



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ-MACAÉ
Professor Aloísio Teixeira



LUIZ OCTAVIO PEREIRA BRANCO

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE ARIL HIDRAZIDAS

**MACAÉ
2021**

LUIZ OCTAVIO PEREIRA BRANCO

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE ARIL HIDRAZIDAS

Trabalho de Conclusão de Curso
Apresentado ao Curso de
Farmácia da Universidade Federal
do Rio de Janeiro – Campus
Macaé como um dos requisitos
para obtenção do título de
farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Evanoel Crizanto de Lima

MACAÉ

2021

B816s

Branco, Luiz Octavio Pereira

Síntese e avaliação da atividade leishmanicida de aril hidrazidas. / Luiz Octavio Pereira Branco. -- Macaé, 2021.

48 f.

Orientador: Evanoel Crizanto de Lima

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé Professor Aloísio Teixeira, Bacharel em Farmácia, 2021.

1. Leishmania. 2. Leishmaniose. I. Lima, Evanoel Crizanto de, orient.
II. Título.

CDD 616.9364

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Campus UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira
Bibliotecária Rosangela Ribeiro Magnani Diogo CRB7/3719

LUIZ OCTAVIO PEREIRA BRANCO

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE ARIL HIDRAZIDAS

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 27 de 05 de 2021.

Comissão avaliadora:

Prof. Dr. Evanoel Crizanto de Lima (Presidente da Banca)

UFRJ/Campus Macaé

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3217533236910632>

Prof. Dr. Nelilma Correia Romeiro

UFRJ/Campus Macaé

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5103876509322346>

Prof. Dr. Tiago Lima da Silva

UFRJ/Campus Macaé

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3937046669738188>

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelas conquistas dos meus estudos e tudo que ele me proporcionou na vida, e por ter me abençoado com uma família que me deu todo amor e apoio durante toda a trajetória da minha vida, fazendo me tornar uma pessoa melhor a cada dia. Agradeço também a amigas que jamais poderia esquecer e a quem tenho muito carinho e gratidão, Silvia Regina da Mota Brandao, Yolanda Pinard e Maria Tereza Mendes Costa que me ajudaram a concluir esse sonho.

A Faperj que foi o órgão de fomento que forneceu o suporte financeiro ao projeto, meus agradecimentos.

Ao grupo Farmanguinhos que foram nossos colaboradores na realização das análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa, meus agradecimentos.

Agradecimento especial ao meu orientador, Evanoel Crizanto de Lima por ter me aceitado no projeto, que proporcionou um maior conhecimento na vida acadêmica, sempre dando conselhos e incentivando a busca por mais conhecimento que foram fundamentais para realizar e prosseguir os estudos, e direcionar uma futura caminhada profissional. Eternamente grato por todo o apoio. Que Deus ilumine sempre você e sua família.

RESUMO

Introdução: A leishmaniose é um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e da família *Trypanosomatidae*. Este conjunto de doenças possui, além do impacto socioeconômico, a segunda maior incidência parasitária, logo após a malária. Pode ser classificada em quatro formas principais: Leishmaniose cutânea, Leishmaniose muco cutânea, Leishmaniose cutânea difusa e Leishmaniose visceral (LV), sendo esta forma mais severa, podendo ser fatal se não for tratada. Recentemente, descobrimos um composto que apresentou atividade leishmanicida contra *L. amazonensis* na forma promastigota e sobre a enzima arginase de *L. amazonensis*. **Objetivo:** Neste trabalho visou-se a produção e avaliação de novas hidrazidas com potencial atividade leishmanicida com base em alterações de um composto protótipo. Os compostos sintetizados terão o seu perfil leishmanicida avaliado nas formas promastigota e amastigota de *L. amazonensis*. **Metodologia:** Após escolha da melhor condição experimental para obtenção das hidrazidas-alvo (**2a-g**), foram então preparados diferentes produtos substituídos na posição *orto*- ou *para*- a partir dos respectivos anidridos isatoicos e das aril hidrazinas comercialmente disponíveis. A atividade leishmanicida dos compostos preparados foi avaliada pelo grupo do prof. Edson Silva, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (USP). **Resultados:** Através desta nova síntese pode-se preparar as novas moléculas em uma única etapa, um ganho de tempo e de recursos quando comparada à síntese do protótipo, de 3 etapas. Durante a síntese utilizou-se solventes distintos para avaliar a melhor condição experimental na obtenção do produto, obtendo resultados melhores nos testes utilizando etanol em refluxo com os cloridratos das respectivas hidrazinas, em meio básico para desprotonação e obtenção dos nucleófilos livres. As reações apresentaram um tempo de reacional de em média 4 horas, onde foi realizado esse acompanhamento através de cromatografia em camada fina (CCF). Em uma triagem em culturas de promastigotas de *Leishmaniose amazonensis* todos os compostos apresentaram inibição acima de 50% a 100 µM em seguida foi na nova triagem a 10 µM onde também apresentaram uma inibição satisfatória, com isso os quatro compostos com melhor desempenho que foram submetidos a determinação do IC₅₀ e apresentaram um resultado satisfatório de até 1,3 µM, sendo feita a comparação com a anfotericina B que foi o controle positivo e apresentou um IC₅₀ = 0,02 µM. **Conclusão:** Foram sintetizados sete novas hidrazidas com rendimentos variando de

moderados a bons, como uma nova classe de potenciais agentes leishmanicidas. Os compostos apresentaram uma considerável toxicidade a 10 μM em macrófagos peritoneais, além disso, a inserção do bromo aos grupos fenila, levou a um aumento na inibição do crescimento das formas promastigotas em cerca de 10 vezes.

Palavras-chave: anidrido isatoico, fenil hidrazinas, aril hidrazidas, leishmania

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estatísticas de endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo (World Health Organization, 2019).....	15
Figura 2: Estatísticas de endemicidade da leishmaniose visceral no mundo (World Health Organization, 2019).....	17
Figura 3: Casos de leishmaniose visceral no Brasil, 1980 a 2017	18
Figura 4: Casos e coeficiente de incidência de LV, Brasil, 2008 a 2017	18
Figura 5: Distribuição global de leishmaniose e países que relatam coinfeção por HIV/ Leishmania (World Health Organization, 2019).....	19
Figura 6: Ciclo de vida de Leishmania em hospedeiros mamíferos (Centers for Disease Control and Prevention – CDC. Imagem Library.....	21
Figura 7: Fármacos de 1ª escolha no tratamento da leishmaniose	23
Figura 8: Estrutura da anfotericina B, fármaco de 2ª escolha no tratamento da leishmaniose	24
Figura 9: Estrutura da pentamidina, fármaco de 2ª escolha no tratamento da leishmaniose	25
Figura 10: Estrutura da miltefosina.....	26
Figura 11: Estrutura da paromomicina	26
Figura 12: Estrutura da sitamaquina (WR-6026)	27
Figura 13: Estrutura do fexinidazol.....	27
Figura14: Metabolismo da L-arginina pela via enzimática da arginase	29
Figura15: Espectro de RMN de ¹ H do composto 2a	40
Figura 16: Comparação da atividade em promastigota da série antranil hidrazidas: A- Curva log(dose) resposta; B- IC ₅₀ . # p < 0,001 vs 7 e 18; * p < 0,05 vs 7 Anfotericina IC ₅₀ = 0,02 µM.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudo para otimização reacional na obtenção de aril hidrazidas 2a	37
Tabela 2: Aril hidrazidas obtidas 2b-g	38
Tabela 3: Triagem da série antranil hidrazidas a 10 μM e comparação das IC_{50} dos compostos que apresentaram inibição do crescimento de promastigotas maior que 50% a 10 μM	42

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Análogos de 1 planejados por supressão do grupo CF ₂	32
Esquema 2: Metodologia para obtenção da molécula alvo	33
Esquema 3: Obtenção de novas aril hidrazidas substituídas	34
Esquema 4: Obtenção de anidridos isatoicos 3a-c	34
Esquema 5: Reagentes não substituídos para otimização da condição reacional ...	36
Esquema 6: Aril hidrazidas orto/para substituídas	37
Esquema 7: Mecanismo de reação para formação das aril hidrazidas	39
Esquema 8: Formação de anidridos isatoicos a partir da oxidação de suas respectivas isatina	41

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μM	Micromolar
Ac₂O	Anidrido Acético
AcOH	Ácido Acético
CCF	Cromatografia em Camada Fina
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
CpG-D35	Imunomodulador para Leishmaniose Cutânea
DNDi	Drugs for Neglected Diseases Initiative
EtOH	Etanol
H₂O₂	Peroxido de Hidrogênio
HAT	Tripanossomíase Humana Africana
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC₅₀	Concentração Inibitória Média
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Muco Cutânea
LOHA	N ^ω -Hidroxi-L-Arginina
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MeCN	Acetonitrila
mL	Mililitro
mmol	Milimol
NaOH	Hidróxido de Sódio
NOS II	Óxido Nítrico Sintase II
PKDL	Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar

Rf	Fator de Retenção
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SBIII	Antimoniais Trivalentes
SBV	Antimoniais Pentavalentes
SINAN	Sistema de Informações de Agravos de Notificação
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
t.a.	Temperatura Ambiente

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	14
1.1 – A Leishmaniose.....	14
1.2 – Ciclo de vida	20
1.3 – Quimioterapia das Leishmanioses.....	22
1.4 – As leishmanioses e a enzima arginase	28
2 - JUSTIFICATIVA	31
3 – OBJETIVOS.....	32
3.1 – Objetivo geral	32
3.2 – Objetivo específico	32
4 – METODOLOGIA	33
4.1 – Metodologia para obtenção das hidrazidas	33
4.2 – Metodologia para obtenção dos anidridos isatoicos	34
4.3 – Testes <i>in vitro</i> em <i>Leishmania amazonensis</i>	35
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 – Síntese das aril hidrazidas	36
5.2 – Análises sinais RMN ¹ H e CG-EM	39
5.3 – Síntese dos anidridos isatoicos.....	40
5.4 – Resultados da análise biológica.....	41
6 – CONCLUSÃO	44
7 – BIBLIOGRAFIA	46

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – A Leishmaniose

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecto-parasitárias provocadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes a família *Trypanosomatidae*. Este conjunto de doenças possui, além do impacto socioeconômico, a segunda maior incidência parasitária, logo após a malária, cujo parasitas apresentam dois estágios evolucionários, a forma amastigota que é intracelular e encontrada no hospedeiro vertebrado e a promastigota que é a forma flagelada presente no vetor. Ela está amplamente disseminada no mundo, ocorrendo em 88 países tropicais e subtropicais, e pode, conforme a forma de acometimento do homem, dividir-se em dois principais grupos, sendo esses as formas tegumentares e a forma visceral (Altamiranoenciso *et al*, 2003).

As manifestações clínicas das leishmanioses diferem pela espécie que infectou o hospedeiro. A leishmaniose visceral (LV), causada por *Leishmania donovani* no Velho Mundo e *Leishmania infantum* no Velho e no Novo Mundo, é a forma mais grave que, se não tratada, invariavelmente leva à morte. Outras espécies diferentes de *Leishmania* podem causar variações da doença, como a Leishmaniose Tegumentar que pode ser classificada de acordo com suas manifestações, sendo essas: Leishmaniose cutânea (LC), Leishmaniose muco cutânea (LMC) ou Leishmaniose difusa (LD) são responsáveis pela considerável morbidade de muitas pessoas em focos endêmicos. (Gramiccia, M., & Gradoni, L. 2005).

