

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**MARCILENE APARECIDA ALVES**

**DERIVADO DA LICARINA A COMO POTENTE AGENTE LEISHMANICIDA:  
EFEITO NO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL**

ALFENAS/MG

2021

**MARCILENE APARECIDA ALVES**

**DERIVADO DA LICARINA A COMO POTENTE AGENTE LEISHMANICIDA:  
EFEITO NO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biologia Celular, Molecular e estrutural de Doenças Agudas e Crônicas.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Figueiredo Peloso

Coorientador: Prof. Dr. Marcos José Marques

ALFENAS/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Alves, Marcilene Aparecida.  
A474d Derivado da Licarina A como potente agente leishmanicida: efeito no potencial de membrana mitocondrial. / Marcilene Aparecida Alves. – Alfenas/MG, 2021.  
71f. : il. --

Orientador: Eduardo de Figueiredo Peloso.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2021.  
Bibliografia.

1. Leishmaniose. 2. Licarina A. 3. Mitocôndria. I. Peloso, Eduardo de Figueiredo. II. Título.

CDD-616.96

Ficha Catalográfica elaborada por Fátima dos Reis Goiatá  
Bibliotecária-Documentalista CRB/6-425

**MARCILENE APARECIDA ALVES**

**DERIVADO DA LICARINA A COMO POTENTE AGENTE LEISHMANICIDA:  
EFEITO NO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biologia Celular, Molecular e Estrutural de Doenças Agudas e Crônicas.

Aprovada em: 24 de fevereiro de 2021.

Prof. Dr. Eduardo de Figueiredo Peloso  
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lívia de Figueiredo Diniz Castro  
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Ramos Gadella  
Universidade Estadual de Campinas

Assinatura:



---

Documento assinado eletronicamente por **Eduardo de Figueiredo Peloso, Professor do Magistério Superior**, em 24/02/2021, às 14:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



---

Documento assinado eletronicamente por **Livia de Figueiredo Diniz Castro, Professor do Magistério Superior**, em 24/02/2021, às 14:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



---

Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Ramos Gadelha, Usuário Externo**, em 24/02/2021, às 15:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



---

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0469574** e o código CRC **4D418AE9**.

---

Aos familiares, amigos e todos que direta ou indiretamente contribuíram para conclusão desta etapa.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da persistência, não permitindo que eu desistisse dos meus objetivos.

Ao Prof. Dr. Eduardo de Figueiredo Peloso, pela orientação, compreensão, paciência, disposição, presença, exigências, críticas e estímulo durante a caminhada em busca ao conhecimento.

Ao Prof. Dr. Marcos José Marques pela coorientação, conhecimentos, paciência, e disposição constantes.

Ao professor Dr. Diogo Teixeira de Carvalho e a doutoranda em Ciências Farmacêuticas Dalila Junqueira de Alvarenga, responsáveis pela síntese da Licarina A e compostos derivados estudados nesta pesquisa.

Aos amigos e colegas, alunos e professores do Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos, que muito contribuíram direta ou diretamente para a realização deste trabalho.

Aos técnicos dos Laboratório de Bioquímica e Hematologia.

Aos professores, técnico e alunos dos departamentos de Parasitologia Básica e de Microbiologia e Imunologia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG.

Aos porteiros e demais funcionários da Universidade Federal de Alfenas pelo respeito, carinho, disposição e pelas atitudes simples como um “bom dia” que tornam minha passagem pela universidade mais feliz.

A todos os meus familiares e amigos, em especial aos meus filhos Enzo e Ian.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

As leishmanioses constituem um conjunto diversificado de doenças parasitárias causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. As opções terapêuticas disponíveis são escassas, de alto custo e alta toxicidade, apresentam efeitos adversos graves, resistências parasitárias e recidivas. Os compostos naturais e seus derivados são considerados promissores candidatos a fármacos para inúmeras patologias. Dentre os compostos naturais com conhecida atividade leishmanicida, porém pouco estudada, está a neolignana Licarina A. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar a atividade leishmanicida da Licarina A (DL01) e 17 de seus derivados em ambas as formas evolutivas de *Leishmania (L.) amazonensis*, bem como sua citotoxicidade e possíveis mecanismos de ação. Para tanto, formas promastigotas ( $10^6$  células/mL) foram tratadas com os compostos em diferentes concentrações (0,1 a 40  $\mu\text{g/mL}$ ) e incubadas durante 72 horas a 25 °C. Após esse período, a viabilidade celular foi avaliada pelo método da resazurina para a determinação da concentração inibitória de 50% das células ( $\text{CI}_{50}$ ). A citotoxicidade foi determinada em macrófagos peritoneais murinos ( $10^6$  células/mL) tratados com compostos em diversas concentrações (3,9 a 500  $\mu\text{g/mL}$ ) e incubados por 48 horas a 37 °C, 5% de  $\text{CO}_2$ . A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico MTT [brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio] para a determinação da concentração citotóxica de 50% ( $\text{CC}_{50}$ ). Adicionalmente, os compostos que apresentaram melhores índices de seletividade (IS) foram submetidos à avaliação da atividade anti-amastigota, na qual macrófagos ( $5 \times 10^5$  células/mL) foram infectados com formas promastigotas em fase estacionária da curva de proliferação, tratados por 48 horas com os compostos em uma escala de concentrações (0,1 a 40  $\mu\text{g/mL}$ ), corados com giemsa e analisados ao microscópio óptico. Em seguida, o melhor IS obtido em relação às formas amastigotas foi utilizado para selecionar o composto mais promissor para o estudo de mecanismo de ação. Este foi realizado através da análise do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) utilizando a sonda JC-10. Os resultados indicaram que treze dos compostos estudados apresentaram atividade contra as formas promastigotas, sendo que alguns se mostraram menos tóxicos, comparados ao composto DL01 e Anfoterina B. Os compostos DL03, DL10, DL17 e DL21 apresentaram IS superior em relação às formas promastigotas, variando entre 1,9 a 7,54. Quando submetidos à análise anti-amastigota, o composto DL21 apresentou melhor atividade entre os demais compostos testados ( $\text{CI}_{50} = 0,45 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$ ) e com maior IS, 41,1. Assim, o DL21 foi selecionado para o estudo de mecanismo de ação, juntamente com a DL01. Diante dos efeitos destes compostos sobre o  $\Delta\Psi$ , o DL01 o reduziu em 13,5%, enquanto o DL 21 o aumentou em 3,0%. Os resultados obtidos indicam que o composto DL21 é um promissor candidato a fármaco com ação leishmanicida. Entretanto, novos estudos são necessários para um conhecimento mais amplo de mecanismo de ação, bem como avaliações *in vivo* da atividade e toxicidade.

**Palavras chaves:** Leishmaniose, Licarina A, mitocôndria

## ABSTRACT

Leishmaniasis combined a diverse set of parasitic diseases caused by flagellated protozoa of the genus *Leishmania*. The therapeutic options available are scarce, of high cost and high toxicity, have adverse effects, parasitic resistance and recurrence. Natural compounds and their candidates are considered candidates for pharmaceutical candidates to study pathologies. Among the natural compounds with known leishmanicidal activity, however, little studied, is the neolignan Licarin A. The present study aimed to analyze the leishmanicidal activity of Licarina A (DL01) and 17 of its derivatives in both evolutionary forms of *Leishmania (L.) amazonensis*, as well as its cytotoxicity and possible mechanisms of action. For this, promastigote forms ( $10^6$  cells / mL) were treated with the compounds in different concentrations (0.1 to 40  $\mu\text{g}$  / mL) and incubated for 72 hours at 25 ° C. After this period, cell viability was assessed by the resazurin method to determine the inhibitory concentration of 50% of the cells ( $\text{IC}_{50}$ ). Cytotoxicity was determined in murine peritoneal macrophages ( $10^6$  cells / mL) treated with compounds in different concentrations (3.9 to 500  $\mu\text{g}$  / mL) and incubated for 48 hours at 37 ° C, 5%  $\text{CO}_2$ . Cell viability was determined by the MTT [3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] for the determination of the 50% cytotoxic concentration ( $\text{CC}_{50}$ ). In addition, the compounds that showed the best selectivity indexes (IS) were subjected to the evaluation of anti-amastigote activity, in which macrophages ( $5 \times 10^5$  cells / mL) were infected with promastigote forms in the stationary phase of the proliferation curve, treated for 48 hours with the compounds on a concentration scale (0.1 to 40  $\mu\text{g}$  / mL), stained with giemsa and analyzed under an optical microscope. Then, the best IS obtained in relation to the amastigote forms was used to select the most promising compound for the study of the mechanism of action. This was done through the analysis of the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ ) using the JC-10 probe. The results indicated that thirteen of the studied compounds showed activity against the promastigote forms, some of which were less toxic compared to the compound DL01 and Amphotericin B. The compounds DL03, DL10, DL17 and DL21 showed higher IS in relation to the promastigote forms, varying between 1.9 to 7.54. When submitted to anti-amastigote analysis, the DL21 compound showed better activity among the other tested compounds ( $\text{IC}_{50} = 0.45 \pm 0.07 \mu\text{g}$  / mL) and with higher IS, 41.1. Thus, DL21 was selected for the study of mechanism of action, together with DL01. Given the effects of these compounds on  $\Delta\Psi$ , DL01 reduced it by 13.5%, while DL21 increased it by 3.0%. The results obtained indicate that the compound DL21 is a promising drug candidate with leishmanicidal action. However, further studies are needed for a broader understanding of the mechanism of action, as well as *in vivo* assessments of activity and toxicity.

**Keywords:** Leishmaniasis. Licarin A. Mitochondria

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Manifestações clínicas da leishmaniose.....	19
Figura 2 -	Ciclo de vida dos parasitas pertencentes ao gênero <i>Leishmania</i> .....	23
Figura 3 -	<i>Neolignana</i> diidrobenezofurânica .....	27
Figura 4 -	Estruturas da Licarina A(DL01) e derivados.....	34
Figura 5 -	Curva de proliferação das formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	41
Figura 6 -	Imagens representativas das lâminas contendo macrófagos infectados tratados com DL01 e DL21.....	48
Figura 7 -	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ). .....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Avaliação da atividade anti-promastigota da DL01 e compostos derivados com 72 horas de incubação.....	2
Tabela 2 -	Avaliação da citotoxicidade da DL01 e compostos derivados em macrófagos peritoneais murinos com 48 horas de incubação.....	43
Tabela 3 -	Índice de seletividade (IS) em relação às formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	44
Tabela 4 -	Avaliação anti-promastigota em diferentes tempos de incubação.....	45
Tabela 5 -	Porcentagem de macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> tratados com DL01 e compostos derivados.....	46
Tabela 6 -	Número de amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> por macrófagos infectados tratados com DL01 e compostos derivados.....	47
Tabela 7 -	Concentração inibitória de 50 e de 90% das formas amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> com o composto DL01 e derivados, e IS em relação ao CI <sub>50</sub> .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ATP	Adenosina Trifosfato
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC <sub>50</sub>	Concentração Citotóxica de 50%
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória de 50%
DL01	Licarina A
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTN	Doença Tropical Negligenciada
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IS	Índice de Seletividade
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea Difusa
LCDI	Leishmaniose Cutânea Disseminada
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LM	Leishmaniose Mucosa
LV	Leishmaniose Visceral ou Calazar
MS	Ministério da Saúde
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\Delta\Psi$       Potencial de Membrana Mitocondrial

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>15</b>
1.1.2	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
3.1	AS LEISHMANIOSES.....	18
3.2	O PARASITA: LEISHMANIA, CICLO DE VIDA E TRANSMISSÃO.....	21
3.3	TRATAMENTOS.....	23
3.4	ESTRATÉGIAS DE ESTUDO PARA NOVAS TERAPIAS.....	26
3.5	LICARINA A E COMPOSTOS DERIVADOS.....	27
3.6	MECANISMO DE AÇÃO.....	29
3.6.1	<b>Bioenergética Mitocondrial.....</b>	<b>29</b>
3.6.2	<b>Potencial de Membrana Mitocondrial e Funcionalidade da Mitocôndria.....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1	OS COMPOSTOS ESTUDADOS.....	33
4.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	34
4.3	CULTURA DOS PARASITOS.....	35
4.4	CURVA DE PROLIFERAÇÃO.....	35
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-PROMASTIGOTA.....	35
4.6	ÍNDICE DE SELETIVIDADE.....	36
4.7	ATIVIDADE ANTI-PROMASTIGOTA EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO.....	37
4.8	OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS.....	37
4.9	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS.....	37
4.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-AMASTIGOTA.....	38
4.11	POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi$ ).....	39

4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
5.1	CULTIVO E CURVA DE PROLIFERAÇÃO.....	41
5.2	ATIVIDADE ANTI-PROMASTIGOTA.....	41
5.3	AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS.....	43
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO.....	44
5.5	ATIVIDADE ANTI-AMASTIGOTA.....	45
5.6	POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi$ ).....	49
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo de doenças infecciosas ou parasitárias, consideradas endêmicas em regiões tropicais e subtropicais afetando mais de um bilhão de pessoas no mundo, principalmente as populações mais pobres (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020). Entre as DTNs, a leishmaniose é considerada um dos principais problemas de saúde pública no mundo e no Brasil (BALNA-FOUCE, 2012; BRASIL, 2019; OMS, 2020).

As leishmanioses formam um grupo diversificado de doenças parasitárias causadas por diferentes espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* que são transmitidos aos humanos por meio de picadas de flebotomíneos fêmeas infectadas, do gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus* (OMS, 2020). Estas doenças apresentam uma prevalência de 12 milhões de pessoas no mundo com cerca de 1 milhão de novos registros e mais de 26 mil mortes anuais. É considerada endêmica em 98 países, sendo que o Brasil se encontra entre os mais afetados (OMS, 2020).

As infecções pelos protozoários do gênero *Leishmania* podem provocar um amplo espectro de manifestações clínicas, as quais variam de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida e com aspectos imunológicos do paciente (BRASIL, 2017; BERLINK, 2011; TEMPONE; OLIVEIRA; TATENG *et al.*, 2018). As diferentes formas clínicas da leishmaniose são classicamente divididas em cutânea (LC) e visceral ou Calazar (LV), sendo a LC subdividida em cutânea localizada (LCL), cutânea disseminada (LCDI), cutânea difusa (LCD) e mucosa (LM) (BRASIL, 2017). As formas de LC são as mais comuns em todo o mundo e podem variar de lesões na pele que apresentam cura espontânea, ou se tornarem lesões crônicas, ou ainda, lesões erosivas da mucosa com destruição facial severa e risco de infecção sistêmica. Já a forma LV se caracteriza principalmente pelo aumento de volume do fígado e do baço, sendo considerada potencialmente letal em até 95% dos casos sintomáticos não tratados (OMS, 2020).

Atualmente, os fármacos de primeira escolha, recomendados para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (BRASIL, 2017). Estes foram introduzidos no mercado há mais de 70 anos e apresentam elevada toxicidade, promovendo graves alterações cardíacas, renais e hepáticas. Tais fármacos são administrados por via parental e em muitos casos necessitam de internações, além

de falha terapêutica, recidivas e resistência (BASTOS et al., 2012; DE CARVALHO et al., 2013; SOUZA et al., 2020). Outros fármacos são indicados como terapias de segunda escolha, entre eles a Anfotericina B e suas formulações lipossomais, a Pentamidina e Miltefosina (BOER et al., 2011), porém todos apresentam alto custo, elevada toxicidade e casos de resistência.

A elevada incidência, morbidade, mortalidade e ampla distribuição geográfica das leishmanioses, juntamente com as limitações dos fármacos disponíveis, têm motivado inúmeros estudos buscando novas alternativas terapêuticas. Nesta busca, os compostos naturais e seus derivados são considerados muito promissores, sendo que nas últimas décadas representaram cerca de 50% dos fármacos antiparasitários produzidos (NEWMAN; GRAGG, 2020). Entre os diversos compostos naturais com atividade antiparasitária, encontramos a Licarina A, apresentando várias atividades biológicas, entre elas, potente atividade leishmanicida contra a *L. (L.) major* (NERIS et al., 2013).

Adicionalmente, o conhecimento do mecanismo de ação de candidatos a fármacos possibilita a identificação dos alvos bioquímicos, o desenvolvimento de moléculas com menor toxicidade e maior eficácia, a previsão de efeitos adversos e interações medicamentosas, entre outros (BACKMAN et al., 2016; BARREIRO; FRAGA, 2005). Neste sentido, o estudo de possíveis alterações em parâmetros mitocondriais, como o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) pode contribuir de forma muito significativa, uma vez que esta organela é considerada como principal sítio de produção de ATP na célula, além de desempenhar outras funções essenciais à sobrevivência de todos os eucariotos, inclusive em *Leishmania* (SAUNDERS et al., 2014).

A manutenção do  $\Delta\Psi$  é essencial para a funcionalidade das mitocôndrias, uma vez que está diretamente envolvido com a fosforilação oxidativa, síntese de ATP, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e homeostase intracelular. Mudanças mitocondriais como estas, representam os principais sinais dos processos semelhantes à apoptose em *Leishmania*. Além disso, a redução do  $\Delta\Psi$  é característica de uma célula em morte celular programada (DAGNINO et al., 2018).

Neste contexto, visto que as opções terapêuticas atualmente disponíveis para o tratamento da leishmaniose são restritas e apresentam muitas limitações, o presente trabalho teve como objetivo analisar a atividade anti-*leishmania*, citotoxicidade e o  $\Delta\Psi$  da Licarina A (DL01) e compostos derivados em diferentes formas evolutivas de *L. (L.)*

*amazonensis*.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Analisar a atividade leishmanicida do composto DL01 e derivados em *L. (L.) amazonensis* e investigar seus efeitos no  $\Delta\Psi$ .

