

PEDRO HENRIQUE DE JESUS BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS VISANDO O TRATAMENTO DE FERIDAS OCACIONADAS POR
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: ESTUDO *IN VITRO* E *IN SILICO***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz

Coorientadores: Gaspar Diaz Muñoz
Tiago Antonio de O. Mendes
Anesia Aparecida Santos

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**


PEDRO HENRIQUE DE JESUS BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS VISANDO O TRATAMENTO DE FERIDAS OCASIONADAS POR
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: ESTUDO *IN VITRO* E *IN SILICO***


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 PEDRO HENRIQUE DE JESUS BARBOSA
Data: 20/10/2023 08:42:03-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Pedro Barbosa
Autor

Documento assinado digitalmente
 MARISA ALVES NOGUEIRA DIAZ
Data: 19/10/2023 14:44:59-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Marisa Alves Nogueira Diaz
Orientadora

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

B238a
2023

Barbosa, Pedro Henrique de Jesus, 2000-
Avaliação da atividade biológica de produtos naturais e
sintéticos visando o tratamento de feridas ocasionadas por
leishmaniose tegumentar : estudo in vitro e in silico / Pedro
Henrique de Jesus Barbosa. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (55 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2023.
Inclui bibliografia.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.620>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bioquímica. 2. Produtos biológicos. 3. Leishmaniose.
4. Agentes antiinflamatórios. I. Diaz, Marisa Alves Nogueira,
1960-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 572

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

*Dedico este trabalho a minha mãe, irmãos e minha segunda família, meus queridos
amigos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de vida e por estar comigo em todos os momentos que me senti sozinho.

A mim mesmo pela dedicação, esforço e acolhimento em todos os momentos que eu achava que não era capaz de realizar este trabalho.

Agradeço a minha mãe, Maria do Carmo da Silva Barbosa, por entender o meu momento de ausência durante o desenvolvimento deste projeto de pesquisa, acolhimento e respeito com minhas escolhas. Eu te amo, mamãe.

Agradeço aos meus irmãos, João Pedro e Luiz Felipe, por todo apoio emocional, financeiro e por entender meu momento de ausência que tive neste período de mestrado.

Agradeço a minha querida orientadora de mestrado e futuramente de Doutorado, a professora Dra. Marisa Alves Nogueira Diaz, obrigado pelo acolhimento, conselhos de vida, conselhos acadêmicos e por acreditar no meu potencial como pesquisador/ estudante e por me receber tão bem em seu ambiente de trabalho.

Obrigado, a minha coorientadora, Dra. Reggiani Vilela Gonçalves por liberar o uso do laboratório LAPEX-UFV, para poder realizar boa parte do meu projeto de pesquisa.

Obrigado, ao meu coorientador Dr. Raphael de Souza Vasconcellos, por liberar o espaço do Laboratório LBB1 para que tornasse possível a realização do meu trabalho.

Agradeço imensamente as minhas pós-doc favoritas, Manoela, Néia e Joice, sem vocês não conseguem realizar este trabalho, entendam a preciosidade de vocês dentro da ciência e agora na minha vida. Pessoas que quero continuar trabalhando no doutorado. Obrigado por todo conhecimento compartilhado.

Agradeço aos meus colegas de trabalho do Laboratório Bionat, Geórgia, Marcela, Mariá, Hyanne, Caio, Gisele, Nathan e Giovanna, sem vocês não seria possível realizar este trabalho

Agradeço a minha alma gêmea de vida, minha melhor amiga, Larissa Monteiro. Obrigado por acreditar em mim, me colocar para cima e por me fazer ser a

minha melhor versão sempre. Mesmo distante sempre sei que tenho para onde ir. Amo-te, minha grande amiga. Torço por você da mesma forma que sei que torce por mim.

Agradeço aos meus amigos de Manhuaçu: Clara, Miguel, Vinicius, Sara, Wellington. Obrigado pela presença de vocês na minha vida. Amo todos vocês e agradeço sempre a Deus por me dar a oportunidade de viver com pessoas tão verdadeiras como vocês. Estou por aqui, torcendo mentalmente para vocês

Obrigado aos meus amigos Maurício e Bárbara, sem dúvidas este é o melhor trio que alguém pode desejar em um ciclo tão árduo como o período de pós-graduação. Obrigado por estarem presentes em minha vida e por serem do jeitinho que vocês são. Amo vocês.

Agradeço ao eterno grupo da faculdade, Kendria, Rafaela, Bruna e Lara, obrigado por cada vibração boa que mandaram para mim e por sempre me fazerem acreditar que eu posso chegar aonde eu quiser. Vocês são incríveis.

Agradeço a minha querida irmã, Bianca! Que tive o prazer de conhecer a moça mais parecida comigo nesta vida, durante o período final do mestrado que claro que terei o prazer de compartilhar as minhas conquistas e histórias que irei cultivar no doutorado e pelo resto da vida. Amo-te

Agradeço aos meus demais amigos que pude construir nesta jornada, obrigado por todos os roles nessa cidade maravilhosa, conselhos e momentos: Alice, Ana Cris, Kayque, Rafael, Aninha, Malu, Vagner, Ginne, Gabi, Alex, Edileuza.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

“Antes de julgar a minha vida ou o meu caráter... calce os meus sapatos e percorra o caminho que eu percorri, viva as minhas tristezas, as minhas dúvidas e as minhas alegrias. [...] Cada um tem a sua própria história. Não compare a sua vida com a dos outros. Você não sabe como foi o caminho que eles tiveram que trilhar na vida.”

(Clarice Lispector)

RESUMO

BARBOSA, Pedro H.J., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Avaliação da atividade biológica de produtos naturais e sintéticos visando o tratamento de feridas ocasionadas por leishmaniose tegumentar: estudo *in vitro* e *in silico*.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Anesia Aparecida Santos, Gaspar Diaz Muñoz e Tiago Antonio de Oliveira Mendes.

A *Leishmania. V. braziliensis* é o agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar (LT) doença que afeta milhares de pessoas, principalmente aquelas em estado de vulnerabilidade social. O tratamento normalmente que é utilizado para tratar essa doença é baseado em fármacos que possuem toxicidade e custos elevados. Sendo assim, a busca de compostos químicos é essencial para o seu controle e tratamento. A busca de compostos oriundos de produtos naturais, advindos da flora ou fauna ou sintéticos através da química medicinal é de grande importância. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de alcaloides indólicos e derivados de dibenzoilmetanos como cicatrizante e leishmanicida. tal, foram feitos testes *in vitro* para avaliar a citotoxicidade em células de macrófagos RAW264. Os compostos que obtiveram uma taxa de viabilidade maior que 80% foram selecionados para os demais testes como atividade anti-inflamatória, atividade antioxidante para avaliar a capacidade de proteção contra danos oxidativos e pela técnica inibição do radical livre DPPH, e posteriormente atividade leishmanicida por infecção em macrófagos. Em seguida os compostos que tiveram como destaques para serem utilizados como tratamento de leishmaniose tegumentar foram levados para análise *in silico* para avaliar o potencial dos compostos dentro das regras de lipinski e ADMET. Os resultados obtidos apontaram três alcalóides e dois derivados de dibenzoilmetanos como potenciais agentes leishmanicida, cicatrizantes e anti-inflamatório.

Palavras-chave: Cicatrização. Leishmaniose tegumentar. Produtos naturais.

ABSTRACT

BARBOSA, Pedro H. J., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2023. **Evaluation of the biological activity of natural and synthetic products aiming treatment of wounds caused by cutaneous leishmaniasis: *in vitro* and *in silico* study.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisers: Anesia Aparecida Santos, Gaspar Diaz Muñoz and Tiago Antonio de Oliveira Mendes.

Leishmania V braziliensis is the etiologic agent of Cutaneous Leishmaniasis, a disease that affects thousands of people, especially those in social vulnerability. The treatment is based on drugs that have high toxicity and cost, therefore, the search for new chemical compounds is essential for the control and treatment of this disease. For this reason, the search for natural products or synthetic compounds is very important. The present work aims to test the capacity of Indole alkaloids and dibenzoylmethane derivatives, as active principles with healing and leishmanicidal potential. For this purpose, *in vitro* tests were carried out to evaluate the cytotoxicity in RAW 264.7 macrophage cells and to evaluate the proliferation capacity and toxicity of the compounds. Compounds that obtained a viability rate greater than 80% were selected for the other tests such as anti-inflammatory activity, antioxidant activity to evaluate the ability to protect against oxidative damage and DPPH free radical inhibition capacity, and subsequently leishmanicidal activity by infection in macrophages. The results indicated three alkaloids and two derivatives of dibenzoylmethanes as potential leishmanicidal, healing and anti-inflammatory agents.

