



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RENATA CARLOS DA SILVA SANTOS

ARIL-TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO
ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA

RECIFE – 2017

RENATA CARLOS DA SILVA SANTOS

**ARIL-TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO
ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA:

Prof.^a. Dr.^a Maria do Carmo Alves de Lima

CO-ORIENTADOR:

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

RECIFE – 2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S237a Santos, Renata Carlos da Silva.
Aril-tiossemicarbazonas: síntese, caracterização estrutural e avaliação
esquistossomicida / Renata Carlos da Silva Santos. – 2017.
75 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. Tiossemicarbazonas. 2. Esquistossomose. 3. Praziquantel. I. Lima,
Maria do Carmo Alves de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-248)

RENATA CARLOS DA SILVA SANTOS

**“ARIL-TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO 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: 27/07//2017

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Alves de Lima (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Presidente)
Universidade Estadual da Paraíba

Prof.^a Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

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^a. Dr^a. 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^a. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Farias

SUB-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof^a. Dr^a. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

**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

À João Batista, Regina, Karol (*in memoriam*) e João Victor.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, pelas bênçãos que tem me dado até hoje e por me permitir caminhar.
Aos meus pais e a meu irmão João Victor, por todo o amor, carinho e apoio. Tudo o que sou devo a vocês.

À Ulisses, por ser um marido tão compreensivo, companheiro, amável e amigo.

Aos meus familiares e amigos maravilhosos, pelo incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus amigos Paulo e Tibério, pelos muitos momentos de felizes e de companheirismo que passamos.

À minha orientadora, Prof.^a Maria do Carmo Alves de Lima, pela confiança em mim depositada.

Ao meu co-orientador Prof.^o Fábio Brayner e ao Prof.^o Luiz Alves, pelo suporte e por terem gentilmente disponibilizado seu laboratório.

A Serginho, Cezar e Karla, por todo conhecimento passado, suporte e companheirismo

A todos os colegas do LQIT: Miguel, Nayara, Paula, Mirelly, Jamerson, Keri, Natan, Amélia, Allana e Diogo, pelos conhecimentos trocados e pelos momentos vividos em laboratório.

Aos colegas do LBCM, Gabriel, Nairom, Elverson, Rubens e Jorge, por todo o suporte, aprendizado e pelos bons momentos compartilhados

Ao CNPq pelo suporte

RESUMO

A esquistossomose é a segunda doença negligenciada de maior abrangência mundial e constitui um grave problema de saúde pública. Estima-se cerca de 258 milhões de casos em 78 países no mundo sendo estes prevalentes em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos nas áreas tropicais e subtropicais do globo. No Brasil, a única esquistossomose presente é a mansônica e fatores como a falta de educação sanitária e acesso ao saneamento básico contribuintes para a disseminação da doença. O fármaco de escolha no tratamento da esquistossomose mansônica é o Praziquantel, único fármaco ativo contra todas as espécies que acometem o ser humano. Entretanto, relatos em literatura de cepas de *S. mansoni* resistentes ao medicamento e outros aspectos farmacológicos, por exemplo, reforçam a necessidade de estudos de desenvolvimento de novos fármacos que possam ser empregados no tratamento da esquistossomose mansônica. Neste cenário, derivados tiossemicarbazônicos vêm sendo apresentados como alternativa tendo em vista seu amplo espectro de ação, inclusive com relatos de atividades esquistossomicidas, bem como aspectos químicos observados, desta forma o presente estudo propõe a síntese, caracterização estrutural e avaliação da potencial atividade esquistossomicida de novos derivados aril-tiossemicarbazonas. Foram sintetizados seis novos derivados tiossemicarbazônicos com diferentes substituintes em N4: 4-cloro-benzil, 4-bromo-benzil, alil, naftil, toluil e 4-metóxi-benzil. Eles foram obtidos através da reação indireta com derivados tiossemicarbazida (LQIT/LT) obtidos em laboratório por adição nucleofílica entre hidrazina e isotiocianatos correspondentes. Posteriormente, foi realizada a condensação dos derivados tiossemicarbazida previamente sintetizados com o 5-metóxi-indol-3-carboxaldeído para a obtenção dos derivados tiossemicarbazona (LQIT/AP) utilizados nos testes deste estudo. Os derivados foram elucidados através de técnicas espectroscópicas (RMN ¹H, RMN ¹³C, COSY e HSQC) e foram submetidos à avaliação de sua citotoxicidade em macrófagos J774, testes de quantificação de óxido nítrico e avaliação *in vitro*, à uma concentração de 200 µM, de sua influência sobre a motilidade/mortalidade de parasitos adultos de *S. mansoni*. Pôde-se observar que os compostos não apresentaram citotoxicidade em células saudáveis, que todos eles foram capazes de promover a produção de óxido nítrico ao passo que para o Praziquantel não foi observada tal característica e que os derivados LQIT/AP09, LQIT/AP07, LQIT/AP12 e LQIT/AP11 promoveram mortalidade de parasitos após 24h, 48h, 72h e 120h, respectivamente. Acredita-se que, diante dos resultados, pode haver alguma relação dos compostos com mecanismos de imunomodulação e ainda que alguns aspectos estruturais destes compostos tais como a presença do grupo metóxi em anel indólico, a presença de anéis aromáticos e a presença de halogênios atrelados à relatos da literatura possam apresentar relação com os aspectos observados durante o experimento e a potencial atividade esquistossomicida dos compostos. Diante dos resultados obtidos, sugerimos como compostos promissores do estudo LQIT/AP09, LQIT/AP07, LQIT/AP12 e LQIT/AP11, contudo são necessários testes complementares *in vivo* e *in vitro* para melhor avaliação desses derivados e maior embasamento de sua atuação frente ao *S. mansoni*.

Palavras-chave: Tiossemicarbazonas. Esquistossomose. Praziquantel.

ABSTRACT

Schistosomiasis is the second most neglected disease in the world and is a serious public health problem. Approximately 258 million cases are estimated in 78 countries around the world and are prevalent in developing and underdeveloped countries in the tropical and subtropical areas of the globe. In Brazil, the only schistosomiasis present is mansonic and the lack of sanitary education and access to basic sanitation contribute to the spread of the disease. The drug of choice in the treatment of schistosomiasis mansoni is Praziquantel, the only active drug against all species that affect humans. However, reports in the literature of drug resistant strains of *S. mansoni* and other pharmacological aspects, for example, reinforce the need for studies of the development of new drugs that may be used in the treatment of schistosomiasis mansoni. In this scenario, thiosemicarbazonic derivatives have been presented as an alternative in view of their broad spectrum of action, including reports of schistosomicidal activities, as well as chemical aspects observed, in this way the present study proposes the synthesis, structural characterization and evaluation of the potential schistosomicidal activity of new aryl-thiosemicarbazones derivatives. Six new thiosemicarbazonic derivatives having different N4 substituents were synthesized: 4-chlorobenzyl, 4-bromobenzyl, allyl, naphthyl, toluyl and 4-methoxybenzyl. They were obtained through the indirect reaction with thiosemicarbazide derivatives (LQIT/LT) obtained in the laboratory by nucleophilic addition between hydrazine and corresponding isothiocyanates. Subsequently, the condensation of thiosemicarbazide derivatives previously synthesized with 5-methoxyindole-3-carboxaldehyde was obtained to obtain the thiosemicarbazone derivatives (LQIT/AP) used in the tests of this study. The derivatives were elucidated by spectroscopic techniques (^1H NMR, ^{13}C NMR, COZY and HSQC) and were submitted to evaluation of their cytotoxicity in J774 macrophages, nitric oxide quantification tests and in vitro evaluation at a concentration of 200 μM of its influence on the motility / mortality of adult *S. mansoni* parasites. It was noted that the compounds did not exhibit cytotoxicity in healthy cells, all of which were able to promote the production of nitric oxide whereas for Praziquantel no such characteristic was observed and that the derivatives LQIT/AP09, LQIT/AP07, LQIT/AP12 and LQIT/AP11 promoted mortality of parasites after 24h, 48h, 72h and 120h, respectively. It is believed that, in view of the results, there may be some relationship of the compounds with immunomodulation mechanisms and although some structural aspects of these compounds such as the presence of the indolic ring methoxy group, the presence of aromatic rings and the presence of halogens attached to the reports of the literature may be related to the aspects observed during the experiment and the potent schistosomicidal activity of the compounds. In view of the obtained results, we suggest as promising compounds of the LQIT/AP09, LQIT/AP07, LQIT/AP12 and LQIT/AP11 study, however, in vivo and in vitro complementary tests are necessary for a better evaluation of these derivatives and a better basis for their performance against the *S. mansoni*.

Keywords: Thiosemicarbazones. Schistosomiasis. Praziquantel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição geográfica das diferentes espécies de <i>Schistosoma</i> .	22
Figura 2 -	Distribuição de casos confirmados de esquistossomose de 2010 a 2015	23
Figura 3 -	Cercária penetrando a pele (A) e Esquistossômulo (B)	24
Figura 4 -	Casal de <i>S. Mansoni</i> . Fêmea no canal ginecofórico do macho no momento da cópula	24
Figura 5 -	Ovo fertilizado de <i>S. mansoni</i>	25
Figura 6 -	Ciclo de vida do <i>S. masoni</i>	25
Figura 7 -	Praziquantel (A) e Oxamniquina (B)	26
Figura 8 -	Derivado da Trioxaquina PA1259	29
Figura 9 -	Derivado promissor do estudo	29
Figura 10 -	Derivados imidazolidínicos LPSF/PTS10 (A) e LPSF/PTS23 (B)	30
Figura 11 -	Mefloquina	30
Figura 12 -	Estrutura básica de uma tiossemicarbazona	31
Figura 13 -	Possíveis configurações das tiossemicarbazonas evidenciando hidrogênio azometínico	44
Figura 14 -	RMN ¹ H do composto AP09	44
Figura 15 -	RMN ¹ H do composto AP09 evidenciando os hidrogênios do grupamento azometínico, NH aromático e NH hidrazínico	45
Figura 16 -	RMN ¹ H do composto AP09 evidenciando o H do NH indólico e os demais hidrogênios das porções aromáticas da molécula	46
Figura 17 -	Espectro de COSY para o composto AP09 mostrando as correlações entre hidrogênios	47
Figura 18 -	RMN ¹³ C do composto AP 09 evidenciado os carbonos da função metóxi, o azometínico, o adjacente ao NH do anel indólico o da tiocarbonila	48
Figura 19 -	Espectro de HSQC para o composto AP09 mostrando as correlações ¹ J _{C,H}	49
Figura 20 -	Quantificação da produção de nitrito em macrófagos J774 dos derivados da série LQIT/AP	54
Figura 21 -	Estrutura geral dos derivados tiossemicarbazônicos	57
Figura 22 -	Composto PCI – 34051 e seu docking com a enzima <i>SmHDAC8</i>	58
Figura 23 -	Compostos 4a (a) e 4g (b) demonstrados no estudo	59
Figura 24 -	Estrutura geral do composto 2b	59
Figura 25 -	Estrutura geral dos compostos 2a-d	60

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 -	Síntese de tiossemicarbazonas a partir de tiossemicarbazidas (obtidas comercialmente ou previamente sintetizadas) e aldeídos ou cetonas	31
Esquema 2 -	Formas tautoméricas de tiossemicarbazonas	32
Esquema 3 -	Rota sintética da série LQIT/AP	35
Esquema 4 -	Mecanismo reacional de formação da tiossemicarbazida 1	42
Esquema 5 -	Mecanismo reacional de formação da tiossemicarbazona 2	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Esquema terapêutico para o tratamento da esquistossomose mansônica no Brasil e efeitos colaterais comuns dos medicamentos utilizados	27
Tabela 2 -	Viabilidade celular em macrófagos J774 dos derivados tiosemicarbazônicos	53
Tabela 3 -	Score de motilidade / mortalidade após o tempo de incubação (%) de parasitos adultos frente à série LQIT/AP	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PZQ	Praziquantel
LQIT	Laboratório de Química e Inovação Terapêutica
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
Th1	Células T helper tipo 1
Th2	Células T helper tipo 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
IL1α	Interleucina-1 α
IL1β	Interleucina 1 β
IL6	Interleucina 6
STAT1	Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição 1
IFN-γ	Interferon gama
IL4	Interleucina 4
IL5	Interleucina 5
IL10	Interleucina 10
IL13	Interleucina 13
IL33	Interleucina 33
T_{reg}	Células T reguladoras
NO	Óxido Nítrico
NOs	NO sintase
N	Nitrogênio
S	Enxofre
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBF	Soro Bovino Fetal
μL	Microlitros
MTT	{brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolio]}
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
COSY	Homonuclear COrrrelation Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy
Rf	Razão de frente
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
μM	Micromolar

SmHDAC histona deacetilase 8 presente no *S. mansoni*

SmCB1 Catepsina B1 do *S. mansoni*

Ca²⁺ Cálcio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	Gerais	19
2.2	Específicos	19
3	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1	Histórico e distribuição geográfica	21
3.2	Doença	23
3.2.1	Ciclo de vida e fases da doença.....	24
3.2.2	Profilaxia e tratamento da esquistossomose mansoni.....	26
3.2.3	Imunopatologia.....	27
3.2.4	Possível resistência ao praziquantel e alternativas terapêuticas.....	28
3.2.4.1	<i>Tiosemicarbazonas</i>	31
4	METODOLOGIA	34
4.1	Materiais e métodos: Estudo químico	34
4.1.1	Materiais, Reagentes e Solventes.....	34
4.1.2	Equipamentos.....	34
4.1.3	Procedimentos experimentais.....	35
4.1.3.1	<i>Síntese do derivados intermediários LQIT/LT</i>	35
4.1.3.2	<i>Síntese dos compostos finais derivados de tiosemicarbazonas LQIT/AP</i>	36
4.2	Materiais e métodos: Estudos biológicos	36
4.2.1	Animais.....	36
4.2.2	Materiais e Equipamentos.....	36
4.2.3	Procedimentos experimentais.....	37
4.2.3.1	<i>Avaliação da viabilidade celular das tiosemicarbazonas frente à linhagem celular de macrófagos J774</i>	37
4.2.3.2	<i>Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)</i>	38
4.2.3.3	<i>Análises estatísticas</i>	38
4.2.3.4	<i>Infecção por Schistosoma mansoni</i>	38
4.2.3.5	<i>Perfusão do sistema porta para recuperação de vermes adultos de Schistosoma mansoni</i>	39
4.2.3.6	<i>Avaliação da suscetibilidade in vitro de vermes adultos de Schistosoma mansoni frente aos derivados de tiosemicarbazona</i>	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Estudo Químico	42
5.1.1	Mecanismo reacional e caracterização estrutural.....	42
5.1.2	Dados espectroscópicos e espectrométricos da série LQIT/AP.....	49
5.1.2.1	<i>N-(4-metoxifenil)-2-[(5-metoxi-1H-indol-3-il)metileno]hidrazinacarboxitioamida – LQIT/AP03</i>	49
5.1.2.2	<i>N-(4-bromofenil)-2-[(5-metoxi-1H-indol-3-il)metileno]hidrazinacarbotoamida – LQIT/AP05</i>	50
5.1.2.3	<i>N-alil-2-[(5-metoxi-1H-indol-3-il)metileno]hidrazinacarbotoamida – LQIT/AP07</i>	50
5.1.2.4	<i>N-(naftaleno-2-il)-2-[(5-metoxi-1H-indol-3-il)metileno]hidrazinacarbotoamida – LQIT/AP09</i>	51
5.1.2.5	<i>N-(p-toluil)-2-[(5-metoxi-1H-indol-3-il)metileno]hidrazinacarbotoamida – LQIT/AP11</i>	51
5.1.2.6	<i>N-(4-clorofenil)-2-[(5-metoxi-1H-indol-3-il)metileno]hidrazinacarbotoamida – LQIT/AP12</i>	52
5.2	Estudo Biológico	52

5.2.1	Avaliação da citotoxicidade frente à linhagem de macrófagos J774 e avaliação da concentração indireta de óxido nítrico (NO).....	52
5.2.2	Avaliação <i>in vitro</i> dos derivados tiossemicarbazona frente a parasitos adultos de <i>S. mansoni</i>	55
6	CONCLUSÃO	63
6.1	Perspectivas	66
	REFERÊNCIAS	67

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma parasitose causada por helmintos trematódeos do gênero *Schistosoma* prevalente em áreas tropicais e subtropicais, principalmente em comunidades pobres com pouco ou nenhum acesso a água potável ou saneamento básico e estima-se que cerca de 90% dos indivíduos infectados que requerem tratamento para a doença, são Africanos. Existem duas formas principais de esquistossomose: A intestinal e a urogenital (WHO, 2017).