### 1.1.2 Objetivos Específicos

Abaixo estão descritos os objetivos específicos deste trabalho:

- a) determinar a curva de proliferação de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*;
- b) avaliar a atividade leishmanicida da DL01 e derivados em formas promastigotas;
- c) avaliar a citotoxicidade da DL01 e derivados em macrófagos peritoneais murinos;
- d) determinar o índice de seletividade (IS) do tratamento com DL01 e derivados, em relação às formas promastigotas;
- e) avaliar a atividade anti-promastigota em diferentes tempos de incubação da DL01 com os compostos selecionados pelo IS;
- f) avaliar a atividade anti-amastigota da DL01 com os compostos selecionados pelo IS;
- g) investigar alterações no  $\Delta\Psi$  em parasitas tratados com DL01 e o composto mais promissor (DL21).

## 2 JUSTIFICATIVA

As Leishmanioses constituem um conjunto variado de doenças causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Esta parasitose apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo considerada endêmica em 98 países. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses possuem uma prevalência estimada de aproximadamente 12 milhões de pessoas, sendo cerca de um milhão de novos casos e mais de 26 mil mortes anuais (OMS, 2020). No continente americano, o Brasil é o país que apresenta maior número de casos da doença com 72,6% dos novos registros de leishmanioses (OPAS, 2019).

Atualmente, os fármacos usados como primeira escolha no tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes, os quais apresentam elevada toxicidade, muitas reações adversas, resistência clínica e recidiva frequentes. Além disso, a administração via parenteral faz com que muitas vezes sejam necessárias internações, o que contribui para o abandono do tratamento. Adicionalmente, as alternativas terapêuticas disponíveis são escassas, de alto custo, com inúmeros efeitos colaterais e em algumas regiões apresentam resistência clínica elevada, justificando o desenvolvimento de novos fármacos. Assim, a busca por novas terapias é urgente, e dentro deste contexto, os compostos naturais têm se destacado.

A modificação estrutural de compostos que possuem atividade biológica já conhecida é considerada uma alternativa muito promissora, possibilitando o desenvolvimento de moléculas com maior eficácia e menor toxicidade. Entre os diversos compostos naturais com atividade já descrita, como antiparasitária, encontramos a Licarina A, com efeito tripanossomicida, shistosomicida e leishmanicida (MELETI *et al.*, 2019; NERIS *et al.*, 2013), entretanto, ainda pouca estudada.

Paralelamente, a mitocôndria é considerada um dos principais alvos bioquímicos de fármacos, e protozoários que possuem uma única mitocôndria apresenta grande sensibilidade a danos nesta organela, de modo que alterações nas funções mitocondriais podem levar à morte celular (SAUDAGAR *et al.*, 2013). Assim, a manutenção do  $\Delta\Psi$  é indispensável para a funcionalidade da mitocôndria, uma vez que este parâmetro bioquímico está relacionado a vários processos como produção de ATP, EROs, homeostase de cálcio e apoptose.

Neste contexto, a avaliação dos efeitos da DL01 e de seus derivados frente à atividade leishmanicida e posterior envolvimento com o  $\Delta\Psi$  poderá contribuir com a elucidação dos mecanismos de ação destes compostos, bem como, levar à produção de potenciais fármacos, mais eficazes e de menor toxicidade contra a leishmaniose.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 AS LEISHMANIOSES

As DTNs são um grupo diversificado de 20 doenças tropicais infecciosas ou parasitárias que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países afetando a vida de mais de um bilhão de pessoas (OMS, 2020). Estas doenças representam um grande problema de saúde pública em países pobres, em especial nas regiões mais marginalizadas, causando redução na qualidade de vida, incapacidade permanente e morte para milhões de pessoas, além de contribuírem para a manutenção da desigualdade social (OMS, 2020). Entre as DTNs se destacam como principais: a malária, a doença de Chagas, a doença do sono, a filariose linfática, a dengue, a esquistossomose e a leishmaniose (BALAÑA-FOUCE, 2012; OMS, 2020).

As leishmanioses formam um grupo de doenças causadas por 21 diferentes espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (AKHOUNDI *et al.*, 2016). Estes protozoários são transmitidos aos humanos por fêmeas de flebotomíneos infectadas, pertencente à família *Phlebotomidae*, gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (LAINSON, 1977).

As leishmanioses são caracterizadas por uma infecção intracelular que pode apresentar diferentes formas clínicas, em função da espécie de parasita envolvida e da resposta imune do hospedeiro (OMS, 2020; TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINK, 2011). Esta parasitose varia de lesões cutâneas simples que podem apresentar cura espontânea a formas viscerais com potencial letal. As principais formas clínicas são: cutânea (classicamente dividida em cutânea localizada (LC) (Figura 1-A), cutânea disseminada (LCDI) (Figura 1-B), cutânea difusa (LCD) (Figura 1-C) e mucosa (LMC) (Figura 1-D)) e a visceral ou Calazar (LV) (Figura 1-E) (CELESTE *et al.*, 2019).

Figura 1- Manifestações clínicas da leishmaniose.



Fonte: COSTA, 2014; Adaptado de CHAPPUIS, 2007

Legenda: A) Forma cutânea localizada de Leishmaniose (LC); B) Forma disseminada (LCDI); C) Forma difusa (LCD); D) Forma mucocutânea (LMC) e E) Leishmaniose Visceral (LV).

No Brasil foram identificadas oito espécies de *Leishmania*, sendo duas do subgênero *Leishmania*: *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* e seis espécies do subgênero *Viannia*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, e *L. (V.) lindenbergi* (BRASIL, 2017; LAINSON, 2010).

A espécie *L. (L.) amazonensis* é uma das diversas espécies do complexo *Leishmania mexicana* e agente etiológico de amplo espectro de leishmanioses (SOONG, 2012), tendo sido isolada de pacientes com distintas manifestações clínicas, tais como: LCL, LCD, LCDI e LV (DE SOUZA, 2011). Acredita-se que a *L. (L.) amazonensis* seja capaz de interferir no sistema imune, impedindo algumas respostas celulares à infecção, levando a uma anergia celular, propiciando então a evolução da LCD (BRASIL, 2017; GOTO; LINDOSO, 2010).

No Brasil, as formas cutâneas da leishmaniose são causadas principalmente pelas espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensi* e *L. (L.) amazonensis* afetando cerca de 30 mil pessoas anualmente (OPAS, 2019).

A forma mais comum da leishmaniose é a LCL que geralmente se limita a áreas expostas do corpo, como a face, braços e pernas. O número de lesões pode variar de um a dez, podendo apresentar úlceras arredondadas e delimitadas com bordas ligeiramente elevadas e endurecidas; na maioria dos casos a cura ocorre de modo

espontâneo (Figura 1 A). Estas lesões se desenvolvem em poucas semanas após a contaminação, sendo geralmente indolores, e em raros casos, se desenvolvem após vários meses da contaminação inicial e podem ser dolorosas (GOTO, LINDOSO, 2010).

A forma LCDI é pouco frequente e se caracteriza pela presença de grande número de lesões papulosas e acneiformes, raramente com ulcerações e com frequente comprometimento mucoso. Nesta forma, o número de lesões pode chegar a centenas e acometem vários segmentos corporais, envolvendo, com frequência, a face e o tronco (Figura 1 B). Posteriormente ao desenvolvimento das lesões primárias, ocorre a disseminação do parasito por via hemática ou linfática, que se estabelece em poucos dias, causando lesões distantes do local da picada (CARDOSO *et al.*, 2019). A principal espécie de *Leishmania* responsável pela LCDI é a *L. (V.) braziliensis* (CARDOSO *et al.*, 2019).

A forma LCD é a forma mais rara e grave da leishmaniose cutânea, acometendo pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Inicia-se apresentando lesão única e que evolui de forma lenta, com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrimdo grandes extensões cutâneas (MARIZ *et al.*, 2019) (Figura 1 B). A LCD apresenta uma baixa resposta aos tratamentos, possui altos índices de recidivas, quase a totalidade dos casos, e mortalidade elevada (BRASIL, 2017). Esta forma de leishmaniose, no Brasil, está associada exclusivamente à infecção por *L. (L.) amazonensis* (BRASIL, 2017).

A forma LMC afeta principalmente as mucosas da face, como fossas nasais e o palato (Figura 1D). A forma clássica de LMC é secundária à lesão cutânea. Acredita-se que a lesão mucosa ocorra por mecanismos metastáticos através de disseminação hemática ou linfática. Geralmente, surge após a cura clínica da LC, com início insidioso e pouca sintomatologia. No entanto, em casos raros podem ocorrer simultaneamente às lesões cutâneas, sendo nesse caso denominada de mucocutânea. O comprometimento da mucosa pode induzir, em alguns casos, à destruição estrutural da face associada à insuficiência respiratória e a uma maior dificuldade de resposta ao tratamento, resultando em alta morbidade e mortalidade (WHO, 2019). A LMC está associada às espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (L.) amazonensis* (DINIZ; COSTA; GONÇALVES, 2011).

A forma LV se caracteriza por promover aumento de volume no fígado e baço, anemia, febre e emagrecimento (HEPBURN, 2000) (Figura 1 E). Em alguns casos

podem ocorrer outras manifestações como: dor de cabeça, calafrios, sudorese, tosse, diarreia, tonturas, vômitos, sangramento das gengivas, dores nos membros, leucopenia e linfadenopatia (MCGWIRE *et al.*, 2013). É considerada uma doença de evolução crônica, apresentando acometimento sistêmico e, se não tratada, pode levar ao óbito em até 95% dos casos dos pacientes sintomáticos (OMS, 2020). A LV é causada por espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo *donovani*, sendo a *L. (L.) donovani* presente no leste da África e sul da Ásia, enquanto a *L. (L.) infantum*, e *L. (L.) chagasi* são encontradas no norte da África e nas Américas (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Durante muitos anos, diferenciou-se a espécie *L. (L.) chagasi* como responsável pela forma visceral das leishmanioses nas Américas, porém, estudos mostraram que esta espécie é geneticamente igual à *L. (L.) infantum* (AKHOUNDI *et al.*, 2016; DANTAS-TORRES, 2006; MAURICIO *et al.*, 1999).

Com relação à epidemiologia, segundo a OMS cerca de um bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas, sendo expostas ao risco de infecção pelas diferentes espécies de *Leishmania*. Esta parasitose possui uma prevalência estimada de aproximadamente 12 milhões de pessoas, com cerca de 700 mil a um milhão de novos registros e de 26.000 a 65.000 mortes anuais (OMS, 2020). As leishmanioses são consideradas endêmicas em 98 países, entre eles, o Brasil. Atualmente, o Brasil faz parte de um grupo de sete países (Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão) que juntos foram responsáveis por cerca de 94% dos casos de leishmaniose relatados à OMS em 2018 (OMS, 2020).

Na América do Sul, o Brasil é o país mais afetado por ambas as formas da leishmaniose, apresentando 35% dos novos casos de LC e LMC e 96 % dos casos de LV (OPAS, 2019). Em 2017, o Brasil registrou 21.589 novos casos de leishmaniose, sendo 17.526 de LC/LM e 4.069 de LV, sendo as regiões norte e centro-oeste as mais afetadas (BRASIL, 2019).

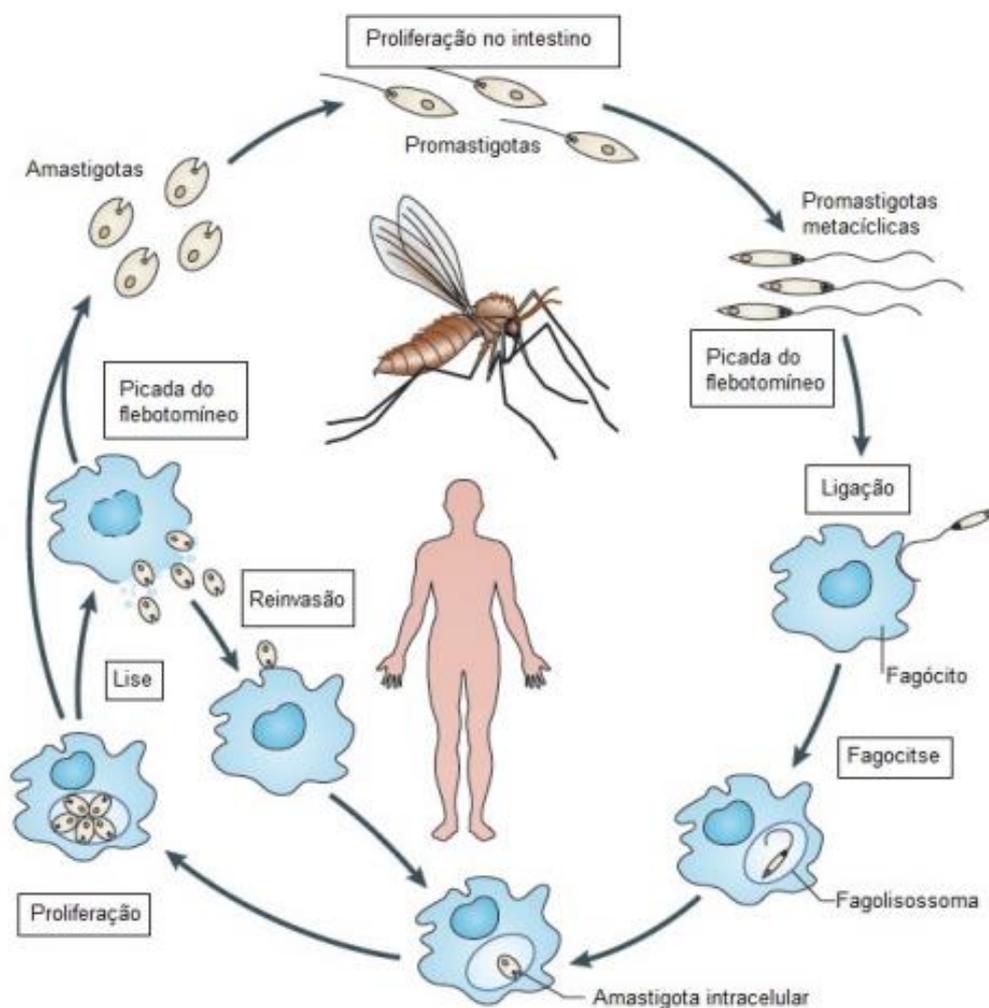
### 3.2 O PARASITA: LEISHMANIA, CICLO DE VIDA E TRANSMISSÃO

As *Leishmanias* fazem parte de um grupo com mais de vinte espécies pertencentes à ordem Kinetoplastida; Família: Trypanosomatidae; Gênero:

*Leishmania* e Subgênero: *Leishmania* ou *Viannia* (GOTO, LINDOSO, 2010; OMS, 2019).

As *Leishmanias* são parasitas digenéticos ou heteróxenos, apresentam um ciclo de vida que envolve dois hospedeiros, um vertebrado, geralmente roedores e canídeos, e ocasionalmente o homem, e um invertebrado, o flebotomíneo (*Phlebotomus* ssp e *Lutzomia* ssp) (Figura 2). No momento em que ocorre o repasto sanguíneo o mosquito palha fêmea da família dos flebotomíneos inocula na pele do hospedeiro vertebrado cerca de 10 a 100.000 formas promastigotas metacíclicas que apresentam flagelos longos e corpo delgado (KLIMBLIN *et al.*, 2008). No vertebrado, estas formas são rapidamente fagocitadas por diversos tipos celulares, principalmente por macrófagos (ANTONIE *et al.*, 1998). Dentro dos macrófagos, em um pequeno intervalo de tempo, as promastigotas metacíclicas adquirem formato arredondado e o flagelo se torna restrito à bolsa flagelar se transformando em amastigotas, as quais se multiplicam por meio de divisão binária no interior dos fagolisossomas. As amastigotas prosseguem se dividindo por fissão binária levando ao rompimento da membrana plasmática do macrófago, liberando as amastigotas na circulação sanguínea, que então podem ser fagocitadas por células próximas, perpetuando a infecção (NEVES, 2004). Em um novo repasto sanguíneo, o inseto vetor irá ingerir macrófagos infectados com formas amastigotas. No interior do hospedeiro invertebrado, os macrófagos se rompem liberando as amastigotas e no intestino médio do vetor, estas irão se transformar em promastigotas procíclicas, formas flageladas, porém pouco infectantes para vertebrados (SACKS, 2001). Estas possuem flagelo curto e formato ovoide, com pouca mobilidade, porém se multiplicam ativamente por fissão binária. Neste período, estas se dirigem para o tubo digestivo do vetor, se mantem aderidas, e passam pela metaciclogênese, processo que envolve diversas mudanças morfológicas e fisiológicas, sendo então denominadas promastigotas metacíclicas que serão transmitidas pelo inseto vetor a um novo hospedeiro vertebrado em um próximo repasto sanguíneo (SACKS, 2001; SINGGH *et al.*, 2006; VAN ASSCHE *et al.*, 2011).

Figura 1 - Ciclo de vida dos parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania*.



Fonte: Adaptado de KAYE; SCOOT, 2011.

