



UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LECILIO SOARES DA SILVA JUNIOR

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS NOVOS
DERIVADOS ARILOXAETILTIOSSEMICARBAZÔNICOS**

RECIFE, PE, BRASIL
2014

LECILIO SOARES DA SILVA JUNIOR

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS NOVOS DERIVADOS
ARILOXAETILTIOSSEMICARBAZÔNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Linha de Pesquisa: Planejamento e síntese dos fármacos

Orientador: Prof. Dr. Dalci José Brondani

RECIFE – PE
2014

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586a Silva Júnior, Lecílio Soares da.
Síntese e avaliação da atividade biológica dos novos derivados
ariloxaetiltiossemicarbazônicos / Lecílio Soares da Silva Júnior. – 2014.
109 f.: il.; tab.; quad.; gráf.; 30 cm.

Orientador: Dalci José Brondani.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2014.
Inclui referências.

1. Leishmaniose. 2. Catepsinas. 3. Câncer. 4. Tiossemecarbazona.
Brondani, Dalci José (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-087)

LECILIO SOARES DA SILVA JUNIOR

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS NOVOS DERIVADOS
ARILOXAETILTIOSSEMICARBAZÔNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau Mestre em Ciências Farmacêuticas. Linha de Pesquisa: Planejamento e síntese dos fármacos.

Aprovado em: 21/02/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Dalci José Brondani
(Orientador - DCFar/UFPE)

Prof^a. Dra. Terezinha Gonçalves da Silva
(Membro Interno Titular - DA/UFPE)

Prof^a. Dra. Ivani Malvestiti
(Membro Externo Titular - DQF/UFPE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Sousa Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Prof^ª. Dra. Ana Cristina Lima Leite

*Primeiramente a Deus, a meus pais, a minha irmã e tia
por todo amor, incentivo, carinho e apoio dedicados
durante toda minha vida.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por existir, por ter saúde e por ter me dado força e discernimento para ultrapassar todas as barreiras na minha vida.

A minha mãe Josilane por todo apóio, amor e paciência, por sempre acreditar no meu potencial, me dando sempre incentivo e estímulo, ao meu pai Lecilio, Irmã Felicia e tia Josilene.

Ao meu orientador Dalci por ter aberto as portas do seu laboratório e ter passado seu conhecimento, por toda autonomia e confiança em me depositada, o que tornou esses dois anos extremamente produtivos no campo do conhecimento, sendo este trabalho um decimo de todo conhecimento adquirido.

A todos os meus familiares por estarem sempre comigo em todos os momentos, sejam eles alegres ou tristes.

A Família LABSINFA de ontem e de hoje: Revorêdo, Wan, Victor, Lucas, Elany, Gevânio e Milca por todos os momentos de alegria e de descontração vividos em nosso dia-dia laboratorial, e tenho certeza que mais momentos agradáveis virão por ai. Em especial a Janessa que inicio-me nesta jornada, a minha eterna chefe Andréa por toda paciente e conhecimento repassado.

A minha amiga Jannieres, por todo apoio e carinho dedicado, da mesma forma a Marcia que inclusive foi responsável pela realização dos testes antileishmania, o meu muito obrigado.

Aos alunos de iniciação científica, Caio, Bianca, Danilo e Jackson, por toda a ajuda e dedicação empenhadas.

A Prof^ª.Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo e sua aluna Dra. Cynarha Daysy Cardoso da Silva, pelo conhecimento e espaço para a realização dos testes antileishmania. E a Prof^ª. Dra. Terezinha Gonçalves da Silva e sua equipe pela realização dos teste citotóxicos.

A toda minha turma de graduação, pois eles fazem parte do que sou hoje e em especial a minha pequenina amiga Micalyne.

A todos os professores e mestre que formaram a pessoa que sou hoje, como os professores da graduação; Antônio Rodolfo, Beate Saegesser ou do ensino médio e fundamental como; Souza, Paulo, Jardson, Anastácio, Luzene entre outros.

A meus amigos e amigas que acompanharam-me ao longo de toda a vida, mesmo que distantes em alguns momentos de certa forma contribuíram para o que sou hoje, em especial a Gustavo e Anicely.

A todos os professores e funcionários que fazem parte do PPGCF por compartilharem conosco de seus conhecimentos, em especial a Nerilim.

A todos os funcionários do DCFar, em especial Iguaci e Fátima.

Ao CNPq pela concessão do auxílio financeiro durante os dois anos de mestrado, possibilitando a realização deste trabalho.

Quanto melhor é adquirir a sabedoria do que o ouro! E quanto mais excelente é escolher o entendimento do que a prata.

Provérbios 16.16

RESUMO

Proteases de Cisteína da família papaína (Clã CA, família C1) tem sido relacionadas como fator-chave na patogênese de várias doenças, entre as quais, o câncer, artrite, osteoporose e infecções microbianas. Isto posto, as enzimas dessa família constituem alvo potencial para o desenvolvimento de estratégias que possam levar ao desenvolvimento de novos fármacos para essas patologias. Várias dessas enzimas têm sido caracterizadas nas espécies de *Leishmania*, tais como a catepsina L (CPA e CPB) e catepsina B (CPC), as quais têm sido atribuídas o papel de fator de virulência, permitindo-lhes evitar e suprimir o sistema imune do hospedeiro. No câncer, observou-se que as catepsinas eram frequentemente reguladas positivamente, principalmente nos tumores mais agressivos, e sido implicadas em vários processos tumorais, como como proliferação, disseminação, degradação da MEC (Matriz Extra Celular), invasão, angiogênese e metástase. Os inibidores das proteases de cisteína que formam ligação covalente irreversível, embora muito potentes, apresentam uma fraca seletividade e seu perfil toxicológico permanece um problema, já dos inibidores contendo um grupo reativo do tipo reversível como a tiossemicarbazida e seus derivados, pode-se esperar que possuam um melhor perfil de segurança no que diz respeito à sua potencial aplicação como medicamento. Neste contexto foram sintetizados sete novos derivados Ariloxaetiltiossemicarbazônicos, através de uma rota sintética composta de três etapas: formação dos intermediários acetais, através de uma reação S_N2 entre o bromo acetaldéido dietil acetal e os diferentes compostos fenólico substituídos em meio básico tendo sido utilizado o KI como catalizador, passando em seguida pela hidrólise dos mesmos e concomitantemente condensação com a tiossemicarbazida, sendo obtidos de forma satisfatória. A elucidação estrutural foi realizada através da análise dos dados espectroscópicos de RMN 1H , ^{13}C e IV. Três compostos foram testados frente a forma promastigota da *Leishmania amazonensis*, apresentando atividade leishmanicida dose dependente e superior a droga de referência, o Glucantime, o composto Lss2 mostrou-se quase duas vezes mais potente que a Pentamidina, uma droga utilizada nos casos de resistência a primeira. No teste da atividade antiproliferativa as sete substâncias foram testadas em linhagens de células tumorais numa concentração de $25\mu g/mL$, exibindo uma potência citotóxica que variou de 35,5% a 100%, sendo mais sensíveis às linhagens consideradas de tumores mais agressivos, com o composto Lss7 apresentando atividade superior que a Doxorubicina para todas as linhagens.

Palavras-chave: Leishmaniose. Catepsinas. Câncer. Tiossemicarbazona.

ABSTRACT

Cysteine protease papain family (CA clan, family C1) has been implicated as a key factor in the pathogenesis of various diseases, including, cancer, arthritis, osteoporosis and microbial infections. So, the enzymes of this family are potential target for the development of strategies that can lead to the development of new drugs for these diseases. Many of these enzymes have been characterized in *Leishmania* species, such as cathepsin L (CPA and CPB) and cathepsin B (CPC), which have been assigned the responsibility of virulence factors, allowing them to avoid and suppress the immune system host. In cancer, it was observed that cathepsins were often upregulated, especially in more aggressive tumors and tumor been implicated in various processes such as proliferation, dissemination, degradation of ECM (extracellular matrix), invasion, angiogenesis and metastasis. Inhibitors of cysteine proteases that form an irreversible covalent bond, although very potent, have a low selectivity and toxicological profile remains a problem, while inhibitors containing a reactive group such as reversible type thiosemicarbazide and its derivatives, one can expect that have a better safety profile with regard to their potential use as a medicament. In this context seven new derivatives have been synthesized Ariloxaetiltiossemicarbazônicos, through a synthetic route comprises three steps: formation of acetals intermediate over the S_N2 reaction between bromo acetaldehyde diethyl acetal and the various substituted phenolic compounds under alkaline conditions have been used as KI catalyst, followed by passing the same hydrolysis and condensation with thiosemicarbazide concomitantly being achieved satisfactorily. The structural elucidation was performed by analysis of spectroscopic data of RMN 1H, 13C and IV. Three compounds were tested against *Leishmania amazonensis* promastigote form, with dose-dependent leishmanicidal activity and greater than the reference drug, Glucantime, Lss2 compound proved to be almost twice as potent as pentamidine, a drug used in cases of resistance to first. In the test the antiproliferative activity of the seven compounds were tested on tumor cell lines at a concentration of 25 mcg/ml, exhibiting a cytotoxic potency that ranged from 35.5% to 100%, being more sensitive to strains considered more aggressive tumors with Lss7 compound showing higher activity than doxorubicin for all strains.

Keywords: Leishmaniasis. Cathepsins. Cancer. Thiosemicarbazone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da papaína.....	25
Figura 2- Mecanismo catalítico de proteólise por proteases de cisteína papaína-like.	26
Figura 3- estrutura terciária da catepsina L.	27
Figura 4 - - sobreposição das estruturas das catepsinas.....	28
Figura 5- estrutura da procatepsina B.....	28
Figura 6 - esquema geral dos subsites da especificidade das proteases.	29
Figura 7- E-64 inibidor das catepsinas e seus derivados inibidores seletivos.	30
Figura 8 - Representação esquemática da ligação das catepsinas B (A) e L (B) com seus inibidores.	31
Figura 9 - Mecanismos de inativação de inibidores de proteases de cisteína.....	33
Figura 10 - mecanismo proposto para a inibição da catepsina L por derivados da tiossemicarbazida.....	35
Figura 11- Representação esquemática das principais organelas intracelulares das principais formas da <i>Leishmania sp.</i>	37
Figura 12- Ciclo biológico heteroxênico dos parasitas do gênero <i>Leishmania.</i>	38
Figura 13- antimoniais trivalentes, tártaro emético	43
Figura 14 - antimoniais pentavalentes.	43
Figura 15 - Dois modelos possíveis para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes.	44
Figura 16 - Complexo de Sb(V) com o ribonucleosídeo adenosina.....	45
Figura 17 - Papel das catepsinas nos processos tumorais.....	50
Figura 18 - Os mecanismos potenciais pelos quais catepsinas promovem a invasão tumoral.	52
Figura 19 - Estrutura química das tiossemicarbazonas	53
Figura 20 - Representação das conformações das tiossemicarbazonas.	53
Figura 21 - Representação dos estereoisômeros <i>E</i> e <i>Z</i> das Tiossemicarbazonas.....	54
Figura 22 - Representação das duas formas tautoméricas das TSCs e seus complexos com metais.....	60
Figura 23 - Espectro de IV referente à ariloxaetiltiossemicarbazonas Lss5.	68
Figura 24 - Espectro de RMN ¹ H referente à ariloxaetiltiossemicarbazonas Lss5.	69
Figura 25 - Curva de Karplus, que correlaciona o valor da constante de acoplamento entre hidrogênios vicinais com o ângulo diedro.	71
Figura 26 - Espectro de RMN ¹³ C referente à ariloxaetiltiossemicarbazonas Lss5.	72
Figura 27 - estrutura dos derivados tiossemecarbazonicos e docking molecular dos mesmos com a catepsina L.	79

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Rota de obtenção de tiossemicarbazonas a partir de tiossemicarbazidas	55
Esquema 2 - Reação global da isatina com N-[4-(4'-clorofenil) tiazol-2-il] tiossemicarbazida, produzindo tiossemicarbazona.	55
Esquema 3 - Rota sintética de tiossemicarbazonas a partir de aldeídos naturais ((3R)- (+) citronelal.	56
Esquema 4 - Rota sintética de novas tiossemicarbazonas a partir de ferrocenilchalconas.....	56
Esquema 5 - Rota de síntese do composto 1,2-naftoquinona tiossemicarbazona.	56
Esquema 6 - Rota de síntese do derivado tiossemicarbazônico da 3-(5-nitrofurfuril) acroleína.	57
Esquema 7 - Rota de síntese de tiossemicarbazonas a partir de hidrazinas.	57
Esquema 8 - Síntese de aril-tiossemicarbazonas utilizando irradiação por ultrassom.	57
Esquema 9 - Rota de síntese do (E)-2-(2,4-dihidroxi-benzilideno) tiossemicarbazona, com rendimento de 87%.....	58
Esquema 10 - Rota de síntese do (E)-2-[(1H-indol-3-il) metileno] tiossemicarbazona com rendimento de 67%.....	58
Esquema 11 - Rota de síntese de 2,4-diaril-3-azobicyclo[3.3.1]nonano-9-ona tiossemicarbazonas.	59
Esquema 12 - Rota geral de síntese das ariloxaetiltiossemicarbazonas (Lss1-7).	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de crescimento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com Lss3.....	76
Gráfico 2 - O gráfico apresenta a Correlação entre a atividade e propriedades físico-químicas dos compostos tais como log P e superfície polar.....	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Caraterísticas da Leishmaniose Cutânea	40
Quadro 2 - Caraterísticas da Leishmaniose Cutânea Difusa	41
Quadro 3 - Caraterísticas da Leishmaniose Mucosa	41
Quadro 4 - Caraterísticas da Leishmaniose Visceral.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química e nomenclatura das ariloxaetiltiossemicarbazonas sintetizadas (Lss1-7).....	64
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas das ariloxaetiltiossemicarbazonas e rendimentos reacionais.	67
Tabela 3 - avaliação da regra dos cinco de Lipinski para os derivados ariloxaetiltiossemecarbazonas	74
Tabela 4 - IC ₅₀ µg/ml encontrado para o composto Lss1	76
Tabela 5 - IC ₅₀ µg/ml encontrado para o composto Lss2	77
Tabela 6 - IC ₅₀ µg/ml encontrado para o composto Lss3.....	77
Tabela 7 - Concentração inibitória em 50% do das drogas Glucantime e Pentamidina para a <i>Leishmania amazonensis</i> (IC ₅₀ µg/ml).....	77
Tabela 8- Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 25 µg/mL	81
Tabela 9 - Atividade antiproliferativa IC ₅₀ (µg/ml).....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
IV	Infravermelho
µg/ml	Microgramas por mililitro
S _N 2	Substituição nucleofílica de segunda ordem
MEC	Matrix Extracelular
WHO	Organização Mundial da Saúde
DNA	Ácido desoxirribonucleico
pH	Potencial de Hidrogênio
PM	Peso Molecular
kDa	Quilodaltons
MSF	Médicos Sem Fronteiras
kDNA	DNA do Cinetoplasto
µm	Micrometro
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
LV	Leishmaniose Visceral
NMG	Antimoniato de N-metilglucamina
SGS	Estibogluconato de sódio
ATP	Trifosfato de adenosina
GTP	Trifosfato de guanosina
MMPs	Metaloproteínases da matriz
siRNA	RNA de interferência
MMP -1	Metaloproteínase da matriz -1
MMP-3	Metaloproteínase da matriz -3
^t BuOK	terc-butóxido de potássio
p-TsOH	Ácido 4-toluenossulfônico
ml	Mililitro
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
DMF	Dimetilformamida
Eq.	Equivalentes
cm ⁻¹	Por Centímetro
ppm	Partes por milhão

ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC ₅₀	Concentração Inibitória para 50%
MTT	Tetrazólio 3- (4,5- di metil tiazol -2-il) -2,5-di fenil tetrazólio
PF	Ponto de Fusão
R _F	Fator de Referencia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Proteases	22
2.1.1 <i>Tipos de proteases</i>	23
2.1.1.1 <i>Proteases de cisteína</i>	24
2.1.1.1.1 <i>Catepsinas proteases papaína-like</i>	24
2.1.2 <i>Inibidores das catepsinas de cisteína</i>	30
2.2 Leishmaniose	35
2.2.1 <i>Agente etiológico</i>	36
2.2.1.1 <i>Ciclo biológico</i>	38
2.2.2 <i>Fisiopatologia da leishmaniose</i>	39
2.2.3 <i>Tratamento</i>	42
2.2.3.1 <i>Antimoniais</i>	43
2.2.4 <i>Catepsinas em Leishmania sp.</i>	46
2.3 Câncer	47
2.3.1 <i>Fisiopatologia do câncer</i>	48
2.3.2 <i>Proteases na progressão do câncer</i>	49
2.4 Química das tiossemicarbazonas	52
2.4.1 <i>Tiossemicarbazonas - aspectos químicos</i>	52
2.4.2 <i>Síntese de tiossemicarbazonas</i>	54
2.4.3 <i>Tiossemicarbazonas e seus metais complexos</i>	60
3. OBJETIVOS	61
3.1 Objetivo geral	61
3.2 Objetivos específicos	61
4. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ARILOXAETILTIOSSEMICARBAZONAS	62
4.1 Metodologia sintética	62
4.1.1 <i>Eterificação para obtenção dos intermediários acetal</i>	62
4.1.2 <i>Hidrólise dos intermediários acetal para obtenção dos aldeídos</i>	63
4.1.3 <i>Condensação dos aldeídos com a tiossemicarbazida para obtenção das ariloxaetiltiossemicarbazonas (Lss1-7)</i>	63
4.2 Resultados e discussão	63
4.3 Avaliação quanto a regra dos cinco de lipinski	73

5. ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	75
5.1 Metodologia.....	75
5.2 Resultados e discussão.....	75
6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DOS DERIVADOS ARILOXAETILTIOSSEMICARBAZÔNICOS.....	80
6.1 Metodologia.....	80
6.2 Resultados e discussão.....	81
7. MATERIAIS E MÉTODOS.....	85
7.1 Materiais.....	85
7.1.1 Cromatografias.....	85
7.1.2 Pontos de fusão.....	85
7.1.3 Espectroscopias de iv, rmn^{1h} e rmn^{13c}	85
7.1.4 Equipamentos.....	86
7.1.5 Reagentes e solventes.....	86
7.2 Métodos.....	87
7.2.1 Procedimento geral para obtenção das fenoximetil-tiossemicarbazonas.....	87
7.2.1.1 Eterificação para obtenção dos intermediários acetal.....	87
7.2.1.2 Hidrólise dos intermediários acetal para obtenção dos aldeídos.....	87
7.2.1.3 Condensação dos aldeídos com a tiossemicarbazida para obtenção das ariloxaetiltiossemicarbazonas (Lss1-7).....	88
7.2.2 Dados físico-químicos e espectroscópicos para as fenoximetil-tiossemicarbazonas.....	88
7.2.2.1 (4-carboxilato de metila-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona (Lss1).....	88
7.2.2.2 (4-etil-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona (Lss2).....	89
7.2.2.3 (ác- carboxílico-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona (Lss3).....	90
7.2.2.4 (2-isopropil-5-metil-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona (Lss4).....	91
7.2.2.5 (4-nitro-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona (Lss5).....	92
7.2.2.6 (2-fenil-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona (Lss6).....	92
7.2.2.7 (3-fenil-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona(Lss7).....	93
7.2.3 Metodologia da atividade leishmanicida.....	94
7.2.4 Metodologia da atividade antiproliferativa.....	94
8. CONCLUSÕES.....	96
9. PERSPECTIVAS.....	98
REFERÊNCIAS.....	99

1. INTRODUÇÃO

A percepção de que, para além das funções de degradação inespecífica, as proteases agem regulando o destino, localização e atividade de muitas proteínas, modulam interações proteína-proteína, criam novas moléculas bioativas, contribuem para o processamento da informação celular, geram transdução e amplificação de sinais moleculares, inaugurou uma nova era na pesquisa ao passo que abriu um novo horizonte para a descoberta e exploração de novos alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novos medicamentos (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008).

Dentre vários tipos de proteases as de Cisteína tem recebido grande atenção devido ao seu envolvimento em processos patológicos, alguns dos quais existe uma carência por novas estratégias terapêuticas, casos estes como do câncer e das doenças infecciosas (SELZER et al., 1999). O primeiro pelas dificuldades no desenvolvimento de terapias seguras e eficazes e o crescente número de casos associados ao envelhecimento da população (POPAT; MCQUEEN; FEELEY, 2013). No segundo caso há uma falta de medicamentos eficazes, seguros e acessíveis para o controle destas doenças. Desta forma novos medicamentos antiparasitários são extremamente necessários para tratar e controlar doenças como a malária, leishmaniose, doença do sono e de chagas, que afetam milhões de pessoas a cada ano. No entanto, como a maioria das pessoas infectadas vivem em países em que as perspectivas de retorno financeiro sobre o investimento são muito baixas, não existe o interesse pela indústria na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos (PINK et al., 2005).

As leishmanioses são um complexo de antroponozoonoses, doenças infecciosas, porém não contagiosas, que possuem características epidemiológicas e de evolução variadas, com um importante espectro clínico e que possuem em comum seu agente etiológico pertencente ao gênero *Leishmania*, endêmicas em 98 países e territórios em quatro continentes. Segundo dados da WHO de 2010 existem cerca de 350 milhões de pessoas sob risco de infecção, com incidência estimada de 2 milhões de novos casos por ano (0,5 milhão de leishmaniose visceral e 1,5 milhão de leishmaniose cutânea). Sendo a leishmaniose visceral responsável por um número estimado em mais de 50.000 mortes a cada ano.

O câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade mundial que o torna um importante problema de saúde pública. Devido ao câncer, a cada ano no mundo, cerca de 12 milhões de pessoas são diagnosticadas, e 7 milhões de pacientes morrem, sendo que 25

milhões de pessoas vivem atualmente com um diagnóstico de câncer (POPAT; MCQUEEN; FEELEY, 2013).

Proteases de Cisteína da família papaína (Clã CA, família C1) têm sido caracterizadas nas espécies de *Leishmania*, tais como a catepsina L (CPA e CPB), e catepsina B (CPC), as quais têm sido atribuídas o papel de fator de virulência, permitindo-lhes evitar e suprimir o sistema imune do hospedeiro (SELZER et al., 1999). No câncer, observou-se que as catepsinas eram frequentemente reguladas positivamente, principalmente nos tumores mais agressivos e sido implicadas em vários processos tumorais como proliferação, disseminação, degradação da MEC (Matriz Extra Celular), invasão, angiogênese e metástase (BERDOWSKA, 2004; JEDESZKO; SLOANE, 2004).

Os inibidores de proteases de cisteína tipicamente apresentam a presença de um grupamento funcional eletrofílico que podem ser representados por funcionalidades tais como um grupo carbonila ou um aceptor de Michael, que reage com o tiolato catalítico da cisteína no sítio ativo da enzima, formando muitas vezes ligações covalentes irreversíveis (HANADA et al., 1978).

Drogas que formam uma ligação covalente com seu alvo têm sido tradicionalmente subjugadas pelo fato de derivarem em parte da sua atividade da formação de uma ligação covalente, de forma que sua reatividade potencial poderia levar ao surgimento de efeitos indesejáveis, fato este que tem levado estes fármacos serem preteridos como uma classe de drogas. Embora evitados pela indústria farmacêutica, vários medicamentos covalentes foram aprovados como tratamentos para diversas indicações clínicas e fizeram um grande impacto positivo sobre a saúde, são exemplos deles o ácido acetilsalicílico, omeprazol e o clopidogrel (SINGH et al., 2011).

Alternativamente a isto surge a possibilidade da concepção de inibidores que formem uma ligação covalente reversível baseados na tiossemicabazida, com estes apresentando vantagens terapêuticas únicas, incluindo início rápido de inibição, maior potência, maior duração da ação da droga e atividade potente e persistente o que pode minimizar mutações e o desenvolvimento de resistência. Características estas devido a formação da ligação covalente, mas apresentado um melhor perfil toxicológico devido a reversibilidade da ligação (SMITH et al., 2009).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Proteases

As proteases tem sido apontadas como promissores alvos para o desenvolvimento de novos fármacos, sobretudo quando foi abandonada a ideia inicial que as mesmas possuíam apenas função degradativa simples, necessárias para o catabolismo protéico e geração de aminoácidos (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008).

Descobriu-se que a clivagem precisa de proteínas por proteases, conduz a uma regulação do meio, estando assim as proteases envolvidas no controle de um grande número de reações altamente específicas de processamento proteolítico, que regulam o destino, localização e atividade de muitas proteínas, modulam interações proteína-proteína, criam novas moléculas bioativas, contribuem para o processamento da informação celular, e geram, transdução, e amplificação de sinais moleculares (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008).

Como resultado direto dessas múltiplas ações, as proteases influenciam a replicação e transcrição do DNA, proliferação e diferenciação celular, morfogênese e remodelação dos tecidos, choque térmico, angiogênese, neurogênese, ovulação, fertilização, reparação de feridas, mobilização das células estaminais, hemostasia, coagulação sanguínea, na inflamação, imunidade, autofagia, senescência, necrose e apoptose. Todas estas funções essenciais das proteases no comportamento celular, sobrevivência e morte de todos os organismos contribuem para entendermos por que as proteases são tão importantes alvos para o desenvolvimento de novos fármacos (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008).

Anomalias na fisiologia normal das próteases tem sido observadas em vários estados patológicos, tais como o câncer, doenças neurodegenerativas, doenças inflamatórias e cardiovasculares (TURK, 2006). Além das mesmas serem apontadas como fatores de virulência de parasitas, permitindo-lhes evitar e suprimir o sistema imune do hospedeiro, conferindo-lhes, por conseguinte, longa da vida no corpo do hospedeiro (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2010).

Para a validação de uma protease como alvo, bem como planejar medicamentos eficientes contra ela, é preciso compreender a complexidade dos processos biológicos que participam, os mecanismos de atividade da protease, sua regulação e a bioquímica que diz respeito a sua estrutura e conseqüentemente a função inerente a mesma (TURK, 2006).

2.1.1 Tipos de proteases

Genericamente, proteases também chamadas peptidases, são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas (proteólise) em proteínas ou peptídeos, liberando peptídeos de tamanho variável ou aminoácidos livres. Pertencentes à classe 3 e subclasse 3.4, na Nomenclatura Internacional de Classificação das Enzimas, sendo ainda dividida em dois grandes grupos: as exo e as endopeptidases. As exopeptidases clivam ligações peptídicas nas extremidades N (aminopeptidases) ou C (carboxipeptidases) terminal, das cadeias polipeptídicas. As ômega peptidases são exopeptidases que removem resíduos terminais que são substituídos, ciclizados ou unidos por ligações isopeptídicas.

As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas, e as proximidades dos grupos N ou C terminais têm um efeito negativo na atividade enzimática. As oligopeptidases são endopeptidases que atuam em oligopeptídeos ou em substratos menores que proteínas (BARRETT, 1994).

Podemos classificá-las ainda quanto à natureza química do sítio catalítico em serino-proteases, que possuem resíduo do aminoácido serina e atuam na faixa de pH alcalino; cisteíno-proteases, que possuem resíduo do aminoácido cisteína e atuam na faixa de pH levemente ácido e as aspártico-proteases, que possuem resíduo do aminoácido aspartato e atuam na faixa de pH ácido. Existem ainda as metaloproteases que utilizam um íon metálico para atividade catalítica, atuando em pH neutro a básico. Esta relação entre o centro catalítico e a faixa de pH em que atuam pode nos indicar a distribuição compartimentar das mesmas dentro da célula (BARRETT, 1994; RAWLING; BARRETT, 1994; WOLF, 1992).

Embora existam diferentes classes de proteases e, todas utilizam o ataque nucleofílico da ligação carbono-oxigênio assistido pela doação de um próton ao nitrogênio da ligação peptídica como mecanismo da reação catalítica, tendo determinadas populações de aminoácidos tendo função de agentes nucleofílicos, enquanto que outros, de doadores de prótons (BARRETT, 1994; WOLF, 1992).