Keywords: Healing. Cutaneous leishmaniasis. Natural products

SUMÁRIO

Capítulo 1- Avaliação das atividades cicatrizante, anti-inflamatória e leishmanicida: In vitro	11
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana	13
2.2 Transmissão	15
2.3 Aspectos Epidemiológicos	16
2.4 Formas clínicas da doença	16
2.5 Diagnóstico	18
2.6 Tratamentos atuais	19
2.7 Cicatrização de feridas	22
2.7.1 Fase inflamatória	23
2.7.2 Fase proliferativa	23
2.7.3 Fase de maturação	24
2.8 Dibenzolmetano	24
2.9 Alcalóides Indólicos	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Obtenção dos compostos	28
4.2 Análise in vitro de viabilidade celular usando macrófago RAW264. 7 pelo método de MTT	29
4.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória com indução por lipopolissacarídeo (LPS) em linhagem de macrófagos RAW 264. 7 in vitro.	30
4.4 Avaliação in vitro da capacidade de sequestro do radical 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH•)	31
4.5 Avaliação in vitro da viabilidade celular após a indução ao estresse oxidativo por Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	31
4.6 Cultivo dos parasitas	32
4.7 Curva de crescimento dos parasitos	32
4.6 Avaliação in vitro da atividade leishmanicida contra a infecção em células de Macrófagos RAW.264,7.	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Avaliação da atividade in vitro da capacidade proliferativa dos alcalóides indólicos e derivados de Dibenzolmetano em células RAW 264.7.	34
5.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória in vitro com indução por lipopolissacarídeo (LPS) em linhagem de macrófagos RAW 264. 7.	36
5.3 Avaliação in vitro da capacidade de sequestro do radical 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil (DPPH•)	38
5.2 Avaliações in vitro da viabilidade celular após a indução ao estresse oxidativo	

por Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) visando a capacidade citoprotetora dos compostos.	39
5.5 Curvas de crescimento dos parasitos	40
5.6 Avaliação in vitro da atividade leishmanicida contra a infecção de <i>L. braziliensis</i> .	40
5- Conclusão	41
6. REFERÊNCIAS	42
Capítulo 2: Perfil toxicológico por Avaliação in silico	45
1. Introdução	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Avaliação in silico	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1 Alcalóides	46
3.2 Derivados dibenzoilmetanos	48
3.3 Relação estrutura atividade	51
3.3.1 Alcalóides	51
3.3.2 Derivados de dibenzoilmetanos	52
4. CONCLUSÃO GERAL	53
5. REFERÊNCIAS	54

Capítulo 1- Avaliação das atividades cicatrizante, anti-inflamatória e leishmanicida: In vitro

1. INTRODUÇÃO

Leishmaniose é um grupo de doenças consideradas tropicais, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* sp. São consideradas como doenças negligenciadas e que tem afetado principalmente países que estão em desenvolvimento (NEVES, 2016). A Leishmaniose Tegumentar (LT) é ocasionada pelo parasita da espécie *L.(V) brasiliensis*, na qual a doença acaba atingindo a pele e a mucosa. Sendo que possuem características diferentes, podendo ser classificada como Leishmaniose cutânea (LC), tendo lesões ulceradas localizadas e com a presença de várias lesões distribuídas em diversas regiões do corpo (NEVES,2016). Leishmaniose mucocutânea (LCM), que possuem uma característica de manifestação clínicas em mucosa bucal e o trato respiratório, sendo uma forma mais agravada e secundária da LC. Leishmaniose cutânea difusa (LCD), já é a doença associada à resposta imunológica do hospedeiro (NEVES,2016). Mesmo com a grande diversidade de manifestações clínicas e espécies de parasitas, os tratamentos ainda são considerados tóxicos e podem gerar resistência ao parasita. Um dos medicamentos de referência para o tratamento de LT é a Anfotericina B, que apresenta uma alta diminuição da carga parasitária, porém possui uma elevada toxicidade e seu uso é considerado limitado pelo seu alto custo e pela forma de administração que no caso é endovenosa (PAULA et al.,2003). Tendo em vista, os efeitos colaterais e a indução na resistência parasitária, a busca por novos fármacos e novas formas de tratamento alternativo é necessária (BEZERRA- SOUZA,2019).

A utilização de produtos de origem vegetal vem aumentando ao longo da história para o tratamento das mais diversas doenças. As plantas possuem durante seu processo de desenvolvimento e vida, a produção de metabólitos secundários. Compostos que atuam como proteção contra estresse de situações, tais como seca,

salinidade alta, temperatura elevada e baixa. Esses metabólitos secundários, têm sido estudados e isolados para entender sua ação nas células vegetais, mostrando grande potencial antimicrobiano e antioxidante, despertando interesse em isolamento e caracterização para serem utilizados como potencial tratamento para doenças humanas (SÁNCHEZ,2022).

No Brasil, é catalogado mais de 120 mil espécies de plantas descritas e catalogadas, tendo grandes possibilidades de aproveitamento dessa biodiversidade em busca de novos compostos orgânicos(SÁNCHEZ,2022). Dentre os compostos já isolados de plantas, destaca-se os alcalóides, por apresentarem grande complexidade química e variedade de atividades farmacológicas. Outro grupo de compostos naturais que merece destaque devido também às inúmeras atividades farmacológicas são os flavonoides, onde se destaca a classe dos dibenzoilmetanos. No entanto, sua diversidade no meio vegetal é muito rara, sendo a síntese orgânica uma alternativa de acesso a esses compostos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana

O gênero *Leishmania* possui dois subgêneros, e estes se dividem de acordo com o desenvolvimento da sua forma promastigota. Presente no Velho Mundo que atualmente é compreendido como a Europa, temos a presença do gênero *Leishmania* e presente no Novo Mundo, conhecido atualmente como as Américas temos o subgênero *Viannia* (ROSS, 2016)

As espécies que são encontradas no subgênero *Viannia* são denominadas como: *L.(V) braziliensis* e *L.(V) guyanensis*, e são responsáveis pelas lesões cutâneas ou muco cutâneas. No subgênero *Leishmania* as principais espécies correspondem a: *L.(L) mexicana*, *L.(L) amazonensis* e são responsáveis pela manifestação clínica das lesões cutâneas localizadas ou difusas. (ROSS, 2016)

Dentro da classificação sistemática do gênero do parasita, consistem em protozoários unicelulares, flagelados, quando estão em sua fase extracelular e são considerados intracelulares obrigatórios(ROSS, 2016).

Os parasitas são descritos morfologicamente em duas formas (Figura 1), sendo elas: promastigota, que são encontradas nos tubos digestivos dos hospedeiros invertebrados (insetos do gênero flebotomíneos popularmente conhecidos como mosquito palha). Segundo Laurenti (2010), a forma promastigota (Figura 1A), é alongada e possui um flagelo livre, tem a presença de um núcleo ovoide ou esférico, que se localiza na região central da célula, possuem a presença de cinetoplasto que geralmente é ovóide e está localizado na região anterior do núcleo, o seu tamanho pode ser variável. A forma amastigota (Figura 1B), possui um formato oval que pode variar de 2-6 μ m de diâmetro, núcleos esféricos ou ovoides, já o cinetoplasto tem sua morfologia como a forma de um bastão situado bem próximo ao núcleo. Nessa fase evolutiva o parasita não possui flagelo livre, apenas uma invaginação da membrana do parasita que apresenta um rudimento na bolsa flagelar, o tamanho da forma amastigota pode variar dependendo da espécie, podendo chegar a ter ,5-3,0 de largura e 3,0-6,5 μ m de comprimento (ROSS,2016).

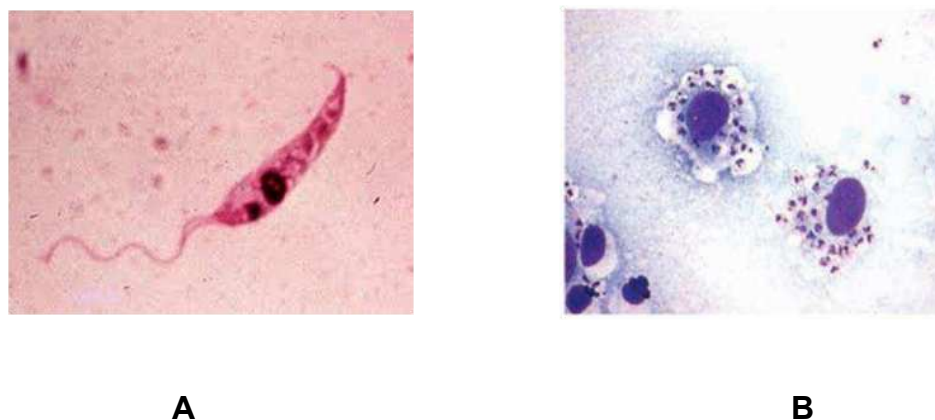


Figura 1. Formas morfológicas de *Leishmania* sp. em A) Forma promastigota extracelular, forma livre e corpo alongado em B) Macrófagos infectados com leishmaniose em sua forma amastigota.

Fonte: LAURENTI,2018.

As infecções por leishmanias que causam a Leishmaniose tegumentar americana (LTA) foram descritas e achadas em diversos animais silvestres, e domésticos, tais como, canídeos, felídeos e equídeos. Essas espécies acabam sendo consideradas reservatórios da LTA, por serem animais que podem garantir a circulação de leishmanias na natureza (BRASIL, 2009). Esses parasitas possuem ciclo de vida heteroxeno, ou seja, durante seu desenvolvimento eles podem estar presentes em mais de um hospedeiro, sendo obrigatório para o seu desenvolvimento. O hospedeiro invertebrado é classificado como vetor biológico, são insetos da classe flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*, conhecidos popularmente como mosquito palha (Figura 2); são insetos pequenos, que podem chegar em seu tamanho aproximadamente 3mm de cor palha ou castanho. Na outra parte do seu ciclo de vida, os cães, roedores e homens são considerados seus hospedeiros definitivos. (NEVES, 2016).



Figura 2. Mosquito palha (*Phlebotomus pappatasi*).

Fonte: domínio público

2.2 Transmissão

A transmissão de LTA (Figura 3) ocorre pela picada da fêmea do mosquito hematófago que está infectado com parasitos do gênero *Leishmania*, que realizam no hospedeiro o repasto sanguíneo. Esses insetos possuem essa característica hematofila então de forma obrigatória, acontece a oviposição, durante a sua alimentação na derme do hospedeiro definitivo a saliva é eliminada, e presentes nessa saliva tem as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania sp* (ROSS,2016).

