

Campus Realengo

Graduação em Farmácia

Walewska Soares de Souza

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
LEISHMANICIDA DE
COMPOSTOS MESOIÔNICOS
E COMPLEXOS
ORGANOMETÁLICOS**

Rio de Janeiro

2022

Walewska Soares de Souza

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS E
COMPLEXOS ORGANOMETÁLICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Federal do Rio de
Janeiro como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Camila Alves
Bandeira Falcão e Dr. Eduardo Caio Torres-
Santos

Rio de Janeiro - RJ
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.
Elaborada por Karina Barbosa dos Santos
Bibliotecária - CRB 7 n° 6212

S729a Souza, Walewska

Avaliação da atividade leishmanicida de compostos mesoiônicos e complexos organometálicos / Walewska

Souza - Rio de Janeiro, 2022.

50 f. : il.

Orientação: Camila Alves Bandeira Falcão.

Coorientação: Eduardo Caio Torres dos Santos.

Trabalho de conclusão de curso (graduação), Bacharelado em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Realengo, 2022.

1. Leishmaniose. 2. Compostos mesoiônicos. 3. Complexos organometálicos. 4. Tratamento. I. Falcão, Camila Bandeira, **orient.** II. Santos, Eduardo Caio Torres dos, **coorient.** III. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. IV. Título

Walewska Soares de Souza

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Federal
do Rio de Janeiro como requisito
parcial para a obtenção do grau
de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em: 10 de agosto de 2022.

Banca Examinadora

Profª Drª Camila Alves Bandeira Falcão
(Orientadora - IFRJ / Campus Realengo)

Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos
(Orientador externo - IOC / Fiocruz)

Profª Drª Débora Leandra Rama Gomes
(Membro da Banca - IFRJ / Campus Realengo)

Profª Drª Kate Katherine da Silva Batista
(Membro da Banca – UENF / CBB)

Rio de Janeiro - RJ
2022

Aos meus pais, sem eles nada seria possível, obrigada por todo esforço dedicado para tornar esse sonho uma realidade.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me dar força, coragem e perseverança durante toda a caminhada da graduação.

Agradeço aos meus pais, Nelson Pereira e Maria das Graças, que me deram a oportunidade de me dedicar exclusivamente aos estudos sem mais preocupações, espero um dia poder retribuir todos os esforços que fizeram para garantir a minha formação, mesmo sem saber ao certo como ajudar, eles fizeram tudo por mim, sem eles nada seria possível.

Agradeço as minhas amigas Camilla Cortes e Renata Meira, verdadeiros presentes que o IFRJ me deu, estavam comigo nos momentos mais felizes e os de angústia, não faltou colo, apoio e o mais importante, muitas risadas que tornaram a faculdade mais leve e prazerosa.

Aos meus orientadores Eduardo Caio, Valter Viana, Marcio Mantuano e Fabiana Maia por toda paciência ao ensinar, por acreditarem em mim, por todo ensinamento transmitido durante os experimentos e apresentações, obrigada por serem professores que despertaram ainda mais meu amor pela pesquisa.

Obrigada a todos os membros do laboratório LBqT, pela ajuda com conselhos e ensinamentos referentes a pesquisa. As meninas da iniciação científica Laís Abreu e Luiza Asth, por me ajudarem quando eu não entendia absolutamente nada em um artigo, por me deixarem um pouquinho mais confiante antes de uma apresentação e por todas as palavras de apoio.

Aos meus amigos, Pamella, Thalia, e Gabriel que sempre me incentivaram a buscar o meu melhor.

Às minhas primeiras orientadoras, Daniele Castro, por abrir as portas da Fiocruz e me apresentar ao mundo da pesquisa, serei eternamente grata por essa oportunidade e Kate Batista por sua enorme paciência, pelos conselhos acadêmicos e não acadêmicos e por todos os ensinamentos transmitidos com o carinho de uma irmã.

E por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação como farmacêutica, cada professor, cada supervisor de estágio e cada colega de graduação que ajudou eu deixo registrado o meu muito obrigada.

Um cientista, que também é um ser humano, não deve descansar enquanto o conhecimento que pode reduzir o sofrimento repousa em uma estante (Albert Sabin).

RESUMO

As leishmanioses são classificadas como doenças negligenciadas, pois não são atrativas para as indústrias farmacêuticas, pois não há perspectiva de retorno do investimento financeiro. Além disso, não há vacina licenciada para uso em humanos, o tratamento atual é caro, tóxico, doloroso e muitos casos de resistência têm sido relatados, dificultando o tratamento. Com o avanço da química inorgânica, complexos metálicos têm sido resgatados como alternativas interessantes para fármacos. De fato, complexos de ouro, platina e prata mostraram boa atividade contra tumores e algumas infecções. Por outro lado, as sidnonas constituem a primeira classe de compostos mesoiônicos sintetizados, possuindo importante atividade biológica e amplamente estudadas. Este trabalho propõe estudos de estrutura/atividade para avaliar o efeito de complexos organometálicos e derivados mesoiônicos em *Leishmania amazonensis*, espécie responsável pela forma cutânea da leishmaniose. As promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas com as moléculas em diferentes concentrações por 72 horas e o crescimento do parasito foi avaliado com resazurina. Para os ensaios de citotoxicidade, macrófagos peritoneais murinos foram incubados com as moléculas por 72 horas e a viabilidade celular foi avaliada por resazurina. Também foi realizada análise farmacocinética e toxicológica *in silico* das substâncias, como parâmetro de seleção de candidatos a serem avaliados *in vivo*. Todas as substâncias analisadas nesse estudo estão de acordo com os critérios estabelecidos por Lipinsky e Veber para biodisponibilidade oral. Das 15 substâncias, sete apresentaram algum grau de atividade. A sidnona 11 foi a mais ativa, com IC₅₀ cerca de 18 µM e CC₅₀ de 109,4.

ABSTRACT

Leishmaniases are classified as neglected diseases, as they are not attractive for the pharmaceutical industries, since there is no prospect of a return on financial investment. Furthermore, there is no licensed vaccine for use in humans, the current treatment is expensive, toxic, painful and many cases of resistance have been reported, making treatment difficult. With the advance in inorganic chemistry, metal complexes have been rescued as interesting alternatives for drugs. In fact, gold, platinum, and silver complexes have shown good activity against tumors and some infections. On the other hand, sydnone constitutes the first class of synthesized mesoionic compounds, having important activity biology and are extensively studied. This work proposes structure/activity studies to evaluate the effect of organometallic complexes and mesoionic derivatives in *Leishmania amazonensis*, the species responsible for the cutaneous form. *L. amazonensis* promastigotes were incubated with the molecules at different concentrations for 72 hours and the parasite growth was evaluated with resazurin. For cytotoxicity assays, murine peritoneal macrophages were incubated with the molecules for 72 hours and cell viability was evaluated by resazurin. In silico pharmacokinetic and toxicological analysis was also performed for the active, as a selection parameter for candidates to be evaluated in vivo. All substances in this study meet the determination established by Lipinsky and Veber for oral bioavailability. Of the 15 substances, seven showed some degree of activity. Sydnone 11 was the most active, with an IC_{50} of around 18 μ M and a CC_{50} of 109.4.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Criança com LV.....	14
Figura 2 - Leishmaniose cutânea localizada: úlcera com bordas em moldura e lesão satélite	15
Figura 3 - Leishmaniose cutânea difusa.....	15
Figura 4 - Leishmaniose mucocutânea.	16
Figura 5 - Leishmaniose disseminada.....	17
Figura 6 - Principais formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp.: promastigota (A) e amastigota (B).....	18
Figura 7 - Ciclo biológico da leishmaniose	19
Figura 8 - <i>Lutzomyia longipalpis</i> - vetor da leishmaniose.....	19
Figura 9 - Distribuição geográfica da LV no mundo.	20
Figura 10 - Casos de LV por UF de infecção. Brasil, 2020.	20
Figura 11 - Distribuição geográfica da LT no mundo.....	21
Figura 12: Casos confirmados de leishmaniose tegumentar, Brasil – 1980 a 2014.	22
Figura 13 - Casos de leishmaniose tegumentar por município no Brasil.....	22
Figura 14 - Complexos metálicos avaliados nesse estudo.....	26
Figura 15 - Sidnonas com diferentes modificações avaliadas nesse estudo. ..	27
Figura 16 - Avaliação da atividade leishmanicida em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	35
Figura 17 - Avaliação da citotoxicidade da sidnona S11	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Doenças tropicais negligenciadas	11
Tabela 2 - Classificação das espécies de <i>Leishmania</i> spp.	13
Tabela 3 - Alguns medicamentos utilizados para o tratamento das leishmanioses	24
Tabela 4 - Representação em forma de smiles das moléculas analisadas nesse estudo.	31
Tabela 5 - Parâmetros de biodisponibilidade oral	33
Tabela 6 - IC ₅₀ das substâncias em promastigota de <i>L. amazonensis</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifosfato
CC50	Concentração citotóxica para 50% das células
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNDi	Drugs for Neglected Diseases Initiative
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
IC50	Concentração inibitória de 50%
IS	Índice de Seletividade
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LD	Leishmaniose Disseminada
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MS	Ministério da Saúde
ODC	Ornitina Decarboxilase
OMS	Organização Mundial da Saúde
SFB	Soro Fetal Bovino

Sumário

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE.....	11
1.1.1 Formas Clínicas	14
1.1.2 Formas do parasito e ciclo biológico.....	17
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	20
1.3 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE.....	23
1.4 COMPLEXOS ORGANOMETÁLICOS.....	25
1.5 COMPOSTOS MESOIÔNICOS – SIDNONAS.....	26
1.6 OBJETIVOS.....	29
1.6.1 Objetivo geral.....	29
1.6.2 Objetivos específicos.....	29
2 DESENVOLVIMENTO.....	30
2.1 METODOLOGIA.....	30
2.1.2 Isolamento e de cultivo do parasito.....	30
2.1.3 Atividade antipromastigota.....	30
2.1.4 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos.....	31
2.1.5 Análise <i>in silico</i> dos parâmetros físico-químicos das substâncias testadas.....	31
2.1.6 Análise estatística.....	32
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1 AVALIAÇÃO IN SÍLICO DAS PROPRIEDADES PREDITORAS DE BOA BIODISPONIBILIDADE ORAL.....	33
3.2 ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA.....	34
3.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	38
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
5 REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são compostas por um grupo diversificado de 20 condições que são predominantes em áreas tropicais e estão presentes em diversos países do mundo constituindo um grande problema social e econômico (OMS, [s.d.]).