A hidrólise das ligações peptídicas media funções essenciais na vida de qualquer organismo vivo. A proteólise limitada, que é aquela onde são clivadas apenas uma ou algumas ligações peptídicas de uma proteína específica, se presta a funções regulatórias, não destrói o substrato, mas modifica suas propriedades e funções biológicas. Já a proteólise não limitada compreende basicamente a completa degradação da proteína alvo através da hidrólise de

múltiplas ligações peptídicas, tendo por objetivo a completa eliminação de uma proteína para regular seus níveis intracelulares (WOLF, 1992).

2.1.1.1 Proteases de cisteína

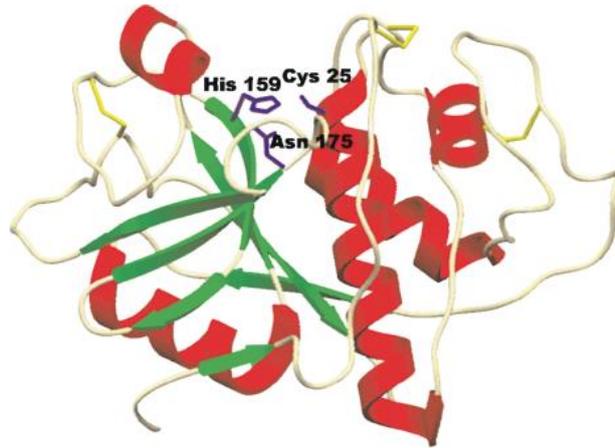
Além da classificação pelo tipo de resíduo responsável pela atividade catalítica, as proteases também apresentam subdivisões. O termo família é utilizado para agrupar proteases que demonstrem relação evolutiva clara através de sua sequência de aminoácidos em pelo menos uma parte da mesma, principalmente na sequência catalítica. Um clã é representativo de um conjunto de famílias que embora tenham indicações de parentesco evolutivo, faltam às mesmas semelhanças estatisticamente significativas em sua sequência de aminoácidos (RAWLINGS; BARRETT, 1993).

Cisteína proteases pertencentes a família da papaína são fatores-chave na patogênese de várias doenças como a artrite, osteoporose, progressão do câncer e infecções microbianas. Desta forma a utilização de enzimas dessa família como alvos para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para uma série de doenças tem se mostrado promissor (SELZER et al., 1999).

2.1.1.1.1 Catepsinas proteases papaína-like

A família das papaína-like peptidases (Clã CA , da família C1) que são estruturalmente relacionados com a papaína, é sem sombra de a família de proteases de cisteína mais estudada. A papaína é caracterizada por uma estrutura de dois domínios e um sítio ativo (bolso catalítico), que está localizado entre os domínios e é responsável pela atividade proteolítica. Os resíduos catalíticos de papaína são a cisteína 25 e a histidina 159, que são evolutivamente conservados como podemos observar na **figura 1**. Esta superfamília engloba um grande número de proteases de cisteína a partir de fontes diversas como bactérias, plantas e mamíferos (GRZONKA et al., 2001).

Figura 1 - Estrutura da papaína.

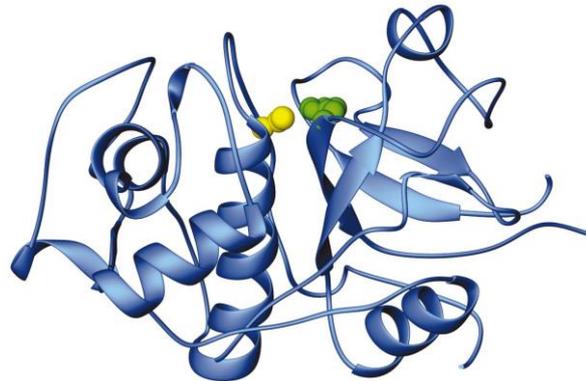


Fonte: GRZONKA et al., 2001.

No sítio ativo destas enzimas o resíduo da cisteína nucleofílica posiciona-se lado a lado a um de histidina ou seja de lados opostos da fenda catalítica (ver figura GG), estando assim espacialmente orientados para formar um par iónico catalítico, que ocorre no intervalo de pH 3,5-8,0, neste princípio que reside à alta atividade proteolítica em pH ácido destas enzimas (**figura 2, ①**). Durante a hidrólise do substrato, o tiolato nucleofílico ataca o carbono da carbonila da ligação peptídica levando a formação de um intermediário transiente tetraédrico (**figura 2, ②**). O oxianião que é gerado é estabilizado pela assim chamada fenda oxionica, que compreende um resíduo de glutamina conservado. No passo seguinte, uma amina livre é formada e a parte C-terminal do substrato é libertado com a transformação simultânea do intermediário tetraédrico numa acil-enzima (**figura 2, ③**). Subsequentemente, a acil-enzima electrofílica é atacada pelo oxigénio nucleofílico da água e um segundo intermediário tetraédrico é produzido (**figura 2, ④**). Finalmente, o colapso do intermediário tetraédrico gera o ácido livre e liberta a parte N-terminal do substrato, e a enzima é regenerada (**figura 2, ⑤**) (STEVERDING; CAFFREY; SAJID, 2006).

lembra um livro fechado. Os domínios separam-se no topo da fenda do sítio ativo em forma de V, no qual forma-se o sítio catalítico da enzima. A característica mais proeminente do domínio esquerdo é a α -hélice central de cerca de 30 resíduos de comprimento, no domínio direito, existe a formação de uma espécie de β -barril, o qual inclui um curto motivo em α -hélice como pode ser observado na **figura 3** (TURK; GUNCAR, 2003).

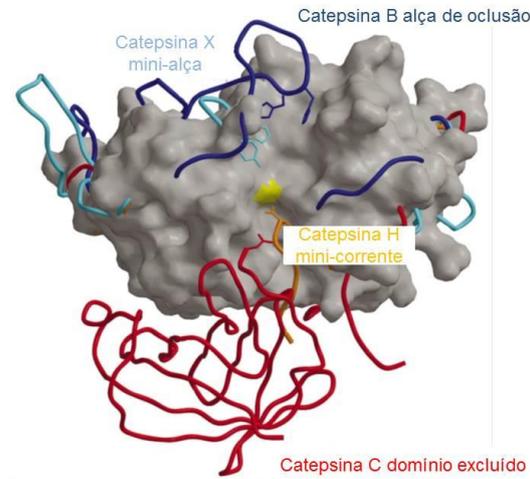
Figura 3- estrutura terciária da catepsina L.



Fonte: TURK; GUNCAR, 2003.

Nas endopeptidases (catepsinas F, L, K, O, S e V) a fenda do sítio ativo se estende ao longo de todo o comprimento da interface dos domínios, as exopeptidases (catepsina B, C, H e X) possuem características adicionais que reduzem os locais de ligação ao substrato. O papel desta característica é duplo: impedir a ligação de substratos peptídicos mais longos e interagir com as regiões N ou C terminais da cadeia do substrato, através da utilização de interações eletrostáticas seletivas. A catepsina B uma Carboxidipeptidase tem uma inserção de cerca de 20 resíduos, denominado de laço de oclusão, o que bloqueia a fenda do sítio ativo. Na **figura 4** podemos ver a sobreposição das estruturas das catepsinas H, C, B, X com a catepsina L como base (TURK; GUNCAR, 2003). As catepsinas B, L, S, O entre outras guardam estreita homologia (BERTI; STORER, 1995).

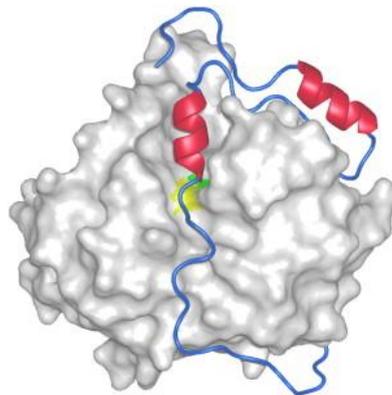
Figura 4 - - sobreposição das estruturas das catepsinas.



Fonte: Adaptado de TURK; GUNCAR, 2003.

As catepsinas são sintetizadas na forma de precursores inativos como uma estratégia de segurança, da mesma forma que ocorre para outras proteases, e são ativadas pela remoção proteolítica do propéptido N-terminal, A estrutura cristalina da procatepsina B revelou que o propéptido passa através da fenda catalítica na orientação oposta à de um substrato, bloqueando o acesso ao sítio ativo já estruturado (**figura 5**). A ativação pela remoção do propéptido pode ocorrer por outras proteases, ou por um mecanismo autocatalítico em pH ácido, processo este que apenas ocorre com as endopeptidases. Uma exceção é a catepsina B que embora seja uma exopeptidase apresenta uma baixa atividade também de endopeptidase, o que permite que a mesma ative-se (TURK; TURK; TURK, 2001).

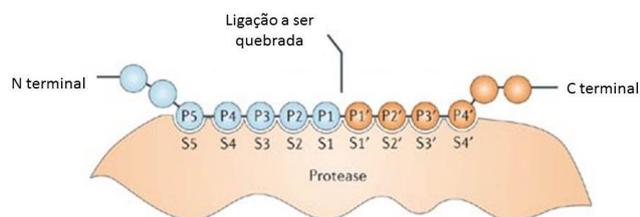
Figura 5- estrutura da procatepsina B.



Fonte: TURK; TURK; TURK, 2001.

Compreender as interações entre as catepsinas de cisteína e seus substratos tem sido e continua a ser um desafio. A parte da superfície da protease que é capaz de acomodar uma única cadeia lateral de um resíduo de aminoácido do substrato é chamado de subsite. Os mesmos são numerados de S1-Sn para cima em direção a porção N-terminal do substrato e S1'-Sn' em direção a porção C-terminal. Os resíduos que são acomodados são numerados como P1-Pn, e P1'-Pn', respectivamente como pode ser observado esquematicamente na **figura 6**. A estrutura do local ativo da protease, por conseguinte, determina quais os resíduos de substrato pode ligar-se a locais específicos da enzima, determinando, assim, a especificidade da protease pelo substrato (SCHECHTER; BERGER, 1967).

Figura 6 - esquema geral dos subsites da especificidade das proteases.



Fonte: Adaptado de TURK, 2006.

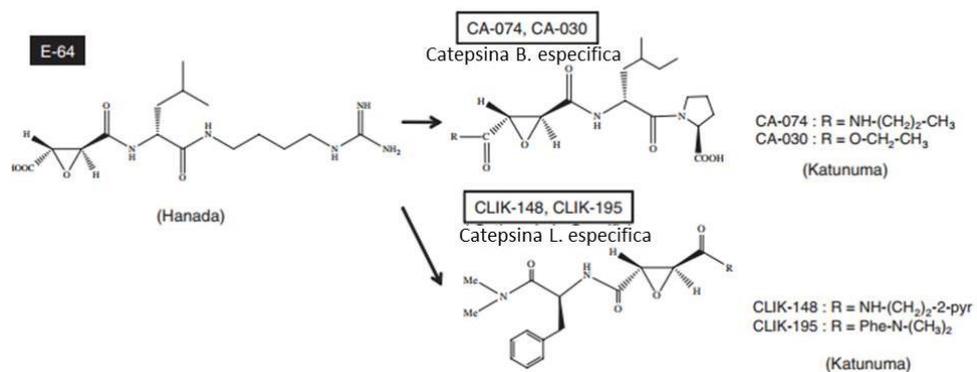
Utilizando um discernimento fornecido por dados cinéticos e pelas estruturas cristalinas obtidas dos complexos das enzimas com pequenas moléculas inibidoras que mimetizam o substrato, observou-se que apenas três subsites, S2, S1 e S1', são fundamentais para o reconhecimento do substrato. As interações entre as enzimas e o substrato nas posições P3 e P2' são menos relevantes. Uma exceção é a catepsina B, tendo em vista que a sua superfície de interação espalha por uma área relativamente grande (TURK et al., 1998).

Catepsinas de cisteína exibem especificidade ampla, clivando assim, preferencialmente, os seus substratos após resíduos básicos ou hidrófobos. Isto é verdade não só para os sintéticos, mas também para substratos proteicos (TURK; TURK; TURK, 2000).

2.1.2 Inibidores das catepsinas de cisteína

Os inibidores de proteases de cisteína tipicamente apresentam a presença de um grupamento funcional eletrofílico que podem ser representados por funcionalidades, tais como um grupo carbonila ou um aceptor de Michael, que reage com o tiolato catalítico da cisteína no sítio ativo da enzima. Um destes inibidores foi fundamental para o avanço das pesquisas sobre as catepsinas de cisteína, o E-64 (L-trans-epoxisuccinil-leucylamido(4-guanidino)butan) (**figura 7**). Este composto alquila seletivamente o sítio ativo das catepsinas e também das calpaínas só que em menor extensão, permanecendo ligado a estes de forma covalente. Por essa seletividade, o E-64 passou a ser utilizado largamente como um indicador da atividade proteolítica das catepsinas de cisteína, sendo desta forma de imensa importância para o progresso na compreensão da função e propriedades dessas enzimas (HANADA et al., 1978). Como um caminho natural os próximos passos foram o desenvolvimento de derivados do epoxisuccinil mais seletivos como os compostos CA030 e CA074 (**figura 7**), os primeiros inibidores específicos da catepsina B (TOWATARI et al., 1991, Murata et al., 1991), que posteriormente levaram ao desenvolvimento de inibidores das catepsinas L e S (**figura 7**)(KATUNUMA et al., 1999).

Figura 7- E-64 inibidor das catepsinas e seus derivados inibidores seletivos.



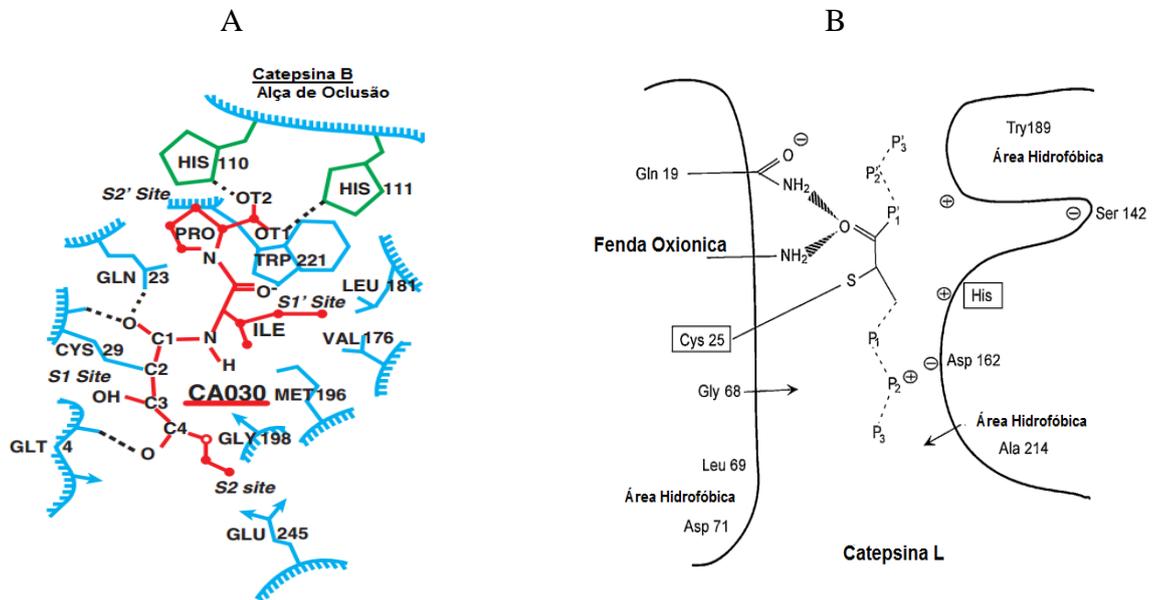
Fonte: Adaptado de KATUNUMA, 2011.

Os estudos de cristalografia das enzimas co-cristalizadas com seus inibidores nos falam muito sobre os mecanismos de interação e inibição dos mesmos, como pode ser visto na **figura 8** que apresenta o resultado dos estudos cristalográficos das catepsinas B e L com seus respectivos inibidores CA030 e CLIK-148.

O estudo com a catepsina B e seu inibidor apontou que o mesmo entra verticalmente na fenda catalítica que é superiormente delimitada por um laço de oclusão carregada positivamente devido à presença de dois resíduos de histidina que interagem fortemente com a prolina do inibidor. Esta é a característica que determina seletividade ao inibidor tendo em vista que a catepsina B é a única que possui esse característico laço de oclusão. O inibidor possui ainda uma isoleucina que irá interagir com a glicina-23, estas interações permitem a formação de uma fenda onde o epoxisuccinato pode sofrer facilmente o ataque do tiolato da cisteína-29 levando a inibição irreversível da enzima (TURK et al., 1995; MUSIL et al., 1991).

O mecanismo de ligação específica do CLIK-148 com a catepsina L é explicado pela interação hidrofóbica formada entre a parte terminal do substrato (inibidor) com o resíduo de triptófano-189 da enzima, e que mais uma vez deixa o epoxisuccinato livre para sofrer o ataque eletrofilico do tiolato da cisteína catalítica (TSUGE et al., 1996).

Figura 8 - Representação esquemática da ligação das catepsinas B (A) e L (B) com seus inibidores.



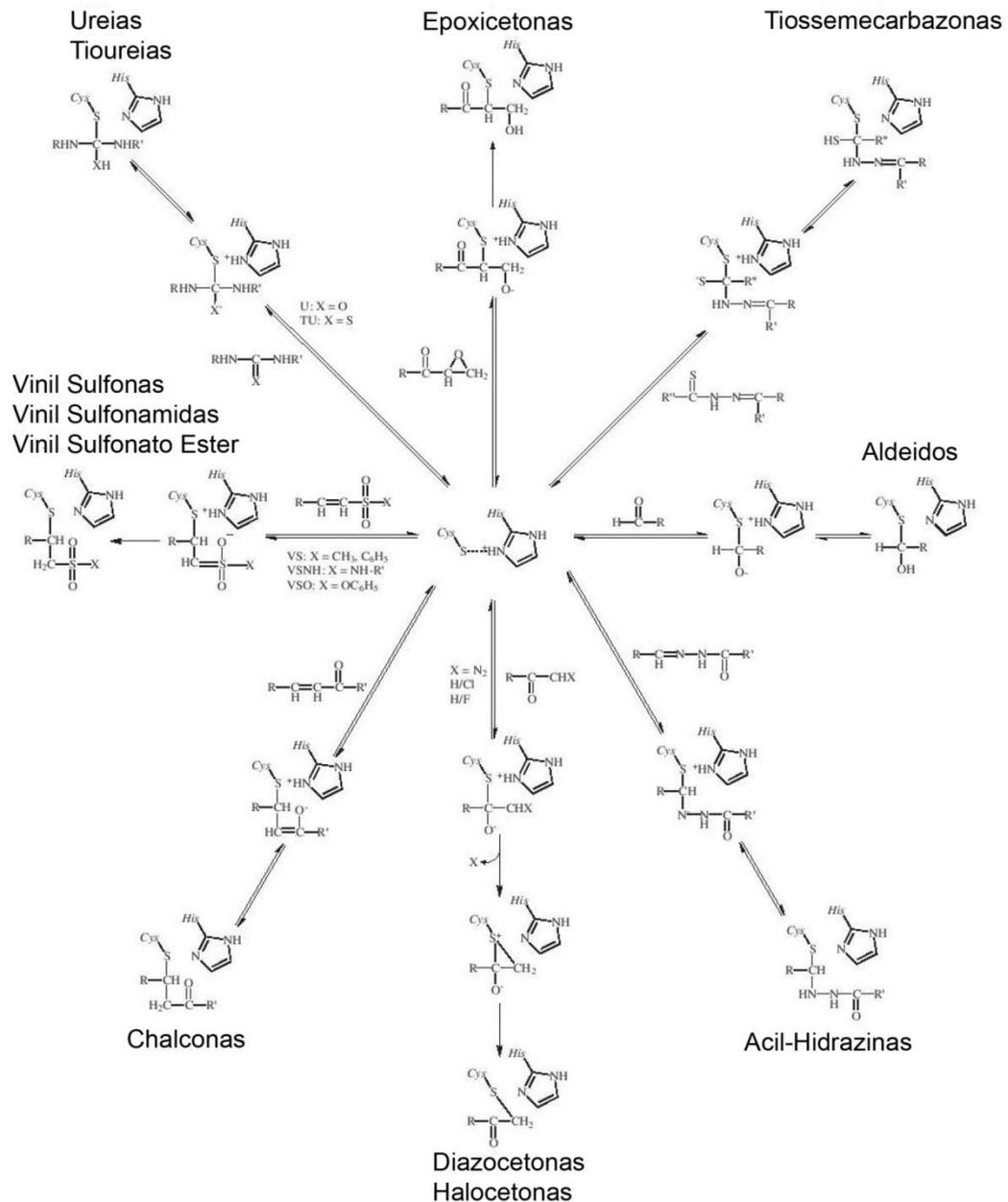
Fonte: Adaptado de KATUNUMA, 2011.

Há um certo número de outros grupos reativos, eletrofilicos, que são utilizados em análogos dipeptídicos do substrato para o desenvolvimento de inibidores de proteases de cisteína. Considerando que o segmento do péptido é responsável pelo reconhecimento do inibidor pelos subsites da enzima, o grupo eletrofilico reage com o resíduo de cisteína do sitio

ativo. Sendo estes grupos aldeídos, halometilcetonas, diazometil cetonas, epoxi cetonas, vinilsulfonas, ésteres de vinilsulfonato e vinilsulfonamidas, cujos mecanismos de inibição encontram-se na **figura 9**(STEVERDING; CAFFREY; SAJID, 2006).

Em paralelo com os desenvolvimentos dos citados acima, novos compostos inibidores não peptídicos foram identificados e sintetizados, Estes incluem uma vasta gama de hidrazidas de acilo, chalconas, uréias, tiouréias e tiossemicarbazonas. O mecanismo da reação destes compostos com o resíduo de cisteína do sítio catalítico é representado na **figura 9**(STEVERDING; CAFFREY; SAJID, 2006).

Figura 9 - Mecanismos de inativação de inibidores de proteases de cisteína



Fonte: Adaptado de STEVERDING; CAFFREY; SAJID, 2006.

Um conceito comum na concepção de fármacos é a descoberta de pequenas moléculas que se submetam predominantemente a interações não covalentes, tais como de Van der Waals e interações eletrostáticas com o alvo farmacológico (GOHLKE; KLEBE, 2002; WILLIAMS et al, 2004). Além das interações não covalentes, também é possível que uma ligação covalente seja formada entre o alvo e o ligante. Moléculas ligantes com grupos funcionais reativos são capazes de se ligar covalentemente à proteínas, DNA, ou glutaciona, o

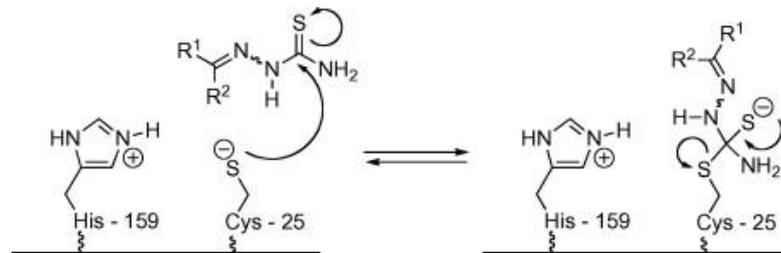
que pode levar a resultados toxicológicos desfavoráveis (KALGUTKAR et al., 2005; WILIAMS, 2006).

Os inibidores das proteases de cisteína que formam ligações covalentes irreversíveis são utilizados na pesquisa e identificação das mesmas. Embora tais inibidores sejam muito potentes, a fraca seletividade e o perfil toxicológico permanecem um problema. Além disso, é desejável o desenvolvimento de inibidores reversíveis para minimizar a toxicidade potencial que pode ser observado com inibidores irreversíveis. Uma alternativa mais viável seria os inibidores baseados em cetonas, aldeídos, uréia, tioureia e tiossemicarbazida. Estes compostos levam a um complexo transicional com a formação de um hemitioacetil com a cisteína do sítio catalítico da protease.

Além disso, as drogas que formam ligações covalentes reversíveis podem apresentar vantagens terapêuticas únicas, incluindo início rápido de inibição, maior potência, maior duração da ação da droga e atividade potente e persistente o que pode minimizar mutações (SMITH et al., 2009). Uma boa oportunidade para a concepção de inibidores covalente de ligação reversível pode estar nas doenças de origem bacteriana, viral e doenças parasitárias, porque os diferentes alvos proteicos têm diferentes taxas de rotatividade e o fármaco correspondente pode ser administrado apenas por um curto período de tempo, reduzindo assim qualquer toxicidade causada por interações fora do alvo (COPELAND, 2005).

Um trabalho, que utilizou a análise cinética de um inibidor não-peptídico da catepsina L derivado da tiossemicarbazida para investigar o seu mecanismo de ação, determinou que este atua como um inibidor, competitivo, dependente do tempo e reversível lento. Sendo a molécula alocada de tal maneira no sítio catalítico que a porção tiocarbonilo fica posicionada para sofrer o ataque pelo tiolato da enzima, formando um intermediário tetraédrico transitório como vemos na **figura 10**. Os estudos cinéticos suportam esse mecanismo proposto (CHAVARRIA et al, 2012).

Figura 10 - mecanismo proposto para a inibição da catepsina L por derivados da tiossemicarbazida.



Fonte: CHAVARRIA et al, 2012.

Outra estratégia que tem se tomado é a utilização de liberadores de óxido nítrico como inibidores destas proteases. Acredita-se que a inativação ocorra através da S-nitrosilação do resíduo catalítico de cisteína como foi sugerido por Bocedi et al., 2004. Muitos estudos já comprovaram esta atividade, contudo moléculas que se baseiem única e exclusivamente na liberação do NO não possuíam a eficácia e a segurança desejadas, visto que não são seletivas o que levará a maior toxicidade.

2.2 Leishmaniose

A leishmaniose caracteriza-se por ser um complexo de antropozoonoses, doenças infecciosas porém não contagiosas, que possuem características epidemiológicas e de evolução variadas com um importante espectro clínico, podendo comprometer pele, mucosas e vísceras, e que possuem em comum seu agente etiológico pertencente ao gênero *Leishmania* que vivem e se multiplicam no interior das células que fazem parte do sistema de defesa do indivíduo, principalmente macrófagos. (SARAVIA et al., 1989).

Essa doença é prevalente em regiões de pobreza, não representando apenas o resultado das condições precárias a que essa população é submetida, mas também um entrave ao desenvolvimento social e econômico deste povo. Podemos também enquadrá-las entre as doenças negligenciadas tendo em vista que se trata de doenças graves, potencialmente mortais e com terapia ineficiente, apresentando falhas no mercado e em políticas públicas o que não assegura o desenvolvimento de novas e mais eficazes e seguras terapias (MSF, 2001).

Essas doenças são endêmicas em 98 países e territórios em quatro continentes América, Europa, Ásia e África, estando presentes entre os trópicos e em localidades de clima

mediterrânico e até temperado. Segundo dados da WHO, em 2010 existiam cerca de 350 milhões de pessoas sob risco de infecção. Com incidência estimada de 2 milhões de novos casos por ano (0,5 milhões de leishmaniose visceral e 1.5 milhões de leishmaniose cutânea). Sendo a leishmaniose visceral responsável por um número estimado em mais de 50.000 mortes a cada ano.

2.2.1 *Agente etiológico*

Responsáveis por causarem as moléstias do complexo das leishmanioses, os protozoários do gênero *Leishmania* são indevidos unicelulares, digenéticos (possui um hospedeiro vertebrado e um invertebrado), flagelados e de reprodução assexuada por divisão binária simples em ambos os hospedeiros. Apresentando-se de duas formas evolutivas principais a amastigota e a promastigota (MCCONVILLE et al., 2002).

