



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA (PGBiotecM)**

ROSÁLIA SANTOS FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
COMPOSTOS SINTÉTICOS SOBRE *LEISHMANIA INFANTUM***

JOÃO PESSOA

2025

ROSÁLIA SANTOS FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
COMPOSTOS SINTÉTICOS SOBRE *LEISHMANIA INFANTUM***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia (PGBiotecM),
da Universidade Federal da Paraíba, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
MESTRE em BIOTECNOLOGIA – Área de
concentração: SAÚDE

Orientadora: Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima

Coorientadora: Dra. Fernanda Silva Almeida

**JOÃO PESSOA
2025**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F383a Ferreira, Rosália Santos.

Avaliação da atividade biológica de compostos
sintéticos sobre *Leishmania infantum* / Rosália Santos
Ferreira. - João Pessoa, 2025.
100 f. : il.

Orientação: Tatjana Keesen de Souza Lima.

Coorientação: Fernanda Silva Almeida.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Leishmaniose. 2. Isatinas Cloradas. 3. Atividade
anti-Leishmania. I. Lima, Tatjana Keesen de Souza. II.
Almeida, Fernanda Silva. III. Título.

UFPB/BC

CDU 593.161(043)



Ata da 46ª (quadragesima sexta) Dissertação de Mestrado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia **ROSÁLIA SANTOS FERREIRA** candidata ao Título de “Mestre” em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Aplicada à Saúde.

Às nove horas (09h00) do dia 12 de agosto do ano de dois mil e vinte e cinco (12/08/2025), via Gogle meet, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Rosália Santos Ferreira** candidata ao Título de “MESTRE” em Biotecnologia. Foram componentes da Banca Examinadora as professoras doutoras Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente (Orientadora) (Universidade Federal da Paraíba); Profa. Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa (Examinador interno) (Universidade Federal da Paraíba); Profa. Dra. Camilla Albertina Dantas de Lima (Examinador externo) (Universidade Federal de Pernambuco) e Profa. Dra. Juliana Alves Vale (Examinador Externo) (Universidade Federal da Paraíba) Dando início aos trabalhos, a Presidente da Banca professora Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Rosália Santos Ferreira**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “Avaliação da Atividade Biológica de Compostos Sintéticos sobre *Leishmania infantum*”. Após discorrer sobre o referido tema, a candidata foi arguida pelos examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a Comissão em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADA. Em face da aprovação, declarou a presidente achar-se a examinada **Rosália Santos Ferreira** legalmente habilitada a receber o Título de “MESTRE” em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Aplicada à Saúde, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito a expedição do Diploma que a mesma faz jus. Nada mais havendo a tratar, eu, Tânia Maria Alves de Araújo, na qualidade de secretária, lavrei a presente Ata que submeto a aprovação da Comissão Examinadora.

Tânia Maria Alves de Araújo (Secretária)



Documento assinado digitalmente

TANIA MARIA ALVES DE ARAUJO

Data: 20/08/2025 11:37:31-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente (Orientadora)

Profa. Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa (Examinador interno)

Profa. Dra. Camilla Albertina Dantas de Lima (Examinador externo)

Proa. Dra. Juliana Alves Vale (Examinador Externo)

Documento assinado digitalmente



JULIANA ALVES VALE

Data: 13/08/2025 09:52:18-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente



CAMILLA ALBERTINA DANTAS DE LIMA

Data: 12/08/2025 16:03:22-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente



TATJANA KEESEN DE SOUZA LIMA CLEMENTE

Data: 13/08/2025 16:00:03-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente



ADNA CRISTINA BARBOSA DE SOUSA

Data: 13/08/2025 14:14:42-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dedico aos meus pais,
pelo amor incondicional
e apoio constante.

AGRADECIMENTOS

Finalizar esta dissertação é, para mim, mais do que a conclusão de uma etapa acadêmica é a concretização de um sonho construído com o apoio, carinho e dedicação de muitas pessoas especiais ao meu redor.

Gratidão ao meu Deus, fonte de força, sabedoria e coragem. Cada conquista é reflexo da Tua graça e fidelidade em minha vida. Sem Ti, nada disso seria possível.

À minha família, minha base sólida, meu porto seguro. Em especial a minha mãe Maria do Carmo e ao meu pai Marcos, agradeço por cada palavra de incentivo, por cada gesto de amor e por nunca medirem esforços para que eu seguisse em frente, mesmo nos momentos de cansaço e incerteza. Obrigada por acreditarem em mim mesmo quando eu duvidei. Ao meu noivo Arthur, pela paciência, companheirismo e apoio incondicional durante toda essa jornada. Obrigada por estar ao meu lado nos dias bons e, principalmente, nos dias difíceis.

Às minhas amigas, que a vida me deu, sou grata eternamente a Deus por tê-las ao meu lado, Lorrane, Dayane e Ividy, que foram muito mais do que companheiras de moradia, foram família longe de casa. Agradeço por cada conversa na cozinha, cada acolhida nos dias difíceis e por todas as risadas que tornaram os meus dias no 403 mais leves. Sou grata em especial, a minha amiga-irmã de longa data Ellen, que esteve ao meu lado em mais uma etapa da vida, que junto com a sua família me acolheu quando mais precisei, a Tia Verônica, sou imensamente grata por seu apoio que foram fundamentais nessa jornada. Dividir o lar com vocês foi um presente que levarei para sempre com carinho e gratidão.

Agradeço também a todo o grupo do Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas (LABIDIC), em especial aos meus amigos Leticia, Leonardo, Delva e Shayenne por dividirem comigo o dia a dia da pesquisa com bom humor, ajuda mútua e espírito de equipe. Obrigada pelo acolhimento, paciência e ajuda todo esse tempo, cada etapa desse trabalho tem um pouco de cada um, fazer ciência ao lado de vocês foi uma honra. Nossa convivência tornou o ambiente mais leve e inspirador, levo comigo grandes aprendizados e lembranças especiais desde os protocolos na bancada até os nossos cafés com bolo na salinha.

À minha orientadora Profa. Dra. Tatjana Keesen, pelo suporte, paciência e confiança no meu trabalho. Sou imensamente grata à senhora por não ter desistido de mim, no início dessa jornada. Agradeço pela orientação firme, e pela liberdade que me permitiu crescer como

pesquisadora. Seu exemplo e dedicação foram essenciais para que esta etapa se concretizasse. Como também a minha Coorientadora Dra. Fernanda Almeida e ao Prof. Dr. Cláudio Gabriel L. Júnior, agradeço pela atenção, disponibilidade e valiosas contribuições ao longo deste trabalho.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), por ter sido o espaço que acolheu minha formação, ao Departamento de Biotecnologia (Cbiotec) oferecendo estrutura e oportunidades para o desenvolvimento científico e pessoal com excelência, a FapesqPB pelo apoio financeiro, essencial para a realização deste trabalho. O investimento em ciência e educação transforma vidas e a minha foi uma delas.

A todos vocês, meu sincero e eterno agradecimento.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é a forma mais grave das leishmanioses e constitui um sério problema de saúde pública em diversas regiões do mundo. A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo *Leishmania infantum* a principal espécie nas Américas. Dessa forma, justifica-se a busca de novos compostos sintéticos para o tratamento dessa doença infecto parasitária. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade biológica *in vitro* de novos compostos sintéticos sobre a espécie de *L. infantum* agente etiológico da leishmaniose visceral. Foram avaliados 65 compostos de duas classes diferentes (derivados de quinolinas e adutos de Morita-Baylis-Hillman), em formas promastigotas e amastigotas axênicas, bem como a sua citotoxicidade em eritrócitos e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos saudáveis. Inicialmente foram selecionados dois compostos sintéticos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman (MBH), estes por apresentarem inibição da viabilidade em formas promastigotas ($CI_{50} = 38,45 \mu M$ e $CI_{50} = 16,97 \mu M$) dos adutos de MBH AIM52 e AIC52 respectivamente, para as formas amastigotas foi obtido uma inibição mais ativa com $CE_{50} = 4,02 \mu M$ (AIM52) e $CE_{50} = 4,24 \mu M$ (AIC52) os mesmos não apresentaram atividade hemolítica na maior concentração testada ($CH_{50} \geq 400 \mu M$), já em PBMCs a citotoxicidade foi elevada para os dois compostos ($CC_{50} = 4,24 \mu M$ e $= 10,34 \mu M$), estes com Índice de Seletividade de ($IS \geq 10,40$ e $2,57$) e ($IS \geq 23,57$ e $0,76$). Considerando assim estes candidatos promissores, foram realizadas mudanças químicas estruturais, a fim de obter um perfil seletivo maior resultando em oito adutos de MBH modificados, destes o composto mais ativo e seletivo contra *L. infantum* foi o AIN41 com $CI_{50} = 8,16 \mu M$ e $CE_{50} = 0,85 \mu M$ apresentando um Índice de Seletividade de $IS \geq 49,01$. Estes adutos possuem a isatina como núcleo que também foi avaliada isolada, mas não apresentou atividade anti-*Leishmania* e citotóxica. Conclui-se que os adutos de Morita-Baylis-Hillman (MBH), especialmente o composto modificado AIN41, apresenta potente atividade anti-*Leishmania*, com alta seletividade e baixa toxicidade hemolítica. Assim, o aduto AIN41, se destaca como promissor candidato protótipo para o desenvolvimento de novas terapias contra a leishmaniose visceral, contribuindo para o avanço terapêutico.

Palavras-chave: Leishmaniose. Isatinas Cloradas. Atividade anti-*Leishmania*.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL), also known as kala-azar, is the most severe form of leishmaniasis and represents a major public health problem in several regions worldwide. The disease is caused by protozoa of the genus *Leishmania*, with *Leishmania infantum* being the main species in the Americas. Therefore, the search for new synthetic compounds for the treatment of this parasitic disease is justified. This study aimed to evaluate the *in vitro* biological activity of new synthetic compounds against *L. infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis. A total of 65 compounds from two different classes (quinoline derivatives and Morita-Baylis-Hillman [MBH] adducts) were tested against promastigote and axenic amastigote forms, as well as for their cytotoxicity in erythrocytes and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors. Initially, two synthetic compounds obtained from the MBH reaction (AIM52 and AIC52) were selected for showing inhibition of promastigote viability ($IC_{50} = 38.45 \mu M$ and $16.97 \mu M$, respectively). Against amastigote forms, these compounds demonstrated stronger activity ($EC_{50} = 4.02 \mu M$ for AIM52 and $4.24 \mu M$ for AIC52). Both compounds showed no hemolytic activity at the highest concentration tested ($HC_{50} \geq 400 \mu M$); however, in PBMCs, they exhibited high cytotoxicity ($CC_{50} = 4.24 \mu M$ and $10.34 \mu M$), with Selectivity Indexes ($SI \geq 10.40$ and 2.57 ; $SI \geq 23.57$ and 0.76 , respectively). Considering these compounds as promising candidates, structural modifications were performed to improve selectivity, resulting in eight modified MBH adducts. Among them, the most active and selective compound against *L. infantum* was AIN41 ($IC_{50} = 8.16 \mu M$; $EC_{50} = 0.85 \mu M$), with a Selectivity Index of $SI \geq 49.01$. These adducts share an isatin-based scaffold, which was also tested alone but did not show anti-*Leishmania* or cytotoxic activity. In conclusion, Morita-Baylis-Hillman adducts, particularly the modified compound AIN41, demonstrated potent anti-*Leishmania* activity, high selectivity, and low hemolytic toxicity. Thus, AIN41 emerges as a promising lead compound for the development of new therapies against visceral leishmaniasis, contributing to therapeutic advancements.

Keywords: Leishmaniasis. Chlorinated Isatins. Anti-*Leishmania* Activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomia de <i>Leishmania</i> spp.....	11
Figura 2. Formas promastigotas e amastigotas de parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	12
Figura 3. Flebotomíneo fêmea transmissor da leishmaniose.....	13
Figura 4. Ciclo biológico e transmissão dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	14
Figura 5. Distribuição da incidência da leishmaniose visceral (LV) no Brasil entre os anos de 2007 a 2020.....	16
Figura 6. Casos clínicos de Leishmaniose Visceral (LV).....	17
Figura 7. Casos clínicos de Leishmaniose Tegumentar (LT).....	19
Figura 8. Estrutura química dos fármacos de primeira e segunda linha utilizados no tratamento das leishmanioses.....	21
Figura 9. Diversidade da atividade biológica de compostos heterocíclicos nitrogenados...	25
Figura 10. Estrutura química geral dos derivados de quinolina.....	30
Figura 11. Estrutura química geral dos derivados de cloroquina.....	30
Figura 12. Estrutura química geral dos Adutos de Morita-Baylis-Hillman.....	33
Figura 13. Fluxograma metodológico.....	38
Figura 14. Atividade dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52, AIM51, AIM03, ANO22 e AIC52) sob a inibição de viabilidade dos parasitos, após 72h de tratamento em formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	43
Figura 15. Concentração de inibição dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52, AIC52) e fármaco de referência Anfotericina B sob a inibição da viabilidade de formas promastigotas após 72h de tratamento.....	46
Figura 16. Concentração Hemolítica média (CH50) dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52 e AIC52) e fármaco de referência Anfotericina B sobre a lise de eritrócitos humanos após 1h de incubação.....	48
Figura 17. Concentração Efetiva (CE50) dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52 e AIC52) e fármaco de referência Anfotericina B sobre a inibição da viabilidade de formas amastigotas axênicas após 24h de tratamento.....	50
Figura 18. Concentração Citotóxica (CC50) dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52 e AIC52) e fármaco de referência Anfotericina B sobre a viabilidade de células mononucleares do sangue periférico após 24h de tratamento.....	52
Figura 19. Concentração de Inibição (CI50) dos adutos de MBH modificados do composto AIM52 sobre a viabilidade dos parasitos, após 72h de tratamento em formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	55
Figura 20. Concentração de Inibição (CI50) dos adutos de MBH modificados do composto AIC52 sobre a viabilidade dos parasitos, após 72h de tratamento em formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	57
Figura 21. Concentração Efetiva (CE50) dos adutos de MBH modificados do composto AIM52 sobre a viabilidade dos parasitos, após 24h de tratamento em formas amastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	59
Figura 22. Concentração Efetiva (CE50) dos adutos de MBH modificados do composto AIC52 sobre a viabilidade dos parasitos, após 24h de tratamento em formas amastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	61

Figura 23. Concentração Hemolítica média (CH50) dos adutos de MBH modificados dos composto AIM52 e AIC52 sobre a lise de eritrócitos humanos após 1h de incubação.....	64
Figura 24. Inibição das formas promastigotas, amastigotas e citotoxicidade em células humanas do núcleo (Isatina) de adutos de Morita-Baylis-Hillman.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Série de compostos derivados quinolínicos avaliados e sua respectiva massa molar.....	31
Tabela 2. Série de compostos derivados de cloroquinas avaliados e sua respectiva massa molar.....	32
Tabela 3. Série de compostos oriundos da reação Morita-Baylis-Hillman (MBH) avaliados e sua respectiva massa molar.....	33
Tabela 4. Série de compostos modificados oriundos da reação Morita-Baylis-Hillman e núcleo (Isatina) avaliados e sua respectiva massa molar.....	34
Tabela 5. Concentração inibitória de 50% da viabilidade de formas promastigotas (CI50) de <i>Leishmania infantum</i> após 72h de incubação com os compostos quinolínicos e fármaco de referência.....	39
Tabela 6. Concentração inibitória de 50% da viabilidade de formas promastigotas (CI50) de <i>Leishmania infantum</i> após 72 h de incubação com os compostos derivados de cloroquina e fármaco de referência.....	41
Tabela 7. Concentração inibitória de 50% da viabilidade de formas promastigotas (CI50) de <i>Leishmania infantum</i> após 72 h de incubação com os compostos derivados de Adutos Morita-Baylis-Hillman e fármaco de referência.....	42
Tabela 8. Concentração capaz de lisar 50% das hemácias (CH50) dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52, AIC52) e fármaco de referência.....	46
Tabela 9. Concentração capaz de lisar 50% das hemácias (CH50) dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52, AIC52) e fármaco de referência.....	48
Tabela 10. Concentração Citotóxica média (CC50) dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52, AIC52) e fármaco de referência.....	50
Tabela 11. Concentração inibitória (CI50) e Concentração Efetiva (CE50) de 50% da viabilidade em formas promastigotas e amastigotas axênicas de <i>Leishmania infantum</i> após 72 h e 24h de incubação.....	52
Tabela 12. Concentração Hemolítica (CH50) e Concentração Citotóxica (CC50) de 50% da viabilidade em eritrócitos humanos e células mononucleares do sangue periférico após 1h e 24h de incubação.....	61
Tabela 13. Índice de Seletividade (IS) dos Adutos de MBH e Anfotericina B.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMBH** - Aduto de Morita-Baylis-Hillman
- AmB** – Anfotericina B
- AMBH** - Aduto de Morita-Baylis-Hillman
- CC50** – Concentração Citotóxica média
- CDC** – Centro de Controle de Doenças
- CH50** - Concentração Hemolítica média
- CI50** – Concentração Inibitória média
- CONITEC** - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS
- CTL (-)** – Grupo Controle Negativo
- CTL (+)** – Grupo Controle Positivo
- DBO** - Demanda Biológica de Oxigênio (*Biochemical oxygen demand*)
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- DSS** - Dodecil Sulfato de Sódio
- EDTA** - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
- ELISA** - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
- IS** – Índice de Seletividade
- L.** – Gênero *Leishmania*
- LABIDIC** – Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas
- LC** – Leishmaniose Cutânea
- LCD** – Leishmaniose Cutânea Difusa
- LCL** - Leishmaniose Cutânea Localizada
- LD** - Leishmaniose Cutânea Disseminada
- LDPC** - Leishmaniose Dérmica Pós-calazar
- LMC** – Leishmaniose Mucocutânea
- LT** - Leishmaniose Tegumentar
- LV** – Leishmaniose Visceral
- MTT** - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
- OMS** - Organização Mundial de Saúde
- OPAS** - Organização Pan-Americana da Saúde
- PBS** - *Phosphate Buffered Saline* (Salina fosfatada tamponada)
- RIFI** - Reação de Imunofluorescência Indireta

RPM - Rotações por minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SBF – Soro Bovino Fetal

SbV - Antimoniais Pentavalentes

SUS - Sistema Único de Saúde

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
2.1 Aspectos taxonômicos do gênero <i>Leishmania</i>	10
2.2 Características biológicas dos vetores.....	12
2.3 Epidemiologia das leishmanioses.....	15
2.4 Manifestações clínicas.....	17
2.5 Terapêutica das leishmanioses.....	20
2.6 Quinolinas e seus derivados.....	24
2.7 Adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH).....	26
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4 METODOLOGIA.....	28
4.1 Local da pesquisa.....	28
4.2 Considerações éticas.....	28
4.3 Parasitos e manutenção das culturas in vitro.....	29
4.4 Obtenção das formas amastigotas axênicas.....	29
4.5 Compostos químicos avaliados.....	29
4.5.1 Fármaco de referência.....	29
4.5.2 Quinolinas e seus derivados.....	30
4.5.3 Adutos de Morita-Baylis-Hillman.....	32
4.6 Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> dos compostos sobre formas promastigotas do parasito <i>Leishmania infantum</i>	34
4.7 Análise da citotoxicidade em eritrócitos humanos.....	35
4.8 Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> dos compostos sobre formas amastigotas axênicas do parasito <i>Leishmania infantum</i>	35
4.9 Ensaio de citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico humano.....	36
4.10 Determinação do índice de seletividade dos compostos avaliados.....	37
4.11 Análise Estatística.....	37
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Atividade anti- <i>Leishmania</i> de derivados quinolínicos sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	39
5.2 Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> de compostos derivados de cloroquinas sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	40
5.3 Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> de Adutos Morita-Baylis-Hillman sob as formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	41
5.4 Atividade anti- <i>Leishmania</i> dos compostos selecionados AIM52 e AIC52 sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	44
5.5 Citotoxicidade dos compostos AIM52 e AIC52 em eritrócitos humanos.....	45
5.6 Atividade anti- <i>Leishmania</i> dos adutos AIM52, AIC52 e Anfotericina B sobre as	

formas amastigotas axênicas de <i>Leishmania infantum</i>	48
5.7 Citotoxicidade dos adutos AIM52, AIC52 e Anfotericina B sobre células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	50
5.8 Análise da atividade anti-Leishmania dos adutos de Morita-Baylis-Hillman modificados dos compostos AIM52 e AIC52 em formas promastigotas e amastigotas axênicas de <i>Leishmania infantum</i>	52
5.9 Avaliação da citotoxicidade dos adutos modificados de Adutos de Morita-Baylis-Hillman derivados dos compostos AIM52 e AIC52 em eritrócitos humanos e células mononucleares do sangue periférico.....	61
5.10 Avaliação da atividade do núcleo (Isatina) dos adutos de Morita-Baylis-Hillman sobre o parasito <i>Leishmania Infantum</i> e Células humanas.....	64
5.11 Determinação do índice de seletividade dos Adutos de Morita-Baylis-Hillman.....	66
6 DISCUSSÃO.....	68
7 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	90
ANEXO A.....	92

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose compreende os tipos visceral e tegumentar, incluindo a cutânea e mucocutânea, causadas por parasitos protozoários intracelulares obrigatórios, que residem em macrófagos de seus hospedeiros mamíferos (NEVES, 2016). A leishmaniose visceral (LV), conhecida também como calazar, é fatal em mais de 95% dos casos quando não tratada. A doença é caracterizada por episódios irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e fígado, além de anemia (PEDROSA, 2017), apresentando um alto potencial de surto e mortalidade (WHO, 2024). A espécie *Leishmania infantum* é uma das responsáveis por causar a leishmaniose visceral, que é a manifestação clínica de maior relevância médica devido à sua alta taxa de mortalidade quando não tratada (BASANO; CAMARGO, 2004; KATO, 2025).

A terapêutica contra a leishmaniose baseia-se na utilização de cinco fármacos: os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B e a sua formulação lipossômica, a miltefosina, a paromomicina e a pentamidina. Com exceção dos compostos antimoniais, todos os outros medicamentos não foram desenvolvidos inicialmente com ação anti-*Leishmania*, assim grande parte desses fármacos causam efeitos colaterais, como altos níveis de toxicidade, longos regimes de tratamento e altos custos, como também resistência já observada em algumas espécies, justificando a busca por novos métodos de tratamento (LAMOTTE et al., 2017; SANTIAGO et al., 2021). Em vista da quantidade indivíduos infectados ou em risco de infecção por residirem em áreas endêmicas e de tratamento não eficaz, é fundamental investigar novos compostos com potencial para o tratamento da leishmaniose, com menos efeitos colaterais e que sejam economicamente viáveis. Portanto, a pesquisa de novas drogas mais eficazes e com baixa toxicidade é crucial para o controle, tratamento e prevenção dessa doença (LAMOTTE et al., 2017; ALMEIDA et al., 2021).

Atualmente muitos compostos orgânicos de diferentes classes e estruturas químicas estão sendo sintetizados com atividade antimicrobiana e antiprotozária, e alguns já em desenvolvimento avançado para novos candidatos a fármacos. Assim como os compostos da classe das quinolinas e cloroquinas que apresentam amplo espectro de atividades biológicas já descritas como antiproliferativa, antibacteriana, anti-*Leishmania*, antimalárica e antichagásica (SOUZA et al., 2009; ARAFA et al., 2013; COA et al., 2015; FERREIRA et al., 2021; JUN et al., 2023). Além disso, os compostos sintéticos derivados da reação Morita-Baylis-Hillman têm chamado a atenção a partir de atividades biológicas já relatadas, sendo elas antiproliferativa, antimalárica e anti-*Leishmania* (LIMA-JUNIOR; VASCONCELOS, 2012).

Portanto, diante da problemática apresentada devido à leishmaniose visceral, da limitação dos tratamentos atuais, torna-se essencial a investigação de novos compostos com potencial anti-*Leishmania*. Nesse contexto os compostos sintéticos derivados de quinolinas e adutos de Morita-Baylis-Hillman, tem despertado interesse por apresentarem inibição da viabilidade de algumas espécies do protozoário do gênero *Leishmania*.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade biológica *in vitro* de novos compostos sintéticos contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum*, analisando também seus possíveis efeitos citotóxicos em células humanas, a fim de contribuir para a identificação de candidatos promissores ao desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

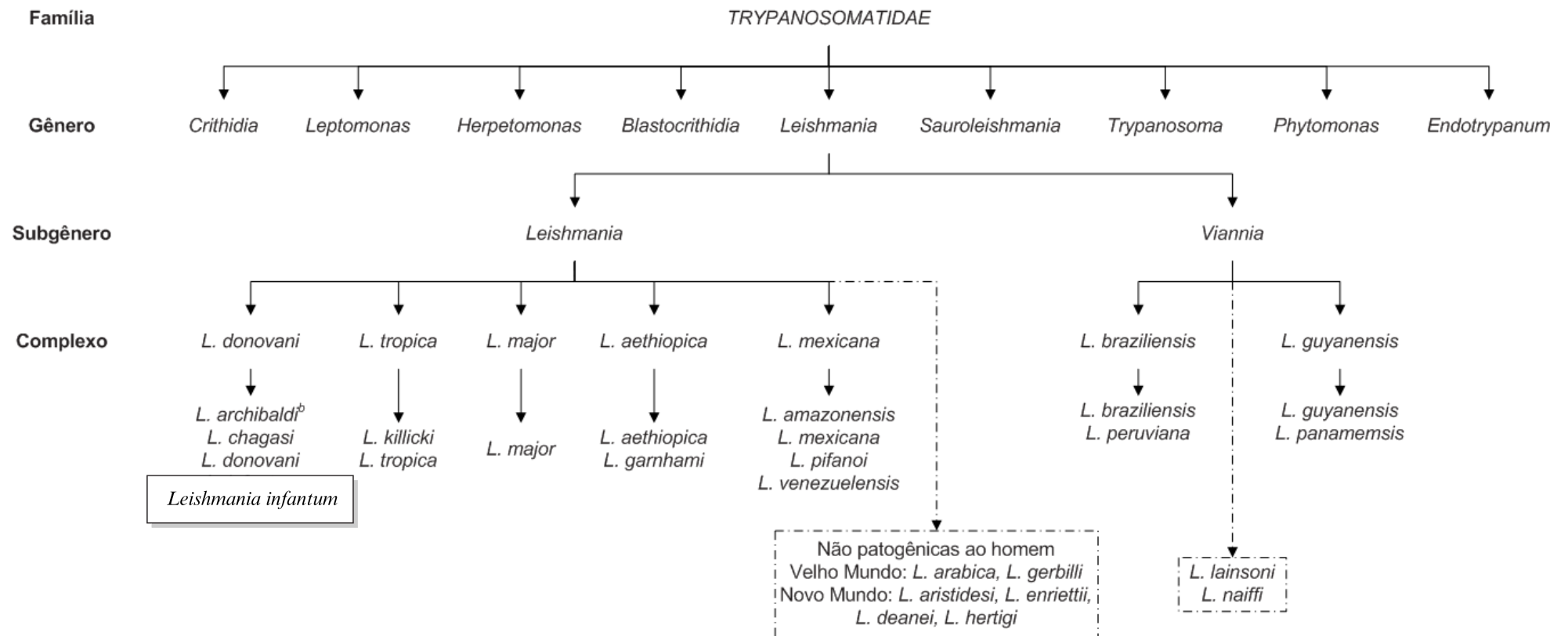
2.1 Aspectos taxonômicos do gênero *Leishmania*

As leishmanioses são causadas por espécies diferentes de um mesmo gênero – o gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) que fazem parte da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Segundo Lainson et al., 1977 esse gênero pode ser subdividido em dois subgêneros de acordo com desenvolvimento do parasito no intestino posterior do flebotomíneo (GONTIJO et al., 1995; LAINSON, 2010; AKHOUNDI et al., 2016).

Esses subgêneros incluem o subgênero *Leishmania* (ROSS, 1903) composto por espécies encontradas no intestino médio do vetor, e o subgênero *Viannia* (LAINSON; SHAW, 1987), constituído por aquelas que se desenvolvem na região posterior do intestino do inseto vetor. A taxonomia desse parasito é um processo em constante evolução, com várias propostas de classificação para os subgêneros. Essas propostas fundamentam-se em uma variedade de métodos de caracterização genética, como eletroforese isoenzimática, análise de DNA, e também em estudos morfológicos (MARCILI et al., 2014; JORDÃO et al., 2021).

No mundo já foram identificadas 22 espécies patogênicas ao ser humano (Figura 1), 15 dessas estão presentes nas Américas (OMS, 2020). Tendo como os principais agentes etiológicos a *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) aethiopica*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) donovani* nos continentes da Ásia, África e Europa. Já no continente americano foram descritos a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum* (GOTO; LINDOSO, 2010). Todos estes parasitos apresentam diferentes manifestações clínicas, padrões epidemiológicos e uma resposta terapêutica. No Brasil, oito espécies catalogadas de *Leishmania* são responsáveis por causar enfermidades em seres humanos. Estas incluem *Leishmania (V) braziliensis*, *Leishmania (V) guyanensis*, *Leishmania (V) lainsoni*, *Leishmania (L) amazonensis*, *L.(V) shawi*, *L. (V) naiffi* e *L. (V) lindenbergi*, as quais estão associadas à forma tegumentar da doença. Além dessas, há também a *Leishmania (L) chagasi/infantum*, que é a causadora da forma visceral (CUPOLILLO et al., 2014; OPAS, 2022; AHMADI et al., 2024).

Figura 1. Taxonomia de *Leishmania* spp.