Estas principais formas são causadas por seis espécies: o *Schistosoma haematobium*, o *Schistosoma mansoni* e o *Schistosoma japonicum*. O *S. haematobium* e o *S. mansoni* ocorrem tanto na África como no Oriente Médio, enquanto que apenas o último está presente nas Américas. O *S. japonicum* está localizado na Ásia, principalmente nas Filipinas e na China. As outras três espécies estão distribuídas mais localmente e são elas: o *Schistosoma mekongi*, na bacia do rio Mekong, o *Schistosoma guineensis* e o *Schistosoma intercalatum* na África Ocidental e Central (COLLEY et al., 2014).

Entre as drogas já utilizadas no tratamento da esquistossomose, o praziquantel (PZQ) 2-(ciclo-hexanocarbonil)-3,6,7,11beta-tetra-hidro-1H-pirazino-[2,1alfa]-isoquinolin-4-ona, um derivado de pirazinoisoquinolina, vem sendo utilizado há mais de 40 anos e é o único fármaco ativo contra as três principais espécies. Desde sua descoberta nos anos 70, ele tem sido amplamente utilizado na prevenção e no tratamento da doença devido à sua alta eficácia, excelente tolerância, poucos efeitos colaterais transitórios, administração simples e custo competitivo. Desde o início da terapêutica da doença, esforços são feitos no intuito de eleger a melhor alternativa para o tratamento, entretanto este trajeto torna-se limitado devido ao reduzido número de medicamentos disponíveis que forneçam eficácia, segurança e boa tolerabilidade. Dentre as alternativas terapêuticas, pode-se observar a síntese de novos fármacos e mais recentemente a elaboração de vacinas (ROFATTO et al., 2011; SILVA, K. et al., 2012; WANG et al., 2012).

Entretanto fatores como o uso de um único fármaco por cerca de 40 anos, a terapia indiscriminada com pouco diagnóstico prévio, a falta de adesão a um tratamento prolongado, a falta de educação sanitária e a indiferença à infecção crônica sugerem uma resistência ao PZQ, inclusive já observada em casos de infecções por *Schistosoma haematobium* em que o tratamento padrão aplicado repetidas vezes não foi capaz de eliminar o parasito. (SETO et al. 2011; WANG et al. 2012).

Em adição, é importante observar que o atual fármaco de escolha na terapia da doença mostra pouca atividade frente a parasitos jovens tanto *in vitro* quanto *in vivo* o que pode corroborar com a baixa taxa de cura observada em áreas de grande transmissão onde indivíduos tendem a infectar-se e apresentar tanto parasitos jovens quanto parasitos adultos (GUIDI et al., 2016). Tendo em vista esses fatores, torna-se imprescindível o avanço nas pesquisas de novos fármacos objetivando a eliminação dos problemas apresentados e sua inclusão na terapêutica da parasitose.

Aliada à essa busca de novas alternativas terapêuticas está a química medicinal que desde seu advento propõe a descoberta de novos quimioterápicos que proporcionem alta seletividade frente ao agente invasor e simultaneamente baixa toxicidade ao hospedeiro. (OLIVEIRA et al., 2008)

As tiossemicarbazonas e seus derivados são compostos ativos que vem se destacando na sua ampla aplicabilidade no tocante a atividades anti *T. cruzi* (FONSECA et al., 2015) antineoplásicas, antifúngicas, antiviral (MOORTHY et al., 2013) e leishmanicida (BRITTA et al., 2014). Além disso, o núcleo indólico vem sendo considerado promissor além de uma estrutura privilegiada no projeto de novas moléculas tendo sido associado por exemplo à sua capacidade de ligação ao DNA, correlacionando-se com a apoptose de células cancerosas uma vez que este tipo de morte pode ser atribuído à alteração na estrutura do ácido nucleico na sua função ou na sua estabilidade. Além disso, a interação entre compostos de indol e regiões específicas deste podem modular vários processos celulares chave tais como a replicação de DNA (OLIVEIRA et al., 2017).

Dessa forma, tendo em vista a resistência associada ao longo período de monoterapia com praziquantel já descrito, o Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) propõe o avanço nos estudos acerca da esquistossomose através do presente trabalho que propõe a síntese de novos compostos tiossemicarbazonas e avaliação de seu potencial esquistossomicida como alternativa terapêutica no tratamento desta parasitose.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Síntetizar, caracterizar estruturalmente e testar a potencial atividade esquistossomicida frente a parasitos adultos de *S. mansoni* (Cepa LE) de novos derivados tiossemicarbazonas.

2.2 Específicos

- Sintetizar e caracterizar estruturalmente 6 novos derivados tiossemicarbazona da série LQIT/AP através de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ^{13}C), Homonuclear COrrrelation SpectroscopY (COSY) e Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy (HSQC);
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos sintetizados frente a células de linhagem de macrófagos J774;
- Avaliar *in vitro* a produção de óxido nítrico (NO) do doseamento de nitrato dos derivados sintetizados.
- Avaliar a susceptibilidade *in vitro* dos parasitos adultos de *S. mansoni* frente aos compostos sintetizados;

Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

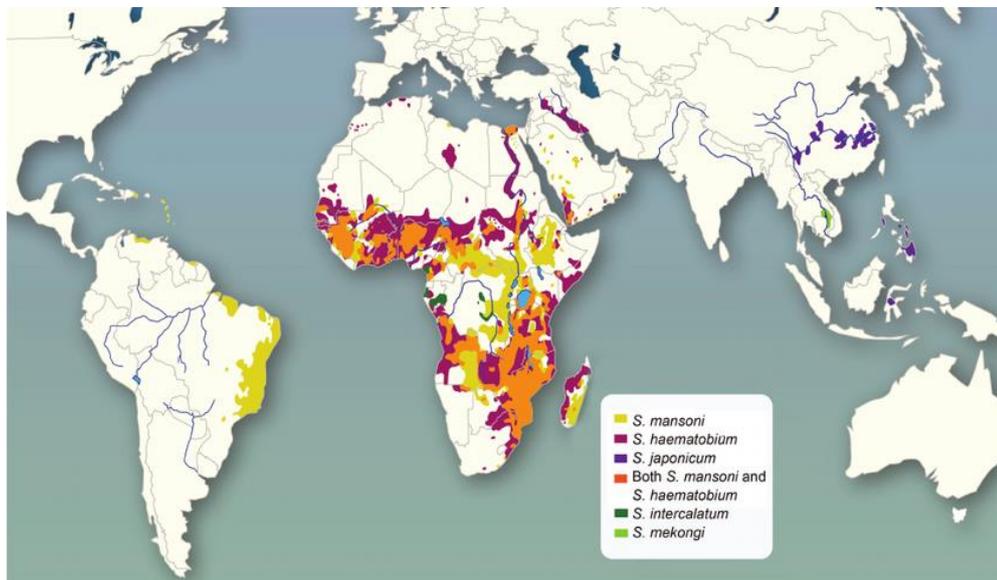
3.1 Histórico e distribuição geográfica

Geograficamente, as esquistossomoses originaram-se nas bacias dos rios Nilo, na África, e Yangtzé, na Ásia. Achados arqueológicos de 1910 apontam a existência de ovos de *Schistosoma* em vísceras de múmias egípcias de 1.250 a.C. bem como há relatos de descoberta de ovos de *Schistosoma japonicum* na cidade de Cehang-Iha em um cadáver de cerca de 2.000 anos. (BRASIL, 2014)

Atualmente, são conhecidas de 6 espécies de *Schistosoma* sendo metade delas de importância mundial: o *S. haematobium*, o *S. japonicum* e o *S. mansoni*, onde o primeiro acomete o trato urinário e os dois últimos o trato intestinal. As demais espécies são o *S. intercalatum*, o *S. guineensis* e o *S. mekongi* de menor relevância devido à sua ocorrência em regiões mais delimitadas do globo. Estimativamente, são cerca de 258 milhões de casos em 78 países no mundo sendo estes prevalentes em áreas tropicais e subtropicais, principalmente em comunidades pobres com pouco ou nenhum acesso a água potável ou saneamento básico sendo distribuídos da seguinte forma: O *S. mansoni* prevalece na África, no Oriente Médio, no Caribe, no Brasil, na Venezuela e no Suriname; O *S. haematobium* prevalece na África e no Oriente Médio e o *S. japonicum* prevalece na China, nas Filipinas e na Indonésia (FALLON, 1998; GRYSSELS, 2012; WHO, 2017).

A transmissão da esquistossomose e suas áreas de prevalência podem ser observadas na figura 1. Entretanto, a quimioterapia preventiva para a doença, onde as pessoas e as comunidades são alvo de tratamento em larga escala, é necessária em 52 países endêmicos com transmissão moderada a alta. Estima-se que pelo menos 218 milhões de pessoas necessitaram de tratamento preventivo em 2015 e mais de 66,5 milhões passaram pelo tratamento da doença no mesmo ano. Um fator agravante da disseminação da parasitose é o crescente número de turistas contraindo-a devido ao ecoturismo e por vezes esses apresentam formas agudas graves da doença com sintomas incomuns incluindo a paralisia (WHO, 2017).

Figura 1 - Distribuição geográfica das diferentes espécies de *Schistosoma*.

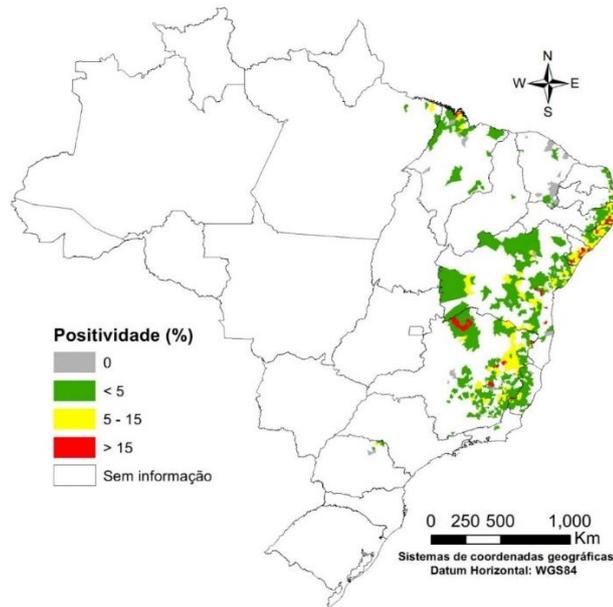


Fonte: (WEERAKOON et al. 2015)

A introdução da esquistossomose mansônica no Brasil se deu por meio do tráfico de escravos originários da costa ocidental da África. A partir daí a doença alastrou-se pelo país a partir da região nordeste em função de movimentos migratórios em direção às áreas com precárias condições de saneamento básico. A propagação da doença possui facilitadores, tais como a longevidade dos parasitos adultos e a alta oviposição das fêmeas, os portadores da doença que continuam excretando ovos por cerca de vinte anos mesmo sendo afastados dos focos de transmissão, o caráter crônico e insidioso da doença que ocasiona a baixa adesão ao tratamento, a ampla distribuição dos hospedeiros intermediários, a facilidade de contrair a infecção e a precariedade do saneamento nas áreas rurais e periferias urbanas, possibilitando a contaminação hídrica, amplamente utilizada pela população mais pobre (BRASIL, 2014).

Apesar dos esforços para o controle da esquistossomose, o Brasil é o país da América do Sul com o maior número de casos registrados sendo 19 dos 27 estados da federação afetados, abrangendo uma área endêmica que vai desde o Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais, além de estar presente, de forma localizada, em outros estados de todas as cinco grandes regiões do país. Na figura 2, pode ser visualizada a distribuição demográfica da doença no país e de acordo com o Ministério da Saúde, em 2015, os estados de Maranhão, Pernambuco, Alagoas, Minas Gerais e Espírito Santo concentravam o maior número de casos (BARRETO et al., 2015; BARBOSA et al., 2015; BRASIL, 2017).

Figura 2 - Distribuição de casos confirmados de esquistossomose de 2010 a 2015.



Fonte: (BRASIL, 2017)

3.2 Doença

A esquistossomose é uma endemia parasitária típica das Américas, Ásia e África. Ovos do esquistossomo — helminto do gênero *Schistosoma* que causa essa endemia — foram encontrados em múmias chinesas de mais de dois mil anos. No século XXI, a doença permanece sendo um problema grave de saúde pública. (KATZ & ALMEIDA, 2003).

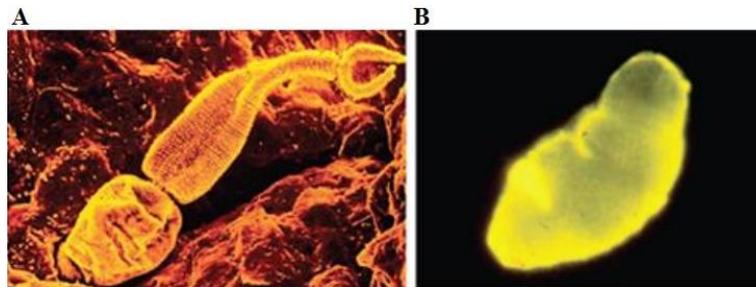
Conhecida popularmente como barriga d'água, xistosa ou doença do caramujo, a esquistossomose mansoni ou mansônica pode ter acometimento hepato-esplênico em sua forma mais grave sendo o diagnóstico e o tratamento relativamente simples, entretanto a erradicação da doença só é possível com medidas sanitárias e educação populacional efetivos que interrompam o ciclo evolutivo do parasito. (KATZ & ALMEIDA, 2003).

Nas agressões patogênicas da doença observa-se acometimento principalmente hepático, caracterizando-se pela presença de granulomas periovulares e formação de fibrose periportal, além de alterações vasculares responsáveis pela hipertensão no sistema venoso que irrigam essa região e as manifestações clínicas dos indivíduos infectados pelo *S. mansoni* apresentam diferenças decorrentes de alterações na área endêmica, intensidade de infecção, estado nutricional e resposta imunológica (ALMEIDA, 2009; REY, 2011).

3.2.1 Ciclo de vida e fases da doença

O ciclo de vida do esquistossomose apresenta um hospedeiro definitivo, geralmente seres humanos ou algumas espécies de mamíferos e um hospedeiro intermediário que é o molusco do gênero *Biomphalaria glabrata* comum em águas doces. O ser humano adquire a doença após contato direto com fontes de água contendo cercárias (Figura 3A) liberadas de forma percutânea pelo caramujo que penetram o hospedeiro definitivo através da pele e entram na circulação pelos capilares e vasos linfáticos. (WEERAKOON et al 2015).

Figura 3 - Cercária penetrando a pele (A) e Esquistossômulo (B).



Fonte: (LAMBERTUCCI, 2010)

Durante a penetração, eles se transformam em esquistossômulos (Figura 3B) e migram para a corrente sanguínea por dias antes de serem levados à veia porta hepática até o fígado. Durante esta migração, pode-se encontrar esquistossômulos nos pulmões em grande número, pois são temporariamente mantidos nos capilares do órgão. Dentro do sistema portal, os parasitos jovens diferenciam-se em parasitos adultos ocorrendo o amadurecimento sexual e a união dos parasitos do sexo masculino e do sexo feminino (Figura 4) que migram para plexos venosos mesentéricos superiores. (WEERAKOON et al 2015).

Figura 4 - Casal de *S. Mansoni*. Fêmea no canal ginecofórico do macho no momento da cópula.



Fonte: (GRYSEELS, 2012).