Na Tabela 1 constam as doenças tropicais negligenciadas de acordo com a OMS:

Tabela 1 - Doenças tropicais negligenciadas

Úlcera de buruli	Equinococose
Doença de Chagas	Fasciolose
Cisticercose	Tripanossomíase africana (doença do sono)
Dengue	Leishmaniose
Dracunculíase (doença do verme-da-Guiné)	Hanseníase
Filariose linfática	Esquistossomose
Oncocercose	Parasitoses (helminthíases) transmitidas pelo solo
Tracoma	Febre amarela
Bouba	Leptospirose

Fonte: Produzida pela autora com base nos dados de (OMS, [s.d.]).

Os medicamentos utilizados para o tratamento dessas doenças proporcionam baixos lucros e por isso o investimento na pesquisa farmacêutica é mínimo. (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2016).

1.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE

As leishmanioses representam um conjunto de doenças causadas por pelo menos 20 espécies de protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, eucariotos unicelulares da ordem Trypanosomatida e família Trypanosomatidae. Espécies distintas de *Leishmania* causam diferentes manifestações clínicas, que variam de lesões cutâneas com capacidade de autocura (leishmaniose cutânea

- LC) a danos em órgãos internos como baço, fígado e medula óssea (leishmaniose visceral - LV). (CDC, 2018; DNDi, 2018).

Documentos antigos e dados paleoparasitológicos indicam que a leishmaniose já era conhecida desde a antiguidade. No início do século XX começou a identificação dos parasitas do gênero *Leishmania* como agentes etiológicos e dos flebotomíneos como vetores da leishmaniose. A descoberta de novos protozoários do gênero *Leishmania* e seus vetores se estende até a atualidade (STERVENDING, 2017). Na era moderna foram evidenciadas lesões cutâneas típicas das leishmanioses em países da América do Sul. No período Inca eram relatadas diversas características da doença em localizações distintas que eram nomeadas de acordo com o local no qual eram registradas e apesar de diferentes nomes como “Doença do Vale”, “Doença Andina” e “Lepra Branca” ambas possuíam condições clínicas semelhantes a LC que atualmente é encontrada na América do Sul (AKHOUNDI et. al., 2016).

No Oriente Médio alguns outros nomes foram dados para tais condições clínicas como, “Febre de Aleppo”, “Febre de Bagdá” e “Botão do Oriente”. Em 1756, o médico Alexander Russek observou lesões cutâneas na pele de pacientes de uma população na Síria, com características parecidas com a LC. Nesse mesmo ano alguns médicos indianos diagnosticaram pacientes com “Febre Negra”, onde os pacientes apresentavam sintomas semelhantes a LV ou calazar. O médico Cosme Bueno relatou em 1764 que a transmissão de uma doença chamada uta era dada através de pequenos insetos que causavam lesões parecidas com as conhecidas atualmente causadas por leishmanias. No ano de 1832, William Twining fez uma publicação que explicava os sintomas de calazar em pacientes indianos que apresentavam febre, anemia, e baço aumentado (AKHOUNDI et. Al., 2016).

No Novo Mundo, o médico brasileiro Adolpho Carlos Lindenberg e o médico italiano Antonio Carini descreveram parasitos em lesões de pele de pacientes diagnosticados com úlcera de Bauru, no estado de São Paulo. Inicialmente pensava-se que os parasitas do Novo Mundo eram idênticos a *L. tropica* (Carini, 1909). No entanto, em 1911, o brasileiro Gaspar de Oliveira Vianna, estudando amostras de leishmaniose obtidas de uma lesão cutânea de

um paciente, chegou à conclusão que o parasita era diferente. Com base em observações sobre morfologia, Gaspar Vianna nomeou a nova espécie como *Leishmania braziliensis*. Com exceção de *L. peruviana*, descrita em 1913, todas as espécies do Novo Mundo causadoras de LC e leishmaniose mucocutânea (LMC) foram identificadas e caracterizadas nas décadas seguintes (LAINSON, 2010; STERVENDING, 2017).

Tabela 2 - Classificação das espécies de *Leishmania* spp.

Subgênero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Velho mundo	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
		<i>L. killick*</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
Novo mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. pifanor*</i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. garnham*</i>	<i>L. naiffi</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	
			<i>L. colombiensis**</i>	
Principal tropismo	Visceral	Dermotropismo	Dermotropismo	Mucotropismo
*status da espécie em discussão				
**posição taxonômica em discussão				

Fonte: OMS, 2011.

E embora seja conhecida desde a antiguidade, a leishmaniose é ainda hoje uma doença negligenciada. Estima-se que ocorram de 900 mil a 1,5 milhão de novos casos anuais, provocando cerca 40 mil óbitos (ALVAR *et al.*, 2012). A coinfeção com o vírus HIV tem aumentado durante os últimos anos, gerando um quadro atipicamente grave, com acometimento do trato gastrointestinal e de outros órgãos que não são normalmente afetados (HARMS & FELDMEIER, 2005). O aumento alarmante do número de casos provocados por parasitas resistentes aos tratamentos convencionais e a falta de uma vacina eficaz,

agravam a situação mundial da leishmaniose. Segundo estudo conduzido pela Organização Mundial da Saúde, o Brasil é o único país que figura entre os que concentram mais de 90% do número de casos das três principais formas da doença: cutânea, mucocutânea e visceral (OMS [s.d.]).

1.1.1 Formas Clínicas

A infecção por *Leishmania* spp. é determinada geralmente pelas características da espécie, pela biologia do vetor e pela resposta do hospedeiro. As leishmanioses possuem dois principais grupos: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

LV ou calazar é considerada a forma mais grave das leishmanioses, onde os protozoários atingem as vísceras do hospedeiro vertebrado como baço, fígado, medula óssea e linfonodos (NEUBER et al., 2008; REY, 2008).

Figura 1 - Criança com LV.



Fonte: Costa, 2014.

Já a LT pode ser dividida em leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose disseminada (LD), leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) e leishmaniose mucosa ou mucocutânea (LMC).

LC é a manifestação clínica mais comum das leishmanioses (Fig. 2), caracterizada pela formação de úlceras na face e membros (BLANCO et al., 2013). Essas lesões podem cicatrizar de forma espontânea no período entre 2 a 5 anos, dependendo do agente etiológico (espécie) e da resposta imunológica do hospedeiro vertebrado.

Figura 2 - Leishmaniose cutânea localizada: úlcera com bordas em moldura e lesão satélite



Fonte: Conceição, 2014.

A LCD (Fig. 3) se inicia com um nódulo indolor que dissemina na superfície cutânea. Os parasitas causadores dessa manifestação clínica podem se instalar na face, orelhas e superfícies extensoras, como joelhos e cotovelos. As lesões de pele podem progredir ainda mais para difundir placas e machas pigmentadas (SCORZA; CARVALHO, 2017).

Figura 3 - Leishmaniose cutânea difusa



Fonte: Conceição, 2014.

A disseminação hematogênica ou linfática nas lesões cutâneas pode ocasionar a LMC. Caracterizada por lesões destrutivas do septo nasal, lábios e palato (Fig. 4), a manifestação da LMC está relacionada a uma forte resposta imunopatológica. A mucosa oral e nasal é preferencialmente afetada, podendo levar a desfiguração permanente (CINCURA et al., 2017). A LMC precisa ser diagnosticada e tratada rapidamente, pois pode levar à morte em casos de infecção secundária (ANDRADE-NETO ET AL., 2018; FRAGA ET AL., 2012; GOTO; LINDOSO, 2010).

Figura 4 - Leishmaniose mucocutânea.



Fonte: Conceição, 2014.

A LD é definida pela presença de lesões localizadas em duas ou mais partes do corpo (Fig. 5). Histologicamente, é possível observar poucos parasitos nas lesões devido à presença de uma resposta imunológica do hospedeiro (HASHIGUCHI et al., 2016).

Figura 5 - Leishmaniose disseminada

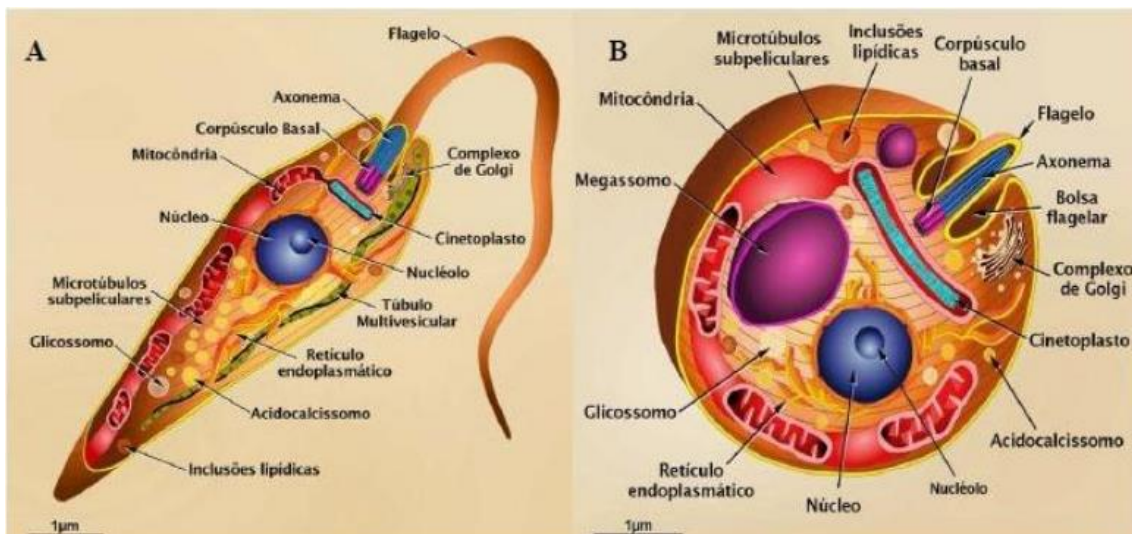


Fonte: Conceição, 2014.

1.1.2 Formas do parasito e ciclo biológico

Os parasitos do gênero *Leishmania* são dimórficos, apresentando duas formas evolutivas distintas: a promastigota e a amastigota (Fig. 6). A forma encontrada no hospedeiro invertebrado é a promastigota, que apresenta alta motilidade e é capaz de formar agrupamentos celulares durante o processo de migração e colonização do hospedeiro invertebrado. Já a forma amastigota é encontrada no hospedeiro vertebrado e apresenta formato elipsoide, com um flagelo rudimentar no interior da bolsa flagelar. Em relação à proliferação, ambas as formas evolutivas do parasita se multiplicam por divisão binária. (TEIXEIRA et al., 2013).

