

**UFRRJ**

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,  
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO AGROPECUÁRIA**

**TESE**

**Investigação da Atividade Antileishmania *in vitro* de  
Chalconas-Tiossemicarbazonas**

**Edinea Pastro Mendes**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E**  
**INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA *IN VITRO* DE**  
**CHALCONAS-TIOSSEMICARBAZONAS**

**EDINEA PASTRO MENDES**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Aurea Echevarria**

*e Co-orientação da Professora*  
**Marilene Marcuzzo do Canto Cavalheiro**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Área de Concentração em Patobiologia Animal.

Seropédica, RJ  
Maio / 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M538 MENDES, EDINÉA PASTRO, 1962-  
i Investigação da Atividade Antileishmania in vitro  
de Chalconas-Tiossemicarbazonas / EDINÉA PASTRO  
MENDES. - RIO DE JANEIRO, 2019.  
73 f.: il.

Orientadora: AUREA ECHEVARRIA.  
Coorientadora: MARILENE MARCUZZO DO CANTO  
CAVALHEIRO.

Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência,  
Tecnologia e Inovação em Agropecuária., 2019.

1. Chalconas. 2. Tiossemicarbazonas. 3.  
Leishmaniose. 4. Tratamento. I. ECHEVARRIA, AUREA,  
1950-, orient. II. CAVALHEIRO, MARILENE MARCUZZO DO  
CANTO , 1951-, coorient. III Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em  
Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária.. IV.  
Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que citada a fonte.

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de  
Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO  
EM AGROPECUÁRIA**

**EDINÉA PASTRO MENDES**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, área de concentração em Patobiologia Animal.

TESE APROVADA EM 13/05/2019

---

Aurea Echevarria. Dra. UFRRJ  
(Orientadora)

---

Eduardo Caio Torres dos Santos. Dr. FIOCRUZ

---

Fernanda Nunes Santos. Dra. FIOCRUZ

---

Lucia Helena Pinto da Silva. Dra. UFRRJ

---

Irene da Silva Coelho Dra. UFRRJ

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa Tese aos meus pais Pedro (em memória) e Eliza, ao meu marido Paulo Roberto Pimenta, por todo amor e incentivo e aos meus filhos, Paula e Fellipe, por darem mais sentido à minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças mesmo quando eu achava que não ia conseguir.

À minha orientadora Aurea Echevarria, pela sua dedicação, incentivo, carinho e ensinamentos. Por acreditar na minha capacidade e por ter me transmitido confiança em cada etapa, da mais fácil à mais complexa, nestes quatro anos.

À Dra Marilene Marcuzzo do Canto Cavalheiro por sua co-orientação e ensinamentos.

Ao meu chefe Dr. Edimilson Domingues da Silva, por ter me acolhido no LATED no início deste doutorado e ter me concedido todo o tempo necessário para que eu pudesse me dedicar ao máximo em todas as etapas da tese, e, também, à Eliane Couceiro, chefe substituta do laboratório, muito obrigada pelo carinho e paciência.

Aos Doutores Eduardo Caio Torres Santos, Fernanda Nunes Santos, Lucia Helena Pinto da Silva, Irene da Silva Coelho, Maria Raquel Garcia Vega e Fabio Scott por aceitarem participar da banca de avaliação.

Ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) / FIOCRUZ, ao atual Diretor Maurício Zuma e ao vice-diretor Sotiris Missailidis, pela liberação e incentivo à capacitação profissional.

Aos meus queridos amigos Hilton Jorge Nascimento e Ana Paula Dinis Ano Bom, que foram meus pilares desde o curso de especialização e mestrado. Sem palavras para descrever o tamanho da minha gratidão e reconhecimento pela capacidade profissional e pedagógica de vocês e pela transformação que fizeram em minha vida.

Ao meu amigo Gerson Silva de Lima, pela amizade, carinho e estímulo para iniciar mais uma etapa tão importante em minha vida.

À Dra. Leonor Leon e aos Doutores Elmo e Eduardo Caio Torres dos Santos por terem me recebido com todo carinho no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos e pelo apoio para a realização deste trabalho, agradeço também aos estudantes do LBqT pelo apoio.

Aos Doutores Elmo Eduardo de Almeida Amaral e Job Inácio pela ajuda com os experimentos da tripanotona redutase.

Às amigas Viviane Faiões dos Santos e Gêrzia Maria Machado pelo apoio e pela ajuda substancial com diversos experimentos desta tese.

Aos colegas do LATED: Pedro, Carlos, Michel, Keyla, Felipe, Maria Amélia, Christiane, Karen, Aline, Rafaela, Marcele, Leila, Bernardo, Cris Shaik, Amauri e, em especial, às amigas Nara Mazarakis Rubim pela correção do inglês e à querida amiga do LAMAM Renata Chagas Bastos, pelo apoio, carinho, incentivo e pelos momentos de descontração com muitas gargalhadas para aliviar a tensão.

Ao coordenador do PPGCTIA / UFRRJ, Prof. Mauro Antonio Homem Antunes, à vice-coordenadora Prof<sup>a</sup>. Lucia Helena Cunha dos Anjos e a nossa querida secretária Renata Gomes, por todo apoio e ajuda.

Aos amigos da turma de doutorado / 2015 do PPGCTIA pelo carinho, amizade e pelos agradáveis e harmoniosos encontros nas disciplinas, no Slactia I e II e no “Tic-Tita” e em especial, Diná, Sérgio e Rafael por nos representarem no Conselho da Pós-Graduação.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta Tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, da UFRRJ, e a todos os seus professores.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## BIOGRAFIA

Edinéa Pastro Mendes, filha de Pedro Mendes Filho e Maria Eliza Pastro Mendes, nascida em 09 de abril de 1962 no Estado da Guanabara, Brasil. cursou o segundo grau em Habilitação Básica em Saúde no Colégio Estadual Prefeito Mendes de Moraes e realizou estágio curricular em Patologia Clínica no PAM Treze de Maio, em 1980. Em dezembro de 1981 ingressou na Fiocruz, na unidade de Bio-Manguinhos, como celetista pelo projeto Finep/Fipecc, para trabalhar na transferência de tecnologia (Brasil-Japão) de produção das vacinas contra sarampo e poliomielite para o Instituto, tendo trabalhado ativamente nas produções dos lotes de consistências dessas duas vacinas. Em 1991 tornou-se Servidora Pública - RJU na mesma Instituição. Em 1989 graduou-se no curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas da Fundação Técnico Educacional Souza Marques. Foi aprovada em 2008 para o Curso de Especialização em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e apresentou a monografia intitulada: “Proposta de Metodologia Para o Controle de Matérias Primas a Serem Utilizadas na Produção de Conjugados de Anticorpos Policlonais de Cabra com Peroxidase de Raiz Forte” sob a orientação da MsC. Maria Aparecida Afonso e co-orientação do Dr. Hilton Jorge do Nascimento. Em 2010 foi aprovada pelo mesmo programa de pós-graduação para o mestrado profissional, tendo defendido a dissertação em 2013 intitulada: “Desenvolvimento de Controles de Processo Para a Produção de Conjugado de Anticorpo Anti-IgG Canina com Peroxidase de Raiz Forte Utilizado no Kit Para Detecção de Leishmaniose Canina”, sob a orientação das Doutoradas Maria Helena Simões Vilas Bôas e Ana Paula Dinis Ano Bom. De 1990 a 2014 atuou na produção de Kits de Reativos para Diagnóstico (Lâminas de Imunofluorescência indireta para detecção do HIV - tendo sido responsável pela produção, cultivo e manutenção de células K-37 infectadas e não infectadas do Kit IFI/HIV -1/2 e Ensaio Imunoenzimático para Detecção do Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B - ELISA - HBsAg). Possui experiência na produção e purificação de anticorpos policlonais e conjugação de polissacarídeos e anticorpos. Foi gestora na Seção de Insumos Conjugados e Apoio no Departamento de Reativos para Diagnóstico, na produção de anticorpos conjugados que compõe os kits de diagnóstico de diversas patologias tais como: Leishmaniose Humana, Leishmaniose Visceral Canina, Leptospirose, Doença de Chagas e HIV. Participou ativamente da transferência de tecnologia e produção dos Kits de Teste Rápido HIV 1/2 e da Transferência de Tecnologia para produção dos kits DPP (Dual Path Platform) HIV1/2, Leptospirose, Leishmaniose Visceral Canina e Sífilis, no Brasil. Em 2014 foi aprovada no processo de seleção para o Doutorado do Programa de Pós-Graduação de Ciência, Tecnologia e inovação em Agropecuária (PPGCTIA), área de concentração em Patobiologia Animal da UFRRJ, sob a orientação da Prof. Áurea Echevarria. Atualmente, exerce diversas atividades de desenvolvimento de reativos para diagnóstico no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED/VDTEC/Fiocruz).

## RESUMO

Mendes, Edinéa Pastro. **Investigação da atividade antileishmania *in vitro* de chalconas-tiossemicarbazonas**. 2019. 73f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

As leishmanioses são doenças transmitidas por insetos vetores, flebotomíneos, infectados com parasitos do gênero *leishmania* spp. e constituem um grave problema de saúde pública mundial, além de estarem relacionadas entre as seis grandes endemias humanas. Essas doenças apresentam uma ampla variedade de manifestações clínicas na sua forma cutânea causando grande deformidade, e na forma visceral com elevado número de morbidade e mortalidade se não for diagnosticada e tratada. A característica limitante, pela dificuldade de acesso e adesão ao tratamento, pela falta de investimentos na criação de novos fármacos pela indústria farmacêutica e políticas sociais ineficientes. O tratamento utilizado não é satisfatório em relação a efetividade e toxicidade, e há resistência aos fármacos disponíveis, ocasionado pela sensibilidade de diversas cepas a estas substâncias, além de ser longo e requerer internação. Assim, objetivando encontrar novos agentes antiparasitários que possam auxiliar no tratamento das leishmanioses, foi avaliada uma série de sete chalconas-tiossemicarbazonas, com diferentes grupos substituintes (CT-H, CT-Me, CT-CN, CT-F, CT-Br, CT-Cl e CT-NO<sub>2</sub>) frente às formas promastigotas de parasitos de *Leishmania* spp. As chalconas são produtos naturais amplamente distribuídos nas plantas superiores que apresentam diversificada atividade biológica incluindo a antiparasitária. A utilização das estruturas moleculares dessas substâncias como protótipos poderão possibilitar a obtenção de novas substâncias com potencial atividade antiparasitária. A introdução de grupos moleculares da classe das tiossemicarbazonas, também com já relatada atividade antiparasitária, poderá provocar a interação com enzimas dependentes de ferro presentes nos parasitos da família dos tripanossomatídeos favorecendo o efeito antiparasitário. Os primeiros resultados com as substâncias a 50 µM testadas frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* apresentaram uma boa atividade antileishmania. A avaliação frente às *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. braziliensis* na forma de promastigotas em concentrações na faixa de 1,56 a 50 µM indicou eficiência dos protótipos, a pentamidina foi utilizada como controle positivo da reação. A citotoxicidade dos compostos, avaliada em células não infectadas de macrófagos murinos em culturas de 72 h, apresentou valores de DL<sub>50</sub> para CT-Br e CT-Cl 44,24 e 32,75 µM, respectivamente, demonstrando serem menos citotóxicos do que a pentamidina. As formas amastigotas intracelulares foram avaliadas com e sem as substâncias em teste. A viabilidade dos parasitos foi determinada utilizando o ensaio de MTT. Os resultados mostraram que a CT-Cl foi o composto mais ativo para as três espécies testadas. Apresentando IC<sub>50</sub> na faixa de 5,22 µM para *L. amazonensis*, 3,97 µM para *L. infantum* e 3,89 µM para *L. braziliensis*, respectivamente, e a pentamidina apresentou IC<sub>50</sub> = 5,20 µM. Os outros compostos também apresentaram bons resultados com IC<sub>50</sub> na faixa de 4,34 a 14,80 µM. Nos ensaios com amastigotas axênicas de *L. amazonensis* foram obtidos valores de IC<sub>50</sub> na faixa de 6,18 a 14,74 µM, indicando atividade promissora. Neste estudo, também foi investigado o mecanismo de ação das substâncias mais ativas na via da enzima tripanotiona redutase e via NO sintase através da avaliação de óxido nítrico. No entanto, não foram observados resultados positivos que indicassem essas vias como significativas para a ação das chalconas-tiossemicarbazonas. Os resultados obtidos frente as três espécies avaliadas quanto a ação de chalconas-tiossemicarbazonas, inéditas, pela primeira vez relatadas nesse trabalho de tese, indicaram essa classe de substâncias como potenciais agentes antileishmania.

Palavras-chave: Leishmanioses. Chalconas. Tiossemicarbazonas.



## ABSTRACT

MENDES, Edinéa Pastro. **Investigation of *in vitro* antileishmanial activity of chalcones-thiosemicarbazones.** 2019. 73p. Thesis (Doctorate in Science, Technology and Innovation in Agriculture). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The leishmaniosis are a serious global public health problem, affecting patients with pronounced deformity, morbidity and mortality, as well as difficulty of access and adherence to treatment, lack of investment in the development of new drugs by pharmaceutical industry and inefficient social policies. The treatment used is not adequate due to drug effectiveness and toxicity. Additionally, resistance to available drugs has been shown by the sensitivity of several strains to these substances and treatment can be long and require hospitalization. In an attempt to find new anti-parasitic agents that can help with Leishmaniosis treatment, a series of seven chalcones-thiosemicarbazones with different substituents (CT-H, CT-Me, CT-CN, CT-F, CT-Br, CT-Cl and CT-NO<sub>2</sub>) against the promastigote forms of parasites of *Leishmania spp* was assessed. Evaluation started through the screening of different substances at 50µM concentration with promastigote forms of *L. amazonensis*, and when leishmanicidal activity was observed, a further evaluation with *L. amazonensis*, *L. infantum* and *L. braziliensis* was performed in the form of promastigotes at concentration range of 50 to 1.56 µM dissolved in DMSO. Parasite cultures were prepared with Schneider's medium supplemented with 10% or 20% of bovine fetal serum, arranged in 96 wells microplates and incubated at 26° C for 12 h. All trials were conducted in triplicate in three independent assays and pentamidine was used as positive control. The cytotoxicity of these compounds was assessed in uninfected cells with murine peritoneal macrophages in 24 h presenting LD<sub>50</sub> values (µM) for CT-Br and CT-Cl 44.24 and 32.75 µM respectively, demonstrating that those compounds are less cytotoxic than pentamidine whose value was = 8.5 . The promastigote forms were cultivated with and without these substances in Schneider's culture medium and incubated at the 26° C for 12 hours using pentamidine isethionate as a reference drug. After incubation, the viability of the parasites was determined by using the MTT assay. The results showed that the CT-Cl was the most active compound for the three species tested, presenting IC<sub>50</sub> = 5.22 µM to *L. amazonensis*, 3.97 µM to *L. infantum* and 3.89 µM to *L. braziliensis*, respectively. Pentamidine presented IC<sub>50</sub> = 5.20 µM. The other compounds also obtained good results with IC<sub>50</sub> in the range of 4.34 to 14.80 µM. In trials of CT with the *L. amazonensis* axenic amastigotes IC<sub>50</sub> values were obtained in the range of 6.18 to 14.74 µM, indicating very interesting activity. This study also investigated the mechanism of action of most active substances in trypanothione reductase enzyme and the NO synthase pathways by evaluating nitric oxide. However, positive results were not observed to support those pathways as significant to chalcones-thiosemicarbazones action. The results obtained by the evaluation of chalcones-thiosemicarbazones action on the three species indicate this class of substances as potential antileishmanial agents.

**Key words:** Leishmaniosis. Chalcones. Thiosemicarbazones

## RESUMEN AMPLIADO

MENDES, Edinéa Pastro. **Investigación *in vitro* de la actividad antileishmaniasis de chalconas-tiosemicarbazonas.** 2019. 73p. Tesis (Doctorado en Ciencia, Tecnología y Innovación en Agropecuaria). Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. UFRRJ, 2019.

### 1. Introducción

El leishmaniasis forman un conjunto de enfermedades infecciosas que pueden ser crónicas o mortales, con gran importancia clínica y epidemiológica, que atacan a principalmente individuos de países en desarrollo. El leishmaniasis son causados por parásitos protozoarios del género *Leishmania* obligatorio intracelulares. Protozoosis afectan a aproximadamente 12 millones de personas en el mundo, con especial relevancia en las regiones tropicales y subtropicales, que según la Organización Mundial de la Salud, las clasificó entre las seis principales enfermedades endémicas humanas. Cada año aparecen nuevos casos de leishmaniasis en el mundo, aproximadamente 2 a 4 millones, llevando a alrededor 70.000 muertes debido a la evolución de la enfermedad, de la forma visceral. Se considera una enfermedad que representa un problema grave de salud pública y que amenaza a las poblaciones de los países en desarrollo con importantes pérdidas económicas.

Un factor importante que ayuda a entender el aumento de la incidencia de estas enfermedades es la aparición de parásitos resistentes a los fármacos utilizados actualmente en la clínica, así como los vectores han presentado, en particular, la resistencia a los insecticidas. Crecientes poblaciones endémicas en los países subdesarrollados, en desarrollo y desarrollados debido al proceso de migración, están también fuertemente relacionados con la co-infección por otras enfermedades como el HIV, por ejemplo. El cambio climático, deforestación, crecimiento urbano desordenado, agroturismo, entre otros factores, también han contribuido significativamente al aumento de leishmaniasis.

Los estudios de nuevas sustancias con potencial acción leishmanicida ha sido eficazmente estimulados, sin embargo, el conocimiento producido no revierte sobre avances terapéuticos, tales como, por ejemplo, nuevos candidatos a fármacos. En este sentido, el propósito principal de este estudio fue contribuir al conocimiento de la actividad biológica de nuevas sustancias sintéticas, chalconas-tiosemicarbazonas, con el prototipo del producto natural chalcona, para el tratamiento de leishmaniasis así como su posible mecanismo de acción (MACIEL y ECHEVARRIA, 2002).

### 2. Material y Métodos

En esta tesis, 7 (siete) chalconas-tiosemicarbazonas (CT-H: **M1**, CT-Me: **M2**, CT-CN: **M3**, CT-F: **M4**, CT-Br: **M5**, CT-Cl: **M6** y CT-NO<sub>2</sub>: **M7**) fueron sintetizadas, purificadas y caracterizadas en el Departamento de Química de la UFRRJ. Todas las sustancias fueron diluidas en DMSO para la acción y más tarde, en medio de cultivo para obtener una solución a 1 mM y una concentración de 0,01% para el DMSO y pentamidina (10 µg/mL) se utilizó como referencia (DA SILVA *et al.*, 2002). Fueron utilizadas cepas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. infantum* proporcionadas por el Laboratorio de Bioquímica de Trypanosomátidos/IOC/Fiocruz.

Las evaluaciones de las actividades antileishmania de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. infantum* en forma de promastigotas se celebraron en medio de cultivo a pH 7,2 suplementado con suero bovino fetal 10%. El cultivo fue realizado en microplacas de 96 pozos y se incubaron a 26 °C. Posteriormente, parásitos fueron contados en cámara de Neubauer, y todos los ensayos

se realizaron por triplicado y repetidos por lo mínimo dos veces. Se evaluaron el efecto citotóxico y la viabilidad celular de las sustancias en macrófagos peritoneales murinos calculando la IC<sub>50</sub>, que es la concentración que se obtiene un efecto tóxico que inhibe el 50% de crecimiento de las células.

Para la evaluación de la actividad en amastigotas intracelulares en macrófagos peritoneales murinos, se obtuvieron mediante lavado peritoneal con RPMI. Las pruebas fueron conducidas en cámaras LAB-TEK y posteriormente se incubaron con promastigotas de *L. amazonensis* en la presencia de las sustancias de prueba. Las estructuras fueron reveladas después de la tinción con el sistema de tinte hematológico Prov instantánea mirando hacia un microscopio. Los resultados se expresaron en la tasa de infección (IF), utilizando la siguiente fórmula: IF = % de células infectadas x amastigotas total / número de macrófagos. Las amastigotas axénicas fueron producidas a partir del cultivo de promastigotas de *L. amazonensis*, siguiendo el protocolo de Cysne-Finkelstein *et al.*, (1998). Para evaluar la actividad en las amastigotas axénicas, los parásitos se incubaron en concentraciones crecientes de los prototipos. La actividad leishmanicida se evaluó por el método del azul de Alamar (resazurina). La medida cuantitativa de la viabilidad celular se midió mediante fluorimetría con irradiación en 560 nm y emisión a 590 nm.

### 3. Resultados y Discusión

La actividad de promastigotas de *L. amazonensis* fue evaluada frente a la serie de siete chalconas-tiosemicarbazonas sustituidas. Las sustancias con grupos ciano (CN, **M3**), flúor (F, **M4**) y nitro (NO<sub>2</sub>, **M7**) no demostraron ninguna actividad importante. Sin embargo, las sustancias **M1** (H), **M2** (CH<sub>3</sub>) y **M5** (Br) mostraron actividad significativa en el rango de 11,02 a 14,68 µM y la chalcona-tiosemicarbazona sustituida por cloro (Cl, **M6**) fue la más activa con IC<sub>50</sub> = 5,22 ± 0,75 µM en el mismo rango que la pentamidina (IC<sub>50</sub> = 5,20 ± 0,41 µM, utilizada como control positivo). *L. braziliensis* presentó los valores de IC<sub>50</sub> para **M1**, **M2** y **M4** en la gama de 12,93 a 10,78 µM y para la especie *L. braziliensis* la sustancia CT-Cl, **M6**, fue la más activa con IC<sub>50</sub> = 7,70 ± 0,23 µM, mientras que el control positivo presentó 3,91 ± 0,90 µM. Para la especie *L. infantum* todos los valores de IC<sub>50</sub> se observaron en la gama de 4,44 a 6,46 µM y la sustancia cloro-sustituida, **M6**, también, en este caso, fue la más activa con IC<sub>50</sub> = 4,44 ± 0,95 µM.

Las amastigotes intracelulares fueron evaluadas en cuatro CT: **M1**, **M2**, **M5** y **M6**, que mostraron resultados consistentes en los ensayos con promastigotas de la especie *L. amazonensis*, en tiempos de tratamiento de 48 horas. Los valores de IC<sub>50</sub> se observaron en 3,8 µM para la CT bromo-sustituida (**M5**) y 4,75 µM para la cloro-sustituida (**M6**). La pentamidina presentó IC<sub>50</sub> = 1,9 µM en las condiciones investigadas.

Los resultados obtenidos en las pruebas de citotoxicidad en macrófagos murinos de 72 horas, permitió calcular los valores de LD<sub>50</sub> para las sustancias **M5** de 44,24 ± 3,34 y **M6** 32,75 ± 1,74 que presentaron la actividad bajo las amastigotes intracelulares. Los resultados indicaron una baja toxicidad para las sustancias **M5** y **M6**, observando que el **M6** fue la más activa en las 3 especies de *Leishmania* entre las sustancias evaluadas. Además, los resultados fueron mejores que la pentamidina para *L. amazonensis* y *L. infantum*, con mayor índice de selectividad.

La prueba con los amastigotes axénicas de *L. amazonensis* presentaron valores de IC<sub>50</sub> en el rango de 3,19 a 7,08 µM y la sustancia cloro-sustituida, **M6**, demostró ser también la más activa con IC<sub>50</sub> = 3,19 ± 1,20 µM. Todas las sustancias evaluadas fueron más activas que la pentamidina (IC<sub>50</sub> = 12,29 ± 1,17 µM).

#### 4. Conclusiones

El estudio con las chalconas-tiosemicarbazonas mostró resultados muy interesantes en la importante acción de estas sustancias y como potenciales agentes antiparasitarios frente a *L. amazonensis*, *L. infantum* y *L. braziliensis*. Una de las sustancias estudiadas, la **M6** (cloro-sustituida) fue la más activa frente a las promastigotas de todas las especies evaluadas. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para *L. infantum* todas las sustancias investigadas mostraron actividad significativa, mayor que la pentamidina utilizada como control positivo en el tratamiento clínico.

Las sustancias estudiadas fueron importantes posteriores estudios más detallados a como prototipos para nuevos agentes leishmanicidas, pues presentaron actividades específicas muy importantes. Pruebas de citotoxicidad realizadas hasta ahora han demostrado que la sustancia **M6** es menos tóxica que la pentamidina y, con mayor índice de selectividad para las promastigotas de *L. amazonensis* y *L. infantum*.

Los mecanismos de acción investigados, hasta el momento, la producción de óxido nítrico y la acción de la enzima tripanotona reductasa, no parecen ser los más relevante para estas sustancias, y se requiere la continuidad de estudios con otros mecanismos posibles.

Las chalconas-tiosemicarbazonas fueron evaluadas contra los parásitos del género *Leishmania* por primera vez y resultaron como importantes prototipos para el desarrollo de nuevos agentes para el tratamiento de las leishmanioses.

**Palabras clave:** Leishmaniosis. Chalconas. Tiosemicarbazonas.

## LISTA DE ABREVIações

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
CT	Chalcona-tiossemicarbazona
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)
2TNB	Ácido 2-nitro-5-tiobenzóico
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FS	Fração solúvel
IC <sub>50</sub>	Concentração de inibição de 50%
IF	Índice de infecção
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IS	Índice de seletividade
LATED	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
LBqT	Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos
LD <sub>50</sub>	Dose letal mediana
LDPC	Leishmaniose dermal pós-calazar
LT	Leishmaniose cutânea ou tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MS	Ministério da Saúde
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PBS	Tampão salina fosfato
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
WHO	<i>World Health Organization</i>
TR	Tripanotiona redutase
[T(S) <sub>2</sub> ]	Tripanotiona oxidada
T(S) <sub>2</sub>	Tripanotiona regenerada

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Manifestações clínicas das leishmanioses .....	4
<b>Figura 2</b>	Formas de <i>Leishmania</i> spp. ....	6
<b>Figura 3</b>	Ciclo biológico e modo de transmissão da <i>Leishmania</i> spp. ....	7
<b>Figura 4</b>	Número de casos de leishmaniose cutânea e mucosa nas sub-regiões e em países selecionados das Américas, 2001-2016 .....	8
<b>Figura 5</b>	Casos de leishmaniose visceral nos países com maior número de casos, Américas, 2001-2016 .....	9
<b>Figura 6</b>	Distribuição geográfica de leishmaniose visceral e cutânea nas Américas	10
<b>Figura 7</b>	Estruturas químicas gerais de chalconas, aril-tiossemicarbazonas e chalconas-tiossemicarbazonas .....	16
<b>Figura 8</b>	Organograma com as diversas etapas dos experimentos realizados .....	18
<b>Figura 9</b>	Amostras de chalconas-tiossemicarbazonas utilizadas nos ensaios .....	19
<b>Figura 10</b>	Estrutura química das chalconas-tiossemicarbazonas utilizadas nos ensaios frente aos parasitos do gênero <i>Leishmania</i> .....	25
<b>Figura 11</b>	Estruturas moleculares das chalconas-tiossemicarbazonas fenil-substituída e seus complexos metálicos .....	28
<b>Figura 12</b>	Gráfico resultante de um dos ensaios em 24 h da chalcona-tiossemicarbazona M2 frente a <i>L. amazonensis</i> correlacionando % de parasitos vivos <i>versus</i> log da dose .....	29
<b>Figura 13</b>	Gráfico resultante de um dos ensaios em 24 h da chalcona-tiossemicarbazona M2 frente a <i>L. braziliensis</i> correlacionando % de parasitos vivos <i>versus</i> log da dose .....	30
<b>Figura 14</b>	Gráfico resultante de um dos ensaios em 24 h da chalcona-tiossemicarbazona M2 frente a <i>L. infantum</i> correlacionando % de parasitos vivos <i>versus</i> log da dose .....	31
<b>Figura 15</b>	Comparação dos valores de IC <sub>50</sub> (μM) das CT e pentamidina frente a <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> .....	32
<b>Figura 16</b>	Resultados dos IC <sub>50</sub> calculados a partir do % de infecção dos macrófagos com amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> .....	33
<b>Figura 17</b>	Fotomicrografia de macrófagos infectados e tratados com CT-Cl por 48h. Macrófagos peritoneais murinos infectados com <i>L. amazonensis</i> foram incubados com o protótipo CT-Cl .....	35
<b>Figura 18</b>	Comparação entre os valores de IC <sub>50</sub> (μM) das formas promastigotas e amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i> .....	43
<b>Figura 19</b>	Gráficos obtidos dos ensaios das amastigotas axênicas de <i>L. infantum</i> tratadas com as chalconas-tiossemicarbazonas M1, M2 e M4, para o cálculo dos valores de IC <sub>50</sub> .....	37
<b>Figura 20</b>	Ação dos compostos M2 e M6 sobre a atividade enzimática da tripanotona redutase .....	38

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Agente etiológico, síndrome clínica e distribuição geográfica das leishmanioses que acometem seres humanos .....	4
<b>Tabela 2</b>	Fármacos disponíveis na clínica para o tratamento das leishmanioses, fórmulas químicas, custos, vantagens e desvantagens .....	14
<b>Tabela 3</b>	Códigos, fórmulas e massas moleculares das chalconas-tiossemicarbazonas testadas .....	19
<b>Tabela 4.</b>	Percentual de parasitos mortos após o tratamento de 24 h com as CT 50 $\mu$ M .....	26
<b>Tabela 5</b>	Valores de IC <sub>50</sub> (concentração de composto necessária para matar 50% $\pm$ SD do parasito) das chalconas-tiossemicarbazonas (M1-M6) contra promastigotas de <i>L. amazonensis</i> nos ensaios de 24 h .....	27
<b>Tabela 6</b>	Valores de IC <sub>50</sub> (concentração de composto necessária para matar 50% $\pm$ DP* do parasito) das chalconas-tiossemicarbazonas contra promastigotas de <i>L. braziliensis</i> nos ensaios de 24 h .....	29
<b>Tabela 7</b>	Valores de IC <sub>50</sub> (concentração de composto necessária para matar 50% $\pm$ DP* do parasito) das chalconas-tiossemicarbazonas contra promastigotas de <i>L. infantum</i> nos ensaios de 24 h .....	30
<b>Tabela 8</b>	Valores de IC <sub>50</sub> (concentração de inibição capaz de matar 50% $\pm$ DP* do parasito) das chalconas-tiossemicarbazonas contra promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> nos ensaios de 24 h .....	31
<b>Tabela 9</b>	Valores de DL <sub>50</sub> ( $\mu$ M) para os ensaios de citotoxicidade das chalconas-tiossemicarbazonas M5 e M6 e pentamidina frente a macrófagos murinos em culturas de 72 horas, IC <sub>50</sub> frente às amastigotas intracelulares e índice de seletividade considerando os resultados de IC <sub>50</sub> frente às amastigotas intracelulares .....	34
<b>Tabela 10</b>	Valores de IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) para os ensaios de amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i> frente às chalconas-tiossemicarbazonas e pentamidina em culturas de 72 h .....	35
<b>Tabela 11</b>	Valores de IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) para as substâncias M1, M2 e M4 avaliadas frente a amastigotas axênicas de <i>L. infantum</i> em cultura de 72 h .....	36

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
2.1 Leishmaniose .....	2
2.1.1 Leishmaniose cutânea .....	2
2.1.2 Leishmaniose mucosa ou mucocutânea .....	2
2.1.3 Leishmaniose cutâneo-difusa .....	3
2.1.4 Leishmaniose visceral ou calazar .....	3
2.1.5 Leishmaniose dérmica pós-calazar .....	3
2.2 Classificação .....	5
2.3 Ciclo de Transmissão e Aspectos Biológicos .....	6
2.4 Epidemiologia .....	7
2.5 Diagnóstico .....	11
2.6 Quimioterapia .....	11
2.7 As Chalconas-Tiossemicarbazonas (CT) .....	15
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	17
3.1 Materiais .....	17
3.1.1 Equipamentos .....	17
3.1.2 Reagentes, solventes e soluções .....	17
3.2 Local de Realização do Trabalho de Tese .....	18
3.3 Organização das Etapas do Delineamento do Estudo .....	18
3.4 Preparo de Solução Estoque das Chalconas-Tiossemicarbazonas .....	19
3.5 Ensaios Biológicos .....	19
3.5.1 Parasitos .....	19
3.5.2 Droga de referência .....	20
3.5.3 Animais .....	20
3.5.4 Manutenção das culturas de <i>L. amazonensis</i> e de <i>L. infantum</i> .....	20
3.5.5 Manutenção da cultura de <i>L. braziliensis</i> .....	20
3.5.6 Atividade leishmanicida .....	20
3.5.7 Triagem contra promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> .....	21
3.5.8 Avaliação da atividade anti <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> .....	21
3.5.8.1 Método colorimétrico de avaliação da sensibilidade do parasito – MTT .....	21
3.5.8.2 Avaliação contra as amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> .....	21
3.5.9 Produção e manutenção de amastigotas axênicas em cultura de <i>L. amazonensis</i> .....	22
3.5.9.1 Cultivo e atividade anti-amastigota axênica de <i>L. amazonensis</i> .....	22



3.5.9.2 Cultivo e atividade anti-amastigota axênica de <i>L. infantum</i> .....	23
3.5.10 Avaliação da citotoxicidade .....	23
3.5.11 Quantificação de óxido nítrico extracelular .....	23
3.5.12 Atividade frente a tripanotona redutase de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> .....	24
3.5.12.1 Obtenção de fração solúvel (FS) de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> .....	24
3.5.12.2 Determinação da concentração protéica .....	24
3.5.12.3 Atividade dos compostos sobre a atividade enzimática da tripanotona redutase (TR) na FS de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> .....	24
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
4.1 As Chalconas-Tiossemicarbazonas (CT) .....	25
4.2 Atividade Leishmanicida .....	26
4.2.1 Triagem dos compostos em 50 $\mu$ M .....	26
4.2.2 Atividade antileishmania para promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> .....	27
4.2.3 Atividade antileishmania para amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> .....	32
4.2.4 Avaliação da citotoxicidade frente a macrófagos murinos .....	33
4.2.5 Atividade antileishmania para amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i> .....	34
4.2.6 Atividade antileishmania para amastigotas axênicas de <i>L. infantum</i> .....	36
4.3 Avaliação da Produção de Óxido Nítrico .....	37
4.4 Avaliação do Efeito Inibitório da Enzima Tripanotona Redutase .....	37
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>39</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>40</b>
<b>7 ANEXOS</b> .....	<b>49</b>

# 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses formam um conjunto de doenças infecciosas que podem ser crônicas ou fatais, com elevada importância clínica e epidemiológica. Essas doenças atingem, principalmente, indivíduos de países em desenvolvimento. As leishmanioses são causadas por protozoários parasitos intracelulares obrigatórios, do gênero *Leishmania*. São protozooses que afetam aproximadamente 12 milhões de pessoas no mundo, com principal relevância nas regiões tropicais e subtropicais, recebendo assim, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, a classificação de estar entre as seis grandes endemias humanas.

