura 8- Distribuição da Leishmaniose Visceral, no ano de 2015.



Fonte: WHO, 2018a.

Nas Américas são registrados uma média de 56.000 casos de leishmaniose tegumentar e 3.800 casos de leishmaniose visceral a cada ano, com uma taxa de mortalidade média de 7%. A leishmaniose cutânea foi registrada em 20 países e é

endêmica em 18 deles (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, Guiana Francesa, Guiana, Honduras, Nicarágua, México, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname e Venezuela) e a leishmaniose visceral foi registrada em 12 países (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Paraguai e Venezuela). Embora mais de 90% dos casos estejam concentrados no Brasil (PAHO, 2017).

No Brasil em dez anos os casos de leishmaniose visceral diminuíram 8%, passando de 3.651 casos em 2006 para 3336 casos em 2016. Em relação a leishmaniose tegumentar, no mesmo período houve redução de 42%, passando de 22.397 casos em 2006 para 12.886 casos em 2016 (WHO, 2017). De acordo com o ministério da saúde, em 2015, a região Nordeste registrou o maior número de casos de leishmaniose visceral com 1.806 casos, seguida pelas regiões Sudeste, com 538 casos, Norte com 469 casos, Centro-Oeste com 157 casos e Sul com 5 casos. Já em relação à leishmaniose tegumentar, a região Norte registrou 8.939 casos, seguida das regiões Nordeste com 5.152 casos, Centro-Oeste com 2.937 casos, Sudeste com 1.762 casos e Sul com 493 casos (BRASIL, 2017).

Além disso, a coinfeção HIV-leishmaniose vem sendo considerada um sério problema, tendo em vista que já foi relatada em 35 países. Essa coinfeção causa formas severas de leishmaniose que são mais difíceis de gerenciar. Tem sido relatado que as pessoas infectadas pelo HIV são mais vulneráveis à leishmaniose visceral, e também essa forma de leishmaniose acelera a replicação e a progressão do HIV para a AIDS, representando um grande desafio para as políticas públicas. Os países com as maiores taxas de coinfeção são o Brasil, Etiópia e a Índia (estado do Bihar) (WHO, 2018a).

Devido ao impacto causado pelas leishmanioses, a OMS vem desenvolvendo e implantando programas de controle e monitoramento da doença ao redor do mundo, principalmente nas regiões com maior incidência e prevalência. Graças aos avanços científicos em tratamento e diagnóstico nos últimos vinte anos, foi possível o desenvolvimento de planos de ação que são lançados a cada cinco anos para fortalecer a pesquisa e o controle da leishmaniose, eles agrupam as principais informações sobre a doença, vetores e reservatórios, bem como as características do ciclo da transmissão, buscando com isso o diagnóstico precoce, tratamento adequado e acompanhamento das pessoas afetadas, vigilância, prevenção e controle de casos,

vetores e reservatórios humanos, quando necessário, o último foi lançado em 2017 e tem período de abrangência até 2022 (WHO, 2018a).

As ferramentas de prevenção e controle da leishmaniose são o combate ao inseto vetor, diagnóstico precoce e tratamento dos humanos infectados. O ciclo de transmissão do parasito é zoonótico e exige a presença de um reservatório animal para a manutenção do parasito na natureza. Os reservatórios silvestres identificados incluem: marsupiais (*Didelphis* spp.), preguiças (*Choloepus* spp. e *Bradypus* spp.), tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), raposa de caranguejo (*Cerdocyon thous*), roedores (*Rattus* spp., *Proechimys* spp., *Nectomys* spp., *Oryzomys* spp., etc.), entre outros. Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é o reservatório principal de *L. infantum chagasi*. No entanto, no entanto, alguns trabalhos recentes também trazem os gatos como reservatório dessa espécie de *Leishmania* (CHATZIS et al., 2014; PAHO, 2018a; PAHO, 2018b).

O diagnóstico da leishmaniose é feito através da combinação de sinais clínicos com testes parasitológicos ou sorológicos. Inicialmente é avaliada a suspeita clínica da doença, levando-se em conta que o paciente mora ou esteve em áreas endêmicas com doença persistente e febre inexplicada, acompanhada de sinais e sintomas sugestivos. Posteriormente, é realizado o diagnóstico laboratorial, com a realização de testes imunológicos, como o teste imunocromatográfico rápido baseado em antígeno recombinante rK39, imunofluorescência indireta (RIFI) e imunoenensaio enzimático (ELISA); e também de testes parasitológicos, que buscam a detecção dos parasitos nos tecidos infectados, principalmente na medula óssea, por meio de exame direto ou isolamento em cultura (*in vitro*). Além desses, também tem os testes moleculares que detectam DNA de *Leishmania* através do método de PCR (PAHO, 2018a; WHO, 2010).

O tratamento medicamentoso disponível, apresenta muitas deficiências significativas, como toxicidade elevada, administração parenteral e longos regimes terapêuticos, limitando sua utilização e eficácia, pois muitos pacientes abandonam o tratamento e isso favorece o aparecimento de cepas resistentes (MORAIS-TEIXEIRA, 2011).

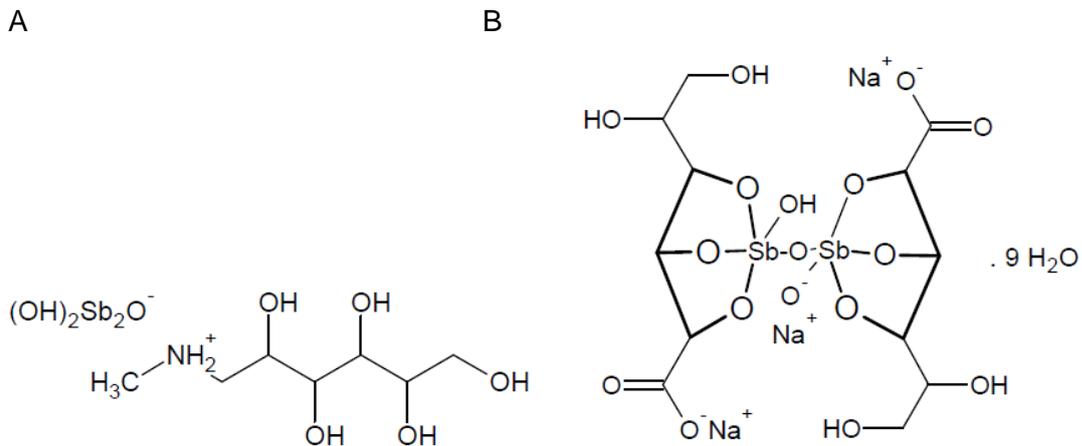
Os medicamentos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes disponíveis como estibogluconato de sódio (Pentostan® Glaxo Wellcome e Solustibosan® Bayer) e o antimoniato de *N*-metilglucamina (Glucantime® Rhône-Poulenc-Rohrer) (Figura 9) (AKBARI, et al., 2017). No início do

século XX os antimoniais trivalentes Sb(III) foram os primeiros medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose, porém apresentavam muita toxicidade. Posteriormente, foram realizadas modificações estruturais dando origem aos antimoniais pentavalentes Sb(V), que apresentavam menos toxicidade (GOTO; LINDOSO, 2010).

Existem algumas hipóteses sobre o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes, no entanto, não se sabe ao certo o mecanismo exato pelo qual eles atuam. Dentre elas, Chai (2005) e Demichele et al. (2002) propõem que o Sb(V) sofra oxirredução para Sb(III), ou seja, o Sb(V) seria um pró-fármaco. Nesse contexto, os grupos tiol, estariam associados a este mecanismo de conversão. Outros autores tem demonstrado que o Sb(III) inibe tripanotiona redutase e a glutathione sintetase (enzimas do parasito) comprometendo suas atividades, tendo em vista que o sistema tripanotiona/tripantion redutase seria responsável pela proteção dos parasitos contra danos oxidativos e ação de metais pesados. Também foi observado que a exposição à Sb(III) resultaria também em efluxo rápido de substâncias importantes para a manutenção da amastigota dentro do macrófago, como tripanotiona e glutathione, *in vitro*, dificultando a sobrevivência do parasito (ASHUTOSH; SUNDAR; GOYAL, 2007). Outra hipótese é a inibição da topoisomerase I de *Leishmania* (FRÉZARD et al., 2009).

Devido à toxicidade dos antimoniais a OMS preconiza que a dose não deve ultrapassar 20 mg/kg/dia (via parenteral), pois podem proporcionar efeitos adversos como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, pancreatite, insuficiência renal reversível, anemia, leucopenia, trombocitopenia, dor abdominal, náuseas, vômitos, distúrbios sanguíneos e mialgias (IGBINEWEKA et al., 2012). São contraindicados em mulheres grávidas, pacientes com problemas cardíacos e com insuficiência renal ou hepática (BRASIL, 2010; WHO, 2010).

Figura 9- Estruturas químicas dos antimoniais pentavalentes.



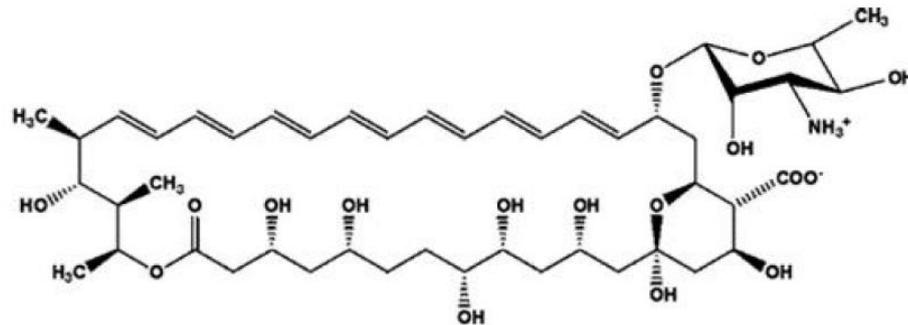
Fonte: GIL et al., 2007.

A- Antimoniato de *N*-metilglucamina; B- Estibogluconato de sódio.

Os medicamentos de segunda linha, como anfotericina B, pentamidina, miltefosina e paromomicina, são utilizados em casos de resistência a antimoniais, ou então em pacientes que tem alguma restrição com os mesmos (PAHO, 2018a).

