



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**TIBÉRIO CÉZAR DE SOUZA FIGUEIRÊDO**

**DERIVADOS 5-METIL-INDOL-TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE,  
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA**

**Recife – 2017**

**TIBÉRIO CÉZAR DE SOUZA FIGUEIRÊDO**

**DERIVADOS 5-METIL-INDOL-TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE,  
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito necessário ao grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de Planejamento e Síntese de Fármacos.

**Orientadora:**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria do Carmo Alves de Lima**

**Co-orientador:**

**Prof. Dr. Luiz Carlos Alves**

**Recife – 2017**

Catálogo na Fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

F475d Figueirêdo, Tibério César de Souza.  
Derivados 5-metil-indol-tiossemicarbazonas: síntese, elucidação estrutural e avaliação esquistossomicida / Tibério César de Souza Figueirêdo. – 2017.  
62 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2017.

Inclui referências.

1. Esquistossomose. 2. Tiossemicarbazonas. 3. Praziquantel. I. Lima, Maria do Carmo Alves de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-219)

**TIBÉRIO CÉZAR DE SOUZA FIGUEIRÊDO**

**" DERIVADOS 5-METIL-INDOL-TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE,  
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA "**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito necessário ao grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de Planejamento e Síntese de Fármacos.

Aprovado em: 14/06/2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria do Carmo Alves de Lima (Presidente e Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Examinador Externo)

Universidade Estadual da Paraíba

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anekécia Lauro da Silva (Examinadora Externa)

Universidade Federal do Vale do São Francisco

---

Prof. Dr. Tiago Bento de Oliveira (Examinador Externo)

Instituto Federal de Alagoas

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

**REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof<sup>a</sup>. Vânia Pinheiro Ramos

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

**SUB-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Betânia Lucena Domingues Hatzlhofe

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

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

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

**DEDICO ESTE TRABALHO**

Aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido capacidades físicas e intelectuais para chegar onde cheguei e continuar minha caminhada.

Aos meus pais, por todo o exemplo de vida, carinho, amor e atenção. É graças a vocês que sou quem eu sou hoje.

Aos meus irmãos, por serem meus primeiros amigos, pelo companheirismo e compreensão.

A Denis, por ser minha base, meu suporte, por ser meu companheiro e por me aguentar nos bons e maus momentos.

Aos meus tios Nereu, Nilson, Salete, Socorro, Ilda, Liu, Cleide e primos, por acreditarem e torcerem pelo meu sucesso.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Maria do Carmo Alves de Lima, pela confiança em mim depositada.

Ao meu co-orientador, Prof.º Luiz Carlos Alves e o Prof.º Fábio Brayner, pelo suporte e por terem me aberto as portas de seu laboratório.

Aos meus amigos Renata e Paulo, por todos os momentos vividos e compartilhados durante esta etapa e tantas outras.

A meu amigo Serginho, por todo o conhecimento adquirido e dedicação em passar informações.

A Cezar, por ter me dado grande suporte em momentos difíceis e por toda paciência em ensinar.

A Karla, por toda a ajuda, paciência e carinho ao transmitir seus conhecimentos.

Aos colegas de laboratório que compõem o LQIT: Íris, Miguel, Mirela, Keriolaine, Amélia, Jamerson, Allana, Paula, Diogo, Nayara, por fazerem parte do dia a dia de trabalho.

Aos colegas que o LBCM me trouxe: Nairon, Gabriel, Camila, Amanda, Elverson, Rubens, pelo auxílio, apoio e aprendizado.

Aos meus incríveis amigos, que compreenderam minha ausência em alguns – tantos – momentos e por fazer dos nossos encontros, sempre muito prazerosos e divertidos.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Mapa representativo dos países identificando a prevalência de esquistossomose	19
<b>Figura 2</b>	Ciclo biológico dos helmintos	21
<b>Figura 3</b>	Estrutura química do Estibofeno	23
<b>Figura 4</b>	Estruturas químicas da Lucantona e Hicantona	24
<b>Figura 5</b>	Estrutura química do Niridazol	24
<b>Figura 6</b>	Estrutura química da Oxamniquina	25
<b>Figura 7</b>	Estrutura química do Praziquantel	26
<b>Figura 8</b>	Derivado da Trioxaquina PA1259	30
<b>Figura 9</b>	Estrutura química do 8-hidroxiquinolina	31
<b>Figura 10</b>	Estrutura química da Piplartina	31
<b>Figura 11</b>	Estrutura química do Clorambucil	32
<b>Figura 12</b>	Estrutura química da Menadiona	33
<b>Figura 13</b>	Estrutura química representando o esqueleto básico das tiossemicarbazonas. R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> e R <sub>4</sub> : H, alquil e aril	34
<b>Figura 14</b>	Região de campo baixo evidenciando o singlete da metila	47
<b>Figura 15</b>	Região de campo alto evidenciando os hidrogênios das porções: azometínica, aromática, hidrazínica e indólica	47
<b>Figura 16</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C evidenciando os carbonos do campo desblindado e o carbono do campo blindado	48
<b>Figura 17</b>	Espectro de COSY para o composto AP-08, evidenciando o acoplamento entre o hidrogênio ligado ao nitrogênio indólico e o hidrogênio ligado ao carbono vizinho ao nitrogênio	49
<b>Figura 18</b>	Espectro bidimensional HMBC evidenciando os hidrogênios e carbonos acoplados	50
<b>Figura 19</b>	Espectro bidimensional HMBC evidenciando os acoplamentos entre o hidrogênio da metila e os carbonos do anel indol	50
<b>Figura 20</b>	Espectro bidimensional HSQC evidenciando as duas ligações C-H da função azometínica e indólica	51
<b>Figura 21</b>	Efeito dos compostos sobre a produção de nitrito em macrófagos J774	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Atividade citotóxica dos compostos tiosemicarbazonas	51
<b>Tabela 2</b>	Percentual de motilidade e mortalidade (em %) dos parasitos de <i>Schistosoma mansoni</i> frente aos derivados tiosemicarbazonas	55

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b>	Mecanismo de obtenção das tiosemicarbazidas	35
<b>Esquema 2</b>	Mecanismo de obtenção das tiosemicarbazonas	36
<b>Esquema 3</b>	Diagrama geral da síntese das tiosemicarbazonas	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>μL</b>	microlitros
<b>μM</b>	micromolar
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>COSY</b>	Homonuclear Correlation Spectroscopy
<b>DMSO</b>	Dimetilssulfóxido
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Correlation
<b>IFN-γ</b>	Interferon gama
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-5</b>	Interleucina 5
<b>LQIT</b>	Laboratório de Química e Inovação Terapêutica
<b>MLC</b>	Concentração letal mínima
<b>MMV</b>	Medicines for Malaria Venture
<b>MTT</b>	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
<b>OMS/WHO</b>	Organização Mundial da Saúde / World Health Organization
<b>ON</b>	Óxido nítrico
<b>OXA</b>	Oxamniquina
<b>PPP</b>	Parceria público-privada
<b>PZQ</b>	Praziquantel
<b>RDR</b>	Ribonucleotídeo Difosfato Redutase
<b>Rf</b>	Razão de frente
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SmCB1</b>	Catepsina B1 do <i>S. mansoni</i>
<b>Th1</b>	Células T helper tipo 1
<b>Th2</b>	Células T helper tipo 2
<b>TRG</b>	Tiorredoxina glutationa redutase

## RESUMO

A esquistossomose é reconhecida como um sério problema de saúde pública no mundo e, dentre as doenças negligenciadas, é a segunda mais abrangente do mundo, atrás apenas da malária. O número estimado de pessoas afetadas pela doença em todo mundo passa de 240 milhões. No Brasil, estima-se que o número de infectados varia em torno de 6 milhões. Fatores como a falta de acesso à água potável e saneamento básico contribuem para a disseminação e prevalência da doença, que é mais presente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, em regiões tropicais do globo. O Praziquantel (PZQ) é o medicamento de escolha para o tratamento. No entanto, a literatura já apresenta relatos de possíveis cepas de *S. mansoni* resistentes ao tratamento, demonstrando a necessidade de haver desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento da esquistossomose mansônica. O núcleo tiossemicarbazona apresenta uma estrutura privilegiada, apresentando um perfil farmacológico amplo. Graças a essas características, é descrito na literatura inúmeras atividades, para as quais ele é estudado, incluindo a esquistossomicida. Neste trabalho foram sintetizados seis novos compostos tiossemicarbazonas, a partir da reação indireta de obtenção de derivados tiossemicarbazidas (LQIT/LT) através de reação de adição nucleofílica entre a hidrazina e o isotiocianato correspondente. Em seguida, foi realizada reação de condensação da tiossemicarbazida obtida com o aldeído correspondente. Os derivados obtidos (LQIT/AP) apresentaram rendimentos satisfatórios e foram elucidados estruturalmente através de técnicas espectroscópicas (RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ ). Foram submetidos aos testes de citotoxicidade para avaliar a viabilidade celular em células Vero e linhagem macrofágicas J774, teste de quantificação de óxido nítrico, além de teste de atividade *in vitro* frente a parasitos adultos de *S. mansoni*. O derivado LQIT/AP-02 apresentou menor citotoxicidade dentre todos os compostos tiossemicarbazonas testados, sendo, inclusive, menos tóxico que o próprio PZQ. Todos os derivados tiossemicarbazonas apresentaram capacidade de estimular a produção de óxido nítrico, sugerindo atividade imunomoduladora. Nos testes *in vitro* o composto LQIT/AP-02 foi capaz de matar 100% dos helmintos em 96 horas de teste. Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que o derivado LQIT/AP-02 é o promissor deste estudo.

Palavras-chave: Esquistossomose. Tiossemicarbazonas. Praziquantel.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is recognized as a serious public health problem in the world and, among neglected diseases, is the second broadest in the world, behind only malaria. The estimated number of people affected by the disease worldwide is over 240 million. In Brazil, it is estimated that the number of infected varies around 6 million. Factors such as lack of access to safe drinking water and basic sanitation contribute to the spread and prevalence of the disease, which is more present in underdeveloped and developing countries in tropical regions of the globe. Praziquantel (PZQ) is the medicine of choice for treatment. Nevertheless, the literature already presents reports of possible strains of *S. mansoni* resistant to the treatment, demonstrating the necessity of development of new drugs more effective and less toxic for the treatment of schistosomiasis mansoni. The nucleus thiosemicarbazone presents a privileged structure, presenting a broad pharmacological profile. Thanks to these characteristics, a number of activities for which it is studied, including the schistosomicidal agent, are described in the literature. In this work six new thiosemicarbazones compounds were synthesized, from the indirect reaction to obtain thiosemicarbazides derivatives (LQIT/LT) through nucleophilic addition reaction between the hydrazine and the corresponding isothiocyanate. Then, a condensation reaction of the thiosemicarbazide obtained with the corresponding aldehyde was performed. The obtained derivatives (LQIT/AP) showed satisfactory yields and were structurally elucidated by spectroscopic techniques ( $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR). They were submitted to cytotoxicity tests to evaluate cell viability in Vero cells and J774 macrophages, nitric oxide quantification test as well as *in vitro* activity test against adult *S. mansoni* parasites. The LQIT/AP-02 derivative shown less cytotoxicity among all thiosemicarbazones compounds tested, has been even less toxic than PZQ. All derivatives thiosemicarbazones showed able to stimulate production of nitric oxid, suggesting immunomodulatory activity. *In vitro* tests the compound LQIT/AP-02 was able to eradicate 100% of parasites in ninety-sixty test hours. In view of these results it was possible to conclude that the compound LQIT/AP-02 is the promising of this study.

Keywords: Schistosomiasis. Thiosemicarbazones. Praziquantel.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Dados Epidemiológicos</b>	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Ciclo Biológico</b>	<b>19</b>
<b>3.3</b>	<b>Patologia</b>	<b>20</b>
<b>3.4</b>	<b>Quimioterapia</b>	<b>21</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Oxamniquina</b>	<b>23</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Praziquantel</b>	<b>24</b>
<b>3.4.2.1</b>	<b>Resistência ao Praziquantel</b>	<b>26</b>
<b>3.5</b>	<b>Perspectivas de novos fármacos</b>	<b>27</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Trioxaquinas</b>	<b>28</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Hidroxiquinolina</b>	<b>28</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Piplartina</b>	<b>29</b>
<b>3.5.4</b>	<b>Clorambucil</b>	<b>30</b>
<b>3.5.5</b>	<b>Menadiona</b>	<b>31</b>
<b>3.6</b>	<b>Tiossemicarbazonas</b>	<b>31</b>
<b>3.6.1</b>	<b>Química</b>	<b>31</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Importância biológica</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiais e métodos – Estudo químico</b>	<b>35</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Materiais, reagentes e solventes</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Equipamentos</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Procedimentos experimentais</b>	<b>36</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Diagrama geral de síntese</b>	<b>36</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Síntese dos derivados intermediários tiossemicarbazidas (LQIT/LT)</b>	<b>37</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Síntese dos derivados finais tiossemicarbazonas (LQIT/AP)</b>	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>Materiais e métodos – Estudo biológico</b>	<b>37</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Animais</b>	<b>37</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Materiais e métodos</b>	<b>38</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Procedimentos experimentais</b>	<b>38</b>
<b>4.4.3.1</b>	<b>Avaliação da citotoxicidade celular dos derivados tiossemicarbazonas frente às linhagens de células macrofágicas J774 e células Vero</b>	<b>38</b>
<b>4.4.3.2</b>	<b>Avaliação da produção de óxido nítrico (ON)</b>	<b>39</b>
<b>4.4.3.3</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>39</b>
<b>4.4.3.4</b>	<b>Infecção por <i>Schistosoma mansoni</i></b>	<b>40</b>
<b>4.4.3.5</b>	<b>Perfusão do sistema porta para recuperação de parasitos adultos de <i>Schistosoma mansoni</i></b>	<b>40</b>

4.4.3.6	Avaliação da suscetibilidade in vitro de parasitos adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> frente aos derivados tiossemicarbazonas	40
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	41
5.1	Estudo químico	41
5.1.1	Características físico-químicas e espectroscópicas dos compostos tiossemicarbazonas sintetizados	41
5.1.1.1	N-fenil-2-[(5-metil-1H-indol-3-il)etileno]-hidrazinacarboxitioamida (AP-01)	41
5.1.1.2	N-(4-metoxifenil)-2-[(5-metil-1H-indol-3-il)etileno]-hidrazinacarboxitioamida (AP-02)	41
5.1.1.3	N-(4-bromofenil)-2-[(5-metil-1H-indol-3-il)etileno]-hidrazinacarboxitioamida (AP-04)	42
5.1.1.4	N-alil-2-[(5-metil-1H-indol-3-il)etileno]-hidrazinacarboxitioamida (AP-06)	42
5.1.1.5	N-(naftaleno-2-il)-2-[(5-metil-1H-indol-3-il)etileno]-hidrazinacarboxitioamida (AP-08)	43
5.1.1.6	N-(4-clorofenil)-2-[(5-metil-1H-indol-3-il)etileno]-hidrazinacarboxitioamida (AP-10)	43
5.2	Estudo biológico	49
5.2.1	Avaliação da citotoxicidade em linhagens de células Vero e macrofágicas J774 dos derivados tiossemicarbazonas	49
5.2.2	Avaliação do teste de quantificação indireta de ON	49
5.2.3	Avaliação dos parasitos adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> frente aos derivados tiossemicarbazonas	50
5.2.3.1	Motilidade dos parasitos	50
5.2.3.2	Mortalidade dos parasitos	51
5.3	Discussão	53
6	<b>CONCLUSÃO</b>	55
6.1	Perspectivas	56
	<b>REFERÊNCIAS</b>	57

## 1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é reconhecida como um sério problema de saúde pública no mundo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que mais de 240 milhões de pessoas em todo o mundo são afetadas pela doença e que mais de 700 milhões de pessoas vivem em áreas onde a doença é endêmica (WHO, 2016).

A incidência desta patologia é descrita majoritariamente em regiões que carecem de saneamento básico de qualidade, permitindo a proliferação dos agentes contaminantes, assim como, da continuidade de pessoas sendo infectadas (SILVA; DOMINGUES, 2011).

O tratamento medicamentoso é um fator importante no tratamento da doença, associado com melhorias e, até mesmo, implementação do saneamento básico em muitas regiões, a fim de combater ou diminuir as chances de novos indivíduos serem infectados, evitando também que outros sejam novamente infectados. Acrescentado a isso, a ausência de campanhas que promovam educação sanitária à população, bem como, a falta de divulgação de dados epidemiológicos, favorecem a continuidade da doença. O tratamento atual está centrado no Praziquantel, sendo este capaz de atuar contra as principais cepas de *S. mansoni* que infectam o ser humano, além de ser de baixo custo e apresentar menos efeitos colaterais aos pacientes (KATZ; COELHO, 2008).

No entanto, o uso exclusivo do Praziquantel possibilitou surgir relatos na literatura de que, em algumas regiões, alguns pacientes passaram a apresentar resistência ao tratamento farmacológico (PICA-MATTOCCIA et al., 2009). Diante deste cenário torna-se imprescindível que novas terapias sejam desenvolvidas, permitindo que mais pessoas possam ter acesso ao tratamento desta parasitose.

