

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

**ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE NOVOS ANÁLOGOS
NITROHETEROCÍCLICOS**

Natália Valério Barbosa

CAMPO GRANDE

2018

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Natália Valério Barbosa

**ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE NOVOS ANÁLOGOS
NITROHETEROCÍCLICOS**

**Dissertação apresentada como requisito
para defesa de Mestrado pelo Programa
de Pós-Graduação em Farmácia, da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Alimentos e Nutrição da Universidade
Federal do Mato Grosso do Sul.**

**Orientador: Prof. Dr. Adriano Cesar de Moraes Baroni
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Carla Cardozo Pinto de Arruda.**

CAMPO GRANDE

2018

Natália Valério Barbosa

**ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE NOVOS ANÁLOGOS
NITROHETEROCICLICOS**

**Dissertação apresentada como requisito
para defesa de Mestrado pelo Programa
de Pós-Graduação em Farmácia, da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Alimentos e Nutrição da Universidade
Federal do Mato Grosso do Sul.**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Adriano Cesar de Moraes Baroni - Orientador
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof^a. Dr^a. Denise Brentan da Silva
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof^a. Dr^a. Maria Carolina Silva Marques
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

2018

Ao meu marido Víctor, que está caminhando por este labirinto estranho e mágico que é a vida de mãos dadas comigo. Me amparando quando necessário, sempre me incentivando com paciência e amor. Você me mostra todos os dias o significado da palavra amor. Você é o raio de sol que ilumina minhas manhãs, é a chuva mansa que traz calma e uma brisa fresca e também é o frio que nos faz querer estar sempre juntos para aquecer o coração.

Eu te amo mais que tudo nessa vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre moldou todos os momentos da minha vida com perfeição. Quanto mais eu agradeço, mais motivos tem para agradecer.

Agradeço aos meus pais Vicente e Marcia, pelo dom da vida. Obrigada por estar sempre ao meu lado e por todo o ensinamento passado durante a vida. Agradecer a vocês nunca será o suficiente, mas passarei a vida tentando.

Ao meu marido, Víctor que nesses mais de seis anos juntos, me entende, me ama, me cuida e me transborda. Você é a parte que eu mais amo em mim e espero que a cada dia eu consiga retribuir tudo o que você sempre me proporcionou. Eu te amo mais que tudo!!

Agradeço também a sorte de ter sido colocado na minha vida esses pacotinhos de alegria e amor, Fred e Shuri filhos gatos que só trazem alegria para a minha vida.

Agradeço também aos meus irmãos, Symone e Rodrigo, aos meus cunhados, Magão (Pá!) e Aline e a preciosidade da minha vida, minha sobrinha Alícia, por todos os momentos em que estamos juntos.

Agradeço de forma mais intensa e enlouquecida a minha amiga, parceira e a sempre metade das “meninas”, Amarith. Não tenho palavras para demonstrar tanta gratidão e amor que tenho por você. Sem você, este mestrado não teria sido realizado. Você foi a melhor parte dos dias, a melhor dupla e melhores conversas jogadas fora. Obrigada por simplesmente tudo o que você foi e representou na minha vida até agora. Eu te amo muito e temos ainda muito o que compartilhar!

Ao meu orientador, Professor Adriano, por toda a paciência e ensinamentos. O senhor é o melhor orientador que poderíamos ter, pois se tornou muito mais que isso... Se tornou um incrível mentor e também uma ótima companhia. Muito obrigada por tudo o que o senhor foi nesses dois anos e meio.

Agradeço imensamente a todos do laboratório de Química farmacêutica. Por todo a parceria, todas as comemorações e também por toda a ajuda. Agradeço em especial a Camila que, nos acolheu, orientou e fez com que nos sentíssemos em casa. Agradeço imensamente também ao Diego, que nos ajudou de formas incríveis, muito obrigada. Agradeço também a Maria Letícia pelas risadas e todo apoio e a Renata pelos bolos. Obrigada de coração a todos.

Agradeço ao laboratório de Parasitologia Humana, onde todos nos acolheram e nos trataram muito bem. Agradeço principalmente a Aline, Ju e Elisa, por toda a ajuda e conversas. Por toda a estrutura física, aparelhos e tudo o que vocês nos proporcionaram. Agradeço principalmente a professora Carla pela orientação e paciência.

Agradeço a minha querida amiga Fanny, que nos deu apoio nos dias difíceis, risadas e descontração quando mais precisamos. Obrigada por tudo o que você representa como alegria, descontração e um pouco falta de noção também. Eu te amo!

Agradeço ao nosso maior e mais incrível parceiro, Antonio. Você nos ensinou, orientou, acompanhou e nós nos ajudamos nessa jornada. Obrigada por momentos memoráveis e que você tenha muito sucesso e que cada dia os seus sonhos se realizem.

Agradeço também as colegas de Mestrado. Obrigada, meninas. Não dividimos tantos momentos, mas foram inesquecíveis. Um agradecimento especial a Lanna que nos ajudou na leitura de alguns dos nossos testes.

Por último, não por ser menos importante, mas, por serem as pessoas que estavam presentes no fechamento deste ciclo da minha vida. Agradeço imensamente as professoras Maria Carolina e Denise, por ter sido minha banca e ter sido professoras tão especiais nas nossas vidas. Levarei vocês gravadas por sempre na minha memória. Muito obrigada e que o sucesso continue acompanhando vocês sempre.

“Concedei-nos Senhor, serenidade necessária, para aceitar as coisas que não podemos modificar, coragem para modificar aquelas que podemos e sabedoria para distinguirmos umas das outras.”

Reinhold Niebuhr

RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada causada por parasitas de *Leishmania* que possui tratamento com toxicidades e possibilidade de resistência do parasita. Sua incidência anual de mais de 1,5 milhão de novos casos e aproximadamente 350 milhões de indivíduos encontram-se sob risco de contrair a doença. Os compostos nitroheterocíclicos sintetizados foram testados frente a cepa de uma das responsáveis pela leishmaniose cutânea no Brasil, *L. (L.) amazonensis*. Dos compostos testados, os compostos monometoxilado 18 ($CI_{50}= 31,81 \mu M$) e dimetoxilados 19 ($CI_{50}= 14,66 \mu M$) e 21 ($CI_{50}= 19,52 \mu M$) são menos ativos que o composto trimetoxilado 22 ($CI_{50}= 1,24 \mu M$) para as formas amastigotas intracelulares e, o último não induziu a produção de óxido nítrico (NO). Na série de compostos que possuem cadeia alifática com o cloro em sua extremidade, o composto 30 que possui o número menor de grupos metileno e menor coeficiente de partição ($\log P= 2,13$) foi o mais potente com uma $CI_{50}= 0,69 \mu M$. Dessa série, destaca-se também o composto 32 com uma $CI_{50}= 0,88 \mu M$ para formas promastigota e $CI_{50}= 3,78 \mu M$ para forma amastigota pela indução de NO, o que pode justificar sua relevante atividade antileishmaniana. Tendo em vista que os compostos mostraram baixa seletividade, há a necessidade de produzir um sistema de distribuição que diminua o impacto dessa toxicidade e também de novas modificações estruturais para que possamos manter ou elevar a potência desses compostos e eliminar a toxicidade desses compostos, para que esses relevantes resultados sejam também obtidos na atividade *in vivo* para desenvolver fármacos que tratem de forma mais eficaz a leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea; atividade antileishmaniana; isoxazóis; nitrofurânicos.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of diseases caused by the protozoan *Leishmania* parasites. Among the neglected diseases, leishmaniasis affect over 1.5 million people annually and approximately 350 million people are living in substandard sanitary conditions and exposed to vectors. Drug design studies searching for new drug candidates are important, because the few options of treatments available are limited due to their highly toxicity and also the emerging parasites resistance. Previously synthesized nitro heterocyclic analogues were tested against promastigote and amastigote forms of *L. (L.) amazonensis*, related to cutaneous leishmaniasis cases in Brazil. Trimethoxy analogue 22 (IC_{50} = 1.24 μ M) showed higher activity on intracellular amastigotes than monomethoxy analogue 18 (IC_{50} = 31.81 μ M) and dimethoxy analogues 19 (IC_{50} = 14.66 μ M) and 21 (IC_{50} = 19.52 μ M). Therefore the compound 22 did not induce NO production by macrophages. The series of analogues with aliphatic chain and a chlorine atom attached showed impressive biological activities. Compound 30 with less methylene groups and lower partition coefficient (CLog P= 2.13) was considered the most potent analogue with an IC_{50} value of 0.69 μ M. Analogue 32 was active on promastigote and amastigote forms with IC_{50} values of 0.88 μ M and 3.78 μ M, respectively. Thus, compound 32 induced the NO production by macrophages, suggesting a possible mechanism of action, which may justify its relevant antileishmanial activity. Since the compounds showed low selectivity, there is a need to produce a distribution system that will reduce the impact of such toxicity and also from new structural modifications so that we can maintain or increase the potency of these compounds and eliminate the toxicity of these compounds, so that these compounds relevant results are also obtained in in vivo activity to develop drugs that more effectively treat leishmaniasis.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis; antileishmanial activity; isoxazole; nitrofurans.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp no hospedeiro vertebrado e no vetor.....	19
Figura 2: Classificação dos subgêneros e espécies de <i>Leishmania</i> associados às diversas manifestações clínicas da leishmaniose (formas cutânea, mucocutânea e visceral) retirada de Real et al. (2013).	19
Figura 3: Troca bioisostérica nas neolignananas formando compostos isoxazólicos com atividade melhorada em resultados obtidos pelo LASQUIM para teste de atividade antileishmania.....	27
Figura 4: Nitroderivados com potencial atividade contra doenças negligenciadas.....	29
Figura 5: Rota sintética para a obtenção dos nitroheterocíclicos isoxazólicos.....	35
Figura 6: Compostos sintetizados que foram testados quanto à atividade antileishmania e seus respectivos rendimentos.....	36
Figura 7: Liberação de óxido nítrico por macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> , após 24 horas de tratamento com os compostos nitroheterocíclicos isoxazólicos que possuem anel aromático. Barras representam a média \pm DP de seis repetições. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,0001$ para as diferentes concentrações comparadas às células não tratadas (controle) e entre concentrações (ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey). (A) Série de compostos que possuem ligado ao anel aromático grupos retiradores de elétrons; (B) Série de compostos que possuem ligado ao anel aromático grupos doadores de elétrons.	46
Figura 8: Liberação de óxido nítrico por macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> , após 24 horas de tratamento com os compostos nitroheterocíclicos isoxazólicos com cadeia lateral alifática. Barras representam a média \pm DP de seis repetições. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,0001$ para as diferentes concentrações comparadas às células não tratadas (controle) e entre concentrações (ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey). (C) Série de compostos de cadeia alifática (D) Série de compostos de cadeia alifática com Cl ligado a sua extremidade (E) Série de compostos de cadeia alifática com OH ligados a sua extremidade.....	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CI₅₀: Concentração Inibitória média

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

EV: Endovenosa

IL: Intralesional

IS: Índice de Seletividade

IM: Intramuscular

LC: Leishmaniose Cutânea

LCD: Leishmaniose Cutânea Difusa

LM: Leishmaniose Mucocutânea

Log P: Coeficiente de Partição

LT: Leishmaniose Tegumentar

LV: Leishmaniose Visceral

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrasodium

μM: Micromolar

NCS: N-clorosuccinimida

NNN: Ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: Reação da Polimerase em Cadeia

pH: Potencial Hidrogeniônico

REA: Relação Estrutura Atividade

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

Sb⁵⁺: Antimonial Pentavalente

THF: Tetrahidrofurano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Leishmanioses.....	17
2.1.1. Agente etiológico e ciclo de vida	17
2.1.2. Manifestações clínicas das leishmanioses	20
2.1.3. Epidemiologia das leishmanioses.....	21
2.1.4. Diagnóstico da leishmaniose tegumentar	22
2.1.5. Prevenção e Tratamento das Leishmanioses	23
2.2. Planejamento de novos compostos contra doenças negligenciadas.....	25
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. Reagentes e substâncias	35
4.2. Animais.....	36
4.3. Parasitos	37
4.4. Atividade <i>in vitro</i> contra formas promastigotas	37
4.5. Atividade <i>in vitro</i> sobre formas amastigotas intracelulares.....	37
4.6. Dosagem de óxido nítrico (NO).....	38
4.7. Efeito citotóxico em células de mamífero	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. Comparativo da produção de óxido nítrico com as atividades biológicas.....	46
6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIAS.....	53
8. ANEXO.....	65

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecciosa, não contagiosa (BRASIL, 2017) que faz parte das doenças tropicais negligenciadas e emergentes que afetam principalmente regiões pobres segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2017). É endêmica em 88 países, com incidência anual de 1,5-2 milhões de novos casos. Aproximadamente 350 milhões de indivíduos encontram-se sob risco de contrair a doença (DASSONI et al., 2013; WHO, 2017; BRASIL, 2017). As leishmanioses estão entre as seis doenças mais negligenciadas do mundo, afetando indistintamente homens, mulheres e crianças. (WHO, 2010).

Parasitas do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) são os agentes causadores da leishmaniose. Estes protozoários unicelulares são transmitidos aos hospedeiros vertebrados pela picada do inseto flebotomíneo fêmea infectado (Diptera, Psychodidae). Cerca de 21 espécies de *Leishmania* podem infectar mamíferos e muitas delas podem causar doenças em humanos (READY, 2014). As manifestações clínicas se caracterizam pela presença de lesões cutâneas distribuídas em áreas expostas do corpo que formam úlceras, o que resulta em cicatrizes para o resto da vida (GONZÁLEZ et al., 2010; BRASIL, 2017).

L. (L.) amazonensis, que tem uma capacidade particular de interferir em mecanismos imunológicos necessários para a geração de uma resposta imune efetiva caracterizando a rara leishmaniose cutânea difusa (LCD), no qual a anergia celular está associada à acentuada proliferação dos parasitos e à disseminação da infecção (BRASIL, 2017), uma evolução lenta da doença, que prejudica seu diagnóstico, deformidades estruturais nas extremidades e não responde ao tratamento medicamentoso (COSTA et al, 2009).

A terapia convencional e de primeira escolha para todas as formas clínicas de leishmaniose inclui o uso de antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), como o antimoniato de *N*-metilglucamina (Glucantime[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]), sendo que este último não é comercializado no Brasil (BRASIL, 2017; CROFT & YARDLEY, 2002). Apresenta efeitos colaterais tóxicos graves, especialmente nos sistemas cardíaco, renal e hepático (MURRAY et al., 2005) e mostra diminuição progressiva da eficácia devido ao aparecimento de resistência em muitos países (CROFT et al., 2006; BALASEGARAM et al., 2012).