A Anfotericina B desoxicolato é usada para o tratamento de leishmaniose em casos não responsivos ao tratamento com os antimoniais pentavalentes, como uma segunda escolha. O mesmo é um antibiótico macrolídeo, derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, que tem atividade antifúngica (liga-se ao ergosterol da parede celular de fungos e membrana de protozoários e causa a morte por aumento de permeabilidade). Os principais efeitos adversos são: febre, calafrios, tromboflebite, miocardite, hipocalcemia severa, disfunção renal, podendo levar a morte (GAMBOA-LEON et al., 2014; LINDOSO et al., 2012). A internação do paciente é necessária para a realização do tratamento devido à cardiotoxicidade e nefrotoxicidade induzida pela medicação (Figura 10) (MONZOTE, 2009; GAMBOA-LEON et al., 2014).

Figura 10- Estrutura química da Anfotericina B.

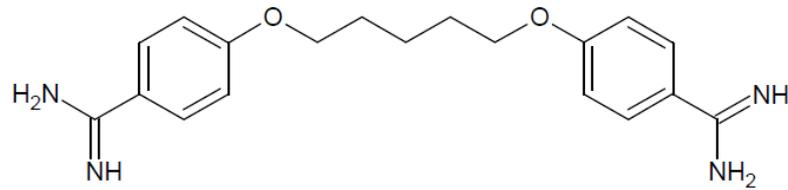


Fonte: GIL et al., 2007.

O desenvolvimento de novas formulações de anfotericina B reduziu a toxicidade observada na apresentação convencional, dentre elas tem-se: anfotericina B lipossomal (AmBisome®), a forma complexada em lipídeos (Abelcet®) e uma anfotericina B em dispersão coloidal (Amphocil®), sendo significativamente mais caras (GRIENSVEN; DIRO, 2012; MITROPOULOS et al., 2010). Além dessas, o AmBisome® apresenta uma formulação com sistema de liberação de fármaco lipossomal com bicamada única. A OMS tem proposto a administração de anfotericina B lipossomal com base em sua alta eficácia e segurança (WHO, 2010). Esta forma de anfotericina B é menos tóxica, mais biodisponível e melhor tolerada pelos pacientes (MULLER; JACOBS; KAYSER, 2001; WHO, 2010).

O isotionato de pentamidina é uma poliamina aromática, administrada por via intramuscular ou, preferencialmente, por infusão intravenosa (MONZOTE, 2009). O tratamento é feito com a administração de uma dose de 2-4 mg/kg/dia em dias alternados, sendo necessárias de 2-4 aplicações. O tratamento causa dor no local da aplicação, mialgias, náuseas, diabetes mellitus, hipoglicemia grave, choque, miocardite e toxicidade renal, dores de cabeça, hipotensão, taquicardia e pancreatite (OLIVEIRA et al, 2011). Berman (1997) observou que este medicamento provavelmente atua interferindo na síntese do DNA, alterando morfológicamente o cinetoplasto e fragmentando a membrana mitocondrial do parasito (Figura 11) (WHO, 2010).

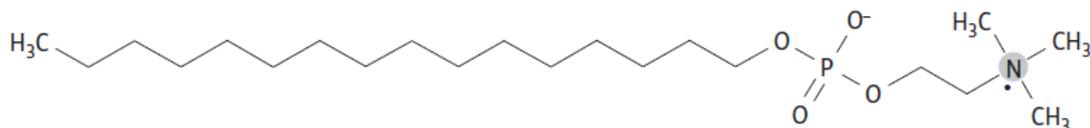
Figura 11- Estrutura química da Pentamidina.



Fonte: GIL et al., 2007.

A miltefosina é um composto alquilfosfolipídico que foi desenvolvido para o tratamento do câncer (EISSA et al., 2015). É o primeiro fármaco leishmanicida administrado por via oral, sem necessidade de internação (GOTO; LINDOSO, 2010). Vários efeitos adversos são relatados, principalmente relacionados ao trato gastrointestinal, além de hepatotoxicidade e problemas renais (SACHDEVA; SEHGAL; KAUR 2013; FERNANDEZ et al., 2014). Alguns estudos já mostraram que o mesmo é teratogênico e não deve ser administrado em gestantes e mulheres em idade fértil (LINDOSO et al., 2012). Seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado, alguns trabalhos mostraram alterações no metabolismo alquil-lipídico e na biossíntese de fosfolipídios (Figura 12) (LUX et al., 2000; WHO, 2010).

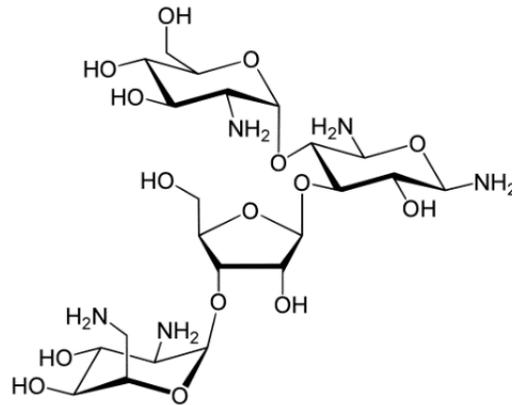
Figura 12- Estrutura química da Miltefosina.



Fonte: DORLO et al., 2012.

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo administrado por via intramuscular. Estudos já mostraram que sua atividade pode ser devido à disfunção respiratória por conta da despolarização da membrana mitocondrial, podendo existir outras vias. Os principais efeitos adversos relacionados ao seu uso são dor no local da injeção, ototoxicidade e nefrotoxicidade, alguns pacientes podem desenvolver hepatotoxicidade (Figura 13) (WHO, 2010).

Figura 13- Estrutura química da paramomicina.



Fonte: PARASITOLOGIA, 2017.

Diante das informações mostradas anteriormente é possível observar que a terapia farmacológica disponível para o tratamento da leishmaniose ainda está muito longe de ser satisfatória. Assim, é necessária uma busca cada vez maior por fármacos mais efetivos e com menos efeitos adversos que os atualmente disponíveis no mercado farmacêutico.

Assim, foi visto que dentro dos trabalhos atuais, ocorre principalmente a busca pela descoberta de novos protótipos com atividade leishmanicida, mas também existe a realização de modificações estruturais nos fármacos já disponíveis no mercado farmacêutico (KHAN, et al., 2017). Dentre os grupos químicos identificados como potenciais agentes leishmanicidas estão as acridinas, os imidazóis, as cumarinas, as chalconas, os esteroides as guanilidrazonas e as tiossemicarbazonas (EPIFÂNIO, 2011; KHAN; KHAN; CHAUHAN, 2015; SANGSHETTI et al., 2015). Baseado no conhecimento sobre o parasito, a topoisomerase II, as cisteíno proteases, a proteína quinase e a via do folato são alguns dos possíveis alvos (KHAN; KHAN; CHAUHAN, 2015; MANZANO et al., 2016).

2.2 Aminoguanidina Hidrazonas (Guanilidrazonas) e outros compostos relacionados

As aminoguanidina hidrazonas, são substâncias de alto interesse científico, devido as suas atividades biológicas, como: anti-HIV (LAKRITZ et al., 2017) e antifúngica (AJDAC'IC' et al., 2016).

A literatura também reporta várias atividades biológicas encontradas para outros compostos relacionados, como as tiossemicarbazonas como: anti-inflamatórias (SHAWISH et al., 2014), antitumorais (PALANIMUTHU et al., 2013), antirretrovirais (PELOSI et al., 2010), antifúngicas (DEGOLA, 2015), antimaláricas (ADAMS et al., 2013) e tripanocidas (GONÇALVES et al., 2017).

Além das propriedades biológicas citadas anteriormente, alguns autores já demonstraram o potencial leishmanicida dessas classes (AHMED et al., 2012; BRITTA et al., 2014; KAUR et al., 2011; MANZANO et al., 2016; SCARIOT et al., 2017).

Com base no que foi exposto, viu-se que as aminoguanidina hidrazonas e alguns compostos relacionados, como as tiossemicarbazonas, apresentam várias atividades biológicas e dentre elas atividade leishmanicida. Visando a necessidade de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da leishmaniose, foi proposta a avaliação da citotoxicidade e do potencial leishmanicida de novas séries de derivados aminoguanidina hidrazonas e outros compostos relacionados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar o potencial citotóxico e a atividade leishmanicida de derivados aminoguanidina hidrazonas e outros compostos relacionados *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade de derivados aminoguanidina hidrazonas e outros compostos relacionados;
- Analisar o efeito dos compostos guanilidrazônicos e de outros derivados relacionados sobre formas amastigotas de *Leishmania infantum chagasi*, *in vitro*;
- Investigar a relação estrutura-atividade dos derivados aminoguanidina hidrazonas e outros compostos relacionados.

4 METODOLOGIA

4.1 Planejamento das substâncias

Os derivados aminoguanidina hidrazonas e os outros compostos relacionados, foram planejados, sintetizados e cedidos pelo grupo de pesquisa do professor doutor João Xavier de Araújo Júnior, do Laboratório de Química Medicinal, da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas (LQM-UFAL), em colaboração com o professor doutor Thiago Mendonça de Aquino, do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB-UFAL) e do grupo de pesquisa do professor doutor Jean Jacques Bourguignon, da Universidade de Estrasburgo na França.

4.2 Preparo das substâncias

As substâncias foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) a 100% e filtradas, formando a solução estoque I (100 mM). No momento dos experimentos, os derivados foram diluídos na forma seriada em meio RPMI para obtenção das concentrações de 10 a 0,1 μ M e foram plaqueados.

4.3 Ensaios farmacológicos *in vitro*

4.3.1 Cultura de parasitos:

Culturas de promastigotas de *Leishmania infantum chagasi* (MCAN/BR/89/BA262) foram cedidas pela Dra. Valéria de Matos Borges do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz-BA. As formas promastigotas do parasito foram mantidas *in vitro* em meio Schneider's, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 2% urina humana masculina a 27°C em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD). No momento do uso, os parasitos foram colocados em tubos tipo Falcon e centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspensão em meio Schneider's. Fez-se, então, a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, para posterior plaqueamento e realização dos experimentos.

4.3.2 Manutenção de macrófagos:

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram mantidos em garrafas de cultura contendo 10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 2 mM de L-glutamina, aminoácidos não essenciais e piruvato. No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e semeadas.