As tiossemicarbazonas são consideradas estruturas químicas privilegiadas, uma vez que permitem que seja realizadas várias substituições em seu esqueleto, permitindo uma grande variedade de compostos. Esta possibilidade permite que inúmeras reações possam ocorrer, a depender dos seus radicais substituintes. Estudos realizados e descritos na literatura já apresentaram resultados bastantes promissores em diversas áreas, como antibacteriana, anti-inflamatória, anti-tumoral, entre outras (BERALDO, 2004). Sua estrutura química permite que uma ampla variedade de radicais sejam combinados, possibilitando lançar mão de recursos da química medicinal a fim de obter estruturas previamente planejadas, objetivando obter novas moléculas com potencial atividade para a qual se destinam (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Partindo desta premissa, o presente trabalho buscou sintetizar e estudar novos compostos tiosemicarbazonas, realizar estudos de citotoxicidade e testes *in vitro* a fim de avaliar seu potencial terapêutico frente a parasitos adultos de *S. Mansoni*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Sintetizar, elucidar estruturalmente e avaliar o potencial terapêutico de novos derivados de tiossemicarbazonas das séries LQIT/AP, a partir da série de intermediários LQIT/LT.

### 2.2 Objetivos específicos

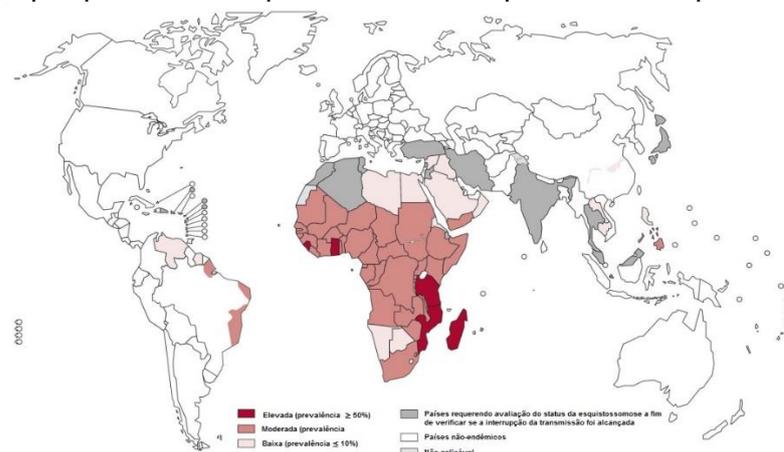
- Realizar a síntese de 6 novos derivados tiossemicarbazonas da série LQIT/AP;
- Caracterizar estruturalmente os compostos através de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono treze;
- Avaliar a atividade citotóxica dos compostos tiossemicarbazonas frente à linhagem de células VERO e células macrofágicas J774;
- Quantificar a produção de óxido nítrico frente à linhagem de células macrofágicas J774;
- Verificar *in vitro* a atividade esquistossomicida dos 6 derivados tiossemicarbazonas frente aos parasitos adultos de *S. mansoni*;

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Dados epidemiológicos

A Esquistossomose é uma doença endêmica causada pelo parasito do gênero *Schistosoma*, que são helmintos encontrados na corrente sanguínea, apresentando prevalência em regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre (figura 1). Segundo a Organização Mundial da Saúde, a esquistossomose é a segunda doença negligenciada de maior abrangência no mundo, ficando atrás apenas da malária (WHO, 2016). As três principais espécies existentes são: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, sendo estas as formas responsáveis pela esquistossomose humana (GRYSEELS, 2012).

Figura 1: Mapa representativo dos países identificando a prevalência de esquistossomose. (Adaptado)



Fonte: ANDERSON et al., 2015.

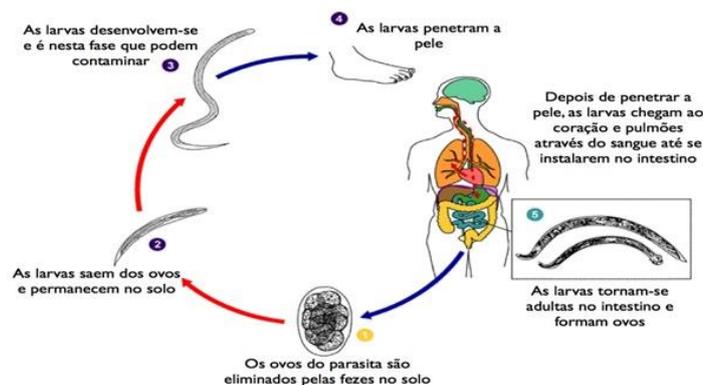
Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que mais de 240 milhões de pessoas em todo o mundo são afetadas pela doença e que mais de 700 milhões de pessoas vivem em áreas onde a doença é endêmica (WHO, 2016). Fatores como a falta de acesso à água potável, bem como locais onde não há saneamento básico contribuem para a disseminação e prevalência da doença. Além disso, não há divulgação dos locais contaminados para a população, inclusive, a ausência de programas em educação sanitária para populações de regiões endêmicas dificultam a redução do número de casos da doença. Ainda de acordo com dados da OMS, dos 78 países considerados endêmicos para a esquistossomose, apenas 52 possuem tratamento para a doença. Estima-se que do número total de pessoas que necessitaram de tratamento, que está acima dos 240 milhões de pessoas, 123,3 milhões são crianças em idade escolar e que em torno de 61 milhões de pessoas receberam o tratamento, o que equivale a um alcance global de 20,8% (WHO, 2016).

### 3.2 Ciclo biológico

Apesar de ser uma doença de abrangência global, a sua prevalência depende de condições específicas em cada região. O ciclo biológico do parasito depende diretamente do encontro do miracídio com o hospedeiro intermediário – o caramujo – para que a evolução da doença tenha prosseguimento. Para cada tipo de doença há uma espécie de caramujo específico para que o ciclo da doença prossiga. O *Schistosoma haematobium*, responsável pelo esquistossomose nas vias urogenitais no continente africano e Península Arábica, tem como hospedeiro intermediário o caramujo do gênero *Bulinus*; o *Schistosoma japonicum*, por sua vez, precisa de caramujos do gênero *Oncomelania* e é causador da esquistossomose hepatoesplênica e intestinal na China, Filipinas e Indonésia e o *Schistosoma mansoni*, caramujos do gênero *Biomphalaria*, responsável pela forma intestinal e hepática da doença na África e América do Sul (BARRETO et al., 2015).

O ciclo de vida dos helmintos – ilustrado na figura 2, tanto a forma urogenital quanto intestinal – é dependente de uma série de fatores, como a necessidade de água, além da presença de hospedeiros intermediários específicos para a continuidade do processo. Quando um indivíduo infectado elimina os ovos viáveis através das fezes e estas entram em contato com a água, ocorre a saída dos miracídios dos ovos. Após a penetração cutânea, os miracídios entram numa fase de multiplicação, havendo a formação do esporocisto; essa fase de multiplicação contínua dura de 4 a 6 semanas, havendo após esse período a formação das cercárias. As cercárias constituem a forma infectante do homem. Possuem cauda bifurcada, o que permite seu nado livre em busca do hospedeiro definitivo: o homem. Além de infectar o ser humano e dar continuidade ao ciclo biológico, as cercárias também são capazes de infectar outros mamíferos (GRYSEELS, 2012).

Figura 2: Ciclo biológico dos helmintos



Fonte: GRYSEELS, 2012.

### 3.3 Patologia

Dividida nas fases aguda e crônica, a fase aguda inicia-se com a penetração das cercárias na pele do hospedeiro. Nesta fase, dependendo da intensidade da infecção o hospedeiro pode tanto ser assintomático quanto apresentar sintomas como a dermatite urticariforme, havendo eritema, erupção papular, prurido e edema, podendo estes sintomas persistirem por até cinco dias após a infecção. Outros sintomas como febre, náuseas, vômitos, dor abdominal e cefaleia podem estar presentes a partir da terceira semana (PORDEUS et al., 2008)

Realizados exames laboratoriais a taxa de eosinófilos estará elevada, o que caracteriza infecção parasitária. Além dessas manifestações clínicas, tosse seca, diarreia aquosa grave, podendo haver presença de sangue e perda de peso podem ser sintomas mais severos que o indivíduo possa vir a desenvolver. No entanto, até se comprovar a presença de ovos do parasito nas fezes do paciente todos os demais sintomas não apresentam nenhuma especificidade à infecção cercariana (DA SILVA et al., 2005)

A fase crônica ocorre em torno de seis meses após a infecção, período este em que os parasitos acometem vários órgãos, inclusive, os locais onde ocorrem as manifestações clínicas mais graves é que irão caracterizar a forma crônica da doença: intestinal, hepatointestinal, hepatoesplênica e neurológica. A intensidade da doença tem relação com o número de órgãos afetados, bem como com a quantidade de parasitos infestando estes órgãos (PORDEUS et al., 2008). Assim como na fase aguda, a crônica geralmente é assintomática, no entanto, pacientes que sofrem sucessivas infecções podem manifestar sintomatologia, devido à excessiva oviposição (LAMBERTUCCI et al., 2000).

A forma intestinal da esquistossomose ocorre devido à resposta inflamatória granulomatosa à presença de ovos de *S. mansoni*, que foram calcificados graças à atuação imunológica do organismo do hospedeiro. A presença destes no mesentério intestinal pode levar a formação de granulomas que provocam lesões no tecido (ELBAZ; ESMAT, 2013). Pode ainda haver fibrose da alça retossigmóide, o que leva à redução do peristaltismo e consequente constipação, no entanto, a maioria dos casos crônicos é benigna, havendo alternância entre períodos de constipação e de diarreia mucosaguinolenta – ocorrendo devido a passagem de numerosos ovos para a luz intestinal, levando à formação de microlesões no tecido. A forma intestinal é quase sempre assintomática, havendo a necessidade de realização do exame parasitológico de fezes para confirmação do diagnóstico (DA SILVA et al., 2005).

A forma hepatointestinal apresenta características semelhantes à forma intestinal, sendo também, em sua maioria, quadro clínico inicial assintomático, caracterizando-se pela deposição

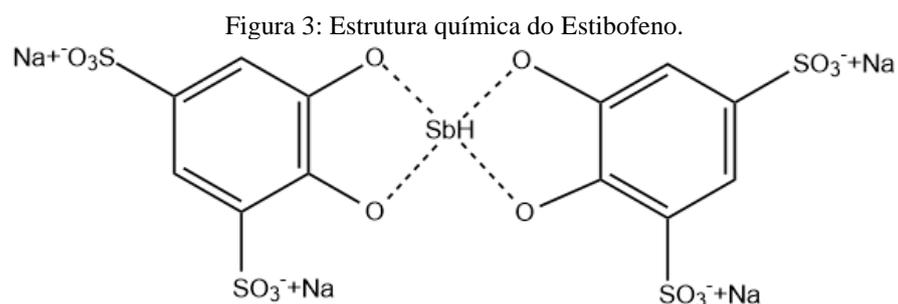
de ovos e fixação destes nas paredes do intestino e também do fígado (LAMBERTUCCI et al., 2000). A fixação dos ovos nessas regiões promove a liberação de antígenos, o que provoca uma reação inflamatória granulomatosa (COON, 2005). Com isso, a reação ocasionada irá provocar uma resposta mais intensa que resulta no comprometimento dos hepatócitos (DA SILVA et al., 2005).

A esquistossomose hepatoesplênica, por sua vez, caracteriza-se pela fibrose periportal, como resultado da inflamação crônica induzida pela deposição dos ovos de *S. mansoni*, induzindo o acúmulo de material fibroso e conseqüente lesão e destruição do tecido vascular (LAMBERLUCCI et al., 2008). Além de promover alterações vasculares levando à hipertensão portal. É considerada uma forma evolutiva da doença, onde entre 5-10% dos indivíduos infectados evoluem para este quadro. Ainda não há estudos que esclareçam as razões pelas quais a hepatoesplenomegalia desenvolver-se apenas em poucos indivíduos (ANDRADE; VAN MARCK, 1984).

### 3.4 Quimioterapia

Diante do crescente cenário da esquistossomose no mundo, a necessidade de medicamentos que pudessem combater a doença se fez necessária. Um dos fatores que sempre se apresentou como um empecilho no tratamento da esquistossomose foi o limitado número de fármacos que fossem eficazes e seguros para tratamento, o que, através do tempo, foi demonstrado que muitos foram descobertos, porém não prevaleceram por razões como toxicidade e efeitos colaterais mais graves (KATZ; COELHO, 2008).

Compostos antimoniais são utilizados nos tratamentos de enfermidades desde a antiguidade, sendo o tartarato de antimônio o primeiro fármaco utilizado no tratamento contra a esquistossomose. Dentre os compostos antimoniais pode-se destacar o dimercaptossuccinato de sódio e antimônio, além do di-(pirocatecol-2,4-dissulfonato) de sódio e antimônio, este também conhecido como Estibofeno (figura 3) (KATZ; COELHO, 2008).

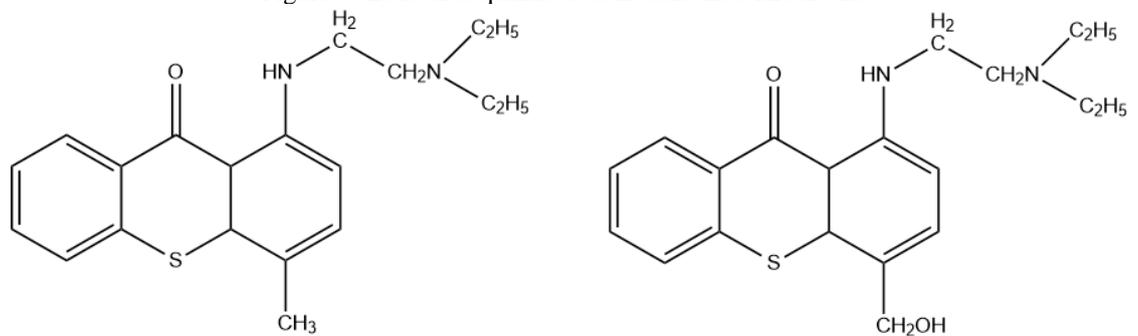


Fonte: KATZ; COELHO, 2008.

O Estibofeno pertence à classe dos antomoniais trivalentes e tem como mecanismo de ação a atuação direta sob a enzima fosfofrutoquinase – enzima responsável pela conversão da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-difosfato – inibindo-a e, conseqüentemente, impedindo a continuidade da via glicolítica do parasito, e assim sua capacidade em obter energia (BUEDING; MANSOUR, 1957). No entanto, os efeitos colaterais como ulcerações na pele e trombocitopenia, apresentados com o uso desde fármaco levaram os pacientes a abandonar o tratamento, levando-o a cair em desuso (CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1995). Os antomoniais trivalentes apresentavam eficácia contra as três principais formas do gênero *Schistosoma*, o *S. mansoni*, o *S. haematobium* e o *S. japonicum* (CHRISTOPHERSON, 1918).

Posteriormente, surgiram outros fármacos que foram utilizados no tratamento, como o 1-N-b-dietil-amino-etil-amino-4-metil-9-tioxantona, sendo conhecido como Lucantona (figura 4), bem como seu metabólito principal, o 1-N-b-dietil-amino-etil-amino-4-(hidroximetil)-9-tioxantona, denominado Hicantona, sendo comprovadamente eficazes contra o *S. mansoni* e o *S. haematobium*. Sendo que, o que no início do tratamento apenas eram relatados casos de náuseas como efeitos colaterais, passou a apresentar problemas cardiovasculares, afetando também o sistema nervoso central – SNC (KATZ; COELHO, 2008).

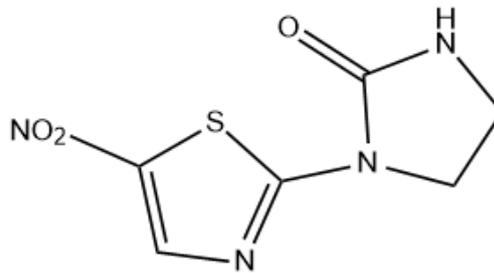
Figura 4: Estruturas químicas da Lucantona e Hicantona.



Fonte: KATZ; COELHO, 2008.

Então o fármaco 1-(5-nitro-2-tiazolil)imidazolidina-2-ona, o Niridazol (figura 5) surge como outra alternativa de fármaco eficaz no tratamento de *S. haematobium* e *S. japonicum*, porém, devido aos graves efeitos adversos como: convulsões, psicoses, alucinações auditivas e visuais, confusão e outros problemas de ordem nervosa, além de lesões hepáticas e renais, teve seu uso suspenso (KATZ; COELHO, 2008).

Figura 5: Estrutura química do Niridazol.

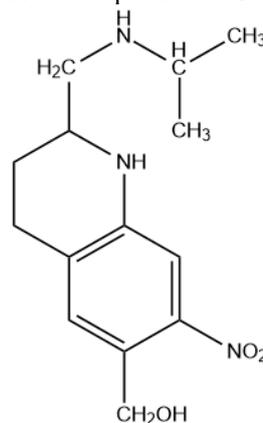


Fonte: KATZ; COELHO, 2008.

### 3.4.1 Oxamniquina

Estruturalmente designada  $(\pm)$ -1,2,3,4-tetraidro-2-[(isopropilamino)metil]-7-nitro-6-quinolinometanol, a Oxamniquina (OXA) (figura 6) é um fármaco da classe das tetraidroquinolinas, que possui atividade comprovada apenas contra o *S. mansoni*. O seu mecanismo de ação foi recentemente elucidado. O mecanismo baseia-se numa reação enzimática que ocorre após a absorção da Oxamniquina pelo parasito. Sob a forma de pró-fármaco, a OXA é convertida, através de uma sulfotransferase endógena, presente apenas no organismo do helminto, resultando em OXA sulfato éster, que é naturalmente decomposta em sua forma ativa que, por sua vez, é capaz de promover alquilação no DNA, proteínas e outras macromoléculas, promovendo alterações metabólicas e, conseqüentemente, morte do parasito (DA SILVA, et al., 2017).