### 3. 3 TRATAMENTOS

Uma vez que um indivíduo foi infectado com *Leishmania*, poderá apresentar uma das manifestações clínicas da leishmaniose, e então deverá ser rapidamente tratado. Durante décadas, a recomendação para o tratamento da leishmaniose foi igual, independente da manifestação clínica, do agente etiológico ou da região. A partir de 2013 a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) seguindo recomendações da OMS passou a recomendar tratamentos específicos, baseados na manifestação clínica, espécie de parasita e na região (OPAS, 2013). De acordo com as recomendações do Ministério da Saúde (MS) publicado em 2017, ainda permanecendo em uso no Brasil, a terapia de primeira escolha para a LV e para todas

as manifestações clínicas de LC em todas as regiões do país e causadas por todas as espécies de *Leishmanias*, exceto *L. (V.) guyanensis* é o antimoniato de meglumina. Para pacientes que apresentam comorbidade renal, hepática ou cardíaca, gestantes, com idade maior ou igual a 50 anos e portadores do vírus HIV ou doença de Chagas, o fármaco de primeira escolha é Anfotericina B lipossomal. Em casos de falha terapêutica são recomendados como segunda escolha o Desoxicolato de Anfotericina B e Isetionato de Pentamidina. Para casos de leishmaniose tegumentar causados por *L. (V.) guyanensi*, o tratamento de primeira escolha é a Pentamidina, na maioria dos casos (BRASIL, 2017).

Os antimoniais pentavalentes foram introduzidos no tratamento das leishmanioses em 1940 por apresentarem uma menor toxicidade comparada aos antimoniais trivalentes que eram utilizados (RATH *et al.*, 2003). Atualmente, permanecem sendo indicados como primeira linha de tratamento pela OMS para a maioria das formas clínicas de leishmanioses (OMS, 2019). Porém, são requeridas altas doses, apresenta elevada toxicidade, muitas vezes o paciente precisa ser hospitalizado por três a quatro semanas para administração parenteral e apresentam vários efeitos adversos severos (BASTOS *et al.*, 2012). Os efeitos colaterais mais comuns são: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda (BRASIL, 2017). A toxicidade destes fármacos pode promover alterações cardíacas, renais e hepáticas, impossibilitando o uso destes fármacos em pacientes gestantes, portadores do vírus HIV, doença de Chagas, cardiopatias, hepatopatias e nefropatias (BRASIL, 2017; CROFT; COOMBS, 2003).

Acredita-se que a atividade leishmanicida dos antimoniais seja decorrente de seu potencial em interferir no metabolismo energético das formas amastigotas de *Leishmania*, por meio de despolarização da membrana mitocondrial (ACARI; MANZANO; GAMARRO, 2017), inibição da glicólise e da oxidação de ácidos graxos, promovendo assim, uma redução na síntese de ATP (MEDEIROS *et al.*, 2005). Além disso, estes compostos podem provocar alterações nas células do hospedeiro aumentando a produção de EROs e óxido nítrico, favorecendo a eliminação do parasito (BASU *et al.*, 2006; RAIS *et al.*, 2000).

O Desoxicolato de Anfotericina B é um antibiótico antifúngico poliênico que possui excelente atividade leishmanicida extra e intracelular. Na forma clássica, a

Anfotericina B é efetiva contra a forma de LC e LMC, porém apresenta toxicidade elevada, sendo seu uso limitado por suas reações adversas como anafilaxia, trombocitopenia, dor generalizada, convulsões, calafrio, febre, anemia, anorexia, diminuição da função tubular renal e hipocalcemia em um terço dos pacientes (LIMA, 2007, RAY *et al.*, 2020). Assim como os antimoniais, é contraindicada para cardiopatas, hepatopatas e nefropatas. Na década de 90 foram desenvolvidas novas formulações de Anfotericina B incorporadas em lipossomas permitindo uma ação melhorada deste fármaco e redução da toxicidade, porém os efeitos secundários são ainda significativos e os custos de produção elevados (FILIPPIN; SOUZA, 2006; SALEEM *et al.*, 2019). A Anfotericina B possui em seu mecanismo de ação múltiplos alvos, acredita-se que seja capaz de atuar inibindo a biossíntese do ergosterol, promovendo a despolarização da membrana mitocondrial, aumento na produção de EROs e indução da fragmentação do DNA, levando à morte celular por apoptose (BRAGA, 2019).

A Pentamidina foi introduzida na quimioterapia das leishmanioses em 1952 e desde então seu uso é restrito aos pacientes que não respondem aos antimoniais, devido a considerável toxicidade e efeitos adversos como neurotoxicidade, taquicardia e hipoglicemia, entre outros (SINGH *et al.*, 2012). Os mecanismos de ação são pouco conhecidos, mas sabe-se que o fármaco interfere na biossíntese de macromoléculas como DNA, RNA, fosfolípidios e proteínas (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014) e reduz o  $\Delta\Psi$  promovendo o desacoplamento da fosforilação oxidativa (VERCESI, DOCAMPO, 1992).

A Miltefosina é o único fármaco disponível de administração oral para tratamento das LV e LC (CROFT; ENGEL, 2006) e foi originalmente desenvolvido como antitumoral, sendo considerado como terapia de primeira escolha na Índia e na Colômbia (DORLO *et al.*, 2012; FERNÁNDEZ *et al.*, 2014). No Brasil, este fármaco não é utilizado em humanos. A partir de 2016 foi aprovada a comercialização e uso em cães portadores de leishmaniose visceral pela Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 – MAPA/MS.

O mecanismo de ação da Miltefosina está associado à indução de apoptose, distúrbios nas vias de sinalização celular dependente de lipídeos (DORLO *et al.*, 2012) e despolarização da membrana mitocondrial (PINTO-MARTINEZ *et al.*, 2018). Os estudos clínicos realizados demonstraram que os efeitos adversos da Miltefosina para o tratamento da LV são geralmente brandos e toleráveis, sendo representados

principalmente por desconforto gastrointestinal transitório como vômito e diarreia, e aumento dos níveis das transaminases hepáticas e da creatinina (BHATTACHARYA *et al.*, 2007). As principais preocupações para o uso disseminado da Miltefosina incluem o seu potencial teratogênico e sua elevada meia vida (150 - 200 horas), a qual pode facilitar a emergência de parasitas resistentes, devido à permanência de níveis subterapêuticos da droga na corrente sanguínea por algumas semanas após o tratamento (BERMAN, 2005). Além disso, pouco mais de uma década após ter sido introduzida na Índia, estima-se uma falha terapêutica de aproximadamente 20% (RAMESH *et al.*, 2015).

Por fim, considerando a elevada toxicidade dos fármacos atualmente em uso, o desenvolvimento de resistências, recidivas, gravidade clínica e a alta incidência das leishmanioses no mundo, e em especial no Brasil, a busca por novas opções terapêuticas se faz urgente.

### 3.4 ESTRATÉGIAS DE ESTUDO PARA NOVAS TERAPIAS

Segundo Silva-Lopes (2020), a investigação de novas alternativas terapêuticas vem sendo realizada priorizando medicamentos de uso oral, de baixo custo, que não necessitem de internação para tratamento, sendo, portanto, acessíveis a países em desenvolvimento, que são os mais afetados pelas leishmanioses.

As principais abordagens nesta busca são: extração de princípios ativos naturais, encontro ao acaso, triagem empírica, triagem de bibliotecas químicas, reposicionamento de fármacos, associação de fármacos, modificação de compostos já existentes e uso da bioinformática no planejamento de fármacos a partir da estrutura molecular dos alvos biológicos (BERKOWITZ, 2006; BRAGA, 2015; DE LIMA *et al.*, 2018; TEMPONE *et al.*, 2011; VIEGAS-JÚNIOR, 2007).

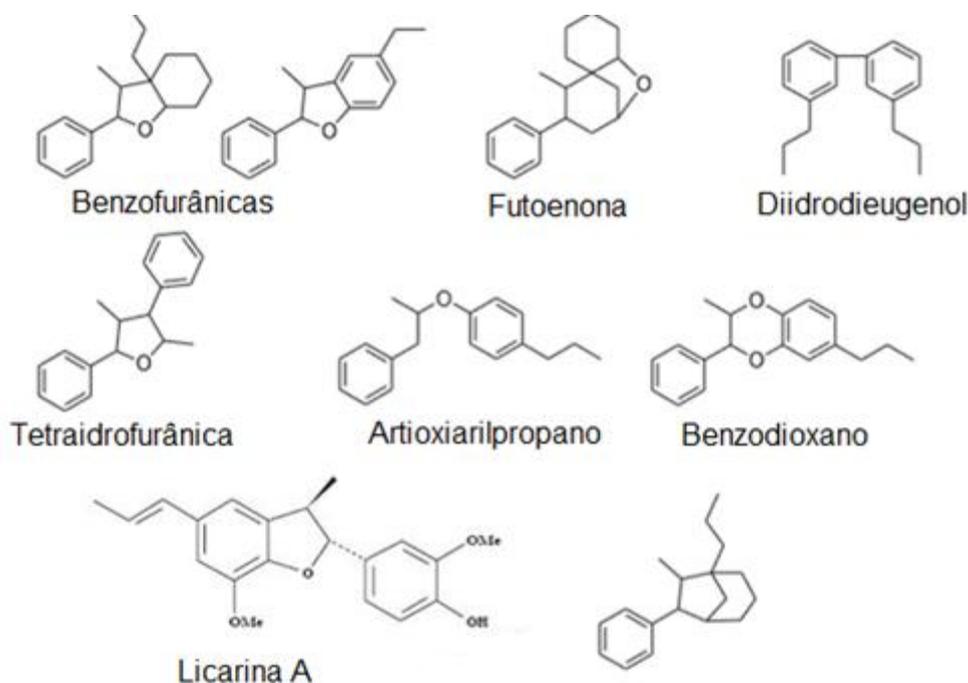
Adicionalmente, diversos compostos de origem natural vêm sendo estudados por apresentarem potencial atividade leishmanicida, entre eles, a Licarina A que é um promissor candidato a novo fármaco, apresentando diversos efeitos biológicos e atividade antiparasitária contra vários agentes patogênicos, inclusive ação leishmanicida contra *L. (L.) major* (CABRAL *et al.*, 2010; CANSINO *et al.*, 2017; GOMES MAHESWARI; GHOSH; SADRAS, 2018; LÉON DIAZ, 2010; MELLETTI *et al.*,

2019; MORIKAWA *et al.*, 2016; NERIS *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2011).

### 3.5 LICARINA A E COMPOSTOS DERIVADOS

Licarina A é uma molécula de origem natural, que faz parte do grupo das neolignananas, substâncias presentes em diversas espécies de vegetais vasculares (BEZERRA *et al.*, 2012). As neolignananas são micromoléculas da classe dos lignoides, os quais assim como as ligninas, são substâncias que apresentam duas unidades de fenilpropano acopladas pelos carbonos 5-5' e em alguns compostos esta ligação entre as duas unidades de fenilpropano pode ser promovida por um átomo de oxigênio (Figura 3) (MOSS, 2000). Na literatura se encontram descritos cerca de 700 lignoides, dos quais 390 são lignanas, 270 neolignananas e 50 outras, abrangendo alolignananas, norlignananas, oligolignoides e heterolignoides (BARBOSA-FILHO, 2004).

Figura 2: Neolignana diidrobenzofurânica.



Fonte: Adaptada de APERS *et al.*, 2003.

As neolignananas são muito estudadas atualmente por apresentarem diversas

atividades biológicas. Entre elas podemos citar o magnolol e o honoquiol isoladas da casca de *Magnolia abovato* e *Magnolia officinalis*, que apresentaram potente atividade anti-inflamatória (WANG *et al.*, 1995), antioxidante (CHAN *et al.*, 1996) e antidepressiva (LO *et al.*, 1994). Além disso, o honoquiol apresenta potente atividade antitumoral e anti-angiogênica (AMBLARD *et al.*, 2006; YOUN *et al.*, 2007). Entre as diversas outras neolignananas de interesse farmacológico, a Licarina A apresenta vários efeitos biológicos entre os quais se destacam a atividade antiparasitária contra *Trypanossoma cruzi* e *Shistosoma mansoni* (CABRAL *et al.*, 2010; MELETI *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2011), além de ter demonstrado uma potente ação leishmanicida (NERIS *et al.*, 2013).

A Licarina A é uma neolignana extraída principalmente de plantas pertencentes às ordens Magnoliales, Laurales e Piperales (BARBOSA-FILHO, 2004). De acordo com a literatura, a síntese da Licarina A é viável, constituindo-se em um processo rápido e simples, características importantes para uma possível comercialização industrial (CHIOCCARA *et al.*, 1993; NASCIMENTO *et al.*, 2000). A síntese da Licarina A é realizada através de acoplamento oxidativo do (E)-isoeugenol, na presença de peroxidase, resultando em uma mistura racêmica de moléculas (+) Licarina A e (-) Licarina A, que posteriormente podem ser isoladas (CHIOCCARA, 1993; NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Paralelamente, a modificação estrutural, também chamada de variação ou manipulação molecular, um método frequentemente utilizado em compostos naturais, muitas vezes resulta em moléculas com maior atividade biológica e menor toxicidade (AVER *et al.*, 2015; CECHINEL-FILHO, 1998). Diversos estudos descrevem resultados promissores relativos à modificação estrutural de compostos naturais com atividade antiparasitária, entre os quais podemos citar como exemplo, um aumento de quatro vezes na atividade esquistossomicida da Licarina A acetilada em relação à Licarina A sem modificação, promovendo a mortalidade total do *Shistosoma mansoni* nas concentrações de 50 e 200  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Segundo o mesmo autor, na avaliação da atividade tripanocida contra as formas tripomastigostas do *T. cruzi*, a substância Licarina A foi mais ativa que seus derivados modificados, apresentando lise parasitária de 58,7 % e valor de  $\text{CI}_{50}$  de 100,8  $\mu\text{M}$ , enquanto seu derivado mais ativo apresentou lise parasitária de 21,1 % e  $\text{CI}_{50}$  de 378,4  $\mu\text{M}$  (MELETI, 2019).

Mesmo sendo a atividade leishmanicida da Licarina A conhecida há alguns anos, estudos da atividade de moléculas derivadas desta substância são escassos

nesses parasitas, como também o conhecimento do mecanismo de ação da Licarina A em *Leishmanias*.

### 3.6 MECANISMO DE AÇÃO

O estudo do mecanismo de ação pode fornecer informações importantes sobre novos alvos bioquímicos possibilitando a produção de moléculas mais eficazes, de menor toxicidade, maior disponibilidade no organismo (BARREIRO; FRAGA, 2005) e ainda sugerir interações medicamentosas e reações adversas (BACKMAN *et al.*, 2016).

Estudos que visam elucidar mecanismos de ação de fármacos podem ser realizados por diversas abordagens. Atualmente, em *Leishmania*, as análises de bioenergética mitocondrial vêm sendo amplamente utilizada por diversos autores (CAO *et al.*, 2019; GEROLDINGER *et al.*, 2018; GIL *et al.*, 2020; KATHURIA *et al.*, 2014, LÓPEZ-ARENCIBIA *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2014; MEINEL, 2019). O grande interesse na atividade mitocondrial se relaciona ao caráter essencial das mitocôndrias na sobrevivência celular em todos os eucariotos, e em especial nas *Leishmanias*, por possuírem apenas uma cópia desta organela (SIMPSON, 1986).

A funcionalidade das mitocôndrias é fortemente dependente do  $\Delta\Psi$ , sendo que este corresponde ao componente elétrico da força próton motriz criada na cadeia respiratória, responsável por manter a fosforilação oxidativa dirigindo a síntese de ATP, controlando os níveis de produção de EROs e a homeostase intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  (BRAND; NICHOLLS, 2011). Em *Leishmania*, perturbações mitocondriais, como aumento de volume, alterações do  $\Delta\Psi$  e liberação de citocromo c, representam os principais sinais do processo de apoptose-like (MEHTA; SHAHA; 2014).

#### 3.6.1 Bioenergética Mitocondrial

As *Leishmanias*, assim como todos os tripanossomatídeos, possuem uma grande e única mitocôndria ramificada que se estende por toda a célula, ocupando

11% do volume celular do parasita, além de possuir um conteúdo de material genético localizado em uma região específica da organela, chamado de cinetoplasto (SIMPSON, 1986).

Os cinetoplastídeos, inclusive no gênero *Leishmania*, diferente dos demais organismos realizam o metabolismo energético em três compartimentos celulares distintos: citosol, glicosomo e mitocôndria (TIELENS; VAN HELLEMOND, 2009).

O glicosomo é uma organela membranosa muito semelhante ao peroxissomo das células animais e exclusivo dos cinetoplastídeos. Esta se encontra intimamente relacionada com o metabolismo energético através da glicólise, embora, possua diversas outras enzimas (OPPERDOES; COOMBS, 2007; PARSON *et al.*, 2001). No glicosomo ocorrem às sete primeiras reações da glicólise, resultando em duas moléculas de 3-fosfoglicerato, o qual é enviado para o citosol, passa pelas três últimas reações da glicólise culminando com a formação de piruvato, e na matriz mitocondrial é oxidado originando o acetil-CoA que reage com o oxalacetato dando início ao ciclo de Krebs; e por fim na cadeia transportadora de elétrons o processo energético é então finalizado (BRINGAUD; RIVIÈRE; COUSTOU, 2006; OPFERDOES; COOMBS, 2007).

A principal fonte de energia para a maioria dos estágios da *Leishmania* nos hospedeiros vertebrados é a glicose, no entanto, os estágios no inseto utilizam aminoácidos como a prolina, porém a via glicolítica é sempre ativa (OPPERDOES; COOMBS, 2007; TIELENS; VAN HELLEMOND, 1998). A ocorrência de metabolismo aeróbico de hidratos de carbono gera como produtos succinato, acetato, alanina, piruvato, lactato e glicerol (OPPERDOES; COOMBS, 2007).