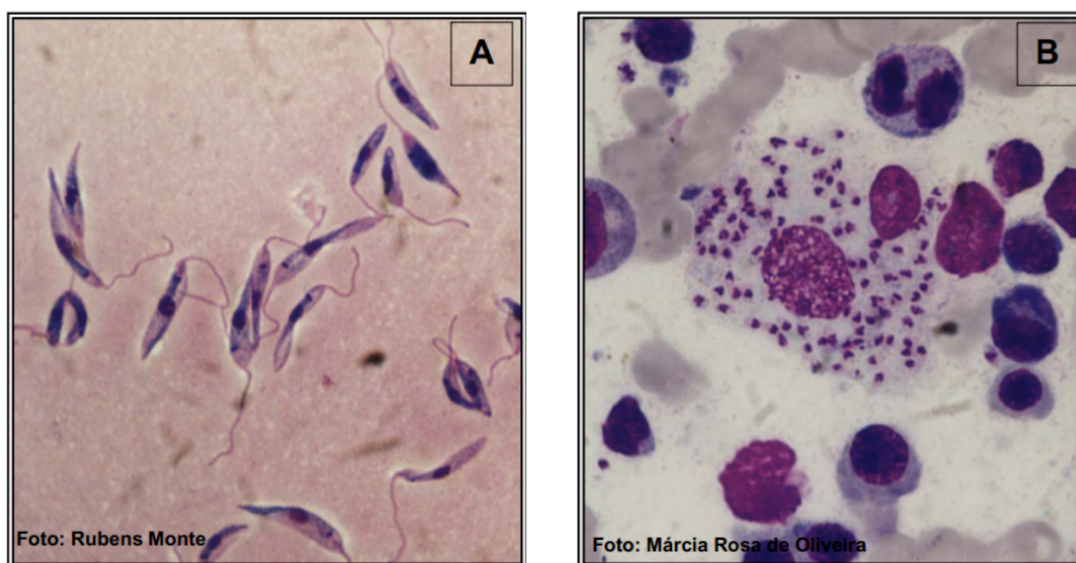


Fonte: CUPOLILLO et al., 2014 adaptado. Esquema da classificação taxonômica atual dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*.

2.2 Características biológicas dos vetores

Os protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios, caracterizados por apresentarem formas evolutivas distintas (digenéticas) ao longo de seu ciclo de vida. A fase promastigota (Figura 2A), que é flagelada, é localizada no intestino médio de insetos vetores, especialmente flebotomíneos. Em contraste, a fase amastigota (Figura 2B), desprovida de flagelo livre, desenvolve-se em células de defesa do hospedeiro vertebrado (TEIXEIRA et al., 2013). A classificação taxonômica dessas formas leva em consideração parâmetros como a exteriorização e o comprimento do flagelo, a morfologia e as dimensões celulares, além da posição do cinetoplasto. O processo reprodutivo desses protozoários ocorre por meio de divisão binária, contribuindo para a sua persistência e disseminação (NEVES et al., 2011).

Figura 2. Formas promastigotas e amastigotas de parasitos do gênero *Leishmania*



Legenda: (A) Formas promastigotas (B) Fotomicrografia de macrófago infectado com formas amastigotas de *Leishmania*. Fonte: ROCHA, J.C. (2018).

A transmissão ocorre principalmente através da picada hematofágica realizada por insetos infectados da ordem Diptera, pertencentes à subfamília Phlebotominae, chamados de flebotomíneos, apenas as fêmeas são hematófagas, pois através do sangue elas obtêm os nutrientes necessários para a maturação e postura dos seus ovos (Figura 3) (AKHOUNDI et al., 2016; SOUSA et al., 2020). Existem dois gêneros de importância médica na transmissão da leishmaniose, o *Phlebotomus* para os continentes europeu, asiático e africano; e o gênero *Lutzomyia* no continente americano (KATO et al., 2010; STEVERDING, 2017).

Figura 3. Flebotomíneo fêmea transmissor da leishmaniose

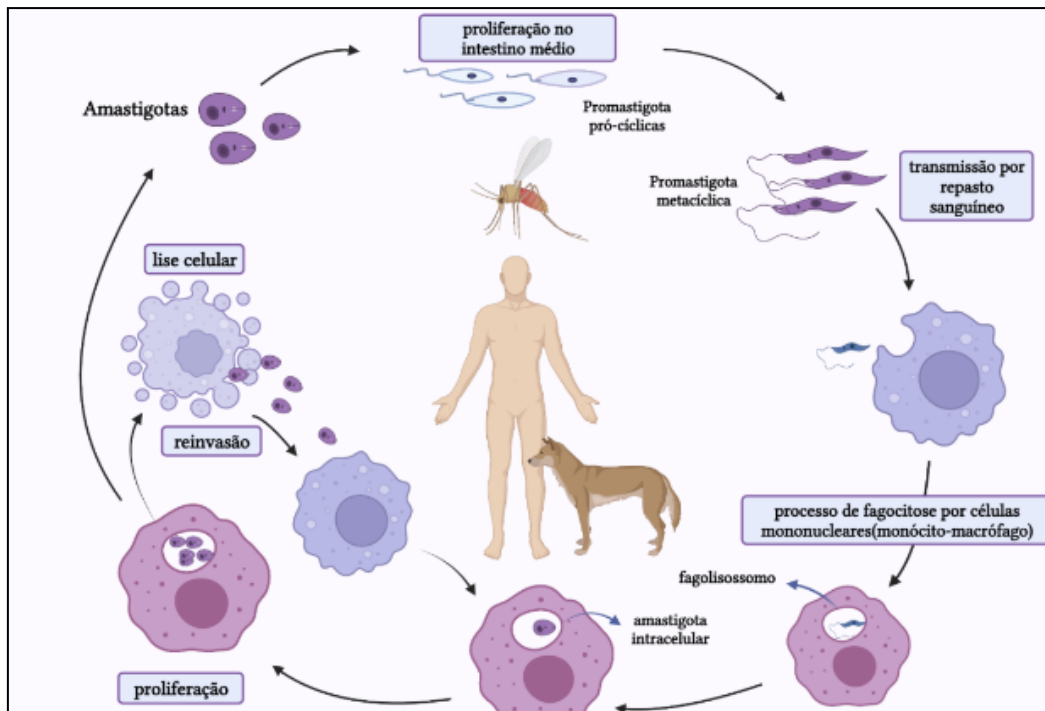


Fonte: http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand_fly.html. Espécie *Lutzomyia longipalpis* (mosquito-palha)

As espécies de *Leishmania* possuem um ciclo de vida dimórfico (Figura 4), alternando entre a fase promastigota (forma extracelular no flebotomíneo) presente no intestino médio do vetor e a fase amastigota (forma intracelular no hospedeiro vertebrado), presente no fagolisossomo de células fagocíticas. Estas mudanças morfológicas estão associadas às condições fisiológicas de cada hospedeiro, o que favorece o parasito na evasão da resposta imunológica do hospedeiro vertebrado (NEVES et al., 2016; MULE et al., 2020; RIOS et al., 2022).

Durante o repasto sanguíneo, insetos flebotomíneos fêmeas infectadas transmitem os promastigotas metacíclicos infecciosos não replicativas através de sua probóscide para o local da picada. Esta forma móvel (presença do flagelo) é fagocitada por células fagocíticas mononucleares (macrófagos e neutrófilos). Nos macrófagos, que são as principais células hospedeiras desse parasito, os mesmos se modificam em amastigotas dentro de vacúolos (fagolisossomos), onde se replicam e causando assim lise celular, consequentemente são liberados, infectando outras células (reinvásão) causando a doença (PETERS; SACKS, 2006; PACE, 2014; AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021).

Figura 4. Ciclo biológico e transmissão dos parasitos do gênero *Leishmania*



Fonte: (ALMEIDA, 2022). A forma promastigota procíclica de *Leishmania* spp. se diferencia em promastigotas metacíclicas infecciosas e não divisíveis no vetor, localizando-se na válvula estomodeal para transmissão.

O inseto vetor se alimenta desse sangue infectado, com células contendo as formas amastigotas ou amastigotas livres que são ingeridas. Dentro do intestino do inseto, estas formas se transformam em promastigotas procíclicas (forma avirulenta), através da diminuição da temperatura e aumento do pH, provocando a modificação morfológica e o desenvolvimento do parasito. Os promastigotas procíclicos se movem até o intestino médio do vetor, onde sofrem metaciclogênese, diferenciando-se em formas infecciosas metacíclicas, que são transmitidas para um novo hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo, por meio da regurgitação (KAUFER et al., 2017). Dentro do intestino do inseto, os amastigotas se transformam em promastigotas procíclicos, que se multiplicam e migram para o intestino médio anterior (válvula estomodeal) do inseto, onde sofrem metaciclogênese, diferenciando-se em formas infecciosas metacíclicas, que são pequenas formas de rápida motilidade. Este processo em *Leishmania* spp. também é induzido *in vitro* por baixo pH e depleção de nutrientes (BANOTH et al., 2020).

2.3 Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são um problema de saúde pública por sua magnitude e distribuição geográfica, pela insuficiência de recursos no seu controle, diagnóstico e tratamento, bem como sua associação com as condições inadequadas de moradia, pobreza e desnutrição (ROCHA et al., 2019). Elas estão entre as dez principais doenças tropicais negligenciadas, afetando mais de 12 milhões de pessoas. A doença é endêmica em 99 países, sendo que 89 são endêmicos para a leishmaniose cutânea (LC), 80 para a leishmaniose visceral (LV) e 71 para ambas as formas clínicas, LC e LV. Dos 9 países que notificam 85% dos casos de LC, 3 estão nas Américas: Brasil, Colômbia e Peru, já 68% dos casos de leishmaniose visceral (LV), se concentram na Índia, Sudão, Brasil e Quênia (BURZA; CROFT; BOELARERT, 2018; WHO, 2023).

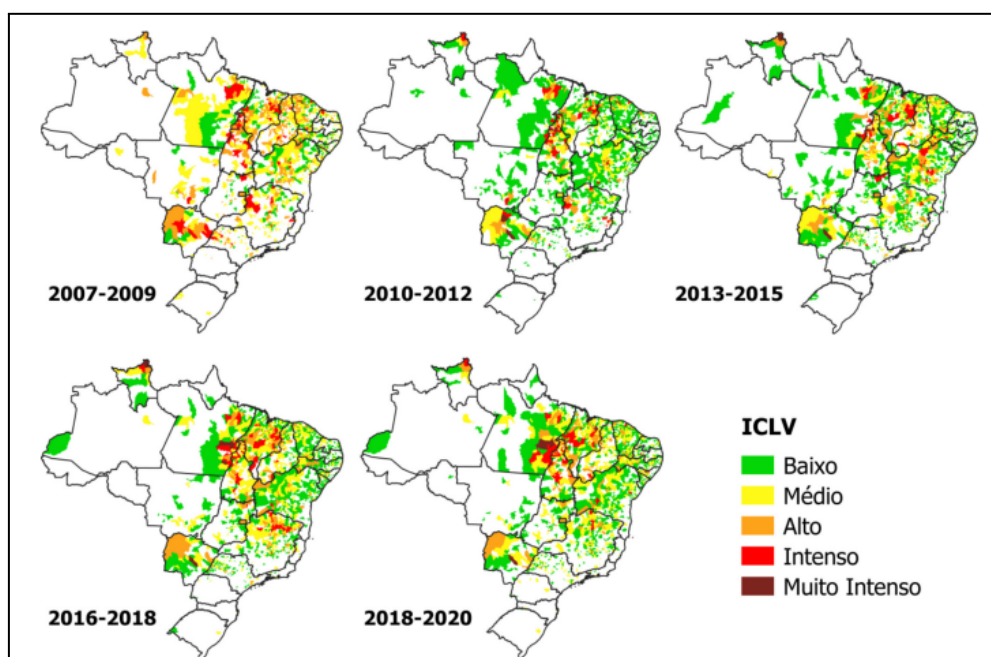
Estima-se que 0,7 a 1 milhão de novos casos de leishmaniose por ano sejam notificados nos países endêmicos, como no caso do Brasil, leste da África e Índia, que detêm a maioria dos casos de leishmaniose visceral (LV), com estimativas de 50.000 a 90.000 novos casos por ano em todo o mundo. Cerca de 95% dos casos de leishmaniose cutânea (LC) ocorrem nas Américas, Mediterrâneo, Oriente Médio e na Ásia Central, há estimativas de 600.000 a 1 milhão de novos casos ocorram anualmente no mundo. Mais de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea (LM) ocorrem na Bolívia (Estado Plurinacional da), Brasil, Etiópia e Peru (ALVAR et al., 2012; WHO, 2023).

Nas Américas, Entre 2001 a 2021, um total de 1.105.545 casos de leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) foram notificados, correspondendo a uma média de 52.645 casos por ano, no mesmo período novos casos de leishmaniose visceral (LV) também foram notificados, com uma média anual de 2.488 casos com taxas de letalidade chegando a 8%, sendo considerada a mais alta, quando comparada a outros continentes (STEVERDING, 2017; WHO, 2023).

No Brasil, entre 2007 a 2020 foram notificados 48.705 casos novos de leishmaniose visceral (LV) (Figura 5), com uma maior incidência no ano de 2017 (2,15 casos/100.000 habitantes) e com menor incidência em 2020 (1,04 casos/100.000 habitantes) devido a pandemia ocasionada pelo covid-19 muitos casos não foram notificados devido ao distanciamento social e a reorganização dos serviços de saúde relacionados à vigilância e ao controle da LV. Nas regiões do Norte e Nordeste, especialmente no Pará, Tocantins e Bahia atingiram uma incidência igual ou superior a 50 casos/100.000 habitantes, no Sudeste apenas

São Paulo e Minas Gerais apresentaram altas incidências em determinados triênios, destacando-se a região da fronteira Pará, Tocantins e Maranhão com prevalência em todos os anos analisados. Isso se deve a dinâmica do desmatamento, uso do solo e vulnerabilidade social foram associados aos altos números de casos (Figura 5) (GRAEPP-FONTOURA et al., 2020; WHO, 2022 ; NINA et al., 2023)

Figura 5. Distribuição da incidência da leishmaniose visceral (LV) no Brasil entre os anos de 2007 a 2020



Fonte: (NINA et al., 2023).

Na década de 1990, cerca de 90% das notificações de leishmaniose no Brasil ocorriam na Região Nordeste, devido ao aumento desordenado das periferias em cidades pequenas e grandes, aliado a falta de infraestrutura adequada e a presença de cães (principais reservatórios da *Leishmania infantum*), forneceram ambientes favoráveis à proliferação e adaptação do vetor (TORRES-GUERREIRO et al., 2017; GRAEPP-FONTOURA et al., 2020; MEDEIROS et al., 2022). No estado da Paraíba, a leishmaniose visceral é de notificação compulsória, ou seja, sua comunicação é obrigatória às autoridades de saúde e que de acordo com a Secretaria de Estado da Saúde da Paraíba (2023), a leishmaniose visceral continua a ser uma preocupação de saúde pública no estado, com 148 notificações em 2022, das quais 42 foram confirmadas e resultando em 4 óbitos (Paraíba, 2023). Entretanto, grande parte desses casos ainda permanecem desconhecidos devido à subnotificação, ausência de métodos de

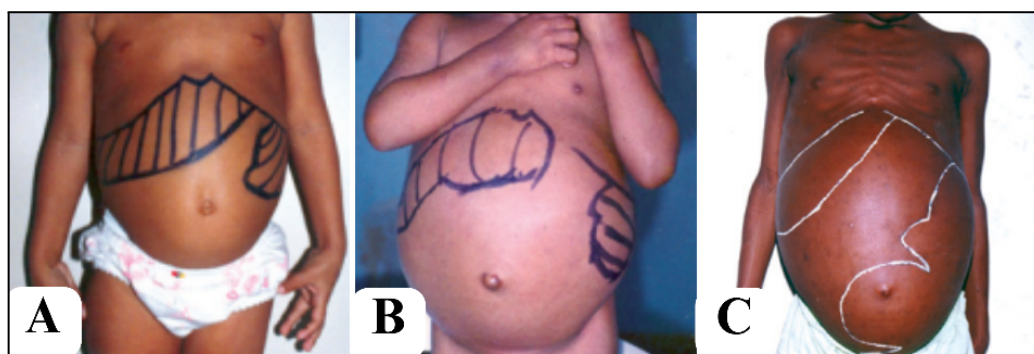
diagnósticos apropriados para cada tipo da doença como também a limitação dos sistemas de vigilância epidemiológica que se baseiam em estimativas (ALMEIDA, 2022).

2.4 Manifestações clínicas

As leishmanioses são antroponoses, ou seja, doença primária de animais e que podem ser transmitidas aos humanos, através da espécie do parasito infectante é possível classificar suas manifestações clínicas, compreendendo as formas visceral e tegumentar (Figuras 6 e 7) (BRASIL, 2014).

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma doença infecciosa sistêmica, considerada a mais grave dos tipos de leishmaniose, com uma variedade no quadro clínico dos pacientes, que se manifestam de acordo com a resposta imunológica, tendo os sintomas principais: febre de longa duração, aumento do fígado e baço (hepatoesplenomegalia) (Figura 6 – A, B e C) perda de peso; fraqueza; redução da força muscular, anemia, aumento dos anticorpos e alteração dos nódulos linfáticos (PISCOPO; MALLIA, 2006; MCGWIRE; SATOSKAR, 2013; NEVES, 2016). A doença ainda pode progredir de maneira súbita ou de forma gradual, influenciada pela susceptibilidade genética, e pelas características da resposta imune mediada por células do hospedeiro, resultando em assintomática, aguda e crônica, podendo levar a morte quando não tratada (GRISARD E ISHIDA, 2011; ZIJLSTRA, 2014; PINTO; AKBARI, ORYAN E HATAM, 2021).

Figura 6. Casos clínicos de Leishmaniose Visceral (LV)



Legenda: Leishmaniose Visceral - (A) Período inicial - Febre com duração inferior a quatro semanas, fase aguda já com a presença de hepatoesplenomegalia. (B) Período de estado - Febre irregular, emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia (C) Período final - Febre contínua, desnutrição, hemorragias, icterícia e ascite. Fonte: (BRASIL, 2014).

No Brasil, a forma de transmissão é através da picada dos vetores *L. longipalpis* e *L. cruzi* infectados pelo parasito *Leishmania infantum*. O período de incubação da doença é bastante variável, que pode ser de 10 dias a 24 meses, com média entre 2 a 6 meses, sendo

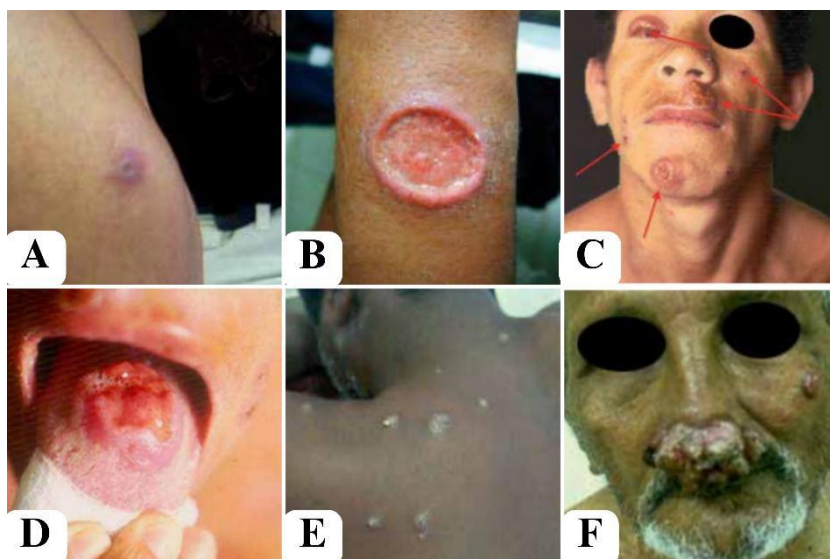
fatal em 2 anos, tendo como resultado infecções bacterianas e/ou anemia grave, principalmente em pacientes imunossuprimidos, como no caso de indivíduos co-infectados com HIV, que apresentam maior gravidade da leishmaniose visceral. Visto que, o parasito atua nas células do sistema fagocitário mononuclear (sistema reticuloendotelial), causa uma supressão específica e reversível da imunidade mediada por células, facilitando a disseminação e multiplicação descontrolada do parasito, desregulando o sistema imunológico do hospedeiro (MCGWIRE; SATOSKAR, 2013; BRASIL, 2014; FREITAS et al., 2016; STEVERDING, 2017; DIRO et al., 2019).

Durante ou após a aparente cura da Leishmaniose Visceral (LV), alguns pacientes podem desenvolver a leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC), especialmente em áreas endêmicas e entre indivíduos com o sistema imunológico comprometido, como ocorre em alguns países africanos. Sendo caracterizada por máculas hipopigmentadas, pápulas e erupções cutâneas, resultando em uma condição crônica e desfigurante, com incidência mais alta no velho mundo (GOTO, 2012; MENDES et al., 2023)

Diferentemente do tipo visceral, a leishmaniose tegumentar apresenta alguns subtipos: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada (LD), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LMC). Além disso, é transmitida por várias espécies de um mesmo gênero de vetores no Brasil: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei* e *Lu. Migonei* (REITHINGE et al., 2007; SILVEIRA et al., 2009). É uma doença não transmissível entre pessoas sendo caracterizada pela formação de úlceras na pele e mucosas, seus principais agentes etiológicos no Brasil são: *Leishmania (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* (BRASIL, 2017; AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021).

Este tipo de leishmaniose, é a forma menos grave da doença, onde a leishmaniose cutânea localizada (LCL) pode apresentar uma ou mais lesões dérmicas de bordas avermelhadas (Figura 7 - A), as quais podem variar de tamanho e aparência ao longo da infecção, que surgem de duas semanas a dois meses e tendem a ser indolor, após a picada do flebotomíneo infectado pela espécie *L. brasiliensis* (LINDOSO, 2012; BRASIL, 2017; GOTO).

Figura 7. Casos clínicos de Leishmaniose Tegumentar (LT)



Legenda: Leishmaniose Tegumentar - (A) Estágio inicial da ulceração, lesão cutânea localizada (LCL), infiltradas com hiperemia ao seu redor. (B) Lesão ulcerada franca, única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso. (C) Forma cutânea disseminada (LD) apresentando múltiplas lesões ulceradas. (D) Leishmaniose mucocutânea (LMC), forma mucosa tardia mucosa oral. (E) LCL- Lesão no tronco, de aspecto nódulo verrucoide, com infiltração local e descamação. (F) LMC- Lesão vegetante extensa no nariz e nódulo infiltrativo na face. Fonte: (BRASIL, 2017).

Já a leishmaniose cutânea disseminada (LD), se apresenta de forma progressiva com várias lesões em forma de pápulas, com pequenas ulcerações em duas ou mais partes do corpo do hospedeiro (Figura 7 - B), e estão associadas a infecção causada pelas espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. A leishmaniose cutânea difusa (LCD), é um tipo raro causada pela espécie *L. amazonensis*, que é caracterizada inicialmente pelo surgimento de mácula ou placa eritematosa de crescimento lento. Após um período de 3 anos, a infecção se dissemina, resultando geralmente na formação de nódulos que não causam úlcera e não afetam a mucosa (BRASIL, 2017; SAMPAIO et al., 2021). A forma clínica da leishmaniose mucocutânea (LMC), se apresenta comprometendo as membranas de mucosas, principalmente nariz, e que também pode afetar a cavidade oral e garganta, sendo considerada mutilante entre as formas tegumentares, causando desde desconforto e dor leve até odinofagia a caquexia, em casos extremos (Figura 7 - F), geralmente associadas a pacientes que já apresentaram quadro clínico da forma cutânea, portanto transmitida por vetores infectados pela espécie *L. brasiliensis* (REITHINGE et al., 2007; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

O diagnóstico clínico das formas de leishmaniose pode ser evidente, mas frequentemente é necessário diferenciar de outras condições similares, exigindo a realização

de exames laboratoriais para confirmação. Para cada forma clínica da doença há um tipo de diagnóstico, na leishmaniose tegumentar é realizado por meio de métodos parasitológicos antes do início do tratamento, complementado por pesquisa direta ou IDRM (Teste intradérmico Intradermorreação de Montenegro ou da *Leishmania*), além disso, através de amostras de tecido é possível visualizar o estágio amastigota no exame microscópico, assim como diagnóstico molecular através de ensaios de PCR, em casos de leishmaniose cutânea ou mucocutânea que apresenta carga parasitária baixa, nos hospedeiros imunossuprimidos (PACE, 2014; BRASIL 2017). Em casos suspeitos de leishmaniose visceral, o método sorológico frequentemente utilizado é a imunofluorescência indireta (RIFI) e ELISA, mas também é empregado testes parasitológicos como a observação do parasito amostras de tecido, aspirados da medula óssea e do baço para confirmação das formas amastigotas. Através da confirmação laboratorial dos achados clínicos é possível disponibilizar dados epidemiológicos, como a identificação da espécie envolvida, a fim de implementar as estratégias de controle da doença (PINTO, GRISARD e ISHIDA, 2011; BRASIL, 2014; ARONSON et al., 2016; CDC, 2024).

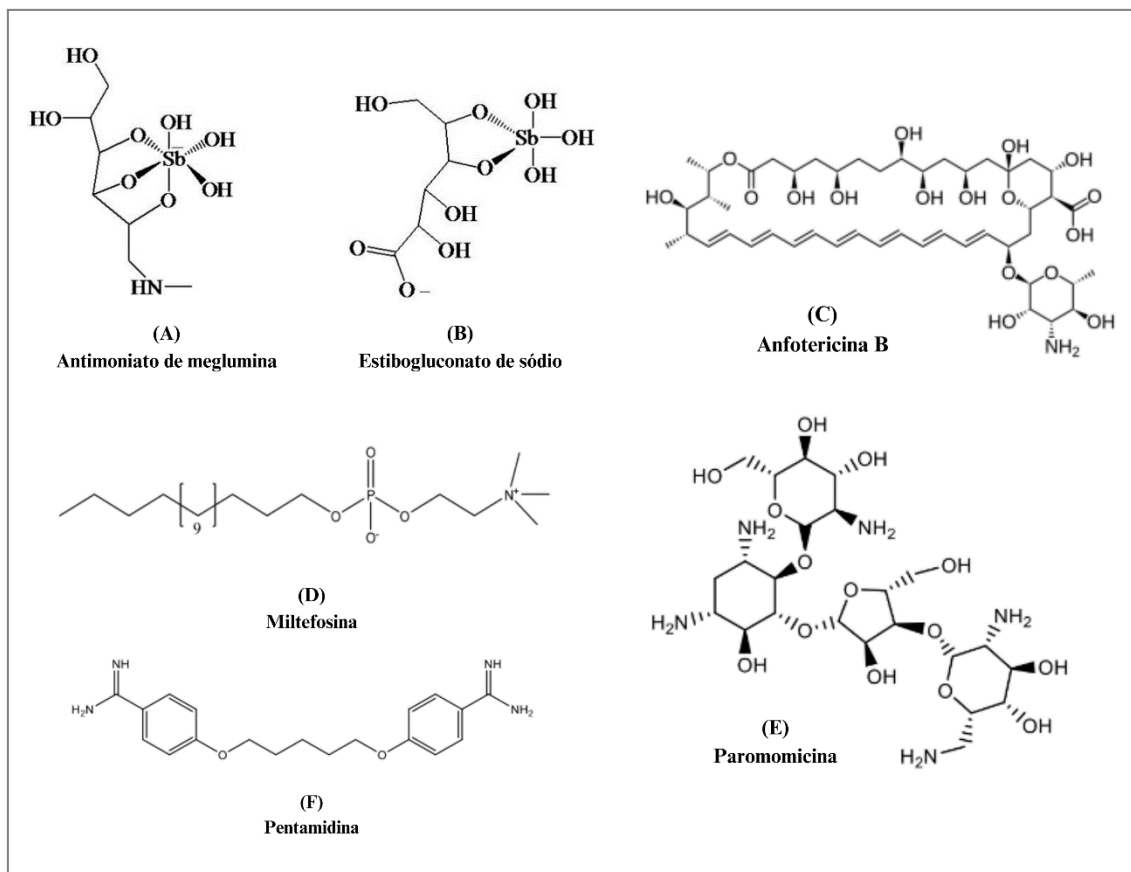
2.5 Terapêutica das leishmanioses

O tratamento da leishmaniose é desafiador devido ao número reduzido de medicamentos disponíveis e dos quais já se tem resistência por parte do parasito, como também o tipo de tratamento de escolha que depende de diversos fatores, como a espécie do parasito e forma clínica, esquema terapêutico, eficácia, toxicidade e custo (OPAS, 2022). Além disso, a resposta imunológica do paciente é importante, devido a habilidade do hospedeiro desenvolver uma resposta imune inata e adaptativa eficaz, sendo influenciada por fatores genéticos e adquiridos (ALMEIDA, 2020; PICCICA et al., 2021).

Não há ainda uma vacina para a leishmaniose e atualmente a abordagem sistêmica de tratamento é composto pelos: antimoniais, Anfotericina B, o isetionato de pentamidina e a miltefosina. Os fármacos antimoniais pentavalentes (SbV), são os mais antigos, no Brasil a única formulação disponível é o antimoniato meglumina (Figura 8 – A), que tem eficácia no tratamento de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral, com capacidade de induzir respostas pró-inflamatórias, importantes no controle da progressão da forma visceral, resultando na regressão rápida das manifestações clínicas, contudo devido a administração de baixas dosagens e tratamentos descontínuos que acarretam falhas na terapia,

consequentemente surgimento também das formas resistentes do parasito (ORYAN E AKBARI, 2016; ARONSON et al., 2016).

Figura 8. Estrutura química dos fármacos de primeira e segunda linha utilizados no tratamento das leishmanioses.



Fonte: (BASTOS et al., 2016) adaptado. Fármacos de primeira linha antimoniais pentavalentes (SbV): Antimoniato de meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®) como também a paromomicina (Humatin®; Fármacos de segunda linha: Anfotericina B (Fungizone®), miltefosina, pentamidina (Lomidina®) (RATH et al., 2003).

Entretanto, um dos fatores relevantes é a alta taxa de toxicidade desse composto, o que acarreta doenças cardíacas, hepáticas e toxicidade pancreática, e que em casos graves leva à morte, principalmente em pacientes acima de 50 anos de idade, além de sua contra indicação para pacientes com insuficiência renal e gestantes. Na maioria dos casos no decorrer do tratamento são notificados sintomas como artralgia, dores abdominais, diarreia, aumento da diurese, erupções cutâneas, anemia, náusea e vômito (FRÉZARD, DEMICHELI E RIBEIRO, 2009; PELISSARI et al., 2011; OPPAS, 2022). Devido a isto, foram empregadas uma segunda linha de tratamento com os fármacos: Miltefosina, Paramomicina e a Anfotericina B, utilizadas de forma isolada ou em combinação, assim se estabeleceram como os

medicamentos mais utilizados nas últimas décadas para prevenir o desenvolvimento de resistência, e combater o parasito de maneira eficaz em casos de leishmaniose visceral e cutânea (SUNDAR E CHAKRAVARTY, 2014).