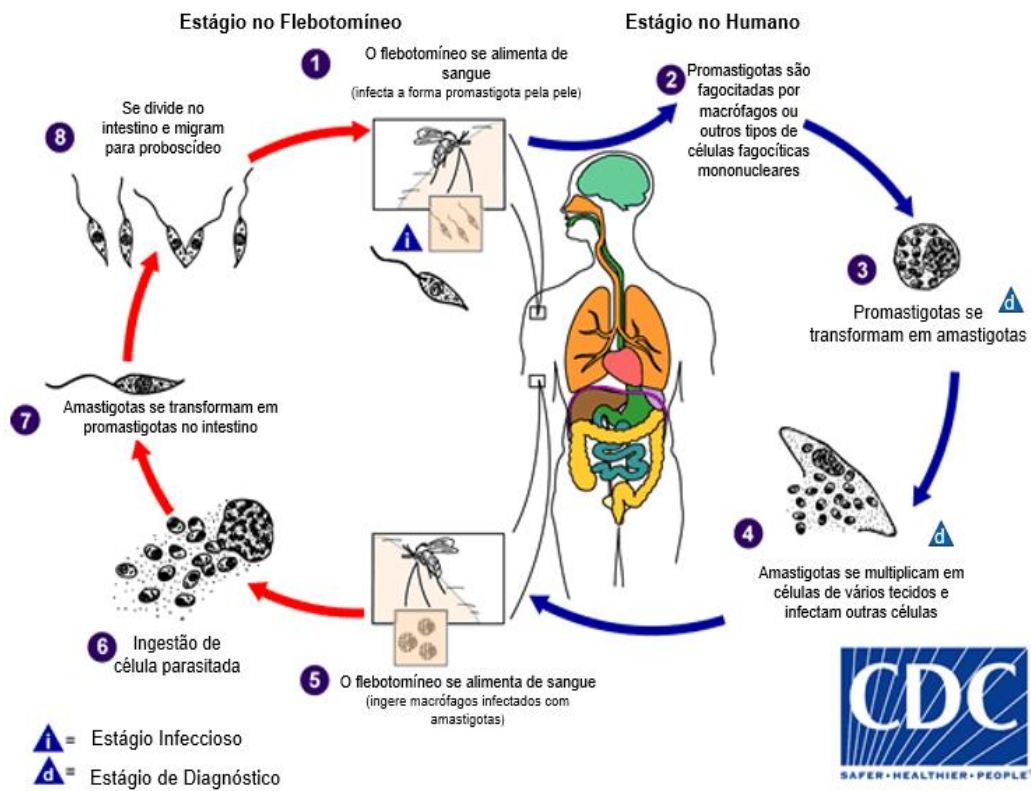
Figura 6 - Principais formas evolutivas de *Leishmania* spp.: promastigota (A) e amastigota (B)



Fonte: Adaptado de Teixeira et al., 2013

Em um ciclo biológico heterogêneo (Fig. 7), os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos, como seres humanos, roedores e canídeos. Os hospedeiros invertebrados são as fêmeas de pequenos insetos hematófagos, conhecidos como flebotomíneos (Fig. 8). Esse inseto realiza seu repasto sanguíneo e inocula na pele formas promastigotas metacíclicas do parasito, que são fagocitadas pelos macrófagos e monócitos. Nessas células, os parasitos se diferenciam em amastigotas e realizam divisão binária, levando-as ao rompimento. Livres, as amastigotas infectam rapidamente células adjacentes. O ciclo prossegue quando outro flebotomíneo suga o sangue contendo células infectadas. No seu intestino, essas células são lisadas liberando amastigotas, que se diferenciam inicialmente em promastigotas procíclicas, não infectivas, que se multiplicam em velocidade logarítmica. Quando alcançam a fase estacionária, se diferenciam em promastigotas metacíclicas infectivas, atravessam a parede do intestino alcançando a glândula salivar do inseto e estão prontas para originar uma nova infecção. (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017).

Figura 7 - Ciclo biológico da leishmaniose



Fonte: Adaptado de Centro de Controle e Prevenção de Doenças, 2017.

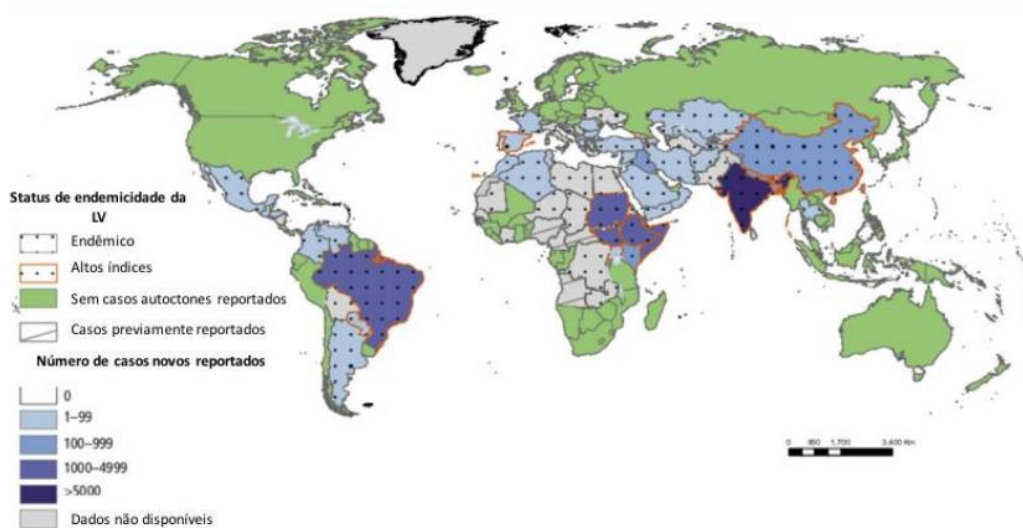
Figura 8 - *Lutzomyia longipalpis* - vetor da leishmaniose

Fonte: ALVARENGA, 2019.

1.2 EPIDEMIOLOGIA

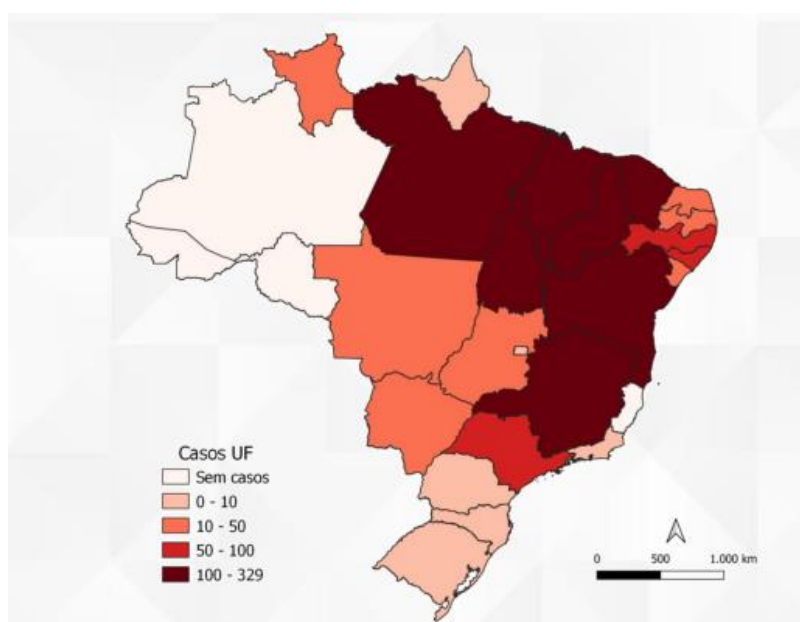
As leishmanioses estão presentes em 98 países com aproximadamente 350 milhões de pessoas em risco. A LV é considerada um problema de saúde pública com grande expansão geográfica (Fig. 9). É responsável por cerca de 300.000 casos que resultam em torno de 20.000 mortes e o Brasil está entre os seis países que representam 90% dos casos (Fig. 10). (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Figura 9 - Distribuição geográfica da LV no mundo.



Fonte: adaptado de OMS, 2017.

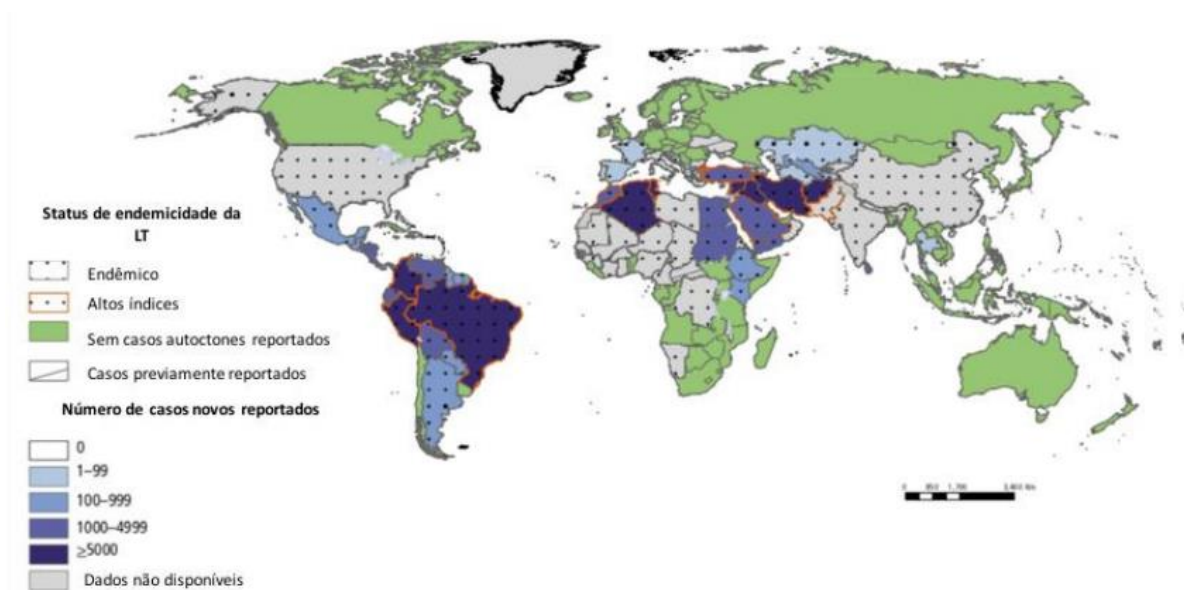
Figura 10 - Casos de LV por UF de infecção. Brasil, 2020.



Fonte: Ministério da Saúde, 2020.