A anfotericina B, o isetionato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) de pentamidina e a paromomicina são medicamentos de segunda linhas e que também possuem efeitos

colaterais tóxicos e a resistência do parasita ainda ocorrem (SUNDAR et al., 2007; MASMOUDI et al., 2013; MCGWIRE & SATOSKAR, 2014; BRASIL, 2017).

Os heterocíclicos nitrogenados são importantes particularmente no que se refere ao seu uso como medicamentos mundialmente consumidos. Dada a necessidade urgente de novos fármacos para o tratamento de doenças relacionadas aos tripanossomatídeo e a eficácia dos nitro-fármacos existentes para estas indicações, vários laboratórios mostraram-se dispostos a identificar e desenvolver compostos anti-tripanosomatídeos nitroaromáticos (ZHOU et al., 2013; PAPADOPOULOU et al., 2013; VOAK et al., 2013).

A pesquisa de novos compostos com atividade antileishmania tem progredido significativamente, mas um fármaco seguro, eficaz e de baixo custo ainda não foi descoberta. Devido à falta de melhores terapias alternativas, a identificação de novos fármacos, compostos e alvos ainda são motivos de estudos e pesquisas pesquisadores em todo o mundo (MISHRA & TIWARI, 2011). No entanto, um fármaco seguro, eficaz e de baixo custo ainda não foi descoberto.

Dentro deste contexto, este trabalho busca avaliar a atividade antileishmania *in vitro* de uma nova biblioteca de compostos nitroheterocíclicos com o anel isoxazólico a fim de desenvolver novos compostos úteis no tratamento contra leishmanioses.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leishmanioses

Leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias que apresenta um espectro de diferentes formas clínicas (BARRETT & CROFT, 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou a leishmaniose entre as doenças tropicais negligenciadas e emergentes que afetam principalmente regiões pobres ao redor do globo, principalmente países em desenvolvimento, contribuindo para o estabelecimento e manutenção das desigualdades sociais (WHO, 2010).

As leishmanioses estão entre as seis doenças mais negligenciadas do mundo, afetando indistintamente homens, mulheres e crianças. Endêmica em 88 países (72 países em desenvolvimento), com incidência anual de 1,5-2 milhões de novos casos. Aproximadamente 350 milhões de indivíduos encontram-se sob risco de contrair a doença (DASSONI et al., 2013; WHO, 2017; BRASIL, 2017).

Parasitas do gênero *Leishmania* são os agentes causadores da leishmaniose. Estes protozoários unicelulares são transmitidos aos hospedeiros vertebrados pela picada do inseto flebotomíneo fêmea infectado (Diptera, Psychodidae). Cerca de 21 espécies de *Leishmania* podem infectar mamíferos e muitas delas podem causar doenças em humanos (READY, 2014).

Dependendo da espécie infectante e da resposta imunológica do hospedeiro (KAYE & SCOTT, 2011), a doença pode se apresentar sob diferentes formas clínicas, tais como: (a) cutânea localizada, caracterizada pela presença de lesões exclusivamente no local da picada do inseto vetor; (b) mucocutânea, com lesões destrutivas na parte superior do trato respiratório; (c) cutânea difusa, com múltiplos nódulos não ulcerados, classicamente refratária aos tratamentos disponíveis; (d) e a visceral, uma forma sistêmica que afeta especialmente nódulos linfáticos, baço, fígado e medula óssea (LAINSON & SHAW, 2005).

2.1.1. Agente etiológico e ciclo de vida

A leishmaniose refere-se coletivamente a várias síndromes clínicas causadas por protozoários intracelulares obrigatórios da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (KHEIRANDISH et al., 2013), que são transmitidos através da picada do flebotomíneo fêmea infectado (KARAMI et al., 2013; AYATOLLAHI et al., 2015). Cães, roedores, lobos e raposas são considerados

reservatórios comuns e os humanos são hospedeiros incidentais (DA SILVA et al., 2014; AYATOLLAHI et al., 2015).

Leishmania spp são protozoários digenéticos e parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear. Apresentam duas formas de desenvolvimento: amastigotas e promastigotas (HORTA et al., 2012; CARLSEN et al., 2013). As formas promastigotas são formas proliferativas, com flagelo livre, que residem no intestino médio do inseto vetor (KAMHAWI, 2006; PETERS et al., 2008; PETERS & SACKS, 2009). Após o repasto sanguíneo, estas formas são fagocitadas por macrófagos e dentro do vacúolos parasitóforos se diferenciam em amastigotas, formas não móveis, ovoides, que se multiplicam mesmo sob a ação das enzimas lisossomais (KAMHAWI, 2006; PETERS et al., 2008; PETERS & SACKS, 2009; READY, 2010; HORTA et al., 2012; THI et al., 2012; CARLSEN et al., 2013; DE MORAIS et al., 2015).

Os estágios do ciclo de vida encontram-se na Figura 1. As formas promastigotas metacíclicas são as formas infectantes, sendo inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo infectado. As promastigotas metacíclicas são então fagocitadas por macrófagos, onde se transformam em amastigotas. As amastigotas se multiplicam e, após o rompimento dos macrófagos, invadem novas células, como células dendríticas, neutrófilos e fibroblastos. Quando um flebotomíneo faz o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, os macrófagos infectados com as amastigotas são ingeridos. As amastigotas são posteriormente liberadas das células, transformando-se em promastigotas no intestino médio do inseto. As promastigotas se multiplicam no intestino médio e migram para a probóscide do flebotomíneo, onde se transformam em promastigotas metacíclicas infecciosas. Eventualmente, as promastigotas metacíclicas são injetadas no hospedeiro mamífero e o ciclo continua (ZULFIQAR et al., 2017).

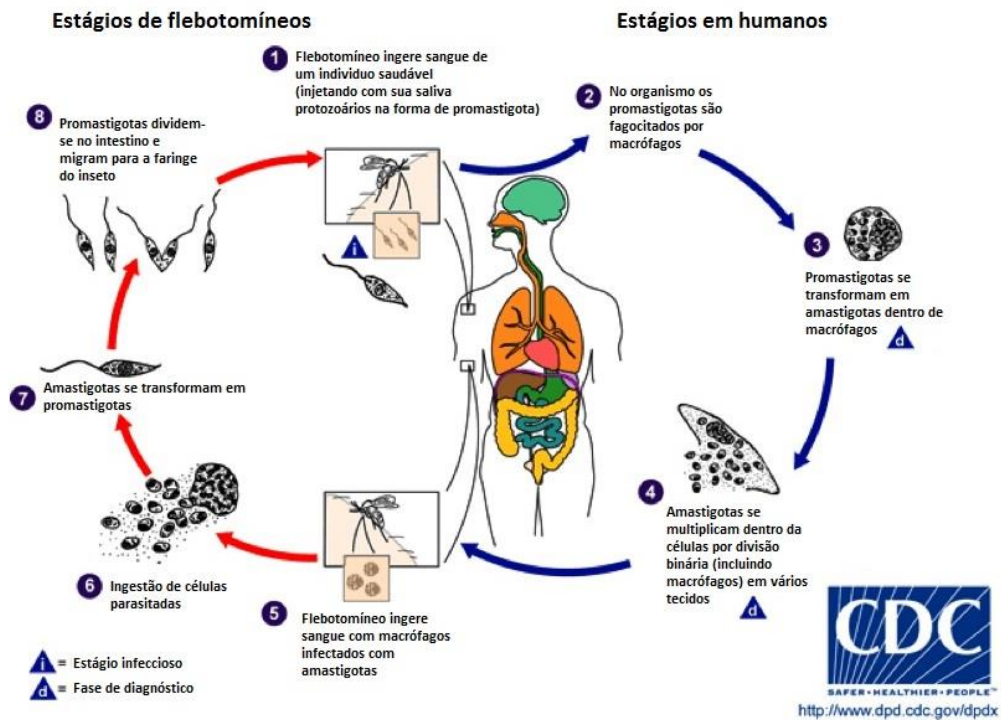


Imagem retirada e disponível no site <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>

Figura 1: Ciclo de vida de *Leishmania* spp no hospedeiro vertebrado e no vetor.

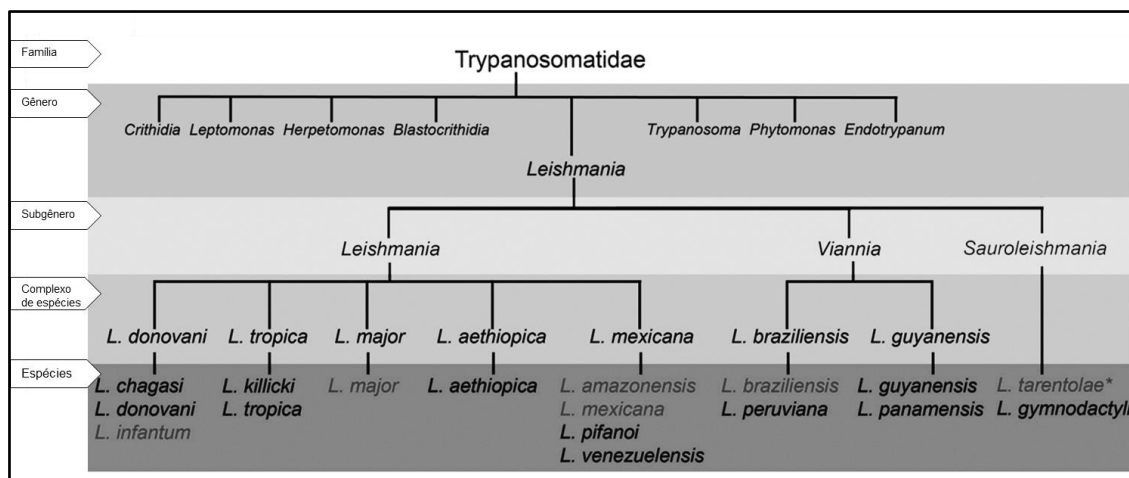


Figura 2: Classificação dos subgêneros e espécies de *Leishmania* associados às diversas manifestações clínicas da leishmaniose (formas cutânea, mucocutânea e visceral). Fonte: Real et al. (2013).

A classificação de Lainson e Shaw (1987) (Figura 2) subdivide o gênero *Leishmania* em dois subgêneros baseado na localização de promastigotas no trato alimentar do inseto. O subgênero *Leishmania* compreende espécies que se desenvolvem na porção anterior e média do intestino, enquanto o subgênero *Viannia* inclui espécies que desenvolvem uma fase prolongada no intestino grosso com posterior migração de

flagelados para o intestino médio e anterior do trato alimentar do vetor (BATES, 2007; REAL et al., 2013).

Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são insetos de grande importância para a saúde pública, uma vez que são responsáveis pela transmissão de bactérias (como por exemplo *Bartonella* spp), um número de agentes virais causadores de febre do flebotomíneo, meningite de verão, estomatite vesicular e encefalite por vírus Chandipura e parasitas, incluindo *Leishmania* (DEPAQUIT et al., 2010; MAROLI et al., 2013). Acredita-se que 98 espécies de flebotomíneos são vetores comprovados ou sob suspeita de transmitir este parasito (MAROLI et al., 2013). Os vetores de *Leishmania* são espécies de *Phlebotomus* na África, Ásia e Europa e de *Lutzomyia* na América Central e do Sul (KAMHAWI, 2006; BRASIL, 2017).

2.1.2. Manifestações clínicas das leishmanioses

Em relação às manifestações clínicas, a leishmaniose pode ser classificada em duas formas principais: a leishmaniose visceral (LV) ou calazar e a leishmaniose tegumentar (LT).

A LV, sistêmica, é a forma clínica mais grave da doença, pois pode apresentar elevada taxa de letalidade (ALVAR et al., 2012). É caracterizada por uma síndrome febril persistente, geralmente associada à esplenomegalia, desnutrição, anemia, hemorragia, icterícia, e morte por sangramento ou infecção bacteriana oportunista (BRASIL, 2014; SINGH & SUNDAR, 2015). É fatal se não for tratada em mais de 95% dos casos (WHO, 2017).

Já a LT caracteriza-se, clinicamente, pela presença de lesões cutâneas distribuídas em áreas expostas do corpo que formam úlceras, o que resulta em cicatrizes para o resto da vida. Embora existam variações consideráveis em seres humanos, as lesões cutâneas são descritas como pápulas ou úlceras indolores, cobertas por crosta aderente ou exsudado seco, variando de 0,5 a 3 cm de diâmetro, em rosto, membros superiores ou inferiores (GONZÁLEZ, 2010; WHO, 2017; BRASIL, 2017). As lesões podem ser únicas ou múltiplas, apresentando bordas elevadas e fundo granuloso, geralmente indolores (GOTO & LINDOSO, 2012).

Na LT, a leishmaniose cutânea (LC) representa a manifestação clínica mais frequente. Nesse caso, as lesões são exclusivamente cutâneas e tendem à cicatrização espontânea. Mais frequentemente, são únicas ou em pequeno número. Em pacientes com lesões por *L. (L.) amazonensis* há um denso infiltrado de macrófagos vacuolizados

na derme, que estão cheios de amastigotas e dão ao infiltrado a aparência de um granuloma macrofágico (MORAES & SILVEIRA, 1994).

Em pacientes sem causas conhecidas de imunodeficiência, a LC pode evoluir para uma ausência de resposta celular específica (anergia) para antígenos de *Leishmania*, que caracteriza a rara leishmaniose cutânea difusa (LCD), no qual a anergia celular está associada à acentuada proliferação dos parasitos e à disseminação da infecção. No Brasil, a LCD está associada à infecção causada por *L. (L.) amazonensis*, que tem uma capacidade particular de interferir em mecanismos imunológicos necessários para a geração de uma resposta imune efetiva caracterizando-se por maciço comprometimento dérmico, de natureza crônica, com recidivas frequentes e anergia ao teste intradérmico de Montenegro (COSTA et al, 2009).

A leishmaniose mucocutânea (LM) caracteriza-se pela presença de lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores. É secundária à lesão cutânea, sendo que, dentre os casos notificados de LT no Brasil, 3% a 6% são de LM e em alguns municípios endêmicos, a porcentagem pode ser superior (BRASIL, 2017).

2.1.3. Epidemiologia das leishmanioses

Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorram em todo o mundo a cada ano. Em 2015, mais de 90% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Dos casos de LC também em 2015, mais de dois terços dos novos casos de LT ocorreram em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã (República Islâmica do Irã) e República Árabe da Síria. Estima-se que entre 600 mil e 1 milhão de novos casos ocorram em todo o mundo anualmente. (WHO, 2017).

No Brasil, o conceito de leishmaniose como zoonose silvestre é restrito à Floresta Amazônica, fragmentos de Mata Atlântica e partes do Cerrado. Um novo perfil de transmissão surgiu, impulsionado principalmente por mudanças ambientais feitas pelo homem. Nas últimas décadas, a migração humana de origens e propósitos diferentes resultou em grandes desmatamentos e assentamentos não planejados. Essas mudanças favorecem a dispersão de animais silvestres (alguns hospedeiros reservatórios de *Leishmania*) e flebotomíneos (especialmente aquelas com hábitos alimentares ecléticos) para áreas domésticas, onde novos ciclos de transmissão podem se estabelecer próximo a habitações humanas (RANGEL et al., 2014).