A Anfotericina B (Figura 8 – C) é um antimicrobiano pertencente à classe dos polienos, que foi isolado pela primeira vez em 1955 a partir de culturas de *Streptomyces nodosus*, atuando como tratamento indispensável nas infecções fúngicas. O seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado, mas há evidências de que atua diretamente sobre a membrana celular (formação de poros) interagindo com o ergosterol, um esteróide essencial de membrana em organismos fúngicos e de protozoários como o gênero *Leishmania* e amebas. Agindo também na indução do estresse oxidativo aumento a formação de radicais livres, com evidências na expressão de genes envolvidos nesse mecanismo, sendo um medicamento de primeira escolha em casos de leishmaniose visceral (Falci e Pasqualotto, 2015). Todavia, a terapia com a Anfotericina B convencional e lipossomal tem alto custo e requer um regime complexo de 15 infusões lentas em dias alternados, com vários efeitos colaterais como febre, calafrios, hipocalemia, nefrotoxicidade e anafilaxia (ROSENTHAL et al., 2009; BASTOS et al., 2016).

A miltefosina (Figura 8 – D) é um medicamento teratogênico que foi originalmente desenvolvido para o tratamento de metástases cutâneas de carcinomas mamários, portanto, seu uso é estritamente proibido em mulheres grávidas ou em mulheres que possam engravidar dentro de dois meses de tratamento. Foi demonstrado ser o primeiro tratamento oral com eficácia e seguro para leishmaniose visceral (LV) em outros países como a Índia, já no Brasil o SUS deliberou como uma das opções de primeira escolha para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar (LT) (CONITEC 2018), em pacientes resistentes aos antimoniais, e seu mecanismo de ação compreende a alteração das vias de sinalização e síntese da membrana celular do parasito, induzindo a apoptose. Entretanto, a não adesão ao regime recomendado também pode levar a resistência ao parasito, e seus efeitos colaterais incluem alterações gastrointestinais e alguns relatos de hepatotoxicidade (MARINHO et al., 2011; DORLO et al., 2012; NAGLE et al., 2014). Já o fármaco paramomicina (Figura 8 – E) é um antibiótico pertencente à classe dos aminoglicosídeos eficaz no tratamento antibacteriano, e de parasitos entéricos (Ameba, giárdia e tênia) que atua interferindo na síntese proteica e alterando a fluidez da membrana mitocondrial, o que inibe a respiração celular. Em virtude disso, tem sido empregado tanto no tratamento direto em regiões específicas de aplicação como na pele ou em membranas mucosas para tratar casos de leishmaniose cutânea (LC) e de forma

sistêmica em casos de leishmaniose visceral (LV). Os efeitos adversos da terapia tópica incluem dor e queimação no local de aplicação, além de baixa hepatotoxicidade (NAGLE et al., 2014)

Outra abordagem terapêutica é a utilização do Isotionato de pentamidina (Figura 8 – F), sintetizado pela primeira vez em 1930, para o tratamento de leishmaniose visceral (LV), depois para o tratamento de formas resistentes de leishmaniose tegumentar (LT), atualmente é preconizado pela OMS para casos clínicos de leishmaniose cutânea difusa (LCD), com administração via intramuscular ou infusão venosa. Havendo como principal mecanismo de ação a inibição da síntese de DNA do patógeno, alterando morfollogicamente o cinetoplasto, promovendo a desintegração mitocondrial, levando a eliminação do parasito. Seu uso é limitado devido aos seus efeitos adversos como hipoglicemia e hiperglicemia (Quadro 1) (PICCICA et al., 2021). A terapia combinada desses fármacos é uma opção para aumentar a eficácia do tratamento, prevenir o desenvolvimento de resistência aos medicamentos, reduzir a duração do tratamento e possivelmente diminuir o custo do tratamento (DIRO, et al., 2019).

Quadro 1. Fármacos convencionais usados no tratamento das leishmanioses recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

Medicamento	Eficácia	Vantagens	Limitações	Média de custo
Anfotericina B (Fungizone®)	>95%	- Eficaz contra a resistência aos antimoniais pentavalentes (SbV).	- A forma desoxicolato requer hospitalização e pode causar miocardite, hipocalcemia, toxicidade renal e reações no local da infusão.	R\$ 1.246,34 – R\$ 1.727,84
Anfotericina B lipossomal (AmBisome®)	100%	- Nenhum caso documentado de resistência ao fármaco; - Eficaz com baixo perfil de toxicidade.	- Alto custo; - Febre e calafrios durante a infusão; - Toxicidade renal.	R\$ 21.726,95 – R\$ 27.855,06
Miltefosina	94-97%	- Altamente potente; Primeiro tratamento oral eficaz para LV e LC.	- Altamente tóxico (fígado e rins); - Complicações gastrointestinais; - Não é seguro para pacientes grávidas (teratogênico).	R\$ 383,10 – R\$ 1.773,00
Sulfato de Paromomicina (Humatin®)	95% (Índia);	- Baixo custo	- Ototoxicidade reversível (2%);	R\$ 54,72 – R\$ 75,00

	46-85% (África)		- Dor no local da injeção (55%); - Altamente hepatotóxico (6%)	
Pentamidina (Lomidina®)	70-80%	- Uso potencial em terapia combinada em baixa dosagem	- Toxicidade renal; - Miocardite; - Diabetes mellitus insulino-dependente como efeito colateral irreversível (4-12% dos pacientes); - Hipoglicemia e hipotensão - Febre	R\$ 96,90 – R\$ 290,90
Antimoniais pentavalentes (SbV) (Glucantime® e Pentostan®)	35-95%	- Baixo custo; - Pode ser usado em combinação com Anfotericina B em pacientes grávidas ou idosos	- Resistência à droga na Índia (>60%); - Complicações cardíacas (taquicardia, fibrilação e arritmias cardíacas fatais); - Artralgia, mialgia, pancreatite, enzimas hepáticas elevadas; - Maior toxicidade em pacientes com HIV	R\$1.246,34 – R\$1.727,84

Fonte: (RATH et al., 2003; NAGLE et al., 2014; OPPAS, 2022; BRASIL, 2024).

Em um estudo de Purkait *et al.*, 2012, já foi relatado a resistência a Anfotericina B, em algumas espécies de *Leishmania* tanto na sua forma promastigota, quanto em amastigota, sendo assim, se faz necessário e importante combater a crescente resistência aos tratamentos atuais e a limitação dos já disponíveis no mercado. O desenvolvimento de novos medicamentos deve ser de forma interdisciplinar que integre diversas áreas como a biologia, química, farmacocinética entre outras, a fim de implementar novas terapias eficazes, com baixa toxicidade, com menor custo, não teratogênicas para os pacientes em tratamento, principalmente em áreas endêmicas (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021; ALMEIDA, 2022).

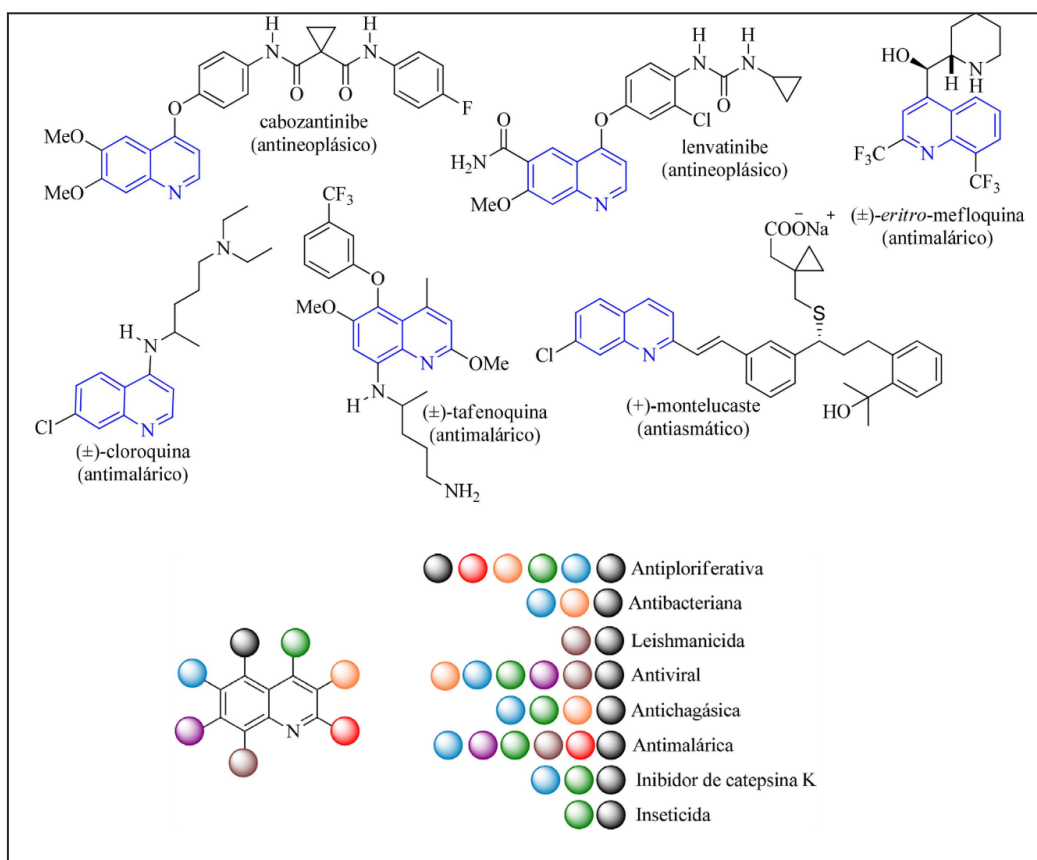
2.6 Quinolinas e seus derivados

Os compostos heterocíclicos são fundamentais em diversos processos, bioquímicos, com uma ampla aplicação na indústria farmacêutica, principalmente os compostos heterocíclicos nitrogenados, os mesmos já se encontram em mais da metade dos fármacos aprovados para diversos tratamentos (VITAKU, SMITH e NJARDARSON, 2014). Particularmente, dentre as

várias substâncias heterocíclicas nitrogenadas, as quinolinas destacam-se pelas diversas propriedades químicas e biológicas, caracterizada pela presença de um anel benzênico e um piridínico fundidos (FERREIRA et al., 2021).

Estes compostos se destacam pela variedade de sua atividade biológica, como antiproliferativa, antibacteriana, leishmanicida, antiviral, antichagásica, antimalárica, inibitória de catepsina K³⁰ e inseticida (RODRIGUES et al., 2011; GARUDACHARI e ISLOOR, 2014; MISHRA et al., 2014; VANDEKERCKHOVE e D'HOOGHE, 2015; NARWAL, KUMAR e VERMA, 2016; FERREIRA et al., 2021). Estas substâncias têm ação através da topoisomerase, interagindo com o DNA para formar complexos que provocam danos irreversíveis nas células, como o bloqueio da replicação celular, levando à indução da apoptose (SPENCER e PANDA, 2023). Considerando a importante funcionalidade do anel quinolínico, foi possível o desenvolvimento de vários medicamentos, destacando-se o cabozantinibe, lenvatinibe, cloroquina, mefloquina, tafenoquina e montelucaste (Figura 9).

Figura 9. Diversidade da atividade biológica de compostos heterocíclicos nitrogenados



Fonte: (FERREIRA et al., 2021). Estruturas de alguns fármacos contendo o núcleo quinolínico em azul e sua função biológica.

Em um estudo de Molina (2018), foi observado atividade anti-*Leishmania* de compostos contendo o núcleo quinolínico, em formas promastigotas e amastigotas *in vitro* e *in vivo* em camundongos, apresentando notável redução da carga parasitária no fígado e baço, levando em consideração que parasitos esplênicos, como a espécie *Leishmania infantum* são causadoras da forma mais grave da doença (Leishmaniose Visceral - LV) (SILVA et al., 2021). Por tanto, a síntese de novas substâncias contendo o núcleo quinolínico vem obtendo o interesse tanto na química medicinal, quanto na biotecnologia, os compostos investigados no presente estudo tem potencial farmacológico anti-*Leishmania* e podem ser alternativas farmacológicas promissoras no tratamento das leishmanioses.

2.7 Adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH)

Nas últimas décadas, novos compostos sintéticos derivados de novas abordagens de síntese, vem demonstrando uma variedade de propriedades farmacológicas, obtendo resultados significativos para o tratamento das leishmanioses, tal como os compostos sintéticos oriundos da reação química de Morita-Baylis-Hillman, que se destacam como candidatos promissores no estudo da atividade biológica contra o patógeno do gênero *Leishmania* (ROCHA et al., 2019; VIEIRA et al., 2022).

A reação, que forma ligações carbono-carbono entre átomos de carbono eletrofílicos sp^2 (BASAVAIAH et al., 2010), foi descrita pela primeira vez por Morita, em 1968, por meio de uma patente envolvendo a reação de aldeídos com acrilonitrila ou acrilato de metila contendo grupos eletrogeradores, utilizando triciclohexilfosfina como catalisador. Posteriormente, em 1972, Baylis e Hillman relataram a reação de aldeídos com alcenos ativados (ésteres, amidas ou nitrilas), catalisada por DABCO, uma amina terciária bicíclica. Ambas as reações possibilitaram a obtenção de compostos polifuncionais com rendimentos variados, devido à ampla variedade de aceptores de Michael capazes de reagir com carbonos eletrofílicos sp^2 obtendo assim abundante quantidade de moléculas desta reação (LIMA-JUNIOR et al., 2010; XAVIER et al., 2014; SILVA et al., 2016).

Desde então, essa reação tem sido aprimorada, por conta de alguns parâmetros como: temperatura, solventes e catalisadores a fim de obter maior pureza e menor tempo de reação. Suas características experimentais, como sua elaboração sintética, seletiva, com baixo custo e disponibilidade de reagentes, com a possibilidade de ser desenvolvida em meio aquoso ou na

ausência de solventes e por ser uma reação orgânica. Evidencia o interesse em aplicação biológica para o desenvolvimento de novas moléculas (COELHO e ALMEIDA, 2000; BARBOSA et al., 2009; BASAVIAH et al., 2010; XAVIER et al., 2016).

Há vários estudos sobre a bioatividade desses adutos contra diversas doenças negligenciadas: malária, doença de chagas, e as leishmanioses (NARENDER et al., 2005; SOUZA et al., 2007; KAUR et al., 2011; SANDES et al., 2014). Apresentam também atividade antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória e anticâncer (NARENDER et al., 2006; VASCONCELLOS et al., 2006; LIMA-JUNIOR e VASCONCELLOS, 2012; FAHEINA-MARTINS et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2024). Em parasitos do gênero *Leishmania* foram obtidas atividade consideráveis desses adutos, nas espécies de *L. donovani* (DA SILVA WAGNER et al., 2016), *L. infantum* e *L. amazonensis* (BARBOSA et al., 2009; LIMA-JUNIOR et al., 2009; JUNIOR et al., 2010; XAVIER et al., 2016; ROCHA et al., 2019) responsáveis pelas formas clínicas visceral e cutânea da leishmaniose.

O mecanismo de ação desses compostos é variável, devido a sua versatilidade em sua estrutura química, como também diferentes rotas metabólicas. Ademais muitos fatores podem influenciar sua atividade biológica (DEVI et al., 2024), como a lipofilicidade, pois fármacos tendem a ultrapassar a bicamada lipídica (lipofílica) da membrana plasmática, o que pode influenciar no seu efeito biofarmacológico, adição ou remoção de grupos funcionais e grau de insaturação, o que podemos chamar de Relação Estrutura-Atividade (SAR) (SILVA et al., 2011; LIMA-JUNIOR e VASCONCELOS, 2012) isto indica que compostos com estruturas químicas semelhantes apresentar podem atividades semelhantes, importante na otimização de análogos mais ativos e menos tóxicos para células humanas.

Diante da diversidade de seu potencial biológico, evidenciados anteriormente, justifica-se a busca por novos adutos oriundos desta reação MBH, contra as formas promastigotas de *Leishmania infantum* como também a investigação sobre a sua citotoxicidade sobre eritrócitos humanos, importantes para a pesquisa de novas moléculas promissoras no desenvolvimento de terapias com menos efeitos colaterais para os pacientes, assim possibilitando abordagens biotecnológicas inovadoras na síntese de novos fármacos anti-*Leishmania*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliação da atividade biológica *in vitro* de novos compostos sintéticos sobre formas promastigotas e amastigotas do parasito *L. infantum* e seus possíveis efeitos citotóxicos sobre células humanas.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* (*screening*) de compostos sintéticos quinolínicos e Adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) sobre formas promastigotas de *L. infantum*;
- Analisar o efeito citotóxico dos compostos sintéticos selecionados sobre os eritrócitos humanos de indivíduos saudáveis;
- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* de compostos sintéticos selecionados sobre formas amastigotas axênicas de *L. infantum*;
- Investigar o efeito citotóxico dos compostos sintéticos selecionados em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis;
- Analisar o efeito inibitório e citotóxico do núcleo (Isatina) dos compostos sintéticos;
- Determinar o índice de seletividade dos compostos sintéticos selecionados.

4 METODOLOGIA

4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas (LABIDIC), do Departamento de Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Considerações éticas

Essa dissertação de mestrado faz parte de um projeto maior na área de pesquisa em leishmanioses, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB (CAAE: 17813013.8.0000.5183) (**ANEXO A**), sendo o projeto intitulado “Leishmaniose Visceral Humana: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico de doença sintomática e assintomática”. Além disso, Todos os participantes desta pesquisa foram informados sobre a importância da mesma,

bem como foram instruídos a assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) para participação voluntária na mesma.

4.3 Parasitos e manutenção das culturas *in vitro*

A forma promastigota da *Leishmania infantum* (cepa de referência - BR2000) foram mantidas *in vitro* em meio NNN (cultivo de Tripanosomatídeos), preparado a partir do ágar base para ágar sangue (Blood agar base- Acumedia- cat. 7266a) (Zeledón, 1996), água destilada e sangue humano heparinizado; juntamente ao meio Schneider com pH 7 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, São Paulo, BRA), 1% de antibiótico (penicilina 200 U/mL e estreptomicina 0.1 mg/mL - Gibco, BR) e 2% de urina masculina humana, denominado neste trabalho de meio Schneider suplementado. As culturas foram mantidas a uma temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ em estufa de demanda biológica de oxigênio (DBO) e repicadas semanalmente, em meio Schneider suplementado, não ultrapassando vinte repiques, para manutenção das culturas. Todos os meios preparados foram realizados teste de esterilidade por no mínimo 24 horas antes do uso.

4.4 Obtenção das formas amastigotas axênicas

As formas promastigotas de *L. infantum* foram diferenciadas em formas amastigotas axênicas conforme o protocolo de Debrabant et al., 2004. Primeiramente as formas promastigotas foram cultivadas até atingirem a fase estacionária, com base em sua curva de crescimento, em seguida, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos à 2000 rotações por minuto (RPM) e 25°C . O sobrenadante foi descartado, sendo então as células ressuspensas em meio Schneider suplementado com pH 5,5 e as células foram incubadas em estufa com Demanda Biológica de CO₂ (5%) à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas para realizar a diferenciação das promastigotas em amastigotas axênicas. A morfologia característica de amastigota foi analisada sob microscopia óptica antes de cada experimento.

4.5 Compostos químicos avaliados

4.5.1 Fármaco de referência

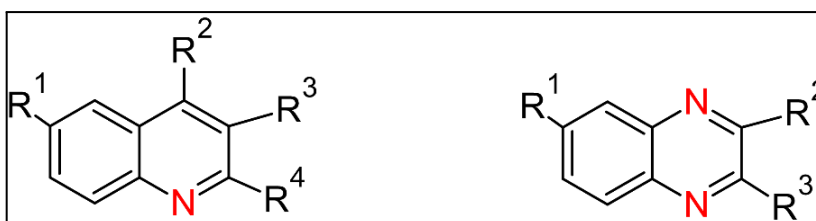
A Anfotericina B (Anforicin B® – Cristália, São Paulo, Brasil), é um antimicrobiano da classe dos polienos, utilizado no tratamento da leishmaniose e foi escolhido como medicamento de referência no presente estudo. Uma solução estoque de Anfotericina B, apresentada na forma de pó liofilizado, foi preparada na concentração de 10 mg/mL,

solubilizada em DMSO. Posteriormente, essa solução foi diluída com o meio de cultura apropriado até a concentração necessária para os testes, garantindo que a concentração final de DMSO nas soluções teste não excedesse 0,5%.

4.5.2 Quinolinas e seus derivados

Vinte e quatro compostos quinolínicos foram sintetizados no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LASOM-PB) (Figura 10), sob responsabilidade do Prof. Dr. Cláudio Gabriel Lima Júnior no Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, estes compostos estudados estão sob sigilo de pesquisa (Tabela 1). Todos os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) para obter soluções-estoque (10 mg/mL). Para obter as concentrações finais dos fármacos nos ensaios, as soluções-estoque foram diluídas a partir da solução-estoque apropriada e diluída nos meios de cultura apropriados até atingir as concentrações finais desejadas, não ultrapassando a concentração de 0,5% de DMSO.

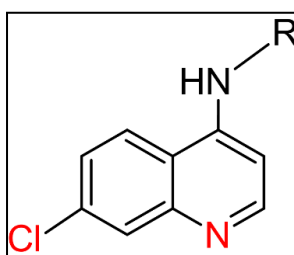
Figura 10. Estrutura química geral dos derivados de quinolina



Elaboração própria, 2025. Estrutura química geral dos compostos derivados quinolínicos, em que um ou dois carbonos são substituídos pelo heteroátomo Nitrogênio (N) e suas respectivas substituições (R) no anel aromático.

Outros 20 compostos sintéticos (Tabela 2), foram sintetizados e cedidas pelo Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica (Figura 11), coordenado pelo Prof. Dr. Petrônio Filgueiras Athayde Filho, da Universidade Federal da Paraíba – UFPB. Os quais apresentam solubilidade em DMSO a 32 °C. Estes compostos estudados estão sob sigilo de pesquisa. Para os testes *in vitro* as substâncias foram solubilizadas em DMSO a fim de se obter soluções-estoque de 10 mg/mL. Em cada protocolo, as soluções-estoque foram diluídas nos meios de cultura apropriados até atingirem as concentrações desejadas, não ultrapassando a concentração de 0,5% de DMSO.

Figura 11. Estrutura química geral dos derivados de cloroquina



Elaboração própria, 2025. Estrutura química geral dos compostos derivados de cloroquina, em que um dos carbonos é substituído pelo heteroátomo Nitrogênio (N) e sua respectiva substituição (R) no 4-aminoquinolinas de seu anel aromático.

Tabela 1. Série de compostos derivados quinolínicos avaliados e sua respectiva massa molar

Compostos (Código)	Massa Molar (g/mol)
QNX-4-OMe	386,41 g/mol
QNX-Tienil	338,40 g/mol
QNX-4-BR	484,15 g/mol
QNX-4-Me	354,41 g/mol
QLB-2	343,38 g/mol
QLB-1	327,38 g/mol
QNL-2-OH	291,31 g/mol
QNL-3-OMe-4-OC4	377,44 g/mol
QNL-2-AC	333,34 g/mol
QNL-2-NO2	320,30 g/mol
QNL-3-OMe-4-AC	363,37 g/mol
QNL-3,4-OMe	335,36 g/mol
QNL-3-OMe-4-OH	321,33 g/mol
2A	267,26 g/mol
2B	281,29 g/mol
2C	281,29 g/mol
2D	343,36 g/mol
2E	317,32 g/mol
2F	285,25 g/mol
2G	346,16 g/mol
2H	283,26 g/mol
2I	283,26 g/mol
2J	297,29 g/mol
2K	311,27 g/mol

Tabela 2. Série de compostos derivados de cloroquinas avaliados e sua respectiva massa molar.

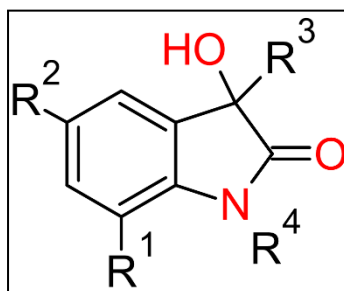
Compostos (Código)	Massa Molar (g/mol)
DOC1	221,68 g/mol
DOC3	220,70 g/mol
DOC2	223,65 g/mol
DOC5	222,67 g/mol
DOC21	221,68 g/mol
DOC22	235,71 g/mol
DOC28	249,74 g/mol
DOC27	277,79 g/mol
DOC30	327,76 g/mol
DOC42	326,78 g/mol
DOC70	325,79 g/mol
DOC71	339,82 g/mol
DOC72	339,82 g/mol
DOC73	355,82 g/mol
DOC74	355,82 g/mol
DOC75	385,84 g/mol
DOC76	360,23 g/mol
DOC77	360,23 g/mol
DOC78	343,78 g/mol
DOC79	370,79 g/mol

4.5.3 Adutos de Morita-Baylis-Hillman

Inicialmente doze compostos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman (MBH), foram sintetizados no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LASOM-PB), sob responsabilidade do Prof. Dr. Cláudio Gabriel Lima Júnior no Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, estes compostos estudados estão sob sigilo de pesquisa (Tabela 3). Estes compostos foram solubilizados em DMSO a 25 °C, para os testes a fim de obter soluções-estoque de 10

mg/mL. Em cada protocolo, as soluções-estoque foram diluídas nos meios de cultura apropriados até atingirem as concentrações desejadas, não ultrapassando a concentração de 0,5% de DMSO.

Figura 12. Estrutura química geral dos Adutos de Morita-Baylis-Hillman



Elaboração própria, 2025. Estrutura química geral dos adutos oriundos da reação Morita-Baylis-Hillman, em que um dos carbonos é substituído pelo heteroátomo Nitrogênio (N) e suas respectivas substituições (R) seu anel aromático de isatina.

Tabela 3. Série de compostos oriundos da reação Morita-Baylis-Hillman (MBH) avaliados e sua respectiva massa molar

Compostos (Código)	Massa Molar (g/mol)
AIM52	247,25 g/mol
AIM22	291,28 g/mol
AIH04	402,41 g/mol
AIM41	281,69 g/mol
AIM21	265,24 g/mol
AIM51	316,13 g/mol
AIM02	273,29 g/mol
AIM12	287,32 g/mol
AIM23	341,34 g/mol
AIM03	323,35 g/mol
ANO22	486,13 g/mol
AIC52	309,15 g/mol

Após a triagem dos doze adutos de MBH foram pré-selecionados os que tiveram uma atividade de inibição da viabilidade em formas promastigotas do parasito, destes ainda foram

sintetizados mais oito adutos de MBH com modificações estruturais com base nos adutos pré-selecionados (Tabela 4) para os testes seguintes juntamente com a isatina (núcleo). Estes compostos também foram solubilizados em DMSO a 25 °C, para os testes a fim de obter soluções-estoque de 10 mg/mL. Em cada protocolo, as soluções-estoque foram diluídas nos meios de cultura apropriados até atingirem as concentrações desejadas, não ultrapassando a concentração de 0,5% de DMSO.

Tabela 4. Série de compostos modificados oriundos da reação Morita-Baylis-Hillman e núcleo (Isatina) avaliados e sua respectiva massa molar

Compostos (Código)	Massa Molar (g/mol)
ISATINA	147,13
AIM51	316,13
AIN51	283,10
AIM41	281,69
AIN41	248,66
AIM43	357,79
AIN43	324,76
AIM53	392,53
AIN53	359,20

4.6 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* dos compostos sobre formas promastigotas do parasito *Leishmania infantum*

A atividade anti-*Leishmania* dos compostos testados foi avaliada utilizando o teste colorimétrico do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT - Amresco, Ohio, EUA) sobre as formas promastigotas da espécie *L. infantum*. Em placas de cultivo de 96 poços, foram adicionados 2×10^6 promastigotas/poço contendo 50 µL de meio Schneider suplementado para o volume final de 100 µL em cada poço, e em seguida as soluções estoques dos compostos avaliados foram adicionadas às placas, em triplicata, atingindo concentrações seriadas de 400 a 3,12 µM e a Anfotericina B como controle positivo, de 10 a 0,07 µM. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa de DBO a 26 °C. Ao final da incubação, foi adicionado 10 µL de MTT diluído em PBS (salina fosfatada tamponada) a uma concentração final de 5 mg/mL e incubadas por mais 4 horas em estufa DBO à 26 °C. Em

seguida foram adicionados 50 µL de dodecil sulfato de sódio (DSS) a 10%. A placa foi incubada até a dissolução completa do formazan e por último, foi realizada a leitura em espectrofotômetro 540 nm em leitor de placa (Biotek modelo ELx800) (RODRIGUES et al., 2015). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular e em valores de concentração inibitória média, onde foi inibido 50% da viabilidade de formas promastigotas (CI_{50}), sendo o controle negativo realizado em meio Schneider suplementado a 0,5% de DMSO e considerado como 100% de viabilidade celular dos parasitos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em 3 experimentos independentes.

4.7 Análise da citotoxicidade em eritrócitos humanos

Amostras de sangue foram coletadas de voluntários saudáveis ($n = 9$), em tubos com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para os ensaios de citotoxicidade em eritrócitos humanos do tipo sanguíneo O+ (LÖFGREN et al., 2008). Após a coleta, os eritrócitos foram diluídos em 80 µL de PBS, ajustando a concentração do sangue para 5% de hemácias. Em seguida, foram adicionados os compostos a serem analisados em concentrações seriadas de 400 a 3,12 µM para os derivados oriundos da reação Morita-Baylis-Hillman como também para a Anfotericina B, diluídos num volume de 20 µL de PBS. Logo após, foram incubados durante 1 hora a 37 °C e a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de PBS. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 2000 rpm a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para placas de 96 poços, sendo submetido à espectrofotometria com comprimento de onda de 550nm para quantificar a atividade hemolítica. A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. O ensaio foi feito em três experimentos independentes e os resultados foram expressos em concentração hemolítica média (CH_{50}), considerando o controle positivo como 100% de hemólise (JAIN e JAIN, 2018).