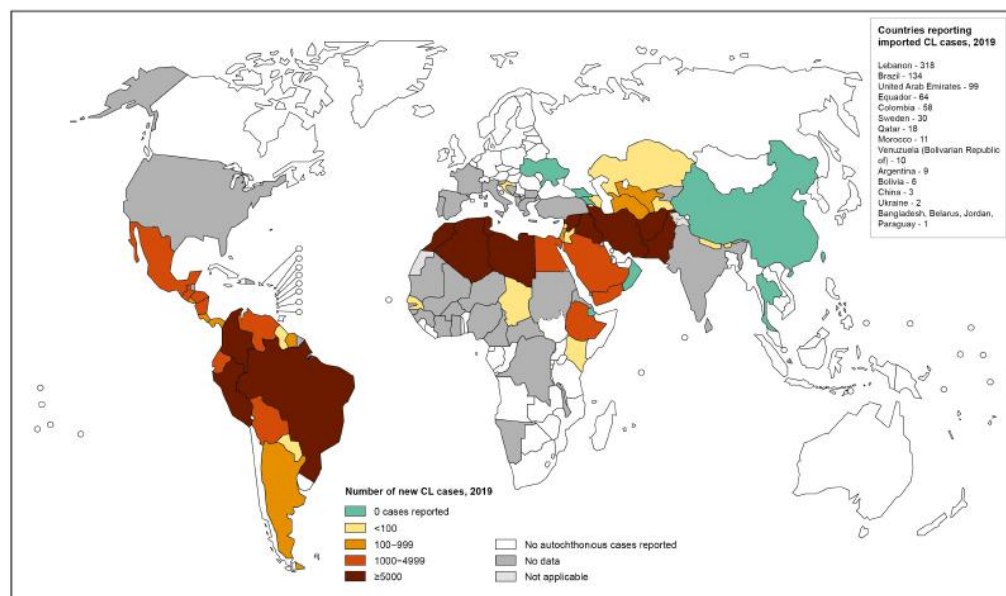
No mundo mais de 20 espécies e subespécies infectam o homem e, de acordo com a espécie, bem como com a capacidade de resposta imune de cada indivíduo à infecção, esta patogenia pode apresentar diferentes espectros de sintomas. (Avlonitis, N. *et al*, 2003).

A leishmaniose cutânea ou úlcera oriental aparece primeiro como uma picada de inseto persistente. Gradualmente, a lesão aumenta, permanecendo vermelha, mas sem dor ou calor perceptível. A resolução da lesão envolve a imigração de leucócitos, que isolam a área infectada, levando à necrose dos tecidos infectados, e a formação de um granuloma cicatrizante no fundo da lesão. O processo necrótico pode ser rápido, causando uma ferida grande, aberta e úmida (especialmente *L. major*, *L.*

panamensis e *L. braziliensis*) ou pode ser mais indolente, sem ulceração franca (*L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. peruviana*). A cura natural sem tratamento é a regra, mas o tempo necessário varia muito de acordo com a identidade do parasita e o local da lesão. Da mesma forma, o tamanho da lesão pode variar entre alguns milímetros e vários centímetros de diâmetro. A ferida oriental geralmente não está associada a sinais ou sintomas sistêmicos, mas os linfonodos drenantes podem aumentar e as lesões podem se espalhar ao longo dos ductos linfáticos como em infecções pela *L. guyanensis*. (Ashford, R. 2000).

Cerca de 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Em 2019, mais de 85% dos novos casos de LC ocorreram em 10 países (Figura 1): Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Irã (República Islâmica do), Iraque, Paquistão, República Árabe Síria e Tunísia. Estima-se que ocorram anualmente entre 700.000 e 1 milhão de novos casos em todo o mundo. (WHO, 2019).

Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2019



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2021. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (CNTD)
World Health Organization



Figura 1: Estatísticas de endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo (World Health Organization, 2019)

Segundo o Ministério da Saúde foram notificados 235.301 casos de LC no país entre o período de 2007 a 2017, sendo 72.395 casos registrados na região nordeste do país. (Brasil, 2018).

Diferente da Leishmaniose cutânea, a leishmaniose muco cutânea possui maior mortalidade se não tratada adequadamente, devido os acometimentos das mucosas, principalmente da região nasofaringe, podendo trazer maiores complicações ao paciente. Essa forma da doença ocorre principalmente quando hospedeiro entra em contato com as espécies de leishmania, tipicamente encontrado nas Américas como *L. (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) amazonensis*, *L. (Viannia) panamensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. A progressão clínica para doença da mucosa vai depender do sistema imune do hospedeiro e a virulência do parasita. Entre uma população de indivíduos infectados, a infecção progride para a mucosa em 1–10% dos pacientes (George L. *et al*, 2005). Os fatores específicos do hospedeiro que determinam quais pacientes desenvolverão e não desenvolverão LMC não são claros. Considera-se que parasitas se disseminam da lesão inicial na pele através dos vasos linfáticos e do sangue para os tecidos nasofaríngeos. Os sinais e sintomas da leishmaniose na mucosa tipicamente desenvolvem-se meses a anos depois do aparecimento da lesão cutânea. (Manual MSD, 2019).

A forma visceral também conhecida como kala-azar, é a forma mais grave (quase sempre fatal se não tratada), sendo as espécies que originam esta forma da doença são *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*. A doença é caracterizada por febre ondulatória, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e / ou linfadenopatias e anemia. Causa epidemias em larga escala com uma alta taxa de mortalidade (Figura 2), sendo boa parte da sua disseminação ocorrendo por meio de cães domésticos e abandonos que são infectados e funcionam como reservatórios dessa doença principalmente sua forma visceral. Após a recuperação, os pacientes podem desenvolver uma forma cutânea crônica denominada leishmaniose dérmica pós-cala-azar (PKDL), que geralmente requer tratamento longo e caro. A PKDL é normalmente uma sequela do tratamento com kala-azar, embora alguns casos tenham sido relatados sem histórico de kala-azar. A PKDL geralmente aparece dentro de dois anos após a cura completa da infecção visceral e começa com o aparecimento de manchas na pele, parecendo sardas. Cinco a quinze por cento dos pacientes com leishmaniose

visceral na Índia desenvolvem leishmaniose dérmica pós-calazar, geralmente 1 a 2 anos após a aparente cura clínica (Salotra e Singh, 2006).

Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2019

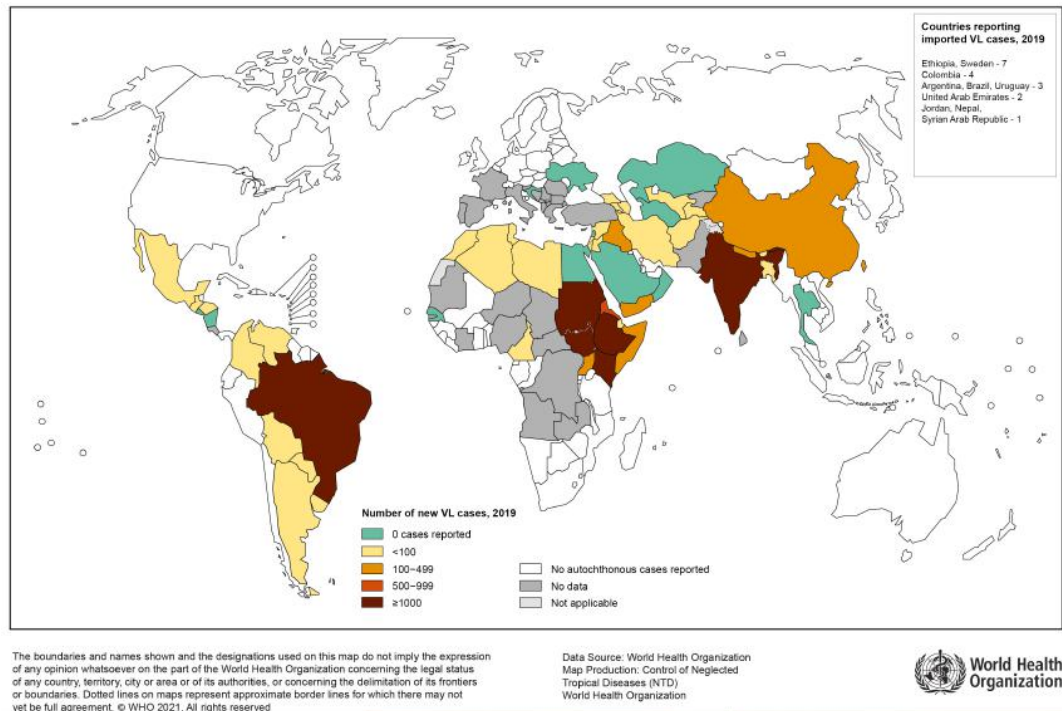


Figura 2: Estatísticas de endemicidade da leishmaniose visceral no mundo (World Health Organization, 2019)

No Brasil, a forma visceral afeta mais de 3.500 pessoas anualmente e para cada indivíduo afetado, estimasse que haja 200 cães infectados, concentrando mais de 97% dos casos de LV nas Américas (WHO, 2019). No estado de Mato Grosso do sul, entre 2011 e julho de 2020, foram confirmados 1.741 casos de LV e 124 óbitos (SES, 2020).

A situação epidemiológica da LV no Brasil em 2017 (Figura 3), com base em dados obtidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS), onde foram registrados 4.103 casos da doença, apresentando um coeficiente de incidência (Figura 4) de 1,98 casos/100,000 habitantes, com 2,744 internações e uma média de permanência de 13,3 dias. Cinco regiões brasileiras foram afetadas sendo a região nordeste a mais prejudicada representando 44,5% dos casos. A faixa etária mais afetada foi de crianças entre 0-9 anos representando 40,9%

dos casos. Os dados são preocupantes em vista o aumento do número de casos em comparação aos anos passados.

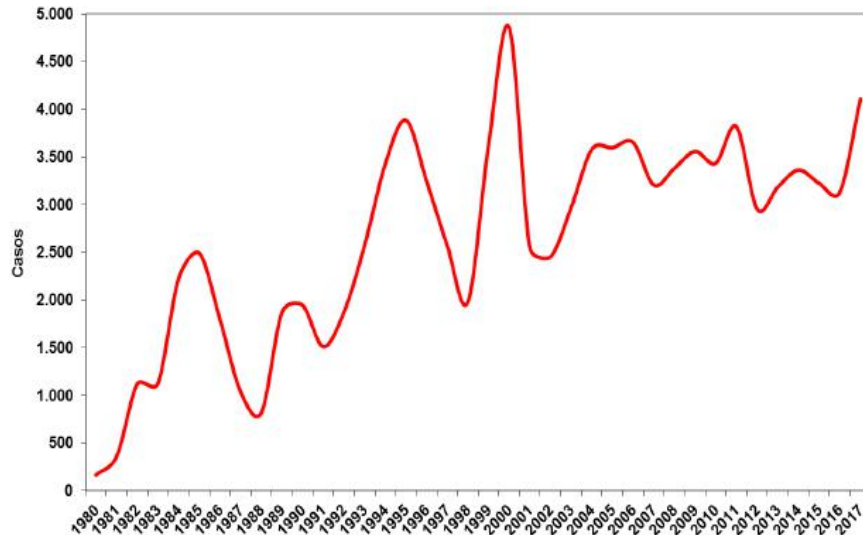


Figura 3: Casos de leishmaniose visceral no Brasil, 1980 a 2017

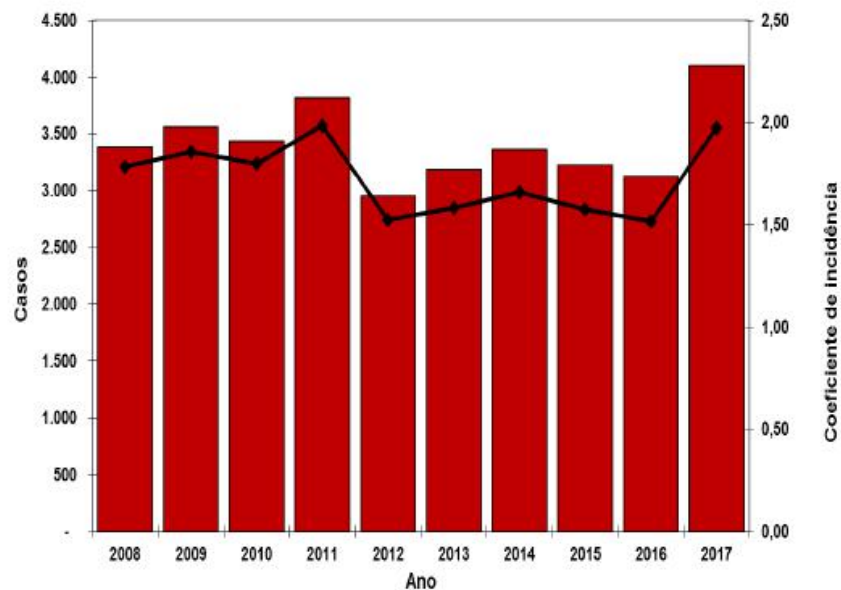


Figura 4: Casos e coeficiente de incidência de LV, Brasil, 2008 a 2017

As leishmanioses podem modificar a progressão da doença pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a imunodepressão causada por este vírus facilita a progressão das leishmanioses (Figura 5). A avaliação do conjunto de manifestações clínicas das leishmanioses em pacientes infectados pelo HIV indica que não existe um perfil definido de manifestações que possa ser indiscutivelmente associado à

coinfecção. Chamam atenção os relatos de disseminação da doença cutânea, com envolvimento de órgãos raramente acometidos em indivíduos imunocompetentes, em um processo conhecido como visceralização da LC. Em pacientes com LV e HIV observa-se maior frequência de envolvimento de órgãos não pertencentes ao sistema fagocítico- -mononuclear e maior frequência de recidivas. Existem, no entanto, casos de indivíduos Co infectados cuja leishmaniose evolui sem nenhum impacto aparente da infecção pelo HIV. A gravidade das manifestações clínicas, a resposta ao tratamento, a evolução e o prognóstico estão diretamente associados à condição imunológica do paciente, avaliada por meio da contagem de linfócitos T CD4+ (Ministério da saúde, 2011).