4.3.3 Determinação da citotoxicidade para a célula hospedeira:

O estudo de viabilidade celular de macrófagos frente aos derivados aminoguanidínicos e tiossemicarbazônicos foi realizado utilizando-se o método de redução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (HUSSAIN NOURI; OLIVER, 1993; MOSMANN, 1983). Neste ensaio, macrófagos da linhagem J774 foram plaqueados em placas de 96 poços por 1 hora em $(1 \times 10^5/\text{poço})$ e expostos a diferentes concentrações dos compostos diluídos em meio RPMI suplementado (1, 10 e 100 μM) por um período de 48 horas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Os poços controles continham células cultivadas somente com meio de cultura ou células cultivadas na presença do diluente das substâncias (DMSO 0,1%). Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 100 μL da solução de MTT (5 mg/10 mL). As placas foram novamente incubadas por um período de 1 hora em estufa a 37°C e a 5% de CO₂, logo após foi retirado o sobrenadante e adicionado 100 μL de DMSO e realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm. A viabilidade celular das culturas tratadas com as substâncias foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle.

4.3.4 Ensaio de infecção de macrófagos com *L. chagasi*:

Macrófagos da linhagem J774 foram plaqueados na proporção de 3×10^5 células/poço de placa de 24 poços com lamínulas por uma hora com meio RPMI suplementado. Os macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *L. chagasi*, numa proporção de 10 parasitos: 1 macrófago. A placa foi incubada por 6 horas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 6 horas de infecção, os macrófagos foram “lavados” com solução salina com fosfatos (PBS, pH 7,2), para remoção dos parasitos não interiorizados. Os macrófagos foram cultivados com RPMI

suplementado com 10% SFB, 2 mM de L-glutamina, 2 mM aminoácidos não essenciais e 2 mM piruvato, na presença ou não dos derivados nas concentrações que foram de 0,1 μM até 10 μM e foram mantidos em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 por 24 horas. Após esse período de cultura os poços contendo as lamínulas foram lavados com PBS, as células foram fixadas com metanol e em seguida coradas com Giemsa-May-Grünswald e montadas sobre lâminas. A avaliação do número de macrófagos infectados e o número de amastigotas em 100 macrófagos foi feita com auxílio de microscópio óptico com objetiva de 100X (imersão) (NUNES et al., 2005).

4.4 Análise estatística

Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram feitos utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido do teste Dunnett no programa GraphPad Prism 5.0. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, todos os derivados foram avaliados no teste de viabilidade celular através do ensaio de redução de MTT e, posteriormente, aqueles que não apresentaram citotoxicidade estatisticamente significativa (> 20% morte até a concentração de 10 μ M, após 24 horas de tratamento), frente aos macrófagos da linhagem J774.A1, foram submetidos ao ensaio contra formas amastigotas do parasito *Leishmania infantum chagasi*, ensaio *in vitro* considerado padrão-ouro na busca de novas alternativas terapêuticas (WHO, 2014).

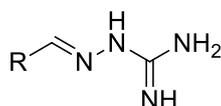
A tabela 1 traz os resultados dos derivados aminoguanidina hidrazonas (ou guanilidrazonas), que totalizam trinta e três compostos. Pode ser observado que os derivados **LQM 02-09, 15, 18, 19, 55, 95-97, 99, 100, 130-132, 137 e 192**, não apresentaram citotoxicidade frente às células utilizadas no ensaio.

Estes foram então selecionados para serem avaliados frente às amastigotas de *L. infantum chagasi*, sendo observado que, as substâncias **LQM 02-04, 06, 08, 09, 18, 95-97, 99, 100, 130-132 e 192**, na concentração máxima testada (10 μ M) foram inativas, quando comparadas ao controle positivo, pentamidina (CI_{50} de 4,4 μ M).

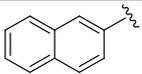
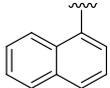
As substâncias **LQM 07, 15 e 137** apresentaram efeito máximo abaixo de 50% (29,0, 48,3 e 30,7%, respectivamente), assim, não foi possível determinar os seus valores de CI_{50} até a concentração máxima testada (10 μ M). Dois derivados se destacaram, devido apresentarem efeito máximo acima de 60%, **LQM 19 e 55** e (63,8% e 63,5%, respectivamente), e concentração inibitória de 50% (CI_{50}) de 4,97 e 7,27 μ M, respectivamente. Os resultados obtidos pelo uso dos dois derivados puderam ser equiparados aos da pentamidina (CI_{50} de 4,4 μ M e EM de $67,3 \pm 2\%$).

Kaur et al, (2011) estudaram um grupo de substâncias para inibir a enzima pteridina redutase (importante na metaciclo-gênese do parasito), e observaram que o composto pirimido[1,2-a]pirimidin-2-ona (derivado aminoguanidina) apresentou atividade contra formas amastigotas de *L. donovani*. Ahmed et al, (2012), elaboraram análogos tricíclicos com o grupo guanidina, e observaram que o candidato mais promissor apresentou atividade contra amastigotas de *L. donovani*. Além disso, alguns autores propuseram que um possível mecanismo de ação de compostos guanilidrazônicos seria a inibição da síntese de poliaminas, importante para a manutenção do metabolismo do parasito (MARQUES et al., 2007).

Tabela 1- Derivados aminoguanidina hidrazonas.



LQM	R =  X	Cl ₅₀ (μM) Amastigotas de <i>Leishmania</i> <i>infantum chagasi</i>	Efeito Máximo (%) Amastigotas de <i>Leishmania</i> <i>infantum chagasi</i>	Citotoxicidade MTT 24 h (10 μM)
02	<i>p</i> -Cl	>10	na	nt
03	<i>p</i> -CN	>10	na	nt
04	<i>p</i> -OMe, <i>m</i> -OH	>10	na	nt
05	<i>m,p</i> -(OMe) ₂	nd	nd	31,5 ± 5**
06	<i>p</i> -OH, <i>m</i> -OMe	>10	na	nt
07	<i>p</i> -OH	>10	29,0 ± 1,3**	nt
08	<i>p</i> -Br	>10	na	nt
09	<i>m,p</i> -(OCH ₂ O)	>10	na	nt
10	<i>p</i> -OH, <i>m,m'</i> -(<i>t</i> -Bu) ₂	nd	nd	32,6 ± 4**
11	<i>p</i> -CO ₂ H	nd	nd	33,2 ± 0,5**
12	<i>o,o'</i> -Cl ₂	nd	nd	32,4 ± 3**
14	<i>p</i> -Ph	nd	nd	63,1 ± 2***
15	H	>10	48,3 ± 3,2***	nt
16	<i>p</i> -CO ₂ Me	nd	nd	30,7 ± 1,4**
17	<i>m,p</i> -Cl ₂	nd	nd	35,5 ± 5**
18	<i>m</i> -Cl	>10	na	nt
19	<i>o</i> -Ph	4,97 ± 0,8	63,8 ± 0,4***	nt
20	<i>o</i> -CF ₃	nd	nd	51,9 ± 0,6***
55	<i>o,m</i> -Cl ₂	7,27 ± 0,3	63,5 ± 1***	nt
95	<i>p</i> -OMe	>10	na	nt
96	<i>m</i> -OMe	>10	na	nt
97	<i>p</i> -F	>10	na	nt
98	<i>o</i> -Cl	nd	nd	46 ± 1***
99	<i>o,p</i> -Cl ₂	>10	na	nt
100	<i>m,m'</i> -Cl ₂	>10	na	nt
191	<i>p</i> -CF ₃	nd	nd	21 ± 5*
192	<i>o</i> -OMe	>10	na	nt

	R			
130	Ph-C=CH-	>10	na	nt
131	Ph-(CH ₂) ₂ -	>10	na	nt
132		>10	na	nt
137		>10	30,7 ± 4**	nt
193		nd	nd	42 ± 5**
194		nd	nd	32 ± 5**
Pentamidina	-	4,4 ± 0,9	67,3 ± 2***	nt

Os resultados referem-se a: CI₅₀ - concentração inibitória de 50% de formas amastigotas, calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média ± erro padrão da média; Efeito máximo - média da toxicidade máxima ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo; Citotoxicidade - média da citotoxicidade máxima ± erro padrão da média da citotoxicidade na concentração de 10 µM em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo e de citotoxicidade foram considerados significativos quando **p<0,01 e ***p <0,001 em relação ao grupo DMSO 0,1%. na: substância não apresentou atividade letal significativa para amastigotas de *Leishmania chagasi* até a concentração de 10 µM em relação ao grupo DMSO. nt: substância não apresentou atividade letal significativa para macrófagos da linhagem J774.A1 até a concentração de 10 µM em relação ao grupo DMSO. nd: Atividade leishmanicida não determinada, pois a substância apresentou citotoxicidade até a concentração de 10 µM em relação ao grupo DMSO.

Baseando-se nos resultados expressos na tabela 1, algumas informações importantes quanto à relação estrutura-atividade (REA) dos derivados puderam ser extraídas. Para tal discussão, os derivados foram agrupados por similaridade estrutural, em que estes foram correlacionados com suas respectivas atividades biológicas.

Inicialmente, serão abordados os compostos contendo substituintes halogenados (grupos retiradores de elétrons), os quais foram sintetizados com o objetivo de permitir uma melhor permeabilidade pelas membranas lipídicas (BARREIRO; FRAGA, 2008). Partindo-se do **LQM 15** (guanilidrazona não substituída), foi verificada a influência da introdução de diferentes átomos em posições distintas no anel aromático. Este não apresentou citotoxicidade significativa e teve um efeito máximo de 48,3% contra amastigotas de *L. infantum chagasi*.

A inserção do átomo de cloro (-Cl) na posição *para* do anel aromático (**LQM 02**) manteve a boa tolerância observada no derivado **LQM 15**, no entanto, reduziu o efeito

máximo a zero, gerando uma substância completamente inativa. Tal fato, também foi verificado com a substituição deste por outro halogênio de menor volume e maior eletronegatividade, o flúor (-F) na mesma posição (**LQM 97**). A inserção do átomo de bromo (-Br), gerou o derivado **LQM 08**, que também revelou o mesmo resultado, assim, demonstrando que o aumento do volume atômico do halogênio e, conseqüentemente, a diminuição da eletronegatividade, não contribuem para a atividade antileishmania.

No entanto, a introdução do *pseudo*-átomo do Cl, o trifluorometil (-CF₃), em *para* (**LQM 191**), gerou uma molécula com citotoxicidade de 20,7%. Em adição, a mudança de 4-CF₃ para 2-CF₃ (posição *orto*) (**LQM 20**) elevou a citotoxicidade (51,9%). A introdução do grupo ciano (-CN) em *para* (**LQM 03**) culminou em uma substância com boa tolerância citotóxica, porém inativa.