4.8 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* dos compostos sobre formas amastigotas axênicas do parasito *Leishmania infantum*

A atividade anti-*Leishmania* dos compostos nas formas amastigotas, foi avaliada também pelo método de MTT, para análise de viabilidade celular. Inicialmente, as culturas promastigotas de *L. infantum* foram diferenciadas para formas amastigotas axênicas conforme protocolo de Debrabant et al., 2004. Em placas de 96 poços, foram adicionados 50µL de meio Schneider suplementado (pH5,5) em todos os poços a partir da 2ª linha. Posteriormente, os

poços da primeira linha foram preenchidos com meio Schneider suplementado e compostos de interesse previamente calculados e diluídos. Em sequência, foi realizada diluição seriada das substâncias, obtendo assim, as concentrações de 400 a 3,12 μM . Após ajuste da concentração, os parasitos foram adicionados aos poços, e posteriormente as placas foram incubadas por 24h em estufa de Demanda Biológica de CO_2 (5%) à 37 °C. Ao final do período de incubação, foram adicionados 10 μL de MTT diluído em PBS, atingindo uma concentração final de 5 mg/mL. Em seguida, as placas foram incubadas por mais 4 horas em estufa BOD à 26 °C, e em seguida, foram adicionados 50 μL de SDS a 10% , passando por um período overnight (12 a 16 horas) para dissolução do formazan e, por fim, foi realizada leitura a 540 nm em leitora de placa (Biotek modelo ELx800). O controle negativo foi mantido na ausência dos compostos teste, contendo 50 μL de meio Schneider suplementado (pH 5,5) + 50 μL de 1×10^6 parasitos/poço. Já o controle positivo foi realizado na presença de Anfotericina B como fármaco de referência nas concentrações de 10 a 0,078 μM + cultura de amastigota na concentração de 1×10^6 parasitos/poço. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular e em valores de concentração efetiva sobre 50% de amastigotas (CE_{50}).

4.9 Ensaio de citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico humano

Para a obtenção das células mononucleares do sangue periférico foram coletados 20 mL de sangue humano de voluntários saudáveis ($n = 3$) em tubos anticoagulantes contendo heparina, o qual foi diluído no mesmo volume em PBS. Montou-se o gradiente para a centrifugação utilizando o Ficoll Paque Plus® (GE Healthcare, Chicago, E.U.A), vertendo o sangue vagarosamente, em tubos cônicos de 50 mL contendo o Ficoll Paque Plus®. Centrifugou-se a 2000 rpm, por 20 minutos à temperatura 20°C. Nesse método de separação, as hemácias e granulócitos possuem uma densidade maior que o Ficoll Paque Plus®, e posicionam-se abaixo da camada desse reagente, enquanto que as células mononucleares e as plaquetas foram coletadas no topo da camada de Ficoll Paque Plus®, por apresentarem uma baixa densidade. Assim, os anéis de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) humano, ou human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), foram coletados e transferidos para um tubo cônico de 15 mL estéril, completando o volume com PBS 1x estéril para lavagem das células, seguido de centrifugação a 1500 RPM por 10 minutos a 4°C, completando um ciclo de 2 lavagens para retirada de plaquetas residentes. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), suplementado com 10% de SBF e 1% de antibiótico (penicilina 200 U/mL e

estreptomicina 0.1 mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). E a viabilidade destas foi observada a partir da contagem das células com corante Azul de Trypan 0,4% (diluição 1:20) no hemocítômetro e determinação do número de células viáveis na suspensão celular (MACIEL et al., 2014). Ao final desta etapa, a concentração de células foi ajustada com meio RPMI para $1,5 \times 10^6$ células/mL, e foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços, fornecendo uma quantidade estimada de 150.000 células/poço. Simultaneamente, os compostos previamente diluídos foram adicionados a seus respectivos poços nas concentrações de 400 a 3,12 μ M, a fim de se obter curva citotóxica e determinar a Concentração Citotóxica Média (CC₅₀) dos compostos em PBMCs. O controle negativo foi realizado apenas com células + meio RPMI e o controle positivo foi a Anfotericina B nas mesmas concentrações de 100 a 0,78 μ M. Após a adição dos compostos, foi adicionado meio para um volume final de 200 μ L/poço. As placas então foram incubadas em estufa com demanda biológica de CO₂ (5%), por 24h. Após o período de tratamento, as placas foram centrifugadas (1500 rpm por 10 minutos à 4°C) e 100 μ L/poço dos sobrenadantes desprezados. Foi adicionado 10 μ L de MTT diluído em PBS 1x a uma concentração final de 5 mg/mL. As placas foram incubadas por mais 4 horas em estufa a 37°C, CO₂ 5%, e em seguida as placas foram centrifugadas novamente para retirada de todo o sobrenadante e adicionado 200 μ L DMSO em cada poço para solubilização do formazan em agitador de placa por 15 minutos. Por fim, foi realizada a leitura a 540 nm em leitor de placa (Biotek modelo ELx800).

4.10 Determinação do índice de seletividade dos compostos avaliados

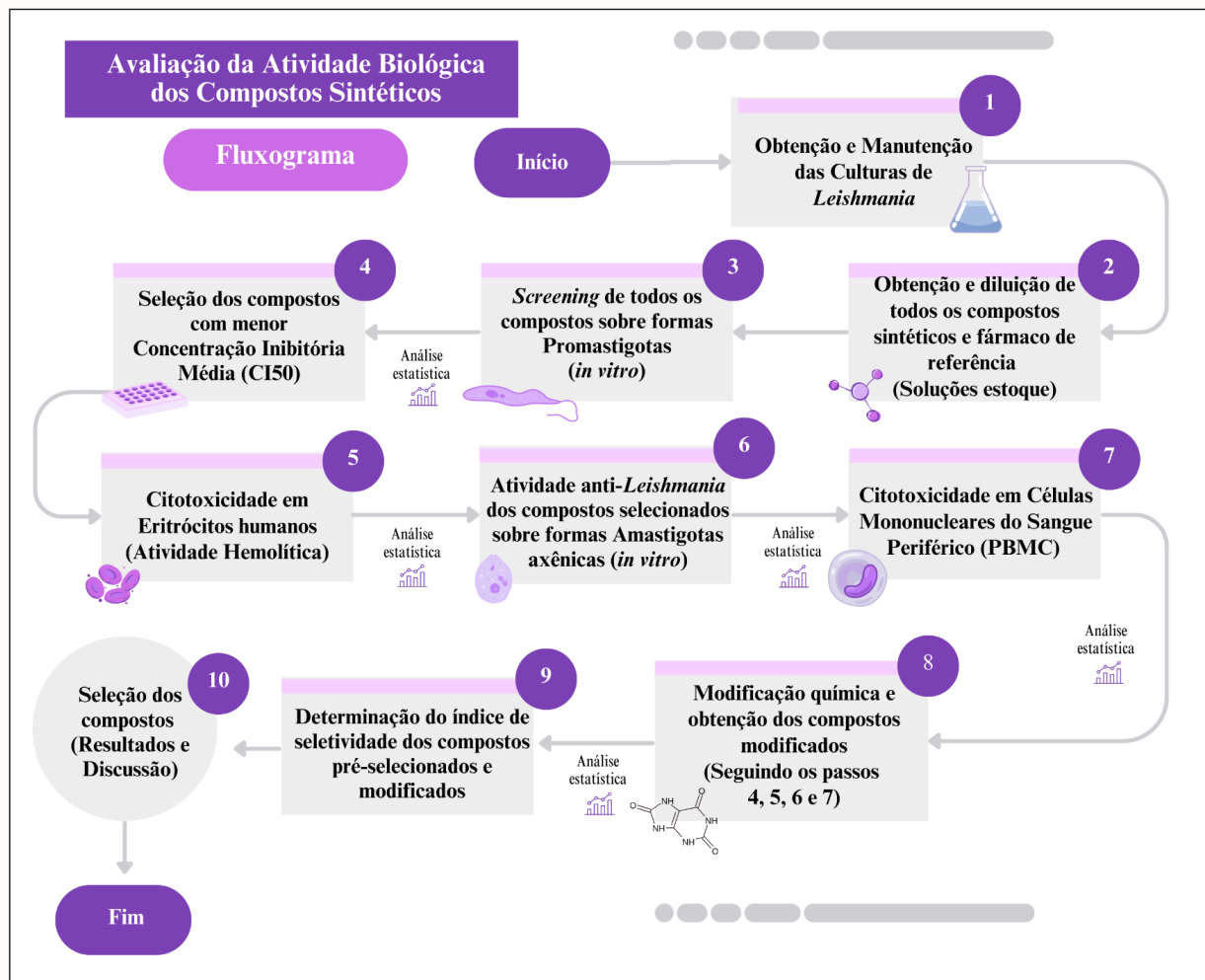
O índice de seletividade (IS) é o valor que indica quantas vezes uma substância é mais seletiva para o parasito do que para a célula mamífera (PBMC ou eritrócitos), e foi calculado a partir dos resultados de Concentração Inibitória 50% (CI₅₀), Concentração Efetiva 50% (CE₅₀), Concentração Citotóxica 50% (CC₅₀), Concentração Hemolítica 50% (CH₅₀). Dessa forma o cálculo do IS é determinado pela razão da CI₅₀ ou CE₅₀ por cada CC₅₀ e CH₅₀ (LAHLOU et al., 2007; AYKUL et al., 2016; KOUTSONI et al., 2019).

4.11 Análise Estatística

Todos os ensaios *in vitro* foram realizados em triplicata, em pelo menos três experimentos independentes. O software GraphPad Prism versão 9.0 (San Diego, CA) foi utilizado para o cálculo da CI₅₀, CE₅₀, CC₅₀, CH₅₀ com limite de confiança de 95%. O mesmo programa foi utilizado para as comparações entre os grupos pela análise de variância

(ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Todas as análises tiveram como nível máximo necessário para a significância estatística com um valor de $p \leq 0.05^*$.

Figura 13. Fluxograma metodológico



Fonte: Elaboração própria, 2025.

5 RESULTADOS

5.1 Atividade anti-*Leishmania* de derivados quinolínicos sobre as formas promastigotas de *Leishmania infantum*

Os compostos QNX-4-BR, QNX-4-Me, QLB-2, QLB-1 apresentaram concentrações de inibição (CI_{50}) com Intervalo de Confiança (IC) em 65,31 μ M (42,40 - 99,13); 71,33 μ M (43,16 - 117,3); 46,9 μ M (31,54 - 70,33); 144,1 μ M (112,2 - 190,1) respectivamente (Tabela 5). Enquanto que o CI_{50} para Anfotericina B, fármaco de referência, foi 0,75 μ M com intervalo de confiança (IC) de 0,52 - 1,12. Dessa forma, após a triagem, observou-se que os compostos dessa classe não apresentaram uma atividade satisfatória de inibição, sendo assim não foram prosseguidos ensaios posteriores.

Tabela 5. Concentração inibitória de 50% da viabilidade de formas promastigotas (CI_{50}) de *Leishmania infantum* após 72h de incubação com os compostos quinolínicos e fármaco de referência

Compostos	IC	CI_{50} (μ M)
QNX-4-OMe	-	≥ 400
QNX-Tienil	-	≥ 400
QNX-4-BR	(42,40 - 99,13)	65,31
QNX-4-Me	(43,16 - 117,3)	71,33
QLB-2	(31,54 - 70,33)	46,93
QLB-1	(112,2 - 190,1)	144,1
QNL-2-OH	-	≥ 400
QNL-3-OMe-4-OC4	-	≥ 400
QNL-2-AC	-	≥ 400
QNL-2-NO2	-	≥ 400
QNL-3-OMe-4-AC	-	≥ 400
QNL-3,4-OMe	-	≥ 400
QNL-3-OMe-4-OH	-	≥ 400
2A	-	≥ 400
2B	-	≥ 400
2C	-	≥ 400
2D	-	≥ 400
2E	-	≥ 400
2F	-	≥ 400
2G	-	≥ 400
2H	-	≥ 400
2I	-	≥ 400
2J	-	≥ 400

2K	-	≥ 400
Anfotericina B	(0,52 - 1,12)	0,75

Fonte: Elaboração própria, 2025. Os valores representam o intervalo de confiança (IC) de 95%, obtido através de regressão não-linear com o programa *GraphPad Prism 9.0*. $CI_{50} \geq 400$ = composto não obteve atividade na maior concentração testada.

5.2 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* de compostos derivados de cloroquinas sobre as formas promastigotas de *Leishmania infantum*

Dos 20 compostos testados apenas dois apresentaram atividade de inibição, sendo o DOC27 e DOC75 com concentrações de inibição (CI_{50}) e intervalo de confiança (IC) em 66,14 μ M (35,24 - 135,7) e 53,94 μ M (32,07 - 88,53) respectivamente (Tabela 6). Enquanto que o CI_{50} para Anfotericina B, fármaco de referência, foi de 0,75 μ M (0,52- 1,12). Dessa forma, após a triagem, observou-se que os compostos dessa classe também não apresentaram uma atividade satisfatória de inibição, sendo assim não foram prosseguidos ensaios posteriores.

Tabela 6. Concentração inibitória de 50% da viabilidade de formas promastigotas (CI_{50}) de *Leishmania infantum* após 72 h de incubação com os compostos derivados de cloroquina e fármaco de referência

Compostos	IC	CI_{50} (μ M)
DOC1	-	≥ 400
DOC3	-	≥ 400
DOC2	-	≥ 400
DOC5	-	≥ 400
DOC21	-	≥ 400
DOC22	-	≥ 400
DOC28	-	≥ 400
DOC27	(35,24 - 135,7)	66,14
DOC30	-	≥ 400
DOC42	-	≥ 400
DOC70	-	≥ 400
DOC71	-	≥ 400
DOC72	-	≥ 400
DOC73	-	≥ 400
DOC74	-	≥ 400
DOC75	(32,07 - 88,53)	53,94
DOC76	-	≥ 400
DOC77	-	≥ 400
DOC78	-	≥ 400
DOC79	-	≥ 400
Anfotericina B	(0,52 - 1,12)	0,75

Fonte: Elaboração própria, 2025. Os valores representam o intervalo de confiança (IC) de 95%, e o CI_{50} , obtidos através de regressão não-linear com o programa *GraphPad Prism 9.0*. $CI_{50} \geq 400$ = composto não obteve atividade na maior concentração testada.

5.3 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* de Adutos Morita-Baylis-Hillman sob as formas promastigotas de *Leishmania infantum*

Os compostos AIM52, AIM51, AIM03, ANO22 e AIC52 avaliados mostraram atividade de inibição da viabilidade (CI_{50}) com Intervalo de Confiança (IC) em 20,89 μ M (14,02 - 32,16); 37,04 μ M (24,90 - 59,46); 62,94 μ M (27,47 - 176,8); 34,42 μ M (15,64 - 77,69); 12,87 μ M (7,62 - 20,13) respectivamente (Tabela 7), enquanto que o CI_{50} para Anfotericina B, fármaco de referência, foi de 0,75 μ M (0,52 - 1,12).

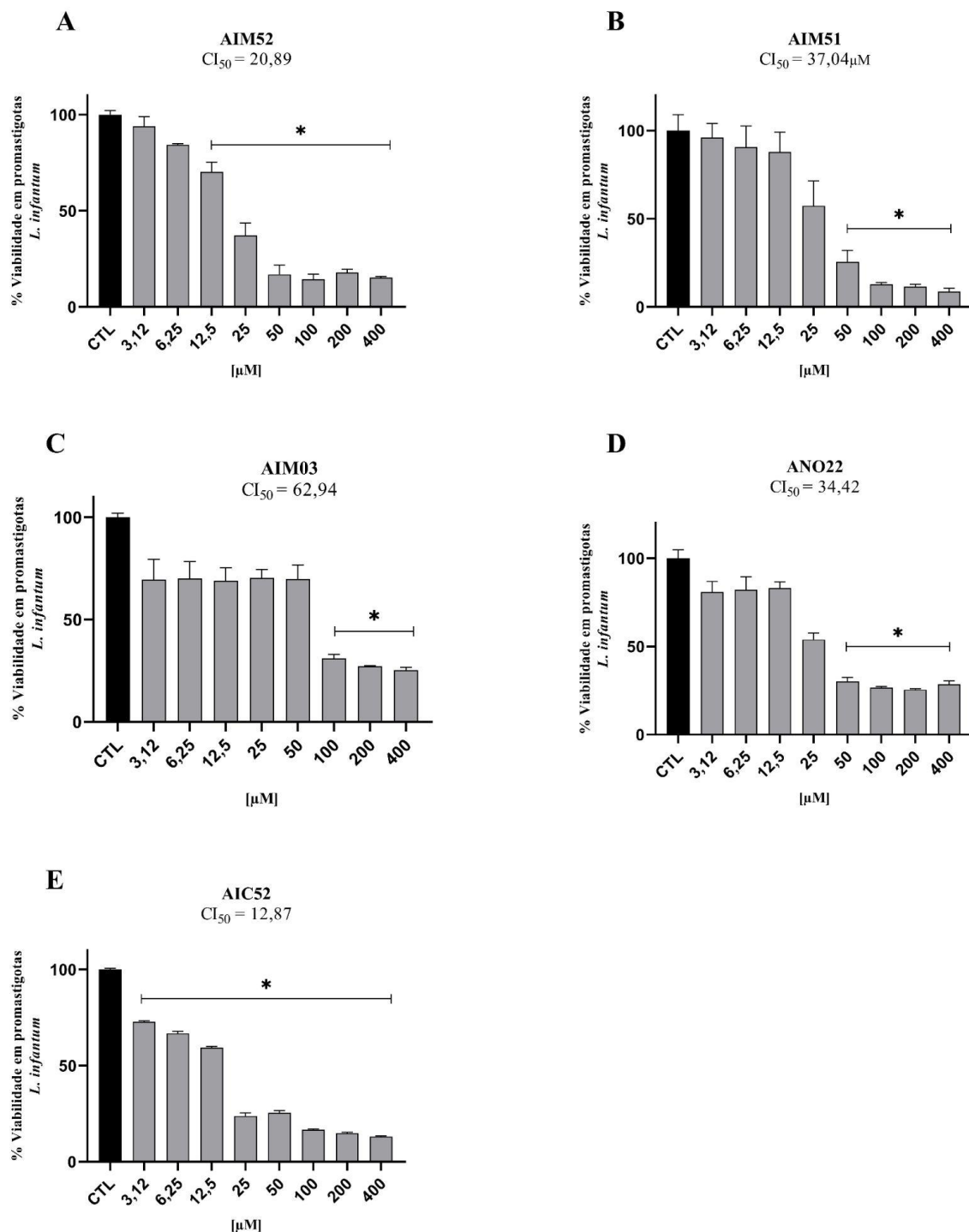
Tabela 7. Concentração inibitória de 50% da viabilidade de formas promastigotas (CI_{50}) de *Leishmania infantum* após 72 h de incubação com os compostos derivados de Adutos Morita-Baylis-Hillman e fármaco de referência

Compostos	IC	CI_{50} (μ M)
AIM52	(14,02 - 32,16)	20,89
AIM22	-	≥ 400
AIH04	-	≥ 400
AIM41	-	≥ 400
AIM21	-	≥ 400
AIM51	(24,90 - 59,46)	37,04
AIM02	-	≥ 400
AIM12	-	≥ 400
AIM23	-	≥ 400
AIM03	(27,47 - 176,8)	62,94
ANO22	(15,64 - 77,69)	34,42
AIC52	(7,62 - 20,13)	12,87
Anfotericina B	(0,52 - 1,12)	0,75

Fonte: Elaboração própria, 2025. Os valores representam o intervalo de confiança (IC) de 95%, obtido através de regressão não-linear com o programa *GraphPad Prism 9.0*. $CI_{50} \geq 400$ = composto não obteve atividade na maior concentração testada.

Portanto, após a triagem, observou-se que os compostos AIM52 e AIC52 apresentaram melhor atividade inibitória (Figura 14) e assim foram selecionados para continuar os testes.

Figura 14 - Atividade dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52, AIM51, AIM03, ANO22 e AIC52) sob a inibição de viabilidade dos parasitos, após 72h de tratamento em formas promastigotas de *Leishmania infantum*



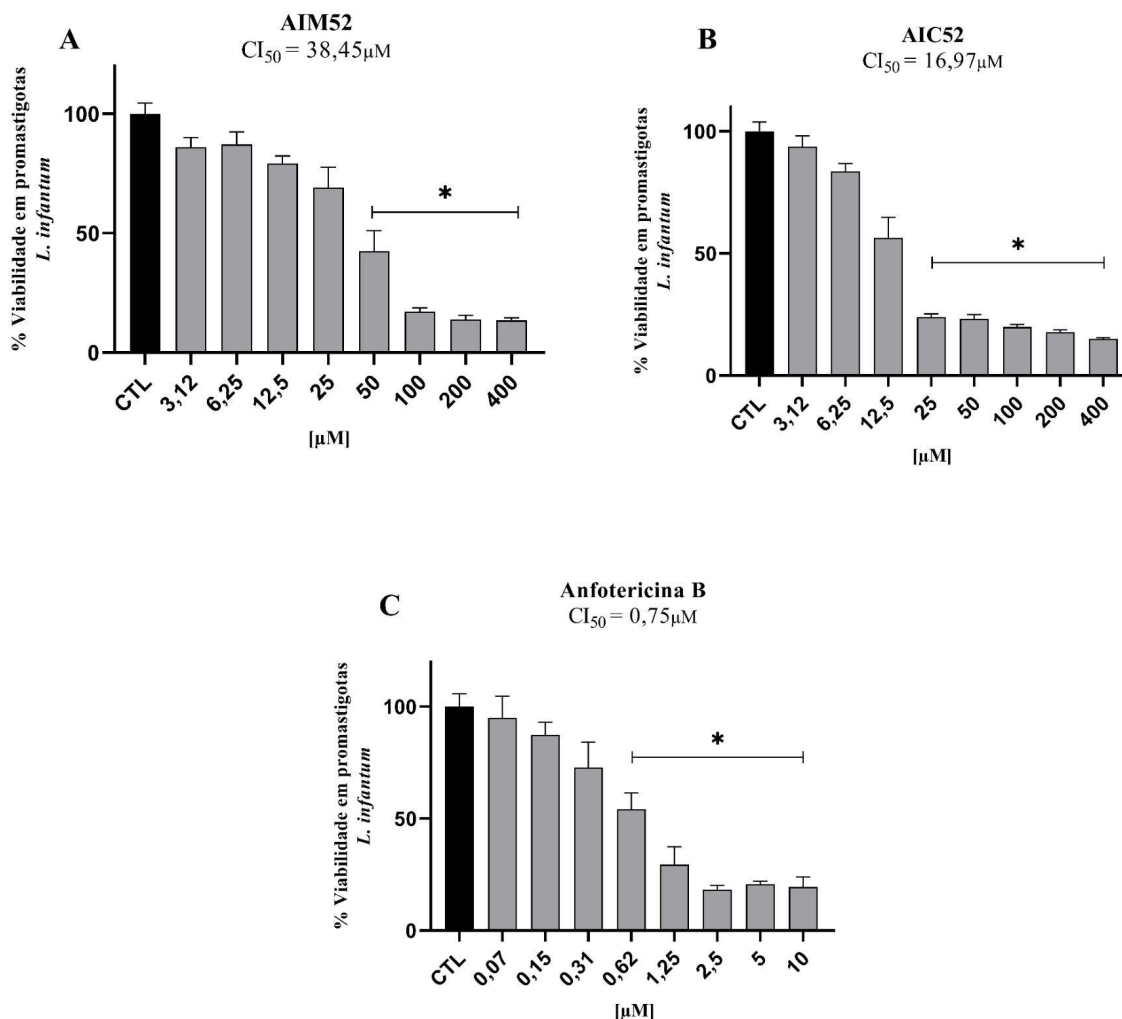
Fonte: Elaboração própria, 2025. A análise representa o intervalo de confiança a 95% da média de cada experimento, considerando o controle negativo (CTL). Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo $*p < 0,05$ em comparação ao controle.

A figura 1 mostra a atividade anti-*Leishmania* sob formas promastigotas dos Adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) após 72h de tratamento, em porcentagem de inibição da viabilidade do parasito, e os seus respectivos valores de CI_{50} na Tabela 7. Esses adutos apresentaram uma inibição nas concentrações analisadas, quando comparadas ao controle (100% de viabilidade celular). Comparando-se a porcentagem de inibição de viabilidade de promastigotas, observou-se que os compostos AIM52 e AIC52, obtiveram melhor atividade inibitória nas concentrações apresentadas (3,12 a 400 μ M) (Figura 14A e 14E), sendo estes valores bem inferiores às concentrações testadas dos demais derivados AIM51, AIM03, ANO22 (50 a 400 μ M) (Figura 14-B, 14C e 14-D). Em 12,5 μ M, para o composto AIM52 (Figura 14A), foi observada uma inibição de 14,02 - 32,16 ($p < 0,05$) enquanto o composto AIC52 (Figura 14-E) na concentração de 3,12 alcançou uma menor inibição de 7,62 - 20,13 ($p < 0,05$). Já para os compostos AIM51 e ANO22 (Figura 14-B e 14-D), na concentração de 50 μ M a porcentagem de inibição da viabilidade foi de 24,90 - 59,46 e 15,64 - 77,69 respectivamente, enquanto o composto AIM03 (Figura 14-C), na concentração de 100 μ M obteve uma inibição de 27,47 - 176,8.

5.4 Atividade anti-*Leishmania* dos compostos selecionados AIM52 e AIC52 sobre as formas promastigotas de *Leishmania infantum*

Os adutos de Morita-Baylis-Hillman que obtiveram melhor índice inibitório de viabilidade das formas promastigotas de *L. infantum*, foram a AIM52 e AIC52, juntamente com o fármaco de referência Anfotericina B. Dessa forma, foi possível determinar em porcentagem a concentração inibitória (CI_{50}), após 72h de tratamento, a partir de ensaios *in vitro* pelo método de MTT. Esses compostos apresentaram uma inibição de maneira dependente de concentração para as concentrações analisadas, quando comparadas ao controle (Figura 15). Foi observado um perfil inibitório de menor valor do CI_{50} (10,12 - 29,90) para o composto AIC52 na concentração de 16,97 μ M, já o composto AIM52 obteve um CI_{50} de 26,61 - 55,19 na concentração de 38,45 μ M, para as formas promastigotas de *L. infantum* em comparação ao controle (0% de inibição de viabilidade). O fármaco de referência utilizado Anfotericina B foi obtido um CI_{50} de 0,52 - 1,12 na concentração de 0,75 μ M demonstrando também a sua atividade anti-*Leishmania* (Figura 15).

Figura 15 - Concentração de inibição dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52, AIC52) e fármaco de referência Anfotericina B sob a inibição da viabilidade de formas promastigotas após 72h de tratamento



Fonte: Elaboração própria, 2025. A análise representa o intervalo de confiança a 95%.

5.5 Citotoxicidade dos compostos AIM52 e AIC52 em eritrócitos humanos

A citotoxicidade em relação aos eritrócitos humanos dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52 e AIC52) foi avaliada *in vitro* e os resultados estão descritos na Tabela 8. Os ensaios da atividade hemolítica demonstraram que os adutos de MBH não alteram a viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas, ou seja, não causam a lise de hemácias na maior concentração observada, tendo uma Concentração Hemolítica $CH_{50} \geq 400\mu M$, com o controle sendo considerado com 100% de viabilidade celular. Em contrapartida o fármaco de referência avaliado, Anfotericina B, apresentou atividade

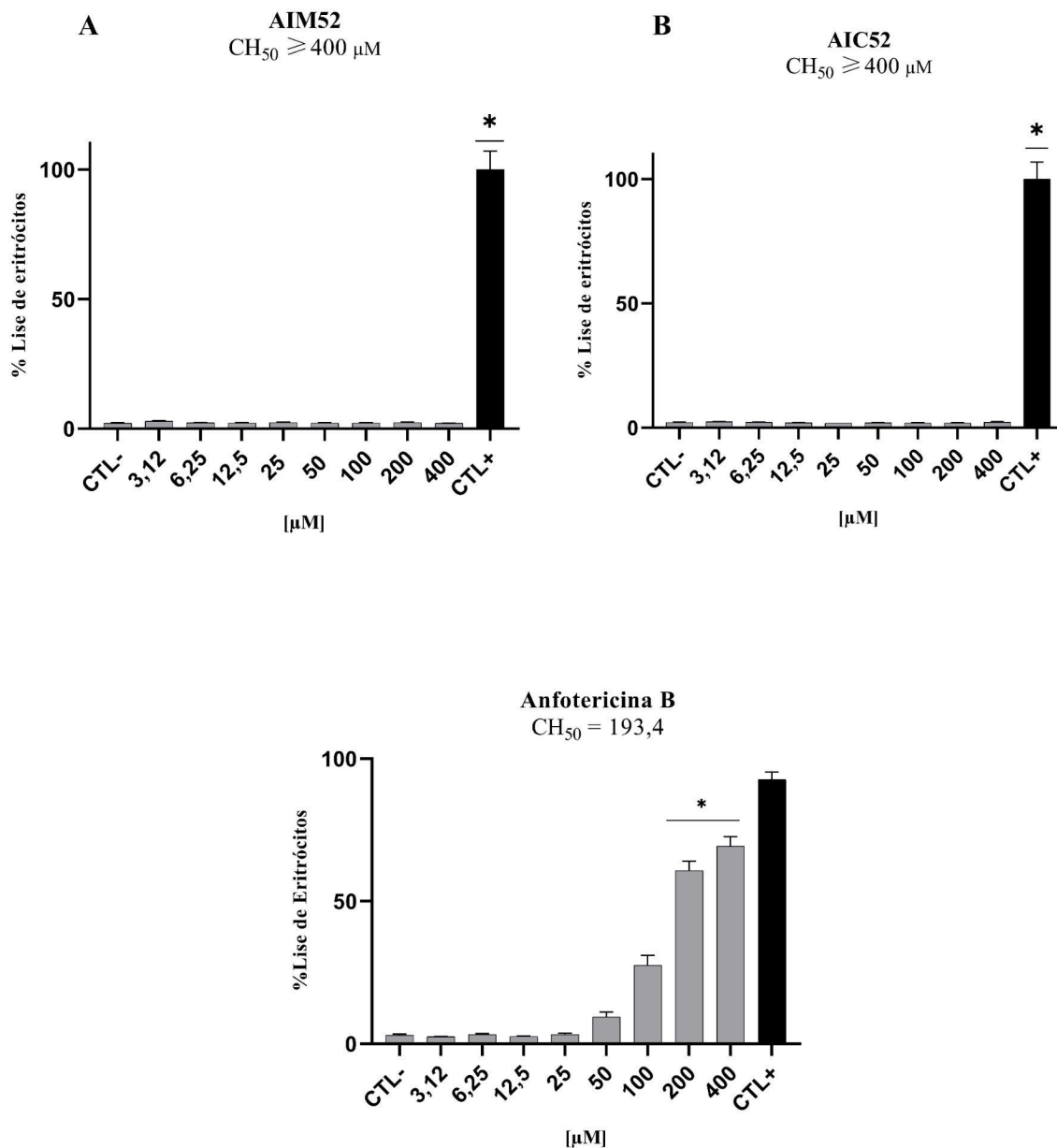
hemolítica com um CH_{50} de 193,4 μ M, ocorrendo assim uma diminuição na viabilidade dos eritrócitos pelo índice de toxicidade desses compostos como pode ser observada também na figura 16.