Global distribution of leishmaniasis and countries reporting HIV/*Leishmania* coinfection

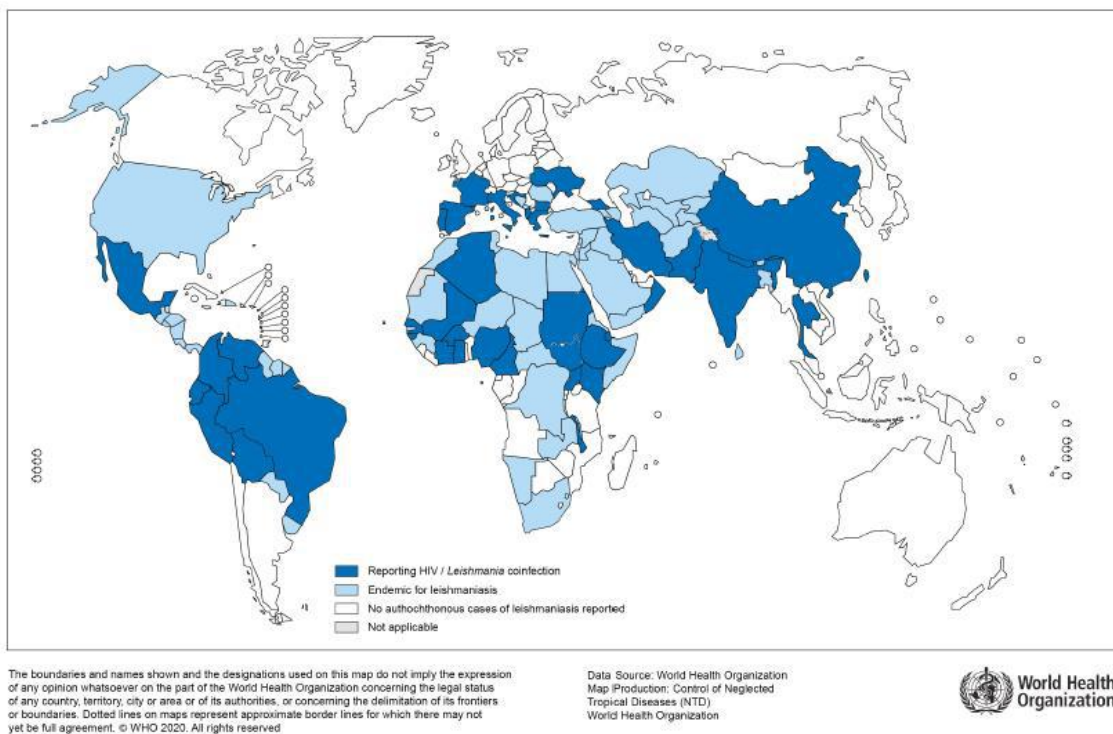


Figura 5: Distribuição global de leishmaniose e países que relatam coinfecção por HIV/ *Leishmania* (World Health Organization, 2019)

O indivíduo que é infectado pelo HIV possui um aumento, entre 100 e 2.300 vezes, o risco de contrair a forma visceral da leishmaniose em áreas de endemicidade. Além disso, pacientes infectados com HIV, apresentam redução da probabilidade de uma resposta terapêutica positiva, aumenta a possibilidade de recidivas e a leishmaniose acelera o desenvolvimento de AIDS por imunossupressão cumulativa

(Alvar *et al*, 2008; Alemayehu *et al*, 2016). No mundo essa coinfeção se tornou uma doença emergente, dada a sobreposição dessas enfermidades em área endêmicas, devido a urbanização da leishmaniose e o maior número de casos de infecção por HIV.

De acordo com dados do Boletim epidemiológico HIV/AIDS 2019 do Ministério da Saúde, o Brasil apresentou 300.496 casos de infecção pelo HIV notificados no Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) no período de 2007 a junho de 2019.

1.2 - Ciclo de vida

Os parasitas são transmitidos por flebotomíneos fêmeas do grupo dos hematófagos e esse parasitos vivem extracelularmente no intestino desses vetores principalmente na sua forma promastigota móvel flagelada. Após a entrada nos hospedeiros mamíferos, os promastigotas são ingeridos pelos fagócitos e se diferenciam no estágio amastigotas, que se multiplicam no sistema vacuolar fagossomo-lisossomo dos macrófagos infectados. Esse parasitismo intracelular acaba resultando em uma imunopatologia que se manifesta como lesões cutâneas, disseminando-se pelas mucosas, agindo de maneira difusa pelo corpo do hospedeiro, ou manifestando-se em órgãos onde é a forma mais grave da doença, essas reações vão depender das espécies dos parasitas envolvidos e de suas interações com os hospedeiros, assim como seu sistema imune (Chang. K-P, 2014).

A Leishmaniose em estágio de reprodução nos mamíferos (Figura 6) começa com: (1) a liberação de promastigotas infectantes na pele de mamíferos pela picada do vetor de flebotomíneo; (2) fagocitose de promastigotas por um macrófago; (3) fusão do fagossomo contendo um promastigota com o lisossomo; (4) diferenciação de promastigotas em amastigotas no fagolisossomo do macrófago infectado; (5) replicação de um amastigota em um vacúolo contendo parasita ou parasitóforos; (6) formação de grandes vacúolos parasitóforos e replicação contínua de amastigotas intravacuolar; (7) ruptura de macrófagos fortemente parasitados e liberação de amastigotas; (8) fagocitose de amastigotas liberados por um macrófago. No estágio do flebotomíneo ocorre primeiramente: (1) ingestão de macrófagos parasitados pelos flebotomíneos após uma refeição de sangue retirada de humanos infectados ou animais do reservatório; (2) ruptura dos macrófagos ingeridos e liberação de

amastigotas no intestino dos flebotomíneos; (3) replicação de amastigotas e sua diferenciação em promastigotas; (4) replicação de promastigotas no intestino médio e inserção de seus flagelos em microvilosidades das células epiteliais do intestino; (5) replicação do grupo *L. brasiliensis* no piloro e íleo do intestino posterior do flebotomíneo como promastigotas com flagelos ampliados ligados à parede do intestino quitinoso via hemidesmossomos; (6) movimento avançado de promastigotas para o intestino médio torácico; (7) promastigotas sésseis com flagelos longos fixados na parede quitinosa da válvula estomacal, faringe e cavidade bucal; e (8) promastigotas ativamente móveis e infecciosas encontradas na probóscide, ou parte da boca, dos flebotomíneos (Chang. K-P, 2014).

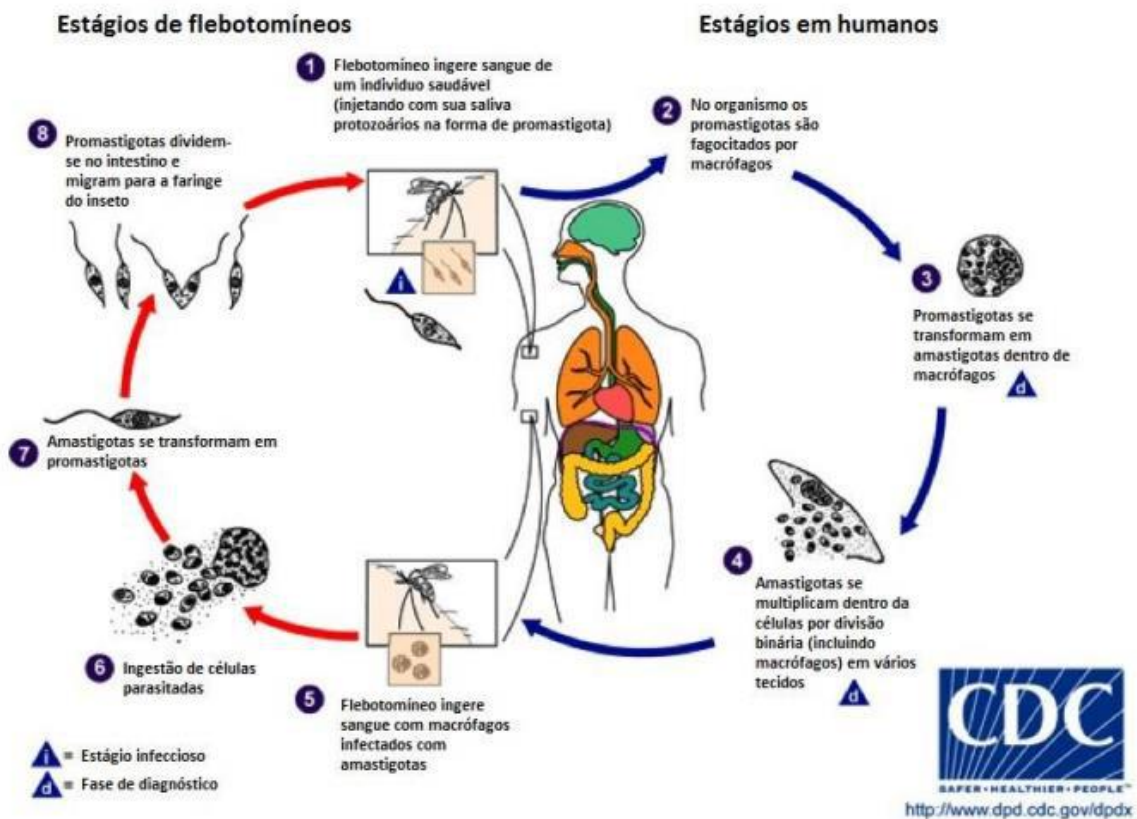


Figura 6: Ciclo de vida de *Leishmania* em hospedeiros mamíferos (Centers for Disease Control and Prevention – CDC. Imagem Library)

1.3 – Quimioterapia das Leishmanioses

O amastigota intracelular é o estágio do ciclo de vida do parasita presente nos mamíferos que é o alvo da quimioterapia. Embora o amastigota seja mais difícil de cultivar do que o estágio promastigota, é importante que esse estágio relevante do parasita seja usado para testes in vitro de potenciais candidatos a fármacos, pois a diferença entre os dois estágios não é apenas morfológica como também existem importantes diferenças bioquímicas e moleculares. (Croft S. L.; Yardley V, 2002).

Ensaio para avaliação da forma amastigota em teste envolvendo novos fármacos, são necessários para avaliar a sensibilidade de formas amastigotas intracelulares de macrófagos comparada à das formas promastigotas em meio axênico sugerindo que as amastigotas sejam inerentemente mais sensíveis a este fármaco. Alternativamente o macrófago pode concentrar o fármaco ativo no fagolisossomo que abriga o parasito. Outra possibilidade seria a de que o macrófago humano possa metabolizar o fármaco para a forma com maior atividade leishmanicida (Berman & Wyler, 1980).