Os processos pelos quais as *Leishmanias* realizam o metabolismo energético apresentam variações entre as formas amastigotas e promastigotas, no entanto, independente das adaptações metabólicas que ocorrem durante o seu ciclo de vida, a mitocôndria permanece como o principal sítio de produção de energia (LIMA, M, 2017; SAUNDERS *et al.*, 2014).

As formas promastigotas quando comparadas com amastigotas, exibem intensa atividade metabólica com altas taxas de consumo de glicose, aminoácidos e secreção de produtos parcialmente metabolizados (SAUNDERS, 2011; SAUNDERS *et al.*, 2014). Já as formas amastigotas possuem como principal fonte de obtenção de energia, a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, entretanto também são capazes de utilizar como fontes de carbono a frutose, manose e glicose (SAUNDERS *et al.*, 2014).

Em ambas as formas evolutivas de *Leishmania*, a mitocôndria é também utilizada para a produção de moléculas essenciais para a sobrevivência (SAUNDERS *et al.*, 2014). As formas promastigotas, através do ciclo de Krebs produzem diversos intermediários anabólicos a partir do succinato, sintetizados no glicosomo que são utilizados em diversas vias, e as formas amastigotas são altamente dependentes da síntese mitocondrial de *novo* de glutamato e glutamina, os quais são utilizados para a produção de glutatona/tripanonina, pirimidinas e amino glicídios essenciais para o crescimento e resposta ao estresse oxidativo no interior dos vacúolos parasitóforos (SAUNDERS *et al.*, 2014).

A cadeia respiratória presente na membrana mitocondrial interna é responsável pela promoção e manutenção do gradiente eletroquímico de prótons, o qual é utilizado na síntese de ATP, embora, a contribuição do complexo I no transporte de elétrons seja muito limitada por estarem ausentes subunidades envolvidas na extrusão de prótons (OPPERDOES, 2008). Nestes organismos, assim como nos demais eucariontes, as reações de oxidação que acontecem no ciclo de Krebs promovem a liberação de prótons e de elétrons presentes nos substratos. Os elétrons são transportados entre os complexos proteicos de II-IV a partir de coenzimas reduzidas (NADH e FADH<sub>2</sub>), fornecendo energia para exportar os prótons para fora da matriz mitocondrial possibilitando a ativação do complexo proteico ATP sintase (OPPERDOES, 2008).

O  $\Delta\Psi$  possui um papel extremamente importante para a manutenção da funcionalidade mitocondrial, onde alterações nesse parâmetro e aumentos na produção de EROs têm sido considerados processos irreversíveis que desencadeiam o colapso mitocondrial e morte celular (MEINEL *et al.*, 2020). Devido à grande importância para a sobrevivência celular, o  $\Delta\Psi$  tem sido amplamente estudado quando se busca elucidar o mecanismo de ação de fármacos ou moléculas candidatas a novos fármacos.

### **3.6.2 Potencial de Membrana Mitocondrial e Funcionalidade da Mitocôndria**

A elucidação dos mecanismos de ação de compostos que apresentam potencial antiparasitário envolve o estudo dos meios pelos quais os compostos

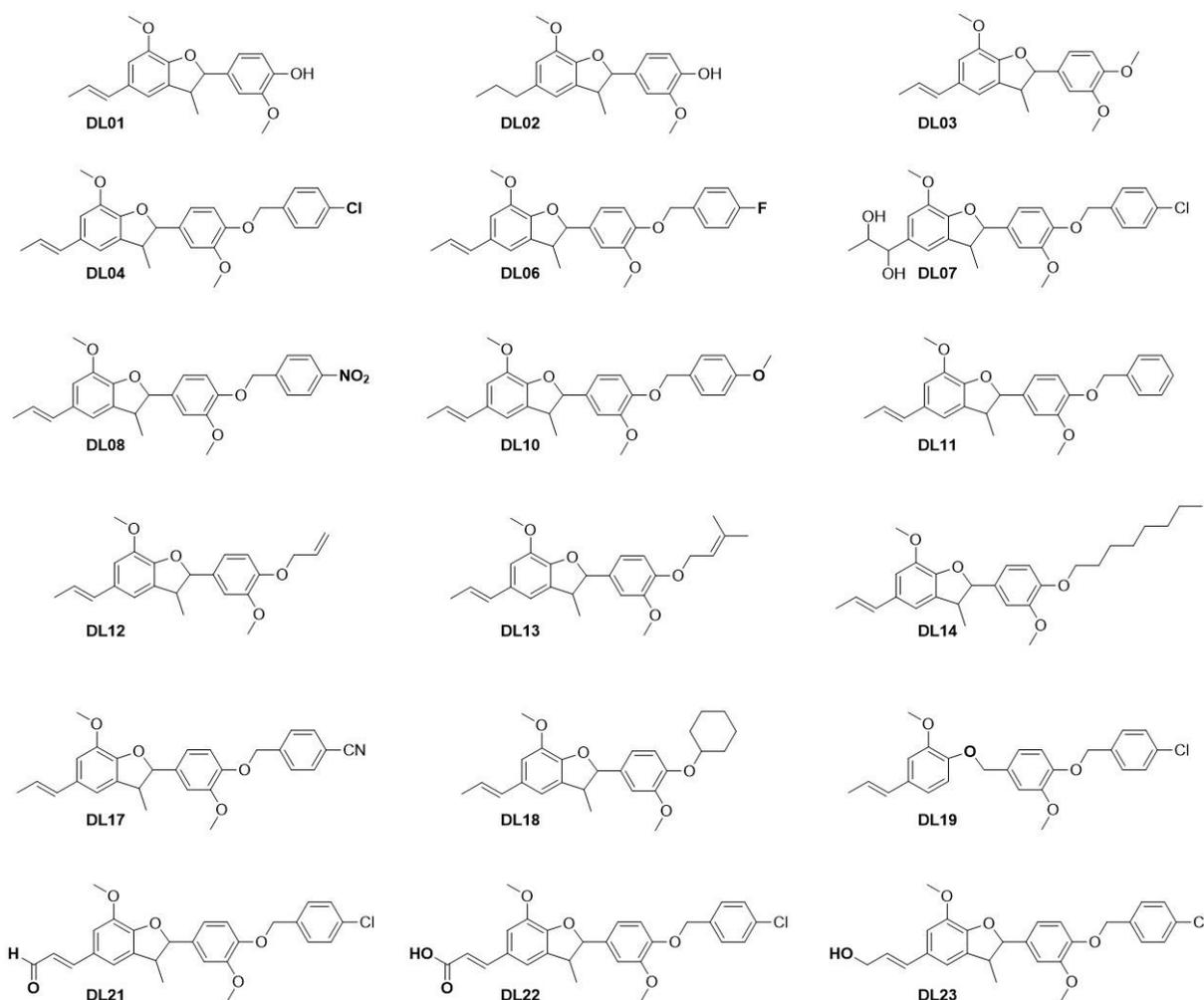
desencadeiam inibição da proliferação celular ou a morte do parasito. Segundo Gottlieb e colaboradores (2003) a redução do  $\Delta\Psi$  promove a liberação de citocromo *c*, que é um evento chave na apoptose pela via mitocondrial. Chowdhury e colaboradores (2018) reportaram atividade antiparasitária do derivado de isobenzofuranona, 3,5-bis (4-clorofenil) -7-hidroxiisobenzofuran1 (3H) -ona (JVPH3) em *T. cruzi*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) donovani*, verificando-se alterações morfológicas em diversas organelas, dentre elas, a mitocôndria, onde foi possível observar o aumento de volume e desorganização das membranas mitocondriais, além de 50% de despolarização em *L. (L.) amazonensis* (CHOWDHURY *et al.*, 2018). De acordo com Shadab e colaboradores (2017) em seus estudos sobre mecanismo de ação da Anfotericina B lipossomal, KalsomeTM10; em *L. (L.) donovani*, foi notado alterações morfológicas, típicas de apoptose, além de dados indicando colapso mitocondrial, evidenciado por redução na concentração de ATP, aumento na produção de EROs e uma despolarização em até 87,3% em relação às células não tratadas (SHADAB *et al.*, 2017). Morais e colaboradores (2020) realizaram um estudo sobre a atividade e o mecanismo de ação da licarina A e uma série de derivados em *T. cruzi*. Durante as análises, observaram aumentos significativos nos níveis de ATP e EROs, além de verificar que, estes compostos induziram um leve aumento do  $\Delta\Psi$  (MORAIS *et al.*, 2020). Oyama e colaboradores (2019) relatam que compostos Pluronic® P-123 e F-127 apresentam uma potente atividade leishmanicida em *L. (L.) amazonensis* e uma baixa toxicidade para macrófagos. Entretanto, não observaram alterações significativas nas análises da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial e do  $\Delta\Psi$  (OYAMA *et al.*, 2019). Tavares e colaboradores (2018) estudaram a atividade leishmanicida do derivado da quinolina, clioquinol (5-chloro-7-iodoquinolin-8-ol) em duas espécies de *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*. Os resultados revelaram nos parasitas tratados, diversas alterações incluindo redução no volume celular, despolarização da membrana mitocondrial, aumento na produção de EROs, redução na concentração de ATP e descontinuidade da membrana plasmática (TAVARES *et al.*, 2018).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OS COMPOSTOS ESTUDADOS

Foi avaliada a atividade anti-*Leishmania* da mistura racêmica da Licarina A (DL01) e de 17 compostos derivados, caracterizados pelas siglas: DL02, DL03, DL04, DL06, DL07, DL08, DL10, DL11, DL12, DL13, DL14, DL16, DL17, DL18, DL19, DL21, DL22 e DL23. Estes foram obtidos em colaboração com pesquisadores do Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar) da UNIFAL-MG, conforme metodologias descritas pelo grupo no estudo de Alvarenga e colaboradores (2020). Brevemente, o composto DL01, substância precursora dos demais derivados, foi obtida por método biossintético, partindo do isoeugenol com o uso de água de coco verde (*Cocos nucifera*). No processo de síntese deste composto, a água de coco é o meio reacional e fonte de peroxidase, que possibilita a oxidação do isoeugenol e sua dimerização em DL01 (BALASUBRAMANIAN, 2013). A obtenção dos derivados eterificados foi realizada através do uso de haletos de interesse (cloreto de prenila, brometo de octila, cloreto de 4-cloro-benzila, carbonato de potássio e dimetilformamida). Foram realizadas, também, modificações na cadeia propenólica da DL01, as quais ocorreram a partir dos derivados previamente eterificados, exceto para o derivado DL02, que, por se tratar de uma redução da dupla ligação, fez-se anteriormente uma reação de hidrogenação catalítica com uso de paládio adsorvido em carvão e hidrogênio gasoso. Para o derivado DL07 foi realizada uma reação de epoxidação seguida da abertura do epóxido com NaOH aquoso, levando à formação do diol de interesse. O derivado DL21 foi obtido a partir de uma reação de oxidação de carbono alílico com DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona), levando a formação do aldeído esperado que, por sua vez, foi oxidado à ácido (DL22) ou reduzido a álcool (DL23).

Figura 3 - Estruturas da Licarina A (DL01) e derivados estudados.



Fonte: Alvarenga et al., 2020.

## 4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 40 camundongos SWISS, com nove semanas de idade, mantidos no Biotério Experimental da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) em ambiente com ventilação, ração e água *ad libitum*, os quais foram utilizados para obtenção de macrófagos peritoneais nos ensaios de citotoxicidade e avaliação da atividade leishmanicida em formas amastigotas. O emprego dos animais na pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - UNIFAL-MG) sob o nº 30/2019 (ANEXO I).

### 4.3 CULTURA DOS PARASITOS

Para o presente estudo foi utilizada a espécie *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269). Os parasitos, na forma promastigota, em fase estacionária da curva de proliferação foram inoculados na pata de camundongos SWISS machos e após 60 dias de infecção, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, a lesão desenvolvida na pata do camundongo foi removida e macerada, para isolamento e expansão dos parasitos. A manutenção dos parasitos foi realizada a 25°C em meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico composto por 50000 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de streptomina. Como o número de passagens (repiques) afetam o fenótipo e a virulência dos parasitos, os experimentos para avaliação da atividade anti-promastigota e anti-amastigota, foram realizados com culturas de até 12° e 5° repiques, respectivamente.

### 4.4 CURVA DE PROLIFERAÇÃO

Promastigotas na 4° passagem (repique) na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL não tratadas foram adicionados em falcons de 15 mL contendo meio LIT e mantidos a 25 °C. Diariamente, uma alíquota foi removida e o número de promastigotas determinado utilizando uma câmara de Neubauer (ARRAIS-SILVA *et al.*, 2005). As contagens foram realizadas em triplicata em três experimentos independentes.

### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-PROMASTIGOTA

Foi realizada pelo método da resazurina para a determinação do potencial inibitório de 50% (CI<sub>50</sub>-promastigota) conforme descrito em Folquitto *et al.*(2017). Este método se baseia na redução da resazurina, de coloração azul e não fluorescente, à resorufin, rosa e fluorescente (O'BRIEN *et al.*, 2000; ROLÓN *et al.*, 2006, GONG *et*

*al.*, 2020). As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na fase *log* da curva de proliferação foram lavadas, contadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada. Posteriormente, os parasitos foram distribuídos em placas de 48 poços em uma concentração final de  $1,0 \times 10^6$  células/mL (volume final de 500  $\mu$ L), onde se adicionou os compostos a serem avaliados nas concentrações de 40; 10; 5 e 0,1  $\mu$ g/mL (solubilizados em dimetil sulfoxido (DMSO) (máximo de 0,6%, v/v em todos os poços), e incubados a 25°C por 72 horas. Após a incubação, foram adicionados aos poços 50  $\mu$ L de resazurina de sódio na concentração de 0,72 mg/mL (10% v,v). Após 6 horas de incubação, as células foram avaliadas em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, duplo-feixe, modelo 2550 a 570 e 600nm, tendo como controle, *Leishmanias* não tratadas. Os valores de densidade óptica obtidos foram convertidos em porcentagem de inibição usando a equação (1) (ROLÓN *et al.*, 2006), e por análise de regressão não linear dos dados foram determinados os CI<sub>50</sub>.

Equação (1):

$$\% \text{ Inibição} = [(A_{LW} - (A_{HW} \times R_o) \text{ células tratadas}) / (A_{LW} - (A_{HW} \times R_o) \text{ controle})] \times 100$$

Onde  $A_{LW}$  e  $A_{HW}$  representam as médias das absorbâncias do menor e do maior comprimento de onda e  $R_o$  representa o fator de correção ( $R_o$  é igual a razão entre  $A_{LW}$  e  $A_{HW}$  para a resazurina em meio de cultura na ausência de células).

Os resultados obtidos foram comparados aos valores obtidos com o fármaco padrão, a Anfotericina B (PEREIRA *et al.*, 2011) e com DL01. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

#### 4.6 ÍNDICE DE SELETIVIDADE

O Índice de Seletividade (IS) é calculado pela razão entre CC<sub>50</sub> e CI<sub>50</sub>. O IS possibilita uma análise da toxicidade relativa dos compostos entre as células dos hospedeiros e dos parasitas, sendo que valores maiores que 1 indicam toxicidade maior para o parasita e menores que 1, para o hospedeiro (TEMPONE *et al.*, 2011). Neste trabalho, foram calculados os valores de IS em relação às formas promastigotas e amastigotas. Os resultados obtidos dos compostos para as formas promastigotas

foram utilizados para selecionar os compostos para os ensaios anti-amastigota e os valores de IS encontrados para as formas amastigotas foram utilizados para selecionar o composto mais promissor para a avaliação do mecanismo de ação, por meio do  $\Delta\Psi$ .

#### 4.7 ATIVIDADE ANTI-PROMASTIGOTA EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO

Os compostos que apresentaram melhores índices de seletividade em relação às formas promastigotas tiveram sua atividade leishmanicida avaliada também nos tempos de 24 e 48 horas, utilizando a metodologia descrita no item 4.5.

#### 4.8 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS

Os macrófagos foram obtidos de camundongos SWISS machos através de lavagem peritoneal com 10 mL de tampão fosfato pH 7,4 (PBS) a 4°C (ARRAIS et al., 2005). Após a coleta, as células foram centrifugadas a 2000 rpm, 4° C por 10 minutos e ressuspendidas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico composto por 50000 UI/mL de penicilina. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS

Os compostos que apresentaram atividade anti-promastigota com concentração inferior à 40 µg/mL tiveram a citotoxicidade avaliada, que foi determinada através do método de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo (MTT). Este ensaio consiste em um teste colorimétrico que quantifica indiretamente as células viáveis, baseado na redução do MTT, um composto de cor

amarela, à formazan, de coloração púrpura, pela atividade da enzima succinato desidrogenase presente nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983). Para realização deste, os macrófagos, após serem coletados através de lavagem peritoneal, como descrito no item 4.8, foram colocados em uma placa de cultura de 96 poços na concentração de  $1,0 \times 10^6$  células/mL e tratados com os compostos na faixa de concentração de 500 a 3,9  $\mu\text{g/mL}$  por 48 horas em estufa  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, foi adicionado em cada poço, 20  $\mu\text{L}$  de MTT na concentração de 5  $\text{mg/mL}$  (10% v/v) e incubados por 4 horas. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e adicionado 100  $\mu\text{L}$  de DMSO em cada poço, seguido por agitação de 15 minutos e leitura realizada em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, duplo-feixe, modelo 2550 à 570 nm para determinação da concentração citotóxica de 50% dos macrófagos ( $\text{CC}_{50}$ ) por comparação ao controle (macrófagos não tratados) (PEREIRA et al., 2011). A densidade óptica obtida foi então convertida à porcentagem de inibição usando a equação (2), e por análise de regressão não linear dos dados, foram determinadas as  $\text{CC}_{50}$  (PEREIRA et al., 2011).