Tabela 8. Concentração capaz de lisar 50% das hemácias (CH_{50}) dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52, AIC52) e fármaco de referência

Compostos	IC	CH_{50} (μ M)
AIM52	-	≥ 400
AIC52	-	≥ 400
Anfotericina B	(156,6 - 244,6)	193,4

Fonte: Elaboração própria, 2025. Valores em μ M apresentam a média da CH_{50} (Concentração Hemolítica) com intervalo de confiança (IC) de 95%. $CH_{50} \geq 400$ = composto não obteve atividade de lise na maior concentração testada.

Figura 16 - Concentração Hemolítica média (CH_{50}) dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52 e AIC52) e fármaco de referência Anfotericina B sobre a lise de eritrócitos humanos após 1h de incubação



Fonte: Elaboração própria, 2025. Intervalo de confiança a 95% considerando o controle negativo. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo $*p < 0,05$ em comparação ao controle.

Estes resultados indicam que os adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52 e AIC52) apresentaram uma atividade de inibição significativa para o parasito *L. infantum* e que diante dos valores de CI_{50} apresentam seletividade, por apresentarem uma toxicidade maior para o

parasito do que para os eritrócitos humanos, observado assim nas maiores concentrações usadas nos testes avaliados.

5.6 Atividade anti-*Leishmania* dos adutos AIM52, AIC52 e Anfotericina B sobre as formas amastigotas axênicas de *Leishmania infantum*

Estes adutos de MBH também foram avaliados em formas amastigotas axênicas de *L. infantum*, juntamente com o fármaco de referência (Tabela 9). Dessa forma, foi possível determinar em porcentagem a Concentração Efetiva média (CE_{50}) capaz de inibir em 50% a viabilidade do parasito, após 24h de tratamento, a partir de ensaios *in vitro* pelo método de MTT. Os compostos (AIM52 e AIC52) também foram testados em concentrações de 3,12 a 400 μ M em contrapartida a Anfotericina B foi testada em concentrações já preestabelecidas de 0,07 a 10 μ M, a fim de obtermos a curva de inibição.

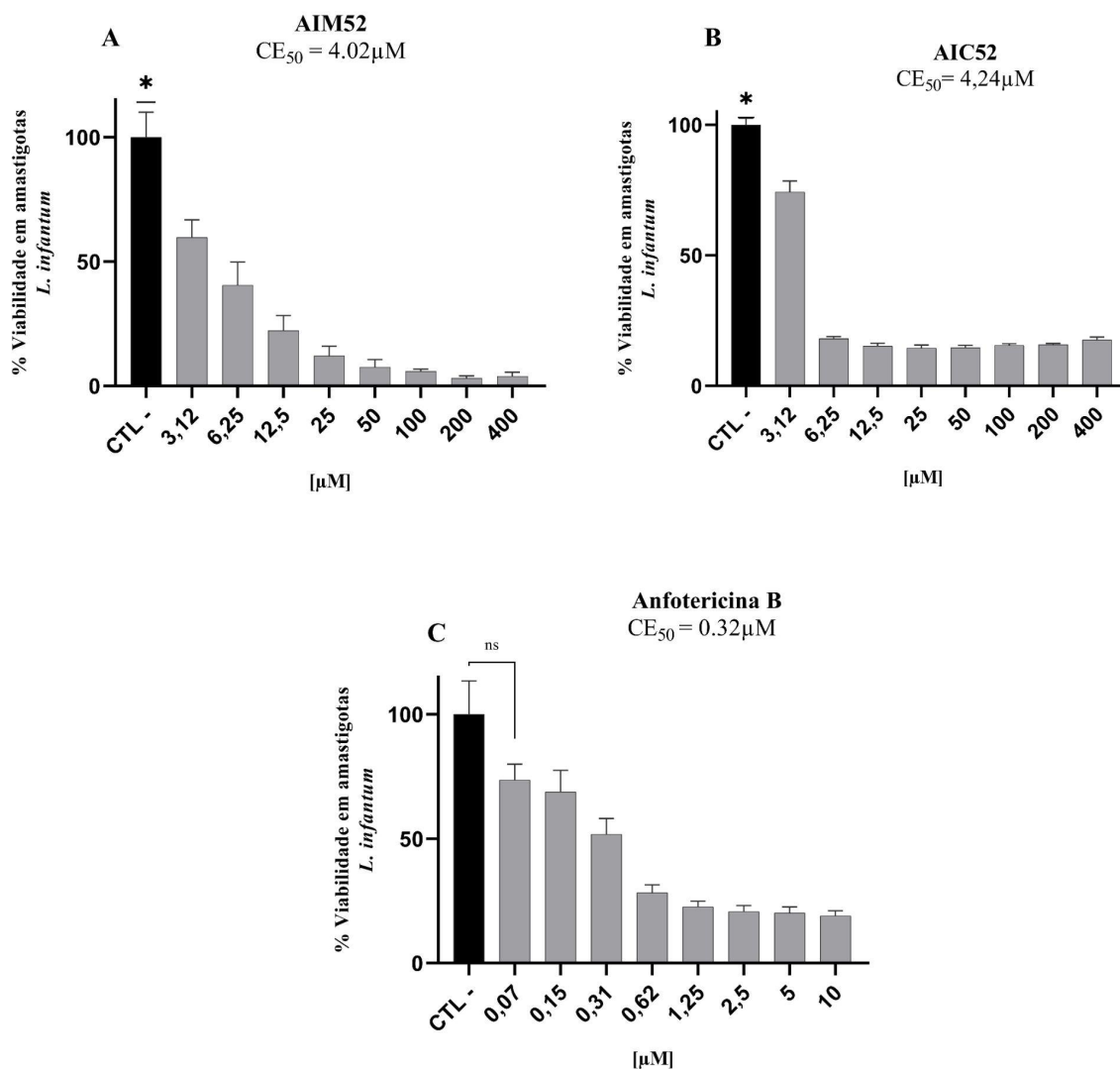
Tabela 9. Concentração capaz de lisar 50% das hemácias (CH_{50}) dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52, AIC52) e fármaco de referência

Compostos	IC	CE_{50} (μ M)
AIM52	(3,77 - 4,90)	4,02
AIC52	(2,85 - 8,65)	4,24
Anfotericina B	(0,17 - 0,53)	0,32

Fonte: Elaboração própria, 2025. Valores em μ M apresentam a média da CE_{50} , intervalo de confiança (IC) de 95%.

Os adutos apresentaram uma inibição de maneira dependente de concentração para as concentrações analisadas, quando comparadas ao controle (100% de viabilidade) (Figura 17).

Figura 17 - Concentração Efetiva (CE_{50}) dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52 e AIC52) e fármaco de referência Anfotericina B sobre a inibição da viabilidade de formas amastigotas axênicas após 24h de tratamento



Fonte: Elaboração própria, 2025. A análise representa o intervalo de confiança a 95% da média das três triplicatas de cada experimento, considerando o controle negativo (CTL). Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo $*p < 0,05$ em comparação ao controle. ns = diferença entre os grupos comparados não foi estatisticamente significativa.

Foi observado um perfil inibitório semelhante entre os dois compostos testados sendo o menor valor do CE_{50} (3,77 - 4,90) para o composto AIM52 na concentração de 4,02 μM (Figura 17-A), já o composto AIC52 obteve um CE_{50} (2,85 - 8,65) na concentração de 4,24 μM (Figura 17-B), para as formas amastigotas axênicas de *L. infantum*. O fármaco de referência utilizado Anfotericina B foi obtido um CI_{50} (0,17 - 0,53) na concentração de 0,32

μM (Figura 17-C) demonstrando também a sua atividade anti-*Leishmania* (Figura 17). Estes dados nos indicam que são compostos potencialmente ativos, embora menos potentes que a Anfotericina B.

5.7 Citotoxicidade dos adutos AIM52, AIC52 e Anfotericina B sobre células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Como parte da investigação da atividade citotóxica dos compostos selecionados (AIM52 e AIC52), foi avaliado nas mesmas concentrações (3,12 a 400 μM) em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC), simultaneamente com a Anfotericina B em concentrações de 0,78 a 100 μM já preestabelecidas (Figura 18). Após a extração das PBMC de doadores voluntários saudáveis, seguindo o protocolo descrito no tópico 4.9, onde essas células incluem linfócitos (células T, células B e células NK), monócitos e células dendríticas.

Essa avaliação faz-se necessária devido ao ciclo de vida dimórfico do parasito que ao infectar o hospedeiro vertebrado afeta principalmente células do sistema imune, como os monócitos. Foi observado que nestas células os adutos em investigação apresentaram citotoxicidade elevada comparadas ao fármaco de referência (Tabela 10).

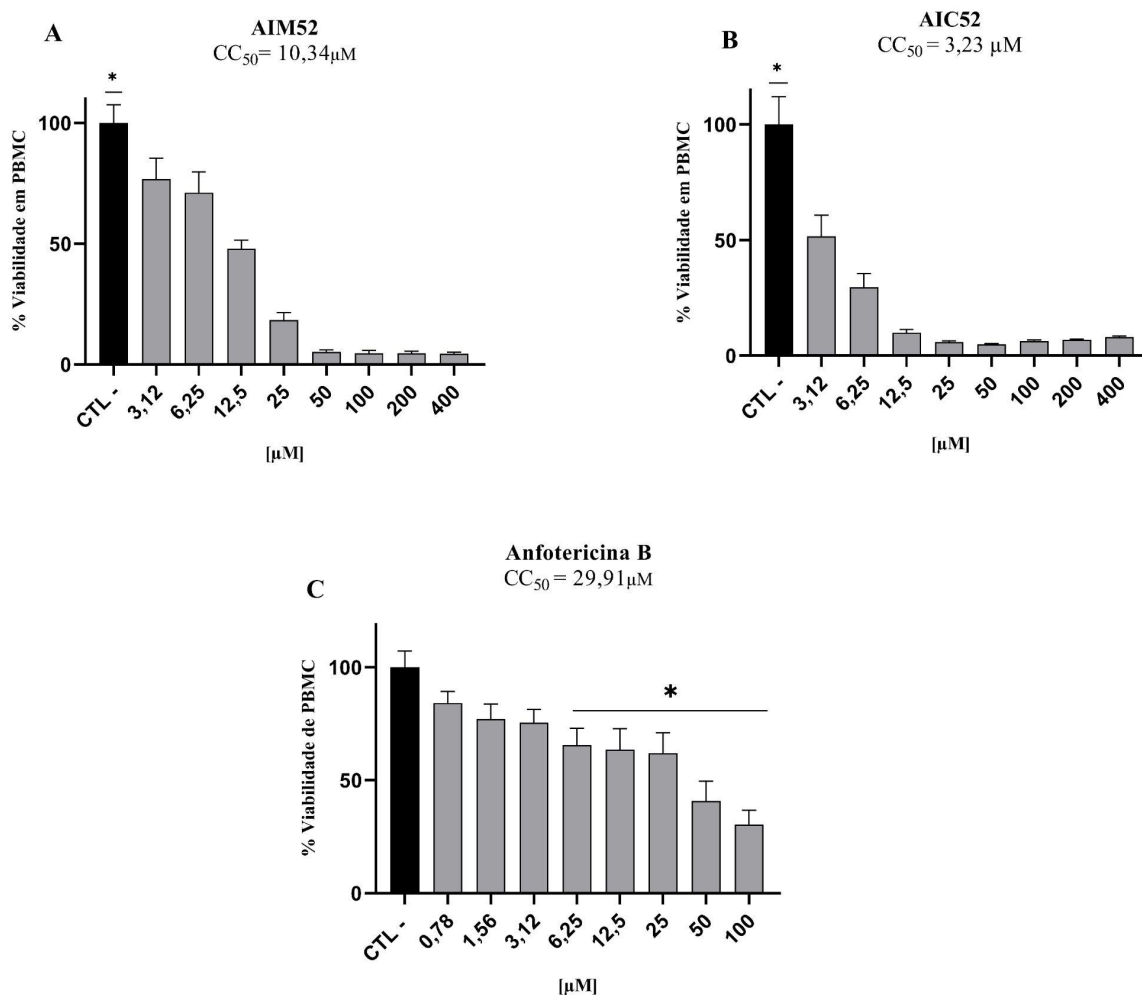
Tabela 10. Concentração Citotóxica média (CC_{50}) dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52, AIC52) e fármaco de referência

Compostos	IC	CC_{50} (μM)
AIM52	(8,21 - 12,86)	10,34
AIC52	(1,85- 4,22)	3,23
Anfotericina B	(19,15 - 53,48)	29,91

Fonte: Elaboração própria, 2025. Valores em μM apresentam a média da CC_{50} , com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Onde o aduto AIM52 apresentou uma Concentração Citotóxica média (CC_{50}) nas células em 10,34 μM com intervalo de confiança de 8,21 - 12,86 inibindo assim a viabilidade dessas células, quando comparado ao controle (100% de viabilidade) (Figura 18-A), já o aduto AIC52 obteve uma toxicidade ainda mais elevada, em 3,23 μM inibindo mais de 50% da com intervalo de confiança de 1,85 - 4,22 (Figura 18-B). Em contrapartida, a Anfotericina B apresentou uma menor citotoxicidade comparada aos compostos em avaliação, mas com inibição acima de 50% nas concentrações de 50 e 100 μM com CC_{50} de 29,91 μM (Figura 18-C).

Figura 18 - Concentração Citotóxica (CC_{50}) dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (AIM52 e AIC52) e fármaco de referência Anfotericina B sobre a viabilidade de células mononucleares do sangue periférico após 24h de tratamento



Fonte: Elaboração própria, 2025. A análise representa o intervalo de confiança a 95% da média das três triplicatas de cada experimento, considerando o controle negativo (CTL-). Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo $*p < 0,05$ em comparação ao controle.

Apesar de apresentarem citotoxicidade elevada em PBMC comparando ao fármaco de referência (AmB), os compostos AIM52 e AIC52 ainda se enquadram dentro de uma faixa de atividade considerada promissora para moléculas em estágio inicial de testes, sobretudo quando considerados aspectos como toxicidade, seletividade e potencial para modificações estruturais que aumentem a sua eficácia e diminuam sua toxicidade.

5.8 Análise da atividade anti-*Leishmania* dos adutos de Morita-Baylis-Hillman modificados dos compostos AIM52 e AIC52 em formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania infantum*

Conforme os resultados obtidos dos dois compostos selecionados (AIM52 e AIC52) foram sintetizadas com base nestes adutos, oito compostos com variações na estrutura química (Tabela 11), a fim de otimizar o perfil de inibição e citotoxicidade em (PBMC).

Tabela 11. Concentração inibitória (CI₅₀) e Concentração Efetiva (CE₅₀) de 50% da viabilidade em formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania infantum* após 72 h e 24h de incubação

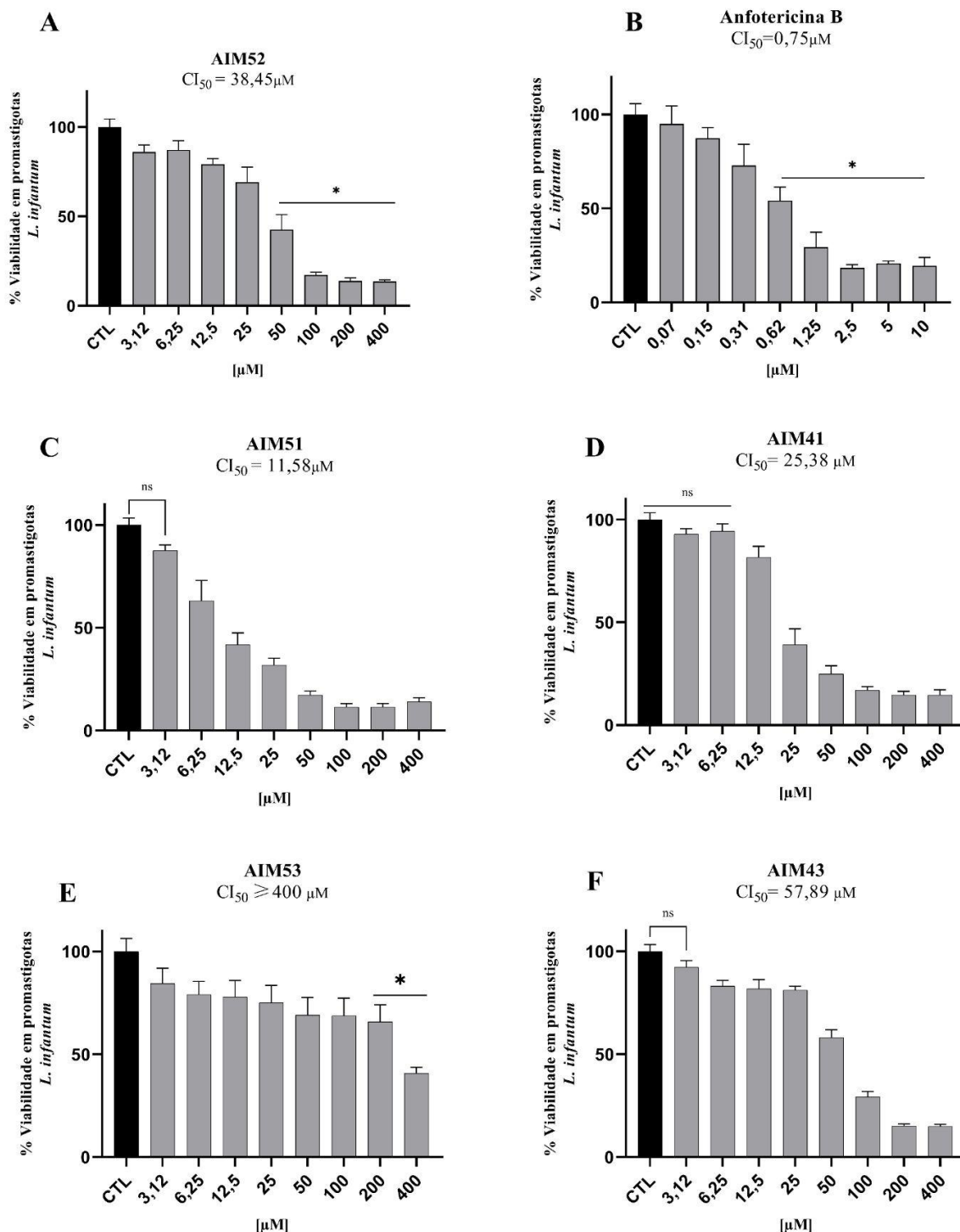
AMBH MODIFICADOS	PROMASTIGOTA		AMASTIGOTA	
	IC (CI ₅₀)	CI ₅₀ (μM)	IC (CE ₅₀)	CE ₅₀ (μM)
AIM51	(7,98 - 16,54)	11,58	(4,95 - 15,25)	9,48
AIM41	(17,27 - 38,99)	25,38	(8,40 - 19,86)	13,15
AIM43	(41,41 - 80,63)	57,89	(11,33 - 24,21)	16,95
AIM53	-	≥ 400	(333,6 - 467,9)	383,6
AIN51	(14,54 - 29,55)	19,91	(2,26 - 8,90)	4,48
AIN41	(6,26 - 10,86)	8,16	(0,09-2,78)	0,85
AIN43	-	≥ 400	-	≥ 400
AIN53	(8,01 - 18,55)	12,05	(6,41-24,34)	11,46

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam o intervalo de confiança (IC) de 95%, e o CI₅₀ (Concentração Inibitória de 50% da viabilidade celular) em formas promastigotas e a Concentração Efetiva (CE₅₀) em formas amastigotas axênicas, pelo teste de MTT após 72 horas e 24h de tratamento respectivamente, obtidas através de regressão não-linear com o programa *GraphPad Prism 9.0*. CI₅₀ e CE₅₀ ≥ 400 = composto não obteve atividade na maior concentração testada.

A figura 6 mostra a atividade anti-*Leishmania* sobre as formas promastigotas dos Adutos de MBH modificados do composto AIM52, após 72h de tratamento, em porcentagem de inibição da viabilidade do parasito, e os seus respectivos valores de CI₅₀ (Tabela 11). Esses adutos apresentaram uma inibição nas concentrações analisadas de 3,12 a 400 μM, quando comparadas ao controle (100% de viabilidade celular). Comparando-se a porcentagem de inibição de viabilidade em promastigotas, observou-se que os compostos AIM51 (7,98 - 16,54) em 11,58μM e AIM41 (17,27 - 38,99) em 25,38 μM, obtiveram uma melhor atividade inibitória em relação a AIM52 (26,61 - 55,19) com 38,45μM (Figura 6-A,C,D), diferentemente dos compostos AIM43 (41,41 - 80,63) com 57,89μM e AIM53 ≥ 400μM que não obteve atividade de inibição na maior concentração testada. Em contrapartida, podemos

observar a inibição do fármaco AmB (0,52 - 1,12) em 0,75 μ M sendo este um valor bem inferior às concentrações testadas (Figura 19-B,E,F).

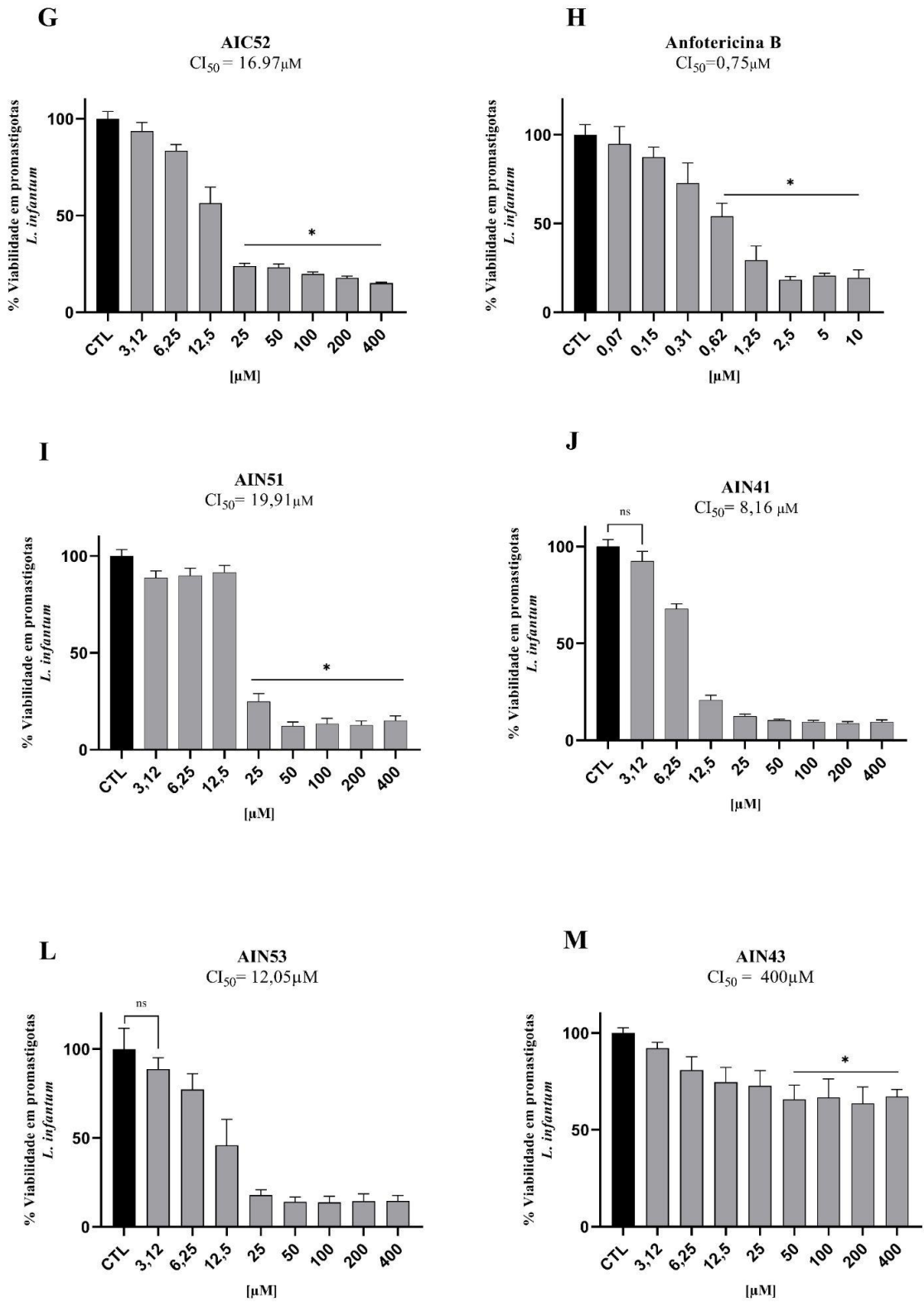
Figura 19 - Concentração de Inibição (CI_{50}) dos adutos de MBH modificados do composto AIM52 sobre a viabilidade dos parasitos, após 72h de tratamento em formas promastigotas de *Leishmania infantum*



Fonte: Elaboração própria, 2025. A análise representa o intervalo de confiança a 95% da média de cada experimento, considerando o controle negativo (CTL). Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo $*p < 0,05$ em comparação ao controle. ns = diferença entre os grupos comparados não foi estatisticamente significativa.

Já os adutos modificados de MBH do composto AIC52 (Tabela 11), conseguiram obter uma atividade de inibição maior nas formas promastigotas em 8,16 μM para a AIN41 (6,26 - 10,86) e 12,05 μM para a AIN53 (8,01 - 18,55) (Figura 20-J,L), quando comparadas com o derivado AIC52 (10,12 - 29,90) que obteve um CI_{50} de 16,97 μM . Diferentemente dos compostos AIN51 (14,54 - 29,55) com 19,91 μM (Figura 20-I) e AIN43 $\geq 400 \mu\text{M}$ (Figura 20-M), que não obteve atividade de inibição na maior concentração testada. Podemos observar também a inibição do fármaco AmB (0,52 - 1,12) em 0,75 μM sendo este um valor bem inferior às concentrações testadas (Figura 20-H).

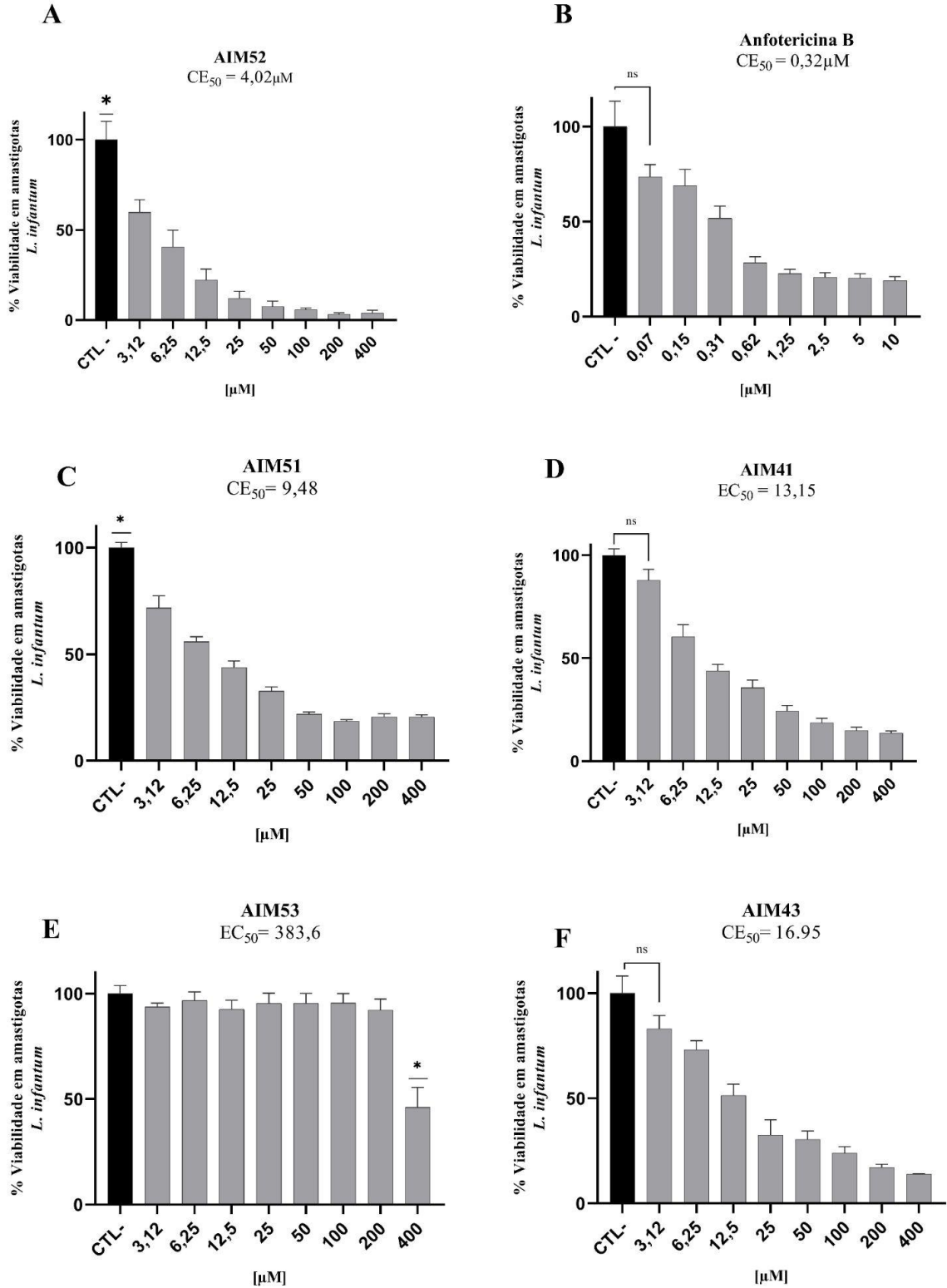
Figura 20 - Concentração de Inibição (CI_{50}) dos adutos de MBH modificados do composto AIC52 sobre a viabilidade dos parasitos, após 72h de tratamento em formas promastigotas de *Leishmania infantum*



Fonte: Elaboração própria, 2025. A análise representa o intervalo de confiança a 95% da média de cada experimento, considerando o controle negativo (CTL). Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo $*p < 0,05$ em comparação ao controle. ns = diferença entre os grupos comparados não foi estatisticamente significativa.