A mudança de *para*-Cl (**LQM 02**) por *meta*-Cl (**LQM 18**) também deu origem a um derivado inativo e sem citotoxicidade significativa. Partindo destes dois derivados (**LQM 02** e **18**), foram avaliados dois compostos que continham dois átomos de cloro em sua estrutura, um deles em *meta*, *para*-diCl (**LQM 17**) que originou um derivado citotóxico (35,5%), e outro em *meta*, *meta*-diCl (**LQM 100**), que gerou um derivado sem citotoxicidade e inativo contra amastigotas de *L. infantum chagasi*.

Foi visto que a troca do *para*-Cl (**LQM 02**) por *meta*-Cl (**LQM 18**) não afetou significativamente a citotoxicidade, nem a atividade leishmanicida, no entanto, a substituição deste por *orto*-Cl (**LQM 98**) contribuiu para o aumento da citotoxicidade (46%). Partindo desses derivados, foi avaliada a introdução de dois átomos de cloro no anel aromático da estrutura em posição *orto*, *orto*'-diCl (**LQM 12**), sendo observada também certa citotoxicidade, assim como seu precursor **LQM 98** (32,4%). Porém, essa citotoxicidade não foi observada nos análogos de posição **LQM 99**, cujo possui átomos de Cl em posições *orto*, *para* e **LQM 55**, o qual tem átomos de Cl em *orto*, *meta*, e apresentou uma atividade leishmanicida promissora, com efeito máximo de 63,5% e uma Cl₅₀ de 7,27 µM.

Em seguida, foram testados os derivados contendo substituintes eletrodoadores, os quais foram planejados visando uma melhor solubilidade em água, ou seja, aceptores/doadores de ligação de hidrogênio, (GARETH, 2009). Utilizando-se novamente o derivado **LQM 15** como estrutura de partida, foi analisada a influência da inserção de diferentes átomos em diferentes posições no anel aromático da estrutura, assim como anteriormente abordado.

A introdução de um grupo hidroxila (-OH) em *para* (**LQM 07**) manteve a ausência de citotoxicidade observada para o derivado **LQM 15**, mas diminuiu a atividade (29,0%). A substituição da hidroxila, no derivado **LQM 07**, por um grupo metóxi (-OMe) (**LQM 95**) manteve o composto sem citotoxicidade, no entanto, originou um derivado inativo.

A inserção de um éster metílico (-CO₂CH₃) na posição *para* (**LQM 16**) aumentou a citotoxicidade do deste (30,7%). A substituição do éster metílico (**LQM 16**) por um ácido carboxílico (**LQM 11**) manteve a citotoxicidade observada no composto anterior (33,2%).

A substituição de *para*-OCH₃ (**LQM 95**) por *meta*-OCH₃ (**LQM 96**) ou *orto*-OCH₃ (**LQM 192**) conservou a ausência de citotoxicidade, além disso, não influenciou na melhora da atividade biológica.

Partindo-se dos derivados **LQM 07** e **96**, foi testado o composto **LQM 06**, o qual tem uma hidroxila em *para* e um grupo *metoxi* em *meta* e, assim como seus precursores, não apresentou citotoxicidade significativa, mas perdeu a atividade leishmanicida observada no derivado **LQM 07**. Posteriormente, foi testado o derivado **LQM 04** que em vez de *meta*-OCH₃, *para*-OH (**LQM 06**), tem *meta*-OH, *para*-OCH₃, onde foi visto que essa inversão de posições não alterou a ausência de citotoxicidade, nem a atividade.

Também foi testado o derivado **LQM 05**, cujo teve a adição de 3,4-diOCH₃ e é derivado dos compostos **LQM 95** e **96**, mas diferente dos seus precursores a adição destes grupamentos aumentou a citotoxicidade do composto final (31,5%).

O derivado **LQM 09** foi obtido através do fechamento do anel entre os grupos 3,4-diOCH₃ do derivado **LQM 05**, e após o teste com o mesmo, foi visto que ocorreu a diminuição da citotoxicidade, quando comparado com o **LQM 05**.

Logo após, foi avaliado o derivado **LQM 10**, que teve como precursor o composto **LQM 07**, do qual derivou a *hidroxila* em *para*, mas também teve a inserção de dois grupamentos *terc*-butila em *meta*, *meta'*, que diferentemente do composto original, foi observado que um maior impedimento estérico favoreceu o aumento da citotoxicidade (32,6%).

Posteriormente, foi inserido um anel aromático na posição *para* (**LQM 14**), o que aumentou significativamente a citotoxicidade do derivado final (63,1%). Mas, isso não foi observado com a mudança do *para*-fenil por *orto*-fenil (**LQM 19**), que deu

origem a um derivado promissor, sem citotoxicidade significativa e ativo contra amastigotas de *L. infantum chagasi*, com CI_{50} de 4,97 μM e efeito máximo de 63,8%.

Nesse sentido, foi adicionado um anel aromático com um espaçador em ($-CH_2$) entre a região da aminoguanidina e a fenila (**LQM 131**) e, em seguida, este espaçador foi aumentado ($(-CH_2-)_2$, **LQM 130**), ambos continuaram sem citotoxicidade e atividade contra *L. infantum chagasi*.

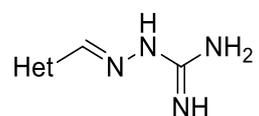
Em seguida, o anel aromático foi substituído por um *iso*-naftil e naftil originando os derivados **LQM 193** e **194**, respectivamente. Com relação a estes, foi visto que a inserção destes grupamentos aumentou a citotoxicidade dos dois compostos, sendo 42 e 32%, respectivamente).

Em adição, foi feita a substituição do anel aromático por um ciclo hexil (**LQM 132**), que gerou um composto sem citotoxicidade e inativo. Por fim, foi realizada a substituição da fenila por um ciclo pentano (**LQM 137**), que deu origem a um composto não citotóxico, e com menor atividade que o seu precursor, **LQM 15**.

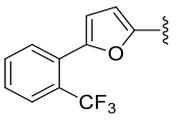
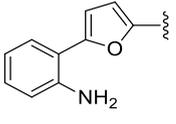
Posteriormente, foram testados os derivados guanilidrazônicos heteroaromáticos, que totalizaram quinze compostos. Os resultados podem ser observados na tabela 2. Nela é possível ver que doze derivados não apresentaram citotoxicidade estatisticamente significativa **LQM 01, 13, 101-104, 139-141, 195, 196** e **200**. Em seguida, esses compostos foram testados contra formas amastigotas de *L. infantum chagasi*. Os outros três derivados, **LQM 197, 198** e **199**, mostraram citotoxicidade, apresentando 34,8, 98,4 e 97,1% de morte celular, respectivamente.

Os derivados **LQM 13, 102, 103** e **196** apresentaram um efeito máximo que variou entre 21,2 e 46,5%, onde não foi possível calcular a concentração capaz de eliminar 50% dos parasitos. Nesse contexto, destacou-se o derivado **LQM 195** que apresentou um efeito máximo de 55,3% e uma CI_{50} de 0,6 μM , resultado que pode ser comparado ao da pentamidina, que apresentou efeito máximo de 67,3% e CI_{50} de 4,4 μM .

Tabela 2- Derivados guanilidrazônicos heterocíclicos aromáticos.



LQM	Het	Cl ₅₀ (μM) Amastigotas de <i>Leishmania</i> <i>infantum</i> <i>chagasi</i>	Efeito Máximo (%) Amastigotas de <i>Leishmania</i> <i>infantum</i> <i>chagasi</i>	Citotoxicidade MTT 24 h (10 μM)
01		>10	na	nt
13		>10	31,9 ± 2**	nt
101		>10	na	nt
102		>10	21,2 ± 5**	nt
103		>10	40,7 ± 1**	nt
104		>10	na	nt
139		>10	na	nt
140		>10	na	nt
141		>10	na	nt
195		0,6 ± 0,06	55,3 ± 0,5***	nt
196		>10	46,5 ± 6***	nt
197		nd	nd	34,8 ± 4**

198		nd	nd	98,4 ± 1***
199		nd	nd	97,1 ± 3***
200		>10	na	nt
Pentamidina	-	4,4 ± 0,9	67,3 ± 2***	nt

Os resultados referem-se a: Cl_{50} - concentração inibitória de 50% de formas amastigotas, calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média ± erro padrão da média; Efeito máximo - média da toxicidade máxima ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo; Citotoxicidade - média da citotoxicidade máxima ± erro padrão da média da citotoxicidade na concentração de 10 μ M em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo e de citotoxicidade foram considerados significativos quando ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo DMSO 0,1%. na: substância não apresentou atividade letal significativa para amastigotas de *Leishmania chagasi* até a concentração de 10 μ M em relação ao grupo DMSO. nt: substância não apresentou atividade letal significativa para macrófagos da linhagem J774.A1 até a concentração de 10 μ M em relação ao grupo DMSO. nd: Atividade leishmanicida não determinada, pois a substância apresentou citotoxicidade até a concentração de 10 μ M em relação ao grupo DMSO.

Em relação à discussão da REA dos derivados guanilidrazônicos heteroaromáticos apresentados na tabela 2, novamente os compostos foram agrupados por similaridade química e correlacionados com suas atividades biológicas, onde o derivado **LQM 15** foi utilizado como estrutura de partida.

O objetivo da introdução de um grupamento heterocíclico aromático na estrutura foi a busca de uma maior estabilidade química dos derivados, além de ser descrito na literatura várias substâncias que contêm heterociclos em suas estruturas, que desempenham importantes funções biológicas, como por exemplo a cafeína, a morfina e os aminoácidos prolina, triptofano e histidina (BRUICE, 2006).

No derivado **LQM 01** foi observado que a troca do anel aromático da estrutura base (**LQM 15**) por um núcleo 3-indol manteve a ausência de citotoxicidade, mas eliminou por completo a atividade leishmanicida. Tal fato também foi observado para a mudança do 3-indol para o 2-indol, que originou o composto **LQM 101**.

O derivado **LQM 13** tem uma 4-quinolina no lugar do aromático da guanilidrazona não substituída **LQM 15**, onde observou-se que essa substituição não influenciou na citotoxicidade, mas diminuiu a atividade leishmanicida (31,9 e 48,3% para os **LQM 13** e **15**, respectivamente). A mudança de 4-quinolina para 2-quinolina

gerou o derivado **LQM 195**, que manteve a ausência de citotoxicidade e aumentou a atividade leishmanicida para 55,3%, apresentando uma CI_{50} de 0,6 μ M, tornando-se um derivado muito promissor. Na literatura, compostos que contêm um núcleo quinolínico, são conhecidos devido ao amplo espectro de atividades biológicas, dentre elas atividade antileishmania (JAIN et al., 2004).

