



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DE
COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE TERPENOS E
ALCALOIDES CONTRA DIFERENTES ESPÉCIES DE
*LEISHMANIA***

LARISSA VIRGOLINO DA SILVA

**JOÃO PESSOA
2017**

LARISSE VIRGOLINO DA SILVA

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DE
COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE TERPENOS E
ALCALOIDES CONTRA DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do Curso
de Graduação em Farmácia, do Centro
de Ciências da Saúde da Universidade
Federal da Paraíba, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Orientador(a): Prof^ª.Dra.Tatjana Keesen de Souza Lima

Larisse Virgolino da Silva

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DE
COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE TERPENOS E
ALCALOIDES CONTRA DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do Curso de
Graduação em Farmácia, do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade
Federal da Paraíba, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente
Orientador

Prof.^a Dra. Daniele Idalino Janebro
Examinadora

Ma. Cíntia Nóbrega de Souza Dias
Examinadora

Dedicatória



**Aos meus pais Severino e Lucia que foram
meus primeiros professores e os principais
responsáveis por me fazerem chegar até aqui,
por toda doação e exemplo.**

Agradecimientos



Agradeço a **Deus** por todas as bênçãos concedidas até aqui, por ser minha fortaleza e amparo, e por me dar forças e coragem para lutar pelo que eu acredito.

Ao meu **pai Severino**, por ser o meu maior exemplo de ser humano, por ser um homem bom e humilde, reflexo de Deus na minha casa, por me ensinar sobre humildade e perseverança e por todo amor dedicado a mim

A minha **irmã Laise**, pelo companheirismo e amizade, pela compreensão e amor.

A minha **mãe Maria Lúcia**, pelo incentivo em escolher essa carreira, por sua compreensão nos momentos que eu mais precisei estar ausente e seu infinito amor.

A minha orientadora, **Profª Drª Tatjana Keesen**, por ter me concedido a oportunidade de adentrar ao universo da ciência, pelos anos de orientação, sua dedicação e também por ter se tornado um exemplo de profissional a quem eu me espelho e que me inspira a ser melhor.

Ao **prof. Dr. Damião Pergentino** por ter cedido as substâncias alvo desse estudo, e seu aluno **Flávio Nóbrega** pelo suporte oferecido.

Aos colegas e amigos do laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas: **Juliana Rocha, Viviane Lima, Pâmela Gabriela, Ronara Cambui, Cinthia Nóbrega, Renata Rodrigues, Rephaney Fonseca, Isabel Guerra, Bruna Macêdo, Pedro Henrique, Fernanda Almeida e Ícaro Alves**, pelos bons momentos compartilhados e conhecimentos transmitidos, pessoas as quais passei a admirar profundamente e criar um enorme carinho, especialmente à **Juliana Rocha** que tanto me ajudou durante todas as etapas deste projeto, além de toda paciência e cuidado, se tornou uma amiga e alguém que eu admiro imensamente.

Aos meus familiares que de algum modo prestaram apoio ou palavras de incentivo, ou por simplesmente existirem e me darem forças nessa jornada, especialmente as minhas tias: **Média, Fátima e Lucimária**, mulheres guerreiras que me ensinam a sempre seguir em frente apesar das adversidades e minha prima Rosana Amâncio por todo o incentivo a seguir essa carreira por sua amizade, companheirismo e por ser um exemplo de mulher e ser humano.

A todos os **professores** que de alguma forma contribuíram para a construção do conhecimento que carrego hoje e ensinaram lições que ultrapassam as barreiras da sala de aula sobre como ser um profissional íntegro, competente e um ser humano melhor. Vocês são

verdadeiros heróis, pois transformam vidas e toda a sociedade que é recompensada formação de profissionais competentes e dignos.

A **UFPB** e demais **profissionais** vinculados ao curso de farmácia e campos de estágio que ensinaram na prática o amor a essa profissão.

Aos amigos e colegas de curso: **Allyson Assis, Anderson Rodrigo, Bruno Henrique, Daniel Bezerra, Danielly Araújo, Deivid Marques, Erika Guedes, Fagner Dyan, Flávia Barbosa, Gildevan Santos, Giuliana Amanda, Jacy Costa, Jade Lima, Jamilly Oliveira, Jean Monteiro, Jéssica Ferreira, João Vitor, Larisse Silva, Lisandra Fernandes, Maressa Ferreira, Mariana Sá, Mariana Targino, Marília Félix, Mateus Oliveira, Mathania Rezende, Rafael Farriere, Raquel Fragoso, Rayane Gomes, Rayanne Silva, Raymunda Nogueira, Rildeane Gabriel, Sabine Dantas, Suelyton Bernardo, Talita Oliveira, Thandy Martins, Vanessa Rangel, Vitória Gama, Wênia Brito**, por todos os momentos e ensinamentos compartilhados, foi muito bom ver a evolução de cada um e o modo que nos adaptamos uns aos outros e aprendemos a conviver e criar laços de amizade.

A meus **amigos** da vida (Alícia Martinez, Ana Waléria, Andrea Karla, Douglas Costa, Luiz Ricardo, Matheus Bezerra, Samantha Cristina, Camila Prudêncio, Marta Prudêncio, Lucas Coelho, Diogo Oliveira, Kellyne Fernandes e muitos outros) por estarem sempre presentes durante esta trajetória, dividindo cada momento tenham sido eles bons ou ruins, tornando os dias mais fáceis e os problemas menos pesados, seja com palavras de apoio, ou por dividirem as alegrias dessa vida.

Quero agradecer especialmente a **Mathania Almeida** por ter se tornado alguém a quem aprendi a admirar e me espelhar, por toda a amizade e ajuda dedicada nestes 5 anos e a **Arthur Pontes** que passou a ser mais que um simples amigo, por acreditar em mim fortalecendo minha auto-confiança, por toda dedicação e amor.

Agradeço enfim a todos os que durante este tempo estiveram presente e se tornaram base para a conquista desse sonho.

Larisse Virgolino da Silva

Ainda que eu tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, se não tivesse amor, nada seria.

"1 Coríntios 13:2"

Resumo

Estudo *in vitro* da atividade anti-*Leishmania* de compostos sintéticos derivados de terpenos e alcaloides contra diferentes espécies de *Leishmania*

Silva, L.V.

Trabalho de Conclusão de Curso. CCS/UFPB, 2017

RESUMO

A leishmaniose é uma doença parasitária endêmica em regiões tropicais do globo, causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidos por vetores flebotomíneos. Esta pode se manifestar sobre as formas cutânea, mucocutânea ou visceral, e apresenta elevados índices de morbidade e mortalidade, o que justifica a busca de novas estratégias terapêuticas, já que as terapias atuais consistem no uso de medicamentos tóxicos e que vem induzindo aquisição de resistência por parte dos parasitas. Portanto, o trabalho em questão teve como objetivo, estudar os efeitos de 36 compostos de origem natural ou sintética, relacionados ao metabolismo secundário de plantas incluindo o extrato hidroalcoólico da *Metha crispa*, o monoterpene rotundifolona, derivados do monoterpene álcool perfílico e análogos da piplartina, uma amida biologicamente ativa, nas espécies: *Leishmania donovani*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, causadoras da leishmaniose visceral e tegumentar. Foi realizado um *screening* de 36 substâncias em diferentes concentrações, para avaliar seu potencial leishmanicida *in vitro*, destas, foi selecionado a que teve uma menor CI₅₀ contra as formas promastigotas de *L. donovani*, para ser submetida a testes de toxicidade contra células sanguíneas humanas. A anfotericina B foi usada como controle positivo e todos os experimentos foram feitos em triplicata. Foi demonstrado no nosso estudo, níveis variados de ação das substâncias-teste contra as diferentes espécies do parasita, destacando-se uma melhor atividade do composto 8,9-epóxi-perialdeído (EP-2), com bons valor de CI₅₀ ($3,87 \pm 0,8$) em comparação ao controle positivo, a Anfotericina B (CI₅₀ = $0,766 \pm 0,06$), e que no entanto ao contrário desta última, não induziu toxicidade para as hemácias e células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis, sugerindo vantagem quanto a sua segurança. Tais resultados promissores incitam a investigação dos mecanismos moleculares de ação dessa substância, bem como, a necessidade de realização de ensaios mais avançados de toxicidade para comprovar sua eficácia, a fim de introduzir o composto EP-2 como possível adjuvante para o tratamento da leishmaniose.

Palavras chave: Leishmaniose, compostos naturais, anti- *Leishmania*.

Abstract



Anti-*Leishmania in vitro* study of synthetic compounds derived from terpenes and alkaloids against *Leishmania* species

Silva, L.V.

Final Graduation Project. CCS / UFPB, 2017

ABSTRACT

Leishmaniasis is an endemic parasitic disease in tropical regions that is caused by protozoa of *Leishmania* genus transmitted by phlebotomine vectors. The clinical manifestations can vary on cutaneous, mucocutaneous or visceral form. Leishmaniasis presents high morbidity and mortality rates involved, which justifies the search for new therapeutic strategies, because the current therapies consist on use of toxic drugs and that has been inducing acquisition of resistance by the parasites. The aim of this work was to study the effects of natural or synthetic compounds related with secondary metabolism of plants, including *Metha crista* hydroalcoholic extract, monoterpene rotundifolone, peryl alcohol monoterpene derivatives and pipartin analogs, a biologically active amide, in *Leishmania donovani*, *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum* strains, which cause visceral and tegumentary leishmaniasis. A total of 36 substances were screened in different concentrations to evaluate their leishmanicidal potential *in vitro*, so, it was selected the compound that had a lower IC₅₀ against *L. donovani* promastigote forms, to test their toxicity against human blood cells. Amphotericin B was used as a positive control and all experiments were performed in triplicate. In the present study, we demonstrated a variety of action levels of the compounds against different parasite species, with a better activity of 8,9-epoxyperialdehyde (EP-2), with good IC₅₀ values (3 , 87 ± 0.8) compared with Amphotericin B (IC₅₀ = 0.766 ± 0.06), but the first did not induce toxicity in red blood cells and peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals. This results suggest good leishmanicidal action and advantage as regards its safety, that encourage the molecular mechanisms of action investigation of that substance, as well the necessity of more advanced toxicity tests to prove its efficacy in order, to introduce EP-2 as a possible adjuvant drug for leishmaniasis treatment.

Key words: Leishmaniasis, natural compounds, antileishmania.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Imagem 1	Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i>	26
Imagem 2	Distribuição da leishmaniose tegumentar no mundo	27
Imagem 3	Distribuição da leishmaniose visceral no mundo	28
Imagem 4	Formas evolutivas do parasita <i>Leishmania spp</i>	29
Imagem 5	Diferentes espécies dos mosquitos flebotomídeos	30
Imagem 6	Ciclo biológico de vida de parasitas do gênero <i>Leishmania spp</i>	32
Imagem 7	Diferentes formas clínicas da Leishmaniose	34
Imagem 8	Principais efeitos colaterais dos medicamentos de referência	39
Imagem 9	Estruturas químicas do álcool perilílico e perilaldeído 8,9-epóxido	43
Imagem 10	Estruturas químicas da piplartina e ácido 3,4,5 trietoxicinâmico	44
Imagem 11	Análogos da piplartina e respectivas reações de síntese	51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI₅₀) de *L. amazonensis* e *L. donovani* após 72 h de incubação com os compostos teste 56
- Tabela 2** Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI₅₀) de *L. infantum* após 72 h de incubação com o composto EP-2 e fármacos de referência. 62
- Tabela 3** Concentração da EP-2 e fármacos de referência capaz de lizar 50% das hemácias (CH₅₀) após 1 h de incubação..... 63
- Tabela 4** Concentração citotóxica da EP-2 e fármacos de referência para 50% de CMSP após 24 h de incubação..... 64
- Tabela 5** Atividade anti-*leishmania* da EP-2 e fármacos de referência nas espécies *L. amazonensis*, *L. donovani* e *L. infantum*, efeitos citotóxicos contra células de mamíferos e índice de seletividade..... 65

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Inibição das formas promastigostas de <i>L. donovani</i> por EP-2 e Anfotericina B	61
Gráfico 2	Inibição das formas promastigostas de <i>L. infantum</i> por EP-2 e Anfotericina B	62

LISTA DE ABREVIATURAS

- AB** – Anfotericina B
- AP** – Alcool Perílico
- AM** – Antimoniato de meglumina
- BOD** – *Biochemical Oxygen Demand* (Demanda Biológica de Oxigênio)
- CMSP** – Células Mononucleares do Sangue Periférico
- EDTA** – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- EP-1** – 1,2 epóxido perialdeído
- EP-2** – 8,9 epóxido perialdeído
- EROS** – Espécies Reativas de Oxigênio
- CC₅₀** – Concentração citotóxica sobre 50% das células mononucleares
- CI₅₀** – Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas
- CH₅₀** – Concentração hemolítica sobre 50% dos eritrócitos
- CP** – Controle Positivo
- CN** – Controle Negativo
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- IFN- γ** – Interferon- γ
- IL-10** – Interleucina-10
- IL-4** – Interleucina-4
- LD** – Leishmaniose Disseminada
- LT** – Leishmaniose Tegumentar
- LCL** – Leishmaniose Cutânea Localizada
- LCD** – Leishmaniose Cutânea Difusa
- LM** – Leishmaniose Mucocutânea
- LV** – Leishmaniose Visceral
- MC** – *Mentha Crispa*
- MTT** – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
- NO** – Óxido Nítrico
- NOS** – Sintase de Óxido Nítrico
- PBS** – *Phosphate Buffered Saline* (salina fosfatada tamponada)
- RPMI** – *Roswell Park Memorial Institute*
- SDS** – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de sódio)

IS – Índice de Seletividade

IS_H – Índice de Seletividade em relação às hemáceas

IS_C – Índice de Seletividade em relação às células mononucleares

RD – Rotundifolona

SBF – Soro Bovino Fetal

Sb III – Antimoniais trivalentes

Sb V – Antimoniais pentavalentes

Th₁ – Linfócito T auxiliar 1

Th₂ – Linfócito T auxiliar 2

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

WHO/OMS – *World Health Organization* (Organização Mundial da saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO
2. REFERENCIAL TEÓRICO	25
2.1 Classificação Taxonômica.....	25
2.2 Epidemiologia	26
2.2 Características morfológicas e moleculares	28
2.3 Vetores.....	29
2.4 Reservatórios	30
2.5 Ciclo Biológico	31
2.6 Formas clínicas	32
2.7 Aspectos Imunológicos.....	35
2.9 Terapias.....	36
2.10 Compostos naturais com atividade anti- <i>Leishmania</i>	39
2.10.2.1 ROTUNDIFOLONA.....	41
2.10.5 Piplartina	43
3. JUSTIFICATIVA	46
4. OBJETIVOS	48
4.1 Objetivo Geral:.....	48
4.2 Objetivos específicos:.....	48
5. MATERIAIS E MÉTODOS	50
5.1 Cultivo das formas promastigotas dos parasitas	50
5.2 Compostos em Estudo.....	50
5.3 Atividade anti- <i>leishmania</i> das substâncias-teste sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. donovani</i> e <i>L. infantum</i>	52
5.4 Determinação da citotoxicidade da substância EP-2 frente à eritrócitos humanos	52
5.5 Avaliação da citotoxicidade da substância EP-2 frente às células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	53
5.6 Análises estatísticas	54
6. RESULTADOS.....	56
6.1 Análise da atividade anti- <i>leishmania</i> das substâncias testes sobre formas promastigotas de <i>L. donovani</i> e <i>L. amazonensis</i>	56
6.2 Análise da atividade anti- <i>leishmania</i> da substância EP-2 sobre formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	62

6.3 Avaliação da citotoxicidade da substância EP-2 e drogas de referência frente a eritrócitos humanos	63
6.4 Avaliação da citotoxicidade da substância EP-2 e drogas de referência frente à CMSP humanos	63
6.5 Determinação do índice de seletividade da substância em estudo	64
7. DISCUSSÃO.....	67
8. CONCLUSÃO	72
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose representa um complexo de doenças com importante diversidade clínica e epidemiológica, sendo causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, se apresenta sob diferentes formas clínicas e pode atingir os mais diversos sistemas, causando desde danos estéticos até lesões severas que afetam funções vitais e que se não tratadas, podem levar seus portadores a óbito. Esta se encaixa na lista da Organização Mundial de Saúde (OMS) de doenças negligenciadas (WHO, 2014), ficando no topo do *ranking* de gravidade devido ao elevado número de infecções bem como às altas taxas de morbidade e mortalidade associadas (BIFELD *et al.*, 2015).

Em 2014, mais de 90% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. A doença afeta principalmente as pessoas mais pobres do mundo, e está associada à desnutrição, deslocamento populacional, condições precárias de habitação (construção de barragens, sistemas de irrigação e urbanização) e sistema imunológico debilitado (ALVAR *et al.*, 2012). Por isso, requer além de medidas terapêuticas aos indivíduos afetados, investimentos em saneamento urbano e educação da população.