Os mesmos adutos de MBH modificados (Tabela 11), também foram testados nas mesmas concentrações (3,12 a 400 μ M) nas formas amastigotas axênicas, apenas o fármaco de referência AmB foi testado em concentrações preestabelecidas de 0,07 a 10 μ M para obtenção das curvas de inibição. Foi possível observar que nenhum dos derivados da AIM52 obteve uma inibição menor nas formas amastigotas em comparação da mesma, que inibiu em 4,02 μ M com um intervalo de confiança de 3,77 - 4,90 (Figura 21-A), onde foram verificadas as concentrações de 9,48 μ M para AIM51 (4,95 - 15,25) (Figura 21-C); 13,15 μ M para AIM41 (8,40 - 19,86) (Figura 21-D); 16,95 μ M para AIM43 (11,33 - 24,21) (Figura 21-F). Em contrapartida a AIM53 (333,6 - 467,9) (Figura 21-E), apresentou atividade apenas em concentrações elevadas de 383,6 μ M. Podemos observar também a inibição do fármaco AmB (0,17 - 0,53) em 0,32 μ M sendo este um valor bem inferior às concentrações testadas (Figura 21-H).

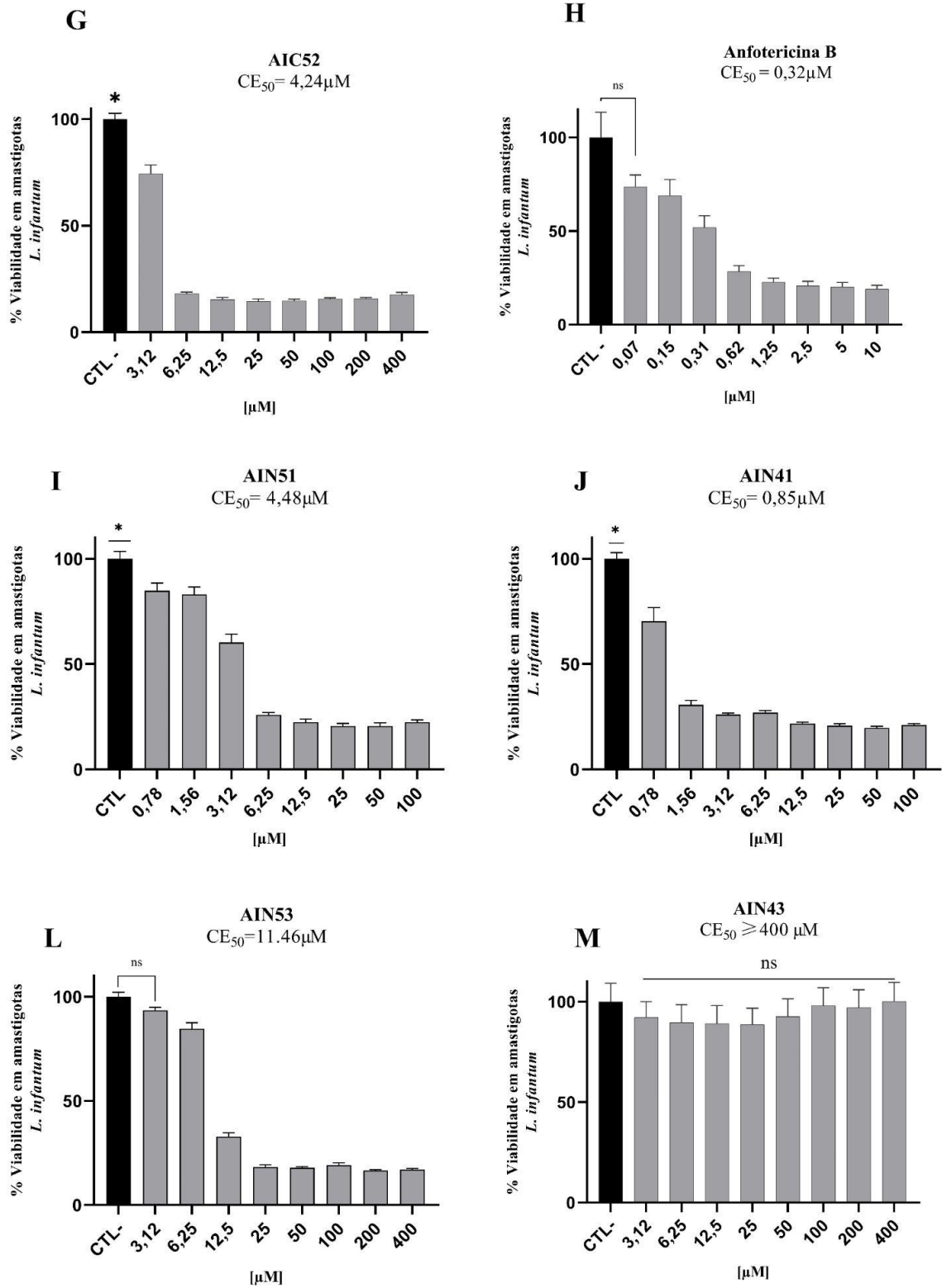
Figura 21 - Concentração Efetiva (CE₅₀) dos adutos de MBH modificados do composto AIM52 sobre a viabilidade dos parasitos, após 24h de tratamento em formas amastigotas de *Leishmania infantum*



Fonte: Elaboração própria, 2025. A análise representa o intervalo de confiança a 95% da média das três triplicatas de cada experimento, considerando o controle negativo (CTL). Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo $*p < 0,05$ em comparação ao controle. ns = diferença entre os grupos comparados não foi estatisticamente significativa.

Já os adutos de MBH modificados do composto AIC52 em amastigotas (Tabela 11), foram testados em diluição seriada de 3,12 a 400 μ M. Os adutos AIN51 e AIN41 obtiveram uma inibição elevada e a curva de diluição seriada foi testada nas concentrações de 0,78 a 100 μ M, apenas o fármaco de referência AmB foi testado em concentrações preestabelecidas de 0,07 a 10 μ M para obtenção da curva de inibição. Foi possível observar que os derivados da AIC52 modificados obtiveram uma inibição da viabilidade maior nas formas amastigotas em comparação das mesmas testadas nas formas promastigotas do parasito. Foram obtidas inibições na viabilidade na concentração de 0,85 μ M para AIN41 (0,09-2,78) (Figura 22-J) em comparação ao composto AIC52 (2,85 - 8,65) com 4,24 μ M (Figura 22-G), já os outros compostos obtiveram inibição em 4,48 μ M para AIN51 (2,26 - 8,90) (Figura 22-I); 11,46 μ M para AIN53 (6,41-24,34) (Figura 22-L), em contrapartida a AIN43 $\geq$ 400 μ M não obteve atividade na maior concentração testada (Figura 22-M). Podemos observar também a inibição do fármaco AmB (0,17 - 0,53) em 0,32 μ M sendo este um valor bem inferior às concentrações testadas (Figura 22-H).

Figura 22 - Concentração Efetiva (CE_{50}) dos adutos de MBH modificados do composto AIC52 sobre a viabilidade dos parasitos, após 24h de tratamento em formas amastigotas de *Leishmania infantum*



Fonte: Elaboração própria, 2025. A análise representa o intervalo de confiança a 95% da média das três triplicatas de cada experimento, considerando o controle negativo (CTL). Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo * $p < 0,05$ em comparação ao controle. ns = diferença entre os grupos comparados não foi estatisticamente significativa.

5.9 Avaliação da citotoxicidade dos adutos modificados de Adutos de Morita-Baylis-Hillman derivados dos compostos AIM52 e AIC52 em eritrócitos humanos e células mononucleares do sangue periférico

Os adutos de MBH modificados foram testados igualmente em concentrações de 3,12 a 400 μM a fim de verificar a citotoxicidade em relação a células humanas. Os ensaios da atividade hemolítica demonstraram que os adutos de MBH modificados também não alteram a viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas, ou seja, não causam a lise de hemácias na maior concentração observada (Tabela 12), tendo uma Concentração Hemolítica $\text{CH}_{50} \geq 400 \mu\text{M}$, com o controle sendo considerado com 100% de viabilidade celular. Em contrapartida o fármaco de referência avaliado, Anfotericina B, apresentou atividade hemolítica com um CH_{50} de 193,4 μM , ocorrendo assim uma diminuição na viabilidade dos eritrócitos pelo índice de toxicidade.

Tabela 12. Concentração Hemolítica (CH_{50}) e Concentração Citotóxica (CC_{50}) de 50% da viabilidade em eritrócitos humanos e células mononucleares do sangue periférico após 1h e 24h de incubação

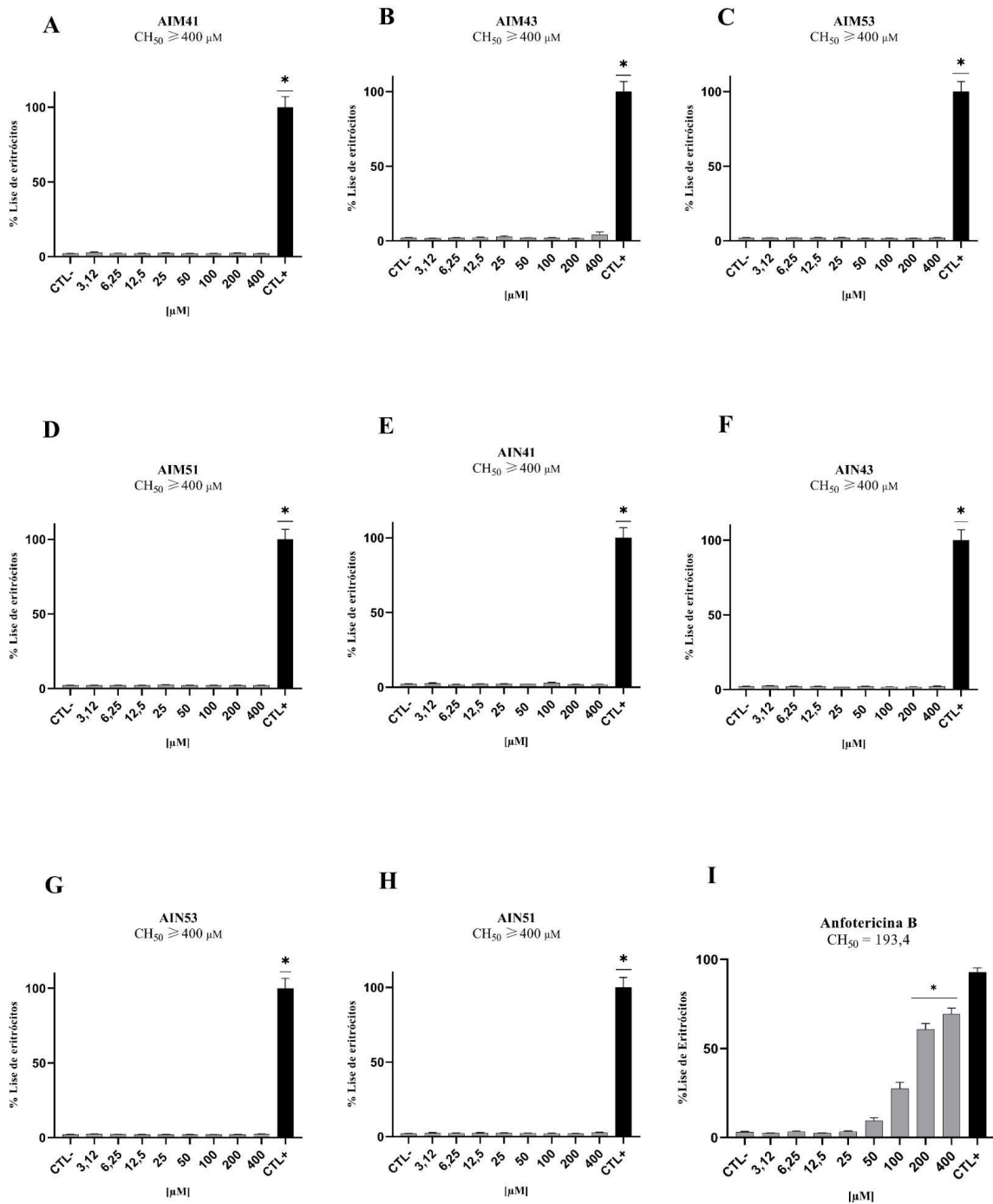
AMBH MODIFICADOS	ERITRÓCITOS		PBMC	
	IC (CH_{50})	CH_{50} (μM)	IC (CC_{50})	CC_{50} (μM)
AIM52	-	≥ 400	(8,21 - 12,86)	10,34
AIM51	-	≥ 400	(9,79 - 17,97)	13,33
AIM41	-	≥ 400	(36,58 - 82,34)	54,30
AIM43	-	≥ 400	(108,0 - 143,2)	124,3
AIM53	-	≥ 400	(181,8 - 250,5)	238,5
AIC52	-	≥ 400	(1,85 - 4,22)	3,23
AIN51	-	≥ 400	(23,45 - 39,62)	30,52
AIN41	-	≥ 400	(9,56 - 18,75)	13,41
AIN43	-	≥ 400	-	≥ 400
AIN53	-	≥ 400	(8,43 - 14,63)	11,11
Anfotericina B	(156,6 - 244,6)	193,4	(19,15 - 53,48)	29,91

Fonte: Elaboração própria, 2025. Os valores representam o intervalo de confiança (IC) de 95%, e o CH_{50} (Concentração Hemolítica de 50% da viabilidade celular) em eritrócitos humanos e a Concentração Citotóxica (CC_{50}) em PBMC. CH_{50} e $\text{CC}_{50} \geq 400$ = composto não obteve atividade na maior concentração testada.

Semelhante aos resultados descritos no tópico 5.5 os adutos de MBH modificados (AIM51, AIM41, AIM43, AIM53, AIN51, AIN41, AIN43 e AIN53) apresentaram uma atividade de inibição significativa para o parasito *L. infantum* e que diante dos valores de CI_{50} e CE_{50} apresentam seletividade, por apresentarem uma toxicidade maior para o parasito do que para os eritrócitos humanos, observado assim nas maiores concentrações usadas nos testes avaliados como podem ser observados no figura 23.

Prosseguindo com a investigação da atividade citotóxica desses compostos, modificados dos adutos AIM52 e AIC52 que obtiveram uma concentração citotóxica (CC_{50}) de 10,34 μ M e 3,23 μ M respectivamente, sugerindo assim uma toxicidade elevada para as células, foram obtidas inibição da viabilidade celular em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 238,5 μ M para o composto AIM53 (181,8 - 250,5) representando o maior valor de CC_{50} indicando baixa citotoxicidade para PBMC, seguido por AIM43 (108,0 - 250,5) com 124,3 μ M e AIM41 (36,58 - 82,34) com 54,30 μ M, esses três adutos modificados mostraram um reduzido potencial citotóxico, sugerindo um menor perfil de citotoxicidade, quando comparados a Anfotericina B que obteve uma inibição da viabilidade celular em 29,91 μ M. Outros compostos obtiveram uma concentração citotóxica média de 30,52 μ M para AIN51 (23,45 - 39,62); 13,14 μ M AIN41 (9,56 - 18,75) ; 13,33 μ M AIM51 (9,79 - 17,97) e 11,11 μ M para AIN53 (8,43 - 14,63). Em contrapartida, o aduto AIN43 não apresentou atividade citotóxica na maior concentração testada sendo o $CC_{50} \geq 400 \mu$ M, o que pode indicar baixa interação com as células humanas (Tabela 12).

Figura 23. Concentração Hemolítica média (CH_{50}) dos adutos de MBH modificados do composto AIM52 e AIC52 sobre a lise de eritrócitos humanos após 1h de incubação



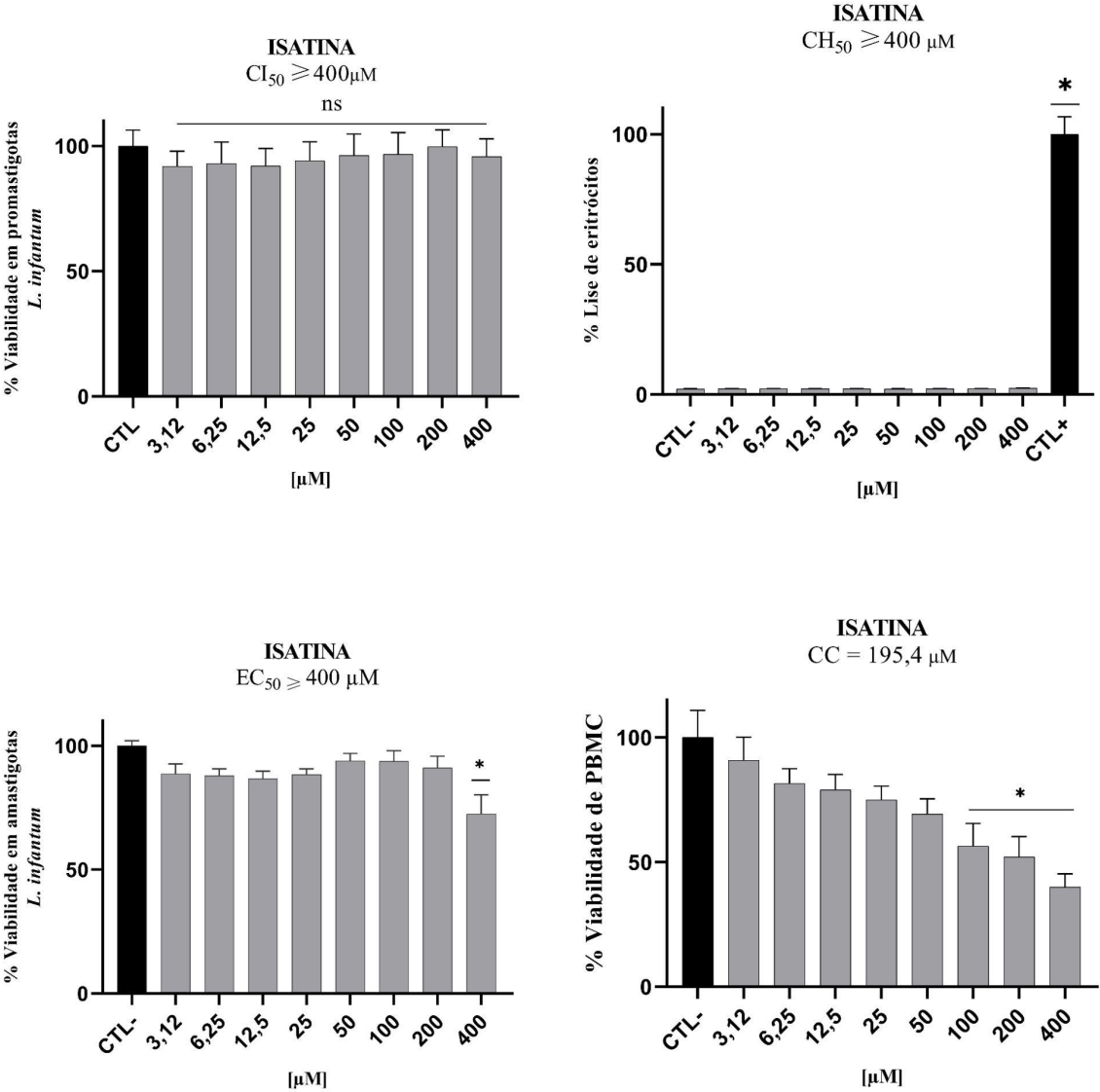
Fonte: Elaboração própria, 2025. A análise representa o intervalo de confiança a 95% da média das três duplicatas de cada experimento, considerando o controle negativo. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo $*p < 0,05$ em comparação ao controle.

5.10 Avaliação da atividade do núcleo (Isatina) dos adutos de Morita-Baylis-Hillman sobre o parasito *Leishmania Infantum* e Células humanas

Seguindo os mesmos protocolos dos adutos selecionados e seus respectivos compostos modificados, foram feitos testes apenas com a isatina (núcleo) nas mesmas concentrações testes a partir de 3,12 a 400 μM . Foi observado que a mesma, não apresentou atividade de inibição na maior concentração, após 72h de tratamento, indicando $\text{CI}_{50} \geq 400 \mu\text{M}$ (Figura 24-A). Da mesma forma, também não obtivemos atividade anti-*Leishmania* contra as formas amastigotas axênicas do parasito, mesmo com uma redução significativa de viabilidade na maior concentração de 400 μM , ainda não é suficiente para estimar um CE_{50} confiável estatisticamente ($\text{CE}_{50} > 400 \mu\text{M}$) como pode ser observado no figura 24-C.

Igualmente foi feita a investigação do potencial citotóxico da isatina em eritrócitos humanos e em células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Foi observada ausência de hemólise em todas as concentrações testadas, em comparação ao controle positivo (CTL+), 100% de lise, sugerindo um $\text{CH}_{50} \geq 400 \mu\text{M}$ (Figura 24-B). Já em PBMC, foi obtido uma inibição na viabilidade celular conforme o aumento da concentração do núcleo, sugerindo um efeito citotóxico moderado de um $\text{CC}_{50} = 195,4 \mu\text{M}$ (Figura 24-D).

Figura 24. Inibição das formas promastigotas, amastigotas e citotoxicidade em células humanas do núcleo (Isatina) de adultos de Morita-Baylis-Hillman



Fonte: Elaboração própria, 2025. A análise representa o intervalo de confiança a 95% da média de cada experimento, considerando o controle negativo (CTL). Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo $*p<0,05$ em comparação ao controle. ns = diferença entre os grupos comparados não foi estatisticamente significativa.

5.11 Determinação do índice de seletividade dos Adutos de Morita-Baylis-Hillman

O índice de seletividade (IS) indica quantas vezes uma substância é mais seletiva para o parasito (*L. infantum*) do que para as células humanas (Eritrócitos e PBMC), esta avaliação é fundamental na triagem de candidatos a fármacos, pois permite estimar a capacidade citotóxica desses compostos. Com base na razão entre CH_{50} e CI_{50} , destacaram-se os adutos AIN41 ($IS \geq 49,01$), AM51 ($IS \geq 34,54$) e AIN53 ($IS \geq 33,19$) os quais apresentaram uma seletividade satisfatória em relação aos adutos pré-selecionados AIM52 ($IS \geq 10,40$) e AIC52 ($IS \geq 23,57$). Em contrapartida o fármaco de referência Anfotericina B apresentou uma seletividade maior para o parasito do que para os eritrócitos com um índice de seletividade de $IS \geq 257,8$ vezes, vale ressaltar que nenhum dos adutos obtiveram atividade hemolítica até na maior concentração testada ($CH_{50} \geq 400\mu M$), porém a Anfotericina B apresentou lise de eritrócitos partir de $100\mu M$ ($CH_{50} = 193,4$).

Quanto à relação entre o CC_{50} e CE_{50} a Anfotericina B novamente apresentou o maior índice de seletividade ($IS \geq 93,46$), no entanto um dos adutos modificados obteve uma seletividade considerável de $IS \geq 15,77$ vezes mais seletiva para as formas amastigotas axênicas, do que para as células mononucleares do sangue periférico, comparados com os adutos AIM52 ($IS \geq 2,57$) e AIC52 ($IS \geq 0,76$), fica evidente um equilíbrio relevante entre sua inibição. Outros compostos como AIM43 ($IS \geq 7,33$), AIM41 ($IS \geq 4,12$) e AN51 ($IS \geq 3,18$) demonstraram uma seletividade baixa, o que indica risco de toxicidade.

Ainda assim, quando analisamos a razão entre a Concentração Hemolítica média e a Concentração Efetiva média (CH_{50}/CE_{50}), o aduto AIN41 ($IS \geq 470,5$) novamente se destaca com um índice de seletividade superior aos demais compostos testados, reforçando o seu potencial como candidato seletivo frente às formas amastigotas axênicas do parasito. Esses resultados, em conjunto, indicam que dentre todos os compostos e seus derivados modificados, o mais promissor é o aduto AIN41, para futura otimização estrutural visando menor citotoxicidade (Tabela 13).

Tabela 13. Índice de Seletividade (IS) dos Adutos de MBH e Anfotericina B

COMPOSTOS	PBMC	ERITRÓCITO	PROMASTIGOTA			AMASTIGOTA		
	CC ₅₀ (μ M)	CH ₅₀ (μ M)	CI ₅₀ (μ M)	IS (CC ₅₀)	IS (CH ₅₀)	CE ₅₀ (μ M)	IS (CC ₅₀)	IS (CH ₅₀)
AIM52*	10,34	≥ 400	38,45	0,26	$\geq 10,40$	4,02	2,57	$\geq 99,50$
AIM51	13,33	≥ 400	11,58	1,15	$\geq 34,54$	9,48	1,40	$\geq 42,19$
AIM41	54,30	≥ 400	25,38	2,13	$\geq 15,76$	13,15	4,12	$\geq 30,41$
AIM43	124,3	≥ 400	57,89	2,14	$\geq 6,61$	16,95	7,33	$\geq 23,59$
AIM53	238,5	≥ 400	≥ 400	0,59	≥ 1	383,6	0,62	$\geq 1,04$
AIC52*	3,23	≥ 400	16,97	0,19	$\geq 23,57$	4,24	0,76	$\geq 94,33$
AIN51	30,52	≥ 400	19,91	1,5	$\geq 20,09$	4,48	3,18	$\geq 89,28$
AIN41	13,41	≥ 400	8,16	1,64	$\geq 49,01$	0,85	15,77	$\geq 470,5$
AIN43	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 1	≥ 1	≥ 400	≥ 1	≥ 1
AIN53	11,11	≥ 400	12,05	0,92	$\geq 33,19$	11,46	0,96	$\geq 34,90$
ISATINA	195,4	≥ 400	≥ 400	0,48	≥ 1	≥ 400	0,48	≥ 1
AmB	29,91	193,4	0,75	39,88	257,8	0,32	93,46	$\geq 604,3$

Fonte: Elaboração própria, 2025. CH₅₀ (Concentração Hemolítica média), CI₅₀ (Concentração Inibitória média) e CE₅₀ (Concentração Efetiva média). O índice de seletividade (IS) dos compostos foi calculado pela razão entre a citotoxicidade em eritrócitos (CH₅₀/CI₅₀) e a atividade inibitória das formas promastigotas, o mesmo cálculo para PBMC (CC₅₀/CE₅₀). A anfotericina B (AmB) foi utilizada como controle positivo. Compostos marcados com (*) são os adutos pré-selecionados (AIM52 e AIC52).

6 DISCUSSÃO

As inúmeras atividades farmacológicas desses adutos, já foram relatadas em vários estudos, desde 1999 por Kundu *et al.* (1999), que realizaram a síntese de alguns AMBH contra *Plasmodium falciparum*, causador da malária obtendo resultados satisfatórios de atividade contra esse patógeno, a partir de então outras funcionalidades desses compostos foram relatados, antimalárica, anti-chagásica (NA RENDER *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2007; KAR *et al.*, 2011; SANDES *et al.*, 2014), apresentando também atividade antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória e anticâncer (NA RENDER *et al.*, 2006; VASCONCELLOS *et al.*, 2006; FACHEIA-MARTINS *et al.*, 2017; LIMA-JUNIOR E VASCONCELLOS, 2012; COELHO *et al.*, 2023; VASCONCELOS *et al.*, 2024).

Em parasitos do gênero *Leishmania* causador da leishmaniose foram obtidas atividades consideráveis desses adutos, nas espécies de *L. donovani* (DA SILVA WAGNER *et al.*, 2016), *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (BARBOSA *et al.*, 2009; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2009; JUNIOR *et al.*, 2010; AMORIM *et al.*, 2012; XAVIER *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2019; FERNANDES *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2022; FERREIRA *et al.*, 2023). Estes artigos fortalecem que adutos de MBH, podem ser inéditas e promissoras moléculas com atividade anti-*Leishmania*. No entanto, dos 12 adutos investigados, oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman, apenas cinco apresentaram perfil de inibição da viabilidade do parasito nas concentrações de 3,12 a 400 μM , sendo possível o cálculo da CI_{50} desses compostos. Desses, apenas duas moléculas (AIM52 e AIC52) apresentaram maior inibição de viabilidade com menor valor de CI_{50} de 38.45 μM (26.61 - 55.19) e 16.97 μM (10.12 - 29.90) respectivamente para as formas promastigotas do parasito, e Anfotericina B com 0.75 μM (0.52 - 1.12) fármaco de referência, demonstrando sua atividade inibitória em formas promastigotas de *L. infantum*.

Em formas amastigotas axênicas do parasito conseguimos uma inibição da viabilidade ainda menor com valores de CE_{50} de 4,02 μM para o aduto AIM52 e 4,24 μM para AIC52, indicando uma potente atividade próxima. Estes dois adutos possuem um núcleo indol, contido na isatina que é um excelente bloco sintético de moléculas bioativas, importante no desenvolvimento de novos compostos potencialmente ativos (PERVEZ *et al.*, 2013; PAKRAVAN *et al.*, 2013; GUO, 2019; VARUN; SONAM; KAKKAR 2019; CHEKE *et al.*, 2022). Os adutos de MBH e seus respectivos compostos modificados, possuem diferentes padrões de substituição com um ou dois halogênios (-Cl), com substituições na posição N1 por cadeia alílica e grupos aromáticos, são heterodímeros de isatinas cloradas, e quando

comparadas estruturalmente podemos observar que o aduto AIM52 apresenta um grupo substituinte, o elemento éster (R-COOR'), diferentemente do aduto AIC52 que apresenta o elemento nitrila (R-C≡N) em sua estrutura química, esta molécula por sua vez obteve uma melhor atividade inibitória, reduzindo a viabilidade celular em formas promastigotas quanto em amastigotas axênicas avaliadas pelo ensaio de MTT, resultando em um baixo valor da CI₅₀.