A substituição do aromático no derivado **LQM 15** por uma 2-piridina deu origem ao composto **LQM 102**, cujo manteve a ausência de citotoxicidade, mas diminuiu a atividade leishmanicida observada em **LQM 15** (21,2%). A mudança de 2-piridina por seu análogo 3-piridina (**LQM 103**), conservou a falta de citotoxicidade significativa e aumentou a atividade da substância (40,7%), mas quando comparada com **LQM 15** (48,3%), ela manteve o potencial leishmanicida observado. Já a substituição por 4-piridina (**LQM 104**), originou um derivado não citotóxico e inativo. Logo após, foi testado o derivado **LQM 141**, originado a partir do composto **LQM 103** com a inserção de um -Cl na posição 3 da 3-piridina, sendo visto, que essa mudança não influenciou a citotoxicidade e forneceu um composto inativo.

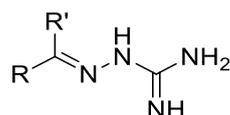
A troca do anel aromático do **LQM 15** por um tiofeno gerou o derivado **LQM 139**, essa alteração manteve a falta de citotoxicidade significativa, mas levou a perda completa da atividade leishmanicida. Isso também foi observado com a troca do aromático por uma tiazolidina no derivado **LQM 140**.

A inserção do benzofurano originou um derivado que manteve a ausência de citotoxicidade, mas levou a perda completa da atividade (**LQM 196**). Já a introdução de um núcleo furano-5-benzil gerou um derivado com citotoxicidade estatisticamente significativa (**LQM 197**). Essa citotoxicidade se pronunciou com a inserção de um grupo trifluorometil em *orto* no derivado **LQM 197**, dando origem ao derivado **LQM 198** (98,4%). Mas, não foi observada com a introdução de uma amina na mesma posição (**LQM 200**), porém o derivado é inativo contra o parasito testado. No entanto, a inserção dos grupos 3,4-diCl inseridos na estrutura do derivado **LQM 197** deu origem ao derivado **LQM 199** que apresentou uma citotoxicidade pronunciada (97,1%).

Dando continuidade, foram testados seis derivados guanilidrazônicos dissustituídos, os resultados obtidos estão mostrados na tabela 3. Nela é possível observar que a dissustituição gerou cinco derivados não citotóxicos, **LQM 133-135**, **138** e **201**, que foram avaliados frente às amastigotas de *L. infantum chagasi*, e apenas um derivado citotóxico, **LQM 136**.

Dos cinco derivados avaliados contra os parasitos intracelulares, quatro apresentaram atividade antileishmania com efeito máximo entre 24 e 43,4%, foram eles: **LQM 133, 135, 138 e 201**. Não sendo possível calcular a CI_{50} , porque não alcançaram uma porcentagem de inibição acima de 50%.

Tabela 3- Derivados guanilidrazônicos dissustituídos.



LQM	R	R'	CI_{50} (μM) Amastigotas de <i>Leishmania</i> <i>infantum</i> <i>chagasi</i>	Efeito Máximo (%) Amastigotas de <i>Leishmania</i> <i>infantum</i> <i>chagasi</i>	Citotoxicidade MTT 24 h (10 μM)
133			>10	24,0 \pm 6,6**	nt
134			>10	na	nt
135			>10	31,8 \pm 3**	nt
136	Ph	Ph	nd	nd	75,3 \pm 2***
138			>10	33,3 \pm 5**	nt
201			>10	43,4 \pm 3**	nt
Pentamidina	-		4,4 \pm 0,9	67,3 \pm 2***	nt

Os resultados referem-se a: CI_{50} - concentração inibitória de 50% de formas amastigotas, calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média \pm erro padrão da média; Efeito máximo - média da toxicidade máxima \pm erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo; Citotoxicidade - média da citotoxicidade máxima \pm erro padrão da média da citotoxicidade na concentração de 10 μM em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo e de citotoxicidade foram considerados significativos quando ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo DMSO 0,1%. na: substância não apresentou atividade letal significativa para amastigotas de *Leishmania chagasi* até a concentração de 10 μM em relação ao grupo DMSO. nt: substância não apresentou atividade letal significativa para macrófagos da linhagem J774.A1 até a concentração de 10 μM em relação ao grupo DMSO. nd: Atividade leishmanicida não determinada, pois a substância apresentou citotoxicidade até a concentração de 10 μM em relação ao grupo DMSO.

As informações relevantes relacionadas à REA dos derivados aminoguanidínicos dissustituídos, cujos resultados estão na tabela 3, foram abordadas utilizando-se as mesmas considerações químicas e biológicas que foram usadas anteriormente para as tabelas 1 e 2.

A dissustituição da estrutura base (**LQM 15**) originou o derivado **LQM 136**, que preservou o anel aromático e teve a substituição do hidrogênio metínico, presente no **LQM 15**, por outro aromático, sendo visto o aumento da citotoxicidade do derivado para 75,3%. Já os demais derivados guanilidrazônicos dissustituídos, tiveram a troca dos dois radicais (R= anel aromático, R'= hidrogênio metínico), por um único substituinte, como é possível observar na tabela 3.

Posteriormente, foi testado o derivado **LQM 201**, que teve a introdução de um ciclohexil e isso manteve a falta de citotoxicidade e a atividade leishmanicida observadas no derivado **LQM 15**. Porém, a mudança do ciclohexil por um tetraidronaftaleno (**LQM 134**), conservou o derivado não citotóxico, mas deu origem a um derivado inativo. Já a inserção de um -OMe na posição 7 do tetraidronaftaleno presente no derivado **LQM 134**, originou o composto **LQM 133** que apresentou uma atividade antileishmania de 24% e continuou não citotóxico. A substituição de 7-OMe por 9-OMe no tetraidronaftaleno gerou o **LQM 138** que conservou a falta de citotoxicidade significativa e ainda aumentou a atividade leishmanicida para 33,3%.

A substituição do tetraidronaftaleno (**LQM 134**), por tetraidro-5*H*-benzo[7]anuleno, deu origem ao derivado **LQM 135** que se manteve não citotóxico e sua atividade foi aumentada para 31,8%, quando comparada com a inatividade do composto **LQM 134**, demonstrando que a substituição de um anel de seis membros por um de sete membros na estrutura, contribuiu positivamente para a atividade antileishmania.

Posteriormente, foram avaliados os derivados tiossemicarbazonas, que foram sintetizados e avaliados por apresentarem diversas propriedades biológicas, reportadas na literatura, dentre elas atividade leishmanicida (BRITTA et al., 2014; BRITTA et al., 2016; SCHRÖDER et al., 2013).

A tabela 4 mostra os resultados dos derivados tiossemicarbazônicos avaliados. Estes são bioisómeros dos compostos aminoguanidina hidrazonas presentes na tabela 1, através da substituição do C=NH por C=S em sua estrutura.

Através da observação da tabela 4, é possível notar que dos vinte e cinco derivados avaliados, vinte e quatro deles não apresentaram citotoxicidade

estatisticamente significativa: **LQM 02.1-12.1, 15.1-18.1, 20.1, 55.1, 95.1-100.1 e 106.1**, apenas o derivado **LQM 14.1** apresentou uma citotoxicidade de 30,6%.

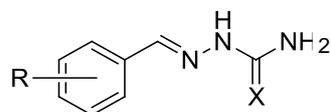
Dos vinte e quatro derivados testados frente às amastigotas de *L. infantum chagasi*, quatorze apresentaram atividade antileishmania. Quatro derivados se destacaram por demonstrarem uma atividade acima de 50%: **LQM 08.1** (efeito máximo: 56,9% e CI_{50} : 8,73 μ M), **17.1** (efeito máximo: 66,38% e CI_{50} : 2,2 μ M), **95.1** (efeito máximo: 60,2% e CI_{50} : 1,6 μ M) e **106.1** (efeito máximo: 60,4% e CI_{50} : 3,2 μ M).

No entanto, nove derivados apresentaram atividade leishmanicida abaixo de 50% (efeito máximo: 26, 42-40 e 49%), **LQM 02.1, 04.1, 05.1, 06.1, 07.1, 09.1, 11.1, 15.1 e 16.1**. Sendo que, dez derivados foram inativos, **LQM 03.1, 10.1, 12.1, 18.1, 20.1, 55.1, 96.1- 98.1 e 100.1**.

Britta et al (2014) avaliaram o efeito do composto tiossemicarbazônico 4-nitrobenzaldeído contra *L. amazonensis* e viram que o mesmo apresentou atividade leishmanicida contra amastigotas intracelulares. Manzano et al (2016) em estudo com uma série de derivados tiossemicarbazônicos otimizados, observaram que um dos compostos não apresentou citotoxicidade estatisticamente significativa e uma potente atividade frente a amastigotas de *L. donovani*. Scariot et al (2017) estudaram um derivado tiossemicarbazona, chamado de BZTS, e demonstraram que o mesmo apresentou atividade frente a amastigotas de *L. amazonensis*.

Em relação aos possíveis alvos dos compostos tiossemicarbazônicos, Britta et al., (2014), observaram que o composto 4-nitrobenzaldeído era capaz de causar disfunção mitocondrial e danos devido ao estresse oxidativo. Schröder et al., (2013), observaram que tiossemicarbazonas inibiam as cisteíno proteases.

Tabela 4- Derivados tiossemicarbazônicos.