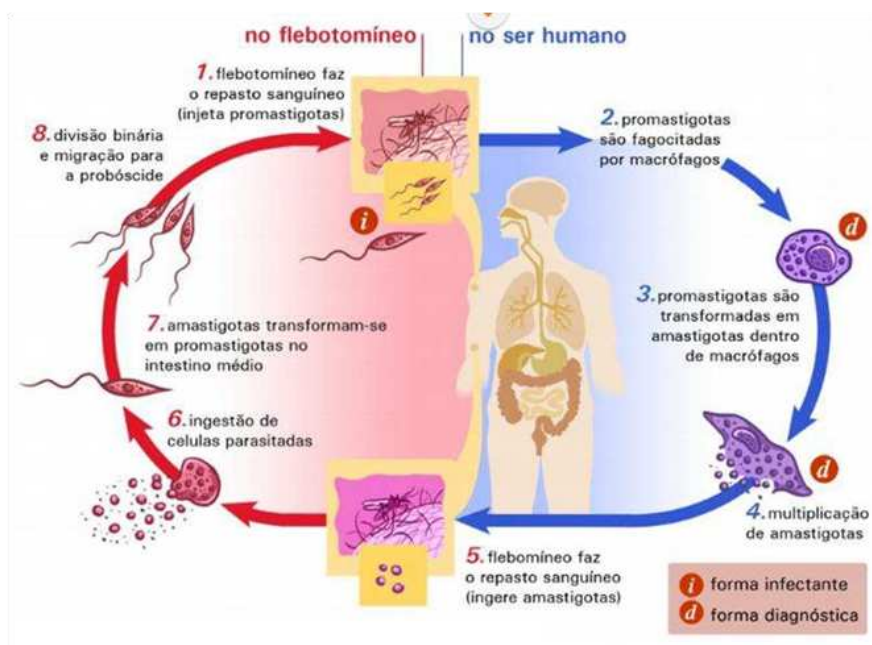


Figura 3. Esquema ilustrativo demonstrando o ciclo de vida do parasita *Leishmania sp.* durante sua diferenciação entre o vetor e o humano.

Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Quando as formas dos parasitas, promastigota entram dentro da derme o sistema imunológico é ativado, tendo a migração das primeiras células frente a imunidade inata: neutrófilos, células dendríticas (DCs), células presentadoras de antígeno (APCs) e macrófagos. Assim que acontece a ativação do sistema inato, os protozoários se deslocam para os linfonodos regionais, já se tem uma resposta imunológica, o período de incubação do protozoário pode variar dentro de duas semanas a vários meses (ROSS,2016).

2.3 Aspectos Epidemiológicos

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é classificada como uma das cinco doenças infecto parasitárias endêmicas de maior relevância para a saúde pública do mundo. É classificada como uma doença negligenciada, ou seja, está presente em países em desenvolvimento e atinge indivíduos que sofrem com vulnerabilidade social. Possui uma grande ampliação global, sendo presente em mais de 80 países distribuídos nos continentes África, Ásia e Américas. Quase 90% dos casos de LTA que ocorrem no continente americano são distribuídos entre Brasil, Bolívia e Peru (Abraão et al 2020). As amplas distribuições de espécies do protozoário e manifestações clínicas graves acabam classificando a doença como um grande problema de saúde pública. (OMS, 2023)

No Brasil, tem se observado, na última década, a expansão das áreas consideradas endêmicas para as leishmanioses, assim como a eclosão de surtos epidemiológicos em regiões antes consideradas livres de doenças. Alguns fatores podem contribuir para essa expansão, sendo a presença de indivíduos que podem visitar áreas endêmicas ou indivíduos portadores que migram para outras regiões, além de surtos endêmicos que estão associados à aceleração do desmatamento para as expansões agrícolas e urbanas, entre outras atividades (OMS, 2023).

2.4 Formas clínicas da doença

Devido à grande variedade dos tipos de lesões que podem manifestar na pele por infecção do protozoário, a LTA é considerada uma doença polimorfa, podendo ser impetiginóide, ectimóide, vegetante, verrucóide, tuberoso, nodular, lipoide dentre outros. A úlcera leishmaniótica é a manifestação cutânea mais comum da doença, tendo como característica, contornos circulares, bordas salientes e infiltradas, fundo com granulação grosseira, avermelhada e com discreto exsudado. A forma clínica cutânea é conhecida de forma popular como ferida brava ou úlcera de Bauru, tendo a presença de lesões cutâneas e pode ser classificada de acordo com o tipo e distribuição da ferida, sendo forma cutânea(LC), forma cutânea difusa (LCD) e forma cutâneo mucosa (LCM) (MS, 2007).

A forma clínica cutânea (Figura 4) é conhecida popularmente como ferida brava ou úlcera de Bauru, e sua manifestação clínica se dá pela presença de lesões cutâneas de vários tipos, começando como uma úlcera crônica que pode aumentar e afetar linfonodos e causar metástases. Após o período de incubação, onde será o tempo decorrido entre a picada do inseto e o aparecimento da lesão inicial que pode ser de duas semanas até dois meses, é notável a ferida cutânea. Ela geralmente pode ser única, pequena e pode ulcerar depois de alguns meses, elas podem medir vários centímetros, suas características são típicas, elas possuem bordas irregulares, inodoras, e com fundo granuloso, deixando cicatrizes depois da fase crônica da doença, que pode durar anos. As espécies que ocasionam esse tipo de infecção são; *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. lainsoni* (MS, 2007).



A

B

C

Figura 4. Manifestação clínica de Leishmania: sendo que em A: Caso de LTA por *L. braziliensis*, lesão ulcerada única em forma de cratera com bordas elevadas. B: Caso de LCM por *L. braziliensis*, lesão extensa causando destruição nasal incluindo o septo. C: Caso de LCD por *L. amazonensis*, lesão nodulares distribuídas por todo o rosto.

A forma clínica cutaneomucosa (Figura 4 **B**), também conhecida popularmente como nariz de anta, é ocasionada pela, *L. braziliensis*. Tem lesões tardias que costumam aparecer meses ou anos tendo como preferência as partes de tabique articular ou nasal, que vai se estendendo para as para os tecidos moles, com inflamação e ulceração. (NEVES, 2016). Na forma cutânea difusa (Figura 4 **C**), podemos notar algumas lesões confinadas na derme, formando nódulos que não estão ulcerados e espalhados por todo o corpo, quando infectados por essa espécie de *leishmania*, não se tem cura espontânea, é de difícil tratamento (Ministério da Saúde, 2007).

2.5 Diagnóstico

O perfil de diagnóstico do LTA pode funcionar em conjunto com propriedades epidemiológicas, clínicas e análises em laboratórios, tais como, pesquisa parasitológica e diagnóstico imunológico. Na figura 5, GONTIJO & CARVALHO (2003) mostram alguns critérios que devem ser levados em consideração para diagnóstico da doença: (1) observação da manifestação clínica, observando características da ferida, como ulcerações com bordas elevadas, indomadas e um fundo com tecido de granulação grosseira, associadas à procedência de uma área endêmica. (2) deve ser realizados exames parasitológicos, que tem o objetivo da busca direta do parasita, onde deve ser realizado uma aspiração, escarificação ou biópsia da borda, após a obtenção do material na ferida, deve ser corado pelo método de Giemsa ou Leishman, este procedimento é feito como a primeira opção do diagnóstico, pois ele é considerado de fácil execução e tem um baixo custo. (3) Imunodiagnóstico, onde é usado a técnica de intradermoreação de Montenegro (IDRM), que consiste em uma análise da resposta tardia de hipersensibilidade celular, sendo este o teste complementar para o diagnóstico de LTA, principalmente pela forma mucocutânea e (4) sendo classificado como diagnóstico molecular, usado como a reação em cadeia polimerase (PCR). (GONTIJO & CARVALHO, 2003; GONTIJO & MELO, 2004; LIMA et al., 2007).

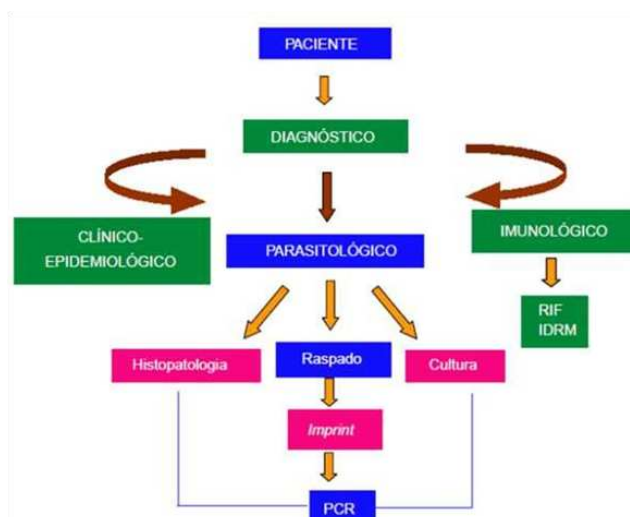


Figura 5. Métodos de diagnósticos de LTA.

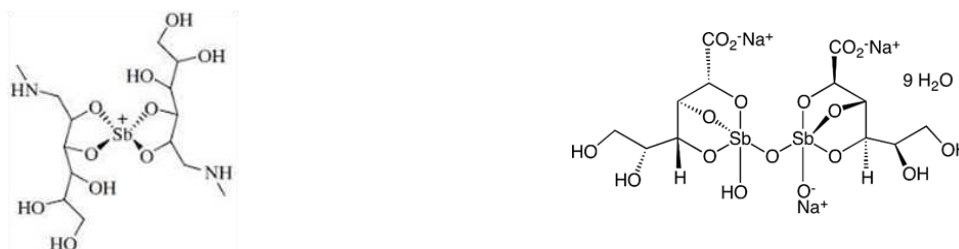
Fonte: (GONTIJO; CARVALHO,2003)

Mesmo tendo a presença de ferramentas moleculares, a melhor forma de diagnóstico de LTA é a confirmação por testes parasitológicos, pois o padrão histopatológico da doença pode auxiliar o profissional a estabelecer o diagnóstico final da doença.

2.6 Tratamentos atuais

O tratamento atual da LTA, tem como objetivo o alívio dos sintomas, adesão ao tratamento, inibir o desconforto causado pela doença, minimização da ocorrência de efeitos adversos (BRASIL, 2018). Mesmo assim, os medicamentos utilizados para o tratamento atual mostram insatisfação em termos de eficácia, custo, facilidade de administração e segurança (HENDRICKY, et al., 2019). Na terapia atual contra a infecção, podemos encontrar medicamentos com aplicação por via oral, intravenosa e intramuscular, sendo eles: antimoniais, anfotericina B, miltefosina, paromomicina e pentamidina, todos apresentando pontos negativos em relação ao tratamento da doença (BRASIL, 2018).