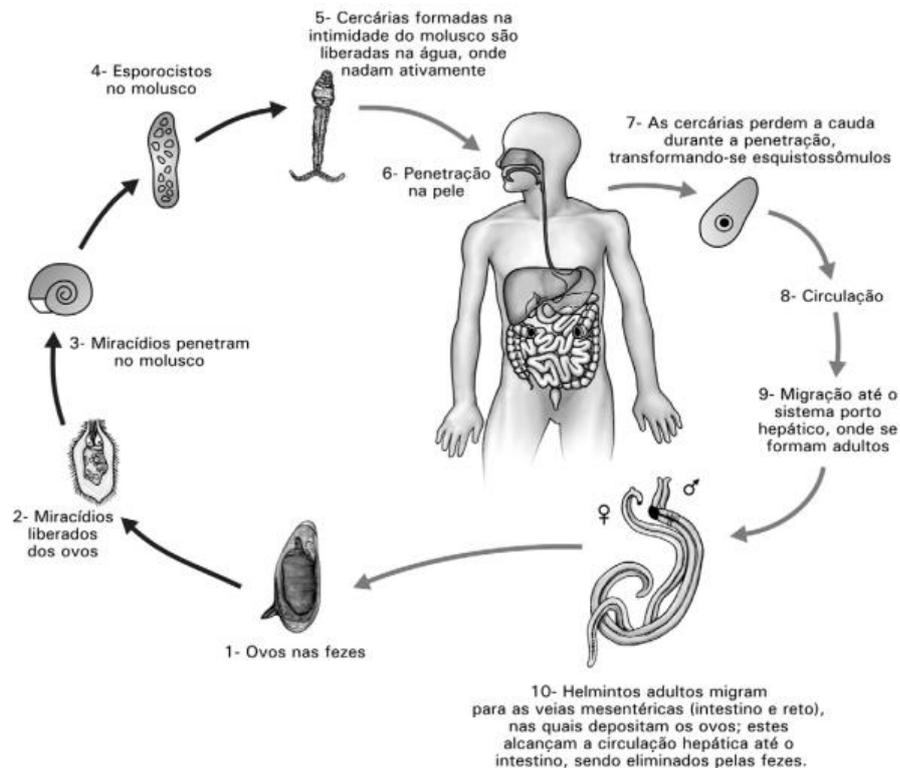
A oviposição ocorre em torno de 4 a 6 semanas após a infecção do *S. mansoni*. Os ovos (Figura 5) penetram nas paredes da vasculatura e entram na bexiga ou no lúmen intestinal para serem liberados através da urina (forma urogenital) ou das fezes (forma intestinal). Os ovos por sua vez eclodem e são liberados os miracídeos que contaminam o hospedeiro intermediário e diferenciam-se em esporocistos que, depois de duas gerações, deixam o caramujo na forma de cercárias após cerca de 30 dias reiniciando o ciclo de vida do parasito (Figura 6). (WEERAKOON et al 2015).

Figura 5 - Ovo fertilizado de *S. mansoni*



Fonte: FERREIRA, 2005

Figura 6 - Ciclo de vida do *S. mansoni*



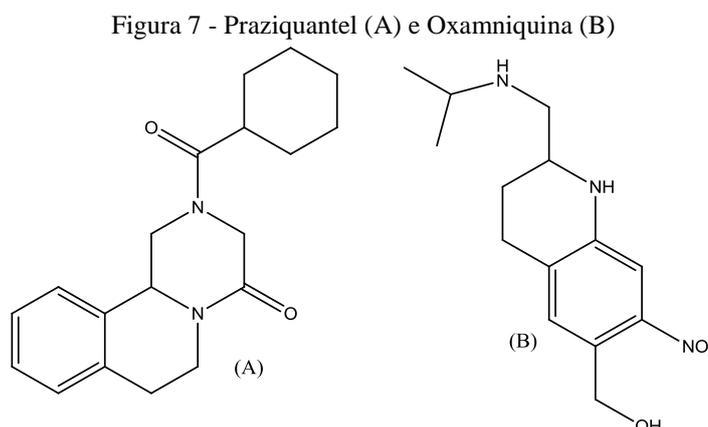
Fonte: SOUZA, F. et al, 2011.

3.2.2 Profilaxia e tratamento da esquistossomose mansoni

A profilaxia da esquistossomose se dá através da educação sanitária associada e do saneamento básico. A quimioterapia tem por objetivo a cura dos pacientes infectados e vários já foram utilizados na quimioterapia da parasitose a exemplo dos compostos antimoniais, da emetina, do niridazol, do metrifonato, do nitrofuranos, do lucantone e do hicantone. Contudo, devido à diversidade de efeitos colaterais apresentados pelos mesmos, o uso de todos foi descontinuados (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995).

Posteriormente foi introduzida a Oxamniquina (Figura 7), um derivado tetraidroquinolínico com atividade estrita sobre o *S. mansoni*, atuando tanto contra parasitos jovens quanto adultos. Alguns estudos brasileiros demonstraram a eficácia clínica do medicamento no tratamento da esquistossomose, atingindo índices de cura entre 80% e 95%. O mecanismo de ação é desconhecido, porém acredita-se que esteja relacionado com a capacidade de inibição irreversível da síntese dos ácidos nucléicos nos parasitos ocasionando sua morte impossibilitando a oviposição e os parasitos são levados pela circulação porta ao fígado, onde são fagocitados (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995; VITORINO et al, 2012).

Atualmente, o PZQ (Figura 7), derivado heterocíclico pirazinoisoquinolínico é a droga de escolha para o tratamento da forma aguda da esquistossomose, bem como para a prevenção na população de risco e o único ativo contra todas as espécies de *Schistosoma*. Ele é eficaz frente a parasitos adultos, paralisando-os e danificando seu tegumento através de mecanismo de ação envolvendo canais de cálcio. Sendo assim, o tratamento objetiva destruir os parasitos adultos com conseqüente eliminação da oviposição, no entanto, ele não é útil na reversão de complicações como a fibrose tecidual e ainda: o fármaco de escolha na terapêutica da doença não é eficaz contra parasitos jovens (SOUZA, A. et al, 2014; WEEKAROON et al, 2015).



Fonte: SILVA, V. et al, 2017 (Adaptado)

O uso destes medicamentos é feito em dose única de acordo com a faixa etária e o peso do paciente e ambos possuem efeitos colaterais (Tabela 1), relatos de resistência e contraindicações. Enquanto o Praziquantel é eficaz apenas contra parasitos adultos, a Oxamniquina por sua vez apresenta atividade também contra os jovens. Entretanto o uso do segundo está em desuso devido à sua especificidade contra o *S. mansoni*, por ser mais tóxico e por possuir mais efeitos colaterais que o primeiro (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995; VITORINO et al, 2012).

Tabela 1 - Esquema terapêutico para o tratamento da esquistossomose mansônica no Brasil e efeitos colaterais comuns dos medicamentos utilizados

	Dose Terapêutica	Efeitos Colaterais
Praziquantel (Caps 600mg)	Adulto: dose única de 50 mg/kg por via oral em única tomada ou 4/4h ou 12/12h. Criança: dose única de 60 mg/kg fracionada em duas doses.	Náuseas, dores abdominais, cefaleia, tontura, sonolência, palpitação, prurido, urticária, vômito, cinetose, diarreia por cerca 24h a 48h após o uso do medicamento cessando espontaneamente.
Oxamniquina (Cap. 250 mg) (Solução 50 mg/mL)	Adulto: dose única de 15 mg/kg por via oral, após a última refeição. Criança: dose única de 20mg/kg por via oral, uma hora após refeição.	Tontura, sonolência, cefaleia, manifestações neuropsíquicas. Febre, hipertensão arterial sistêmica, leucopenia e linfopenia transitórias.

Fonte: VITORINO et al, 2012 (adaptado)

3.2.3 Imunopatologia

Na infecção pelo *S. mansoni* existem dois momentos na resposta imune do organismo: a resposta de células T helper tipo 1 (Th1), antes da oviposição, e a resposta de células T helper tipo 2 (Th2), após a oviposição. Nesta última, há uma reação granulomatosa de agregados de leucócitos, linfócitos, eosinófilos e macrófagos (STADECKER & HERNANDEZ, 1998; PEARCE & MACDONALD, 2002).

Estudos rastream a expressão de genes hepáticos imunes e inflamatórios durante a infecção, inflamação e formação de granulomas. Nos estágios iniciais, a resposta Th1 é definida pela produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina 1 α (IL1 α), a interleucina 1 β (IL1 β) e a interleucina 6 (IL6), bem como Transdutores

de Sinal e Ativadores de Transcrição 1 (STAT1) e interferon gama (IFN- γ). Essa resposta está associada às reações de hipersensibilidade tardia, recrutamento e ativação de macrófagos e leucócitos inflamatórios e respostas citotóxicas que levam à proteção contra micro-organismos celulares (CHTANOVA & MACKAY, 2001; SANCHEZ et al., 2017).

À medida que a oviposição inicia, uma resposta Th2 é caracterizada por um excedente de expressão de quimiocinas, bem como a produção de interleucina 4 (IL4), interleucina 5 (IL5), interleucina 10 (IL10), interleucina 13 (IL13) e interleucina 33 (IL33) também está em andamento (SANCHEZ et al., 2017).

Na infecção pelo *S. mansoni*, a ativação dos macrófagos pelo IFN- γ e por outros fatores celulares estimula a produção de NO pela reação enzimática que por sua vez torna-se uma molécula efetora causando a morte do parasito (JAMES, 1995).

3.2.4 Possível resistência ao praziquantel e alternativas terapêuticas

Diferentemente da tolerância, que é a falta de susceptibilidade inata que não é em resposta à exposição prévia ao fármaco, a resistência é um aumento hereditário na frequência de indivíduos em uma população capazes de tolerar doses de um composto após sua exposição à ele (GREENBERG, 2013).

Existem áreas endêmicas onde verificou-se uma diminuição acentuada da suscetibilidade ao PZQ no tratamento da esquistossomose em países como o Egito (ISMAIL et al., 1996), o Quênia (MELMAN et al., 2009) e o Senegal (FALLON et al., 1995) e no Brasil (LOTFY et al, 2015). Sendo os países africanos alvo de tratamento para esquistossomose em larga escala e repetidamente com uso do PZQ (WANG et al., 2012).

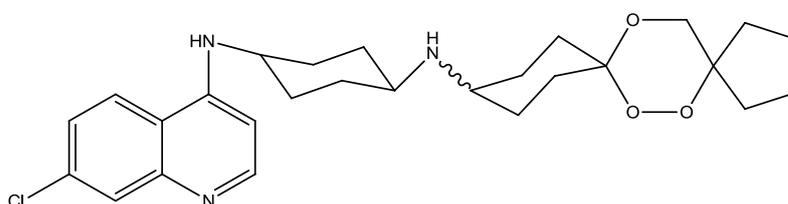
Observados estes fatos, podem-se tomar algumas medidas de controle da doença como evitar subdoses do medicamento bem como sua qualidade, diminuir a frequência dos tratamentos em larga escala, aperfeiçoar a detecção de resistência e caso esta ocorra considerar o uso de tratamento alternativo com outro fármaco eficaz a exemplo da Oxamniquina no caso do *S. mansoni* (WANG et al, 2012).

Tendo em vista os casos de resistência já citados em literatura, grupos de pesquisa têm apresentado novas alternativas terapêuticas no tratamento da esquistossomose tais como trioxaquinas, oxadiazóis, imidazolidinas e mefloquina.

As trioxaquininas, atuam como agentes heme-alquilantes impossibilitando a utilização do grupo heme na alimentação de parasitos que utilizam o metabolismo da hemoglobina na alimentação como os do gênero *Schistosoma* e o *Plasmodium* (ROBERT et al., 2005).

Esses derivados mostraram efetividade tanto contra as fases larvares quanto contra os parasitos adultos do *Schistosoma mansoni*. O derivado PA1259 (Figura 8), o mais promissor do estudo, que possui um grupamento ciclopentil ligado ao grupo trioxano apresentou potencial esquistossomicida semelhante ao do praziquantel (BOISSIER et al, 2009).

Figura 8 - Derivado da Trioxaquina PA1259

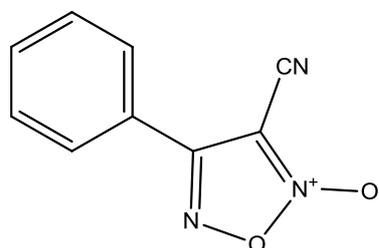


Fonte: BOISSIER et al, 2009

Os compostos derivados de oxadiazóis-2-óxidos, apresentam em sua estrutura o óxido nítrico (NO). No organismo, a resposta imune ativa a enzima NO sintase (NOS) a qual produz NO que tem mostrado a capacidade de matar as fases larvares do parasito do gênero *Schistosoma* (JAMES & GLAVEN, 1989).

Em estudo com derivados oxadiazóis-2-óxidos (Figura 9), SAYED et al (2008) demonstraram 100% de mortalidade do composto promissor frente a parasitos na concentração de 10 μ M e 2 μ M decorrido um tempo de 24 horas.

Figura 9 - Derivado promissor do estudo



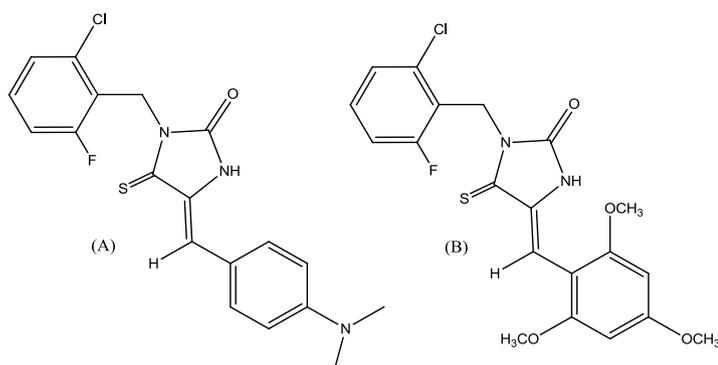
Fonte: SAYED et al, 2008.

Em 2010, derivados imidazolidínicos demonstraram potencial atividade esquistossomicida como demonstrado no estudo de Neves et al dos compostos LPSF/RZS-2 (5-(4-clorobenzilideno-3-(4-nitrobenzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona) e LPSF/RZS-5 (5-(4-fluorbenzilideno-3-(4-nitrobenzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona) (Figura 10A) que

demonstraram total mortalidade dos vermes em 24h além de presença de produção de NO de células esplênicas.

Mais recentemente, em 2017, Matos-Rocha et al. obtiveram derivados imidazolidínicos com potencial atividade esquistossomicida, sendo os compostos sintetizados LPSF/PTS10 (Figura 10A) e LPSF/PTS23 (Figura 10B) eficazes frente a parasitos adultos de *S. mansoni* com 100% de mortalidade após 72h e 24h, respectivamente, a uma concentração de 20 μ M.

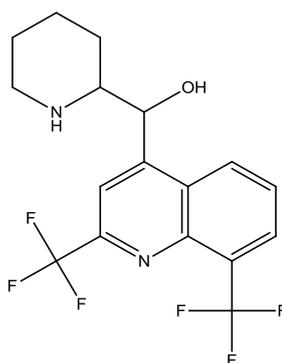
Figura 10 - Derivados imidazolidínicos LPSF/PTS10 (A) e LPSF/PTS23 (B)



Fonte: MATOS-ROCHA et al, 2017 (adaptado)

A mefloquina (Figura 11), [(R,S)-(±)- α -(2-piperidinil)-2,8-bis-(trifluorometil)-4-quinolinametanol] é um fármaco antimalárico, análogo sintético da Quinina e acredita-se que seu provável mecanismo de ação seria a inibição da formação da hemozoína. Em um estudo recente, a mefloquina reduziu significativamente a carga parasitária, a presença de ovos teciduais, o número de granulomas hepáticos e promoveu o aumento da porcentagem de ovos mortos dentro desses granulomas. Em adição, a administração concomitante de mefloquina e praziquantel apresentou melhores resultados se comparados com estes compostos utilizados separadamente (KEISER et al., 2009; ABOU-SHADY et al., 2016).

Figura 11 - Mefloquina

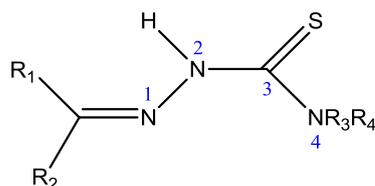


Fonte: SÁ, 2015.

3.2.4.1 Tiosemicarbazonas

As tiosemicarbazonas (Figura 12) compreendem uma classe de moléculas que apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas: Antimicrobiana, antitumoral, leishmanicida, antiplasmódicas (OLIVEIRA et al., 2015) e, mais recentemente, foram desenvolvidos estudos frente à *S. mansoni* com alguns derivados (SANTIAGO et al., 2014).

Figura 12 - Estrutura básica de uma tiosemicarbazona

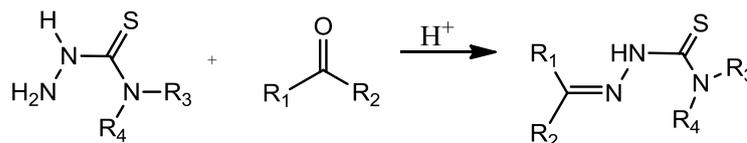


R_1, R_2, R_3 e $R_4 = H, \text{Alquil e Aril}$

Fonte: BERALDO, 2004 (adaptado)

Elas são um grupo de moléculas da classe das iminas ($-C=N$), conhecidas como bases de Schiff obtidas geralmente através da reação de condensação de tiosemicarbazidas com aldeídos ou cetonas como podemos observar no esquema 1 (LOBANA et al, 2009).