Mesmo essa parasitose apresentando uma prevalência mundial, uma vez que os países de maior incidência são países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, que acabam não possuindo um alto poder econômico para aquisição dos medicamentos necessários, e um baixo interesse da indústria farmacêutica, no desenvolvimento de novos fármacos para atender esse mercado. A quimioterapia das leishmanioses ainda é bastante deficiente, uma vez que os fármacos utilizados se encontram a bastante tempo no mercado, eles apresentam diversos efeitos colaterais devido sua alta toxicidade, apresentando também em sua grande maioria soluções injetáveis. Esse apanhado de fatores acaba tornando difícil a adesão do paciente a terapia medicamentosa, o que acaba influenciando no aparecimento de espécies resistentes, principalmente aos fármacos de 1ª escolha.

O antimônio foi utilizado pela primeira vez na terapêutica médica no século XV, empregado em diversos tratamentos. Sua toxicidade e ineficácia em muitos pacientes fizeram com que seu uso fosse proibido. Em 1630, o sal de antimônio trivalente, denominado emético, foi incorporado na medicina, entretanto sua utilização foi novamente abandonada nos séculos XVIII e XIX, até que, em 1907, um estudo relatou a atividade do tártaro emético contra tripanosomas africanos. Em 1912 foram

publicados os resultados obtidos por Vianna no tratamento da úlcera de Bauru e, cerca de três anos depois, o tártaro emético já estava sendo amplamente empregado no tratamento da leishmaniose visceral na Índia, levando a redução da mortalidade dessa doença, de cerca de 90 para 5% dos pacientes (Bryceson, 2000). Os antimoniais trivalentes (SbIII), extremamente tóxicos, foram, a partir de 1920, substituídos pelos antimoniais pentavalentes e, a partir dos anos 40, o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumine (Figura 7) passaram a representar os medicamentos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, ainda não possuindo seu mecanismo de ação elucidado (Croft S. L.; Yardley V, 2002). Os antimoniais pentavalentes (SbV) são administrados por via parenteral. No interior do macrófago, são convertidos em antimoniais trivalentes, compostos com maior toxicidade tanto para os dois estágios da *Leishmania* quanto para o hospedeiro (Frezard *et al*, 2001).

Estas substâncias causam uma variedade de efeitos adversos podendo algum deles ser mais graves, tais como: artralgias, mialgias, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, dor abdominal, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitações, insônia, nervosismo, insuficiência renal, arritmias, anemia e tosse (Ravdin, 1990; Khaw; Panosian, 1995). Outros efeitos como supressão da medula óssea, hepatotoxicidade e pancreatite química também podem ocorrer (Hepburn, 2000). A eficácia destas substâncias é variável devido a dosagem baixa e descontínua, sendo um fator de importância no número de recaídas e resistência de *Leishmania* (Sundar *et al.*, 2001).

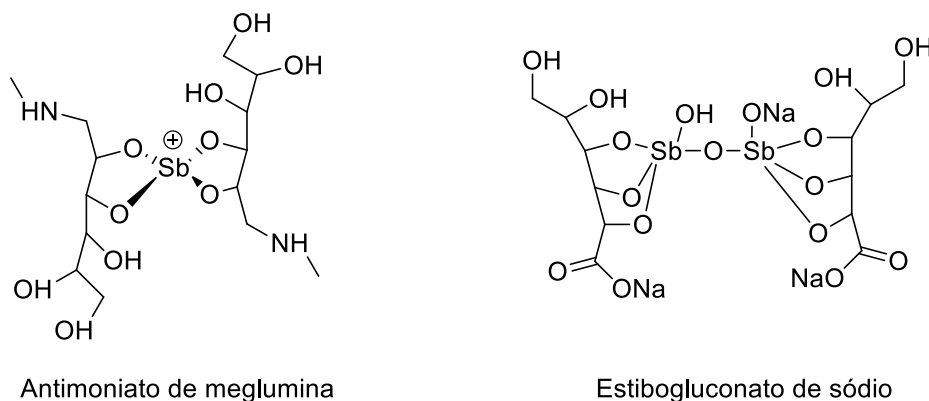


Figura 7: Fármacos de 1ª escolha no tratamento da leishmaniose

Mesmo com os efeitos colaterais o tratamento convencional é realizado com antimoniais pentavalentes (SbV) como o N-metil-glucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®) (Brasil, 2017).

A anfotericina B (Figura 8) é um fármaco de segunda escolha, sendo altamente efetiva no tratamento das leishmanioses resistentes aos antimoniais (Bern *et al*, 2006). O metabolismo dos esteróis em *Leishmania* é particular, sendo o ergosterol o mais importante esterol de membrana neste parasito, o que o diferencia da célula hospedeira, onde o colesterol é o componente esterol predominante na membrana plasmática. O macrolídeo anfotericina B tem alta afinidade por episterol, que é um precursor do ergosterol (Singh; Pandey; Sundar, 2006), o que leva a uma alteração na composição da membrana, levando formação de poros que alteram a permeabilidade, ocasionando uma desregulação com perda de íons, provocando morte do parasito.

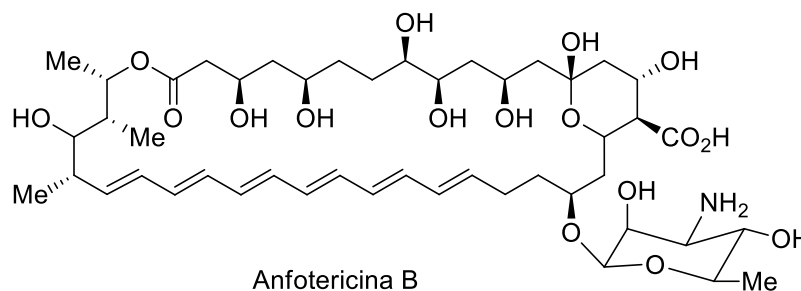


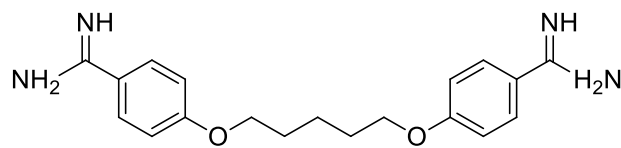
Figura 8: Estrutura da anfotericina B, fármaco de 2ª escolha no tratamento da leishmaniose

A anfotericina B é administrada por via endovenosa, tendo o seu uso limitado devido a sua toxicidade, apresentando efeitos como anafilaxia, trombocitopenia, anorexia, anemia, dor muscular, febre, tremor, calafrio, disfunção renal, entre outros (Laniado-Laborin; Vergas, 2009). Novas formulações de anfotericina B associada a lipídeos conferem propriedades peculiares resultando na sensibilidade a macrófagos infectados por *leishmania* além de apresentarem uma redução da toxicidade (Bern *et al*, 2006).

A pentamidina (Figura 9) é utilizada como fármaco de 2ª escolha em casos de leishmanioses resistentes aos antimoniais (Singh *et al*, 2012). Tem sido aplicada no Brasil, principalmente, para o tratamento de infecções por *L. (V.) guyanensis*, que geralmente não possuem boa resposta ao tratamento com antimoniais. Seu

mecanismo de ação não está bem definido, mas parece ocorrer inibição da síntese das poliaminas arginina, petruscina e espermidina (Bray *et al*, 2003).

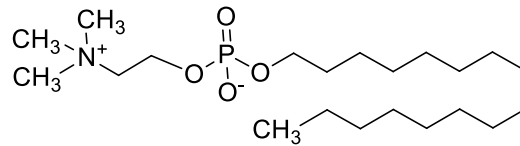
Esta diamina pode ser administrada por via endovenosa, e com frequência produz efeitos adversos como taquicardia, hipotensão, dor de cabeça, vômitos, náuseas, erupção cutânea, disfunção renal e outros como hipoglicemia ou hiperglicemia (Coelho *et al*, 2007).



Pentamidina

Figura 9: Estrutura da pentamidina, fármaco de 2^a escolha no tratamento da leishmaniose

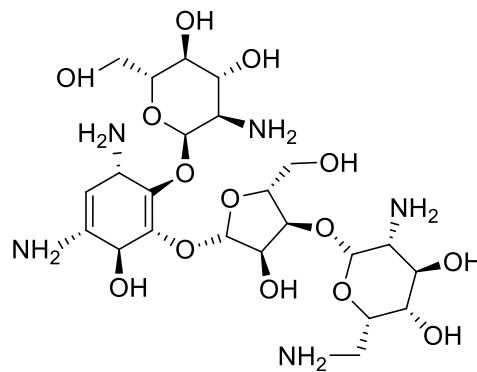
A miltefosina (Figura 10) é um derivado alquil-lisofosfolipídico, com atividade antiproliferativa, que foi inicialmente testado por suas propriedades antitumorais. Recentemente, começou a ser utilizado para o tratamento da LV, constituindo-se no primeiro medicamento bem-sucedido por via oral (Croft; Sundar; Fairlamb, 2006). Esta substância está sendo avaliada em diferentes partes do mundo. Os testes realizados na Índia indicaram boa atividade contra LV, com eficácia de 95% (Bhattacharya *et al.*, 2007). A atividade da miltefosina está relacionada ao seu mecanismo de ação que leva a alteração da composição da membrana, com redução do conteúdo de fosfatidilcolina e ergosterol, entretanto, não apresenta eficácia nas espécies mais frequentes no Brasil (Rakotomanga *et al*, 2007). As reações adversas mais frequentes, relacionadas ao uso de miltefosina são distúrbios gastrintestinais transitórios como vômitos e diarreia. A maior limitação ao seu uso até o momento está relacionada aos efeitos teratogênicos (Bhattacharya *et al*, 2004).



Miltefosina

Figura 10: Estrutura da miltefosina

A paromomicina (Figura 11) é um antibiótico da família dos aminoglicosídeos que, além da aplicação parenteral, vem sendo avaliada por via tópica em leishmaniose cutânea (Sundar *et al*, 2007). Atua inibindo a atividade mitocondrial da leishmania, com a perda do potencial de membrana e respiração, através da inibição no abastecimento de substratos para o metabolismo da mitocôndria. Existem também evidências de que este antibiótico altere a captação de precursores de macromoléculas dificultando o crescimento do parasito. E de que altere a composição de lipídeos na membrana, provocando diminuição na fluidez (Lima *et al*, 2007).



Paromomicina

Figura 11: Estrutura da paromomicina

A sitamaquina (WR-6026) é um análogo da 8-aminoquinolina (Figura 12) descoberto pelo Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR, EUA) e em desenvolvimento com a GlaxoSmithKline (Reino Unido) para o tratamento oral da LV (Loiseau *et al*, 2011). Esse composto foi sintetizado pela primeira vez como parte do programa antimalárico colaborativo nos Estados Unidos (1944-1950) que resultou na descoberta da primaquina (Elderfield *et al*, 1955). A sitamaquina é uma droga oral ativa que concluiu os testes de Fase II para VL na Índia e no Quênia. O principal efeito adverso é a nefrotoxicidade em doses superiores a 2 mg / kg, o que acabou levando

o abandono do seu desenvolvimento, devido as doses toleradas apresentarem baixa eficácia.

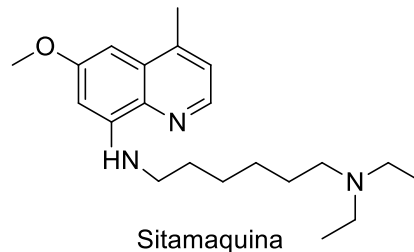


Figura 12: Estrutura da sitamaquina (WR-6026)

Na busca de potenciais agentes terapêuticos o nitroimidazol fexinidazol (Figura 13) descoberto pela empresa alemã Hoechst AG, que atualmente faz parte do grupo Sanofi e atualmente um candidato a medicamento no tratamento da tripanossomíase humana africana (HAT) também conhecida popularmente como doença do sono africana (Sundar, 2015). Em ensaios recentes para o estágio final da tripanossomíase humana africana, o uso de fexinidazol oral administrado uma dose ao dia utilizando 1.800 mg nos quatro primeiros dias, baixando a dosagem para 1.200 mg do quinto ao decimo dia, onde apresentou ser seguro e teve uma taxa de cura de 91%. (Mesu *et al*, 2018).