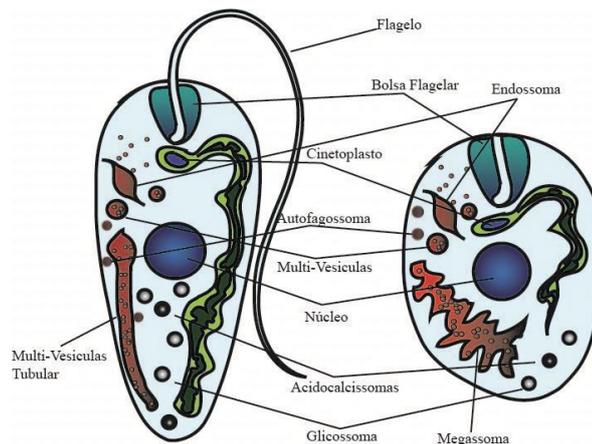
No citoplasma são encontrados (**figura 11**) núcleo, uma única mitocôndria, nove pares de microtúbulos concêntricos e um central, sendo chamada de cinetoplasto, onde fica armazenado o kDNA. Característica que dá nome a ordem Kinetoplastida, muito importante no que diz respeito a saúde pública por conter protozoários causadores de doenças como a tripanossomíase africana (*Trypanosoma brucei*) e americana (*Trypanosoma cruzi*). Os parasitas passam por uma série de estágios de desenvolvimento distintos durante seu ciclo de vida digenético, no inseto vetor e no hospedeiro mamífero. As formas características destes estágios de desenvolvimento são mantidas por uma matriz de microtúbulos subpeliculares que estão subjacentes à membrana plasmática. Um único flagelo emerge a partir de uma invaginação profunda na membrana plasmática, denominada de bolso flagelar (MCCONVILLE et al., 2002).

O mesmo é um compartimento semicircular que é acessível a uma gama de proteínas, incluindo os grandes complexos macromoleculares, mas não para os componentes celulares do sistema imune do hospedeiro mamífero. A membrana do bolso flagelar não é sobre-revestida pela matriz de microtúbulos subpeliculares e pensa-se ser o principal local de exocitose (MCCONVILLE et al., 2002).

Hoje já se sabe que o bolso flagelar é um lugar de trânsito para as proteases, as mesmas passam por essa região a caminho dos lisossomos sofrendo até ativação, desta forma

fica implícito que as catepsinas não se restringem ao ambiente interno dos lisossomos e que as mesmas são encontradas na superfície do parasita onde pode exercer várias atividades, como de fatores de virulência (BROOKS et al., 2000).

Figura 11- Representação esquemática das principais organelas intracelulares das principais formas da *Leishmania sp.*



Amastigotas são formas intracelulares encontradas em células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro vertebrado, principalmente macrófagos. Apresentam forma arredondada ou fusiforme, com cerca de 2 a 3 μm de diâmetro, contendo um único núcleo, cinetoplasto e uma bolsa flagelar com um rudimento de flagelo. Esta forma divide-se repetidamente e se espalha para outras células (ASHFORD, 2000; PEARSON; SOUSA, 1996).

Promastigotas vivem extracelularmente nas vísceras das fêmeas infectadas de dípteros da sub-família Phlebotominae. São mais longas, 15-26 μm de comprimento e 2-3 μm de largura, com núcleo central, cinetoplasto terminal e com um flagelo bem desenvolvido, que é usado tanto para a fixação ou propulsão, como nas promastigotas metacíclicas que apresentam grande mobilidade e são encontradas livres nas porções anteriores do trato digestivo do inseto, apresentando diferenciações bioquímicas das formas promastigotas, o que confere a estas condições para tornarem-se infectantes aos mamíferos (ASHFORD, 2000; PEARSON; SOUSA, 1996).

Existem, cerca de 30 espécies conhecidas de *Leishmania*, dentre todas estas espécies, especula-se que aproximadamente 21 infectam o homem, podendo ocasionar doenças. A classificação mais aceita nos dias atuais divide as espécies encontradas nos mamíferos em dois subgêneros, o *Leishmania*, constituído pelas espécies que são encontradas no intestino

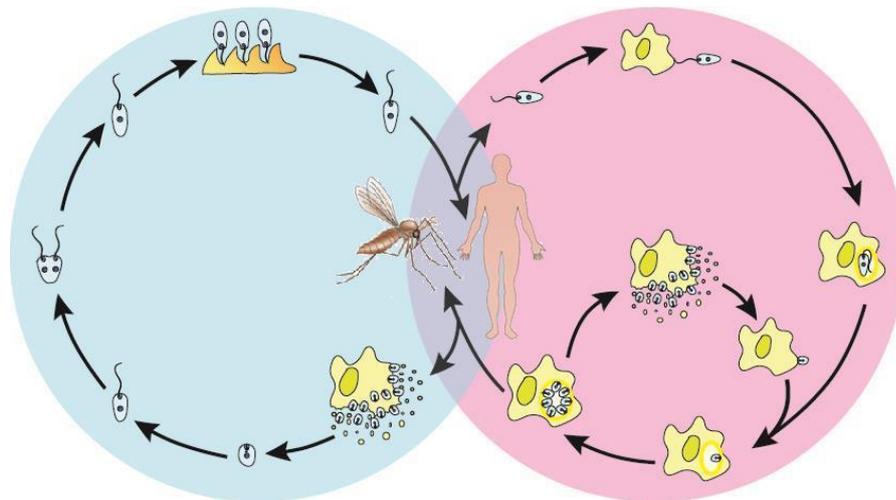
médio do vetor, e o *Viannia*, constituído pelas espécies que se desenvolvem na região posterior do intestino do inseto vetor (SHAW, 1994).

2.2.1.1 Ciclo biológico

As espécies de *Leishmania* possuem ciclo biológico completo (**figura 12**), envolvendo um hospedeiro invertebrado, dípteros dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, e um vertebrado onde encontramos uma ampla lista de mamíferos, entre eles o homem. Apenas as fêmeas são responsáveis pela transmissão do parasita, pois só elas alimentam-se de sangue já que necessitam para desenvolvimento dos ovos.

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea infectada regurgita formas promastigotas metacíclicas no local da picada. Promastigotas são interiorizadas por macrófagos teciduais através da endocitose, mediada por receptores de superfície. Depois de estabelecer uma residência intracelular, promastigotas metacíclicos transformam-se em amastigotas, forma evolutiva mais adaptada ao meio ácido, além de modular a atividade bioquímica do macrófago.

Figura 12- Ciclo biológico heteroxênico dos parasitas do gênero *Leishmania*.



São importantes no estabelecimento da infecção, tanto componentes salivares do inseto quanto lipofosfolípidos e a proteína gp63 presente na membrana do parasita, já que modulam a atividade imunológica do hospedeiro, promovendo proteção ao parasita.

Mantido o controle das condições ambientais no interior do vacúolo parasitóforo, inicia-se o processo de reprodução. Sem um controle da atividade parasitária pela célula hospedeira, ocorre a lise e as novas amastigotas são liberadas. Posteriormente são internalizadas por novos macrófagos (fagocitados) por mecanismo semelhante ao já apresentado (KAYE; SCOTT, 2011).

Durante o repasto sanguíneo em indivíduo ou animal infectado, macrófagos apresentando em seu interior formas amastigotas, acompanham o sangue e ou a linfa intersticial, levam a infecção do hospedeiro invertebrado. Na matriz peritrófica, no intestino médio do inseto, as amastigotas se transformam em formas promastigotas pequenas, ovóides e pouco móveis, em seguida há um período de multiplicação intensa, e posterior transformação em formas delgadas e longas. Por volta de três a cinco dias são encontradas formas flageladas (Promastigotas) migrantes na porção torácica do intestino médio. Neste estágio ocorre um movimento migratório acompanhado de uma sequência de transformações por parte do parasito, que levam as promastigotas a transformarem-se em promastigotas metacíclicas, a forma infecciosa para os mamíferos. Esta última acredita-se que ocorra devido a alterações do meio e a escassez de alimento (BATES; ROGERS, 2004).

2.2.2 *Fisiopatologia da leishmaniose*

As leishmanioses são um conjunto de enfermidades que podem vir a comprometer pele, mucosas e até vísceras, dependendo da espécie do parasito e da relação parasito-hospedeiro firmada, principalmente da resposta imune do hospedeiro. O que faz atentar para problemas tais como a desnutrição e imunossupressão, devido à co-infecção pelo HIV, condições comuns nos territórios onde essas doenças são endêmicas, levando a casos incomuns e a maior mortalidade. Este complexo pode ser dividido basicamente em duas doenças distintas, a Leishmaniose Visceral (**quadro 4**), que é a forma mais grave, em que os órgãos vitais do corpo são afetados, sendo considerada pela WHO (2010) como uma das doenças mais importantes da atualidade. De distribuição mundial, aproximadamente 90% dos casos ocorrem em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil. Na América Latina a doença já foi descrita em 12 países, sendo o Brasil responsável por 90% dos casos desta

região, e a Leishmaniose Tegumentar, a forma mais comum que se divide em Leishmaniose Cutânea (**quadro 1**), Cutânea Difusa (**quadro 2**) e Mucosa (**quadro 3**) (WHO, 2010).

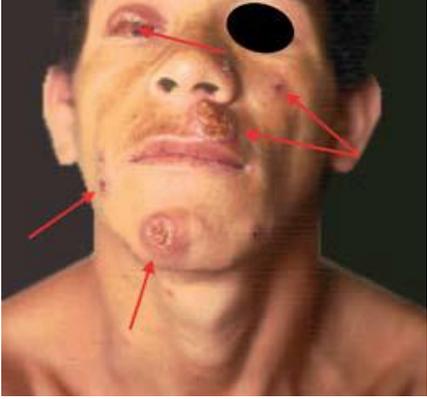
Tem-se evidenciado nas últimas décadas uma expansão das fronteiras epidemiológicas dessas doenças, a Leishmaniose Cutânea passou a ser endêmica em todo território nacional e os casos de Leishmaniose Visceral que restringiam-se as regiões norte e nordeste hoje já são encontrados até no sul do país. Esses aumentos são principalmente atribuídos as mudanças comportamentais e ambientais, incluindo o desenvolvimento de novos assentamentos, intrusão em floresta primária, o desmatamento, a migração massiva das zonas rurais para áreas urbanas, urbanização rápida e não planejada, e da construção de barragens e novos esquemas de irrigação (BRASIL, 2006;2007).

Quadro 1 - Características da Leishmaniose Cutânea

	Espécies	<i>L. (Viannia) braziliensis</i> , <i>L.(V.) guyanensis</i> <i>L. (Leishmania) amazonensis</i> e, as outras são a <i>L.(V.) lainsoni</i> , <i>L. (V.) naiffi</i> , <i>L. (V.) lindenberg</i> e <i>L. (V.) shawi</i>
	Condição imunológica	normal
	Patologia	Aparenta inicialmente uma picada de inseto persistente, que aumenta, mantendo-se vermelha. A imigração de leucócitos isola a área infectada levando a necrose dos tecidos infectados, e a formação de um granuloma de cura.

Fonte: BRASIL, 2006;2007.

Quadro 2 - Características da Leishmaniose Cutânea Difusa

	Espécies	<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>
	Condição imunológica	hiporreatividade
	Patologia	Causada normalmente por parasitas responsáveis pela leishmaniose cutânea, associada a uma falta de resposta imunológica. As lesões são máculas ou manchas de pele fina que, embora não doloridas, são desfigurastes.

Fonte: BRASIL, 2006;2007.

Quadro 3 - Características da Leishmaniose Mucosa

	Espécies	<i>L. (V.) braziliensis</i>
	Condição imunológica	hiperreatividade
	Patologia	Surge após a aparente cura da lesão inicial, às vezes, muitos anos depois, as lesões metastáticas aparecem na mucosa bucal ou nasal. A mucosa e cartilagem associada são gradualmente erodidas, podendo levar a destruição de boa parte do rosto.

Fonte: BRASIL, 2006;2007.

Quadro 4 - Características da Leishmaniose Visceral

Leishmaniose Visceral		
	Espécies	<i>L. (L.) chagasi</i>
	Patologia	Por vezes não apresenta sinal no local da picada. Os sintomas sistêmicos como febre intermitente de grau médio, anemia, esplenomegalia, hepatomegalia e caquexia são progressivos e desenvolvem-se a taxas variáveis, entre as semanas e anos após a infecção. O resultado da leishmaniose visceral totalmente desenvolvida é a morte.

Fonte: BRASIL, 2006;2007.

2.2.3 Tratamento

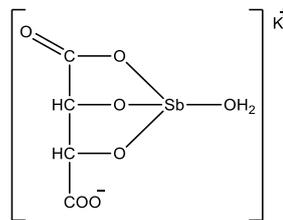
Desde os anos 1940 os compostos antimoniais, sob a forma de sais pentavalentes (Sb^{+5}), são as drogas de escolha para o tratamento das leishmanioses em todo o mundo. Sua introdução na terapêutica ocorreu a partir da descoberta de Gaspar de Oliveira Vianna em 1912 de que o tártaro emético, que apresenta o antimônio na sua forma trivalente, era eficaz no tratamento da leishmaniose tegumentar americana. Já a introdução dos antimoniais trivalentes no tratamento da LV se deu um pouco mais tarde em 1915, na Itália e na Índia (DAVIDSON, 1998; BRASIL, 2011).

Como alternativa ao tratamento em caso de resistência, situação esta que vem se tornando cada vez mais frequente, existe uma série de outras drogas, todavia nenhuma preenche os requisitos para se tornar uma droga de primeira escolha, maior segurança e eficácia aliado a o baixo custo do tratamento. A anfotericina B e a pentamidina têm sido as drogas alternativas utilizadas no Brasil, mas não possuem um índice terapêutico favorável, além de apresentar importantes reações adversas (BRASIL, 2007).

2.2.3.1 Antimoniais

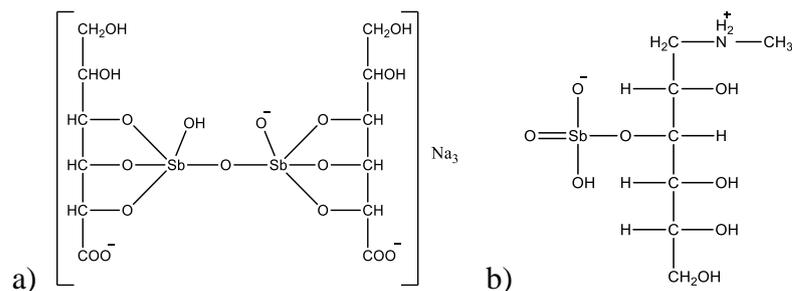
Em razão da alta toxicidade e dos graves efeitos colaterais produzido pelos complexos de antimônio trivalente (SbIII) e associados ao tártaro emético (**figura 13**), foram rapidamente substituídos por complexos de antimônio pentavalente (SbV) menos tóxicos.

Figura 13- antimoniais trivalentes, tártaro emético



Hoje são comercializados o Antimoniato de N-metilglucamina (NMG) (Glucantime), na América Latina, África, França e em países francófonos, e o estibogluconato de sódio (SGS) (Pentostam), nos EUA, Europa e países de colonização inglesa (PATRÍCIA, 2000). No Brasil, o NMG é distribuído gratuitamente na rede única de saúde (**figura 14**) (BRASIL, 2007).

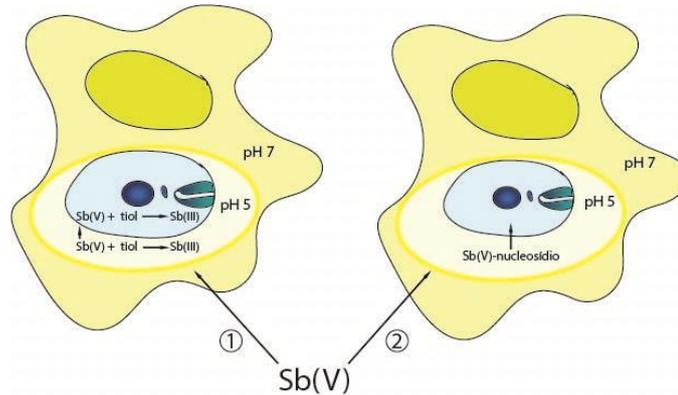
Figura 14- antimoniais pentavalentes.



a) estibogluconato de sódio (Pentostam), b) Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime).

A exata estrutura e composição dos compostos NMG e SGS até hoje são incertas, assim como a eficácia terapêutica do antimônio pentavalente ainda não foi esclarecida (KOFF; ROSEN, 1994). Indícios sugerem que ocorra uma conversão metabólica intramacrofágica do Sb^{+5} em Sb^{+3} sendo, neste caso, o Sb^{+3} o elemento tóxico às leishmanias, funcionando assim o Sb^{+5} comportando-se como um pró-fármaco de atuação leishmanicida. (**figura 15**) (SERENO; LEMESRE, 1997).

Figura 15 - Dois modelos possíveis para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes.

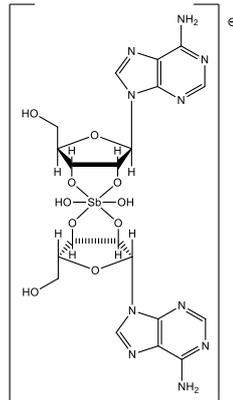


Modelo (1) envolve a redução de SbV a SbIII pelos tióis; modelo (2) envolve a formação de complexo SbV-ribonucleosídeo.

Sua atividade provavelmente decorre da depleção dos níveis de adenosina (ATP) e guanosina trifosfatos (GTP), gerada através da inibição do maquinário energético do ciclo do ácido cítrico e da glicólise (KOFF; ROSEN, 1994). Parece que o Sb é capaz de alterar o potencial redox da célula (OUELLETTE et al., 2004). Sabe-se que, tanto o Sb^{+5} e Sb^{+3} mediam a fragmentação do DNA nas leishmanias, sugerindo que os antimoniais ajam promovendo a apoptose (SUDHANDIRAN; SHAHA, 2003). Tudo leva a crer que os antimoniais podem destruir o parasito por mecanismos diretos e indiretos, com ajuda da resposta imune do hospedeiro.

Tem sido sugerido que nos meios biológicos Sb^{+3} interagiria com os grupos sulfidrilas de certas proteínas, resultando na perda de sua função. Por outro lado, foi também demonstrado que Sb^{+5} forma complexos com ribonucleosídeos (**figura 16**), e que essa interação poderia ter implicações no mecanismo de ação dos antimoniais (DEMICHELI;FRÉZARD, 2005).

Figura 16 - Complexo de Sb(V) com o ribonucleosídeo adenosina.



O principal efeito adverso do antimoniato N-metil-glucamina é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular. Esse efeito tem dose e tempo dependentes e se traduz por distúrbios de repolarização. Outros efeitos indesejados incluem mialgias, artralgias, adinamia, anorexia, cefaléia, supressão da medula óssea, pancreatite e aumento da diurese por perda transitória da capacidade de concentração urinária. Todas as reações adversas graves ou potencialmente graves como Arritmias, insuficiência renal, icterícia e pancreatite aguda devem ser notificadas às secretarias municipais e estaduais de saúde, bem como à SVS e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2007).

A avaliação do ECG durante o tratamento é indispensável, independente da presença de fatores de risco cardíaco. É contra indicado no tratamento de gestantes, havendo restrições do uso em pacientes com idade acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas (BRASIL, 2007).

A atual preocupação é com o aparecimento de casos de resistência aos antimoniais, embora não exista registro de caso na América do Sul, em algumas regiões da Índia o percentual varia de 30 a 60% para a LV. Para o mecanismo de resistência especula-se que possa haver uma redução na conversão (redução) do Sb^{+5} em Sb^{+3} (SERENO et al., 1998). Diminuição na entrada e ou incremento no efluxo do Sb, com conseqüente redução no meio intracelular (DEY et al., 1996). Uma bomba para efluxo de metais está presente na membrana plasmática das leishmânias, que reconhece o Sb conjugado com tiol como glutationa e tripanotiona (CHEN et al., 1997).

2.2.4 *Catepsinas em Leishmania sp.*

O tratamento contra agentes microbiológicos sempre se mostrou difícil, até mesmo contra bactérias que apresentam grandes diferenças com relação às células animais, um exemplo disso é o grande número de mortes por infecção bacteriana e o surgimento de formas resistentes. O que dizer então sobre o tratamento contra agentes microbianos patológicos que apresentam uma maior similaridade com a célula do hospedeiro.

Neste contexto encontramos as leishmanioses, doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que ao contrário das bactérias (procariotos) são eucariotos, guardando assim maior relação bioquímica com o hospedeiro, isto torna a terapia limitada devido às dificuldades impostas para o desenvolvimento de medicamentos com segurança, largo espectro de atividade e eficácia adequadas.

O desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que mais se aproximem das características ideais só torna-se possível com os avanços da bioquímica e biologia molecular que tem levado a uma melhor compreensão das vias importantes e essenciais nestes microrganismos, incluindo a nutrição, crescimento, proliferação, sinalização, diferenciação e morte, e suas peculiaridades em relação ao hospedeiro. Contribuindo com novos alvos para o desenvolvimento de terapias inovadoras (BARRETT et al., 1999).

Ao longo da vida do parasito ele se apresenta em diferentes formas, sendo cada uma o resultado das adaptações necessárias para a sobrevivência ao meio em que o mesmo está a residir. Estas formas são distinguíveis pelas necessidades nutricionais, seu crescimento e capacidade de divisão, expressão diferencial de moléculas e também pela sua morfologia (BARAK et al., 2005).

Muito se fala e já foi estudado sobre o papel das proteases do parasita nesses processos de adaptação que incluem a modulação do sistema imune do hospedeiro, a invasão e destruição de tecidos e de aquisição de nutrientes. Esse envolvimento das enzimas proteolíticas no estabelecimento da relação hospedeiro-parasita sugere que as mesmas possam ser utilizadas como possíveis alvos para a concepção de potentes agentes quimioterápicos.

O genoma de três espécies do parasita (*L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis*) foi sequenciado e estão depositados no banco de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>), estudos estes que objetivavam a identificação de proteases através de sua homologia com proteases já conhecidas detectaram cerca de 150 proteases o que corresponde

aproximadamente a 1,8% de seu genoma, além de demonstrar que elas estão em grande parte conservadas entre as espécies (BESTEIRO et al., 2007).

Dentre os grupos identificados, um dos que apresentou maior número de proteases e mais extensivamente estudado foi o das cisteíno-proteases, por elas desempenharem numerosos papéis indispensáveis ao parasita, no estudo de Courret et al., 2001, foi observada a importância destas proteases para a diferenciação de promastigotas em amastigotas e o estabelecimento da relação hospedeiro-parasita já no de Lima et al., de 2009, comprovou-se que em cepas avirulentas existe uma menor expressão de proteases comparadas as estirpes virulentas.

Grande atenção tem sido dada as catepsinas L e B pertencentes ao Clan CA e família C1 das Papaína-like, as catepsinas L são expressas a partir dos genes CPA e CPB este último leva a produção de diferentes isoenzimas que apresentam especificidades por substratos diferentes e são expressas diferencialmente de acordo com a fase do ciclo de vida do parasita o que sugere que elas tenham papéis distintos na interação do parasita com seu hospedeiro, a catepsina B é produzida a partir de um gene de cópia única o CPC (MOTTRAM et al., 1997).

Diversos estudos têm apontado para a ligação destas com a virulência do parasita bem como a modulação da resposta imunológica, como nos estudos de Mottram et al., 1996, Alexander et al., 1998, Frame et al., 2000 e Denise et al., 2003 com mutantes deficientes dos genes que codificam as proteases, observou-se uma diminuição da virulência, sobrevivência e multiplicação, redução na produção de lesões e alterações na diferenciação do parasito, bem como o estabelecimento de uma resposta imunológica Th1 diferente da Th2 condicionada pelo parasito durante a infecção. Contudo estes estudos apontam para a necessidade da criação de inibidores de amplo espectro já que são sintetizados vários tipos de catepsinas e a inativação de um único tipo não causa o resultado esperado.

2.3 Câncer

O câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade mundial que o torna um importante problema de saúde pública. Devido ao câncer, a cada ano no mundo, cerca de 12 milhões de pessoas são diagnosticadas, e 7 milhões de pacientes morrem, sendo que 25 milhões de pessoas vivem atualmente com um diagnóstico de câncer.

Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, sendo a principal causa de morte nestes, mais de 60% das mortes por câncer ocorrem nos países com média a baixa renda, onde o câncer já representa a segunda causa de morte mais frequente. Nesses territórios os recursos para a prevenção, diagnóstico e tratamento são limitadas ou inexistentes o que explica a maior incidência de morte. Como os idosos são mais suscetíveis ao câncer e o envelhecimento da população avança em muitos países, o câncer continuará a ser um importante problema de saúde em todo o mundo. Os pesquisadores preveem que, até 2030, o número anual de novos diagnósticos de câncer será de 21 milhões em todo o mundo, com 17 milhões de mortes cada ano e 75 milhões de pessoas convivendo com o diagnóstico de câncer (POPAT; MCQUEEN; FEELEY, 2013).

2.3.1 Fisiopatologia do câncer

Em condições de normalidade, ou seja, nos tecidos saudáveis, existe um equilíbrio entre a divisão celular que originam novas células e a apoptose responsável pela morte celular programada de outras, para que o tecido não se prolifere desenfreadamente e assim acarrete danos ao organismo. Contudo, este equilíbrio muitas vezes é quebrado levando ao desenvolvimento de tumores malignos, sendo este caracterizado por cinco processos: proliferação, apoptose, angiogênese, invasão e migração de células (EICHHORST; KRAMMER, 2001; HENGARTNER, 2000).

As células malignas perdem a capacidade de responder aos estímulos do seu microambiente, passando a se proliferar até na ausência dos mesmos e seus mecanismos de autodestruição tornam-se ineficazes. A célula passa por um processo de desprogramação, agora não é mais que um “estranho no ninho” não desempenha mais suas funções básicas e passa a ser um agente nocivo a vida (EVAN; VOUSDEN, 2001).

Uma consequência desse crescimento desenfreado da massa celular dos tumores é a crescente necessidade de nutrição que o torna dependente de novos vasos, a angiogênese, que será responsável pelo fornecimento constante de oxigênio e nutrientes e remoção de resíduos. Com a perda das características morfofuncionais da célula no tecido também se perdem as adesões célula-célula e célula-matriz, características que entre outras como a degradação de componentes da matriz extracelular (MEC) estão envolvidas nos processos de invasão e migração (CAIRNS, KHOKHA, HILL, 2003).