A cada ano surgem novos casos de leishmaniose no mundo, aproximadamente de 2 a 4 milhões, acarretando em torno de 70.000 mortes devido a evolução da doença, na forma visceral. Sendo considerada uma doença negligenciada, ela representa um grave problema de saúde pública que ameaça populações de países em desenvolvimento com significativas perdas econômicas.

Um fator importante no aumento da incidência dessas doenças é o surgimento de parasitos resistentes aos fármacos utilizados, atualmente, em clínica, assim como os vetores tem apresentado resistência aos inseticidas. As populações endêmicas crescentes nos países subdesenvolvidos, em desenvolvimento e desenvolvidos devido ao processo migratório, também estão fortemente relacionadas à co-infecção devido a outras doenças como os portadores de HIV, por exemplo.

As mudanças climáticas, desmatamentos, crescimento urbano desordenado, agro turismo, dentre outros fatores, também tem contribuído de forma significativa para o aumento das leishmanioses.

Devido aos efeitos colaterais severos referentes à toxicidade dos medicamentos disponíveis, existe um expressivo número de pacientes que abandonam o tratamento. Os estudos de novas substâncias com potencial ação leishmanicida tem sido efetivamente incentivado, porém, o conhecimento produzido não se reverte em avanços terapêuticos, como, por exemplo, novos candidatos a fármacos. Há, contudo, pouco interesse da indústria farmacêutica nesse tema, que pode ser justificado pelo reduzido potencial de retorno lucrativo para a indústria, uma vez que a população atingida é de baixa renda e de países em desenvolvimento.

Neste sentido, o objetivo principal deste estudo foi contribuir para o conhecimento da atividade biológica de novos compostos sintéticos, chalconas-tiossemicarbazonas (CT), tendo como protótipo os produtos naturais chalconas, para o tratamento das leishmanioses, bem como seu possível mecanismo de ação.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a atividade leishmanicida de uma série de CT frente aos parasitos do gênero *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*) nas formas promastigotas, amastigotas intracelulares e axênicas;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos;
- Avaliar o possível mecanismo de ação antiparasitário envolvendo as enzimas antioxidantes, especialmente a óxido nítrico sintase (NOS), para os compostos que apresentarem atividade significativa;
- Investigar a possível ação das CT mais ativas sobre a enzima tripanotona redutase (TR).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Leishmaniose

Há cerca de 20 espécies do gênero *Leishmania* classificadas que podem infectar o homem e são responsáveis por causar diferentes manifestações clínicas da leishmaniose (CUPOLILLO, 2000) e é transmitida por 30 espécies de flebotomíneos, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Outros modos de transmissão, incluindo transfusão sanguínea, compartilhamento de seringa por usuários de drogas ou, raramente, através de acidente laboratorial são, também, observados (MYLER & FASEL, 2008).

Esta doença consiste de quatro síndromes clínicas principais: Leishmaniose Cutânea ou Tegumentar (LC), Leishmaniose Muco-cutânea (LM), Leishmaniose Visceral (LV) ou calazar e Leishmaniose Dermal Pós-Calazar (LDPC) (CHAPPUIS et al., 2007). No caso da LC a infecção acomete pele e mucosas e, no caso da LV acomete órgãos internos, sendo potencialmente fatal para o homem. Esta enfermidade é um grande problema de saúde pública e apresenta taxa de letalidade que pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado (WHO, 2015).

#### 2.1.1 Leishmaniose cutânea

É a forma mais comum de leishmaniose, causando úlceras na face, membros anteriores ou membros posteriores (BLANCO et al., 2013). A lesão inicia-se com uma área de vermelhidão e inchaço no local da inoculação com aumento no tamanho e, após 3-4 semanas, desenvolve lesão ulcerada com bordos elevados e fundo granulomatoso (NEUBER et al., 2008). A LC é tipicamente causada por *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (DE BRITO et al., 2012; FRAGA et al., 2012), embora *L. infantum* e *L. donovani* também possam estar implicadas (NEUBER et al., 2008). Nas Américas, as principais espécies envolvidas são as do complexo *L. mexicana* e do subgênero *Vianna* (MYLER, 2008). No Brasil a principal espécie causadora da LC é a *L. braziliensis*. A cura da doença é observada após 6-12 meses com cicatrização e desfiguração da pele do paciente. A cura espontânea nas Américas é mais rara, porque a lesão tende a ser mais severa (NEUBER et al., 2008). Cerca de 1/3 dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem nas Américas, no Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Estima-se que de 700 mil a 1,3 milhão de novos casos ocorram anualmente (Figura 1A) (OMS, 2010).

#### 2.1.2 Leishmaniose mucosa ou mucocutânea

A leishmaniose mucosa (LM), também denominada espúndia, é condição de difícil tratamento e prognóstico reservado quanto à possibilidade de cura. Na maioria dos casos ocorre em um intervalo de tempo variável após a instalação da lesão cutânea inicial. Os fatores que contribuem para que uma doença inicialmente cutânea evolua para essa forma tardia não são de todo conhecidos, mas sabe-se que a demora na cicatrização da lesão primária e tratamento inicial inadequado podem estar associados (MARSDEN, 1986; OMS, 1990; CARVALHO, 1995).

Evolui para uma parcial ou total destruição das mucosas do nariz, boca e garganta (DANESHOD et al., 2011, STRAZZULLA et al., 2013). É causada, principalmente, por *L. braziliensis*, mas também, ocasionalmente, por *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (FRAGA et al., 2012, GUERRA et al., 2011). Por meio da corrente sanguínea ou vasos linfáticos esta forma se dissemina, fazendo o transporte de células contendo amastigotas da pele para a mucosa nasofaríngea, propiciando a destruição dos tecidos (Figura 1B). Tem por

característica uma forte resposta imune celular, que pode estar envolvida com a destruição tissular. A maioria dos casos descritos estão na Bolívia, Brasil e Peru (MYLER & FASEL, 2008).

### **2.1.3 Leishmaniose cutâneo-difusa (LCD)**

Caracteriza-se por apresentar evolução crônica progressiva, com numerosas lesões nodulares não ulceradas disseminadas pelo corpo. É usualmente uma manifestação de infecção com parasitos que normalmente causam leishmaniose cutânea localizada, associada com uma anergia específica ou perda de resposta imunológica pelo paciente (Figura 1C) (ASHFORD et al., 2000). É causada principalmente por *L. amazonensis*, mas também, pode ser causada por *L. aethiopica* (MYLER & FASEL, 2008).

### **2.1.4 Leishmaniose visceral ou calazar (LV)**

É a forma mais grave da doença, afetando os nódulos linfáticos, baço, fígado, e medula óssea (Figura 1D) (NEUBER et al., 2008).

O registro do primeiro caso da doença no Brasil ocorreu em 1913, quando Migone, no Paraguai, descreveu o caso em material de necrópsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso (ALENCAR et al. 1991). A partir de um estudo realizado para o diagnóstico e distribuição da febre amarela no Brasil, encontraram-se 41 casos positivos para Leishmania, sendo identificados em lâminas de viscerotomias praticadas post-mortem, em indivíduos oriundos das regiões Norte e Nordeste (PENA *et al*, 1934). A seguir, o *Lutzomyia longipalpis* foi incriminado como espécie vetor e foram descobertos os primeiros casos da infecção em cães.

É causada pelo complexo de *L. donovani* que inclui, *L. donovani* e *L. infantum* no velho mundo e *L. infantum* (*syn. L. chagasi*) no novo mundo. Raramente, a *L. tropica* (velho mundo) e *L. amazonensis* (novo mundo) tem sido implicadas nessa forma de leishmaniose (MYLER & FASEL, 2008; van GRIENSVEN & DIRO, 2012). Desde 1979, quando o primeiro caso de LV em paciente que sofreu transplante renal foi registrado na literatura, um aumento regular de todas as formas de leishmaniose tem sido observado em pacientes transplantados (ANTINORI et al., 2008).

### **2.1.5 Leishmaniose dérmica pós calazar (LDPC)**

É uma complicação da LV que aparece como uma pápula ou erupção cutânea nodular geralmente na face, braços, troncos ou outras partes do corpo. É uma manifestação dérmica após a cura do calazar por *L. donovani*. Ocasionalmente, alguns casos são reportados sem nenhum histórico de calazar (ASHFORD et al., 2000; DESJEUX et al., 2013). A localização dérmica dos parasitos na LDPC torna-os mais acessíveis para o flebotomíneo e tem sugerido que pacientes com LDPC possivelmente servem como reservatórios de infecção, especialmente no intervalo entre a eclosão (MYLER et al., 2008). Ocorre principalmente no leste da África (50%) e no subcontinente Indiano (10%) dos pacientes com Calazar, desenvolvem essa condição (OMS, 2012).



**Figura 1.** Manifestações clínicas das leishmanioses: (A) leishmaniose cutânea localizada, (B) leishmaniose cutânea mucosa, (C) leishmaniose cutânea-difusa, (D) leishmaniose visceral. Fonte: (WHO, 2015).

A Tabela 1 mostra a distribuição geográfica das leishmanioses no mundo, bem como os agentes etiológicos e as manifestações clínicas (MARZOCHI et al., 1994; ALIAGA et al., 2003; MURRAY et al., 2005; SHAW, 2006; REY, 2001; SANTOS et al., 2008; ALMEIDA & SANTOS, 2011).

**Tabela 1.** Agente etiológico, síndrome clínica e distribuição geográfica das leishmanioses que acometem seres humanos.

Espécies de <i>Leishmania</i>	Síndrome clínica	Distribuição geográfica
<i>Leishmania</i> ( <i>Viannia</i> ) <i>braziliensis</i>	Cutânea e mucosa	América do Sul
<i>Leishmania</i> ( <i>Viannia</i> ) <i>guyanensis</i>	Cutânea	América do Sul
<i>Leishmania</i> ( <i>Viannia</i> ) <i>naiffi</i>	Cutânea	Amazônia (Brasil)
<i>Leishmania</i> ( <i>Viannia</i> ) <i>shawi</i>	Cutânea	Amazônia (Brasil)
<i>Leishmania</i> ( <i>Viannia</i> ) <i>lainsoni</i>	Cutânea	Pará (Brasil)
<i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania</i> ) <i>amazonensis</i>	Cutânea e cutâneo-difusa	América Central e Brasil
<i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania</i> ) <i>mexicana</i>	Cutânea e cutâneo-difusa	México e América Central
<i>Leishmania</i> ( <i>Viannia</i> ) <i>panamensis</i>	Cutânea	América do Sul

Continua...

Continuação da **Tabela 1.**

<i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania</i> ) <i>pifanoi</i>	Cutânea e cutâneo-difusa	Venezuela
<i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania</i> ) <i>infantum chagasi</i>	Visceral	América Central e do Sul
<i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania</i> ) <i>venezuelensis</i>	Cutânea	Venezuela
<i>Leishmania</i> ( <i>Viannia</i> ) <i>peruviana</i>	Cutânea	Peru
<i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania</i> ) <i>donovani</i>	Visceral	Índia, Mediterrâneo
<i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania</i> ) <i>major</i>	Cutânea	Ásia, África, Índia e Oriente Médio
<i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania</i> ) <i>tropica</i>	Cutânea	Ásia, África, Índia e Oriente Médio

Fonte: MARZOCHI et al., 1994; ALIAGA et al., 2003; MURRAY et al., 2005; SHAW, 2006; CASTRO-PINTO, 2007; REY, 2001; SANTOS et al., 2008; ALMEIDA & SANTOS, 2011.

## 2.2 Classificação

*Leishmania* é um protozoário, parasito intracelular obrigatório do gênero *Leishmania*, da família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida que se caracteriza por apresentar mitocôndria única que possui uma porção rica em kDNA (material genético mitocondrial) denominado cinetoplasto (GRIMALDI Jr; TESH, 1993). São parasitos heteroxenos, ou seja, possuem dois hospedeiros durante seu ciclo de vida, um invertebrado no qual o parasito se desenvolve no tubo digestivo, e outro vertebrado no qual os parasitos se desenvolvem nos tecidos, principalmente, em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM).

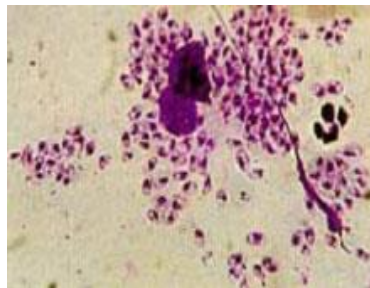
Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam dois estágios evolutivos: a forma promastigota, extracelular, que é longa, com um núcleo central, cinetoplasto posicionado na região anterior do parasito e longo flagelo, medindo entre 14 e 20  $\mu\text{m}$  (Figura 2A, 2C), e a forma amastigota, intracelular, que tem corpo elipsóide, e um curto flagelo observável apenas ultraestruturalmente, medindo entre 2,1 e 3,2  $\mu\text{m}$  (Figura 2B, 2C). Ambas promastigota e amastigota se dividem repetidamente por divisão binária longitudinal. (PESSOA & MARTINS, 1982, MARZOCHI, 1992).

**A**



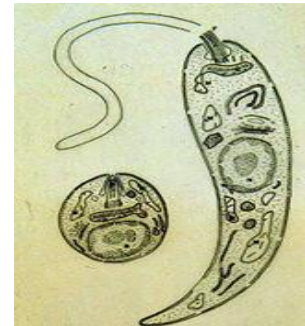
Fonte: SOUZA, 2002.

**B**



Fonte: Atlas de Parasitologia Clínica Viqar Zaman, 1979.

**C**

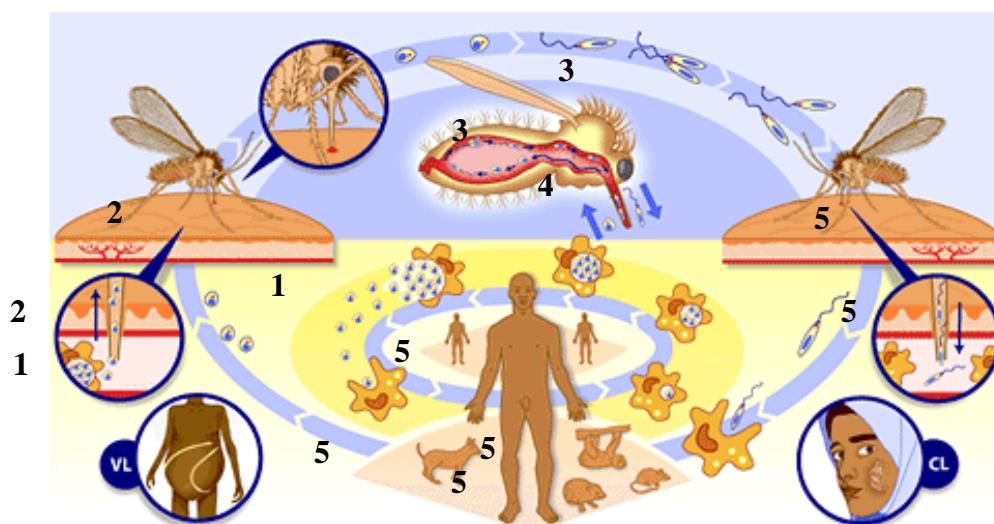


Fonte: REY, 2001

**Figura 2.** Formas de *Leishmania* spp. (A) Formas promastigotas, (B) Formas amastigotas e (C) Morfologia de *Leishmania* - figura esquemática mostrando o núcleo, cinetoplasto, blefaroplasto, flagelo e mitocôndria de forma promastigota e amastigota.

### 2.3 Ciclo de Transmissão e Aspectos Biológicos

A principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através do repasto sanguíneo de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. A *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* é a principal espécie transmissora da *L. chagasi* no Brasil (SANTOS et al., 1998, GONTIJO; MELO, 2004). O vetor contrai as formas amastigotas do parasito, contidas em células do SFM do hospedeiro infectado, ao fazer seu repasto sanguíneo. No intestino do inseto vetor, as formas promastigotas passam por um processo denominado metaciclogênese, que é o processo pelo qual estas formas deixam de se dividir e tornam-se infectantes (promastigotas metacíclicas). As formas multiplicativas, não infectantes (procíclicas), aderem à parede do tubo digestivo do inseto vetor. Durante a metaciclogênese, as promastigotas sofrem modificações bioquímicas em sua superfície, perdendo assim sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio do flebótomo. Como resultado, as promastigotas metacíclicas destacam-se, migrando para a faringe e cavidade bucal, de onde elas são transmitidas ao hospedeiro vertebrado, durante o próximo repasto sanguíneo, que pode ser o homem ou outros mamíferos como preguiças, gambás, roedores, raposas e até mesmo cães domésticos, tornando estes hospedeiros fontes de infecção para outros flebótomos, dando continuidade ao ciclo (Figura 3) (STUART et al., 2008).



Fonte: Organização Mundial da saúde (2008)

**Figura 3.** Ciclo biológico e modo de transmissão da *Leishmania* spp.

1 - Formas amastigotas no SFM do hospedeiro. 2 - O vetor contrai as formas amastigotas do parasito ao fazer o repasto sanguíneo no hospedeiro. 3 - As formas amastigotas, se diferenciam em formas promastigotas. 4 - As formas promastigotas são multiplicadas e armazenadas na cavidade bucal do vetor. 5 - Transmissão das formas promastigotas aos hospedeiros vertebrados, dando continuidade ao ciclo.

Os hospedeiros silvestres da *L. chagasi*, até agora conhecidos, são as raposas e os marsupiais. O fato destes animais possuírem hábitos sinantrópicos poderia promover a ligação entre os ciclos silvestre e doméstico. No ambiente doméstico, o cão (*Canis familiaris*) é o reservatório envolvido na manutenção do ciclo zoonótico predominante em várias regiões do país (BRASIL, 2003). O diagnóstico clínico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é precário e complexo, pois os sinais clínicos da doença são variáveis e inespecíficos, comuns a outras

enfermidades que acometem o cão. A imunossupressão causada por *Leishmania* pode gerar infecções oportunistas, dificultando do mesmo modo o diagnóstico da LVC (SILVA, 2007).

Dependendo da fase da doença e das condições imunológicas, muitos cães infectados apresentam-se assintomáticos. Entretanto, já foi demonstrado que cães infectados, mesmo assintomáticos, são fontes de infecção para os flebotomíneos e têm papel ativo na transmissão de *Leishmania* (PALATNICK DE SOUZA et al., 2001). Naturalmente, tanto a resposta imune humoral como a celular estão envolvidas, e a gravidade e variedade dos sinais clínicos da doença dependem do equilíbrio entre esses dois sistemas (POCAI et al., 1998; FEITOSA et al., 2000). Usando técnicas sorológicas, imuno-histoquímicas e reação de sensibilidade tardia, é possível avaliar a característica e o tipo de resposta imune que é envolvida, e desta forma pode-se definir o estado imune dos cães (NOGUEIRA; ODORIZZI; NAKAMURA, 2007).

## 2.4 Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que as leishmanioses ocorram em 98 países distribuídos em quatro continentes, onde a maior incidência é observada em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Desse total, 90% dos casos ocorrem em países como: Brasil, Bolívia, Peru, Irã, Índia, Síria, Afeganistão e Arábia Saudita, e em alguns países africanos (WHO, 2015).

Dentre os 98 países endêmicos, 72 são considerados países em desenvolvimento e treze estão na lista dos menos desenvolvidos. Cerca de 12 milhões de pessoas no mundo estão infectadas e há um total de 350 milhões de indivíduos sob risco de contrair a infecção, que está classificada pela OMS entre as seis maiores endemias humanas devido a sua alta incidência e capacidade de produzir deformações (ZAVERRUCHA, 2005; GONTIJO & CARVALHO, 2003; WHO, 2015).

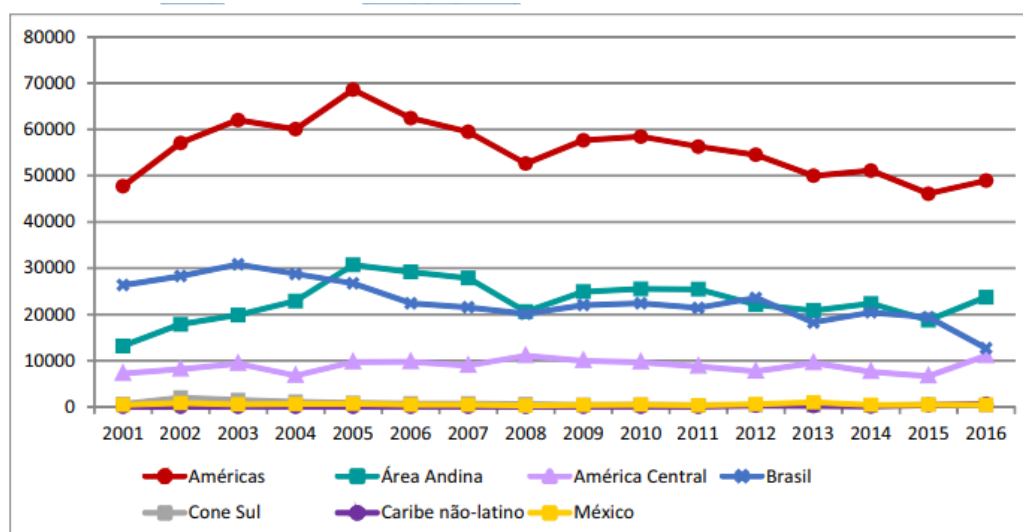
As LC e LM são endêmicas em 18 países das Américas, porém, os casos reportados a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS) não incluem os dados da Guiana Francesa, que os reporta diretamente à França. No período de 2001-2016 foram notificados 892.846 casos novos de LC, distribuídos em 17 dos 18 países endêmicos. A série histórica mostra que a partir de 2009 até 2015 houve uma redução dos casos de LC na Região. Em 2016 foi registrado um aumento de 6,15% com relação ao ano anterior, sendo que esse mesmo aumento foi observado nos registros de casos das sub-regiões da América Central (66%) e área Andina (27%) (Figura 2). Em 2016, 17 países endêmicos reportaram 48.915 casos de LC e LM. Os maiores números de registros foram feitos pelo Brasil (12.690), Colômbia (10.966), Nicarágua (5.423) e Peru (7.271) que juntos representaram 74,3% do total de casos na região. Este aumento, de um pouco mais de 5% dos casos, em comparação ao o ano anterior, foi impulsionado principalmente pelo incremento dos registros na Colômbia (31,3%), Peru (33%) e Nicarágua (181,8%), enquanto que, por outro lado, houve uma redução de cerca de 34% (6.705) dos casos no Brasil, impactando diretamente nos dados regionais. A taxa de incidência foi de 21,71 casos por 100.000 habitantes, apresentando um aumento em relação a 2015 (18,35/100.000 habitantes). As incidências mais elevadas foram registradas no Suriname (52,93/100.000), Nicarágua (197,2/100.000) e Colômbia (52,93/100.000), destacando-se que o incremento na incidência da Nicarágua foi de 157% comparado ao ano anterior (76,6/100.000).

Nas Américas, os casos de LC foram registrados em 223 (70,8%) unidades de primeiro nível político administrativo subnacional (departamentos, estados, regiões ou províncias, de acordo com a divisão de cada país) e em 2877 (23,9%) unidades de segundo nível administrativo (municípios, cantones, províncias, distritos, etc.), sendo que 333 delas (34,19%) são unidades de fronteira entre países, com um total de 8.953 (18,3%) registros (Figura 4).

Alguns países como Argentina e Guatemala se destacaram por apresentar mais de 40% dos casos de LC nas zonas fronteiriças. Em 2017, mais de 95% dos novos casos de LC



ocorreram em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã (República Islâmica do Iraque), Iraque e República Árabe da Síria. Estima-se que entre 600.000 e 1 milhão de novos casos ocorram em todo o mundo anualmente (WHO, 2019).

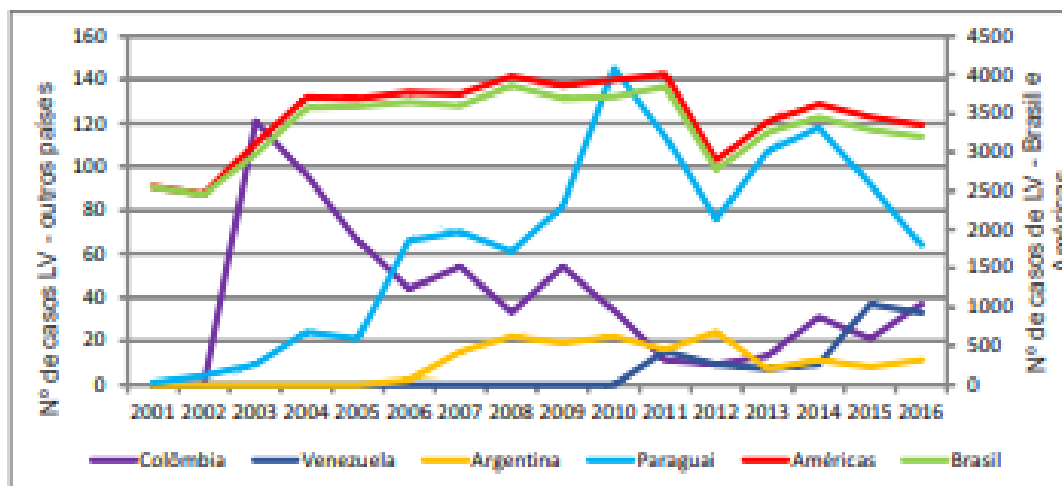


**Figura 4.** Número de casos de leishmaniose cutânea e mucosa nas sub-regiões e em países selecionados das Américas, 2001-2016. Fonte: SisLeish-OPAS/OMS: Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Serviços de Vigilância. Acesso em: 01 de Dezembro de 2017.

No período de 2001-2016 foram reportados 55.530 casos humanos de LV nas Américas com uma média anual de 3.457 casos. Em 2016, observamos uma redução de 67% no número de casos de LV no Paraguai em relação a 2013. Neste mesmo período, os casos da Colômbia e Venezuela tiveram um incremento de 13 para 37 e de 7 para 33 casos/ano, respectivamente (Figura 5).

Em 2016, foram registrados um total de 3.354 casos de LV, com uma incidência de 4,51 e 1,04 casos por 100.000 habitantes, considerando a população de áreas de transmissão e população total do país, respectivamente. Os casos foram reportados em sete países, distribuídos em 54 departamentos/estados e 935 municípios (1-89 casos). Em comparação com 2015, verificamos uma discreta diminuição no total de casos de LV, onde no Paraguai a redução foi de 43,7%, porém na Colômbia se observou um aumento de 76% do número de casos (OPAS, 2018).

Em 2017, mais de 95% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 10 países: Bangladesh, Brasil, China, Etiópia, Índia, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2019).