Esquema 1 - Síntese de tiosemicarbazonas a partir de tiosemicarbazidas (obtidas comercialmente ou previamente sintetizadas) e aldeídos ou cetonas



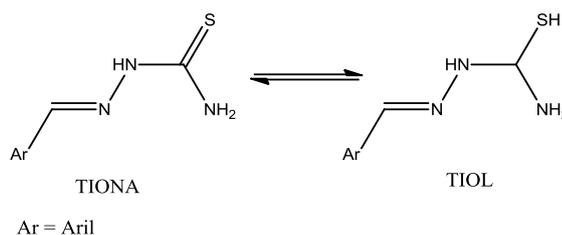
Fonte: TENÓRIO et al, 2005 (adaptado)

Tiosemicarbazonas representam uma porção química da molécula que lhe confere versatilidade, uma vez que proporciona possibilidades de substituição em diversas regiões e são consideradas ligantes iônicos, uma vez que apresentam em sua estrutura átomos de Nitrogênio (N) e Enxofre (S) que possuem pares de elétrons passíveis de doação (LOBANA et al, 2009).

Quando não substituídas na posição N-4, as tiosemicarbazonas apresentam conformação aproximadamente planar estando o átomo de enxofre em posição *anti* em relação ao átomo de nitrogênio da função imina, havendo mudança significativa no arranjo estrutural ao serem adicionados substituintes nesta posição, favorecendo a conformação *sin* entre esses átomos (TENÓRIO et al, 2005).

Estas porções moleculares, apresentam-se como sistemas com deslocalização eletrônica significativa, principalmente quando há substituição por grupos aromáticos no carbono da imina, que é favorecida pela influência da deslocalização de elétron π sobre o comprimento das ligações das tiossemicarbazonas. Devido a esta deslocalização eletrônica, as elas apresentam equilíbrio tautomérico nas formas tiona ou tiol que podemos observar no esquema 2 (TENÓRIO et al, 2005).

Esquema 2 - Formas tautoméricas de tiossemicarbazonas



Fonte: TENÓRIO et al, 2005 (adaptado)

Dessa forma, considerando o amplo período de monoterapia com o praziquantel, os relatos de casos de resistência ao fármaco e as evidências que apontam a versatilidade química e biológica das tiossemicarbazonas, propomos neste trabalho a síntese, caracterização estrutural e avaliação da atividade esquistossomicida de novos derivados.

Metodologia

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 intermediários tiossemicarbazida: hidrazina e os derivados de isotiocianato correspondentes. Para a síntese dos produtos finais derivados de tiossemicarbazonas foram utilizados os compostos intermediários previamente sintetizados, 5-metoxi-indol-3-carboxaldeído e ácido acético glacial.

Para todas as sínteses não foi realizado nenhum procedimento prévio de purificação dos reagentes, todos são de procedência da Sigma-Aldrich de acordo com as 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.

4.1.2 Equipamentos

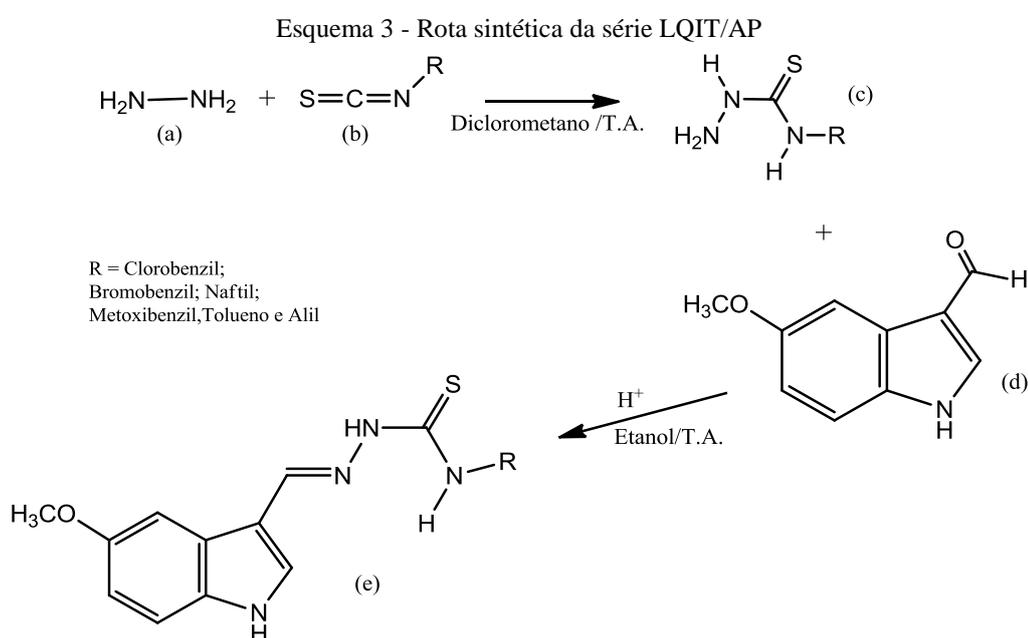
As placas de sílica gel para cromatografia em camada delgada foram reveladas em luz ultravioleta (254 ou 365 nm) no aparelho Vilber Lourmat modelo CN15.LC (LQIT/UFPE). As faixas de fusão foram determinadas em aparelho **Quimis, modelo 340.27** (LQIT/UFPE).

Para elucidação estrutural dos compostos sintetizados utilizamos na espectrofotometria de absorção no Infravermelho (IV), espectrofotômetro FTIR Bruker, modelo IFS66 (DQF/UFPE, em pastilhas de KBr de 1 % e 2 %, com bandas de absorção expressas em cm⁻¹. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram realizados em espectrômetro Varian, modelo Unity plus-400 (DQF/UFPE). Os espectros de Massa, MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) Laser Nd: YAG, 255nm, freq. Laser 100 Hz (DQF/UFPE).

4.1.3 Procedimentos experimentais

As sínteses e os dados físico-químicos dos novos derivados tiossemicarbazonas foram realizadas no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT), do Departamento de Antibióticos – CCB/ UFPE. A caracterização estrutural por meio do RMN¹H, RMN¹³C e espectrometria de Massas foi realizada na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental – DQF/ UFPE.

A rota sintética utilizada no estudo está representada no esquema 3.



(a): hidrazina; (b): isotiocianato correspondente; (c): composto intermediário LQIT/LT; (d): 5-metoxi-indol-3-carboxaldeído e (e): composto final LQIT/AP

4.1.3.1. Síntese do derivados intermediários LQIT/LT

Em um balão de fundo redondo foram adicionadas quantidades equimolares de hidrazina, dos respectivos isotiocianatos e cerca de 10mL de diclorometano. A reação deu-se à temperatura ambiente por, em média, 3 horas. Em seguida, foi feita placa cromatográfica para confirmar a formação do composto que foi filtrado, lavado com diclorometano e deixado ao abrigo de eventuais sujeiras à temperatura ambiente até evaporação do diclorometano.

4.1.3.2. Síntese dos compostos finais derivados de tiosemicarbazonas LQIT/AP

Em um balão de fundo redondo foram adicionadas quantidades equimolares do composto LQIT/LT correspondente, 5-metoxi-indol-3-carboxaldeido, 15 gotas de ácido acético glacial e 15mL de etanol. A reação deu-se à temperatura ambiente por, em média, 3 horas. Em seguida, foi feita placa cromatográfica para confirmar a formação do composto que foi filtrado, lavado com etanol e deixado ao abrigo de eventuais contaminações à temperatura ambiente até evaporação do solvente. Os compostos que se apresentaram impuros após a filtragem foram novamente lavados com etanol até que fosse confirmada sua pureza em placa cromatográfica.

4.2 Materiais e métodos: Estudos biológicos

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

4.2.2 Materiais e Equipamentos

- Câmara de fluxo;
- Equipamento de perfusão;
- Microscópio óptico invertido;

- Placas de Petri e placas de cultura com 24 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 de falcon, seringa, ponteiras, álcool 70% e matérias cirúrgicos todos esterilizados;
- Praziquantel (2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4*H*-pirazino{2,1-a}isoquinolina-4-ona)
- Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Sigma-Aldrich) completo suplementado com penicilina, estreptomicina e soro bovino fetal (SBF);
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich);
- Derivados tiossemicarbazona.

4.2.3 Procedimentos experimentais

4.2.3.1 Avaliação da viabilidade celular das tiossemicarbazonas frente à linhagem celular de macrófagos J774

As análises de citotoxicidade foram realizadas através da técnica do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolio]}, descrita por Mosmann (1983) que consiste na redução do MTT por células viáveis. O MTT é um sal de coloração amarela que, quando metabolizado pela redutase mitocondrial, é convertido em cristais de formazan que possuem coloração púrpura. Estes cristais são solubilizados com DMSO, formando uma solução de mesma cor em tons a depender da concentração destes sais em solução, permitindo a leitura de sua absorbância.

Para tal, as células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 , em placas de 96 poços contendo meio RPMI com vermelho de fenol suplementado com 10% de SBF e incubados em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °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 microlitros (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 CO₂. 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 em quadruplicata cada.

4.2.3.2 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

A fim de analisar possíveis alterações na produção de NO 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 NO, uma vez que esse, 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 submissão aos compostos sintetizados), 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 em proporções de 1:1 de sulfanilamida (1%) e naftiletlenodiamino-biclorato (0,1%) em ácido fosfórico (H_3PO_4).

A concentração de nitrito foi determinada, partindo de uma curva padrão de concentrações conhecidas de nitrito de sódio ($NaNO_2$). A absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 540nm e o teste realizado em quadruplicata.

4.2.3.3 Análises estatísticas

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.

4.2.3.4 Infecção por *Schistosoma mansoni*

Após 15 dias da disponibilização dos camundongos, esses foram infectados por via percutânea, utilizando aproximadamente 120 cercárias (Cepa LE – Belo Horizonte), oriundas

de *Biomphalaria glabrata* para cada animal. Após 45 dias de infecção, realizou-se exame parasitológico das fezes dos camundongos para confirmar a infecção dos animais. (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934).

4.2.3.5 *Perfusão do sistema porta para recuperação de vermes adultos de Schistosoma mansoni*

Os camundongos foram submetidos à eutanásia após 55 dias de infecção. No procedimento, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de ketamina (100-200 mg/Kg) associada a cloridrato de xilasina (5-16 mg/Kg). Verificada ausência de resposta álgica, os animais foram submetidos à perfusão do sistema porta hepático para a recuperação dos vermes adultos de *S. mansoni* os quais foram separados em placas de petri contendo meio RPMI-1640. Finalmente, os parasitos foram contados e classificados, de acordo com o sexo e vitalidade (DUVAL & DEWITT, 1967).

4.2.3.6 *Avaliação da suscetibilidade in vitro de vermes adultos de Schistosoma mansoni frente aos derivados de tiossemicarbazona*

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

Para a concentração de 200 μ M determinada para o experimento, foram utilizados 3 poços da placa de cultura e foram acrescidos a cada poço 4 vermes (2 machos e 2 fêmeas ou dois casais), em seguida foram incubados a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂. Após o período de incubação de 2 horas de adaptação ao meio, os derivados de tiossemicarbazona foram adicionados na concentração descrita anteriormente. Para esta atividade esquistossomicida *in vitro* foram testados os derivados de tiossemicarbazona LQIT/AP-03, LQIT/AP-05, LQIT/AP-07, LQIT/AP-09, LQIT/AP-11 e LQIT/AP-12. Para controle positivo foi utilizado o praziquantel e para controle negativo utilizado DMSO. Os parasitos foram mantidos em cultura por 5 dias consecutivos sendo monitorados a cada 24 horas

com observação no microscópio óptico invertido (BestScope BS-2090) para avaliação da atividade motora e da taxa de mortalidade. Para confirmação dos resultados todos os testes foram realizados em duplicata.

Resultados e Discussão

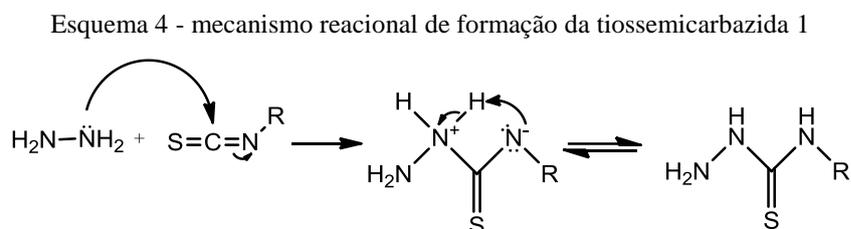
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo Químico

5.1.1 Mecanismo reacional e caracterização estrutural

A síntese dos compostos desse estudo se deu em duas etapas: na primeira, obtiveram-se as tiossemicarbazidas (série LQIT/LT) através de uma reação entre a hidrazina e os isotiocianatos substituídos e, na segunda etapa, a reação entre os compostos intermediários LQIT/LT com o 5-metoxi-indol-3-carboxaldeído.

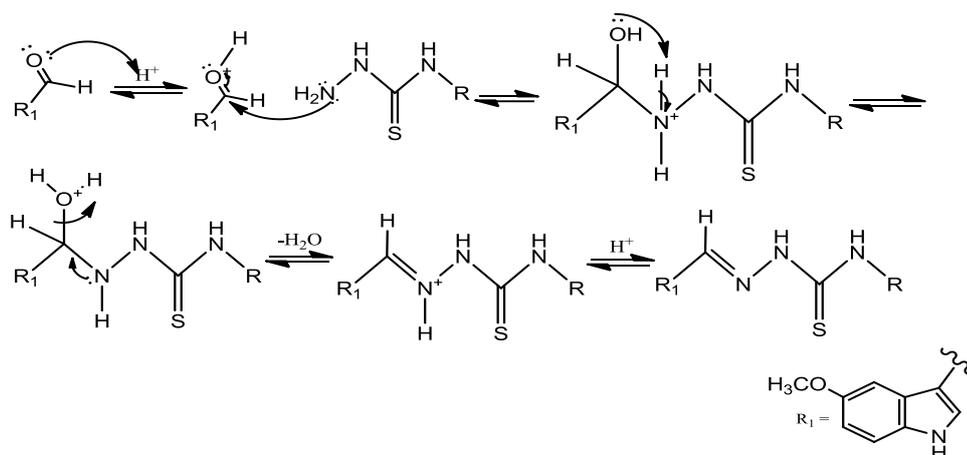
A reação inicia-se com o ataque do par de elétrons livres presente no nitrogênio da hidrazina, que têm um caráter nucleofílico, ao carbono do isotiocianato. Posteriormente ao ataque nucleofílico, ocorre a quebra da ligação π e os elétrons migram para o nitrogênio devido a sua alta eletronegatividade. Em seguida, ocorre um rearranjo de cargas intramolecularmente, onde o nitrogênio com excesso de elétrons desprotona o nitrogênio carregado positivamente formando a tiossemicarbazida conforme o esquema 4 (TENÓRIO et al, 2005).



FONTE: TENÓRIO et al., 2005 (adaptado)

Na segunda etapa, foram sintetizados 6 derivados tiossemicarbazona a partir da reação da tiossemicarbazida correspondente com o 5-metóxi-indol-3-carboxaldeído. Esta reação inicia-se com a protonação do oxigênio do aldeído na presença do ácido acético glacial ocorrendo a formação do íon oxônio. Em seguida, ocorreu o ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio N_1 da tiossemicarbazida ao carbono do aldeído protonado, com posterior quebra da ligação π e formação da função álcool. Posteriormente, ocorre uma reação intramolecular com a transferência do próton do nitrogênio para o oxigênio, a fim de facilitar a desidratação seguinte, com a deslocalização do par de elétrons do nitrogênio, formação da tiossemicarbazona gerando a função imina (AQUINO, 2007).

Esquema 5 - mecanismo reacional de formação da tiossemicarbazona 2

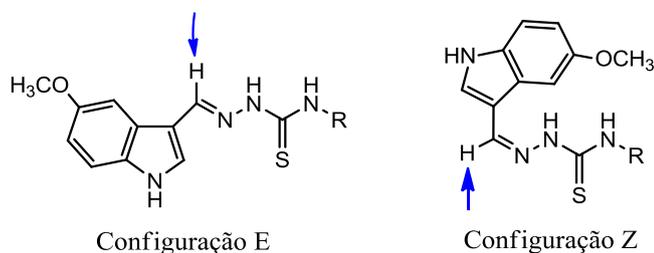


Apesar da reação ser favorável à formação das tiossemicarbazonas, o caráter reversível de todas as etapas de sua síntese torna importante a utilização do meio ácido. Em geral, a formação da tiossemicarbazona é mais rápida na faixa de pH entre 4 e 5 (TENÓRIO et al., 2005).