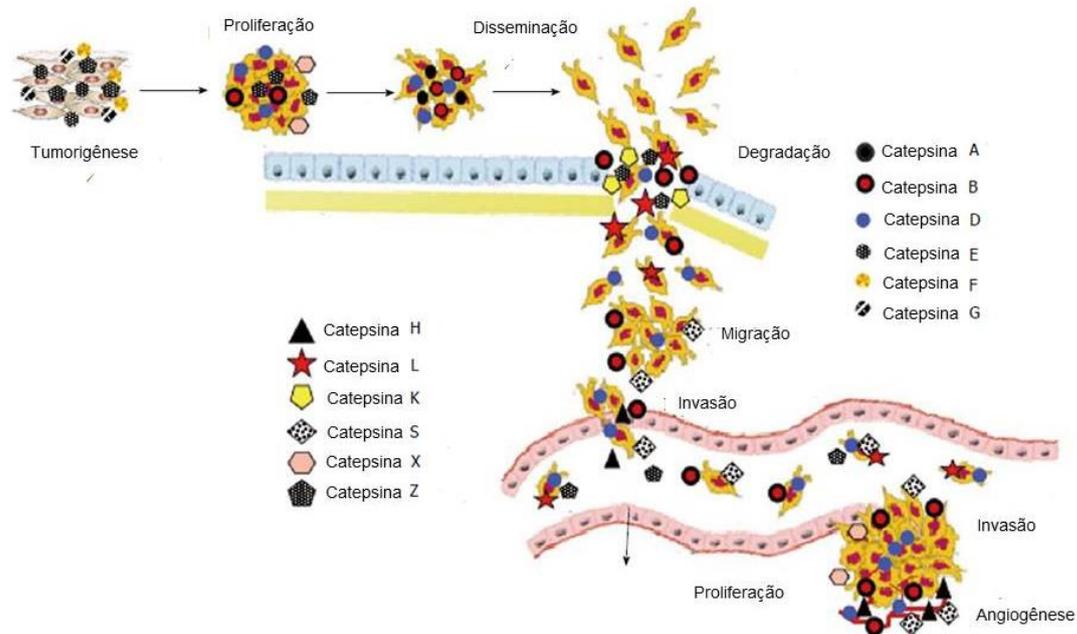
Quando há a redução e perda da expressão de moléculas de aderência entre as células e também das mesmas com matriz extracelular (MEC) os laços entre as células e seu microambiente se desfazem e as mesmas tornam-se invasivas e migrantes. As células malignas mostram aumento da atividade proteolítica, que as ajuda a digerir a MEC. Esta digestão é necessária para que as células do câncer possam invadir e migrar através da lâmina basal, que é a marca de malignidade (GOICHEVA et al., 2006). Invasão e migração de células cancerosas podem levar ao desenvolvimento de metástases em locais distantes (FIDLER, 1990), sendo a principal causa de morte em pacientes com câncer. Com isso, a redução da progressão metastática é o maior desafio para o desenvolvimento de terapias anticâncer eficazes.

2.3.2 Proteases na progressão do câncer

Devido à necessidade de degradação da membrana basal e a MEC circundante, na progressão da doença e na cascata metastática, tem se dado bastante atenção aos processos proteolíticos no câncer. Até recentemente, a maior parte da atenção estava sendo dada as metaloproteinasas da matriz (MMPs) constantemente implicadas na progressão do tumor, incluindo a invasão e metástase (EGEBLAD; WERB, 2002). Como também a uma serina-protease uroquinase ativador do plasminogênio que leva em última instância a degradação do MEC (LAUFS; SCHUMACHER; ALLGAYER, 2006).

Recentemente passou-se a dar uma maior atenção as catepsinas de cisteína, depois que se observou que as mesmas eram frequentemente reguladas positivamente em vários cânceres, tanto de origem epitelial quanto mesenquimal, incluindo o de mama, do cérebro, do pulmão, gastrointestinal, de cólon, reto e melanoma entre outros, e sido implicadas em vários processos tumorais (**figura 17**), como proliferação, disseminação, degradação da MEC, invasão e angiogênese. Além disso, o aumento da expressão de certas catepsinas tem recebido valor de diagnóstico e mau prognóstico em vários tipos de câncer (BERDOWSKA, 2004; JEDESZKO; SLOANE, 2004).

Figura 17 - Papel das catepsinas nos processos tumorais.



Fonte: Adaptado de Tan, 2013.

Vários estudos têm demonstrado a importância das catepsinas na invasão tumoral utilizando ensaios *in vitro*. A maior parte dos relatórios situam-se sobre as catepsinas B e L uma vez que estes são também os dois tipos mais comumente regulados positivamente nos cânceres.

A regulação negativa da expressão de catepsina B utilizando siRNA em várias linhas de células cancerosas diferentes tem revelado uma diminuição da motilidade e invasão, como avaliado por ensaios em Matrigel (KRUEGER et al., 1999; SZPADERSKA; FRANKFATER, 2001). De modo semelhante, obteve-se a inibição da atividade da catepsina utilizando inibidores de amplo espectro ou específicos para a catepsina B que também levou a diminuição da invasão *in vitro* (PREMZL et al., 2003; NAVAB; MORT; BRODT, 1997).

Inversamente, a sobre-expressão da catepsina B, em uma linha de células de melanoma fracamente metastático obteve um incremento de pelo menos três vezes em sua invasibilidade (SZPADERSKA; FRANKFATER, 2001). Estudos análogos têm sido realizados para a catepsina L e produzido resultados semelhantes (LEVICAR et al., 2003; ROUSSELET et al., 2004). Confirmando coletivamente a correlação clínica entre a expressão elevada de certas catepsinas e o avanço da neoplasia em vários tipos de câncer.

Os últimos esforços têm sido empregados nos estudos *in vivo*, utilizando modelos de câncer em ratos, objetivando fornecer evidências que revelem os mecanismos e relações que levam as catepsinas a promoverem a progressão do câncer e invasão. Catepsinas B, C, H, L,

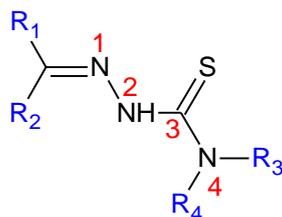
S e X mostraram-se reguladas positivamente no modelo de câncer de células da ilhota pancreática de rato.

Além disso, com a utilização de sondas químicas que detectam a forma ativa das proteases, permitindo imagens bioquímicas *in vivo*, determinou-se que houve um aumento da atividade das catepsinas, particularmente nas margens do tumor. O tratamento de ratos com um inibidor da catepsina de largo espectro para combater farmacologicamente a função das catepsinas em diferentes fases de Tumorigênese, bem como o crescimento de tumores, a vascularização, e capacidade de invasão, conduzindo a uma carga tumoral significativamente reduzida (JOYCE et al., 2004). Da mesma forma, em um modelo de adenocarcinoma de pulmão de rato, observou-se a sobre expressão das catepsinas B, H e L, enquanto que a expressão em tecidos normais foi inferior ao nível de detecção (GRIMM et al., 2005).

Em um trabalho utilizando ratos RIP1-Tag2 (RT2) nulo para cada um das quatro catepsinas (B,C,L,S), buscou-se determinar o papel de cada protease no câncer de células de ilhota pancreática. Observou-se que os ratos nulos para as catepsinas B, L ou S tinha uma carga de tumor significativamente reduzida. Descobriu-se que a exclusão de catepsina B ou S reduzia angiogênese do tumor, enquanto que com o nocaute das catepsinas B ou L havia diminuição da proliferação de células tumorais. Criticamente, a eliminação de qualquer uma das três catepsinas resultava numa diminuição da invasão tumoral com uma mudança no sentido de lesões menos malignas (GOCHEVA et al., 2006).

A contribuição das catepsinas para a evolução tumoral (**figura 18**) é bem documentada, embora os mecanismos precisos ainda estejam sob investigação. Em células normais, catepsinas estão tipicamente localizadas nos lisossomas, enquanto que durante o desenvolvimento do câncer, são muitas vezes translocadas para a superfície celular ou segregadas (ROSHY; SLOANE; MOIN, 2003; FROSCHE et al., 1999). Na superfície da célula, as catepsinas podem ativar outras proteases, afetando assim a invasão indiretamente através da participação em cascatas proteolíticas (**figura 18, A**). Tem sido atribuída a catepsina B a capacidade de ativar diretamente a MMP-1 e MMP-3, (EECKHOUT; VAES, 1977). Catepsina B e L podem também ativar a uroquinase ativador do plasminogênio (GUO et al., 2002; GORETZKI et al., 1992). Além da sua participação em cascatas proteolíticas, as catepsinas também podem clivar diretamente componentes da membrana basal e matrix extracelular (**figura 18, B**). Recentemente identificou-se que as catepsina B, L e S possuem a capacidade de degradação das E-caderinas (**figura 18, C**), que são os principais componentes das conexões aderentes e medeia a adesão célula-célula em células epiteliais, demonstrando

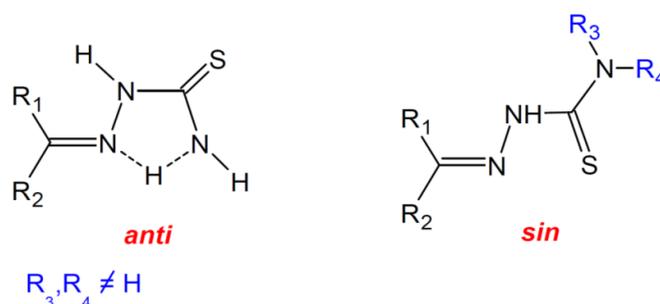
Figura 19 - Estrutura química das tiossemicarbazonas



$R_1, R_2, R_3, R_4 = H, \text{ Alquil ou Aril}$

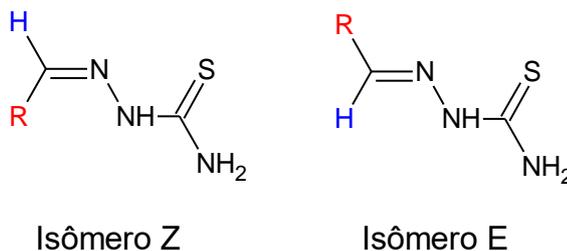
As tiossemicarbazonas são compostos amplamente explorados na síntese orgânica. Apresentam-se como sistemas com extrema deslocalização eletrônica, principalmente quando há grupos aromáticos ligados ao carbono da imina; aproximadamente planar, com o átomo de enxofre em posição *anti* em relação ao átomo de nitrogênio da função imina (**Figura 20**). Fatores eletrônicos e estéricos contribuem para este arranjo estrutural, porém, possivelmente o fator mais importante é que o átomo de enxofre em posição *anti* possibilita a ocorrência de ligação de hidrogênio intramolecular entre o nitrogênio da imina e os hidrogênios da tioamida, isso para as tiossemicarbazonas não substituídas em N-4. Levando em consideração as substituídas, a conformação *sin* é a preferida pela molécula (TENÓRIO et al., 2005).

Figura 20 - Representação das conformações das tiossemicarbazonas.



Devido à presença da ligação dupla na tiossemicarbazonas, podem ser encontrados diastereoisômeros conformacionais (*Z* e *E*) (**figura 21**). Mesmo a configuração *E* sendo teoricamente a mais favorável, estudos têm evidenciado a mudança de configuração de aril-tiossemicarbazonas quando complexadas com metais de transição, tornando difícil a determinação configuracional absoluta.

Figura 21 - Representação dos estereoisômeros *E* e *Z* das Tiossemicarbazonas.

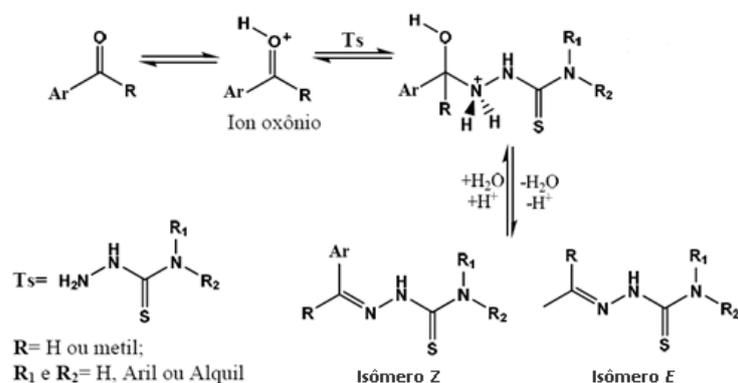


Um complicador para a correta elucidação configuracional destes compostos é a difícil atribuição da configuração por técnicas de RMN, talvez por causa da flexibilidade da ligação imínica e os efeitos paramagnéticos do nitrogênio, ou até mesmo devido ao efeito ‘guarda-chuva’ que pode ocorrer com os pares de elétrons livres do nitrogênio (KARABATSOS et al., 1964).

2.4.2 Síntese de tiossemicarbazonas

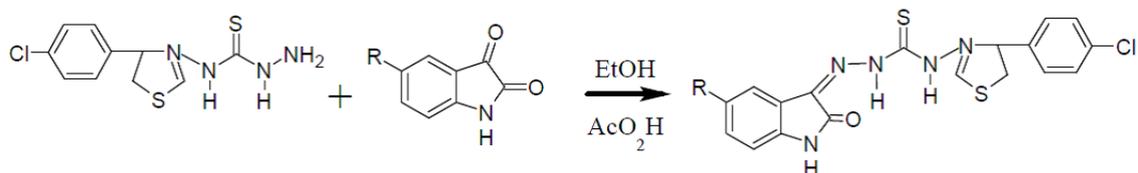
Uma das formas mais simples de obtenção das tiossemicarbazonas se dá pela reação de condensação equimolar de um derivado carbonilado (aldeído ou cetona), com tiossemicarbazidas em meio alcoólico sob refluxo, e com quantidades catalíticas de ácido (**Esquema 1**). Esta reação é muito utilizada pelo fato de possuir alta quimiosseletividade e rapidez apresentando geralmente altos rendimentos (CASTIÑEIRAS et al., 1999). As tiossemicarbazonas são geralmente obtidas como misturas de isômeros *E* e *Z*, no estado sólido, havendo, em solução, isomerização da configuração *Z* para *E*, devido a uma maior estabilidade termodinâmica. Quanto à nomenclatura, recebem o nome da classe tiossemicarbazona após o nome do respectivo aldeído ou cetona (HANG; BERTOZZI, 2001).

Esquema 1 - Rota de obtenção de tiossemicarbazonas a partir de tiossemicarbazidas



Em 1999, Pandeya e colaboradores mostraram a síntese de tiossemicarbazonas através da reação equimolar de isatina (indol 2,3 diona) com N-[4-(4'-clorofenil) tiazol-2-il] tiossemicarbazida (**Esquema 2**). Ambos foram dissolvidos em etanol morno contendo 1mL de ácido acético glacial. A mistura ficou sob refluxo por 15 horas e o sólido resultante foi recristalizado uma mistura de etanol e clorofórmio, alcançando rendimento excelente de 94,6% (PANDEYA et al., 1999).

Esquema 2 - Reação global da isatina com N-[4-(4'-clorofenil) tiazol-2-il] tiossemicarbazida, produzindo tiossemicarbazona.



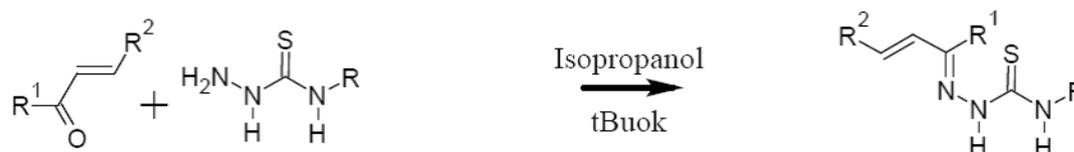
Em 2000, Tarasconi e seu grupo realizaram a síntese de tiossemicarbazonas através de uma reação de condensação de aldeídos naturais com a tiossemicarbazida, ambas em solução alcoólica a 95% (10mL), sob irradiação ultrassônica (40°) durante 1 hora. Este método visava aumentar a solubilidade dos reagentes e conseqüentemente o rendimento, chegando em alguns casos a 95% (**Esquema 3**) (TARASCONI et al., 2000).

Esquema 3 - Rota sintética de tiossemicarbazonas a partir de aldeídos naturais ((3R)- (+) citronelal).



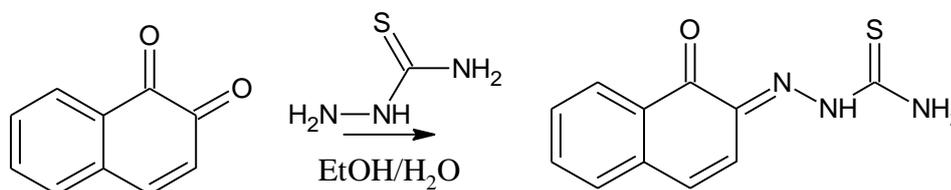
No ano de 2001, Klimova e seu grupo de pesquisa demonstraram a síntese de uma série de acetilferroceno-tiossemicarbazonas através da mistura de ferrocenilchalconas (Fc-chalconas) com tiossemicarbazida. A reação se processa com excesso de ^tBuOK em isopropanol anidro(150mL) sob agitação e refluxo, durante cerca de 3-5 horas (**Esquema 4**) (KLIMOVA et al., 2001).

Esquema 4 - Rota sintética de novas tiossemicarbazonas a partir de ferrocenilchalconas.



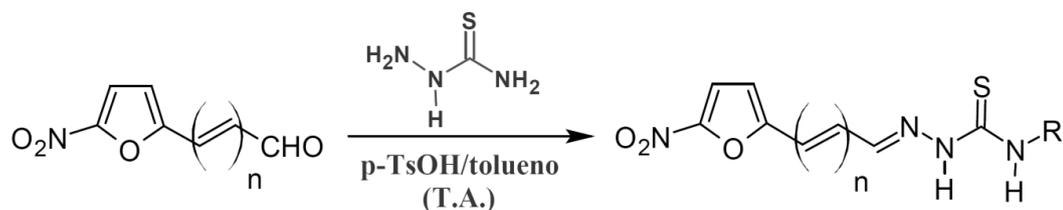
Em 2004, Chen e colaboradores realizaram a síntese do composto 1,2-naftoquinona tiossemicarbazona (**Esquema 5**) fazendo-se reagir uma solução de tiossemicarbazida, em água quente, com uma suspensão etanólica a quente de 1,2 naftoquinona, mantida em refluxo em banho de água (CHEN et al., 2004).

Esquema 5 - Rota de síntese do composto 1,2-naftoquinona tiossemicarbazona.



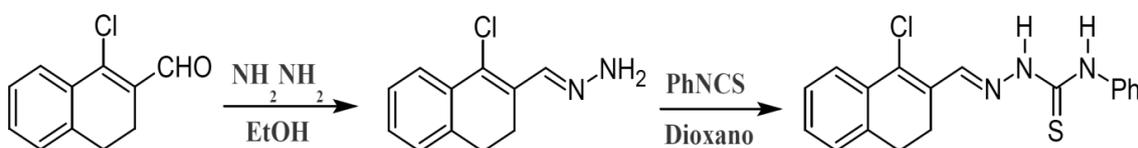
Aguirre et al., 2004 sintetizou tiossemicarbazonas oriundas de derivados do 5-nitrofuril (**Esquema 6**). O 5-nitrofurfural ou 3-(5-nitrofurfural) acroleína foram postas para reagir com derivados da tiossemicarbazida. A reação se procedeu a temperatura ambiente em tolueno seco, com alíquotas catalíticas de ácido p-tolueno sulfônico (p-TsOH) (AGUIRRE et al., 2004).

Esquema 6 - Rota de síntese do derivado tiossemicarbazônico da 3-(5-nitrofurfuril) acroleína.



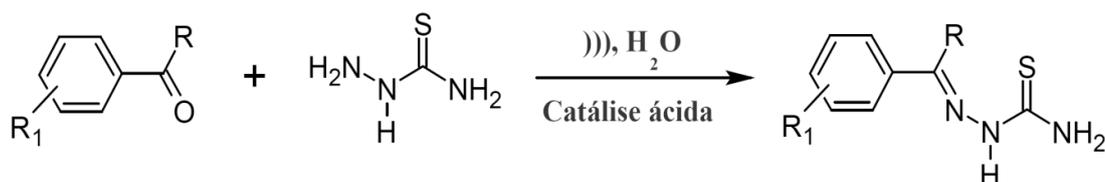
Em 2007, Bondock demonstrou a síntese de tiossemicarbazonas em duas etapas (**Esquema 7**), sem a utilização da tiossemicarbazida. Na primeira etapa, fez-se reagir 1-cloro-3,4-dihidronaftaleno-2-carboxaldeído com hidrato de hidrazina, originando o composto 1-((4-cloro-1,2-dihidronaftaleno-3-il)metileno) hidrazina, uma base de Schiff. Em seguida, essa base de Schiff foi posta para reagir com uma solução de fenil- isotiocianato em dioxano fervente, chegando enfim a respectiva tiossemicarbazona. A mistura ficou sob refluxo e agitação por 1 hora, obtendo rendimento de 77% (BONDOCK et al., 2007).

Esquema 7 - Rota de síntese de tiossemicarbazonas a partir de hidrazinas.



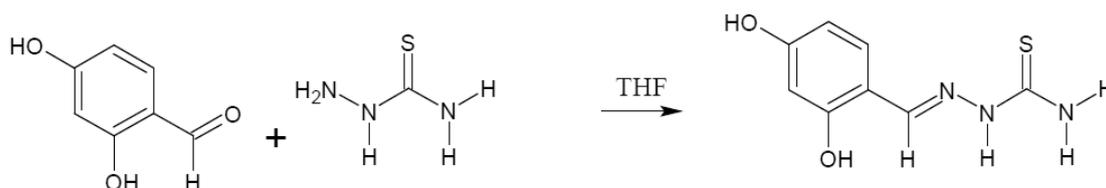
Leite et al., em 2008, demonstraram uma nova metodologia prática e rápida para a síntese de aril-tiossemicarbazonas a partir da reação entre aril-aldeídos/cetonas e a tiossemicarbazida. Estes reagentes, como exibido no **esquema 8**, foram misturados na proporção molar de 1:1 em meio aquoso sob condições ácidas e submetidos à irradiação por ultrassom em temperatura ambiente durante 20 a 30 min. Os produtos foram filtrados e lavados com solvente adequado, de modo que os rendimentos apresentados por essa nova metodologia foram excelentes e variaram de 80 a 95% (LEITE et al., 2008).

Esquema 8 - Síntese de aril-tiossemicarbazonas utilizando irradiação por ultrassom.

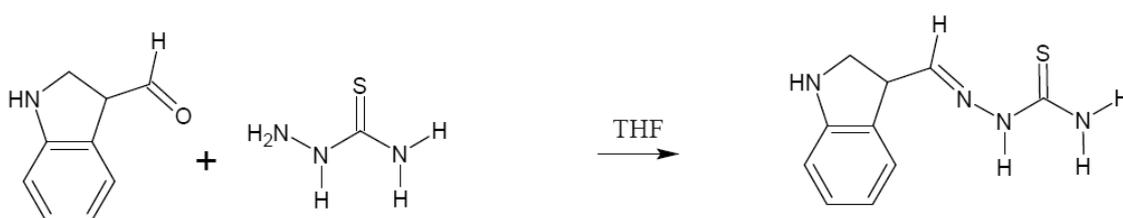


No ano seguinte, 2009, Yildiz e grupo demonstraram a síntese de duas tiossemicarbazonas, a (E)-2-(2,4-dihidroxi-benzilideno) tiossemicarbazona (**Esquema 9**) e (E)-2-[(1H-indol-3-il) metileno] TSC (**Esquema 10**), utilizando uma metodologia simples e diferente. Nesse método, a tiossemicarbazida foi adicionada a uma solução em THF (100mL) do respectivo aldeído, ficando sob agitação e aquecimento por 2 horas. Não houve a necessidade de adição do ácido como catalisador. Houve uma pequena queda do rendimento da primeira para a segunda reação, tendo como possível causa a solubilidade do produto de partida, limitando sua utilização apenas para síntese de tiossemicarbazonas oriundas de aldeídos poucos polares (YILDIZ et al.,2009).

Esquema 9 - Rota de síntese do (E)-2-(2,4-dihidroxi-benzilideno) tiossemicarbazona, com rendimento de 87%.

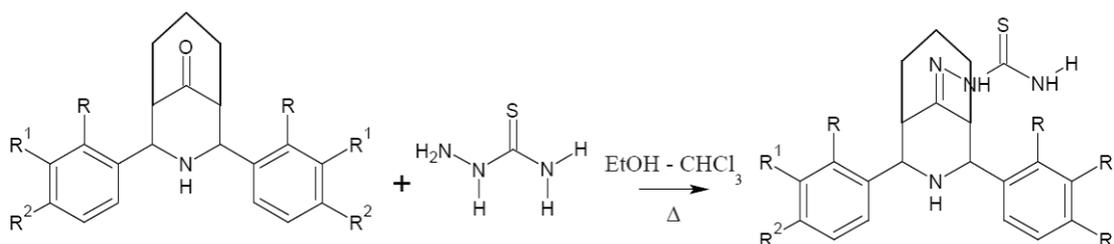


Esquema 10 - Rota de síntese do (E)-2-[(1H-indol-3-il) metileno] tiossemicarbazona com rendimento de 67%.



Em 2010, Ramachandran e equipe obtiveram uma série de 2,4-diaril-3-azobicyclo[3.3.1]nonano-9-ona tiossemicarbazonas fazendo-se reagir a 2,4-diaril-3-azobicyclo[3.3.1]nonano-9-ona em solução clorofórmio-etanólica (45mL) fervente com uma mesma solução de cloridrato de tiossemicarbazida (0,01mol), a frio adicionada gota a gota, por 3 horas sob refluxo em banho de água (**Esquema 11**) (RAMACHANDRAN; RANI; KABILAN, 2010).

Esquema 11 - Rota de síntese de 2,4-diaril-3-azobiciclo[3.3.1]nonano-9-ona tiossemicarbazonas.



Do ponto de vista sintético apresentam como característica principal, sua versatilidade de obtenção, assim como sua aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes. Em geral, apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada em sua síntese, todos os outros átomos dos reagentes estarão presentes na molécula final (DU et al, 2002).

Como podemos observar os métodos de obtenção de derivados tiossemicarbazônicos são bastantes diversificados. Sendo obtidos na presença de catalise acida ou na sua ausência, ou até mesmo na presença de uma base como o butóxido de potássio. Em solventes aproticos como o THF e tolueno, bem como na presença de solventes proticos como a água e soluções hidro alcoólicas entre outros.

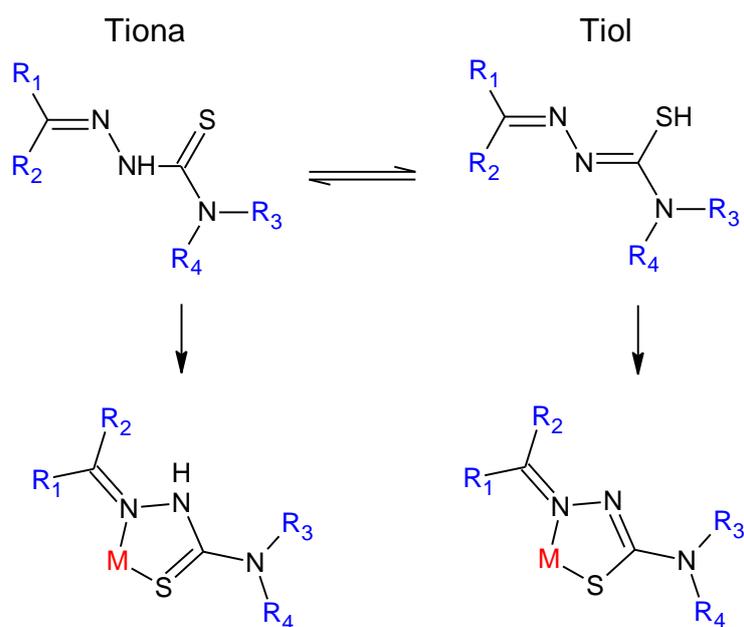
Em condições amenas de temperatura como a temperatura ambiente, até condições drásticas de refluxo, sendo de certo modo sua obtenção através da irradiação de ultrassom um salto metodológico por proporcionar altos rendimentos em condições amenas. Os compostos podem ainda ser obtidos de forma que proporcione uma maior gama de substituintes como foi demonstrado na reação de uma base de Schiff com o fenil- isotiocianato, onde o radical fenil pode ser substituído uma série de outros grupos.

As metodologias de síntese de heterociclos envolvendo aril-tiossemicarbazonas têm sido bastante empregadas, por causa da vasta possibilidade de obter heterociclos mais funcionalizados, contendo átomos de enxofre e\ou grupo amino livres, o que facilita a modificação estrutural (MOREIRA, 2008).

2.4.3 Tiossemicarbazonas e seus metais complexos

As tiossemicarbazonas possuem uma capacidade intrínseca de formar complexos com metais de transição, seja na sua forma tiona ou na forma tiol (**figura 22**), formas essas coexistentes em equilíbrio tautomérico, oriundas da intensa deslocalização de elétrons nessas moléculas. A forma tiona atua como ligante neutro bidentado, enquanto a forma tiol se desprotona e atua como ligante aniônico (KURUP; JOSEPH, 2003). Esta capacidade de formar ligação coordenada com metais é aumentada se houver grupos doadores de elétrons ligados ao carbono da função azometina (CASAS; TASENDE; SORDO, 2000)

Figura 22 - Representação das duas formas tautoméricas das TSCs e seus complexos com metais.