Equação (2):

$$\% \text{Inibição} = \frac{(\text{DO}_{\text{controle}} - \text{DO}_{\text{composto}})}{\text{DO}_{\text{controle}}} \times 100$$

O DMSO foi usado como controle e a Anfotericina B utilizada como fármaco de referência. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

#### 4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-AMASTIGOTA

Para avaliação da atividade leishmanicida em amastigotas, foram utilizados macrófagos peritoneais murinos na concentração de  $5,0 \times 10^5$  células/mL, mantidos em meio RPMI-1640 a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , em placas de 24 poços contendo uma lamínula circular de 13 mm. Após 24 horas, os poços foram lavados com PBS pH 7,4 para remover as células que não aderiram nas lamínulas. Em seguida, os macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na fase estacionária da curva de proliferação na razão de 10:1. Após 24 horas, os poços foram novamente lavados com PBS pH 7,4 para remover promastigotas que não foram

fagocitadas pelos macrófagos e posteriormente foram adicionados os compostos nas concentrações de 40, 10, 5 e 0,1 µg/mL. Após 48 horas de incubação com os compostos, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, as lamínulas foram fixadas com metanol 100% por 5 minutos e coradas com Giemsa (MERCK®) a 10% por 10 minutos para posterior análise por microscopia óptica. Em seguida, 100 macrófagos foram avaliados por lamínula, quanto ao número de macrófagos infectados e número de amastigotas por macrófago. Os resultados foram expressos como CI<sub>50</sub> e concentração inibitória de 90% (CI<sub>90</sub>) das formas amastigotas e calculados a partir do índice de infecção, equação (3) (AGUILERA *et al.*, 2019).

Equação (3):

$$\text{Índice de infecção} = \frac{(\% \text{ de células infectadas} \times \text{amastigotas por macrófago})}{\text{número total de macrófagos analisados}}$$

O fármaco de referência utilizado neste ensaio foi Anfotericina B. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

As concentrações e o período de tempo avaliados são parâmetros padronizados pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Microorganismos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) para triagem de compostos com possível atividade leishmanicida. Uma vez que, já foram realizados, por este laboratório, diversos testes com diferentes compostos e foi observado que compostos que apresentam CI<sub>50</sub> superior a 40 µg/mL não apresentam resultados satisfatórios em experimentos *in vivo*. Adicionalmente, o período de incubação de 72 horas apresenta para a maioria dos compostos avaliados melhores resultados (ESPURI *et al.*, 2019).

#### 4.11 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi$ )

O  $\Delta\Psi$  foi avaliado por fluorimetria utilizando a sonda catiônica JC-10 como descrito por Inacio e colaboradores (2014). Brevemente, promastigotas (10<sup>6</sup> células/mL) tratadas ou não (controle) com os compostos selecionados nas concentrações iguais ao CI<sub>50</sub> para promastigotas por 48 horas. Em seguida, a concentração dos parasitos foi ajustada em 10<sup>7</sup> cel/mL e incubadas com a sonda JC-

10 na concentração de 10 mg/mL em tampão fosfato pH7,4 por 30 minutos a 25°C. Após este período, as promastigotas foram lavadas três vezes através de centrifugação à 3000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em tampão fosfato pH 7,4 e analisadas em espectrofluorímetro (*Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer*®) com comprimentos de onda de excitação a 530 nm e 590 nm e de emissão, 480 nm. A razão dos valores obtidos em 530 nm e 590 nm foi utilizada para determinar o  $\Delta\Psi$ .

#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

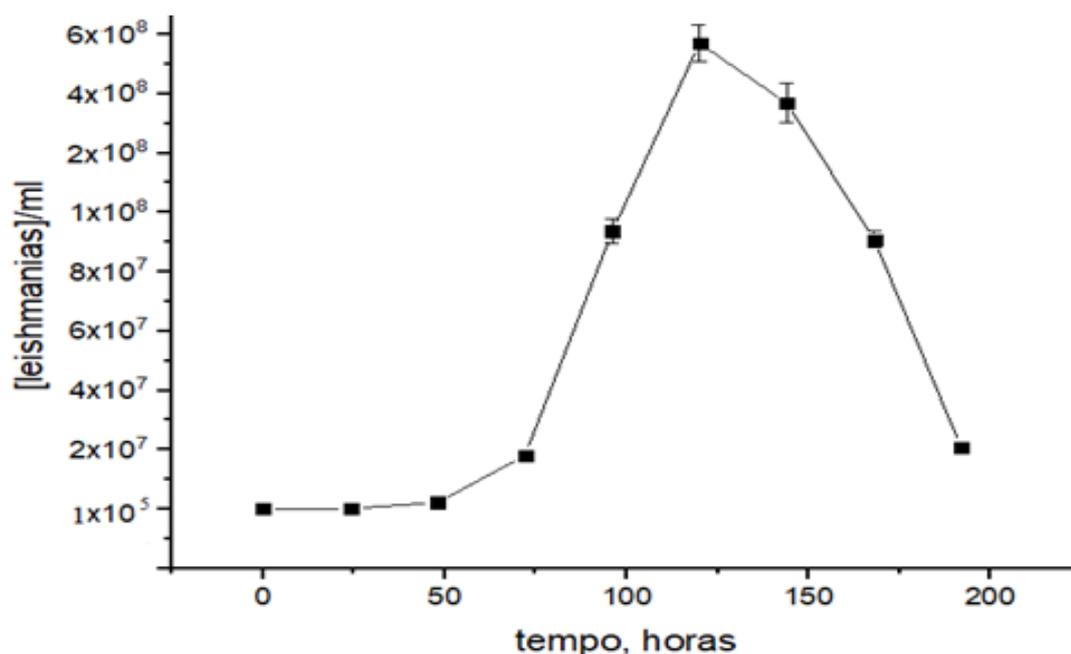
Os dados obtidos foram expressos por média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. Os valores de  $CI_{50}$ -promastigota,  $CI_{50}$ -amastigota,  $CI_{90}$ -amastigota e  $CC_{50}$  encontrados para os compostos derivados testados foram comparados ao fármaco de referência e a DL01 através de análise de variância (ANOVA) seguida pela análise do teste de Tukey, com o software Bioestat 5.0 onde  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CULTIVO E CURVA DE PROLIFERAÇÃO

A curva de proliferação obtida para *L. (L.) amazonensis* (Figura 5) demonstrou que nas primeiras 48 horas os parasitas se encontram em fase *lag*; em seguida entram na fase *log* permanecendo até cerca de 120 horas; e posteriormente atingem a fase estacionária na qual permanecem por um curto período de tempo. Após aproximadamente 144 horas do repique, as formas promastigotas se encontram em fase de declínio ou morte.

Figura 5 - Curva de proliferação das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: O número dos parasitas em cultura foi estimado diariamente por meio de contagem em câmara de Neubauer. Fase *lag* (0-48h), *log* (48-120 h), estacionária (120-144h).

Uma vez definida a curva de proliferação, parasitas na fase *log* foram empregados para os ensaios anti-promastigota.

## 5.2 ATIVIDADE ANTI-PROMASTIGOTA

Com relação à atividade anti-promastigota, DL01 e 12 de seus compostos derivados apresentaram ação leishmanicida com  $CI_{50}$ -promastigota inferior a 40  $\mu\text{g/mL}$ . Destes, o de maior destaque foi o DL21, com valor de  $CI_{50}$  estatisticamente menor que o fármaco de referência, Anfotericina B. Todos os compostos que apresentaram atividade leishmanicida foram considerados estatisticamente iguais entre si e iguais ao DL01, com exceção do composto DL21 que demonstrou uma atividade 12,7 vezes maior que DL01(Tabela 1).

Tabela 1 - Avaliação da atividade anti-promastigota da DL01 e compostos derivados com 72 horas de incubação.

Composto	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL} \pm$ desvio padrão)
DL01	31,45 $\pm$ 1,06
DL02	31,50 $\pm$ 1,13
DL03	25,53 $\pm$ 0,21
DL04	> 40,00
DL06	> 40,00
DL07	33,65 $\pm$ 0,31
DL08	> 40,00
DL10	38,70 $\pm$ 0,90
DL11	> 40,00
DL12	30,12 $\pm$ 0,53
DL13	31,72 $\pm$ 0,07
DL14	29,91 $\pm$ 0,22
DL17	37,80 $\pm$ 0,23
DL18	32,82 $\pm$ 0,32
DL19	> 40,00
DL21	2,45 $\pm$ 0,21*
DL22	35,62 $\pm$ 1,09
DL23	29,70 $\pm$ 0,05
Anfotericina B	4,72 $\pm$ 0,56 *

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Cada valor de  $CI_{50}$  representa a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. Como avaliação estatística, foram realizados a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey utilizando o software Bioestat 5.0. \*Os valores marcados com asterisco diferem estatisticamente entre si e de todos dos demais ( $p < 0.05$ ).  $CI_{50}$ : concentração inibitória de 50% das formas promastigotas determinado com 72 horas de incubação. DL01: Licarina A.

Todos os compostos que apresentaram valores de  $CI_{50}$ -promastigota menores que 40  $\mu\text{g/mL}$  tiveram sua citotoxicidade avaliada em macrófagos peritoneais murinos.

### 5.3 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS

A avaliação da citotoxicidade de compostos candidatos a fármacos com potencial leishmanicida são de grande importância, pois as formas amastigotas do parasita são encontradas no interior dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, podemos observar que de todos os compostos testados, apenas DL03, DL10 e DL17 foram considerados estatisticamente menos tóxicos que DL01. Entre estes, os compostos DL10 e DL17 se destacaram apresentando uma toxicidade de cerca de 4 vezes menor do que o fármaco de referência, Anfotericina B.

Tabela 2 - Avaliação da citotoxicidade da DL01 e compostos derivados em macrófagos peritoneais murinos com 48 horas de incubação.

Composto	CC <sub>50</sub> (µg/mL ± desvio padrão)
DL01	38,50 ± 3,00
DL02	15,65 ± 1,55
DL03	50,85 ± 5,65
DL07	18,30 ± 1,8
DL10	109,17 ± 3,52
DL12	25,35 ± 2,10 **
DL13	30,25 ± 1,80 **
DL14	37,15 ± 0,75 *
DL17	112,10 ± 8,65
DL18	10,25 ± 0,3
DL21	18,50 ± 1,7 **
DL22	26,05 ± 2,45 **
DL23	29,05 ± 4,95 **
Anfotericina B	25,00 ± 1,04 **

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Os valores de CC<sub>50</sub> representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada com o software Bioestat 5.0. As diferenças entre os valores de CC<sub>50</sub> obtido para os compostos foram considerados significativos estatisticamente quando  $p < 0.05$ . \*Indica que os valores obtidos para os compostos são estatisticamente iguais e ao obtido para a Licarina A. \*\*Indica que os valores obtidos para os compostos são considerados estatisticamente iguais a Anfotericina B. DL01: Licarina A.

A partir dos valores de CI<sub>50-promastigota</sub> e CC<sub>50</sub> foi possível definir o IS e assim, selecionar os compostos derivados DL03, DL10, DL17 e DL21, com IS de 1,9; 2,8; 2,9 e 7,5, respectivamente. DL01 prosseguiu nos experimentos como um controle, por se tratar do protótipo de origem das demais moléculas.

A seleção dos compostos para as próximas etapas da pesquisa foi realizada

através da análise do IS apresentado na Tabela 3. Este índice é calculado pela razão entre a concentração citotóxica para 50% dos macrófagos (CC<sub>50</sub>) e a concentração inibitória de 50% dos parasitas (CI<sub>50</sub>-promastigota).

Tabela 3 - Índice de seletividade (IS) em relação às formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

Composto	IS
DL01	1,22
DL02	0,49
DL03	1,90
DL07	0,54
DL10	2,82
DL12	0,83
DL13	0,95
DL14	1,24
DL17	2,96
DL18	0,31
DL21	7,55
DL22	0,73
DL23	0,97
Anfotericina B	5,29

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Índice de seletividade (IS) foi calculado através da razão dos valores obtidos de CC<sub>50</sub> para os macrófagos peritoneais murinos e o CI<sub>50</sub> obtido para as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. DL01: Licarina A.

#### 5.4 ATIVIDADE ANTI-PROMASTIGOTA EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO

A avaliação da atividade de compostos com atividade antiparasitária em diferentes períodos pode fornecer informações relevantes quanto à atividade dos compostos em análise. Isso se justifica pelo fato de que dependendo da via metabólica envolvida no mecanismo de ação de um determinado composto, os efeitos poderão se apresentar por meio de uma resposta rápida ou lenta. Neste sentido, incubação por diferentes períodos pode ajudar a determinar a efetividade dos compostos e o tempo necessário para a atividade máxima.

Uma vez que o mecanismo de ação dos compostos aqui estudados não foi ainda estabelecido, a atividades dos mesmos foi avaliada em diferentes períodos de incubação (24, 48 e 72 horas) (Tabela 4).

Tabela 4 - Avaliação anti-promastigota em diferentes tempos de incubação.

Composto	CI <sub>50</sub> (µg/mL) 24 horas	CI <sub>50</sub> (µg/mL) 48 horas	CI <sub>50</sub> (µg/mL) 72 horas
DL01	29,78 ± 0,33	28,35 ± 0,65 *	31,17 ± 0,73
DL03	36,59 ± 1,89 *	29,83 ± 0,84	28,00 ± 1,50
DL10	33,43 ± 2,55 **	37,61 ± 1,14 **	38,70 ± 0,90 **
DL17	29,27 ± 0,88 *	33,95 ± 2,92	37,43 ± 1,05
DL21	2,38 ± 0,44 **	2,18 ± 0,13 **	2,45 ± 0,21**

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Foram realizados três experimentos independentes em duplicata. \* Apresenta valores de CI<sub>50</sub> diferentes estatisticamente em relação aos demais tempos de incubação para o composto. \*\* Não apresentam diferenças significativas em nenhum dos tempos analisados ( $p < 0,05$ ).

DL01: Licarina A.

A análise estatística dos dados apresentados na Tabela 4 nos permite concluir que para o composto DL01, apenas o tempo de 48 horas difere dos demais ( $p < 0,001$ ), enquanto que para o composto DL03 apenas o tempo de 24 horas difere estatisticamente dos demais ( $p < 0,001$ ), para o composto DL10 todos os tempos são estatisticamente iguais ( $p = 0,144$ ); para o composto DL17 os tempos 48 e 72 horas são estatisticamente iguais, porém diferentes do tempo de 24 horas ( $p < 0,001$ ) e para o composto DL21 todos os tempos são estatisticamente iguais ( $p = 0,166$ ).

No entanto, de acordo com análise estatística, foi possível observar que DL01 foi mais ativo contra as formas promastigotas com 48 horas de incubação. Já o composto DL17 apresentou uma melhor atividade com 24 horas de incubação e o composto DL03 mostrou-se mais potente com 48 e 72 horas de incubação. Além disso, em relação aos dados de CI<sub>50</sub> dos compostos DL10 e DL21 estabelecidos, é possível notar que o tempo de incubação não influenciou no aumento ou diminuição de suas atividades.

Quanto menores os valores de CI<sub>50-promastigota</sub>, maior a atividade antiparasitária dos compostos. Portanto, o período de 48 horas de incubação foi selecionado para a avaliação leishmanicida nas formas amastigota e mecanismo de ação.

## 5.5 ATIVIDADE ANTI-AMASTIGOTA

Entre as etapas de triagem de compostos candidatos a novos fármacos com ação leishmanicida, a realização de ensaios de atividade em formas amastigotas é considerada uma das mais importantes, já que estão presentes em células dos hospedeiros vertebrados, principalmente em macrófagos. O composto DL01 e os derivados DL03, DL10 e DL17 foram analisados nas concentrações de 0,1; 5,0; 10 e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e o composto DL21 em virtude de sua toxicidade ( $\text{CC}_{50} = 18,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi avaliado em concentrações menores, 0,1; 1; 5,0 e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , com 48 horas de incubação. Os resultados foram expressos em percentual de macrófagos infectados (tabela 5), número de amastigotas por macrófago infectado (tabela 6) e concentração inibitória de 50 e 90% ( $\text{CI}_{50}$  e  $\text{CI}_{90}$ ) (tabela 7).

Podemos observar na Tabela 5 que DL01 reduziu de forma significativa o percentual de macrófagos infectados a partir da concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , enquanto que com o composto DL03 só foi possível observar redução significativa com concentração superior a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os compostos DL10 e DL17 não apresentaram redução significativa no percentual de macrófagos infectados na máxima concentração empregada, 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Já o composto DL21 apresentou redução significativa em todas as concentrações avaliadas.

Tabela 5 - Porcentagem de macrófagos infectados com *L. (L) amazonensis* tratados com DL01 e compostos derivados.