A LT é considerada pela OMS como uma das seis doenças infecciosas mais importantes, devido ao elevado número de indivíduos infectados (Fig. 11) e a capacidade de produzir deformidades (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

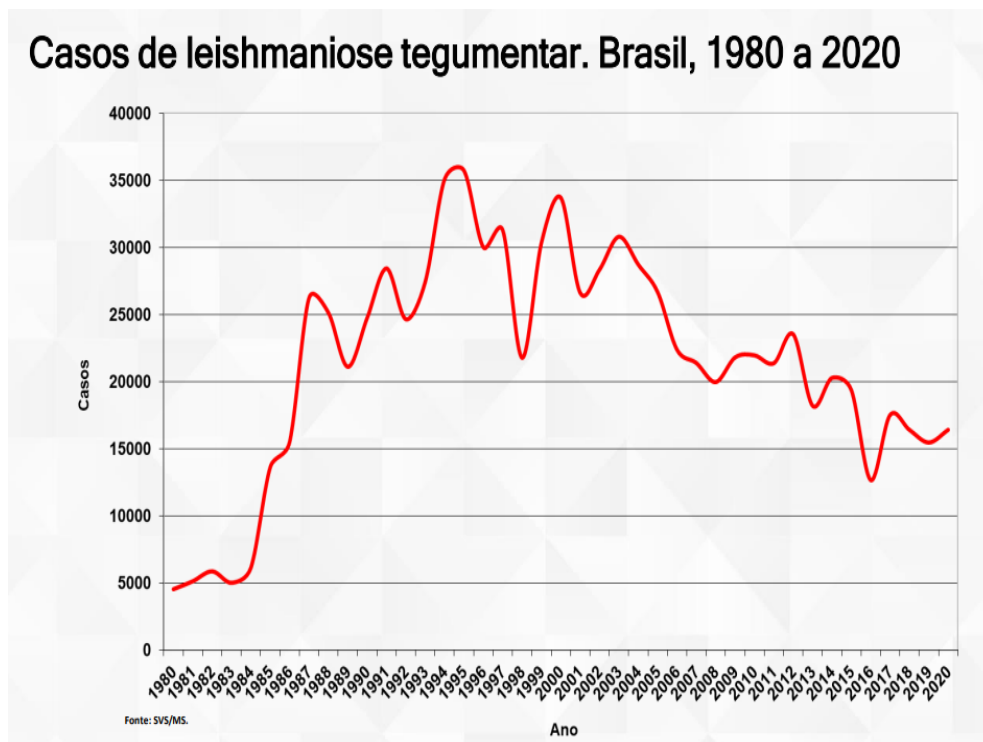
Figura 11 - Distribuição geográfica da LT no mundo



Fonte: adaptado de OMS, 2017.

No Brasil, a LT é uma das afecções dermatológicas de maior destaque, devido à sua magnitude (Fig. 12) e pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no paciente, bem como pelo envolvimento psicológico. Apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras. (Fig. 13) (SVS/ MS, 2020).

Figura 12: Casos confirmados de leishmaniose tegumentar, Brasil – 1980 a 2020.



Fonte: SVS/MS, 2020.

Figura 13 - Casos de leishmaniose tegumentar por município no Brasil.



Fonte: SVS/MS, 2015.

Enquanto a LT apresenta tendência de autocura, a LV é fatal quando não tratada, causando um efeito anual de mortalidade em torno de 59 mil indivíduos (35 mil homens e 24 mil mulheres) (DESJEUX, 2004; BOER et al., 2011).

1.3 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

Os fármacos de primeira escolha no Brasil para o tratamento de todas as formas de leishmaniose são os antimoniais pentavalentes (Tabela 3). Estes antimoniais são medicamentos injetáveis, que devem ser administrados diariamente por um período de cinco semanas ou mais dependendo da resposta clínica do paciente, o que frequentemente requer hospitalização, acarretando desconforto para o paciente e alto custo. Além disso, esses medicamentos causam uma série de reações adversas severas, tais como hepatotoxicidade (HEPBURN *et al.*, 1994), nefrotoxicidade, alterações cardiográficas (BERMAN, 1988), além de haver indícios de indução de mutagenese (LÉONARD; GERBER, 1996). A persistência dos antimoniais no mercado como primeira escolha para o tratamento da leishmaniose há mais de 70 anos não deve ser interpretada como uma vantagem. Ao contrário, pois apresentam além dos inconvenientes já citados, uma taxa de ineficácia crescente, sobretudo em casos de leishmaniose visceral, devido ao surgimento de resistência. Em algumas regiões da Índia, o tratamento com antimonial foi descontinuado, devido à grande ocorrência de casos de resistência (30-60%) (LIRA *et al.*, 1999; SINGH, 2006; SUNDAR *et al.*, 2000; THAKUR *et al.*, 1998).

Entre os fármacos de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose estão a anfotericina B e a pentamidina. A anfotericina B é uma lactona macrocíclica poliênica com potente ação antifúngica, usada classicamente no tratamento de micoses profundas. A anfotericina B é administrada através de infusão endovenosa, sendo ainda mais tóxica do que os antimoniais, e produz febre, calafrio e dor nas articulações, além de severa nefrotoxicidade (BERMAN, 1997, MURRAY, 2005). Já a pentamidina (Tabela 3) é utilizada como segunda escolha contra a leishmaniose desde 1952 e parece interferir com a síntese de

poliaminas, inibindo a S-adenosil-L-metionina, a ODC e a espermidina sintase (BASSELIN *et al.*, 1997). Porém, assim como os antimoniais e a anfotericina B, seu uso está associado com muitas reações adversas, principalmente náusea, vômito e diarreia muito frequentes, hiperglicemia e cardiotoxicidade com menor frequência (MURRAY, 2005).

O principal avanço no tratamento da leishmaniose nos últimos anos ocorreu com a descoberta do efeito terapêutico da hexadecilfosfocolina, a miltefosina (Tabela 3). Trata-se de uma fosfocolina administrada por via oral, desenvolvida pela ASTA Medica (atual Zentaris) para o tratamento do câncer. Porém, a toxicidade nas doses terapêuticas necessárias para combater essa doença limitou os testes clínicos para o câncer. Por outro lado, a miltefosina mostrou atividade contra *Leishmania donovani* e a ASTA Medica, com apoio da OMS e de pesquisadores indianos, realizou com sucesso os testes clínicos (OMS, 2009). A miltefosina foi licenciada pelo governo indiano em março de 2002 e posteriormente em diversos outros países, inclusive o Brasil. Embora a miltefosina represente um marco na luta contra a leishmaniose, sendo o primeiro medicamento de administração oral, ela produz efeitos desagradáveis na maioria dos pacientes tratados. Levantamentos feitos durante os estudos clínicos revelaram que 60% dos pacientes relataram sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômito e diarreia (JHA *et al.*, 1999; SINDERMANN; ENGEL, 2006). Em adição, os parasitos facilmente desenvolvem resistência à miltefosina em modelos experimentais (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2006) e em modelos animais esse fármaco mostrou-se embriotóxico, fetotóxico e teratogênico (SINDERMANN; ENGEL, 2006).

Tabela 3 - Alguns medicamentos utilizados para o tratamento das leishmanioses

Fármaco	Mecanismo de ação	Atividade leishmanicida
Antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio Pentostam®) e antimoniato de N-metilglucamina [Glucantime®]	Inibição da glicólise e na β -oxidação de ácidos graxos. Interferência na síntese de tióis efluxo de tióis intracelulares Ação similar a endonucleases, fragmentando o DNA,	Depleção de ATP Indução da apoptose Inibição da tripanotona redutase Inibição do metabolismo mitocondrial

	perturbação mitocondrial via moléculas mediadoras	Inibem a utilização de S-adenosil-L metionina, impedindo a síntese de moléculas importantes para a manutenção da vida do parasita
Pentamidina	Compete com poliaminas pelo ácido nucleico de ligação e pode se ligar ao DNA citoplasmático aumentam a eficácia dos inibidores do Complexo II da cadeia respiratória mitocôndria	Interfere na replicação e transcrição em nível mitocondrial diminuição do potencial de membrana mitocôndria
Anfotericina B	Aumento da permeabilidade da membrana a prótons e cátions monovalentes	Altera o equilíbrio de íons e conduzem à morte celular
Miltefosina	Provoca apoptose e alteração das vias de sinalização celular mediada por lipídeos Inibe a síntese de lipofosfoglicano (LPG) e glicoproteína 63 (gp63)	Inibição da síntese da membrana celular do parasita e por interrupção das vias de sinalização celulares presentes nessa membrana.

Fonte: Adaptado de MS (2017).

1.4 COMPLEXOS ORGANOMETÁLICOS

Alguns autores já possuem diversos estudos publicados sobre o uso de complexos metálicos para o tratamento da tripanossomíase, malária e leishmaniose, importantes representantes da área geral de doenças tropicais. (SÁNCHEZ-DELGADO; ANZELLOTTI, 2004).

O sinergismo metal-fármaco tem sido empregado para tentar produzir novos agentes quimioterápicos potentes para o tratamento de leishmanioses, usando como base a pentamidina (SÁNCHEZ-DELGADO; ANZELLOTTI, 2004).

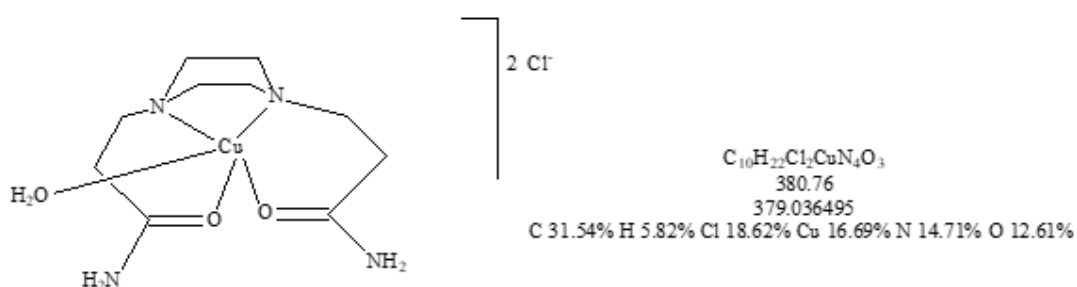
Diante da urgência e necessidade de novos medicamentos eficazes para tratar os milhões de pessoas que sofrem de doenças parasitárias, complexos metálicos aparecem como uma alternativa muito útil, possivelmente por

possuírem alta atividade e toxicidade controlada (SÁNCHEZ-DELGADO; ANZELLOTTI, 2004).