Os medicamentos antimoniais, são os mais antigos para o tratamento de LTA, porém sua forma de aplicação é dolorosa e restrita, sabendo que é aplicada somente por via intramuscular, gerando uma dor local, devido os graves problemas adversos, logo foi substituído por pentavalentes, o mesmo é considerado como um pré fármaco quando aplicado ele é convertido em forma ativa trivalente, isso acontece por conta da redução do pH baixo nos fagócitos dos hospedeiros, essa ação acaba gerando uma toxicidade tanto contra o hospedeiro quanto o parasita. (SINGH et al, 2012). Atualmente somente os medicamentos antimoniais estão presentes no mercado, o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®) (Figura 6).



Antimoniato de meglumina (Glucantime®) Estibogluconato de sódio (Pentostan®)
Figura 6. Estrutura química dos principais medicamentos antimoniais utilizados para o tratamento de LTA.

Fonte: domínio público

Os medicamentos trivalentes obtidos induzem um apoptose nos parasitas usando a redução da enzima tripanotona redutase (TR), esta enzima é exclusiva dos parasitas que estão presentes na família *Trypanosomatidae*. (ROSS,2016). O uso desses medicamentos pode gerar dores abdominais, vômitos, diarreia, náusea, dor de cabeça, fadiga, febre, tosse, erupção cutânea, pancreatite, pneumonia, insuficiência hepática, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade, fora a internação hospitalar para a aplicação intramuscular e intravenosa (ROSS,2016).

O medicamento anfotericina B (Figura 7), é um metabólico secundário presente em fungos que acabam não apresentando boas propriedades físico-químicas relevante, outra característica é sua baixa solubilidade em água, sendo assim esse medicamento apresenta uma baixa permeabilidade das membranas, elevando o peso molecular, por isso acaba tendo uma baixa absorção e baixa disponibilidade oral, sendo obrigatória a administração por via intravenosa, o que acaba obrigando a internação do paciente, limitando o uso do medicamento em países que estão em desenvolvimento(ROSS,2016).

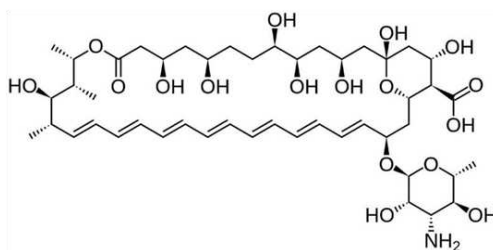


Figura 7. Estrutura Química do medicamento Anfotericina B

Fonte: domínio público

Durante o tratamento, podem-se observar leves reações como nefrotoxicidade transitória e trombocitopenia, além disso, a formulação desse medicamento é o alto custo que impossibilita seu uso por populações de baixa renda, que ironicamente são os mais afetados por esse grupo de doenças.

O medicamento miltefosina (Figura 8) é um análogo alquilfosfocolina, originalmente desenvolvido como agente antitumoral, apresentando como mecanismo de ação a interrupção da via de sinalização do fosfoinositol 3-quinase- Akt/PKB para inibir o crescimento metastático das células (ROSS,2016). Em relação a sua atividade

antiparasitária, nenhum modo de ação foi comprovado, porém a diversas hipóteses, como a indução de apoptose, distribuídos de vias de sinalização celular dependentes de lipídios, alteração da composição da membrana e efeitos imunomoduladores (DORLO et al., 2012). É o único medicamento que possui administração por via oral, porém pode apresentar distúrbios gastrointestinais e toxicidade renal, obrigando o paciente a interromper o tratamento, gerando uma resistência ao parasito.

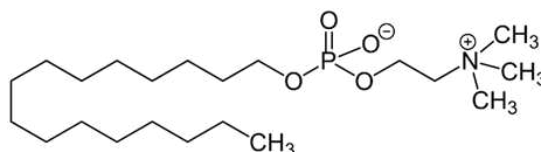


Figura 8. Estrutura Química do medicamento Miltefosina.

Fonte: domínio público

A paromomicina (Figura 9) é um antibiótico aminoglicosídeo, e tem uma necessidade de administração parenteral, por isso se tem uma dificuldade de aplicar esse tratamento em países pobres e em desenvolvimentos, além disso possuem uma baixa absorção no organismo. (BASTOS et al., 2016).

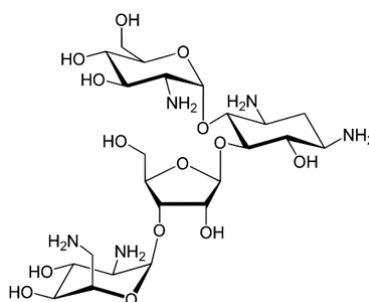


Figura 9. Estrutura Química do medicamento Paromomicina.

Fonte: domínio público

Estudos demonstram que o mecanismo de ação desse medicamento é através da inibição da síntese de proteínas do protozoário ligando a subunidade ribossômica 30S, resultando no acúmulo de complexos ribossômicos anormais e finalmente causando a morte celular. A paromomicina apresenta como efeitos adversos mais comuns a nefrotoxicidade, ou ototoxicidade e a hepatotoxicidade (HENDRICKX, et al., 2019).

Os compostos que são utilizados para o tratamento da doença tem a finalidade de diminuição de sua carga parasitária e alívio dos seus principais sintomas. Nos tratamentos atuais, não são descritos a capacidade de aceleração do processo de cicatrização de feridas, acontecendo de forma espontânea, tendo uma grande variação de tempo do fechamento, chegando a ser notável até o período de 60 dias para que ocorra o fechamento completo da ferida (ROSS,2016). Levando em consideração que durante o tratamento, a exposição da ferida, pode ser um grande problema tendo o aproveitamento de bactérias oportunistas gerando uma nova infecção e inflamação da ferida (ROSS,2016).

2.7 Cicatrização de feridas

A pele é considerada como o maior órgão do corpo humano, com a função de revestir além de possuir outras funções importantes como proteção, excreção de substâncias, termorregulação e percepções sensoriais. A pele, como um importante órgão, pode sofrer lesões, gerando assim o processo de cicatrização, independente do agente que a causou. O processo cicatricial, pode ser considerado um sistema dinâmico com a presença de cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que irão trabalhar de forma conjunta para realizar o reparo tecidual. (EBERHARDT et al., 2015).

Os mecanismos de cicatrização foram descritos por Carrel em 1910, como uma sequência ordenada de eventos divididos em cinco elementos, sendo eles: Inflamação, proliferação celular, formação do tecido de granulação, contração e remodelamento da ferida. Esse processo pode ser classificado de forma didática em três fases, fase inflamatória, fase de proliferação ou granulação e fase de remodelamento ou de maturação da ferida (Figura 10) (EBERHARDT et al., 2015).

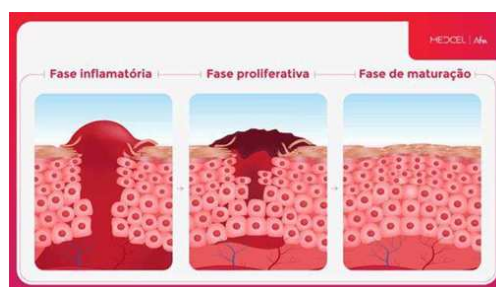


Figura 10. Etapas do processo de cicatrização de feridas. Processo dividido de forma didática em três etapas para a formação do novo tecido

2.7.1 Fase inflamatória

O primeiro passo para o processo de cicatrização, inicia-se após a lesão, sendo a fase inflamatória, liberando substâncias vasoconstritoras, como a tromboxana A2 e prostaglandinas, pelas membranas celulares. Assim que o endotélio é lesionado é iniciada uma cascata de coagulação, tendo presente as plaquetas que tem um papel importante para o processo de cicatrização (WU, et al., 2014). Buscando a hemostasia, a cascata é iniciada com grânulos que serão liberados das plaquetas, nas quais estarão presentes fatores de crescimento beta (TGF- β), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de fibroblasto (FGF), esses fatores irão atrair os neutrófilos para a área que foi lesionada. O coágulo presente na área da ferida é formado por colágeno, plaquetas e trombina que terão função de reservatórios proteicos para síntese de citosinas e fatores de crescimento. (WU, et al., 2014) Sendo assim, a fase inflamatória tem como propriedade a formação da vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular, trazendo a migração de neutrófilos para a ferida. Os neutrófilos irão para o local da ferida, fixando-se no endotélio com as ligações de selectinas, que são receptores presentes na membrana plasmática. Após a fixação eles acabam produzindo radicais livres que serão utilizados para a eliminação de bactérias, destruindo a membrana plasmática delas. Logo em seguida os neutrófilos são substituídos por macrófagos, que terão função de secretar citocinas e fatores de crescimento, além de poderem contribuir para o processo de angiogênese, fibroplasia e síntese da matriz extracelular que serão fundamentais para a fase proliferativa. (WU, et al., 2014).

2.7.2 Fase proliferativa

Essa fase é subdividida em quatro etapas fundamentais para o reparo do tecido lesionado: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno (WU, et al., 2014). No processo de epitelização inicial, se a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais que estiverem localizados logo abaixo, irão migrar em direção superior, e as camadas normais da epiderme serão restauradas em três dias; porém se a membrana basal for lesionada, as células presentes nas bordas irão se multiplicar formando então uma barreira protetora (WU, et al., 2014).

O processo de angiogênese é estimulado pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Durante esse processo tem-se a migração de células endoepiteliais que ajudaram no processo de formação de novos vasos sanguíneos e capilares, que serão de extrema importância para nutrir os novos tecidos, assim gerando uma cicatrização adequada (WU, et al., 2014).