O gênero *Leishmania* faz parte da família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*, com inúmeras espécies patogênicas à humanos. Tais parasitas apresentam um ciclo de vida heteroxênico, com um hospedeiro definitivo vertebrado e um inseto vetor invertebrado responsável pela transmissão da doença (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Os protozoários são transmitidos pelo repasto sanguíneo de mosquitos flebotômicos infectadas, de modo que foram descritas cerca de 98 espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* como vetores comprovados ou suspeitos de leishmaniose humana, sendo somente as fêmeas hematófagas, estas são responsáveis por entrar em contato com os mamíferos fazendo a captura do sangue para garantir a conclusão do desenvolvimento do ovo (STEVERDING, 2017).

As manifestações clínicas são diversas e podem variar de lesões ulcerativas e nodulares na pele, passando pela forma mucocutânea, na qual há o acometimento de mucosas e cartilagens até a forma visceral, mais severa e potencialmente fatal (KAYE e SCOTT, 2011).

As principais estratégias de controle da doença incluem: localização de casos e tratamento, controle de vetores e de animais em focos zoonóticos. Até agora, o progresso no desenvolvimento de uma vacina protetora contra as diferentes leishmanioses humanas tem sido limitado, portanto os medicamentos representam a principal medida de controle da doença. A

primeira escolha na terapia envolve o uso de drogas enquadradas na classe dos antimoniais, e em casos refratários ou que demonstra a aquisição de resistência, pode-se optar para o tratamento de segunda linha que inclui a anfotericina B, pentamidina, paramomicina e miltefosina. Estes no entanto, apresentam custos elevados, e geralmente são mais tóxicos que os antimoniais, além de envolver esquemas terapêuticos complexos (FRÉZARD e DEMICHELI, 2010).

Outra classe que pode fornecer substâncias com propriedades terapêuticas para a doença em questão são os fitocompostos. Nos últimos dez anos, foram encontrados dezenas de novos compostos naturais com potencial de uso no combate da *Leishmania spp.*, especialmente provenientes das florestas tropicais da América do Sul e África (DE CARVALHO e FERREIRA, 2001) incluindo: compostos fenólicos como Auronas, Lignanas, Óleos essenciais, Chalconas, Flavonóides, Isoflavonoides, Saponinas, Quinonas, Alcalóides, Taninos, Terpenoides, Iridoides, Terpenos, Oxylipins entre outros (SEN et al., 2011). Particularmente os óleos essenciais utilizados frequentemente na aromaterapia, se destacam pelo seu amplo espectro de atividades antimicrobianas em bactérias, fungos e protozoários, de modo que já foi relatado para este ação anti-*Leishmania* em ensaios *in vitro* e *in vivo* em baixas concentrações (MACHADO *et al.*, 2011).

Alguns óleos essenciais têm uma elevada percentagem de monoterpenos, que são fundamentais para sua atividade farmacológica. Os terpenóides constituem a maior classe de moléculas bioativas, sendo classificados pela quantidade de carbonos, o qual é resultado do número de moléculas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) presentes em sua estrutura. Em óleos essenciais, os compostos terpênicos mais encontrados são monoterpenos (C10) e sequiterpenos (DE VRIESE *et al.*, 2000).

Outro grupo de metabólitos secundários que tem sido investigado extensivamente, são os alcaloides. São conhecidos mais de 5000 alcaloides com atividade biológica, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas e estudadas. A Piplartina (piperlongumine, 5,6-di-hidro-1 - [(2E) -1-oxo-3- (3,4,5-trimetoxifenil) -2-propenil] -2 (1H) -piridinona) pertence a esse grupo, e mostrou em diversos estudos entre outras, atividade anti-protozoário contra espécies que tem potencial em causar doenças tropicais negligenciadas como a esquistossomose e a leishmaniose (HARDOK S. DODIWALA, 2007).

Os desafios atuais na terapia da leishmaniose clássica incluem opções limitadas, aparecimento de resistência, e elevada toxicidade das drogas existentes,. (DE LALLA F 1993),

fazendo-se necessário a pesquisa e desenvolvimento de novos compostos que sejam seguros, eficazes, baratos e de fácil administração (LEZAMA-DÁVILA *et al.*, 2014). Está bem estabelecido que produtos naturais constituem uma fonte importante de novos medicamentos, porque além de serem amplamente distribuídos na natureza, seus derivados apresentam estruturas extremamente versáteis para modificação sintética com bioatividade promissora.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Classificação Taxonômica

Os parasitas de *Leishmania* pertencem ao Reino Protista (Haeckel, 1866), Classe *Kinetoplastea* (Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976), Subclasse *Metakinoplastina* (Vickerman, 2004), Ordem *Trypanosomatida* (Kent, 1880), Família *Trypanosomatidae* (Döflein, 1901), Subfamília *Leishmaniinae* (Maslov e Lukeš 2012), e Gênero *Leishmania* (ROSS, 1903).

Desde a descrição original destes parasitos e da criação do gênero *Leishmania* por Ross em 1903, o número de espécies reconhecidas aumentou continuamente, e vários esquemas de classificação taxonômica foram propostos (GRIMALDI e TESH, 1993). Os mais utilizadas na atualidade seguem o modelo proposto por Lainson & Shaw em 1987, que dividem as *Leishmanias* nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (MISHRA *et al.*, 2009).

O gênero *Leishmania* abrange cerca de 30 espécies conhecidas e Segundo a OMS, mais de 20 destas são potencialmente patogênicas à humanos (WHO, 2016).

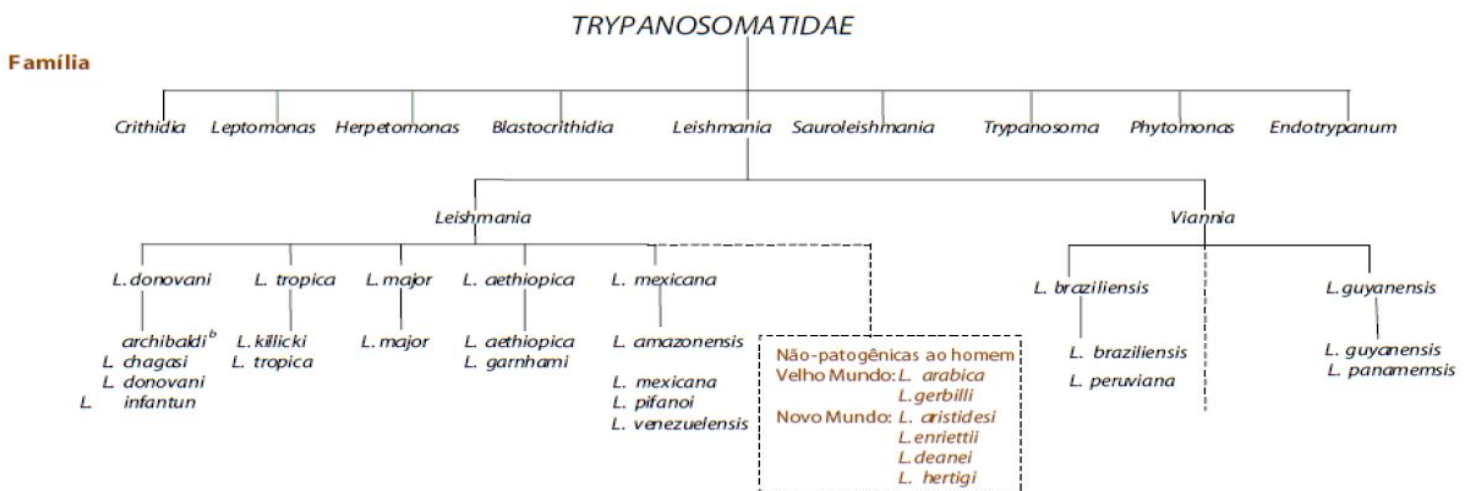


Figura 01: Taxonomia do gênero *Leishmania*.

Fonte: Modificado de MISHRA *et al.*, 2009

Na Ásia, África e Europa, a leishmaniose tegumentar é causada por *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) aethiopica* e alguns zimodemas da *Leishmania infantum*. No novo mundo, principalmente na América Latina, as espécies incluem *Leishmania (Viannia) braziliensis* a mais prevalente, seguida da

Leishmania amazonensis, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) panamensis*, embora outras espécies como *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) pifanoi*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*, *Leishmania (Viannia) peruviana*, *Leishmania (Leishmania) shawi* e *Leishmania (Viannia) lainsoni* estejam presentes na região do Amazonas e na América Central (GOTO e LINDOSO, 2010). Enquanto que a Leishmaniose visceral na África, Ásia, Europa e nas Américas, é uma doença causada por parasitos do complexo *Leishmania donovani* que inclui duas espécies: *L. donovani* e *L. infantum* (NEVES, 2005).

No Brasil especificamente são reconhecidas pelo menos sete espécies de *Leishmanias* responsáveis pela doença humana, sendo a forma tegumentar causada principalmente pela *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais raramente, pela *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*, enquanto a *Leishmania (Leishmania) chagasi* é a responsável pela doença visceral. Cada espécie apresenta particularidades concernentes às manifestações clínicas, vetores, reservatórios, padrões epidemiológicos, distribuição geográfica e até mesmo à resposta terapêutica (VALE., 2005).

2.2 Epidemiologia

As leishmanioses estão presentes em 98 países (5 continentes), sendo 72 destes localizados no velho mundo e 26 no novo mundo (ALVAR *et al.*, 2012). Estima-se que 2 milhões de novos casos ocorram anualmente e que, em todo o mundo, 12 milhões de pessoas estejam infectadas. As taxas de mortalidade anual chegam a mais de 60 mil, sendo que 350 milhões de pessoas vivem em regiões de risco (WHO, 2015). No entanto, é importante salientar que o impacto da leishmaniose na saúde pública mundial encontra-se subestimado. De fato, a declaração da doença é compulsória em apenas 32 dos 88 países afetados, verificando-se, assim, um número substancial de casos não registrados (WHO, 2016).

A maioria dos casos cutâneos de leishmaniose ocorre no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe Síria. A forma cutânea antropótica (onde os seres humanos são o principal reservatório do parasita) é predominantemente urbana e periurbana e apresenta padrões de agrupamento espacial semelhantes aos da leishmaniose visceral antropótica no sudeste Asiático. A doença é geralmente caracterizada por grandes surtos em cidades densamente povoadas, especialmente

em zonas de guerra e conflitos, campos de refugiados e em ambientes onde há migração em grande escala de populações (WHO, 2016).

Em relação a forma mucocutânea, quase 90% dos casos ocorrem no Estado Plurinacional da Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2016).

No Brasil em média, cerca de 3.500 casos são registrados anualmente e o coeficiente de incidência é de 2,0 casos/100.000 habitantes (WHO, 2016). Nos últimos anos, a letalidade vem aumentando gradativamente, passando de 3,2% em 2000 para 6,6% em 2014, para a forma mais grave da doença – leishmaniose visceral, segundo dados do ministério da saúde (SAÚDE, 2016). O Brasil concentra cerca de 70% dos casos de leishmanioses na América do Sul (BARRETO *et al.*, 2011) e nas últimas duas décadas, epidemias urbanas foram observadas em várias cidades, incluindo as capitais Teresina e Belo Horizonte (SAÚDE, 2016). A transmissão da *L.chagasi*, antes restrita à área rural, vem mudando desde 1980, espalhando-se por áreas urbanas. Além disso, vem aumentando, também, o número de cães de áreas rurais em contato com ciclos zoonóticos, isto os torna principais reservatórios da doença nestas regiões (BARRETO *et al.*, 2011).

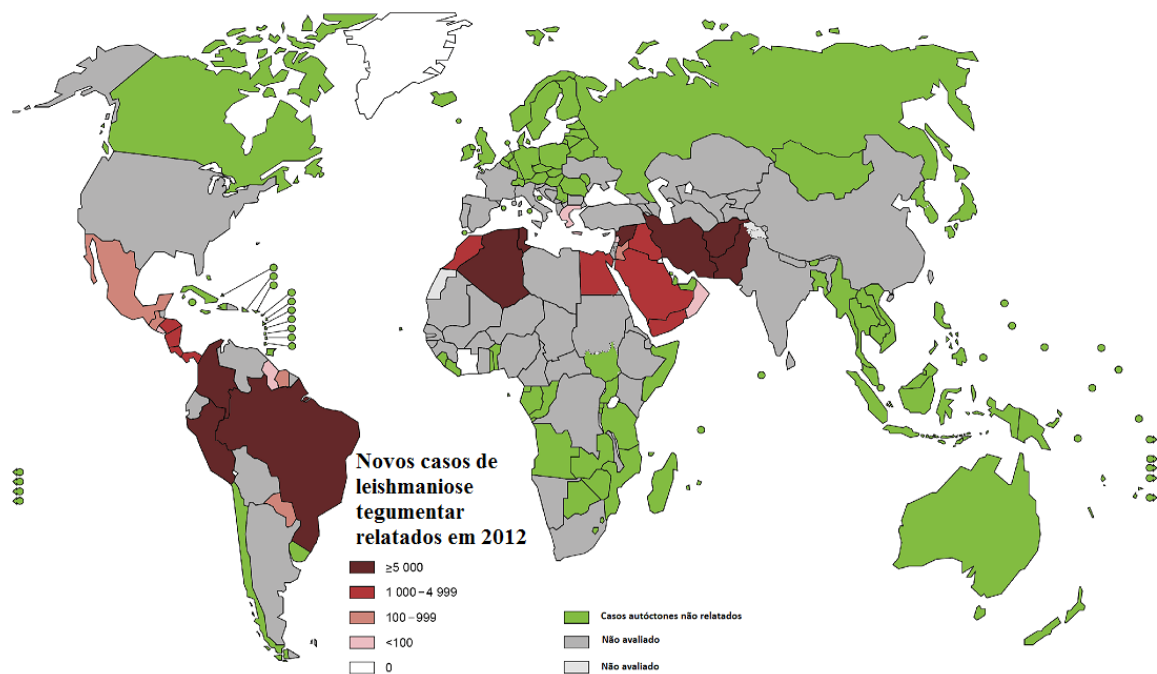


Imagem 02: Distribuição da leishmaniose tegumentar no mundo

Fonte: Modificado de *World Health Organization* – 2013 (Who, 2013)

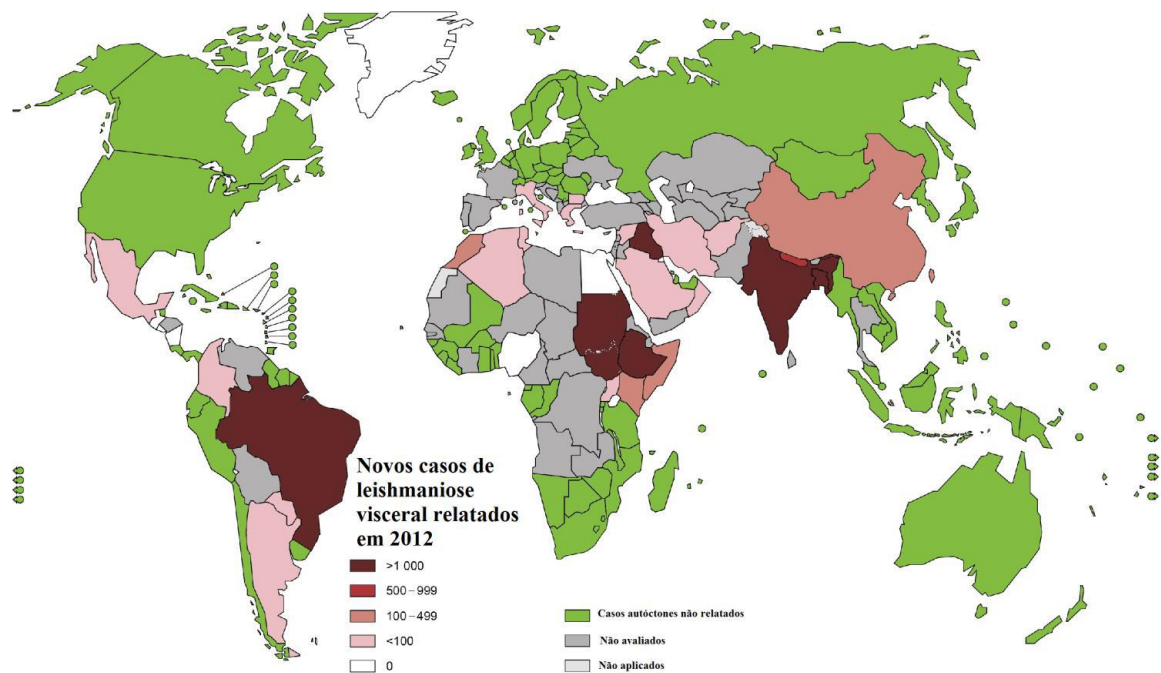


Imagem 03: Distribuição da leishmaniose visceral no mundo

Fonte: Modificado de *World Health Organization* – 2013 (Who, 2013)

2.2 Características morfológicas e moleculares

As espécies de *Leishmania* são heteroxênicas, significando que são capazes de colonizar dois hospedeiros. Elas vivem nos fagócitos do sistema reticulo-endotelial de mamíferos e no trato intestinal de flebotomíneos. Portanto, estes são tidos como parasitas intracelulares obrigatórios apresentando-se sobre duas formas evolutivas: a forma promastigota, presente no hospedeiro invertebrado e a forma amastigota no hospedeiro vertebrado (BAÑULS *et al.*, 2007; ALCOLEA *et al.*, 2010). Ambas são resultado de uma adaptação à mudança ambiental e as condições encontradas pelos parasitas dentro de seus dois hospedeiros.