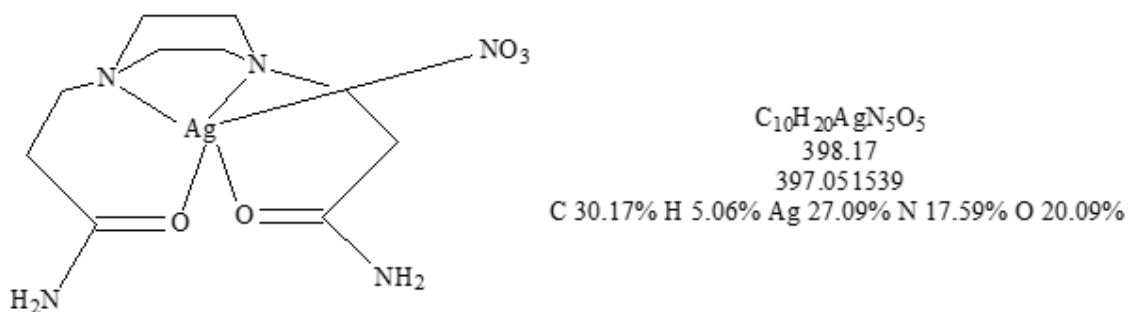
No presente trabalho, avaliamos a atividade leishmanicida de complexos organometálicos de cobre e prata (Fig. 14).

Figura 14 - Complexos metálicos avaliados nesse estudo.

Complexo de cobre:



Complexo de prata:



Fonte – DO AUTOR, 2022.

1.5 COMPOSTOS MESOIÔNICOS – SIDNONAS

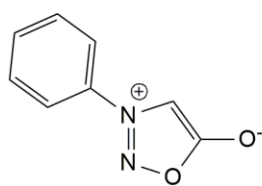
No ano de 1976, Ollis e Ramsden propuseram conceito de mesoiônicos:

Um composto pode ser apropriadamente classificado como mesoiônico quando for constituído por um anel heterocíclico de cinco membros, o qual não possa ser representado satisfatoriamente por uma estrutura covalente ou polar, e que possua um sexteto de elétrons π associados aos cinco átomos que formam o anel. (KAWASE; SAKAGAMI; MOTOHASHI, 2009).

Os compostos mesoiônicos apresentam um momento dipolo na estrutura, mas, no entanto, são globalmente neutros. Por estas características os compostos mesoiônicos não podem ser representados unicamente por uma estrutura polar ou covalente, mas sim como híbridos de ressonância (BADAMI, 2006). Assim, esses compostos podem atravessar membranas biológicas e devido suas cargas parciais positiva e negativa, conseguem interagir com biomoléculas. Em virtude dessas características, o interesse científico por estas moléculas é crescente, principalmente na indústria farmacêutica, apresentando diversas atividades biológicas (KAWASE; SAKAGAMI; MOTOHASHI, 2009; MALLUR *et. al.*, 2007), como analgésica, antimicrobiana, antimalárica, antitumoral (BROWNE; HARRITY, 2010).

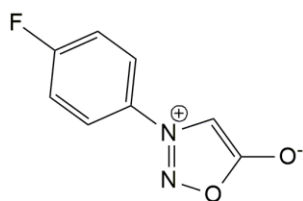
As sidnonas constituem a primeira classe de compostos mesoiônicos sintetizados, possuem importante atividade biológica e são bastante estudadas. Sua forma clássica de obtenção envolve apenas duas etapas: uma N-nitrosação seguida por uma ciclodesidratação. Há várias modificações químicas que podem ser introduzidas nesses compostos, tal como acilação, halogenação, bromação, litiação, cicloadição com alcenos e alcinos, entre outros. Estas alterações visam a síntese de compostos biologicamente ativos ou a potencialização de efeitos biológicos já conhecidos (BROWNE; HARRITY, 2010). Nesse estudo, avaliamos a atividade leishmanicida de sidnonas com várias das substituições mencionadas (Fig. 15).

Figura 15 - Sidnonas com diferentes modificações avaliadas nesse estudo.



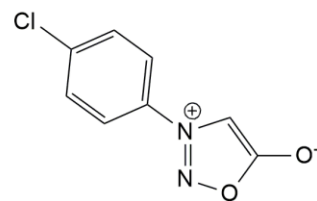
Peso Molecular: 162,15

S1



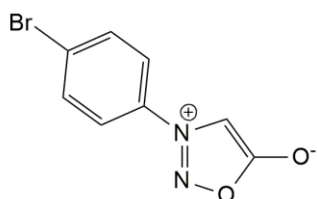
Peso Molecular: 180,14

S2



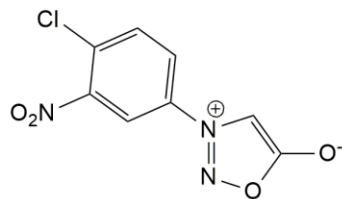
Peso Molecular: 196,59

S3



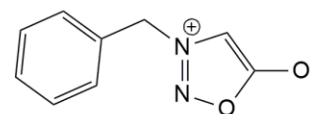
Peso Molecular: 241,04

S4



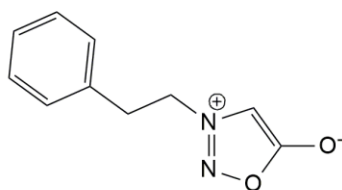
Peso Molecular: 241,59

S5



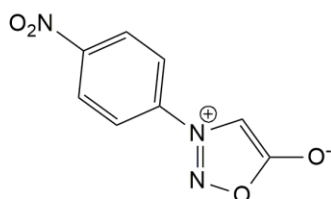
Peso Molecular: 176,17

S6



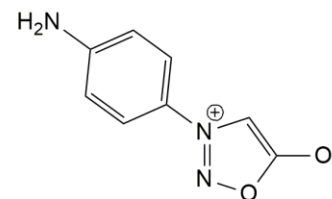
Peso Molecular: 190,20

S7



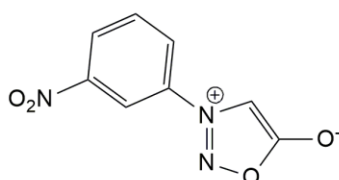
Peso Molecular: 207,14

S8



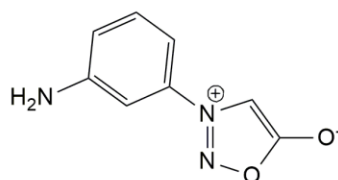
Peso Molecular: 177,16

S8B



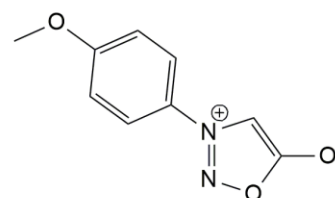
Peso Molecular: 207,14

S9



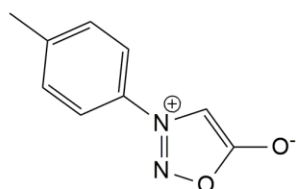
Peso Molecular: 177,16

S9B



Peso Molecular: 192,17

S10



Peso Molecular: 176,17

S11

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* de derivados mesoiônicos e complexos organometálicos.

1.6.2 Objetivos específicos

- 1) Realizar estudo teórico das propriedades preditoras de boa biodisponibilidade oral.
- 2) Avaliar a atividade dos complexos organometálicos e dos derivados mesoiônicos em promastigotas de *L. amazonensis*.
- 3) Avaliar a toxidez das moléculas ativas sobre células de mamíferos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 METODOLOGIA

2.1.1 Derivados mesoiônicos e complexos organometálicos

Os derivados mesoiônicos (sidnonas) foram sintetizados pelo grupo da Profa. Áurea Echevarria, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e os complexos de prata e cobre pelo grupo do Prof. Sérgio Machado, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

2.1.2 Isolamento e de cultivo do parasito.

A cepa MHOM/BR/77/LTB0016 de *L. amazonensis* foi isolada de lesões de camundongos BALB/c infectados e mantida na forma promastigota a 26°C em meio Schneider (Sigma, Sant Louis, USA), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), 100UI/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Sigma, Sant Louis, USA). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de uso de animais do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz (L26/2015, L02/2022).

2.1.3 Atividade antipromastigota

Promastigotas (1×10^7 parasitos/mL) de *L. amazonensis*, mantidas em meio Schneider, suplementado com 10% SFB, penicilina (100UI/ml) e estreptomicina (100mg/ml), foram incubadas com diferentes concentrações das substâncias-teste (volume de 200µL/poço) a 26°C. Após 72 h, resazurina a 50 µM foi adicionada a cada poço por 4 h. A leitura foi realizada em um equipamento Spectra Max GEMINI XPS (Molecular Devices, Silicon Valley, EUA), com excitação a 560 nm e emissão a 590 nm e utilizada como medida indireta da viabilidade dos parasitas. Os valores de IC₅₀ foram calculados por regressão logarítmica não linear no software GraphPad Prism 7.0.

2.1.4 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos

Para avaliar a atividade na célula hospedeira, foram realizados testes de toxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss não infectados na ausência ou presença da substância mais ativa, a sidnona 11, por um período de incubação de 72 horas a 37°C/5%CO₂. Após o tempo de incubação, a viabilidade celular foi avaliada por fluorimetria, adicionando 50 µM de resazurina por poço. A leitura foi realizada em um equipamento Spectra Max GEMINI XPS (Molecular Devices, Silicon Valley, EUA), com excitação a 560 nm e emissão a 590 nm. Os valores de CC₅₀ foram calculados por regressão logarítmica não linear no software GraphPad Prism 7.0.

2.1.5 Análise *in silico* dos parâmetros físico-químicos das substâncias testadas

Visando o futuro ensaio *in vivo* das substâncias mais promissoras, verificamos a compatibilidade das moléculas aos descritores moleculares de Lipinski (Lipinski 2004; Lipinski et al. 2001), conhecidos como: “Regra dos Cinco” e realizamos a análise *in silico* das propriedades físico-químicas das substâncias utilizando a plataforma pkCSM (Pires et al. 2015). Para realizar o teste desses parâmetros geramos os “smiles” (simplified molecular-input lineentry system) uma forma de notação em linha que descreve a estrutura química da substância apresentados na Tabela 4. Não foi possível gerar o smile dos complexos organometálicos para realizar essa análise.

Tabela 4 - Representação em forma de smiles das moléculas analisadas nesse estudo.