LQM	R	X	Cl ₅₀ (μM) Amastigotas de <i>Leishmania</i> <i>infantum chagasi</i>	Efeito Máximo (%) Amastigotas de <i>Leishmania</i> <i>infantum chagasi</i>	Citotoxicidade MTT 24 h (10 μM)
02.1	<i>p</i> -Cl	S	>10	28,37 ± 2,6**	nt
03.1	<i>p</i> -CN	S	>10	Na	nt
04.1	<i>p</i> -OMe, <i>m</i> -OH	S	>10	40,25 ± 2,5***	nt
05.1	<i>m,p</i> -(OMe) ₂	S	>10	35,56 ± 0,2**	nt
06.1	<i>p</i> -OH, <i>m</i> -OMe	S	>10	26,42 ± 1**	nt
07.1	<i>p</i> -OH	S	>10	38,02 ± 0,2**	nt
08.1	<i>p</i> -Br	S	8,73 ± 0,2	56,9 ± 0,6***	nt
09.1	<i>m,p</i> -(OCH ₂ O)	S	>10	27,65 ± 3,7*	nt
10.1	<i>p</i> -OH, <i>m,m'</i> -(<i>t</i> -Bu) ₂	S	>10	na	nt
11.1	<i>p</i> -CO ₂ H	S	>10	26,6 ± 0,8**	nt
12.1	<i>o,o'</i> -Cl ₂	S	>10	na	nt
14.1	<i>p</i> -Ph	S	nd	nd	30,6 ± 6**
15.1	<i>H</i>	S	>10	40,49 ± 0,9***	nt
16.1	<i>p</i> -CO ₂ Me	S	>10	30,37 ± 4,4**	nt
17.1	<i>m,p</i> -Cl ₂	S	2,2 ± 1,8	66,38 ± 4***	nt
18.1	<i>m</i> -Cl	S	>10	na	nt
20.1	<i>o</i> -CF ₃	S	>10	na	nt
55.1	<i>o,m</i> -Cl ₂	S	>10	na	nt
95.1	<i>p</i> -OMe	S	1,6 ± 1,1	60,2 ± 1,8***	nt
96.1	<i>m</i> -OMe	S	>10	na	nt
97.1	<i>p</i> -F	S	>10	na	nt
98.1	<i>o</i> -Cl	S	>10	na	nt
100.1	<i>m,m'</i> -Cl ₂	S	>10	na	nt
106.1	<i>p</i> -CF ₃	S	3,2 ± 1	60,4 ± 1,6***	nt
Pentamidina	-	-	4,4 ± 0,9	67,3 ± 2***	nt

Os resultados referem-se a: Cl₅₀ - concentração inibitória de 50% de formas amastigotas, calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média ± erro padrão da média; Efeito máximo - média da toxicidade máxima ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo; Citotoxicidade - média da citotoxicidade máxima ± erro padrão da média da citotoxicidade na concentração de 10 μM em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo e de citotoxicidade foram considerados significativos quando **p<0,01 e ***p<0,001 em relação

ao grupo DMSO 0,1%. na: substância não apresentou atividade letal significativa para amastigotas de *Leishmania chagasi* até a concentração de 10 µM em relação ao grupo DMSO. nt: substância não apresentou atividade letal significativa para macrófagos da linhagem J774.A1 até a concentração de 10 µM em relação ao grupo DMSO. nd: Atividade leishmanicida não determinada, pois a substância apresentou citotoxicidade até a concentração de 10 µM em relação ao grupo DMSO.

Depois da apresentação dos resultados dos derivados tiossemicarbazônicos (tabela 4), a discussão da REA foi feita abordando-se os mesmos pontos utilizados anteriormente para as tabelas 1, 2 e 3.

Contudo os derivados guanilidrazônicos que compõem a tabela 1 foram utilizados como estruturas de partida para a comparação com os derivados tiossemicarbazônicos, tendo em vista que a única diferença entre eles é a substituição do grupamento C=NH (imina) por C=S (tiocarbonila) na região da tiocarbonila.

O derivado **LQM 02.1**, assim como o **LQM 02** (tabela 1) tem um 4-Cl e um C=S substituindo a imina, essa modificação estrutural manteve o derivado sem citotoxicidade significativa e aumentou a atividade observada no composto guanilidrazônico correspondente para 28,37%, que foi inativo. Essa manutenção da não citotoxicidade e o aumento da atividade de um derivado inativo também foram observadas em outros derivados, quando ocorreu a inserção do átomo de enxofre nas estruturas-correspondentes: **LQM 04.1** - efeito máximo: 40,25%; **LQM 04** – na (tabela 1), **LQM 06.1** – efeito máximo: 26,42%; **LQM 06** – na (tabela 1), **LQM 08.1** – efeito máximo: 56,9%, Cl₅₀: 8,73 µM; **LQM08** – na (tabela 1), **LQM09.1**- efeito máximo: 27,65%; **LQM 09** – na (tabela 1) e **LQM 95.1** – efeito máximo: 60,2%, Cl₅₀: 1,6 µM; **LQM 95** – na (tabela 1).

Já a inserção do C=S no derivado **LQM 05.1** forneceu um derivado não citotóxico, quando comparado com seu correspondente guanilidrazônico **LQM 05** (tabela 1) e foi possível testá-lo frente às amastigotas de *L. infantum chagasi*, sendo observado que o mesmo apresentou uma atividade de 35,56%. Essa modificação estrutural também eliminou a citotoxicidade significativa de alguns outros derivados, sendo possível avaliar a atividade dos mesmos e observar que eles apresentaram uma atividade leishmanicida significativa, como o **LQM 11.1** – efeito máximo: 26,6% (**LQM 11** – tabela 1), o **LQM 16.1** – efeito máximo: 30,37% (**LQM 16** – tabela 1), o **LQM 17.1** – efeito máximo: 66,38 e Cl₅₀: 2,2 µM (**LQM 17** – tabela 1 e **LQM 106.1** – efeito máximo: 60,4 e Cl₅₀: 3,2 µM (**LQM 191** – tabela 1).

Porém, essa diminuição de citotoxicidade não foi observada no derivado **LQM 14.1**, que manteve a citotoxicidade significativa observada no derivado

guanilidrazônico **LQM 14** (tabela 1), no entanto, a mesma foi reduzida em torno de 50% (**LQM 14.1**, citotoxicidade: 30,6%; **LQM 14**, citotoxicidade: 63,1%).

A introdução do enxofre no derivado **LQM 03.1** não influenciou na citotoxicidade, nem aumentou a atividade do composto, mantendo o mesmo inativo quando comparado com seu correspondente, **LQM 03** (tabela 1). Assim como pode ser observado nos derivados **LQM 18.1** (**LQM 18** – tabela 1), **LQM 96.1** (**LQM 96** – tabela 1), **LQM 97.1** (**LQM 97** – tabela 1) e **LQM 100.1** (**LQM 100** – tabela 1).

Essa mudança estrutural, com a troca da imina por tiocarbonila conseguiu manter a não citotoxicidade e também a atividade leishmanicida do derivado **LQM 07.1** (efeito máximo: 38,02%), quando comparado com o derivado **LQM 07** (efeito máximo: 29%, tabela 1). Como também foi observado no derivado **LQM 15.1** (efeito máximo: 40,49%, Tabela 1).

A introdução do enxofre no derivado **LQM 55.1** gerou um composto que manteve a não citotoxicidade, observada no derivado **LQM 55** (tabela 1), porém perdeu completamente a atividade antileishmania.

Isso não foi visto no derivado **LQM 10.1**, que deixou de apresentar citotoxicidade significativa, quando comparado com o **LQM 10** (tabela 1), mas gerou um composto inativo. Observação que também foi feita para os derivados **LQM 12.1** (**LQM 12**, tabela 1), **20.1** (**LQM 20**, tabela 1) e **98.1** (**LQM 98**, tabela 1).

Diante dos resultados apresentados nas tabelas de 1-4, foi possível verificar que dos setenta e oito derivados testados, sete apresentaram atividade leishmanicida acima de 50% sobre amastigotas de *L. infantum chagasi*, podendo ser comparados com a Pentamidina, que apresentou efeito máximo de 67,3% e Cl_{50} de 4,4 μ M.

Foram dois derivados aminoguanidina hidrazonas o **LQM 19** – efeito máximo: 63,8%, Cl_{50} – 4,97 μ M e **55** – efeito máximo: 63,5%, Cl_{50} – 7,7 μ M (tabela 1), um derivado guanilidrazônico heterocíclico, **LQM 195** – efeito máximo: 55,3%, Cl_{50} – 0,06 μ M (tabela 2) e quatro derivados tiossemicarbazônicos, **LQM 08.1** – efeito máximo: 56,9%, Cl_{50} – 8,73 μ M; **17.1** – efeito máximo: 66,38%, Cl_{50} – 2,2 μ M; **95.1** – efeito máximo: 60,2%, Cl_{50} – 1,6 μ M e **106.1** – efeito máximo: 60,4%, Cl_{50} – 3,2 μ M (tabela 4).

Dessa forma, pode-se inferir que os derivados citados apresentaram efeito máximo que variou entre 66,38-69,1% e Cl_{50} que foi de 0,06-8,73 μ M, demonstrando uma equivalência biológica, com pouca variação entre eles. Porém era necessário

selecionar um derivado para que fossem realizadas modificações estruturais no mesmo, em busca de um composto com melhor atividade.

No entanto, devido à similaridade da atividade leishmanicida entre eles, essa escolha teve que ser baseada avaliando-se também outro trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa. Neste estudo foi observado que o derivado LQM 17.1 demonstrou uma potente atividade leishmanicida *in vivo* em modelo de leishmaniose visceral com *L. infantum chagasi* utilizando *Mesocricetus auratus* (Golden hamsters) (SANTOS, 2015), o mesmo foi escolhido para a realização de modificações estruturais. As tabelas 5 e 6 trazem os resultados biológicos obtidos com as modificações químicas realizadas neste derivado.

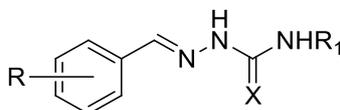
A tabela 5 mostra os resultados dos derivados guanilidrazônicos, tiossemicarbazônicos e semicarbazônico *N*-substituídos, obtidos a partir das mudanças estruturais realizadas no derivado **LQM 17.1**, que totalizaram oito compostos, cinco guanilidrazonas, duas tiossemicarbazonas e uma semicarbazona.

Nela é possível observar que os dois derivados tiossemicarbazonas, **LQM 56 e 202** não apresentaram citotoxicidade significativa. Porém, foram inativos frente a amastigotas de *L. infantum chagasi*, demonstrando assim, que a inserção de um grupamento benzil ou etil no lugar do hidrogênio terminal conservou a ausência de citotoxicidade vista no derivado **LQM 17.1**, porém, os mesmos perderam a atividade. Também pode ser visto, que apenas um derivado guanilidrazona, não apresentou citotoxicidade significativa, **LQM 105**, além de apresentar atividade leishmanicida (35,8%). Porém, a substituição do C=S por um grupamento C=NH e do N-H por um grupo etil diminuíram a atividade do derivado **LQM17.1** (66,38% - tabela 5) em quase 50%.