A partir do composto final sintetizado, existe a possibilidade de formação de isômeros *Z* ou *E*, conforme exemplificado na figura 13, e essa conformação é influenciada fortemente pelo meio ácido e pelo hidrogênio da ligação azometínica podendo haver uma mistura desses diastereoisômeros ou a formação preferencial de um deles. (TENÓRIO et al., 2005).

Durante este estudo, pudemos observar que a espectroscopia de RMN ^1H revelou apenas um sinal referente ao hidrogênio da ligação azometínica sugerindo que não houve formação de mistura racêmica de isômeros *Z* e *E*. Em adição, observou-se também a formação de apenas uma mancha na placa cromatográfica.

Figura 13 - Possíveis configurações das tiossemicarbazonas evidenciando hidrogênio azometínico

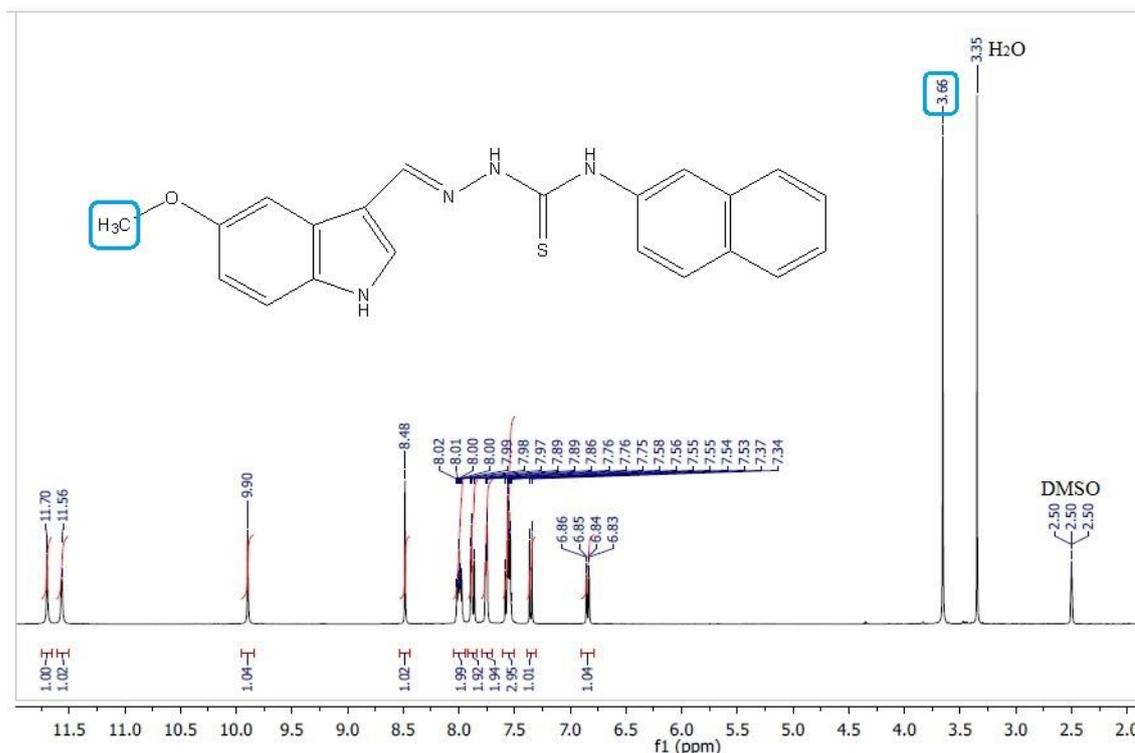


Através de estudos espectroscópicos de Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy (NOESY), Vieira (2013), demonstrou a preferência de formação do isômero *E* na síntese de tiossemicarbazonas e Cardoso et al. (2014) confirmaram através de estudos cristalografia de raio-X a preferência da configuração *E*. Diante desses dados e dos resultados

obtidos, podemos sugerir que, majoritariamente, os compostos obtidos nesse estudo são diastereoisômeros *E*.

A caracterização de hidrogênios das moléculas se deu através da análise espectroscópica de RMN ^1H onde foi possível identifica-los a exemplo do espectro do composto AP09 (Figura 14).

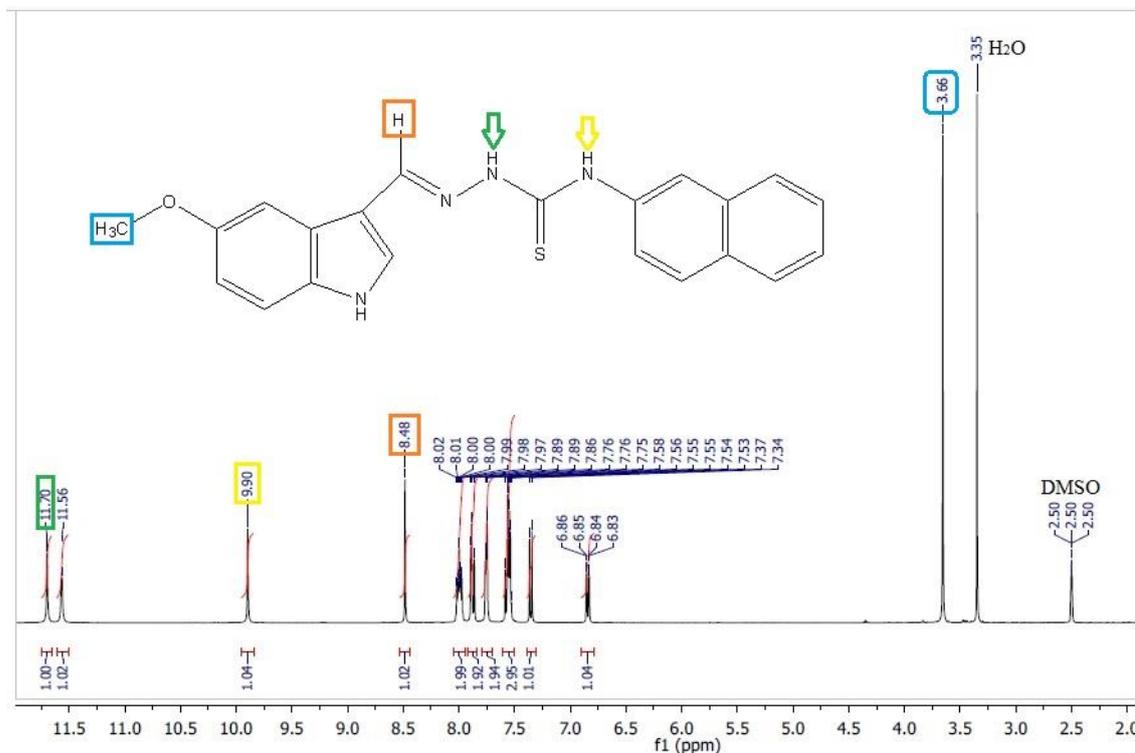
Figura 14 - RMN ^1H do composto AP09



Na figura 14 acima, na região de campo baixo, identificamos o sinal do hidrogênio do CH_3 ligado ao grupamento metóxi do anel indólico em δ 3.66 ppm na forma de um simpleto. Na região de campo alto foi possível caracterizar os demais hidrogênios presentes no nosso composto.

Na figura 15, podemos identificar os hidrogênios correspondentes à função azometínica, ao hidrogênio ligado ao nitrogênio aromático e do NH hidrazínico que aparecem na forma de simpletos em δ 8.48, 9.90 e 11.70 ppm, respectivamente (AQUINO, 2007).

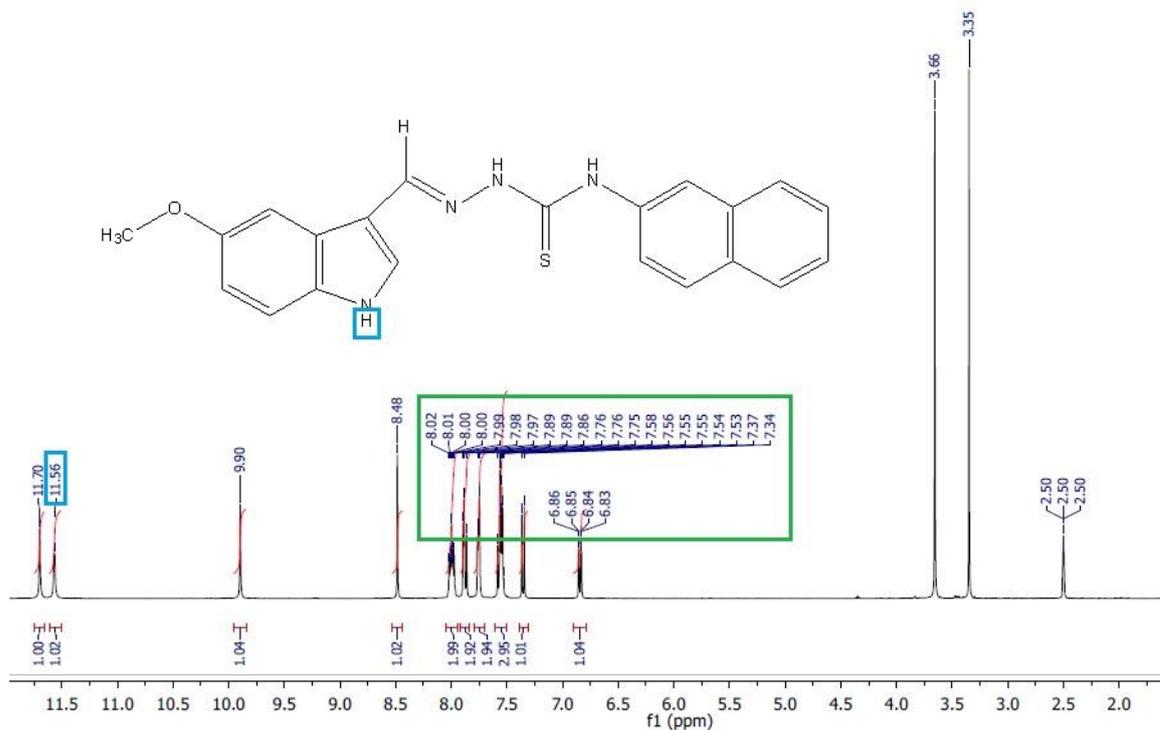
Figura 15 - RMN¹H do composto AP09 evidenciando os hidrogênios do grupamento azometínico, NH aromático e NH hidrazínico



A partir dessas informações, podemos sugerir que o composto AP09 foi obtido com sucesso, uma vez que o pico observado correspondente ao hidrogênio da função azometínica evidencia que ocorreu a formação do produto esperado mantendo as propriedades do fragmento de tiossemicarbazona também observado nos dados relatados.

Oliveira et al. (2017) afirmam que os picos relativos à ligações N-H indólicos estão na faixa δ 11.22 – 11.83 ppm, possibilitando atribuir ao pico em δ 11.56 ppm, que aparece na forma de um simpleto, o H do NH indólico conforme destacado na figura 16. Os demais hidrogênios da molécula estão compreendidos entre δ 6.83 – 8.02 ppm.

Figura 16 - RMN¹H do composto AP09 evidenciando o H do NH indólico e os demais hidrogênios das porções aromáticas da molécula.

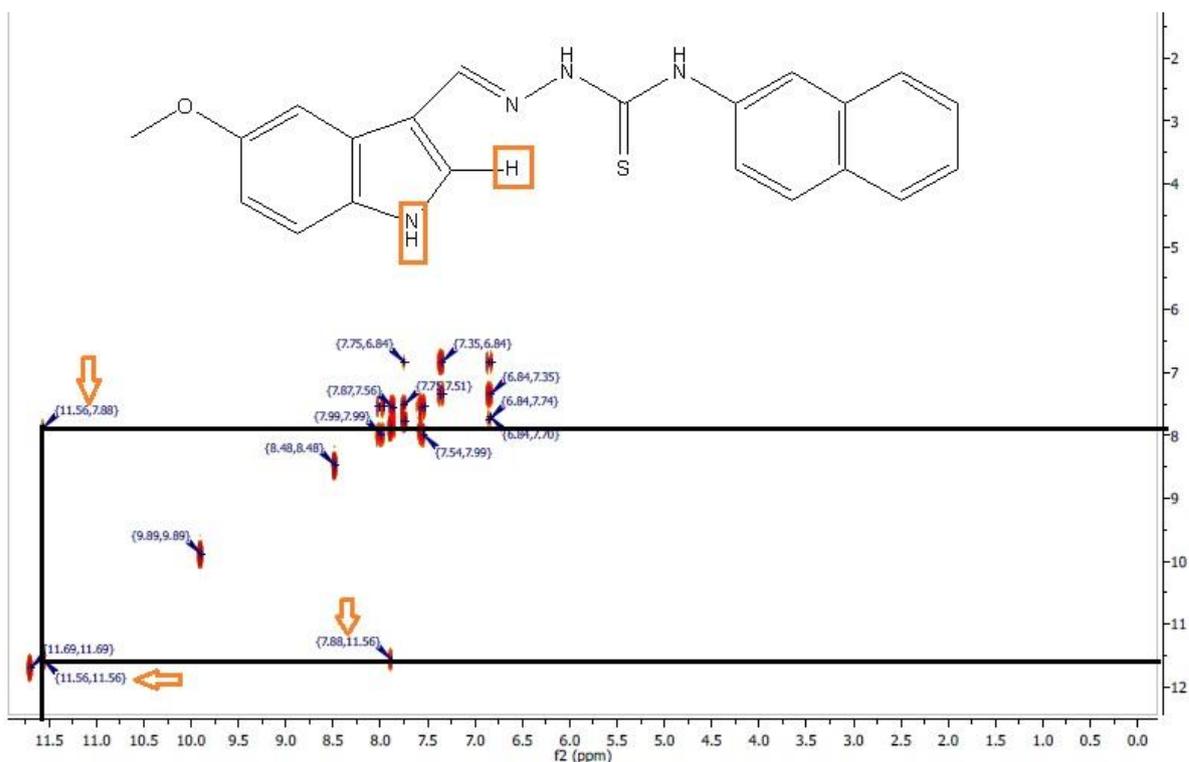


Com o intuito de confirmar os acoplamentos entre os hidrogênios presentes na estrutura do composto, foi utilizada a técnica de COSY (homonuclear COrelation SpectroscopY) onde é possível estabelecer as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por $^{2-3}J_{H,H}$ (KAISER, 2000).

Dessa maneira, foi possível verificar o acoplamento entre o H do NH indólico com o H do carbono sp^2 adjacente devido a presença de uma correlação mútua entre os sinais referentes à esses hidrogênios (Figura 17) bem como os demais acoplamentos correspondentes aos hidrogênios aromáticos do composto.

Os hidrogênios que se apresentam como simpletos, assim como os ligados aos nitrogênios da molécula não possuem acoplamento nem correlações no COSY, por isso não foram evidenciados nesta análise, entretanto estes foram elucidados no RMN¹H.