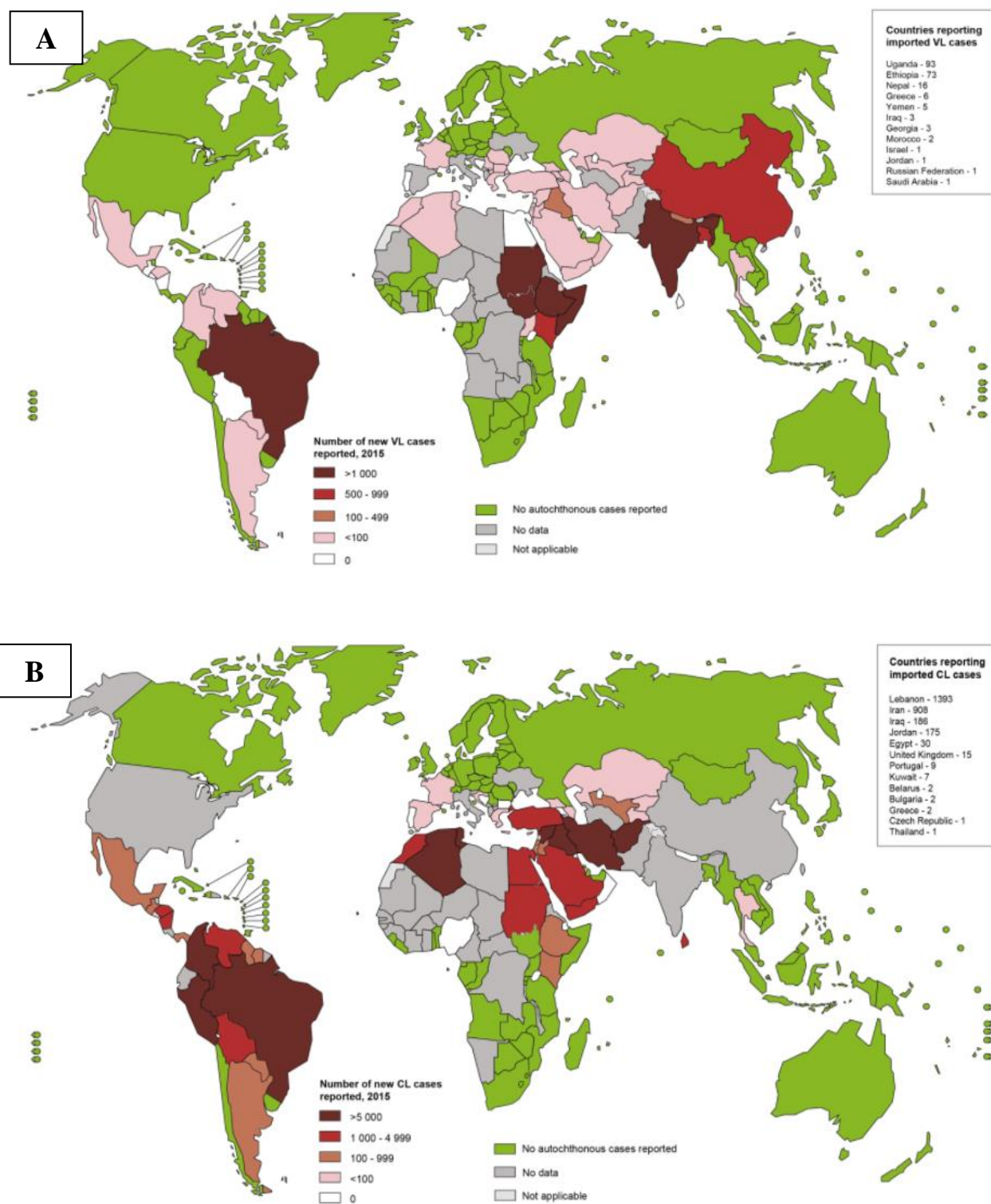


**Figura 5.** Casos de leishmaniose visceral nos países com maior número de casos, Américas, 2001-2016. Fonte: SisLeish-OPAS/OMS: Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Serviços de Vigilância. Acesso em: 01 de Dezembro de 2017.

A LV segue apresentando uma ampla distribuição geográfica de casos humanos no Brasil, onde se destacam as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste. Da mesma forma, a dispersão geográfica segue ocorrendo no Paraguai e Argentina, nas fronteiras com o Brasil e Uruguai. Em 2016, também observamos uma dispersão em Roraima, Norte do Brasil, onde foram registrados casos nas áreas de fronteira com a Venezuela, o que requer uma maior atenção e fortalecimento da vigilância nos municípios desses países (OPAS, 2018).

Estima-se que anualmente ocorram 2 milhões de novos casos, embora somente 600 mil sejam relatados oficialmente e que cerca de 60 mil mortes por ano sejam devidas às leishmanioses (WHO, 2015). No sul da Europa a coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) agrava ainda mais a situação da LV. Neste continente, de 25 a 70% dos casos de LV em adultos estão relacionados com a infecção por HIV (WHO, 2015).

A Figura 6 mostra a distribuição geográfica das leishmanioses em todo mundo. No quadro A observa-se a distribuição da leishmaniose visceral e no quadro B a distribuição da leishmaniose cutânea (WHO, 2015).



**Figura 6.** Distribuição geográfica das Leishmanioses no mundo. Leishmaniose visceral (A) e leishmaniose cutânea (B) (WHO, 2015).

## 2.6 Diagnóstico

Na leishmaniose visceral, avaliam-se os sinais clínicos e os testes parasitológicos ou sorológicos (testes rápidos de diagnóstico). Na leishmaniose cutânea e mucocutânea, os testes sorológicos têm valor limitado e a manifestação clínica com testes parasitológicos confirma o diagnóstico (WHO, 2019).

O tratamento da leishmaniose depende de vários fatores, incluindo tipo de doença, patologias concomitantes, espécies de parasitas e localização geográfica. A leishmaniose é uma doença tratável e curável, que requer um sistema imunocompetente, porque os medicamentos não eliminam o parasita do corpo, portanto, o risco de recaída se ocorrer imunossupressão. Todos os pacientes diagnosticados com leishmaniose visceral requerem tratamento imediato e completo (WHO, 2019).

No Brasil, nos últimos dez anos, apesar dos recursos de tratamento intensivo e das rotinas estabelecidas para o tratamento específico da LV, constatou-se aumento na letalidade da doença em diversas regiões do país, alcançando a letalidade média de 5,8% nos últimos quatro anos. Um dos principais fatores que contribuem para o aumento dessa letalidade é o diagnóstico tardio, razão pela qual o Programa de Vigilância e Controle da LV tem como principal objetivo a redução do número de casos e de óbitos por meio do diagnóstico e do tratamento precoces. Além disso, o Ministério da Saúde (MS), na perspectiva de reduzir a letalidade por leishmaniose, tem implementado as ações de vigilância e assistência ao paciente com LV (BRASIL, 2011; WHO, 2013).

Visando contribuir para a diminuição no número de casos e óbitos da leishmaniose, tuberculose, dengue, síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS) e doenças crônicas não transmissíveis na região, os Ministérios da Saúde do Mercosul assinaram sete acordos que estabelecem ações integradas para o controle e prevenção de doenças. O documento prevê o intercâmbio de informações epidemiológicas para o controle e vigilância das leishmanioses nos países do bloco (MS, 2013).

A maioria dos testes sorológicos utiliza antígenos de promastigotas obtidos em culturas, o que pode comprometer a especificidade do ensaio devido a possibilidade de reações cruzadas com outras espécies da família Trypanosomatidae (DESJEUX, 2004).

O teste imunocromatográfico DPP (plataforma de duplo percurso) é um teste qualitativo para detecção de anticorpos antileishmania que utiliza a proteína recombinante K39 (rK39) como antígeno. Esta proteína é o produto de um gene clonado a partir de *L. chagasi* e que contém uma repetição de 39 aminoácidos conservados entre as espécies viscerotrópicas de *Leishmania* (*Leishmania donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*). A presença de anticorpos anti-rK39 é indicativo de infecção, e ainda não foi relatado a reatividade com outros tripanosomatídeos (BURNS JR et al., 1993; BISUGO et al., 2007).

## 2.6 Quimioterapia

A alta toxicidade dos fármacos utilizados atualmente e as formas resistentes de *Leishmania* têm impulsionado as pesquisas para a síntese de novos compostos sintéticos, semissintéticos e produtos naturais, principalmente os fitoterápicos tradicionalmente usados para o tratamento de parasitoses (TEMPONE et al., 2005).

Os compostos antimoniais, sob a forma de sais trivalentes, foram utilizados pela primeira vez no tratamento da leishmaniose tegumentar em 1913 por Gaspar Vianna. Na leishmaniose visceral esses fármacos só foram utilizados dois anos após, na Itália. Os derivados pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ), só foram introduzidos na década de 40 e, desde então, os mesmos têm sido considerados como quimioterápicos de primeira escolha no tratamento dessas protozooses (MS, 2014).

O tratamento da leishmaniose através da quimioterapia é baseado na utilização de medicamentos que possuem metais pesados tóxicos, conhecidos como antimoniatos, entre eles os mais usados são o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®). Outros medicamentos como pentamidina e anfotericina B também são utilizados quando o tratamento não é eficaz, além disso, eles são de administração injetável e precisam de supervisão clínica ou hospitalização devido à severidade dos efeitos colaterais (CHAN-BACABAND & PENA-RODRIGUEZ, 2001).

O antimoniato de meglumina (Glucantime) tem sido utilizado como fármaco de primeira escolha para todas as formas de leishmaniose no Brasil, porém, seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que atua nas formas amastigotas do parasita, inibindo sua atividade glicolítica. Além disso, atua na via oxidativa de ácidos graxos e na inibição da fosforilação do ADP, na inibição da topoisomerase I, além de alterar o potencial tio-redox dos parasitos tornando-os mais suscetíveis (CHAKRABORTY e MAJUMDER, 1988; FRANCO et al., 1995; WYLLIE et al., 2004). Mas é aceito que o  $Sb^{+5}$  é reduzido a  $Sb^{+3}$  dentro do organismo resultando a alta toxicidade e ação contra a leishmaniose (KATO et al., 2014). O tratamento necessita de três semanas, onde o paciente recebe 20 mg/Kg por dia, via intramuscular ou endovenosa. Os efeitos colaterais vão desde dor local da injeção ao mais grave, cardiotoxicidade (FRÉZARD et al., 2009).

O principal efeito adverso do antimoniato de meglumina é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular. Esse efeito é dose e tempo dependentes e se traduz por distúrbios de repolarização (OLIVEIRA *et al.* 2011). Em pacientes acima de 50 anos, precedendo ao tratamento, deve-se realizar o eletrocardiograma (ECG) e o acompanhamento com ausculta cardíaca sempre antes de cada infusão do medicamento, objetivando detectar arritmias. Caso essas ocorram, o tratamento deve ser imediatamente interrompido, e, após reavaliação do paciente, deve-se reiniciar o tratamento com o mesmo fármaco ou com outros alternativos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

A anfotericina B é um antifúngico usado para micoses profundas, com cadeia carbônica cíclica poli-hidroxilada e insaturada, isolado da bactéria *Streptomyces nodosus* que inicialmente foi isolada por sua atividade antifúngica (NAGLE et al., 2014). Para o tratamento das leishmanioses, sua utilização foi iniciada na década de 1960, e a sua administração realizada por via endovenosa (CARVALHO et al., 2000; CROFT e YARDLEY, 2002; CROFT et al., 2006). É um fármaco alternativo quando os antimoniais pentavalentes não são satisfatórios no tratamento, entretanto, sua elevada toxicidade pode causar febre, disfunção renal e, inclusive, levar o paciente a óbito, sendo necessária a internação para tratamento (CARVALHO et al., 2000; MONZOTE et al., 2007). A forma lipossomal é mais eficaz e menos tóxica, porém, seu elevado custo impossibilita o uso por populações de baixo poder aquisitivo (NAGLE et al., 2014).

Outro medicamento utilizado no tratamento contra a leishmaniose como segunda escolha é a pentamidina e vem sendo bem aceito por países da América do Sul e África. A pentamidina é uma poliamina administrada por via parenteral, recomendado para pacientes acometidos por LV resistente ao tratamento com antimônio (PISCOPO e MALLIA, 2006). Sua atividade leishmanicida está associada com a interferência da síntese de poliaminas, inibindo a S-adenosil-L-metionina, a ornitina descarboxilase (ODC) e a espermidina sintase (BASSELIN e cols., 1997). Seus efeitos colaterais são menos severos (PIMENTEL, 2011; ARONSON, 2006), sendo em aerossol ou injetável a sua administração, não requer internação e seu custo é mais baixo em relação à anfotericina B.

A miltefosina, desenvolvida para o tratamento do câncer, representa um avanço no tratamento das leishmanioses e sua atividade leishmanicida foi descrita em 1987 sobre *L. donovani* e licenciada em 2002, sendo o único medicamento licenciado para administração por via oral para o tratamento da LV em países como Índia, Nepal e Bangladesh

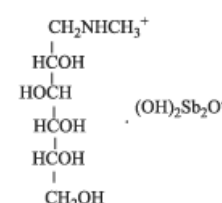
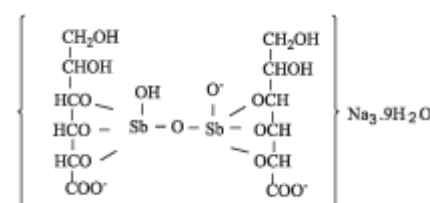
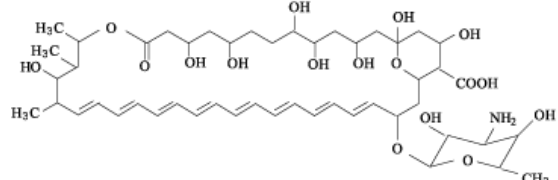
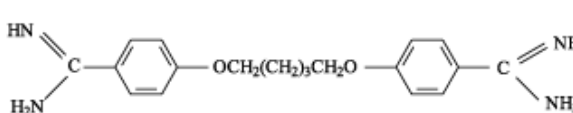
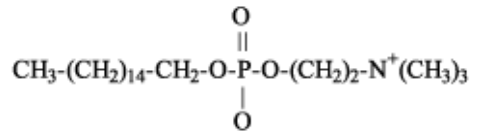
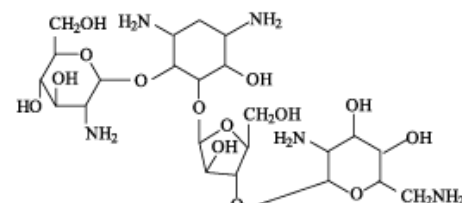
(ELMAHALLAWY e AGIL, 2015). Sua atividade sobre o parasito se deve a interação com lipídeos, fosfolipídeos e esteróis da membrana plasmática (BARRATT et al., 2009; RAKOTOMANGA et al., 2007), bem como a interferência da funcionalidade de diferentes enzimas relacionadas com o metabolismo de fosfolipídeos, culminando na indução de apoptose nos parasitos (BARRATT et al., 2009). Os efeitos adversos citados são distúrbios gastrointestinais como náuseas, vômito e diarreia e toxicidade renal (JHA et al., 1999; Sinderman e Engel, 2006). Porém, este fármaco possui potencial efeito teratogênico e por esta razão seu uso é contraindicado na gravidez e período de lactação (EIRAS et al., 2015; ELMAHALLAWY e AGIL, 2015; MCGWIRE e SATOSKAR, 2014).

A paromicina é um antibiótico utilizado no tratamento de outras infecções, mas, a partir de 2006 foi aprovada para o tratamento das leishmanioses. É um aminoglicosídeo que teve sua atividade leishmanicida demonstrada em 1968 por Neal e colaboradores. Este medicamento tem sido utilizado em formulação parenteral para o tratamento da LV em triagem clínica de fase III, e no tratamento da LC em formulação tópica e parenteral (CROFT et al., 2006). Três preparações de pomadas de paromomicina têm sido utilizadas para LC apresentando resultados variáveis. Os efeitos adversos encontrados nos pacientes tratados com essas formulações foram erupções cutâneas e prurido local (SUNDAR e CHAKRAVARTY, 2008).

Outras propostas terapêuticas alternativas também têm sido avaliadas como a utilização do alopurinol em associação com o antimônio que tem apresentado resultados divergentes. Outros compostos como a dapsona, a rifampicina, a azitromicina, a sitamaquina, o imiquimod, dentre outros também têm tido sua atividade leishmanicida testada (GOTO et al., 2010; SINGH et al., 2004; TUON et al., 2008).

A Tabela 2 mostra a estrutura química dos fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses, bem como a correlação entre os custos, vantagens e desvantagens.

**Tabela 2.** Fármacos disponíveis na clínica para o tratamento das leishmanioses, fórmulas químicas, custos, vantagens e desvantagens. Adaptado de (Nagle e cols., 2014; OMS, 2010b; <https://www.hindawi.com/journals/2015/815023/tab2/>)

Fármaco / Valor	Vantagem	Limitações	Estrutura química
Antimoniais pentavalentes:  Glucantime®  \$50–198	Baixo custo	-Resistência (Índia); -Complicações cardíacas; -Artralgia, mialgia, elevação das enzimas hepáticas, pancreatite; -Alta toxicidade em pacientes HIV+	
Pentostam®  \$50–198			
Anfotericina B lipossomal  \$280–3000	Baixa toxicidade	Alto custo; -Calafrio e febre durante a infusão; -Toxicidade renal.	
Pentamidina	Eficaz contra cepas resistentes aos antimoniais	Toxicidade renal; -miocardite; Diabetes Mellitus insulino-dependente	
Miltefosina \$70–150 *Uso clínico em humanos	Primeiro tratamento oral	-Toxicidade hepática e renal; -Complicações gastrointestinais -Não é segura para gestantes	
Paromomicina  \$10–15	Baixo custo Aplicação tópica	-Ototoxicidade reversível; -Alta hepatotoxicidade	

Grande parte dos medicamentos em estudo para o tratamento de leishmaniose são apenas novas formulações, ou novas formas farmacêuticas de medicamentos já utilizados em infecções por *Leishmania* (MENDONÇA-FILHO et al., 2004). Para todas as formas de

leishmaniose, o tratamento de primeira escolha no Brasil se faz por meio do antimoniato de meglumina (Glucantime). O medicamento provoca regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, bem como provoca a esterilização do parasito (SANTOS *et al.*, 2008). O principal efeito adverso do antimoniato de meglumina é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular. Esse efeito é dose e tempo dependentes e se traduz por distúrbios de repolarização (OLIVEIRA *et al.* 2011). Em pacientes acima de 50 anos, precedendo ao tratamento, deve-se realizar o eletrocardiograma (ECG) e o acompanhamento com ausculta cardíaca sempre antes de cada infusão do medicamento, objetivando detectar arritmias. Caso essas ocorram, o tratamento deve ser imediatamente interrompido, e, após reavaliação do paciente, deve-se reiniciar o tratamento com o mesmo fármaco ou com outros alternativos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Todos os medicamentos utilizados têm toxicidade considerável, causando efeitos sérios adversos levando a necessidade do estudo de novos medicamentos (OLIVEIRA *et al.* 2011). Assim, busca de novos tratamentos através do uso de agentes quimioterápicos com menor toxicidade e maior seletividade é necessária, pois a quimioterapia atual utiliza medicamentos muito tóxicos, administração parenteral ou intravenosa e causam resistência.

## 2.6 As Chalconas-Tiossemicarbazonas (CT)

As chalconas são produtos naturais amplamente distribuídos nas plantas superiores e, apresentam diversificada atividade biológica incluindo a antiparasitária. A utilização das estruturas moleculares dessas substâncias como protótipos poderão possibilitar a obtenção de novas substâncias com potencial atividade antiparasitária. A introdução de grupos moleculares da classe das tiossemicarbazonas, também com já relatada atividade antiparasitária, poderá provocar a interação com enzimas dependentes de ferro presentes nos parasitos da família dos tripanossomatídeos favorecendo o efeito antiparasitário.

Além disso, o estudo frente às espécies mais prevalentes no Brasil e América Latina, especialmente na Argentina, do gênero *Leishmania*, bem como a avaliação do possível mecanismo de ação, mostram-se importantes para o tratamento das leishmanioses.

Assim, neste trabalho de tese, selecionamos, para o estudo de potenciais agentes quimioterápicos para o tratamento da leishmaniose, compostos da classe das chalconas-tiossemicarbazonas (CT) já sintetizadas, purificadas e caracterizadas pelo Núcleo de Síntese e Química Medicinal (NUSQUIMED) do Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sob a coordenação da prof<sup>a</sup> Aurea Echevarria.

As chalconas constituem uma classe de produtos naturais encontrada em caules, raízes, folhas, frutos e sementes de diversas plantas. O sistema conjugado das chalconas é capaz de conferir pigmento amarelo às pétalas de algumas plantas de uso medicinal, e o poder adoçante de alguns compostos desta classe tem sido explorado industrialmente. Em síntese orgânica, as chalconas são utilizadas como precursoras de diversas classes de compostos, incluindo oximas, pirimidinas, hidrazonas e pirazóis, além das flavanonas, obtidas através da ciclização de 2-hidroxichalconas (Figura 7A) (LUO *et al.*, 2012; MONDAL *et al.*, 2011). Diversas atividades são atribuídas a compostos pertencentes a estas classes, tais como imunossupressora (LUO *et al.*, 2012), anti-inflamatória e antimicrobiana (KUMAN *et al.*, 2011), antioxidante (DETSI *et al.*, 2009), antitumoral (CABRERA *et al.*, 2007), etc.

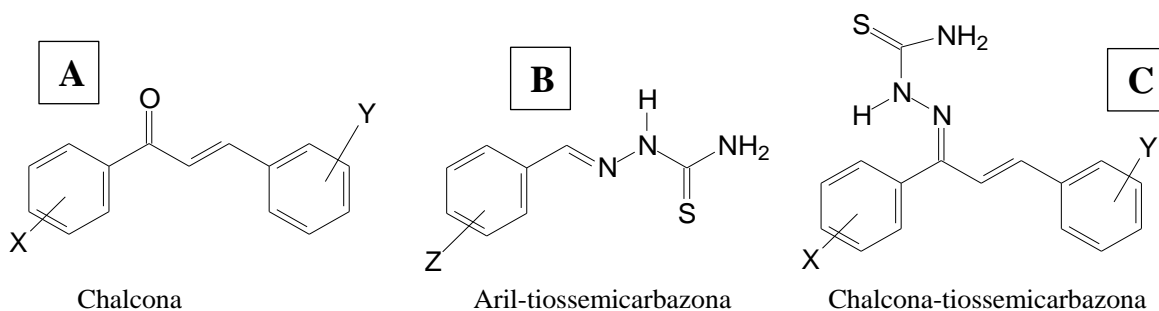
As tiossemicarbazonas (Figura 7B) são substâncias que apresentam um amplo perfil farmacológico e constituem uma importante classe cuja propriedade tem sido extensivamente estudada na Química Medicinal. Tiossemicarbazonas apresentam, entre outras, atividades como agentes antitumorais, antivirais, antifúngicos, antibacterianos e antimaláricos, sendo hoje a segunda classe mais importante de compostos antitumorais depois dos derivados do cisplatina (BERALDO, 2004). O mecanismo de ação biológica das tiossemicarbazonas, em muitos casos,



envolve os complexos metálicos destes compostos, o que torna o estudo destes tão, ou mais importante que o estudo dos ligantes livres (RIGOL et al., 2005).

As CT (Figura 7C), podem ser obtidas através de reação de condensação entre chalconas e a tiossemicarbazida, em meio ácido levando a estruturas moleculares híbridas.

Os derivados das CT são compostos que apresentam diversas atividades biológicas (RANI et al., 2012, ÖZDEMIR et al., 2015). As CT apresentam capacidade quelante, com diversos metais (BARBOSA et al., 2018) que podem proporcionar diversas atividades biológicas importantes, como atividade antitumoral, antibacteriana, antidepressiva e anticonvulsivante, entre outras (ÖZDEMIR et al., 2015).



**Figura 7.** Estruturas químicas gerais de chalconas (A), aril-tiossemicarbazonas (B) e chalconas-tiossemicarbazonas (C)

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Equipamentos e materiais

Agitador magnético Ika  
Balança analítica Ohaus  
Cabine de segurança biológica Bio Seg 09 VECO  
Cabine de segurança química VECO  
Câmaras LAB-TEK (Nunc, Rochester, EUA)  
Centrífuga Mikro 120 Analítica  
Espectrofotômetro  $\mu$ Quant (Biotek-Instrument Inc., Winooski)  
Espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)  
Estufa bacteriológica Nova Etica 150  
Estufa de CO<sub>2</sub> (Shel Lab, IR2424, Cornelius, EUA)  
Microscópio invertido Zeiss  
Microplaca de 96 poços, fundo chato, estéril (Falcon Co, Franklin Lakes, EUA)

#### 3.1.2 Reagentes, solventes e soluções

Água destilada  
Alamar Blue (resazurina)  
BSA - Albumina bovina (fração V, Boehringer, Mannheim)  
CaCl<sub>2</sub> - Cloreto de cálcio  
Corante hematológico Instant Prov (Newprov, Curitiba, Brasil)  
DMSO (Dimetilsulfóxido) com 99,9% de pureza  
DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)  
EDTA  
Estreptomicina  
Etanol a 95%  
Gentamicina  
Hepes-tris  
KCl - Cloreto de potássio  
L-glutamina  
Meio DMEM (Gibco)  
Meio RPMI-1640 ("Minimum Essential Medium" - Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA)  
Meio Schneider (Schneider's Insect Medium)  
MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - Fosfato de sódio monobásico  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Fosfato de potássio monobásico  
NaCl - Cloreto de sódio  
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida  
NaHCO<sub>3</sub> 0,0075 M - Bicarbonato de sódio  
Penicilina  
Pentamidina (Filaxis S.A., Buenos Aires, Argentina)  
Reagente de Griess - Reagente de nitrito GRIESS-ILOSVAYS (Merck)  
Soro bovino fetal (GIBCO)  
Tampão Fosfato Salina - PBS - 1% de BSA

Tampão Fosfato Salina - PBS pH 7,4

T(S)<sub>2</sub> – Tripanotona oxidada

Compostos Chalconas-Tiossemicarbazonas (CT-H: M1, CT-Me: M2, CT-CN: M3, CT-F: M4, CT-Br: M5, CT-Cl: M6 e CT-NO<sub>2</sub>: M7)

### 3.2 Local de Realização do Trabalho de Tese

O trabalho experimental foi realizado no Instituto Oswaldo Cruz no Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos (LBqT) / Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz) com o nível de biossegurança 2.

### 3.3 Organização das Etapas do Delineamento do Estudo

Para direcionar as diversas etapas experimentais foi construído um organograma para melhor entendimento e visualização (Figura 8).

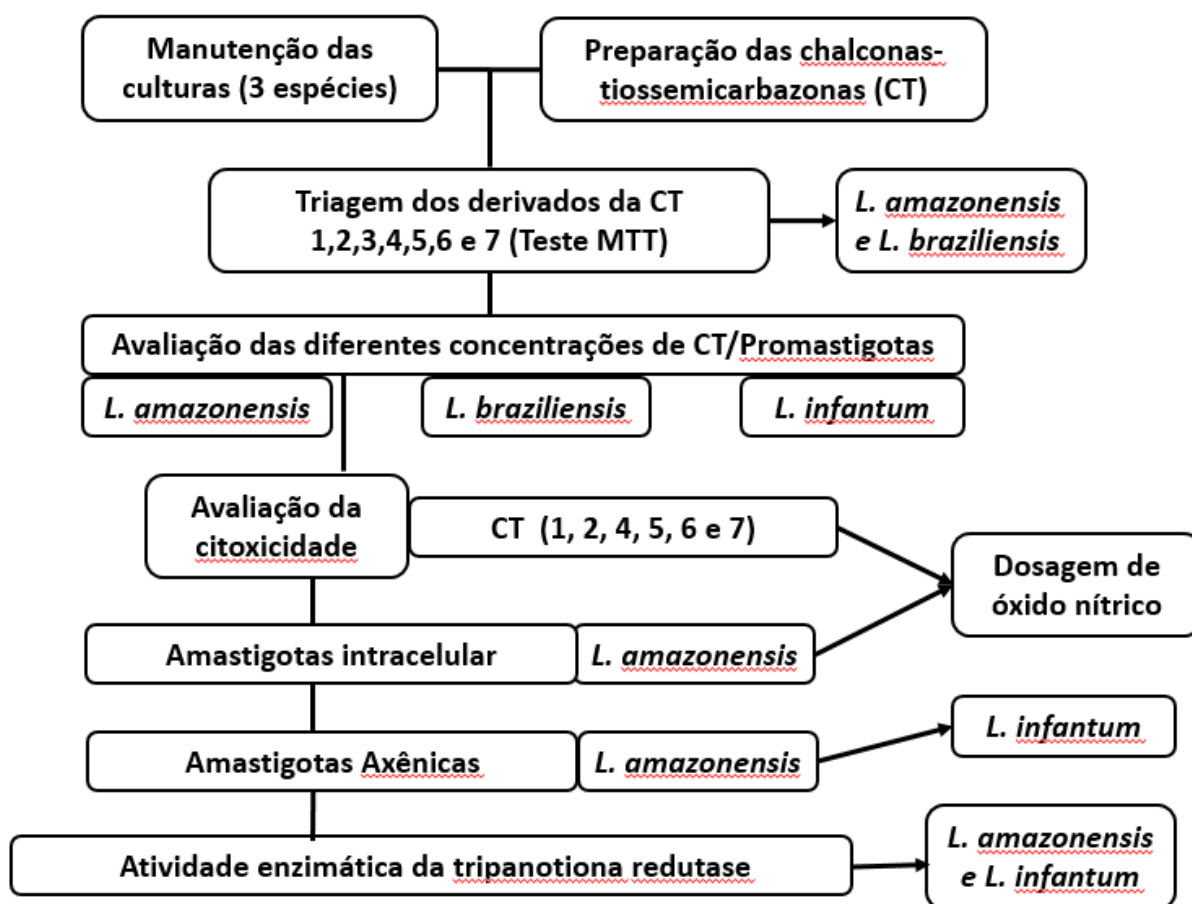


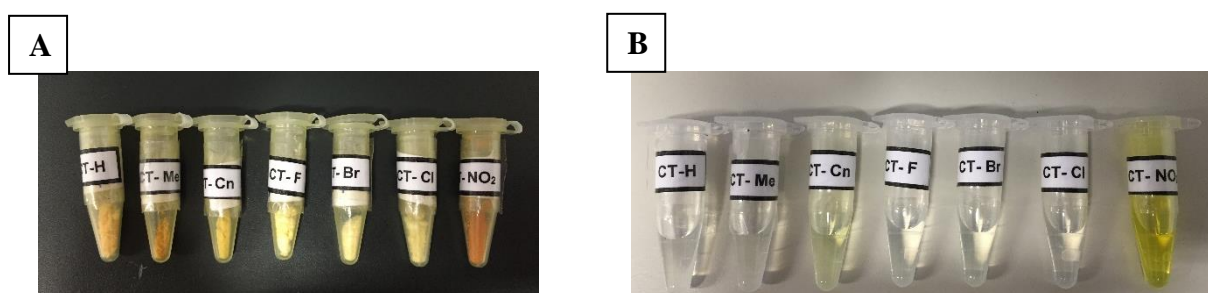
Figura 8. Organograma com as diversas etapas dos experimentos realizados.

### 3.4 Preparo de Solução Estoque das Chalconas-Tiossemicarbazonas (CT)

Sete CT (CT-H: **M1**, CT-Me: **M2**, CT-CN: **M3**, CT-F: **M4**, CT-Br: **M5**, CT-Cl: **M6** e CT-NO<sub>2</sub>: **M7**) foram sintetizadas previamente no Departamento de Química da UFRRJ, purificadas e caracterizadas por ponto de fusão e por análises espectroscópicas de rotina como infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (Figura 9A). Todos os compostos foram diluídos em DMSO a uma concentração de 10 mM para estoque (Figura 9B). Esta solução foi dissolvida em meio de cultura para obter uma solução a 1 mM e uma concentração de DMSO não tóxica de 0,01% para uso. Ambas as soluções foram guardadas em freezer a -20 °C e protegidas da luz. A Tabela 3 apresenta os códigos utilizados para as CT e suas respectivas fórmulas e massas moleculares.

**Tabela 3.** Códigos, fórmulas e massas moleculares para as chalconas-tiossemicarbazonas testadas

Substância	Substituinte	Fórmula molecular	Massa molecular
<b>M1</b>	<b>H</b>	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> S	281,38
<b>M2</b>	<b>Me</b>	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> S	295,40
<b>M3</b>	<b>CN</b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> S	306,38
<b>M4</b>	<b>F</b>	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> FN <sub>3</sub> S	299,37
<b>M5</b>	<b>Br</b>	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> BrN <sub>3</sub> S	360,27
<b>M6</b>	<b>Cl</b>	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>3</sub> S	315,82
<b>M7</b>	<b>NO<sub>2</sub></b>	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> S	326,37



**Figura 9.** Amostras de chalconas-tiossemicarbazonas utilizadas nos ensaios. A) substâncias liofilizadas. B) substâncias dissolvidas em DMSO 10 mM (solução estoque).

### 3.5 Ensaios Biológicos

#### 3.5.1 Parasitos

Para os ensaios biológicos, foram utilizadas as cepas MHOM/BR/77/LTB0016 de *L. amazonensis*, MCAN/BR/98R619 de *L. braziliensis* e MHOM/MA/67/ITMAP263 de *L. infantum* cedidas pelo LBqT/IOC/Fiocruz.