As formas aflageladas ou amastigotas são parasitas intracelulares de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), medindo cerca de 3,7 x 2,1 µm. São arredondadas ou ovóides com núcleo grande, oval e excêntrico; junto ao qual se encontra uma estrutura denominada cinetoplasto (extensão da mitocôndria), rica em DNA mitocondrial. No citoplasma ainda são observados o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático, além de vacúolos e inclusões.

As formas flageladas ou promastigotas, são extracelulares e móveis, observadas em cultura de células e no hospedeiro invertebrado, são alongadas com corpo fusiforme, com cinetoplasto localizado na extremidade do flagelo. O núcleo é central, formado de feixes

paralelos de microtúbulos, envolvidos em uma bainha citoplasmática (FERREIRA M. U., 2003; BASANO, 2004).

Além das organelas presentes em todas as células eucarióticas convencionais, os protozoários do gênero *Leishmania* possuem ainda algumas organelas características, como megassomos, acidocalcissomos, glicossomos e cinetoplasto.

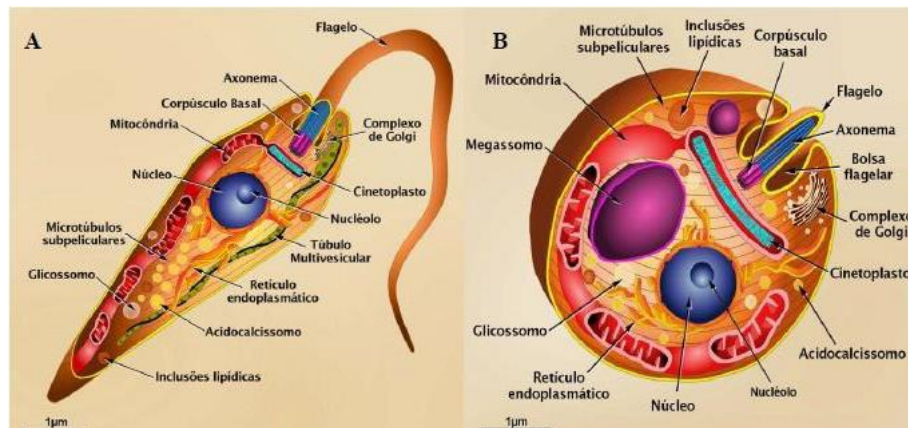


Imagem 04: Desenho ilustrativo das principais organelas intracelulares das formas evolutivas do parasita *Leishmania spp*: Promastigota (A) e amastigota (B).

Fonte: Adaptado de Teixeira *et al.*, 2013.

2.3 Vetores

Existem mais de 800 espécies de mosquitos flebotomíneos conhecidas, sendo 464 encontradas no Novo Mundo e 375 no Velho Mundo (AKHOUNDI *et al.*, 2016). Mais de 90 dessas são capazes de transmitir parasitas *Leishmania*, sendo o gênero *Phlebotomus* prevalente na Europa, Ásia e África, enquanto no Brasil o principal vetor faz parte do gênero *Lutzomyia* (DOSTÁLOVÁ e Volf, 2012). Estes últimos, são insetos pequenos, de cor amarelada, pertencentes à ordem *Diptera*, mesmo grupo das moscas, mosquitos, borrachudos e maruins; apresentam um par de asas e de pequenas estruturas, chamados de halteres ou balancins, responsáveis pela estabilidade do voo e o zumbido característico dos dípteros. No Brasil, esses insetos podem ser conhecidos por diferentes nomes de acordo com sua ocorrência geográfica, como tatuquira, mosquito palha, asa dura, asa branca, cangalhinha, birigui, anjinho, entre outros (VILELA, 2013).

Os flebotomíneos apresentam importância médica como vetores naturais não só de *Leishmania*, mas também de outros agentes etiológicos, como protozoários tripanossomatídeos, bactérias do gênero *Bartonella* e vários arbovírus (SHERLOCK, 2003).

Apesar da transmissão por flebotomíneos ser a mais importante na epidemiologia da leishmaniose, a participação de outros vetores tem sido avaliada: Macerado de carrapatos e pulgas provenientes de cães positivos já foi demonstrado capaz de infectar hamsters por via oral e inoculação intraperitoneal. No entanto, o fato não comprova a viabilidade destes ectoparasitos como vetores uma vez que formas promastigotas não foram evidenciadas nos esfregados de sangue do macerado (COUTINHO *et al.*, 2005; COUTINHO E LINARDI, 2007).

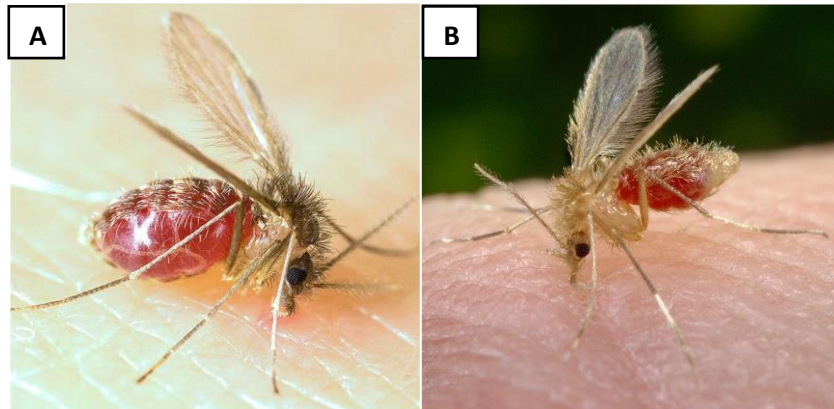


Imagem 05: Mosquito flebotomíneo. - Espécies *Lutzomyia longipalpis* (A) e *Phlebotomus papatasi* (B)

Fonte: Ray Wilson, *Liverpool School of Tropical Medicine - PLoS Pathogens Issue Image* - Vol. 5(8) August 2009. *PLoS Pathog* 5(8): ev05.i08 (A); *Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library* (PHIL) – 2005 (B)

2.4 Reservatórios

Um animal considerado reservatório de doenças tem seu sistema capaz de manter populações do parasito que consigam sobreviver indefinidamente, com alta carga do micorganismo. Alguns fatores determinam a susceptibilidade de um hospedeiro, como sua densidade populacional, a duração da infecção, a localização do parasito no seu interior e o seu estado imunológico após a cura. O hospedeiro alberga o parasito em seu corpo, mas não consegue transmiti-lo diretamente a outros animais (ASHFORD, 1996).

Considerada uma doença primária de animais e que pode ser transmitida aos humanos, a leishmaniose apresenta como principal reservatório na área urbana o cão (*Canis familiaris*), e no ambiente silvestre, as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (SAÚDE, 2006).

Segundo Caldas e colaboradores, os roedores constituem um dos grupos de animais sinantrópicos mais procurados pelos flebótomos (CALDAS *et al.*, 2002), de fato, uma pesquisa em área endêmica de leishmaniose tegumentar e visceral mostrou que as espécies *Rattus rattus*

e *Thrichomys apereoides* foram encontrados naturalmente infectados por espécies do protozoário (OLIVEIRA *et al.*, 2006) atuando como possíveis reservatórios peridomésticos, constituindo assim, um importante elo entre o ambiente silvestre e domiciliar (CORREDOR *et al.*, 1989). Além disso, também têm sido encontrados gatos naturalmente infectados mas pouco se sabe sobre a importância epidemiológica destes animais como reservatórios da doença (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

2.5 Ciclo Biológico

Os ciclos de transmissão da leishmaniose variam de acordo com a região geográfica, espécie de parasito, vetores, reservatórios e hospedeiros. Os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas metacíclicas são inoculadas pelas fêmeas dos insetos vetores, durante o repasto sanguíneo (BATES, 2007). A saliva do mosquito exerce papel importante, com efeito anticoagulante, vasodilatador e antiagregante plaquetário, favorecendo o fluxo de sangue e a linfa intersticial para o alimento, além de ação quimiotática para monócitos e imunorregulador, com capacidade de interagir com os macrófagos, aumentando sua proliferação e impedindo a habilidade destas células de destruição dos parasitos (CHANG *et al.*, 1990).

A internalização de *Leishmania* spp se faz através da endocitose mediada por receptores CR1 e CR3 na superfície do macrófago. Com isso, há uma rápida transformação dos parasitos à forma amastigotas como outra estratégia para evadir ao ataque do hospedeiro. Após a internalização, a promastigota metacíclica transforma-se em amastigota, capaz de se desenvolver e se multiplicar no vacúolo digestivo, compartimento com pH ácido e enzimas hidrolíticas. Mantendo o controle das condições ambientais internas, a amastigota inicia o processo de sucessivas multiplicações até o rompimento da célula hospedeira, com libertação das amastigotas que serão, por mecanismo semelhante, internalizadas por outros macrófagos (CHANG *et al.*, 1990).

A infecção para o hospedeiro invertebrado ocorre a partir da ingestão, no momento do repasto sanguíneo em um indivíduo ou animal infectado, das formas amastigotas que acompanham o sangue e/ou a linfa intersticial. Por volta de três a cinco dias o alimento é digerido e excretado, neste tempo, já são encontradas formas flagelas migrantes na porção torácica do intestino médio, que é acompanhada pela transformação dos parasitos em (1) promastigotas curtas e largas livres na luz intestinal, (2) paramastigotas arredondadas, fixadas

pelo flagelo através de hemidesmossomos e (3) promastigotas metacíclicas. Em todas as espécies, os parasitos migram para as porções anteriores do aparelho digestivo do inseto comprometendo a válvula estomadeu, seguida da invasão da faringe, cibário e probólide onde permanecem até que ocorra o repasto sanguíneo para a inoculação no hospedeiro vertebrado (CHANG *et al.*, 1990; GRIMALDI e TESH, 1993; NEVES, 2005; BATES, 2007; NEUBER, 2008)

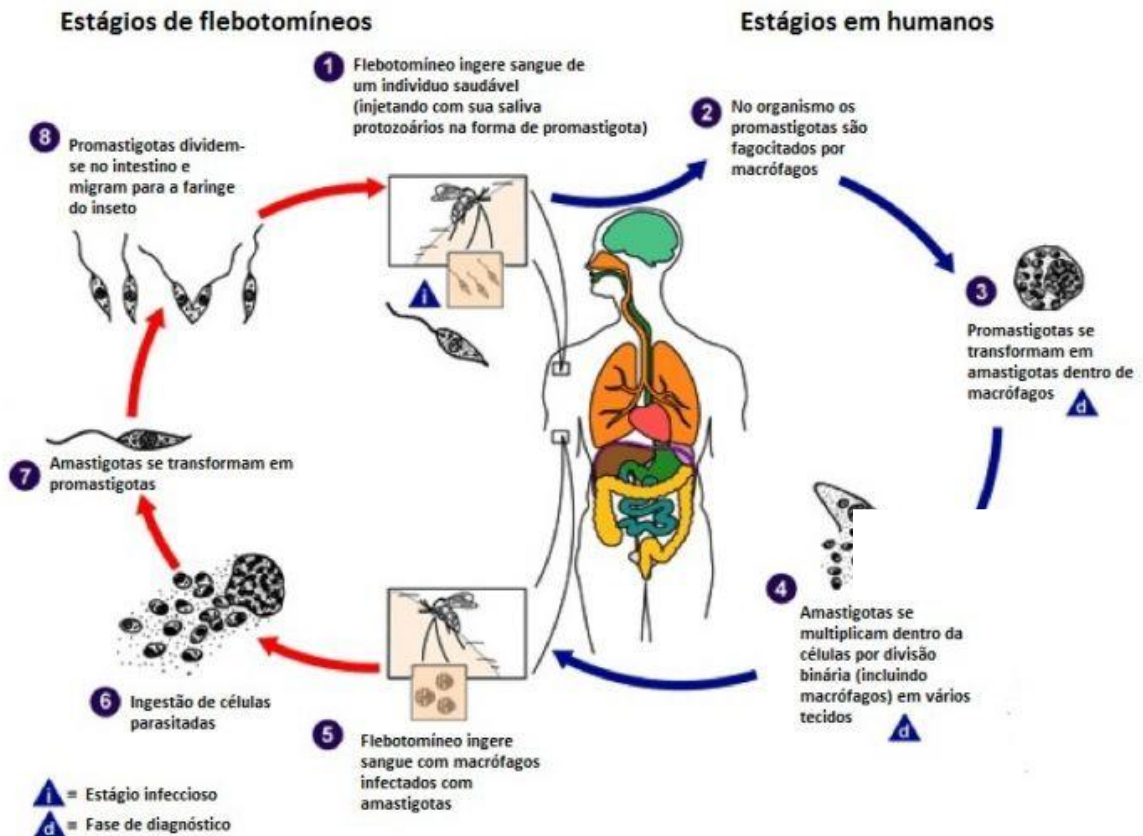


Imagem 06: Ciclo biológico de vida de parasitas do gênero *Leishmania*.,

Fonte: Adaptado de *Center of disease control and prevention* - 2013

2.6 Formas clínicas

Interferências do homem sobre o meio ambiente e ecossistema, levaram a uma alteração no ciclo de parasitos do gênero *Leishmania*, resultando na leishmaniose, que é tida como doença tropical potencialmente fatal, segundo a OMS como a segunda protozoose mais importante em saúde pública (OMS, 2016).

A ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor susceptível e de um hospedeiro/reservatório igualmente susceptível (GONTIJO, 2004). Diferenças na virulência do parasito podem explicar a diversidade de sinais clínicos (CAMPOS-PONCE *et al.*, 2005). Além disso, foram relacionados que a idade, a genética e o estado nutricional são fatores determinantes na expressão da enfermidade no homem e no animal (Davies *et al.*, 2000).

A leishmaniose se apresenta sob duas formas clínicas: leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar. Esta última pode ainda ser subdividida em: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Disseminada (LD), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) e Leishmaniose Mucocutânea (LMC) (NEVES, 2005; GOTO E LINDOSO, 2010).

A forma cutânea ou tegumentar (LC) chamada usualmente de “ferida brava” ou “úlcerade-Bauru”, é a mais comum e provoca lesões na pele, principalmente úlceras, em partes expostas do corpo (Imagem 5 – A), deixando cicatrizes ao longo da vida e deficiências graves (SILVEIRA, 2004; NYLÉN e EIDSMO, 2012). Geralmente, existe um período de incubação de 2 semanas a vários meses. Primeiro, uma pequena pápula vermelho-acastanhado aparece, normalmente em áreas da pele não protegida pelas roupas, além disso, nódulos ou placas podem desenvolver-se no curso da doença; ulcerações são frequentes dentro 12-18 meses, e sem tratamento a LC normalmente evolui para a cura com o surgimento de lesões focais.

A LD (Figura 5 – B) é uma manifestação rara, observada em até 2% dos casos de LT, e leva a um quadro de múltiplas lesões papulares não nodulares (número varia de 10 a 300), infiltrações difusas e úlceras pequenas de fundo granuloso que acometem vários segmentos corporais, frequentemente a cabeça e o tronco. A disseminação do parasito ocorre principalmente por via hematogênica, causando lesões distantes do local da picada (SILVEIRA *et al.*, 2008; GODO e LINDOSO, 2012).

Lesões nodulares não-ulceradas, contendo elevado número de amastigotas, precedidas por nódulo único que evolui com disseminação linfática do parasito, caracterizam a LCD (Imagem 5 – C), que constitui uma forma menos incidente do que a localizada, porém grave, que ocorre em pacientes anérgicos (SILVEIRA, 2004; NYLÉN e EIDSMO, 2012).

A forma mucocutânea (Figura 5 – D) conduz à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta (SILVEIRA, 2004; NYLÉN e EIDSMO, 2012). Esta, tradicionalmente refere-se a uma sequela de infecção cutâneo metastática no Novo Mundo, que resulta da difusão de parasitas da pele para a mucosa naso-orofaríngea. A LM

normalmente torna-se clinicamente evidente dentro de vários anos (por vezes décadas) das lesões cutâneas originais, que normalmente não foram tratadas ou foram sub-tratadas. As manifestações iniciais geralmente incluem irritação, congestão ou sangramento nasal podendo progredir para destruição ulcerativa da mucosa naso-orofaríngea (tais como a perfuração do septo nasal) (GUERRA *et al.*, 2011).