Figura 6: Estrutura química da Oxamniquina.



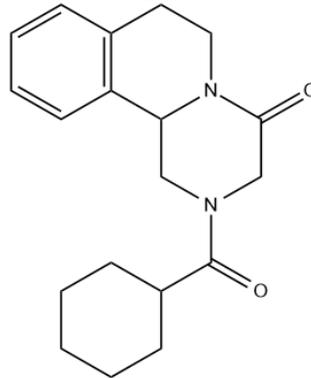
Fonte: DA SILVA et al., 2017.

É considerada o medicamento de segunda escolha no tratamento da esquistossomose nos dias atuais, ficando atrás apenas do Praziquantel, devido aos seus efeitos adversos ligados ao SNC, além do valor mais elevado, quando comparado ao primeiro (ALMEIDA et al., 2008).

### 3.4.2 Praziquantel

O surgimento deste medicamento se deu através dos esforços conjuntos dos pesquisadores dos laboratórios Merck e Bayer durante a década de 1970. Foram sintetizados aproximadamente 400 compostos da classe química dos pirazil isoquinolínicos, sendo o Praziquantel (PZQ), o medicamento de escolha para o tratamento da esquistossomose. Estruturalmente denominado como ( $\pm$ )-2-ciclo-hexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexa-hidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona (figura 7), consiste num fármaco anti-helmíntico de amplo espectro de ação indicado para o tratamento contra trematódeos e cestódeos (ANDREWS et al., 1983).

Figura 7: Estrutura química do Praziquantel.



Fonte: ANDREWS et al., 1983.

A atividade esquistossomicida do praziquantel foi demonstrada clinicamente utilizando o camundongo como modelo de estudo animal. Sua eficácia foi comprovada, clinicamente, utilizando camundongos como modelo de estudo animal. Através destes estudos ficou comprovada a eficácia deste fármaco frente a parasitos adultos de ambos os sexos, no entanto, pouco eficaz contra helmintos jovens (GONNERT; ANDREWS, 1977). A partir daí foram feitos estudos clínicos. O estudo em relação à infecção por *S. mansoni* foi realizado no Centro de Pesquisa René Rachou (FIOCRUZ; Belo Horizonte/MG - Brasil) (KATZ et al., 1979).

O Praziquantel tornou-se o medicamento de escolha para o tratamento de todas as formas da doença, tendo sido eleito pela Organização Mundial da Saúde para tal fim, apresentando taxa de cura entre 75 a 95% dos pacientes e/ou redução da liberação de ovos entre 80 e 98%. A taxa de cura varia de acordo com fatores como a idade do paciente, taxa de infecção e condição do sistema imunológico. A posologia indicada consiste em doses de 50 mg/Kg para adultos e 60mg/Kg para crianças, ambos em dose única.

A biodisponibilidade do Praziquantel é de 80%, sendo rapidamente absorvido após ser administrado via oral, onde o pico de concentração sérico é de 0,2 a 2µg/mL no intervalo de 1 a 2 horas após uma dose terapêutica de 50 mg/kg (MANDOUR et al., 1990) O fármaco administrado após as refeições torna-se mais disponível e sua eliminação se dá através da urina e fezes, ocorrendo que mais de 80% do fármaco é eliminado após 24h (STEINER et al., 1976).

A segurança do Praziquantel foi comprovada através dos estudos clínicos, nos quais, foram realizados experimentos que se basearam na administração oral do medicamento em animais e também em seres humanos. Constatou-se que farmacodinamicamente o medicamento não apresenta riscos à saúde, sendo realizados testes de toxicidade aguda que comprovaram que a referida medicação apresentou baixos índices de toxicidade tanto em animais quanto no homem. Ainda de acordo com os estudos, o Praziquantel não apresenta riscos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos (FROHBERG et al., 1981).

Por se tratar de uma substância exógena é normal que cada organismo que a receba venha a reagir de maneira diferente e, portanto, possa apresentar efeitos colaterais nos indivíduos que façam uso do fármaco. No caso do Praziquantel os efeitos colaterais relatados são tidos como passageiros e pouco frequentes, consistindo em: náuseas, vômitos, diarreia, anorexia e dores abdominais, além de efeitos a nível de sistema nervoso central como: dores de cabeça, sonolência e tontura. Outros efeitos, ainda mais raros de se manifestarem, foram relatados, tais como: febre, erupções cutâneas, fadiga e urticária (SANTOS et al., 1979).

É tido um medicamento considerado seguro, inclusive para o tratamento de mulheres diagnosticadas com a doença e que estejam grávidas, no entanto, em estudo realizado em 2003 por Olds, é recomendado que as mulheres que estejam realizando o tratamento e precisem amamentar, que aguardem 48 horas após o término do tratamento com praziquantel para voltar a amamentar. A OMS preconiza o tratamento à base do praziquantel tanto em mulheres grávidas quanto em lactantes (WHO, 2016).

O mecanismo de ação do praziquantel ainda não foi completamente elucidado (CIOLI, 2000). No entanto estudos verificaram uma série de mecanismos que ocorrem após a administração do medicamento e seus efeitos nos helmintos. Após o contato do fármaco com os parasitos reações como aumento da atividade muscular, seguido de contração de toda a musculatura levando a paralisia do parasito. Graças a paralisia, ele não é capaz de fixação, sendo então arrastado pela corrente sanguínea até o fígado, sofrendo as reações inflamatórias, resultando em sua morte (PAX et al., 1978). Ainda sobre alterações a nível tegumentar, após a administração do Praziquantel observou-se que, do contato deste com o parasito, houve deformação no tegumento tanto em parasitos machos quanto fêmeas, apresentando os machos

vacuolização e bolhas na superfície, enquanto que nas fêmeas os danos manifestaram-se nas camadas subtegumentares (MELHORN et al., 1981).

### 3.4.2.1 Resistência ao Praziquantel

Estabelecido como medicamento de escolha pela Organização Mundial de Saúde para o tratamento da esquistossomose mansônica, o Praziquantel assumiu este posto devido à sua eficácia e segurança comprovadas, baixos índices de toxicidade, efeitos colaterais brandos e passageiros, fácil administração, além de preço competitivo. No entanto, uma grande preocupação em torno de qualquer tratamento é quando a quimioterapia utilizada é restrita, de modo que, havendo resistência ao fármaco utilizado restam poucas ou nenhuma opção de tratamento a recorrer (WANG et al., 2012).

Importante definir o conceito de resistência, bem como de tolerância a fim de entender os motivos pelos quais há enorme preocupação em buscar desenvolver novos fármacos para o tratamento de doenças. De acordo com Michael Doenhoff (2002) a resistência a um fármaco caracteriza-se pela redução gradativa do efeito do fármaco durante a execução do tratamento, enquanto que a tolerância diz respeito à condição inata do indivíduo em apresentar um organismo que resiste à ação do fármaco, tendo seu organismo nunca tido contato prévio com o medicamento.

O fato de haver apenas um fármaco que agrega todas as características positivas para tratar um grande número de pessoas ao redor do mundo sempre foi uma preocupação, motivando grupos de pesquisa a buscarem novas alternativas, temendo um cenário, no qual, a medicação de escolha não apresentasse a mesma eficácia de antes. As preocupações acerca do assunto acima aumentaram quando casos de resistência ao tratamento da esquistossomose com praziquantel foram relatados em cepas de *S. mansoni* no norte do Senegal e no Egito (FALLON et al., 1995; GUISSSE et al., 1997).

No Egito foram identificados grupos que, mesmo tratados de maneira sucessiva na dosagem terapêutica (duas doses de 40 mg/Kg), seguidos de uma terapia de ataque mais forte (uma dose de 60 mg/Kg) apresentaram pacientes que expuseram ovos viáveis de *S. mansoni* nas fezes (1-2,4%) (ISMAIL et al., 1996). No Senegal um foco endêmico foi localizado no norte do país, após realização de testes em pacientes tratados com praziquantel (40 mg/Kg via oral) durante 12 semanas, onde apresentaram taxa de cura que variava entre 18-39%, sendo este valor bem abaixo do esperado (80-90%) (STELMA et al., 1995).

### 3.5 Perspectivas de novos fármacos

Os processos que envolvem à descoberta de novos fármacos tornaram-se possíveis graças aos avanços na área de química medicinal, que buscou olhar através de uma nova abordagem para novas estratégias que auxiliem na descoberta de novas estruturas moleculares candidatas a fármacos. A descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos são um processo complexo, longo e de alto custo, possuindo uma forte ligação às inovações em ciência e tecnologia. Diante disso, fatores como os avanços na química e biologia levaram a descobertas em vias bioquímicas, em alvos moleculares e também na compreensão de mecanismos que levam ao surgimento e desenvolvimento de novas doenças, tornaram possíveis inovações terapêuticas, visando a melhora na qualidade de vida de diversas populações ao redor do mundo (GUIDO; OLIVA, 2009).

Como dito anteriormente, a descoberta de novos fármacos não é um processo simples e quando o cenário analisado compreende o que engloba às doenças negligenciadas – mais precisamente as endêmicas em países em desenvolvimento nas regiões tropicais – a emergência em descobrir novos fármacos que sejam eficazes é ainda maior, uma vez que os medicamentos atuais, além de serem bastante limitados no que diz respeito à quantidade e variedade, não são totalmente eficazes no combate às endemias, além do público-alvo desses fármacos, que em sua massiva maioria carece de recursos, além de se encontrar em regiões que favorecem a infecção e proliferação dessas doenças, não desperta o interesse de grandes investidores em pesquisa e desenvolvimento (GUIDO; OLIVA, 2009).

Apesar de não haverem investimentos expressivos na pesquisa de novos fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas existem certos grupos que surgem e unem-se em prol dessa causa, que são as organizações sem fins lucrativos. Divididas em três categorias, estas têm como objetivo maior a busca por melhores tratamentos. É o caso das Organizações Não-Governamentais (ONGs), que buscam consórcios com órgãos ou indústrias que possam contribuir no tratamento de determinada doença, podendo essa parceria ser com grupos de pesquisa das universidades e indústrias farmacêuticas, como foi o caso da ONG Medicamentos Para Malária (*Medicines for Malaria Venture - MMV*), que consegue financiamento tanto do governo quanto de organizações privadas como o Welcome Trust (WT) e com esses investimentos a MMV investe em atividades de pesquisa nas universidades; das Parcerias Público-Privadas (PPPs), que surgem quando os interesses do governo sobrepõem-se aos da indústria, como foi o caso da Novartis e o governo da Singapura, no qual a indústria ficou encarregada de investir em pesquisa para o tratamento de doenças como a dengue, tuberculose

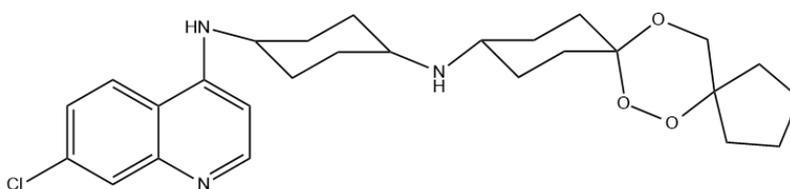
e malária, objetivando melhorar a qualidade de vida da sua população, enquanto que, para a indústria, poder se firmar em países em desenvolvimento, onde os custos são mais baixos e ainda podendo ter acesso a um banco de talentos que passa a surgir com o treinamento e aperfeiçoamento da população; por fim, através dos grupos de pesquisa das universidades, que se encarregam de pesquisar acerca de doenças que não recebem tanta ênfase por parte de grandes centros de pesquisa (MATTER; KELLER, 2008).

### 3.5.1 Trioxaquinas

Corresponde a uma classe de derivados químicos obtidos através da artemisina. As artemisinas são uma classe de compostos que vem recebendo destaque, devido à sua potencial atividade antimalárica (GARAH et al., 2008).

O metabolismo da hemoglobina é comum tanto para helmintos do gênero *Schistosoma* quanto para *Plasmodium*, levando a acreditar que a atuação desses compostos poderia ocorrer de forma semelhante em parasitos do gênero *Schistosoma* – uma vez que a atividade frente a *Plasmodium* já havia sido confirmada. Essencialmente, a ação desses compostos baseia-se na alquilação do grupo heme, interferindo em sua digestão. Como o parasito utiliza a hemoglobina do hospedeiro para nutrir-se, através da utilização desses agentes alquilantes, a disponibilidade de grupo heme livre estaria reduzida e, conseqüentemente, o parasito não teria como utilizá-lo para sua alimentação. Ficou demonstrado que, dentre os compostos testados, o PA1259 (figura 8) apresentou resultados satisfatórios tanto frente as formas larvares quanto adultas de *S. mansoni*, apresentando potencial esquistossomicida semelhante ao do Praziquantel (PRADINES et al., 2011).

Figura 8: Derivado da Trioxaquina PA1259.



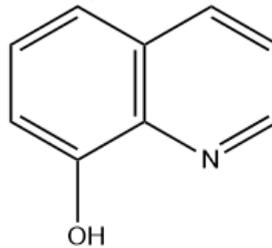
Fonte: PRADINES et al., 2011.

### 3.5.2 Hidroxiquinolina

Os derivados 8-hidroxiquinolina (figura 9) são descritos na literatura como poderosos quelantes de ferro, com propriedades antioxidantes, o que levou a apresentar interesse em

muitas áreas de desenvolvimento farmacêutico, como: inibidores de integrase, para fármacos no tratamento do HIV; antiprotozoário; inibidores da proteína quinase e agentes antifilariose (EWEAS et al., 2013).

Figura 9: Estrutura química do 8-hidroxiquinolina.



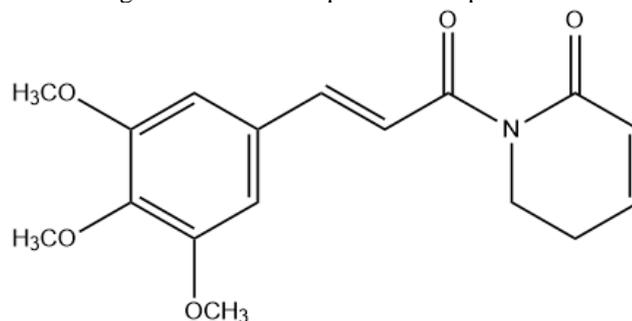
Fonte: EWEAS et al., 2013.

No que corresponde à atuação desses compostos frente a *S. mansoni*. Atribuiu-se a sua atividade à inibição da enzima tiorredoxina glutationa redutase (TGR). O mecanismo de homeostase do parasito difere do hospedeiro, sendo, portanto, a TGR a enzima crucial à sobrevivência do parasito (EWEAS et al., 2013).

### 3.5.3 Piplartina

Outra abordagem para o tratamento da *S. mansoni* consiste no controle populacional do hospedeiro intermediário – *Biomphalaria glabrata* – em regiões endêmicas à doença. A Piplartina (figura 10) é um composto natural, extraído das sementes, folhas, frutos e sementes das plantas da espécie *Piper tuberculatum*. Dentre as partes listadas anteriormente, as sementes possuem as maiores concentrações da substância ativa e, portanto, correspondem às melhores partes da planta para obter o composto (RAPADO et al., 2013).

Figura 10: Estrutura química da Piplartina.



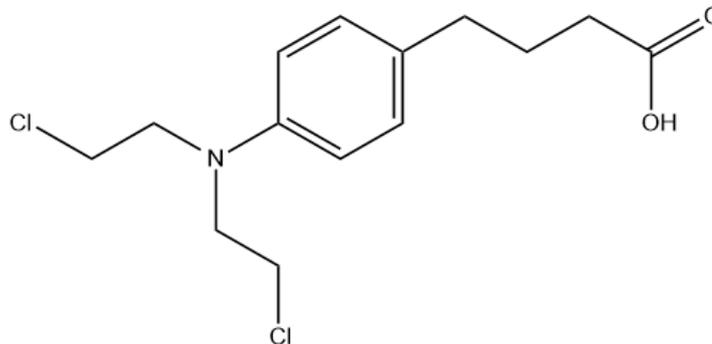
Fonte: RAPADO et al., 2013.

O estudo teve como objetivo avaliar o potencial moluscicida, em todos os estágios de desenvolvimento do caramujo. Ficou comprovado que a Pirplatina possui atividade citoxótica frente a todos os estágios do *B. glabrata* e, comparado à Niclosamida – atual moluscicida disponível comercialmente – apresentou resultados de toxicidade ao meio-ambiente inferiores, uma vez que a Niclosamida apresenta valores considerados tóxicos ao ambiente. Portanto, a Piplartina é um potencial agente moluscicida, obtido naturalmente de plantas tropicais (RAPADO et al., 2013).

### 3.5.4 Clorambucil

O Clorambucil (figura 11) é um fármaco utilizado no tratamento quimioterápico do câncer, predominantemente, na leucemia mieloide crônica. Estudos recentes avaliam a similaridade entre o estilo de vida dos parasitos e o câncer (OLIVEIRA et al., 2014), o que vem levando parasitologistas a conduzir suas pesquisas através deste viés, impulsionou a realização do estudo com Clorambucil (EISSA et al., 2016).

Figura 11: Estrutura química do Clorambucil.



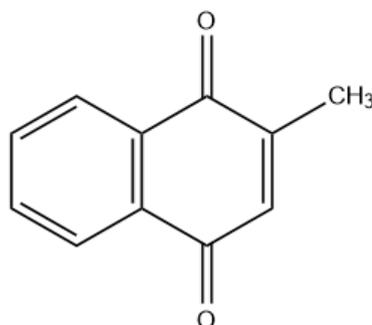
Fonte: EISSA et al., 2016.