Molécula	Smile
S1	<chem>[O-]C1=C[N+](C2=CC=CC=C2)=NO1</chem>
S2	<chem>[O-]C1=C[N+](C2=CC=C(F)C=C2)=NO1</chem>

S3	<chem>[O-]C1=C[N+](C2=CC=C(Cl)C=C2)=NO1</chem>
S4	<chem>[O-]C1=C[N+](C2=CC=C(Br)C=C2)=NO1</chem>
S5	<chem>[O-]C1=C[N+](C2=CC([N+](O)=O)=C(Cl)C=C2)=NO1</chem>
S6	<chem>[O-]C1=C[N+](CC2=CC=CC=C2)=NO1</chem>
S7	<chem>[O-]C1=C[N+](CCC2=CC=CC=C2)=NO1</chem>
S8	<chem>[O-]C1=C[N+](C2=CC=C([N+](O)=O)C=C2)=NO1</chem>
S8B	<chem>[O-]C1=C[N+](C2=CC=C(N)C=C2)=NO1</chem>
S9	<chem>[O-]C1=C[N+](C2=CC=CC([N+](O)=O)=C2)=NO1</chem>
S9B	<chem>[O-]C1=C[N+](C2=CC=CC(N)=C2)=NO1</chem>
S10	<chem>[O-]C1=C[N+](C2=CC=C(OC)C=C2)=NO1</chem>
S11	<chem>[O-]C1=C[N+](C2=CC=C(C)C=C2)=NO1</chem>

Fonte: Autoria própria ferramenta Medchem Designer 5, 2022.

2.1.6 Análise estatística

Os resultados foram avaliados utilizando o teste não paramétrico ANOVA one-way/Dunnette. O nível de significância foi estabelecido em * $p < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. As análises foram realizadas usando GraphPad Prism 7.0 Software (San Diego, CA, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO IN SÍLICO DAS PROPRIEDADES PREDITORAS DE BOA BIODISPONIBILIDADE ORAL

Inicialmente, fomos avaliar se as moléculas estudadas possuem características favoráveis ao desenvolvimento de fármacos, utilizando a ferramenta de bioinformática PKcms. Um dos parâmetros avaliados foi a Regra dos Cinco de Lipinsky. Essa regra foi criada através da observação de que fármacos com atividade por via oral, em sua maioria, são moléculas pequenas e moderadamente lipofílicas. Christopher Lipinsky, então, sugeriu em seus trabalhos (LIPINSKY *et al.*, 2001; LIPINSKY, 2004) que um candidato a fármaco não deve violar mais do que uma das seguintes regras:

- Não possuir mais do que cinco átomos doadores de ligação de hidrogênio;
- Não possuir mais do que 10 átomos aceptores de ligação de hidrogênio;
- Não possuir massa molecular superior a 500 daltons;
- Possuir coeficiente de partição octanol:água (log P) menor que 5.

Adicionalmente, também avaliamos dois parâmetros complementares: a área de superfície polar (PSA) e o número de ligações rotativas, que foram propostas posteriormente por Veber e colaboradores (2002). Nesse caso, as moléculas devem possuir menos que 10 ligações rotativas e PSA menor que 140 Angstroms. Como pode ser observado na Tabela 5, todas as substâncias utilizadas nesse estudo passam pelos critérios de Lipinsky e Veber.

Tabela 5 - Parâmetros de biodisponibilidade oral

Substância	Peso Molecular	Log P	Receptores	Doadores	Superfície de contato	Nº de rotações
S1	162.148	0.0249	3	0	68.646	1
S2	180.137	0.164	3	0	72.812	1
S3	196.593	0.6783	3	0	78.949	1
S4	241.044	0.7874	3	0	82.514	1

S5	241.59	0.5865	5	0	93.602	2
S6	176.175	0.084	3	0	75.011	2
S7	190.202	0.2784	3	0	81.376	3
S8	207.145	-0.0669	5	0	83.299	2
S8B	177.163	-0.3929	4	1	73.986	1
S9	207.145	-0.0669	5	0	83.299	2
S9B	177.163	-0.3929	4	1	73.986	1
S10	192.174	0.0335	4	0	80.125	2
S11	176.175	0.33332	3	0	75.011	1

Fonte: Autoria própria, ferramenta PKcms (2022).

3.2 ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA

O passo seguinte foi realizar a avaliação da atividade leishmanicida dessas substâncias. Embora a forma amastigota seja a que está presente nos pacientes infectados sendo, portanto, o alvo da quimioterapia, nós realizamos a triagem inicial dos candidatos a fármaco em promastigotas. Essa escolha se deu considerando-se aspectos práticos, éticos e científicos. Os ensaios em amastigotas intracelulares são muito mais trabalhosos, pois envolvem mais etapas e a leitura do resultado não pode ser feita de maneira automatizada. Pelo contrário, é um processo exaustivo, que depende da habilidade do observador reconhecer e contar cada amastigota dentro do macrófago. Além disso, no padrão-ouro, se utiliza macrófagos murinos, o que levanta uma questão ética de sacrificar animais sem nenhuma evidência prévia experimental da atividade das substâncias. Em adição, Muylder e colaboradores (2011) realizaram um estudo comparativo do emprego de promastigotas e amastigotas intracelulares no resultado de triagem de fármacos. De 909 substâncias testadas, 57 foram positivas em promastigotas, enquanto 27 em amastigotas intracelulares. Dessas, 26 foram ativas em ambas as formas e apenas 1 foi ativa somente em amastigotas. Pode-se concluir, então, que o principal problema da triagem de

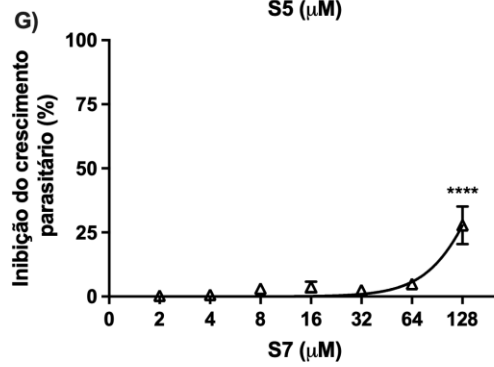
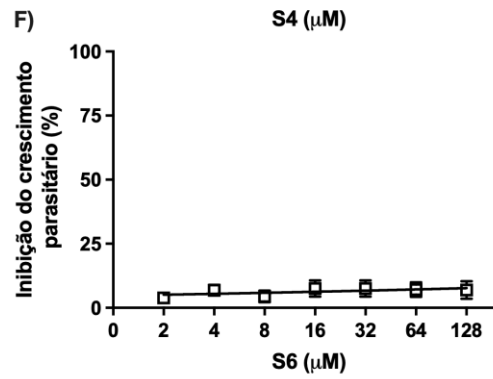
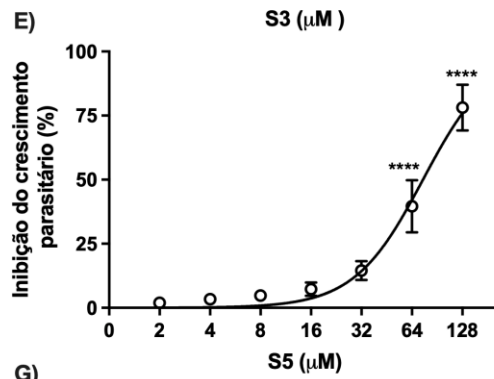
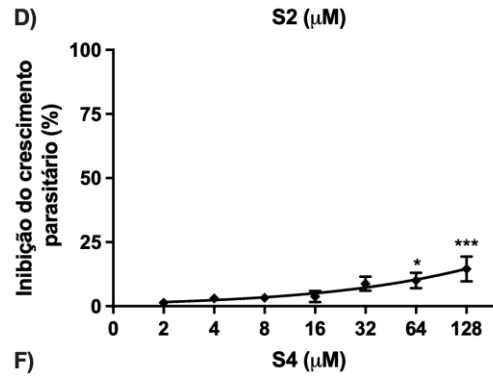
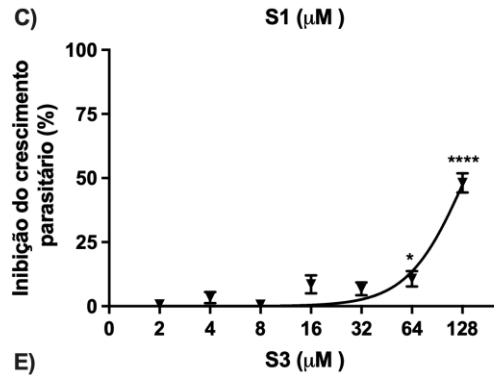
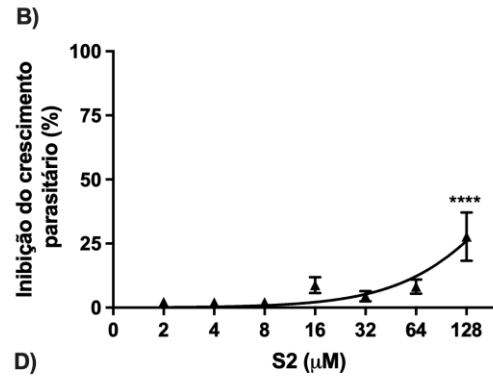
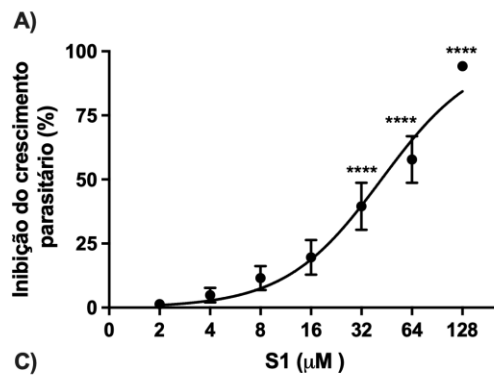
candidatos a fármacos utilizando promastigotas é o grande número de falsos positivos. Porém, no exemplo do estudo, seria possível reduzir de 909 substâncias que seriam testadas diretamente em amastigotas para apenas 57, reduzindo em mais de 90% o esforço, o custo e o uso de animais.