Já a leishmaniose visceral (Imagem 5 – E), também conhecida como calazar, é a forma mais grave, sendo sistêmica; é a terceira causa parasitária mais comum de morte, após malária e criptosporidiose infantil. A doença pode ter um início abrupto ou gradual, podendo ainda permanecer latente por anos e se manifestar clinicamente décadas após a exposição em pessoas que se tornam imunocomprometidos por outras razões médicas (como a infecção pelo HIV). Nas formas sintomáticas é fatal se não for tratada em mais de 95% dos casos. Os indivíduos infectados apresentam febre, perda de peso, anemia, hepatoesplenomegalia e uma resposta imune deprimida, levando a pancitopenia e infecções sobrepostas. Uma das suas sequelas, a Leishmaniose dérmica pós-Calazar, é uma condição cutânea crônica e desfigurante associada a considerável morbidade e estigma social, além de provavelmente contribuir para a transmissão da *Leishmania* (OMS, 2016).



Imagem 07: Diferentes formas clínicas da Leishmaniose – Forma cutânea (A), Forma disseminada (B) Forma cutânea difusa (C), Forma mucocutânea (D), Forma visceral (E).

Fonte: *Center of Disease Control and Prevention* – 2013 (A); Organização Mundial da Saúde – 2012 (B e C); *Dermatologia básica* - SAMPAIO e RIVITTI, 2014 (D e E)

2.7 Aspectos Imunológicos

Assim como outras doenças infecciosas, a leishmaniose envolve a participação da imunidade inata (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) e adaptativa (Linfócitos T). Contudo, a cura desta está mais associada à resposta imune celular, especialmente na ativação macrofágica que leva a eliminação do parasito (Wanderley *et al.*, 2012; Tripathi *et al.*, 2007).

O repasto sanguíneo através do inseto vetor com inoculação do parasita, induz uma resposta inflamatória local forte, com liberação do fator quimiotático de *Leishmania* (LCF) que induz a atração de neutrófilos cerca de minutos após a infecção (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2002; LASKAY *et al.*, 2003; AWASTHI *et al.*, 2004; RITTER *et al.*, 2009). No entanto, um número significativo de macrófagos migra para o local apenas após cerca de 2 a 3 dias, constituindo o principal tipo de célula parasitada (MOUGNEAU, 2011).

A resposta adaptativa contra o protozoário ocorre após a apresentação de antígenos por macrófagos e células dendríticas, via MHC classe II para as células T. Há uma expansão de vários tipos celulares, que pode ser caracterizada pelo aumento de linfócitos T CD4⁺, apresentando um perfil de citocinas TH₁ ou TH₂ (HOLZMULLER *et al.*, 2006). As primeiras, estão envolvidas principalmente na eliminação de patógenos intracelulares e nas respostas imunológicas do tipo celular, neste caso, citocinas como IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-12 serão produzidas, ativando os macrófagos que conseqüentemente produzem moléculas microbidas, como espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO) via indução da Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) sendo este o principal mecanismo de morte para as *Leishmanias* (Mosser; Zhang, 2008).

Por outro lado, os linfócitos ditos do tipo Th₂ estão relacionados à indução da resposta humoral e os fenômenos de eosinofilia. Esta resposta é caracterizada pela persistência da infecção, como ocorre na LV; portanto são produzidos IL-4 e IL-10, que inibem a ativação macrofágica e induzem a produção de anticorpos, principalmente os isotipos IgG₁, IgE e IgA. Assim, o parasita escapa da resposta celular do hospedeiro e pode ser encontrado em órgãos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea (BOGDAN e RÖLLINGHOFF, 1998). A resposta humoral desenvolvida não é protetora e está envolvida em mecanismos de patogênese pela deposição de imunocomplexos observada na LV. Como outras células podem ser

infectadas, e os macrófagos e células dendríticas também expressam moléculas de MHC classe I, nas infecções por protozoários, há também ativação das células TCD8⁺ (MACHADO et al., 2011).

Imunologicamente a LCL e LM se caracterizam principalmente pela resposta através das células T CD4⁺ e CD8⁺ tanto em pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* quanto naqueles com *L. (L.) amazonensis*, porém a resposta imune provocada pela primeira espécie apresenta maior expressão de INF- γ e baixa ou nenhuma expressão de IL-4 nas lesões (REIS A.B., 2006).

A forma mucocutânea está associada com a exacerbada resposta imune celular, sendo novamente a reação causada pela espécie *L. (V.) braziliensis* maior quando comparada com outras do mesmo subgênero (SILVEIRA, 2004). Seu aspecto imunológico tem como característica a presença predominante de células T CD4⁺ em detrimento das células T CD8⁺ (ESTERRE et al., 1992). De forma similar ao que acontece na LCL, os níveis de INF- γ e TNF- α nas lesões são bem elevados enquanto que os níveis de IL-4 e IL-10 permanecem baixos, o que contribui para a exacerbção da resposta imune inflamatória do hospedeiro (GOMES-SILVA A.; SOUZA e R.; DIETZE, 2008).

2.9 Terapias

Atualmente as terapias para o tratamento das leishmanioses são bastante limitadas e se baseiam no emprego de substâncias que apresentam eficiência ainda muito restrita além de causar diversas ações tóxicas sob o indivíduo e envolver esquemas terapêuticos difíceis, com via de administração parenteral que requer muitas vezes internação hospitalar.

Não há atualmente nenhuma vacina licenciada contra a leishmaniose humana e, embora várias tenham avançado para ensaios clínicos, a maioria ainda está em fases de pesquisa e desenvolvimento precoces. Idealmente, uma vacina eficaz contra esta doença deve conferir uma imunidade duradoura, limitando assim o uso de quimioterapia e envolver uma resposta imunitária mediada por TH₁ e TH₂ equilibrada a partir da vacinação. A "leishmanização", que simula a infecção por inoculação de *L. major* viva como uma vacina para proteção contra a leishmaniose cutânea, foi realizada no Uzbequistão, no Irã e em Israel. No entanto, esta técnica não é adequada para uso em larga escala ou em áreas endêmicas do HIV, e foi descontinuado, de modo que nenhuma das preparações de parasitas mortos (que são preparações brutas e difíceis de definir e padronizar) com ou sem adjuvantes demonstrou eficácia profilática

significativa nos estudos já realizados, portanto tal tarefa permanece uma meta, que requer uma melhor compreensão da patogênese da enfermidade e melhores modelos animais que reflitam mais precisamente a doença humana (DESJEUX, 2004).

A terapia farmacológica é então o método de controle existente e se baseia no uso de duas classes de medicamentos, os antimoniais e os não-antimoniais (incluindo nesta categoria a pentamidina, paramomicina e anfotericina B) (BAILEY e LOCKWOOD, 2007). Apesar de haver várias espécies de *Leishmania* e diversas manifestações clínicas, os mesmos medicamentos são utilizados para tratar essa antropozoonose (GOTO e LINDOSO, 2010).

Os antimoniais são tidos como fármacos de primeira escolha, e dentre estes, pode-se destacar os complexos de antimônio trivalentes (Sb III), tais como o tartarato antimonial de potássio (Tartarato emético), antimoniato de bis-catecol-3,5-dissulfonato sódico, tioglicolato de sódio e o antimônio, bem como antimoniais pentavalentes (Sb V) , como antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®), gluconato de antimônio (V) sódico (Pentostan®, Solustibosan®, estibogluconato sódico) e uréia estibamina (Estibamine) (RATH S e MN, 2003). Entretanto, devido a cardiotoxicidade e intolerância gastrointestinal dos Sb III, são os Sb V, que apresentam maior uso terapêutico.

No Brasil, o medicamento antimonial de escolha é o antimoniato de N-metilglucamina o qual, se administrado de forma contínua e com posologia adequada, é eficaz no tratamento das formas tegumentar e visceral. Esses medicamentos são de administração parenteral obrigatória (SINGH e SIVAKUMAR, 2004) na dose de 20 mg/kg/dia por pelo menos 20 dias; muitas vezes requerem internação hospitalar e podem causar reações locais e sistêmicas como: dor na área de aplicação, rigidez articular, problemas gastrointestinais, pancreatite, cardiotoxicidade, insuficiência hepática e renal e hemólise.

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes no combate à *Leishmania* é ainda controverso e pouco compreendido (AMATO *et al.*, 2000; PHARMA, 2014). Estas são drogas consideradas leishmanicidas, pois interferem na bioenergetica das formas amastigotas, tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, processos localizados em organelas peculiares são inibidos, acompanhada de redução na produção de ATP e GTP (GOTO e LINDOSO, 2010).

Evidências científicas apontam uma característica de pró-fármaco do SbV, sendo este metabolizado no interior de macrófagos e do parasito à forma trivalente ativa. Mais recentemente, descobriu-se ainda que a forma pentavalente, possui atividade anti-*Leishmania* intrínseca, pela capacidade de se complexar com a DNA polimerase do tipo I, inibindo assim o

desenrolamento e clivagem do DNA, induzindo a célula à morte celular semelhante a apoptose (FRÉZARD *et al.*, 2013). Devido ao uso indiscriminado desses compostos, tem sido observada aquisição de resistência e um dos mecanismos mais aceitos para isso, seria a perda da capacidade de reduzir SbV a SbIII, como tem sido observado em experimentos realizados utilizando amastigotas axênicos de *Leishmania donovani* (SHAKED-MISHAN *et al.*, 2001).

A pentamidina é a droga de segunda escolha comumente recomendada, sendo uma molécula de grande interesse no tratamento da leishmaniose visceral e mucocutânea refratária a antimoniais pentavalentes, embora também apresente efeitos adversos significantes e requeira a administração parenteral. De caráter catiônico, pode apresentar-se sob a forma de isotionato ou cloridrato. (AMATO *et al.*, 2000). A alta toxicidade desta droga, com relatos de morte repentina, é um fator limitante de seu emprego terapêutico. Dentre os principais efeitos adversos ou colaterais, estão a hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade (HEKIMI *et al.*, 2016). Um possível mecanismo de ação dessa droga é a sua acumulação na mitocôndria (Basselin *et al.*, 2002), podendo aumentar significativamente a eficácia de inibidores do complexo II da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (MEHTA, 2002).

A paromomicina por sua vez, é um aminoglicosídeo utilizado no tratamento da criptosporidíase, amebíase, giardíase e topicamente para tricomoníase. Seu mecanismo de ação consiste na inibição de síntese proteica, através de ligação às proteínas ribossômicas induzindo a leitura equivocada do RNAm; desta forma, interfere no complexo de formação de peptídeos causando ruptura dos polissomos em monossomos não funcionais (GOTO e LINDOSO, 2010; RAJASEKARAN e CHEN, 2015). Esta droga é administrada por via endovenosa, na dose de 16-20 mg/kg diariamente durante 21 dias ou 12-20 mg/kg/dia em combinação com antimoniais. Efeitos tóxicos, como nefrotoxicidade e ototoxicidade são associados com excessos de doses recomendadas e o uso concomitante de outros agentes com toxicidades similares. Casos de resistência foram relatados em isolados de promastigotas de *L. aethiopica* e *L. donovani* associada com a absorção diminuída da droga (SOARES *et al.*, 2002).

Já a anfotericina B (AB) é um antibiótico macrolídeo, derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, pertence ao grupo dos fármacos leishmanicidas de segunda geração e é usada extensivamente no caso de falhas no tratamento com compostos antimoniais e pentamidina (DOGRA e SAXENA, 1996). O mecanismo de ação, assim como da toxicidade, envolve a formação de poros artificiais ao longo da membrana celular do parasito e do hospedeiro por inibição da síntese do ergosterol, um importante componente de membrana,

alterando a permeabilidade seletiva a cátions o que conduz à morte celular por lise coloidal osmótica devido ao influxo iônico exacerbado (COHEN, 1998).

A anfotericina B clássica (desoxicolato) é efetiva na LC e LM, seu uso é limitado pelos efeitos adversos, que incluem anafilaxia, trombocitopenia, dor generalizada, convulsões, calafrio, febre, flebite, anemia, anorexia, diminuição da função tubular renal e hipocalcemia em um terço dos doentes. Uma alternativa à redução da toxicidade é o uso de novos sistemas de liberação, tais como lipossomas, nanotecnologia e polímeros carreadores (COHEN, 1998; KAYSER *et al.*, 2003; NAN *et al.*, 2004). A AB em lipossoma é incorporada pelo macrófago, onde se abriga o parasito, praticamente não reagindo com o colesterol das células do hospedeiro, aumentando a eficácia e tolerabilidade da droga.

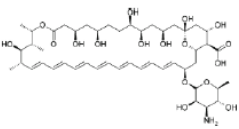
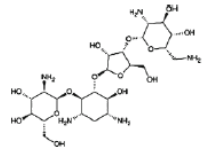
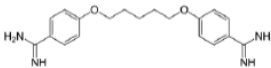
Comercial	Nome Fármaco	Fórmula Estrutural	Fórmula Molecular	MM(g/mol)	Efeitos Colaterais
Pentostam®	Estibogluconato de sódio	ND	$C_{12}H_{38}Na_3O_{26}Sb_2$	ND	Pancreatite, cardiotoxicidade, insuficiência renal e hepática
Fungizone®	Anfotericina B		$C_{47}H_{73}NO_{17}$	924,08	Nefrotoxicidade, anafilaxia, trombocitopenia, dores generalizadas e convulsões
Humatin®	Sulfato de paramomicina		$C_{23}H_{47}N_5O_{18}S$	615,63	Nefrotoxicidade, ototoxicidade
Pentamidina	Isotionato de pentamidina		$C_{19}H_{24}N_4O_2$	340,42	Hipotensão, hipoglicemia, náuseas e vômitos
Glucantime®	Antimoniato de meglumina	ND	$C_{14}H_{29}O_{10}N_2Sb$	ND	Pancreatite, cardiotoxicidade, insuficiência renal e hepática

Figura 08: Principais efeitos colaterais dos medicamentos de referência utilizados para o tratamento das leishmanioses.

Fonte: SANTOS *et al.*, 2008. ND – Fórmula estrutura não determinada. MM – massa molecular.

2.10 Compostos naturais com atividade anti-*Leishmania*

Os produtos naturais são compostos extraídos de plantas, organismos marinhos, fungos ou bactérias. Muitas pesquisas para novas drogas são baseadas nestas moléculas, principalmente por seus benéficos à saúde, sua eficácia e segurança terapêutica. No Brasil, existe uma extensa e diversificada flora, permitindo que este seja um país privilegiado no ramo da pesquisa farmacológica de fitocompostos (EDRIS, 2007).

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e por muito tempo estes se constituíram como a base para drogas da humanidade. Com o advento da Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica houve uma intensa conversão na preferência para os derivados sintéticos. As razões para tal são de ordem econômica, produtiva e gerencial; no entanto, em torno de 25% das drogas prescritas no mundo todo advém de plantas, e das 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela OMS (WHO, 2016), 11% são exclusivamente de plantas (RATES, 2001).

O crescimento da resistência as drogas e alta toxicidade dos medicamentos da atualidade que combatem as leishmanioses sugere que a monoterapia deve ser revisada, o uso racional e simultâneo de várias drogas com sinergismo pode reduzir os problemas atribuídos a estes medicamentos.

Uma grande variedade de moléculas de origem natural possui atividade leishmanicida, destacando-se entre estes os terpenos e alcaloides, que se mostram como fontes promissoras de novos compostos e também podem servir como base para o desenvolvimento de análogos bioativos para combater formas resistentes destes protozoários. Exemplos destes (O extrato da *Mentha crispera*, os monoterpênicos rotundifolona e álcool perílico e o alcaloide piplartina) são descritos a seguir por já terem sido estudados em alguns modelos de doença com boas atividades farmacológicas.

2.10.1. *Mentha crispera*

A *Mentha crispera*, da família *Lamiaceae*, é um híbrido originário do cruzamento entre a *Mentha spicata* L. e a *Mentha suaveolens* Ehlh (FJA, 1991). Devido à complexidade taxonômica na identificação da espécie, esta também pode ser denominada *Mentha x villosa* Hudson ou *Mentha spicata* L. (HARLEY *et al.*, 1990) e apresenta-se como uma planta herbácea rasteira, aromática, amplamente distribuída em praticamente todo território nacional, sendo conhecida popularmente como "hortelã-da-folha-miúda", "hortelã-panela" ou "hortelã-rasteira" (R, 1983; ER, 1993).