A eficácia *in vitro* do Clorambucil ficou evidenciada, através de concentrações entre 0,5 e 2,0 µg/mL, frente a parasitos adultos. Adicionalmente, foi verificada diminuição na postura de ovos. Nos testes *in vivo* também ficou clara a eficácia contra os diferentes estágios de desenvolvimento dos parasitos, bem como a redução na oviposição. Nos testes *in vivo*, o impacto maior foi evidenciado em parasitos jovens, havendo redução na carga parasitária em 75,8%, além de redução de 89,2% na carga total parasitária e 86,7% na postura de ovos. Estas características elevam o Clorambucil como potencial fármaco no tratamento da esquistossomose, principalmente quando verificados os resultados frente a parasitos jovens, uma vez que é sabido que o Praziquantel é ineficaz contra este estágio da infecção (EISSA et al., 2016).

### 3.5.5 Menadiona

A Menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) (figura 12), é uma provitamina sintética (vitamina K<sub>3</sub>), que, quando no organismo, é metabolizada à vitamina K no fígado. Pertence à classe das Naftoquinonas e possui extensas atividades no organismo, como: essencial na formação da protrombina, que é uma glicoproteína que está relacionada com a regulação da calcificação óssea (KAPADIA et al., 2017)

Figura 12: Estrutura química da Menadiona.



Fonte: KAPADIA et al., 2017.

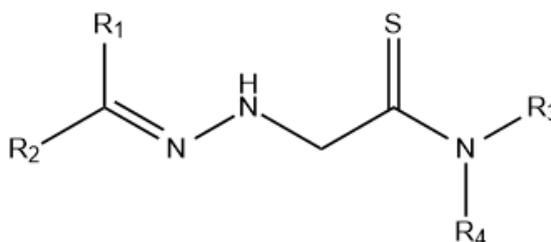
Durante estudos *in vitro* foi demonstrada a atividade esquistossomicida deste composto, apresentando em testes de concentração letal mínima (MLC), valores de 12,5  $\mu\text{M}$  e concentração letal (LC<sub>50</sub>) de 5,8  $\mu\text{M}$ , quando incubada por 72h. Estes resultados permitiram que a Menadiona fosse a Naftoquinona mais promissora para futuros testes *in vivo* (KAPADIA et al., 2017).

## 3.6 Tiossemicarbazonas

### 3.6.1 Química

As tiossemicarbazonas (figura 13) e também as semicarbazonas apresentam um perfil farmacológico amplo, levando às realizações de muitos estudos no campo da Química Medicinal, mais particularmente, na Química Medicinal Inorgânica, haja vista sua propriedade quelante e também o seu papel da coordenação no mecanismo bioquímico de ação. Haja vista a sua estrutura química, as tiossemicarbazonas apresentam a possibilidade de realizar inúmeras ligações de radicais em sua estrutura principal e, por isso, permite que sejam obtidas grandes quantidades de moléculas (BERALDO, 2004).

Figura 13: Estrutura química representando o esqueleto básico das tiossemicarbazonas. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>: H, alquil e aril.



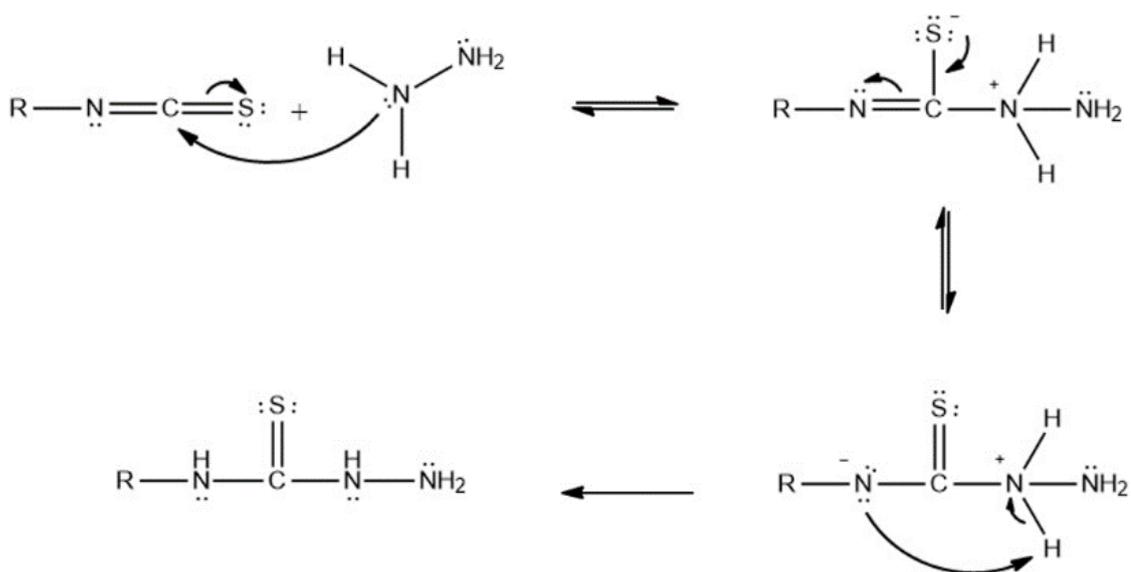
Constituem um grupo químico pertencente à classe das iminas (-C=N), apresentando versatilidade nas reações, devido à sua capacidade de se ligar a diversos reagentes, uma vez que se comporta como uma base de Schiff. A presença de nitrogênio e enxofre em sua estrutura permite que as tiossemicarbazonas sejam consideradas ligantes orgânicos, uma vez que estes átomos se caracterizam como doadores de elétrons (TENÓRIO et al., 2005).

No que diz respeito ao mecanismo de ação, dois são descritos na literatura. O primeiro refere-se à inibição da enzima ribonucleotídeo difosfato redutase (RDR), responsável pela conversão de ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos, impedindo a biossíntese de DNA. Diante disso, a inibição desta enzima tornou-se um alvo promissor no que diz respeito à terapia do câncer e outras patologias (BERALDO; GAMBINO, 2004). O outro mecanismo proposto de ação consiste na inibição da enzima cisteína protease – SmCB1 – sendo esta responsável por reduzir a motilidade dos parasitos e até danos mais severos em seu tegumento, levando à morte do parasito (FONSECA, 2015).

A síntese de tiossemicarbazonas é bastante descrita na literatura. Sua obtenção pode ser realizada através de dois métodos: direto e indireto. A obtenção direta consiste na condensação equimolar de um derivado carbonilado – seja ele um aldeído ou cetona – a tiossemicarbazida em meio alcóolico e quantidades catalíticas de ácido. Este método apresenta alta quimiosseletividade, versatilidade, além de rapidez, geralmente apresentando altos rendimentos. Já o método de obtenção indireta consiste na preparação prévia da tiossemicarbazida utilizando a hidrazina (NH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), para posterior condensação com o derivado carbonilado específico. Ainda sobre a síntese, tendo em vista que as etapas são reversíveis, o uso de catálise ácida tem a função de equilibrar os valores de pH entre 4 e 5, além de permitir a protonação da carbonila, uma vez que valores abaixo de 4 favorecem a protonação do nitrogênio em N-1 e valores acima de 5 tornam a carbonila progressivamente menos protonada, conseqüentemente, diminuindo a velocidade da reação (TENÓRIO et al., 2005).

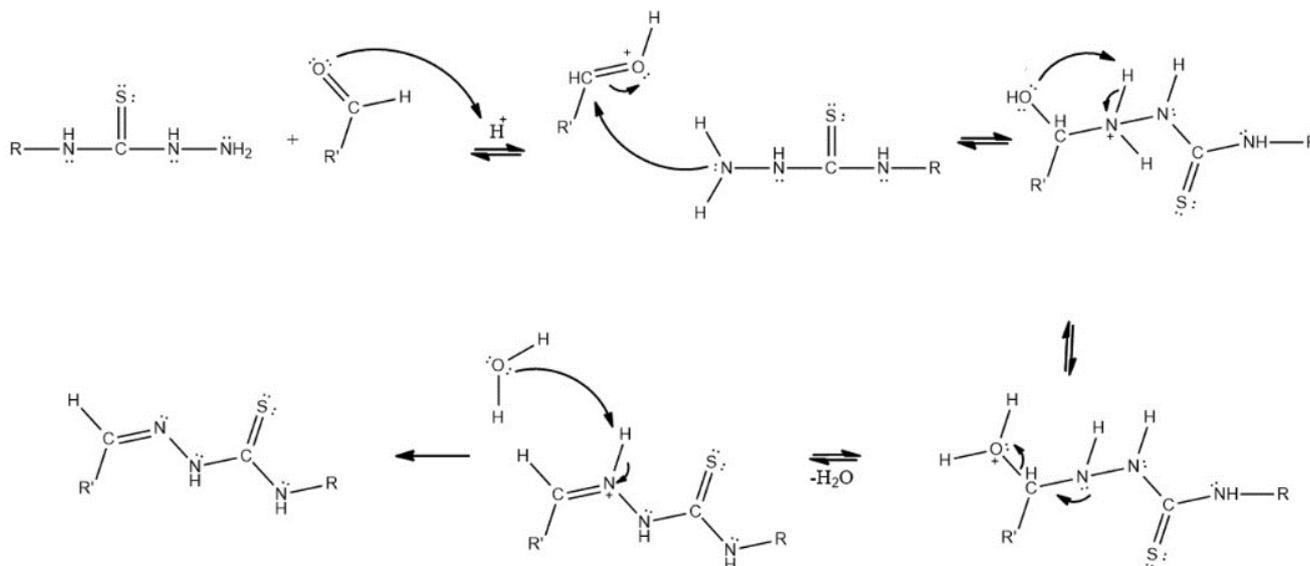
No presente trabalho utilizamos o método de obtenção indireta (esquema 1). A reação se processa com o ataque nucleofílico do par de elétrons da hidrazina ao carbono da tiocarbonila do isotiocianato, deslocando os elétrons pi para o enxofre, deixando-o com carga negativa. Este então restabelece a dupla ligação, deslocando os elétrons da dupla ligação para o nitrogênio, deixando-o com carga negativa. Por fim, o par de elétrons deste nitrogênio capta o próton do nitrogênio carregado positivamente, estabilizando as cargas e obtendo a tiossemicarbazida.

Esquema 1: mecanismo de obtenção das tiossemicarbazidas.



A segunda etapa consiste numa reação de condensação da tiossemicarbazida e o aldeído correspondente, em meio ácido (esquema 2). Nesta reação, o oxigênio da carbonila do aldeído capta um próton do meio, tornando-o positivo e favorecendo o ataque do par de elétrons do nitrogênio da tiossemicarbazida ao carbono. Com isso, a carga do oxigênio é estabilizada com o deslocamento dos elétrons da dupla ligação, obtendo uma porção hidroxila e deixando o nitrogênio ligado ao carbono com carga positiva. A hidroxila, através de reação intramolecular, capta o próton ligado ao nitrogênio positivo, estabilizando sua carga e formando uma molécula de água. Esta é então eliminada através da formação de uma dupla ligação, que é estabilizada com a captura do próton pela molécula de água eliminada. Esta captura estabelece a acidez do meio e obtém-se a tiossemicarbazona.

Esquema 2: mecanismo de obtenção das tiossemicarbazonas.



As tiossemicarbazonas podem assumir duas conformações estruturais: *E* ou *Z* e quem determina estas configurações é o hidrogênio da função azometínica. A possibilidade de obter-se, majoritariamente, uma das configurações tem relação com os reagentes utilizados. Como regra geral, tiossemicarbazonas sintetizadas a partir de aldeídos tendem a preferir o isômero *E*, uma vez que esta é a configuração termodinamicamente mais estável, ao passo que, reações utilizando cetonas não-simétricas tendem a resultar na obtenção de tiossemicarbazonas na configuração *Z* (TENÓRIO et al., 2005).

### 3.6.2 Importância biológica

Graças a esta ampla variedade de produtos que podem ser obtidos, as tiossemicarbazonas são extensamente descritas na literatura, apresentando atividades biológicas confirmadas, como: antimicrobiana (EL-SHARIEF et al., 2013), (SOUZA et al., 2013); antirretroviral (PELOSI et al., 2010); esquistossomicida (SANTIAGO et al., 2014); antituberculose (PAVAN et al., 2010); anti-inflamatória (OLIVEIRA et al., 2016); tripanocida (LEITE et al., 2006); antimalária (KHANYE et al., 2011); antiprotozoária (BHARTI et al., 2002); leishmanicida (BRITTA et al., 2012) e antitumoral (FERRAZ et al., 2010), (FEUN et al., 2002), sendo a atividade antitumoral a mais amplamente estudada.

As tiossemicarbazonas também possuem potencial capacidade imunomoduladora, a partir da capacidade de estimular a produção de óxido nítrico (ON) e consequente estímulo e liberação de citocinas – que são moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células,

durante o desencadeamento de uma resposta imune. No caso de uma infecção por *S. mansoni*, as principais citocinas envolvidas são: interferon gama (INF-  $\gamma$ ), e as interleucinas 2, 4 e 5 (IL-2, IL-4 e IL-5). E é através da resposta mediada por estas moléculas que ocorre o desencadeamento da resposta imune, através da ativação dos linfócitos T helper (Th) (GRZYNCH et al., 1991).

É sabido que a resposta imune, através da infecção por *S. mansoni*, apresenta dois momentos, os quais, antes da oviposição, ocorre resposta Th1 e, após a oviposição, resposta Th2. A resposta Th1 é relacionada com a produção de INF-  $\gamma$  e IL-2 e o resultado é a resposta imune celular, ou seja, ativação de macrófagos. Já a resposta Th2 está relacionada com a produção de IL-4 e IL-5, já seu resultado é a resposta humoral, produzindo anticorpos para combater infecções parasitárias (YANG et al., 2005).

De acordo com James (1995), partindo da ativação dos macrófagos por INF-  $\gamma$  (resposta Th1), a produção de ON é aumentada, sendo esta uma molécula efetora que promove a morte do parasito. Esse mesmo aumento de ON, observado durante a oviposição (ou seja, durante a resposta Th1), é diminuído com o início da resposta Th2 (BRUNET, et al., 1999).

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Materiais e métodos – Estudo químico**

#### **4.1.1 Materiais, reagentes e solventes**

Foram utilizados os seguintes reagentes e solventes para obtenção dos compostos tiossemicarbazidas: a hidrazina, os isotiocianatos correspondentes e o diclorometano. Para os compostos tiossemicarbazonas: derivados tiossemicarbazidas obtidos previamente, etanol, ácido acético glacial, 5-metilindol-3-carboxialdeído, n-hexano, acetato de etila. Para todas as sínteses não houve necessidade de realização de nenhum procedimento prévio de purificação dos reagentes, uma vez que todos são de procedência da Sigma-Aldrich, Vetec ou Acros, obedecendo às especificações para PA ou PS. Na cromatografia em camada delgada foram utilizadas placas de sílica gel 60 Merck F254, de 0,25 mm de espessura.

## 4.2 Equipamentos

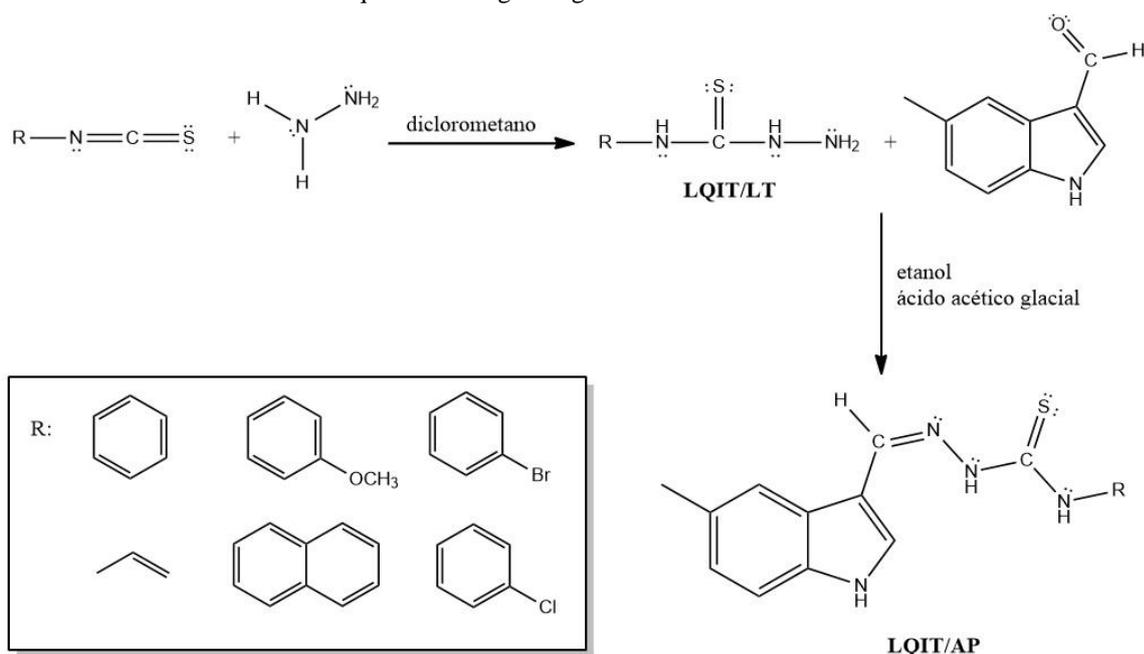
As placas de sílica gel para cromatografia em camada delgada foram reveladas em luz ultravioleta (254 ou 365 nm) no aparelho Vilber Lourmat modelo CN15.LC (LQIT/UFPE). As faixas de fusão foram determinadas em aparelho Quimis, modelo 340.27 (LQIT/UFPE). Na determinação dos pontos de fusão foi utilizado aparelho em tubo capilar Modelo Quimis 340 (Quimis, Brasil). Para caracterização estrutural dos compostos sintetizados, foram utilizadas Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de Carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) realizados em aparelhos Varian UnityPlus 400 MHz (400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) ou Bruker AMX-300 MHz (300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75.5 MHz para  $^{13}\text{C}$ ).