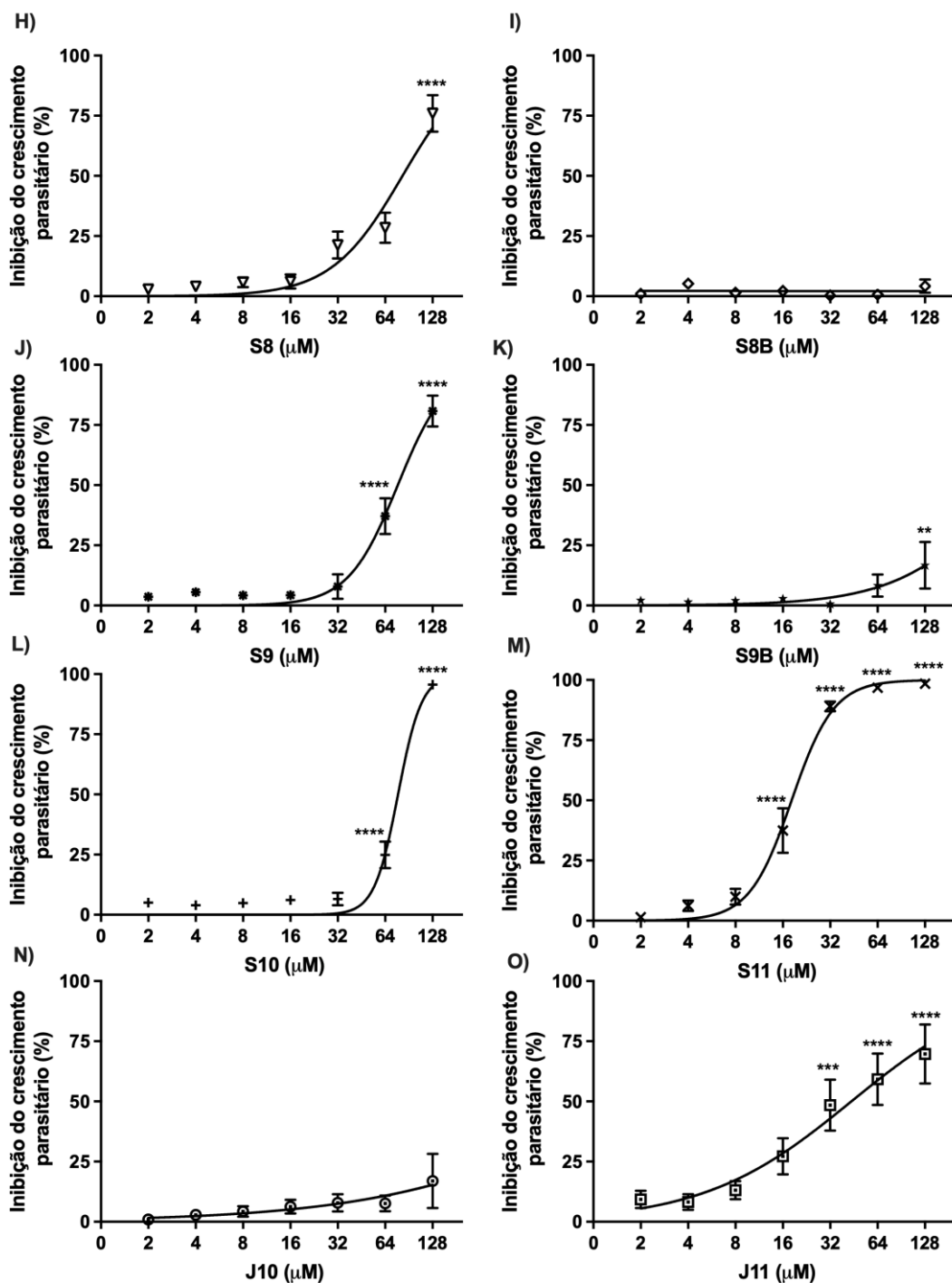
Como é possível observar na Figura 14 e na Tabela 6, sete substâncias apresentaram atividade antipromastigota, sendo elas S1, S5, S8, S9, S10, S11 e J11 possuindo os respectivos IC_{50} : 42,05 μ M (34,43 - 51,26 μ M), 74,42 μ M (34,43 - 51,26 μ M), 82,4 μ M (71,48 - 95,50 μ M), 76,94 μ M (69,32 - 85,67 μ M), 77,23 μ M (82,29), 18,18 μ M (16,66 - 19,84 μ M), 43,56 μ M (30,42 - 66,74 μ M).

Esses valores estão de acordo com os publicados por Dos Santos e colaboradores (2021) que encontraram valores semelhantes de IC_{50} para diferentes sais mesoiônicos.

Segundo Katsuno 2010, uma substância deve possuir um $IC_{50} < 10\mu$ M para ser considerada ativa. Dentre as substâncias analisadas nesse estudo, a que mais se aproximou desse valor foi a S11 com o IC_{50} de 18,18 μ M. Porém, embora nenhuma substância tenha atingido o valor preconizado pela literatura, fica evidente que essa classe de substâncias é promissora, pois várias moléculas testadas foram capazes de matar as promastigotas dentro da faixa de concentração do experimento. A avaliação da estrutura-atividade poderá revelar as futuras modificações na estrutura base para torna-las mais potentes.

Figura 16 - Avaliação da atividade leishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis*.





*Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados com as moléculas em diferentes concentrações por 72 horas a 26°C. (A) S1, (B) S2, (C) S3, (D) S4, (E) S5, (F) S6, (G) S7, (H) S8, (I) S8B, (J) S9, (K) S9B (L) S10, (M) S11, (N) J10, (O) J11. Os experimentos foram realizados em triplicatas, n=3. Os gráficos e os valores de IC₅₀ foram obtidos no programa Graphpad Prism

7. Teste one way ANOVA, * $p < 0,5$, ** $p < 0,05$ *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle.

Tabela 6 - IC₅₀ das substâncias em promastigota de *L. amazonensis*.

Moléculas	IC₅₀ (µM)
S1	42,05
S2	>128
S3	>128
S4	>128
S5	74,42
S6	>128
S7	>128
S8	82,4
S8B	>128
S9	76,94
S9B	>128
S10	77,23
S11	18,18
J10	>128
J11	43,56

Fonte: GraphPad Prism 5 (2019).

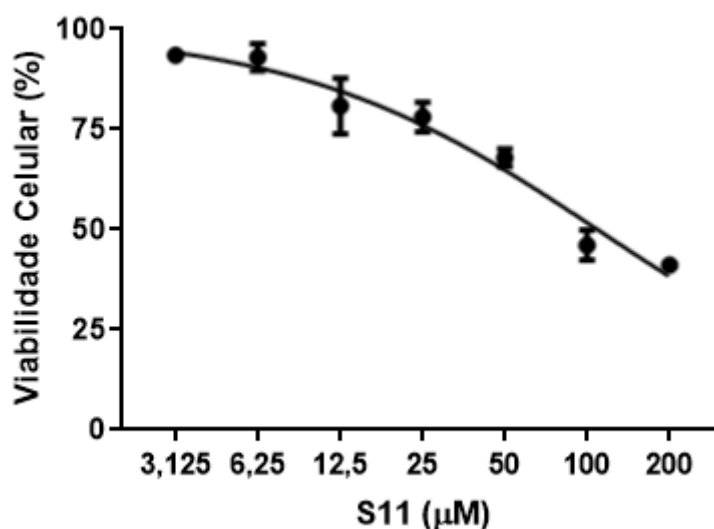
3.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Apesar de sete substâncias terem se mostrado ativas como mencionado anteriormente, decidimos seguir para o experimento de citotoxicidade apenas com a sidnona S11 pelo fato de ser a substância que mais se aproxima do valor

de IC_{50} estabelecido por Katsuno (2010). A sidnona S11 mostrou possuir uma Concentração Citotóxica (CC_{50}) de $109,4 \mu M$ ($86,97 - 137,6$), ou seja, sua concentração citotóxica que inibe 50% da viabilidade de macrófagos é cerca de seis vezes maior que a concentração inibitória parasitária para promastigotas que foi de $18,18 \mu M$.

O Índice de Seletividade (IS) é um parâmetro usado para determinar a seletividade do fármaco, ou seja, o quanto a mais de fármaco seria necessário para ser tóxico para células de mamífero, ele é calculado a partir da razão entre CC_{50} e IC_{50} em amastigotas ao fazermos uma relação com IC_{50} de promastigota o resultado é inferior ao preconizado por Katsuno que é de 10. Caso esse resultado prossiga para amastigotas novas modificações devem ser realizadas nas moléculas antes de seguir para os ensaios *in vivo*.

Figura 17 - Avaliação da citotoxicidade da sidnona S11



*Os experimentos foram realizados em duplicata, $n=2$. O gráfico e os valores de CC_{50} foram obtidos no programa Graphpad Prism

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo avaliamos a atividade de 15 substâncias sintéticas inéditas, visando uma inovação radical, ou seja, o desenvolvimento de um fármaco a partir de uma nova entidade química. Todas as substâncias escolhidas para o estudo estão em conformidade com os parâmetros da regra dos cinco de Lipinsky e Veber indicando possuir boa biodisponibilidade oral. Das 15 substâncias, sete apresentaram algum grau de atividade, embora nenhuma tenha atingido a potência desejada, que seria IC_{50} menor que $10\ \mu M$. A sidnona 11 foi a mais ativa, com IC_{50} cerca de $18\ \mu M$ e CC_{50} de 109,4. Porém, essas informações são valiosas para a análise de estrutura-atividade que irá guiar o planejamento da síntese de uma nova série de substâncias, com o objetivo de aumentar a potência, para que possamos prosseguir para os ensaios de amastigotas intracelulares, determinar o índice de seletividade e assim seguir para os ensaios em modelos *in vivo* se o IS for maior que 10.

5 REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **Neglected Tropical Diseases**, p. 1–40, 2016.
- ALVARENGA, I. M. Leishmaniose visceral: caracterização de uma nova área de transmissão, de um antigo problema de saúde pública. 2019. 60 p. **Dissertação Mestrado em Ciências Veterinárias** – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.
- ALVAR, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., ... & WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035671>>. Acesso em: 15 Dez 2022.
- ANDRADE-NETO, V et al. Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 15–18, 2018.
- ANDREWS, K. T.; FISHER, G.; SKINNER ADAMS, T. S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases, **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 2, p. 95–111, Mar, 2014.
- BASSELIN, M.; BADET-DENISOT, M.A.; LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type pentamidine treated and pentamidine-resistant Leishmania **Exp Parasitol.**, v. 85, p.274-282, 1997.
- BERMAN, J D et al. Effects of Ketoconazole on Sterol Biosynthesis by Leishmania Mexicana Mexicana Amastigotes in Murine Macrophage Tumor-Cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 85–92, 1986.
- BLANCO, V et al. Clinical and Epidemiologic Profile of Cutaneous Leishmaniasis in Colombian Children : Considerations for Local Treatment. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 2, p. 359–364, 2013.
- BOER, M et al. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1471–1477, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso eletrônico]. Brasília. Ministério da Saúde, 2017. Disponível em:<http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmanios_e_tegumentar.pdf>. Acesso em: 01 Jul de 2022.

BROWNE, D. L.; HARRITY, J. P. A. Recent developments in the chemistry of sydnones, **Tetrahedron**, v. 66, n. 89, p. 553-568, 2010.