A última etapa da fase proliferativa é a formação do tecido de granulação. Nessa etapa vamos ter a presença de fibroblastos e células endoepiteliais. Os fibroblastos irão migrar para o local da ferida e serão ativados por PDGF. Logo em seguida terão a produção de colágeno do tipo I e serão transformados em miofibroblastos, ajudando na contração da ferida.

2.7.3 Fase de maturação

A organização do colágeno nesta fase, é a mais importante durante essa etapa. O colágeno produzido inicialmente é mais fino do que o colágeno presente na pele, com o passar do tempo esse colágeno é substituído e reabsorvido e organizado ao longo das linhas de tensão. Os fibroblastos e leucócitos são importantes para secretar as enzimas colagenases que irão destruir a matriz antiga, fazendo com que as células de fibroblastos produzam sua nova matriz e aconteça a restauração do tecido lesionado. (WU, et al., 2014).

2.8 Dibenzoilmetano

O dibenzoilmetano (DBM), são compostos químicos que pertencem a classe dos flavonoides (Figura 11), são considerados raros na natureza e encontrados principalmente na família Fabaceae subfamília *papilionoidea* e foram isolados pela primeira vez na espécie *Lonchocarpus latifolius*. O DBM, possui fortes atividades fotoprotetoras e anticâncer em células humanas (NOGUEIRA et. al., 2003), sendo considerados compostos químicos com grande potencial de fontes de medicamentos cosméticos.

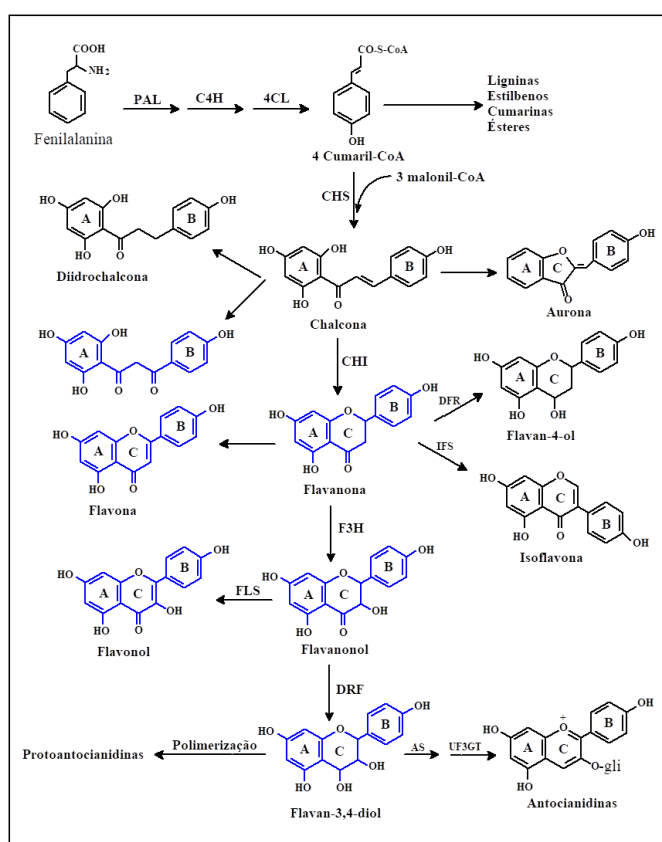
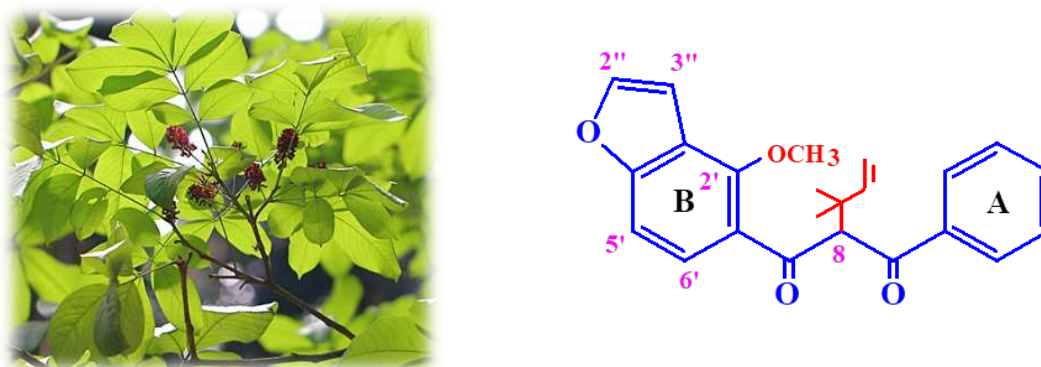


Figura 11. Estrutura química de derivado de dibenzoilmetano e sua classificação como flavonóide

Fonte: o autor

2.9 Alcalóides Indólicos

Alcalóides indólicos, são os compostos nitrogenados tendo um núcleo indólico presente em sua estrutura, tem despertado grande atenção devido a enorme variedade de atividade biológica desde os anos 50 e 60. Estes alcalóides são

encontrados principalmente na família Apocynaceae no gênero *Tabernaemontana*, grupo de plantas conhecidas popularmente por jasmim-catavento jasmim-café, leiteiro de folha fina (Figura 12), plantas nativas da América do Sul, (VAN BEEK,1984).



Figura 12. Jasmim-café

Fonte: <https://www.jardineiro.net/plantas/jasmim-cafe-tabernaemontana-divaricata.html>

Os alcalóides indólicos (Figura 13), são compostos químicos que podem ser considerados de difícil síntese em laboratório, na sua composição estrutural está presente um núcleo, com um anel indólico, pouco polar e que podem ser monômeros, dímeros e trímeros (NEUSS,1970).

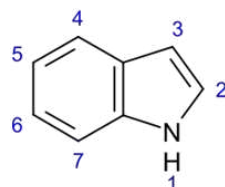


Figura 13. Estrutura química genérica dos alcalóides indólicos

Fonte: domínio publico

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliação de alcalóides indólicos e derivados de dibenzoilmetanos como potencial agentes cicatrizantes e leishmanicidas para tratamento da doença Leishmaniose Tegumentar.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade *in vitro* de células de macrófagos tratados com DBM e alcaloides indólicos;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* dos compostos estimulados por LPS na capacidade de redução dos óxido nítrico em células de macrófagos RAW 264.7;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* dos compostos por meio do teste do radical DPPH.
- Avaliar o potencial de citoproteção dos compostos após indução de estresse oxidativo em células de macrófagos RAW 264.7;
- Avaliar a capacidade dos derivados de DBM e dos alcalóides Indólicos de reduzir a infecção causada por *L. Brazilienses* em células de macrófagos RAW.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos compostos

Os alcalóides indólicos foram cedidos pelo Professor, Gaspar Diaz Muñoz do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), os derivados de dibenzoilmetanos foram sintetizados no Laboratório BioNat da UFV. Para cada composto foi preparado uma solução estoque de 100 mg/mL diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,1%. Os compostos foram identificados e armazenados em temperatura de 4°C para serem utilizados ao decorrer do trabalho. Na tabela 1, podemos ver a descrição da identificação dos compostos utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Tabela 1. Compostos utilizados

Código compostos	Classificação química	Identificação
5-HI-2-AC	Alcaloide	C1
5-HI-3-AC	Alcaloide	C2
2-IAC	Alcaloide	C3
3-IAC	Alcaloide	C4
3-IAP	Alcaloide	C5
3-IAB	Alcaloide	C6
3-IAC	Alcaloide	C7
5-IAC	Alcaloide	C8
TRY-HCl	Alcaloide	C9
TRY	Alcaloide	C10
HAR	Alcaloide	C11
DBM	Dibelzoilmetano	C12
DPBP	Dibelzoilmetano	C13
DPAP	Dibelzoilmetano	C14
ABB	Dibelzoilmetano	C15
DBM6-OH	Dibelzoilmetano	C16

4.2 Análise *in vitro* de viabilidade celular usando macrófago RAW264.7 pelo método de MTT

Os compostos químicos utilizados foram testados quanto seus efeitos não citotóxico sobre a linhagem de células RAW264,7. Neste trabalho, foi utilizado o ensaio colorimétrico do MTT, conforme proposto por Takeuchi, Baba e Shigeta (1991), com algumas modificações segundo Siewerdt et al. (1995).

Os macrófagos foram plaqueados na densidade de 1×10^5 células em 200 μ l por poço em placas de 96 poços, utilizando como meio de cultura para o crescimento das células o meio RPMI com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e incubadas na estufa em 37°C e 5% de CO₂ por um tempo de 24h. Após o período de incubação foi retirado 50 μ L do sobrenadante da placa e os compostos químicos diluídos em meio RPMI foram adicionados na placa. Foi realizada uma diluição seriada de 1:2 com a concentração inicial de 400 μ g/mL, conseqüentemente tendo testados as concentrações de 400 μ g/mL, 200 μ g/mL, 100 μ g/mL, 50 μ g/mL, 25 μ g/mL, 12,5 μ g/mL, logo após as placas foram levadas para a estufa em 37°C e 5% de CO₂ e incubadas por 48h. Foram realizados dois controles, o primeiro controle contendo células e meio RPMI e o segundo controle com meio RPMI + Células e DMSO na concentração de 1%, para certificar que a diluição dos compostos com o DMSO não fosse tóxico para as células. Após o tempo de tratamento das células, foram retirados 50 μ L do sobrenadante de cada poço e adicionado 50 μ L de solução brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) na concentração de 0,05mg/mL. Após a aplicação do MTT, foi levado para a incubação na estufa, deixando em tratamento por 3h. Após o tempo de incubação foi observado a formação dos cristais de formazan é adicionado o DMSO para a homogeneização dos cristais e a finalização da reação. A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 570nm. Para aqueles compostos que foram tóxicos para as células foram excluídos dos experimentos, dando continuidade somente os compostos que apresentaram uma viabilidade acima de 80%. Este experimento foi realizado em triplicata e com três repetições biológicas.