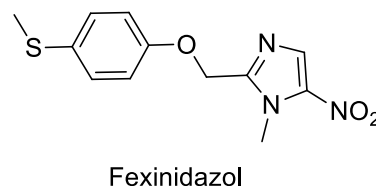


Figura 13: Estrutura do fexinidazol

Em um estudo de Fase II conduzido pela Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi), para avaliar a segurança e eficácia do fexinidazol para o tratamento da LV no Sudão, participaram 14 pacientes, onde a maioria apresentou eliminação do parasita com o tratamento, porém apenas três pacientes apresentaram cura total no acompanhamento de 6 meses, levando ao encerramento dos testes (Clinical Trials, 2015). Contudo pelo fato do fexinidazol apresentar via de administração oral e segurança para com tratamento nos testes realizados, a DNDi pretende avaliar a combinação da administração concomitante de fexinidazol e miltefosina no tratamento

de pacientes com LV na África oriental, entretanto precisam de mais informações para descartar completamente o risco de fertilidade relacionado à exposição à miltefosina para justificar um estudo em voluntários saudáveis conforme solicitado pelas autoridades regulatórias francesas (DNDi , 2017)

Um imunomodulador nomeado como CpG-D35 foi desenvolvido como uma terapia combinada para o tratamento de leishmaniose cutânea complicada e leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL) em parceria com a GeneDesign no Japão. Parasitas *Leishmania* são capazes de persistir nas células hospedeiras evitando ou explorando mecanismos imunológicos. A modulação da resposta imune com oligonucleotídeos CpG pode melhorar a eficácia das quimioterapias. Este estudo tem como objetivo demonstrar a adequação de um imunomodulador para estimular o sistema imunológico inato a combater a infecção parasitária, como coadjuvante à terapia medicamentosa existente. Os estudos de toxicologia pré-clínica foram iniciados em 2019 e devem ser concluídos em meados de 2020. Enquanto se aguardam resultados positivos, a DNDi espera iniciar um primeiro estudo de Fase I em humanos no final de 2020 (DNDi, 2020).

1.4 - As leishmanioses e a enzima arginase

No ciclo de vida da leishmania ambas as formas evolutivas (promastigota e amastigota) apresentam atividade de algumas enzimas do ciclo da ureia, sendo estas utilizadas pela maioria dos metazoários, responsáveis pela eliminação de nitrogênio em forma de ureia. A enzima arginase é uma das enzimas que faz parte desse ciclo em animais ureotélicos, catalisando o último passo do ciclo da ureia, que envolve a eliminação da amônia. A atividade desta enzima também ocorre em alguns trypanossomídeos, entre eles os do gênero *Leishmania*. A princípio, a arginase está associada aos processos metabólicos que envolvem Inter conversão arginina-ornitina-citrulina. (Camargo *et al*, 1992).

Nos mamíferos existem duas isoformas da arginase: I e II, possuindo entre si 60% (sessenta por cento) de similaridade na sequência de aminoácidos, e são codificadas por genes diferentes, estão localizadas em compartimentos distintos da célula e possuem distribuição tecidual desiguais devido essas restrições dessas localidades (Grody, *et al*, 1987; Jenkinson, *et al*,1996).

A arginase hepática ou do tipo I é uma enzima localizada predominantemente no citosol dos hepatócitos, a qual atua no ciclo da ureia. Já a arginase extra-hepática ou do tipo II de mamíferos encontra-se na matriz mitocondrial de outras células, incluindo macrófagos (Collerluori; Morris; Ash; 2001).

A arginase tipo II apresenta maior distribuição tecidual dada sua localização extra-hepática e apresenta um papel fundamental no metabolismo da L-arginina, uma vez que está diretamente relacionada a produção de L-ornitina, um precursor da síntese de poliaminas (LI et al., 2001).

Estudos salientam que a síntese de poliaminas possui uma função essencial para o parasita do gênero *Leishmania* no que se refere ao crescimento e infecção do hospedeiro. No estágio evolutivo promastigota de *L. donovani* com uma supressão no gene da enzima responsável pela síntese de poliaminas (Ornitina descarboxilase), observou-se incapacidade de crescimento do parasita, devido queda rápida nos níveis de poliaminas. (Jiang et al, 1999; Roberts et al, 2004).

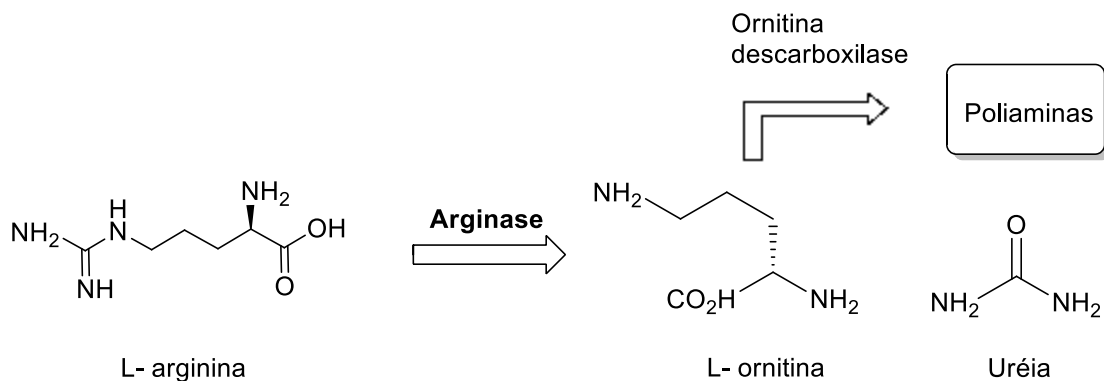


Figura 14: Metabolismo da L-arginina pela via enzimática da arginase

Um mecanismo defensivo fisiológico contra *Leishmania* é mediado pela N^ω-hidroxi-L-arginina (LOHA), uma molécula efetora envolvida no controle da infecção atuando como inibidor da arginase, gerado pelo óxido nítrico sintase II (NOS II), que pode controlar a infecção celular de *L. major* e *L. infantum* (Iniesta; Gomez-Nieto; Corraliza, 2001).

Foi observado que uma espécie do gênero de leishmania, a *L. mexicana* apresentam capacidade de expressar apenas a enzima arginase, na sua forma promastigota, sendo esta enzima essencial para síntese de poliaminas. Em parasitas

com supressão do gene da arginase, apresentaram diminuição dos níveis de poliaminas, devido incapacidade de produção da ornitina. Dada essa importância para o desenvolvimento do parasita, a arginase acabou se tornando um potencial alvo terapêutico no desenvolvimento de novos fármacos (Roberts *et al*, 2004).

Com a sequência do gene da enzima arginase de *L. amazonenses* completamente elucidado, foram observadas algumas diferenças entre o sítio ativo da enzima do parasita com a dos mamíferos, podendo esta diferenciação ser usada como alvo para quimioterapia da leishmaniose. Com a expressão do gene da arginase de *L. amazonenses* em *Escherichia coli*, e utilizando parâmetros bioquímicos já estabelecidos, torna-se possível a síntese de inibidores seletivos para a enzima presente no parasita, sendo fundamental para o desenvolvimento de novas terapias para tratamento da doença. (Da Silva *et al*, 2002; Da Silva *et al*, 2008).

2 - JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é uma das doenças tropicais mais negligenciadas e seu tratamento é composto por poucos fármacos, estabelecidos a muito tempo no mercado, como os antimoniais que foram desenvolvidos durante a década de 40 e que possuem alta toxicidade, paralelo a existência de formas resistentes de *Leishmania* e do aumento de casos de coinfeção leishmaniose/AIDS que justificam a busca de novos candidatos a agentes terapêuticos.

A ausência de controle em áreas remotas torna difícil estimar a real incidência e a taxa de letalidade da LV. A LV afeta populações economicamente vulneráveis em mais de 80 países da Ásia, África Oriental, América do Sul e a região do Mediterrâneo. Os 7 países mais afetados: Brasil, Índia, Etiópia, Quênia, Sudão do Sul, Somália e Sudão, e representam mais de 90% dos novos casos. A maioria dos casos de LC ocorre no Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã e Síria (WHO, 2019).

Estes fatores impulsionam as pesquisas para a obtenção de novos compostos sintéticos, semissintéticos e produtos naturais. Portanto, a busca por novas terapias, eficientes e seguras, para o tratamento desta patologia é de grande importância para a saúde pública, uma vez que o Brasil se encontra entre os 7 países com maior incidência de *Leishmania* visceral.

3 – OBJETIVOS

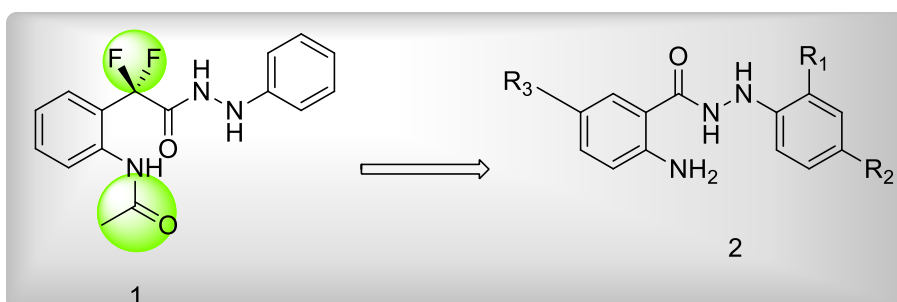
3.1 – Objetivo geral

- ✓ Sintetizar novas hidrazidas com potencial atividade leishmanicida visando otimização do composto protótipo.

3.2 – Objetivo específico

- ✓ Preparo das moléculas alvo a partir da reação dos anidridos isatoicos comercialmente disponíveis e/ou obtidos por síntese, com diversas aril hidrazinas, visando simplificação do composto protótipo.
- ✓ Obtenção dos anidridos isatoicos não obtidos comercialmente, a partir das respectivas isatinas.
- ✓ Avaliação da atividade leishmanicida das aril hidrazidas preparadas

Neste TCC as aril hidrazidas tiveram suas estruturas baseadas no recente trabalho do meu orientador (DE LIMA, E. C. et al., 2019) onde foi descoberto um composto que apresentou atividade leishmanicida contra *L. chagasi* na forma promastigota e apresentou atividade sobre a enzima arginase de *L. amazonensis*. A síntese e o ensaio biológico de novas hidrazidas (**2**, Esquema 1), foram feitos empregando simplificação molecular sobre o composto protótipo (**1**) com o intuito de avaliar a importância dos grupos CF₂ e N-Acetil para a atividade leishmanicida.

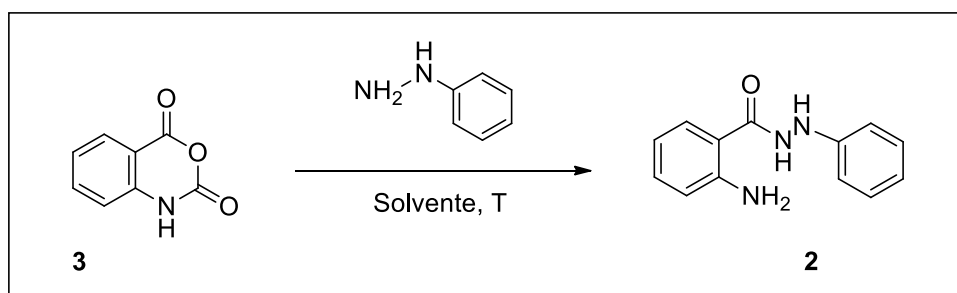


Esquema 1: Análogos de **1** planejados por supressão do grupo CF₂

4 – METODOLOGIA

4.1 – Metodologia para obtenção das hidrazidas

A obtenção dos compostos, consiste na utilização do respectivo anidrido isatoicos (**3**) e fenil hidrazinas, comercialmente disponíveis (Esquema 2), como nucleófilos para a abertura-descarboxilação dos anidridos, que forneceu as hidrazidas (**2**).