Todos os outros derivados guanilidrazônicos, **LQM 86-89**, mostraram uma citotoxicidade acima de 50%, ou seja, a troca do C=S por C=NH influenciou negativamente a citotoxicidade, fato que também foi visto no derivado **LQM 17** (35,5% - tabela 1), bioisómero do **LQM 17.1**. Além disso, a introdução de um grupamento etilfenil, benzil, fenil ou propilfenil aumentou a citotoxicidade para quase 100% (85, 5-99,4%).

Já o derivado semicarbazona **LQM 110** apresentou uma citotoxicidade de 40,4%. Sendo observado que a troca do C=S por C=O (semicarbazona) aumentou a citotoxicidade do composto.

Tabela 5- Derivados guanilidrazônicos, tiossemicarbazônicos e semicarbazônicos *N*-substituídos.

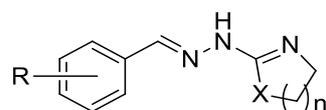


LQM	R	X	R ₁	Cl ₅₀ (µM) Amastigotas de <i>Leishmania</i> <i>infantum</i> <i>chagasi</i>	Efeito Máximo (%) Amastigotas de <i>Leishmania</i> <i>infantum</i> <i>chagasi</i>	Citotoxicidade MTT 24 h (10 µM)
56	<i>m,p</i> -Cl ₂	S	Bn	>10	na	nt
86	<i>m,p</i> -Cl ₂	NH	(CH ₂) ₃ Ph	Nd	nd	97,1 ± 3 ^{***}
87	<i>m,p</i> -Cl ₂	NH	Bn	Nd	nd	97,1 ± 3 ^{***}
88	<i>m,p</i> -Cl ₂	NH	Ph	Nd	nd	85,5 ± 0,4 ^{***}
89	<i>m,p</i> -Cl ₂	NH	(CH ₂) ₂ Ph	Nd	nd	99,4 ± 0,6 ^{***}
105	<i>m,p</i> -Cl ₂	NH	Et	>10	35,8 ± 4,9 ^{**}	nt
110	<i>m,p</i> -Cl ₂	O	H	Nd	nd	40,4 ± 2 ^{**}
202	<i>m,p</i> -Cl ₂	S	Et	>10	na	nt
Pentamidina	-	-	-	4,4 ± 0,9	67,3 ± 2 ^{***}	nt

Os resultados referem-se a: Cl₅₀ - concentração inibitória de 50% de formas amastigotas, calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média ± erro padrão da média; Efeito máximo - média da toxicidade máxima ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo; Citotoxicidade - média da citotoxicidade máxima ± erro padrão da média da citotoxicidade na concentração de 10 µM em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo e de citotoxicidade foram considerados significativos quando ^{**}p<0,01 e ^{***}p<0,001 em relação ao grupo DMSO 0,1%. na: substância não apresentou atividade letal significativa para amastigotas de *Leishmania chagasi* até a concentração de 10 µM em relação ao grupo DMSO. nt: substância não apresentou atividade letal significativa para macrófagos da linhagem J774.A1 até a concentração de 10 µM em relação ao grupo DMSO. nd: Atividade leishmanicida não determinada, pois a substância apresentou citotoxicidade até a concentração de 10 µM em relação ao grupo DMSO.

A tabela 6 traz os resultados dos derivados desenvolvidos após as ciclizações e modificações realizadas no derivado **LQM 17.1**. Sendo possível observar que a ciclização do derivado gerou dois compostos que mantiveram a não citotoxicidade, porém perderam completamente a atividade antileishmania, **LQM 59** (tiazolidina) e **60** (diidrotiazina). Já, a substituição do enxofre pela imina e a ciclização do derivado, deram origem a dois derivados citotóxicos, **LQM 142** (diidroimidazolina) e **144** (diidrotiazina). Essa citotoxicidade também foi observada no derivado guanilidrazônico **LQM 17**, como foi dito anteriormente (35,5% - tabela 1).

Tabela 6- Derivados guanilidrazônicos e tiossemicarbazônicos ciclizados.



LQM	R	X	n	Cl ₅₀ (μM) Amastigotas de <i>Leishmania</i> <i>infantum chagasi</i>	Efeito Máximo (%) Amastigotas de <i>Leishmania</i> <i>infantum chagasi</i>	Citotoxicidade MTT 24 h (10 μM)
59	<i>m,p</i> -Cl ₂	S	1	>10	na	nt
60	<i>m,p</i> -Cl ₂	S	2	>10	na	nt
142	<i>m,p</i> -Cl ₂	NH	1	nd	nd	46,8 ± 2,5***
144	<i>m,p</i> -Cl ₂	NH	2	nd	nd	42,05 ± 2***
Pentamidina	-	-	-	4,4 ± 0,9	67,3 ± 2***	nt

Os resultados referem-se a: Cl₅₀ - concentração inibitória de 50% de formas amastigotas, calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média ± erro padrão da média; Efeito máximo - média da toxicidade máxima ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo; Citotoxicidade - média da citotoxicidade máxima ± erro padrão da média da citotoxicidade na concentração de 10 μM em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo e de citotoxicidade foram considerados significativos quando **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo DMSO 0,1%. na: substância não apresentou atividade letal significativa para amastigotas de *Leishmania chagasi* até a concentração de 10 μM em relação ao grupo DMSO. nt: substância não apresentou atividade letal significativa para macrófagos da linhagem J774.A1 até a concentração de 10 μM em relação ao grupo DMSO. nd: Atividade leishmanicida não determinada, pois a substância apresentou citotoxicidade até a concentração de 10 μM em relação ao grupo DMSO.

De posse dos resultados das tabelas 5 e 6, foi possível observar que as alterações estruturais realizadas no derivado **LQM 17.1** não favoreceram a atividade, ao contrário, ou diminuíram a atividade observada no derivado original, como visto no derivado **LQM 105** (tabela 5), ou perderam completamente a atividade (**LQM 56** e **202** – tabela 5; **LQM 59** e **60** – tabela 6), ou tornaram-se citotóxicas (**LQM 86, 87, 88, 89** e **110** – tabela 5; **LQM 142** e **144** – tabela 6).

6 CONCLUSÕES

Por fim, foi visto que dos noventa compostos testados sessenta e seis não apresentaram citotoxicidade significativa frente as células utilizadas. Os derivados aminoguanidina hidrazonas LQM 02, 03, 04, 06, 07, 08, 09, 15, 18, 19, 55, 95, 96, 97, 99, 100, 130, 131, 132, 137 e 192. Assim como, os derivados guanilidrazonas heteroaril LQM 01, 13, 101, 102, 103, 104, 139, 140, 141, 195, 196 e 200 e também os derivados guanilidrazônicos dissustituídos LQM 133, 134, 135, 138 e 201. Da mesma forma os derivados tiossemicarbazônicos LQM 02.1, 03.1, 04.1, 05.1, 06.1, 07.1, 08.1, 09.1, 10.1, 11.1, 12.1, 15.1, 16.1, 17.1, 18.1, 20.1, 55.1, 95.1, 96.1, 97.1, 98.1, 100.1 e 106.1. Bem como, o derivado guanilidrazônico *N*-substituído LQM 105 e os derivados tiossemicarbazônicos *N*-substituídos LQM 56 e 202 e os derivados tiossemicarbazônicos cíclicos LQM 59 e 60.

Além disso, dos noventa derivados avaliados contra amastigotas de *L. infantum chagasi*, sete apresentaram atividade leishmanicida acima de 50% e CI_{50} menor que 10 μ M, podendo ser comparados com o fármaco-padrão utilizado nesse trabalho, pentamidina com efeito máximo de 67,3% e CI_{50} de 4,4 μ M. Foram, dois derivados aminoguanidina hidrazonas: LQM 19 que apresentou efeito máximo de 63,8% e CI_{50} de 4,97 μ M e LQM 55 que teve efeito máximo de 63,5% e CI_{50} de 7,7 μ M, um derivado guanilidrazônico heterocíclico aromático: LQM 195 que teve efeito máximo de 55,3% e CI_{50} de 0,06 μ M e quatro derivados tiossemicarbazônicos: LQM 08.1 com efeito máximo de 56,9% e CI_{50} de 8,73 μ M, LQM 17.1 que mostrou efeito máximo de 66,38% e CI_{50} de 2,2 μ M, LQM 95.1 com efeito máximo de 60,2% e CI_{50} de 1,6 μ M e LQM 106.1 com efeito máximo de 60,4% e CI_{50} de 3,2 μ M.

Posteriormente, dos sete derivados que mais se destacaram pela atividade leishmanicida, um deles foi escolhido para a realização de modificações estruturais, em busca de um composto mais ativo. Porém, devido à similaridade da atividade observada entre eles, a escolha foi baseada considerando outro trabalho desenvolvido anteriormente por nosso grupo, que revelou que o derivado LQM 17.1 apresentou uma potente atividade leishmanicida *in vivo*, em modelo de leishmaniose visceral, com *L. infantum chagasi*, assim o mesmo foi escolhido, para a realização das mudanças químicas, originando doze novos compostos, porém, as modificações realizadas não acarretaram em melhora da atividade.

Diante do exposto, é válido aprofundar os estudos com os sete derivados que se destacaram pela atividade leishmanicida contra amastigotas de *L. infantum chagasi*, avaliando mecanismos de ação e também a atividade antileishmania sobre outras espécies de *Leishmania*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. et al. Synthesis, characterization and antiplasmodial evaluation of cyclopalladated thiosemicarbazone complexes. **Journal of Organometallic Chemistry**. v. 736, p. 19e26, 2013.
- AHMED, N. et al. Synthesis and biological evaluation of tricyclic guanidine analogues of batzelladine K for antimalarial, antileishmanial, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities. **Chemical Biology and Drug Design**. p. 491-498, 2012.
- AJDACIĆ, V. et al. Synthesis and evaluation of thiophene-based guanylhydrazones (iminoguanidines) efficient against panel of voriconazole-resistant fungal isolates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 24, p. 1277–1291, 2016.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. **Acta Tropica**. v. 172, p. 86–90, 2017.
- ARIDOSS, G. et al. Synthesis and antimicrobial activities of N-chloroacetyl-2,6-diaryl piperidin-4-ones. **Med Chem Res**. v. 16, p. 188–204, 2007.
- ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. **J. Med. Microbiol**. v. 56, p. 143–153, 2007.
- ASSIS, R. R. et al. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1820, p. 1354-1365, 2012.
- BAIOCCO, P. et al. Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. **J. Med. Chem**. v. 52, p. 2603–2612, 2009.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 2 ed. Artmed. Porto Alegre, 2008.
- BERMAN, J. D. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnosis, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. **Clin. Infect. Dis**. v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 182 p. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de **Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Disponível em: [http: <www.brasil.gov.br/saude/2017/08/casos-de-leishmaniose-caem-no-pais-mas-doenca-ainda-requer-atencao>](http://www.brasil.gov.br/saude/2017/08/casos-de-leishmaniose-caem-no-pais-mas-doenca-ainda-requer-atencao) Acesso em 28 de dezembro de 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. 236, 2014.