No âmbito da química medicinal, salvo poucas exceções, vantagens podem ser observadas quando da utilização de moléculas bioativas complexadas com íons metálicos. Dentre estas, o incremento da atividade biológica, quando comparado somente ao ligante; a habilidade de mimetizar substratos endógenos; e a modificação do perfil farmacodinâmico e farmacocinético (MOREIRA, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Síntese de derivados tiossemicarbazônicos e avaliação das atividades leishmanicida e antiproliferativa.

3.2 Objetivos específicos

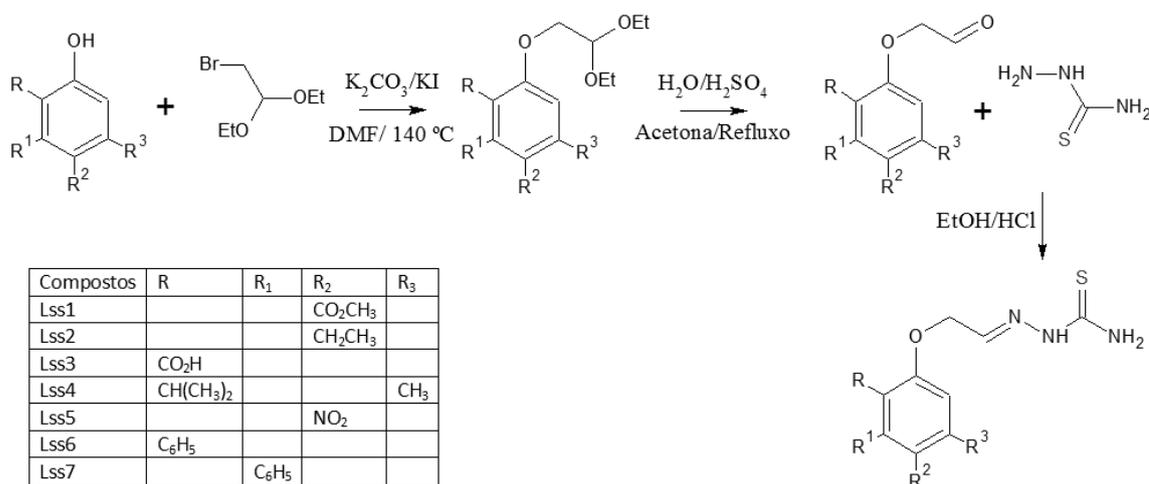
- Síntese de novos derivados ariloxaetiltiossemicarbazônicos;
- Determinação das propriedades físico-químicas dos compostos obtidos, bem como elucidação de suas estruturas químicas através da Espectroscopia de Infravermelho (IV) e de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN ^1H) e Carbono (RMN ^{13}C);
- Avaliação da atividade leishmanicida dos derivados tiossemicarbazônicos frente a forma promastigota da *Leishmania amazonensis*;
- Avaliação da atividade antiproliferativa dos compostos obtidos;

4. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ARILOXAETILTIOSSEMICARBAZONAS

4.1 Metodologia sintética

A síntese dos derivados ariloxaetiltiossemicarbazonas se deu em três etapas a partir de diferentes fenóis substituídos, conforme demonstrado no **esquema 12**.

Esquema 12 - Rota geral de síntese das ariloxaetiltiossemicarbazonas (**Lss1-7**).



4.1.1 Eterificação para obtenção dos intermediários acetal

Adicionaram-se 1 Eq. dos diferentes fenóis, 1,2 Eq. de K₂CO₃ e 0,25 Eq. de KI a um meio contendo o solvente DMF, de tal maneira que a mistura foi mantida sob agitação até atingir à temperatura de 140 °C. Após este período, adicionaram-se 1,5 Eq. de bromoacetaldeído dietil acetal e manteve-se a reação sob refluxo. O fim da reação foi detectado através da CCD, a partir de qual se observou o desaparecimento na placa cromatográfica da mancha referente ao fenol utilizado como reagente de partida. Em seguida, o conteúdo foi extraído com diclorometano e a fase orgânica evaporada, entretanto devido ao

alto ponto de ebulição apresentado pelo DMF, ele persistiu na fase orgânica, impossibilitando, consequentemente, o isolamento total do intermediário acetal.

4.1.2 Hidrólise dos intermediários acetal para obtenção dos aldeídos

Solubilizou-se o conteúdo resultante da etapa anterior com acetona e, subsequentemente, foi acrescentada de forma lenta uma solução aquosa de H₂SO₄. A mistura foi submetida a refluxo (80°C) e agitação para a hidrólise do acetal, de modo que a reação foi monitorada por CCD, a partir de qual observou-se o desaparecimento da mancha referente ao intermediário acetal. Por fim, extraiu-se o conteúdo com acetato de etila e a fase orgânica foi evaporada para obtenção do aldeído.

4.1.3 Condensação dos aldeídos com a tiossemicarbazida para obtenção das ariloxaetiltiossemicarbazonas (LssI-7)

O conteúdo proveniente da etapa anterior contendo o aldeído foi dissolvido em etanol e quantidade aproximadamente equimolar da tiossemicarbazida foi adicionada, seguidas da adição do catalisador ácido clorídrico (HCl). A reação foi mantida à temperatura ambiente e sob constante agitação magnética, de modo que foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD). Ao término da reação, o precipitado obtido, após adição de água destilada ao meio, foi filtrado em funil sinterizado e lavado com água. Para purificação de algumas ariloxaetiltiossemicarbazonas obtidas, foram realizadas recristalizações em solução hidroalcoólica.

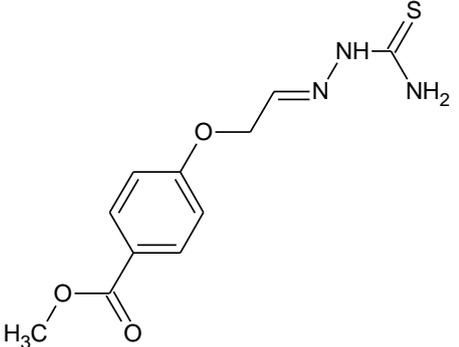
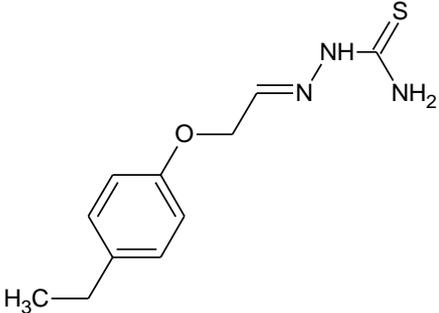
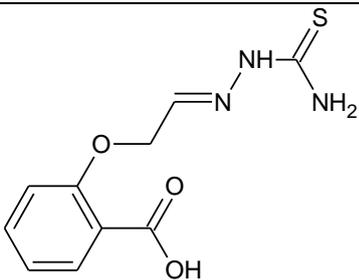
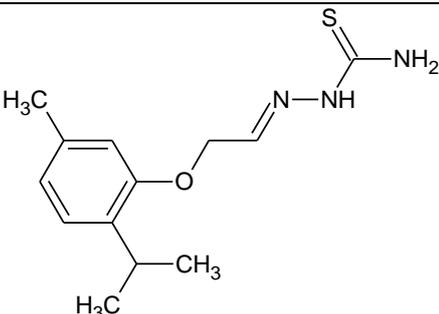
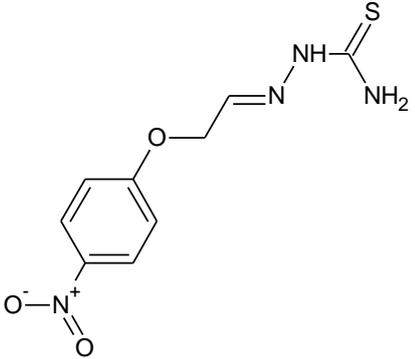
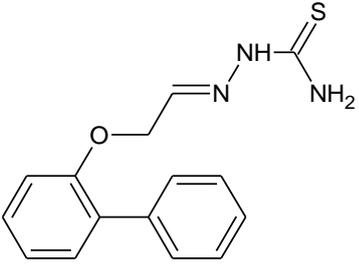
4.2 Resultados e discussão

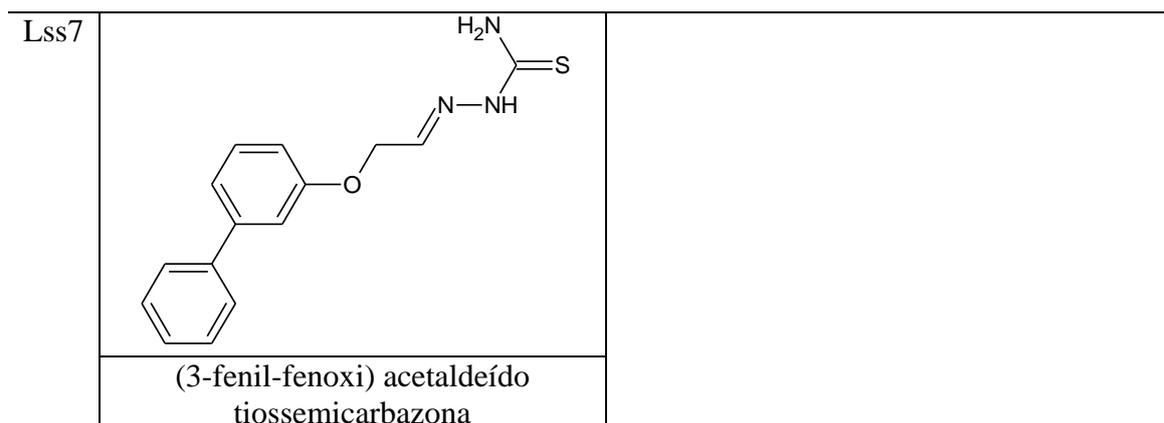
Como a síntese das ariloxaetiltiossemicarbazonas, ainda não foi descrita na literatura, os aldeídos utilizados na etapa de condensação com a tiossemicarbazida foram previamente

sintetizados a partir de diferentes fenóis substituídos. A obtenção destes aldeídos envolveu uma etapa de eterificação, seguida da hidrólise ácida do intermediário acetal.

A **tabela 1** demonstra a estrutura química e a nomenclatura das ariloxaetiltiossemicarbazonas obtidas.

Tabela 1 - Estrutura química e nomenclatura das ariloxaetiltiossemicarbazonas sintetizadas (Lss1-7).

Lss1		Lss 2	
	(4-carboxilato de metila-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona		(4-etil-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona
Lss3		Lss 4	
	(ác- carboxílico-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona		(2-isopropil-5-metil-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona
Lss5		Lss 6	
	(4-nitro-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona		(2-fenil-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona



Segundo a metodologia anteriormente desenvolvida por nosso grupo a etapa de eterificação apresentava-se como a mais problemática, possuindo um alto tempo reacional, 72h, e utilizando grandes quantidades de reagentes, 2,5 Eq. de K_2CO_3 e 3Eq. de bromoacetaldeído dietil acetal, o que eleva o custo da síntese. Além disso, o DMF, utilizado como solvente nesta etapa, persistiu na fase orgânica após a extração com o diclorometano e, devido ao seu alto ponto de ebulição, impossibilitou o isolamento do intermediário acetal a partir deste solvente, mesmo mediante aquecimento a altas temperaturas durante a evaporação da fase orgânica. Então buscou-se resolver esses e outros problemas na metodologia.

A primeira etapa desta reação envolve a desprotonação do fenol pela base utilizada (K_2CO_3) originando o íon fenóxi, portanto a presença de solventes próticos no meio tenderia a reagir com esta base, dificultando a desprotonação do fenol e, conseqüentemente, inviabilizando a reação. Diante disso, tentou-se substituir o DMF por acetona anidra e a mistura de DMF com dioxano, não obtendo-se sucesso.

Como estratégia para resolver o problema do tempo reacional e a quantidade elevada de reagentes empregados, passou-se a utilizar o KI como catalizador da reação elevando-se a temperatura até 140 °C, fundamentando-se na reação de finkelstein. Onde o tratamento de um halogeneto de alquilo primário com um halogeneto de metal alcalino, leva à substituição do halogéneo por meio de uma Reação S_N2 . E sendo o KBr produto desta reação insolúvel no DMF o equilíbrio é deslocado para a formação do iodoacetaldeído dietil acetal *in situ*, um melhor eletrofilo, o que acelera a velocidade reacional levando a um menor custos (FINKELSTEIN, 1910). Desta forma foi possível reduzir o tempo reacional de 72 horas para de 3 a 5 horas, a quantidade de K_2CO_3 de 2,5 Eq para 1,2 e o bromoacetaldeído dietil acetal de 3 Eq. para 1,5.

Durante a etapa de hidrólise, não houve mistura adequada do conteúdo resultante da etapa de eterificação com a solução aquosa ácida, quando esta foi adicionada diretamente, e,

consequentemente, não ocorreu a hidrólise do intermediário acetal. Portanto, optou-se por adicionar um co-solvente que facilitasse esta mistura para otimizar a reação. Após algumas tentativas com diferentes solventes bem como a tentativa de hidrolisar utilizando o ácido fórmico, a acetona mostrou-se a mais eficiente para esta função e, como consequência, a etapa de hidrólise passou a ocorrer normalmente (em média 12h), levando à formação dos aldeídos desejados.

Estes aldeídos foram utilizados para a síntese das inéditas ariloxaetiltiossemicarbazonas na última etapa de reação, as quais foram obtidas com tempo de reação em torno de 12 horas com bons graus de pureza, como sólidos cristalinos estáveis e insensíveis à luz, após a lavagem destes com água. Entretanto, os rendimentos reacionais gerais foram moderados (20 – 56%), pelo fato de que as etapas de eterificação e hidrólise, muitas vezes, forneceram intermediários impuros e pela dificuldade de purificação deles devido principalmente à persistência do DMF no meio. E a possibilidade de formação de sub produtos durante a hidrolise utilizando a acetona como co-solvente. Então, é necessário a substituição dos mesmos por outros que sejam mais adequados e preencham os requisitos necessários. Os valores dos rendimentos reacionais, bem como as propriedades físico-químicas das novas ariloxaetiltiossemicarbazonas sintetizadas são expostos na **tabela 2**.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas das ariloxaetiltiossemicarbazonas e rendimentos reacionais.

Compostos	F.M	M.M (g/mol)	R _f	Meio de Eluição	P.F. (°C)	Rend. (%)
Lss1	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	267.31	0,58	6/4 (Acet:Hexa)	132-134	46
Lss2	C ₁₁ H ₁₅ N ₃ OS	237.33	0,53	7/3 (Hexa:Acet)	124-126	48
Lss3	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253.28	0,42	5/5 (Acet:Hexa)	159-161	20
Lss4	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ OS	265.38	0,58	6/4 (Cicloex:Actn)	125-128	42
Lss5	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₃ S	254.27	0,48	6/4 (Actn:Cicloex)	204-206	56
Lss6	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ OS	285.37	0,5	7/3 (Cicloex:Actn)	ND	40
Lss7	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ OS	285.37	0,46	7/3 (Cicloex:Actn)	144-146	36

ND; Não Determinado.

Na síntese destas ariloxaetiltiossemicarbazonas inéditas, foi observada a presença de uma única mancha na CCD e, desse modo, pode-se sugerir também que foram obtidas preferencialmente na forma do isômero *E*, o qual é termodinamicamente mais estável (COSTA et al., 2003; SOMOGYI, 1991).

A elucidação estrutural desta nova série de compostos envolveu a análise dos dados espectroscópicos fornecidos pelas técnicas de RMN ¹H, ¹³C e IV .

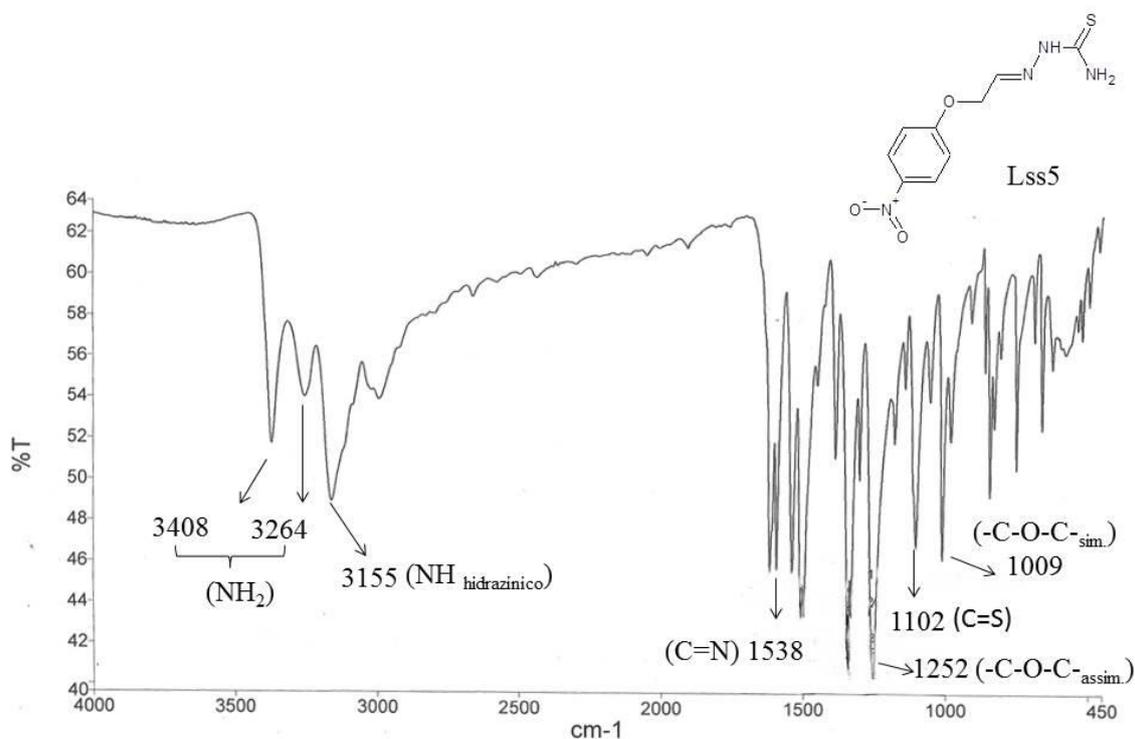
A banda de absorção no IV encontrada em frequências entre 3171 e 3152 cm⁻¹ nos espectros das ariloxaetiltiossemicarbazonas foi atribuída ao estiramento da ligação N-H hidrazínico, o qual está exemplificado na **figura 23**, pois, de acordo com SANTHAKUMARI et al., (2010) e FERRARI et al., (2000), ela é encontrada na região de 3141 – 3178 cm⁻¹ (PALENIK; RENDLE; CARTER, 1974; TARASCONI et al., 2000).

A confirmação do sucesso da metodologia empregada na condensação entre os arilaldeídos e a tiossemicarbazida se deu principalmente por meio da presença no espectro de IV

das tiossemicarbazonas sintetizadas de uma banda de absorção forte entre 1508 e 1546 cm^{-1} , a qual foi atribuída à frequência de estiramento da ligação $\text{C}=\text{N}$ para os compostos desta série (**Figura 23**) e, algumas vezes, apareceu quase superposta pela banda larga das ligações $\text{C}=\text{C}$ dos aromáticos (DUFFY et al., 2002; PANDEYA et al., 1999).

Além disso, a inexistência da banda característica do $\text{C}-\text{SH}$ nos espectros de IV, a qual é observada em geral na região de $2500 - 2600\text{ cm}^{-1}$, bem como a presença da banda de $\text{C}=\text{S}$ entre 1051 e 1172 cm^{-1} confirma a formação das aril-tiossemicarbazonas sintetizadas (**Figura 23**) (TARASCONI et al., 2000; BHARTI et al., 2003).

Figura 23 - Espectro de IV referente à ariloxaetiltiossemicarbazonas **Lss5**.

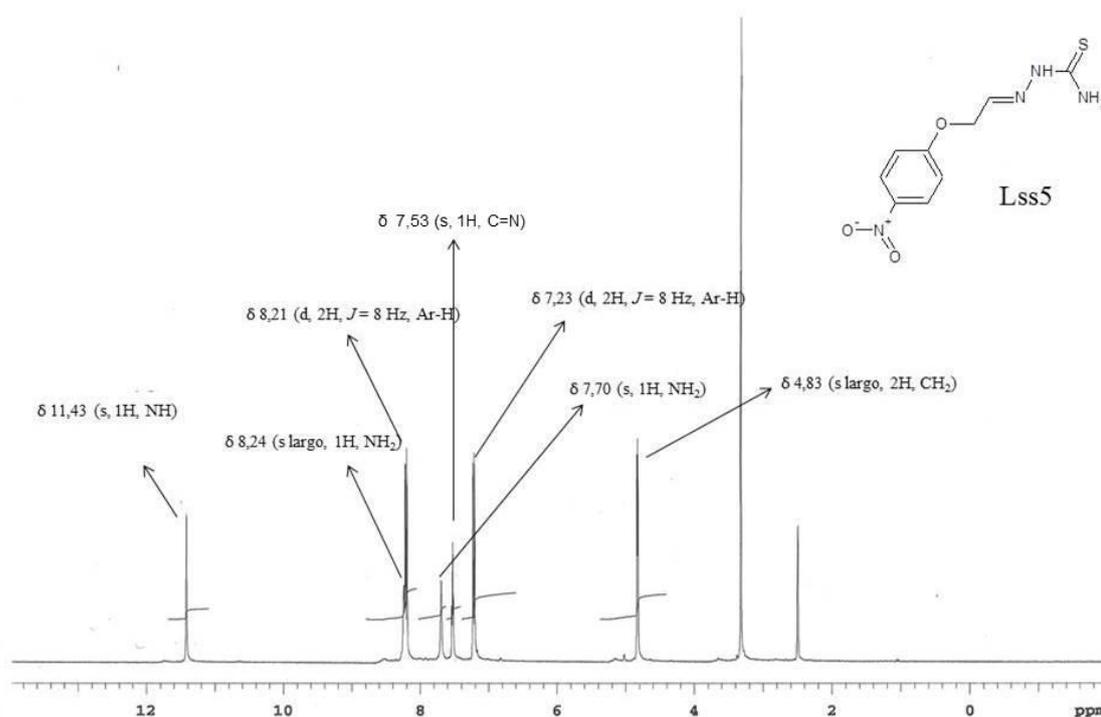


A banda de absorção cuja frequência variou entre 1009 e 1080 cm^{-1} nos espectros foi atribuída à frequência de estiramento simétrico da função $\text{C}-\text{O}-\text{C}$. Em adição, atribuiu-se a presença da banda entre 1214 e 1261 cm^{-1} à frequência de estiramento assimétrico desta função, que geralmente é observada na região de $1200 - 1275\text{ cm}^{-1}$ neste tipo de éteres (COSTA et al., 2003). Portanto, a presença destes sinais, exemplificados no espectro do composto **Lss5** (**Figura 23**), demonstra a realização com sucesso da etapa de eterificação bem como da condensação entre a tiossemicarbazida e o aldeído.

A análise inicial dos espectros de IV teve como objetivo identificar a presença das bandas de absorção referentes aos principais grupamentos químicos característicos dos compostos desta série.

A confirmação estrutural foi realizada através da análise dos espectros de RMN ^1H , nos quais o cálculo das integrais da área dos picos nos forneceu uma importante informação acerca do número de átomos de hidrogênio que a molécula possui.

Figura 24 - Espectro de RMN ^1H referente à ariloxaetiltiossemicarbazonas **Lss5**.



A presença dos hidrogênios da função NH_2 foi confirmada nos espectros de RMN ^1H das tiossemicarbazonas sintetizadas como dois singletos largos com deslocamentos químicos distintos, variando de 8,24 a 7,00 e 7,79 a 6,86 ppm, como exemplificado pelo espectro do composto **Lss5** na **figura 24**. Isto se deve ao bloqueio da rotação livre da ligação C-N que ocorre nas tiossemicarbazonas, em virtude de seu caráter parcialmente duplo (TARASCONI et al., 2000; JOUAD et al., 2001). Consequentemente, os hidrogênios se encontram em ambientes químicos diferentes, de modo que o mais próximo espacialmente ao enxofre da tiocarbonila apresenta um deslocamento químico maior, ou seja, está mais desblindado,

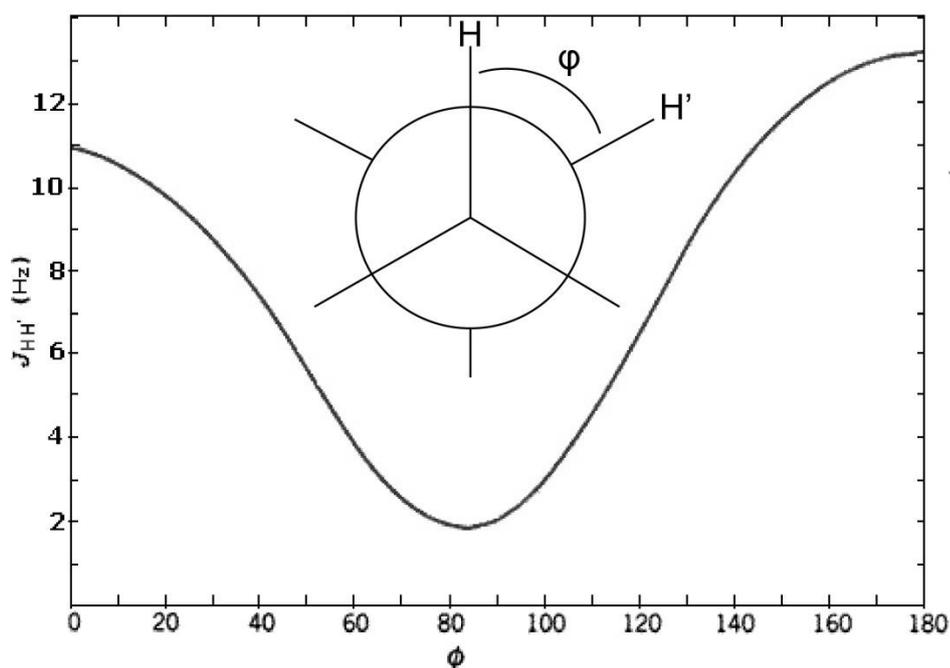
devido à sua interação com a nuvem eletrônica deste átomo, que possui um raio atômico relativamente grande.

O sucesso da realização da etapa de eterificação foi confirmado pela presença de um pico que integrou para dois hidrogênios, com deslocamentos químicos que variaram entre 4,83 e 3,99 ppm, o qual foi atribuído aos hidrogênios metilênicos (-O-CH₂-), como pode ser observado no espectro do composto **Lss5 (Figura 24)** (TENÓRIO et al., 2005). Esta atribuição levou em conta a influência do efeito diamagnético local causado pelo átomo de oxigênio próximo (bastante eletronegativo), bem como do efeito anisotrópico gerado pelo movimento dos elétrons π da ligação imínica sobre estes hidrogênios metilênicos. Isto porque, na ausência desses efeitos de desblindagem, hidrogênios metilênicos apresentam menores valores de deslocamento químico em relação aos demonstrados por esta série de moléculas.

Embora estes prótons metilênicos estejam localizados a três ligações do hidrogênio do carbono azometínico (CH=N), na maioria dos espectros não é visualizado o acoplamento do tipo J^3 entre eles, conforme é mostrado na **figura 24**, de tal maneira que o sinal referente aos hidrogênios do CH₂, o qual deveria aparecer como um dubleto em condições normais, é visto como um singlete largo. Desse modo, o sinal relativo ao hidrogênio da função azometina (CH=N), cujos deslocamentos químicos variaram entre 8,24 e 7,53 ppm para as ariloxaetiltiossemicarbazonas obtidas, mostrou-se também como um singlete largo, quando na verdade deveria aparecer como um tripleto (**Figura 24**).