4.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória com indução por lipopolissacarídeo (LPS) em linhagem de macrófagos RAW 264. 7 *in vitro*.

Os compostos, foram testados quanta a sua capacidade de redução da produção de Óxido Nítrico (NO) induzidos pelo efeito da inflamação por lipopolissacarídeo (LPS). Os macrófagos foram plaqueados na densidade de 1×10^5 células em 200 μ L por poço em placas de 96 poços, utilizando como meio de cultura para o crescimento das células o meio DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e incubadas na estufa em 37°C e 5% de CO₂ por um tempo de 24h. No segundo dia foi preparada uma solução contendo 400 μ L de LPS na concentração de 218mM e 19,600mL de meio DMEM e a partir dessa solução os compostos foram solubilizados nas concentrações de 400 μ g/mL e 100 μ g/mL, sendo escolhidas essas concentrações, pois foram elas que apresentaram melhores resultados no teste de viabilidade celular. Após o preparo das diluições dos compostos nas concentrações desejadas o sobrenadante das placas contendo meio DMEM e células foram retirados e descartados. Após o descarte, foi inoculado 100 μ L das diluições dos compostos em cada poço. Os controles utilizados para esse teste foram Controle 1: Células+ Meio (Branco), Controle 2: Células+ Meio com LPS (Positivo), Controle 3: Dexametazona em 100 μ g/mL. Após a inoculação dos compostos a placa foi levada para a estufa em 37°C e 5% CO₂ e armazenada por 24h. Após o tempo de incubação, foi retirado o 50 μ L do sobrenadante da placa para realizar a dosagem do NO. O sobrenadante foi coletado e inoculado em uma nova microplaca. Para a dosagem do NO, foi realizado o preparo de uma solução reveladora, sendo esta solução a mistura de Sulfanilamida a 1% (C₆H₈N₂O₂S) e Nafitil etileno amida dihydrochoride 0,1% na proporção 1:1 e inoculados 100 μ L em cada poço, deixando agir por 15 minutos no escuro. Para as análises dos efeitos de redução de NO dos compostos, foi realizado uma curva padrão de concentração inicial de 0,15mM. Em uma nova microplaca, foi adicionado uma solução tampão em todos os poços que estavam destinados a receber a curva padrão. Em seguida foi preparada uma solução mãe contendo a concentração de 15mM de NO diluído em água destilada, a partir desta solução mãe foi realizado a retirada de quantidade específicas para os 7 pontos da curva padrão. Após o tempo de incubação, as placas foram levadas ao espectrofotômetro e realizada a leitura em 540nm.

4.4 Avaliação *in vitro* da capacidade de sequestro do radical 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH•)

Para esse teste, foi avaliada a capacidade antioxidante dos compostos ao manter contato direto com o radical livre estável DPPH, descrito por Wilians eat (1995) com modificações. Esse sequestro acontece por meio de transferência de elétrons ou por transferência de um átomo de hidrogênio. Primeiramente foi feito o preparo da solução dos compostos nas concentrações de 400µg/mL e 100µg/mL. Os compostos foram previamente diluídos em metanol. Após o preparo dos compostos, foram adicionados 50µL da diluição em triplicata e 50µL de Metanol para ser utilizado com um controle branco das análises. Logo em seguida foi preparada a solução de DPPH na concentração de 0,2mM/L e aplicado 250µL em cada poço sendo incubado por 30 min à temperatura ambiente no escuro. Após o tempo de incubação a placa foi levada ao espectrofotômetro e foi realizada a leitura em 517 nm.

4.5 Avaliação *in vitro* da viabilidade celular após a indução ao estresse oxidativo por Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

Neste teste avaliamos a capacidade dos compostos no seu efeito protetor para as células. Macrófagos foram plaqueados na concentração de 1x10⁵ por células/poço em uma placa de 96 poços, contendo meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e levados para a estufa por 24h em 37°C e 5% de CO₂. Após o período de incubação da placa contendo as células os compostos foram diluídos nas concentrações de 400µg/mL e 100µg/mL em meio DMEM e aplicados 200µL de cada diluição em triplicata e foram levados para a estufa em 37°C e 5% de CO₂ por 24h. Após este período, as células tratadas foram expostas a uma concentração de 2mM de H₂O₂ por duas horas, após o período do estresse foi realizado a avaliação de viabilidade celular através do teste de MTT descrito conforme no item 3.1.

4.6 Cultivo dos parasitas

As formas promastigotas de *L. braziliensis* de cepa M2904 foram mantidas em meio de cultura Medium 199 (MEIO 199), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 1% de adenina 1mM, 1% de penicilina G 100U/mL e hemina a 0,25% com pH 7,0 e incubados em BOD a 26°C. Os parasitas foram doados pelo professor Raphael Vasconcelos, do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Protocolos foram adaptados para manutenção e expansão de parasitas, avaliando sua adaptação *in vitro* e *in vivo*, e sua infectividade. Além disso, foram congelados estoques de *L. braziliensis* para futuros estudos e análises.

4.7 Curva de crescimento dos parasitos

Três garrafas de cultura celular foram preparadas, contendo cepa de M2904 da espécie de *L. braziliensis* em 10 mL no meio 199 descrito no item 3-6, com a quantidade inicial de 1×10^5 /mL de parasitas na sua forma promastigota. Foram feitas duas contagens diretas em câmara de Neubauer durante 15 dias. O valor diário da quantidade de parasitas foi calculado pela média aritmética. Após o período de contagem, a curva de crescimento parasitário foi construída utilizando o software *GraphPad Prism 5*. Para este ensaio foi usado 2 repetições biológicas.

4.6 Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida contra a infecção em células de Macrófagos RAW.264,7.

Neste ensaio, avaliamos a capacidade dos compostos de inibição de crescimento do parasita contra a infecção em macrófagos. No primeiro dia do ensaio foi realizado o plaqueamento dos macrófagos em placas de 96 poços. Foram inoculados 1×10^5 de células por poço, em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e levados para a estufa em 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por um período de 4 horas, para que os macrófagos conseguissem aderir no fundo da placa. Foi utilizado 3 garrafas de cultura, contendo formas promastigotas do parasita no seu 7º dia após a replicação, sendo necessário o parasita está na fase estacionária para que ocorra a infecção do parasita nos macrófagos. O conteúdo da garrafa foi vertido em um tubo falcon estéril e levado para a centrífuga, onde foi centrifugado por 11 minutos em 3500 RPM, após a centrifugação foi descartado o

sobrenadante e adicionado 5mL de meio RPMI. Foi realizada a contagem dos parasitas através da câmara de Neubauer inoculando 1×10^5 de parasitas por poço. Logo após a contagem dos parasitas, o sobrenadante das placas contendo macrófagos aderidos foi descartado e foi adicionado 200 μ L de parasita por poço para que ocorresse a infecção. Logo após a inoculação do meio novo contendo os parasitas, a placa foi levada para a estufa por um período de 24h a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂

No segundo dia de experimento foi realizada a lavagem dos poços, essa etapa é necessária para tirar o meio já metabolizado e retirar os parasitas que não infectam as células. Foi coletado 200 μ L do sobrenadante e foi descartado, logo em seguida foi adicionado 200 μ L de PBS em 1x e lavado cada poço 3 vezes. Após o processo de lavagem dos poços por PBS, foi adicionado novamente 200 μ L por poço de meio RPMI e incubados na estufa pelo período de 24h.

No terceiro dia, foi realizada previamente a diluição dos compostos em meio RPMI nas concentrações de 400 μ g e 100 μ g e a preparação dos controles que serão utilizados para este ensaio. Após o preparo dos compostos nas concentrações desejadas, foi retirado 200 μ L do sobrenadante de cada poço e adicionado 200 μ L das diluições dos compostos nas concentrações desejadas. Para este ensaio foi utilizado como controle: 1° Meio RPMI sem SFB, 2° Meio RPMI completo com macrófagos, 3° Meio RPMI completo com macrófagos mais Anfotericina B, 4° Meio RPMI completo com macrófagos mais parasita, 5° Meio RPMI completo com macrófagos mais parasita e DMSO e o último controle, tendo meio RPMI completo mais macrófagos e parasitas. Após a inoculação dos compostos, a placa foi levada à estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e deixada por 48h em tratamento.

Após o período de tratamento o sobrenadante foi retirado e os poços foram lavados com PBS 1x. Logo em seguida foi adicionado 50 μ L de meio RPMI incompleto com SDS (Docetil Sulfato de Sódio) a 0,05% para que ocorresse a lise das células de macrófagos. Após a adição de SDS a placa foi levada para o microscópio para a observação. A placa contendo meio RPMI+SDS permaneceu em repouso por 25 minutos para interromper a lise completa das células. Posteriormente adicionou-se 200 μ L de meio 199 para que ocorra a parada da lise.