CARINI, Antonio; PARANHOS, Ulisses. Identificação das úlceras de Bauru ao botão do oriente. **Revista Médica de São Paulo**, São Paulo, n. 6, p. 111-116, 1909b.

CARINI, Antonio; PARANHOS, Ulisses. Identification de l'Ulceras de Bauru' avec le bouton d'orient. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, França, v. 2, n. 5, p. 255-257, 1909a.

CDC, Centers For Disease Control And Prevention (2017). **Leishmaniose**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> Acesso em: 15 de Nov. de 2021.

CHENG; F. *et al.* ADMETSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties, **Journal of Chemical Information and Modeling**, Oct, 2012. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci300367a>. Acesso em: 20 de Jan, 2020.

CINCURÁ, C et al. Mucosal leishmaniasis: A retrospective study of 327 cases from an endemic área of Leishmania (Viannia) braziliensis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 97(3), p. 761-766, 2017.

CONCEIÇÃO-SILVA, F., and ALVES, C. R., comps. Leishmanioses do continente americano [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014, 511 p. ISBN 978-85-7541-568-9. <https://doi.org/10.7476/9788575415689>. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/42089/3/conceicao-9788575415689.pdf>>. Acesso 05 Jul 2022.

COSTA, D.L., and COSTA, C.H.N. Leishmaniose Visceral. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., and ALVES, C. R., comps. **Leishmanioses do continente americano [online]**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014, pp. <https://doi.org/10.7476/9788575415689.0020>. Disponível em: <https://books.scielo.org/id/dgkx2/pdf/conceicao-9788575415689-20.pdf>. Acesso em: 01 de Jul de 2022.

DE MUYLDER G., ANG K.K., CHEN S., ARKIN M.R., ENGEL J.C. and MCKERROW J.H. A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS Negl Trop Dis**. 2011 Jul;5(7):e1253. doi: 10.1371/journal.pntd.0001253. Epub 2011 Jul 19. PMID: 21811648; PMCID: PMC3139667.

DOS SANTOS Rosa A, Frauches-Santos C, Santana RC, Gomes JSC, Lima K, Echevarria A, Saraiva E, Decote-Ricardo D, Atella G, Pinto-da-Silva LH. Leishmanicidal effect of 1,3,4-thiadiazolium mesoionic salts on *Leishmania amazonensis* in vitro. *Parasitol Int*. 2021 Aug;83:102342. doi: 10.1016/j.parint.2021.102342. Epub 2021 Apr 5. PMID: 33831578.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, v. 27, p. 305–318, 2004.

Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *Neglected Tropical Diseases*, p. 1–40, 2016.

DNDi. Doenças e projetos – Leishmanioses. Disponível em Acessado em 01 de julho de 2022. DONOVAN, C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Natural Medical Journal India*, v.7, n.196, p.201-202, 1903.

DOS SANTOS, A. R., *et al.* Leishmanicidal effect of 1,3,4-thiadiazolium mesoionic salts on *Leishmania amazonensis* in vitro, *Parasitology International [BRASIL]*, v. 83, Ago, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383576921000611?via%3Dihub>. Acesso em: 05 de Set de 2021.

FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Drug repositioning approaches to parasitic diseases: a medicinal chemistry perspective, *Drug discovery today*, v. 21 p. 1699-1710, Jun, 2016.

FRAGA, J et al. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 74, n. 2, p. 142–150, 2012.

GEORGIADOU, S; MAKARITSIS, K; DALEKOS, G. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology , diagnosis and treatment. *Journal of Translational Internal Medicine*, v. 3, n. 2, 2015.

GOTO, H; ANGELO, J. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert-reviews*, p. 419–433, 2010.

HARMS G. & FELDMEIER. Hermann, The impact of HIV infection on tropical diseases, *Infectious Disease Clinics of North America*, Volume 19, Issue 1,2005, p 121-135, ISSN 0891-5520, <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.10.002>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891552004001114>>. Acesso em: 23 Dez 2022.

HASHIGUCHI, Y et al. Diffuse and disseminated leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Trop Med Health*, v. 2, n. 44, 2016.

HEPBURN NC, Tidman MJ, Hunter JA. Aminosidina (paromomicina) versus estiboglucoto de sódio para o tratamento da leishmaniose cutânea americana. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994 Nov-Dez;88(6):700-3. doi: 10.1016/0035-9203(94)90237-2. 7886779.

KAWASE, M.; SAKAGAMI, H.; MOTOHASHI, N. The Chemistry of Bioactive Mesoionic Heterocycles. *Bioactive Heterocycles VII. Topics in Heterocyclic Chemistry*, [Berlin], v. 16 p. 135-152, Dez, 2007.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species : a brief historical review of their discovery , ecology and taxonomy. **Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS**, v. 1, n. 2, p. 13–32, 2010.

LEONARD A, Gerber GB. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of antimony compounds. **Mutation Research** 366:1-8, 1996.

LIPINSKI CA. *et al.* Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution, **Drug Discovery Today Technologies**, v. 1, p. 337-341, Dez, 2004.

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. 46, p. 03-26, Mar, 2001.

LIRA, R., Shyam Sundar, A. Makharia, Richard Kenney, Albert Gam, Elvira Saraiva, David Sacks, Evidence that the High Incidence of Treatment Failures in Indian Kala-Azar Is Due to the Emergence of Antimony-Resistant Strains of Leishmania donovani, **The Journal of Infectious Diseases**, Volume 180, Issue 2, August 1999, Pages 564–567, <https://doi.org/10.1086/314896>

MALLUR, S. G. *et al.* Synthesis and evaluation of phenyl substituted sydnone as potential DPPH-radical scavengers, **Indian Journal of Chemistry**, v. 46B, p. 1686-1689, Out, 2007.

MURRAY HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. **Lancet**. 2005 Oct 29-Nov 4;366(9496):1561-77.

NEUBER, H. Leishmaniose. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, 2008 6: 754-765. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2008.06809.x>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Control of Neglected Tropical Diseases. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/lymphatic-filariasis/diagnosis-and-treatment>>. Acesso em: 03 m=Mar 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: A road map for neglected tropical diseases 2021–2030. [S.l.]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>. Acesso em: 03 Mar 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Leishmaniasis. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 10 mar 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Neglected tropical diseases. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases>>. Acesso em: 02 Mar 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Doenças tropicais negligenciadas. [S.l.]. [s.d.]. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1>. Acesso em: 02 Mar 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Trabalhando para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas: primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/7680>>. Acesso em: 03 Mar 2022.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE-OPAS. Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas. Report n. 10. Brasília; 2021. Disponível em: <<https://www.paho.org/leishmaniasis>> <https://www.paho.org/leishmaniasis>

PAVLI, A; MALTEZOU, H. International Journal of Infectious Diseases Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1032–1039, 2010.

PÉREZ-VICTORIA FJ, Sánchez-Cañete MP, Seifert K, Croft SL, Sundar S, Castanys S, Gamarro F. Mechanisms of experimental resistance of Leishmania to miltefosine: Implications for clinical use. **Drug Resist Updat**. 2006 Feb-Apr;9(1-2):26-39. doi: 10.1016/j.drup.2006.04.001. PMID: 16814199.

RAVERA M, *et al.* Organometallic compounds in the discovery of new agents against kinetoplastid-caused diseases, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 155 p. 459-482 Jul, 2018.

REMME, J.H.F. *et al.* Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective, **Trends in Microbiology**, v. 10, p. 435-440, 2002.

REY, L. Parasitologia. 4ª edição. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro 2008, 914p.

RODRIGUES RF, *et al.* Investigation of trypanothione reductase inhibitory activity by 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide derivatives and molecular docking studies, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Mar, 2012. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/22304847>. Acesso em: Set de 2021

SAIRAFIANPOUR, M. *et al.* Leishmanicidal, antiplasmodial, and cytotoxic activity of novel diterpenoid 1,2-quinones from *Perovskia abrotanoides*: New source of transquinones, Journal of natural products, **Journal of Natural Products**, Oct, 2001. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np010032f>. Acesso em: Jan de 2020.

SCORZA, B; CARVALHO, E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **Int J Mol Sci**, v. 18(6), n. 1296, 2017.

SERBAN G. Future Prospects in the Treatment of Parasitic Diseases: 2-Amino-1,3,4-Thiadiazoles in Leishmaniasis, **Molecules**. [Romênia] Abr, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/8/1557>. Acesso em: 06 de Set de 2021.

SILVA, A.J.M. *et al.* Antitumoral, antileishmanial and antimalarial activity of pentacyclic 1,4-naphthoquinone derivatives. [BRASIL]: **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2009. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/31056>. Acesso em: 21 de Jan de 2020.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, [Brasil], Mai, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300019>. Acesso em: 19 de Jan de 2020.

SINDERMANN H, Engel J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Dec;100 Suppl 1:S17-20. doi: 10.1016/j.trstmh.2006.02.010. Epub 2006 May 26. PMID: 16730362.

SINGH, O *et al.* Asymptomatic Leishmania Infection: A New Challenge for Leishmania Control. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, p. 1424–1429, 2014.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, p. 1–10, 2017.

SUNDAR, S; CHAKRAVARTY, J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. **Expert opinion on investigational drugs**, p. 787–794, 2008.

TÁPIA, R.A. *et al.* Synthesis and antiprotozoal activity of naphthofuranquinones and naphthothiophenequinones containing a fused thiazole ring, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, p. 2175-2182, 2003.

TEIXEIRA, D *et al.* The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 8–11, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.100359>. Acesso em: 01 de Jul de 2022.

THAKUR, Jha, Olliaro P, Thakur CP, Kanyok TP, Singhania BL, Singh IJ, Singh NK, Akhoury S, Jha S. Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India. **BMJ.** 1998 Apr 18;316(7139):1200-5. doi: 10.1136/bmj.316.7139.1200. PMID: 9583927; PMCID: PMC28521.

THAKUR, Jha. Sundar S, Thakur CP, Bachmann P, Karbwang J, Fischer C, Voss A, Berman J. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **N Engl J Med.** 1999 Dec 9;341(24):1795-800. doi: 10.1056/NEJM199912093412403. PMID: 10588964.

VALDERRAMA, J.A. *et al.* Studies in quinones: Synthesis and leishmanicidal activity of acylchloroquinones and hydroquinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4153-4159, Jul, 2005.

WHO, World Health Organization, **Leishmaniasis**: the global trend, Geneva, Jan 2009. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/30-01-2009-leishmaniasis-the-global-trend>. Acesso em: 19 de Jan de 2020.