Este fenômeno observado foi atribuído ao baixo valor da constante de acoplamento entre os hidrogênios metilênicos e este hidrogênio azometínico, o qual provavelmente está associado ao fato de que o ângulo diedro (θ) entre eles se aproxima a 100°. Segundo a correlação de Karplus (1963), o valor da constante de acoplamento entre hidrogênios vicinais geralmente se aproxima de zero à medida que o ângulo diedro entre eles gira em torno de 90° e aumenta quando o ângulo aproxima-se de 0° ou 180° (**Figura 25**) (BENBROOK et al., 1997).

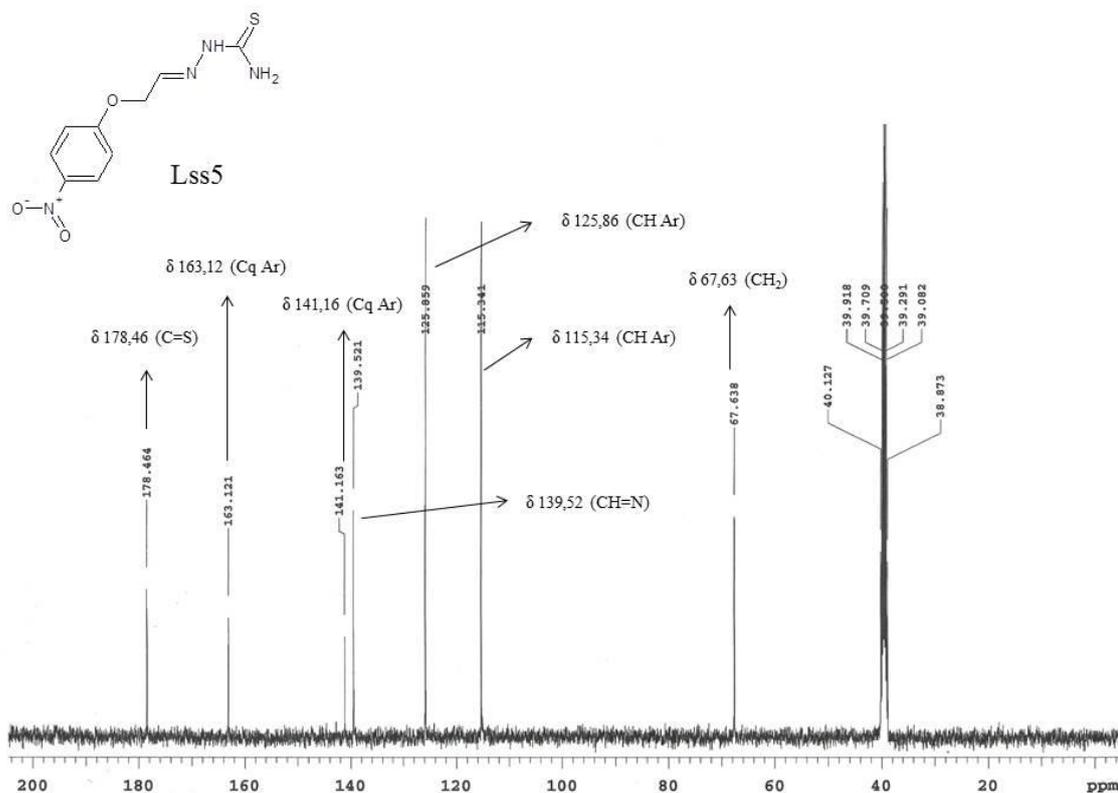
Figura 25 - Curva de Karplus, que correlaciona o valor da constante de acoplamento entre hidrogênios vicinais com o ângulo diedro.



A presença deste hidrogênio azometínico nos espectros de RMN ^1H citada acima corrobora com dados do IV e revela, portanto, o sucesso da realização da etapa de condensação entre os aldeídos sintetizados e a tiossemicarbazida.

Nos espectros de RMN ^{13}C , por sua vez, os sinais existentes com deslocamentos químicos entre 64,02 e 67,63 ppm para os compostos desta série foram atribuídos à absorção do carbono metilênico (-O-CH₂-), o qual é observado como o mais blindado. Os sinais encontrados nos espectros entre 139,46 e 141,20 ppm foram atribuídos ao carbono da função CH=N, como pode ser observado no espectro do composto **Lss5** (Figura 26) (TENÓRIO et al., 2005).

Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C referente à ariloxaetiltiossemicarbazonas **Lss5**.



Logo, estes dados estão de acordo com os obtidos pelas técnicas de IV e RMN ^1H e confirmam mais uma vez o sucesso da realização das etapas de eterificação e condensação dos aldeídos obtidos com a tiossemicarbazida, respectivamente. Os demais picos de absorção relativos às novas ariloxaetiltiossemicarbazonas sintetizadas são exemplificados também no espectro do composto **Lss5** (Figura 26)

Por fim, a confirmação da obtenção destas novas tiossemicarbazonas na forma tiona se deu pela ausência da banda característica do C-SH nos espectros de IV e presença da banda de C=S em frequências que variaram de 1051 a 1172 cm^{-1} entre os compostos obtidos (Figura 23) (TARASCONI et al., 2000; BHARTI et al., 2003). Esta forma também foi comprovada pela presença, nos espectros de RMN ^{13}C , de picos de absorção com os maiores deslocamentos químicos, variando de 178,46 a 176,35 ppm (Figura 26), os quais foram atribuídos ao carbono da tiocarbonila (C=S), bastante desblindado (TENÓRIO et al., 2005).

4.3 Avaliação quanto a regra dos cinco de lipinski

O trabalho fundamenta-se na busca por novos fármacos que venham a preencher a lacuna que a terapêutica atual exhibe quanto ao tratamento das leishmanioses, para tanto buscamos utilizar as técnicas racionais de planejamento de fármacos para projetar novas moléculas que atuem como inibidores formadores de ligação covalente reversível para as catepsinas de cisteína, esperando uma forte atividade inibitória bem como um melhor perfil toxicológico.

Para uma boa aceitação e adesão ao tratamento por parte do paciente, é fundamental que o medicamento exiba eficácia e segurança satisfatórias, ao contrário disto o abandono do mesmo gera um custo tanto ao sistema de saúde quanto à saúde do próprio paciente, podendo levar até ao desenvolvimento de resistência por parte do parasita ao medicamento.

Outros fatores que influenciam a adesão ao tratamento é o tempo do mesmo, a via de administração e a forma farmacêutica do medicamento, casos estes que se refletem no tratamento das leishmanioses. Uma vez que o mesmo além de não apresentar a segurança adequada, é longo, necessita de monitoramento e a administração da medicação dá-se por via parenteral, o que leva muitas vezes à desistência do tratamento.

Vislumbrando resolver também essa problemática, todas as moléculas projetadas cumprem a regra dos cinco de Lipinski, essa regra correlaciona as propriedades físico-químicas das entidades químicas e a farmacocinética do fármaco no corpo humano, incluindo a sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) (Lipinski et al, 2001), o que pode determinar que o mesmo possa ser concebido em uma forma farmacêutica sólida, o que irá garantir uma maior facilidade de administração e conseqüentemente maior adesão.

De acordo com esta regra, um candidato a fármaco é mais propenso a apresentar má absorção ou permeação quando o peso molecular é superior a 500. O $\log P$, uma medida da lipofilicidade, não deve exceder o valor de 5, o título de doadores de H não pode ultrapassar o número de 5 ou a quantidade de aceptores formadores de ligação de H, a soma dos átomos de N e O ser superior a 10. Independentemente de algumas exceções a esta regra, este é um método simples e amplamente aceito para tutelar o planejamento de novas drogas. O servidor Molinspiration foi utilizado para deduzir os dados com base na regra dos cinco de Lipinski para todos os novos ariloxaetiliossemecarbazonas sintetizados e os resultados estão resumidos na **Tabela 03**.

Tabela 3 - avaliação da regra dos cinco de Lipinski para os derivados
ariloxaetiltiossemecarbazonas

	PM	LogP	H Aceptor	H Doador	Nº Violações
Lss1	267.31	1.607	6	3	0
Lss2	237.328	2.351	4	3	0
Lss3	253.283	1.381	6	4	0
Lss4	265.382	2.852	4	3	0
Lss5	254.271	1.395	7	3	0
Lss6	285.372	3.184	4	3	0
Lss7	285.372	3.184	4	3	0

5. ATIVIDADE LEISHMANICIDA

5.1 Metodologia

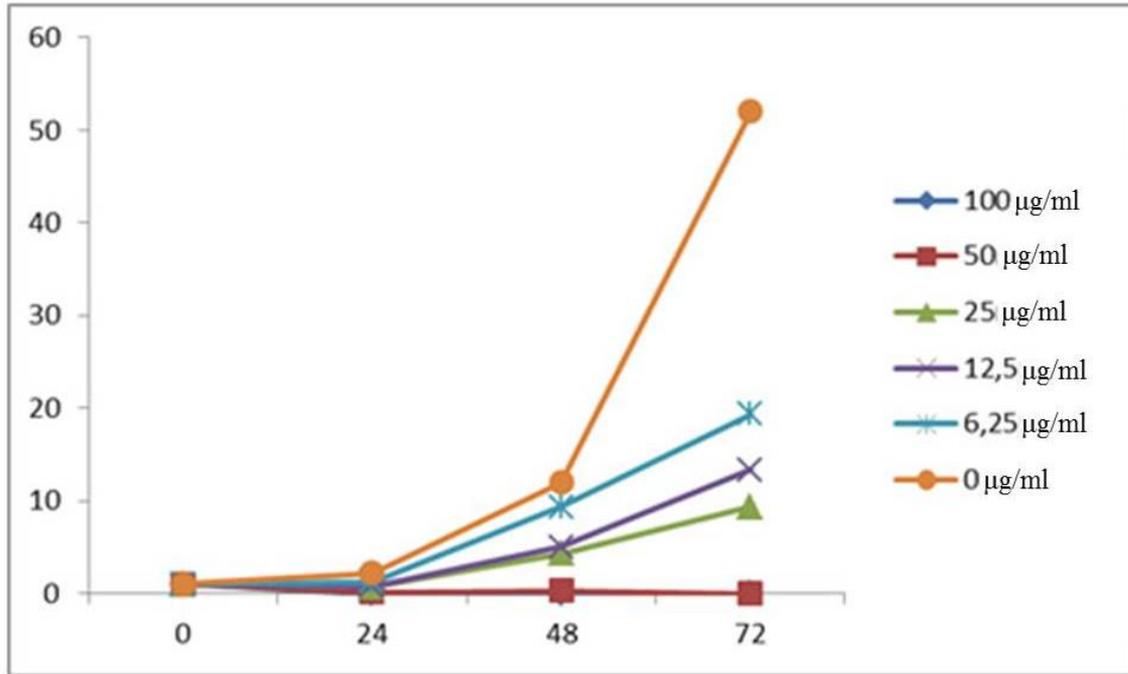
Para o ensaio *in vitro* da atividade leishmanicida, os derivados tiossemicarbazônicos foram inicialmente dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), a uma concentração de 50 mg/ml e armazenada a -20 ° C. Esta solução mãe foi diluída para se obter uma solução a 1 mg/mL em meio de cultura. Esta solução foi novamente diluída no mesmo meio de cultura em concentrações que variavam de 100 a 6,25 ug/ml, de modo que a concentração final de DMSO nunca excedeu 0,2%, uma concentração que não é tóxico para os protozoários. A fim de investigar os efeitos dos derivados tiossemicarbazônicos no crescimento da forma promastigata da *Leishmania amazonensis*, os parasitas (2×10^6 parasitas/ml) foram incubadas durante 72 h a 26 °C na ausência ou na presença dos derivados e o crescimento da cultura foi avaliada por contagem de células numa câmara de Neubauer, após 24, 48 e 72 horas de cultivo respectivamente. Para cada experimento, foram feitos três ensaios independentes em triplicata. Os dados obtidos foram analisados por análise de regressão utilizando o programa SPSS para Windows 8.0 (BORGES et al., 2012).

5.2 Resultados e discussão

O estudo da atividade leishmanicida dos novos derivados ariloxaetiltiossemicarbazônicos ocorreu pelo acompanhamento do crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* expostas a diferentes concentrações dos derivados. Culturas sem tratamento foram monitoradas como controle e o crescimento dos parasitos foi investigado através de contagens diárias em câmara de Neubauer. Ocorrendo inibição do crescimento das formas em um perfil que é claramente dose dependente como podemos

observar no **gráfico 1**, que representa o crescimento das promastigotas com a presença do composto Lss3 em várias concentrações e na ausência do mesmo, que vem reforçar a hipótese que tais compostos apresentam uma atuação específica sobre as catepsinas.

Gráfico 1 - Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com Lss3.



Promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6) foram cultivadas em meio Schneider's Drosophila mantidas a 26° C e submetidos ao tratamento com Lss3. O resultado foi representado graficamente com a média de 4 experimentos independentes.

Analisando o gráfico já citado, assim como as tabelas 04, 05 e 06 que apresentam os IC_{50} dos respectivos derivados Lss1, 2 e 3 para 24, 48 e 72 horas, percebemos que os compostos apresentam uma atividade dependente do tempo, o que está de acordo com a literatura, uma vez que um estudo cinético realizado por Chavarria e colaboradores em 2012 apontou os derivados tiossemicarbazônicos como inibidores, competitivos, dependentes do tempo e reversíveis lentos, como já citado neste trabalho.

Tabela 4 - IC_{50} µg/ml encontrado para o composto Lss1

	tempo (h)		
	24 h	48 h	72 h
exp. 1	20	31,09	52,76
exp. 2	8,4	22,31	39,46
exp. 3	11,1	22,21	47,74
média	13,17	25,20	46,65

desvpad	6,07	5,10	6,72
---------	------	------	------

Tabela 5 - IC₅₀ µg/ml encontrado para o composto Lss2

	tempo (h)		
	24 h	48 h	72 h
exp. 1	6,64	2,74	2,46
exp. 2	5,52	3,06	5,01
exp. 3	10,13	4,63	5,01
média	7,43	3,48	4,16
desvpad	2,40	1,01	1,47

Tabela 6 - IC₅₀ µg/ml encontrado para o composto Lss3.

	tempo (h)		
	24 h	48 h	72 h
exp. 1	15	13,58	14,54
exp. 2	37,25	11,84	19,7
exp. 3	14,06	14,74	9,06
média	22,10	13,39	14,43
desvpad	13,13	1,46	5,32

Deste modo os valores de IC₅₀ a serem considerados são os de 48 horas já que nesse período as promastigotas de *L. amazonensis* encontram-se numa fase mais estável de desenvolvimento, sendo assim o composto Lss1 apresenta o IC₅₀ de 25,20 µg/ml, o Lss2 de 3,48 µg/ml e o Lss3 de 13,39 µg/ml ou os respectivos valores na concentração micromolar (µM) 94,27, 14,66, e 52,86.

Como existe uma variação de sensibilidade entre as espécies dos parasitas aos quimioterápicos a comparação entre os resultados quantitativos mostram-se interessantes apenas entre estudos com a *L. amazonensis*. No trabalho de Torres-Santos et al., 2004 onde foram testados triterpenos frente as formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*, foram utilizados como controle o Glucantime e a Pentamidina, que são respectivamente a droga de escolha padrão e a utilizada nos casos de resistência a primeira. Os IC₅₀ encontrados são apresentados na tabela 07.

Tabela 7 - Concentração inibitória em 50% do das drogas Glucantime e Pentamidina para a

Leishmania amazonensis (IC₅₀ µg/ml)

	promastigotas	amastigotas
Glucantime	> 200	83
Pentamidina	6	nd

nd: não determinado

Fonte: Adaptado de TORRES-SANTOS et al., 2004

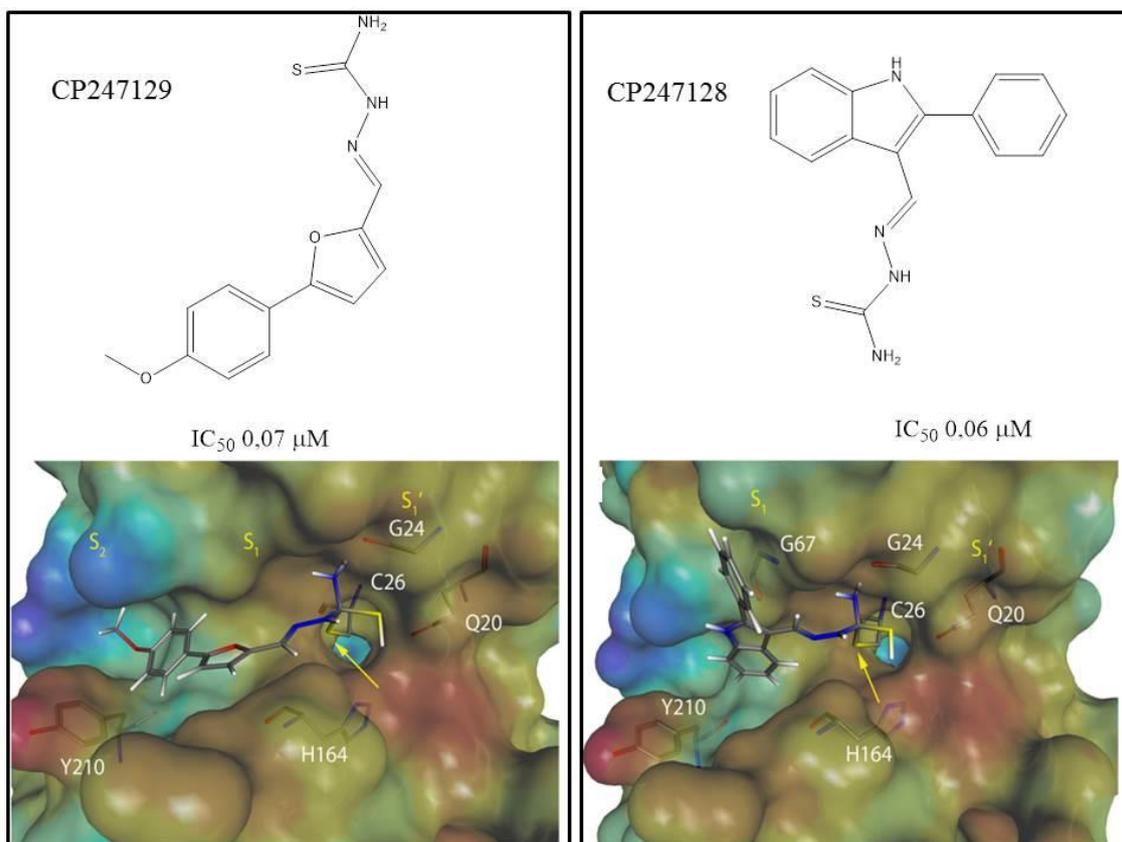
Comparando os valores dos IC₅₀ dos compostos testados aos das drogas já utilizadas no tratamento das leishmanioses para as formas promastigotas, observamos que todos os novos compostos apresentam maior atividade que a droga de escolha padrão, sendo o composto Lss2 mais de 57 vezes superior ao Glucantime e apresentando quase o dobro da atividade da Pentamidina.

Mesmo quando comparamos os resultados obtidos com o IC₅₀ do Glucantime para as formas amastigotas, todos os compostos apresentaram atividade superior, sendo que o composto Lss2 se destaca com uma atividade quase 24 vezes superior. Há uma expectativa que nossas moléculas serão ainda mais ativas frente as formas evolutivas amastigotas que as promastigotas, uma vez que existe uma maior presença e importância das catepsinas durante a transformação das promastigotas em amastigotas bem como durante essa fase intracelular, como relatados nos estudos de Ueda-Nakamura et al., 2002 e Frame et al., 2000.

Quando compararmos estes resultados com os valores de log P que são respectivamente para os compostos de Lss1-3, 1.607, 2.351 e 1.381 percebemos que o composto Lss2 que apresenta a maior atividade é justamente o mais hidrofóbico, o que vem a concordar com a literatura, uma vez que em seus trabalhos Alves et al., 2001, St Hilaire et al., 2002 e Tornøe et al., 2004, produziram peptídeos inibitórios da cisteíno-protease recombinante CPB2.8ΔCTE da *Leishmania mexicana* através da química combinatória. Constataram a importância de um resíduo hidrofóbico no subsite S1 para os inibidores e que proporciona alta afinidade, o que destoa do seu substrato natural que apresenta nesta posição resíduo básico.

Em um estudo recente realizado por Schröder et al., 2013, de atacação covalente, que buscou por compostos que formassem ligações covalentes reversíveis com a catepsina L, levou a descoberta de inibidores competitivos não peptídicos, onde foram identificados dois derivados tiossemicarbazonicos **Figura 27**. Embora existam diferenças entre os métodos analíticos, visto que o estudo citado utilizou a catepsina L recombinante pura, enquanto que o deste estudo a avaliou frente a um organismo vivo e complexo, não nos permitam a comparação dos resultados quantitativos, contudo nos fornece uma visão do potencial desses compostos.

Figura 27 - estrutura dos derivados tiossemecarbazonicos e docking molecular dos mesmos com a catepsina L.



Fonte: Adaptado de SCHRÖDER et al., 2013.

O estudo confirma a importância de grupamentos hidrofóbicos para a interação dos inibidores com a enzima, como podemos observar na **figura 27** onde estão plotados os estudos de Docking dos derivados da tiossemecarbazona com o modelo homólogo da catepsina L. O sítio ativo foi colorido de acordo com o potencial lipofílico. O espectro de cor varia de marrom (área mais lipofílico) para azul (área mais hidrofílica). O resíduo de cisteína catalítico foi excluído da geração da superfície para facilitar a visualização da ligação covalente formada entre a enzima e o inibidor da molécula e que é apontada por uma seta amarela.

Nossos compostos sintetizados são moléculas pequenas comparadas a outros inibidores seletivos de proteases o que nos leva a crer que os mesmos apresentem um amplo espectro de inibição e consequentemente baixa seletividade. Suspeitas que podem ser confirmadas pela alta atividade citotóxica, e pela literatura apontar que tal atividade leishmanicida só é possível através da inibição de um amplo espectro de catepsinas da *Leishmania sp*, como citado neste trabalho.

6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DOS DERIVADOS ARILOXAETILTIOSSEMICARBAZÔNICOS

6.1 Metodologia

Para o estudo em questão, as linhagens tumorais utilizadas, HEP-2 (câncer de laringe), MCF-7 (câncer de mama), NCI H-292 (câncer de pulmão) e HL60 (leucemia promielocítica), foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEN, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril e testadas na concentração de 25 µg/mL para substâncias puras e 50 µg/mL para extratos ou frações.

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por MOSMAN (1983) (BERRIDGE et al., 1996), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (MOSSMAN, 1983).

As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 100 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm. Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos desvio no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em duplicata.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de

crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%).

6.2 Resultados e discussão

Em uma análise preliminar dos resultados, presentes na **tabela 08**, observamos que todos os compostos apresentam atividade antiproliferativa que variou da pouca atividade a até muita atividade, numa escala que foi de 35,5% para o composto Lss5 frente a linhagem NCI H-292 a 100% apresentado pelo composto Lss2, frente a linhagem HEp-2.

Tabela 8- Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 25 µg/mL

Substância	MCF-7		HEp-2		NCI H-292		HL60	
	% inibição	desvio						
Lss1	52,6	6,6	88,2	0,7	ND		77,0	1,4
Lss2	44,4	1,8	100,0	0,0	ND		96,7	2,0
Lss3	55,6	8,1	77,5	2,8	ND		98,4	1,6
Lss4	78,2	0,1	97,5	2,5	98,4	0,5	ND	
Lss5	53,1	1,8	ND		35,5	4,1	69,0	11,5
Lss6	46,2	4,5	ND		94,1	3,0	92,0	0,2
Lss7	72,1	4,0	ND		93,6	0,5	92,6	0,9
doxorubicina	64,5	1,9	83,0	1,6	99,1	0,5	ND	

.ND; não determinado.

Contudo ao analisarmos minuciosamente o que levou a tais resultados, percebemos que existe uma correlação entre a agressividade das linhagens tumorais e a atividade apresentada. Esta correlação deve-se principalmente a grande presença de catepsinas nos tipos de cânceres mais agressivos, e como já foi citado anteriormente, a presença destas enzimas é considerado como um mal prognóstico.

A linhagem MCF-7 é apontada como a menos invasiva dentre todas linhas celulares tumorais de mama humano e que além disso apresenta baixa expressão de catepsinas B. Sendo que esta expressão aumenta a medida que o tumor torna-se mais agressivo (BERVAR et al, 2003).

O câncer de laringe, como a linhagem HEP-2, está associado a uma alta prevalência de invasão local e metástase nos linfonodos cervicais. O mesmo apresenta uma sobre-expressão de catepsinas B, bem como uma sub expressão de um inibidor endógeno, sendo sugestivo a inibição desta catepsina como alvo farmacológico (LI et al., 2011). A catepsina D também tem sido envolvida na progressão destes tumores (PAKSOY; HARDAL; CAGLAR, 2011).

A catepsina B nas células tumorais do câncer de pulmão, assim como a linhagem NCI H-292, tem sido relatada para esta hiperexpressa principalmente nos casos onde existe um aumento na invasão e metástase, sendo relacionada a um mal prognóstico e a uma maior probabilidade de reincidência (FUJISE et al., 2000; WERLE et al., 2000; CHEN et al., 2011). Já a HL60 de leucemia promielocítica é amplamente conhecida por apresentar alta sensibilidade a compostos citotóxicos o que explica a falta de correlação entre os resultados.

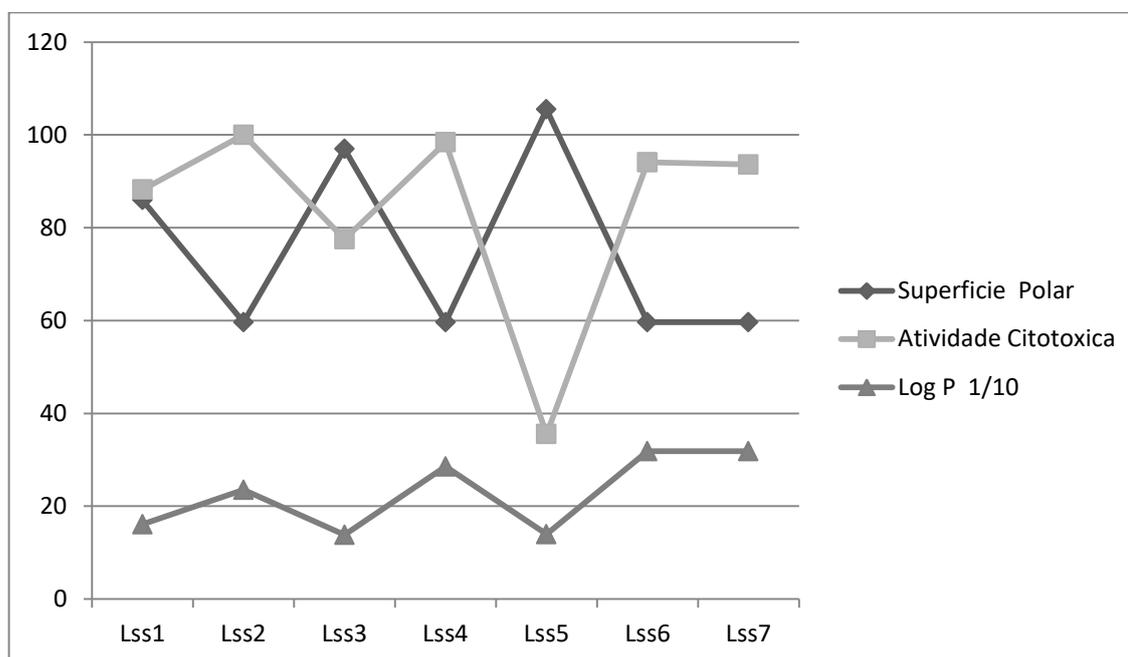
Neste conjunto podemos perceber que a sobre expressão das catepsinas em tumores mais agressivos cria uma seletividade, já que observamos que os compostos apresentaram uma maior atividade neste tipo de célula, podendo assim apresentar uma maior atividade entre as células tumorais em detrimento aquelas não malignas, que apresentam uma menor expressão destas proteases.