Resultados semelhantes foram observados por Sabt et al. (2022), que sintetizaram alguns híbridos com núcleo de isatina contendo cloro, obtiveram também uma atividade de inibição *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas axênicas em *L. major*, com CI₅₀ variando entre 0,51 e 5,95 µM, demonstrando um melhor desempenho quando comparados com o fármaco de referência miltefosina (7,90 µM). Outros compostos, como os derivados tiazolil-isatina, foram sintetizados e obtiveram atividade anti-*Leishmania* com CI₅₀ entre 7,97 a 6,04 µM para as formas promastigotas em espécies de *L. amazonensis* e *L. infantum* respectivamente, por sua vez demonstrando uma alta seletividade quando comparados com a miltefosina (FREITAS et al., 2021).

Outro parâmetro fundamental na triagem de novas moléculas candidatas a fármacos, é a determinação de seu potencial citotóxico frente a células humanas e consequentemente sua seletividade. A citotoxicidade desses compostos (AIM52 e AIC52) nos revelaram segurança onde obtivemos uma concentração hemolítica CH₅₀ ≥ 400 µM para as duas moléculas investigadas, esses valores estão em concordância com Rocha *et al.*, 2019 em que adutos da reação de MBH também não apresentam lise de eritrócitos nas mesmas concentrações testadas, reforçando o promissor potencial anti-*Leishmania* desses compostos e sua seletividade para os eritrócitos humanos, o que nos permite observar os seus efeitos sobre a estabilidade mecânica da membrana plasmática do eritrócito, o que podem gerar poros e rupturas causando a morte celular (Golubeva *et al.*, 2023). A Anfotericina B também avaliada nas mesmas concentrações (3,12 a 400 µM) e apresentou toxicidade sob os eritrócitos na concentração hemolítica (CH₅₀) de 193.4 µM (156.6 - 244.6), o que restringe o seu uso na terapêutica das leishmanioses, sendo considerada uma droga de segunda escolha (Barbosa *et al.*, 2009; Bastos *et al.*, 2016), evidenciando a lise dessas células, e consequentemente levando a nefrotoxicidade, já relatada em outros estudos, tornando-se indispensável a busca por novas drogas anti-*Leishmania* (Löfgren *et al.*, 2008; Jain; Jain, 2018; Almeida *et al.*, 2021). Já estes mesmos adutos nas mesmas concentrações testadas apresentaram uma citotoxicidade elevada em células mononucleares do sangue periférico (PBMC), em que observamos uma Concentração Citotóxica média (CC₅₀) de 10,34 µM e 3,23 µM para AIM52

e AIC52 respectivamente, enquanto a Anfotericina B obteve um CC_{50} de 29,91 μM , indicando uma menor toxicidade para as PBMC's. Embora o fármaco de referência nesse estudo, tenha se mostrado menos tóxico a estas células em relação aos adutos de MBH analisados, é importante ressaltar que os compostos demonstraram atividade anti-*Leishmania* eficaz em concentrações significativamente baixas, principalmente na forma clinicamente mais relevante da infecção (forma intracelular), que são as amastigotas axênicas representadas nesse estudo.

Conforme discutido em outro estudo, essa citotoxicidade pode estar relacionada a substituição na região do átomo de nitrogênio presente no anel heterocíclico da molécula de isatina, em que grupos de retirada (Indutivo e ressonante) podem fornecer propriedades tóxicas para as células, halógenos como os átomos de cloro ($-Cl$), ciano grupo de nitrila ($-CN$) e carbonila como os ésteres ($R-COOR'$) parecem influenciar a atividade citotóxica (HASSANZADEH et al., 2024). Então esta inibição da viabilidade celular em PBMC pode estar atrelada aos grupos farmacofóricos metil-éster (AIM52) e nitrila (AIC52) nas estruturas químicas, principalmente em grupos nitrilas por serem mais ativos e citotóxicos, o que possivelmente inibe eficientemente enzimas como as tirosina-quinases e inibidores de DHFR-TS (dihidrofolato redutase-timidilato sintase) e PTR1 (pteridina redutase 1) importantes no funcionamento do metabolismo do parasito (JUNIOR et al., 2010; LIMA-JUNIOR et al., 2016; SABB et al., 2023; BETHENCOURT-ESTRELLA et al., 2024).

Após ser determinada a atividade anti-*Leishmania* dos adutos de MBH sob formas promastigotas e amastigotas da espécie *Leishmania infantum*, e seus efeitos citotóxicos em eritrócitos humanos e em PBMC's, foi possível calcular o Índice de Seletividade (IS) desses compostos junto ao fármaco Anfotericina B. O IS é um parâmetro que avalia a seletividade do composto teste para o parasito do que para as células humanas e revela o nível de segurança *in vitro* dessas substâncias CI_{50} (promastigota) sob CH_{50} (eritrócitos) e CE_{50} (amastigota) sob CC_{50} (PBMC). Os dois adutos apresentaram um $IS \geq 10,40$ e $IS \geq 23,57$ para AIM52 e AIC52 respectivamente, sugerindo que AIC52 é 23,57 vezes mais seletiva para o parasito do que para os eritrócitos humanos, não obtemos um valor exato do CH_{50} pela ausência de atividade hemolítica, consequentemente não conseguimos obter um valor exato. Mas quando observamos a seletividade dessas mesmas moléculas na razão de CH_{50} (eritrócitos) sob CE_{50} (amastigota) observamos um aumento dessa seletividade de $IS \geq 99,50$ para AIM52 e $IS \geq 94,33$ para AIC52 sobre a citotoxicidade em eritrócitos humanos. A proximidade nos valores

sugere que ambos os compostos possuem bom perfil de ação *in vitro* contra o parasito *L. infantum* tais análises são essenciais para estimar a eficácia e segurança destes compostos.

Embora esses resultados sejam relevantes, principalmente sobre a inibição da viabilidade das formas amastigotas axênicas, é importante reconhecer que comparado ao fármaco de referência (Anfotericina B) que obteve uma seletividade de 257,8 vezes para as formas promastigotas do que para os eritrócitos humanos como também obteve um $IS \geq 604,3$ para as formas amastigotas axênicas do que para as células mononucleares do sangue periférico (PBMC), isso nos mostra que os adutos de MBH com núcleo de isatina clorados selecionados previamente estão abaixo de um índice de seletividade aceitável, por sua elevada citotoxicidade em (PBMCs).

Diante disso, visando ampliar a compreensão dos efeitos estruturais sobre a atividade biológica e citotóxica desses adutos, a próxima etapa envolveu compostos com modificações químicas direcionadas em regiões estratégicas, fornecendo a partir desses, novos compostos modificados a fim de obtermos uma molécula mais seletiva. Foram avaliados 8 compostos modificados, sendo quatro destes (AIM51, AIM41, AIM43, AIM53) do aduto AIM52 e outros quatro (AIN51, AIN41, AIN43, AIN53) do aduto AIC52, como também avaliamos o núcleo (Isatina) sem nenhuma modificação química estrutural, a fim de validar sua contribuição na citotoxicidade sobre PBMCs.

Dentre todos estes compostos avaliados foi possível obter através destas modificações menores valores de Concentração Inibitória média (CI_{50}) para as formas promastigotas do parasito, em que observamos que comparando a AIM52 ($CI_{50} = 38,45\mu M$), o composto AM51, obtivemos um $CI_{50} = 11,58\mu M$, seguido do AM41 com um $CI_{50} = 25,38\mu M$, entretanto para as formas amastigotas axênicas a inibição foi menor comparado ao composto AIM52 ($CE_{50} = 4,02\mu M$), em que o aduto modificado AIM51 inibiu a viabilidade apenas em $9,48\mu M$ e $13,15\mu M$ para AIM41 respectivamente. Desta série de derivados com grupo metileno ativado, nenhum causou lise da membrana dos eritrócitos humanos na concentração mais elevada ($CH_{50} \geq 400\mu M$), já em PBMCs houve uma baixa redução na citotoxicidade em que o composto AIM51 inibiu a viabilidade celular em $13,33\mu M$, diferentemente observamos um significativo aumento da redução dessa toxicidade celular em $54,30\mu M$ para AIM41, com relação ao índice de seletividade podemos destacar dessa série de moléculas o aduto AM51 ($IS \geq 34,54$) na razão de (CH_{50}/CI_{50}) sendo mais seletivo para as formas promastigotas do que para os eritrócitos, porém na razão (CC_{50}/CE_{50}) não obtivemos um perfil de seletividade

considerável (IS = 1,40). Esses dados demonstram que estes compostos possuem uma atividade anti-*Leishmania* relevante, porém limitada a citotoxicidade.

Da mesma forma foi possível obter valores ainda mais baixos da série de derivados nitrilados modificados, comparando com o composto AIC52 ($CI_{50} = 16,97\mu M$ e $CE_{50} = 4,24\mu M$), dentre os quatro avaliados três obtiveram atividade considerável, AIN53 ($CI_{50} = 12,05\mu M$ e $CE_{50} = 11,46\mu M$), AIN51 ($CI_{50} = 19,91\mu M$ e $CE_{50} = 4,48\mu M$), foi visto uma inibição significativa para AIN41, obtendo o melhor desempenho dentre todos os compostos testados, para as formas amastigotas axênicas obtendo um $CE_{50} = 0,85\mu M$, e para as formas promastigotas do parasito $CI_{50} = 8,16\mu M$, quanto a citotoxicidade em eritrócitos foi obtido para todos os compostos testados ($CH_{50} \geq 400\mu M$), ou seja, ausência de atividade hemolítica, entretanto em PBMCs obtivemos valores distintos e um pouco mais elevado comparado a AIC52 ($CC_{50} = 3,23\mu M$) em que obtivemos as seguintes concentrações AIN53 ($CC_{50} = 11,11\mu M$), AIN41 ($CC_{50} = 13,41\mu M$) e com uma concentração citotóxica razoável o aduto AIN51 ($CC_{50} = 30,52\mu M$). Quanto ao melhor perfil de seletividade, mesmo com uma alta concentração citotóxica do composto AIN41 o mesmo se mostra 49,01 vezes mais seletivo na razão de (CH_{50}/CI_{50}) e 15, 77 vezes mais seletivo para as formas amastigotas axênicas do que para PBMCs (CC_{50}/CE_{50}), seguido do AIN53 (IS $\geq 33,19$) apenas na razão (CH_{50}/CI_{50}).

Esses dados sugerem uma forte influência dessas modificações químicas, como a adição e remoção de halogênios como o cloro (-Cl) no anel benzênico da isatina, nas posições C-5 e C-7, que são substituintes eletroretiradores que podem influenciar no aumento da lipofilicidade, uma melhor penetração na membrana do parasito e até mesmo modular a afinidade por enzimas-alvo. Estes resultados corroboram com outros estudos, onde grupos eletronegativos no anel aromático melhoram atividade, mas aumentam a citotoxicidade, em que foi visto no estudo de síntese de compostos de benzoilguanidinas, a obtenção de um $CI_{50} = 9,8\mu M$ em *L. amazonensis*, mas com um índice de seletividade de 5,5 (SILVA, 2019), da mesma forma foi observado em derivados de Alquilamino-1,2,3,4-tetrahidroacridinas, em que grande parte dos compostos sintetizados demonstraram alta toxicidade, mas permitindo avanços em modificações estruturais, que resultou em uma atividade de inibição em promastigotas ótima ($CI_{50} = 0,60\mu M$) em parasitos da espécie *L. infantum* e uma citotoxicidade moderada levando assim a um índice de seletividade mais elevado (IS = 19,48) (SILVA et al., 2023). Outra série de análogos com grupos retiradores de elétrons, foram avaliados por Batista (2022), os derivados nitroheterocíclicos: 1,2,4-nitrotriazóis, com destaque para um deles, com $CI_{50} = 4,7\mu M$ e IS > 21 em *L. amazonensis*. Semelhante aos

resultados obtidos neste trabalho, uma série de compostos com o grupo cloro (-Cl) também obteve uma inibição da viabilidade em *L. amazonensis* de $CI_{50} = 4,7 \mu M$ com uma seletividade moderada de $IS = 6,4$, em que o caráter eletrônico do aril e lipofilia influenciaram em sua atividade (LAVORATO et al, 2017), mostrando que as substituições com -Cl e -NO₂ aumentam a atividade anti-*Leishmania* em testes *in vitro* (KAMDEM et al., 2021; ABDELAHI et al., 2021; HUANG et al., 2021).

Ampliando um pouco mais a investigação desses adutos de MBH modificados, analisamos o seu núcleo isolado (Isatina) (Bergman, Lindström e Tilstam, 1985), a fim de obtermos informações de sua interferência na bioatividade citotóxica em células humanas, assim como os outros compostos, foi testada entre 3,12 a 400 μM sob as formas promastigotas e amastigotas axênicas como também nos eritrócitos e em PBMC, como resultado observamos que não há atividade inibitória do núcleo isolado na maior concentração testada ($CI_{50} \geq 400 \mu M$ e $CE_{50} \geq 400 \mu M$) como também nos eritrócitos ($CH_{50} \geq 400 \mu M$), entretanto foi verificado uma leve citotoxicidade em PBMC ($CC_{50} = 195,4 \mu M$), é importante reconhecer que mesmo com essa leve toxicidade, a presença do núcleo de isatina não é suficiente para conferir a alta atividade citotóxica em células humanas, e nos leva novamente aos grupos adicionados em sua estrutura em posições específicas, que podem ter interação com enzimas-chave da vida redox do parasito.

Embora os resultados obtidos sejam relevantes, quando comparados ao fármaco de referência Anfotericina B ($CC_{50} = 29,91 \mu M$) ainda há limitações quanto a citotoxicidade, e seu índice de seletividade ($IS = 257,8$ e $IS = 93,46$) se destaca frente às moléculas sintéticas testadas, dentre todos os adutos de MBH pré-selecionados (AIM52 e AIC52) e modificados, somente os adutos modificados AIM41 ($CC_{50} = 54,30 \mu M$) e AIN51 ($CC_{50} = 30,52 \mu M$) obtiveram uma menor citotoxicidade quando comparados a AmB, levando em consideração que estes compostos demonstram uma atividade inibitória considerável nas formas promastigotas e amastigotas axênicas do parasito. Contudo, vale ressaltar que os compostos sintéticos não apresentaram nenhuma toxicidade hemolítica e que as modificações estruturais não interferiram nessa baixa toxicidade e isto representa uma base importante no desenvolvimento futuro de uma seletividade eficaz.

Os alvos terapêuticos desses novos adutos de MBH ainda não foi identificado e podem ser diversos de acordo com a estrutura química de cada composto (relação estrutura-atividade), como também de diferentes rotas metabólicas, alguns estudos relatam morte celular por

apoptose desses adutos de MBH, enquanto a Anfotericina B causa apoptose e necrose (ROCHA et al., 2019; FERREIRA et al., 2023). Alguns trabalhos apontam mecanismos e alvos moleculares promissores para o desenvolvimento de novos compostos com atividade anti-*Leishmania*. Dentre eles, a tripanotiona redutase (TR) uma flavoproteína homodimérica exerce papel central na defesa contra o estresse oxidativo, mantendo a trypanotiona ($T(SH)_2$) em sua forma reduzida (GONZÁLEZ-MONTERO et al., 2024). Esse ciclo redox ocorre pela transferência de elétrons do NADPH, via FAD, para a ponte dissulfeto da trypanotiona (COMINI e FLOHÉ 2013). Diferentemente de mamíferos, o parasito *Leishmania* não possui a catalase nem o sistema tioredoxina-redutase, tornando a TR o seu principal mecanismo de proteção contra espécies reativas de oxigênio (ROS) (TURCANO et al., 2018). Os antimoniais pentavalentes exploram essa vulnerabilidade, uma vez reduzidos a antimônio trivalente dentro do parasito, eles inativam a TR e elevam o estresse oxidativo consequentemente interrompem a homeostase celular (SOLOMON et al., 2022; ZHANG et al., 2025). Da mesma forma, em testes *in vitro* com parasitos da espécie *Leishmania infantum* foram observados a inibição dessa enzima por uma nova série de derivados de 3-amino-1-arylpropan-1-ona, que se ligam ao sítio de entrada do NADPH onde reduziram a atividade enzimática abaixo de 75 % (Madia et al., 2023), em concordância, outro derivado o diaryl sulfeto RDS 777 (6-(sec-butoxy)-2-((3-chlorophenyl)thio)pyrimidin-4-amine) estabeleceu forte ligação ao sítio catalítico da enzima por hidrogênio com os resíduos Glu466', Cys57 e Cys52, que impediram o ciclo redox, obstruindo o acesso ao cofator NADPH, levando à inibição eficaz da enzima (COLOTTI et al., 2019; SACCOLITI et al., 2017). Resultados semelhantes foram observados em *Leishmania donovani* por novos derivados de chalcona que apresentaram atividade inibitória na faixa de 3,0 a 21,5 μ M, com alta afinidade à tripanotiona redutase (TR) (ORTALLI et al., 2018).

Outro tipo de mecanismo importante que pode ser o alvo dos adutos de MBH dessa investigação são os componentes que formam a membrana plasmática do parasito, como proteínas e esteróis que desempenham função na patogênese em espécies do gênero *Leishmania*, um dos mais descritos na literatura é o metabolismo do ergosterol, pois a biossíntese de esteróis é essencial para a sobrevivência do parasito (GOAD, et al., 1984; BATES, 2018). Nas formas amastigota e promastigota de *Leishmania*, os principais esteróis identificados incluem ergosta-5,7,24(28)-trieno-3 β -ol, ergosta-7,22-dieno-3 β -ol e estigmasta-7,24(28)-dieno-3 β -ol, que representam a maior parte da composição esteroidal (SAKYI et al., 2021). Diferentemente das células de mamíferos, esses organismos não

possuem as enzimas necessárias para a biossíntese de colesterol, embora sejam capazes de incorporá-lo do meio externo, onde ele é detectado em pequenas quantidades. Em um estudo de Yao e Wilson (2016), foi observado que o pasocanazol um composto antifúngico inibidor da enzima esterol 14 α -desmetilase (CYP51) que é uma enzima importante na conversão de lanosterol em ergosterol, reduziu a viabilidade em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*, pelo acúmulo de esteróis anormais, interferindo na integridade da membrana celular do parasito, além de respostas oxidativas e alterações morfológicas levando assim a morte celular programada (SOUZA E RODRIGUES, 2009; SAKYI et al., 2021).

Além disso, em outro estudo foram testados compostos inibidores dessa enzima mostrando uma atividade significativa, em *L. donovani* com alelos do gene CYP51 deletados, ou seja, a redução da expressão da CYP51 obteve uma diminuição nos níveis de ergosterol (MCCALL et al., 2015). A enzima CYP5122A1 também foi identificada, como um componente essencial no metabolismo de esteróis de *L. donovani*, especificamente atuando na oxidação do grupo metil na posição C4 do lanosterol, onde sua superexpressão afeta o crescimento celular, a resposta ao estresse e a expressão de glicoconjugados importantes para a infecção. Outro aspecto relevante foi de que essa enzima influencia diretamente a eficácia de azóis antifúngicos, sugerindo que inibidores com ação combinada sobre a CYP5122A1 e a CYP51 podem oferecer maior eficácia terapêutica contra a leishmaniose visceral (JIN et al., 2024).

Há evidências de que a CYP51 depende da presença da redutase de citocromo P450 (CPR1) em *L. donovani*, onde a deleção do gene CPR1 resultou na perda da atividade da CYP51, levando à interrupção da síntese de ergosterol e ao acúmulo de intermediários esteroidais, impactando na viabilidade do parasito (KEIGHOBADI et al., 2018; TULLOCH et al., 2024). Em *L. major* foi demonstrado que a enzima C24-esterol metiltransferase (SMT) é essencial para a síntese de ergosterol, funcionamento mitocondrial e virulência. Parasitos SMT-nulos apresentaram alterações na bioenergética, acúmulo de ROS e perda de infectividade em modelo murino (MUKHERJEE et al., 2018). Esses achados reforçam a SMT como alvo terapêutico promissor para o combate à leishmaniose.

Do mesmo modo, o fármaco de segunda linha a Anfotericina B tem alta afinidade pelo ergosterol, sendo essa interação mais intensa do que com o colesterol em células do hospedeiro mamífero. Isso ocorre, por meio de interações, como ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, atuando de forma eficiente contra *Leishmania* devido a alta afinidade

pelo ergosterol das membranas do parasito, além dessas interações específicas a estrutura da AmB com o ergosterol especialmente nas regiões das duplas ligações C7, C22 e na metilação do carbono C24 da cadeia lateral, leva à formação de canais iônicos ou agregados lipídicos, causando desestabilização osmótica e colapso da homeostase iônica, o que causa a morte do parasito, através desses poros (RODRIGUES, 2018).

Entretanto, nas últimas décadas foram observados resistência por esse fármaco, e até mesmo pela adição de outro, a miltefosina, onde foi visto mutações pontuais no transportador do mesmo, em linhagens resistentes à AmB, além da resistência cruzada entre esses dois fármacos, sendo observadas alterações na composição lipídica da membrana desses parasitos (FERNANDEZ-PRADA et al., 2016). Associados a mutações de genes envolvidos na síntese de ergosterol, como 24-esterol metiltransferase (SMT), C5-desaturase (SC5D) e CYP51 (14 α -desmetilase), que reduzem a afinidade da AmB, e consequentemente a sua eficácia, outros genes como o MDR1 são superexpressos promovendo o efluxo de fármacos contribuindo assim para a resistência já observada em algumas linhagens do gênero *Leishmania*.

O desenvolvimento e a descoberta de novos medicamentos eficazes para as leishmanioses são desafiadores, devido às variáveis formas clínicas da doença, espécie do parasito, resistência às drogas, alta toxicidade entre outros fatores (ANDREWS, FISHER E SKINNER-ADAMS, 2014). As moléculas oriundas da reação de MBH utilizadas neste trabalho são inéditas, baseadas em estratégias da química medicinal e sintética, associadas à inovação. Apesar das limitações em desenvolver um aduto com uma toxicidade baixa e um perfil seletivo maior, comparado ao fármaco de referência utilizado atualmente no tratamento desta infecção, foi possível selecionar e analisar uma nova série de moléculas com uma atividade anti-*Leishmania* promissora em formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. infantum* (CI₅₀ = 8,16 e μ M CE₅₀ = 0,85 μ M) e com um índice de seletividade moderado entre $\geq 49,01$ e 15,77 vezes na razão CH₅₀/CI₅₀ e CC₅₀/CE₅₀ respectivamente, possuindo assim um perfil citotóxico manejável para o aduto de MBH AIN41.

Deste modo, investigações adicionais são necessárias para possibilitar um perfil seletivo maior, assim, através da biotecnologia poderemos ampliar e possibilitar abordagens de nanoencapsulamento em lipossomas podendo contribuir na diminuição da citotoxicidade em células humana, como também identificar o mecanismo alvo desses adutos no parasito o que contribuirá para a validação dessa classe de moléculas bioativas, testes de toxicidade em

outras linhagens celulares (macrófagos) *in vitro*, e em modelos animais *in vivo* justificando a continuidade dessa avaliação futura.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos ao longo deste estudo demonstram o potencial promissor dessa nova classe de compostos sintéticos, especialmente o derivado AIN41 modificado com núcleo de isatina obtido da reação de Morita–Baylis–Hillman, frente às formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania infantum*. Observou-se que todos os compostos de MBH apresentaram efeito inibitório significativo aliado a ausência de citotoxicidade em eritrócitos humanos e citotoxicidade moderada em células mononucleares de sangue periférico, indicando um perfil de seletividade promissor. A análise do núcleo isatina (isolado) evidenciou seu potencial como farmacóforo relevante para o desenvolvimento de derivados bioativos. Dessa forma, os achados deste estudo reforçam a importância da triagem de novos compostos sintéticos como candidatos a agentes terapêuticos contra a leishmaniose visceral, destacando a necessidade de investigações adicionais, como *in vitro* e *in vivo*, para elucidar mecanismos de ação, otimizar estruturas químicas e validar a eficácia em modelos experimentais.

REFERÊNCIAS

- ABDELAHI, Mohamed Mokhtar Mohamed et al. Novel 3-chloro-6-nitro-1H-indazole derivatives as promising antileishmanial candidates: synthesis, biological activity, and molecular modelling studies. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 37, n. 1, p. 151-167, 11 dez. 2021. Informa UK Limited.
- AHMADI, Somayyeh et al. An update on *Leishmania martiniquensis* infections: transmission, clinical characteristics, and treatment. *Parasite Epidemiology and Control*, [S.l.], v. 27, p. 1-12, nov. 2024. Elsevier BV.
- AIN, Vineet; JAIN, Keerti. Molecular targets and pathways for the treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 1, p. 161-170, Jan. 2018.
- AKBARI, Maryam; ORYAN, Ahmad; HATAM, Gholamreza. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 233, p. 80-86, Maio. 2021.
- AKHAN, Farhan; MAALIK, Aneela. Advances in Pharmacology of Isatin and its Derivatives: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 10, p. 1937-1944, 6 nov. 2015.
- AKHOUNDI, Mohammad et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 3 mar. 2016.
- ALMEIDA, Fernanda S. et al. In vitro anti-Leishmania activity and molecular docking of spiro-acridine compounds as potential multitarget agents against Leishmania infantum. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 49, p. 128289, out. 2021.
- ALMEIDA, Fernanda Silva. Avaliação da atividade de compostos de guanidina, selenoglicolicamidas e espiro-acridínicos sobre Leishmania infantum. 2022. 200 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2022.
- ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012.
- AMORIM, F. M. et al. Morita-Baylis-Hillman adduct shows in vitro activity against Leishmania (Viannia) braziliensis associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide. **Parasitology**, v. 140, n. 1, p. 29-38, 4 ago. 2012.
- ANDREWS, Katherine T.; FISHER, Gillian; SKINNER-ADAMS, Tina S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 2, p. 95-111, ago. 2014.
- ARAFA, Reem K. et al. Synthesis and in vitro antiproliferative effect of novel quinoline-based potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 826-832, maio 2013.
- ARAÚJO, Ywkiane Lopes de et al. Ocorrência da leishmaniose visceral na Paraíba e sua correlação com indicadores municipais. **Saúde (Santa Maria)**, v. 47, n. 1, p. 1-14, 3 maio 2021.

ARONSON, Naomi et al. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 12, p. e202-e264, 7 dez. 2016.

ATLAS didático: ciclo de vida da Leishmania / Dirceu Esdras Teixeira ... [et al.]. Rio de Janeiro: **Fundação CECIERJ**, Consórcio CEDERJ, 2013.

BANOTH, K. K.; FAHEEM; CHANDRASEKHAR, K. V. G.; ADINARAYANA, N.; MURUGESAN, S. Recent evolution on synthesis strategies and anti-leishmanial activity of β -carboline derivatives – An update. **Heliyon**, [S.l.], v. 6, n. 9, p. e04916, 2020.

BARBOSA, T. P. et al. Improved synthesis of seven aromatic Baylis–Hillman adducts (BHA): evaluation against *Artemia salina* Leach. and *Leishmania chagasi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 44, n. 4, p. 1726–1730, 2009.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [S.l.], v. 7, n. 3, p. 328–337, 2004.

BASAVAIAH, D.; REDDY, B. S.; BADSARA, S. S. Recent contributions from the Baylis–Hillman reaction to organic chemistry. **Chemical Reviews**, [S.l.], v. 110, n. 9, p. 5447–5674, 2010.

BASTOS, M. M.; HOELZ, L. V. B.; BOECHAT, N.; OLIVEIRA, A. P. Antileishmanial chemotherapy: a literature review. **Revista Virtual de Química**, [S.l.], v. 8, n. 6, p. 2072–2104, 2016.

BATES, Paul A. Revising *Leishmania*'s life cycle. **Nature Microbiology**, [S.l.], v. 3, n. 5, p. 529–530, 24 abr. 2018. Springer.

BATISTA, Jaqueline Cristiane Zequini. Atividade antileishmania in vitro dos novos análogos 1,2,4-nitrotriazóis. 2022. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS, 2022.

BERGMAN, J.; LINDSTRÖM, J. O.; TILSTAM, U. The structure and properties of some indolic constituents in *Couroupita guianensis* Aubl. **Tetrahedron**, [S.l.], v. 41, n. 14, p. 2879–2881, 1985.

BETHENCOURT-ESTRELLA, C. J. et al. Acrylonitrile derivatives: in vitro activity and mechanism of cell death induction against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, [S.l.], v. 24, p. 100531, 2024.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos – **CMED**. Preços de medicamentos. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. 2. ed. atual. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p. ISBN 978-85-334-2474-6.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed., 5. reimpr. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p. ISBN 978-85-334-0742-8.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. *The Lancet*, [S.l.], v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (org.). Leishmaniasis: laboratory diagnosis. DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, 2024.

CHEKE, Rameshwar S. et al. Therapeutic outcomes of isatin and its derivatives against multiple diseases: recent developments in drug discovery. **Pharmaceuticals**, [S.l.], v. 15, n. 3, p. 272, 22 fev. 2022. MDPI AG.

COA, J. C. et al. Synthesis, leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activity of quinoline-hydrazone hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 101, p. 746–753, 2015.

COELHO, F.; ALMEIDA, W. P. Reação de Baylis–Hillman: uma estratégia para a preparação de intermediários multifuncionalizados para síntese orgânica. **Química Nova**, [S.l.], v. 23, n. 1, p. 98–101, 2000.

COELHO, M. et al. Synthesis and anticancer activity of homodimeric Morita–Baylis–Hillman adducts based on 3-hydroxyindolin-2-one core. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S.l.], v. 00, n. 00, p. 1–11, 2023.

COLOTTI, G. et al. Structure-guided approach to identify a novel class of anti-leishmaniasis diaryl sulfide compounds targeting the trypanothione metabolism. **Amino Acids**, [S.l.], v. 52, n. 2, p. 247–259, 29 abr. 2019. Springer.

COMINI, M. A.; FLOHÉ, L. Trypanothione-based redox metabolism of trypanosomatids. In: **Trypanosomatid Diseases**. [S.l.], p. 167–199, 4 abr. 2013. Wiley.