Figura 17 - Espectro de COSY para o composto AP09 mostrando as correlações entre hidrogênios

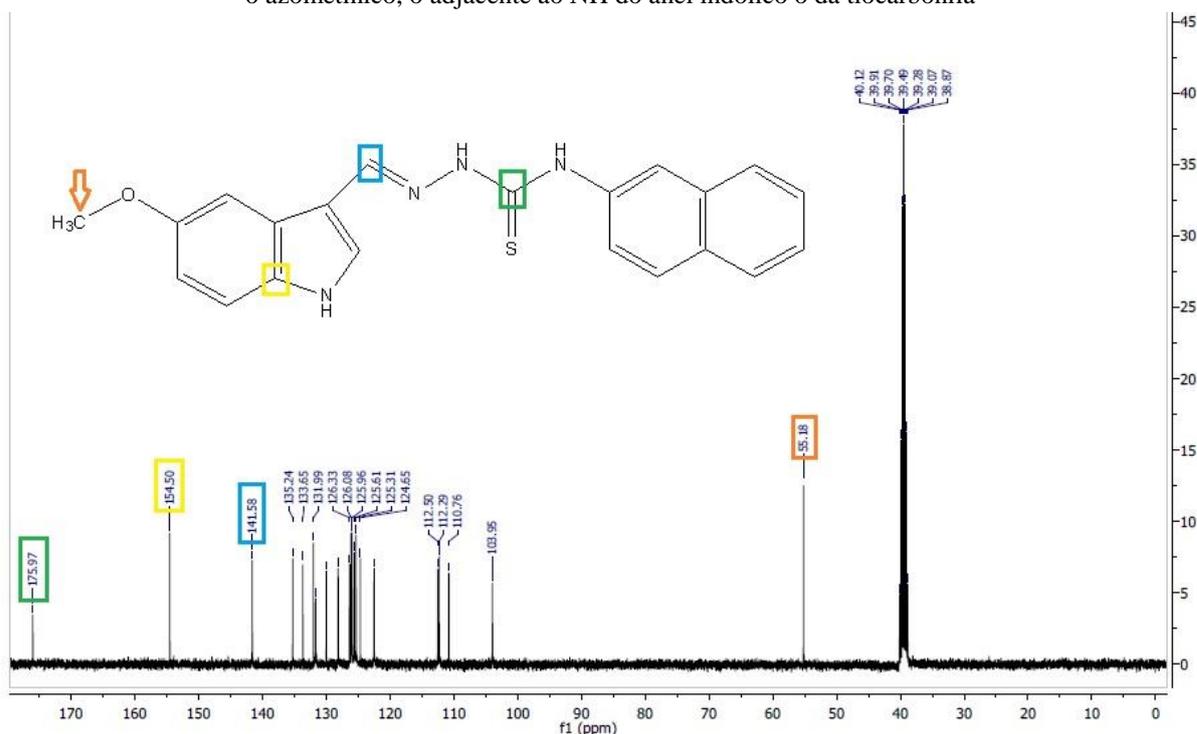


A análise para confirmação da quantidade e tipos de carbonos presentes na estrutura do composto AP09 foi realizada utilizando a análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN ^{13}C).

A partir do espectro, foi possível identificar todos os carbonos da molécula sendo um deles encontrado na escala abaixo de 100 ppm sendo este o carbono da função metóxi com sinal em δ 55.18 ppm e os demais acima da mesma escala. Puderam ser identificados ainda o carbono azometínico em δ 142.09 ppm (OLIVEIRA et al., 2017), o carbono sp^2 adjacente ao NH do anel indólico em δ 154.50 ppm (GUIMARÃES, BRAZ-FILHO & VIEIRA, 2012) e o carbono da tiocarbonila (C=S) em δ 175.97 ppm (OLIVEIRA et al., 2015) (figura 18). O pico em torno de δ 40 ppm é referente ao resíduo do solvente. (FULMER et al., 2010).

Através do RMN ^{13}C foi possível sugerir mais uma vez o sucesso da reação com a formação da tiossemicarbazona, uma vez que os sinais dos carbonos azometínico e da tiocarbonila puderam ser identificados.

Figura 18 - RMN ^{13}C do composto AP 09 evidenciado os carbonos da função metóxi, o azometínico, o adjacente ao NH do anel indólico da tiocarbonila

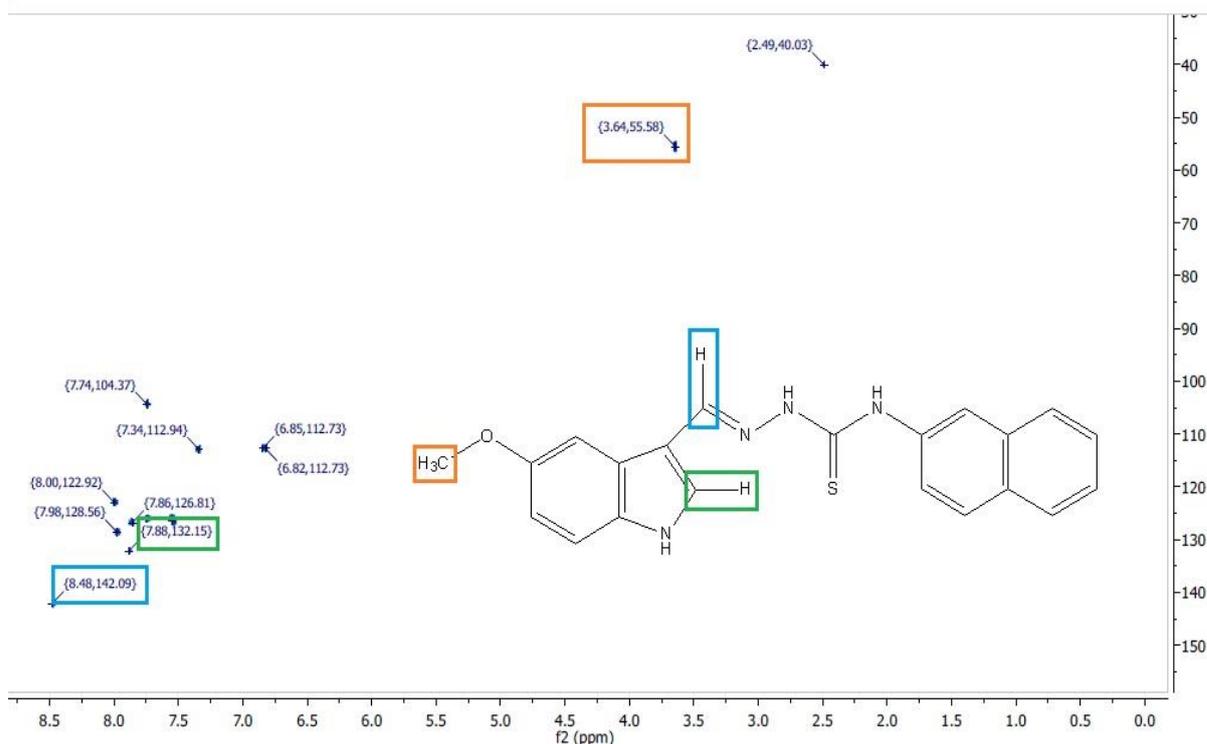


Para uma melhor confiabilidade na elucidação do AP09, também foi utilizada a técnica espectroscópica de HSQC. Com este experimento foi possível identificar o carbono ligado ao seu respectivo hidrogênio em acoplamento $^1J_{\text{C,H}}$ auxiliada pelo RMN ^1H , ou vice e versa (KAISER, 2000).

Devido à prévia elucidação do RMN ^1H e ^{13}C , foi possível identificar os carbonos e os hidrogênios azometínico, adjacente ao NH do anel indólico, da função metóxi, bem como os demais átomos confirmando as ligações dos seus hidrogênios aos seus respectivos carbonos.

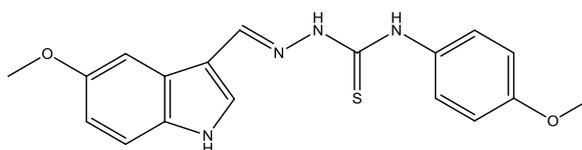
Conforme representado na figura 19, é possível identificar o carbono da função metóxi em δ 55.58 ppm ligado aos hidrogênios em δ 3,66 ppm, o carbono com sinal em δ 132.15 ppm encontra-se ligado ao hidrogênio em δ 7.88 ppm e o carbono azometínico com sinal em δ 142.09 ppm está ligado ao hidrogênio com sinal em δ 8.48 ppm. Pode-se observar na figura também as demais ligações entre os hidrogênios e carbonos das porções aromáticas do composto.

Como a análise descrita anteriormente fornece dados relativos ao acoplamento $^1J_{\text{C,H}}$, não foi possível evidenciar os carbonos quaternários os quais são dois do anel indólico e dois no grupamento naftil bem como os hidrogênios ligados aos nitrogênios (NH) também não apareceram na análise do HSQC. No entanto, tais hidrogênios encontram-se devidamente elucidados através da análise de RMN ^1H e COSY.

Figura 19 - Espectro de HSQC para o composto AP09 mostrando as correlações $^1J_{C,H}$ 

5.1.2 Dados espectroscópicos e espectrométricos da série LQIT/AP

5.1.2.1 *N*-(4-metoxifenil)-2-[(5-metoxi-1*H*-indol-3-il)metileno]- hidrazinacarboxitioamida – LQIT/AP03

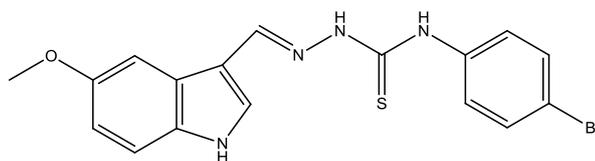


$C_{18}H_{18}N_4O_2S$. Rendimento: 67%; Faixa de fusão: 198 °C; Razão de frente (Rf): 0,45 (n-hexano/acetato de etila, 1:1)

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.51 (d, $J = 12.9$ Hz, 2H), 9.70 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.83 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.58 – 7.49 (m, 2H), 7.40 – 7.29 (m, 2H), 6.96 – 6.83 (m, 3H), 6.83 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H), 3.80 – 3.68 (m, 7H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ 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.

5.1.2.2 *N*-(4-bromofenil)-2-[(5-metoxi-1*H*-indol-3-il)metileno]hidrazinacarbotioamida – LQIT/AP05

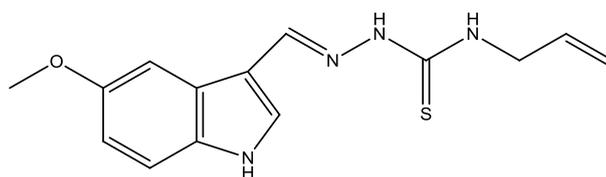


$C_{17}H_{15}BrN_4OS$. Rendimento: 31%; Faixa de fusão: 180-182 °C; Razão de frente (Rf): 0,44 (n- hexano/acetato de etila, 1:1)

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.68 (s, 1H), 11.56 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 9.72 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.39 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H), 7.85 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 7.77 – 7.59 (m, 3H), 7.56 – 7.46 (m, 2H), 7.33 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.83 (ddd, $J = 8.8, 2.5, 0.7$ Hz, 1H), 3.78 (s, 2H), 3.33 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H), 2.52 – 2.45 (m, 2H), 1.21 (s, 1H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ 174.39, 154.96, 142.06, 139.22, 132.38, 132.17, 131.38, 126.31, 125.06, 117.00, 113.10, 113.06, 111.16, 104.01, 55.52.

5.1.2.3 *N*-alil-2-[(5-metoxi-1*H*-indol-3-il)metileno]hidrazinacarbotioamida – LQIT/AP07

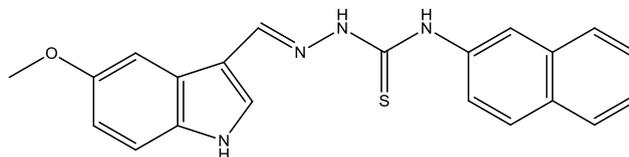


$C_{14}H_{16}N_4OS$. Rendimento: 46%; Faixa de fusão: 226-228 °C; Razão de frente (Rf): 0,41 (n- hexano/acetato de etila, 1:1)

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.48 (s, 1H), 11.30 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.92 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.58 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.83 (dd, $J = 8.7, 2.5$ Hz, 1H), 5.98 (ddt, $J = 17.3, 10.5, 5.4$ Hz, 1H), 5.23 (dq, $J = 17.2, 1.8$ Hz, 1H), 5.18 – 5.08 (m, 1H), 4.31 – 4.22 (m, 2H), 3.83 (d, $J = 4.4$ Hz, 0H), 3.78 (s, 3H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ 176.07, 154.45, 140.75, 135.19, 131.87, 131.16, 124.45, 115.52, 112.64, 112.58, 110.85, 103.19, 55.06, 45.64.

5.1.2.4 *N*-(naftaleno-2-il)-2-[(5-metoxi-1*H*-indol-3-il)metileno]hidrazinacarbotioamida – LQIT/AP09

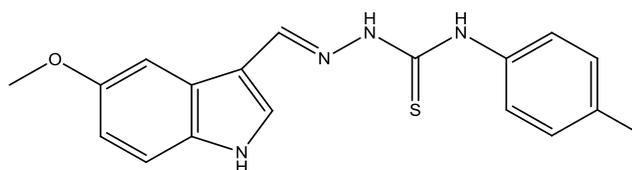


$C_{21}H_{18}N_4OS$. Rendimento: 81%; Faixa de fusão: 197-198 °C; Razão de frente (Rf): 0,4 (n- hexano/acetato de etila, 1:1)

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.70 (s, 1H), 11.57 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 8.49 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 8.00 (ddd, $J = 9.6, 6.3, 3.4$ Hz, 2H), 7.92 – 7.84 (m, 2H), 7.79 – 7.72 (m, 2H), 7.61 – 7.50 (m, 3H), 7.36 (dd, $J = 8.8, 1.5$ Hz, 1H), 6.85 (dt, $J = 8.8, 2.0$ Hz, 1H), 3.66 (s, 2H), 3.35 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H).

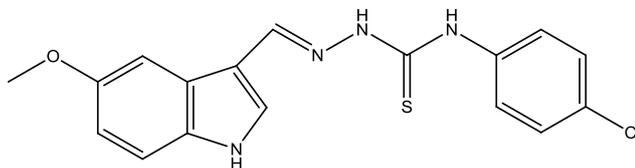
RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ 175.98, 154.51, 141.59, 135.24, 133.65, 132.00, 131.66, 129.98, 128.12, 126.34, 126.09, 125.97, 125.61, 125.31, 124.66, 122.49, 112.50, 112.29, 110.76, 103.95, 55.18.

5.1.2.5 *N*-(*p*-toluil)-2-[(5-metoxi-1*H*-indol-3-il)metileno]hidrazinacarbotioamida – LQIT/AP11



$C_{18}H_{18}N_4OS$. Rendimento: 55%; Faixa de fusão: 219-221 °C; Razão de frente (Rf): 0,47 (n- hexano/acetato de etila, 1:1).

5.1.2.6 *N*-(4-clorofenil)-2-[(5-metoxi-1*H*-indol-3-il)metileno]hidrazinacarbotioamida – LQIT/AP12



$C_{17}H_{15}ClN_4OS$. Rendimento: 79%; Faixa de fusão: 228-230 °C; Razão de frente (Rf): 0,51 (n- hexano/acetato de etila, 1:1)

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.68 (s, 1H), 11.59 – 11.53 (m, 1H), 9.98 (s, 1H), 9.73 (s, 2H), 8.41 (s, 1H), 7.86 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 7.82 – 7.74 (m, 2H), 7.68 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.45 – 7.31 (m, 4H), 6.84 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.53 – 2.47 (m, 1H), 1.06 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H).

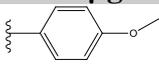
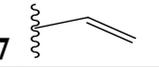
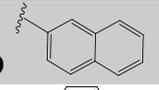
RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ 174.01, 154.48, 141.55, 138.30, 138.17, 131.90, 131.65, 128.37, 127.97, 125.52, 124.59, 112.60, 112.57, 110.68, 103.54, 55.04.

5.2 Estudo Biológico

5.2.1 Avaliação da citotoxicidade frente à linhagem de macrófagos J774 e avaliação da concentração indireta de óxido nítrico (NO)

Na tabela 2 temos o resultado da citotoxicidade dos derivados tiossemicarbazona frente à linhagem de macrófagos J774. Esses testes permitem avaliar a toxicidade dos compostos frente às linhagens celulares de macrófagos J774, estabelecendo a concentração necessária destes para causar morte de 50% das células. Sendo assim quanto maior esse valor, menos tóxica será a molécula.