### 3.5.2 Droga de referência

A Pentamidina (Filaxis S.A., Buenos Aires, Argentina) foi utilizada como droga de referência para os ensaios *in vitro* (DA SILVA et al., 2002).

### 3.5.3 Animais

Para os ensaios de citotoxicidade em célula hospedeira (macrófagos murinos) e atividade leishmanicida frente às amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e de *L. infantum*, foram utilizados camundongos BALB/c com 6 a 8 semanas de idade, podendo ser macho ou fêmea. Estes animais foram fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fundação Oswaldo Cruz (ICTB/Fiocruz) e sua utilização seguiu as normas previstas no estatuto da Comissão e Ética da Fiocruz (CEUA L-026/2015). Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados por inalação controlada de CO<sub>2</sub>, conforme preconizado pelo Manual de Utilização de Animais/Fiocruz.

### 3.5.4 Manutenção das culturas de *L. amazonensis* e de *L. infantum*

As culturas de *L. amazonensis* e de *L. infantum* nas formas promastigotas foram realizadas em meio Schneider pH 7,2 complementado cuja composição por litro é: 24,5 g de meio Schneider, NaHCO<sub>3</sub> 0,0075 M, CaCl<sub>2</sub> 0,1 M e, suplementado com soro fetal bovino inativado a 10%, L-glutamina 2 mM, 100 U/mL penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina.

Os parasitos foram mantidos por transferências em garrafas de cultivo (25 cm<sup>3</sup>) a cada 3 dias no meio de cultura Schneider em pH 7,2 suplementado com 10% de soro fetal bovino armazenado em estufa a 27°C.

### 3.5.5 Manutenção da cultura de *L. braziliensis*

A cultura de *L. braziliensis* na forma promastigota foi realizada em meio Schneider complementado cuja composição é: 24,5 g de meio Schneider, NaHCO<sub>3</sub> 0,0075 M, CaCl<sub>2</sub> 0,1 M e, suplementado com soro fetal bovino inativado a 20%, L-glutamina 2 mM, 100 U/mL penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina e pH 7,2.

Os parasitos foram mantidos por transferências a cada 3 dias no meio de cultura Schneider em pH 7,2 suplementado com 20% de soro fetal bovino armazenado em estufa a 27°C.

### 3.5.6 Atividade Leishmanicida

A avaliação da atividade antileishmania das CT, frente as espécies de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, está sendo relatada pela primeira vez neste trabalho de tese. Esta avaliação foi realizada frente às três espécies de *Leishmania spp.* nas formas evolutivas de promastigotas em culturas de 24 h e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* em culturas de 48 h e amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e *L. infantum* em culturas de 72 h. A avaliação em todos os ensaios foi realizada, no mínimo em triplicata e três ensaios independentes, pelo método MTT nas formas promastigotas e pelo método Alamar Blue para as formas amastigotas intracelulares e axênicas.

### 3.5.7 Triagem contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

Para avaliar os compostos de CT com possível atividade biológica contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, todas as amostras (CT) foram diluídas e avaliadas em uma concentração inicial de 50  $\mu\text{M}$  e, incubadas em placas de 96 poços, contendo uma concentração de  $4 \times 10^6$  parasitos/mL por 24 h. Como controle negativo, os parasitos foram incubados na ausência de CT e com DMSO 1%; como controle positivo utilizou-se pentamidina (0,1  $\mu\text{M}$ ) para os ensaios com *L. amazonensis* e *L. infantum*. Após 24 horas de incubação na estufa BOD a 26°C, os parasitos sobreviventes foram contados em câmara de Neubauer (Berlim, Alemanha). Os valores do  $\text{IC}_{50}$ / 24 horas (valor do composto necessário para matar 50% das células em 24 horas) foram calculados pela regressão linear das porcentagens de inibição do crescimento dos parasitos.

### 3.5.8 Avaliação da atividade anti promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*

#### 3.5.8.1 Método colorimétrico de avaliação da sensibilidade do parasito – MTT

Para avaliar a atividade antileishmania das substâncias nas formas promastigotas do parasito, promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* mantidas em meio Schneider com pH 7,2 suplementado com 10 ou 20% de soro fetal bovino foram incubadas com concentrações decrescentes (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56  $\mu\text{M}$ ) das sete chalconas-tiossemicarbazonas (diluídas em DMSO) por 24 horas a 26 °C. Estes ensaios foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes em microplacas de 96 poços, fundo chato, (Falcon Co, Franklin Lakes, EUA). Em seguida, 22  $\mu\text{L}$  de solução de MTT (brometo de tiazolil azul tetrazólio, Sigma) (5 mg/ml) foram adicionados a cada poço das microplacas e reincubadas por 16 h. Na presença de precipitado violeta (formazana), 50  $\mu\text{L}$  de solução de solubilização (1:1 SDS 20 % e N,N-dimetilformamida 50%) foram adicionados e incubados por 3 horas. A mudança de cor, de amarelo para violeta, indicou a viabilidade celular e a quantidade de formazana resultante foi proporcional ao número de parasitos vivos.

Células viáveis realizam esta conversão continuamente gerando uma medida quantitativa da viabilidade que foi mensurada a partir da leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 570 nm em leitor de microplaca ( $\mu\text{Quant}$  Bio-Tek Instruments, Winooski). O cálculo do  $\text{IC}_{50}$  (concentração que inibe 50% do crescimento) foi determinado em relação ao controle por análise de regressão sigmoidal através do programa *Origin* 6.0. Como controles, os parasitos foram incubados na ausência das amostras, na presença de 1% de DMSO e na presença de 10  $\mu\text{g/mL}$  de pentamidina como controle positivo.

O ensaio colorimétrico baseado no brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), um sal tetrazólico amarelo que é convertido a formazana, um precipitado violeta, por enzimas desidrogenases das células vivas, consiste na redução deste composto por redutases mitocondriais, formando cristais de formazana, que são solúveis em solventes orgânicos.

Devido à inconsistência dos resultados com as substâncias CT-CN e CT-NO<sub>2</sub>, não foram objeto da sequência dos experimentos.

#### 3.5.8.2 Avaliação contra as amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*

A avaliação da atividade sobre amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais murinos foi realizada utilizando camundongos BALB-c. Os macrófagos peritoneais murinos foram obtidos por lavagem peritoneal inoculando 5 mL de meio RPMI gelado (ou “Minimum

Essential Medium” - Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 µM de estreptomicina, e 100 U/mL de penicilina, 5 mg/mL de hemina, 0,5 mg/mL de ácido fólico, 0,2 mg/mL de D-biotina, 4 mg/mL de adenina (Sigma). Após breve massagem no peritônio do animal, fez-se a aspiração utilizando a mesma seringa e este volume foi transferido para um béquer. Após a contagem em câmara de Neubauer, o lavado peritoneal foi ajustado à concentração de  $2 \times 10^6$  macrófagos/mL e distribuído em câmaras LAB-TEK (Nunc, Rochester, EUA) e incubados por 1 hora a 37 °C e 5 % CO<sub>2</sub> para adesão dos macrófagos. As células aderidas foram incubadas com promastigotas de *L. amazonensis*, na razão de 3:1, a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Após 24 h, as câmaras foram lavadas novamente, para remover os parasitos livres. As monocamadas foram incubadas com as substâncias em teste **M1**, **M2**, **M4**, **M5** e **M6** (CT-H, CT-Me, CT-F, CT-Br e CT-Cl), por 48 horas a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, os sobrenadantes das culturas foram coletados e a atividade anti-amastigota foi avaliada microscopicamente, corando-se as lâminas com o sistema de corante hematológico Instant Prov (Newprov, Curitiba, Brasil) e contando pelo menos 100 macrófagos por amostra. Os resultados foram expressos em índice de infecção (IF), utilizando a seguinte fórmula:

**IF = % células infectadas X número de amastigotas/número total de macrófagos**

O cálculo do IC<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% do parasito) foi feito por análise de regressão sigmoideal através do programa *Origin 6.0*. Os resultados foram obtidos em dois experimentos independentes, realizados em triplicatas.

### **3.5.9 Produção e manutenção de amastigotas axênicas em cultura de *L. amazonensis* e *L. infantum***

#### **3.5.9.1 Cultivo e atividade anti-amastigota axênica de *L. amazonensis***

As formas amastigotas axênicas foram produzidas a partir do cultivo de promastigotas de *L. amazonensis* (fase metacíclica). Seguindo o protocolo de Cysne-Finkelstein e colaboradores (1998), as formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) foram cultivadas até a fase estacionária, lavadas uma vez em PBS (pH 7.4) e ajustadas para  $5 \times 10^6$  parasitos/mL em meio Schneider, suplementado com 20% de SFB, pH 5.5 e mantidos a 32 °C. Após 5 dias de cultivo, as formas arredondadas com flagelo livre ausente foram obtidas. Para avaliar a atividade frente amastigotas axênicas, os parasitos foram incubados com os derivados de CT **M1**, **M2**, **M4**, **M5** e **M6** em diferentes concentrações (1,56 a 50 µM) diluídos em DMSO por 72 horas a 32 °C. Estes ensaios foram realizados em triplicata em placas de 96 poços, fundo chato, (Falcon Co, Franklin Lakes, EUA). A atividade leishmanicida foi avaliada, adicionando a cada poço 22 µL de Alamar Blue (resazurina). Um ensaio colorimétrico baseado na redução da resazurina não fluorescente à resorufina que fluoresce em vermelho. Células viáveis realizam esta conversão continuamente gerando uma medida quantitativa da viabilidade que foi mensurada por fluorimetria (Spectra Max GEMINI XPS- Molecular Devices, Silicon Valley, EUA) com excitação a 560 nm e a 590 nm emissão. O cálculo do IC<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% do crescimento) foi determinado em relação ao controle por análise de regressão logarítmica no programa *Origin 6.0*.

#### **3.5.9.2 Cultivo e atividade anti-amastigota axênica de *L. infantum***

As formas amastigotas axênicas foram produzidas a partir do cultivo de promastigotas de *L. infantum* (fase metacíclica). Seguindo o protocolo de Sereno e colaboradores (1998), as

formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP263) foram cultivadas até a fase estacionária, lavadas uma vez em PBS (pH 7.4) e ajustadas para  $5 \times 10^6$  parasitos/mL em meio para amastigota axênica (Meio 199 com Hanks, tripto-caseína (0,5%), L-cisteína 3mM, glucose 15 mM, glutamina 5 mM, bicarbonato de sódio 4 mM, hemina 0,023 mM, hepes 2 mM) suplementado com 20% SBF, pH 6,5 e mantidos a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 5 dias de cultivo, as formas arredondadas com flagelo livre ausente foram obtidas. Para avaliar a atividade frente amastigotas axênicas, os parasitos foram incubados com os derivados de CT **M1, M2, M4, M5 e M6** em diferentes concentrações (1,56 a 50 µM) diluídos em DMSO por 72 horas a 37 °C. Estes ensaios foram realizados em triplicata em placas de 96 poços, fundo chato, (Falcon Co, Franklin Lakes, EUA). A atividade leishmanicida e o cálculo do IC<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% do crescimento) seguiram os mesmos parâmetros do item descrito acima (3.5.9.1)

### 3.5.10 Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada fluorimetricamente com Alamar Blue (resazurina). Inicialmente, os macrófagos peritoneais murinos foram obtidos a partir da lavagem da cavidade peritoneal com 8 mL de RPMI 1640 (Sigma, St Louis, EUA) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma, St Louis, EUA), 15 mM de HEPES (Sigma, St Louis, EUA), penicilina e estreptomicina (Sigma, St Louis, EUA), foram distribuídos em placas de fundo chato, 96 orifícios ( $1 \times 10^6$ ) em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Posteriormente foram incubados por uma hora a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub> (Shel Lab, IR2424, Cornelius, EUA), a cultura foi lavada e os protótipos foram adicionados em diferentes concentrações por 72 horas a 37 °C. Após o período de incubação o sobrenadante foi retirado e adicionados 200 µL de PBS contendo 22 µL de Alamar Blue. Após o período de 3 horas de incubação, a viabilidade foi mensurada por fluorimetria (Spectra Max GEMINI XPS-Molecular Devices, Silicon Valley, EUA) com excitação a 560 nm e a 590 nm de emissão. O cálculo do LD<sub>50</sub> (dose letal mediana) foi determinado em relação ao controle por análise de regressão sigmoidal através do programa *Origin* 6.0. Os resultados foram expressos através do cálculo do índice de seletividade (IS) (LD<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> em amastigota intracelular).

### 3.5.11 Quantificação de óxido nítrico extracelular

A produção de óxido nítrico foi estimada indiretamente pela quantificação de nitrito no sobrenadante, como descrito por Green e cols. (1982). Macrófagos peritoneais murinos ( $1 \times 10^6$ /mL), foram incubados com as CT em estudo, em diferentes concentrações, a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, pelo período de 24 horas. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram coletados e adicionados com igual volume de reagente de Griess. Como padrão foi efetuada uma curva de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) a partir de solução estoque (200 mM). Após a adição do reagente de Griess, foi mantida uma curta incubação de 20 minutos e realizada a leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 540 nm em leitor de microplaca.

O sobrenadante da cultura foi disposto em triplicata em placa de 96 poços (50 µL/poço) e incubado com igual volume do reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de dihidroclorato de naftiletieno diamida e 5% de ácido fosfórico H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) recém preparado, por 15 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Esta reação é colorimétrica e absorvância foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm. O branco da reação foi constituído de meio RPMI e de reagente de Griess em volumes iguais. Os resultados foram expressos em µM de NO<sub>2</sub>, e como parâmetro comparados a uma curva padrão a partir da concentração conhecida de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) dissolvido em meio de cultura.



### 3.5.12 Avaliação da atividade da tripanotona redutase (TR) na fração solúvel (FS) de *L. amazonensis* e *L. infantum*

#### 3.5.12.1 Obtenção de FS de *L. amazonensis* e *L. infantum*

Uma suspensão de parasitos contendo  $2 \times 10^9$  nas formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* foram retirados do meio Schneider contendo 10% de SFB, por centrifugação a 500 g/10 min. Os sedimentos foram colocados em tubo falcon 15 mL, separados e identificados por espécie, foram lavados em PBS pH 7,2 uma vez e centrifugados por mais duas vezes nas mesmas condições. Ao sedimento final foi adicionado o meio de reação composto por: tampão Tris-HEPES 40 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NADPH 0,1 mM, tripanotona oxidada [T(S)<sub>2</sub>] 0,05 mM e DTNB 0,1 mM. O material foi lisado por 4 ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento (N<sub>2</sub> líquido em banho a 37 °C). Ao final, a amostra foi centrifugada a 12.500 g por 15 min, sendo o sobrenadante considerado a FS. A concentração de proteína do extrato solúvel foi quantificada usando o espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

#### 3.5.12.2 Determinação da concentração protéica

A concentração protéica da fração obtida (FS), foi avaliada através de leitura em espectrofotômetro  $\mu$ Quant (Biotek-Instrument Inc., Winooski) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A concentração foi expressa segundo a fórmula (Johnstone & Thorpe, 1982):

**Concentração de proteína (mg/mL) = (leitura da DO a 280 nm x 1,5) – (leitura da DO a 260 nm x 0,75)**

Todas as amostras foram aliqüotadas em microtubos eppendorfs e estocadas em nitrogênio líquido até o momento da análise.

#### 3.5.12.3 Atividade dos compostos sobre a atividade enzimática da tripanotona redutase

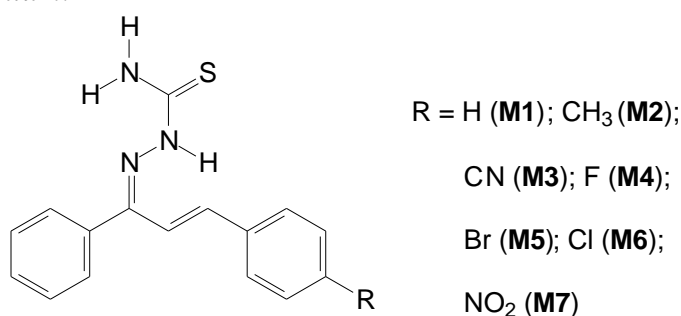
A atividade dos compostos na inibição da tripanotona redutase foi avaliada através do método de Ellman, que se baseia na redução do DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) a 2TNB-(ácido 2-nitro-5-tiobenzóico). A tripanotona na forma oxidada [T(S)<sub>2</sub>], que pode ser então, novamente regenerada a T(S)<sub>2</sub> por ação da TR formando tripanotona reduzida [T(SH)]<sub>2</sub>, que por sua vez doa elétrons para o DTNB formando 2TNB e tripanotona na forma oxidada [T(S)<sub>2</sub>], que pode ser então novamente regenerada a T(S)<sub>2</sub> por ação da TR. Concentrações crescentes dos compostos **M2** e **M6** foram avaliadas para dosar a atividade da TR no extrato solúvel das promastigotas das duas espécies em teste. A reação foi disparada com a adição de 0,4 mg/mL da FS de *L. amazonensis* e de *L. infantum*, separadamente, e incubada por 25 minutos. O sobrenadante (extrato solúvel), contendo a TR, foi utilizado para a medida da atividade enzimática. A atividade da TR (formação do 2TNB-) foi avaliada colorimetricamente em comprimento de onda de 410 nm. Clomipramina (50  $\mu$ M) foi utilizada como controle positivo de inibição.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 As chalconas-tiossemicarbazonas (CT)

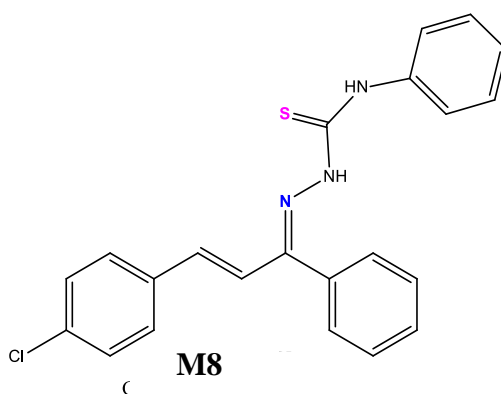
As CT são substâncias híbridas entre chalconas, presentes em diversas espécies vegetais, e a tiossemicarbazona. Foram previamente sintetizadas, purificadas e caracterizadas por técnicas espectroscópicas GOULART (2015).

Foi investigada uma série de 7 (sete) CT (**M1-M7**), sendo substituídas no anel aromático da chalcona com substituintes doadores e retiradores de elétrons. A Figura 10 mostra as estruturas das CT avaliadas frente à 3 (três) espécies de *Leishmania spp*: *L. amazonensis*, *L. brasiliensis* e *L. infantum*.

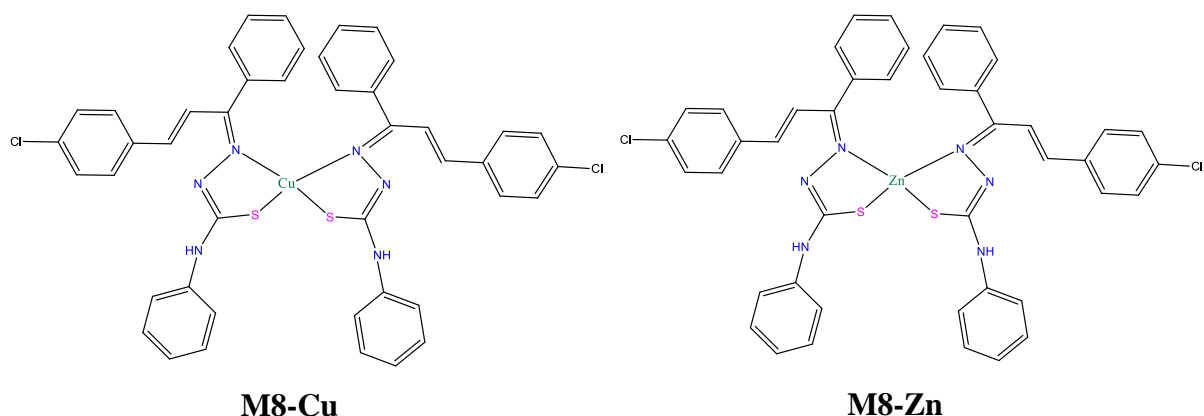


**Figura 10.** Estrutura química das chalcona-tiossemicarbazonas avaliadas nos ensaios frente aos parasitos do gênero *Leishmania*.

Além da série das 7 CT (**M1-M7**), foram avaliadas frente à *L. amazonensis* e *L. infantum* outras 3 (três) CT substituídas com o anel fenila no nitrogênio da porção tiossemicarbazona (**M8**) e, os correspondentes complexos com os íons de zinco e cobre (**M8-Zn** e **M8-Cu**), conforme estruturas químicas na Figura 11.



Continua...



**Figura 11.** Estruturas moleculares da CT fenil-substituída (**M8**) e de seus correspondentes complexos metálicos (**M8-Cu** e **M8-Zn**).

## 4.2 Atividade Leishmanicida

### 4.2.1. Triagem dos compostos em 50 $\mu\text{M}$

Os ensaios frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* utilizando-se todas as CT foram realizados na concentração de 50  $\mu\text{M}$  em DMSO 1% (v/v) em meio Schneider em culturas de 24 h. A pentamidina foi utilizada como droga de referência para avaliar o teste quanto à sensibilidade do parasito em comparação às CT. Na tabela 4 é possível verificar o percentual de parasitos mortos após o tratamento com as CT.

**Tabela 4.** Percentual de parasitos mortos após o tratamento de 24 h com as CT.

Moléculas		Parasitos Mortos <i>L. amazonensis</i>	Parasitos Mortos <i>L. braziliensis</i>
1	CT-H	70 %	79 %
2	CT-Me	72 %	87 %
3	CT-CN	42 %	63 %
4	CT-F	78 %	95 %
5	CT-Br	74 %	90 %
6	CT-Cl	73 %	91 %
7	CT-NO <sub>2</sub>	63 %	89 %
Pentamidina		66 %	56 %
DMSO		5 %	0 %

#### 4.2.2 Atividade antileishmania para promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*

Os ensaios frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* utilizando-se as CT foram realizados com as concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56  $\mu\text{mol/L}$  em DMSO 1% (v/v) em meio Schneider em culturas de 24 h.

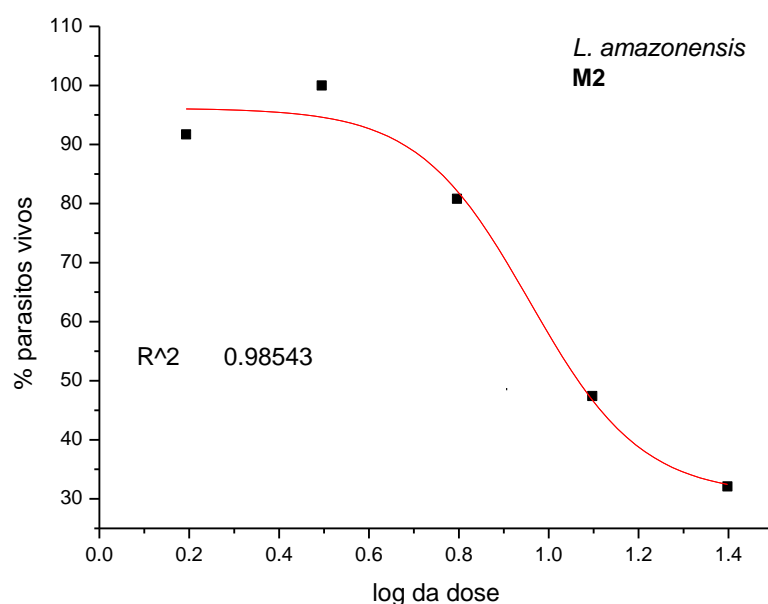
Os resultados obtidos nessas condições possibilitaram a determinação dos valores de  $\text{IC}_{50}$  (concentração de composto necessária para matar 50% dos parasitos) para as promastigotas de *L. amazonensis*, conforme Tabela 5. As CT substituídas com os grupos ciano (CN, **M3**), fluor (F, **M4**) e nitro ( $\text{NO}_2$ , **M7**) não apresentaram atividade significativa. As substâncias **M1** (H), **M2** ( $\text{CH}_3$ ) e **M5** (Br) mostraram atividade significativa na faixa de 11,02 à 14,68  $\mu\text{M}$  e, a CT cloro-substituída (Cl, **M6**) foi a mais ativa com  $\text{IC}_{50} = 5,22 \pm 0,75 \mu\text{M}$  na mesma faixa que a pentamidina ( $\text{IC}_{50} = 5,20 \pm 0,41 \mu\text{M}$ ), usada como controle positivo.

A Figura 12 mostra o perfil do gráfico obtido em um dos ensaios realizados com a substância **M2** frente aos promastigotas de *L. amazonensis* que indica um modelo sigmoidal dose-dependente entre o percentual de parasitos vivos *versus* log da dose ensaiada.

**Tabela 5.** Valores de  $\text{IC}_{50}$  (concentração de composto necessária para matar 50%  $\pm$  SD do parasito) das chalconas-tiossemicarbazonas (**M1-M6**) contra promastigotas de *L. amazonensis* nos ensaios de 24 h

Composto	X	Média $\pm$ DP*
		$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>M1</b>	H	$14,68 \pm 0,31$
<b>M2</b>	Me	$11,02 \pm 1,95$
<b>M3</b>	CN	-
<b>M4</b>	F	-
<b>M5</b>	Br	$12,52 \pm 0,99$
<b>M6</b>	Cl	$5,22 \pm 0,75$
<b>M7</b>	$\text{NO}_2$	-
Pentamidina		$5,20 \pm 0,41$

\*DP: desvio padrão



**Figura 12.** Gráfico resultante de um dos ensaios em 24 h da chalcona-tiossemicarbazona **M2** frente a *L. amazonensis* correlacionando % de parasitos vivos *versus* log da dose.

Soares e colaboradores (2011) avaliaram estiril-tiossemicarbazonas e fenil-tiossemicarbazonas substituídas frente ao tripanossomatídeo *Trypanosoma cruzi* na forma de tripomastigotas observando valores de  $IC_{50}$  na faixa de 0,4 a 1,8  $\mu\text{g/mL}$  em culturas de 24 h. Esses resultados indicaram as tiossemicarbazonas como uma classe promissora para auxiliar no tratamento das infecções por tripanossomatídeos.

Em 2015, Melos e colaboradores avaliaram uma série de tiossemicarbazonas derivadas do piperonal frente a *L. amazonensis* na forma de promastigotas mostrando resultados promissores para as substâncias hidróxi e ciano-substituídas com valores de  $IC_{50}$  de 53  $\mu\text{g/mL}$  e 16,4  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Uma série de 19 substâncias da classe das chalconas, também, foram investigadas frente *L. amazonensis* apresentando valores de  $IC_{50}$  na faixa de 0,4  $\mu\text{g/mL}$  a > 100  $\mu\text{g/mL}$  na forma de promastigotas, sendo as mais ativas substituídas nos dois anéis com os grupos cloro e piperonal (BOECK et al., 2006).

Assim, as substâncias híbridas, CT, avaliadas frente à *L. amazonensis* na forma de promastigotas pela primeira vez neste trabalho de tese, mostraram atividade coerente quando comparadas com as classes separadas já descritas na literatura (BOECK et al., 2006; MELOS et al., 2015).

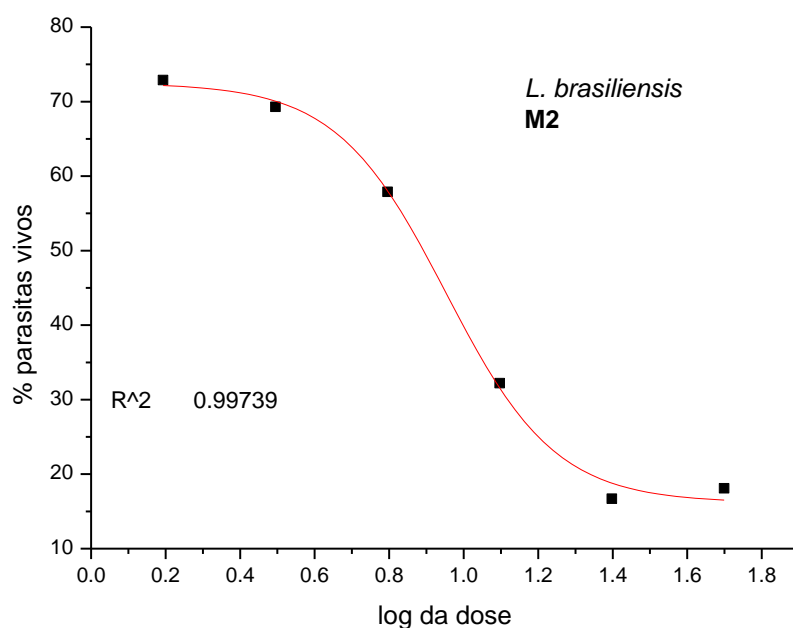
Os resultados obtidos nos ensaios das CT frente às promastigotas de *L. brasiliensis* mostraram atividade significativa para os compostos **M1**, **M2**, **M4** e **M6**, sendo que da mesma forma que para *L. amazonensis*, não foram ativos **M3** e **M7** e, neste caso, também o composto **M5** (bromo-substituído). Os valores de  $IC_{50}$  para **M1**, **M2** e **M4** foram observados na faixa de 12,93 a 10,78  $\mu\text{M}$  e, também, para *L. brasiliensis* a substância cloro-substituída, **M6**, foi a mais ativa com  $IC_{50} = 7,70 \pm 0,23 \mu\text{M}$ , enquanto que o controle positivo apresentou  $IC_{50} = 3,91 \pm 0,90 \mu\text{M}$ , ou seja, na mesma ordem de grandeza. A Tabela 6 mostra os valores das médias de  $IC_{50}$  obtidos.

A Figura 13 ilustra o perfil do gráfico obtido em um dos ensaios realizados com a substância **M2** frente aos promastigotas de *L. brasiliensis* que também indicou um modelo sigmoide dose-dependente entre o percentual de parasitos vivos *versus* log da dose ensaiada.

**Tabela 6.** Valores de IC<sub>50</sub> (concentração de composto necessária para matar 50% ± DP\* do parasito) das chalconas-tiossemicarbazonas contra promastigotas de *L. braziliensis* nos ensaios de 24 h

Composto	X	Média ± DP*
		IC <sub>50</sub> (μM)
M1	H	12,93 ± 2,54
M2	Me	10,78 ± 1,39
M3	CN	-
M4	F	12,41 ± 0,59
M5	Br	-
M6	Cl	7,70 ± 0,23
M7	NO <sub>2</sub>	-
Pentamidina		3,91 ± 0,90

\*DP: desvio padrão



**Figura 13.** Gráfico resultante de um dos ensaios em 24 h da chalcona-tiossemicarbazona **M2** frente a *L. braziliensis* correlacionando % de parasitas vivos *versus* log da dose.