No Brasil, a LT é uma das afecções dermatológicas que merecem mais atenção, devido à sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades e envolvimento psicológico do paciente, com reflexos no campo social e econômico, sendo considerada doença ocupacional. Apresenta ampla distribuição, com registro de casos em todas as regiões brasileiras (BRASIL, 2017). No Brasil, foram registrados de 2000 a 2016, cerca de 398.103 novos casos. Em Mato Grosso do Sul, foram registrados 2627 novos casos no mesmo período (BRASIL, 2015).

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um grande problema de saúde pública global e a prevalência está aumentando em todo o mundo. Este cenário é agravado por uma coinfeção entre o HIV e várias doenças infecciosas, incluindo a leishmaniose (ALVAR et al., 2008). Como resultado, o número de casos de coinfeção relatados tem aumentado globalmente (LINDOSO et al., 2016), e esses pacientes apresentam maior risco de falha do tratamento, maior risco de recaída e maiores taxas de mortalidade (ALVAR et al., 2008). A infecção com o HIV e a leishmaniose apresentam problemas adicionais ao tratamento do paciente devido à falta de informações sobre a combinação de quimioterápicos (ULIANA et al., 2018). Outros problemas relacionados ao tratamento da leishmaniose são os econômicos (ENNES-VIDAL et al., 2017; ULIANA et al., 2017; ALVAR E ARANA, 2018).

2.1.4. Diagnóstico da leishmaniose tegumentar

Em relação ao diagnóstico clínico, observam-se lesões normalmente indolores e em áreas expostas da pele, de formato arredondado ou ovalado, bordas bem delimitadas e elevadas. No exame clínico deve-se investigar se o paciente vive em área endêmica ou se viajou para uma área endêmica (BRASIL, 2017).

Há relatos de lesões atípicas que podem ser confundidas com outras doenças como a hanseníase, paracoccidiodomicose, úlcera tropical, sífilis, tuberculose cutânea, micobactose atípica e esporotricose cutânea (MEIRELES et al., 2017). Portanto o diagnóstico é alcançado através de uma associação de características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais (REIS et al., 2008).

O diagnóstico laboratorial é o mais indicado para a comprovação da infecção pelo parasito. A investigação direta do parasito é o procedimento de primeira escolha por ser mais rápido, de menor custo e de fácil execução. A probabilidade de encontro do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea. Para sua

realização são utilizados esfregaços fixados e corados com Giemsa para identificar formas amastigotas (SHAW et al., 1989; BRASIL, 2017).

O parasito pode ser isolado no meio NNN/Schneider a partir de um fragmento de tecido removido da borda de uma lesão ativa. A cultura geralmente requer 3 a 10 dias para crescer e às vezes mais, dependendo da espécie. A amostra não deve ser descartada a menos que seja negativa por quatro semanas (FABER et al., 2003; MASMOUDI et al., 2013; BRASIL, 2017).

Podem ser empregados outros métodos como, por exemplo, a caracterização de *Leishmania* baseada em critérios bioquímicos (eletroforese de isoenzimas) ou critérios genéticos, usando vários métodos moleculares incluindo PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) e a técnica de anticorpos monoclonais com painel específico, que são usados para fins de diagnóstico e prognóstico e permitem uma melhor compreensão da epidemiologia da leishmaniose. Além destes, exames histopatológicos (coloração pela hematoxilina-eosina), sorológicos (imunofluorescência indireta e ELISA) e imunológicos, sendo que o principal e clássico é a Reação de Montenegro. Este teste revela a infecção por *Leishmania* e, portanto, é utilizado em estudos epidemiológicos, com uma sensibilidade de cerca de 90% (MASMOUDI et al., 2013; BRASIL, 2017).

2.1.5. Prevenção e Tratamento das Leishmanioses

A prevenção das leishmanioses baseia-se no controle de vetores e reservatórios combinada com a quimioterapia dos indivíduos infectados. No entanto, o controle de vetores e de reservatórios é difícil devido a problemas operacionais, tornando o desenvolvimento de uma vacina eficaz e acessível contra a leishmaniose como uma tarefa altamente desejável (DE LUCA & MACEDO, 2016).

A terapia convencional para todas as formas clínicas de leishmaniose inclui o uso de antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), como o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®), sendo que este último não é comercializado no Brasil (CROFT & YARDLEY, 2002; BRASIL, 2017). Com o objetivo de padronizar o esquema terapêutico, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose desse antimonial seja calculada em miligramas de antimônio pentavalente (Sb^{+5}) por quilograma de peso corporal por dia ($mg\ Sb^{+5}/kg/dia$), podendo ser utilizado via intramuscular (IM), endovenosa (EV: mais indicada por poder administrar quantidades maiores sem dor para o paciente) ou intralesional (IL: via

subcutânea, restrita para a forma clínica da leishmaniose cutânea localizada) (BRASIL, 2017).

O antimônio pentavalente comporta-se como pró-fármaco, passando por redução biológica a uma forma trivalente mais ativa e tóxica de antimônio, que exibe atividade antileishmanial (RAJASEKARAN & CHEN, 2015), por inibir a tripanotona redutase, aumentar as espécies reativas ao oxigênio (ROS) e também, possivelmente, inibir a biossíntese macromolecular em amastigotas (SINGH et al., 2016). Este medicamento tem o inconveniente de exigir administração parenteral a longo prazo, apresenta efeitos colaterais tóxicos graves, especialmente nos sistemas cardíaco, renal e hepático (MURRAY et al., 2005) e mostra diminuição progressiva da eficácia devido ao aparecimento de resistência em muitos países (CROFT et al., 2006; BALASEGARAM et al., 2012).

A anfotericina B, antibiótico poliênico de reconhecida ação de destruição de *Leishmania* intra e extracelular, possui como mecanismo de ação a interferência na biossíntese da membrana celular do parasita (MASMOUDI et al., 2013; BALASEGARAM et al., 2012). É o fármaco de segunda escolha, empregada nos casos de ausência de resposta ao tratamento com antimônio ou na impossibilidade de seu uso. É considerada mais eficaz que os antimônios no tratamento das lesões mucosas. É formulada em suspensão coloidal e comercializada em frascos-ampola com 50 mg, com dose de 0,7 a 1,0 mg/kg/dia, com dose total de 25 a 40 mg/kg. A dose máxima diária é de 50 mg, sendo administrada por EV (BALASEGARAM et al., 2012; BRASIL, 2017). A anfotericina B lipossomal, utilizada em dose total de 18 mg/kg em injeções intravenosas durante 10 dias, é mais indicada devido ao maior perfil de segurança presumido, mas o seu custo impede maior adesão do sistema público de saúde (NAKAMURA et al., 2006; BRASIL, 2017). Durante a terapia com anfotericina B, recomenda-se a monitorização da função renal, do fígado, eletrólitos séricos e dos componentes sanguíneos, como nitrogênio ureico e creatinina, para que sejam melhor controlados os efeitos adversos (BRASIL, 2017).

O isetionato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) de pentamidina é utilizado em diferentes protocolos para tratar a LT. A pentamidina interfere na síntese de DNA do parasita, levando à sua morte. Vários efeitos colaterais foram observados: hipertensão, taquicardia, problemas digestivos, problemas de pele, enzimas musculares elevadas, insuficiência renal e toxicidade pancreática, limitando o uso do medicamento como

primeira opção na LT. A aplicação poderá ser feita por via IM ou EV (MASMOUDI et al., 2013; BRASIL, 2017).

Miltefosina (hexadecilfosfocolina) é um agente antitumoral oral descoberto em 1980, que foi rapidamente abandonado devido à sua toxicidade hematológica (MOHEBALI et al., 2007). Em 2002, na Índia, foi introduzido como fármaco no tratamento terapêutico da leishmaniose visceral, representando grande avanço relacionado a possibilidade de administração via oral. É bem tolerado, possui efeitos adversos mais amenos (problemas digestivos, aumento da concentração de transaminases e creatinina). No entanto, as preocupações relacionadas à teratogenicidade, ao desenvolvimento de resistência e ao custo relativamente alto limitou seu uso (MOHEBALI et al., 2007; SUNDAR et al., 2012).

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídico de amplo espectro produzido a partir de filtrados de cultura de *Streptomyces krestomyceticus* e com atividade contra uma variedade de organismos Gram-positivos e negativos, micobactérias, protozoários. A atividade antileishmania da paromomicina foi demonstrada pela primeira vez na década de 1960 (KELINA, 1961; NEAL, 1968) e posteriormente confirmada *in vitro* e *in vivo* (NEAL et al., 1995). Este fármaco foi testado pela primeira vez no Quênia em 1980 para o tratamento da LV humana (CHUNGE et al., 1990). O mecanismo de ação da paromomicina na *Leishmania* não é conhecido, mas a síntese proteica tem sido proposta como alvo, baseada em grande parte em estudos em bactérias (SUNDAR et al., 2011; HWAN, 2016). Outros mecanismos possíveis foram propostos, incluindo a alteração da fluidez da membrana (MAAROUF et al., 1997a) e os efeitos no potencial da membrana mitocondrial (MAAROUF et al., 1997b). Quando administrada por via oral é pouco absorvida, o que limita seu uso às injeções intramusculares em LV (BEN SALAH et al., 2013).

O efeito colateral mais comum é dor no local da injeção, no entanto, isso geralmente não leva à descontinuação da terapia. Uma pequena fração dos pacientes experimenta os efeitos semelhantes a outros aminoglicosídeos, como ototoxicidade, instabilidade vestibular e nefrotoxicidade (SUNDAR et al., 2007; MCGWIRE & SATOSKAR, 2014).

2.2. Planejamento de novos compostos contra doenças negligenciadas

A pesquisa de novos compostos ativos antileishmania tem progredido significativamente, porém, um fármaco seguro, eficaz e de baixo custo ainda não foi

descoberto. Devido à falta de melhores terapias alternativas, a identificação de novos fármacos, compostos e alvos ainda é um assunto muito discutido e estudado por pesquisadores em todo o mundo (MISHRA & TIWARI, 2011).

Os produtos naturais são fonte potencial novos compostos para tratamento de doenças tropicais negligenciadas. A utilidade de produtos vegetais na descoberta e desenvolvimento de fármacos não é surpreendente, uma vez que os seres humanos vêm usando muitos materiais derivados de plantas, como seus metabólitos secundários, há muitos séculos (MISHRA & TIWARI, 2011).

Os produtos naturais são derivados do fenômeno da biodiversidade, em que interações entre os organismos e seu ambiente acabam por originar diversos compostos químicos complexos dentro dos organismos como meio de defesa das plantas contra microrganismos, insetos como compostos de sinalização para atrair animais polinizadores e dispersores de sementes, além de antioxidantes e protetores de UV (LEE, 2010; WINK, 2015). Através de uma abordagem de química medicinal, produtos naturais ou compostos já conhecidos com baixa bioatividade podem ser modificados sinteticamente para melhorar seus perfis farmacológicos. A síntese de novos compostos deve ser acompanhada por uma triagem de ensaio biológico apropriada para otimizar com sucesso um composto em um candidato a ensaio clínico (LEE, 2010).

Lignan e neolignan são um grupo de fenóis de ocorrência natural que são amplamente difundidos no reino vegetal, derivam da via biossintética do ácido chiquímico (chiquimato) e representam uma enorme classe de compostos farmacologicamente ativos (PAN et al., 2009; TEPONNO, et al, 2016).

O interesse nas neolignanas aumentou nos últimos anos, sendo relatadas propriedades leishmanicidas (AVENIENTE et al., 2007; VENDRAMETTO et al., 2010; NÉRIS et al., 2013), antitumorais (PIETERS et al., 1993; LEE, et al., 2004, ZHOU et al., 2009; LEÓN-DÍAZ et al., 2010; KANG et al., 2012), antimicrobianas, tripanocidas (CABRAL et al., 2010; PELIZZARO-ROCHA et al., 2011) e antimaláricas (ZHANG et al., 2001).

Uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Química Farmacêutica da UFMS (LASQUIM) é a modificação molecular de derivados das neolignanas veraguensina **1**, grandisina **2** e machilina G **3**, com objetivo de encontrar novos potenciais candidatos a fármacos úteis contra Leishmanioses e outras doenças negligenciadas. Desde 2009, o LASQUIM desenvolve pesquisas relacionadas, conforme pode ser visualizado na Figura 3 (SOARES, 2012).

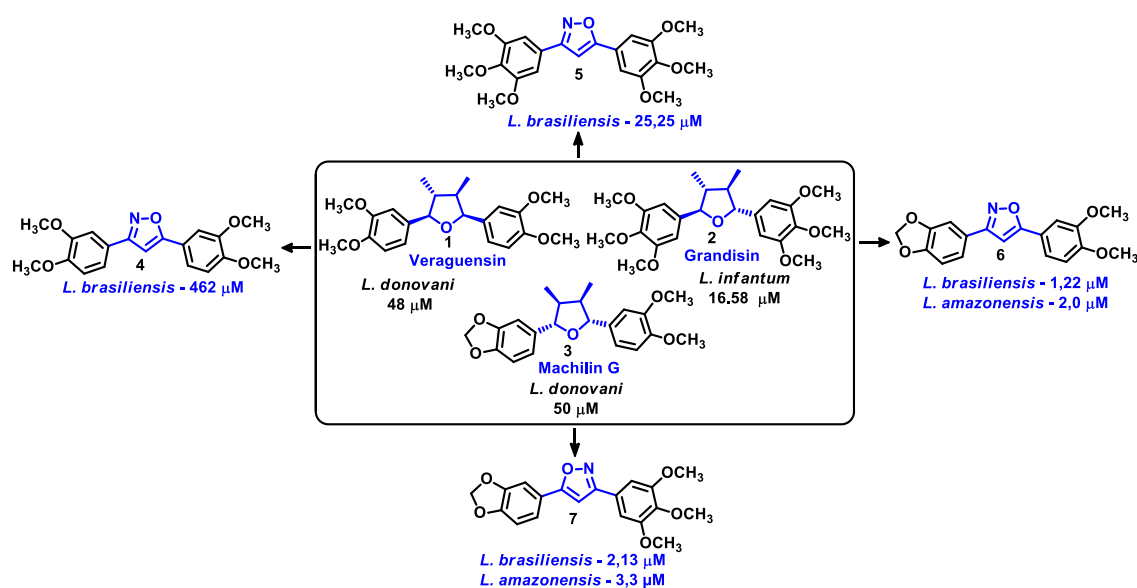


Figura 3: Substituição bioisostérica nas neolignanas formando compostos isoxazólicos com atividade melhorada em resultados obtidos pelo LASQUIM para teste de atividade antileishmania em formas promastigotas.