## 4.3 Procedimentos experimentais

As sínteses e os dados físico-químicos dos novos derivados tiossemicarbazonas foram realizadas no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica, do Departamento de Antibióticos – CCB/ UFPE. A caracterização estrutural por meio do RMN $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foi realizada na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental – DQF/ UFPE.

### 4.3.1 Diagrama geral de síntese

Esquema 3: Diagrama geral da síntese das tiossemicarbazonas.



#### 4.3.2 Síntese dos derivados intermediários tiossemicarbazidas (LQIT/LT)

Em um balão de fundo redondo foi adicionado o diclorometano como solvente (10 mL) e o isotiocianato correspondente (0,5 mmol). Posteriormente, foi adicionada lentamente a hidrazina (1 mmol). A reação ocorreu à temperatura ambiente, sob agitação magnética e com duração média de 3 horas, quando se observa a formação de precipitado. O precipitado obtido foi então filtrado com diclorometano e seco em dessecador para utilização na etapa de obtenção dos derivados tiossemicarbazonas.

#### 4.3.3 Síntese dos derivados finais tiossemicarbazonas (LQIT/AP)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados os reagentes 5-metilindol-3-carboxialdeído (0,1 mmol), juntamente com o derivado tiossemicarbazida correspondente (0,1 mmol) em 10 mL de etanol e 10-15 gotas do catalisador ácido acético glacial. A reação se deu à temperatura ambiente, sob agitação magnética e com duração média de 3 horas. Após esse tempo, observou-se a presença de precipitado no fundo do balão, então foi feita uma placa de CCD a fim de verificar a formação do produto e consumo do aldeído, através do sistema de eluição n-hexano/ acetato de etila 1:1. O Produto obtido foi filtrado e utilizou-se uma pequena quantidade de etanol para arrastar quaisquer vestígios de produto que tenham ficado no fundo do balão. Em seguida, foi seco em dessecador para posterior caracterização estrutural avaliação biológica.

### 4.4 Materiais e métodos – Estudo biológico

#### 4.4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos com 30 dias de idade, albinos suíços (*Mus musculus*) mantidos no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM – FIOCRUZ/Recife), em gaiolas, sob condições padronizadas de temperatura, luminosidade e alimentação. A utilização desses animais no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ) sob licença nº 69/2014.

As cercárias (Cepas LE) de *S. mansoni* foram obtidas por meio do setor de Malacologia do Laboratório de Esquistossomose e do Serviço de Referência em Esquistossomose do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM).

Os vermes adultos de *S. mansoni* foram obtidos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM - FIOCRUZ) após realização da perfusão dos camundongos infectados.

#### **4.4.2 Materiais e métodos**

Câmara de fluxo;

Equipamento de perfusão;

Microscópio óptico invertido (BestScope BS-2090);

Espectrofotômetro Benchmark plus (Bio-Rad®);

Placas de Petri, placas de cultura com 24 poços e placas de cultura com 96 poços;

Anestésicos: cloridrato de xilasina (Bayer) e cloridrato de ketamina (Agener União);

Solução salina obtida a partir de cloreto de sódio, citrato de sódio e água destilada;

Pipeta graduada, tubos Falcon, seringa, ponteiras, álcool 70% e materiais cirúrgicos todos esterilizados;

Amostra do fármaco Praziquantel;

Meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) completo suplementado com penicilina, estreptomicina e soro bovino fetal;

Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich);

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (Sigma-Aldrich);

Derivados tiossemicarbazonas.

#### **4.4.3 Procedimentos experimentais**

##### **4.4.3.1 Avaliação da citotoxicidade celular dos derivados tiossemicarbazonas frente às linhagens de células macrofágicas J774 e células Vero**

As análises de citotoxicidade foram realizadas através da técnica do MTT, descrita por Mosmann (1983). Esta técnica consiste na redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) por células viáveis. O MTT é um sal de coloração amarela e, quando metabolizado pela redutase mitocondrial é convertido aos cristais de formazan, que possuem coloração púrpura. Estes cristais são solubilizados com DMSO, obtendo uma solução de igual cor e permitindo a leitura de sua absorbância.

Para tal, as células foram semeadas na concentração de  $1 \times 10^4$  para as células Vero e  $1 \times 10^5$  para as células macrofágicas em placas de 96 poços contendo meio RPMI com vermelho de fenol suplementado com 10% de SFB e incubados em uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ$

C. Após 24h, o sobrenadante foi removido e as células incubadas na presença de várias concentrações dos compostos (200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL) por 24 horas.

Após este período, foi adicionado 10 µL de MTT (5 mg/mL), 100 µL de RPMI sem vermelho de fenol e incubados por 3h em estufa de 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e sua absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 540nm. Células sem tratamento foram utilizadas como controle da reação.

Foram realizados dois experimentos independentes para células Vero e dois experimentos independentes para linhagem J774 e cada experimento foi feito em quadruplicata.

#### **4.4.3.2 Avaliação da produção de óxido nítrico (ON)**

A fim de analisar possíveis alterações na produção de ON pelas células de macrófagos da linhagem J774 submetidos ao tratamento com os diferentes compostos testados neste estudo, foi realizado o método colorimétrico de Griess. Este teste consiste em uma quantificação indireta de ON, uma vez que este, quando produzido, é rapidamente convertido a outros radicais, através de degradação oxidativa e que, dentre esses radicais, o nitrito é o mais estável, permitindo sua mensuração (GREEN et al, 1982).

Partindo do teste de avaliação da citotoxicidade com células macrofágicas J774, após a etapa de preparação da placa (semeio das células nas placas, incubação e tratamento), o sobrenadante que foi retirado deste primeiro procedimento, foi transferido para outra placa de 96 poços e, posteriormente, cada poço contendo o sobrenadante recebeu o reagente de Griess – este reagente consiste na mistura equimolar 1:1 de sulfanilamida (1%) e naftiletilenodiaminobiclorato (0,1%) em ácido ortofosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).

A concentração de nitrito foi determinada, partindo de uma curva padrão de concentrações conhecidas de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>). A absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 540nm e o teste realizado em quadruplicata.

#### **4.4.3.3 Análise estatística**

As análises de regressão linear foram feitas no programa SPSS 18.0 (IBM Co., Nova Iorque, EUA) para Windows. As análises de significância, considerado significativo valores  $p < 0.05$ , foram realizadas através do teste ANOVA e o pós-teste de Tukey no programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA) para Windows.

#### **4.4.3.4 Infecção por *Schistosoma mansoni***

Após 15 dias do recebimento dos camundongos, os animais foram infectados por via percutânea, utilizando cerca de 120 cercárias (Cepa LE – Belo Horizonte), oriundas de *Biomphalaria glabrata*, para cada animal. Após 45 dias de infecção, foi realizado exame parasitológico das fezes dos camundongos para avaliar a positividade da infecção (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934).

#### **4.4.3.5 Perfusão do sistema porta para recuperação de parasitos adultos de *Schistosoma mansoni***

Os camundongos foram submetidos a eutanásia após 50 dias de infecção. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de cetamina (100-200 mg/Kg) associada a cloridrato de xilasina (5-16 mg/Kg). Após anestesia, os animais foram submetidos à perfusão do sistema porta hepático para a recuperação dos parasitos, os quais foram separados em placas de petri contendo meio RPMI-1640 e em seguida, foram contados e classificados de acordo com o sexo e vitalidade (DUVAL; DEWITT, 1967).

#### **4.4.3.6 Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de parasitos adultos de *Schistosoma mansoni* frente aos derivados tiossemicarbazonas**

Os parasitos foram removidos dos camundongos infectados e posteriormente lavados em meio RPMI-1640 acrescido de HEPES 20 mM pH 7,5 e suplementado com penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e soro bovino fetal a 10 % em uma placa de Petri. Após a lavagem os parasitos adultos foram transferidos para placas de cultura de tecidos contendo 2 mL de meio RPMI-1640 completo.

Para cada composto testado, o teste foi feito em triplicata, acrescentando em cada poço da placa de cultura cada poço 4 parasitos (2 machos e 2 fêmeas), em seguida foram incubados a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. Após o período de 2 horas de adaptação ao meio, os derivados tiossemicarbazonas foram adicionados na concentração de 200 µM. Para esta atividade esquistossomicida *in vitro* foram testados os derivados tiossemicarbazonas LQIT/AP 01, LQIT/AP 02, LQIT/04, LQIT/AP 06, LQIT/AP 08 e LQIT/AP 10. Utilizou-se o Praziquantel como controle positivo e o DMSO como controle negativo dos experimentos. Os parasitos foram mantidos em cultura por 5 dias, sendo monitorados a cada 24 horas e observados no microscópio óptico invertido para avaliação da atividade motora e da taxa de

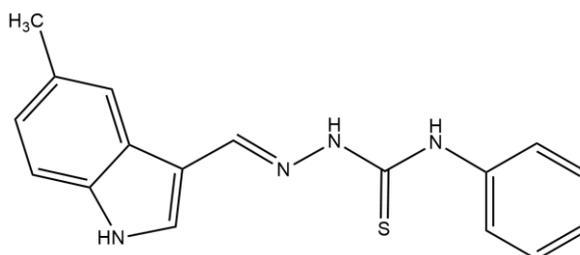
mortalidade e motilidade. Para confirmação dos resultados todos os testes foram realizados em duplicata.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo químico

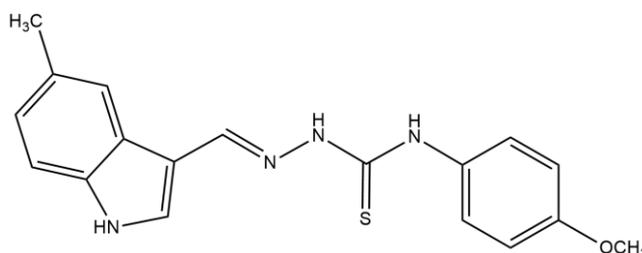
#### 5.1.1 Características físico-químicas e espectroscópicas dos compostos tiossemicarbazonas sintetizados

##### 5.1.1.1 N-fenil-2-[(5-metil-1H-indol-3-il)etilen]-hidrazinacarboxitioamida (AP-01)



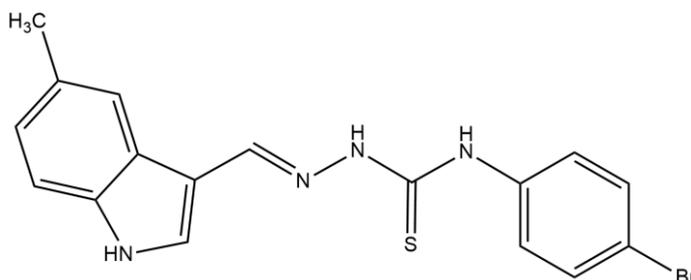
Fórmula molecular:  $C_{17}H_{16}N_4S$ ; Massa molecular: 308,4 g/mol; Faixa de fusão: 187-189° C; Rendimento: 47%; Razão de frente: 0,54 sistema n-hex/AcOEt 1:1; RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.58 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 9.87 (s, 3H), 9.65 (d, J = 13.6 Hz, 3H), 8.39 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.85 (d, J = 2.8 Hz, 2H), 7.76 – 7.69 (m, 1H), 7.54 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.35 (dt, J = 17.3, 7.6 Hz, 2H), 7.21 – 7.10 (m, 3H), 7.03 (dd, J = 8.3, 1.6 Hz, 2H), 2.49 (t, J = 1.9 Hz, 3H), 2.41 (s, 1H). RMN  $^{13}C$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  174.52, 141.65, 139.60, 135.84, 131.66, 129.86, 128.67, 128.59, 125.14, 124.83, 124.63, 124.58, 121.67, 112.09, 110.91, 21.85.

##### 5.1.1.2 N-(4-metoxifenil)-2-[(5-metil-1H-indol-3-il)etilen]-hidrazinacarboxitioamida (AP-02)



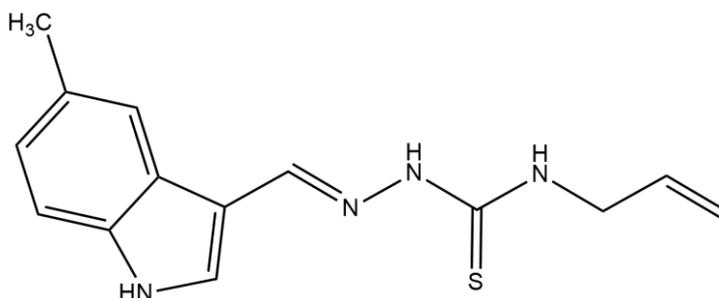
Fórmula molecular:  $C_{18}H_{18}N_4OS$ ; Massa molecular: 338,43 g/mol; Faixa de fusão: 204-206° C; Rendimento: 68%; Razão de frente: 0,5 sistema n-hex/AcOEt 1:1; RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.54 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 11.49 (s, 1H), 9.71 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.98 – 7.92 (m, 1H), 7.84 (dd, J = 2.8, 0.9 Hz, 1H), 7.58 – 7.49 (m, 2H), 7.35 (dd, J = 20.5, 8.4 Hz, 2H), 7.06 – 6.98 (m, 1H), 6.98 – 6.84 (m, 2H), 3.75 (dd, J = 9.1, 0.9 Hz, 2H), 2.52 – 2.43 (m, 1H), 2.40 (s, 1H). RMN  $^{13}C$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  175.06, 157.14, 157.08, 141.45, 135.82, 132.67, 132.43, 131.45, 129.81, 126.84, 124.84, 124.61, 121.67, 113.83, 112.05, 110.97, 55.71, 55.66, 21.83.

### 5.1.1.3 N-(4-bromofenil)-2-[(5-metil-1H-indol-3-il)etilen]-hidrazinacarboxitioamida (AP-04)



Fórmula molecular:  $C_{17}H_{15}BrN_4S$ ; Massa molecular: 387,30 g/mol; Faixa de fusão: 201-203° C; Rendimento: 53%; Razão de frente: 0,48 sistema n-hex/AcOEt 1:1; RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.66 (s, 1H), 11.57 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 9.69 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.98 – 7.92 (m, 1H), 7.86 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.77 – 7.66 (m, 2H), 7.58 – 7.48 (m, 2H), 7.32 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.02 (dd, J = 8.3, 1.6 Hz, 1H), 2.41 (s, 3H). RMN  $^{13}C$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  174.48, 141.99, 139.22, 135.83, 131.71, 131.40, 129.87, 126.75, 124.83, 124.64, 121.77, 117.20, 112.06, 110.87, 21.84.

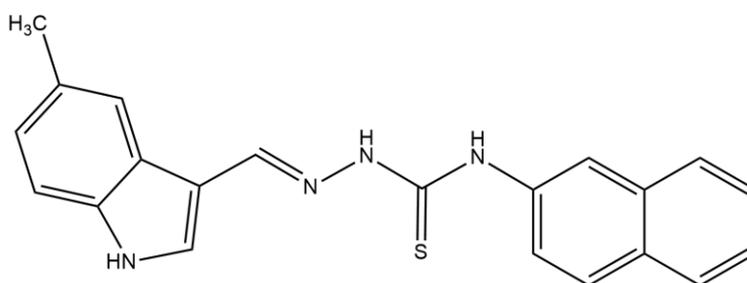
### 5.1.1.4 N-alil-2-[(5-metil-1H-indol-3-il)etilen]-hidrazinacarboxitioamida (AP-06)



Fórmula molecular:  $C_{14}H_{16}N_4S$ ; Massa molecular: 272,37 g/mol; Faixa de fusão: 219-220° C; Rendimento: 55%; Razão de frente: 0,44 sistema n-hex/AcOEt 1:1; RMN  $^1H$  (400 MHz,

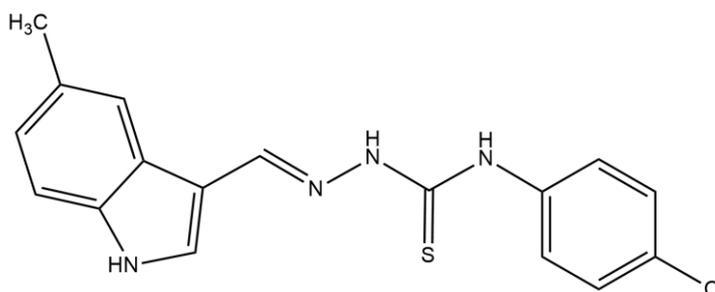
DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  11.49 (s, 1H), 11.28 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.97 – 7.87 (m, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.32 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.02 (dd, J = 8.3, 1.6 Hz, 1H), 6.01 (ddt, J = 17.3, 10.4, 5.2 Hz, 1H), 5.25 (dq, J = 17.3, 1.8 Hz, 1H), 5.16 (dq, J = 10.3, 1.6 Hz, 1H), 4.28 (tt, J = 5.7, 1.7 Hz, 2H), 2.41 (s, 1H), 0.97 (t, J = 7.4 Hz, 2H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  176.10, 140.69, 135.36, 135.31, 130.78, 129.30, 124.24, 124.13, 121.20, 115.30, 111.59, 110.61, 45.56, 40.12, 39.91, 39.70, 39.50, 39.29, 39.08, 38.87, 21.28.