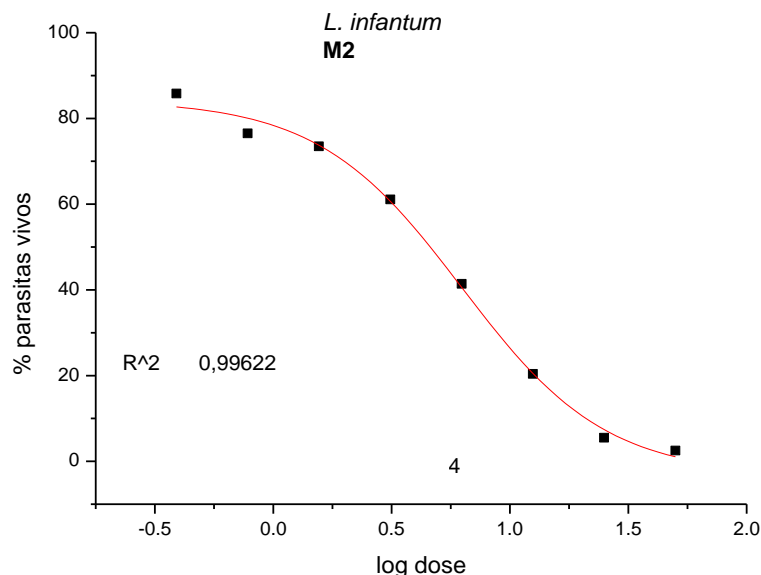
Os resultados obtidos nos ensaios das CT frente às promastigotas de *L. infantum* mostraram atividade significativa de maneira similar à *L. braziliensis*, ou seja, para os compostos **M1**, **M2**, **M4** e **M6**, e, não foram ativas as substâncias **M3**, **M5** e **M7**. No entanto, todas as CT ativas apresentaram valores de IC<sub>50</sub> na faixa de 4,44 μM a 6,46 μM e, a substância cloro-substituída, **M6**, também, neste caso, foi a mais ativa com IC<sub>50</sub> = 4,44 μM ± 0,95 μM. Interessante salientar que todas as substâncias avaliadas foram mais ativas que a pentamidina (IC<sub>50</sub> = 10,14 ± 0,36 μM). A Tabela 7 mostra os valores das médias de IC<sub>50</sub> obtidos para *L. infantum*.

A Figura 14 mostra o perfil do gráfico obtido em um dos ensaios realizados com a substância **M2** frente aos promastigotas de *L. infantum* que indica um modelo sigmoidal dose-dependente entre o percentual de parasitos vivos *versus* log da dose ensaiada

**Tabela 7.** Valores de IC<sub>50</sub> (concentração de composto necessária para matar 50% ± DP\* do parasito) das chalconas-tiossemicarbazonas contra promastigotas de *L. infantum* nos ensaios de 24 h

Composto	X	Média ± DP*
		IC <sub>50</sub> (µM)
<b>M1</b>	H	4,82 ± 0,94
<b>M2</b>	Me	5,49 ± 0,87
<b>M3</b>	CN	-
<b>M4</b>	F	6,46 ± 1,35
<b>M5</b>	Br	-
<b>M6</b>	Cl	4,44 ± 0,95
<b>M7</b>	NO <sub>2</sub>	-
Pentamidina		10,14 ± 3,36

\*DP: desvio padrão



**Figura 14.** Gráfico resultante de um dos ensaios em 24 h da chalcona-tiossemicarbazona **M2** frente a *L. infantum* correlacionando % de parasitos vivos *versus* log da dose.

Alguns relatos na literatura indicam atividade de chalconas naturais e sintéticas frente a promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum*, de maneira geral, com valores de IC<sub>50</sub> abaixo de 10 µg/mL (MELLO *et al.*, 2014; TAJUDDEEN *et al.*, 2018). Quanto à atividade antileishmaniana de tiossemicarbazonas frente a promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum*, não foram

observados relatos até o momento, assim como para as chalconas-tiossemicarbazonas avaliadas neste trabalho de tese.

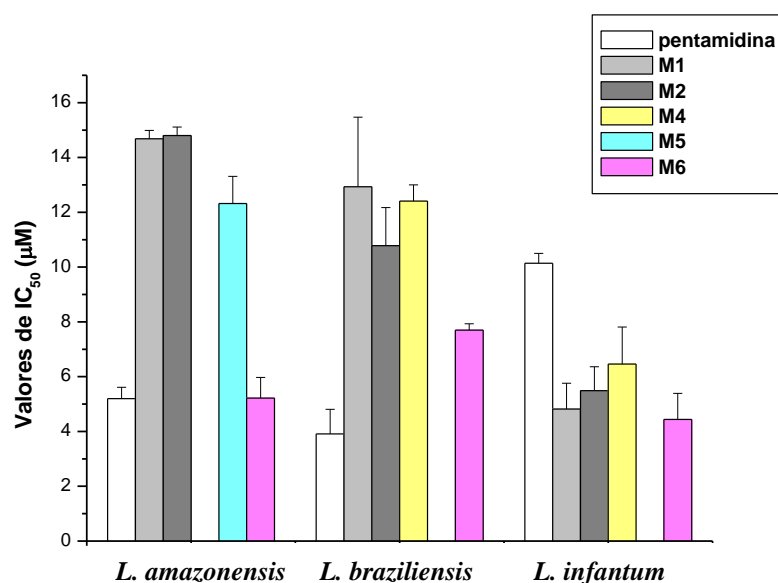
A Tabela 8 mostra os valores de IC<sub>50</sub> reunidos para todas as espécies de *Leishmania* avaliadas.

**Tabela 8.** Valores de IC<sub>50</sub> (concentração de inibição capaz de matar 50% ± DP\* do parasito) das chalconas-tiossemicarbazonas contra promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* nos ensaios de 24 h

Composto	X	IC <sub>50</sub> (µM) Média ± DP*		
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. infantum</i>
M1	H	14,68 ± 0,31	12,93 ± 2,54	4,82 ± 0,94
M2	Me	11,02 ± 1,95	10,78 ± 1,39	5,49 ± 0,87
M3	CN	**	**	**
M4	F	**	12,41 ± 0,59	6,46 ± 1,35
M5	Br	12,52 ± 0,99	**	**
M6	Cl	5,22 ± 0,75	7,70 ± 0,23	4,44 ± 0,95
M7	NO <sub>2</sub>	**	**	**
Pentamidina		5,20 ± 0,41	3,91 ± 0,90	10,14 ± 3,36

\*DP: desvio padrão. \*\*Nenhuma atividade até 50 µM.

A comparação entre os valores de IC<sub>50</sub> para as CT considerando cada espécie de *Leishmania*, na forma evolutiva promastigota, pode ser ilustrada na Figura 15. Assim, foi possível observar que a espécie mais sensível às CT foi a *L. infantum*, responsável pela leishmaniose visceral, sendo que todas as substâncias ensaiadas, frente a essa espécie, foram mais ativas do que a pentamidina.



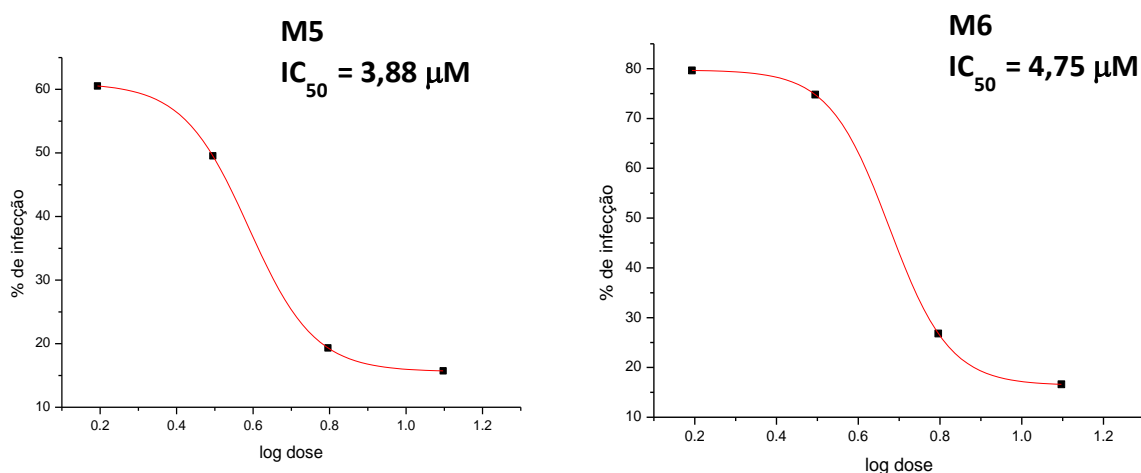
**Figura 15.** Comparação dos valores de IC<sub>50</sub> (µM) das CT e pentamidina frente a *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.



Os resultados dos ensaios com a chalcona-tiossemicarbazona fenil-substituída (**M8**), bem como, seus complexos metálicos (**M8-Zn** e **M8-Cu**) não apresentaram atividade antileishmania significativa frente a promastigotas de *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. brasiliensis*. Após diversas repetições dos ensaios com essas substâncias e, confirmado os resultados anteriores de nenhuma atividade significativa até a concentração de 50  $\mu\text{M}$ , essas três moléculas não tiveram a continuidade do estudo.

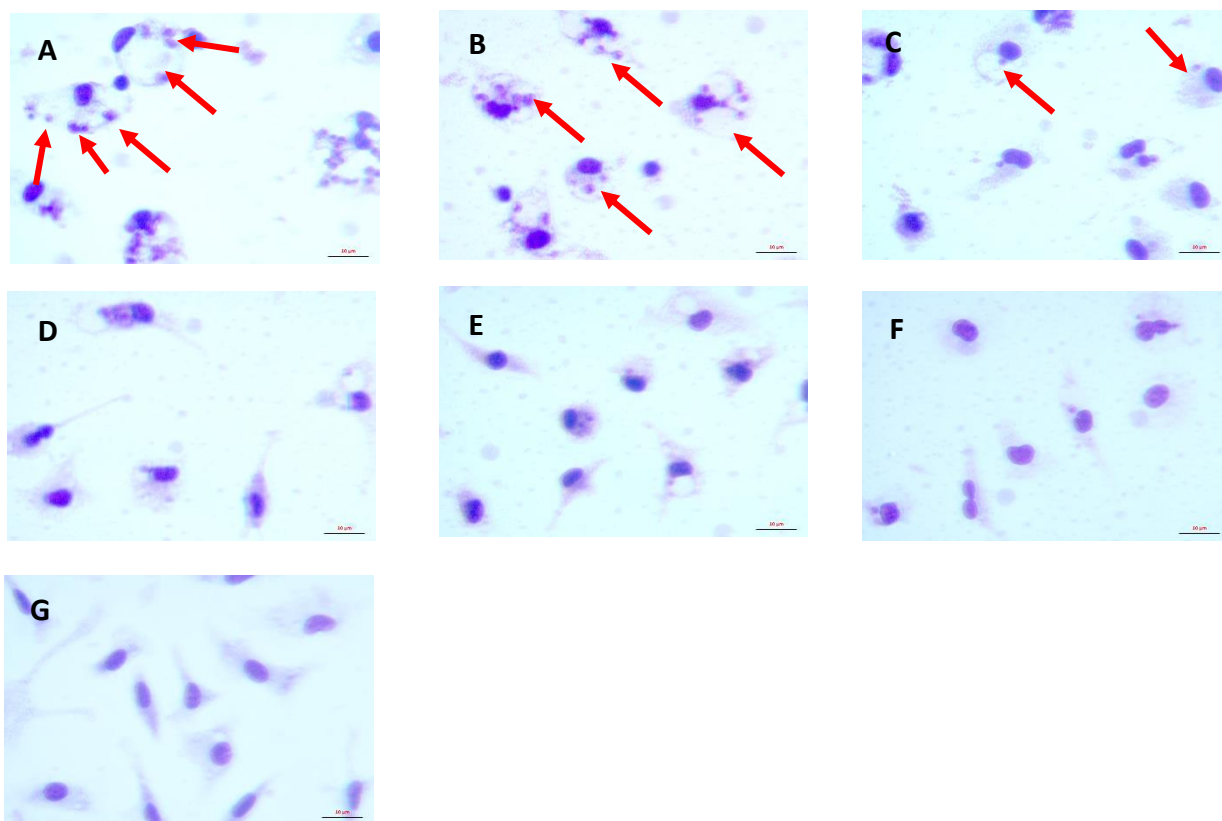
#### 4.2.3 Atividade antileishmania para amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*

Nos ensaios frente às amastigotas intracelulares foram avaliadas as quatro CT: **M1**, **M2**, **M5** e **M6**, que apresentaram resultados significativos consistentes nos ensaios com as promastigotas da espécie *L. amazonensis*, em tempos de tratamento de 48 horas. Os experimentos foram realizados nas concentrações em ordem decrescente de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56  $\mu\text{M}$ . Foram observados valores de  $\text{IC}_{50}$  de 3,8  $\mu\text{M}/\text{mL}$  para a CT bromo-substituída (**M5**) e 4,75  $\mu\text{M}/\text{mL}$  para a cloro-substituída (**M6**) (Figura 16). O controle positivo, pentamidina, apresentou  $\text{IC}_{50} = 1,9 \mu\text{M}$  nas condições investigadas. As substâncias **M1** e **M2** não apresentaram resultados consistentes.



**Figura 16.** Resultados dos  $\text{IC}_{50}$  calculados a partir do % de infecção dos macrófagos com amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.

A Figura 17 mostra as fotomicrografias de macrófagos infectados e tratados com **M6** por 48 h. Os macrófagos peritoneais murinos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e incubados com a CT **M6** e com a pentamidina como referência. A atividade foi avaliada microscopicamente corando-se as lâminas com Instant Prov (Newprov, Curitiba, Brasil).



**Figura 17.** Fotomicrografia de macrófagos infectados e tratados com CT-M6 por 48 h. (A) Controle; (B) M6 (1,56  $\mu\text{M}$ ); (C) M6 (3,125  $\mu\text{M}$ ); (D) M6 (6,25  $\mu\text{M}$ ); (E) M6 (12,5  $\mu\text{M}$ ); (F) Pentamidina (12,5  $\mu\text{M}$ ); (G) Macrófagos não infectados. As setas em vermelho apontam para as formas amastigotas intracelulares encontradas no tratamento com as menores concentrações da CT-M6.  
\*Barra = 10  $\mu\text{m}$

Relatos na literatura mostram resultados para tiossemicarbazonas derivadas de cetonas em ensaios com amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* com valores de  $\text{IC}_{50}$  na faixa de 33  $\mu\text{M}$  a 40  $\mu\text{M}$  (SCARIM *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2017). Quanto a resultados com amastigotas intracelulares tratadas com chalconas foram observados valores de  $\text{IC}_{50}$  na faixa de 3,4 a 28  $\mu\text{M}$ , além de resultados com > 100  $\mu\text{M}$  (BOECK *et al.*, 2006). De Mello (2018) relatou em revisão a atividade de diversas chalconas que apresentaram atividade significativa frente a amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* na faixa de 2  $\mu\text{M}$  a >30  $\mu\text{M}$ .

As CT M5 e M6 apresentaram atividade significativa melhores do que para as tiossemicarbazonas e chalconas isoladamente (3,88  $\mu\text{M}$  e 4,75  $\mu\text{M}$  para M5 e M6, respectivamente) indicando a importância de moléculas híbridas.

#### 4.2.4 Avaliação da citotoxicidade frente a macrófagos murinos

Os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade utilizando macrófagos murinos em culturas de 72 h, possibilitaram calcular os valores de  $\text{DL}_{50}$  para os compostos M5 e M6 que apresentaram atividade frente as amastigotas intracelulares. A Tabela 9 mostra os resultados de  $\text{DL}_{50}$  obtidos para as CT M5 e M6, além da pentamidina usada como referência, bem como o índice de seletividade calculado através da razão entre os valores de  $\text{DL}_{50}$  da citotoxicidade e

os valores de IC<sub>50</sub> das amastigotas intracelulares. Assim, quanto maior o valor numérico da razão menos tóxica, ou seja, mais segura será a substância.

**Tabela 9.** Valores de DL<sub>50</sub> (µM) para os ensaios de citotoxicidade das chalconas-tiossemicarbazonas **M5** e **M6** e pentamidina frente a macrófagos murinos em culturas de 72 horas, IC<sub>50</sub> frente as amastigotas intracelulares e índice de seletividade considerando os resultados de IC<sub>50</sub> frente às amastigotas intracelulares

Substância	DL <sub>50</sub> (µM) ± DP <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (µM)	IS <sup>c</sup>
			<i>L. amazonensis</i>
<b>M5</b>	44,24 ± 3,34 <sup>a</sup>	3,88	11,40
<b>M6</b>	32,75 ± 1,74 <sup>a</sup>	4,75	6,89
Pentamidina	8,5 ± 1,3 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,1	4,47

<sup>a</sup>DP: desvio padrão; <sup>b</sup>IC<sub>50</sub>: valores frente à amastigotas intracelulares;

<sup>c</sup>IS: índice de seletividade (IS = DL<sub>50</sub> / IC<sub>50</sub>)

Os resultados obtidos indicaram uma menor toxicidade para as substâncias **M5** e **M6**, observando-se que a CT-**M6** foi a mais ativa frente às 3 espécies de *Leishmania* dentre as substâncias avaliadas. Além disso, os resultados foram melhores do que a pentamidina para a *L. amazonensis* e *L. infantum* e, com maior índice de seletividade.

#### 4.2.5 Atividade antileishmania para amastigotas axênicas de *L. amazonensis*

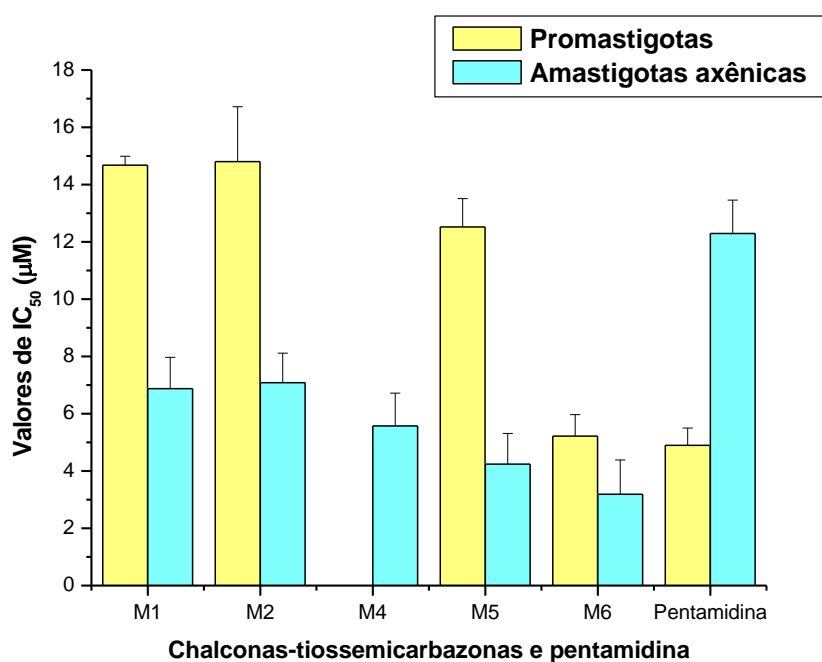
As formas amastigotas axênicas foram produzidas a partir do cultivo de promastigotas de *L. amazonensis*. Neste trabalho de tese, testamos frente às amastigotas axênicas as CT: **M1**, **M2**, **M4**, **M5** e **M6**, nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56 µM. A atividade antiparasitária foi avaliada adicionando a cada poço 50 µM de resazurina, conforme descrito em Materiais e Métodos. O cálculo do IC<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% do crescimento) foi determinado em relação ao controle por análise de regressão logarítmica no *Origin 6.0*. Os resultados observados indicaram valores de IC<sub>50</sub> na faixa de 3,19 a 7,08 µM e, a substância cloro-substituída, **M6**, mostrou ser a mais ativa com IC<sub>50</sub> = 3,19 ± 1,20 µM. Interessante salientar que todas as substâncias avaliadas foram mais ativas que a pentamidina (IC<sub>50</sub> = 12,29 ± 1,17 µM).

A Tabela 10 mostra os resultados obtidos para os ensaios com as amastigotas axênicas no tempo de cultura de 72 h para todas as amostras testadas e, a Figura 18 mostra a comparação entre os IC<sub>50</sub> das promastigotas e amastigotas axênicas.

**Tabela 10.** Valores de IC<sub>50</sub> (μM) para os ensaios de amastigotas axênicas de *L. amazonensis* frente às chalconas-tiossemicarbazonas e pentamidina em culturas de 72 h

		IC <sub>50</sub> (μM) Média ± DP*
<b>Composto</b>	<b>X</b>	<i>L. amazonensis</i>
<b>M1</b>	H	6,88 ± 1,09
<b>M2</b>	Me	7,08 ± 1,03
<b>M4</b>	F	5,57 ± 1,15
<b>M5</b>	Br	4,24 ± 1,07
<b>M6</b>	Cl	3,19 ± 1,20
Pentamidina		12,29 ± 1,17

\*DP: desvio padrão



**Figura 18.** Comparação entre os valores de IC<sub>50</sub> (μM) das formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*.

#### 4.2.5 Atividade antileishmania para amastigotas axênicas de *L. infantum*

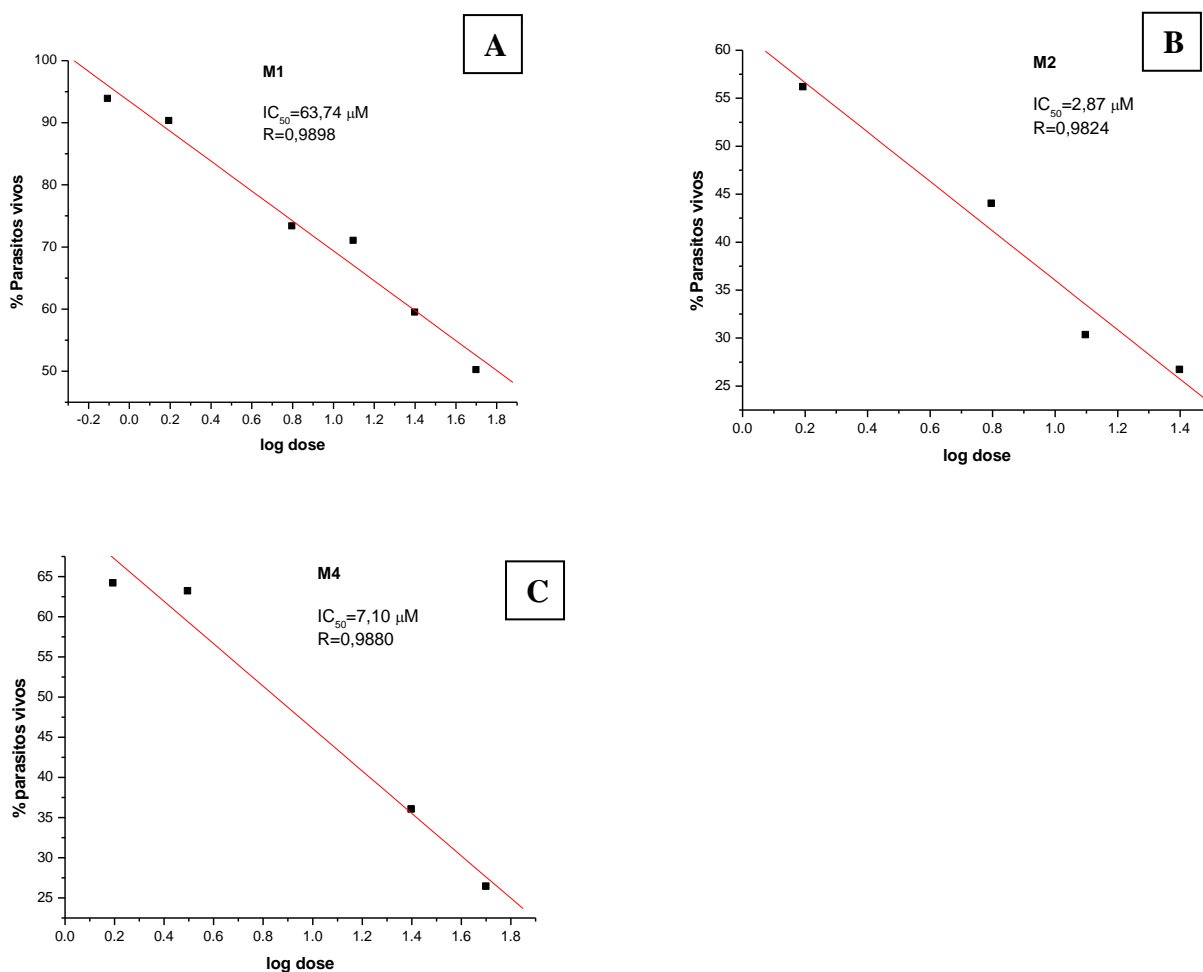
As formas amastigotas axênicas foram produzidas a partir do cultivo de promastigotas de *L. infantum*. A obtenção das amastigotas axênicas foi muito difícil, sendo necessárias várias repetições para que houvesse uma conversão com número adequado de promastigotas a amastigotas para a realização dos ensaios.

Os ensaios possibilitaram obter valores de IC<sub>50</sub> apenas para as CT: **M1**, **M2** e **M4** (Tabela 11 e Figura 19). Os compostos **M5** e **M6** promoveram destruição completa das amastigotas axênicas nas concentrações avaliadas, não sendo o cálculo dos valores de IC<sub>50</sub>.

**Tabela 11.** Valores de IC<sub>50</sub> (μM) para as substâncias **M1**, **M2** e **M4** avaliadas frente a amastigotas axênicas de *L. infantum* em cultura de 72 h.

X	Composto	IC <sub>50</sub> (μM)	Desvio Padrão	R**
H	<b>1</b>	63,74	± 0,62	0,9898
Me	<b>2</b>	2,87	± 0,49	0,9824
F	<b>4</b>	7,10	± 0,82	0,9741
Br	<b>5</b>	*	-	-
Cl	<b>6</b>	*	-	-

\*Não determinado. \*\*Coeficiente de correlação.



**Figura 19.** Gráficos obtidos dos ensaios das amastigotas axênicas de *L. infantum* tratadas com as chalconas-tiossemicarbonas **M1** (A), **M2** (B) e **M4** (C), para o cálculo dos valores de IC<sub>50</sub>.

O artigo de revisão de Mello (2018) sobre atividade de diversas chalconas frente a *L. amazonensis* e *L. infantum* indica para amastigotas axênicas valores de IC<sub>50</sub> de 0,8 µM a 13 µM e 6,3 µM e 9,6 µM, respectivamente. Para as CT a atividade frente às amastigotas axênicas apresentou valores de IC<sub>50</sub> de 3,19 µM a 7,08 µM para *L. amazonensis* para as 5 substâncias investigadas e, com valores abaixo da pentamidina (12,29 µM). No entanto, para as amastigotas axênicas de *L. infantum* apenas as substâncias **M1**, **M2** e **M4** apresentaram resultados consistentes na faixa de 2,87 µM e 63,74 µM.

### 4.3 Avaliação da Produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula instável e sofre rápida oxidação, podendo se transformar em NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e/ou NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. O NO<sub>2</sub><sup>-</sup> tem capacidade de reação com aminas presentes no reagente de Griess e, essa reação gera um produto de coloração púrpura cuja intensidade é medida a 540 nm (GREEN *et al.*, 1982). Por meio da concentração de nitritos presentes no sobrenadante da cultura de macrófagos infectados com *Leishmania* na forma de promastigotas é possível quantificar a produção de NO pelo método de Green (GREEN *et al.*, 1990). Os métodos diretos ou indiretos de detecção de NO, como por exemplo a dosagem de nitrito, possuem limitações pela incapacidade de definir populações de interesse e detectar eventos intracelulares em nível unicelular (CHATTON & BROILLET, 2002; FAILLI *et al.*, 2002).

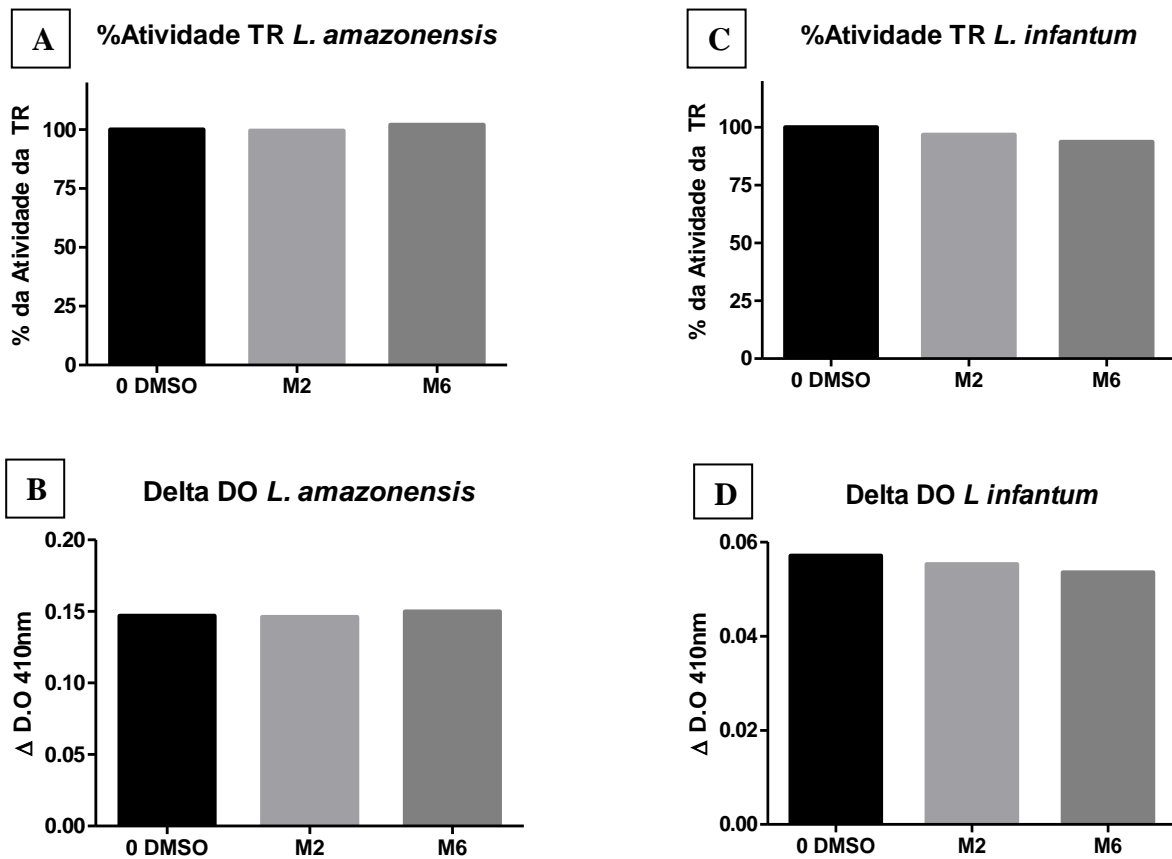
Devido a produção muito baixa de NO por *L. amazonensis* em macrófagos infectados, nos experimentos realizados foi dosada a quantidade total desta molécula durante a infecção de macrófagos estimulados com LPS. Em nosso estudo não foi possível detectar a produção de NO, nem mesmo quando macrófagos foram infectados pelas mesmas promastigotas, revelando baixa sensibilidade do reagente Griess na reação nas condições ensaiadas.

### 4.4 Avaliação do Efeito Inibitório da Enzima Tripanotiona Redutase

Tripanossomatídeos possuem um metabolismo do grupo tiol único, envolvendo a tripanotiona, que desempenha um papel crucial na regulação do equilíbrio redox e na defesa contra o estresse oxidativo em um caminho não compartilhado pelo hospedeiro humano (MÜLLER *et al.*, 2003). A enzima tripanotiona redutase mantém a tripanotiona em sua forma reduzida e assim capaz de ser oxidada para tripanotiona oxidase, levando a redução dos níveis de radicais livres e contribuindo para a manutenção de um ambiente intracelular redutor (HEBY *et al.*, 2007).