Dentre os compostos sintetizados, o derivado isoxazólico da veraguensina **4** ($CI_{50} = 462 \mu\text{M}$) e o derivado da grandisina **5** ($CI_{50} = 25,25 \mu\text{M}$) não foi ativo e teve atividade moderada antileishmania, respectivamente. Enquanto o derivado isoxazólico da machilina G **6** CI_{50} (1,22 μM e 2,0 μM) e o híbrido da machilina G e grandisina **7** (CI_{50} de 2,13 μM e 3,3 μM) mostraram resultados excelentes, para *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*, respectivamente (SOARES, 2012).

Para a síntese destes compostos, foi utilizada como estratégia de modificação molecular a substituição bioisostérica, que refere-se a compostos ou subunidades estruturais de compostos bioativos que apresentem volumes moleculares, formas, distribuições eletrônicas e propriedades físicoquímicas semelhantes, capazes de apresentar propriedades biológicas similares (BARREIRO & FRAGA, 2008). A troca bioisostérica do grupo tetrahydrofurano pelo grupo isoxazólico permitiu a descoberta de compostos mais potentes contra leishmanioses do que as neolignanas originais (SOARES, 2012).

Para a realização deste trabalho, também foi utilizada a hibridização molecular como estratégia de modificação molecular. Esta estratégia apresenta como fundamento a reunião de subunidades farmacofóricas parciais de compostos bioativos distintos em uma nova estrutura, podendo apresentar padrões originais ou conjugar as duas

atividades farmacológicas em uma única molécula, formando um novo composto com características duais (KOLB et al., 2001; LASAR et al., 2004, BARREIRO & FRAGA, 2008).

Considerando a necessidade de se sintetizar bibliotecas químicas extensas para obtenção de informações sobre a relação estrutura-atividade (REA) em química medicinal, estratégias de síntese utilizando reações de cicloadição [3+2] de Huisgen, conhecida como “click chemistry”, tem sido foco de pesquisa de vários grupos no âmbito mundial com o objetivo de se obter novos compostos bioativos (TORNOE et al., 2002; MENEGATTI et al., 2003; MELO et al., 2006; COLOMBANO et al., 2010).

Os heterocíclicos nitrogenados são importantes particularmente no que se refere ao seu uso como medicamentos mundialmente consumidos. Um heterocíclico que pode ser obtido por “click chemistry” e tem despertado grande interesse em química medicinal e em nosso laboratório são os anéis isoxazóis. Este heterociclo vêm sendo utilizado em potentes agonistas de receptores de dopamina tipo D4 (ROWLEY et al., 1996), antagonistas do GABA (ROWLEY et al., 1996; FROLUND et al., 2002), compostos com atividade anti-inflamatória (DAIDONE et al., 1999), antiulcerogênica (FROLUND, et al., 2002), antimicrobiana (PIRRUNG et al., 2002), antifúngica (PIRRUNG et al., 2002), anti-inflamatórios inibidores específicos da COX-2 (DAIDONE et al., 1999), antinociceptiva (GIOVANNONI et al., 2003) e anti-câncer (LI et al., 2003).

Isoxazóis possuem um pK_{aH} de -3,0, contendo um nitrogênio em um ambiente análogo ao da piridina, onde o nitrogênio fica com um par de elétrons solitários em um orbital sp^2 no plano do anel e não envolvido na aromaticidade, e no oxigênio, um dos pares de elétrons, faz parte da aromaticidade do mesmo (CARLSEN et al., 1992; JOULE & MILLS, 2013). A aromaticidade do anel isoxazol, associada à proximidade entre o nitrogênio e o oxigênio, faz com que o mesmo não se ionize em pH fisiológico. Por outro lado, o anel isoxazólico, por ser mais polar, pode favorecer um maior perfil de solubilidade em água, e ao mesmo tempo pode participar de interações de ponte de hidrogênio como aceptores de ligação de hidrogênio com o sítio alvo.

A família dos nitroderivados são compostos particularmente úteis contra doenças negligenciadas. A nitrofurazona **8** (CHUNG et al., 2003), o nifurtimox **9** (PAULINO et al., 2005; WOSTER, 2007), a nifuroxazida **10** (RANDO et al., 2008), o benzonidazol **11** (PAULINO et al., 2005; WOSTER, 2007), o megazol **12** (CHAUVIÈRE et al., 2003) e o fexinidazol **13** (TORREELE et al., 2010) são exemplos de fármacos antibacterianos

e antiprotozoários que tem sido objeto de estudo no âmbito mundial como moléculas líderes na busca de novas entidades químicas contra doenças negligenciadas (Figura 4).

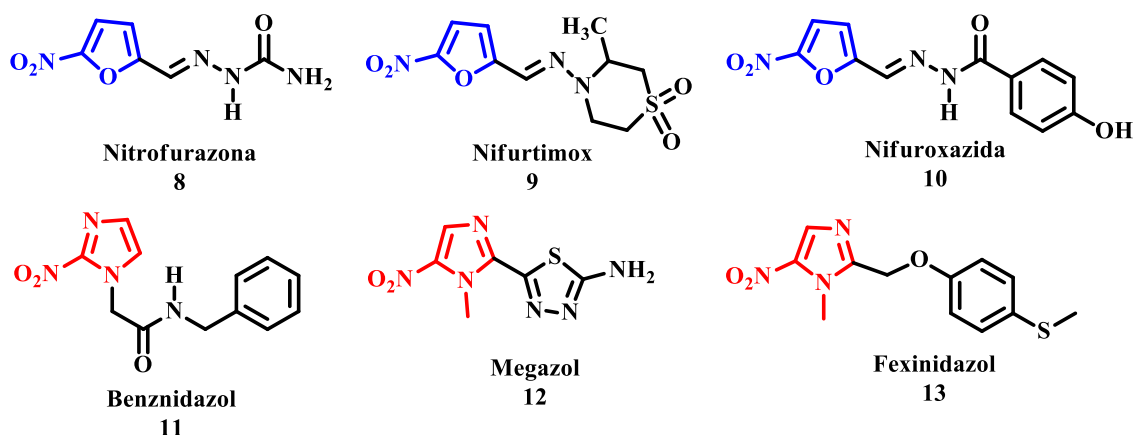


Figura 4: Nitroderivados com potencial atividade contra doenças negligenciadas.

Apesar dos efeitos colaterais dos nitrocompostos **8-10**, a nitrofurazona **8** e, principalmente, seu farmacóforo (nitrofurânico), é utilizada como modelo no desenho de novos análogos com atividade antitrypanosoma e antileishmania (CHUNG et al., 2003) sendo utilizado neste presente estudo.

O nitroimidazol megazol **12** foi abandonado como potencial candidato a fármaco contra *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei*, por apresentar genotoxicidade (BOURDIN-TRUNZ et al., 2011). O benznidazol **11**, apesar de estar associado a vários efeitos adversos, ainda é a fármaco de escolha no tratamento contra o *T. cruzi* no Brasil (FIOCRUZ, 2017). Porém, o nitroimidazol fexinidazol **13** não possui efeitos de genotoxicidade em humanos e possui uma ótima atividade antileishmania (CI₅₀: 5,6 µm para *L. donivani* (WILLIE et al., 2012) (BOURDIN-TRUNZ et al., 2011; TWEATS et al., 2012), mostrando que processos de modificação molecular continuam a ser úteis no desenho de novos compostos nitroheterocíclicos e, como consequência, para a obtenção de futuros candidatos a fármacos contra doenças negligenciadas.

A modificação estrutural é fundamental para diminuir toxicidade e também melhorar biodisponibilidade oral, sendo considerada uma importante característica para o desenvolvimento de moléculas bioativas. Um fármaco oral para o tratamento das doenças negligenciadas aumentaria a adesão e provavelmente diminuiria consideravelmente o elevado custo do tratamento.

Os compostos devem estar dentro da regra dos cinco de Lipinski, estabelecendo que um bom fármaco deve apresentar log P menor ou igual a 5; massa molecular menor ou igual a 500 Da; grupos aceptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10 e grupos doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5 (LIPINSKI et al., 1997)

Apesar das preocupações de segurança válidas relacionadas aos compostos nitroaromáticos, há um interesse contínuo em seu uso no plano terapêutico, particularmente para doenças infecciosas e câncer. Nestes casos, o objetivo é desenvolver compostos que sejam seletivamente tóxicos, de tal modo que o composto estimule a morte do agente infeccioso e/ou células cancerígenas sem prejudicar as células hospedeiras (STRAUS, 1979).

Dada a necessidade urgente de novos fármacos para o tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos e a eficácia dos nitro-fármacos existentes para estas indicações, vários laboratórios mostraram-se dispostos a identificar e desenvolver compostos anti-tripanosomatídeos nitroaromáticos (ZHOU et al., 2013; PAPADOPOULOU et al., 2013; VOAK et al., 2013). A iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas (DNDi) escolheu ativamente investigar compostos nitroaromáticos (TORREELE et al., 2010). Suas investigações mostraram-se frutíferas, resultando em um portfólio com vários compostos nitroaromáticos com ação antitripanossomatídea (PATTERSON & WYLLIE, 2014).

O redirecionamento de fármacos ou candidatos clínicos tem sido utilizado na indústria farmacêutica, com o objetivo de encontrar novas possíveis aplicações terapêuticas, entre elas às doenças negligenciadas. De fato, o uso de nifurtimox para tratar tripanossomíase africana humana (HAT) (PRIOTTO et al., 2009) e o desenvolvimento de fexinidazol para LV (WYLLIE et al., 2012) são exemplos de reutilização de nitroaromáticos para doenças de tripanosomatídeos (PATTERSON & WYLLIE, 2014).

Após o planejamento e desenvolvimento de novos candidatos à fármacos antiparasitários, são necessárias estratégias para validação dos mesmos. Uma das estratégias baseia-se na triagem inicial de bibliotecas de compostos empregando modelos de cultura *in vitro* adequados, seguidos de estudos em um modelo *in vivo* adequado. Investigações em alvos potenciais são realizadas após a confirmação da eficácia de um determinado composto. Atualmente, todas os fármacos antiparasitários disponíveis no mercado foram identificadas por meio dessa abordagem, portanto, essa

estratégia ainda fornece uma importante fonte de candidatos a medicamentos (GAMO et al., 2010; STEYN et al., 2011; MOINE et al., 2015).

Dentro deste contexto, este trabalho buscou avaliar a atividade antileishmania *in vitro* de uma nova biblioteca de compostos nitroheterocíclicos com o anel isoxazólico a fim de desenvolver novos compostos úteis contra leishmanioses.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antileishmania de 22 novos análogos nitroheterocíclicos isoxazólicos com variados padrões de substituição.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade *in vitro* dos análogos nitroheterocíclicos isoxazólicos sintetizados, contra as formas promastigotas e formas amastigotas intracelulares de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*;
- Avaliar o efeito citotóxico dos compostos nitroheterocíclicos isoxazólicos em células de mamífero (fibroblastos NIH/3T3), a fim de determinar sua seletividade para os parasitos;
- Avaliar a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, tratados *in vitro* com diferentes concentrações dos análogos nitroheterocíclicos isoxazólicos sintetizados, para investigar possível mecanismo de ação leishmanicida.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e substâncias

Os compostos **14** – **35** (Figura 6) foram previamente sintetizados no Laboratório de Química Farmacêutica (LASQUIM) e identificados quanto à estrutura.

Para a síntese desses nitroheterocíclicos, dois blocos de construção, acetilenos terminais e cloro-oximas, foram unidos através de uma reação de cicloadição [3+2]. Esta abordagem permite a união do grupo farmacofórico nitrofurânico, com elementos estruturais que permitem a criação de uma série de compostos com boa diversidade química (Figuras 5 e 6).

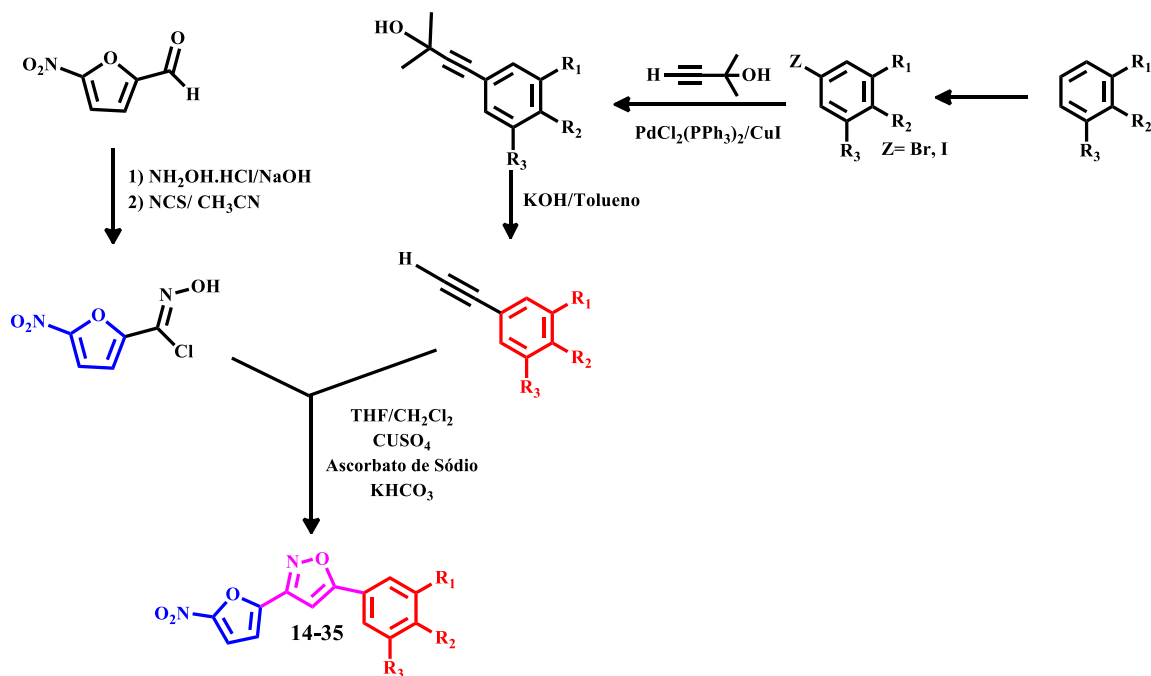


Figura 5: Rota sintética para a obtenção dos nitroheterocíclicos isoxazólicos.