**5.1.1.5 N-(naftaleno-2-il)-2-[(5-metil-1H-indol-3-il)etileno]-hidrazinacarboxitioamida (AP-08)**



Fórmula molecular: C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>S; Massa molecular: 358,46 g/mol; Faixa de fusão: 195-197° C; Rendimento: 78%; Razão de frente: 0,5 sistema n-hex/AcOEt 1:1; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 11.70 (s, 1H), 11.63 – 11.48 (m, 1H), 9.90 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 7.99 (ddd, J = 6.3, 5.0, 3.1 Hz, 2H), 7.91 – 7.84 (m, 2H), 7.79 – 7.72 (m, 2H), 7.60 – 7.51 (m, 3H), 7.35 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.84 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 2.38 (s, 3H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 175.97, 131.99, 129.98, 125.96, 154.50, 141.58, 103.95, 133.65, 131.66, 124.65, 110.76, 125.60, 122.48, 112.50, 126.33, 135.24, 125.31, 128.12, 126.08, 112.19, 55.18.

**5.1.1.6 N-(4-clorofenil)-2-[(5-metil-1H-indol-3-il)etileno]-hidrazinacarboxitioamida (AP-10)**



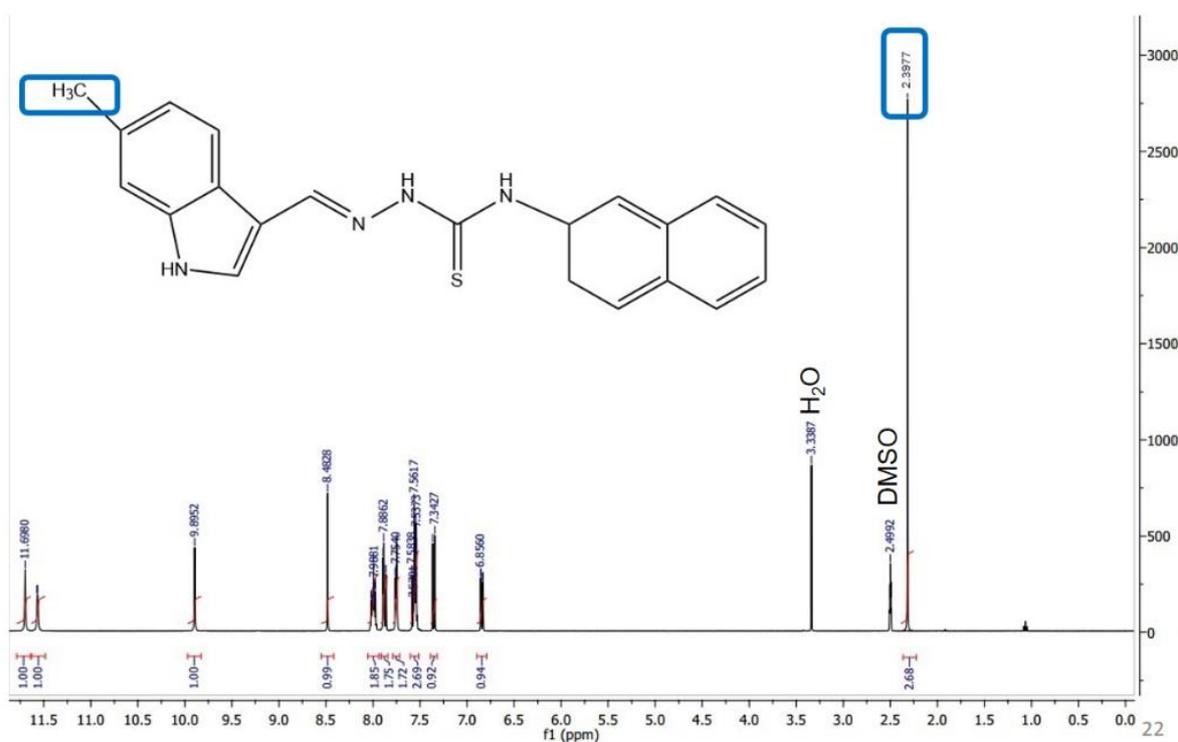
Fórmula molecular: C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>S; Massa molecular: 342,85 g/mol; Faixa de fusão: 227-229° C; Rendimento: 78%; Razão de frente: 0,53 sistema n-hex/AcOEt 1:1; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  11.66 (s, 1H), 11.61 – 11.55 (m, 1H), 9.98 (s, 1H), 9.71 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.97

(s, 1H), 7.87 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 7.80 – 7.73 (m, 2H), 7.58 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.42 (dd,  $J = 9.2, 3.2$  Hz, 2H), 7.33 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.07 – 7.00 (m, 1H), 2.42 (s, 1H); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  174.09, 141.49, 138.30, 135.34, 131.20, 129.38, 128.55, 127.98, 125.94, 124.36, 124.15, 121.27, 111.57, 110.39, 40.13, 39.92, 39.71, 39.50, 39.29, 39.08, 38.87, 21.34.

A elucidação estrutural das moléculas foi feita através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) e também utilizando as técnicas de análises bidimensionais.

Através do (RMN  $^1\text{H}$ ), foi possível observar os diferentes tipos de hidrogênio presentes na molécula (figura 14). Na região de campo baixo (hidrogênios blindados), é possível identificar um sinal referente aos hidrogênios da metila, que se encontram no anel indólico. Eles se apresentam como um singlete em  $\delta$  2.38 ppm. Os picos em  $\delta$  2.50 ppm e  $\delta$  3.34 ppm referem-se respectivamente aos sinais residuais dos solventes DMSO deuterado e água, deslocamentos característicos do solvente (FULMER, G. R. et al., 2010).

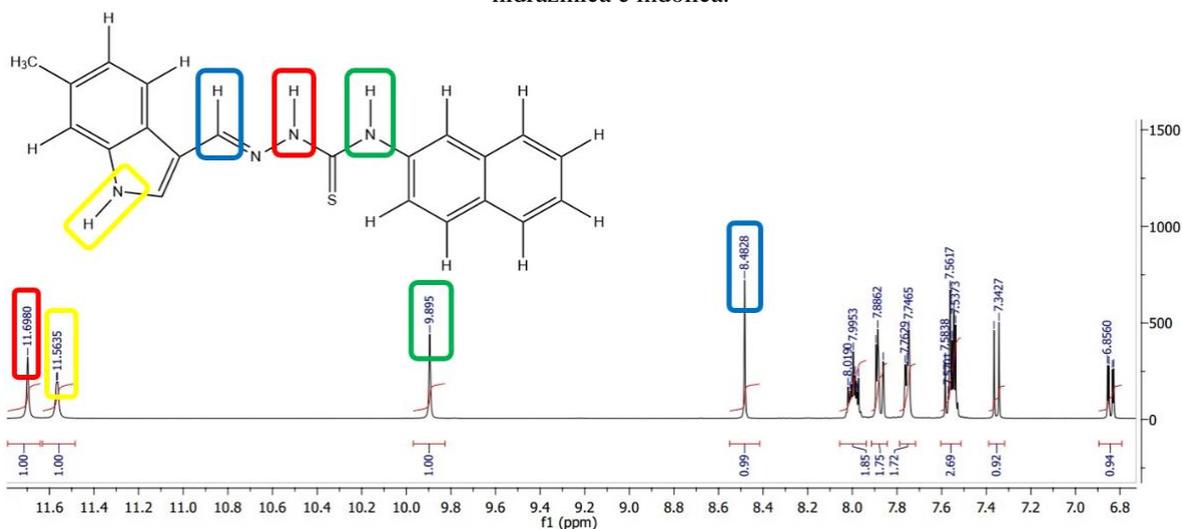
Figura 14: Região de campo baixo evidenciando o singlete da metila.



Na região de campo alto (hidrogênios desblindados), os demais hidrogênios da molécula estão presentes. Os singletos referentes ao hidrogênio azometínico, NH ligado à porção aromática, o NH referente à porção hidrazínica e o hidrogênio do anel indólico (figura 15) correspondem a  $\delta$  8.48 ppm,  $\delta$  9.90 ppm,  $\delta$  11.70 ppm e  $\delta$  11.57 ppm respectivamente.

Especificamente, o singlete azometínico aparecendo entre  $\delta$  7.32 – 8.47 ppm é característico de tiossemicarbazonas (OLIVEIRA et al. 2017).

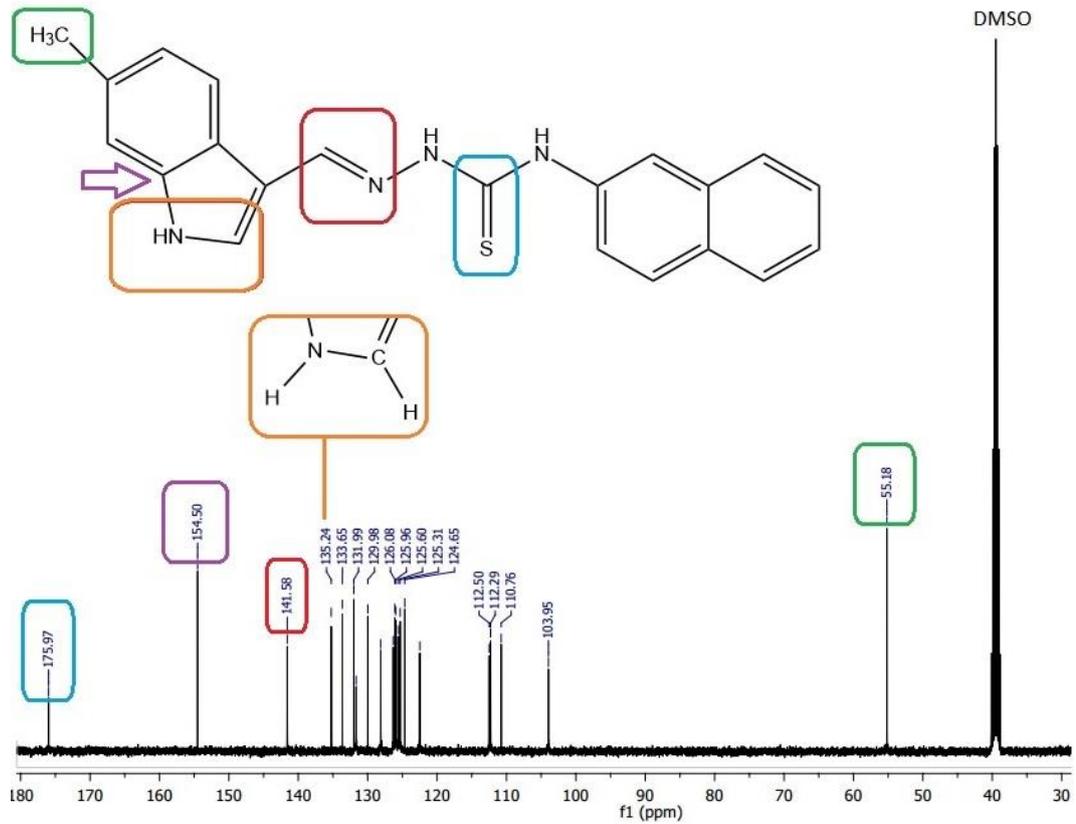
Figura 15: Região de campo alto evidenciando os hidrogênios das porções: azometínica, aromática, hidrazínica e indólica.



A porção do espectro representada pelo intervalo de deslocamento entre  $\delta$  6.58 ppm e 8.00 ppm corresponde às porções aromáticas da molécula, que se manifestam na forma de singletos, dubletos e multipletos. E, por serem muitos sinais referentes a hidrogênios que estão passíveis de acoplamento, estes podem apresentar padrões de acoplamento mais complexos. Essa complexidade fica mais evidente quando os sinais aparecem, em sua grande maioria, sobrepostos, caracterizando assim a presença de multipletos. Sendo um multipletos o equivalente a um hidrogênio acoplado a outros hidrogênios vizinhos (GONSALVES; MELO, 2007).

Na elucidação dos carbonos, foi utilizada a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN  $^{13}\text{C}$ ), identificando vinte e um picos referentes aos carbonos presentes na estrutura. Abaixo de 100 ppm é possível identificar a metila ligada ao anel indol em  $\delta$  55.18 ppm. Os demais carbonos foram identificados acima de 100 ppm. O carbono mais desblindado encontra-se ligado ao enxofre através de dupla ligação, além de dois nitrogênios, justificando ser o mais desblindado da estrutura, apresentando deslocamento de  $\delta$  157.97 ppm (figura 16). O carbono ligado ao nitrogênio do anel indol também se apresenta mais desblindado que os demais ( $\delta$  154.50 ppm), devido à ressonância do anel e a proximidade com o átomo de nitrogênio.

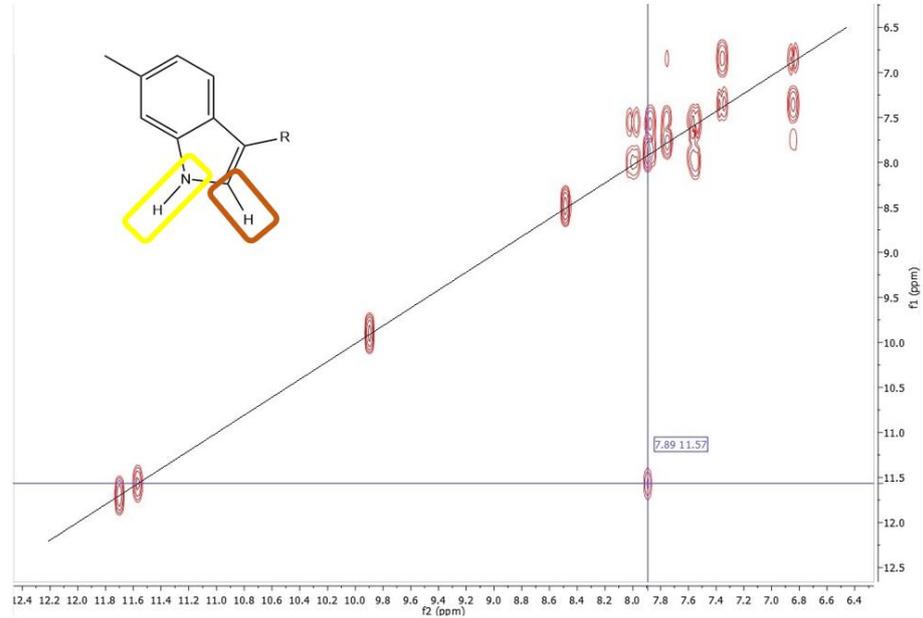
Figura 16: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  evidenciando os carbonos do campo desblindado e o carbono do campo blindado.



Os demais carbonos pertencentes aos grupos aromáticos encontram-se na faixa de deslocamento que varia de  $\delta$  110 a 175 ppm, enquanto que carbonos insaturados ( $\text{sp}^2$ ), entre  $\delta$  100 – 150 ppm (os demais picos encontram-se nestes dois intervalos). O pico em torno de  $\delta$  40 ppm é referente ao resíduo do solvente (FULMER et al., 2010).

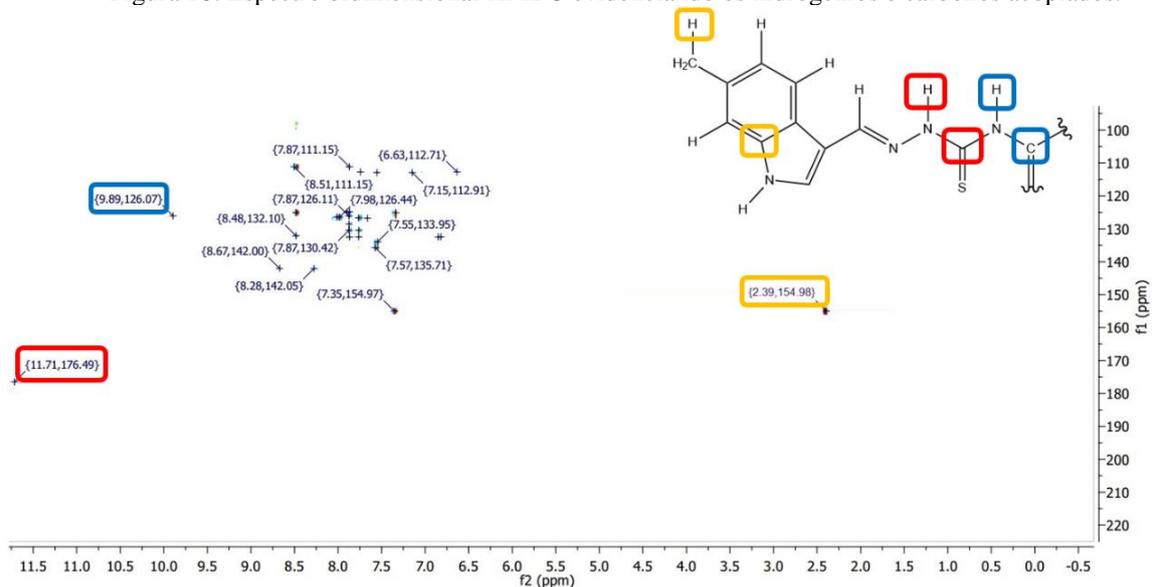
Através da técnica de COSY (Homonuclear COrrrelation SpectroscopY) é possível identificar hidrogênios que estejam acoplados por  $^2\text{-}^3\text{J}_{\text{H,H}}$  estabelecendo correlação entre eles (KAISER, 2000). Através do conhecimento do deslocamento do hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel indol, foi possível encontrar o deslocamento do hidrogênio acoplado a ele em  $\delta$  11.57 ppm (figura 17).