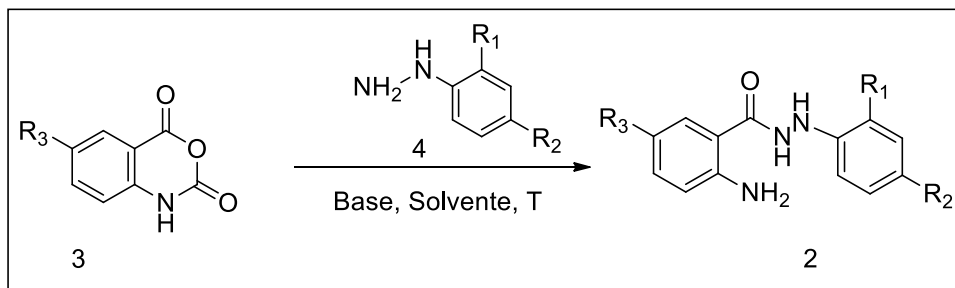
Esquema 2: Metodologia para obtenção da molécula alvo

1º Procedimento

Utilizou-se uma solução contendo 1g de anidrido isatoicos (6,13 mmol) em acetonitrila (MeCN) ou etanol (EtOH) (7,5 mL) onde foram adicionados 1g de fenil hidrazina (6,13 mmol). A solução permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente por 24 h, após esse tempo o sólido obtido foi filtrado em um sistema a vácuo, seguida de uma lavagem com água gelada para então fornecer produto alvo **2a** (R₁ = R₂ = R₃ = H, de 59 a 62% de rendimento).

2º Procedimento

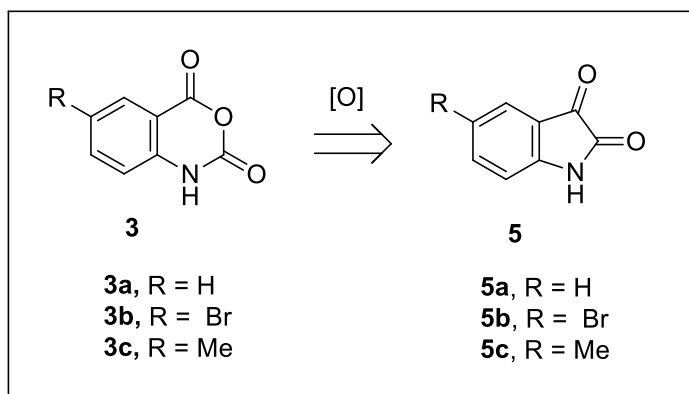
Utilizou-se uma solução contendo 2g anidrido isatoicos (12,26 mmol) em EtOH (20 mL) onde foram adicionados 2g das respectivas aril hidrazinas substituídas (**4**, Esquema 3) (12,26 mmol). A solução permaneceu sob refluxo por 2h. Ao fim da reação realizou-se a filtração do produto, seguida de uma lavagem com água gelada, para então obtenção dos produtos **2a-g** (25 a 80% de rendimento).



Esquema 3: Obtenção de novas aril hidrazidas substituídas

4.2 – Metodologia para obtenção dos anidridos isatoicos

Com interesse de aumentar variedade de produtos, os anidridos isatoicos 6-substituídos (**3b-c**) foram sintetizados através da oxidação de isatinas 5-substituídas (**5b-c**) comerciais, como empregado por Deligeorgiev e colaboradores (2007), representado no esquema 4.



Esquema 4: Obtenção de anidridos isatoicos **3b-c**

Procedimento – obtenção de anidridos isatoicos

Foi preparada uma solução contendo: 1g de isatina (6,8 mmol) (**5a-c**), 8 mL de anidrido acético, 1 mL de ácido acético glacial, 3 gotas de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado e (8,84 mmol) (1,3 equivalentes) de complexo ureia-H₂O₂. Após adição dos componentes em um balão de 25 mL, a mistura reacional foi deixada em refluxo por 5h. Uma CCF foi realizada após o refluxo, utilizando como eluente acetato de etila/hexano 30%. Foi realizada uma filtração a vácuo, seguida de uma lavagem com água gelada, para então obtenção do produto, onde apresentou rendimento de 85%.

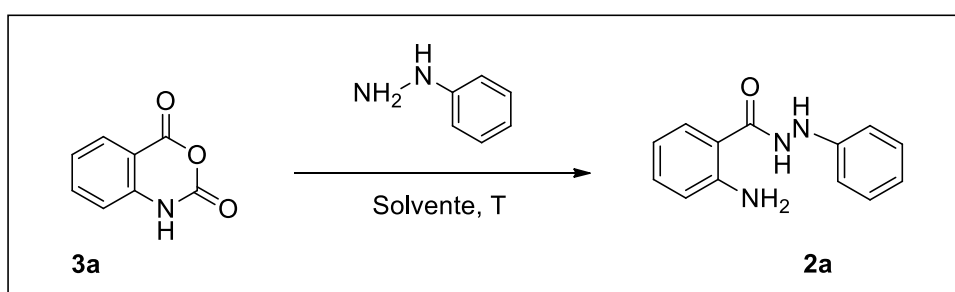
4.3 – Testes *in vitro* em *Leishmania amazonensis*

Os ensaios para a atividade leishmanicida dos compostos preparados foram avaliados pelo grupo do prof. Edson Silva, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (USP). Na avaliação da atividade dos compostos em leishmania foram utilizadas culturas de promastigotas de *L. amazonensis*, realizando uma triagem em culturas de promastigotas para avaliar o nível de inibição dos compostos.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Síntese das aril hidrazidas

No planejamento reacional foi realizado um estudo metodológico para determinação das melhores condições reacionais (Tabela 1) na obtenção das aril hidrazidas, utilizando-se anidrido isatoico em reação com diferentes aril hidrazinas (Esquema 5). Os produtos obtidos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), para confirmação da obtenção do produto alvejado.



Esquema 5: Reagentes não substituídos para otimização da condição reacional

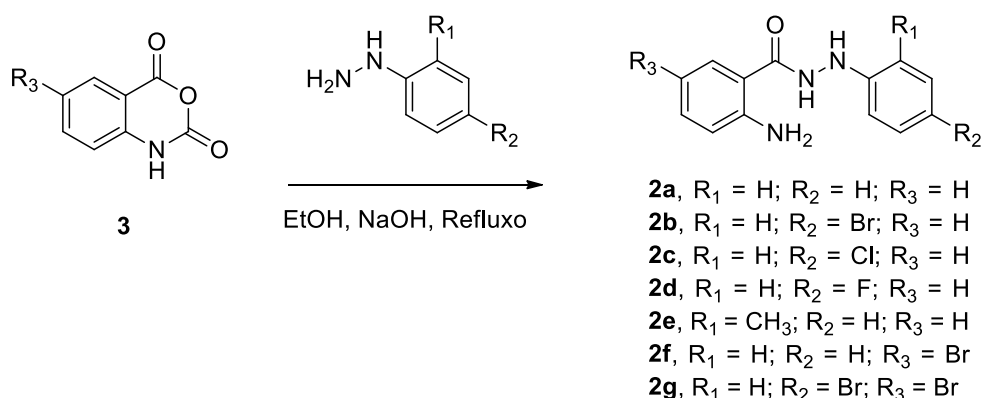
O início da reação é marcado pela liberação de gás nos primeiros 30min de reação, que foi verificado utilizando-se uma bexiga acoplada ao condensador. Durante o processo de síntese, foi utilizada a técnica de cromatografia em camada fina (CCF) para acompanhar o tempo reacional, utilizando como fase móvel misturas de acetato/hexano 30-50%. O início da reação é marcado pela liberação de gás nos primeiros 30min de reação, que foi verificado utilizando-se uma bexiga acoplada ao condensador. O acompanhamento foi realizado de duas em duas horas, onde foi visto que em oito horas de reação ainda possuía material de partida na CCF, onde então optou-se por deixar a reação em andamento durante a noite (overnight) totalizando um tempo reacional de vinte e quatro horas. Após esse tempo foi verificado a obtenção do produto, com consumo total do material de partida.

Tabela 1: Estudo para otimização reacional na obtenção de aril hidrazidas **2a**

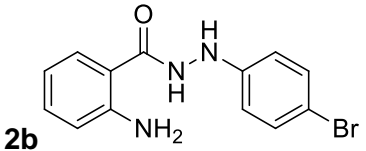
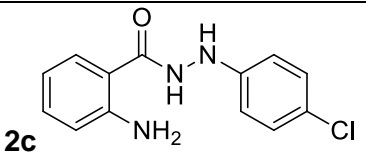
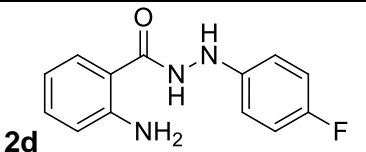
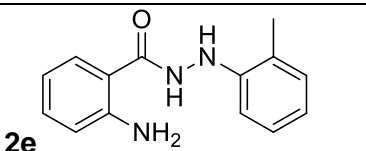
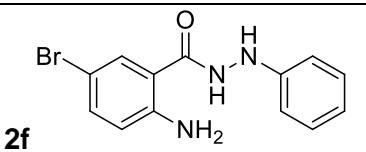
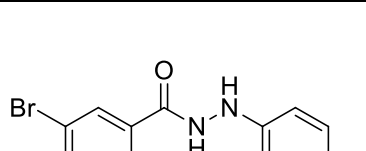
Entrada	Solvente	T	Fenil hidrazina	Anidrido Isatoico	Tempo	Rend. %
1	MeCN	t.a.	6,13 mmol	6,13 mmol	24h	45%
2	MeCN	t.a.	12,26 mmol	6,13 mmol	24h	68%
3	MeCN	t.a.	6,13 mmol	12,26 mmol	24h	130%
4	EtOH	refluxo	6,13 mmol	6,13 mmol	2h	63%

Como demonstrado na tabela anterior a utilização de etanol em refluxo foi a melhor condição para obtenção do produto, uma vez que a elevação da temperatura, aumenta a energia cinética das partículas dos reagentes, levando a um aumento na velocidade de reação. Considerando também a vantagem de o etanol ser um solvente mais volátil, acaba influenciando em um melhor isolamento do produto. Com base em números, a entrada 3 apresentou maior rendimento, entretanto utilizou-se um excesso de anidrido isatoico que é sólido igual nosso produto, uma vez terminada a reação com todo consumo da fenil hidrazina, ainda tem esse excesso de anidrido que acaba passando junto com produto na filtração, e elevando assim o valor do rendimento. Essa reação acabou sendo descartada pelo fato de possuir mais uma etapa para separação desse anidrido do nosso produto o que acaba sendo desvantajoso no ponto de vista sintético.

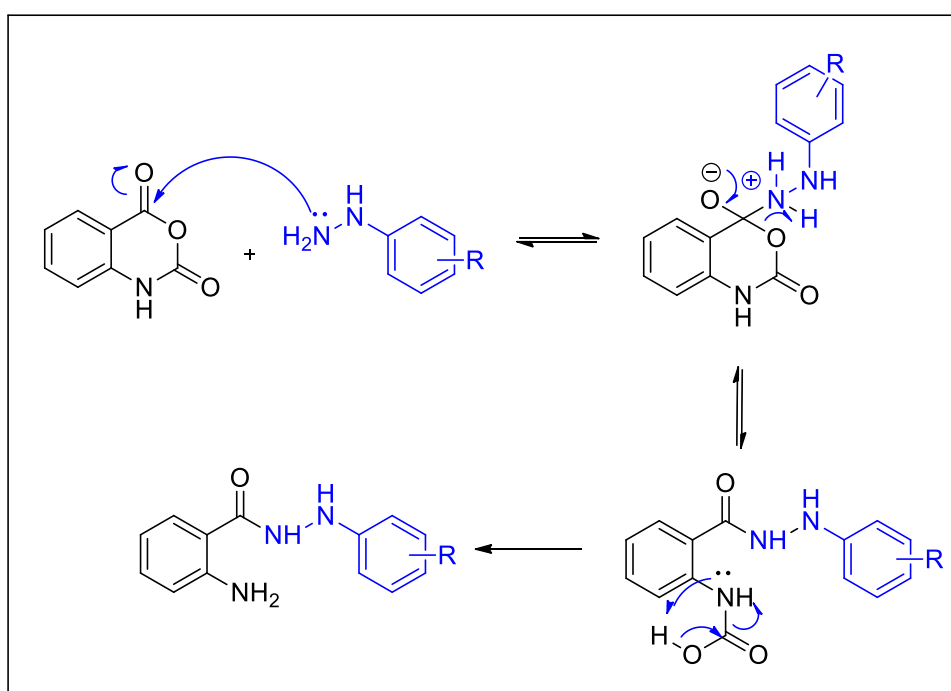
Com a definição da melhor condição experimental, deu-se prosseguimento para síntese das aril hidrazidas alvo (**2a-g**), que foram preparadas a partir dos diferentes cloridratos de fenil hidrazinas, substituídos nas posições *orto* e *para* (Esquema 6, Tabela 2), previamente colocadas na presença do hidróxido de sódio em um pouco de etanol em agitação por 10 minutos para que em meio básico ocorra desprotonação e obtenção dos nucleófilos livres que reagirão com o anidrido isatoico.