CUPOLILLO, E.; BOITÉ, M. C.; PORROZZI, R. Considerações sobre a taxonomia do gênero *Leishmania*. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. (org.). *Leishmanioses do continente americano*. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, 2014. p. 39–51. ISBN 978-85-7541-568-9.

DEVI, N. et al. Synthesis, biological activities, and structure–activity relationships of Morita–Baylis–Hillman adducts: an update. **Archiv der Pharmazie**, [S.l.], p. 1–10, 2024.

DIRO, E. et al. A randomized trial of AmBisome monotherapy and AmBisome and miltefosine combination to treat visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients in Ethiopia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 1–19, 2019.

DORLO, T. P. C.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H.; VRIES, P. J. de. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.], v. 67, n. 11, p. 2576–2597, 2012.

FALCI, Diego Rodrigues; PASQUALOTTO, Alessandro Comarú. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical & Biomedical Research**, [S.l.], v. 35, n. 2, p. 65-82, 2015. Tikinet Edição Ltda. - EPP.

FERNANDES, Fábio S. et al. Discovery of highly potent and selective antiparasitic new oxadiazole and hydroxy-oxindole small molecule hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 201, p. 112418, set. 2020. Elsevier BV.

FERREIRA, Dartagnan et al. Recentes avanços na funcionalização seletiva de quinolinas. *Química Nova*, [S.l.], v. 44, n. 5, p. 599-615, 2021. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**.

FERREIRA, Larissa Adilis Maria Paiva et al. Biological activities of Morita-Baylis-Hillman adducts (MBHA). **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 23, n. 17, p. 1691-1710, set. 2023. Bentham Science Publishers Ltd.

FREITAS, Elisangela Oliveira de et al. The contribution of immune evasive mechanisms to parasite persistence in visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, [S.l.], v. 7, p. 1-7, 22 abr. 2016. Frontiers Media SA.

FREITAS, Luiz Alberto Barros et al. Structural improvement of new thiazolyl-isatin derivatives produces potent and selective trypanocidal and leishmanicidal compounds. **Chemico-Biological Interactions**, [S.l.], v. 345, p. 109561, ago. 2021. Elsevier BV.

FRÉZARD, Frédéric; DEMICHELI, Cynthia; RIBEIRO, Raul R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, [S.l.], v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 30 jun. 2009. MDPI AG.

G.L. JUNIOR, Cláudio et al. Efficient synthesis of 16 aromatic Morita-Baylis-Hillman adducts: biological evaluation on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*. **Bioorganic Chemistry**, [S.l.], v. 38, n. 6, p. 279-284, dez. 2010. Elsevier BV.

GARUDACHARI, Bhadrachari; ISLOOR, Arun Mohan. Substituted quinoline derivatives as potent biological agents. **Advanced Materials Research**, [S.l.], v. 995, p. 61-84, jul. 2014. Trans Tech Publications, Ltd.

GOAD, L. J.; HOLZ, G. G.; BEACH, D. H. Sterols of *Leishmania* species: implications for biosynthesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [S.l.], v. 10, n. 2, p. 161-170, fev. 1984. Elsevier.

GOLUBEVA, Olga Yu. et al. Hemolytic activity and cytotoxicity of synthetic nanoclays with montmorillonite structure for medical applications. **Nanomaterials**, [S.l.], v. 13, n. 9, p. 1470, 25 abr. 2023. MDPI AG.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira et al. The development of species of *Leishmania* Ross, 1903 in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, [S.l.], v. 90, n. 3, p. 367-373, jun. 1995. **FapUNIFESP (SciELO)**.

GONZÁLEZ-MONTERO, M. C. et al. Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatids. **Molecules**, [S.l.], v. 29, n. 10, p. 2214, 9 maio 2024. MDPI.

GOTO, Hiro. Review of the current treatments for leishmaniases. **Research and Reports in Tropical Medicine**, [S.l.], p. 69, jul. 2012. Informa UK Limited.

GOTO, Hiro; LINDOSO, José Angelo Lauletta. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, [S.l.], v. 8, n. 4, p. 419-433, abr. 2010. Informa UK Limited.

GOTO, Hiro; LINDOSO, José Angelo Lauletta. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, [S.l.], v. 26, n. 2, p. 293-307, jun. 2012. Elsevier BV.

GRAEPP-FONTOURA, Iolanda et al. Epidemiological aspects and spatial patterns of human visceral leishmaniasis in Brazil. **Parasitology**, [S.l.], v. 147, n. 14, p. 1665-1677, 21 set. 2020. Cambridge University Press (CUP).

GUO, Hua. Isatin derivatives and their anti-bacterial activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 164, p. 678-688, fev. 2019. Elsevier BV.

HASSANZADEH, Farshid et al. Molecular docking and synthesis of N-alkyl-isatin-3-imino aromatic amine derivatives and their antileishmanial and cytotoxic activities. **Research in Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 19, n. 2, p. 238-250, mar. 2024. Medknow.

HUANG, Min-Fu et al. Synthesis, in silico study and antileishmanial evaluation of new selenides derived from 7-chloro-quinoline and N-phenylacetamides. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S.l.], p. 712-721, 2021. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

JIN, Y. et al. CYP5122A1 encodes an essential sterol C4-methyl oxidase in *Leishmania donovani* and determines the antileishmanial activity of antifungal azoles. **Nature Communications**, [S.l.], v. 15, n. 1, p. 1–19, 31 out. 2024. Springer.

JORDÃO, Felipe Trovalim et al. Evolutive history of *Leishmania* genus and differential diagnosis of clinical important species based on a unique kinetoplastida chitinase. **International Journal of Medical Parasitology and Epidemiology Sciences**, [S.l.], v. 2, n. 3, p. 48-55, 1 out. 2021. Maad Rayan Publishing Company.

JUN, Wang; YUMIN, Shi; HENG, Yan. Recent advances in quinolone hybrids with potential antibacterial activity against drug-resistant bacteria. **Future Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 15, n. 6, p. 555-578, mar. 2023. Informa UK Limited.

KAMDEM, Boniface P. et al. The role of nitro (NO₂-), chloro (Cl), and fluoro (F) substitution in the design of antileishmanial and antichagasic compounds. **Current Drug Targets**, [S.l.], v. 22, n. 4, p. 379-398, mar. 2021. Bentham Science Publishers Ltd.

KATO, Hirotomo et al. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S.l.], v. 7, n. 3, p. 814-826, 5 mar. 2010. MDPI AG.

KATO, Hirotomo. Epidemiology of Leishmaniasis: risk factors for its pathology and infection. **Parasitology International**, [S.l.], v. 105, p. 102999, abr. 2025. Elsevier BV.

KAUFER, Alexa et al. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & Vectors**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 2-17, 8 jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

KAUR, Jaspreet et al. In silico screening, structure-activity relationship, and biologic evaluation of selective pteridine reductase inhibitors targeting visceral leishmaniasis.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, [S.l.], v. 55, n. 2, p. 659-666, fev. 2011. American Society for Microbiology.

KEIGHOBADI, M. et al. Molecular modeling and structural stability of wild-type and mutant CYP51 from *Leishmania major*: in vitro and in silico analysis of a laboratory strain. **Molecules**, [S.l.], v. 23, n. 3, p. 696, 19 mar. 2018. MDPI.

KUNDU, Marginal K. et al. Antimalarial activity of 3-hydroxyalkyl-2-methylene-propionic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.l.], v. 9, n. 5, p. 731-736, mar. 1999. Elsevier BV.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 199, n. 1135, p. 309-320, 14 nov. 1977.

LAINSON, Ralph. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônia de Saúde**, Ananindeua, v. 1, n. 2, p. 13-32, jun. 2010.

LAMOTTE, S. et al. The enemy within: Targeting host-parasite interaction for antileishmanial drug discovery. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005480, 8 jun. 2017.

LAVORATO, Stefânia Neiva et al. Synthesis, antileishmanial activity and QSAR studies of 2-chloro-N-arylacetamides. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 53, n. 1, p. 1-7, 2017. FapUNIFESP (SciELO).

LIMA JUNIOR, Claudio Gabriel. Síntese de dezesseis adutos aromáticos de Morita-Baylis-Hillman: bioavaliação contra *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi* e análise da relação estrutura atividade biológica. 2009. 122 f. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

LIMA-JUNIOR, C. G. et al. Efficient synthesis of 16 aromatic Morita-Baylis-Hillman adducts: biological evaluation on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*. **Bioorganic Chemistry**, [S.l.], v. 38, n. 6, p. 279-284, dez. 2010. Elsevier BV.

LIMA-JUNIOR, Claudio G. et al. Synthesis, cytotoxic activity on leukemia cell lines and quantitative structure-activity relationships (QSAR) studies of Morita-Baylis-Hillman adducts. **Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 12, n. 7, p. 602-612, 27 set. 2016. Bentham Science Publishers Ltd.

LIMA-JUNIOR, Claudio G.; VASCONCELLOS, Mário L. A. A. Morita-Baylis-Hillman adducts: biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 20, n. 13, p. 3954-3971, jul. 2012. Elsevier BV.

LÖFGREN, S. E. et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Experimental Parasitology**, [S.l.], v. 118, n. 2, p. 197-202, fev. 2008. Elsevier BV.

MADIA, V. N. et al. Inhibition of *Leishmania infantum* trypanothione reductase by new aminopropanone derivatives interacting with the NADPH binding site. **Molecules**, [S.l.], v. 28, n. 1, p. 338, 1 jan. 2023. MDPI.

MARCILI, Arlei et al. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, [S.l.], v. 25, p. 44-51, jul. 2014. Elsevier BV.

MARINHO, Fernanda de Aquino et al. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, [S.l.], v. 106, n. 4, p. 507-509, jun. 2011. FapUNIFESP (**SciELO**).

MCCALL, L.-I. et al. Targeting ergosterol biosynthesis in *Leishmania donovani*: essentiality of sterol 14 α -demethylase. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S.l.], v. 9, n. 3, p. 1–17, 13 mar. 2015. PLOS.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM*, [S.l.], v. 107, n. 1, p. 7-14, 5 jun. 2013. **Oxford University Press (OUP)**.

MEDEIROS, Alba Leticia Peixoto et al. Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral no nordeste brasileiro no período de 2009 a 2019. **Brazilian Journal of Health Review**, [S.l.], v. 5, n. 5, p. 20683-20693, 15 out. 2022. South Florida Publishing LLC.

MENDES, Pedro Henrique Gonçalves et al. Leishmaniose dérmica pós-calazar por *Leishmania infantum*: uma apresentação atípica. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [S.l.], v. 27, p. 103023, out. 2023. Elsevier BV.

MISHRA, Amita et al. Synthesis and evaluation of new diaryl ether and quinoline hybrids as potential antiparasitic and antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.l.], v. 24, n. 7, p. 1719-1723, abr. 2014. Elsevier BV.

MOLINA, Sonia López. Derivados de [1,2,3]triazolo[1,5-a]quinolina y [1,2,3]triazolo[1,5-a]piridina. Interacción con ADN. Actividad fotonucleasa. Potenciales aplicaciones como antitumorales o agentes leishmanicidas. 2018. 337 f. **Tese (Doutorado)** – Universitat de València, València, 2018.

MUKHERJEE, S. et al. Sterol methyltransferase is required for optimal mitochondrial function and virulence in *Leishmania major*. **Molecular Microbiology**, [S.l.], v. 111, n. 1, p. 65–81, 21 out. 2018. Wiley.

MULE, Simon Ngao et al. Protein glycosylation in *Leishmania* spp. *Molecular Omics*, [S.l.], v. 16, n. 5, p. 407-424, 2020. **Royal Society of Chemistry (RSC)**.

NAGLE, Advait S. et al. Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, [S.l.], v. 114, n. 22, p. 11305-11347, 3 nov. 2014. American Chemical Society (ACS).

NARWAL, Sangeeta; KUMAR, Sanjiv; VERMA, Prabhakar Kumar. Synthesis and therapeutic potential of quinoline derivatives. **Research on Chemical Intermediates**, [S.l.], v. 43, n. 5, p. 2765-2798, 4 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC.

NEVES, D. P. et al. *Parasitologia humana*. 13. ed. Rio de Janeiro: **Livraria Atheneu**, 2016.

NEVES, David Pereira et al. *Parasitologia humana*. 12. ed. São Paulo: **Atheneu**, 2011. ISBN 9788538802204.

NINA, Larissa Neuza da Silva et al. Distribuição espaço-temporal da leishmaniose visceral no Brasil no período de 2007 a 2020. **Revista Panamericana de Salud Pública**, [S.l.], v. 47, p. 1-10, 14 nov. 2023. Pan American Health Organization.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. *Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas*. 2. ed. Washington, DC: OPAS, 2022.

ORGANIZATION, World Health. *Leishmaniasis*. 2020.

ORGANIZATION, World Health. *Leishmaniasis: epidemiological report for the Americas*. No. 12. 2024. IRIS – Institutional Repository for Information Sharing.

ORGANIZATION, World Health. *Leishmaniasis: epidemiological report for the Americas*. No. 7. 2019. IRIS – Institutional Repository for Information Sharing.

ORTALLI, M. et al. Identification of chalcone-based antileishmanial agents targeting trypanothione reductase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 152, p. 527–541, maio 2018. Elsevier.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [S.l.], v. 9, n. 10, p. 925-932, out. 2016. Medknow.

PACE, David. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, [S.l.], v. 69, p. 10-18, nov. 2014. Elsevier BV.

PAKRAVAN, Parvaneh et al. Biochemical and pharmacological characterization of isatin and its derivatives: from structure to activity. **Pharmacological Reports**, [S.l.], v. 65, n. 2, p. 313-335, mar. 2013. Springer Science and Business Media LLC.

PARAÍBA, Secretária de Estado de Saúde da. *Situação dos casos de leishmaniose visceral humana no Estado da Paraíba*. João Pessoa: **Gerência Executiva de Vigilância em Saúde**, 2023.

PELISSARI, Daniele Maria et al. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, [S.l.], v. 20, n. 1, p. 107-110, mar. 2011. FapUNIFESP (**SciELO**).

PERVEZ, Humayun et al. 5-Nitroisatin-derived thiosemicarbazones: potential antileishmanial agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 29, n. 5, p. 628-632, 3 out. 2013. Informa UK Limited.

PETERS, Nathan C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, [S.l.], v. 321, n. 5891, p. 970-974, 15 ago. 2008. AAAS.

PETERS, Nathan; SACKS, David. Immune privilege in sites of chronic infection: leishmania and regulatory T cells. **Immunological Reviews**, [S.l.], v. 213, n. 1, p. 159-179, 14 set. 2006. Wiley.

PICCICA, Matteo; LAGI, Filippo; BARTOLONI, Alessandro; ZAMMARCHI, Lorenzo. Efficacy and safety of pentamidine isethionate for tegumentary and visceral human leishmaniasis: a systematic review. **Journal of Travel Medicine**, [S.l.], v. 28, n. 6, p. 1-13, 22 abr. 2021. Oxford University Press.

PINTO, Carlos José Carvalho; GRISARD, Edmundo Carlos; ISHIDA, Maria Márcia Imenes. *Parasitologia*. Florianópolis: CCB/EAD/UFSC, 2011. 136 p. ISBN 978-85-61485-46-7.

PISCOPO, T. V.; MALLIA, A. C. Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal*, [S.l.], v. 82, n. 972, p. 649-657, 1 out. 2006. Oxford University Press.

RANG, H. P. et al. *Rang & Dale farmacologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 760 p. ISBN 978-85-352-8343-3.

RATH, Susanne et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*, [S.l.], v. 26, n. 4, p. 550-555, ago. 2003. FapUNIFESP (SciELO).

REITHINGER, Richard et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.l.], v. 7, n. 9, p. 581-596, set. 2007. Elsevier BV.

RIOS, Letícia Correia et al. Leishmaniose visceral: histórico, agente etiológico, ciclo biológico, vetor, diagnóstico e tratamento. **Tópicos nas Ciências da Saúde: Volume X**, [S.l.], p. 98-107, 16 set. 2022. Pantanal Editora.

ROATT, Bruno Mendes et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 104, n. 21, p. 8965-8977, 2 set. 2020. Springer.

ROCHA, Juliana da Câmara et al. Biological activity of Morita-Baylis-Hillman adduct homodimers in *L. infantum* and *L. amazonensis*: anti-leishmania activity and cytotoxicity. **Parasitology Research**, [S.l.], v. 118, n. 10, p. 3067-3076, 7 ago. 2019.

ROCHA, Juliana da Câmara. Investigação da atividade biológicas dos adutos de Morita-Baylis-Hillman sobre *Leishmania* spp. 2018. 181 f. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

RODRIGUES, Klinger Antonio da França et al. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 160, p. 32-40, fev. 2015. Elsevier BV.

RODRIGUES, Tiago et al. Targeting the liver stage of malaria parasites: a yet unmet goal. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 55, n. 3, p. 995-1012, 21 dez. 2011. ACS.

ROSENTHAL, E. et al. Le traitement de la leishmaniose viscérale en Europe em 2009: place de l'amphotéricine B liposomale. **Médecine et Maladies Infectieuses**, [S.l.], v. 39, n. 10, p. 741-744, out. 2009. Elsevier BV.

SABT, Ahmed et al. New antileishmanial quinoline linked isatin derivatives targeting DHFR-TS and PTR1: design, synthesis, and molecular modeling studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 246, p. 114959, jan. 2023. Elsevier BV.

SACCOLITI, F. et al. Inhibition of *Leishmania infantum* trypanothione reductase by diaryl sulfide derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 32, n. 1, p. 304–310, 1 jan. 2017. Informa UK Limited.

SAKYI, P. O. et al. Unravelling the myth surrounding sterol biosynthesis as plausible target for drug design against leishmaniasis. **Journal of Parasitic Diseases**, [S.l.], v. 45, n. 4, p. 1152–1171, 24 abr. 2021. Springer.

SAMPAIO, Raimunda Nonata Ribeiro et al. Successful treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.l.], v. 96, n. 5, p. 602–604, set. 2021. Elsevier BV.

SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. da R.; GUIMARÃES, E. T. Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: a narrative review. **Research, Society and Development**, [S.l.], v. 10, n. 7, p. e29510716543, 2021.

SANTOS, G. M. dos. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em um estado do Nordeste brasileiro. **Archives of Health Investigation**, [S.l.], v. 7, n. 3, 2018.

SAÚDE, Organização Pan-Americana da. *Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas*. 2. ed. [S.l.]: OPAS, 2022. Pan American Health Organization.

SILVA, Carlos F. M. et al. Structure–activity relationship studies of 9-alkylamino-1,2,3,4-tetrahydroacridines against *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* promastigotes. **Pharmaceutics**, [S.l.], v. 15, n. 2, p. 669, 16 fev. 2023. MDPI AG.

SILVA, Fábio P. L. et al. Synthesis, evaluation against *Leishmania amazonensis* and cytotoxicity assays in macrophages of sixteen new congeners Morita–Baylis–Hillman adducts. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 46, n. 9, p. 4295–4301, set. 2011. Elsevier BV.

SILVA, Kaio Maciel de Santiago. Síntese e avaliação da atividade antileishmania in vitro de benzoilguanidinas. 2019. **Dissertação (Mestrado em Química)** – Universidade Estadual de Londrina, PR, 2019.

SILVA, Thallys Mendes da et al. Alternativas farmacológicas promissoras para o tratamento da leishmaniose. *Anais do I Congresso Brasileiro de Parasitologia Humana On-Line*, [S.l.], p. 1–10, 13 set. 2021. **Revista Multidisciplinar em Saúde**.

SILVA, Wagner A. V. da et al. Synthesis and activity of novel homodimers of Morita–Baylis–Hillman adducts against *Leishmania donovani*: a twin drug approach. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.l.], v. 26, n. 18, p. 4523–4526, set. 2016. Elsevier BV.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. de C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* and *L. (L.) amazonensis*

in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [S.l.], v. 31, n. 8, p. 423-431, 10 jul. 2009. Wiley.

SOLOMON, M. et al. Efficacy of systemic treatment for *Leishmania tropica* cutaneous leishmaniasis. **Acta Dermato-Venereologica**, [S.l.], v. 102, p. 1–10, 24 maio 2022. Medical Journals Sweden AB.

SOUSA, Francisco das Chagas Araújo et al. Perfil epidemiológico de doenças negligenciadas de notificação compulsória no Brasil com análise dos investimentos governamentais nessa área. **Research, Society and Development**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 1-12, 1 jan. 2020.

SOUZA, Marcus V. N. de et al. Synthesis and in vitro antitubercular activity of a series of quinoline derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 17, n. 4, p. 1474-1480, fev. 2009. Elsevier BV.

SOUZA, W. de; RODRIGUES, J. C. F. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, [S.l.], v. 2009, p. 1–19, 2009. Wiley.

SPENCER, Angela C.; PANDA, Siva S. DNA gyrase as a target for quinolones. **Biomedicines**, [S.l.], v. 11, n. 2, p. 371, 27 jan. 2023. MDPI AG.

STEVERDING, Dietmar. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 1-10, 15 fev. 2017. Springer.

TORRES-GUERRERO, Edoardo et al. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, [S.l.], v. 6, p. 1-12, 26 maio 2017. F1000 Research Ltd.

TULLOCH, L. B. et al. Sterol 14- α demethylase (CYP51) activity in *Leishmania donovani* is likely dependent upon cytochrome P450 reductase 1. **PLOS Pathogens**, [S.l.], v. 20, n. 7, p. 1–23, 11 jul. 2024. PLOS.

TURCANO, L. et al. Identification and binding mode of a novel *Leishmania* trypanothione reductase inhibitor from high throughput screening. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S.l.], v. 12, n. 11, p. 1–21, 26 Nov. 2018. PLOS.

VANDEKERCKHOVE, Stéphanie; D’HOOGHE, Matthias. Quinoline-based antimalarial hybrid compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 23, n. 16, p. 5098-5119, ago. 2015. Elsevier BV.

VARUN, Varun; SONAM, Sonam; KAKKAR, Rita. Isatin and its derivatives: a survey of recent syntheses, reactions, and applications. **MedChemComm**, [S.l.], v. 10, n. 3, p. 351-368, 2019. Royal Society of Chemistry (RSC).

VASCONCELOS, Aliny et al. Synthesis and analysis of carvacrol-derived Morita-Baylis–Hillman adducts as potential anticancer agents. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S.l.], v. 8, n. 35, p. 1-16, 2024. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

VIEIRA, Ana Carolina Santana et al. Leishmanicidal activity of Morita-Baylis–Hillman adducts. **Parasitology Research**, [S.l.], v. 121, n. 2, p. 751-762, 6 jan. 2022. Springer.

VITAKU, Edon; SMITH, David T.; NJARDARSON, Jon T. Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 57, n. 24, p. 10257-10274, 7 out. 2014. ACS.

WHO. World Health Organization. *Leishmaniasis*. 2023.

XAVIER, Francisco et al. Synthesis and in vitro anti-*Leishmania amazonensis* biological screening of Morita-Baylis-Hillman adducts prepared from eugenol, thymol and carvacrol. **Molecules**, [S.l.], v. 21, n. 11, p. 1483, 8 nov. 2016. MDPI AG.

XAVIER, Francisco J. s. et al. Kinetic resolution of leishmanicidal meta and para ($\pm$)-2-[Hydroxy(nitrophenyl)methyl]acrylonitrile catalyzed by CALB: in vitro evaluations of separated meta (r), (s) and (r/s) adducts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S.l.], v. 108, p. 7-12, out. 2014. Elsevier BV.

YAO, C.; WILSON, M. E. Dynamics of sterol synthesis during development of *Leishmania* spp. parasites to their virulent form. **Parasites & Vectors**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 1–12, 12 abr. 2016. Springer.

ZELEDÓN, R. A. Hemoflagellates. **Medical Microbiology**, 1996.

ZHANG, H. et al. Progress in antileishmanial drugs: mechanisms, challenges, and prospects. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S.l.], v. 19, n. 1, p. 1–28, 3 jan. 2025. PLOS.

ZIJLSTRA, Eduard E. PKDL and other dermal lesions in HIV co-infected patients with leishmaniasis: review of clinical presentation in relation to immune responses. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S.l.], v. 8, n. 11, p. 1-12, 20 nov. 2014. PLoS.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: *Leishmaniose Visceral Humana: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico de doença sintomática e assintomática*

Pesquisadora: Tatjana Keesen de Souza Lima

I. Esclarecimentos

Estamos convidando você para participar como voluntário de uma pesquisa sobre calazar ou leishmaniose visceral. Esta é uma doença que afeta milhares de pessoas por ano, principalmente populações de baixa renda vivendo em áreas de risco. Devido a isso, a falta de políticas públicas e o desinteresse da indústria em investir no combate a leishmaniose levam a baixa disponibilidade de terapêuticas mais eficientes presentes no mercado, levando-se em conta que os atuais fármacos de referência disponíveis para o tratamento dessa patologia apresentam altas taxas de toxicidade para o corpo.

Em face do exposto, nessa pesquisa nós pretendemos realizar o estudo *in vitro* (sem aplicação de compostos em seres vivos) de potenciais fármacos anti-*Leishmania* que possam atuar no tratamento da leishmaniose visceral. Para isso, iremos realizar a coleta de sangue de indivíduos saudáveis no intuito de ver a atuação dessas moléculas testes sobre células sanguíneas de humanos e avaliar o grau de toxicidade tanto para glóbulos vermelhos, nossas famosas hemácias, responsáveis pelo carregamento de oxigênio para as nossas células, quanto para glóbulos brancos, que são nossos Leucócitos, principais componentes do nosso sistema imunológico. Ambos os tipos celulares são imprescindíveis para a saudabilidade do nosso corpo e a procura de moléculas que tratem a doença sem atacar essas células é de suma importância.

Caso você aceite em participar do estudo você deverá permitir a coleta do seu sangue para a realização dos experimentos.

Vamos a seguir, explicar a você para que usaremos cada material coletado e os riscos e desconforto que poderão existir.

Na coleta de sangue, serão coletados por uma pessoa treinada aproximadamente 20 mL de sangue, usando-se material estéril e descartável. Os riscos e desconfortos que você correrá nessa coleta são mínimos e poderá ser desmaio, sangramentos, manchas arroxeadas ou infecção no local da coleta. Iremos minimizar este risco com cuidados na realização deste procedimento, que são a limpeza no local da coleta usando-se álcool e pressionando o local de coleta por alguns minutos, depois da retirada da agulha. Com o sangue iremos utilizar parte deste de forma total (sangue total), para a realização dos testes de atividade hemolítica sobre as suas hemácias (eritrócitos), em que suas células serão expostas aos compostos em teste para avaliarmos seus efeitos de toxicidade. Ademais, a outra e maior parte do

sangue será submetida a extração de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC), basicamente seus Leucócitos do tipo linfócitos e monócitos, que assim como as hemácias, porém, através de outros processos de tratamento de amostra, também serão expostos as moléculas em teste, para avaliação dos índices de toxicidade sobre tais células.

Todos os materiais biológicos utilizados neste trabalho (sangue periférico) serão utilizados somente para pesquisa.

Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade.

Os benefícios da sua participação nesta pesquisa é que você irá facilitar a busca pela melhoria dos estudos na pesquisa de novos fármacos que sejam capazes de combater a leishmaniose de forma mais segura e eficaz, podendo no futuro contribuir com informações que poderão ser utilizadas na busca da melhoria no tratamento da doença e/ou da cura.

Garantimos que todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Caso você tenha interesse nos resultados da pesquisa basta solicitar ao pesquisador responsável.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária, você não será pago por participar do estudo. No entanto, caso você tenha algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, e se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito à indenização.

Você ficará com uma cópia deste documento e toda dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá entrar em contato com a Dr^a Tatjana Keesen de Souza Lima, no Centro de Biotecnologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária- João Pessoa - PB - Brasil - CEP: 58051-900 Fone: (83) 3216-7173.

Dúvidas a respeito de questões éticas desta pesquisa poderão ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFPB do hospital universitário Lauro Wanderley (CEP/HULW)- Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW- 4º andar.Campus I-Cidade Universitária-Bairro: Castelo Branco-CEP:58059-900-João Pessoa-PB- FAX (083) 32167522- CNPJ:24098477/007-05- Telefone: (083) 32167964- E-mail:comitedeetica@hulw.ufpb.br.

Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será desenvolvida, os riscos e benefícios envolvidos, bem como os meus direitos, e concordo em participar voluntariamente do estudo *“Leishmaniose Visceral Humana: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico de doença sintomática e assintomática”* autorizando o uso do meu sangue para a realização deste estudo.

Participante da pesquisa:

_____ data ____/____/____
Voluntário

_____ data ____/____/____
Pesquisador

ANEXO A

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
LAURO WANDERLEY/UFPB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Leishmaniose Visceral Humana: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico de doença sintomática e assintomática

Pesquisador: Tatjana Keesen de Souza Lima

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17813013.8.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 404.854

Data da Relatoria: 24/09/2013

Apresentação do Projeto:

A leishmaniose visceral é uma doença endêmica na região do nordeste incluindo o estado da Paraíba e possui um forte impacto na população. O modelo epidemiológico deixou de ser totalmente rural e esta doença se tornou prevalente também em zonas urbanas e peri-urbanas. O projeto de pesquisa tem como proposta estudar a leishmaniose que é uma doença infecciosa causada por várias espécies de protozoários do gênero Leishmania.

Serão selecionados 3 grupos de indivíduos: 1) com leishmaniose visceral com sintomatologia e 2) indivíduos assintomáticos, com sorologia positiva e sem sintomatologia clínica, além de 3) indivíduos com sorologia negativa e com nenhuma sintomatologia. Os pacientes com leishmaniose visceral serão provenientes de áreas endêmicas da Paraíba. O diagnóstico da doença será baseado em achados clínicos e testes laboratoriais, padrão utilizados nos centros de referência, incluindo demonstração parasitológica e presença de anticorpos anti-leishmania. Os indivíduos não infectados e assintomáticos serão selecionados de acordo com uma anamnese detalhada e exames sorológicos. Todos os indivíduos que contribuirão para a realização deste trabalho participarão voluntariamente da pesquisa, sendo esclarecidos sobre a importância do trabalho e assinarão o termo de consentimento esclarecido (TCLE). Após

Endereço: HULW-4º andar - Campus I - UFPB

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município:

Telefone: (833)216-7302

Fax: (833)216-7522

E-mail: iaponiracortez@yahoo.com.br; cepulw@hotmail.