Tabela 2 - Viabilidade celular em macrófagos J774 dos derivados tiossemicarbazônicos

Composto	CC ₅₀ J774 µg/mL
AP03 	266,28 ± 10,3
AP05 	189,12 ± 1,0
AP07 	169,29 ± 11
AP09 	82,06 ± 9,3
AP12 	159,97 ± 2,8
PZQ	117,08 ± 12

Legenda: PZQ - praziquantel; CC₅₀ - concentração citotóxica para 50% das células

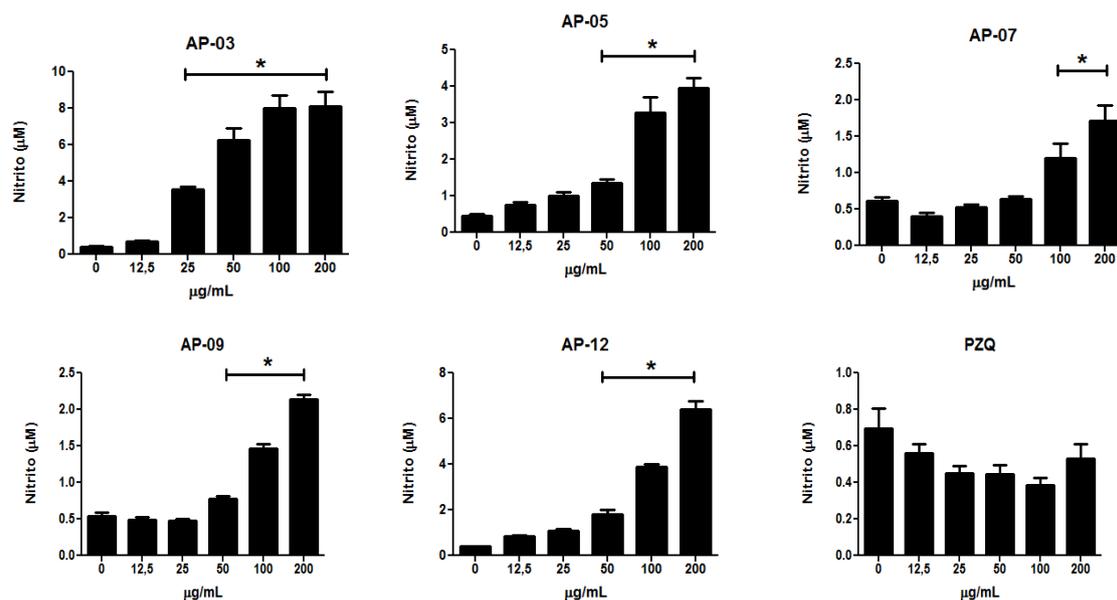
Analisando os resultados frente à linhagem macrófágica, os derivados testados, inicialmente, apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que estes apresentaram majoritariamente menor toxicidade que o praziquantel, medicamento de escolha no tratamento da esquistossomose mansônica.

Na imunopatologia da esquistossomose, os macrófagos exercem papel importante na defesa do organismo contra a doença. Durante a resposta Th2 há a liberação de citocinas importantes tais como IL-4 e IL-13 que, através de seus efeitos em outras células como por exemplo os macrófagos, orquestram funções efetoras que medeiam a eliminação do parasito e agem na reparação de dano tecidual causado por eles (NASCIMENTO et al., 2014). Dessa forma, pode-se considerar positivas as observações de que os derivados tiossemicarbazônicos são menos citotóxicos que o PZQ já que o organismo do hospedeiro necessita de capacidade imunológica para combater o parasito.

Apesar dos resultados díspares, a avaliação da toxicidade requer estudos mais aprofundados com a realização de testes *in vivo* para avaliar os efeitos dos compostos a nível sistêmico. (OLIVEIRA et al., 2015).

Os compostos apresentados neste estudo também foram testados quanto à avaliação indireta da produção de NO e os dados obtidos das análises estão representados em gráficos que demonstram a quantificação da produção de nitrito de acordo com as concentrações dos compostos testados (figura 20).

Figura 20 - Quantificação da produção de nitrito em macrófagos J774 dos derivados da série LQIT/AP



Legenda: PZQ – Praziquantel; (*) valor estatisticamente significativo pelo teste ANOVA em relação ao controle sem tratamento ($p < 0,0001$).

A partir dos resultados, podemos observar que todos os compostos testados foram capazes de induzir a produção de nitrito de forma semelhante e por vezes maior que o PZQ. O composto AP09, por exemplo, demonstrou indução na produção de nitrito cerca de três vezes maior em 200 µg/mL. Diante deste cenário, todos derivados tiossemicarbazônicos foram capazes de aumentar a produção de nitrito enquanto que para o praziquantel não foram observadas alterações significativas nessa produção quando comparadas com o controle.

Existem evidências diretas e indiretas da atuação do NO como agente esquistossomicida e mais amplamente, como molécula antiparasitária. O NO produzido pelo sistema imune ocasiona a letalidade dos parasitos de *S. mansoni*. Em adição, o NO produzido através da indução da NOs é um componente importante na resposta imune havendo evidências diretas desse ser um aspecto primário da defesa do hospedeiro contra outros parasitos, tais como o *Echinococcus granulosus* e o *Trypanosoma congolense* (PAVANELLI et al., 2014).

Durante a resposta Th1 nos estágios iniciais da esquistossomose, ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como o TNF- α , IL6 e IFN- γ . Esta última promove a ativação de macrófagos estimulando a produção de NO (SANCHEZ et al., 2017). Partindo desses dados e dos resultados obtidos, podemos sugerir que os derivados da série LQIT/AP tenham influência na fase aguda da doença.

Correlacionando os resultados apresentados nos testes de produção de NO em comparação ao que foi obtido nos testes de citotoxicidade, os compostos AP03 e AP05, por

exemplo, se apresentaram como as moléculas menos citotóxicas e com indução significativa na produção de óxido nítrico nas concentrações de 100 e 200µg/mL quando comparados ao PZQ. Entretanto isso não refletiu no potencial esquistossomicida deles, uma vez que não foram capazes de diminuir a motilidade dos parasitos como pode-se observar nos resultados expostos mais à frente.

Por outro lado, os compostos AP07, AP09 e AP12 que também não foram tóxicos frente aos macrófagos J774 e obtiveram melhor capacidade de indução na produção de óxido nítrico em comparação ao PZQ, demonstraram potencial esquistossomicida chegando a causar mortalidade de 100% dos parasitos no caso do AP09 que apresenta em sua estrutura o substituinte naftil em N4.

Em estudos desenvolvidos por Oliveira et al. (2016), foi constatado um aumento na atividade antiproliferativa em compostos tiossemicarbazônicos com grupo naftil quando esse fora empregado como substituto ao fenil. Esse fato pode auxiliar na análise dos estudos de CC₅₀, uma vez que o composto AP09 apresentou o menor valor quando comparado aos demais, apesar de não ter apresentado toxicidade celular.

5.2.2 Avaliação *in vitro* dos derivados tiossemicarbazona frente a parasitos adultos de *S. mansoni*

Os parasitos adultos de *S. mansoni* recuperados no procedimento de eutanásia foram avaliados em relação à sua motilidade e mortalidade quando submetidos aos derivados tiossemicarbazônicos (Figura 21) na concentração de 200 micromolar (µM), ao PZQ (controle positivo) e ao DMSO (controle negativo) (Tabela 3).

A observação dos parasitos foi feita por 5 dias (120 horas) consecutivos. Quanto aos seus movimentos, foram avaliados de acordo com os critérios de Horiuchi et al. (2005) que estabelecem pontuações de acordo o nível de movimentação destes:

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

A mortalidade causada pelos derivados tiossemicarbazona possuíram como característica comum a contração espiralada dos e o escurecimento de seu tegumento.

Após 24h o derivado AP09 causou mortalidade de 100% dos parasitos igualmente ao controle positivo utilizado no experimento, o praziquantel. Obervou-se também que os compostos AP07, AP11 e AP12 causaram lentidão nos objetos de estudo do teste.

Após o segundo dia, poços contendo o composto AP07 já apresentavam parasitos mortos (13,4%), bem como lentos e ativos. Esse status evoluiu para 14,3% de mortalidade, apresentando apenas parasitos lentos e mortos no terceiro dia do experimento. Entretanto não houve aumento do percentual de parasitos mortos até o final do período de observação.

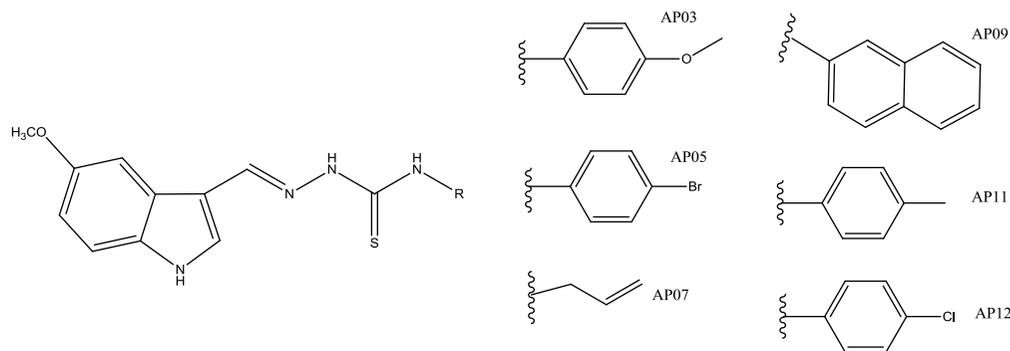
O composto AP11 apresentou 16,7% de parasitos mortos após 120h, ao passo que o AP12 apresentou parasitos mortos ao final de 72h de experimento juntamente com lentos e ativos, evoluindo em seu score de parasitos mortos: 14,75% ao final de 72h, 28,7 % ao final de 96h e 29,5% ao final de 120h quando apresentava apenas parasitos lentos e mortos.

Tabela 3 - Score de motilidade / mortalidade após o tempo de incubação (%) de parasitos adultos frente à série LQIT/AP

Grupos	Score de motilidade / mortalidade após o tempo de incubação (%)																			
	24h				48h				72h				96h				120h			
	0	1,5	3	M	0	1,5	3	M	0	1,5	3	M	0	1,5	3	M	0	1,5	3	M
DMSO			100	0			100	0			100	0			100	0			100	0
PZQ	100			100	100			100	100			100	100			100	100			100
AP-03			100	0			100	0			100	0			100	0			100	0
AP-05			100	0			100	0			100	0			100	0			100	0
AP-07		42,9	57,1	0	13,4	57,1	29,5	13,4	14,3	85,7		14,3	14,3	85,7		14,3	14,3	85,7		14,3
AP-09	100			100	100			100	100			100	100			100	100			100
AP-11		16,7	83,3	0		16,7	83,3	0		33,4	66,6	0		33,4	66,6	0	16,7	33,3	50	16,7
AP-12		14,31	85,71	0		29,5	70,5	0	14,75	14,75	70,5	14,75	28,7	14,2	57,1	28,7	29,5	70,5		29,5

Legenda: M – Score de mortalidade.

Figura 21 - Estrutura geral dos derivados tiossemicarbazônicos

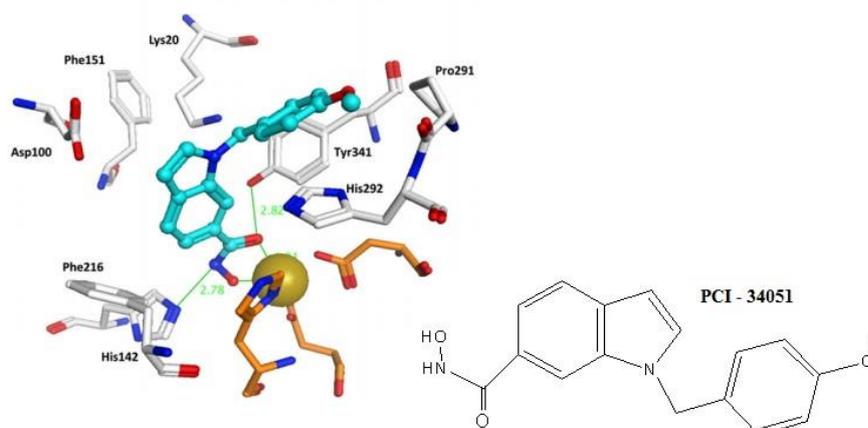


Pode-se observar na estrutura dos compostos da série LQIT/AP a presença de regiões da molécula já descritas em literatura envolvendo estudos acerca da esquistossomose.

O anel indólico vem sendo amplamente estudado em compostos com atividade antimalárica (SCHUCK et al., 2014), antineoplásica (FOOTE et al., 2013), anti-inflamatória (SANTIN et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016), antituberculose (GUZEL, KARALI & SALMAN, 2008) e esquistossomicida (STOLFA et al., 2014).

Em 2014, Stolfa et al. testaram derivados com potencial atividade contra a enzima histona deacetilase 8 presente no *S. masoni* (*SmHDAC*) e alterações estruturais importantes que a diferem da presente nos humanos (*hHDAC8*) fizeram com que ela fosse considerada um potencial alvo biológico pelo grupo. A *SmHDAC* quando inibida não promove a deacetilação de histonas ligadas ao DNA e conseqüentemente não há transcrição uma vez que este permanece em sua forma condensada. Dentre os compostos testados, o PCI-34051 foi o de maior atividade e o anel indólico presente nele interage com vários resíduos aromáticos no sítio ativo da enzima (Figura 22).

Figura 22 - Composto PCI – 34051 e seu docking com a enzima *SmHDAC8*

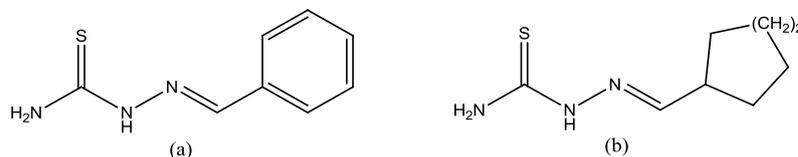


Fonte: STOLFA et al., 2014 (adaptado). Legenda: Composto destacado em ciano. Apenas resíduos de aminoácidos que interagem são exibidos. Íon Zinco representado como uma esfera laranja e os resíduos do composto que interagem com ele estão representados de igual cor. Ligações de hidrogênio / coordenação ao íon de zinco indicados pelas linhas verdes (distâncias em Angstroms).

Em estudos com derivados tiossemicarbazonas, Fonseca et al. (2015) comprovaram seu potencial de inibição da enzima Catepsina B1 do *S. mansoni* (*SmCB1*), enzima da classe das cisteínas proteases considerada potencial alvo biológico e essencial em mecanismos de nutrição, evasão imunológica e invasão de células hospedeiras. O grupo propõe que os

derivados 4a e 4g (Figura 23) estejam entre os que mais apresentaram inibição enzimática, entretanto sugere futuras modificações moleculares até chegar a um composto promissor.

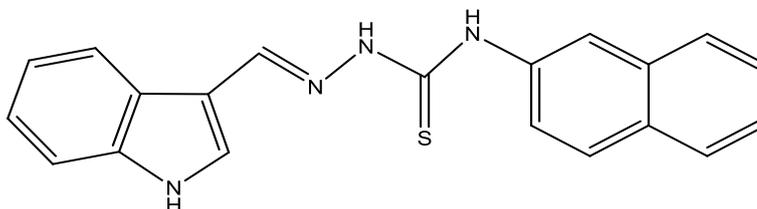
Figura 23 - Compostos 4a (a) e 4g (b) demonstrados no estudo



Fonte: FONSECA et al., 2015 (adaptado)

Mais recentemente, Oliveira et al. (2017) desenvolveram estudos envolvendo derivados tiossemicarbazônicos a base de indol com avaliação de sua atividade antiproliferativa bem como a promoção de ensaios de morte celular e de inibição de topoisomerase. O composto 2b (figura 24) foi apontado como promissor do estudo sugerindo que este possua capacidade de ligação com a enzima topoisomerase II α , inibindo-a e conseqüentemente impossibilitando a transcrição do DNA conferindo a este composto uma capacidade antiproliferativa.

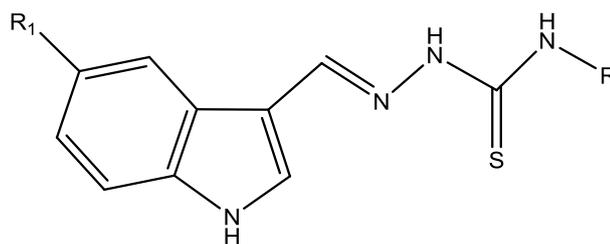
Figura 24 - estrutura geral do composto 2b



Fonte: Oliveira et al., 2017 (adaptado)

É possível inferir semelhança estrutural ao AP09, que apresentou 100% de mortalidade dos parasitos nas primeiras 24h, e ainda: no mesmo estudo, os compostos 2a-d (figura 25) apresentaram atividade antiproliferativa moderada a potente. Se comparadas as estruturas gerais dos compostos da série LQIT/AP com os compostos 2a-d, observa-se semelhança estrutural entre eles podendo sugerir mecanismo de ação envolvendo interação com o DNA e inibição da topoisomerase II α .

Figura 25 - Estrutura geral dos compostos 2a-d



Fonte: Oliveira et al., 2017 (adaptado)

Observando os resultados de motilidade/mortalidade nos testes com parasitos adultos, quatro dos seis compostos testados promoveram a morte dos parasitos. Desses, três contêm substituições em N4 com anel aromático, sendo assim podemos sugerir que a presença desse é importante na atividade dos compostos.