A avaliação do composto Lss4, onde foram utilizadas as linhagens tumorais MCF-7, HEP-2 e NCI H-292, mostrou que a atividade do composto apresenta mesma significância para as duas linhagens mais agressivas, HEP-2 e NCI H-292, o que vem a reforçar os indícios de que tumores que apresentem alta expressão de catepsinas seriam mais sensíveis aos inibidores.

A atividade obtida frente as linhagens mais invasivas, apresenta claramente uma correlação direta com o Log P das moléculas bem como inversamente a superfície polar das mesmas como podemos observar no **gráfico 02**. Característica já esperada, pois como relatado neste trabalho o sitio de ligação do substrato a enzima possui regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo esta última mais próxima à cisteína catalítica. Por estas moléculas serem pequenas, comparadas a outros inibidores de proteases, apresentam um menor numero de interações que poderiam levar a uma maior seletividade.

Isto explica a correlação observada entre a atividade citotóxica com a leishmanicida, por esses inibirem amplamente as catepsinas apresentando baixa ou nenhuma seletividade entre as mesmas, relacionando globalmente as atividades.

Gráfico 2 - O gráfico apresenta a Correlação entre a atividade e propriedades físico-químicas dos compostos tais como log P e superfície polar.



Outras considerações que podem ser tomadas são em relação aos grupos substituintes do anel aromático, já que é de conhecimento do grupo de pesquisa que os substituintes desativadores do anel aromático levam a uma diminuição da atividade antiproliferativa a medida que grupos ativadores proporcionam maior atividade. Aqui essa característica é explicada porque os grupos desativantes levaram as moléculas a serem mais hidrofílicas a medida que os ativantes proporcionaram compostos mais lipofílicos.

Neste último grupo podemos observar um decaimento, embora pequeno, da atividade quando são acrescentados ao anel grupos volumosos, o que pode representar uma maior dificuldade de acomodação destes na enzima.

Um outro ponto que colabora com evidências para afirmarmos que estes novos candidatos a fármacos apresentam mecanismos de ação específico sobre as catepsinas, é a baixa atividade do composto Lss5 que possui como substituinte no anel aromático o grupo nitro, cuja literatura aponta por proferir as moléculas atividades como antiparasitária, microbiana e citotóxica (TOCHER, 1997). Este, por tratar-se de um substituinte hidrofílico evidenciado pela alta superfície polar e baixo log P, apresenta baixa interação com a enzima, o que vem a justificar a baixa atividade.

Com os resultados do IC_{50} para cada composto calculado e apresentado na **tabela 09**, podemos comprovar que a série de novos derivados tiossemecarbazônicos mostra-se promissora com o composto Lss7, apresentando maior atividade que a doxorubicina, um

quimioterápico já utilizado no tratamento de várias formas de câncer. As substâncias Lss4 e Lss6 também apresentam atividade interessante.

Tabela 9 - Atividade antiproliferativa IC₅₀ (µg/ml)

Amostras	HL-60	MCF-7	NCI-H292	HEP-2
Lss1	>25	>25	>25	>25
Lss2	>25	>25	>25	>25
Lss3	>25	>25	>25	>25
Lss4	1,14 0,93 a 1,39	6,98 5,42 a 8,99	10,13 6,67 a 15,37	10,62 7,87 a 14,34
Lss5	>25	>25	>25	>25
Lss6	0,91 0,65 a 1,25	3,85 3,06 a 4,85	9,15 7,06 a 11,86	6,56 4,142 a 10,38
Lss7	0,033 0,021 a 0,038	0,03 0,013 a 0,095	0,18 0,13 a 0,23	0,53 0,41 a 0,69
doxorubicina	0,02 0,01 a 0,02	0,3 0,2 a 0,5	0,2 0,1 a 0,5	0,7 0,3 a 1,4

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Materiais

7.1.1 Cromatografias

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de Sílica Gel 60 F254 da MERCK de 0,25 mm de espessura. A leitura das mesmas foi realizada através de radiação de ultravioleta (UV) no comprimento de onda (λ) de 254 nm.

7.1.2 Pontos de fusão

Os pontos de fusão foram medidos no equipamento QUILMES Q.340.23, em tubos capilares imersos em banho de silicone.

7.1.3 Espectroscopias de iv, ^1H e ^{13}C

Os espectros de IV foram obtidos em espectrofotômetro BRUKER IFS-66, em discos de KBr. Alguns espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos no equipamento UNITYplus-300 MHz-VARIAN e outros no UNMRS-400 MHz-VARIAN, utilizando-se DMSO- d_6 como solvente. Os deslocamentos químicos (δ) foram reportados em ppm, utilizando tetrametilsilano como referência interna. As constantes de acoplamento foram indicadas em

Hz, e as multiplicidades dos sinais foram designadas da seguinte forma: s – singleto, d – dubleto, dd – duplo dubleto, t – tripleto, m – multipletto.

7.1.4 Equipamentos

- Bomba de vácuo TECNAL TE 058
- Estufa FANEM 315/3;
- Evaporador rotativo FISATON 802;
- Balança analítica SHIMADZU AUW220D
- Balança semi-analítica BEL MARC 500 C
- Espectrofotômetro BIORAD 3550
- Câmara de Neubauer
- Placas de agitação e aquecimento FISATON 752A
- Vidraria geral;
- Capela com exaustão;
- Freezer;
- Espátulas e pinças metálicas
- Dessecador
- Contador Beta de Cintilação

7.1.5 Reagentes e solventes

- Tiossemicarbazida
- Fenóis substituídos
- Carbonato de potássio
- Dimetil-formamida (DMF)
- Diclorometano
- Bromoacetaldeído dietil acetal
- Acetona
- Meio de cultura RPMI 1640
- Soro bovino fetal
- Dimetil-sulfóxido (DMSO)
- DMSO- d_6
- Ácido clorídrico conc.
- Dimetil-sulfóxido (DMSO)
- Água destilada

- Hexano
- Acetato de etila

7.2 Métodos

7.2.1 Procedimento geral para obtenção das fenoximetil-tiossemicarbazonas.

A síntese dos derivados ariloxaetiltiossemicarbazônicos se deu em três etapas a partir de diferentes fenóis.

7.2.1.1 Eterificação para obtenção dos intermediários acetal

Em balão de fundo redondo, 3,12 mmol (1 Eq.) do fenol foram dissolvidos em DMF. 1,2 Eq. (3,7 mmol) de K_2CO_3 e 0,25 Eq. (0,78 mmol) de KI foram adicionados à mistura, a qual foi mantida sob agitação até atingir a temperatura de 140 °C. Após esse período, adicionaram-se 1,5Eq. (4,68 mmol) de bromoacetaldeído dietil acetal e manteve-se a reação por um período de 3 a 5 horas em média, sob refluxo. O fim da reação foi detectado através da CCD, a partir da qual se observou o desaparecimento na placa cromatográfica da mancha referente ao fenol utilizado como reagente de partida. Em seguida, o conteúdo foi extraído com diclorometano e a fase orgânica evaporada para obtenção do intermediário acetal.

7.2.1.2 Hidrólise dos intermediários acetal para obtenção dos aldeídos

Ao balão que possuía o conteúdo resultante da etapa anterior foram adicionados 5 mL de acetona. Em seguida, acrescentou-se lentamente uma solução ácida (7 gotas de H_2SO_4 em 10 mL de H_2O) e a mistura resultante foi submetida a refluxo (100°C) e agitação durante em média 4 horas, para a hidrólise do acetal. A reação foi monitorada por CCD, a partir de qual

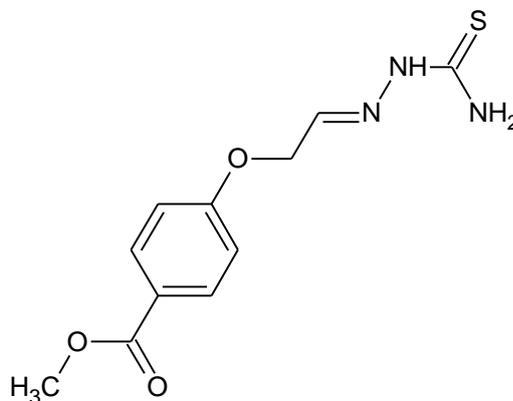
observou-se o desaparecimento do ponto referente ao intermediário acetal. Por fim, o conteúdo do balão foi extraído com acetato de etila e a fase orgânica evaporada para obtenção do aldeído.

7.2.1.3 Condensação dos aldeídos com a tiossemicarbazida para obtenção das ariloxaetiltiossemicarbazonas (Lss1-7)

Ao balão de fundo redondo contendo o aldeído proveniente da etapa anterior, quantidade aproximadamente equimolar da tiossemicarbazida seguidos da adição de 3 gotas de ácido clorídrico (HCl) como catalisador. A reação foi mantida à temperatura ambiente e constante agitação magnética, por um período de 12 horas, de modo que foi monitorada por CCD. Ao término da reação, adicionou-se água destilada ao balão e foi observada a formação de precipitado, o qual foi filtrado em funil sinterizado e lavado com água, sucessivamente. Para a purificação de algumas ariloxaetiltiossemicarbazonas obtidas, foram realizadas recristalizações em água/álcool etílico absoluto (1:1).

7.2.2 Dados físico-químicos e espectroscópicos para as fenoximetil-tiossemicarbazonas

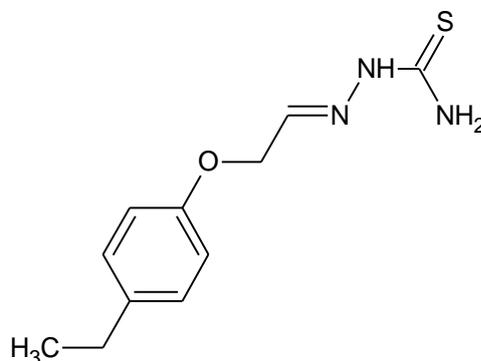
7.2.2.1 (4-carboxilato de metila-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona (Lss1)



- F.M: C₁₁H₁₃N₃O₃S.
- M.M: 267.31 g/mol.

- Análise Elementar: N: 14,46%; C: 47,01%; H: 5,37%; S: 13,27%
- Sólido bege; Rendimento: 46%; P.F: 132-134 °C; R_f: 0,58 (Meio de eluição: acetato de etila/hexano 6:4).
- IV (ν cm⁻¹ KBr): 3380 e 3276 (NH₂); 3155 (NH hidrazínico); 1534 (C=N); 1051 (C=S); 1024 e 1242 (C-O-C).
- RMN ¹H (400 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 11,41 (s, 1H, NH); 8,24 (s, 1H, CH=N); 7,18 (s largo, 2H, Ar-H); 7,71 (s largo, 1H, NH₂); 7,53 (s largo, 1H, NH₂); 7,10 (s largo, 2H, Ar-H); 4,76 (s largo, 2H, CH₂); 3,81 (s, 3H, CH₃).
- RMN ¹³C (100 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 178,42 (C=S); 165,80 (COO); 161,72 (Cq Ar); 140,08 (CH=N); 131,25 (CH Ar); 122,33 (Cq Ar); 114,76 (CH Ar); 67,09 (CH₂); 51,87 (CH₃).

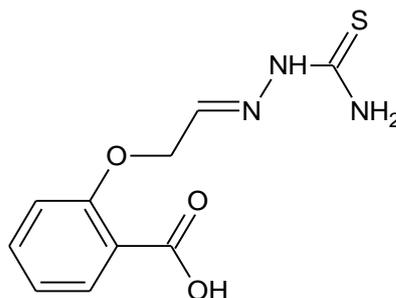
7.2.2.2 (4-etil-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona (Lss2)



- F.M: C₁₁H₁₅N₃OS.
- M.M: 237.33 g/mol.
- Análise Elementar: N: 16,10%; C: 53,40%; H: 5,06%; S: 12,18%
- Sólido bege; Rendimento: 48%; P.F: 124-126 °C; R_f: 0,53 (Meio de eluição: hexano/acetato de etila 7:3).
- IV (ν cm⁻¹ KBr): 3438 e 3277 (NH₂); 3154 (NH hidrazínico); 1546 (C=N); 1059 (C=S); 1030 e 1236 (C-O-C).
- RMN ¹H (400 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 11,34 (s, 1H, NH); 8,19 (s largo, 1H, CH=N); 7,70 (s largo, 1H, NH₂); 7,50 (s largo, 1H, NH₂); 7,10 (s largo, 2H, Ar-H); 6,88 (s largo, 2H, Ar-H); 4,61 (s largo, 2H, CH₂); 2,50 (s largo, 2H, CH₂); 1,12 (s, 3H, CH₃).

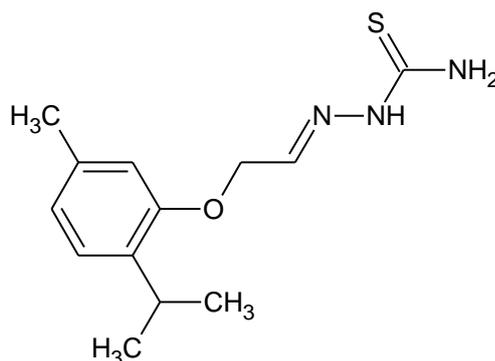
- RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 178,34 (C=S); 155,91 (Cq Ar); 141,19 (CH=N); 136, 28 (Cq Ar); 128,72 (CH Ar); 114,56 (CH Ar); 66,84 (CH $_2$); 27,27 (CH $_2$); 15,81 (CH $_3$).

7.2.2.3 (*ác- carboxílico-fenoxi*) acetaldeído tiossemicarbazona (**Lss3**)



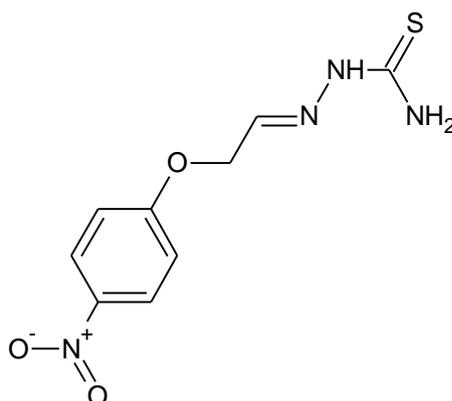
- F.M: $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$.
- M.M: 253.28 g/mol.
- Análise Elementar: N: 18,13%; C: 43,89%; H: 4,41%; S: 13,18%
- Sólido branco; Rendimento: 20%; P.F: 159-161 °C; R $_f$: 0,42 (Meio de eluição: acetato de etila/hexano 5:5).
- IV (v cm^{-1} KBr): 3414 e 3288 (NH $_2$); 3171 (NH hidrazínico); 1530 (C=N); 1136 (C=S); 1080 e 1214 (C-O-C).
- RMN ^1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 11,44 (s, 1H, NH); 10,35 (s largo, 1H, COOH); 8,24 (s largo, 1H, NH $_2$); 7,79 (s largo, 1H, NH $_2$); 7,66 (s largo, 1H, CH=N); 7,54 (s largo, 2H, Ar-H); 6,98 (s largo, 2H, Ar-H); 4,91 (s largo, 2H, CH $_2$).
- RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 178,05 (C=S); 167,96 (COOH); 159,84 (Cq Ar); 139,46 (CH=N); 135,76 (CH Ar); 139,27 (CH Ar); 119, 46 (CH Ar); 117, 48 (CH Ar); 113, 08 (CH Ar); 64,02 (CH $_2$).

7.2.2.4 (2-isopropil-5-metil-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona (**Lss4**)



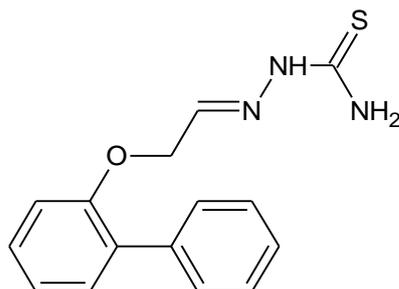
- F.M: C₁₃H₁₉N₃OS.
- M.M: 265.38 g/mol.
- Análise Elementar: N: 15,71%; C: 58,38%; H: 7,22%; S: 5,60%
- Sólido areia; Rendimento: 42%; P.F: 125-128 °C; R_f: 0,58 (Meio de eluição: cicloexano/acetona 6:4).
- IV (ν cm⁻¹ KBr): 3439 e 3285 (NH₂); 3158 (NH hidrazínico); 1540 (C=N); 1172 (C=S); 1096 e 1261 (C-O-C).
- RMN ¹H (400 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 10,66 (s, 1H, NH); 7,54 (s largo, 1H, CH=N); 7,00 (s largo, 1H, NH₂); 6,86 (s largo, 1H, NH₂); 6,39 (d, 1H, J = 7,2 Hz, Ar-H); 6,14 (s, 1H, Ar-H); 6,05 (d, 1H, J = 7,2 Hz, Ar-H); 3,99 (s largo, 2H, CH₂); 2,51 (d, 1H, J = 6 Hz, CH₂); 1,57 (s largo, 3H, CH₃); 1,45 (d, 6H, J = 6 Hz, CH₃).
- RMN ¹³C (100 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 178,37 (C=S); 154,83 (Cq Ar); 141,20 (CH=N); 135,94 (Cq Ar); 133,25 (Cq Ar); 125,77 (CH Ar); 121,57 (CH Ar); 112,96 (CH Ar); 67,10 (CH₂); 26,05 (CH); 22,65 (CH₃); 20,92 (CH₃).

7.2.2.5 (4-nitro-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona (**Lss5**)



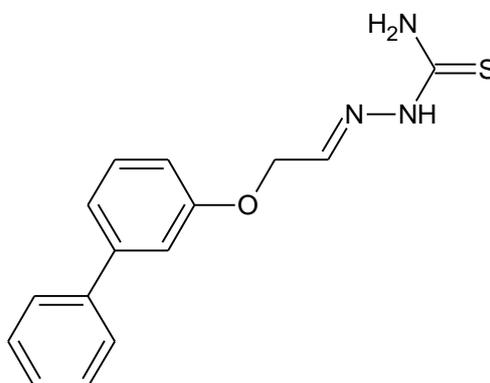
- F.M: C₉H₁₀N₄O₃S.
- M.M: 254.27 g/mol.
- Sólido bege; Rendimento: 56%; P.F: 204-206 °C; R_f: 0,48 (Meio de eluição: acetona/cicloexano 6:4).
- IV (v cm⁻¹ KBr): 3408 e 3264 (NH₂); 3155 (NH hidrazínico); 1538 (C=N); 1102 (C=S); 1009 e 1252 (C-O-C).
- RMN ¹H (400 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 11,43 (s, 1H, NH); 8,24 (s largo, 1H, NH₂); 8,21 (d, 2H, J = 8 Hz, Ar-H); 7,70 (s, 1H, NH₂); 7,53 (s, 1H, CH=N); 7,23 (d, 2H, J = 8 Hz, Ar-H); 4,83 (s largo, 2H, CH₂).
- RMN ¹³C (100 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 178,46 (C=S); 163,12 (Cq Ar); 141,16 (Cq Ar); 139,52 (CH=N); 125,86 (CH Ar); 115,34 (CH Ar); 67,63 (CH₂).

7.2.2.6 (2-fenil-fenoxi) acetaldeído tiossemicarbazona (**Lss6**)



- F.M: $C_{15}H_{15}N_3OS$.
- M.M: 285.37 g/mol.
- Óleo amarelo; Rendimento: 40%; R_f : 0,5 (Meio de eluição: cicloexano/acetona 7:3).
- IV (ν cm^{-1} KBr): 3420 e 3280 (NH_2); 3155 (NH hidrazínico); 1508 ($C=N$); 1121 ($C=S$); 1053 e 1219 ($C-O-C$).
- RMN 1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 11,30 (s, 1H, NH); 8,19 (s largo, 1H, $CH=N$); 7,60 (s largo, 1H, NH_2); 7,49 (s largo, 1H, NH_2); 7,42 (s, 1H, Ar-H); 7,40 (dd, 1H, $J = 8,4; 7,6$ Hz, Ar-H); 7,36-7,30 (m, 5H, Ar-H); 7,17 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, Ar-H); 7,06 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, Ar-H); 4,70 (s largo, 2H, CH_2).
- RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 178, 32 ($C=S$); 154,66 (Cq Ar); 140,99 ($CH=N$); 137,93 (Cq Ar); 130,09 (CH Ar); 130,02 (CH Ar); 129,19 (CH Ar); 128,81 (CH Ar); 127, 96 (CH Ar); 126, 88 (CH Ar); 121, 38 (CH Ar); 113, 13 (CH Ar); 67,20 (CH_2).

7.2.2.7 (3-fenil-fenoxi) acetaldéido tiossemicarbazona (Lss7)



- F.M: $C_{15}H_{15}N_3OS$.
- M.M: 285.37 g/mol.

- Sólido marfim; Rendimento: 36%; P.F: 144-146 °C; R_f: 0,46 (Meio de eluição: cicloexano/acetona 7:3).
- RMN ¹H (400 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 11,37 (s, 1H, NH); 8,22 (s largo, 1H, CH=N); 7,72 (s largo, 1H, NH₂); 7,66 (d, 1H, J = 7,6 Hz, Ar-H); 7,46 (s largo, 1H, NH₂); 7,46 (t, 1H, J = 7,6 Hz, Ar-H); 7,40-7,35 (m, 5H, Ar-H); 7,26 (s, 1H, Ar-H); 7,00 (d, 1H, J = 7,6 Hz, Ar-H); 4,77 (s largo, 2H, CH₂).
- RMN ¹³C (100 MHz, ppm, DMSO-d₆): δ 176,34 (C=S); 158,36 (Cq Ar); 141,74 (Cq Ar); 140,92 (CH=N); 139,80 (Cq Ar); 130,07 (CH Ar); 128,86 (CH Ar); 127,61 (CH Ar); 126,75 (CH Ar); 119,51 (CH Ar); 113,80 (CH Ar); 113,01 (CH Ar); 66,92 (CH₂).

7.2.3 Metodologia da atividade leishmanicida

Para o ensaio *in vitro* da atividade leishmanicida, os derivados tiossemicarbazônicos foram inicialmente dissolvidos em dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), a uma concentração de 50 mg/ml e armazenada a -20 ° C. Esta solução mãe foi diluída para se obter uma solução a 1 mg/mL em meio de cultura. Esta solução foi novamente diluída no mesmo meio de cultura em concentrações que variavam de 100 a 6,25 ug/ml, de modo que a concentração final de DMSO nunca excedeu 0,2%, uma concentração que não é tóxico para os protozoários. A fim de investigar os efeitos dos derivados tiossemicarbazônicos no crescimento da forma promastigata da *Leishmania amazonensis*, os parasitas (2×10^6 parasitas/ml) foram incubadas durante 72 h a 26 °C na ausência ou na presença dos derivados e o crescimento da cultura foi avaliada por contagem de células numa câmara de Neubauer, após 24, 48 e 72 horas de cultivo respectivamente. Para cada experimento, foram feitos três ensaios independentes em triplicata. Os dados obtidos foram analisados por análise de regressão utilizando o programa SPSS para Windows 8.0 (BORGES et al., 2012).

7.2.4 Metodologia da atividade antiproliferativa.

Para o estudo em questão, as linhagens tumorais utilizadas, HEP-2 (câncer de laringe), MCF-7 (câncer de mama), NCI H-292 (câncer de pulmão) e HL60 (leucemia promielocítica), foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEN, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril e testadas na concentração de 25 µg/mL para substâncias puras e 50 µg/mL para extratos ou frações.

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por MOSMAN (1983) (BERRIDGE et al., 1996), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (MOSSMAN, 1983).

As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 100 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm. Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos desvio no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em duplicata.

8. CONCLUSÕES

Na busca por novos candidatos a fármacos para o tratamento das leishmanioses e do câncer, doenças antigas, mas que apresentam tratamento inseguro e com perspectiva de aumento da incidência, como é o caso do câncer, sintetizou-se inibidores reversíveis das catepsinas, que são proteases de cisteína pertencente a família da papaína, baseados na tiossemicarbazida.

Tais inibidores pertencem a uma série inédita de ariloxaetiltiossemicarbazonas, produzidos a partir de diferentes fenóis, através de três etapas que envolvem a produção de um intermediário acetal, sua hidrólise e posterior condensação com a tiossemicarbazida, obtendo-se rendimentos globais moderados. Após purificação, quando necessária, estes compostos foram caracterizados através de suas propriedades físico-químicas, bem como por métodos espectroscópicos convencionais (RMN ^1H , RMN ^{13}C e IV).

Compostos estes que ao serem testados frente a forma promastigota da *Leishmania amazonensis* apresentaram uma atividade dose e tempo dependente, com IC_{50} que variou de 25,20 $\mu\text{g/ml}$ para o composto Lss1 a 3,48 $\mu\text{g/ml}$ para o Lss2, que apresentaram atividade superior ao Glucantime, medicamento de primeira escolha, com o composto Lss2 apresentando quase o dobro da atividade da Pentamidina, medicamento utilizado nos casos de resistência ao tratamento usual. O composto que apresentou maior atividade foi justamente o que possui como substituinte do anel aromático o grupo etil, um ativante que deixa a molécula mais hidrofóbica. Relação está já esperada, uma vez que a literatura relata a presença de regiões hidrofóbicas próximas ao resíduo de cisteína catalítica.

Acredita-se que estes compostos demonstraram-se mais ativos frente às formas amastigotas, uma vez que a literatura indicada uma maior presença e importância das

catepsinas durante a transformação das promastigotas em amastigotas bem como durante essa fase.

No teste da atividade antiproliferativa frente a linhagens tumorais, observou-se que os novos inibidores apresentaram uma atividade que variou de 35,5% a 100%, com pouca atividade a muita atividade, variação esta que também obedeceu aos critérios de hidrofobicidade já citada acima. O composto Lss7 apresentou atividade superior a doxorrubicina, um medicamento utilizado em vários tipos de câncer

De um modo geral foram sintetizados inibidores com um amplo espectro de inibição e não seletivos, que apresentaram atividade que variou de acordo com a hidrofobicidade de seu radical. Representando um ponto de partida para o desenvolvimento de futuros inibidores de catepsinas de cisteína mais seletivos que podem proporcionar mudanças na terapia atual da leishmaniose e do câncer.

9. PERSPECTIVAS

- Otimização da metodologia empregada na síntese das novas ariloxaetiltiossemicarbazonas no intuito de melhorar os rendimentos reacionais;
- Síntese de uma série de ariloxaetiltiossemicarbazonas mas funcionalizada e até mesmo baseada em dipeptídios com o objetivo de desenvolver inibidores mais seletivos e menos tóxicos.
- Terminar a avaliação dos novos compostos frente a forma promastigota da *Leishmania amazonensis*, bem como a toxicidade dos mesmo frente a macrófagos.
- Avaliação da atividade destas ariloxaetiltiossemicarbazonas contra a forma evolutiva amastigota da *Leishmania amazonensis*.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, G.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; GAMBINO, D.; OTERO, L.; OLEAZAR, C.; RIGOL, C.; DENICOLA., In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, n. 18, p. 4885 – 4893, 2004.

ALEXANDER J, COOMBS GH, MOTTRAM JC. Leishmania mexicana cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. **J Immunol.** v.161, n.12, p. 6794-801, 1998.

ALVES LC, MELO RL, SANDERSON SJ, MOTTRAM JC, COOMBS GH, CALIENDO G, SANTAGADA V, JULIANO L, JULIANO MA. S1 subsite specificity of a recombinant cysteine proteinase, CPB, of *Leishmania mexicana* compared with cruzain, human cathepsin L and papain using substrates containing non-natural basic amino acids. **Eur J Biochem.** v. 268, n. 5, p. 1206-12, 2001.