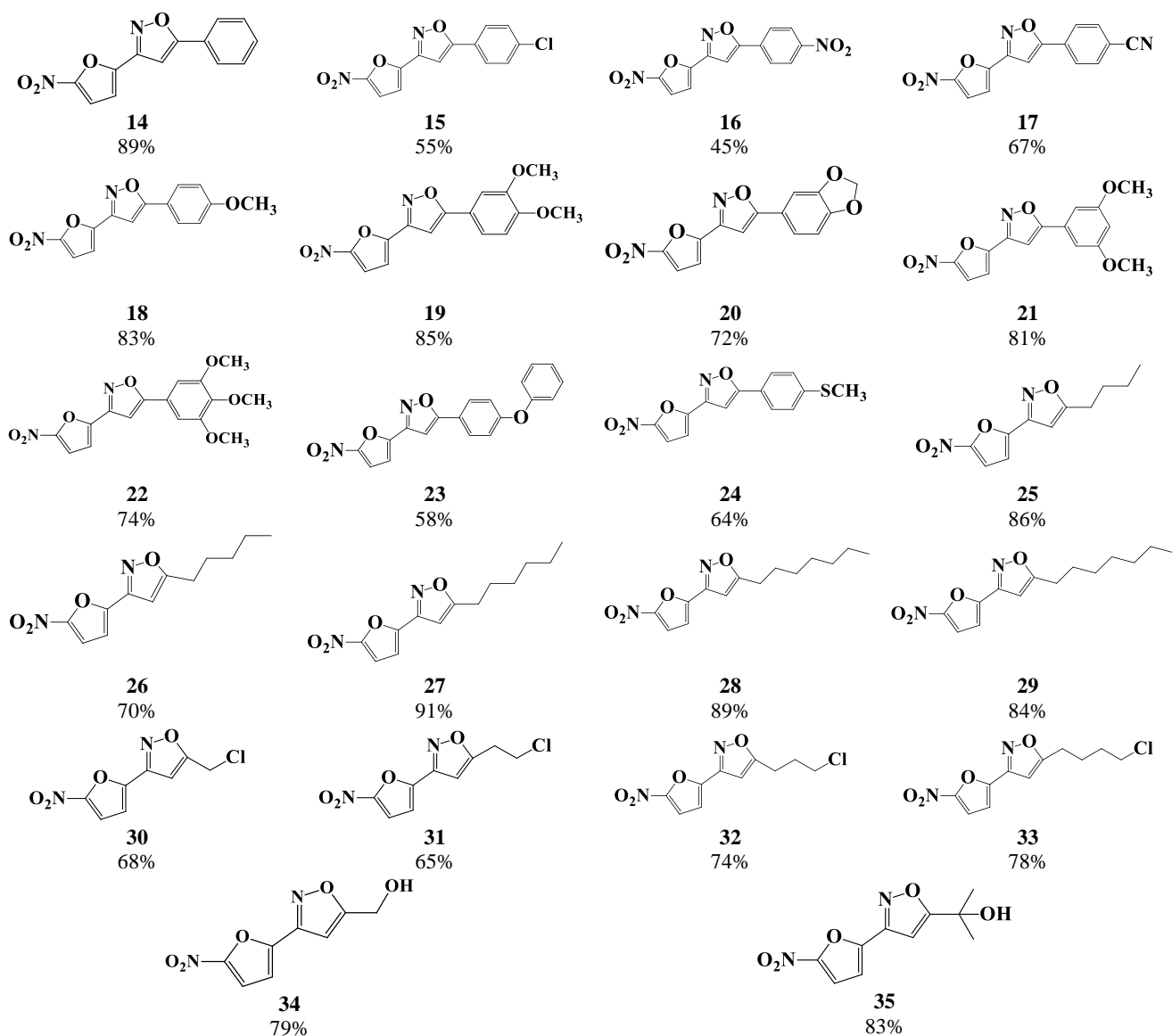


Figura 6: Compostos sintetizados que foram testados quanto à atividade antileishmania e seus respectivos rendimentos.

4.2. Animais

Camundongos BALB/c fêmeas (4-5 semanas) foram obtidos do Biotério Central do Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Campo Grande, MS, Brasil). Os animais apresentavam boas condições de saúde e estavam livres de patógenos comuns aos roedores. Foram mantidos em mini-isoladores acoplados a rack ventilado (Alesco®), em boas condições de higiene, a 25°C±1°C, com ciclos de 12 horas claro/escuro, sendo alimentados com ração balanceada comercial (Nuvilab CR-1®, Nuvital®) e hidratados com água *ad libitum*. A pesquisa foi aprovada

pela Comissão de Ética e Experimentação animal da UFMS (Parecer No. 847/2017) (Anexo).

4.3. Parasitos

Para a realização dos ensaios de atividade antileishmania *in vitro* foi utilizada a cepa padrão IFLA/BR/1967/pH8 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. As formas amastigotas foram rotineiramente isoladas de camundongos BALB/c previamente infectados e mantidas como formas promastigotas em meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich®), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich®), 10.000 U/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) a 26°C.

4.4. Atividade *in vitro* contra formas promastigotas

Em microplacas de 96 poços, em quintuplicata, formas promastigotas (10^6 /mL) em fase log de crescimento em Schneider's Insect Medium (Sigma-Aldrich®) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cultilab®), 10.000 unidades/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®), foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos previamente sintetizados (0,78-50 µg/mL). Pentamidina (Sigma-Aldrich®; 12,5-100 µg/mL) foi utilizada como droga de referência, e o meio de cultura sozinho como controle negativo. As microplacas foram incubadas a 26°C em 5% CO₂ por 72 h (BRAGA et al., 2007). A viabilidade celular foi determinada por meio da adição de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrasodium] (Sigma-Aldrich®; 5 mg/mL). As placas foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 4 h e, em seguida, a absorbância estimada em espectrofotômetro, com comprimento de onda a 540 nm. A atividade das amostras foi expressa através da concentração inibitória de 50% do crescimento (CI₅₀), calculada pelo Programa GraphPad Prism 5.0 por meio de curva de regressão não linear.

4.5. Atividade *in vitro* sobre formas amastigotas intracelulares

Macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos BALB/c, eutanasiados através de deslocamento cervical. Para isso, após assepsia do abdômen, foram injetados, na cavidade peritoneal, 10 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) contendo 10.000 unidades/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®). Após massagem da área, o líquido foi aspirado e transferido para tubos mantidos em gelo. As células peritoneais foram quantificadas em câmara de Neubauer após exclusão em Azul

de Trypan (Sigma-Aldrich®) e distribuídas (1×10^6 células/poço) em placas de 24 poços contendo lamínulas, em sextuplicata. Após uma hora de incubação a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$, as células foram infectadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária (4×10^6 células/poço) e incubadas a $35^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Após 4 h, as células infectadas foram tratadas com os diferentes compostos (6,25-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por 24 h a $35^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Anfotericina B (Sigma-Aldrich®; 0,25-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e pentamidina (Sigma-Aldrich®; 6,25-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram utilizadas como fármacos de referência. Células infectadas cultivadas em meio sem tratamento foram utilizadas como controle negativo. Após o tratamento, as lamínulas foram retiradas, fixadas e coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich®) diluído a 1:10 em água destilada (COSTA et al., 2016). O número médio de amastigotas por célula foi calculado pela contagem de 200 células por lamínula e a concentração inibitória de 50% (CI_{50}) foi determinada através de curva dose-resposta de regressão não-linear.

4.6. Dosagem de óxido nítrico (NO)

A produção de NO pelas células peritoneais infectadas e tratadas com os diferentes compostos foi avaliada pela reação de Griess (DING et al., 1988). 50 μL dos sobrenadantes das culturas foram incubados com 50 μL de reagente de Griess à temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 550 nm. Os resultados foram expressos como média e erro-padrão. Os dados foram analisados por ANOVA de fator único com pós-teste de Tukey e considerados significantes quando $p \leq 0,05$.

4.7. Efeito citotóxico em células de mamífero

Cem microlitros de suspensão de fibroblastos murinos NIH/3T3 (Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil) foram semeados em placas de 96 poços ($1 \times 10^5/\text{mL}$ em meio RPMI 1640, Sigma-Aldrich®). Após 24h, os compostos foram adicionados nas concentrações 0,25–250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Anfotericina B (Sigma-Aldrich®, 0,025–25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi utilizada como droga de referência e as células foram incubadas a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ por 48 h, a fim de estimar a CI_{50} . O crescimento celular foi avaliado por meio do método colorimétrico da sulforrodamina B (SKEHAN et al., 1990), sendo obtidas as absorbâncias: amostras-teste (T), controle negativo (CN), branco das amostras-teste (B) e a leitura do início da incubação, ou seja, antes da adição das amostras-teste (AT). Em todos os experimentos foi incluído um controle negativo (DMSO, na maior

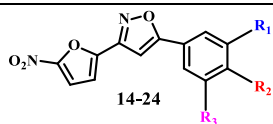
concentração utilizada para as amostras). A porcentagem de crescimento de cada amostra foi calculada em programa Softmaxmex Pro 6.3 segundo Monks et al. (1991). A concentração inibitória em 50% (CI₅₀) foi determinada por curva de regressão não linear (MicrocalOrigin Versão 6.0). O índice de seletividade (IS) foi determinado pela CI₅₀ encontrada no experimento de citotoxicidade/ CI₅₀ de cada atividade antileishmania (Medeiros et al. ,2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antileishmania para as formas promastigotas dos compostos nitrofurânicos (Tabela 1 e 2) foram expressas em concentração inibitória em 50% (CI_{50}) e utilizada como base para avaliação a escala descrita por Upegui et al., (2014), em que compostos com $CI_{50} < 20,0 \mu\text{M}$ foram considerados ativos, CI_{50} entre 20,0 e 50,0 μM foram moderadamente ativos e compostos com $CI_{50} > 50,0 \mu\text{M}$ foram considerados inativos.

Tabela 1: Massa molecular, coeficiente de partição e atividades antileishmania *in vitro* de compostos nitrofurânicos isoxazólicos com anel aromático.



Compostos	R ₁	R ₂	R ₃	MM	ClogP ^a	NIH/3T3 CI ₅₀ (μM) ^b	Promastigota CI ₅₀ (μM) ^c	IS ^d	Amastigota Intracelular CI ₅₀ (μM) ^e	IS ^f
14	-H	-H	-H	256,22	3,24	28,47 ± 0,25	7,93 ± 0,5	3,59	34,01 ±	0,84
15	-H	-Cl	-H	290,66	3,92	> 250	7,08 ± 0,8	35,31	23,05 ± 1,3	10,84
16	-H	-NO ₂	-H	301,21	3,20	nc ^h	> 166,00 ± 2,2	nc ^h	>166,00 ± 2,2	nc ^h
17	-H	-CN	-H	281,23	2,99	> 250	> 177,79 ± 2,2	1,41	41,39 ± 1,6	6,04
18	-H	-OCH ₃	-H	286,24	3,29	25,39 ± 4,89	5,99 ± 0,7	25,39	31,81 ± 1,5	0,80
19	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	316,27	2,88	36,40 ± 4,25	7,78 ± 0,8	4,68	14,66 ± 1,1	2,48
20	-OCH ₂ O-		H	300,23	3,13	43,36 ± 6,01	16,39 ± 1,2	2,64	7,02 ± 0,8	6,18
21	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	316,27	3,28	> 250	> 158,09 ± 2,2	1,58	19,52 ± 1,3	12,80
22	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	346,30	2,87	25,07 ± 2,13	> 144,38 ± 2,1	0,17	1,24 ± 0,0	20,22
23	-H	-OC ₆ H ₅	-H	348,31	4,99	> 250	1,76 ± 0,2	142,04	16,63 ± 1,2	15,25
24	-H	-SCH ₃	-H	302,31	3,67	57,94 ± 8,50	16,76 ± 1,2	3,46	5,69 ± 0,7	10,18
Doxurubicina^g	-	-	-	-	-	0,77 ± 0,04	-	-	-	-
Glucantime^g	-	-	-	-	-	>250	-	-	-	-
Pentamidina^g	-	-	-	-	-	27,54 ± 3,12	8,9	-	3,3	-
Anfotericina B^g	-	-	-	-	-	2,61 ± 0,07	-	-	0,054	-

^aLog P: coeficiente de partição octanol/água (© Molinspiration Cheminformatics 2017); ^b CI₅₀: concentração inibitória média em células de fibroblastos NIH/3T3; ^c CI₅₀: concentração inibitória média em promastigota de *L. amazonensis*; ^d IS: (índice de seletividade), CI₅₀ em células de mamíferos/ CI₅₀ em promastigotas; ^e CI₅₀: concentração inibitória média em amastigota intracelular de *L. amazonensis*; ^f IS: (índice de seletividade), CI₅₀ em células de mamíferos/ CI₅₀ em amastigotas intracelulares; ^g Controles positivos: pentamidina e anfotericina B para *L. (L.) amazonensis* e doxorubicina para fibroblastos.

Tabela 2: Massa molecular, coeficiente de partição e atividades antileishmania *in vitro* de compostos nitrofurânicos isoxazólicos com cadeia alifática.

25 - 35

Compostos	R ₁	MM	ClogP ^a	NIH/3T3 CI ₅₀ (μM) ^b	Promastigota CI ₅₀ (μM) ^c	IS ^d	Amastigota Intracelular CI ₅₀ (μM) ^e	IS ^f
25	-C ₄ H ₉	236,23	3,17	24, 17 ± 1,60	> 211,66 ± 2,3	0,11	39,17 ± 1,6	0,61
26	-C ₅ H ₁₁	250,25	3,68	nc ^h	>199,80 ± 2,3	nc ^h	19,42 ± 1,2	nc ^h
27	-C ₆ H ₁₃	264,28	4,19	23, 98 ± 1,48	16,43 ± 1,2	1,46	36,88 ± 1,6	0,65
28	-C ₇ H ₁₅	278,31	4,69	> 250	3,28 ± 0,5	76,22	64,39 ± 1,8	3,88
29	-C ₈ H ₁₇	292,33	5,20	68, 05 ± 5,80	6,07 ± 0,7	11,21	8,55 ± 0,9	7,96
30	-CH ₂ Cl	228,59	2,13	3,12 ± 0,14	3,55 ± 0,5	0,88	0,69 ± 0,1	4,52
31	-C ₂ H ₃ Cl	242,62	2,34	4,97 ± 2,35	2,95 ± 0,9	1,68	3,16 ± 0,4	1,57
32	-C ₃ H ₆ Cl	256,64	2,61	7,02 ± 3,74	0,88 ± 0,0	7,98	3,78 ± 0,5	1,86
33	-C ₄ H ₈ Cl	270,67	2,88	3,35 ± 0,40	1,84 ± 0,3	1,82	4,09 ± 0,6	0,82
34	-CH ₂ OH	210,15	0,90	230,49 ± 4,64	75,56 ± 1,9	3,05	> 237,92 ± 2,3	0,97
35	-C(CH ₃) ₂ OH	238,20	1,71	39,39 ± 8,95	18,79 ± 1,3	2,09	13,28 ± 1,1	2,97
Doxurubicina^g	-	-	-	0,77 ± 0,04	-	-	-	-
Glucantime^g	-	-	-	>250	-	-	-	-
Pentamidina^g	-	-	-	27,54 ± 3,12	8,9	-	3,3	-
Anfotericina B^g	-	-	-	2,61 ± 0,07	-	-	0,054	-

^aLog P: coeficiente de partição octanol/água (© Molinspiration Cheminformatics 2017); ^bCI₅₀: concentração inibitória média em células de fibroblastos NIH/3T3; ^cCI₅₀: concentração inibitória média em promastigota de *L. amazonensis*; ^dIS: (índice de seletividade), CI₅₀ em células de mamíferos/ CI₅₀ em promastigotas; ^eCI₅₀: concentração inibitória média em amastigota intracelular de *L. amazonensis*; ^fIS: (índice de seletividade), CI₅₀ em células de mamíferos/ CI₅₀ em amastigotas intracelulares; ^gControles positivos: pentamidina e anfotericina B para *L. (L.) amazonensis* e doxorubicina para fibroblastos.