**Esquema 6:** Aril hidrazidas *orto/para* substituídas

Na análise dos nucleófilos, baseada nos rendimentos dos produtos, observou-se que a eletronegatividade dos compostos halogenados influenciou diretamente nos seus rendimentos, sendo a hidrazina substituída com flúor o menor resultado, devido a eletronegatividade desse halogênio, observando o oposto com a hidrazina substituída com grupamento metila, que resultou no melhor rendimento, sendo esse um grupo doador de elétrons.

Tabela 2: Aril hidrazidas obtidas 2b-g		
Entrada	Produto	Rendimento %
1	 2b	61%
2	 2c	56%
3	 2d	25%
4	 2e	78%
5	 2f	68%
6	 2g	62%

Para o entendimento da reação de formação das aril hidrazidas, foi montado um mecanismo proposto no Esquema 7. O radical amino das aril hidrazinas realiza um ataque nucleofílico na carbonila do anidrido isatoico ligada ao anel aromático que estabiliza a carga por ressonância. O par de elétrons da dupla ligação se desloca para o oxigênio, que, ao regenerar a dupla ligação, expulsa o oxigênio sp^3 com a carga negativa, abstraindo o próton da hidrazina protonada. Na etapa seguinte o nitrogênio reativo reagirá com o H do ácido carboxílico, formando uma anilina e levando a descarboxilação do produto, resultando no produto desejado.



Esquema 7: Mecanismo de reação para formação das aril hidrazidas

5.2 – Análises sinais RMN ¹H e CG-EM

Na realização da análise de RMN ¹H (Figura 15), observou-se que a integração e os deslocamentos químicos se enquadram com a obtenção de um único produto que corresponde a fórmula molecular da aril hidrazida especificado na literatura (C₁₃H₁₃N₃O).

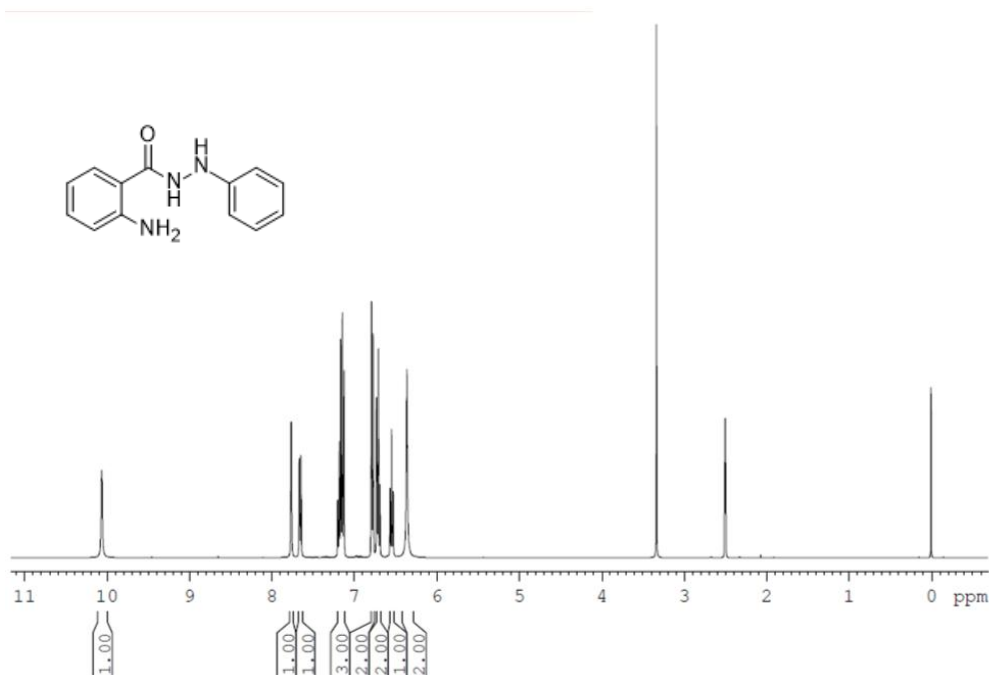


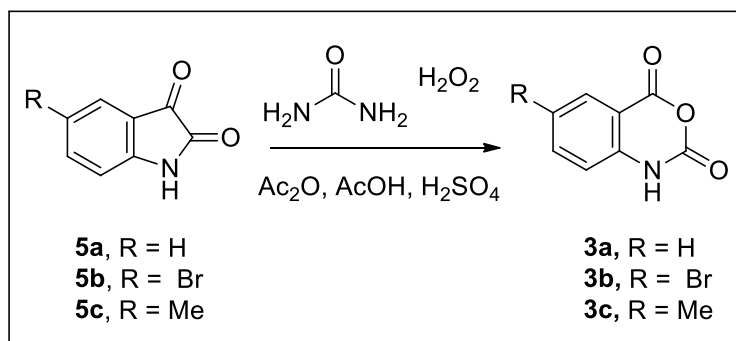
Figura15: Espectro de RMN de ^1H do composto **2^a**

A análise realizada por CG-EM também indicou a presença de um único produto, com valor do tempo de retenção igual a 22,94 minutos, apresentando uma alta pureza. O composto apresentou um íon molecular no pico de $m/z = 227$, que equivale ao peso molecular da aril hidrazida **2a**, confirmando a presença do produto esperado.

5.3 – Síntese dos anidridos isatoicos

A síntese dos anidridos isatoicos 6-substituídos foi realizada por meio da oxidação de isatinas 5-substituídas utilizando metodologia (Esquema 8) empregada por Deligeorgiev e colaboradores (2007). O intuito dessa síntese extra foi ampliar nossa gama de anidrido isatoico para então reagirem com as aril hidrazidas, gerando nossos produtos de interesse com variedade de substituintes, uma vez que foi avaliado que essa porção da molécula pertencente ao anidrido possui influência na sua atividade leishmanicida.

O acompanhamento da reação foi realizado com CCF, entretanto esse método apresentou difícil acompanhamento da reação, pelo fato do anidrido e da isatina apresentarem um fator de retenção (R_f) similares, mesmo na utilização de diferentes eluentes o que acabava mascarando o fim da reação. CG-EM foi utilizada para caracterização dos produtos.



Esquema 8: Formação de anidridos isatoicos a partir da oxidação de suas respectivas isatina

5.4 – Resultados da análise biológica

Os compostos alvos sintetizados como potenciais agentes leishmanicidas passaram por uma triagem em culturas de promastigotas de *L. amazonensis* como havia sido realizado com o composto protótipo, e todos os novos compostos apresentaram inibição acima de 50% a uma concentração de 100 μM . Em seguida para avaliar suas atividades, os mesmos foram submetidos a uma nova triagem, em uma concentração dez vezes menor e assim foram selecionados quatro de sete compostos para determinar a concentração inibitória média (IC_{50}).

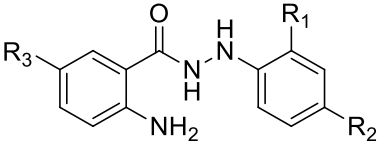
					
Composto	R1	R2	R3	Atividade máxima inibitória a 10 μ M (%)	IC ₅₀ (μ M) (intervalo de confiança de 95%)
2a	H	H	H	41,3	>10
2b	H	Br	H	55,2	5,3 (4,963 – 5,670)
2c	H	Cl	H	59,2	-
2d	H	F	H	12,8	>10
2e	CH ₃	H	H	4,4	>10
2f	H	H	Br	67,7	4,2 (3,460 – 5,038)
2g	H	Br	Br	97,9	1,3 (1,177 – 1,411)
Anfotericina	-	-	-	-	0,02

Tabela 3: Triagem da série antranil hidrazidas a 10 μ M e comparação das IC₅₀ dos compostos que apresentaram inibição do crescimento de promastigotas maior que 50% a 10 μ M.

Na avaliação da IC₅₀ para os compostos **2b**, **2f** e **2g** (Figura 16, Tabela 3). O composto **2g** foi o com melhor desempenho apresentando IC₅₀ de 1,3 μ M. Foi aplicado um teste de ANOVA seguido de pós teste de Tukey que indicou que o composto **2b** difere significativamente do composto **2f** ($p < 0,05$) e que o composto **2g** difere tanto do composto **2b** quanto do **2f** ($p < 0,001$). O controle positivo de tratamento com anfotericina resultou em IC₅₀ = 0,02 μ M.

Os compostos **2b**, **2f** e **2g** apresentaram alta toxicidade a 10 μ M em macrófagos peritoneais e as demais não apresentaram atividade contra amastigotas intracelulares, onde os testes tiveram uma pausa devido ao início da pandemia, diminuindo assim drasticamente as análises laboratoriais. O desempenho desses compostos irá direcionar futuras alterações estruturais no planejamento de novos compostos.

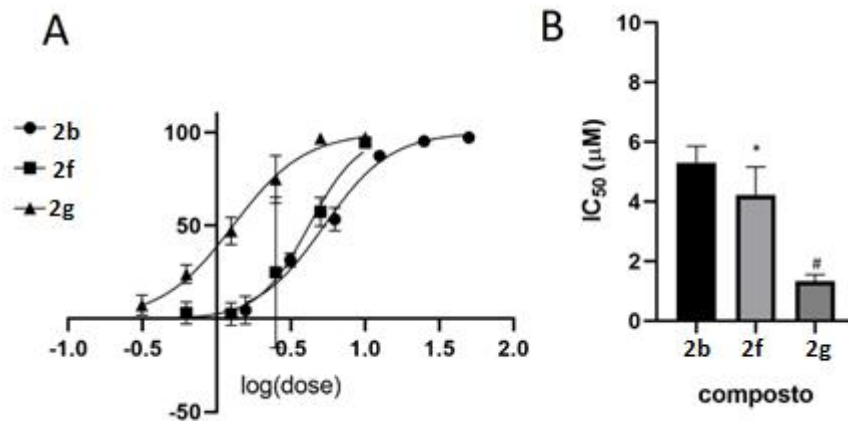
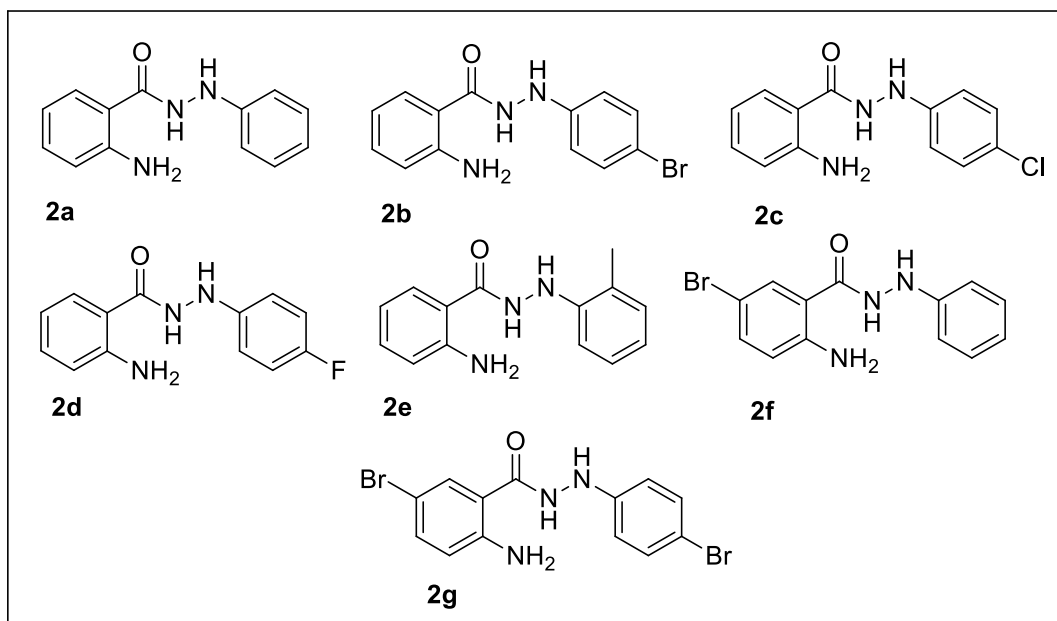


Figura 16: Comparação da atividade em promastigota da série antranil hidrazidas: **A-** Curva log(dose) resposta; **B-** IC₅₀. # p < 0,001 vs **2b** e **2f**; * p < 0,05 vs **2b**. Anfotericina IC₅₀ = 0,02 μM.