ASHFORD RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol.** v. 30, p.1269-81, 2000.

BARRETT AJ. Classification of peptidases. **Methods Enzymol.**; v.244, p.1-15, 1994.

BARRETT MP, MOTTRAM JC, COOMBS GH. Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. **Trends Microbiol.** v.7, n. 2, p. 82-8, 1999.

BATES PA, ROGERS ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Curr Mol Med.** v. 4, n. 6, p. 601-9, 2004.

BENBROOK, D. M.; MADLER, M. M.; SPRUCE, L. W.; BIRCKBICHLER, P. J.; NELSON, E. C.; SUBRAMANIAN, S.; WEERASEKARE, G. M.; GALE, J. B.; PATTERSON, M. K.; WANG, B.; WANG, W.; LU, S.; ROWLAND, T. C.; DISEVESTRO, P.; LINDAMOOD, C.; HILL, D. L.; BERLIN, D. Biological activity Heteroarotinoids Exhibiting Anticancer Activity and decreased Toxicity, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 3567, 1997.

BERDOWSKA I. Cysteine proteases as disease markers. **ClinChim Acta**. v.342, p.41-69, 2004.

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BERTI, P, STORER, A.C. Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. **J. Mol. Biol.** v. 246, p. 273–283, 1995.

BERVAR A, ZAJC I, SEVER N, KATUNUMA N, SLOANE BF, LAH TT. Invasiveness of transformed human breast epithelial cell lines is related to cathepsin B and inhibited by cysteine proteinase inhibitors. **Biol Chem**. v. 384, n. 3, p. 447-55, 2003.

BESTEIRO S, WILLIAMS RA, COOMBS GH, MOTTRAM JC. Protein turnover and differentiation in Leishmania. **Int J Parasitol**. v. 37, n. 10, p. 1063-75, 2007.

BHARTI, N.;SHAILENDRA; SHARMA, S.; NAQVI, F.; AZAM, A. New Palladium(II) Complexes of 5-Nitrothiophene-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazones: Synthesis, Spectral Studies and In Vitro Anti-Amoebic Activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 13, p. 2923–2929, 2003.

BOCEDI A, DAWOOD KF, FABRINI R, FEDERICI G, GRADONI L, PEDERSEN JZ, RICCI G. Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. **FASEB J**. v. 24, n. 4, p. 1035-42, 2010.

BONDOCK, S.; KHALIFA, W.; FADDA, A. A. Synthesis and antimicrobial evaluation of some new thiazole, thiazolidinone and thiazoline derivatives starting from 1-chloro-3,4-dihydronaphthalene-2-carboxaldehyde., **Eur. J. Med. Chem**. v. 42, p. 948–954, 2007.

BORGES AR, AIRES JR, HIGINO TM, DE MEDEIROS MD, CITÓ AM, LOPES JA, DE FIGUEIREDO RC. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Exp Parasitol**. v. 132, n. 2, p. 123-8, 2012.

BRASIL. Fiocruz. Ministerio da Saúde (Org.). **As Leishmanioses**. 1997. Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/hist_rico.htm>. Acesso em: 30 out. 2011.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério Da Saúde (Org.). **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ms, 2006. 120 p.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério Da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília: Ms, 2007. 180 p.

BROOKS DR , TETLEY L , COOMBS GH , MOTTRAM JC .Processamento e tráfico de cisteína proteases em Leishmania mexicana. **J celular Sci**. v. 113, p. 4035-41, 2000.

CAIRNS RA, KHOKHA R, HILL RP. Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view. **Current Molecular Medicine**. v. 3, n. 7, p. 659–671, 2003.

CASAS, J. S.; TASENDE, M. S. G.; SORDO, J.; Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review **Coord. Chem. Rev.**, v.209,p.197.2000.

CASTIÑEIRAS, A.; BERMEJO, E.; ACKERMAN, L.J.; BERALDO, H.; WEST, D.X. Structural and spectral characterization of two bis{N(4)-alkylthiosemicarbazones} of 1-phenylglyoxal, **Journal of Molecular Structure** , v. 477, p. 1–6, 1999.

CHAVARRIA GE, HORSMAN MR, ARISPE WM, KUMAR GD, CHEN SE, STRECKER TE, PARKER EN, CHAPLIN DJ, PINNEY KG, TRAWICK ML. Initial evaluation of the antitumour activity of KGP94, a functionalized benzophenone thiosemicarbazone inhibitor of cathepsin L. **Eur J Med Chem.** v. 58, p. 568-72, 2012.

CHEN J, HUANG YW, LIU G, AFRASIABI Z, SINN E, PADHYE S, MA Y. The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 197, n. 1, p. 40-8, 2004.

CHEN Q, FEI J, WU L, JIANG Z, WU Y, ZHENG Y, LU G. Detection of cathepsin B, cathepsin L, cystatin C, urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in the sera of lung cancer patients. **Oncol Lett.** v. 2, p. 693–699, 2011.

CHEN ZS, MUTOH M, SUMIZAWA T, FURUKAWA T, HARAGUCHI M, TANI A, ET AL. Reversal of heavy metal resistance in multidrug-resistant human KB carcinoma cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 236, p. 586–590, 1997.

COPELAND, R. A. **Irreversible Enzyme Inactivators in Evaluation of Enzyme Inhibitors. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery. A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists.** New York, John Wiley & Sons: Chapter 8, 2005, pp 214– 248.

COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELLOS, M. **Substâncias Carboniladas e seus Derivados.** 1ª Ed., Porto Alegre: Editora Bookman, 2003.

COURRET N, FREHEL C, PRINA E, LANG T, ANTOINE JC. Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. **Parasitology.** v. 122, n. 3), p. 263-79, 2001.

DAVIDSON RN. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. **Drugs;** v. 56 , p. 1009-1018, 1998.

DENISE H, MCNEIL K, BROOKS DR, ALEXANDER J, COOMBS GH, MOTTRAM JC. Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. **Infect Immun.** v. 71, n. 6, p. 3190-5, 2003.

DEY S, OUELLETTE M, LIGHTBODY J, PAPADOPOULOU B, ROSEN BP. An ATP-dependent As (III)-glutathione transport system in membrane vesicles of *Leishmania tarentolae*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 93, p. 2192–2197, 1996.

DOLENC I, TURK B, PUNGERCIC G, RITONJA A, TURK V. Oligomeric structure and substrate induced inhibition of human cathepsin C. **J Biol Chem.** v. 270, n. 37, p. 21626-31,1995.

DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and structure-activity Relationship Study of potent Trypanocidal Thio semicarbazone inhibitors of the Trypanosomal Cysteine protease Cruzain **J. Med. Chem.**, v. 45, p. 2695–2707, 2002.

DUFFY, K. J.; SHAW, A. N.; DELORME, E.; DILLON, S. B.; ERICKSON-MILLER, C.; GIAMPA, L.; HUANG, Y.; KEENAN, R. M.; LAMB, P.; LIU, N.; MILLER, S. G.; PRICE, A. T.; ROSEN, J.; SMITH, H.; WIGGALL, K. J.; ZHANG, L.; LUENGO, J. I. Identification of a Pharmacophore for Thrombopoietic Activity of Small, Non-Peptidyl Molecules. 1. Discovery and Optimization of Salicylaldehyde Thiosemicarbazone Thrombopoietin Mimics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 17, p. 3573-3575, 2002.

EECKHOUT Y, VAES G. Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. **Biochem J.** v. 166, p. 21-31, 1977.

EGEBLAD M, WERB Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat RevCancer.** v. 2, p. 161-74, 2002.

EICHHORST ST, KRAMMER PH. Derangement of apoptosis in cancer. **Lancet.** v. 358, n. 9279, p. 345–346, 2001

EVAN GI, VOUSDEN KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature.** v.411, n. 6835, p. 342–348, 2001.

FERRARI, M. B.; CAPACCHU, S.; REFFO, G.; PELOSI, G.; TARASCONI, P.; ALBERTINI, R.; PINELLI, S.; LUNGHI, P. Synthesis, structural characterization and biological activity of *p*-fluorobenzaldehyde thiosemicarbazone and of nickel complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 81, n. 1-2, p. 89-97, 2000.

FIDLER IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. **Cancer Research.** v. 50, n. 19, p. 6130–6138, 1990.

FINKELSTEIN, H. Darstellung organischer Jodide aus den entsprechenden Bromiden und Chloriden. **Ber. Dtsch. Chem. Ges**, v. 43: p. 1528-1532, 1910.

FRAME MJ, MOTTRAM JC, COOMBS GH. Analysis of the roles of cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* in the host-parasite interaction. **Parasitology.** v. 121, n. 4, p. 367-77, 2000.

FROSCH BA, BERQUIN I, EMMERT-BUCK MR, MOIN K, SLOANE BF. Molecular regulation, membrane association and secretion of tumor cathepsin B. **Apms.** v. 107, p. 28-37, 1999.

FUJISE N, NANASHIM A, TANIGUCHI Y, MATSUO S, HATANO K, MATSUMOTO Y, TAGAWA Y, AYABE H. Prognostic impact of cathepsin B and matrix metalloproteinase-9

in pulmonary adenocarcinomas by immunohistochemical study. **Lung Cancer**. v. 27, p. 19–26, 2000.

GOCHEVA V, ZENG W, KE D, KLIMSTRA D, REINHECKEL T, PETERS C, HANAHAN D, JOYCE JA. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. **Genes & Development**. v. 20, n. 5, p. 543–556, 2006.

GOHLKE H, KLEBE G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. **Angew Chem Int Ed Engl**. v. 41, n. 15, p. 2644–76, 2002.

GORETZKI L, SCHMITT M, MANN K, CALVETE J, CHUCHOLOWSKI N, KRAMER M, GUNZLER WA, JANICKE F, GRAEFF H. Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. **FEBS Lett**. v. 297, p. 112–8, 1992.

GRIMM J, KIRSCH DG, WINDSOR SD, KIM CF, SANTIAGO PM, NTZIACHRISTOS V, JACKS T, WEISSLEDER R. Use of gene expression profiling to direct in vivo molecular imaging of lung cancer. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 102, p. 14404–9, 2005.

GRZONKA Z, JANKOWSKA E, KASPRZYKOWSKI F, KASPRZYKOWSKA R, LANKIEWICZ L, WICZK W, WIECZERZAK E, CIARKOWSKI J, DRABIK P, JANOWSKI R, KOZAK M, JASKÓLSKI M, GRUBB A. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochim Pol**. v. 48, n. 1, p. 1–20, 2001.

GUO M, MATHIEU PA, LINEBAUGH B, SLOANE BF, REINERS JR JJ. Phorbol ester activation of a proteolytic cascade capable of activating latent transforming growth factor-betaL a process initiated by the exocytosis of cathepsin B. **J Biol Chem**. v. 277, p. 14829–37, 2002.

HANADAK., M. TAMAI, M. YAMAGISHI, S. OHMURA, J. SAWADA, I. TANAKA, Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor, *Agric. Biol. Chem.* v. 42, p. 523–528, 1978.

HANG, H. C.; BERTOZZI, C. R. Chemoselective Approaches to Glycoprotein Assembly. **Accounts of Chemical Research**, v. 34, n. 9, p. 727–736, 2001.

HENGARTNER MO. The biochemistry of apoptosis. **Nature** v. 407, n. 6805, p. 770–776, 2000.

JEDESZKO C, SLOANE BF. Cysteine cathepsins in human cancer. **Biol Chem**. v. 385, p. 1017–27, 2004.

JOUAD, E. M.; RIOU, A.; ALLAIN, M.; KHAN, M. A.; BOUET, G. M. Synthesis, structural and spectral studies of 5-methyl 2-furaldehyde thiosemicarbazone and its Co, Ni, Cu and Cd complexes. **Polyhedron**, v. 20, n. 1–2, p. 67–74, 2001.

JOYCE JA, BARUCH A, CHEHADE K, MEYER-MORSE N, GIRAUDO E, TSAI FY, GREENBAUM DC, HAGER JH, BOGYO M, HANAHAN D. Cathepsin cysteine proteases

are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. **Cancer Cell**. v. 5, p. 443-53, 2004.

KALGUTKAR, A. S.; GARDNER, I.; OBACH, R. S.; SHAFFER, C. L.; CALLEGARI, E.; HENNE, K. R.; MUTLIB, A. E.; DALVIE, D. K.; LEE, J. S.; NAKAI, Y.; O'DONNELL, J. P.; BOER, J.; HARRIMAN, S. P. A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. **Drug Metab.** v. 6, p. 161–225, 2005.

KARABATSOS, G. J.; VANE, F.M.; TALLER, R.A.; HIS, N. Structural studies by nuclear magnetic resonance VIII. Ring-substituted phenylhydrazones, semicarbazones, and thiosemicarbazones. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 86, n. 16, p. 3351 – 3357, 1964.

KATUNUMA N, MURATA E, KAKEGAWA H, MATSUI A, H TSUZUKI, TSUGE H, D TURK, TURK V, M FUKUSHIMA, TADA Y, ASAO T. Structure based development of novel specific inhibitors for cathepsin L and cathepsin S in vitro and in vivo. **FEBS Lett.** v. 458, p. 6–10, 1999.

KATUNUMA N. Structure-based development of specific inhibitors for individual cathepsins and their medical applications. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.** v. 87, n. 2, p. 29–39, 2011.

KAYE P, SCOTT P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol.** v. 9, p. 604-15, 2011.

KLIMOVA, T.; KLIMOVA, E.I.; MARTÍNEZ GARCÍA, M.; MÉNDEZ STIVALET, J.M.; RUÍZ RAMÍREZ, L. The reactions of semicarbazide and thiosemicarbazide with ferrocenyl-substituted α - β -enones., **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 633, p. 137–142, 2001.

KOFF AB, ROSEN T. Treatment of cutaneous leishmaniasis. **J Am Acad Dermatol**; v. 31, p. 693-708, 1994.

KRUEGER S, HAECKEL C, BUEHLING F, ROESSNER A. Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in a human osteosarcoma cell line. **Cancer Res.** v. 59, p. 6010-4, 1999.

KURUP, M.R.P.; JOSEPH, M. Transition Metal Complexes of Furan-2-aldehyde Thiosemicarbazone, **Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.**, v. 33, p. 1275, 2003.

LAUFS S, SCHUMACHER J, ALLGAYER H. Urokinase-receptor (u-PAR): A essential player in multiple games of cancer: A review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. **Cell Cycle**. v. 5, p. 1760-71, 2006.

LEITE, A. C. L.; MOREIRA, D. R. M.; COELHO, L. C. D.; MENEZES, F. D., BRONDANI, D. J. Synthesis of aryl-hydrazones via ultrasound irradiation in aqueous medium. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 9, p. 1538–1541, 2008.

LEVICAR N, DEWEY RA, DALEY E, BATES TE, DAVIES D, KOS J, PILKINGTON GJ, LAH TT. Selective suppression of cathepsin L by antisense cDNA impairs human breast cancer cell invasion in vitro and promotes apoptosis. **Cancer Gene Ther.** v.10, p.141-51, 2003.

LI C, CHEN L, WANG J, ZHANG L, TANG P, ZHAI S, GUO W, YU N, ZHAO L, LIU M, YANG S. Expression and clinical significance of cathepsin B and stefin A in laryngeal cancer. **Oncol Rep.** v. 26, n.4, p. 869-75, 2011.

LIMA AK, ELIAS CG, SOUZA JE, SANTOS AL, DUTRA PM. Dissimilar peptidase production by avirulent and virulent promastigotes of *Leishmania braziliensis*: inference on the parasite proliferation and interaction with macrophages. **Parasitology.** v.136(10), p.1179-91, 2009.

LIPINSKI CA, LOMBARDO F, DOMINY BW, FEENEY PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev.** v.46(1-3): p.3-26, 2001.

LÓPEZ-OTÍN C1, BOND JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **J Biol Chem.** v. 283, n. 45, p. 30433-7, 2008.

MCCONVILLE MJ, MULLIN KA, ILGOUTZ SC, TEASDALE RD. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. **Microbiol Mol Biol Rev.** v. 66, n.1, p.122-54, 2002.

MCGRATH M. As cisteína proteases lisossomais. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** v. 28, p. 181-204, 1999.

MÉDICOS SEM FRONTEIRAS. **Desequilíbrio fatal: a crise em pesquisa e desenvolvimento de drogas para doenças negligenciadas.** Geneva: Grupo de Trabalho de Drogas para Doenças Negligenciadas, Médicos Sem Fronteiras; 2001.

MOREIRA, D. R. M. **Sínteses de hidrazidas, hidrazonas e 4-tiazolinonas e a avaliação das atividades anti-*Trypanosoma cruzi*.** 116 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Recife, 2008.

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

MOTTRAM JC, FRAME MJ, BROOKS DR, TETLEY L, HUTCHISON JE, SOUZA AE, COOMBS GH. The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. **J Biol Chem.** v. 272, n. 22, p. 14285-93, 1997.

MOTTRAM JC, SOUZA AE, HUTCHISON JE, CARTER R, FRAME MJ, COOMBS GH. Evidence from disruption of the *lmcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 93, n. 12, p. 6008-13, 1996.

MUSIL D., ZUCIC D., TURK D., ENGH R.A., MAYR I., HUBER R., POPOVIC T., TURK V., TOWATARI T., KATUNUMA N., BODE W. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure

of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. **EMBO J.** v. 10, p. 2321–2330, 1991.

NAVAB R, MORT JS, BRODT P. Inhibition of carcinoma cell invasion and liver metastases formation by the cysteine proteinase inhibitor E-64. **Clin Exp Metastasis.** v. 15, p. 121-9, 1997.

OLIVIER M, HASSANI K. Protease inhibitors as prophylaxis against leishmaniasis: new hope from the major surface protease gp63. **Future Med Chem.** v. 2, n. 4, p. 539-42, 2010.

OUELLETTE M, DRUMMELSMITH J, PAPADOPOULOU B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resist Updat.;** v. 7, p. 257-66, 2004.

PAKSOY M, HARDAL U, CAGLAR C. Expression of cathepsin D and E-cadherin in primary laryngeal cancers correlation with neck lymph node involvement. **J Cancer Res Clin Oncol.** v. 137, n. 9, p. 1371-7, 2011.

PALENIK, G. J.; RENDLE, D. F.; CARTER, W. S. The Crystal and Molecular Structures of Thiosemicarbazones; an Antitumor Agent 5-hydroxy-2-formylpyridine Thiosemicarbazone Sesquihydrate and the Inactive Acetone Thiosemicarbazone. **Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry,** v. 30, n. 10, p. 2390-2395, 1974.

PANDEYA, S.N.; SRIRAM, D.; NATH, G.; DECLERCQ, E. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of Schiff and Mannich bases derived from isatin derivatives and *N*-[4-(49-chlorophenyl)thiazol-2-yl] thiosemicarbazide., **European Journal of Pharmaceutical Sciences,** v.9, p. 25–31, 1999

PEARSON RD1, SOUSA AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clin Infect Dis.** v. 22, p. 1-13, 1996.

PINK R, HUDSON A, MOURIÈS MA, BENDIG M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nat Rev Drug Discov.** v. 4, n. 9, p.727-40, 2005.

POPAT K, MCQUEEN K, FEELEY T.W. The global burden of cancer. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology.** v. 27, p. 399-408, 2013.

PREMZL A, ZAVASNIK-BERGANT V, TURK V, KOS J. Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neo T cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. **Exp Cell Res.** v. 283, p. 206-14, 2003.

RAMACHANDRAN, R.; RANI, M.; KABILAN, S. Synthesis, structure and conformational analysis of 2,4-diaryl-3-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-one thiosemicarbazones and semicarbazones, **Journal of Molecular Structure,** v. 970, p. 42–50, 2010.

RAWLINGS ND, BARRETT AJ. Evolutionary families of peptidases. **Biochem J.** v. 290, p. 205-18, 1993.

RAWLINGS ND, BARRETT AJ. Families of serine peptidases. **Methods Enzymol.;** v. 244, p. 19-61, 1994.

ROSHY S, SLOANE BF, MOIN K. Peri cellular cathepsin B and malignant progression. **Cancer Metastasis Rev**, v. 22, p. 271-86, 2003.

ROUSSELET N, MILLS L, JEAN D, TELLEZ C, BAR-ELI M, FRADE R. Inhibition of tumorigenicity and metastasis of human melanoma cells by anti-cathepsin L single chain variable fragment. **Cancer Res**. v. 64, p. 146-51, 2004.

SANTHAKUMARI, R.; RAMAMURTHI, K.; VASUKI, G.; YAMIN, B. M.; BHAGAVANNARAYANAE, G. Synthesis and spectral characterization of acetophenone thiosemicarbazone—A nonlinear optical material. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 76, n. 3-4, p. 369-375, 2010.

SARAVIA NGL VALDERRAMA M, LABRADA AF, HOLGUÍN C, NAVAS G, PALMA A, WEIGLE KA. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases** v.159, p. 725-735, 1989

SCHECHTER I, BERGER A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 27, n. 2, p. 157-62, 1967.

SCHRÖDER J, NOACK S, MARHÖFER RJ, MOTTRAM JC, COOMBS GH, SELZER PM. Identification of semicarbazones, thiosemicarbazones and triazine nitriles as inhibitors of *Leishmania mexicana* cysteine protease CPB. **PLoS One**. v. 8, n. 10, p. 77460, 2013.

SELZER PM, PINGEL S, HSIEH I, UGELE B, CHAN VJ, ENGEL JC, BOGYO M, RUSSELL DG, SAKANARI JA, MCKERROW JH. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 28, p. 11015-22, 1999.

SERENO D, CAVALEYRA M, ZEMZOUMI K, MAQUAIRE S, OUAISSI A, LEMESRE JL. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. **Antimicrob Agents Chemother**; v. 42, p. 3097-30102, 1998.

SERENO D, LEMESRE JL. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. **Antimicrob Agents Chemother**; v.41, n.5, 972-976, 1997.

SHAW JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 89, n. 3, p. 471-8, 1994.

SINGH J, PETTER RC, BAILLIE TA, WHITTY A. The resurgence of covalent drugs. **Nat Rev Drug Discov**. v. 10, n. 4, p. 307-17, 2011

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **J. Natl. Cancer Inst**. v.82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SMITH, A. J.; ZHANG, X.; LEACH, A. G.; HOUK, K. N. Beyond picomolar affinities: quantitative aspects of noncovalent and covalent binding of drugs to proteins. **J. Med. Chem.** v. 52, p. 225–233, 2009

SOMOGYI, L. Reactions of Flavonoid Thiosemicarbazones under Acetylating Conditions. **Tetrahedron**, v. 47, n. 44, p. 9305-9316, 1991.

ST HILAIRE PM, ALVES LC, HERRERA F, RENIL M, SANDERSON SJ, MOTTRAM JC, COOMBS GH, JULIANO MA, JULIANO L, AREVALO J, MELDAL M. Solid-phase library synthesis, screening, and selection of tight-binding reduced peptide bond inhibitors of a recombinant *Leishmania mexicana* cysteine protease B. **J Med Chem.** v. 45, n.10, p. 1971-82, 2002.

STEVERDING D, CAFFREY CR, SAJID M. Cysteine proteinase inhibitors as therapy for parasitic diseases: advances in inhibitor design. **Mini Rev Med Chem.** v. 6, n. 9, p. 1025-32, 2006.

SUDHANDIRAN G, SHAHA C. Antimonial -induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. **J Biol Chem;** v.278, p.25120–25132, 2003.

SZPADERSKA AM, FRANKFATER A. An intra cellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer. **Cancer Res.** v. 61, p. 3493-500, 2001.

TARASCONI, P.; CAPACCHI, S.; PELOSI, G.; CORNIA, M.; ALBERTINI, R.; BONATI, A.; DALL'AGLIO, P.P.; LUNGHI, P.; PINELLI, S. Synthesis, Spectroscopic Characterization and Biological Properties of New Natural Aldehydes Thiosemicarbazones., **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 157-162, 2000.

TENÓRIO, R. P.; Góes, A. J. S.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; ALVES, A. J.; AQUINO, T. M. Tiossemicarbazonas: Métodos de Obtenção, Aplicações Sintéticas Importância Biológica. **Química Nova**, v. 28, p. 1030-1037, 2005.

TOCHER, J. H.; Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. **Gen. Pharmac.** v. 28, p. 485, 1997.

TORNØE CW, SANDERSON SJ, MOTTRAM JC, COOMBS GH, MELDAL M. Combinatorial library of peptidotriazoles: identification of [1,2,3]-triazole inhibitors against a recombinant *Leishmania mexicana* cysteine protease. **J Comb Chem.** v. 6, n. 3, p. 312-24, 2004.

TORRES-SANTOS EC, LOPES D, OLIVEIRA RR, CARAUTA JP, FALCAO CA, KAPLAN MA, ROSSI-BERGMANN B. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. **Phytomedicine.** v. 11, n. 2-3, p. 114-20, 2004.

TOWATARI T, T NIKAWA, MURATA M, YOKOO C, M TAMAI, HANADA K, N KATUNUMA. Novel epoxysuccinylpeptides. a selective inhibitor of cathepsin B, in vivo. **FEBS Lett.**, v. 280, p. 311–315, 1991.

TSUGE H., NISHIMURA T., TADA Y., ASAO T., TURK D., TURK V., KATUNUMA N. Inhibition mechanism of cathepsin L - specific inhibitors based on the crystal structure of papain-CLIK148 complex. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 266, p. 411–416, 1996.

TURK B, TURK D, TURK V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. **Biochim Biophys Acta.** v. 1477, n. 1-2, p. 98-111, 2000.

TURK B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nat Rev Drug Discov.** v. 5, n. 9, p. 785-99, 2006.

TURK D, GUNCAR G, PODOBNIK M, TURK B. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. **Biol Chem.** v. 379, n. 2, p. 137-47, 1998.

TURK D, GUNCAR G. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.** v. 59, n. 2, p. 203-13, 2003.

TURK D., PODOBNIK M., POPOVIC T., KATUNUMA N., BODE W., HUBER R., TURK V. Crystal structure of cathepsin B inhibited with CA030 at 2.0-Å resolution: A basis for the design of specific epoxysuccinyl inhibitors. **Biochemistry.** v. 34, p. 4791–4797, 1995.

TURK V , TURK B , D TURK . Lysosomal cisteína proteases : fatos e oportunidades. **EMBO J.** v. 20, n. 17, p. 4629-33, 2001.

UEDA-NAKAMURA T, DA CONCEIÇÃO ROCHA SAMPAIO M, CUNHA-E-SILVA NL, TRAUB-CSEKO YM, DE SOUZA W. Expression and processing of megasome cysteine proteinases during *Leishmania amazonensis* differentiation. **Parasitol Res.** v. 88, n. 4, p. 332-7, 2002.

WERLE B, KRAFT C, LAH TT, KOS J, SCHANZENBÄCHER U, KAYSER K, EBERT W, SPIESS E. Cathepsin B in infiltrated lymph nodes is of prognostic significance for patients with nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer.** v. 89, p. 2282–2291, 2000.

WILIAMS, D. P. Toxicophores: investigations in drug safety **Toxicology.** v. 226, p. 1– 11, 2006.

WILLIAMS, D. H.; STEPHENS, E.; O'BRIEN, D. P.; ZHOU, M. Understanding noncovalent interactions: ligand binding energy and catalytic efficiency from ligand-induced reductions in motion within receptors and enzymes. **Angew. Chem.** v. 43, p. 6596-6616, 2004.

WOLF DH. Proteases as biological regulators. Introductory remarks. **Experientia.**; v. 48, n. 2, p. 117-118, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases.** Geneva, 2010. p.105-6.

YILDIZ, M.; UNVER, H.; ERDENER, D.; KIRAZ, A.; ISKELELI, N.O. Synthesis, spectroscopic studies and crystal structure of (E)-2-(2,4 dihydroxybenzylidene) thiosemicarbazone and (E)-2-[(1H-indol-3-yl)methylene]thiosemicarbazone, **Journal of Molecular Structure,** v. 919, p. 227–234, 2009.