Figura 17: Espectro de COSY para o composto AP-08, evidenciando o acoplamento entre o hidrogênio ligado ao nitrogênio indólico e o hidrogênio ligado ao carbono vizinho ao nitrogênio.



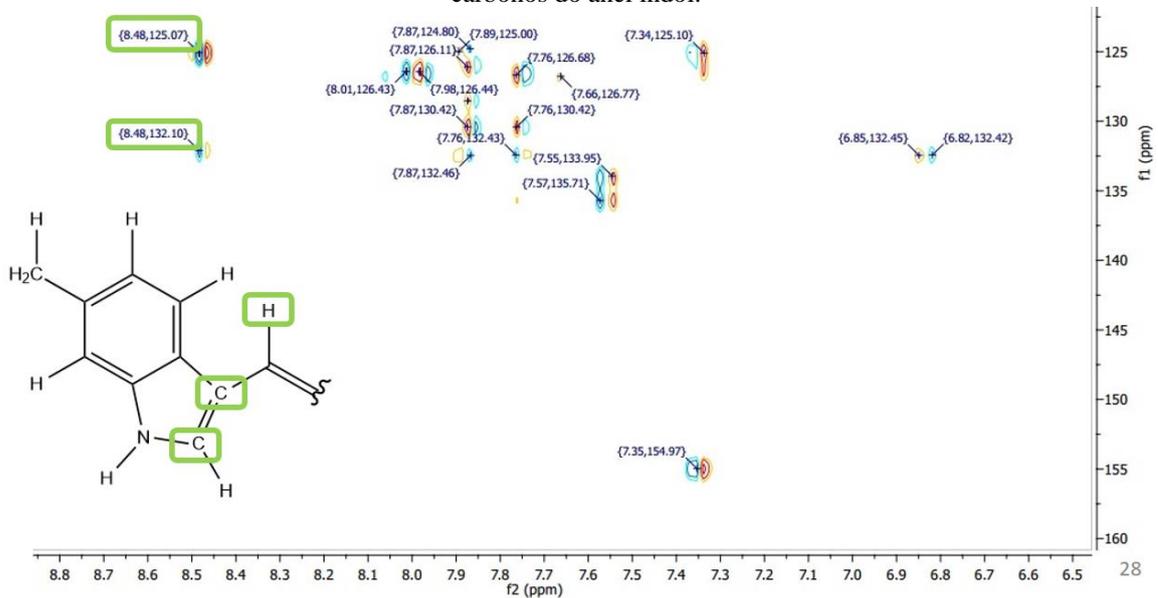
Através da técnica de análise bidimensional HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation – é possível identificar acoplamentos entre hidrogênios e carbonos a uma distância  $2\text{-}^3J_{\text{H,C}}$  e, eventualmente,  $^4J$  em sistemas conjugados (VASAVI et al., 2011). Com isso, foi possível correlacionar os acoplamentos entre os hidrogênios da porção hidrazínica e aromática com os carbonos próximos, bem como, o hidrogênio da porção metil com o carbono do anel indólico (figura 18).

Figura 18: Espectro bidimensional HMBC evidenciando os hidrogênios e carbonos acoplados.



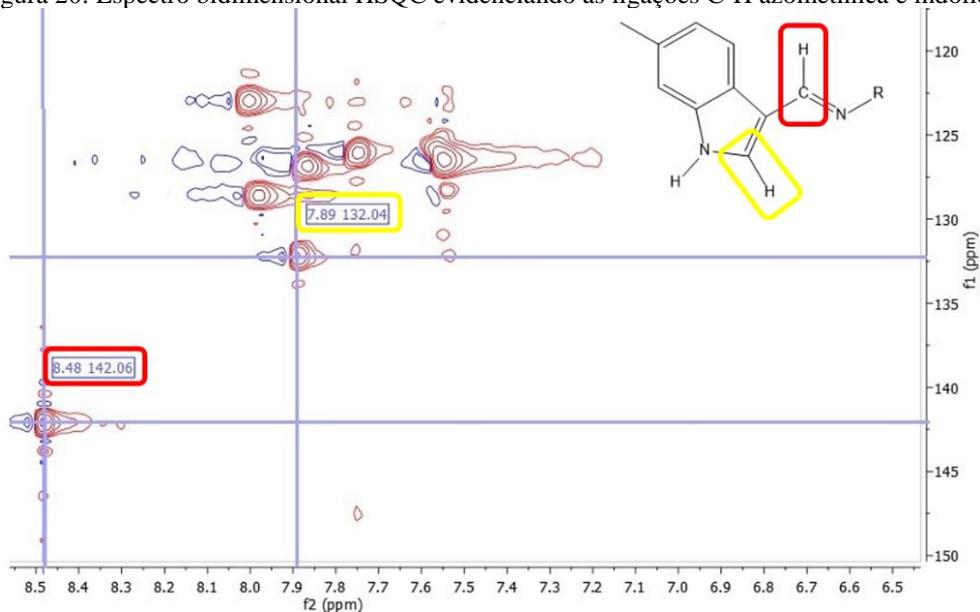
Ainda sobre este espectro, é possível observar também o acoplamento entre o hidrogênio da metila e os carbonos do anel indólico (figura 19).

Figura 19: Espectro bidimensional HMBC evidenciando os acoplamentos entre o hidrogênio da metila e os carbonos do anel indol.



Por fim, a técnica bidimensional HSQC – Heteronuclear Single Quantum Correlation – permite que seja enxergada a ligação direta entre o carbono e o hidrogênio (KAISER, 2000). Através dela foi possível confirmar a ligação entre o hidrogênio da função azometínica com seu respectivo carbono, assim como, o hidrogênio e o carbono da porção indólica (figura 20) ligados entre si, confirmando a presença destes na molécula.

Figura 20: Espectro bidimensional HSQC evidenciando as ligações C-H azometínica e indólica.



## 5.2 Estudo biológico

### 5.2.1 Avaliação da citotoxicidade em linhagens de células Vero e macrofágicas J774 dos derivados tiossemicarbazonas

Tabela 1: Atividade citotóxica dos compostos tiossemicarbazonas.

COMPOSTO	CC <sub>50</sub> VERO	CC <sub>50</sub> J774
	µg/mL	
AP-01	31,88 ± 8,6	82,06 ± 9,3
AP-02	144,91 ± 5,4	178,01 ± 16
AP-04	87,31 ± 4,2	89,13 ± 1,1
AP-06	84,84 ± 5,9	62,62 ± 4,9
AP-08	5,71 ± 0,3	8,31 ± 1,5
AP-10	49,41 ± 3,5	57,32 ± 1,2
PZQ	113,9 ± 4,39	117,08 ± 12,6

A partir dos testes de citotoxicidade – tanto em células Vero quando em macrófagos – concluiu-se que o composto LQIT/AP-08 foi o mais tóxico dentre todos os compostos testados, uma vez que, em concentrações muito pequenas, ele foi capaz de inibir em 50% o crescimento das células. No entanto, o composto AP-02 apresentou valores de citotoxicidade menores que o próprio Praziquantel, indicando que, nas mesmas concentrações, o composto tiossemicarbazona é menos tóxico que o Praziquantel.

### 5.2.2 Avaliação do teste de quantificação indireta de ON

A partir dos dados obtidos nas análises foram construídos gráficos que demonstram a quantificação da produção de nitrito de acordo com as concentrações dos compostos testados.

Os resultados mostraram que o LQIT/AP-01 foi capaz de induzir um aumento significativo (cerca de 1,5 vezes) na produção de nitrito por macrófagos J774 na concentração mais elevada – 200 µg/mL – em relação a sua menor concentração testada.

O LQIT/AP-02 apresentou aumento significativo na produção de nitrito a partir da concentração de 25 µg/mL. Na concentração seguinte em ordem crescente – 50µg/mL – a produção de nitrito foi duas vezes maior e aproximadamente sete vezes mais com 200µg/mL.

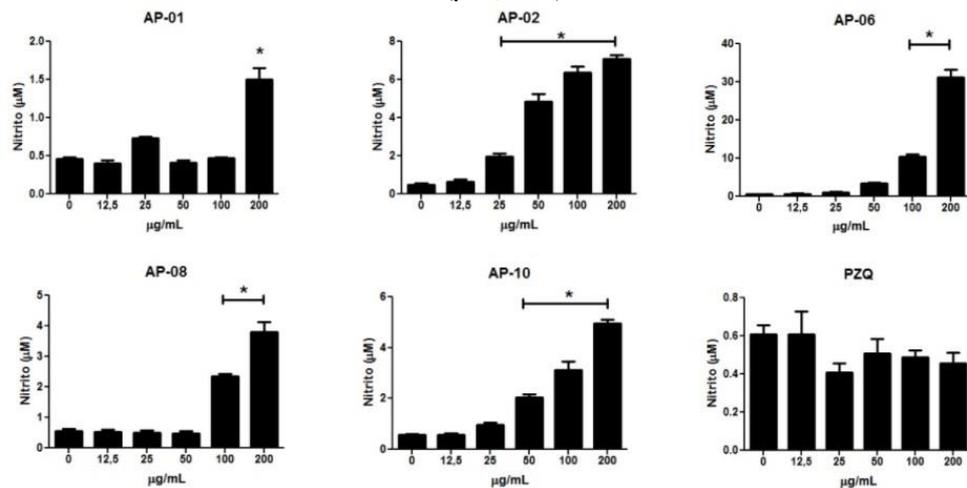
O composto LQIT/AP-06 teve aumento significativo na produção de nitrito nas duas maiores concentrações testadas – 100 µg/mL e 200 µg/mL. Na concentração de 200 µg/mL aumentou cerca de 30 vezes mais do que o controle sem tratamento.

O composto LQIT/AP-08 apresentou aumento significativo na produção de nitrito nas duas maiores concentrações testadas – 100 µg/mL e 200 µg/mL. Na concentração de 200 µg/mL aumentou cerca de 4 vezes mais do que o controle sem tratamento.

O último composto testado, o LQIT/AP-10 teve aumento significativo na produção de nitrito a partir da concentração de 25 µg/mL. A partir de 50 µg/mL aumentou duas vezes a produção de nitrito e aproximadamente cinco vezes mais com 200 µg/mL.

Para o Praziquantel não foram observadas alterações significativas na produção de nitrito quando comparadas com o controle. A figura a seguir (figura 14) apresenta estes dados em forma de gráficos.

Figura 21: Efeito dos compostos sobre a produção de nitrito em macrófagos J774.  
Legenda: (\*) valor estatisticamente significativo pelo teste ANOVA em relação ao controle sem tratamento ( $p < 0,0001$ ).



### 5.2.3 Avaliação dos parasitos adultos de *Schistosoma mansoni* frente aos derivados tiossemicarbazonas

#### 5.2.3.1 Motilidade dos parasitos

Os parasitos obtidos nos processos de eutanásia e submetidos aos testes foram avaliados tanto a sua motilidade quanto à mortalidade. Os derivados tiossemicarbazonas foram testados na concentração inicial de 200 µM.

Quanto aos seus movimentos, utilizando-se os critérios criados por Horiuchi (2005), o qual utiliza pontuações para avaliar cada estágio de movimento:

- Pontuação 3: parasitos ativos, apresentando movimentos corporais normais;
- Pontuação 1,5: parasitos lentos a muito lentos, apresentando movimentos retardados, podendo indicar apenas movimentos cefálicos;
- Pontuação 0: parasitos imóveis/mortos, ausência completa de qualquer movimento corporal e/ou cefálico.

O derivado LQIT/AP-08 apresentou pontuação 0 nas primeiras 24h, sendo o derivado tiossemicarbazona com melhor resposta esquistossomicida, seguido pelo LQIT/AP-02, que apresentou pontuação 0 (taxa de motilidade de 100%) em 96h. O composto LQIT/AP-01 apresentou 37,5% de parasitos sem qualquer mobilidade a partir de 72h. O composto LQIT/AP-10 apresentou, em 96h de experimento, uma taxa de ausência de motilidade de 12,5% (pontuação 0). Os compostos LQIT/AP-04 e LQIT/AP-06 não apresentaram quaisquer alterações na motilidade dos parasitos durante a realização dos experimentos.

### 5.2.3.2 Mortalidade dos parasitos

O derivado tiossemicarbazona LQIT/AP-08 apresentou a melhor atividade frente a parasitos adultos de *Schistosoma mansoni*, o qual, nas primeiras 24h de teste, já apresentou 100% de mortalidade. Os derivados LQIT/AP-01 e LQIT/AP-02 apresentaram resultados semelhantes 72h após a realização do teste (taxa de mortalidade de 37,5%), no entanto, no momento seguinte – em 96h de teste – o derivado LQIT/AP-02 atingiu 100% de mortalidade, ao passo que o derivado LQIT/AP-01 conseguiu erradicar 62,5% dos parasitos. O derivado LQIT/AP-10 apresentou taxa de mortalidade de 12,5% em 96h e manteve esta taxa em 120h. Os derivados LQIT/AP-04 e LQIT/AP-06 não apresentaram nenhuma taxa de mortalidade dos parasitos testados.

O derivado LQIT/AP-02 apresentou resposta à atividade esquistossomicida promissora, chegando a 100% de mortalidade dos parasitos em 96h de experimento. Valores próximos foram observados também com o LQIT/AP-01, chegando a causar a morte de 66% dos parasitos.

A tabela 2 apresenta os dados acerca das avaliações da motilidade e mortalidade dos testes.

Tabela 2: Percentual de motilidade e mortalidade (em %) dos parasitos de *Schistosoma mansoni* frente aos derivados tiossemicarbazonas.

GRUPOS	24h			48h			72h			96h			120h		
	Score de motilidade (em %) a 200 $\mu$ M														
	0	1,5	3	0	1,5	3	0	1,5	3	0	1,5	3	0	1,5	3
PZQ	100			100			100			100			100		
DMSO			100			100			100			100			100
AP-01	12,5	87,5		25	75		37,5	62,5		62,5	37,5		62,5	37,5	
AP-02		75	25		100		25	75		100			100		
AP-04			100			100			100			100			100
AP-06			100			100			100			100			100
AP-08	100			100			100			100			100		
AP-10	37,5	62,5		37,5	62,5		37,5	62,5		12,5	25	62,5	12,5	37,5	50
	24h			48h			72h			96h			120h		
	Score de mortalidade (em %) a 200 $\mu$ M														
PZQ	100			100			100			100			100		
DMSO			0			0			0			0			0
AP-01		12,5			12,5			37,5			62,5			62,5	
AP-02		0			0			37,5			100			100	
AP-04		0			0			0			0			0	
AP-06		0			0			0			0			0	
AP-08	100			100			100			100			100		
AP-10	0			0			0			12,5			12,5		

### 5.3 Discussão

O método de obtenção dos compostos finais tiossemicarbazonas, através da via indireta, que consistiu na condensação entre a hidrazina e o isotiocianato correspondente – obtendo a tiossemicarbazida – e posterior adição nucleofílica desta com o aldeído correspondente, permitiu que fossem obtidos os seis compostos finais utilizados neste estudo.

As sínteses são consideradas simples e apresentaram rendimentos satisfatórios. E, ainda sobre a síntese, através das técnicas espectroscópicas para elucidação estrutural, ficou comprovado que a configuração *E* é a majoritária, uma vez que, ao utilizar o aldeído como um dos reagentes, há uma preferência por esta configuração, além deste ser termodinamicamente mais estável, quando comparada com a configuração *Z*. O singlete azometínico é o indicativo de que a reação de obtenção das tiossemicarbazonas foi bem-sucedida.

No que diz respeito à relação estrutura-atividade das tiossemicarbazonas, dentre as atividades anteriormente listadas, a capacidade de possuir o efeito antiproliferativo se dá por conta da presença de porções aromáticas ligadas diretamente à estrutura principal da molécula e, ligado a este anel aromático, tanto átomos de halogênios quanto porções curtas alquil (OLIVEIRA et al., 2015). Este perfil de moléculas é encontrando em AP-04 e AP-12, bem como, um substituinte alquil em AP-06. No entanto, apesar da possibilidade de atividade antiproliferativa celular, estas moléculas não apresentaram resultados satisfatórios frente à atividade esquistossomicida, indicando que estes radicais não possuem atividade frente ao *S. mansoni* tanto na fase jovem quanto adulta dos parasitos.

Já os compostos AP-08 e AP-02, frente ao teste *in vitro*, o composto 08 foi capaz de matar 100% dos parasitos em 24h, no entanto, apresentou os valores mais tóxicos nos testes de citotoxicidade. Já o composto 02 também foi capaz de matar 100% dos helmintos em 96h de teste, apresentando valores de citotoxicidade bastante promissores, indicando, inclusive, que este composto é menos tóxico frente às células de macrófagos J774 e Vero que o Praziquantel.

Estruturalmente, o composto 02 diferencia-se das demais tiossemicarbazonas no radical ligado ao anel aromático – uma metoxila. A presença do oxigênio ligado ao anel aromático e a uma metila favorece tanto um possível aumento na interação com o receptor, através de ligação de hidrogênio e dipolo-dipolo, quanto na sua conjugação e posterior eliminação, o que sugere tanto a capacidade esquistossomicida, quanto a baixa citotoxicidade.