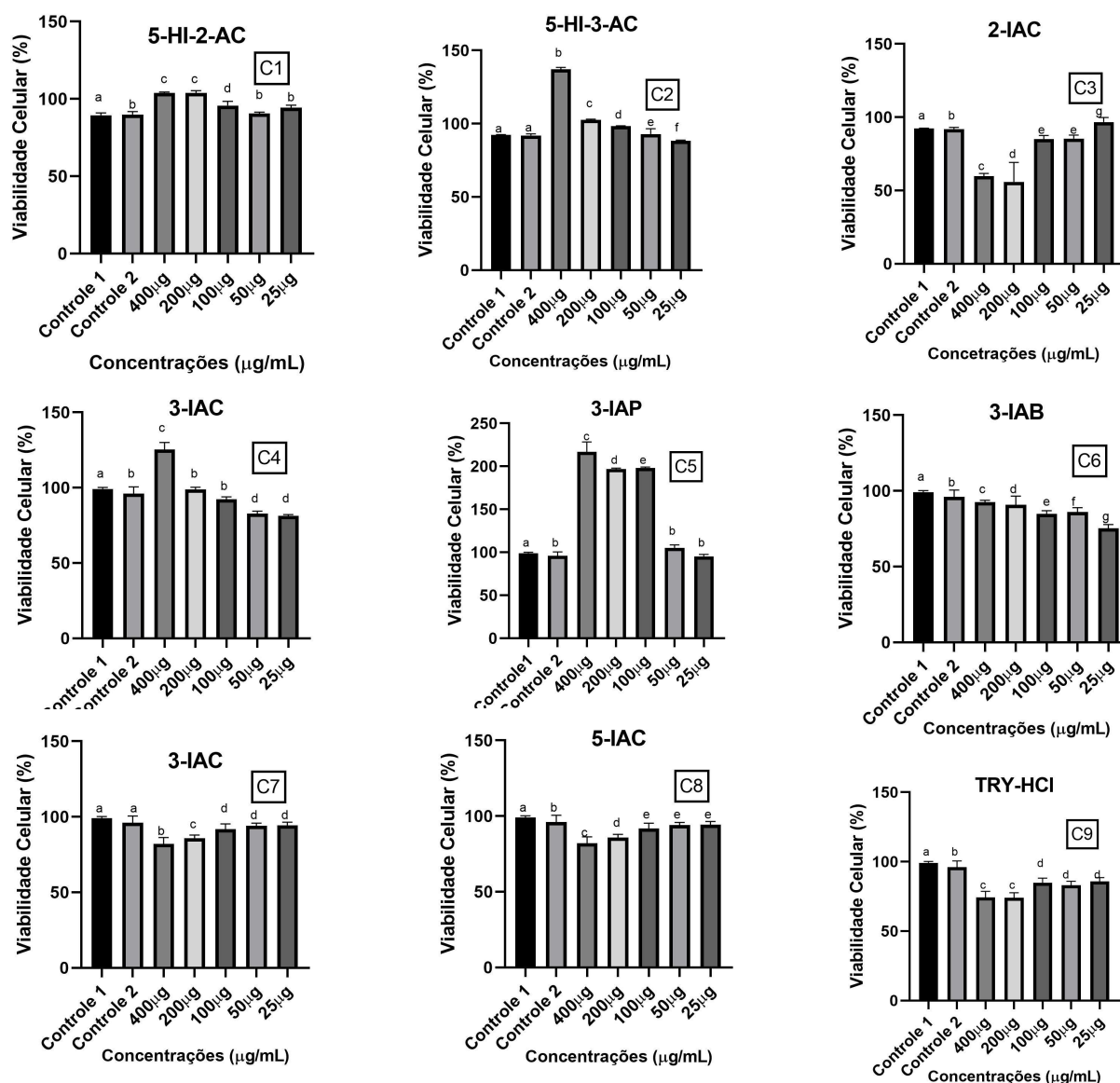
Logo após a aplicação do meio 199, a placa foi levada para a estufa BOD a 26°C e 5% de CO₂ e mantida por 5 dias, para que os parasitas que não foram inibidos pelo composto pudessem se recuperar. Após o tempo de incubação a placa foi levada

para o espectrofotômetro para a leitura por inflorescência a 540 nm. Para avaliar a % de parasitas viáveis foram realizados os mesmos cálculos descritos no item 3.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da atividade *in vitro* da capacidade proliferativa dos alcalóides indólicos e derivados de Dibenzoilmetano em células RAW 264.7.

Os resultados obtidos para a viabilidade celular em diferentes concentrações de alcalóides indólicos e DBM são apresentados na figura 14.



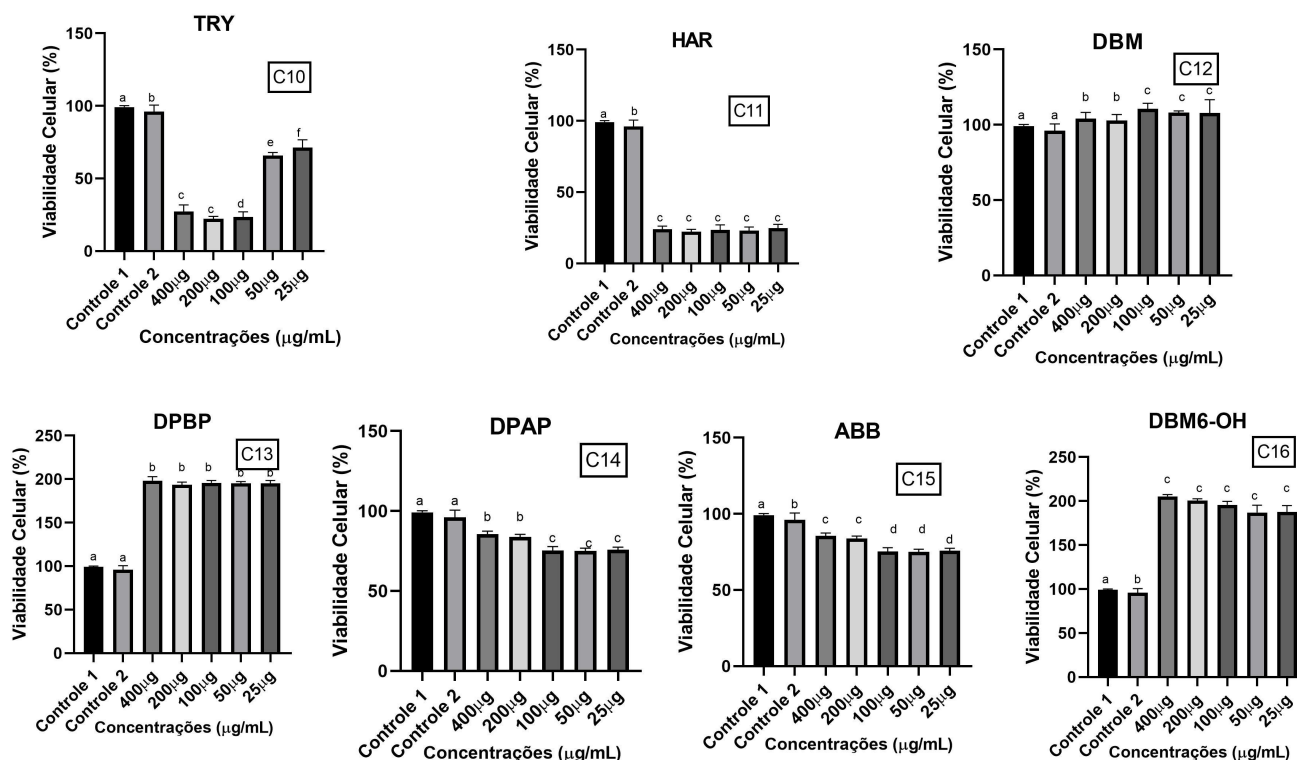


Figura 14. Avaliação da viabilidade celular sob células de macrófagos dos alcalóides indólicos e derivados de Dibenzoilmetanos testados em cinco concentrações diferentes. Os resultados foram calculados em média de seis experimentos em triplicata e estão sendo apresentados em percentual de viabilidade celular. O controle 1 (Células+Meio); controle 2 (Células Meio+ DMSO em 0,01%). Letras diferentes representam diferença estatística.

Os compostos C2, C5, C13 e C16, apresentaram capacidade proliferativa, sendo que o composto C5 nas concentrações de 400, 200 e 100µg/mL apresentou uma média de 200% de células viáveis após as 48h de tratamento, já nas suas menores concentrações de 50 e 25µg/mL não apresentaram atividade proliferativa, porém os compostos não apresentam atividade citotóxicas nas concentrações testadas. Já o composto C2 apresentou taxa de proliferação apenas na sua maior concentração de 400µg/mL, tendo, as demais concentrações não demonstram atividade proliferativa, nas outras concentrações o composto não demonstrou toxicidade para as células. O composto C3, apresentou em sua concentração de 400µg/mL atividade proliferativa. Os derivados de DBM(C12), DPBP(C13) e DBM6-OH(C16) demonstraram uma alta taxa proliferativa a partir de sua menor concentração em 25µg/mL, tendo como média o percentual de 200% de células

viáveis no meio que foi utilizado o MTT, sendo estes os melhores do estudo. Já o composto C9 apresentou em sua maior concentração uma viabilidade de 75% de células viáveis dentro do meio, mostrando uma toxicidade para a célula. Nas suas demais concentrações o composto não foi tóxico, mostrando que a medida que aumenta a concentração do composto, a capacidade de viabilidade e proliferação das células podem diminuir. Os compostos C10 e C11 foram os mais tóxicos nos estudos, visto que em sua maior concentração ambos tiveram um percentual de 25% de células viáveis e se mantiveram dentro desta média nas demais concentrações. Os demais compostos não apresentaram atividade proliferativa e citotóxica para as células.

No presente estudo, podemos observar que os compostos analisados possuem baixa toxicidade e elevada ação proliferativa em macrófagos. AZONSIVO (2023), demonstrou que os alcalóides presentes no extrato etanólico de casca do caule de *Z. rhoifolium* apresentaram uma baixa atividade citotóxica. Em células de macrófagos peritoneais murinos. O mesmo foi observado por GUANGZHOU (2022) em alcalóides indólicos isolados do caule de *Nauclea officinalis*. Os derivados de dibenzoilmetano também apresentaram baixa citotoxicidade em estudos realizados com células VERO nas concentrações de 400µg, 100µg e 50µg/mL.

Como as concentrações de 400 e 100µg/mL demonstraram uma atividade proliferativa e capacidade de não ser tóxico para as células, os demais experimentos foram realizados nessas concentrações. Os compostos que apresentaram uma taxa de viabilidade/Proliferação celular >75% de células viáveis foram considerados viáveis para os próximos experimentos. Assim sendo, os compostos C10 e C11 foram excluídos dos outros testes devido à sua toxicidade.

5.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* com indução por lipopolissacarídeo (LPS) em linhagem de macrófagos RAW 264. 7.