Os resultados foram obtidos colorimetricamente com o comprimento de onda de 410 nm. Os painéis A e B (Figura 20) expressam a atividade da TR em *L. amazonensis* pela porcentagem e delta da DO em 410 nm, respectivamente. O extrato solúvel obtido do lisado celular foi incubado com a M2 e M6 e a atividade avaliada pelo método de Ellman. Os painéis C e D (Figura 20) expressam a atividade da TR em *L. infantum* pela porcentagem e delta da DO em 410 nm, respectivamente.

Estes resultados mostraram que essas substâncias não tem participação expressiva na via da TR (Figura 20).



**Figura 20:** Ação dos compostos **M2** e **M6** sobre a atividade enzimática da tripanotona redutase. Os painéis A e B expressam a atividade da TR em *L. amazonensis* pela porcentagem e delta da DO em 410 nm, respectivamente. Os painéis C e D expressam a atividade da TR em *L. infantum* pela porcentagem e delta da DO em 410 nm, respectivamente.

## 5 CONCLUSÕES

O estudo realizado com as CT mostrou resultados interessantes na importante ação dessas substâncias e como potenciais agentes antiparasitários frente a *Leishmania amazonensis*, *L. infantum* e *L. braziliensis*.

Dentre as substâncias estudadas, a **M6** (CT cloro-substituída) foi a mais ativa para as formas promastigotas de todas as espécies avaliadas.

Considerando os resultados obtidos para a *L. infantum* todas as substâncias investigadas mostraram atividade significativa, maior que a pentamidina usada como controle positivo e no tratamento clínico.

As substâncias estudadas mostraram-se promissoras para estudos mais detalhados visando novos agentes leishmanicidas, uma vez que apresentaram atividades muito significativas para as diversas formas dos parasitos estudados neste trabalho.

Os ensaios de citotoxicidade realizados, até o momento, mostraram que a substância **M6** é menos tóxica do que a pentamidina e, com maior índice de seletividade para as promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*.

Os mecanismos de ação investigados, a produção de óxido nítrico e a ação na enzima tripanotiona redutase, não foram indicados como de maior relevância para essas substâncias, necessitando-se da continuidade de estudos com outros possíveis alvos.

As CT foram avaliadas frente aos parasitos do gênero *Leishmania* pela primeira vez e, se mostraram importantes protótipos para o desenvolvimento de novos agentes para o tratamento das leishmanioses.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, J. E.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONESI, R. Doenças infecciosas e parasitárias, 8. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 706-17, 1991.
- ALIAGA, L. et al. Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: clinical and microbiologic findings in 31 patients. **Medicine** (Baltimore), n. 82, p. 147 –158, 2003.
- ALMEIDA, O.L.S.; SANTOS, J.B. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, n.3, v. 86, p. 497-506, 2011.
- ANTINORI, S.; CASCIO, A.; PARRAVICINI, C.; BIANCHI, R.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. **Lancet Infectious Diseases**, n. 8, p. 191-199, 2008.
- ARONSON, J.K., *Meyler's Side Effects of Drugs: the international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions*, **Elsevier.**, 15a ed, 2006.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, n. 30, p. 1269-1281, 2000.
- BASU, N.K., KOLE, L., GHOSH, A., DAS, P.K. Isolation of a nitric oxide synthase from the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **FEMS Microbiol. Lett**, v.1, n. 156, p. 43-47, 1997.
- BARBOSA, J.F.; FIGUEIREDO, S.M. DE; MONTEIRO, F.M.; ROCHA-SILVA, F. New Approaches on Leishmaniasis Treatment and Prevention: A Review of Recent Patents. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 9, p. 90–102, 2015.
- BARRAT, G.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; LOISEAU, P.M. Cellular Transport and Lipid Interactions of Miltefosine. **Current Drug Metabolism**, v. 10, n. 3, p. 247-255, 2009.
- BASSELIN, M.; BADET-DENISOT, M.A.; LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated, and pentamidine-resistant *Leishmania*. **Exp Parasitol**, v. 85, n. 3, p. 274-282, 1997.
- BERALDO, H.; GAMBINO, D.; The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.4, n.1, p. 31-39, 2004.
- BISUGO, M. C. *et al.* Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 185-193, 2007.
- BLANCO, V.M.; COSSIO, A.; MARTINEZ, J.D.; SARAVIA, N.G. Clinical and Epidemiologic Profile of Cutaneous Leishmaniasis in Colombian Children: Considerations for Local Treatment. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 89, p. 359-364, 2013.

BOECK, P.; FALCÃO, C.A.B.; LEAL, P.C.; YUNES, R.A.; FILHO, V.C.; TORRES-SANTOS, E.C.; ROSSI-BERGMANN, B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, n. 14, p. 1538–1545, 2006.

BRAZIL, R.P.; BRAZIL, B.G.; Rangel, E.F.; Lainson, R. Biologia de flebotômíneos neotropicais. **Flebotômíneos do Brasil**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 257-274, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da saúde, Secretaria de vigilância em saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose tegumentar americana**. Brasília-DF. p. 184, 2007.

BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C.J.; MCMASTER, W.R.; MCGWIRE, B.S.; CHANG, K.P.; MOSSER, D.M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **J Immunol**, v. 155, p. 3102-3111, 1995.

BURNS-JR, J. M.; SHREFFLER, W.G.; BENSON, D.R.; GHALIB, H.W.; BADARO, R.; REED, S.G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 2, p. 775–779, 1993.

CABREIRA, M.A.A. Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937) no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro-RJ: estudo de possíveis variáveis preditoras. 1999. Dissertação (Mestrado Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

CABRERA, M.M.; SIMOENS, G.; FALCHI, M.L.; LAVAGGI, O.E., PIRO, E.E.; CASTELLANO, A.; VIDAL, A.; AZQUETA, A.; MONGE, A.L.; DE CERÁIN, G.; SAGRERA, G.; SEOANE, H.; CERECETTO, M.; GONZÁLEZ. **Bioorg Med Chem**, n. 15, v. 10, p. 3356, 2007.

CARVALHO, E.M.; CORREA-FILHO, D.; BARCELAR, O.; ALMEIDA, R.P.; LESS, H.; ROCHA, H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 273-277, 1995.

CARVALHO, P.B.; ARRIBAS, M.A.G.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis: What do we know about its chemotherapy? **Braz J Pharm Sci**, v. 36, p. 69-96, 2000.

CASTRO-PINTO, D.B.; ECHEVARRIA, A.; GENESTRA, M. S; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L. L. Trypanothione reductase activity is prominent in metacyclic promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania amazonensis*. Evaluation of its potential as a therapeutic target. **J. Enz. Inhib. Med. Chem.**, n. 19, p. 57-63, 2004.

CASTRO-PINTO, D.B.; GENESTRA, M.; MENEZES, G.B.; WAGHABI, M.; GONCALVES, A.; DE NIGRIS DEL CISTIA, C.; SANT'ANNA, C.M.; LEON, L.L.; MENDONÇA-LIMA, L. Cloning and expression of trypanothione reductase from a New World *Leishmania* species. **Arch. Microbiol.**, v. 189, p. 375-384, 2008.

CHAKRABORTY, A.K.; MAJUMDER, H.K. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 152, n. 2, p. 605-11, 1988.

CHAN-BACAB, M.J.; PENA-RODRÍGUEZ, L.M. Plant natural products with leishmanial activity. **Royal Soc. Chem.**, n. 18, p. 674-688, 2001.

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

CHATTON, J.Y.; BROILLET, M.C. Detection of nitric oxide production by fluorescent indicators. **Methods Enzymol.**, 359, p. 134-48, 2002

CROFT, S.L.; COOMBS, G.H. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian J Med Res**, v. 123, n. 3, p. 399-410, 2006.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, AH. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin Microbiol. Ver**, v.19, n.1, p. 111, 2006.

CROFT, S.L., YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Curr Pharm**, v. 8, n. 4, p. 319-342, 2002.

CYSNE-FINKELSTEIN, L.; TEMPORAL, R.M.; ALVES, F.A.; LEON, L.L. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. **Exp Parasitol.**, v. 89, n.1, p. 58-62, 1998.

CUPOLILLO, E.; MEDINA-A.; COSTA, E.; NOYES, H.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G.Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, n. 16, p. 142-144, 2000.

DANESHBOD, Y.; ORYAN, A.; DAVARMANESH, M.; SHIRIAN, S.; NEGAHBAN, S.; ALEDAVOOD, A.; DAVARPANAH, M.A.; SOLEIMANPOOR, H.; DANESHBOD, K. Clinical, Histopathologic, and Cytologic Diagnosis of Mucosal Leishmaniasis and Literature Review. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, 135, p. 478-482, 2011.

DE BRITO M.E.; ANDRADE M.S.; DANTAS-TORRES, F.; RODRIGUES, E.H.; CAVALCANTI, M.P.; de ALMEIDA, A.M.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 45, n. 4, p. 425-429, 2012.

DESJEUX, P.; GHOSH, R.; DHALARIA, P.; STRUB-WOURGAFT, N.; ZIJLSTRA, E.E. Report of the Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) consortium meeting, New Delhi, India, June 2012. **Parasites & Vectors**, n. 6, p. 27-29, 2013.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol, Microbiol Infect Dis.**, n. 27, p. 305–318, 2004.

DETSI, A.; MAJDALANI, M.; KONTOGIORGIS, C. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; KEFALAS, P. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, n. 23, p. 8073-8085, 2009.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n.2, p. 88-95, 1961.

FAILLI, P.; NISTRI, S.; QUATTRONE, S.; MAZZETTI, L.; BIGAZZI, M.; SACCHI, T.B. et al. Relaxin up-regulates inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide generation in rat coronary endothelial cells. **FASEB J.**, n. 16, p. 252–254, 2002.

FEITOSA, M. M. *et al.* Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba- São Paulo (Brasil). **ClínVet.**, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FISCHER, D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, p. 382-390, 2005.

FRAGA, J.; VELAND, N.; MONTALVO, A.M.; PRAET, N.; BOGGILD, A.K.; VALENCIA, B.M.; ARÉVALO, J.; LLANOS-CUENTAS, A.; DUJARDIN, J.C.; VAN DER AUWERA, G. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 74, n. 2, p. 142-150, 2012.

FRANCO, M.A.; BARBOSA, A.C.; RATH, S.; DOREA, J.G. Antimony oxidation states in antileishmanial drugs. **Am J Trop Med Hyg**, n. 52, v. 5, p. 435-437, 1995.

FRÉZARD, F.; DEMICHELII, C.; RIBEIRO, R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, n. 14, p. 2317, 2009.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev bras epidemiol**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

GONTIJO, B; CARVALHO. M.L.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev Soc Brasil Medic Trop.**, n. 36, v.1, p. 71-80, 2003.

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. 419-43, 2010.

GOULART, C.M. **Síntese e Avaliação da Atividade Anticorrosiva de Tiossemicarbazonas, Chalconas-tiossemicarbazonas e 1-Tiocarbamoil-4,5-diidropirazóis.** 2015. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

GRIMALDI Jr., G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microb Rev.**, v. 6, p. 230–250, 1993.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, n. 126, p.131-138, 1982.

GUERRA, J.A.; PRESTES, S.R.; SILVEIRA, H.; COELHO, L.I.; GAMA, P.; MOURA, A.; AMATO, V.; BARBOSA, M. D.; FERREIRA, L.C. Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS Negl Trop Dis**; v. 5, n. 3, p. 980, 2011.

HAMILTON, C. J. *et al.* Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. **Biochem. J.**, v. 369, p. 529-537, 2003.

JHA, T.K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C.P.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISCHER, C.; VOSS, A.; BERMAN, J. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **N Engl J Med**, v. 341, n. 24, p. 1795-1800, 1999.

JOHNSTONE, A.; THORPE, R. *Immunochemistry in Practice*, Blackwell. **Scientific Publications**. 1982.

KUMAR, N.; CHAUHAN, A; DRABU, S. **Biomed. Pharmacother.** v. 65, n. 5, p. 375-380, 2011.

LUO, Y.; SONG, R.; LI, Y.; ZHANG, S.; LIU, Z.; FU, J.; ZHU, H. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 22, n. 9, p. 3039-3043, 2012

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis (*Espundia Escemel*,1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 859-876, 1986.

MARZOCHI, M.C.A.; TEIXEIRA, P.C.; MARZOCHI, K.B.F.; CONCEIÇÃO, N.F.; COUTINHO, W.; BRITO, D.B. Vacuum aspiratory puncture system for *Leishmania* culturing, isolation and transport. Preliminary report. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 35, p. 301-303, 1993.

MARZOCHI, M.C.A. Doenças infecto-parasitárias: Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **J Bras Med.**, v.63, p. 82-104, 1992.

MARZOCHI, M.C.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and for their control. **Cadernos de Saúde Pública** n. 10, v. 2, p. 359-375, 1994.

MELOS, J.L.R.; TORRES-SANTOS, E.C.; FAIÕES, V.S.; CATARINA DE NIGRIS DEL CISTIA, C.N.D.; SANT'ANNA, C.M.R.; RODRIGUES-SANTOS, C.E.; ECHEVARRIA, A.

Novel 3,4-methylenedioxyde-6-X-benzaldehyde-thiosemicarbazones: Synthesis and antileishmanial effects against *Leishmania amazonensis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. 103, p. 409 e 417, 2015.

MELLO, M.V.P. et al. A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 920-929, 2018.

MENDONÇA-FILHO, R.R.; RODRIGUES, I. A.; ALVIANO, D.S.; SANTOS, L.S.; SOARES, R.M.A.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.H.C.S.; ROSA, M.S.S. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nicifera* Linn. (Palmae). **Rev. Microbiol.**, v. 155, p.136-143, 2004.

MONDAL, R.; GUPTA, A. D.; MALLIK, A. K. **Tetrahedron Lett.**, v. 52, n. 39, p. 5020-5024, 2011.

MONZOTE, L.; STAMBERG, W.; PATEL, A.; ROSENAU, T.; MAES, L.; COS, P.; GILLE, L. Current Treatment of Leishmaniasis: A sand flies. **International Journal for Parasitology**, n. 37, p. 1097, 2007.

MORENO, S. N. J.; CARNIERI. E. G. S.; DOCAMPO, R. Inhibition of *Trypanossoma cruzi* trypanothione reductase by crystal violet. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 67, p. 313- 320, 1994.

MÜLLER, S.; LIEBAU, E.; ROLF, D.W.; KRAUTH-SIEGEL, R.L. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 7, p. 320-328, 2003.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, n. 366, p. 1561-1577, 2005

MYLER, P.J.; FASEL, N. Leishmaniasis: epidemiological Trends and Diagnosis. **Leishmania - After the genome**, p. 1-14, 2008.

HEBY, O.; PERSSON, L.; RENTALA, M. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. **Amino Acids**, v. 33, n. 2, p. 359-366, 2007.

NAGLE, A.S.; KHARE, S.; KUMAR, A.B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKYY, A.; MATHISON, C.J.N.; MOLTENI, V. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, n. 114, p. 11305, 2014.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, n. 6, p. 754-764, 2008.

NOGUEIRA, Y.L.; ODORIZZI, R.M.; NAKAMURA, P.M.A. Comparison of the immune parameters of dogs infected with visceral leishmaniasis using Western blot and neutralization techniques. **Rev Inst Med Trop.**, São Paulo, v. 49, n. 6, p. 379-384, 2007.

OLIVEIRA, L.F.; SCHUBACH, A.O.; MARTINS, M.M.; PASSOS, S.L.; OLIVEIRA, R.V.; MARZOCHI, M.C.; ANDRADE, C.A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, 118, p. 87-96, 2011.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD – Lucha contra las leishmaniasis. Ginebra, OMS, (**Série de Informes Técnicos**, 793) 178p.1990.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Temas de Salud- Leishmaniasis. 2012. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>> Acesso em: 24 mar de 2017.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE: Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2018. Disponível em [www.paho.org/leishmaniasis](http://www.paho.org/leishmaniasis)

ÖZDEMİR, A.; ALTINTOP, M.D.; TURAN-ZITOUNI, G.; ÇİFTÇİ, G.A.; ERTORUN, I.; ALATAS, Ö.; KAPLANCIÇLI, Z.A. Synthesis and Evaluation of New Indole-Based Chalcones as Potential Antiinflammatory Agents, **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. 89, p. 304, 2015.

PALATNICK DE SOUSA, C.B. *et al.* Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil-Médico**, v. 48, p. 949-950, 1934.

PESSOA, S.B. **Parasitologia Médica**. 11. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.

PIMENTEL, M.I.F.; BAPTISTA, C.; RUBIN, E.F.; VASCONCELLOS, E.F.; LYRA, M.R.; SALGUEIRO, M.M. American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* resistant to meglumine antimoniate, but with good response to pentamidine: a case report. **Rev Soc Bras Med Trop.**, n. 44, p. 254, 2011.

PISCOPO, T.V.; MALLIA, A.C. Leishmaniasis. **Postgrad Med J**, v. 82, n. 972, p.649-657, 2006.

POCAI, E.A. *et al.* Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciênc Rural**, v. 28, n. 3, p. 501-505, 1998.

RANI, M.; YUSUF, M; KHAN, S. **J. Saudi Chem. Soc.**, n. 16, p. 431, 2012.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**, 2ª ed. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 349, 2001.

RIGOL, C.; OLEA-AZAR, C.; MENDIZÉBAL, F.; OTERO, L.; AMBINO, D.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs. **Spectrochimica Acta**, Part A., v. 61, n. 13-14, p. 2933-2938, 2005.

SANTOS, D.O.; COUTINHO, C.E.R.; MADEIRA, M.F.; BOTTINO, C.G.; VIEIRA, R.T.; NASCIMENTO, S.B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S.C.; CORTE-REAL, S.; Pinho, R.T.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. Leishmaniasis treatment-a challenge that remains: a review. **Parasitol. Res.**, v. 103, p. 1–10, 2008.

SANTOS, M. et al. Riboflavin biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning, characterization, and expression of the RIB5 gene encoding riboflavin synthase. **J Biol Chem**, v. 270, n. 1, p. 437-44, 1995.

SANTOS, S.O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, n. 2, p. 315-317, 1998.

SCARIM, C.B. et al. Thiazole, thio and semicarbazone derivatives against tropical infective diseases: Chagas disease, human African trypanosomiasis (HAT), leishmaniasis, and malaria. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. 162, p. 378-395, 2019.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 577-579, 2006.

SILVA, A.C. et al. Aryl thiosemicarbazones: in vitro and immunomodulatory activities against *L. amazonensis*. **Exp. Parasitol.**, n. 177, p. 57-65, 2017.

SILVA, F.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **J Inf Chemother**, v. 10, n. 6, p. 307-315, 2004.

SisLeish-OPAS/OMS: Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Serviços de Vigilância. Acesso em: 01 de Dezembro de 2017.

SOARES, R.O.A.; ECHEVARRIA, A.; BELLINENY, M.S.S.; PINHO, R.T.; DE LEO, R.M.M.; SEGUINS, W.S.; MACHADO, G.M.; CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; LEON, L.L. Evaluation of thiosemicarbazones and semicarbazones as potential agents anti-*Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, n. 129, p. 381-387, 2011.

STRAZZULLA, A.; COCUZZA, S.; PINZONE, M. R.; POSTORINO, M.C.; COSENTINO, S.; SERRA, A.; CACOPARDO, B.; NUNNARI, G. Mucosal Leishmaniasis: An Underestimated Presentation of a Neglected Disease. **Biomed Research International**, 2013.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GURTLER, R.E.; McKERROW, J., REED, S.; TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**; v. 118, n. 4, p. 1301-1310, 2008.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Investig Drugs*, v. 17, n. 5, p. 787-794, 2008.

TAJUDDEEN, N.; ISAH M.B.; SULEIMAN M.A.; van HEERDEN F.R.; IBRAHIM M.A. The chemotherapeutic potential of chalcones against leishmaniasis: a review. **Int J Antimicrob Agents.**, n. 51, v. 3, p. 311-318, 2018.

TEMPONE, A.G.; BORBOREMA, S.E.T.; ANDRADE Jr, H.F.; GUALDA, N.C.A.; YOGI, A.; CRAVALHO, C.S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; FISCHER, D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids-producing families. **Phytomedicine**, v.12, p. 382-390, 2005.



Tuon, F.F.; Amato, V.S.; Graf, M.E.; Siqueira, A.M.; Nicodemo, A.C.; Neto, V.A. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis – a systematic review with a meta-analysis. **Int J Dermatol**, v. 4, n. 2, p. 109-124, 2008.

van GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 309, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Temas de Salud- Leishmaniasis. 2012. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>> Acesso em: 24 mar de 2017.

World Health Organization (WHO) 2013. <http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-image-library?idNumber=00061046>. Acessado em 30 de julho de 2017.

World Health Organization 2010 (OMS/WHO). <http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-image-library?idNumber=00061043>. Acessado em 5 de Agosto de 2017.

World Health Organization (WHO), 2015. 1-164p.

WHO 2010a. Technical Report Series. Control of the leishmaniasis. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf). Acesso em 10 de fevereiro de 2017.

WHO 2010b. World Health Organization. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Disponível em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/2010report/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/). Acesso em 20 de novembro de 2017.

WHO 2012. Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases. Treatment recommendation for leishmaniasis. Disponível em: [http://www.who.int/leishmaniasis/research/978924129496\\_pp67\\_71.pdf?ua=1](http://www.who.int/leishmaniasis/research/978924129496_pp67_71.pdf?ua=1). Acesso em 20 de abril de 2017.

WHO - World Health Organization, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (14 de março de 2019).

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M.L.; FAIRLAMB, A.H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **J Biol Chem**, v. 279, n. 38, p. 39925-39932, 2004.

ZAVERUCHA, T.V. **Vacinação murina com frações subcelulares de *Leishmania amazonensis* sob modulação de *Mycobacterium bovis* BCG e ciclofosfamida**. 2005. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

## 7 ANEXOS

### Anexo A – Artigo submetido para a revista “Chemical Biology & Drug Design”

#### Chalcone-thiosemicarbazones: As novel potential anti-*Leishmania amazonensis* agents

Edinéa Pastro Mendes<sup>a,b</sup>, Carla Marins Goulart<sup>a</sup>, Viviane dos S. Faiões<sup>c</sup>, Marilene M. Canto-Cavalheiro<sup>c</sup>, Gerzia C. Machado<sup>c</sup>, Eduardo Caio Torres-Santos<sup>c\*</sup>, and Aurea Echevarria<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23.890-000 Seropédica, RJ, Brazil*

<sup>b</sup>*Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 23890-000, RJ, Brazil*

<sup>c</sup>*Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 21040-900, Brazil*

\*Corresponding authors. Tel/fax: 55-21-26861872, and Tel/fax: (55) 21 3865-8247

E-mail address: [echevarr@ufrj.br](mailto:echevarr@ufrj.br) (A. Echevarria); [ects@ioc.fiocruz.br](mailto:ects@ioc.fiocruz.br) (E.C. Torres-Santos)

#### ABSTRACT

A series of seven chalcone-thiosemicarbazones (**5a–5g**) were synthesised as part of a study to search for potential new drugs with anti-leishmanial effects. Although four of the chalcone-thiosemicarbazones are already known, none of them or any compound in this class has been previously investigated for their effects on parasites of the *Leishmania* genus. The compounds were prepared in satisfactory yields (40–75%) by using a mixture of previously synthesized substituted chalcones and thiosemicarbazide and a few drops of concentrated HCl and ethanol as solvents during reflux. These compounds were evaluated against promastigotes, axenic amastigotes and intracellular amastigotes of *L. amazonensis* after 48 h of culture. The IC<sub>50</sub> values of the intracellular amastigotes were determined to be in the range of 3.40 to 5.95 μM for all compounds assayed. The murine macrophage cytotoxicity revealed LD<sub>50</sub> in the concentration of 32.48 to 56.35 μM, and the pentamidine, used as a positive control, had an LD<sub>50</sub> = 25.85 ± 4.06 μM. The selectivity index showed values of 7.27 and 15.05 for **5a** and **5b**, respectively, whereas pentamidine was found to be more toxic in our model (SI = 2.32). Furthermore, to understand the preliminary relationship between the anti-leishmanial activity of the chalcone-thiosemicarbazones, their electronic (σ), steric (MR) and lipophilicity (π)

properties were correlated, and the results indicate that moieties with electronic withdrawing effects increase the anti-leishmanial activity. The results of antiparasitic effects against *L. amazonensis* revealed the chalcone-thiosemicarbazone class to be novel prototypes for drug development against leishmaniasis.

*Keywords:* *Leishmania amazonensis*; Promastigotes; Intracellular amastigotes; Chalcone-thiosemicarbazones

## 1. Introduction

Leishmaniasis is an infectious disease caused by protozoan parasites from among more than 20 *Leishmania* species. These parasites are transmitted to humans by the bite of female sand flies. There are three principal forms of the disease: cutaneous, mucocutaneous and visceral. This disease is prevalent in 98 countries on 5 continents and is estimated to cause 700,000 to 1 million new cases and 20,000 to 30,000 deaths annually [1].

The chemotherapeutic treatments for leishmaniasis are still unsatisfactory due to their limited effectiveness, long timeline of treatment, high cost and severe secondary effects [2,3]. The first-choice treatment involves the use of pentavalent antimonials (SbV) such as sodium stibogluconate (Pentostam®) and meglumine antimoniate (Glucantime®) [4]. The second choice includes pentamidine and amphotericin B, which are highly toxic and cause serious side effects [5,6]. More recently, the oral drug miltefosine has been used for the treatment of visceral leishmaniasis, but it presents a high cost and a low therapeutic ratio and, in addition, has mild-to-severe gastrointestinal side effects and teratogenicity [7].

Thus, since the chemotherapy is still inefficient, there is an urgent need for the development of new and more effective and safe drugs for the treatment of the leishmaniasis. Currently, our research group has been developing new compounds based on natural products, such as chalcones and their derivatives.

Chalcones are an important class of natural products with widespread biological activities [8-11]. This molecular class is present in several vegetal species, and its synthesis is easy, representing a great opportunity to generate several new derivatives. Chalcones have the ability to coordinate metals and exhibit a diversified range of biological activities such as antiparasitic [8,9], anticancer [10] and antioxidant activity [11], among others. The thiosemicarbazones derivatives also present interesting structural properties due to their several pharmacological effects such as antiparasitic [12-14], antimicrobial [15,16], and anticancer activities [17,18].

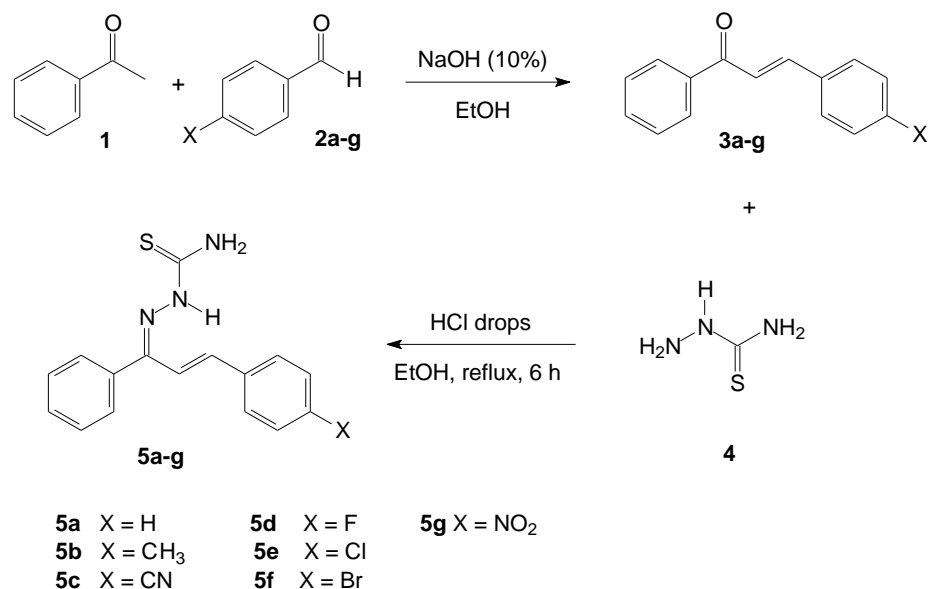
The molecular composition from hybridizing chalcones and thiosemicarbazones may result in new and interesting molecules with favourable biological activities. In the last few years, some chalcone-thiosemicarbazones have been reported with promising biological activities such as anticancer [19] and anti-tyrosinase activities [20]. Furthermore, several metal complexes of chalcone-thiosemicarbazones with biological activity have also been reported [21,22].

Thus, in the present work, a series of seven chalcone-thiosemicarbazones were synthesized, 1-phenyl-3-(4-X-phenyl)-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazones, where X=H (**5a**), CH<sub>3</sub> (**5b**), CN (**5c**), F (**5d**), Br (**5e**), Cl (**5f**) and NO<sub>2</sub> (**5g**), and they were then evaluated for their activity against promastigotes, axenic and intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis*.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Synthesis of chalcone-thiosemicarbazones

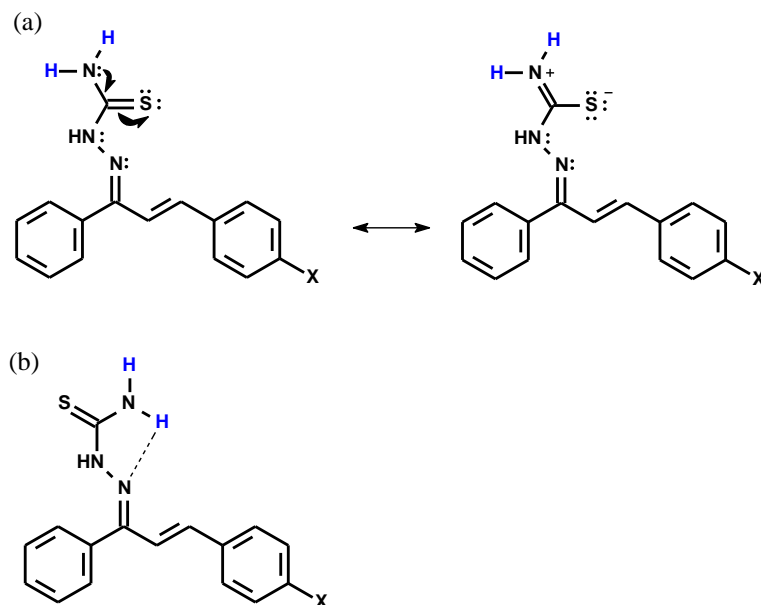
A series of seven 1-phenyl-3-(4-X-phenyl)-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazones (**5a-g**) were prepared using an adapted pathway [23] involving substituted chalcones (**3a-g**) and thiosemicarbazide (**4**). The substituted chalcones were prepared by a traditional Claisen-Schmidt condensation reaction [24] using acetophenone (**1**) and X-benzaldehydes (**2a-g**) in the presence of NaOH and ethanol as the solvent and purified from ethanol in good yields (75–93%). Then, the chalcone-thiosemicarbazones were obtained from a mixture of previously synthesized substituted chalcones and thiosemicarbazide using a few drops of concentrated HCl and ethanol as a solvent at the reflux temperature within 6 h (Scheme 1). The products were purified by recrystallization from ethanol in reasonable yields (40-75%).



**Scheme 1.** Synthetic route of chalcone-thiosemicarbazones.

The infrared spectra of the chalcone-thiosemicarbazones showed the disappearance of the carbonyl band ( $\nu$  C=O) at approximately  $1640\text{ cm}^{-1}$  of the precursor chalcones [25] and the new band ( $\nu$  C=N) at  $1585\text{--}1598\text{ cm}^{-1}$  resulting from imine evidence in accordance with the literature [22]. Additionally, the  $\nu$  C=S absorption was observed in the range of  $1126\text{--}1131\text{ cm}^{-1}$ .