De acordo com os resultados para as formas promastigotas de *L. amazonensis* apresentados na Tabela 1, observamos que os compostos **14** e **15** foram ativos (CI_{50} de 7,93 e 7,08 μM respectivamente). Quanto às formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, os compostos **14** e **15** apresentaram moderada atividade com $CI_{50} = 34,01$ e 23,05 μM respectivamente. O composto **16** contendo o grupo $R_2 = \text{NO}_2$ foi inativo para as formas promastigotas e amastigotas. O composto **17** não foi ativo contra as formas promastigotas, porém mostrou atividade moderada contra as formas amastigotas ($CI_{50} = 41,39 \mu\text{M}$).

Os compostos contendo grupos doadores de elétrons apresentaram diferentes perfis de atividades antileishmania. Os compostos **18-20** contendo metoxilas na posição 4-, 3,4- e contendo o grupo metilenodioxila, respectivamente, foram mais ativos para as formas promastigotas ($CI_{50} = 5,99, 7,78$ e 16,39 μM) que os compostos **21** e **22**, com padrões de substituição nas posições 3,5 e 3,4,5-. O composto **22** contendo o grupo -O-Ph mostrou CI_{50} de 1,76 μM contra as formas promastigotas. Por outro lado, os compostos **18, 19, 21** e **23** tiveram uma CI_{50} de 14,66 a 31,81 μM contra as formas amastigotas intracelulares.

O composto contendo o grupo -SCH₃ **24** foi menos ativo contra as formas promastigotas ($CI_{50} = 16,76 \mu\text{M}$) que seu congênere **18** contendo o grupo OCH₃, porém demonstrou-se ser mais ativo contra as formas amastigotas ($CI_{50} = 5,69 \mu\text{M}$).

O composto contendo o grupo metilenodioxila **20** apresentou $CI_{50} = 7,02 \mu\text{M}$ contra as formas amastigotas intracelulares e o composto trimetoxilado **22** é o grande destaque da série aromática com uma CI_{50} igual a 1,24 μM contra as formas amastigotas, sendo mais ativo que o controle, a pentamidina ($CI_{50} = 3,3 \mu\text{M}$) sobre esta forma.

Através de uma análise parcial da relação estrutura-atividade (REA), pode-se inferir que os compostos monometoxilado **18** e dimetoxilados **19** e **21** são menos ativos que o composto trimetoxilado **22** para as formas amastigotas. Este padrão foi também encontrado em estudos anteriores em processos de modificação molecular das neolignanas tetrahidrofurânicas veraguensina e grandisina, no qual os compostos mais ativos para as formas amastigotas continham o grupamento 3,4,5-trimetoxi como padrão de substituição em um dos anéis (COSTA et al., 2016).

Pode ser observado na Tabela 2 que compostos de cadeia alifática da série **27-29** com maior cadeia alquílica e, portanto, Log P maior são mais ativos contra as formas promastigotas. Porém, para as formas amastigotas este padrão não é seguido.

Por outro lado, o composto **29** que possui o maior coeficiente de partição (Log P = 5,2) mostrou ótima atividade tanto para as formas promastigotas quanto amastigotas com valores de CI_{50} de 6,07 e 8,55 μM respectivamente.

Outro padrão de compostos sintetizados foram os produtos de cadeia alifática, com o cloro (Cl) ligado em sua extremidade. Os compostos **32** ($CI_{50} = 0,88 \mu\text{M}$) e **33** ($CI_{50} = 1,84 \mu\text{M}$) apresentaram bons resultados contra as formas promastigotas, indicando uma tendência de maior potência quanto maior o Log P.

Porém a análise desta série quanto à atividade nas formas amastigotas indica um resultado inverso, sendo que o composto **30** ($CI_{50} = 0,69 \mu\text{M}$) contendo o menor número de grupos metílicos, e menor coeficiente de partição (Log P = 2,13), é mais potente que os seus homólogos correspondentes **31-33**.

Os resultados obtidos com esta última série **30-33** podem indicar que no sítio ativo, além das interações hidrofóbicas existentes, também existe a possibilidade de haver a formação de ligações covalentes, devido a um possível ataque de um nucleófilo, presente no sítio ativo, ao carbono eletrofílico ligado ao cloro, o que pode explicar em teoria, a maior atividade destes compostos frente à série alifática.

Os compostos **34** e **35** tiveram diferentes atividades antileishmania, sendo este último mais ativo (CI_{50} promastigotas = 18,79 μM e CI_{50} amastigotas = 13,28 μM).

Os compostos sintetizados mostraram uma baixa seletividade quanto ao teste de citotoxicidade em relação as atividades antileishmania. Existe a necessidade de um estudo para desenvolver um sistema de distribuição mais seletivo que ajude a diminuir a toxicidade destes. Se faz necessário promover novas modificações estruturais para que possamos manter ou elevar a potência desses compostos e eliminar a toxicidade desses compostos, para que esses relevantes resultados sejam também obtidos na atividade *in vivo* para desenvolver fármacos que tratem de forma mais eficaz a leishmaniose.

5.1. Comparativo da produção de óxido nítrico com as atividades biológicas

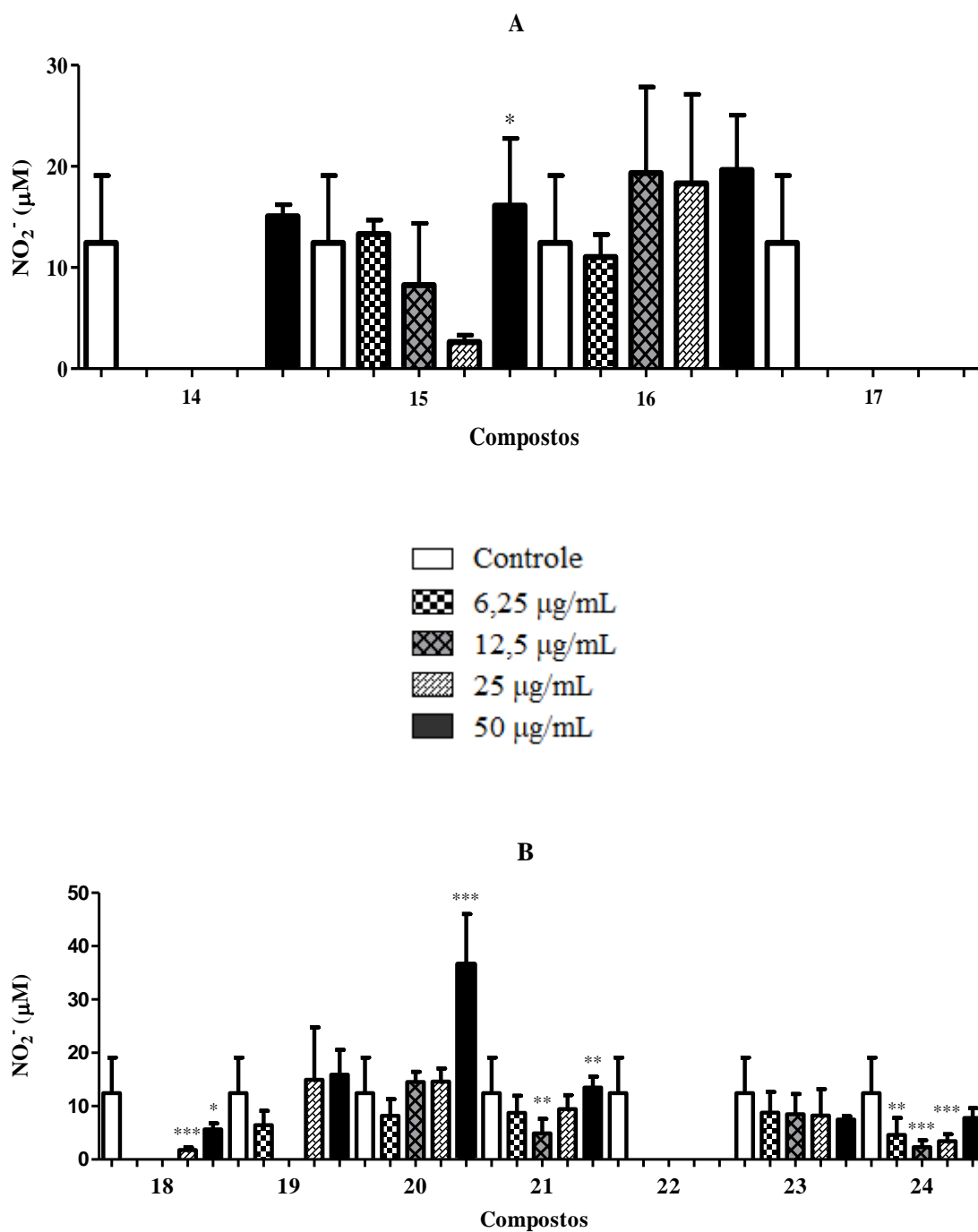


Figura 7: Liberação de óxido nítrico por macrófagos infectados por *L. amazonensis*, após 24 horas de tratamento com os compostos nitroheterocíclicos isoxazólicos que possuem anel aromático. Barras representam a média \pm DP de seis repetições. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,0001$ para as diferentes concentrações comparadas às células não tratadas (controle) e entre concentrações (ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey). (A) Série de compostos que possuem ligado ao anel aromático grupos retiradores de elétrons; (B) Série de compostos que possuem ligado ao anel aromático grupos doadores de elétrons.

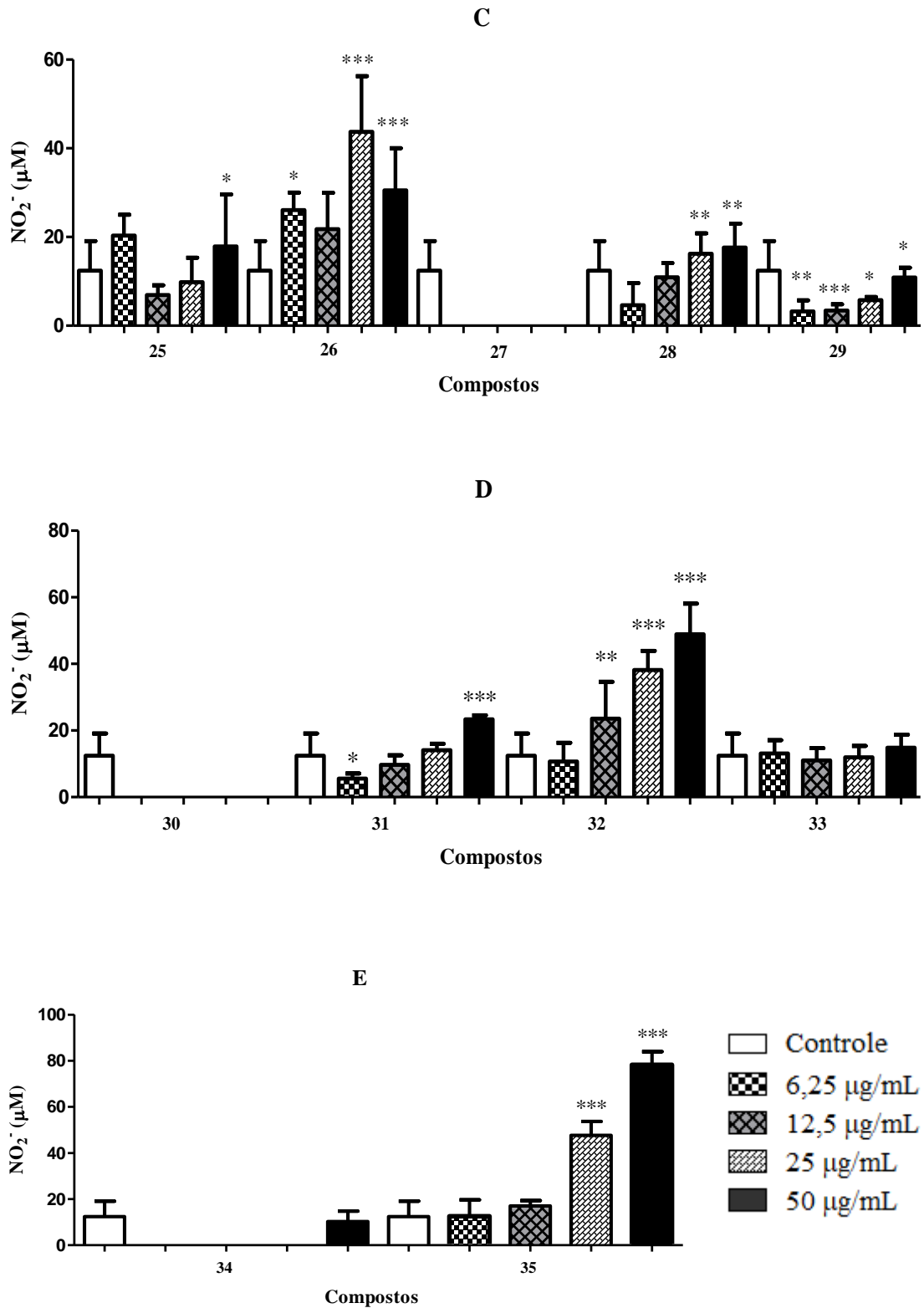


Figura 8: Liberação de óxido nítrico por macrófagos infectados por *L. amazonensis*, após 24 horas de tratamento com os compostos nitroheterocíclicos isoxazólicos com cadeia lateral alifática. Barras representam a média \pm DP de seis repetições. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,0001$ para as diferentes concentrações comparadas às células não tratadas e entre concentrações (controle) (ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey). (C) Série de compostos de cadeia alifática (D) Série de compostos de cadeia alifática com Cl ligado a sua extremidade (E) Série de compostos de cadeia alifática com OH ligados a sua extremidade.