O gênero *Mentha* (comumente conhecido como menta) compreende aproximadamente 19 espécies e 13 híbridos naturais e é uma das mais populares culturas de óleos essenciais, devido à notável diversidade química e bioatividade de seus compostos secundários. As plantas são comumente conhecidas por seu uso culinário como especiarias, temperos, chás e infusões, enquanto seus compostos isolados são usados como aromas em pasta de dentes, enxaguatórios

buciais anti-sépticos, purificadores de sopro, gomas de mascar, bebidas, sobremesas e doces. As folhas e os caules da *Mentha crisper* são amplamente empregados ainda na medicina tradicional por sua propriedade antiparasitária contra *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica* (DIMECH, 2006). Essa atividade culminou no desenvolvimento do fitoterápico Giamebil plus® que contém como único princípio ativo o extrato hidroalcoólico (EHA) das partes aéreas o qual, também demonstrou ser eficaz em mulheres com infecção por *Trichomonas vaginalis*. Foi relatado ainda que o óleo essencial da espécie híbrida *Mentha crisper* L. (*syn. Mentha x villosa* Huds.) exibe atividade larvídica contra *Aedes aegypti* e *Schistosoma mansoni*, o que pode ser atribuído à elevada porcentagem de terpenos encontrada neste metabólito.

2.10.2. Terpenos

Os terpenos são compostos lipofílicos que formam uma diversificada classe de substâncias (SIKKEMA J, 1995; MORALES-YUSTE *et al.*, 2010) e constituem a maior família de produtos naturais. O termo terpeno é empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidade de isopreno (SIMÕES e PETROVICK, 2004). A unidade isoprênica, por sua vez, origina-se a partir do ácido mevalônico, que se polimeriza para originar moléculas de cadeias crescentes de cinco em cinco átomos de carbono (C5). Os principais terpenos formados são: os monoterpenos (C10) , a partir do acoplamento de duas unidades de isopreno e os sesquiterpenos (DE VRIESE *et al.*, 2000) com a montagem de três unidades de isopreno (BAKKALI *et al.*, 2008).

Os terpenos possuem inúmeras atividades biológicas como, ação anti-inflamatória, bactericida, antiparasitária, entre outras (BEZERRA *et al.*, 2009). Sua lipofilicidade facilita a penetração na bicamada lipídica de membranas celulares e, conseqüentemente provoca alterações na organização da cromatina nuclear e do cinetoplasto de protozoários, gerando também um aumento do volume da mitocôndria, que pode levar parasitos como a *Leishmania* à morte, além de alterar a permeabilidade e integralidade celular (MORALES-YUSTE *et al.*, 2010; SIKKEMA J, 1995; MORALES-YUSTE *et al.*, 2010). Exemplos de terpenos com atividade anti-*leishmania* já estudada são a rotundifolona o álcool perílico e seus derivados.

2.10.2.1 ROTUNDIFOLONA

A rotundifolona é considerada uma cetona monoterpênica de peso molecular igual a 166,219 g/mol e sua concentração no óleo essencial pode variar de 55,5% a 63,5%, dependendo da região de cultivo ou do período de coleta (FJA, 1991; GUEDES, 2004).

Este se trata de um dos compostos predominantes encontrados em muitas espécies de plantas do gênero *Mentha*, de modo que o óleo essencial de *M. crispera* contém geralmente cerca de 70% de rotundifolona. Para esta, tem sido relatada uma forte ação tripanocídica contra formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas na América Latina, com valores de $IC_{50} < 10 \mu\text{g} / \text{mL}$ (SILVA, 2015).

2.10.2.2 ÁLCOOL PERÍLICO

O Álcool Perílico (AP) é um monoterpene monocíclico hidroxilado, isolado de óleos essenciais de hortelã, sementes de aipo e cerejas. Estudos *in vitro* e em animais mostraram que o AP é citotóxico para uma grande variedade de células promovendo regressão de tumores pancreáticos, hepáticos, de mama e glioblastomas e possui ação quimiopreventiva em câncer de cólon, pele e pulmão. Trabalhos clínicos na FASE I apontam para a sua utilidade em seres humanos (SUFFNESS, 1991).

O composto perilaldeído 8,9-epóxido é um derivado sintético estruturalmente correlacionado ao álcool perílico, pertence à classe p-metano. Num estudo da percentagem de inibição de crescimento de células (GI%) por Andrade e Colaboradores em 2016, o álcool perílico e seu derivado perilaldeído 8,9-epóxido foram avaliados contra linhas de células tumorais de adenocarcinoma de ovário, carcinoma de cólon e glioblastoma. O estudo indicou que a presença das funções epóxido e aldeído podem ser um determinante para alta citotoxicidade do composto (ANDRADE *et al.*, 2016).

O AP é considerado o agente anti-câncer mais potente entre os monoterpenos (MN, 1997; JT, 1998; PL, 1999), e dado os resultados promissores encontrados em ensaios clínicos com seu derivado (perilaldeído 8,9-epóxido), e com o entendimento de que a mudança estrutural pode revelar novas possibilidades para o tratamento do câncer (ANDRADE *et al.*, 2016), bem como ampliar a área de pesquisa com estes compostos para outros modelos de doenças, o interesse por tais moléculas é justificado, principalmente no que diz respeito às doenças parasitárias de difícil controle e com escassez de terapias efetivas na atualidade.

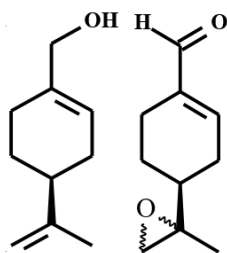


Imagem 10: Estruturas químicas do álcool (S) - (') - perilílico e perilaldeído 8,9-epóxido.

Fonte: *In Vivo* Anti-Tumor Activity and Toxicological Evaluations of Perillaldehyde 8,9-Epoxy, a Derivative of Perillyl Alcohol – ANDRADE et al., 2016 – Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 32; doi:10.3390/ijms17010032

2.10.5 Piplartina

A Piplartina é um alcaloide / amida biologicamente ativa, encontrado em espécies do gênero *Piper* tais como, *P. longum* L. (Pimenta Longa), *P. tuberculatum* L. (Pimenta d'água), *P. asborescens* Roxb. (Pimenta do fruto ganchoso). A pimenta longa é um dos elementos mais amplamente utilizados na medicina ayurvédica, para o tratamento de diversas doenças (BEZERRA *et al.*, 2013). As atividades farmacológicas relatadas desse composto incluem ação citotóxica, genotóxica, anti-tumoral, antinociceptiva, ansiolítica, antidepressiva, anti-aterosclerótica, antidiabética e microbicida (BEZERRA *et al.*, 2013) inclusive contra parasitas, agindo como uma molécula tripanocida (DA SILVA, 2008), e leishmanicida (BODIWALA *et al.*, 2007).

A pipartina exibiu em estudos, significativa atividade *in vitro*, contra formas promastigotas de *Leishmania donovani*, e reduziu a carga parasitária e o peso do baço utilizando um modelo *in vivo* de leishmaniose visceral em hamster a partir da administração de uma dose de 30 mg / kg (BODIWALA *et al.*, 2007).

A pipartina em sua estrutura possui um fenilpropanóide, chamado ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico que é frequentemente utilizado para a síntese de análogos, tais como ocorreu em um trabalho realizados por Masic e colaboradores em 2015 (Masic, *et al.*, 2015). Foi isolado e identificado o éster Cafeato de borneol, um fenilpropanóide derivado do ácido caféico com (-)-borneol, este composto proporcionou um IC₅₀ de 48,8 µM contra cepas de *L. (L.) major*, semelhante a atividade do medicamento controle a miltefosina (CI₅₀ igual a 36.2 µM). Essa molécula serviu como base para a síntese de diversos análogos dentre estes, seu enantiômero teve um IC₅₀ de 45,8 µg e outras derivações como a do éster do ácido caféico diacetato com (-)-borneol proporcionou um IC₅₀ de 30,7 µg contra cepas de *L. (L.) major* porém, teve alta toxicidade contra células da linhagem J744.1 (Macrófagos oriundo de

camundongos BALB/c). Estudos de Relação Estrutura - atividade mostraram que em geral, os compostos possuindo um Brenzcatequina foram ativas, mas também citotóxicas contra células hospedeiras devido à oxidação, enquanto compostos análogos sem a substituição 3,4-di-hidroxi no anel fenilo permanecia ativa, mas menos tóxica (GLASER *et al.*, 2014). Além disso, verificou-se que a atividade biológica e a toxicidade desses derivados estão envolvidas com a presença do grupo carbonila α , β insaturado e que a redução ou substituição de qualquer um dos dois grupamentos insaturados originam moléculas sem citotoxicidade e com atividade reduzida (BEZERRA *et al.*, 2008; COTINGUIBA e R.M.B., 2009; BEZERRA *et al.*, 2013).

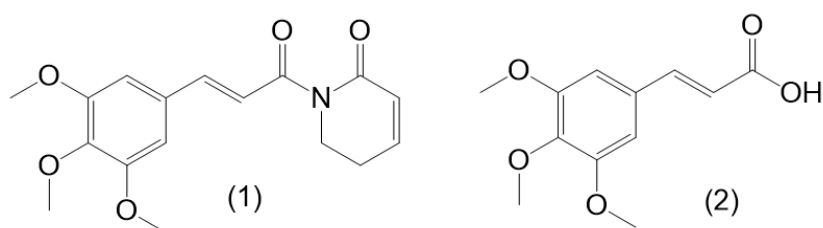


Figura 11: Estruturas químicas da Piplartina (1) e Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico (2)

Fonte: (BEZERRA *et al.*, 2013; CURY *et al.*, 2015)

Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o impacto e a dificuldade no tratamento das leishmanioses, se faz necessário a busca por novos compostos que possam vir a substituir as terapias atuais ou, atuar como adjuvantes no tratamento dos doentes, os quais sofrem com as consequências dos efeitos colaterais, além dos métodos de administração e esquemas terapêuticos complexos que geram muitas outras co-morbidades

O fácil acesso aos produtos naturais e o fato destes tratarem-se de uma fonte renovável e promissora, incita a investigação de suas propriedades frente as diversas espécies de *Leishmania*, as quais podem exibir padrões distintos de resistência ou susceptibilidade às drogas, o que pode alterar a terapêutica atualmente existente, mediante a implantação de esquemas personalizados de acordo com a apresentação clínica e espécie de parasita envolvido. Além disso, é necessário a investigação das propriedades toxicológicas destes compostos (assim como de qualquer fármaco ou medicamento em potencial) nas diferentes linhagens celulares do hospedeiro a fim de garantir segurança e eficácia terapêutica.

Visto os inúmeros benefícios das diferentes classes de moléculas antes mencionadas (item 2.10), houve um interesse em estudá-las para o modelo de doença em questão (leishmaniose) utilizando ensaios *in vitro* a fim de verificar as propriedades anti-*Leishmania* e sua inocuidade em células sanguíneas humanas.

Objetivo



4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

Estudar os efeitos de 36 derivados sintéticos de metabólitos secundários de plantas (monoterpenos e alcaloides) contra diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, bem como avaliar sua ação citotóxica contra linhagens de células sanguíneas humanas.

4.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade inibitória das substâncias-teste frente as formas promastigotas das espécies *Leishmania donovani*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*.
- Calcular a concentração inibitória mínima de todas as substâncias testadas e determinar a mais potente
- Determinar o efeito citotóxico da substância com maior ação anti-*Leishmania*, contra as linhagens eritrocítica e mononuclear do sangue periférico de humanos saudáveis.

Metodologia



5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Cultivo das formas promastigotas dos parasitas

Os parasitas utilizados nesse estudo foram mantidos em meio Schneider[®] (Sigma Chemical -t. Louis, MO, USA), suplementado com 20% de soro bovino fetal, 2% de urina humana masculina e 1% de antibiótico - penicilina 200U/mL- (Sigma Chemical -t. Louis, MO, USA) com pH 7,0 em garrafas estéreis para cultura de células. Foram utilizados para os experimentos as formas promastigotas de *Leishmania donovani* (MHOM/ET/1967/HU3), *Leishmania infantum* (Isolado clínico de paciente com Leishmaniose visceral – Natal/RN) e *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) incubados em estufa refrigerada à temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Biochemical Oxygen Demand - B. O. D). Os protozoários passaram por repiques sucessivos e os testes foram realizados com os mesmos em fase logarítmica de crescimento celular (RODRIGUES *et al.*, 2015).

5.2 Compostos em Estudo

Devido a excelente atividade leishmanicida da piplartina (1) mencionada no item 2.10.5 considerando também a importância das modificações moleculares na atividade biológica de diferentes compostos, 32 análogos foram preparados tomando como molde o ácido 3,4,5-Trimetoxicinâmico (2), ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico (3) e 3',4',5'-Trimetoxiacetofenona (4), produzindo moléculas com as funções amida e éster a partir das reações de esterificação e amidação ilustrados abaixo.

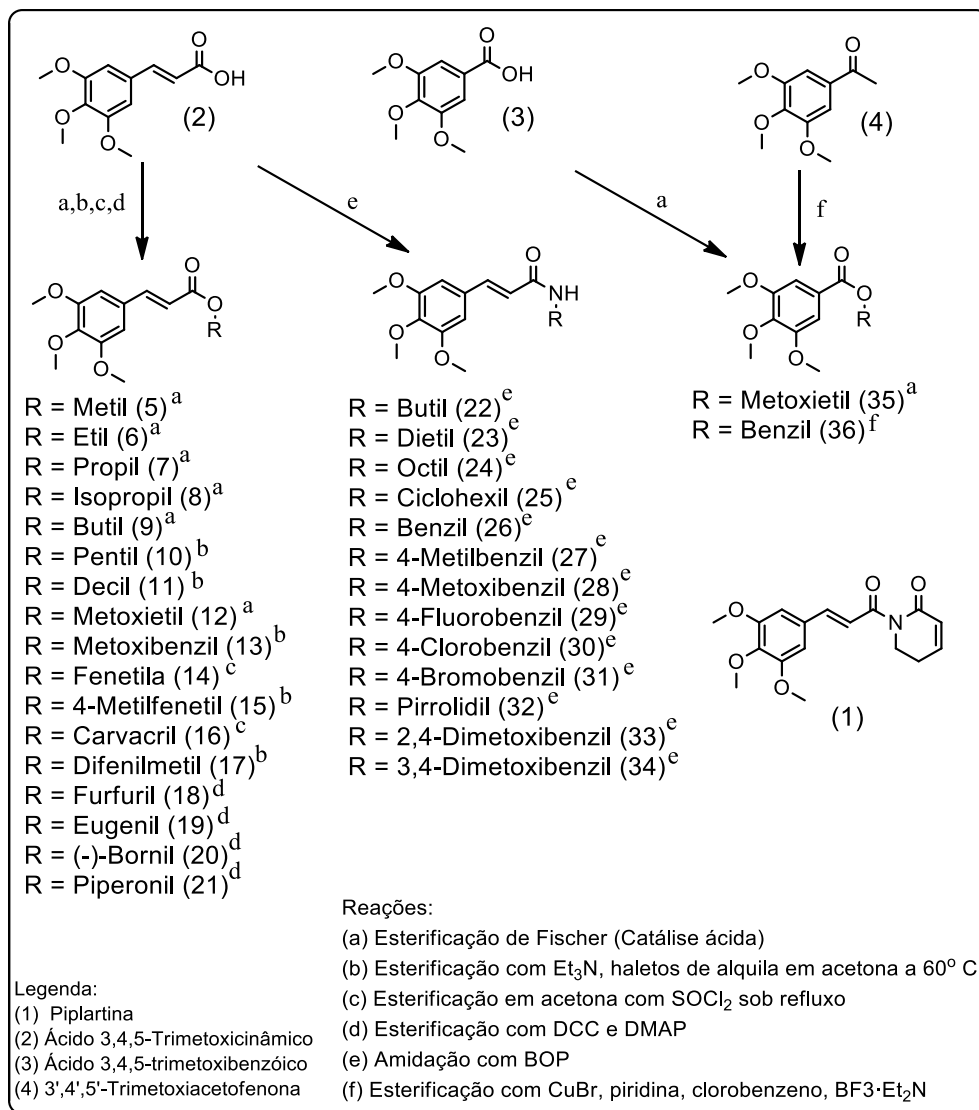


Imagem 12: Análogos da pirplatina (1) e respectivas reações de preparação.

Fonte: LI *et al.*, 2012; KONGKATHIP *et al.*, 2013

Além disso, foi feita a avaliação do monoterpeno rotundifolona (RD) isolado da *Mentha Crispa*, e o extrato desta planta (MC) frente as suas propriedades anti-*Leishmania* contra formas promastigotas do parasita, bem como de derivados do álcool perfílico (1,2 epóxido- perialdeído e 8,9 epóxido perialdeído) mencionados no item 2.10.4, antes estudado contra linhagens de células tumorais, gerando um estudo inovador destas moléculas frente a um novo modelo de doença.

As substâncias teste foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Damião Pergentino de Sousa, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba. Os 36 compostos em estudo além do controle positivo utilizado, a Anfotericina B, mostraram boa solubilidade em CH₂CL₂ (diclorometano) e DMSO (Dimetilsulfóxido), à 25°C e 1 atm, sendo

este último escolhido como solvente na concentração de 0,5% que é isenta de toxicidade para as linhagens celulares avaliadas. As drogas foram submetidas a um *screening* inicial pelo método de viabilidade celular através do corante MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil) - 2,5-difeniltetrazolio contra duas espécies de *Leishmania* (*L. amazonensis* e *L. donovani*), sendo a mais efetiva contra esta última submetida a testes *in vitro* com formas promastigotas de *L. infantum* e posteriormente à testes de citotoxicidade em eritrócitos e células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos saudáveis.