The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shift values were used to characterize the proposed structures of **5a–g** (the spectra are shown in the Supplementary data). The chemical shift values of  $\text{NH}_2$  were absorbed as two singlets in the range of  $\delta$  8.50–8.72 due to the resonance effect from the thiocarbamoyl moiety, and the hydrogen bond between one of the hydrogens to a sulphur atom led to diastereotopic hydrogens, as indicated in Scheme 2 (a) and (b), respectively. On the other hand, the resonance effect caused by electron acceptor groups in the aromatic ring caused a more upfield absorption in the range of  $\delta$  8.12–8.19 as a singlet to HN.



**Scheme 2.** Effects involving the hydrogens  $\text{H}_2\text{N}$ : (a) resonance effect with thiocarbamoyl group; (b) intramolecular hydrogen bond between the hydrogen and azomethine nitrogen.

The  $^{13}\text{C}$  NMR spectra showed the chemical shifts in the typical range of  $\delta 178.3\text{--}179.5$  assigned to  $\text{C}=\text{S}$ . The chemical shifts of  $\text{C}=\text{N}$  were observed at  $\delta 147.5\text{--}150.7$  due the resonance effect with a conjugated double bond enhancing the electronic density of this carbon atom. The other carbon atoms showed chemical shift values as expected.

## 2.2. Anti-leishmanial effects

The treatment of the parasites with the chalcone-thiosemicarbazones **5a-g** against *L. amazonensis* promastigotes resulted in a dose-dependent response after 48 h of culture. The values of 50% of growth inhibitory activity was assessed by the MTT method [26], and the values were obtained by a sigmoidal curve, relating the percentage of growth inhibition and the log of drug concentration in  $\mu\text{M}$ , as shown in Table 1. The results revealed a good inhibitory effect, with the exception of **5c** and **5g** that showed no significant activity. The most active compound, **5e**, showed an  $\text{IC}_{50}$  value of  $5.22 \pm 0.75 \mu\text{M}$ , and the positive control pentamidine had an  $\text{IC}_{50}$  value of  $4.90 \pm 0.60 \mu\text{M}$ .

The assays with axenic amastigotes of *L. amazonensis* were performed with **5a**, **5b**, **5d**, **5e** and **5f** over 72 h of culture. The results showed good growth inhibitory effects for all assayed compounds with  $\text{IC}_{50}$  in the range of 3.19 to 7.08  $\mu\text{M}$ , with the chalcone-thiosemicarbazone

chloro-substituted (**5e**) the most active compound. On the other hand, pentamidine showed  $IC_{50} = 12.29 \pm 1.17 \mu\text{M}$ .

**Table 1**

In vitro anti-leishmanial activity of chalcone-thiosemicarbazones against promastigotes, axenic amastigotes, and intracellular amastigotes of *L. amazonensis* after 48 h of culture, and their macrophage cytotoxicity and selectivity index.

Compound	Promastigotes $IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Axenic amastigotes $IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Intracellular amastigotes $IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Macrophages $LD_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Selectivity index (SI)
<b>5a</b>	$14.68 \pm 0.31$	$6.88 \pm 1.09$	$3.40 \pm 0.28$	$40.98 \pm 1.12$	15.05
<b>5b</b>	$14.80 \pm 1.92$	$7.08 \pm 1.03$	$5.95 \pm 0.61$	$56.35 \pm 0.78$	9.47
<b>5c</b>	n.a. <sup>a</sup>	n.d. <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	-
<b>5d</b>	$13.09 \pm 1.85$	$5.57 \pm 1.15$	> 3.13	$35.47 \pm 1.38$	-
<b>5e</b>	$5.22 \pm 0.75$	$3.19 \pm 1.20$	$4.47 \pm 0.42$	$32.48 \pm 1.81$	7.27
<b>5f</b>	$12.52 \pm 0.99$	$4.24 \pm 1.07$	$3.88 \pm 0.24$	$44.24 \pm 4.21$	11.40
<b>5g</b>	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	-
pentamidine	$4.90 \pm 0.60$	$12.29 \pm 1.17$	$11.12 \pm 1.98$	$25.85 \pm 4.06$	2.32

<sup>a</sup> n.a.: no active; <sup>b</sup> n.d.: not determined.

Thus, after these promising results were obtained against promastigotes and axenic amastigotes of *L. amazonensis*, their cytotoxicity and their activity against intracellular amastigotes were evaluated for **5a**, **5b**, **5d**, **5e** and **5f**. The cytotoxic effects were assessed using murine peritoneal macrophages after 48 h of culture. The pentamidine, used as a positive control, was also assayed using the same conditions. The macrophages in the presence of the chalcone-thiosemicarbazones showed  $LD_{50}$  in the range of 32.48 to 56.35  $\mu\text{M}$ , and the pentamidine with  $LD_{50} = 25.85 \pm 4.06 \mu\text{M}$ .

The treatment of *L. amazonensis*-infected macrophages with **5a**, **5b**, **5d**, **5e** and **5f** after 48 h of culture reduced the infection with  $IC_{50}$  in the range of 3.40 to 5.95  $\mu\text{M}$ , as shown in Table 1, whereas the reduction was 11.12  $\mu\text{M}$  for pentamidine.

Thus, the selectivity index ( $SI = LD_{50}/IC_{50}$  intracellular amastigotes) showed values in the range of 7.27 and 15.05, whereas pentamidine was found to be more toxic in our model ( $SI = 2.32$ ). It is important to highlight that some guidelines suggest an SI higher than 10 and

IC<sub>50</sub> against intracellular amastigotes below 10 μM as thresholds for an anti-leishmanial hit before proceeding with further studies [27,28]. The chalcone-thiosemicarbazones **5a** and **5f** met both criteria.

It is interesting that the growth inhibitory effects of chalcone-thiosemicarbazones against *L. amazonensis* axenic and intracellular amastigotes were observed in the same numerical range with lower values when compared to pentamidine but also with a lower toxicity, so, consequently, it can be considered to be safer.

To understand which parameters are involved in the antileishmanial activity of the chalcone-thiosemicarbazones, their electronic ( $\sigma$ ) [29], steric (MR) and lipophilicity ( $\pi$ ) properties [30] (see Table 2) were correlated with log IC<sub>50</sub> or 1/IC<sub>50</sub> values of *L. amazonensis* axenic amastigotes by linear regression models. After analysis, we observed that the best correlation was with the electronic parameter (Hammett constant,  $\sigma_p$ ) in the polynomial model with  $R^2 = 0.9998$ , SD = 0.0033 (standard deviation), n = 5 and p = 0.00024. Thus, this result indicates that moieties with electronic withdrawing effects increase their anti-leishmanial activity.

**Table 2**

Electronic, steric and lipophilic parameters: Hammett constant ( $\sigma_p$ ), Taft constant (Es), molecular refractivity (MR), and Hansh constant ( $\pi_m$ ).

Compound	4-X	$\sigma_p^a$	Es <sup>b</sup>	MR <sup>b</sup>	$\pi^b$
<b>5a</b>	H	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>5b</b>	CH <sub>3</sub>	-0.14	-0.25	0.57	0.56
<b>5c</b>	CN	0.71	-0.51	0.63	-0.57
<b>5d</b>	F	0.15	-0.46	0.10	0.14
<b>5e</b>	Cl	0.34	-0.97	0.60	0.71
<b>5f</b>	Br	0.26	-1.16	0.89	0.86
<b>5g</b>	NO <sub>2</sub>	0.81	-1.01	0.74	-0.28

<sup>a</sup> [29]; <sup>b</sup> [30].

### 3. Conclusions

In conclusion, a new series of chalcone-thiosemicarbazones were prepared in reasonable yields. All compounds tested against intracellular amastigotes of *L. amazonensis* were more



potent and selective than pentamidine, the reference drug. The molecules **5a** and **5f** had a selectivity index higher than 10 and an IC<sub>50</sub> below 10 μM, showing that they are promising anti-leishmanial hits. The results of the study of their antiparasitic effects against *L. amazonensis* revealed the chalcone-thiosemicarbazone class are novel prototypes for drug development against leishmaniasis.

## 4. Material and methods

### 4.1. Chemistry

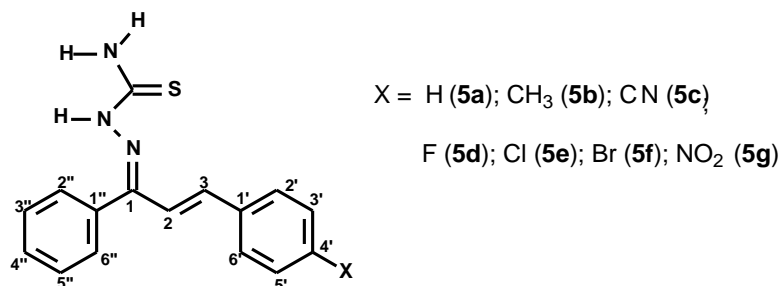
All reagents and solvents were purchased from commercial sources and used without further purification. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were obtained using a Bruker NMR Ultrashield 400 MHz spectrometer with tetramethylsilane as the internal reference and DMSO-d<sub>6</sub> as the solvent; the chemical shifts are reported in ppm. The IR spectra were recorded on a Bruker Vertex 70 spectrometer using KBr tablets. Elemental analyses were performed on a PerkinElmer 2400 CHN in the Laboratory of Environmental Science in the State University of Northern Rio de Janeiro (UENF). The melting points were recorded on a Gehaka (PF 1500 Farma) capillary melting points apparatus and are uncorrected. Reactions were monitored by TLC on Merck silica gel 60 F245 aluminium sheets. TLC spots were visualized by inspection of the plates under UV light (254 and 365 nm).

#### 4.1.1. (2E)-3-(4-X-phenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one (**3a-g**)

These compounds were prepared and characterized according to the literature reported [24,31].

#### 4.1.2. General procedure for the preparation of the (1E,2E)-3-(4-X-phenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one thiosemicarbazones (**5a-g**)

A mixture of chalcones (**3a-g**) (2 mmol) and thiosemicarbazide (**4**) (2.4 mmol) in hot ethanol (50 mL) had a few drops of concentrated hydrochloric acid added. The reaction mixture was stirred at reflux temperature for 2–6 h, and monitored by TLC using hexane:ethyl acetate (8:2) as the eluent. Afterwards, the precipitate was filtered off and the crude product purified by recrystallization from ethanol resulted in the target compounds (**5a-g**).



4.1.2.1. *(1E,2E)*-3-(phenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (**5a**). Pale yellow amorphous solid; yield 82%; m.p. 133-135 °C (135-137 °C, [32]). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3469, 3287, 3187 and 3140 (N-H), 3036 (C-H), 1585 (C=N), 1498 and 1444 (C=C), 1128 (C=S), 968 (C=C *trans*-substituted). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.65 and 8.50 (2H, 2s, NH<sub>2</sub>), 8.16 (1H, s, NH), 7.67-7.60 (3H, m, H-3'', H-4'' and H-5''), 7.47-7.46 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H-2'' and H-6''), 7.38-7.29 (5H, m, H-2', H-3', H-4', H-5' and H-6'), 7.20-7.17 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-3), 6.45-6.42 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-2). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 179.3 (C=S), 148.6 (C=N), 140.1 (C-3), 137.3 (C-1''), 136.2 (C-1'), 130.2 (C-4''), 129.7 (C-2'' and C-6''), 129.1 (C-2' and C-6'), 128.7 (C-3' and C-5''), 128.4 (C-3'' and C-5''), 127.3 (C-4'), 119.2 (C-2).

4.1.2.2. *(1E,2E)*-3-(4'-methylphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (**5b**). Yellow amorphous solid; yield 51%; m.p. 138-140 °C (145 °C, [32]). IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3408, 3341, 3233 and 3143 (N-H), 3037 (C-H), 1598 (C=N), 1477 and 1440 (C=C), 1126 (C=S), 966 (C=C *trans*-substituted). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 11.08 and 8.10 (1H, s, NH), 8.59 and 8.44 (2H, 2s, NH<sub>2</sub>), 7.67-7.62 (3H, m, H-3'', H-4'' and H-5''), 7.37-7.34 (2H, dd, *J* = 7.5 and 1.5 Hz, H-2'' and H-6''), 7.23-7.22 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-2' and H-6'), 7.18-7.17 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-3' and H-5'), 7.14-7.10 (1H, d, *J* = 16.4 Hz, H-3), 6.42-6.39 (1H, d, *J* = 16.4 Hz, H-2), 2.30 (3H, s, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 179.3 (C=S), 148.9 (C=N), 140.1 (C-3), 139.6 (C-1'), 137.4 (C-1''), 133.6 (C-4'), 129.7 (C-2'' and C-6''), 129.5 (C-2' and C-6'), 128.7 (C-3'' and C-5''), 128.4 (C-3' and C-5'), 127.3 (C-4'), 118.1 (C-2), 21.5 (CH<sub>3</sub>).

4.1.2.3. *(1E,2E)*-3-(4'-cyanophenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (**5c**). Pale yellow amorphous solid; yield 75%; m.p. 195-196 °C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3422, 3341, 3246 and 3146 (N-H), 3040 (C-H), 2233 (C≡N), 1599 (C=N), 1549 and 1476 (C=C), 1131 (C=S), 951 (C=C *trans*-substituted). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.72 and 8.67 (2H, 2s, NH<sub>2</sub>), 8.19 (1H, s, NH), 7.83-7.81 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3' and H-5'), 7.70-7.68 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2' and H-6'), 7.67-7.62 (3H, m, H-3'', H-4'' and H-5''), 7.38-7.36 (2H, dd, *J* = 7.3 and 1.7 Hz, H-2'' and H-6''), 7.35-7.31 (1H, d, *J* = 16.5 Hz, H-3), 6.56-6.52 (1H, d, *J* = 16.5 Hz, H-2). <sup>13</sup>C NMR

(DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 178.4 (C=S), 150.1 (C=N), 140.9 (C-1'), 134.7 (C-3), 133.2 (C-3' and C-5'), 132.3 (C-2), 130.5 (C-4''), 130.5 (C-1''), 130.3 (C-2'' and C-6''), 128.7 (C-3'' and C-5''), 128.0 (C-2' and C-6'), 119.2 (CN), 111.0 (C-4'). Anal. Calcd. for  $C_{17}H_{14}N_4S$ : C, 66.64, H, 4.61, N, 18.29. Found: C, 66.68, H, 4.57, N, 18.32.

4.1.2.4. *(1E,2E)-3-(4'-fluorophenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (5d)*. Yellow amorphous solid; yield 37%; m.p. 152-154 °C (without m.p., [33]). IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3413, 3342, 3256 and 3154 (N-H), 3043 (C-H), 1598 (C=N), 1476 and 1443 (C=C), 1229 (C-F), 1127 (C=S), 967 (C=C *trans*-substituted).  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.63 and 8.50 (2H, 2s,  $NH_2$ ), 8.12 (1H, s, NH), 7.68-7.62 (3H, m, H-3'', H-4'' and H-5''), 7.57-7.53 (2H, dd,  $J = 8.8$  and 3.2 Hz, H-2' and H-6'), 7.37-7.34 (2H, dd,  $J = 8.1$  and 1.5 Hz, H-2'' and H-6''), 7.23-7.18 (2H, t,  $J = 8.8$  Hz, H-3' and H-5'), 7.15-7.11 (1H, d,  $J = 16.4$  Hz, H-3), 6.48-6.44 (1H, d,  $J = 16.4$  Hz, H-2).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 179.3 (C=S), 164.1 and 162.1 (1C, d,  $^1J = 248.0$  Hz, C-4'), 148.4 (C=N), 138.8 (C-3), 137.2 (C-1''), 132.9 and 132.9 (1C, d,  $^4J = 2.5$  Hz, C-1'), 130.6 and 130.5 (2C, d,  $^3J = 8.5$  Hz, C-2' and C-6'), 129.7 (C-2'' and C-6''), 129.5 (C-4''), 128.7 (C-3'' and C-5''), 119.0 (C-2), 116.1 and 115.9 (2C, d,  $^1J = 21.5$  Hz, C-3' and C-5'). Anal. Calcd. for  $C_{16}H_{14}FN_3S$ : C, 64.19, H, 4.71, N, 10.04. Found: C, 64.25, H, 4.68, N, 10.09.

4.1.2.5. *(1E,2E)-3-(4'-chlorophenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (5e)*. Pale yellow amorphous solid; yield 57%; m.p. 163-164 °C (164-166 °C, [34]). IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3413, 3341, 3256 and 3154 (N-H), 3043 (C-H), 1598 (C=N), 1476 and 1441 (C=C), 1127 (C=S), 1093 (C-Cl), 968 (C=C *trans*-substituted).  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.63 and 8.53 (2H, 2s,  $NH_2$ ), 8.12 (1H, s, NH), 7.67-7.60 (3H, m, H-3'', H-4'' and H-5''), 7.52-7.50 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2' and H-6'), 7.42-7.41 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-3' and H-5'), 7.37-7.35 (2H, dd,  $J = 6.9$  and 1.0 Hz, H-2'' and H-6''), 7.20-7.16 (1H, d,  $J = 16.4$  Hz, H-3), 6.47-6.44 (1H, d,  $J = 16.4$  Hz, H-2).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 178.3 (C=S), 150.7 (C=N), 135.5 (C-3), 135.2 (C-1''), 133.6 (C-1'), 130.6 (C-4'), 130.5 (C-4''), 130.2 (C-2'' and C-6''), 129.6 (C-2), 129.3 (C-2' and C-6'), 129.0 (C-3' and C-5'), 128.7 (C-3'' and C-5'').

4.1.2.6. *(1E,2E)-3-(4'-bromophenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (5f)*. Pale yellow amorphous solid; yield 43%; m.p. 166-168 °C (without m.p., [33]). IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3414, 3341, 3256 and 3154 (N-H), 3043 (C-H), 1598 (C=N), 1476 and 1441 (C=C), 1127 (C=S), 1072 (C-Br), 969 (C=C *trans*-substituted).  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.65 and 8.54 (2H, 2s,  $NH_2$ ), 8.15 (1H, s, NH), 7.68-7.62 (3H, m, H-3'', H-4'' and H-5''), 7.57-7.55 (2H, d,  $J =$

8.5 Hz, H-2' and H-6'), 7.46-7.44 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-3' and H-5'), 7.37-7.35 (2H, dd,  $J = 7.0$  and  $1.5$  Hz, H-2'' and H-6''), 7.22-7.18 (1H, d,  $J = 16.5$  Hz, H-3), 6.46-6.41 (1H, d,  $J = 16.5$  Hz, H-2).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 178.3 (C=S), 150.7 (C=N), 135.5 (C-3), 135.5 (C-1''), 132.3 (C-3' and C-5'), 130.6 (C-1'), 130.5 (C-4''), 130.2 (C-2'' and C-6''), 129.6 (C-2), 129.3 (C-2' and C-6'), 128.7 (C-3'' and C-5''), 122.3 (C-4'). Anal. Calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{BrN}_3\text{S}$ : C, 53.34, H, 3.92, N, 11.66. Found: C, 53.39, H, 3.88, N, 11.72.

4.1.2.7. (1E,2E)-3-(4'-nitrophenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (**5g**). Orange amorphous solid; yield 66%; m.p. 188-190 °C (184-186 °C, [34]). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3482, 3337, 3249 and 3152 (N-H), 3057 (C-H), 1594 (C=N), 1512 and 1471 (C=C), 1341 (N=O), 1131 (C=S), 966 (C=C *trans*-substituted).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.70 and 8.69 (2H, 2s,  $\text{NH}_2$ ), 8.20-8.19 (3H, m, NH, H-3' and H-5'), 7.76-7.64 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2' and H-6'), 7.68-7.61 (3H, m, H-3'', H-4'' and H-5''), 7.38-7.35 (3H, m, H-3, H-2'' and H-6''), 6.61-6.58 (1H, d,  $J = 16.4$  Hz, H-2).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 179.5 (C=S), 147.7 (C-4'), 147.5 (C=N), 143.1 (C-1'), 137.3 (C-3), 136.9 (C-1''), 129.7 (C-2'' and C-6''), 129.4 (C-3'' and C-5''), 128.8 (C-2' and C-6'), 128.3 (C-4''), 124.2 (C-3' and C-5'), 123.4 (C-2).

## 4.2. Biologic assays

### 4.2.1. Chemicals

The chalcone-thiosemicarbazones (**5a-g**) were solubilized in dimethylsulphoxide (DMSO; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) to obtain a stock solution of 10 mM.

### 4.2.2. Parasite cultures

A strain of *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016), characterized by molecular and immunological techniques [35], was maintained by periodic subculture. Parasites isolated from infected mice were maintained as promastigotes through weekly passages in Schneider's medium (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated foetal calf serum, penicillin (100 UI/mL), and streptomycin (100  $\mu\text{M}$ ) at 26 °C. Parasites were maintained until the 10th passage; subsequently, new cultures were obtained from infected animals. The Animal Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation (license number LW07/2010) approved this study.

#### 4.2.3. Promastigote assays

Briefly, 4 days before the experiment, the parasites were transferred to Schneider's medium (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with heat-inactivated foetal calf serum 10% (v/v) and 2 mM L-glutamine, in a B.O.D. incubator (Logen Scientific, São Paulo, SP, Brazil) at 25 °C. The promastigotes ( $1 \times 10^6$  promastigotes/mL) were incubated with chalcones diluted in culture medium (0.032% v/v DMSO in the first well at the highest concentration tested) and diluted in series at a ratio of two, starting from  $\frac{1}{2}$ , on a 96-well cell culture plate (TPP™ test plate, Switzerland).

The compounds were tested in concentrations from 50 to 1.56  $\mu$ M for all chalcone-thiosemicarbazones (**5a–g**) and for pentamidine. The concentration of DMSO used had no effect on the parasites. Then, the parasites (100  $\mu$ L) were added. The plates were incubated for 24 h at 25 °C. All compounds were analysed in at least three experiments performed in triplicate. Pentamidine isethionate was used as the reference drug and diluted in the same concentrations used for **5a–g**.

The anti-leishmanial activity was evaluated by adding 22  $\mu$ L of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] at 5 mg/mL (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) to each well. After 2 h, 80  $\mu$ L of DMSO was added and the optical density was determined at a wavelength of 570 nm in a microplate reader ( $\mu$ Quant Bio-Tek Instruments®, Winooski). The assays were carried out in triplicate in 96-well plates (Costar, New York, USA). The inhibition percentage was estimated by the comparison with the non-treated control. The values for the inhibitory concentration for 50% of the promastigotes ( $IC_{50}$ ) were calculated by a sigmoidal model.

#### 4.2.4. Macrophage cytotoxicity

Adherent mouse peritoneal macrophages were cultured in RPMI 1640 medium at pH 7.2 (Gibco, New York, NY, USA) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated foetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 0.1 mg/mL of streptomycin and were distributed in culture dishes ( $1 \times 10^6$  macrophages/well) in triplicate in 96-well plates (Falcon Co, Franklin Lakes, USA) and incubated for 1 h in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere incubator at 37 °C. The supernatant was removed, and the compounds were added to the plate at concentrations from 10  $\mu$ M to 50  $\mu$ M. Next, the cultures were incubated for 48 h in a CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. After incubation, the supernatant was removed and to each well a solution was added containing 0.85% saline plus 22  $\mu$ L of Alamar Blue™.

#### 4.2.5. Intracellular amastigotes assays

Murine peritoneal macrophages were isolated from the peritoneal space of BALB/c mice with cold RPMI 1640 medium (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 1 mM L-glutamine, 1 M HEPES, penicillin G (105 IU-I) and streptomycin sulphate (0.10 g L<sup>-1</sup>). The concentration was adjusted to 1 × 10<sup>6</sup> macrophage/mL and incubated in a LAB-TEK 8-chamber slide (Nunc, Roskilde, Denmark) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 1 h. Non-adherent cells were removed and stationary-phase *L. amazonensis* promastigotes were added at a 3:1 parasite/macrophage ratio. The cultures were incubated for a further 4 h, and free parasites were removed. The chambers were washed, and the monolayers were incubated with the compounds for 48 h. Infected macrophages incubated only in the culture medium were used as controls to compare with the infected treated macrophages. The concentration of DMSO in the wells did not exceed 0.001% (v/v), which is not toxic to the parasites. The cultures were fixed in methanol and stained with the haematological system Instant Prov (Newprov<sup>®</sup>, Curitiba, Brazil), and fixed on glass slides (24 × 76 mm) with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). The coverslips were examined by light microscopy, and the number of infected macrophages and the mean number of parasites per macrophage were determined in 100 cells counted. The experiments were performed twice in triplicate. The percentage of infected macrophages was calculated by dividing the number of infected macrophages by the total number of macrophages (infected and uninfected) counted on the coverslips, multiplied by 100. To determine the infection index, the percentage of infected macrophages was multiplied by the mean number of parasites per macrophage. The percentage inhibition of infection was calculated by multiplying the difference between the infection index of the control and the compound by 100 and dividing by the infection index (IF) of the control using the following equation:

$$\text{IF} = \% \text{ infected cells} \times \text{amastigotes number} / \text{total number of macrophages}$$

The IC<sub>50</sub> ± SD values were obtained by a sigmoidal model using Origin 6.0 with statistical error limits up to 10%. All tests were conducted in duplicate for each concentration, and two independent assays were performed.

#### 4.2.6. Axenic amastigotes assays

Promastigote forms of *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) were grown to a stationary phase, washed once in PBS (pH 7.4) and adjusted to 5 × 10<sup>6</sup> parasites/mL in Schneider's medium, supplemented with 20% FBS, pH 5.5 and maintained at 32 °C. After 5 days of cultivation, the rounded forms without free flagella were obtained and, after heat shock, were used in the appropriate assays [36]. To evaluate the activity against axenic amastigotes,

the parasites were incubated with increasing concentrations of the prototypes (diluted in DMSO) for 72 h at 32 °C. These assays were performed in triplicate in 96-well flat bottom plates (Falcon Co, Franklin Lakes, USA). The leishmanicidal activity was evaluated by adding 22 µl of Alamar Blue (resazurin) to each well. A colorimetric assay was used based on the reduction of non-fluorescent resazurin to resorufin, which fluoresces in red. Viable cells perform this conversion continuously, generating a quantitative measure of viability that was measured by fluorimetry (Spectra Max GEMINI XPS-Molecular Devices, Silicon Valley, USA) with excitation at 560 nm and 590 nm emission. Calculation of the IC<sub>50</sub> (concentration inhibiting 50% growth) was determined in relation to the control by a sigmoidal model using Origin 6.0.

#### 4.2.7. Statistical analysis

Significance was determined using a non-paired Student's *t*-test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Each experiment was, at minimum, performed in triplicate.

### Acknowledgements

The authors thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPERJ (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro), and FIOCRUZ (Fundação do Instituto Oswaldo Cruz) for financial support and fellowships received.

### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data related to this article can be found at [http...](http://...)

### References

- [1] WHO - World Health Organization. [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/); 2017 Accessed 13 April 2017.
- [2] L. Monzote, Current treatment of leishmaniasis: a review, *Open Antimicrob. Agents J.* 1 (2009) 9.
- [3] G. Bilbe, Overcoming neglect of kinetoplastid diseases, *Science* 348 (2015) 974.
- [4] J.A.L. Lindoso, J.L.M. Costa, I.T. Queiroz, H. Goto, Review of current treatments for leishmaniasis, *Res. Rep. Trop. Med.* 3 (2012) 69.
- [5] R. Rajasekaran, Y.P. Cham, Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel anti-leishmanial drugs, *Drug Discov. Today* 20 (2015) 958.
- [6] R.F. Rodrigues, D. Castro-Pinto, A. Echevarria, C.M. Reis, C.N. Del Cistia, C.M.R. Sant'Anna, F. Teixeira, H. Castro, M. Canto-Cavalheiro, L.L. Leon, A. Tomás,

- Investigation of thypanothione reductase inhibitory activity by 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide derivatives and molecular docking studies, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 1760.
- [7] K. Seifert, Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development, *Open Med. Chem. J.* 5 (2011) 31.
- [8] B. Insuasty, J. Ramírez, D. Becerra, C. Echeverry, J. Quiroga, R. Abonia, S.M. Robledo, I.D. Velez, Y. Upegui, J.A. Muñoz, V. Ospina, M. Nogueras, J. Cobo, An efficient synthesis of new caffeine-based chalcones, pyrazolines and pyrazolo[3,4-*b*][1,4]diazepines as potential antimalarial, antitrypanosomal and antileishmanial agents, *Eur. J. Med. Chem.* 93 (2015) 401.
- [9] E.C. Torres-Santos, D.L. Moreira, M.A. Kaplan, M.N. Meirelles, B. Rossi-Bergmann, Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999) 1234.
- [10] D. Coskun, M. Erkisa, E. Ulukaya, M.F. Coskun, F. Ari, Novel 1-(7-ethoxy-1-benzofuran-2-yl) substituted chalcone derivatives: Synthesis, characterization and anticancer activity, *Eur. J. Med. Chem.* 136 (2017) 212.
- [11] F. Sonmez, S. Sevmezler, A. Atahan, M. Ceylan, D. Demir, N. Gencer, O. Arslan, M. Kucukislamoglu, Evaluation of new chalcone derivatives as polyphenol oxidase inhibitors, *Bioorg. Med Chem. Lett.* 21 (2011) 7479.
- [12] J.L.R. de Melos, E.C. Torres-Santos, V.S. Faiões, C.N. Del Cistia, C.M.R. Sant'Anna, C.E. Rodrigues-Santos, A. Echevarria, Novel 3,4-methylenedioxyde-6-X-benzaldehyde-thiosemicarbazones: Synthesis and anti-leishmanial effects against *Leishmania amazonensis*, *Eur. J. Med. Chem.* 103 (2015) 409.
- [13] A. Moreno-RM. Rodrigues, P.M. Salazar-Schettino, J.L. Bautista, F. Hernandez-Luis, H. Torrens, Y. Guevara-Gomez, S. Pina-Canseco, M.B. Torres, M. Cabrera-Bravo, C.M. Martinez, E. Perez-Campos, In vitro antiparasitic activity of new thiosemicarbazones in strain *Trypanosoma cruzi*, *Eur. J. Med. Chem.* 87 (2014) 23.
- [14] R.O.A. Soares, A. Echevarria, M.S.S. Bellieny, R.T. Pinho, R.M.M. de Leo, W.S. Seguin, G.M. Machado, M.M. Canto-Cavalheiro, L.L. Leon, Evaluation of thiosemicarbazones and semicarbazones as potential agents anti-*Trypanosoma cruzi*, *Exp. Parasitol.* 129 (2011) 381.
- [15] F.R. Pavan, P.I.S. Maia, S.R.A. Leite, V.M. Daflon, A.A. Batista, D.N. Sato, S.G. Franzblau, C.Q.F. Leite, Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1898.
- [16] R.O. Paiva, L.F. Kneipp, C.M. Goulart, M.A. Albuquerque, A. Echevarria, Antifungal activities of thiosemicarbazones and semicarbazones against mycotoxigenic fungi, *Cienc. Agrotec.* 38 (2014) 531.
- [17] Y. Wang, W. Gu, Y. Shan, F. Liu, X. Xu, Y. Yang, Q. Zhang, H. Kuang, Z. Wang, S. Wang, Design, synthesis and anticancer activity of novel nopinone-based thiosemicarbazones derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27 (2017) 2360.
- [18] T.A.R. dos Santos, A.C. da Silva, E.B. Silva, P.A.T.M. Gomes, J.W.P. Espíndola, M.V.O. Cardoso, D.R.M. Moreira, A.C.L. Leite, V.R.A. Pereira, Antitumor and



- immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-thiazoles in Jurkat and HT-29 cells, *Biomed. Pharmacother.* 82 (2016) 5X.55.
- [19] H. Zhang, Y. Qian, D. Zhu, X. Yang, H. Zhu, Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of chalcone-thiosemicarbazide derivatives as novel anticancer agents, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 4702.
- [20] J. Liu, C. Chen, F. Wu, L. Zhao. Microwave-assisted synthesis and tyrosinase inhibitory activity of chalcone derivatives, *Chem. Biol. Drug Des.* 82 (2013) 39.
- [21] J.G. da Silva, A.A.R. Despaigne, S.R.W. Ouro, C.C. Bandeira, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper(II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones, *Eur. J. Med. Chem.* 65 (2013) 415.
- [22] J.G. da Silva, C.C.H. Perdigão, N.L. Speziali, H. Beraldo, Chalcone-derived thiosemicarbazones and their zinc(II) and gallium(III) complexes: spectral studies and antimicrobial activity, *J. Coord. Chem.* 66 (2013) 385.
- [23] R.B. Oliveira, E.M. Souza-Fagundes, R.P.P. Soares, A.A. Andrade, A.U. Krettli, C.L. Zani, Synthesis and antimalarial activity of semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 1983.
- [24] H. Suwito, J. Mustofa, P. Pudjiastuti, M.Z. Fanani, Y. Kimata-Ariga, R. Katahira, T. Kawakami, T. Fujiwara, T. Hase, H.M. Sirat, N.N.T. Puspaningsih, Design and synthesis of chalcone derivatives as inhibitors of *Plasmodium falciparum*: pursuing new antimalarial agents, *Molecules* 19 (2014) 21473.
- [25] B.E. Aksöz, R. Ertanm, Spectral properties of chalcones II, *FABAD J. Pharm. Sci.* 37 (2012) 205.
- [26] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Immunol. Methods* 65 (1983) 55.
- [27] R. Don, J.R. Ioset, Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections, *Parasitology* 141 (2014) 140.
- [28] L. Ballell, M. Strange, N. Cammack, A.H. Fairlamb, L. Borysiewicz, Open Lab as a source of hits and leads against tuberculosis, malaria and kinetoplastid diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 751.
- [29] N. Isaacs, *Physical Organic Chemistry*, Longman Scientific & Technical, 1987, England.
- [30] C. Hansch, A. Leo, *Exploring QSAR – Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*, ACS Professional Reference Books, American Chemical Society, Washington, DC, 1995.
- [31] A.K. Singh, G. Saxena, R. Prasad, A. Kumar, Synthesis, characterization and calculated non-linear optical properties of two new chalcones, *J. Mol. Struct.* 1017 (2012) 26.
- [32] J.R. Dimmock, S.S. Jonnalagadda, S. Hussein, S. Tewari, J.W. Quail, R.S. Reid, L.T.J. Delbaere, L. Prasad, Evaluation of some thiosemicarbazones and arylidene ketones and analogues for anticonvulsant activities, *Eur. J. Med. Chem.* 25 (1990) 581.
- [33] H.J. Zhang, Y. Qian, D.D. Zhu, X.G. Yang, H.L. Zu, Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of chalcone thiosemicarbazide derivatives as novel anticancer agents, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 4702.
- [34] S.X. Wang, C. Liu, J. Duan, Synthesis of chalcone thiosemicarbazones under ultrasound irradiation, *Asian J. Chem.* 23 (2011) 4451.