Relatos na literatura têm demonstrado que o óxido nítrico é um mediador importante no combate dos macrófagos às formas amastigotas de leishmanioses (COSTA et al, 2016). Neste trabalho foram realizados ensaios visando à obtenção de informações que pudessem indicar uma possível associação da produção de NO com a atividade antileishmania dos compostos sintetizados.

Dos compostos com grupos retiradores de elétrons, apenas o composto **15** obteve uma diferença significativa na produção de NO na maior concentração (50 µg/mL) em relação a concentração de 25 µg/mL, porém abaixo do controle.

Dos compostos com grupos doadores de elétrons, os compostos **19** (CI₅₀: 14,66 µM), **21** (CI₅₀: 19,52 µM) e **24** (CI₅₀: 16,63 µM) estão na faixa de compostos ativos, <20 µM. O composto **21** apresentou uma maior e significativa produção de NO na maior concentração de 50 µg/mL em relação à concentração 12,5 µg/mL.

Apesar do composto trimetoxilado **22** ter alcançado uma CI₅₀ de 1,24 µM, não houve indução da produção de NO que indicasse uma possível associação da atividade antileishmania com este mediador. O composto **20** (CI₅₀ = 7,02 µM) induziu a produção significativa de NO na concentração de 50,0 µg/mL em relação ao controle, podendo ser o NO um dos responsáveis pelo seu mecanismo de ação. Já no composto **24** que mostrou uma CI₅₀ de 5,69 µM, houve diferença na produção de NO pelos macrófagos entre as concentrações de 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL, porém a indução de NO ocorreu abaixo do controle.

Dos compostos de cadeia alifática descritos na tabela 2, apenas o composto **29** foi ativo contra as formas amastigotas intracelulares, no entanto a indução da produção de NO não superou o controle diferente dos homólogos **25-28**.

Dos compostos contendo cloro na extremidade da cadeia alifática para os testes em amastigotas intracelulares, o **30** (CI₅₀ = 0,69 µM), **31** (CI₅₀ = 3,16 µM), **32** (CI₅₀ = 3,78 µM) e **33** (CI₅₀ = 4,09 µM) temos uma série com atividade antileishmania comparável ao padrão de referência pentamidina. Os compostos **31** e **32** induziram a produção de NO de forma significativa na concentração de 50 µg/mL ($p \leq 0,0001$) em relação ao controle. O composto **32** é o destaque da série na indução de NO, nas concentrações 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL o que pode justificar sua relevante atividade antileishmania nas formas amastigotas intracelulares.

O composto **35**, ativo para formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, apresentou indução na produção de NO nas concentrações 50 µg/mL e 25 µg/mL em relação ao controle, sendo uma sugestão para seu mecanismo de ação.

Tendo em vista que, poucos compostos tiveram um aumento significativo na indução da produção de NO em relação ao controle, concluímos que estes fármacos desenvolvidos possuem ação sobre tripanotoma redutases, que são o alvo terapêutico dos nitroheterocíclicos em geral. A tripanotiona redutase é uma enzima encontrada nos protozoários flagelados como a *Leishmania*, o qual possui um papel fundamental no combate ao estresse oxidativo, neutralizando espécies reativas de oxigênio e regenerando a tripanotiona (GALARRETA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008).

Essa manutenção da homeostase dentro do parasita é seu mecanismo de defesa, podem causar efeitos tóxicos através do aumento da formação de espécies de radiculares e danificar organelas necessárias para a sobrevivência do parasita (SING et al., 2016). Sua característica principal é que não se assemelha à glutathiona redutase, responsável pelo sistema redox no ser humano, tornando a inibição dessa enzima mais seletiva. Diversos estudos recentemente mostram o quão importante é esta via o desenvolvimento de novos candidatos à fármacos que sejam mais efetivos e com bom perfil de segurança no tratamento contra leishmanioses (FATIMA et al., 2016).

O mecanismo de ação dos nitroheterociclos na tripanotiona redutase ainda não está totalmente elucidado, porém existe o consenso de que a atividade pode advir da redução do grupo nitro ao grupo amino, com a formação de vários intermediários radiculares e metabólitos eletrofílicos como hidroxilaminas (MORENO et al., 1982; KAPPUS, 1987; PATTERSON & WYLLIE, 2014). O efeito biológico também pode em menor proporção, estar relacionado à interação dos compostos com alvos específicos, sem que a redução do grupo nitro seja necessária para a atividade do composto (TOCHER, 1997; VIODÉ et al., 1999).

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Os compostos nitrofurânicos testados neste trabalho demonstraram diferentes perfis de atividade antileishmania. A série de compostos aromáticos contendo grupos doadores de elétrons foram mais potentes sobre as formas amastigotas de *L. amazonensis*, destacando-se os compostos **20**, **22** e **24**, com valores de CI_{50} iguais a 7,02, 1,24 e 5,69 μM , respectivamente.

Os compostos de cadeia aberta apresentaram um perfil de atividade, relacionando a maior atividade antileishmania com um maior Log P, sendo o composto **29** o destaque desta série ($CI_{50} = 6,07$ e $8,55 \mu\text{M}$ nas formas promastigotas e amastigotas, respectivamente).

Na série homóloga contendo Cl, o composto **30**, com $CI_{50} = 3,28$, e $0,69 \mu\text{M}$ para as formas promastigotas e amastigotas, é o grande destaque. Deve-se salientar que o aumento da cadeia metilênica diminuiu a atividade antileishmania para as formas amastigotas nas séries **29-33**. Para as formas promastigotas e amastigotas, houve uma atividade ótima para o composto **32** ($CI_{50} = 0,88$ e $3,78 \mu\text{M}$ respectivamente) que contém três grupos CH_2 .

Tendo em vista que os compostos mostraram baixa seletividade, há a necessidade desenvolver métodos de distribuição seletiva e também aplicar novas modificações estruturais para que possamos manter ou elevar a potência desses compostos e eliminar a toxicidade desses compostos, para que esses relevantes resultados sejam também obtidos na atividade in vivo para desenvolver fármacos que tratem de forma mais eficaz a leishmaniose.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ALVAR, J et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 21, n. 2, p 334–59, abr 2008. Disponível em: <doi: 10.1128/CMR.00061-07>

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLOS ONE**. v. 7, n. 5, p. 1-12, maio 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>

ALVAR, J.; ARANA, B. I. Appraisal of leishmaniasis chemotherapy, current status and pipeline strategies. In Rivas, L.; Gil, C. (eds), *Drug Discovery for Leishmaniasis*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, pp. 1–23, 2018.

AVENIENTE, M. et al. Structure–activity relationship of antileishmanials neolignan analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 15, n. 23, p. 7337–43, dez 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.08.016>

AYATOLLAHI, J.; BAFGHI, A.F.; SHAHCHERAGHI, S.H.; Chronic zoster-form: a rare variant of cutaneous leishmaniasis. **Reviews in Medical Microbiology**. v. 26, n. 3, p. 114-5, jul 2015. Disponível em: <doi: 10.1097/MRM.0000000000000031>

BALASEGARAM, M. et al. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opinion on Emerging Drugs**. v. 17, n. 4, p. 493-510, nov 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/14728214.2012.748036>

BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Lignoids from *Nectandra amazonum* and *N. glabrescens*. **Phytochemistry**. v.28, n. 5, p. 1991, jan 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97906-8>

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. *Química medicinal: bases moleculares da ação dos fármacos*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 536 p.

BARRETT, M.P.; CROFT, S.L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**. v. 104, n. 1, p. 175-196, dez 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bmb/lds031>

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**. n. 37, ed. 10, p. 1097 – 106, ago 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>

BEN SALAH, A. et al. Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**. v. 368, ed. 6, p. 524–32, fev 2013. Disponível em: <doi: 10.1056/NEJMoa1202657>

BOURDIN-TRUNZ, B. et al. 1-Aryl-4-nitro-1H-imidazoles, a new promising series for the treatment of human African trypanosomiasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.46 n.5, 1524–35, maio 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.01.071>

BRAGA, F.G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 111, n. 2, p. 396-402, maio 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.12.006>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p.: il.

BRASIL. Ministério da Saúde, Portal da saúde. 2015. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LT-Casos.pdf>>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, p. 189, 2017.

CABRAL, M. et al. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**. v. 124, n. 3, p. 319–24, mar 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.11.007>>

CARLSEN, L. et al. In Houben-Weyl, Methods in Organic Chemistry. Schaumann, E. ed. Ed Georg Thieme Verlag: Stuttgart: Germany, 1992. p. 45-204.

CARLSEN, E.D. et al. *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. **Infection and Immunity**. v. 81, n. 11, p. 3966-74, nov 2013. Disponível em: <doi: 10.1128/IAI.00770-13>

CHAUVIÈRE, G. et al. Synthesis and Biological Activity of Nitro Heterocycles Analogous to Megazol, a Trypanocidal Lead. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 46, n. 3, p. 427-40, jan 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jm021030a>>

CHUNGE, C.N.; OWATE, J.; PAMBA, H.O.; DONNO, L. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 84, ed. 2, p. 221–5, mar 1990. Disponível em: <[https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1016/0035-9203\(90\)90263-E](https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1016/0035-9203(90)90263-E)>

CHUNG, M.C. et al. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. **Bioorgani c& Medicinal Chemistry**. v. 11, n. 22, p. 4779-83, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.07.004>>

COLOMBANO, G. et al. A novel potente nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibitor synthesized via click chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 53, n. 2, p. 616-23, dez 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jm9010669>>

COSTA, J.A. et al. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. **Gazeta Médica da Bahia**. v. 79 (Supl.3), p. 16–24. 2009.

COSTA, E.C. et al. Antileishmanial activity and structure-activity relationship of triazolic compounds derived from the neolignans grandisin, veraguensin, and machilin G. **Molecules**. v. 21, p. 802, jun 2016. Disponível em: <doi: 10.3390/molecules21060802>

CROFT, S.L.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design**. v. 8, n. 4, p. 319-42, fev 2002. Disponível em: <<https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.2174/1381612023396258>>

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 19, n. 1, p. 111-26, jan 2006. Disponível em: <[doi:10.1128/CMR.19.1.111-126.2006](https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.111-126.2006)>

DAIDONE, G. et al. Synthesis and Pharmacological Activities of Novel 3-(Isoxazol-3-yl)-Quinazolin-4(3h)-One Derivatives. **Archiv der Pharmazie**. v. 332, n. 2, p. 50-4, 1999.

DASSONI, F. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis resembling borderline-tuberculoid leprosy: a new clinical presentation? **Acta Dermatovenereologica**. v. 93, n. 1, p. 74-7, jan 2013. Disponível em: <<https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.2340/00015555-1338>>

DA SILVA, G.A. et al. Mucocutaneous leishmaniasis/HIV coinfection presented as a diffuse desquamative rash. **Case Reports in Infectious Diseases**. v. 2014, id. 293761, dez 2014. Disponível em: <<https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.2340/00015555-1338>>

DE LUCA, P.M.; MACEDO, A.B.B. Cutaneous Leishmaniasis vaccination: A Matter of Quality. **Frontiers in Immunology**. v. 7. P. 151, abr 2016. Disponível em: <[doi:10.3389/fimmu.2016.00151](https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00151)>

DE MORAIS, C.G.V. et al. The dialogue of the host-parasite relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* infection, **BioMed Research International**. v. 2015, id: 324915, set 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/293761>>

DEPAQUIT, J. et al. Arthropod-borne viruses transmitted by *Phlebotomine* sandflies in Europe: a review. **Eurosurveillance**. v. 15, ed. 10, p. 19507, 2010. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19507>>

DING, A.H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **The Journal of Immunology**. v. 141, n. 7, p. 2407-12, out 1988.

DEPAQUIT, J. et al. Arthropod-borne viruses transmitted by *Phlebotomine* sandflies in Europe: a review. **Eurosurveillance**. v. 15, ed. 10, p. 19507. (2010). Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19507>>

ENNES-VIDAL, V. et al. Why calpain inhibitors are interesting leading compounds to search for new therapeutic options to treat leishmaniasis? **Parasitology**: ©Cambridge University Press. v. 144, ed. 2, p. 117-23, fev 2017. Disponível em: <<https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1017/S003118201600189X>>

FABER, W.R. et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 49, n. 1, p. 70-4, jul 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1067/mjd.2003.492>>

FATIMA, N. et al. In silico analyses of epicoccamides on selected Leishmania trypanothione reductase enzyme-based target. **Indian Journal Pharmaceutical Sciences**. v. 78, ed. 2, p. 259–66, abri 2016. Disponível em: <doi:10.4172/pharmaceutical-sciences.1000111>

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz. [homepage na internet]. Doença de Chagas. Acessado em 04.12.2017 às 9:55h. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doença-de-chagas>

FROLUND, B. et al. Novel class of potent 4-arylalkyl substituted 3-isoxazolol GABA(A) antagonists: synthesis, pharmacology, and molecular modeling. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, n. 12, p. 2454-68, jun 2002. Disponível em: <doi:10.1021/jm020027o>

GALARRETA, B. C. et al. The use of natural product scaffolds as leads in the search for trypanothione reductase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**., v. 16, n. 14, p. 6689-95, jul 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2008.05.074>

GAMO, F.J. et al. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. **Nature**. v. 465, n. 7296, p. 305–10, fev 2010. Disponível em: <doi:10.1038/nature09107>

GIOVANNONI, M.P. et al. [(3-Chlorophenyl) piperazinylpropyl]pyridazinones and Analogues as Potent Antinociceptive Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 46, n. 6, p. 1055-9, jan 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm021057u>

GONZÁLEZ, C. et al. Climate change and risk of leishmaniasis in North America: predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 4, n. 1, jan 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000585>

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 26, n. 2, p. 293-307, jun 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.001>

HORTA, M.F. et al. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**. v. 2012, id: 203818, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/203818>

J HWAN, J. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Trop**. v. 115, p. 113–23, mar 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.016>

JOULE, J. A.; MILLS, K. Heterocyclic Chemistry at a Glance; Blackwell: John Wiley & Sons: UK. 2 ed., p. 214, 2013.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439-45, set 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.06.012>

KANG, Y.J. et al. Wnt/ β -catenin signaling mediates the antitumor activity of magnolol in colorectal cancer cells. **Molecular Pharmacology**. v. 82, p. 168–77, 2012.

KAPPUS, H. Review: Oxidative stress in chemical toxicity. **Archives of Toxicology**. v. 60, n. 1-3, p.144-9, maio 1987.

KARAMI, M.; DOUDI, M.; SETORKI, M. Assessing epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Isfahan, Iran. **Journal of Vector Borne Diseases**. v. 50, n. 1, p. 30–7, mar 2013.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**. v. 9, p. 604-15, jul 2011. Disponível em: <doi:10.1038/nrmicro2608>

KELLINA, O.I. A study of experimental cutaneous leishmaniasis in white mice. **Méditsinskaia Parazitologija I Parazitarnye Bolezni**. v. 30, p. 684–91, nov 1961.