Ainda analisando a importância desse anel e os substituintes nele propostos, podemos observar que a presença do cloro confere atividade esquistossomicida aos derivados tiossemicarbazonas. A mesma afirmação foi feita para derivados 2-tioimidazolidin-4-ona e ftalil-tiazóis (SANTIAGO et al., 2014). Porém a presença de halogênios neste estudo não foi determinante, uma vez que o composto AP05 (4-bromo-fenil) não demonstrou atividade frente aos parasitos adultos.

Quando comparados os compostos AP03 (4-metóxi-fenil), AP11 (*p*-toluil) e AP12 (4-cloro-fenil), podemos inferir que a inclusão do 4-metóxi no anel aromático causa a perda da atividade esquistossomicida na série LQIT/AP. Stolf et al. (2014) propuseram que a menor inibição da *SmCB1* em relação à observada para a *hCB1* pode ter sido causada pela presença do 4-metóxi-fenil no composto de maior atividade devido à sua menor interação no sítio ativo da enzima que contém uma região apolar em congruência com a porção da molécula contendo este substituinte.

Estudos relatam maior atividade esquistossomicida de heterociclos contendo grupo metóxi quando comparados aos que não possuem esses substituintes (SANTIAGO et al., 2014). Essa substituição na porção indólica dos compostos se mostrou importante, porém não determinante na atividade esquistossomicida, uma vez que, ao relacionarmos o AP03 (4-metóxi-fenil) aos compostos que apresentaram-se ativos, todos apresentam a mesma característica no heterociclo mencionado.

A presença de uma cadeia lateral alifática, a exemplo do observado no composto AP07, certamente não favoreceu o aumento do potencial esquistossomicida, uma vez que substituindo-a por grupos aromáticos como o 4-cloro-fenil (AP12) observou-se melhora nos scores de mortalidade de 14,3% no AP07 para 29,5% no AP12 chegando a 100% quando o substituinte

foi o naftil (AP09). Por outro lado a presença deste mesmo substituinte apresenta influência na motilidade dos parasitos, uma vez que ele promoveu maior diminuição nesta (85,7%) em comparação aos demais compostos da série.

O mecanismo proposto para o Praziquantel é de que os parasitos ao entrarem em contato com o fármaco *in vitro* sofrem um rápido influxo de Cálcio (Ca^{2+}) ocasionando sua paralisia muscular intensa além de notáveis protusões tegumentares (CUPIT & CUNNINGHAM, 2015). Entretanto este não aparenta ser o mecanismo através do qual atuam os derivados da série LQIT/AP, uma vez que eles não compartilham semelhança estrutural com o PZQ e, por outro lado, compartilham porções de sua estrutura com as de outras moléculas relatadas na literatura com atividades frente a enzimas que atuam no DNA ou outros mecanismos de vida do parasito. Dessa forma, pode-se sugerir que essas últimas opções sejam mecanismos de ação mais prováveis para os derivados tiosemicarbazônicos.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Os derivados tiossemicarbazona foram sintetizados com sucesso, considerando que foi possível empregar a rota sintética já descrita em literatura e interpretar os estudos espectroscópicos e espectrométricos realizados confirmar a formação dos derivados tiossemicarbazonas.

Não foi possível determinar a forma tautomérica dos compostos através de estudo de infravermelho ou confirmar a presença de diastereoisômeros através de análise espectroscópica de NOESY. Entretanto observações experimentais, interpretação de análises espectroscópicas de RMN¹H, COSY, RMN ¹³C e HSQC, bem como relatos da literatura possibilitaram sugerir a formação majoritária do isômero *E*.

Quanto aos estudos biológicos, os derivados não apresentaram toxicidade sobre células macrófaga saudáveis, sugerindo a contribuição dos compostos na resposta imunológica, uma vez que macrófagos estão envolvidos nas respostas Th1 e Th2 da esquistossomose. O composto AP09, apesar de ter apresentado maior toxicidade comparativamente ao PZQ, não demonstrou toxicidade em macrófagos J774.

Nos testes de indução de produção de nitrito, todos os compostos da série LQIT/AP obtiveram maiores concentrações deste composto quando comparados ao praziquantel. O NO é produzido por macrófagos durante a resposta Th1 em consequência da ação de citocinas promovendo a morte dos parasitos. Dessa forma pode-se sugerir influência dos compostos na fase da doença que precede a oviposição.

De um modo geral, alguns pontos podem ser considerados, no que diz respeito à atividade *in vitro* frente a parasitos adultos do *S. mansoni*:

A presença do anel aromático é importante na atividade dos derivados, com aumentos significativos na presença de um grupo volumoso como o nafil. O Cloro confere atividade esquistossomicida, entretanto a presença de halogênios não é determinante para ela. A presença de um grupo metóxi em heterociclos, segundo relatos da literatura, confere aumento da atividade esquistossomicida e mostrou-se importante na promoção da mortalidade e de alterações de motilidade nos compostos avaliados neste estudo, todavia esse mesmo grupo quando substituído no anel aromático do lado oposto da molécula acarreta na perda de sua atividade. A presença de uma cadeia lateral alifática não promove o aumento do potencial esquistossomicida.

Por fim, dentre os compostos avaliados, AP07, AP09, AP11 e AP12 apresentaram atividade frente a parasitos adultos de *S. mansoni*, não apresentaram toxicidade sobre células

sadias e promoveram a síntese de NO em células macrofágicas podendo ser considerados os mais promissores do estudo e prováveis alvos de futuros estudos para conhecimento mais aprofundado de suas propriedades químicas e influências sobre o *S. mansoni*.

Perspectivas

6.1 Perspectivas

A partir dos resultados químicos desse experimento, propomos a futura realização de técnicas espectroscópicas de infravermelho e NOESY a fim de determinar a presença de uma ou ambas as formas tautométicas tiona (banda entre 1028 – 1082 cm^{-1}) e tiol (2500 – 2600 cm^{-1}) e elucidar a predominância de um ou ambos os diastereoisômeros, respectivamente.

Quanto aos resultados observados na toxicidade frente à linhagem de células macrofágicas e de indução de óxido nítrico, realizar testes adicionais de doseamento de citocinas para que haja maior embasamento no tocante ao potencial imunomodulador dos compostos testados e realizar testes *in vitro* frente a parasitos jovens para estabelecer melhor a relação dos compostos com a fase inicial da doença, bem como testes *in vivo* para avaliação da atividade sistêmica destes.

Realizar testes com os compostos mais promissores a 100 μM , 50 μM , 25 μM e 12,5 μM para compreender a influência da concentração desses frente ao *S. mansoni* (jovens e adultos) concomitantemente a estudos de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no intuito de registrar e observar possíveis alterações tegumentares nos parasitos.

Por fim, proceder com estudos *in vivo* dos melhores compostos empregando técnicas de oograma e de cheever para avaliar a viabilidade e a quantidade de ovos, respectivamente em camundongos infectados com o *S. mansoni*.

REFERÊNCIAS

ABOU-SHADY, O. M. et al. Therapeutic effect of mefloquine on *Schistosoma mansoni* in experimental infection in mice. **J Parasit Dis**, v. 40, n. 2, p. 259-267, 2016.

ALGAHTANI, H. A. et al. Acute paraplegia caused by *Schistosoma mansoni*. **Neurosciences Journal**, v. 19, n. 1, p. 47-51, abr./nov. 2013.

ALMEIDA, M. M. Efeito da quimioterapia com praziquantel no perfil de citocinas de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* portadores de fibrose periportal. 78f. (Mestrado em Ciências Biológicas: Imunopatologia das doenças infecciosas e parasitárias) – Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares. 2009.

AQUINO, T. M.. Síntese e Avaliação das Atividades Anti-Toxoplasma gondii e Antimicrobiana de Benzaldeído 4-Fenil-3-tiossemicarbazonas e Derivados 2[(Fenilmetileno)hidrazono]-3-fenil-4-tiazolidinona-5-substituídos. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

BARBOSA, C. S. et al. Turismo de risco para esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Estado de Pernambuco, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 6, n. 1, p. 51-58, 2015.

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**. v. 24, n. 1, p. 87-96, 2015.

BERALDO, H. Semicarbazonas e Tiossemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 461-471, 2004.

BOISSIER, J. et al. In Vitro Activities of Trioxaquines against *Schistosoma mansoni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 11, p. 4903–06, 2009.

BRASIL, PORTAL DA SAÚDE. **Situação epidemiológica - dados**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/656->

secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/esquistossomose/11244-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: 09 jun. 2017.

BRASIL. **Vigilância da esquistossomose mansoni diretrizes técnicas**. 4 ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014. 146 p.

BRITTA, E. A. et al. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 236, p. 1-12, 2014.

CHTANOVA, T.; MACKAY, C. R. T Cell Effector Subsets: Extending the Th1/Th2 Paradigm. **Adv Immunol**, v. 78, p. 233-266, 2001.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present and future? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 68, p. 35-85, 1995.

COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 383, p. 2253-2264, 2014.

CUPIT, P. M.; CUNNINGHAM, C. What is the mechanism of action of praziquantel and how might resistance strike?. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 701-705, 2015.

DUVALL, R.H.; DEWITT, W.B. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 16, p. 483-486, 1967.

FALLON, P. G. et al. Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 53, p. 61-2, 1995

FALLON, P.G. Schistosome resistance to praziquantel. **Drug Resistance Updates**, v. 1, p. 236-41, 1998

FERREIRA, C. S. Brief communication refractive index matching applied to fecal smear clearing. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 47, n. 6, p. 347-350, nov./dez. 2005.

FONSECA, N. C. et al. Synthesis of a Sugar-Based Thiosemicarbazone Series and StructureActivity Relationship versus the Parasite Cysteine Proteases Rhodesain, Cruzain, and Schistosoma mansoni Cathepsin B1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2666-2677, 2015.

FOOTE, K. M. et al. Discovery of 4-{4-[(3R)-3-Methylmorpholin-4-yl]-6-[1-(methylsulfonyl)cyclopropyl]pyrimidin-2-yl}-1H-indole (AZ20): A Potent and Selective Inhibitor of ATR Protein Kinase with Monotherapy in Vivo Antitumor Activity. **J. Med. Chem.**, v. 56, n. 5, p. 2125-2138, 2013.

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, 2010.

GRAY, D. J. et al. Schistosomiasis elimination: lessons from the past guide the future. **Lancet Infect Diseases**, v. 10, p. 733-736, 2010.

GREEN, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem.**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GREENBERG, R.M. New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in Schistosomes. **Parasitology**, v. 140, p. 1534-46, 2013.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 383-397, 2012.

GUIDI, A. et al. Discovery and Characterization of Novel Antischistosomal Properties of the Anti-anginal Drug, Perhexiline and Its Impact on Schistosoma mansoni Male and Female Reproductive Systems. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1-22, 2016.

GUIMARÃES, H. A.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA; CURCINO, I. J.. ¹H and ¹³C-NMR Data of the Simplest Plumeran Indole Alkaloids Isolated from Aspidosperma Species. **Molecules**, v. 17, p. 3025-3043, jan. 2012.

GUZEL, O.; KARALI, N.; SALMAN, A. Synthesis and antituberculosis activity of 5-methyl/trifluoromethoxy-1H-indole-2,3-dione 3-thiosemicarbazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 8976-8987, 2008.

HOFFMAN, W. A., PONS, J. A., JANER, J. L. Sedimentation concentration method in Schistosomiasis mansoni. **Puerto Rico J. Publ. Health & Trop. Med.** v.9, p. 283-298, 1934.

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. **Am J Trop Med Hyg**, v. 55, p. 214-8. 1996

JAMES, S. L.; GLAVEN, J. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of Schistosoma mansoni involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. **The Journal of Immunology**, v. 143, p. 4208-4212, 1989.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasite infections. **Microbiological reviews**. v. 59, n.4, p. 533-547, 1995.

KATZ, N. & ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 38-41, 2003.

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

LAMBERTUCCI, J.R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 422-435, 2010.

LOBANA, T. S. et al. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals - An overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 977-1055, 2009.

LOTIFY, W. M. et al. Evaluation of a method for induction of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 8, p. 1214-19, 2015.

MATOS-ROCHA, T. J. et al. Synthesis and biological evaluation of novel imidazolidine derivatives as candidates to schistosomicidal agents. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 59, p. 1-10, 2017.

MELMAN, S.D. et al. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, p. 504, 2009

MOORTHY, N. S. et al. Aryl- and Heteroaryl-Thiosemicarbazones Derivatives and Its Metal Complexes: A Pharmacological Template. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 168-182, 2013.

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

NASCIMENTO, M. et al. Ly6Chi Monocyte Recruitment Is Responsible for Th2 Associated Host-Protective Macrophage Accumulation in Liver Inflammation due to Schistosomiasis. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 8, p. 1-14, 2014.

NEVES, J.K.A.L. et al. Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 107, p. 531–538, 2010.

NEVES, J.K.A.L. et al. Antischistosomal action of thioxo-imidazolidine compounds: An ultrastructural and cytotoxicity study. **Experimental Parasitology**, v. 128, p. 82–90, 2011.

OLIVEIRA, J. F. D. et al. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 104, p. 148-156, 2015.

OLIVEIRA, J. F. D. et al. Evaluation of anti-inflammatory effect of derivative (E)-N-(4-bromophenyl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 80, p. 388-392, 2016.

OLIVEIRA, J. F. D. et al. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 139, p. 305-314, 2017.

OLIVEIRA, S. M. D. et al. Estrutura, Reatividade e Propriedades Biológicas de Hidantoínas. **Química Nova**, v. 31, n. 3, 2008.

PAVANELLI, W. R. et al. Nitric Oxide Donors with Therapeutic Strategic in Experimental Schistosomiasis Mansoni. **American Journal of Immunology**, v. 10, n. 4, p. 225-239, 2014.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews**, v. 2, p. 499-511, 2002.

REY, LUIS. **Bases da parasitologia médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 424 p.

ROFATTO, H. K. et al. Antígenos vacinais contra esquistossomose mansônica: passado e presente. **Revista da Biologia**, v. 6, p. 54-59, 2011.

SANCHEZ, M. C. et al. Effect of praziquantel on the differential expression of mouse hepatic genes and parasite ATP binding cassette transporter gene family members during *Schistosoma mansoni* infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 6, 2017.

SANTIAGO, E. D. F. et al. Evaluation of the Anti-*Schistosoma mansoni* Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 58, n. 1, p. 352-363, 2014.

SANTIN, J. R. et al. Role of an Indole-Thiazolidine Molecule PPAR Pan-Agonist and COX Inhibitor on Inflammation and Microcirculatory Damage in Acute Gastric Lesions. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1-13, 2013.

SAYED, A.A. et al. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. **Nature Medicine**, v. 14, p. 407-412, 2008.

SÁ, Ivone Manzali De. A resistência à cloroquina e a busca de antimalariais entre as décadas de 1960 e 1980. **Hist. cienc. saude-Manguinhos**, v. 18, n. 2, p. 407-430, 2015.

SCHUCK, D. C. et al. Synthetic indole and melatonin derivatives exhibit antimalarial activity on the cell cycle of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 78, p. 375-382, 2014.

SILVA, V. B. R. D. et al. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 13, 2017.

SOUZA, A. L. R. D. et al. In vitro evaluation of permeation, toxicity and effect of praziquantel-loaded solid lipid nanoparticles against *Schistosoma mansoni* as a strategy to

improve efficacy of the schistosomiasis treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, p. 31-37. 2014.

SOUZA, F. P. C. D. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev Bras Clin Med**, v. 9, n. 4, p. 300-307, jul./ago. 2011.

STADECKER, M. J.; HERNANDEZ, H. J. The immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: a key role of major egg antigen Sm-p40. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 5, p. 217-221, 1998.

SETO, E. Y. W. et al. Human Schistosomiasis Resistance to Praziquantel in China: Should We Be Worried?. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, n. 85, p. 74-82, 2011.

SILVA, K. E. R. et al. Alternativas terapêuticas no combate à Esquistossomose Mansônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 1, n. 33, p. 9-16, 2012.

STOLFA, D. A. et al. Molecular Basis for the Antiparasitic Activity of a Mercaptoacetamide Derivative That Inhibits Histone Deacetylase 8 (HDAC8) from the Human Pathogen *Schistosoma mansoni*. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, p. 3442-3453, jan. 2014.

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

VIEIRA, R. P. Estudo do perfil farmacológico de bases de Schiff e de suas interações com metais. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2013.

VITORINO, R. R. et al. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 1, p. 39-45, jan./fev. 2012.

WANG, et al. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 1871–1877, 2012.

WEEKAROON, et al. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 28, n. 4, p. 939-967, 2015.

WHO. Schistosomiasis. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: 27 mar. 2017.