- [35] R.M. Temporal, L.C. Finkelstein, A. Echevarria, M.A.S. Souza, M. Sertã, A.J. Silva-Gonçalves, C. Pirmez, L.L. Leon, Effects of amidine derivatives on parasite-macrophage interaction and evaluation of toxicity, *Arzneim-Forch. / Drug Res.* 6 (2002) 489.
- [36] D.B. Castro-Pinto, A. Echevarria, M. Genestra, L. Cysne-Finkelstein, L.L. Leon, Trypanotione reductase activity is prominent in metacyclic promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania amazonensis*. Evaluation of its potentiality as a therapeutic target, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 19 (2004) 57.

## Anexo B – Pôster apresentado no I Simpósio Latino Americano de Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária / UFRRJ - 2015



1º SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E  
INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA.

INOVAÇÃO, TECNOLOGIA & SUSTENTABILIDADE

### Estudo da Atividade Leishmanicida *in vitro* de Chalconas-tiossemicarbonas Frente a *Leishmania amazonensis*

Edinéa Pastro Mendes<sup>1</sup>; Aurea Echevarría<sup>2</sup>

1. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, [edlone@bio.uffirj.br](mailto:edlone@bio.uffirj.br); 2. Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; [aechevarr@ufrrj.br](mailto:aechevarr@ufrrj.br)

Palavras-chave: leishmaniose, chalconas, *Leishmania amazonensis*

#### RESUMO

Leishmaniose é uma doença endêmica presente em mais de 80 países no mundo incluindo o Brasil, tornando-se um grave problema de saúde pública no mundo (WHO, 2015). No Brasil, a leishmaniose está disseminada na maioria dos estados, e, acomete um grande número de indivíduos. Os medicamentos utilizados no tratamento clínico são antigos e causam severos efeitos colaterais além de apresentarem resistência. Atualmente, os medicamentos em estudo para o tratamento de leishmaniose são apenas novas formulações, ou novas formas farmacêuticas de medicamentos já utilizados em infecções por *Leishmania* (MENDONÇA-FILHO et al., 2004). Assim, a busca por novas substâncias com atividade antileishmaniana é extremamente necessária e premente. As chalconas constituem uma classe de produtos naturais encontrada em caules, raízes, folhas, frutos e sementes de diversas plantas e apresentam diversificadas atividades biológicas incluindo antiparasitária (ANTHONY et al., 2005). Avaliar a atividade leishmanicida de uma série chalconas-tiossemicarbonas sintéticas frente a promastigotas de parasitas do gênero *Leishmania amazonensis*. As chalconas-tiossemicarbonas foram sintetizadas, purificadas e caracterizadas por ponto de fusão e por análises espectroscópicas de rotina como infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono. A avaliação da atividade antileishmaniana frente a *L. amazonensis* na forma de promastigotas, foi realizada em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino. As culturas em microplacas de 96 poços foram incubadas a 26 °C, por 24 h. As chalconas-tiossemicarbonas foram avaliadas na concentração de 50 µM, dissolvidas em DMSO (1,5%) e os parasitas vivos contados em câmara de Neubauer. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em dois ensaios independentes e a pentamidina usada como controle positivo. Os ensaios foram realizados com sete chalconas-tiossemicarbonas com diferentes grupos substituintes (GT-H, GT-Me, GT-CN, GT-F, GT-Br, GT-Cl e GT-NO<sub>2</sub>) na concentração de 50 µM frente a promastigotas de *L. amazonensis* em cultura de 24 h. Os resultados obtidos apresentaram uma faixa de percentual de parasitas mortos de 42% a 79%, sendo que a chalcona-tiossemicarbona substituída com o grupo flúor (GT-F) foi a mais ativa com apenas 21% dos parasitas vivos. A pentamidina, na concentração de 50 µM, apresentou 66% de morte dos parasitas. Os resultados obtidos mostraram-se interessantes indicando que as chalconas-tiossemicarbonas podem atuar como agentes antileishmaniana e, motivaram-nos a dar continuidade aos ensaios com as amastigotas intracelulares.

Agências Financiadoras: FAPERJ, CNPq e CAPES.

## Atividade Antileishmania de Chalconas-tiossemicarbazonas frente a *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*

Edinéa Pastro Mendes<sup>1</sup>; Marilene Marcuzzo Canto-Cavalheiro<sup>2</sup> & Aurea Echevarria<sup>3</sup>

1. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, [edinea@bio.fiocruz.br](mailto:edinea@bio.fiocruz.br); 2. Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, RJ, Brasil, [mcantoca@ioc.fiocruz.br](mailto:mcantoca@ioc.fiocruz.br). 3. Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; RJ, Brasil, [echevarr@ufrj.br](mailto:echevarr@ufrj.br)

Palavras-chave: leishmaniose, chalconas, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*

### RESUMO

Leishmaniose é uma doença endêmica presente em mais de 80 países no mundo incluindo o Brasil, tornando-se um grave problema de saúde pública no mundo (WHO, 2015). No Brasil, a leishmaniose está disseminada na maioria dos estados, e, acomete um grande número de indivíduos. Os medicamentos utilizados no tratamento clínico são antigos e causam severos efeitos colaterais além de apresentarem resistência. Atualmente, os medicamentos em estudo para o tratamento de leishmaniose são apenas novas formulações, ou novas formas farmacêuticas de medicamentos já utilizados em infecções por *Leishmania* (MENDONÇA-FILHO *et al.*, 2004). Assim, a busca por novas substâncias com atividade antileishmania é extremamente necessária e premente. As chalconas constituem uma classe de produtos naturais encontrada em caules, raízes, folhas, frutos e sementes de diversas plantas e apresentam diversificadas atividades biológicas incluindo antiparasitária (ANTHONY *et al.*, 2005). Deste modo, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade leishmanicida de uma série chalconas-tiossemicarbazonas sintéticas frente a promastigotas de parasitos de *Leishmania amazonensis* e *braziliensis*. As chalconas-tiossemicarbazonas foram sintetizadas, purificadas e caracterizadas por ponto de fusão e por análises espectroscópicas de rotina como infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono. A avaliação da atividade antileishmania frente a *L. amazonensis* e *braziliensis* na forma de promastigotas, foi realizada em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino. As culturas em microplacas de 96 poços foram incubadas a 26 °C, por 24 h. As chalconas-tiossemicarbazonas foram avaliadas na concentração de 50  $\mu$ M, dissolvidas em DMSO (1,5%) e os parasitos vivos contados em câmara de Neubauer. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em dois ensaios independentes e a pentamidina usada como controle positivo. Os ensaios foram realizados com sete chalconas-tiossemicarbazonas com diferentes grupos substituintes (CT-H, CT-Me, CT-CN, CT-F, CT-Br, CT-Cl e CT-NO<sub>2</sub>) na concentração de 50  $\mu$ M frente a promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em cultura de 24 h. Os resultados obtidos para *L. amazonensis* apresentaram uma faixa de percentual de parasitos mortos de 42% a 79%, sendo que a chalcona-tiossemicarbazona substituída com o grupo flúor (CT-F) foi a mais ativa com apenas 21% dos parasitos vivos. Já os resultados obtidos para *L. braziliensis*, a faixa percentual foi de 63% a 95% de parasitos mortos, e a chalcona-tiossemicarbazona substituída com o grupo flúor (CT-F), também, foi a mais ativa com apenas 5% dos parasitos vivos. A pentamidina, na concentração de 50  $\mu$ M, apresentou 66% de morte dos parasitos. Os resultados obtidos mostraram-se interessantes indicando que as chalconas-tiossemicarbazonas podem atuar como agentes antileishmania e, motivaram-nos a dar continuidade aos ensaios com as amastigotas intracelulares.

#### Referências Bibliográficas:

ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H.; Plant active components - a resource for antiparasitic agents? **Trends Parasitol.** 21, 462-468, 2005.

WHO - World Health Organization, 2015. Leishmaniasis: disease information. (<http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>). Acesso 24/06/2015.

Agencias Financiadoras: FAPERJ, CNPq e CAPES.

Anexo D – Flash Poster apresentado na forma oral no XIIth SEQT Symposium – IIIrd Spanish/Portuguese/Brazilian Meeting - Medicinal Chemistry of Tropical Diseases – Três Cantos (Madri/Spain) - 2016

SYNTHESIS AND ANTILEISHMANIAL ACTIVITY OF NOVEL CHALCONES DERIVATIVES



Edinéia Mendes<sup>1</sup>, Marilene Cavalheiro<sup>2</sup>, Gêrzia Machado<sup>2</sup>, Viviane Falões<sup>2</sup>, Eduardo Santos<sup>2</sup> & Aurora Echeverría<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, [edineia@intabio.fiocruz.br](mailto:edineia@intabio.fiocruz.br); <sup>2</sup> Laboratório de Biotecnologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, RJ, Brasil, [marilene@intabio.fiocruz.br](mailto:marilene@intabio.fiocruz.br); <sup>3</sup> Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, Brasil, [aecheverr@ufrrj.br](mailto:aecheverr@ufrrj.br)



INTRODUCTION

The parasitic protozoans of the genus *Leishmania* are the causative agents of several forms of cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis in any parts of the world. The drugs currently recommended lead to severe toxic side effects, and furthermore there is an urgent need for the development of new, efficient, and safe drugs for the treatment of this disease. Chalcone-thiosemicarbazones is a class of compounds with a wide range of biological activity and, simultaneously, substances containing the thiosemicarbazone group present activities against a large number of pathogens, including *Leishmania* sp.

MATERIALS AND METHODS

In this present work, 5 (CT-H, CT-Me, CT-F, CT-Bi, CT-Cl) derivatives with potential antileishmanial activity have been prepared. These compounds were obtained, in good yields, after condensation reaction of chalcones with thiosemicarbazones in acid medium, and all were fully characterized by IR-FT, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR. The antileishmanial activity of these derivatives was assayed in promastigotes forms of *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/77/LT80018 strain) and *L. braziliensis* (MCAN/BR/95/819 strain). In parallel, the cytotoxicity of these compounds was evaluated on macrophage cells. Parasites were cultured with and without the drugs in Schneider's medium at 25°C, using pentamidine isethionate as reference drug. After 24h incubation, parasite viability was determined using the MTT assay.

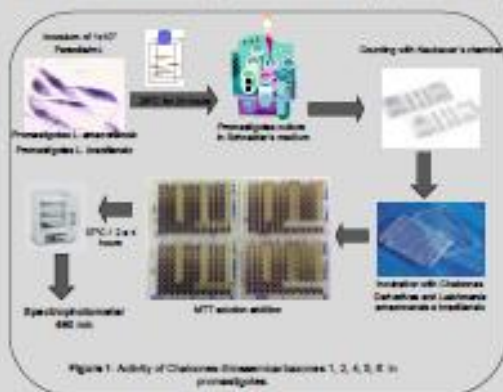


Figure 1. Activity of Chalcone Thiosemicarbazones 1, 2, 4, 5, 6 in promastigotes.

Leishmania Screening Assay

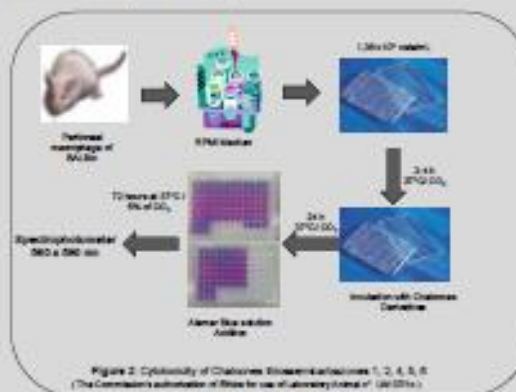
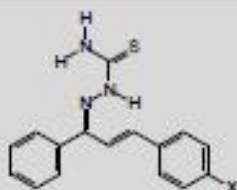


Figure 2. Cytotoxicity of Chalcone Thiosemicarbazones 1, 2, 4, 5, 6 (The Commission's authorization of flow for use of Laboratory Index of Cell Culture.)

cytotoxicity Assay

RESULTS AND CONCLUSIONS



X	Compound	Assay L. amazonensis (IC <sub>50</sub> μM)	Assay L. braziliensis (IC <sub>50</sub> μM)
H	1	14.99 ± 0.20*	12.22 ± 0.20*
Me	2	14.82 ± 1.22*	15.78 ± 1.20*
F	4	12.52 ± 0.28*	12.47 ± 0.20*
Bi	5	3.89 ± 0.28*	3.89 ± 0.28*
Cl	6	3.89 ± 0.28*	3.89 ± 0.28*
	Pentamidine <sup>1</sup>	0.22	-

IC<sub>50</sub>: 50% inhibitory concentration.

The results showed that CT-Cl was the most active for two species, with IC<sub>50</sub> values 3.89±0.14 and 5.22±0.75 μM, for *L. braziliensis* and *L. amazonensis*, respectively. In addition, these derivatives was less cytotoxic than pentamidine. These results reinforce the chalcone-thiosemicarbazones derivatives as potential antileishmanial agents. Further experiments are being carried out in order to define a mechanism of action besides a chemical structure and biological activity.



Support: CNPq, FAPESP e CAPES

**Anexo E – Pôster apresentado no 2º Simpósio Latino Americano de Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária / UFRRJ – 2017**

**ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE CHALCONAS-TIOSSEMICARBAZONAS  
FRENTE A *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum***

**Edinéa Pastro Mendes<sup>1</sup>; Marilene Marcuzzo Canto-Cavalheiro<sup>2</sup>; Gérzia M. C. Machado<sup>2</sup>; Viviane Faiões<sup>2</sup>  
& Aurea Echevarria<sup>3</sup>**

1. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fiocruz, Doutoranda PPGCTIA, [edinea@bio.fiocruz.br](mailto:edinea@bio.fiocruz.br); 2. Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, Fiocruz, RJ; 3. Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; RJ, [echevarr@ufrj.br](mailto:echevarr@ufrj.br)

**Palavras-chave:** leishmaniose, chalconas, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania infantum*

Protozoários do gênero *Leishmania* são os agentes causadores das várias formas de leishmanioses: cutânea, mucocutânea, cutâneo difusa e visceral. Presente em 98 países, incluindo o Brasil, esta doença é potencialmente fatal se não for diagnosticada e tratada a tempo. Os medicamentos disponíveis são altamente tóxicos, causam efeitos colaterais graves e, além disso, o tratamento é longo e requer internação. Há uma necessidade urgente de procurar novos agentes antiparasitários, seguros e eficientes para o tratamento das leishmanioses. Chalconas e tiossemicarbazonas pertencem a classes de compostos com grande variedade de atividade biológica, incluindo a atividade frente a *Leishmania sp.* No presente trabalho, 5 derivados de chalconas-tiossemicarbazonas (CT-H, CT-Me, CT-F, CT-Br, CT-Cl) foram preparados e caracterizados, com bons rendimentos, após a reação de condensação de chalconas com tiossemicarbazonas em meio ácido. A atividade antileishmania destes compostos foi analisada nas formas promastigotas e amastigotas intracelular de *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) e promastigotas de *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP263). Além disso, a citotoxicidade destes compostos foi avaliada em células não infectadas de macrófagos murinos. As formas promastigotas foram cultivadas com e sem as substâncias em meio de cultura Schneider a 26° C, e isotionato de pentamidina como medicamento de referência. Após incubação de 24 h, a viabilidade dos parasitos foi determinada utilizando o ensaio de MTT. A atividade anti-amastigotas foi analisada em macrófagos murinos cultivados em meio RPMI a 34° C e 5% CO<sub>2</sub>, infectados por 24 h e, após 48 h de tratamento, o índice de infecção foi determinado pela contagem do número de parasitos intracelulares. Os resultados mostraram que a CT-Cl foi o composto mais ativo para promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*, com IC<sub>50</sub> = 3,97±0,46 µM e 5,22±0,75 µM, respectivamente. Os outros compostos também apresentaram bons resultados com IC<sub>50</sub> na faixa de 4,34 a 14,80 µM. Os resultados dos ensaios com amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* indicaram IC<sub>50</sub> < 3,125 µM. Além disso, todos esses derivados foram menos citotóxicos do que a pentamidina e, estes resultados reforçam a hipótese de que as CT podem ser potenciais candidatos para o tratamento das leishmanioses.

**Referências Bibliográficas:**

ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H.; Plant active components - a resource for antiparasitic agents? **Trends Parasitol.** 21, 462-468, 2005.

WHO-World Health Organization, 2015. Leishmaniasis: disease information. (<http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>). Acesso 24/08/2017.

**Agências Financiadoras:** FAPERJ, CNPq e CAPES.

Type of presentation **Poster**

Area of interest **Drug development: conventional and alternative. Clinical and experimental therapy in cutaneous and visceral leishmaniasis**

### **C1035 NOVEL CHALCONE-THIOSEMICARBAZONES WITH ANTI-LEISHMANIAL ACTIVITY**

#### **1 Background**

The parasitic protozoans of the genus *Leishmania* are the causative agents of several forms of cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis in any parts of the world. The available antileishmanial drugs still rely on the highly toxic, cause serious side effects and require long-term treatment. There is an urgent need to search for new, safe and efficient antiparasitic agents for the treatment of leishmaniasis. Chalcone-thiosemicarbazones is a class of compounds with a wide range of biological activity and, simultaneously, substances containing the thiosemicarbazone or chalcone group present activities against many pathogens, including *Leishmania sp.*

In this present work, 5 chalcone-thiosemicarbazones (CT-H, CT-Me, CT-F, CT-Br, CT-Cl) were prepared, and evaluated for the anti-leishmanial activity.

#### **2 Methods**

The compounds were obtained, in good yields, after condensation reaction of chalcones with thiosemicarbazones in acid medium, and all were fully characterized. The antileishmanial activity of these compounds was assayed in promastigotes of *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016 strain), *L. infantum* (MHOM/MA67ITMAP263 strain), and intracellular amastigotes forms of *L. amazonensis*. Further, the cytotoxicity of these compounds was evaluated on non-infected murine macrophage cells. Promastigotes were cultured with and without the drugs in Schneider's medium at 2°C, using pentamidine isethionate as reference drug. After 24h incubation, parasite viability was determined using the MTT assay. Anti-amastigote activity was assayed in mouse-infected macrophages cultured in RPMI medium at 34°C and 5% CO<sub>2</sub>. The macrophages were infected with *L. amazonensis* promastigotes and cultured for 1h. Anti-amastigote activity was determined by counting the number of intracellular parasites after 72h of treatment.

#### **3 Results**

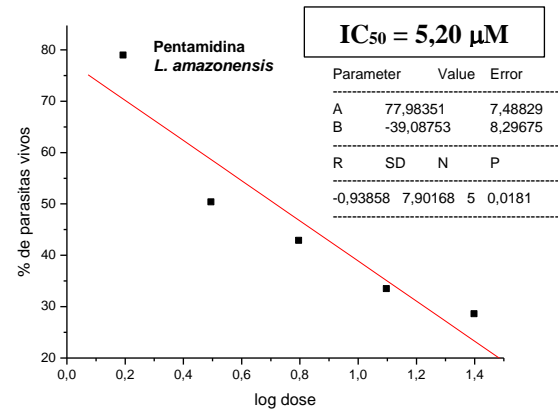
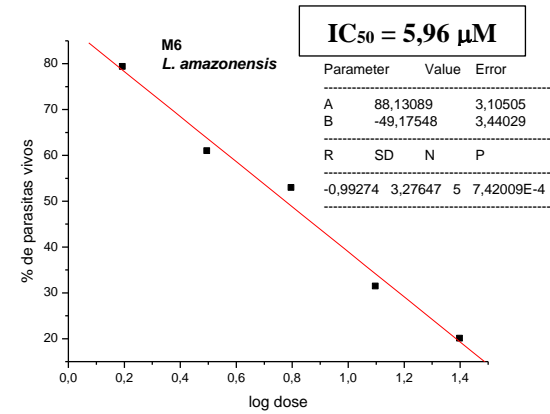
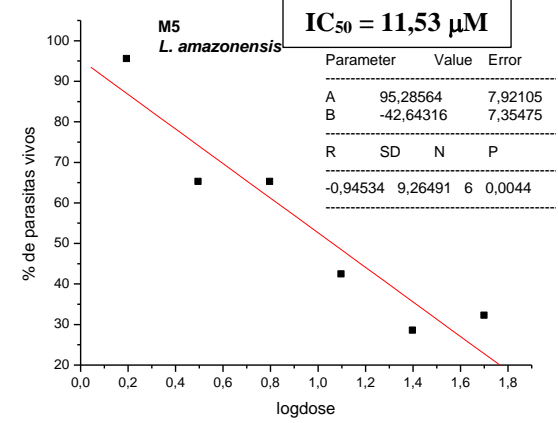
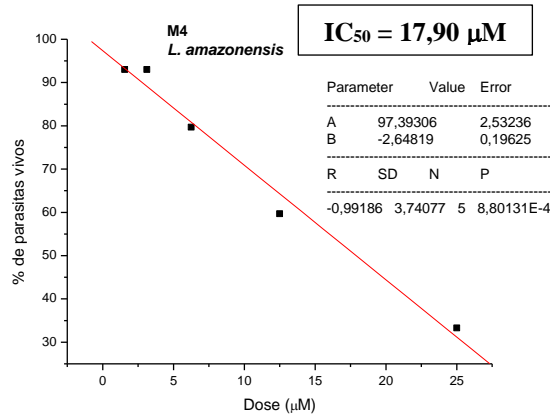
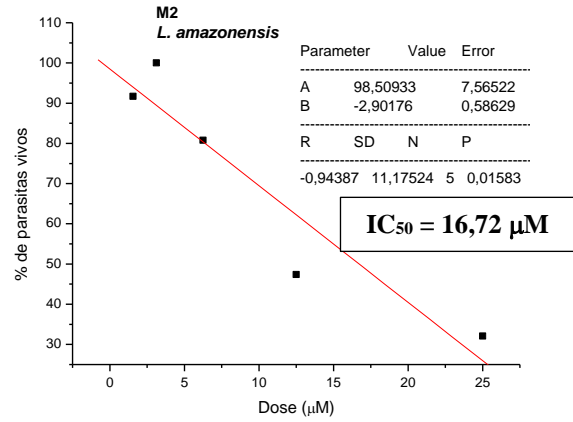
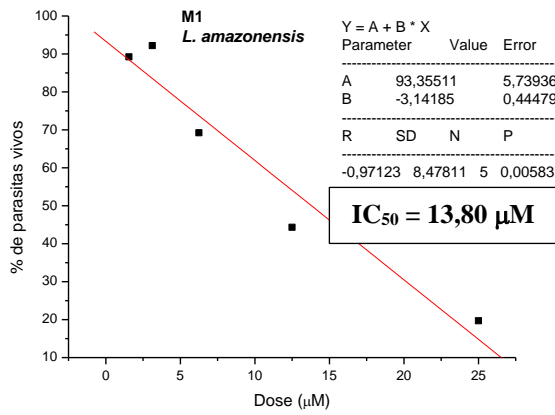
The results showed that CT-Cl derivative was the most active compound for promastigotes of *L. infantum* and *L. amazonensis*, with IC<sub>50</sub> values 3.97±0.46 µM and 5.22±0.75 µM, respectively. The other compounds also showed a good *in vitro* anti-leishmanial activity with IC<sub>50</sub> in the range of 4.34 to 14.80 µM. The results of assays with intracellular amastigotes of *L. amazonensis* indicated IC<sub>50</sub> < 3.125 µM. In addition, all these derivatives were less cytotoxic than pentamidine.

#### **4 Conclusions**

In conclusion, these results reinforce the chalcone-thiosemicarbazone derivatives as potential new candidates for leishmaniasis treatment.

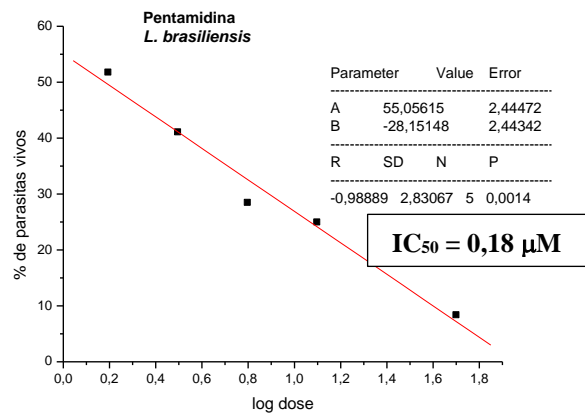
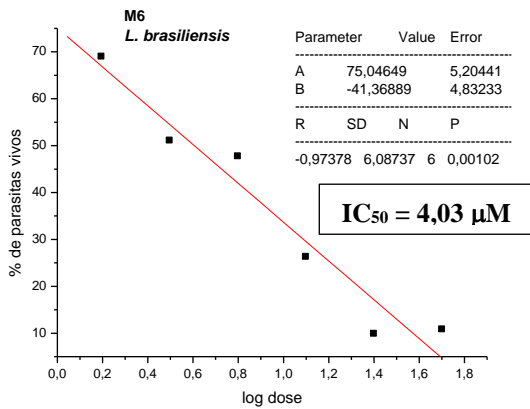
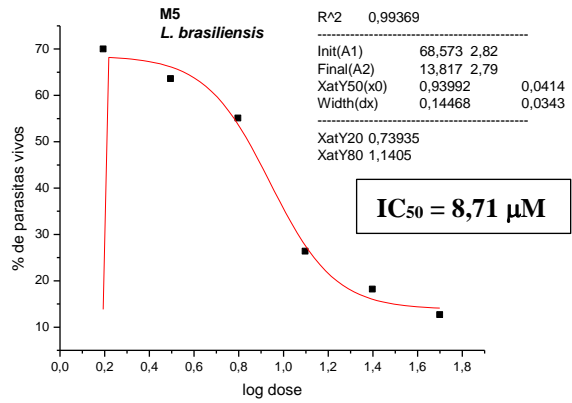
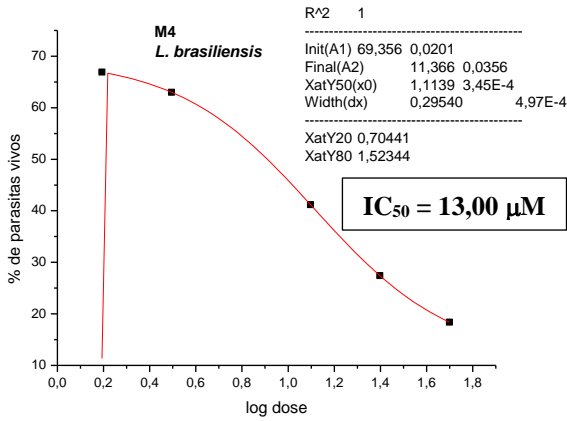
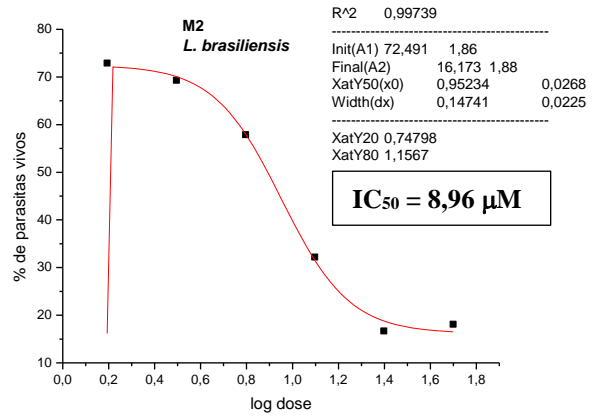
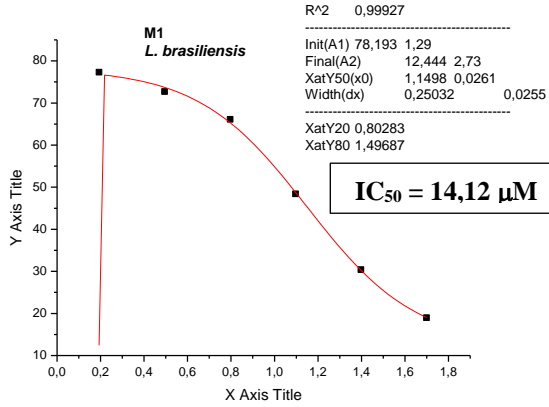
You can access your personal area at:  
[http://worldleish2017.org/index.php?go=panel\\_personal](http://worldleish2017.org/index.php?go=panel_personal)

Anexo G - Gráficos dos ensaios antipromastigotas de *L. amazonensis* - cálculo do IC<sub>50</sub>





Anexo H - Gráficos dos ensaios antipromastigotas de *L. braziliensis* - cálculo do IC<sub>50</sub>



Anexo I - Gráficos dos ensaios antipromastigotas de *L. infantum* - cálculo do IC<sub>50</sub>