5.3 Atividade anti-leishmania das substâncias-teste sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. donovani* e *L. infantum*

A atividade anti-*Leishmania* em formas promastigotas foi avaliada utilizando o teste do MTT. Após a cultura celular como antes descrito, foram mantidas as formas promastigotas das diferentes espécies do parasita (1×10^6 células) - *L. amazonensis*, *L. donovani* e *L. infantum* - em contato com as crescentes concentrações de substâncias-teste (400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL e 3,125 µg/mL) em placa estéril de 96 poços com meio Schneider® durante 72 horas; no fim desse tempo de incubação, foi adicionado à cada poço 10 µL do corante MTT (diluído em PBS até uma concentração final de 5 mg/mL) e em seguida a placa foi incubada durante mais 4 horas. Ao fim desse tempo, foi adicionado 50 µL de uma solução de Dodecil Sulfato de Sódio (ALVAR, JORGE *et al.*, 2012) (Sigma Chemical -t. Louis, MO, USA) e deixado overnight para dissolução dos cristais de formazan. Finalmente, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Biotek modelo Elx800) à 540 nm. O controle negativo foi realizado com meio Schneider, considerado como 100% de viabilidade dos parasitas (SOARES *et al.*, 2007).

5.4 Determinação da citotoxicidade da substância EP-2 frente à eritrócitos humanos

A determinação da atividade hemolítica da molécula EP-2 em estudo, foi realizada a partir da coleta de amostras de sangue periférico humano (cerca de 5 mL), de acordo com o método descrito por Jaén e colaboradores em 2008, de voluntários adultos e saudáveis O⁺ (n = 3), utilizando material estéril (agulhas e seringas BD Plastipak® - BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e veiculadas em tubos a vácuo (Greiner bione, Vacuette, Americana, SP, Brasil), contendo EDTA como anticoagulante. Após a coleta, o sangue foi diluído para um volume final de 80 µL (Sigma Chemical -t. Louis, MO, USA) para se chegar a uma suspensão com

concentração de 5% de hemácias. Posteriormente, foram adicionadas as concentrações pré-estabelecidas de 8,9-epóxi-perialdeído, bem como da anfotericina B, diluídos num volume de 20 µL de PBS seguindo-se por incubação por 1 h a 37°C, sendo a reação interrompida pela adição de 200 µL de PBS. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 2000 rpm, por 10 minutos a temperatura ambiente (25 °C) sendo 100 µL do sobrenadante coletados e transferidos para placas de 96 poços de fundo reto para proceder a leitura em espectrofotômetro (Biotek modelo Elx800) a 550 nm. Foi avaliado a concentração de hemoglobina livre a partir da lise dos eritrócitos com formação de uma coloração avermelhada no sobrenadante. A ausência de lise (controle negativo) e lise total de glóbulos vermelhos (controle positivo) (OLIVEIRA *et al.*, 2006) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril (lise por choque hipotônico), respectivamente (LÖFGREN *et al.*, 2008).

5.5 Avaliação da citotoxicidade da substância EP-2 frente às células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Foi realizada a coleta de amostras de sangue periférico humano (cerca de 15 mL) de 3 voluntários adultos e saudáveis utilizando material estéril (agulhas e seringas BD Plastipak® - BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e veiculadas em tubos a vácuo (Greiner bione, Vacuette, Americana, SP, Brasil) contendo heparina como anticoagulante. O sangue foi transferido para tubo falcon estéril (50 mL) e diluído no mesmo volume de PBS 1x (Sigma Chemical -t. Louis, MO, USA), sendo adicionado após a diluição 15 mL de Ficoll Hystopaque (Sigma Chemical - t. Louis, MO, USA). O sangue foi submetido a centrifugação (1300 rpm por 40 min a 25°C) e ao final desta, o anel de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) foi coletado e transferido para um tubo falcon de 50 mL, completando o volume para 45 mL com PBS seguindo-se com a centrifugação (1300 rpm por 10 min a 4°C), sendo o sobrenadante desprezado e as células ressuspensas em 1 mL de RPMI. Os monócitos viáveis foram quantificados em câmara hemocitométrica de Neubauer na presença do corante vital azul de Tripán 0,4% (190 µL de célula + 10 µL de azul de trypan). Após quantificado, foi transferido uma concentração aproximada de $2,5 \times 10^5$ por poço de células viáveis para placa de 96 poços de fundo reto, e a estas foram adicionadas concentrações equivalentes ao CI_{50} (1 x) e quatro vezes (4 x) o valor de CI_{50} da substância- teste, sendo a placa posteriormente incubada durante 24 horas à 37°C em estufa com 5% de CO_2 . Seguiu-se com execução da metodologia de

determinação da viabilidade celular por MTT, para avaliação da concentração de substância capaz de reduzir em 50% o número de células. O controle negativo foi realizado com meio RPMI 1640 (Cutilab - São Paulo, SP, Brasil) suplementado a 0,5% de DMSO (Sigma Chemical -t. Louis, MO, USA) e considerado como 100% de viabilidade dos monócitos e linfócitos (PARISI, 2014).

5.6 Análises estatísticas

Os ensaios foram realizados em triplicata e em experimentos independentes, sendo analisados com o auxílio do software GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, USA). A concentração inibitória (CI₅₀) foi calculada usando curvas dose-resposta e intervalos de 95% de confiança foram incluídos. O valor de CI₅₀, CH₅₀ e CC₅₀ (concentração da droga capaz de inibir 50% do crescimento celular dos parasitas, eritrócitos e CMSP respectivamente) foi calculado usando a Regressão linear e assumindo um nível de confiança de 95% ($p < 0.05$). Foi realizada Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Tukey, tomando um valor de $p < 0,05$ como o nível mínimo necessário para a significância estatística.

Resultados



6.2 Análise da atividade anti-*leishmania* da substância EP-2 sobre formas promastigotas de *L. infantum*

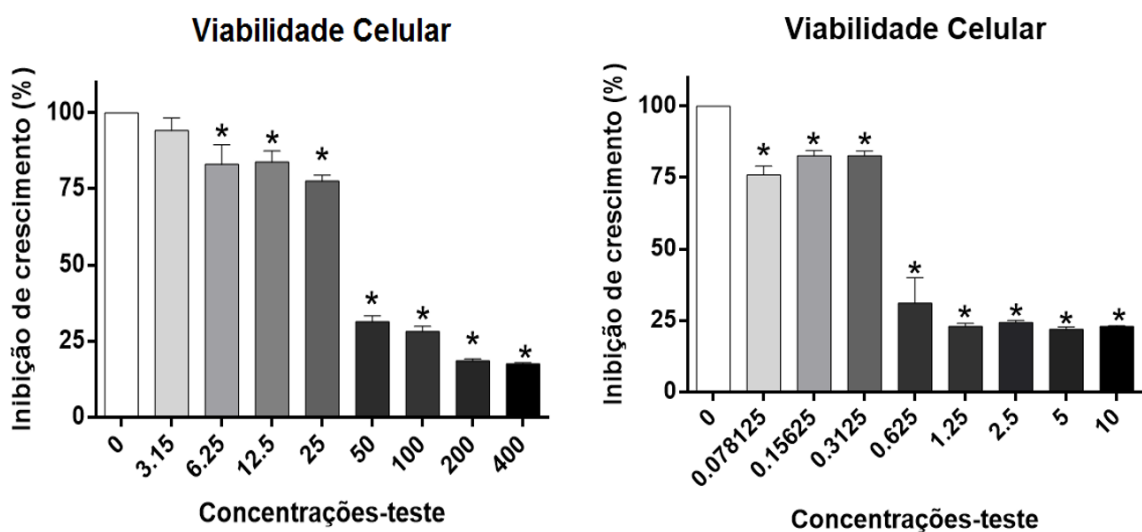
Dado os resultados obtidos com o *screening* inicial, foi selecionada a substância que mostrou melhor ação sob as formas promastigotas de *L. donovani* – EP2- para testes frente a *L. infantum* que é tida como a principal espécie envolvida com a leishmaniose visceral no Brasil. Os resultados mostraram um comportamento diferente da *L. infantum* frente à droga em estudo, sendo esta mais resistente do que a *L. donovani*, de modo que houve variação de IC₅₀ de 3,87 ± 0,8 para 45,1 ± 9,43 em relação às duas espécies. Este achado, no entanto, não foi verificado para as drogas de referência, já que a Anfotericina B apresentou valores de IC₅₀ de 0,722 ± 0,03 para *L. donovani* e 0,57 ± 0,02 para *L. infantum* e o Antimoniato de meglumina se mostrou igualmente pouco efetivo (IC₅₀ = 9417 ± 482).(Tabela 2).

Tabela 2- Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (IC₅₀) de *L. infantum* após 72 h de incubação com o composto EP-2 em relação aos fármacos de referência.

Substância	IC ₅₀ (µg/mL ⁻¹)
EP-2	45,1 ± 3,4
Anfotericina B	0,57 ± 0,02
Antimoniato de meglumina	9417 ± 482

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média de IC₅₀ de todas as substância-teste frente às espécies de *L. amazonensis* e *L. donovani* (Calculada em 3 experimentos independentes) ± erro padrão da média, analisados por ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; $p < 0,05$ comparado ao grupo controle não-tratado.

Gráfico 2: Inibição das formas promastigotas de *L. infantum* por EP-2 e Anfotericina B



Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum* pela EP-2 e Anfotericina B. (calculada em 3 experimentos independentes) \pm erro padrão da média, analisados por ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

6.3 Avaliação da citotoxicidade da substância EP-2 e drogas de referência frente a eritrócitos humanos

A EP-2 foi submetida em seguida a testes de citotoxicidade para averiguar sua capacidade em lizar os glóbulos vermelhos humanos. Os dados obtidos são necessários para correlacionar a citotoxicidade *in vitro* com danos celulares *in vivo*, baseados em lesão ou formação de poros na membrana plasmática dos eritrócitos. Os resultados demonstraram um nível de segurança elevado da droga frente a este parâmetro visto que, a concentração que lisa 50% dos eritrócitos é $> 400 \mu\text{g/mL}$ – maior concentração utilizada no teste, ou seja, não foi observado destruição significativa das hemácias nem em altas concentrações da substância, o que por sua vez demonstrou vantagem quando comparado aos controles positivos, Anfotericina B que apresentou CH_{50} equivalente a $10,73 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$ e Antimoniato de meglumina com CH_{50} de $429,5 \pm 41,35$ (Tabela 4).

Tabela 3: Concentração capaz de lizar 50% das hemácias (CH_{50}) da EP-2 e fármacos de referência após 1 h de incubação.

Substância	$\text{CH}_{50} (\mu\text{g/mL}^{-1})$
EP-2	>400
Anfotericina B	$10,73 \pm 0,6$
Antimoniato de meglumina	$429,5 \pm 41,35$

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média (calculada em 3 experimentos independentes) \pm erro padrão da média, analisados por ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

6.4 Avaliação da citotoxicidade da substância EP-2 e drogas de referência frente à CMSP humanos

Foi avaliado ainda a toxicidade da substância EP-2 e fármacos de referência contra os glóbulos brancos sanguíneos, utilizando o protocolo de isolamento de CMSP descrito no item 4.6, baseado nos valores de IC_{50} obtidos contra as formas promastigotas de *L. donovani*. Os resultados obtidos por esse teste demonstraram que a droga analisada não se mostrou citotóxica às células avaliadas, o que pôde ser constatado pelos achados de 100% de viabilidade celular em ambas concentrações de $1 \times \text{CI}_{50}$ e $4 \times \text{CI}_{50}$ obtidos, comparados ao nosso controle negativo constituído de DMSO 0,5% em meio RPMI que representa 0% de citotoxicidade e, portanto, é equivalente a 100% de absorbância. Logo, a Concentração Inibitória Mínima capaz de destruir

50% das CMSP (CC₅₀) foi equivalente a > 16 µg/mL, por ser esta a maior concentração utilizada neste experimento. Nas drogas de referência foi verificado um comportamento diferente pois estas diminuíram de forma significativa a viabilidade dessa linhagem celular, em concentrações abaixo dos valores de IC₅₀, atestando sua toxicidade e seus efeitos danosos à saúde dos pacientes que dependem das mesmas para o controle da doença (Tabela 5).

Tabela 4: Concentração citotóxica para 50% de CMSP (Lage *et al.*, 2015) da EP-2 e fármacos de referência após 24 h de incubação.

Substância	CC ₅₀ (µg/mL ⁻¹)
EP-2	>16
Anfotericina B	0,166 ± 0,06
Antimoniato de meglumina	1035 ± 71,6

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média (calculada em 3 experimentos independentes) ± erro padrão da média, analisados por ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

6.5 Determinação do índice de seletividade da substância em estudo

Partindo dos dados de inibição do crescimento e do ensaio de citotoxicidade frente à eritrócitos humanos e CMSP estimou-se respectivamente a CI₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento das formas promastigotas do parasita), CH₅₀ (concentração citotóxica para 50% dos eritrócitos) e CC₅₀ (Concentração citotóxica para 50% das células mononucleares) da substância testada com melhor atividade anti-*leishmania* - EP-2 - bem como dos fármacos de referência – Anfotericina B e Antimoniato de meglumina, exibidos anteriormente. O índice de seletividade é um indicativo *in vitro* se a substância tem atividade mais seletiva para o parasito do que para a célula humana eritrocitária (IS_E) ou da linhagem mononuclear (IS_C), sendo determinado pela razão entre a CH₅₀ e CI₅₀ e CC₅₀ e CI₅₀, respectivamente (Tabela 4).

Os resultados estão demonstrados na tabela 5 e mostram uma maior seletividade da substância EP-2 para as diferentes espécies de *Leishmania* do que para as células sanguíneas, o que certifica uma maior segurança no uso desta frente a tais parâmetros quando comparadas as terapias de referência que obtiveram valores para o antimoniato de meglumina de SI_H que variaram entre 2,4 , 0,043 e 0,045 e IS_C de 0,04 , 0,104 e 0,1 frente à *L. amazonensis*, *L. donovani* e *L. infantum* respectivamente. Já a anfotericina B resultou em IS_H de 14,8 , 14 e 18,8 e IS_H de 0,23 , 0,21 e 0,29 de nas mesmas espécies (Tabela 5).

Tabela 5: Atividade anti-*leishmania* nas espécies *L. amazonensis*, *L. donovani* e *L. infantum*, efeitos citotóxicos contra células de mamíferos e índice de seletividade do composto EP-2 e fármacos de referência frente as linhagens eritrocítica e mononuclear sanguínea.

	<i>L. amazonensis</i>					<i>L. donovani</i>					<i>L. infantum</i>				
	CI ₅₀	CH ₅₀	IS _H	CC ₅₀	IS _C	CI ₅₀	CH ₅₀	IS _H	CC ₅₀	IS _C	CI ₅₀	CH ₅₀	IS _H	CC ₅₀	IS _C
EP-2	19,95	>400	>20	>16	-	3,87	>400	>103,3	>16	>4,1	45,1	>400	>8,8	>16	-
Anfotericina B	0,722	10,73	14,8	0,166	0,23	0,766	10,73	14	0,166	0,21	0,57	10,73	18,8	0,166	0,29
Antimoniato de meglumina	25740	429,5	2,4	1035	0,04	9916	429,5	0,043	1035	0,104	9417	429,5	0,045	1035	0,1

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam os IS_C (índice de seletividade em CMSP) = CC₅₀/CI₅₀. e IS_H (índice de seletividade com eritrócitos) = CH₅₀/CI₅₀. Para o composto em estudo (EP-2) e drogas de referência.

Discussão



7. DISCUSSÃO

As doenças parasitárias costumam atingir normalmente pessoas de classes sociais inferiores em países subdesenvolvidos, algumas delas como a leishmaniose apresentam curso crônico e lento, condenando geralmente o paciente a um mau prognóstico (STEVERDING, 2017). As leishmanioses são de difícil tratamento devido à localização intramacrofágica do parasita no hospedeiro vertebrado infectado, sendo as terapias restritas e em geral bastante agressivas a esses indivíduos que já estão com a saúde debilitada nas fases mais agudas da doença. Entre os medicamentos usados, os antimonialis pentavalentes (SbS+) antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime[®]) e o estibogliconato sódico (Pentostam[®]) são, na maioria dos países, a primeira opção terapêutica (FRÉZARD e DEMICHELI, 2010). No Brasil, a droga de escolha é o Glucantime[®], que é de distribuição gratuita na rede de saúde pública. O Ministério da Saúde recomenda a dose de 20mg de Sb5+kg/dia por via endovenosa ou intramuscular, durante 20 dias e, no máximo, por 40 dias (SAÚDE, 2006), o que dificulta a adesão ao tratamento, e por existir ainda, além dos efeitos tóxicos intrínsecos do medicamento o agravante da via de administração ser incômoda (NEVES, 2005). Tendo em vista isso, é muito importante a busca por novas terapias que auxiliem como adjuvantes farmacológicos ou que substituam as drogas de primeira escolha utilizadas atualmente.