Ainda sobre a importância da estrutura e atividade, no que diz respeito à presença de halogênios ligados a grupos aromáticos, Santiago et al. (2014) comprovou a importância da presença destes na atividade esquistossomicida. No entanto, para o presente estudo, os

compostos que possuem halogênios em sua molécula – AP-04 e AP-10 – não apresentaram resultados satisfatórios frente aos parasitos de *S. mansoni*. Ainda sobre o estudo, ele relata maior atividade esquistosomicida quando há a presença de heterociclos contendo grupo metóxi e essa informação corrobora a atividade demonstrada pelo composto AP-02.

Acerca do derivado tiossemicarbazona AP-08, no que diz respeito à sua atividade frente aos parasitos no teste *in vitro*, a porção naftil, em outros estudos já descritos na literatura, apresentam a capacidade de se intercalar nas moléculas de DNA e, conseqüentemente, atuam promovendo a diminuição da atividade proliferativa celular (ALMEIDA et al., 2015). No entanto, apesar dessa atividade promissora frente ao teste supracitado, os valores de toxicidade demonstrados tornam esta molécula a mais tóxica dentre as testadas no estudo.

Na avaliação da produção indireta de óxido nítrico ficou claro que todos os compostos testados apresentaram capacidade de estimular a ativação de macrófagos, a partir da resposta Th1. A ativação dos linfócitos Th e posterior liberação de macrófagos, favorece a produção e liberação endógena de óxido nítrico. Sendo o ON uma molécula efetora que é capaz de atuar contra infecções, é esperado que este atue frente à infecção por *S. mansoni*.

A ativação de macrófagos nesta etapa – antes da postura de ovos pelos parasitos – sugere que as tiossemicarbazonas podem apresentar atividade esquistosomicida frente a helmintos imaturos. Este potencial de atuar contra parasitos jovens não é percebido na terapêutica com o Praziquantel, já que este é um de seus pontos negativos.

## 6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos nos testes, é possível concluir que o AP-02 é o composto promissor neste estudo. Através da avaliação dos testes e citotoxicidade ficou claro que o composto 02 apresentou os melhores resultados, inclusive, quando comparado ao Praziquantel. Todos os compostos tiossemicarbazonas foram capazes de promover aumento na produção de ON, o que sugere uma possível atividade imunomoduladora a estas moléculas. Por fim, no que diz respeito à atividade esquistossomicida, apesar do AP-08 ter apresentado os melhores resultados – no que diz respeito ao tempo de ação – o composto AP-02, por ter se apresentado como menos tóxico e também capaz de estimular a produção de óxido nítrico, foi eleito o composto promissor deste estudo.

## 6.1 Perspectivas

- Realizar os testes *in vitro* utilizando concentrações menores (100, 50, 25 e 12,5  $\mu\text{M}$ );
- Realizar Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de transmissão (MET) dos parasitos adultos de *S. mansoni* tratados *in vitro* com o derivado tiosemicarbazona LQIT/AP-02;
- Realizar o teste das citocinas, a fim de avaliar a possibilidade de atividade imunomoduladora;
- Avaliar a atividade *in vivo* dos composto AP-02.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. E. de et al. Síntese e atividade biológica do derivado 6-formil-oxamniquina. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, Brasil, v. 44, n. 4, p.111-222, out./nov. 2008.
- ALMEIDA, S. M. V. de et al. Synthesis, dna binding, and antiproliferative activity of novel acridine-thiosemicarbazone derivatives. **International journal of molecular sciences**, Recife, v. 16, p. 13023-13042, jun. 2015.
- ANDERSON, R. M. et al. What is required in terms of mass drug administration to interrupt the transmission of schistosome parasites in regions of endemic infection?. *Parasites & vectors*, Londres, v. 8, p. 2-11, out. 2015.
- ANDREWS, P. et al. Praziquantel. **Med res reviews.**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 147-200, abr./nov. 2013.
- BARRETO, A. V. M. S. et al. Análise da positividade da esquistossomose mansoni em regionais de saúde endêmicas em pernambuco, 2005 a 2010. **Epidemiol. serv. saúde**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 87-96, jan./mar. 2015.
- BERALDO, Heloisa. Semicarbazonas e tiossemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Quim. nova**, Belo horizonte, v. 27, n. 3, p. 461-471, set. 2003.
- BERALDO, H.; GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. **Mini-reviews in medicinal chemistry**, Belo horizonte, v. 4, n. 1, p. 31-39, jun. 2004
- BHARTI, N.; ATHAR, F.; MAURYA, M. R.; AZAM, A. Synthesis, characterization and in vitro anti-amoebic activity of new palladium (II) complexes with 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde N(4)-substituted thiosemicarbazones. **Bioorg. Med. Chem.** v.12, p. 4679-4684, 2004.
- BRUNET, L. R. Nitric oxide and Th2 response combine to prevent severe hepatic damage during *Schistosoma mansoni* infection. **The Journal of Immunology**. v. 163, p. 4976-4984, 1999.
- CDC/ATLANTA/USA. DPDX, 2003 – DIVISION OF PARASITIC DISEASES. *Schistosoma mansoni*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/>>. Acesso em: 16 dez. 2016
- CERQUEIRA, Nereide Freire; YOSHIDA, Winston Bonetti. Óxido nítrico. revisão. **Acta cir bras**, Botucatu, v. 17, n. 6, p. 417-423, nov./dez. 2002.
- CHRISTOPHERSON, J. B. - The successful use of antimony in bilharziasis administered as intravenous injections of antimony tartaratum. **Lancet** 2: 325-327, 1918
- CIOLI, D. Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? **Opin infect dis.** v. 13, n.11, p. 659-663, abr. 2000.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; AECHER, S. Antischistosomal Drugs: Past, Present and Future. *Pharmac. Ther.* v. 68, p. 35-85. 1995

COON, D. R.; **Schistosomiasis: Overview of the History, Biology, Clinicopathology, and Laboratory Diagnosis**. Clinical Microbiology Newsletter, 27 (21). 2005.

CVE. **Manual das doenças transmitidas por água e alimentos** Esquistossomose Mansônica. Disponível em:  
<[http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IFN\\_Esquito.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IFN_Esquito.htm)>. Acesso em: 16 dez. 2016.

CVE. **Vigilância epidemiológica e controle da esquistossomose**. Disponível em:  
<[ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/hidrica/doc/manu\\_esqui.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/manu_esqui.pdf)>. Acesso em: 12 mai. 2016.

DA SILVA, V. B. R. et al. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: praziquantel and oxamniquine. **Bioorganic & medicinal chemistry**, Recife, v. 25, p. 3259-3277, abr. 2017.

DA SILVA, L. C.; CHIEFFI, P. P.; CARRILHO, F. J. **Schistosomiasis mansoni – Clinical features**. Gastroenterol Hepatol. 28(1):30-39 p. 2005.

DOENHOFF, M. J. et al. Resistance of schistosoma mansoni to praziquantel: is there a problem? **Trans r soc trop med hyg.**, v. 96, n. 5, p. 465-469, set/out. 2002.

DVORÁK J. et al. SmCL3, a Gastrodermal Cysteine Protease of the Human Blood Fluke Schistosoma mansoni. **PLoS Negl Trop Dis** 3(6): e449, 2009.

EISSA, M. M. et al. Repositioning of chlorambucil as a potential anti-schistosomal agent. **Acta tropica**, Egito, v. 166, p. 58-66, nov. 2016.

ELBAZ, T.; ESMAT, G. **Hepatic and intestinal schistosomiasis**. Journal of Advanced Research, 2013.

EWEAS, A. F. et al. Design, synthesis, anti-schistosomal activity and molecular docking of novel 8-hydroxyquinoline-5-sufonyl 1,4-diazepine derivatives. **Bioorganic chemistry**, Egito, v. 46, p. 17-25, fev. 2013.

FALLON, P. G. et al. Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a senegal isolate of schistosoma mansoni. **American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 53, n. 1, p. 61-62, jul. 1995.

FEUN, L. et al Phase I and pharmacokinect study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 50, p. 223-229, 2002.

FONSECA, N. C. et al. Synthesis of a sugar-based thiosemicarbazone series and structure-activity relationship versus the parasite cysteine proteases rhodesain, cruzain and schistosoma mansoni cathepsin b1. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2666-2677, mai. 2015.

FROHBERG, H.; SCHENCKING, M. S. The toxicological profile of praziquantel in comparision to other anthelmintics drugs. **Acta leiden**, v. 57, p. 201-215, ago. 1989.

FULMER, G. R. et al. NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. **Organometallics**, v. 29, N. 9, p. 2176-2179, abr. 2010.

GONNERT, R.; ANDREWS, P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. **Z parasitenkd**, Berlin, v. 52, n. 2, p. 129-150, jul. 1977.

GARAH, F.B. ET AL. The Antimalarial Trioxaquine DU1301 Alkylates Heme in Malaria-Infected Mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2966-2969, 2008.

GONSALVES, A. M. D'a. R.; MELO, T. M. Y. D. P. E. **Ressonância magnética nuclear: Espectroscopia, desvio químico**. 1 ed. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2007. 59-66 p.

GREEN, L. C.; et al. Analyses of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p. 131-138, 1982

GRYSEELS, Bruno. Schistosomiasis. **Infectious disease clinics of north america**, Antwerpen, v. 26, n. 2, p. 383-387, jun. 2012.

GRZYNCH et al. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **J Immunol**, v. 146, p. 1322-1327, 1991.

GUIDO, R. V. C. & OLIVA, G. Structure-Based Drug Discovery for Tropical Diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. 9, p. 824-843, 2009

GUISSE, F. et al. Therapeutic evaluation of two different dose regimens of praziquantel in a recent schistosoma mansoni focus in northern Senegal. **American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 56, n. 1, p. 511-514, abr. 1997.

HORIUCHI, A. et al. The effect of free and polyethylene glycol-liposome-entrapped albendazole on larval mobility and number of Toxocara canis infected mice. **Vet Parasitol**, v. 129 (1-2): p. 83-87, 2005.

ISMAIL, M. et al. Characterization of isolates of schistosoma mansoni from egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. **American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 55, n. 1, p. 214-218, nov. 1996.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infection. **Microbiological Reviews**. v. 59, n. 4, p. 533-547, 1995.

KAPADIA, G. J. et al. Antiparasitic activity of menadione (vitamin k3) against schistosoma mansoni in bab/c mice. **Acta tropica**, Washington, v. 167, p. 163-173, fev. 2017.

KATZ, N. Terapêutica Experimental da Esquistossomose mansoni. In: Carvalho OS; Coelho PMZ; Lenzi HL (Org.). Schistosoma mansoni e Esquistossomose uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008, p. 823-847.

KATZ, N. et al. Imatinib activity on schistosoma mansoni. **Mem inst oswaldo cruz**, Rio de janeiro, v. 108, p. 83-90, nov/abr. 2014.

KATZ, N; COELHO, P. M. Z. clinical therapy of schistosomiasis mansoni: The brazilian contribution. **Acta Tropica**, Miami, v. 108. p. 72-78, 2008

LAMBERTUCCI, J. R. et al. Imaging techniques in the evaluation of morbidity in schistosomiasis mansoni. **Acta Tropica**, 108, 209–217 p. 2008

KAISER, C.R. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, 2000.

LIU, Y. H. et al. Comparative efficacy of praziquantel and its optitic isomers in experimental therapy of schistosomiasis japonica in rabbits. **Chin med j (engl)**., Georgia, v. 99, n. 12, p. 935-940, dez. 1986.

MANDOUR, M. E. et al. Pharmacokinetics of praziquantel in healthy volunteers and patients with schistosomiasis. **Trans r soc trp med hyg.**, v. 84, p. 389-393, mai/jun. 1990.

MATOS-ROCHA, T. J. et al. Ultrastructural changes in schistosoma mansoni male worms after in vitro incubation with the essential oil of mentha x villosa huds. **Rev inst med trop**, São paulo, mai. 2016

MATTER, A.; KELLER, T. H.. Impact of non-profit organizations on drug discovery: opportunities, gaps, solutions. **Drug discovery today**, Singapore, v. 13, n. 7, p.111-222, abr. 2008.

MELHORN, H. et al. In vivo and in vitro experiments on the effects of praziquantel on schistosoma mansoni. **Arzneimittelforschung**, v. 81, n.11, p. 544-554, ago. 1981.

MOORCROFT, M. J.; DAVIS, J; COMPTON, R G.. Detection e determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, Cidade, v. 54, n. 5, p. 785-803, jun. 2011.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, Cidade, v. 65, p. 55-63, dez. 1983.

NAFTALE, K.; ROCHA R. S.; CHAVES, A. Preliminary trials with praziquantel in human infections due to schistosoma mansoni. **Bull world health organ**, v. 57, n. 2, p. 781-785, fev. 1979.

OLDS, G R. Administration of praziquantel to pregnant and lactating women. **Acta tropica**, v. 86, p. 185-195, jan. 2003.

OLIVEIRA, J. F. et al. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. **European journal of medicinal chemistry**, Recife, v. 104, n. 2, p. 148-156, nov. 2015.

OLIVEIRA, G. Cancer and parasitic infections: similarities and opportunities for the development of new control tools. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 47, n. 1, p. 1-2, 2014.

- PAX, E. et al. A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of schistosoma mansoni and schistosoma japonicum. **Naunyn shmiedebergs arch pharmacol.** v. 13, n.11, p. 309-315, out. 1978.
- PICA-MATTOCCIA, L. et al. Cytochalasin D abolishes the schistosomicidal activity of praziquant. **Experimental Parasitology**, 115, 344–351 p. 2007.
- PORDEUS, L. et al. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 3, n. 17, p.163-175, jul. 2008a.
- PORTAL SAÚDE. **Esquistossomose e geo-helmintíases**. Disponível em: <[http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/protocolo\\_de\\_apoio\\_ao\\_tratamento\\_coletivo-\\_esquistossomose.pdf](http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/protocolo_de_apoio_ao_tratamento_coletivo-_esquistossomose.pdf)>. Acesso em: 19 ago. 2016.
- PRADINES, V. ET AL. Trioxaquine PA1259 Alkylates Heme in the Blood-Feeding Parasite Schistosoma mansoni. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 2403-2405, 2011.
- PRETSCH, E; BUHLMANN, P; BADERTSCHER, M. **Structure determination of organic compounds: Tables of Spectral Data**. 4 ed. Zurique: Springer-Verlag, 2009, p. 93-106-183.
- RAPADO, L. N. et al. Schistosomiasis control using pipartine against biomphalaria glabrata at different developmental stages. **Plos negl trop dis**, São paulo, v. 7, n. 6, p. 2251, jul. 2013.
- SADHU, P. S. et al. Synthesis of new praziquantel analogues: potential candidates for the treatment of schistosomiasis. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, India,v. 22, p. 1103-1106, dez. 2011.
- SANTOS, A. T. et al. Preliminary clinical trials with praziquantel in schistosoma japonicum infections in the philippines. **Bull world health organ.**, v. 57, p. 793-799, abr. 1979.
- SANTIAGO, E. F. et al. Evaluation of the anti-schistosoma mansoni activity of thiosemicarbazones and thiazoles. **Antimicrob agents chemother**, v. 58, n. 1, p. 352-363, jan. 2014.
- SHUHUA, X. et al. Effects of praziquantel on different developmental stages of schistosoma mansoni in vitro and in vivo. **J infect dis**, Oxford, v. 151, n. 6, p. 1130-1137, jun. 1985.
- SHUHUA, X.; CATTO, B. A. In vitro and in vivo studies of the effect of artemether on schistosoma mansoni. **Antimicrob agents chemother**, Georgia, v. 33, n. 6, p. 1557-1566, set. 1989.
- SILVA, P. C. V. & DOMINGUES, A. L. C. **Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no Estado de Pernambuco, Brasil**. Brasília: Epidemiol. Serv. Saúde, jul-set 2011. 20(3):327-336 p.
- STEINER, K. et al. The fate of praziquantel in the organism. i – pharmacokinetics in animals.. **Eur j drug metab pharmacokinetic.**, v. 1, p. 85-95, mar. 1976.

STELMA, F. F. et al. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of schistosoma mansoni. **American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 53, n. 1, p. 167-170, jan. 1995.

TENÓRIO, R. P. et al. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química nova**, Recife, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, ago. 2005.

TALLIMA, Hatem; RIDI, Rashika El. Praziquantel binds schistosoma mansoni adult worm actin. **International journal of antimicrobial agents**, Cairo, v. 29, p. 570-575, 2007.

VASAVI, Y. et al. Heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy – an overview. **International Journal of PharmTech Research**, India, v. 3, p. 1410-1422, 2011.

VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Praziquantel**. Disponível em:  
<[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cab\\_n21\\_vigilancia\\_saude\\_2ed\\_p1.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cab_n21_vigilancia_saude_2ed_p1.pdf)>. Acesso em: 04 ago. 2016

WANG, W.; WANG, Li; LIANG, Y. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. **Parasitol res**, Berlin, v. 111, n. 5, p. 1871-1877, out. 2012.

WHO, World Health Organization. **Schistosomiasis: key facts**. Disponível em:  
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: 29 jun. 2016.

WHO, World Health Organization. **Schistosomiasis: situation and trends**. Disponível em:  
<[http://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/schistosomiasis/en/](http://www.who.int/gho/neglected_diseases/schistosomiasis/en/)>. Acesso em: 29 jun. 2016.

WHO, World Health Organization. **Strategy**. Disponível em:  
<<http://www.who.int/schistosomiasis/strategy/en/>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

YANG, Y. et al. IL-6 plays a unique role in initiating c-Maf expression during early stage of CD4 T cell activation. **Journal of Immunology**, v. 174, p. 2720-2729, 2005.