Percentual de Macrófagos infectados (%)					
Concentração ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Compostos				
	DL01	DL03	DL10	DL17	DL21
40	0	24,7	100 *	98,0 *	-
10	76,0	94,5	-	-	0
5	95,5	100,0 *	-	-	34,7
1	-	-	-	-	53,1
0,1	100 *	98,5 *	-	-	78,4
Controle	99,6	-	-	-	-

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Foram realizados três experimentos independentes em duplicata. \* Indica que os valores obtidos para os compostos são estatisticamente iguais ao obtido para o controle. Controle: Macrófagos infectados e não tratados. A análise estatística foi realizada com o software Bioestat 5.0. As diferenças entre os valores obtidos para os compostos foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

No que tange a relação entre o número de amastigotas por macrófago infectado, foi possível observar que DL01 e DL21 promoveram redução significativa da carga parasitária em todas as concentrações avaliadas, enquanto que DL03 a partir

de 5 µg/mL. Ainda, DL10 foi considerado estatisticamente igual ao controle não tratado e DL17 apresentou uma redução de 13,9% na máxima concentração avaliada, também em relação ao controle (Tabela 6).

Tabela 6 - Número médio de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* por macrófagos infectados tratados com DL01 e compostos derivados.

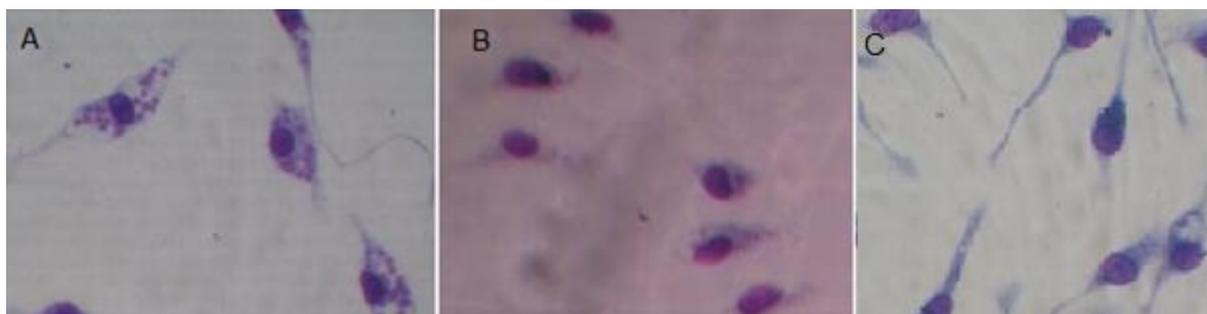
Relação de amastigotas/macrófagos infectado					
Concentração (µg/mL)	Compostos				
	DL01	DL03	DL10	DL17	DL21
40	0	2,50	13,52 *	12,01	-
10	4,11	9,65	-	-	0
5	7,20	12,00	-	-	1,1
1	-	-	-	-	3,5
0,1	12,45	13,26 *	-	-	5,12
Controle	14,42 *	-	-	-	-

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Foram realizados três experimentos independentes em duplicata \* Indica que os valores obtidos para os compostos são estatisticamente iguais ao obtido para o controle. Controle: Macrófagos infectados e não tratados. A análise estatística foi realizada com o software Bioestat 5.0. As diferenças entre os valores obtidos para os compostos foram consideradas significativas estatisticamente quando  $p < 0.05$ .

Na Figura 6 estão apresentadas as imagens representativas dos macrófagos infectados não tratados (controle) e tratados com DL01 e DL21. Podemos observar um grande número de amastigotas no grupo controle (Figura 6 A) demonstrando que a infecção dos macrófagos pelas leishmanias foi dentro do esperado. Em relação a atividade leishmanicida dos compostos estudados frente as formas amastigotas, podemos observar que, a DL01, na concentração de 5 µg/mL, concentração próxima ao  $CI_{50}$ , promoveu uma redução bastante significativa no número de amastigotas por macrófago (Figura 6 B). Adicionalmente, os macrófagos infectados e tratados com o composto DL21 na concentração de 1 µg/mL, concentração próxima ao  $IC_{90}$ , eliminou quase que completamente as amastigotas (Figura 6 C).

Figura 6 - Imagens representativas das lâminas contendo macrófagos infectados tratados com DL01 e DL21.



Legenda - A) Macrófagos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* não tratados (controle negativo);  
 B) Macrófagos infectados tratados com a DL01 (5 µg/mL);  
 C) Macrófagos infectados tratados com DL21 (1 µg/mL);

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: As lamínulas foram coradas com Giemsa e analisadas em microscópio óptico, aumento final de 1000x.

DL01: Licarina A.

Ainda com relação aos efeitos dos compostos testados sobre as formas amastigotas, a Tabela 7 apresenta os resultados de  $CI_{50}$ ,  $CI_{90}$  e o IS. A análise dos dados indica que DL01, DL03 e DL21 apresentaram atividade leishmanicida significativa frente às formas amastigotas, com valores de  $CI_{50}$  de 5,25, 18,05 e 0,45 µg/mL, respectivamente. A atividade anti-amastigota demonstrada pelo composto DL21 foi considerada 11,6 vezes maior que a DL01 e 2,6 maior que o fármaco de referência, Anfotericina B.

Tabela 7 - Concentração inibitória de 50 e de 90% das formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* com o composto DL01 e derivados, e IS em relação ao  $CI_{50}$ .

Composto	$CI_{50}$ (µg/mL)	$CI_{90}$ (µg/mL)	IS
DL01	5,25 ± 0,35	12,52 ± 0,55	7,3
DL03	18,05 ± 1,05	28,5 ± 1,95	2,7
DL10	>40,00	-	-
DL17	>40,00	-	-
DL21	0,45 ± 0,07	1,14 ± 0,2	41,1
Anfotericina B	1,17 ± 0,08	>2,00	21,4

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Foram realizados três experimentos independentes em duplicata. Todos os valores diferem estatisticamente entre si e da Anfotericina B. Os valores referentes ao Índice de Seletividade (IS) foram calculados através da razão entre a concentração citotóxica para 50% dos macrófagos peritoneais murinos e os valores da concentração inibitória de 50% das formas amastigotas, ambas com 48 horas de incubação com os compostos.

DL01: Licarina A.

O IS apresentado pelo composto DL21 (41,1) indica uma seletividade 5,7 vezes

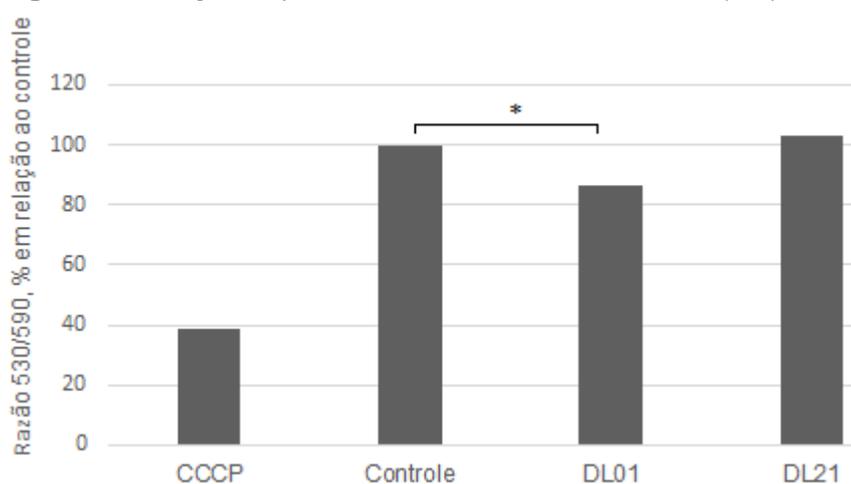
maior que o composto de origem e 1,9 vez maior que o fármaco de referência, Anfotericina B, sugerindo assim, que este composto é um promissor candidato a fármaco leishmanicida. Desse modo, o composto DL21 foi selecionado para a continuidade dos estudos, visando à elucidação do mecanismo de ação.

Adicionalmente, o mecanismo de ação da DL01 também foi avaliado, já que, apesar da sua reconhecida atividade anti-promastigota e anti-amastigota em *L. (L.) major* (NERIS et al., 2013) não havia estudos relativos ao seu mecanismo de ação, e ainda de modo específico em *L. (L.) amazonensis*.

## 5.6 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi$ )

A funcionalidade mitocondrial foi avaliada através da análise do  $\Delta\Psi$  nas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na fase *log* da curva de proliferação tratadas ou não (controle) com valores de concentrações iguais ao  $CI_{50}$ -promastigota. Em relação ao controle, DL01 provocou uma redução de 13,5% no  $\Delta\Psi$ , enquanto que o tratamento com o composto DL21 não provocou alteração significativa comparada ao controle (Figura 7).

Figura 7- Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ).



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* ( $1 \times 10^7$  cels/mL) na fase *log* da curva de proliferação foram tratadas ou não (controle) e incubadas por 48 horas com Licarina A (DL01) e DL21. Os valores são expressos pela razão da fluorescência a 530nm e 590nm. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata. \*Significativamente diferentes ( $p < 0.01$ ).

## 6 DISCUSSÃO

A pesquisa por novos agentes terapêuticos tem como principal objetivo a obtenção de compostos que apresentem alta seletividade de ligação com seu alvo farmacológico, seja tóxico para o parasito, porém não cause danos às células humanas hospedeiras. Paralelamente, todos os fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose, apresentam uma elevada toxicidade, inúmeros efeitos colaterais severos, índices de resistência elevados e diversos casos de recidiva (DA LUZ, *et al.*, 2015; LIRA *et al.*, 1999; SILVA-LOPES, 2010).

Atualmente, o estudo de compostos de origem natural e derivados tem se mostrado como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos fármacos em diversas patologias, inclusive parasitárias (GREEG; NEWMAN, 2020). A Licarina A apresenta várias propriedades farmacológicas importantes, entre elas a atividade contra *Mycobacteria* resistente a multidrogas (LEÓN-DÍAZ *et al.*, 2010), efeito citotóxico e antiproliferativo sobre linhagens celulares de câncer humano (LEE *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2004), efeito esquistomicida (PEREIRA *et al.*, 2011), atividade triponocida (CABRAL *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2011) e leishmanicida em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) major* (NÉRIS *et al.*, 2013). No entanto, a atividade leishmanicida tem sido pouco explorada em outras espécies de *Leishmania*, bem como seu mecanismo de ação. A partir dessa perspectiva, esta pesquisa teve como um de seus focos, a avaliação da atividade antiparasitária da Licarina A (DL01) e seus 17 derivados em *L. (L.) amazonensis*.

O estudo *in vitro* com *Leishmanias* envolve a realização da curva de proliferação com as formas promastigotas, estabelecendo assim as fases *lag*, *log* e estacionária. Os dados obtidos com o crescimento dos parasitos em meio de cultura mostram diferenças significativas entre as diferentes fases, justificando a necessidade de defini-las para a realização de cada experimento. Essa definição das fases da curva é importante já que as mesmas possuem diferenças bioquímicas como disponibilidade de substratos, suplementação, bem como metabólitos secretados pelos parasitas. Ao mesmo tempo, frente a essas alterações ao longo da curva, os parasitas sofrem algumas alterações. Segundo Nikolaev e Sizova (2011), modificações bioquímicas são observadas na molécula de lipofosfoglicano que recobre a membrana externa do parasito, e sua morfologia, onde os parasitos em fase *log* da curva apresentam o corpo

celular grande, com flagelo curto e maior proliferação celular; já na fase estacionária, os parasitos apresentam diminuição do corpo celular e redução do comprimento do flagelo, além de ser a fase mais infectante (NIKOLAEV; SIZOVA, 2011; VAN ASSCHE *et al.*, 2011). Neste contexto, utiliza-se parasitos em fase *log* para a realização de ensaios anti-promastigota e parasitos em fase estacionária para a infecção de macrófagos peritoniais murinos em ensaios anti-amastigota. Além disso, em *Leishmania*, o número de passagens (repiques) também apresenta uma grande relevância para a realização de experimentos. Sendo que, sucessivas passagens causam perturbações durante o desenvolvimento dos parasitos, afetando a expressão de diversas proteínas, além da capacidade proliferativa e as propriedades de virulência (BEETHHAM *et al.*, 1997; LEI *et al.*, 2010; SARAIVA *et al.*, 1995; SINHA *et al.*, 2018; WILSON *et al.*, 1989). A curva de proliferação obtida durante a realização deste trabalho (Figura 5) apresentou dados semelhantes aos encontrados na literatura, identificando a fase *log* até o 5º dia de cultivo após o repique (CAMPOS *et al.*, 2008; INACIO *et al.*, 2012; PASSOS, 2004).

As triagens de compostos com potencial leishmanicida são iniciadas por estudos *in vitro* em ambas as formas evolutivas do parasito (BEZERRA *et al.*, 2006; ESPURI *et al.*, 2019). Assim, a DL01 e os compostos derivados foram avaliados frente à atividade anti-promastigota de *L. (L.) amazonensis*. Os resultados obtidos desta avaliação demonstraram que entre todos compostos derivados estudados, apenas DL21 (CI<sub>50</sub> = 2,45 µg/mL) apresentou uma atividade leishmanicida superior a DL01 (CI<sub>50</sub> = 31,45 µg/mL) e ao fármaco de referência, a Anfotericina B (CI<sub>50</sub> = 4,72 µg/mL). O efeito da DL01 e de DL21 em *L. (L.) amazonensis* se mostraram dependentes da dose, mas independentes do tempo de incubação, como foi apresentado na Tabela 4.

Os dados encontrados na literatura, relacionados às atividades antiparasitárias e citotoxicidade da Licarina A em tripanossomatídeos, apresentam divergências entre si (LÉON DIAZ *et al.*, 2010; MORAIS *et al.*, 2020; NÉRIS *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2011) e com os resultados encontrados no presente estudo. Vale ressaltar, que a Licarina A é um composto orgânico que possui em sua estrutura dois centros quirais, portanto apresenta diferentes formas enantioméricas. Paralelamente, as propriedades biológicas apresentam estereosseletividade, o que faz com que compostos quirais apresentem propriedades bioquímicas, farmacológicas e fisiológicas distintas, inclusive de citotoxicidade (CALDEWELL, 1995; RIBEIRO *et al.*, 2016). Adicionalmente, as espécies de tripanossomatídeos avaliadas nos diferentes trabalhos são distintas,

assim como os meios de cultivo utilizados, períodos de tratamento e métodos de análise. Estudos prévios relataram atividade leishmanicida da (-) Licarina A em formas promastigotas da espécie *L. (L.) major* ( $CI_{50} = 10,59 \mu\text{g/mL}$ ) (NÉRIS *et al.*, 2013), ação tripanocida da (-) Licarina A em formas tripomastigotas de *T. cruzi* ( $CI_{50} = 7,49 \mu\text{g/mL}$ ) (PEREIRA *et al.*, 2011), atividade tripanocida da Licarina A, forma enantiomérica não identificada, nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* ( $CI_{50} = 150,8$  e  $312,96 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente) (CABRAL *et al.*, 2010). De acordo com os dados encontrados na literatura e do presente trabalho, observa-se que os compostos estudados, destacando a DL01 e DL21 apresentam-se grande atividade contra as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, sendo importante a realização de experimentos como citotoxicidade para observar se estes não provocam danos às células de mamíferos.

Uma das abordagens de grande relevância nos estudos são a determinação da atividade e a segurança dos compostos, os quais são considerados essenciais para o desenvolvimento de novos fármacos, sendo realizados em estágios iniciais das pesquisas (LI *et al.*, 2018). O equilíbrio entre as propriedades farmacológicas e a citotoxicidade se relacionam diretamente à aplicabilidade de um agente terapêutico (MELO *et al.*, 2000).

A importância do ensaio de toxicidade se dá principalmente pelo fato da necessidade do composto a ser testado ser pouco tóxico para células de mamíferos, já que formas amastigotas de *Leishmania* estão contidas em seu interior. Sendo assim, os compostos precisam atravessar membranas celulares para atingir o alvo (formas amastigotas) sem danificar a célula em que está presente (PEREIRA *et al.*, 2011). Nesta pesquisa, a DL01 e todos os compostos derivados que apresentaram atividade leishmanicida, bem como o fármaco de referência, foram avaliados quanto a citotoxicidade *in vitro* em macrófagos peritoneais murinos pelo método colorimétrico do MTT.

Os dados obtidos para citotoxicidade da DL01 mostrou  $CC_{50}$  igual a  $38,5 \mu\text{g/mL}$ . Assim como a atividade leishmanicida em promastigotas apresentaram divergências em relação aos dados encontrados na literatura, dados de citotoxicidades também mostraram-se diferentes. Entretanto, é importante destacar que, embora todos os trabalhos tenham sido realizados com um mesmo tipo celular e meio de cultura, macrófagos peritoneais murinos e meio RPMI; os períodos de tratamento e as formas enantioméricas da Licarina A utilizadas foram distintas. Nérís e colaboradores (2013),

analisaram a citotoxicidade da (-) Licarina A após 24 horas de tratamento por dois métodos distintos, MTT e exclusão por azul de tripan, obtendo valores distintos de  $CC_{50}$  (729,80  $\mu\text{g/mL}$  e 308,96  $\mu\text{g/mL}$  (NÉRIS *et al.*, 2013). Léon-Díaz e colaboradores avaliaram a citotoxicidade da Licarina A isolada de raízes da planta *Aristolochia taliscana* por um período de 48 horas através do método de exclusão por azul de tripan encontrando um valor de  $CC_{50}$  igual a 312  $\mu\text{g/mL}$  (LÉON-DÍAZ *et al.*, 2010). Adicionalmente, estudos mostram que compostos derivados ou análogos de Licarina A exibem uma menor toxicidade em células de mamíferos, apresentando  $CC_{50}$  maiores que 65,2  $\mu\text{g/mL}$  e menor toxicidade comparado ao fármaco de referência (MORAIS *et al.*, 2020).