Como os produtos naturais são uma fonte atrativa de estruturas variadas que apresentam atividades biológicas potentes e desejáveis perfis farmacológicos, estes podem ser utilizados como protótipos para o desenho e o planejamento racional de novas drogas, desenvolvimento de sínteses biomimética e descoberta de novas propriedades terapêuticas até então não atribuídas aos compostos já conhecidos (BOLDI, 2004).

Algumas modificações moleculares são determinantes para mudanças da atividade de moléculas de origem vegetal. A partir desses compostos podem ser sintetizados análogos que potencializam ou não o efeito contra determinado patógeno ou dependendo da ação farmacológica podem causar inibição ou ativação de alguma enzima, receptor, bem como alterar suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas entre diversas outras atividades (FAGAGNA *et al.*, 2003).

Dentre os produtos que são amplamente estudados frente suas ações antiprotozoários estão os óleos essenciais, monoterpenos, amins aromáticas e seus derivados sintéticos, alvos desse projeto.

O trabalho realizado foi bastante satisfatório pois permitiu a determinação de uma substância de origem natural como portadora de uma boa atividade anti-*leishmania* frente à *L. donovani*, *L. amazonensis* e *L. infantum* a partir de testes *in vitro*, em baixas concentrações e que não são tóxicas às células sanguíneas humanas.

As substâncias avaliadas mostraram graus variáveis de inibição do crescimento e morte das formas promastigotas do parasita. Destas, destacou-se a substância EP-2 dotada de uma concentração inibitória mínima de 19,9 µg/mL para *L. amazonensis* e 3,87 µg/mL para *L. donovani*, que é baixa quando comparada ao controle positivo (Anfotericina B), droga de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose visceral e que demonstrou valores de CI₅₀ de 0,722 µg/mL para *L. amazonensis* e 0,766 µg/mL para *L. donovani*, corroborando com dados presentes na literatura que indicam resultados de CI₅₀ de 0,52 ± 0,03 µg/mL para *L. amazonensis* e valores similares para demais espécies (XAVIER *et al.*, 2016). Baseado nisso, foi escolhida a EP-2 para ser submetida aos mesmos testes utilizando, no entanto, uma cepa de *L. infantum* que também é responsável por causar a forma visceral da leishmaniose e é tida como a principal espécie encontrada no território brasileiro. Os resultados obtidos com esse ensaio, no entanto, mostraram um perfil diferente de resposta do parasito à droga, sendo este mais resistente, o que pôde ser constatado pelo valor de CI₅₀ encontrado (45,1 µg/mL), fato que não se reproduziu para o controle positivo (Anfotericina B) que teve CI₅₀ de 0,57 µg/mL, que condiz com outros ensaios já realizados com essa espécie (1,0 ± 0,9 µg/mL) (LAGE *et al.*, 2015). Já o antimoniato de meglumina apresentou no estudo valores muito elevados de CI₅₀ para todas as espécies de *Leishmania*, o que ressalta sua baixa efetividade *in vitro* contra as formas promastigotas do parasita.

As diferenças de valores de CI₅₀ entre as diferentes espécies de *Leishmania*, indicam variações moleculares de interação entre a droga e o parasita ou alterações na própria biologia do microrganismo que determina uma maior ou menor resistência intrínseca à fatores inóspitos.

Mediante esses achados, a EP-2 foi selecionada para testes de citotoxicidade contra os eritrócitos e células mononucleares (monócitos e linfócitos) do sangue periférico de indivíduos saudáveis, o que gerou resultados promissores, determinados com a exposição da droga por certo período de tempo a estas células, seguindo o protocolo de atividade hemolítica e viabilidade celular por MTT a partir do isolamento de CMSP descritos nos itens 4.5 e 4.6 respectivamente. Ambos os testes demonstraram um nível de segurança elevado da substância,

que não provocou hemólise e nem efeito citotóxico das linhagens monocítica/linfocitária. o qual foi averiguado pelo resultado de HC_{50} superior a 400, e CC_{50} igual a $>16 \mu\text{g/mL}$.

O índice de seletividade da EP-2 foi de 103,5 para eritrócitos (IS_H) em relação à *L. donovani*, >20 para *L. amazonensis* e $>8,8$ para *L. infantum* e o IS_C encontrado foi igual a $> 4,13$ para a primeira espécie. Valores superiores a 1, demonstram uma predileção da molécula para o parasita, o que é primordial para a segurança de um fármaco. A anfotericina B teve valores de IS_H 14,8; 14 e 18,8 e IS_C de 0,23; 0,21 e 0,29 e o AM que apresentou valores de IS_H de 2,4; 0,03 e 0,045 e IS_C de 0,04, 0,104 e 0,01 para *L. amazonensis*, *L. donovani* e *L. infantum* respectivamente. Esses achados indicam portanto, uma vantagem da EP-2 em relação as drogas de referência. Reforçando a ideia de citotoxicidade destas, que pode se reproduzir à outras linhagens celulares, podendo explicar os efeitos cardiotoxicos e nefrotóxicos inerentes a estes compostos.

A substância EP-2 é um análogo sintético do álcool perfílico, um metabolito hidroxilado do monoterpene monocíclico d-limoneno (JAMES T, 1998). O AP já foi aprovado pela Food and Drug Administration dos EUA como um aditivo alimentar que pode ser consumido com segurança por humanos exibindo sua natureza não tóxica (FDA, 2014).

As propriedades anticancerosas da AP têm sido extensivamente estudadas sendo sua atividade *in-vitro* contra o câncer de mama, crescimento intracraniano *in vivo* do tumor triplo negativo, câncer pancreático e câncer colo retal metastático bem documentada (ANSARI Ma, 2016).

A atividade antifúngica preliminar de AP também foi relatada, e um estudo realizado por Moiz e colaboradores em 2016 traçou alguns dos mecanismos da ação anti-fungica deste composto contra seis isolados clínicos de *C. albicans*, e verificou-se que todas as estirpes apresentaram susceptibilidade à AP variando de 200-600 $\mu\text{g/mL}$. Foi observado ainda, a ocorrência de alterações nas membranas celulares do fungo, com supra-regulação de genes, sendo descrita a ruptura da membrana celular por AP que também foi avaliada através da estimativa dos níveis de ergosterol, com diminuição acentuada ($P < 0,05$) em cerca de 53% na presença de AP. Este composto ainda, causou danos na parede fúngica, diminuiu a capacidade de aderência das células de *Candida spp.*, suprimiu vários genes associados à reparação do DNA e causou inibição do ciclo celular obstruindo a maquinaria de reparo do DNA, além de comprometer a atividade mitocondrial, com redução considerável para 53% na presença de AP, o que foi averiguado através do teste de viabilidade celular por MTT. Estes mesmo mecanismos

podem envolver à ação deste composto e seus análogos frente à outras espécies de microrganismos como os protozoários do gênero *Leishmania*.

O composto perilaldeído 8,9-epóxido é um análogo sintético do álcool perílico e também vem sendo estudado contra diversos tipos de tumores. Em um estudo recente, o potencial citotóxico de dezoito derivados de p-metano foi investigado, e foi demonstrado que o 8,9-epóxido perilaldeído exibe alta toxicidade para 4 linhagens celulares tumorais (carcinoma de cólon, adenocarcinoma de ovário, glioblastoma e leucemia), com um CI_{50} menor que 4,0 g/mL (Andrade *et al.*, 2015). De acordo com o National Cancer Institute (Bethesda, MD, USA) no seu programa de seleção de fármacos anti-cancer, valores de CI_{50} inferiores ou iguais a 4,0 g/mL são considerados agentes anticancerígenos candidatos (SUFFNESS, 1991).

O efeito promissor deste composto foi afirmado por testes que confirmaram a atividade antitumoral *in vivo* do perilaldeído 8,9-epóxido com potência semelhante ao álcool perílico sem demonstrar alterações estatisticamente significativas nos parâmetros bioquímicos ou histopatológicos testados (Renais e hepáticos) (ANDRADE *et al.*, 2016).

Os resultados obtidos no nosso trabalho indicam que o composto EP-2 é efetivo contra microrganismos pertencentes ao gênero *Leishmania*, além de não causar injúria ou diminuição da viabilidade das células sanguíneas, o que somado aos achados antes mencionados à cerca da isenção de toxicidade em órgão vitais como fígado e rins em um modelo animal (ANDRADE *et al.*, 2016), sugere uma grande vantagem dessa molécula como promissora para o tratamento das leishmanioses. Os mecanismos moleculares de interação da droga com o parasito ainda não foram elucidados, porém os resultados obtidos no estudo realizado por Moiz e colaboradores em 2016 antes citados, sobre a ação do álcool perílico contra diferentes cepas de *C. albicans* podem direcionar à investigação do seu mecanismo de ação que pode interferir em vias semelhantes na célula de *Leishmania* spp.

Conclusão



8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse projeto demonstraram uma boa atividade anti-*Leishmania* do derivado sintético 8,9-epóxido perilaldeído contra as formas infectantes do protozoário *L. donovani*, causador da leishmaniose visceral, que é considerada uma doença grave, endêmica e negligenciada em nosso país, e que, portanto, necessita de incremento no arsenal terapêutico visto que as terapias atuais são demasiadamente agressivas. Os resultados frente à outras espécies, no entanto indicam graus variáveis de sensibilidade da *Leishmania* spp. às drogas testadas, que requer melhores investigações da biologia de cada espécie, bem como das interações moleculares droga-parasito.

Os produtos naturais são grandes fontes de compostos bioativos de importância já demonstrada na medicina alopática; estes tendem a ser abundantes em nossa região visto a rica flora do território brasileiro e podem representar uma alternativa na busca de novas terapias às diversas doenças negligenciadas. A substância estudada no projeto apresentou bons resultados nas análises *in vitro*, além de ser comprovada como não-tóxica aos glóbulos vermelhos e células mononucleares de indivíduos saudáveis, demonstrando vantagem (em relação a esse parâmetro) frente as terapias de referência. Resultado promissor que incita a busca para elucidar os mecanismos de ação da EP-2, além de testes de sua influência na infecção por *Leishmania* em modelos animais e nas células do sistema imunológico.

Referências



9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, G.; MEDEIROS, W. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In **Rangel EF & Lainson R (org.), Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ**, p. 207-255, 2003.
- AKHOUNDI, M. et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *infantu* parasites and sandflies. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349> >.
- ALCOLEA, P. J. et al. Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: High down-regulation rate in the amastigote stage. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 13, p. 1497-1516, 11// 2010. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751910002523> >.
- ALTMANN, K.-H. Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 4, p. 424-431, 8/1/ 2001. ISSN 1367-5931. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593100002258> >.
- ALVAR, J. et al. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035671> >.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671> >.
- AMATO, V. S. et al. Use of itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis: A pilot study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 153-157, 2000/01/01 2000. ISSN 1201-9712. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971200900778> >.
- ANDRADE, L. et al. In Vivo Anti-Tumor Activity and Toxicological Evaluations of Perillaldehyde 8,9-Epoxyde, a Derivative of Perillyl Alcohol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1, p. 32, 2016. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/1/32> >.
- ANDRADE, L. et al. Evaluation of the Cytotoxicity of Structurally Correlated p-Menthane Derivatives. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13264, 2015. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/7/13264> >.
- ANSARI MA, F. Z., HAMEED S. Anticandidal Effect and Mechanisms of Monoterpenoid, Perillyl Alcohol against *Candida albicans*. **PLoS ONE**, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162465> >.

ASHFORD, R. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. . **Clinics in Dermatology** v. 14, p. 523-532, 1996.

AYRES, D. C. M., MARIA CRISTINA AND GIORGIO, SELMA. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 2, p. 215-220, 2007.

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203-211, 2007. ISSN 0738-081X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.05.008> >. Acesso em: 2017/04/21.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507004541> >.

BAÑULS, A.-L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. In: J.R. BAKER, R. M. e ROLLINSON, D. (Ed.). **Advances in Parasitology**: Academic Press, v. Volume 64, 2007. p.1-458. ISBN 0065-308X.

BARRETO, M. L. et al. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **The Lancet**, v. 377, n. 9780, p. 1877-1889, 2011. ISSN 0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60202-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60202-X) >. Acesso em: 2017/04/21.

BASANO, S. A. C., L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol**, v. 37, 2007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003> >.

BERN, C.; COURTENAY, O.; ALVAR, J. Of Cattle, Sand Flies and Men: A Systematic Review of Risk Factor Analyses for South Asian Visceral Leishmaniasis and Implications for Elimination. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, p. e599, 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000599> >.

BEZERRA, D. P. et al. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 156-163, 2008. ISSN 1099-1263. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jat.1261> >.

BEZERRA, D. P. et al. Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 453-463, 2013. ISSN 0928-0987. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098712004757> >.

- BEZERRA, S. B. et al. Bisabolol-Induced Gastroprotection Against Acute Gastric Lesions: Role of Prostaglandins, Nitric Oxide, and K⁺ATP Channels. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 6, p. 1403-1406, 2009/12/01 2009. ISSN 1096-620X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2008.0290> >. Acesso em: 2017/04/21.
- BIFELD, E. et al. Geographical sequence variation in the Leishmania major virulence factor P46. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 30, p. 195-205, 3// 2015. ISSN 1567-1348. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134814004857> >.
- BODIWALA, H. S. et al. Antileishmanial amides and lignans from Piper cubeba and Piper retrofractum. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, n. 4, p. 418-421, 2007. ISSN 1861-0293. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11418-007-0159-2> >.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 121-134, 1998/01/01 1998. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751997001690> >.
- BOLDI, A. M. Libraries from natural product-like scaffolds. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 3, p. 281-286, 6// 2004. ISSN 1367-5931. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593104000560> >.
- BRANNIGAN, J. A. et al. N-Myristoyltransferase from Leishmania donovani: Structural and Functional Characterisation of a Potential Drug Target for Visceral Leishmaniasis. **Journal of Molecular Biology**, v. 396, n. 4, p. 985-999, 3/5/ 2010. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283609015393> >.
- BRASIL, A. N. D. V. S.-M. D. S.-. **Portaria nº 886, de 20 de abril de 2010. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistem Único de Saúde.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília: Poder Executivo 2010.
- AMPOS-PONCE, M. et al. Leishmania chagasi/infantum: further investigations on Leishmania tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. **Experimental Parasitology**, v. 109, n. 4, p. 209-219, 4// 2005. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489404001997> >.
- CERQUEIRA, E. J. L. et al. Considerações sobre pulgas (Siphonaptera) da raposa Cerdocyon thous (Canidae) da área endêmica de leishmaniose visceral de Jacobina, Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 91-93, 2000. ISSN 0037-8682. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822000000100015&nrm=iso >.
- CHAMAILLÉ, L. et al. Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 31, 2010. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-3-31> >.
- CHEN, M. C. S. B. B., J.; LEMMICH, E.; NADELMANN, L. FICH, K.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against

human pathogenic protozoan species of Leishmania. **Antimicrob. Agents. Ch**, n. 37, p. 2550-2556, 2003.

COHEN, B. E. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, n. 1–2, p. 95-106, 3/20/ 1998. ISSN 0378-5173.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517397004171> >.

CORREDOR, A. et al. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 5, p. 480-486, 1989. Disponível em:

< <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1989.40.480> >.

COSTA FILHO, A. V. D. L., ÍRIS CAMPOS AND SAMPAIO, RAIMUNDA NONATA RIBEIRO. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por Leishmania (Leishmania) amazonensis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 41, n. 4, p. 424-427, 2008. ISSN 0037-8682.

COTINGUIBA, F., REGASINI, L.O., BOLZANI, V.S., DEBONSI, H.M., PASSERINI, G.D., CICALI, R.M.B., K., M.J., FURLAN, M., Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Med. Chem. Res.**, n. 9, p. 703–711, 2009.

COUTINHO, M. T. Z. et al. Participation of Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 1–2, p. 149-155, 3/10/ 2005. ISSN 0304-4017. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401704005461> >.

COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 320-325, 2007.

CURY, T. A. C. et al. Cinnamic acid derived compounds loaded into liposomes: antileishmanial activity, production standardisation and characterisation. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 5, p. 467-477, 2015/07/04 2015. ISSN 0265-2048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/02652048.2015.1046518> >.

DA SILVA, C. F. **Atividade de amidinas aromáticas sobre Trypanosoma cruzi: Estudos in vitro e in vivo**. 2008. Tese (Doutorado em ciências) Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

DAVIES, C. R. et al. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. 925-950, 2000. ISSN 0102-311X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2000000400013&nrm=iso >.