O resultado dos testes em cultura de promastigotas mostraram que as antranil hidrazidas foram superiores ao composto protótipo. A comparação das IC₅₀ em cultura de promastigotas permite inferir que a halogenação com cloro ou bromo na posição p-fenil em R2 e/ou R3 (Tabela 3) nos dois anéis confere uma potência superior a presença de um único bromo presente somente em um dos anéis benzênico nos compostos **2b** e **2f**. Esses resultados direcionam o desenho de fármacos seletivos para o tratamento da leishmaniose baseados no grupo aril hidrazidas.

6 – CONCLUSÃO

A síntese das sete aril hidrazidas **2a-g** foram realizadas com sucesso, após os testes e ajustes das condições experimentais, resultando em rendimentos satisfatórios (25-80%).



O preparo de anidridos isatoicos 6-substituídos também foram realizados com sucesso, fornecendo material de partida para respectivas aril hidrazidas possibilitando obtenção de novos produtos. Os ensaios de avaliação biológica realizada pelos colaboradores demonstraram resultados promissores para os compostos como uma nova classe de potenciais agentes leishmanicidas. Os compostos **2b**, **2f** e **2g** apresentaram atividade em macrófagos peritoneais com uma toxicidade de 10 μ M, sendo um aumento no potencial de inibição de crescimento das formas promastigotas em cerca de 10 vezes em comparação aos outros compostos. Esse desempenho foi associado pela presença de bromo tanto na porção fenil hidrazina quanto no anidrido isatoico, mostrando essas porções da molécula como grupo farmacofórico importantes na atividade leishmanicida direcionando futuras alterações estruturais dos compostos.

Como perspectivas temos a síntese de novos compostos com o objetivo de ampliar a gama de produtos substituídos, assim como retomar os testes biológicos realizados pelo grupo de colaboradores para dar então continuidade a avaliação da

atividade leishmanicida em amastigotas intracelulares e avaliação sobre atividade na enzima arginase presente no parasita, onde os resultados obtidos serão utilizados em futuro projeto de mestrado.

7 – BIBLIOGRAFIA

Akilov, O. E., Khachemoune, A., & Hasan, T. **Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis**. *International Journal of Dermatology*, 46(2), 132–142, 2007

Akuffo, H., Costa, C., van Griensven, J., Burza, S., Moreno, J., & Herrero, M. New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2018.

Alemayehu, M.; Wubshet M.; Mesfin N.; Gebayehu A. **Effect of Health Care on Quality of Life among Human Immunodeficiency Virus Infected Adults With and Without Visceral Leishmaniasis in northwest Ethiopia: A Longitudinal Follow-Up Study**. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98(3), 2018, pp. 747–752. 2016.

Altamiranoenciso, A. J., et al. **Sobre a origem e dispersão das Leishmanioses Cutânea e Mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas**. *História, Ciência e Saúde*. Rio de Janeiro. V.10, n.2, p.853-882, 2003.

Alvar, j.; Aparicio, P.; Aseffa, A.; Boer, M. D.; Cañavate, C.; Dedet, J. P.; Gradoni, I.; Horst, R. T.; López-vélez, R.; Moreno, j. **The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the second 10 years**. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 21, n. 2, p. 334-359, 2008.

Ashford, R. **The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses**. *International Journal for Parasitology*, 30(12-13), 1269–1281, 2000

Avlonitis, N., Lekka, E., Detsi, A., Koufaki, M., Calogeropoulou, T., Scoulica, E., ... Makriyannis, A. **Antileishmanial Ring-Substituted Ether Phospholipids**. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(5), 755–767, 2003

Berman JD, Wyler DJ. **An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in Leishmaniasis**. *J Infect Dis*. 1980 Jul;142(1):83-6.

Berman, J. D. **Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years**. *Clinical Infectious Diseases*, 24(4), 684–703, 1997.

Bern, C. *et al.* **Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis.** Clin. Infect. Dis., v. 43, p. 917–924, 2006.

Bhattacharya, S. K. *et al.* **Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India.** Clin. Infect. Dis., v. 38, n. 2, p. 217-221, 2004.

Bhattacharya, S. K. *et al.* **Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis.** J. Infect. Dis., v. 196, n. 4, p. 591-598, 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.**

Brasil. **Ministério da Saúde. Manual da Vigilância de Leishmaniose Tegumentar Americana.** 2017.

Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. **Doenças e agravos de notificação online.** Brasília: Ministério da Saúde. Disponível: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29892200&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/Ita> , 2018.

Bray, P. G. *et al.* **Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future.** Trends Parasitol., v. 19, n. 5, p. 232-239, 2003.

Bryceson, A. **Visceral leishmaniasis in India.** Lancet., v. 356, p. 1399, 2000.

Camargo, E. P. *et al.* **Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids.** Journal of Parasitology, v. 78, n. 1, p. 40-8, Feb 1992.

Ceará – Secretaria da Saúde do Estado do Ceará. **Boletim Epidemiológico – Leishmaniose Visceral.** 2007. 14p

Chang, K.-P. **Leishmaniasis. Reference Module in Biomedical Sciences.** Elsevier, 2014.

Chulay, J. D., Fleckenstein, L., & Smith, D. H. **Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate.** Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene 82, 69-72, 1988.

ClinicalTrials - Trial to Determine Efficacy of Fexinidazole in Visceral Leishmaniasis Patients in Sudan – Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01980199>
 Croft, S.; yardley, V. **Chemotherapy of leishmaniasis**. *Curr. Pharm. Des.*, v. 8, n. 4, p. 319-342, 2002.

Croft, S. L.; sundar, S.; fairlamb, A. H. **Drug resistance in leishmaniasis**. *Clin. Microbiol. Rev.* v.19, p. 111–126, 2006.

Coelho, A. C. et al. **Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in Leishmania amastigotes**. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 51, p. 3030-3032, 2007.

Collerluori. D. M.; morris, S. M., JR.; ash, D. E. **Expression, purification, and characterization of human type II arginase**. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 389, n. 1, p. 135-43, May 1 2001.

Da silva, E. R. et al. **Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding Leishmania (Leishmania) amazonenses arginase and its protein structure prediction**. *International Journal for Parasitology*, V. 32, n. 6, p. 727-737, 2002.

Da silva, E. R. eta al. **Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from Leishmania (Leishmania) amazonenses and subcellular localization of native enzyme**. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 159, n. 2, p. 104-11, 2008.

Deligeorgiev, T., Vasilev, A., Vaquero, J. J., & Alvarez-Builla, J. (2007). **A green synthesis of isatoic anhydrides from isatins with urea–hydrogen peroxide complex and ultrasound**. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(5), 497–501. doi:10.1016/j.ultsonch.2006.12.003

DNDi – 2017. R&D status leishmaniasis programme. Disponível em: <https://dndi.org/news/2017/leish-rdn-status-feb-2017/>

Frezard, F. *et al.* **Gluthatione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalente antimony in meglumine antimoniate**. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, n. 3, p. 913-916, 2001.

George, L. L. M. C., Caiaffa, W. T., Genaro, O., Magalhães, P. A., & Mayrink, W. **Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis**. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 99(1), 55–61, 2005.

Gramiccia, M., & Gradoni, L. **The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control**. *International Journal for Parasitology*, 35(11-12), 1169–1180, 2005.

Hepburn, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 25, n. 5, p. 363-370, 2000.

Iniesta, V.; Gomez-Nieto, L. CL.; Corraliza, I. **The inhibition of arginase by N(ômega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of leishmania inside macrophages.** *Journal of Experimental Medicine*, v. 193, n. 6, p. 777-84, Mar 19 2001.

Jiang, Y. Q. et al. **Ornithine decarboxylase gene deletion mutants of Leishmania donovani.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 6, p. 3781-3788, 1999.

Khaw, M.; PANOSIAN, C. B. **Human antiprotozoal therapy: past, present and future.** *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 8, n. 3, p. 427-439, 1995.

Lainson, R.; shaw, J. J. **The Leishmaniasis in Biology and medicine.** In: London: Academic Press. cap. Evolution, classification and geographical distribution, p. 1-120, 1987.

Lainson, R.; shaw, J. J. **A brief history of the genus Leishmania (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil.** *Ciência e Cultura*, v. 44, p. 94-105, 1992.

Laniado-laborin, R.; vergas M. C. **Amphotericin B: Side effects and toxicity.** *J. Rev. Iberoam. Microl.*, v. 26, p. 223-227, 2009.

LI, H. et al. **Simultaneous quantification of hyperin, REYNOUTRIN and GUAIJAVERIN in mice plasma by LC-MS/MS: application to a pharmacokinetic study.** *Biomedical Chromatography*, v. 30, n. 7, p. 1124-1130. 2016.

Lima, E. B. *et al.* **Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana.** *An. Bras. Dermatol.*, v. 82, p. 111-24, 2007.

Loiseau, P. M., Cojean, S., & Schrével, J. **Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance.** *Parasite*, 18(2), 115–119, 2011

Mesu, V. K. B. K., Kalonji, W. M., Bardonneau, C., Mordt, O. V., Blesson, S., Simon, F, Tarral, A. **Oral fexinidazole for late-stage African Trypanosoma brucei gambiense trypanosomiasis: a pivotal multicentre, randomised, non-inferiority trial.** *The Lancet*, 391(10116), 144–154, 2018.

MSD – Merck Sharp & Dohme. Disponível em: <<https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/protozo%C3%A1rios-extraintestinais/leishmaniose>> , 2019

New, R. C.; Chance, M. L.; Heath, S. **Biol. Cell**, 1983, 47, 59-64.

Rakotomanga, M. *et al.* **Miltefosine affects lipid metabolism in Leishmania donovani promastigotes.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 51, n. 4, p. 1425-1430, 2007.

Ravdin, J. I. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. In: New York: Churchill Livingstone,. cap. Protozoal Diseases, p. 2035-2130. 1990

Roberts, S. C. et al. **Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in Leishmania. Characterization of gene deletion mutants**. Journal of Biological Chemistry, v. 279, n. 22, p. 23668-78, May 28 2004.

Salotra, P. and Singh, R. **Challenges in the diagnosis of post kalaazar dermal leishmaniasis**. Indian Journal of Medical Research 123, 295–310. 2006

SES - Secretaria de estado de saúde. **Boletim epidemiológico Leishmaniose** -Mato Grosso do Sul. Disponível em: <https://www.vs.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2020/08/Boletim-Epidemiol%C3%B3gico-Leishmaniose-SE-32.pdf> 2020.

Singh, R. K.; Pandey, H. P.; Sundar, S. **Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead**. Indian. J. Med. Res., v. 123, n. 3, p. 331-344, 2006.

Singh, N. et al. **Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drugs targets**. Asian Pac. J. Trop. Med., p. 485-497, 2012.

Sundar, D. et al. **Resistance to treatment in kala-azar: speciation of isolates from northeast India**. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 65, n. 3, p. 193-196, 2001.

Sundar S, Chakravarty J. **Investigational drugs for visceral leishmaniasis. Expert Opin Investig Drugs**. Sci Transl Med. 2012;4(119):119re1–119re1, 2015

Williams, D. M.; Carter, K. C.; Baillie, A. J. J. **Pharm. Pharmacol.**, 50, 1351-6, 1998.

WHO; World health organization. **Steering Committee on Drugs for African Trypanosomiasis, Chagas Disease and Leishmaniasis (ICHEM)**: Geneva, 1996.

WHO; World health organization. **Leishmaniasis**. Disponível em: Disponível: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>; 2019.