Vale ressaltar que, o presente trabalho abordou estudos referente a mistura racêmica de DL01, verificando-se uma toxicidade maior que os resultados apresentados na literatura, que utilizam formas enantioméricas isoladas da Licarina A e com diferentes períodos de tratamento, justificando assim, sua maior toxicidade. Apesar dos resultados de citotoxicidade da DL01 apresentarem mais tóxicos dos demais trabalhos, nota-se que este se configurou com uma diferença estatística, ou seja, menos tóxico quando se compara ao fármaco de referência, despertando o interesse para os seguintes estudos.

Os dados de  $CC_{50}$  obtidos para DL01 e demais compostos que apresentaram atividade leishmanicida contra formas promastigotas foram utilizados para calcular os valores de IS. Considerando este parâmetro, o composto DL21 se destacou apresentando um IS superior a DL01 e ao fármaco de referência, a Anfotericina B (Tabela 3).

Como já mencionado, as *Leishmanias* são organismos que apresentam duas formas evolutivas, uma dessas é a amastigota, forma intracelular, encontrada nos hospedeiros vertebrados. O fato das diferentes formas de *Leishmania* apresentarem diferenças metabólicas significativas, devido às adaptações ambientais, como osmolaridade, pH, disponibilidade nutricional, temperatura, presença de espécies oxidativas e da resposta imunológica do hospedeiro vertebrado, torna essencial a análise da atividade de compostos candidatos a fármacos nas formas amastigotas (REQUENA, 2012; STEVERDING, 2017). Assim, a atividade da DL01 e derivados mais promissores foram avaliados nas formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* contidas em macrófagos peritoneais murinos, que é considerado um dos modelos mais precisos para este ensaio, exibindo resultados altamente reprodutíveis

e elevada taxa de infecção (TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINK, 2011). Tais parâmetros são necessários para uma análise apropriada da atividade leishmanicida.

Os resultados da avaliação anti-amastigota mostraram que em relação à quantificação da carga parasitária intracelular, DL01 e compostos derivados, assim como a Anfotericina B, foram capazes de reduzir o parasitismo intracelular *in vitro* no modelo de infecção por *L. (L.) amazonensis*. Entre as moléculas estudadas, a que apresentou melhor atividade leishmanicida contra as formas amastigotas foi o composto DL21 ( $CI_{50} = 0,45 \mu\text{g/mL}$ ), comparados a DL01 ( $IC_{50} = 5,25 \mu\text{g/mL}$ ) e Anfotericina B ( $CI_{50} = 1,17 \mu\text{g/mL}$ ). Em relação à atividade leishmanicida da DL01 em formas amastigotas de *Leishmanias*, o resultado obtido no presente estudo foi muito similar ao encontrado por Nérís e colaboradores (2013) ( $CI_{50} = 4,7 \mu\text{g/mL}$ ), mesmo trabalhando com diferentes formas enantioméricas do composto, períodos de tratamento e espécies de *Leishmanias* (NÉRIS *et al.*, 2013).

A partir dos valores encontrados nos ensaios anti-amastigota, avaliou-se o IS referente a estas formas do parasito. Assim, o valor de IS encontrado para o composto DL21 sugere uma alta seletividade deste composto para as formas intracelulares da espécie de *Leishmania* estudada. Este composto apresentou um valor de IS igual 41,1 mostrando-se mais seletivo que a DL01 e ao fármaco de referência. Vale ressaltar, que segundo Don e Loset (2014), em Kinetoplastídeos, compostos que apresentam valores de IS superiores a 20,0 são considerados excelentes candidatos a novos fármacos, ou seja, o maior valor de IS mostra que tal composto apresenta-se com menor toxicidade e maior atividade (DON; IOSET, 2014). Assim, o composto DL21, juntamente com DL01 foram selecionados para análise do mecanismo de ação.

A mitocôndria, além de ser o principal sítio de produção de ATP e EROs, apresenta um extenso envolvimento em diferentes eventos celulares, como a diferenciação, proliferação, homeostase de cálcio, balanço redox e morte celular programada (DUCHEN, 2000). Portanto, a funcionalidade mitocondrial é essencial para a manutenção da viabilidade celular.

Paralelamente, em *Leishmanias*, a mitocôndria é considerada um dos principais alvos a serem estudados, quando se busca compreender o mecanismo de ação de candidatos a fármacos; de modo que esta organela tem envolvimento no mecanismo de ação de fármacos como Anfotericina B (SHADAB *et al.*, 2017), Miltefosina (PINTO-MARTINEZ *et al.*, 2018), Pentamidina (VERCESI; DOCAMPO, 1992), antimoniais

(ACARI; MANZANO; GAMARRO, 2017) e de diversos compostos candidatos leishmanicidas (CORRAL *et al.*, 2016; MONZOTE *et al.*, 2018; VILLA-PULGARI *et al.*, 2017).

Adicionalmente, a manutenção da funcionalidade mitocondrial se relaciona diretamente com a manutenção do  $\Delta\Psi$ , já que o mesmo está envolvido diretamente com a fosforilação oxidativa, síntese de ATP, controle dos níveis de produção EROs e a homeostase intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  (LIMA *et al.*, 2018). Sendo assim, o mecanismo de ação dos compostos selecionados foi avaliado por meio de estudos de seus efeitos sobre a função mitocondrial através da análise de perturbações no  $\Delta\Psi$ .

O resultado da avaliação do  $\Delta\Psi$  nas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com a DL01 e DL21 revelaram mecanismos de ação diversos. Sendo que, o tratamento com a DL01 promoveu uma redução significativa no  $\Delta\Psi$  evidenciado por uma despolarização da membrana mitocondrial. Entretanto, o tratamento com DL21 não afetou de forma significativa este parâmetro. Segundo Dagnino e colaboradores (2017) em promastigotas de *Leishmania*, tanto a hiperpolarização quanto a despolarização, podem resultar em morte celular por apoptose (DAGNINO *et al.*, 2017). A alteração do  $\Delta\Psi$  observada com DL01 é corroborada com resultados encontrados na literatura relativos à ação da Licarina A em células pulmonares tumorais. Segundo Maheswari e colaboradores (2018), a interação da Licarina A com células tumorais promove despolarização mitocondrial, a qual pode estar relacionada ao início do processo de apoptose, evidenciado por fragmentação nuclear e condensação do DNA (MASHESWARI *et al.*, 2018). Adicionalmente, Morais e colaboradores (2020) avaliaram derivados da Licarina A com atividade contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* quanto ao provável mecanismo de ação na membrana plasmática e nas mitocôndrias deste parasito, onde foi possível observar aumento na produção de EROs e consumo de ATP, bem como, hiperpolarização mitocondrial (MORAIS *et al.*, 2020).

Em todos os tripanossomatídeos, inclusive em *Leishmanias*, a manutenção de um ambiente intracelular reduzido é essencial para a sobrevivência e proliferação celular. Paralelamente, mesmo leves disfunções no  $\Delta\Psi$  podem interferir diretamente na produção de EROs, entre os quais, a produção de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (BROOKES, 2005) afetando o estado redox da célula, e/ou ainda interferindo em taxas de proliferação celular (LENNICKE, 2015; LEE, 2011, FINZI, 2004).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos podemos verificar que:

- a) DL01 e 12 de seus derivados estudados apresentaram atividade leishmanicida frente às formas promastigotas;
- b) em relação à atividade anti-amastigota, a DL01 e DL21 apresentaram melhores resultados, com IS de 7,3 e 41,1, respectivamente;
- d) o valor de IS apresentado pelo composto DL21, evidencia que este derivado apresenta uma maior atividade leishmanicida e uma menor toxicidade relativa para mamíferos, tanto em relação à DL01 quanto à Anfotericina B, o fármaco de referência utilizado;
- e) os dados obtidos relativos ao mecanismo de ação demonstraram que o tratamento com DL01 promove alterações no  $\Delta\Psi$ , sugerindo, a mitocôndria como um alvo farmacológico deste composto, em *L. (L.) amazonensis*;
- f) de acordo com o mecanismo de ação do composto DL21, os resultados não apontaram efeitos no potencial de  $\Delta\Psi$ ;
- g) são necessários, estudos complementares para elucidar possíveis mecanismos de ação destes compostos, bem como avaliar sua eficácia *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ACARI, T.; MANZANO, J. I.; GAMARRO, F. ABC13 is a new mitochondrial ABC transporter from *Leishmania major* involved in susceptibility to Antimonials and Infectivity. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 61, n. 12, 2017.
- AGUILERA, E. *et al.* A nature-inspired design yields a new class of steroids against Trypanosomatids. **Molecules**, v. 24, 2019.
- ALMEIDA, A., N. *et al.* Surveillance of cutaneous leishmaniasis in clinical samples: distribution of *Leishmania guyanensis* in the state of Amapá, Brazil, 2018. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 17, v. 29, n.1, 2020.
- AMBLARD, F. *et al.* Facile purification of honokiol and its antiviral and cytotoxic properties. **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 11, p. 3426- 3427, 2006.
- AMIRI-DASHATAN, N.; REZAEI-TAVIRANI, M.; AHMADI, N. A Quantitative proteomic and bioinformatics analysis of proteins in metacyclogenesis of *Leishmania tropica*. **Acta Tropica**, p. 105227, 2019.
- AMORIN, F. M. *et al.* Morita–Baylis–Hillman adduct shows in vitro activity against *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide. **Parasitology**, v. 140, p. 29–38, 2013.
- ANDERSON, L. *et al.* Effects of Oltipraz and related chemoprevention compounds on gene expression in rat liver. **Journal of Cellular Biochemistry, Supplement**, v. 22, p.108-116, 1995.
- ANDERSON, N. G.; ANDERSON, N. L. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. **Electrophoresis Proteome and Proteomics**, v. 1853, n. 19, p. 1853-1861, 1998.
- ANTONIE, J. C. *et al.* A biogênese e propriedades dos vacúolos parasitóforos que abrigam *Leishmania* em macrófagos murinos. **Tendências Microbiol.**, v. 6, n. 10, p. 392-401, 1998.
- APERS, S.; VLIETINCK, A.; PIETERES, L. Lignans and neolignans as lead compounds. **Phytochem. Rev.**, v. 2, p. 201-217, 2003.
- ARANGO, V. *et al.* Coumarins from *Galipea panamensis* and their activity against *Leishmania panamensis*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 5, p. 1012-1014, 2010.
- ARRAIS-SILVA, W. W. *et al.* Effects of hyperbaric oxygen on *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. **Parasitol. Int.**, v. 54, n. 1, p. 1-7, 2005.

AVER, G. M.; KREUTZ, O. C.; SUYENAGA, E. S. Métodos de obtenção de fármacos sob a óptica da química medicinal. **Revista Conhecimento Online**, n. 7, v. 2, p. 63-72, 2015.

BACKMAN, J. T. *et al.* Role of cytochrome P450 2C8 in drug metabolism and interactions. **Pharmacol. Rev.**, v. 68, n. 1, p. 168-241, 2016.

BASTOS, M. M. *et al.* O Uso de porfirinas em terapia fotodinâmica no tratamento da Leishmaniose Cutânea. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 258-267, 2012.

BALANÍA-FOUCE, R. *et al.* Role of Trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 181, p. 85-93, 2012.

BALASUBRAMANIAN, M. *et al.* Purification and characterization of peroxidases from liquid endosperm of *Cocos nucifera* (L.): biotransformation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.**, v. 90, p. 33-42, 2013.

BARBOSA-FILHO, J. M. Lignanais, neolignanais e seus análogos. *In*: SIMÕES, C.M.O. *et al.* (ed.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004. cap. 22.

BARRAL, A. American Cutaneous Leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-Methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. **Inter J Dermatol.**, v. 2, p. 203-210, 2003.

BARREIRO, E. J; FRAGA, C. A. M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (Pronfar). **Quim. Nova**, v. 28, p. 56-S63, 2005.

BASU, J. M. *et al.* Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 1788–1797, 2006.

BERG, M. *et al.* Post- Genomic approaches to tackle drug resistance in Leishmania. **Parasitology**, v. 140, n. 12, p. 1492 – 1505, 2013.

BERKOWITZ, B. A. Avaliação Básica e clínica de novas drogas. *In*: KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica & clínica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap.5, p.53-61.

BERMAN, J. Miltefosine to treat leishmaniasis. **Expert Opin Pharmacother**, v.6, n.8, p. 1381-1388, 2005.

BEZERRA, A. M. *et al.* Neolignans from *Licaria chrysophylla* and *Licaria aurea* with DNA topoisomerase II- $\alpha$  inhibitory activity. **Quím. Nova**, v. 35, n. 11, 2012.

BHATTACHARYA, P. *et al.* *In vitro* susceptibilities of wild and drug resistant *Leishmania donovani* amastigotes to piperolactam a loaded hydroxypropyl--

cyclodextrin nanoparticles. **Acta Tropica**, v. 158, p. 97–106, 2016.

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

BIYANI, N.; MADHUBALA, R. Quantitative proteomic profiling of the promastigotes and the intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* isolates identifies novel proteins having a role in *Leishmania* differentiation and intracellular survival. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, p. 1342–1350, 2012.

BOER, M. *et al.* Leishmaniose impacto e acesso ao tratamento. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 10, p. 1471-1477, 2011.

BONARD, A. *et al.* Nitrosulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors: a promising chemotype for targeting Chagas disease and *Leishmaniasis*. **ACS Med. Chem. Lett.**, v. 10, n. 4, p. 413-418, 2019.

BRAGA, R. C. *et al.* Virtual screening strategies in medicinal chemistry: the state of the art and current challenges. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1899–1912, 2014.

BRAGA, S.S. Multi-target drugs active against *leishmaniasis*: a paradigm of drug repurposing. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 183, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. Situação epidemiológica-Dados. Brasília, DF, 2017.

\_\_\_\_\_. **Leishmaniose visceral**. Situação epidemiológica-Dados. Brasília, DF, 2017.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais**. Brasília, DF, 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Acesso em: 10 nov. 2019.

Brand M. D.; Nicholls, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **Biochem. J.**, v. 435, p. 297- 312, 2011.

BRINGAUD, F.; RIVIÈRE, L.; COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 1, p. 1-9, 2006.

BROOKES, P. S. Mitochondrial h<sup>+</sup> leak and ROS generation: an odd couple. **Free Radical Biology e Medicine**, n. 38, p. 12-23, 2005.

BRYCESSON, A. D. *et al.* Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. Clinical and immunological studies. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 5, p. 700-704, 1985.

CABRAL, M. M. O. *et al.* Neolignans from plants in northeastern Brazil (*Lauraceae*) with activity against *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, v. 124, n. 3, p. 319-324, 2010.

CALDWELL, J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drug metabolism. **Journal of Chromatography**, v. 694, p. 39-48, 1995.

CALLAHAN, H. L.; BEVERLEY, S. M. A member of the aldoketo reductase family confers methotrexate resistance in *Leishmania*. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 24165-24168, 1992.

CAMPOS, C. B. *et al.* Ibuprofen-induced Walker 256 tumor cell death: cytochrome c release from functional mitochondria and enhancement by calcineurin inhibition. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, p. 2197–2206, 2004.

CASSAMALE, T. B. *et al.* Synthesis and antitrypanosomastid activity of 1,4-Diaryl-1,2,3-triazole analogues of neolignans Veraguensin, Grandisin and Machilin G. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 1217–1228, 2016.

CARRANZA, J. C. *et al.* Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 41, p.299–308, 2009.

CECHINEL-FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação molecular para a otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998

CHAN, P. *et al.* The *in vitro* antioxidant activity of trilinolein and other lipid-related natural substances as measured by enhanced chemiluminescence. **Life Sci.**, v. 59 n. 24, p. 2067-2073, 1996.

CHANGTAM, C. *et al.* Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 941–956, 2010.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral Leishmaniasis: what Are the Needs for Diagnosis, Treatment and Control. **Nature**, v. 5, p. S7-S16, 2007.

CHAWLA, B. *et al.* Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin -susceptible -resistant leishmania donovani. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

COLE, L. W. The evolution of per-cell organelle number. **Front. Cell Dev. Biol.**, v. 4, 2016.

CORRAL, M. J.; BENITO-PE, E.; JIMÉNEZ-ANTÓN, M. D. Allicin induces calcium and mitochondrial dysregulation causing necrotic death in *Leishmania*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, p. 1-22, 2016.

- COSTA, D. C. S. **Caracterização clínica e laboratorial das manifestações orais da leishmaniose tegumentar americana**. 2014, 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2014.
- CREEK, D. J. *et al.* Toward global metabolomics analysis with hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry: improved metabolite identification by retention time prediction. **Anal Chem.**, v. 83, p. 8703–8710, 2011.
- CROFT, S. L.; ENGEL, J. Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. S4-S8, 2006.
- CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. "Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs." **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.
- DA LUZ, J. S. B. *et al.* Ultrastructural Analysis of *Leishmania infantum chagasi* promastigotes forms treated *in vitro* with Usnic Acid. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1–7, 2015.
- DAGNINO, A. P. A. *et al.* Phoroglucionol derivatives from hypericum species trigger mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*. **Parasitology**, 2018.
- DAVIES, J. M. S. *et al.* Transient adaptation to oxidative stress in yeast. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 317, p. 1-6, 1995.
- DEEP, D. K. *et al.* Increased miltefosine tolerance in clinical isolates of *Leishmania donovani* is associated with reduced drug accumulation, increased infectivity and resistance to oxidative stress. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p.1-16, 2017.
- DENG, H. *et al.* Synthesis, *in vitro* and *in vivo* biological evaluation of dihydroartemisinin derivatives with potential anti-Toxoplasma gondii agents. **Bioorganic Chemistry**, p. 103467, 2019.
- DEPS, P. D. *et al.* Avaliação comparativa da eficácia e toxicidade do antimoniato de N-metil-glucamina e do Estibogluconato de Sódio BP88 no tratamento da leishmaniose cutânea localizada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 6, p. 535-543, 2000.
- DE SOUZA, V. L. *et al.* Immune and inflammatory responses to *Leishmania amazonensis* isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBA mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, 2011.
- DON, R.; IOSET, J. R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 01, p. 140-146, 2014.
- DORLO, T. P. C. *et al.* Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic

efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 67, p. 2576-2597, 2012.