DE CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E. I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 599-618, 8// 2001. ISSN 0367-326X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X0100301X> >.

DE LALLA F , P. G., GRADONI L , VESPIGNANI M , FRANZETTI M , STECCA C Prime

Acute pancreatitis associated with the administration of meglumine antimonate for the treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America** p. 730-1, 1993.

DE VRIESE, A. S. et al. Endothelial dysfunction in diabetes. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 5, p. 963-974, 02/14/received 03/22/revised 03/27/accepted 2000. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1572156/> >.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 9// 2004. ISSN 0147-9571. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147957104000232> >.

DI GIORGIO C, F.-G. F., IMBERT A, MINODIER P, GASQUET M, DUMON H. Flow cytometric assessment of amphotericin B susceptibility in *Leishmania infantum* isolates from patients with visceral leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother**, n. 1, p. 71-6, 1999.

DIMECH, G. S. Avaliação do extrato hidroalcoólico de *Mentha crispera* sobre a performance reprodutiva em ratos Wistar. **Rev. bras. farmacogn. [online]**, v. 16, n. 2, p. 152-157, 2006. ISSN 0102-695X.

DO CAMPO, R. M., S.N. The acidocalcisome. **Mol Biochem Parasitol**, n. 114, p. 151-159, 2001.

DOGRA, J.; SAXENA, V. N. Itraconazole and leishmaniasis: A randomised double-blind trial in cutaneous disease. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 12, p. 1413-1415, 1996/12/01 1996. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751996001282> >.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 276, 2012. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-276> >.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007. ISSN 1099-1573. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2072> >.

ER, A. **Plantas medicinais brasileiras - conhecimento popular e científico**. São Paulo: 1993.

ESTERRE, P. et al. Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis: A light microscopical, immunohistochemical and ultrastructural study. **Virchows Archiv A**, v. 421, n. 3, p. 239-247, 1992. ISSN 1432-2307. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF01611181> >.

FAGAGNA, F. D. A. D. et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. **Nature**, v. 426, n. 6963, p. 194-198, 11/13/print 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature02118> >.

FDA. **US Food and Drug Administration**: Food additives permitted for direct addition to food for human consumption 2014.

FERREIRA M. U., F. A. S., SCHUMAKER T. T. S. **Fundamentos da Parasitologia Humana**. Barueri, São Paulo: Manole, 2003.

FIGUEIREDO, F. B. et al. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-Leishmania em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 141-145, 2009. ISSN 0037-8682. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822009000200009&nrm=iso >.

FJA, M. **Farmácias vivas**. 1991. Universidade Federal do Ceará

FOURNET, A. B. A. A. M., V.; HOCQUEMILLER, C.A. Effects of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. **Ann Trop Med Parasitol**, n. 43, p. 219-222, 1992.

FRAME MJ, M. J., & COOMBS GH. Analysis of the roles of cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* in the host-parasite interaction. **Parasitology**, p. 367-77, 2000.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 12, p. 1343-1358, 2010/12/01 2010. ISSN 1742-5247. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2010.529897> >.

FRÉZARD, F. et al. **Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action**. *Reviews in Inorganic Chemistry*. 33: 1 p. 2013.

GLASER, J. et al. Antileishmanial Lead Structures from Nature: Analysis of Structure-Activity Relationships of a Compound Library Derived from Caffeic Acid Bornyl Ester. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1394, 2014. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/2/1394> >.

GOMES-SILVA A.; SOUZA, M. A. A.-C., S. R.; ANDRADE, L.; R.; DIETZE, R. L., E.; BELLI, A.; JÚNIOR, S. F. & FERREIRA, M. S. . Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. **Rev Soc Bras Med Trop**, n. 41, p. 135-141, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004. ISSN 1415-

790X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2004000300011&nrm=iso >.

GONTIJO, C. M. N. E. M., MARIA NORMA. **Revista brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. Número 3, 2004.

GONZÁLEZ, U. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2009. ISSN 1465-1858. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD004834.pub2> >.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010/04/01 2010. ISSN 1478-7210. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1586/eri.10.19> >.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993. ISSN 0893-8512 1098-6618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358284/> >.

GUEDES, D. N. S., D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolone. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, p. 1881 - 1887, 2004.

GUERRA, J. A. D. O. et al. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. e980, 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000980> >.

HARBORNE, J. *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. **Chapman and Hall, London** v. 3, p. 302, 1998.

HARDOK S. DODIWALA, G. S., RANVIR SINGH, CHINMOY SANKAR DEY, SHYAM SUNDAR SHARMA, KAMLESH KUMAR BHUTANI, INDER PAL SINGH. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *piper retrofractum*. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, n. Number 4, p. 418, 2007.

HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403-409, 9// 2011. ISSN 1471-4922. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147149221100064X> >.

HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature**, v. 345, n. 6274, p. 458-460, 05/31/print 1990. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/345458a0> >.

HEKIMI, S.; WANG, Y.; NOË, A. Mitochondrial ROS and the Effectors of the Intrinsic Apoptotic Pathway in Aging Cells: The Discerning Killers! **Frontiers in Genetics**, v. 7, n.

161, 2016-September-14 2016. ISSN 1664-8021. Disponível em: <
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2016.00161> >.

HODGKINSON, V. H. et al. Leishmania amazonensis: Cultivation and Characterization of Axenic Amastigote-like Organisms. **Experimental Parasitology**, v. 83, n. 1, p. 94-105, 1996/06/01 1996. ISSN 0014-4894. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489496900533> >.

HOLZMULLER, P.; BRAS-GONÇALVES, R.; LEMESRE, J. L. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in Leishmania. **Parasitology**, v. 132, n. S1, p. S19-S32, 2006. ISSN 0031-1820. Disponível em: <
<https://www.cambridge.org/core/article/phenotypical-characteristics-biochemical-pathways-molecular-targets-and-putative-role-of-nitric-oxidemediated-programmed-cell-death-in-leishmania/9C6F24B35A1945753AC38EBB358F13DA> >.

JAMES T, B. N. Perillyl alcohol: applications in oncology. **Altern Med Rev**, v. 3, p. 448-457, 1998.

JT, B. Perillyl alcohol: Applications in oncology. **Atern Med Rer**, n. 3, p. 448-457, 1998.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Micro**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 08/print 2011. ISSN 1740-1526. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608> >.

KAYSER, O. et al. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, n. 1, p. 73-75, 3/18/ 2003. ISSN 0378-5173. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517302006865> >.

KONGKATHIP, B. et al. Synthesis of novel naphthoquinone aliphatic amides and esters and their anticancer evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 271-284, 2// 2013. ISSN 0223-5234. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523412007283> >.

KORNBERG, A. Inorganic Polyphosphate: A Molecule of Many Functions. In: SCHRÖDER, H. C. e MÜLLER, W. E. G. (Ed.). **Inorganic Polyphosphates: Biochemistry, Biology, Biotechnology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999. p.1-18. ISBN 978-3-642-58444-2.

LAGE, P. S. et al. Antileishmanial activity and evaluation of the mechanism of action of strychnobiflavone flavonoid isolated from *Strychnos pseudoquina* against *Leishmania infantum*. **Parasitology Research**, v. 114, n. 12, p. 4625-4635, 2015. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-015-4708-4> >.

LEZAMA-DÁVILA, C. M. et al. Pentalinon andrieuxii root extract is effective in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana*. **Phytotherapy research : PTR**, v. 28, n. 6, p. 909-916, 11/08 2014. ISSN 0951-418X

1099-1573. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4136428/> >.

LI, W. et al. Biological activity evaluation and structure–activity relationships analysis of ferulic acid and caffeic acid derivatives for anticancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 19, p. 6085-6088, 10/1/ 2012. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X12010384> >.

LÖFGREN, S. E. et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 2, p. 197-202, 2// 2008. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489407002020> >.

MACHADO, P. R. et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 8, p. 438-444, 07/02 2011. ISSN 0035-9203 1878-3503. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3157292/> >.

MASIC, A. et al. Cinnamic Acid Bornyl Ester Derivatives from *Valeriana wallichii* Exhibit Antileishmanial In Vivo Activity in *Leishmania major*-Infected BALB/c Mice. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0142386, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142386> >.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 206-224, 2004. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00190.x> >.

MEHTA, A. S., C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. **J Biol Chem**, n. 279, p. 11798-11813, 2002.

MICHELS, P. A. M. et al. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 12, p. 1463-1477, 12// 2006. ISSN 0167-4889. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016748890600231X> >.

MISHRA, B. B. et al. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, v. 80, n. 2, p. 81-90, 3// 2009. ISSN 0367-326X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X08002165> >.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 2, p. 309-322, ISSN 0190-9622. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2009.06.088> >. Acesso em: 2017/04/21.

MN, G. Cancer Chemoprevention and therapy by monoterpenes. **Environ Health Perspect**, p. 105:977-979, 1997.

MORALES-YUSTE, M. et al. Activity of (-) α -bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. **Phytomedicine**, v. 17, n. 3–4, p. 279-281, 3// 2010. ISSN 0944-7113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711309001548> >.

NAN, A. et al. Targetable water-soluble polymer-drug conjugates for the treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Controlled Release**, v. 94, n. 1, p. 115-127, 1/8/ 2004. ISSN 0168-3659. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365903004450> >.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 6, n. 9, p. 754-765, 2008. ISSN 1610-0387. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1610-0387.2008.06809.x> >.

NEVES, D. **Parasitologia Humana**. 11. São Paulo: Atheneu Riou, 2005.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007/03/01 2007. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/np068054v> >.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003/07/01 2003. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/np030096l> >.

NYLÉN, S.; EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 12, p. 551-561, 2012. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/pim.12007> >.

OLIVEIRA, L. S. D. et al. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. **2006**, v. 6, n. 1, p. 7, 2006-10-28 2006. ISSN 1809-6891. Disponível em: < <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/345> >.

PARISI, M. M. **Padronização de técnica de purificação de monócitos como modelo de cultura celular para estudo da diferenciação in vitro de macrófagos**. 2014. Dissertação Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica., Universidade Federal do Rio Grande do Sul

PHARMA, A. Bula do medicamento Glucantime®. 2014. Disponível em: < <http://www.bulas.med.br/p/bulas-de-medicamentos/bula/2792/glucantime.htm> >. Acesso em: 15/04/17.

PL, C. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **J Nutr**, p. 129:775S-778S, 1999.

R, B. **Plantas do Nordeste – Especialmente do Ceará**. 4ª. Natal: 1983.

R, M. D. C. Terpenoid Metabolism. **American Society of Plant Physiologists**, n. 7, p. 1015-26, 1995.

RAJASEKARAN, R.; CHEN, Y.-P. P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 8, p. 958-968, 8// 2015. ISSN 1359-6446. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644615001555> >.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 5// 2001. ISSN 0041-0101. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010100001549> >.

RATH S, T. L., IMBRUNITO TR, TOMAZELA DM, JESÚS; MN, M. P. Antimoniais empregados no tratamento de leishmaniose; estado da arte. **Quimica Nova**, p. 550-5, 2003.

READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 227-250, 2013. Disponível em: <
<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-ento-120811-153557> >.

REIS A.B., M.-F. O. A., TEIXEIRA-CARVALHO A., CARVALHO M.G., MAYRINK W., FRANÇA-SILVA J.C., GIUNCHETTI R.C., GENARO O. & CORRÊA-OLIVEIRA R. Parasite density and impaired bio-chemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res. Vet. Sci.**, n. 81, p. 68-75, 2006.

RODRIGUES, K. A. D. F. et al. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 106, p. 1-14, 12/1/ 2015. ISSN 0223-5234. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523415302968> >.

ROSS, R. Further notes of Leishman's bodies. **Br Med J**, v. 2, 1903. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1136/bmj.2.2239.1401> >.

RUIZ FA, R. C., DOCAMPO R. Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem.**, p. 26114-21, 2001.

SAMAILA, D. et al. Monoterpenes Enhanced the Sensitivity of Head and Neck Cancer Cells to Radiation Treatment In Vitro. **Anticancer Research**, v. 24, n. 5A, p. 3089-3096, September 1, 2004 2004. Disponível em: <
<http://ar.iijournals.org/content/24/5A/3089.abstract> >.

SANDJO, L. P. et al. Individual and combined antiparasitic effect of six plant metabolites against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 7, p. 1772-1775, 4/1/ 2016. ISSN 0960-894X. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X16301561> >.

SAÚDE, M. D. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1 ed., série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília-DF. 2006.

Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1 2014.

SAÚDE, P. D. Situação Epidemiológica da leishmaniose- Dados. 2016. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados> >.

SHAKED-MISHAN, P. et al. Novel Intracellular SbV Reducing Activity Correlates with Antimony Susceptibility in *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, p. 3971-3976, February 9, 2001 2001. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/276/6/3971.abstract> >.

SHAW, J. **The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini-review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 102: 541-547 p. 2007.

SHERLOCK, I. A. Importância Médico-Veterinária. . In, **Rangel, E.F. & Lainson, R. Flebotômicos do Brasil, Rio de Janeiro ed. FIOCRUZ**, p. 15-22, 2003.

SIKKEMA J, B. J., POOLMAN B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. n. 59, p. 201–22, 1995.

SILVA, L. H. V. **ESTUDO DO EFEITO INIBITÓRIO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PIMENTA DE MACACO (PIPER ADUNCUM) E PIMENTA LONGA (PIPER HISPIDINERVUM) CONTRA TRYPANOSOMA CRUZI.** 2015. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia) Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, INSTITUTO CARLOS CHAGAS, CURITIBA.

SILVEIRA, F. T. L., R. & CORBETT, C. E. P. . Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n. 99, p. 239-51, 2004.

SIMÕES, C. M. O. S., E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.;; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento.** Porto Alegre/ Florianópolis: 2004.

SIMPSON, L. Kinetoplast DNA in tripanosomid flagellates. **Int Rev Cytol** n. 99, p. 119-207, 1986.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 6, p. 307-315, 2004/01/01 2004. ISSN 1341-321X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1341321X04710284> >.

SOARES, D. C. et al. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International**, v. 56, n. 2, p. 135-139, 6// 2007. ISSN 1383-5769. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576907000074> >.

SOARES, R. P. P. et al. Leishmania chagasi: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector Lutzomyia longipalpis. **Mol Biochem Parasitol**, v. 121, 2002. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00033-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00033-6) >.

SOTO, J.; BERMAN, J. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. Supplement_1, p. S34-S40, 2006. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.02.022> >.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, 2017. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5> >.

SUFFNESS, M. P., J.M. . Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity. **Academic Press Inc**, v. 6, n. London, UK, p. 71–133, 1991.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 6, n. 11, p. 849-854, 2001. ISSN 1365-3156. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00778.x> >.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Investigational drugs for visceral leishmaniasis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 24, n. 1, p. 43-59, 2015/01/02 2015. ISSN 1354-3784. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1517/13543784.2014.954035> >.

TAKAHASHI, H. T. et al. Thiophene Derivatives with Antileishmanial Activity Isolated from Aerial Parts of Porophyllum ruderales (Jacq.) Cass. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3469, 2011. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/5/3469> >.

TASDEMIR, D. K., M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T. J.; TOSUN, F.; RUEDI, P. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 1352–1364, 2006.

THAKUR, C. P. et al. Treatment of visceral leishmaniasis with injectable paromomycin (aminosidine). An open-label randomized phase-II clinical study. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 4, p. 432-433, 2000. ISSN 0035-9203. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90131-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90131-7) >.

TIAN, J. et al. Inhibition of iNOS protects endothelial-dependent vasodilation in aged rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 10, p. 1324-1328, 09/13 03/31/received 07/05/accepted 2010. ISSN 1671-4083 1745-7254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4012905/> >.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from Ocimum gratissimum. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 99-105, 6// 2006. ISSN 1383-5769. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576905001029> >.

VALE., E. C. S. D. F., TANCREDO. Tegumentary leishmaniasis in Brazil:

a historical review related to the origin, expansion and etiology. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, n. 4, p. 421-8, 2005.

VANNIER-SANTOS, M. A., MARTINY, A. & DE SOUZA, W. . Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading. **Current Pharmaceutical Design**, n. 8, p. 297-318, 2002.

VILELA, M., MENDONÇA, SERGIO. Leishmaniose. 2013. Disponível em: < <https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose> >. Acesso em: 21/03/2017.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. **World Health Org Fact Sheet**. 2016;375. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Accessed 23 Aug 2016 2016.

WHO, W. H. O.-. Leishmaniasis: epidemiology and access to medicines. **Leishmaniasis home**, 2013. Disponível em: < http://www.who.int/leishmaniasis/resources/leishmaniasis_epidemiology_access_to_medicine/en/ >. Acesso em: 30/03/2017.

XAVIER, F. et al. Synthesis and In Vitro Anti Leishmania amazonensis Biological Screening of Morita-Baylis-Hillman Adducts Prepared from Eugenol, Thymol and Carvacrol. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1483, 2016. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/11/1483> >.