KHEIRANDISH, F. et al. Identification of *Leishmania* species using PCR assay on Giemsa-stained slides prepared from cutaneous leishmaniasis patients. **Iranian Journal of Parasitology**. v. 8, ed. 3, p. 382-8, set 2013. Disponível em: <PMCID: PMC3887238>

KOLB, H.C.; FIN, M.G.; SHARPLESS, K.B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. **Angewandte Chemie International Edition**. v. 40, n. 11 p. 2004-21, jun 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5>

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution, 1-120 in PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. The leishmaniasis in biology and medicine. Biology and Epidemiology, Academic Press. v.1, London, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. New World Leishmaniasis—the neotropical *Leishmania* species. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, editors. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. London: Arnold; 2005. p. 313–49.

LAZAR, C. et al. Drug evolution concept in drug design: 1. Hybridization method. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 47, n. 27, p. 6973-82, dez 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm049637+>

LEE, J.S. et al. Inhibition of phospholipase C γ 1 and cancer cell proliferation by lignans and flavans from *Machilus thunbergii*. **Archives of Pharmacal Research**. v. 27, n. 10, p.1043–7, out 2004. Disponível em: <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1007/BF02975429>

LEE, K.H. Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. **Journal of Natural Products**. v. 73, ed. 3, p. 500-16, fev 2010. Disponível em: <doi: 10.1021/np900821e>

LEÓN-DÍAZ, R. et al. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 105, n. 1, p. 45–51, fev 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000100006 >

LI, W.T. et al. Synthesis and biological evaluation of N-heterocyclic indolyl glyoxylamides as orally active anticancer agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 46, n. 9, p. 1706-15, abr 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm020471r>

- LINDOSO, J.A. et al. Leishmaniasis-HIV coinfection: current challenges. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care - Dove Press**. v. 8, p. 147–156, 2016. . Disponível em: <doi: 10.2147/HIV.S93789>
- LIPINSKI, C.A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3-25, 1997.
- MAAROUF, M. et al. Biochemical alterations in paromomycin-treated *Leishmania donovani* promastigotes. **Parasitology Research**. v. 83, ed. 2, p. 198–202, jan 1997a. Disponível em: <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s004360050232>
- MAAROUF, M. et al. *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp. Cell Res.* v. 232, ed. 2, p. 339–48, maio 1997b. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3500>
- MASMOUDI, A. et al. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. **Journal of Dermatological Case Reports**. v. 7, n. 2, p. 31–41, jun 2013. Disponível em: <doi:10.3315/jdcr.2013.1135>
- MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 27, n. 2, p. 123–47, ago 2013. Disponível em: <doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>
- MCGWIRE, B.S., SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment, **QJM: An International Journal of Medicine**. v. 107, ed. 1, p. 7-14, jan 2014. Disponível em: <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1093/qjmed/hct116>
- MEDEIROS, M.G.F. et al. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides Cham.* **Parasitology International**. v. 60, p. 237–41, set 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.03.004>
- MENEGATTI, R. et al. Design, synthesis and pharmacological profile of novel dopamine d2 receptor ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 11, n.22, p. 4807-13, dez 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/S0968-0896(03)00487-5>
- MEIRELES, C.B. et al. Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. **Acta Tropica**. v. 172, p. 240-54, ago 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.05.022>
- MELO, J.O.F. et al. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**. v .29, n. 3, p. 569-79, 2006.
- MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.46, ed. 10, p. 4769–4807, out 2011. Disponível em: < https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.057>
- MOHEBALI, M. et al. Comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) by a randomized clinical trial in Iran. **Acta Tropica**. v. 103, n. 1, p. 33-40, jul 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.05.005>

MOINE, E. et al. A small-molecule cell-based screen led to the identification of biphenylimidazoazines with highly potent and broad-spectrum anti-apicomplexan activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 89, ed. 7, p. 386–400, jan 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.057>>

MONKS, A. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 83, n. 11, p. 757-66, jun 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jnci/83.11.757>>

MORAES, M.A.P., SILVEIRA, F.T. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 36, n. 5, p. 459-63, 1994. Disponível em: <<https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1590/S0036-46651994000500011>>

MORENO, S.N. et al. Different behaviors of benzimidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 218, n. 2, p. 585–91, out 1982. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(82\)90383-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90383-6)>

MURRAY, H.W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**. v. 366, v. 9496, p. 1561–77, nov 2005. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67629-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67629-5)>

NAKAMURA, C. V. et al. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira Farmacognosia**. v. 16, n. 1, p. 61-6, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2006000100011>>

NEAL, R.A. The effect of antibiotics of the neomycin group on experimental cutaneous leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**. v. 62, ed. 1, p. 54–62, mar 1968. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00034983.1968.11686529>>

NEAL, R.A., ALLEN, S., MCCOY, N., OLLIARO, P., CROFT, S.L. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 35, ed. 5, p. 577–84, maio 1995. Disponível em: <<https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1093/jac/35.5.577>>

NÉRIS, P.L. et al. Neolignan Licarin A presents effect against *Leishmania (Leishmania)* major associated with immunomodulation *in vitro*. **Experimental Parasitology**. v. 135, n. 2, p. 307–13, out 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.07.007>>

OLIVEIRA, R.B. et al. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotionaredutase. **Química Nova**. v. 31, n. 2, p. 261-7, 2008.

PAN, J.Y. et al. An update on lignans: natural products and synthesis. **Natural Product Reports**. v. 26, p. 1251-92, 2009. Disponível em: <doi: 10.1039/B910940D>

PAPADOPOULOU, M.V. et al. Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based piperazines and 2-amino-1,3-benzothiazoles as antichagastic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 21, ed. 21, p. 6600–7, nov 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.08.022>>

PATTERSON, S. WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**. v. 30, ed. 6, p. 289–98, jun 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.003>>

PAULINO, M. et al. The Chemotherapy of Chagas Disease: An Overview. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**. v.5, n. 5, p. 499 – 519, maio 2005. Disponível em: <<https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.2174/1389557053765565>>

PELIZZARO-ROCHA, K.J. et al. Trypanocidal action of eupomatenoide-5 is related to mitochondrion dysfunction and oxidative damage in *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and Infection**. v. 13, n. 12-3, p. 1018–24, nov 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.05.011>>

PETERS, N.C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies, **Science**. v. 321, n. 5891, p.970–74, ago 2008. Disponível em: <[doi: 10.1126/science.1159194](https://doi.org/10.1126/science.1159194)>

PETERS, N.C.; SACKS, D.L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis, **Cellular Microbiology**. v. 11, n. 9, p. 1290–96, jun 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01348.x>>

PIETERS, L. et al. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from South American dragon's blood (*Croton* spp.) as an inhibitor of cell proliferation. **Journal of Natural Products**. v. 56, n. 6, p. 899–906, jun 1993.

PIRRUNG, M.C. et al. Inhibition of the antibacterial target UDP-(3-O-acyl)-N-acetylglucosamine deacetylase (LpxC): isoxazoline zinc amidase inhibitors bearing diverse metal binding groups. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, n. 19, p. 4359-70, set 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jm020183v>>

PRIOTTO, G. et al. Nifurtimox–eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, noninferiority trial. **Lancet**. v. 374, ed. 9683, p. 56–64, jul 2009. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61117-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61117-X)>

RAJASEKARAN, R.; CHEN, Y.P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. *Drug Discovery Today*. v. 20, ed. 8, p. 858-68, ago 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.04.006>>

RANDO, D.G. et al. Antileishmanial activity screening of 5-nitro-2-heterocyclic benzylidene hydrazides. **Bioorgani c& Medicinal Chemistry**. v.16, n. 14, p. 6724–31, jul 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2008.05.076>>

RANGEL, E.F.; COSTA, S.M.; CARVALHO, B.M. Environmental changes and the geographic spreading of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. In: Claborn D, editor. *Leishmaniasis—Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. Rijeka: InTech; 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.5772/57207>>

READY, P.D. Leishmaniasis emergence in Europe, **Euro Surveillance**. v. 15, n. 10, p. 1-11, mar 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.2807/ese.15.10.19505-en>>

READY, P.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**. v. 6, p. 147-54, maio 2014. Disponível em: <<http://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.2147/CLEP.S44267>>

REAL, F. et al. The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. **DNA Research**. v. 20, ed. 6, p. 567-581, dez 2013. Disponível em: <<https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1093/dnares/dst031>>

REIS, L.C. et al. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, n. 5, p. 439-43, out 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822008000500001>>

ROWLEY, M. et al. 5-(4-Chlorophenyl)-4-methyl-3-(1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl)isoxazole: a potent, selective antagonist at human cloned dopamine D4 receptors. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 39, n. 10, p. 1943-5, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jm960072u>>

SHAW, J.J.; ISHIKAWA, E.A.; LAINSON, R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluoresce in labeled avidin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 83, p. 783-784, 1989.

STRAUS, M.J. The nitroaromatic group in drug design. Pharmacology and toxicology (for nonpharmacologists). **Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development**. v. 18, n. 3, p. 158–166, 1979.

SINGH, O.P.; SUNDAR, S. “Developments in Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in the Elimination Era,” **Journal of Parasitology Research**, v. 2015, out 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2015/239469>>

SINGH, O.P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. **Infectious Diseases of Poverty**. v. 5, p. 19, 2016. Disponível em: <<https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1186/s40249-016-0112-2>>

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 82, n. 13, p. 1107-12, jul 1990. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140229>>

SOARES, O. em: Síntese de Análogos Isoxazólicos Derivados das Neolignanas Grandisina e Veraguensina como Candidatos a Fármacos contra Doenças Negligenciadas – Dissertação de Mestrado Pós-graduação em Química – UFMS – Dezembro de 2012.

STEYN, M. et al. Synthesis and antimalarial activity of ethylene glycol oligomeric ethers of artemisinin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 63, ed. 2, p. 278–86, jan 2011. Disponível em: <<https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1111/j.2042-7158.2010.01205.x>>

SUNDAR, S. et al. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. **The New England Journal of Medicine**. v. 356, n. 25, p. 2571–81, jun 2007. Disponível em: <doi: 10.1056/NEJMoa066536>

SUNDAR, S. et al. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. **Lancet**, v. 377, ed. 9764, p. 477-86, fev 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62050-8>

SUNDAR, S. et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral Leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**. v. 55, n. 4, p. 543-50, ago 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/cis474>

TEPONNO, R. B.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. Recent advances in research on lignans and neolignans. **Natural Product Reports**. v. 33, p. 1044–92, 2016. Disponível em: <doi: 10.1039/C6NP00021E>

THI, E.P.; LAMBERTZ, U.; REINER, N.E. Sleeping with the enemy: how intracellular pathogens cope with a macrophage lifestyle. **PLoS Pathogens**. v. 8, n. 3, mar 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002551>

TOCHER, J.H. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. **General Pharmacology: The Vascular System**. v. 28, n. 4, p. 485-7, abr 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/S0306-3623(96)00283-2>

TORNOE, C. W.; CHRISTENSEN, C.; MELDAL, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 67, n. 9, p. 3057–64, abr 2002. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo011148j>

TORREELE, E. et al. Fexinidazole--a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 4, n. 12, dez 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000923>

TWEATS, D.; TRUNZ, B.B.; TORREELE, E. Genotoxicity profile of fexinidazole—a drug candidate in clinical development for human African trypanomiasis (sleeping sickness). **Mutagenesis**. v. 27, ed. 5, p. 523-32, set 2012. Disponível em: <doi: 10.1093/mutage/ges015>

ULIANA, S.R.B.; TRINCONI, C.T.; COELHO, A.C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology*. v. 145, ed. 4, p. 464-80, jan 2017. Disponível em: <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1017/S0031182016002523>

UPEGUI, Y. et al. Preparation of Rotenone Derivatives and in Vitro Analysis of Their Antimalarial, Antileishmanial and Selective Cytotoxic Activities. **Molecules**. v. 19, n. 11, p. 18911-22, nov 2014. Disponível em: <doi:10.3390/molecules191118911>

VENDRAMETTO, M.C. et al. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*. **Parasitology International**. v. 59, n. 2, p. 154–8, jun 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.12.009>

VIODÉ, C. et al. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles **Biochemical Pharmacology**. v.57, n. 5, p. 549-57, mar 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00324-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00324-4)>

VOAK, A.A. et al. An essential type I nitroreductase from *Leishmania major* can be used to activate leishmanicidal prodrugs. **Journal Biological Chememistry**. v. 288, n. 40, p. 28466–76, out 2013. Disponível em: <[doi: 10.1074/jbc.M113.494781](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.494781)>

WHO – World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010 (WHO Technical Report Series, nº 949). Geneva: WHO Press; 2010.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis Situation and Trends. Global Health Observatory. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/>

WINK, M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. **Medicines**. v. 2, ed. 3, p. 251– 86, set 2015. Disponível em: <[doi: 10.3390/medicines203025](https://doi.org/10.3390/medicines203025)>

WOSTER, P.M. Antiprotozoal Agents (African Trypanosomiasis, Chagas Disease, and Leishmaniasis). **Comprehensive Medicinal Chemistry II**. v. 07, p. 815–43, abr 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00229-7>>

WYLLIE, S. et al. The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. **Science Translational Medicine**. v. 4, ed. 199, p. 119re1, fev 2012. Disponível em: <[doi: 10.1126/scitranslmed.3003326](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003326)>

ZHANG, H. J. et al. Antimalarial compounds from *Rhaphidophora decursiva*. **Journal of Natural Products**. v. 64, n. 6, p. 772–7, jun 2001. Disponível em: <[doi: 10.1021/np010037c](https://doi.org/10.1021/np010037c)>

ZHOU, Y. et al. Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth. **Clinical Cancer Research**. v. 15, n. 16, p. 5161–9, ago 2009. Disponível em: <[doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0661](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0661)>

ZHOU, L. et al. A class of 5-nitro-2-furancarboxylamides with potent trypanocidal activity against *Trypanosoma brucei* in vitro. **Journal Medicinal Chemistry**. v. 56, ed. 3, p. 796–806, jan 2013. Disponível em: <[doi: 10.1021/jm301215e](https://doi.org/10.1021/jm301215e)>

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T.B.; AVERY, V.M. Leishmaniasis drug discovery: recente progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**. v. 22, n. 10, p. 1516-31, out 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.004>>

ANEXO

8. ANEXO



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da atividade antileishmania de novos análogos nitro-heterocíclicos sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*", registrada com o nº 847/2017, sob a responsabilidade de **Adriano César de Moraes Baroni** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 4ª reunião ordinária do dia 12/05/2017.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/03/2016 a 30/08/2018
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Mus musculus</i> / BALB/c
Nº de animais	156
Peso/Idade	Aprox. 20g / 4 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central/CCBS/UFMS


Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFMS

Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 15 de maio de 2017.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.2000@gmail.com
fone (67) 3345-7925