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

BRUCE, P. Y. **Química orgânica**. 4^o ed. vol. 2. Ed. Pearson Prentice Hall, São Paulo, 2006.

CARVALHO, C. E. S. et al. Anti-*Leishmania* activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: Composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action. **Experimental Parasitology**, v. 175, p. 59e67, 2017.

CDC. Disponível em: [http: <www.dpd.cdc.gov/dpdx>](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx) Acesso em 27 de outubro de 2017.

CHAI, Y. Complexation of antimony (Sbv) with guanosine 5´-monophosphate and guanosine 5´-diphospho-Dmannose: Formation of both mono- and bis-adducts. **J. Inorg. Biochem.** v. 99, p. 2257-2263, 2005.

CHATZIS, M. K. et al. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3-4, p. 217–225, 2014.

DE ALMEIDA, et al. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 98, p. 861e870, 2003.

DEBROY, S. et al. Challenges in modeling complexity of neglected tropical diseases: a review of dynamics of visceral leishmaniasis in resource limited settings. **Emerg. Themes Epidemiol.** v. 14, n. 10, 2017.

DEGOLA, F. et al. In vitro evaluation of the activity of thiosemicarbazone derivatives against mycotoxigenic fungi affecting cereals. **International Journal of Food Microbiology**. v. 200, p. 104–111, 2015.

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

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 67, p. 2576–2597, 2012.

EISSA, M. M. et al. Miltefosine lipid nanocapsules for single dose oral treatment of Schistosomiasis Mansoni: a preclinical study. **PLoS One** 0141788. 2015.

EPIFÂNIO, W. **Síntese de derivados aminoguanidínicos planejados como protótipos de fármacos antineoplásicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de Federal de Alagoas, Maceió, 2011.

FEASEY, N. et al. Neglected tropical diseases. **Br. Med. Bull.** v. 93, p. 179e200, 2010.

FERNANDEZ, O. L. et al. Miltefosine and antimonial drug susceptibility of Leishmania/Viannia species and populations in regions of high transmission in Colombia. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 8, p. e2871, 2014.

FRÉZARD, F. et al. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. **Molecules**. v. 14, p. 2317-2336, 2009.

GAMBOA-LEON, R. et al. Antileishmanial activity of a mixture of Tridax procumbens and Allium sativum in mice. **Parasite**. v. 21, p. 15, 2014.

GARETH, T. **Medicinal chemistry: an introduction**. 2.ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009.

GIL, E. S. et al. Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares. **Vita Sanitas**, Trindade/Go, v. 1, n. 01, 2007.

GONÇALVES, A. C. R. et al. Pt^{II}, Pd^{II} and Au^{III} complexes with a thiosemicarbazone derived from diacetylmonooxime: Structural analysis, trypanocidal activity,

cytotoxicity and first insight into the antiparasitic mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 141, p. 615e631, 2017.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.** v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GRIENSVEN, J. V.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infect. Dis. Clin. N. Am.** v. 26, p. 309–322, 2012.

HUSSAIN, R.F.; NOURI, A.M.; OLIVER, R. T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **J. Immunol. Method.** v. 160, n. 1, p. 89-96, 1993.

IGBINEWEKA, O. et al., Evaluating the efficacy of topical silver nitrate and intramuscular antimonial drugs in the treatment of cutaneous leishmaniasis in sokoto, Nigeria. **Afr. J. Clin. Exp. Microbiol.** n. 13, p. 90–97, 2012.

JAIN, M., VANGAPANDU, S., SACHDEVA, S., JAIN, R. Synthesis and bloodschizontocidal antimalarial activities of 2-substituted/2,5-disubstituted-8-quinolinamines and some of their amino acid conjugates. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, p. 1003-1010, 2004.

KAUR, J. et al. *In Silico* Screening, Structure-Activity Relationship, and Biologic Evaluation of Selective Pteridine Reductase Inhibitors Targeting Visceral Leishmaniasis. **Antimicrob. Agents. chemother.** v. 55, n. 2, p. 659–666, 2011.

KHAN, F. A. K. et al. Antileishmanial evaluation of clubbed bis (indolyl)-pyridine derivatives: One-pot synthesis, in vitro biological evaluations and in silico ADME Prediction. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 27, p. 567–573, 2017.

KHAN, S.; KHAN, I.; CHAUHAN, P. M. S. Antileishmanial chemotherapy: present status and future perspectives. **Chemistry & Biology Interface**, v. 5, n. 1, p. 1–28, 2015.

LAKRITZ, J. R. et al. An oral form of methylglyoxal-bis-guanylhydrazone reduces monocyte activation and traffic to the dorsal root ganglia in a primate model of HIV-peripheral neuropathy. **J. Neurovirol.** v. 23, p. 568–576, 2017.

LAURENTI, M. D. **Patologia e patogenia das leishmanioses**. Tese (Doutorado em medicina veterinária e zootecnia), USP, São Paulo, 2010.

LINDOSO, J. A. et al. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Res. Rep. Trop. Med.** v.3, p. 69–77, 2012.

LUX, H. et al. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 111, p. 1-8, 2000.

MANZANO, J. I. et al. Arylthiosemicarbazones as antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 123, p. 161e170, 2016.

MARQUES, M. P. et al. Biological activity of antitumoral MGBG: the structural variable. **Amino Acids.** v. 34, p. 555-564, 2007.

MITROPOULOS, P. et al. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. **J. Am. Acad. Dermatol.** p. 309-322, 2010.

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

MORAIS-TEIXEIRA, E. The *in vitro* leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v. 106, n. 4, p. 475-478, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Method.**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MULLER, R. H., JACOBS, C., KAYSER, O. Nano suspensions as particulate drug formulations in therapy: rationale for development and what we can expect for the future. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.47, p. 3–19, 2001.

NUNES, M.P. et al. Cd40 Signaling Induces Reciprocal Outcomes In *Leishmania*-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. **Micro Infect.** v.7, n. 1, p. 78-85, 2005.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic Review of the Adverse Effects of Cutaneous Leishmaniasis Treatment in the New World. **Acta. Tropica**, v.118, p 87-96, 2011.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pac. J. Trop. Med.** v. 9, p. 925–932, 2016.

PAHO. Disponível em: <www.paho.org/leishmaniasis>. Acesso em: 28 de dezembro de 2017.

PAHO. Disponível em:
<www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420&Itemid=39347&lang=en>. Acesso em: 10 de janeiro de 2018a.

PAHO. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754
> Acesso em 17 de janeiro de 2018b.

PAHO. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?ua=1>> Acesso em 08 de março de 2019.

PALANIMUTHU, D. et al. *In Vitro* and *in Vivo* Anticancer Activity of Copper Bis(thiosemicarbazone) Complexes. **J. Med. Chem.** v. 56, p. 722–734, 2013.

PELOSI, G. et al. Antiretroviral Activity of Thiosemicarbazone Metal Complexes. **J. Med. Chem.** v. 53, p. 8765–8769, 2010.

PARASITOLOGIA: Disponível em:
<http://www.uft.edu.br/parasitologia/pt_BR/farmacos/paromomicina/qu%C3%ADmica/index.html> Acesso em: 10 de novembro de 2017.

PATIL, R. S. et al. Synthetic and Natural Products Against Leishmaniasis: A Review. **World J. Publ. Health. Sci.** v.1, n. 1, p. 7-22, 2012.

SACHDEVA, H.; SEHGAL, R.; KAUR, S. Studies on the protective and immunomodulatory efficacy of *Withania somnifera* along with cisplatin against experimental visceral leishmaniasis. **Parasitol. Res.** v. 112, p. 2269–2280, 2013.

SANGSHETTI, J. N. et al. Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years. **RSC Adv.** v. 5, n. 41, p. 32376–32415, 2015.

SANTOS-FILHO, O. A.; FIGUEROA-VILLAR, J. D.; ARAÚJO, M. T. Molecular modeling of the interaction of trypanocide guanyl hydrazones with B-DNA. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 7, n. 13, 1797–1802, 1997.

SANTOS, M. S. **Avaliação do potencial leishmanicida de derivados guanilidrazônicos e tiossemicarbazônicos.** Dissertação. Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, UFAL, Maceió, AL. 2015.

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, p. 1-16, 2017.

SCHRÖDER, J. et al. Identification of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Triazine Nitriles as Inhibitors of *Leishmania mexicana* Cysteine Protease CPB. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–12, 2013.

SHAWISH, H. B. et al. Nickel(II) Complex of Polyhydroxybenzaldehyde N4-Thiosemicarbazone Exhibits Anti-Inflammatory Activity by Inhibiting NF-κB Transactivation. **Plos one.** v. 9, n. 6 p. e1009332014- e100933, 2014.

SHIRIAN, S. et al. Comparison of conventional, molecular, and immunohistochemical methods in diagnosis of typical and atypical cutaneous leishmaniasis. **Arch. Pathol. Lab. Med.** v. 138, p. 235–240, 2014.

SILVA, F. P. L. et al. Synthesis and Anticancer Activities of Novel Guanyldiazone and Aminoguanidine Tetrahydropyran Derivatives. **Molecules.** v. 21, p. 671, 2016.

SLAMA, D. et al. First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae). **Parasites and Vectors.** v. 7, 2014.

SOUZA, V. L., et al. Immune and inflammatory responses to *Leishmania amazonensis* isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBA mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.106, p. 23–31, 2011.

TEIXEIRA, D. E. et al. **Atlas didático: Ciclos de vida da Leishmania**, 1ª edição, Rio de Janeiro, 2013.

WHO. **Leishmaniasis: disease burden and epidemiological trends**. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/files/direction.pdf>>. Acesso em: 26 de dezembro de 2014.

WHO. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. In: Organization WHO, editor. Geneva: WHO Technical Report Series; 2010. p. 186p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>. Acesso em: 02 de dezembro de 2017.

WHO. **Plan of action to strengthen the surveillance and control of leishmaniasis in the americas, 2017-2022**. WHO, 2018a.

WHO. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/photo_gallery/gallery/en/>. Acesso em: 16 de janeiro de 2018b.