DUCHEN, M. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. **The Journal of Physiology**, v. 529, n. 1, p. 57-68, 2000.

D'AVILA-LEVY, C. M. *et al.* GP63 Function in the interaction of Trypanosomatids with the invertebrate host: facts and prospects. **Subcell Biochem.**, v. 74, p. 253-70, 2014.

EI FADILI, K. *et al.* Down regulation of KMP-11 in *Leishmania infantum* axenic antimony resistant amastigotes as revealed by a proteomic screen. **Exp. Parasitol**, v. 123, p. 51–7, 2009.

ESCOBAR, P. *et al.* Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Tropica**, v. 81, n. 2, 151-157, 2002.

FELIPPIN, F. B; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 42, n. 2, p.167-194, 2006.

FERNÁNDEZ, O. L. *et al.* Miltefosine and Antimonial drug susceptibility of *Leishmania viannia* species and populations in regions of high transmission in Colombia. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e2871-11, 2014.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. "Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs." **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, p. 2758–2770, 2011.

FINZI, J. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 133, n. 1, p. 37-43, 2004.

FOLQUITO, L. R. S. *et al.* Synthesis, protease inhibition, and antileishmanial activity of new benzoxazoles derived from acetophenone or benzophenone and synthetic precursors. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, n. 6, p. 1149–1159, 2017.

GEROLDIGER, G. *et al.* Activation of anthracene endoperoxides in *Leishmania* and impairment of mitochondrial functions. **Molecules**, v. 7, p. 1680-23, 2018.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, p. 419–452, 2010.

GOTTLIEB, E. *et al.* Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome *c* release during apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 10, p. 709-717, 2003.

GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. Lignóides com atenção especial à química das neolignanas. **Quím. Nova**, v. 7, n. 4, p. 250-273, 1984.

GROGL, M.; THOMASON, T. N.; FRANK, E. D. Drug resistance in leishmaniasis:its

implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, p. 117-126, 1992.

HANNAERT, V. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 30, p. 1–30, 2003.

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

INACIO, J. D. F. *et al.* The Effect of (-)-Epigallocatechin 3-O *in vitro* and *in vivo* in *Leishmania braziliensis*: Involvement of reactive oxygen species as a mechanism of Action. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n.8, 2014.

KATAKURA, K. *et al.* Structural and functional analysis of the LaMDR1 multidrug resistance gene in *Leishmania amazonensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 255, p. 289-294, 1999.

KATHURIA, M. *et al.* Induction of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in *Leishmania donovani* by orally active clerodane diterpene. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 10, p. 5916–5928, 2014.

KAYE; SCOTT. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.9, n.8, p.604-615, 2011.

KIMBLIN, N. *et al.* Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 10125-10130, 2008.

KRAMER, S. Developmental regulation of gene expression in absence of transcriptional control: the case of Kinetoplastids. **Mol Biochemical Parasitol.**, v. 182, n. 2, p. 61-72, 2012.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature**, v. 266, n. 5603, p. 628-630, 1977.

LENNICKE, C. *et al.* Hydrogen peroxide-production, fate and role in redox signaling of tumor cells. **Cell Commun Signal**, v.13, p. 13-39, 2015.

LÉON-DÍAZ, R. *et al.* Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 105, n. 1, p. 45-51, 2010.

LI, X. *et al.* Determining the balance between drug efficacy and safety by the network and biological system profile of its therapeutic target. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.

LIMA, E. B. *et al.* Tratamento da leishmaniose tegumentar americana treatment of american cutaneous leishmaniasis. **An. Bras. Dermatol.**, v. 82, n. 2, p. 111-134, 2007.

- LIRA, R. *et al.* Evidence that the high incidence of treatment failure in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony resistant strains of *Leishmania donovani*. **J. Infect. Dis.**, v. 180, n. 2, p. 564–567, 1999.
- LO, Y. C. *et al.* Magnolol and honokiol isolated from *Magnolia officinalis* protect rat heart mitochondria against lipid peroxidations. **Biochem. Pharmacol.**, v. 47, n. 3, p. 549-553, 1994.
- LÓPEZ-ARENCIBIA, A. *et al.* Apoptotic protein profile in *Leishmania donovani* after treatment with hexaazatrinaphthylenes derivatives. **Experimental Parasitology**, v. 166, p. 83–88, 2016.
- MACHADO, M. *et al.* Activity of *Thymus capitellatus* volatile extract, 1,8-cineole and borneol against *Leishmania* species. **Vet Parasitol.**, v. 24, n. 200, p. 39-49, 2000.
- MAHESWARI, U.; GHOSH, K.; SADRAS, S. R. Licarin A induces cell death by activation of autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer cells. **Apoptosis**, v. 23, p. 210-225, 2018.
- MARSDEN, P.D. *et al.* High continuous antimony therapy in two patients with unresponsive mucosal leishmaniasis. **Am. J. Trop Med. Hyg.**, v. 34, n. 4, p. 710-713, 1985.
- MARSHALL, S. *et al.* Extracellular release of virulence factor major surface protease via exosomes in *Leishmania infantum* promastigotes. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 355-10, 2018.
- McGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.
- MEDEIROS, I. M. *et al.* Leishmanioses - Visceral e Tegumentar. In: HINRINCHSEN, S. L. **DIP - Doenças Infeciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 398-409.
- MEHTA, A; SHAHA, C. Apoptosis death *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 12, p. 789-813, 2014.
- MELET, V. R. *et al.* (±)-Licarin A and its semi-synthetic derivatives: *in vitro* and *in silico* evaluation of trypanocidal and schistosomicidal activities. **Acta Trop.**, v. 202, n. 3, 2019.
- MELO, P. S. *et al.* Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cell Dev. Biol. Animal**, v. 36, p. 539-543, 2000.
- MEINEL, R. S. *et al.* Novel functionalized 1,2,3-triazole derivatives exhibit antileishmanial activity, increase in total and mitochondrial-ROS and depolarization of mitochondrial membrane potential of *Leishmania amazonensis*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 315, 2020.

MERCER, L. *et al.* 2,4-Diaminopyrimidines as potent inhibitors of *Trypanosoma Brucei* and identification of molecular targets by a chemical proteomics approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 2, 2011.

MONZOTE, L. *et al.* Interaction of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. with mitochondria in *Leishmania* and other eukaryotes. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1729–1740, 2018.

MONZOTE, L. *et al.* The antileishmanial activity of xanthohumol is mediated by mitochondrial inhibition. **Parasitology**, v. 144, n. 6, p. 747-759, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOSS, G. P. Nomenclature of lignans and neolignans. **Pure Appl. Chem.**, v. 72, n. 8, p. 1493-1523, 2000.

MUKHERJEE, A. *et al.* Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. **J. Antimicrob. Chemoth.**, v. 59, p. 204–211, 2007.

NEMAN, J. D; GRAGG, M. G. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Jornal Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2014.

NERIS, P. L. N. *et al.* Neolignan Licarin A presents effect against *Leishmania (Leishmania) major* associated with immunomodulation *in vitro*. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 307-313, 2013.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

NIKOLAEV, A. V.; SIZOVA, O. V. Synthetic neoglycoconjugates of cell-surface phosphoglycans of *Leishmania* as potential anti-parasite carbohydrate vaccines. **Biochemistry**, v. 76, p. 761–773, 2011.

OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P.A. Complex I of tripanossomatidae: does it exist? **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 7, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Doenças tropicais negligenciadas**, 2018.  
\_\_\_\_\_. **Leishmaniose**, 2019.

ORGANIZACAO PAN- DA AMERICANA DE SAÚDE. **Leishmaniose. Informe Epidemiológico das Américas**, n. 7, 2019.

ORLANDO, R. M. *et al.* Importância farmacêutica de fármacos quirais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 1, p. 08-14, 2007.

OYAMA, J. *et al.* Potential of Pluronic P-123 and F-127 as nanocarriers of anti-

Leishmania chemotherapy. **Acta Tropica**, v. 192, p. 11-21, 2019.

PARSON, M. *et al.* Biogenesis and function of peroxissomes and glycosomes. **Molecular e biochimacal Parasitology**, n. 115, p. 19-28, 2001.

PELOSO, E. F. *et al.* Role of *Trypanosoma cruzi* peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, p. 419-424, 2011.

PELOSO, E. F. *et al.* Tryparedoxin peroxidases and superoxide dismutases expression as well as ROS release are related to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes growth phases. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 15, n. 520–2, p. 117–122, 2012.

PELOSO, E. F. *et al.* Investigation of 8-methoxy-3-(4-nitrobenzoyl)-6-propyl-2H-chromen-2-one as a promising coumarin compound for the development of a new and orally effective antileishmanial agent. **Molecular biology reports**, 2020.

PEREIRA, A. C. *et al.* Schistosomicidal and trypanocidal structure-activity relationships for (±)-licarin A and its (-)- and (+)-enantiomers. **Phytochem.**, v. 72, p. 1424-1430, 2011.

PEREIRA, I. O. *et al.* Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, v. 17, p. 339-45, 2011.

PEREZ-VICTORIA, F. J. *et al.* Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 50, Dec 12, p. 49965-49971. 2003.

PIACENZA, L. *et al.* Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. **Int. J. Parasitol.**, n. 39, v. 13, p. 1455–1464, 2009.

PIACENZA, L. *et al.* Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously derived peroxynitrite. **Biochem J.**, v. 410, n. 2, p. 359–368, 2008.

PINTO-MARTINEZ, A. K. *et al.* Mechanism of action of miltefosine on *Leishmania donovani* involves the impairment of acidocalcisome function and the activation of the sphingosine-dependent plasma membrane Ca<sup>2+</sup> channel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. 1–10, 2018.

RAIS, S. *et al.* Sodium stibogluconate (Pentostam) potentiates oxidant production in murine visceral leishmaniasis and in human blood. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2406–2410, 2000.

RAMESH, V. *et al.* Decline in clinical efficacy of oral miltefosine in treatment post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) in India. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 10, 2015.

RATH, S. *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da

arte. **Química nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REQUENA, J. M. The stressful life of pathogenic *Leishmania* species. **Stress Response in Microbiology**, p. 323-346, 2012.

RIBEIRO, A. R. *et al.* Fármacos quirais em diferentes matrizes ambientais: ocorrência, remoção e toxicidade. **Química nova**, v. 39, n. 5, 2016.

ROYCHOWDHRY, S. *et al.* Isobenzofuranone derivative JVPH3, an inhibitor of *L. donovani* topoisomerase II, disrupts mitochondrial architecture in trypanosomatid parasites. **Scientific Reports**, v. 8, 2018.

SACK, D. L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cellular microbiology**, v. 3, n. 4, p. 189-196, 2001.

SAUNDERS, E. C. *et al.* Induction of a stringent metabolic response in intracellular stages of *Leishmania mexicana* leads to increased dependence on mitochondrial metabolism. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2014.

SAUNDERS, E.C. *et al.* Isotopomer profiling of *Leishmania mexicana* promastigotes reveals important roles for succinate fermentation and aspartate uptake in the tricarboxylic acid cycle (TCA) anaplerosis, glutamate synthesis, and growth. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 2706-2723, 2011.

SAUDAGAR, P. *et al.* Molecular mechanism underlying antileishmanial effect of oxabicyclo[3.3.1] nonanones: inhibition of key redox enzymes of the pathogen. **Eur J Pharm. Biopharm.**, v. 85, p. 569–577, 2013.

SHADAB, M. *et al.* Apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani* treated with KalsomeTM10, a new liposomal amphotericin B. **PLOS ONE**, n.12, v. 2, 2017.

SERAFIM, L. *et al.* New thiophene-acridine compounds: synthesis, antileishmanial activity, DNA binding, chemometric, and molecular docking studies. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 91, n. 6, p. 1141-1155, 2018.

SIFAOU, I. *et al.* Selective activity of oleanolic and maslinic acids on the amastigote form of *Leishmania spp.* **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 3, 2017.

SILVA-LOPEZ, R. E. S. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Quím. Nova**, v. 33, n. 7, 2010.

SIMPSON, L. Kinetoplast DNA in trypanosomid flagellates. **Int. Rev. Cytol.**, v. 99, p. 189-207, 1986.

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

SOONG, L. Subversion and Utilization of Host Innate Defence by *Leishmania amazonensis*. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 58, p. 1-5, 2012.

- SRIVASTAVA, S. *et al.* Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasit Vectors.**, v. 10, n. 49, p. 1-11, 2017.
- STEINER, S. *et al.* Cyclosporine a decreases the protein level of the calcium-binding protein calbindin-D 28kda in rat kidney. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 253-258, 1996.
- STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, 2017.
- TAVARES,, G. S. *et al.* Antileishmanial activity, cytotoxicity and mechanism of action of clioquinol against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* species. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 123, n. 3, p. 236-246, 2018.
- TEMPONE, A. G.; OLIVEIRA, C. M.; BERLINCK, R. G. S. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. **Planta Med.**, v. 77, p. 572-585, 2011.
- TER KUILE, B. H.; Opperdoes, F. R. "Uptake and turnover of glucose in *Leishmania donovani*." **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 60, n. 2, p. 313-321, 1993.
- TIELENS, A. G. M., VAN HELLMOND, J. J. Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 10, p. 482-490, 2009.
- TREFZGER, O. S. *et al.* Design, synthesis and antitrypanosomatid activities of 3,5-diaryl-isoxazole analogues based on neolignans veraguensin, grandisin and machilin.G. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 93, p. 313–324, 2019.
- ULLMAN, B.; CARRERO-VALENZUELA, E.; COONS, T. *Leishmania donovani* Isolation and characterization of sodium stibogluconate (Pentostan) – resistant cell lines. **Exp. Parasitol.**, v. 69, p. 157-163, 1989.
- VAN ASSCHE, T; *et al.* Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free radical biology & medicine**, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011.
- VERAS P. S. T; MENEZES, J. P. B. Using proteomics to understand how *Leishmania* parasites survive inside the Hst and establish infection. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n. 8, 2011.
- VERONICA, J. *et al.* Iron superoxide dismutase contributes to miltefosine resistance in *Leishmania donovani*. **FEBS Journal**, p. 1-16, 2019.
- VIEGAS-JUNIOR, C. *et al.* Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes, **Curr. Med. Chem.**, v. 14, p.1829-1852, 2007.
- VILLA-PULGARI, J. A. *et al.* Mitochondria and lipid raft-located FOF1-ATP synthase as major therapeutic targets in the antileishmanial and anticancer activities of ether lipid edelfosine. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 8, 2017.

WANG, J. P.; HO, L. C.; CHEN, C. C. Anti-inflammatory effect of magnolol, isolated from *Magnolia officinalis*, on A23187-induced pleurisy in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 47, n. 10, 857-860, 1995.

WILSON, M. E.; PEARSON, R. D. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. **J. Immunol.**, v. 12, n. 136; p. 4681-4689, 1986.

WIESE, A. G. *et al.* Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. **Ach Biochem Biophys.**, v. 318, n. 231-240, 1995.

WILKINSON, S. R. *et al.* Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 11, p. 8220-8225, 2000.

YOUN, U. J. *et al.* Cytotoxic Lignans from the stem bark of *Magnolia officinalis*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 1687-1689, 2007.

## ANEXO



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG**  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000  
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



Comissão de Ética no

Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de atividade Leishmanicida de derivados do composto licarina A e mecanismo de ação, através de bioenergética mitocondrial e metabolômica em *L. (L) amazonensis*", registrada com o nº 30/2019, sob a responsabilidade de Eduardo de Figueiredo Peloso, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	( ) Ensino científica	(X) Pesquisa
Vigência da autorização	De 01/08/2019 a 01/02/2020	
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss / heterogênico	
Nº de animais	48	
Sexo	Machos	
Origem	Biotério Central da UNIFAL	

Alfenas, 11 de Julho de 2019.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida  
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG


**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**

**Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG**  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000  
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063


**Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL**
**CERTIFICATE**

We hereby certify that the proposal entitled “Evaluation of leishmanicide activity of licarine compound derivatives and mechanisms of action, through mitochondrial and metabolomic bioenergetic in *L. (L) amazonensis*”, registration number 30/2019, under the responsibility of Eduardo de Figueiredo Peloso, which implies production, maintenance or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans), for the purpose of scientific research (or teaching), is in compliance with Law no. 11794, published on October 8th, 2008, with Decree no. 6899, published on July 15th, 2009, and with the guidelines issued by the National Council on the Control of Animal Experimentation (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA), and was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA-UNIFAL) (Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas).

Purpose: ( ) Teaching	(X) Scientific research
Expiration date	01/01/2020
Species/strain/breed	Swiss mice / Outbred
Number of animals	48
Sex	Male
Origin	Central Vivarium UNIFAL-MG

Alfenas, July 11, 2019.

Leonardo Augusto de Almeida PhD

CEUA/UNIFAL Coordinator