Os resultados dos compostos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C12, C13, C14, C15 e C16 foram avaliados quanto a sua capacidade de redução de óxido nítrico (ON), induzido por LPS em células de macrófagos nas concentrações de 400µg/mL e 100µg/mL que são apresentados na figura 15. Os resultados foram avaliados em triplicata e calculados nas concentrações de óxido nítrico a partir da curva padrão de óxido nítrico, realizada após o experimento.

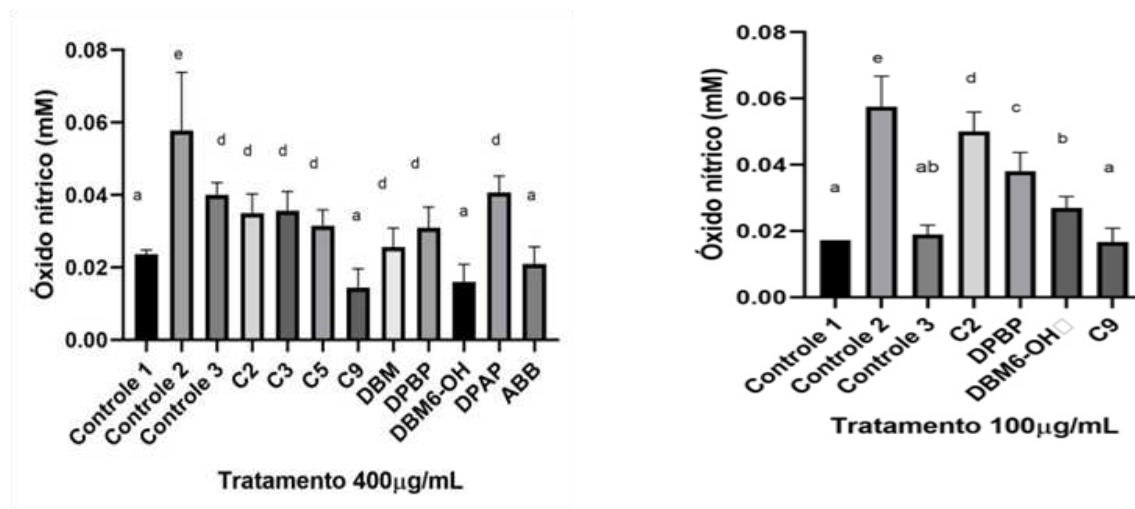


Figura 15. Avaliação da capacidade de redução de óxido nítrico são células de macrófagos dos compostos testados nas concentrações de 400µg/mL e 100µg/mL. Os resultados foram calculados em média em triplicata e estão sendo apresentados em redução da quantidade de ON em milimolar. O controle 1 (Células+Meio), controle 2 (Células+ Meio+ LPS), controle 3: (Meio+ LPS+ Células+Dexametazona). Letras diferentes possuem diferença estatística significativa.

Dentre os compostos testados na concentração de 400 mg/mL, os compostos C9, DBM6-OH e ABB foram os que apresentaram melhor resultado de redução de ON entre 0,011, 0,014 e 0,002mm respectivamente. Esse resultado se mostrou mais eficiente que o medicamento de uso tradicional, a Dexametazona (controle 3).

Na concentração de 100 mg/mL os compostos C2, C9, DPBP e DBM6-OH, foram os mais eficientes, sendo o composto C9 tão eficiente quanto o controle C3. Os compostos testados foram relatados pela primeira vez neste tipo de estudo, sendo necessário novos estudos para descrever a atividade biológica.

5.3 Avaliação *in vitro* da capacidade de sequestro do radical 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil (DPPH•)

Na figura 16, podemos observar os compostos que apresentaram capacidade de inibição do radical livre DPPH nas concentrações de 400µg/mL e 100µg/mL.

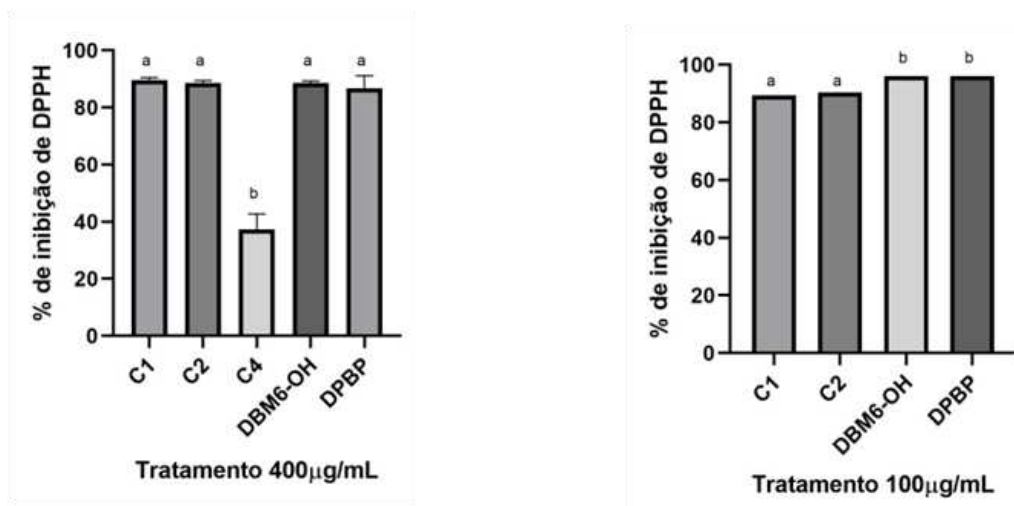


Figura 16. Avaliação da capacidade de sequestro do DPPH nas concentrações de 400 e 100µg. Os resultados foram calculados em média em triplicata e estão sendo apresentados de inibição. Letras diferentes representam diferença significativa nas análises.

No presente estudo, os compostos C1, C2, DBM6-OH e DPBP, apresentaram uma grande capacidade de inibição de DPPH com uma taxa de inibição de 90% na concentração de 100µg/mL, mostrando um grande potencial de inibição em sua menor concentração testada. Na concentração de 400µg/mL os compostos C1, C2, DBM6-OH e DPBP mostraram inibição do radical. O composto C4, apresentou uma porcentagem de 40% de inibição do sequestro, mostrando que em concentrações maiores ele pode ser utilizado como um candidato a antioxidante.

Os antioxidantes são substâncias que estão presentes no nosso corpo, que são utilizados para inibir radicais livres que tem capacidade de destruir principalmente membranas células, conseqüentemente destruir células. Os antioxidantes possuem capacidade de doar elétrons ou de hidrogênio em sua estrutura. Foi descrito pela primeira vez no presente estudo a capacidade de inibição desses compostos frente ao radical livre DPPH, mostrando grande potencial como antioxidante.

5.2 Avaliações *in vitro* da viabilidade celular após a indução ao estresse oxidativo por Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) visando a capacidade citoprotetora dos compostos.

Na figura 17, podemos observar a porcentagem da viabilidade celular dos compostos após a indução do estresse oxidativo nas células.

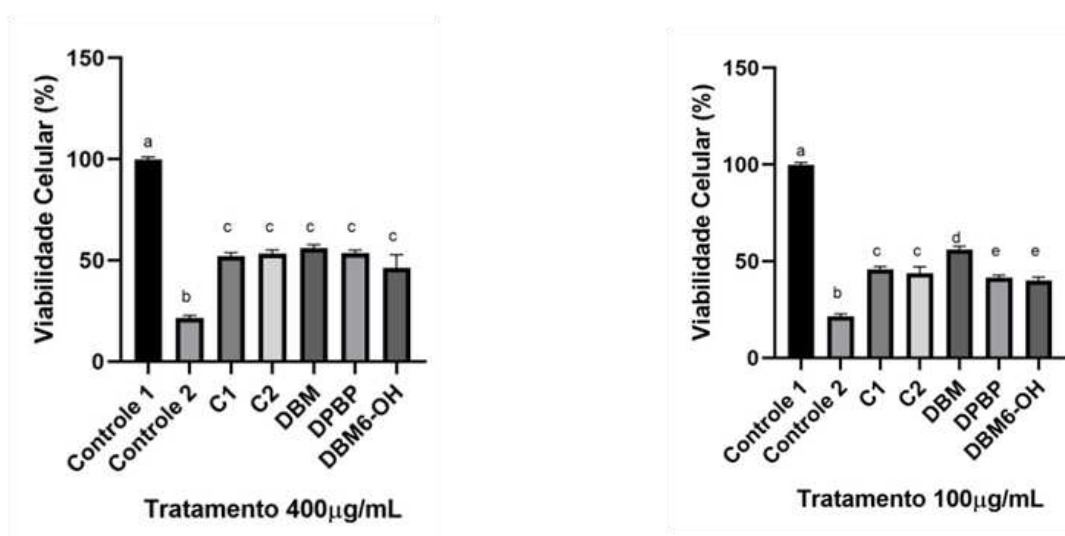


Figura 17. Avaliação da viabilidade celular dos compostos após a indução do estresse oxidativo utilizando Peróxido de Hidrogênio, os controles 1 (Meio+ Células) controle 2 (Meio+ Células+ Peróxido de Hidrogênio). Letras diferentes representam diferença estatística significativa.

Os compostos C1, C2, DBM, DPBP e DBM6-OH, mostraram capacidade citoprotetora, já os demais compostos testados não atingiram 10% de viabilidade celular, mostrando baixo nível de proteção das células em casos de estresse oxidativo, levando à morte das células.

O composto C1 em sua concentração de 100µg/mL mostrou uma taxa de viabilidade de 45% em relação ao controle, mostrando que houve morte celular, mas manteve uma taxa de proteção relevante para as células. O composto C2, apresentou uma viabilidade de 43% de células viáveis após o estresse induzido por peróxido de hidrogênio. O composto DBM, na concentração de 100µg/mL apresentou a maior eficiência dentro dos compostos avaliados, tendo uma média de proteção de 56% de células viáveis após o período de 3h de estresse. Já os compostos DPBP e DBM6-OH, demonstraram uma taxa de respectivamente 45% e

41% de viabilidade celular, mostrando que os compostos na sua menor concentração testada possuem capacidade citoprotetora e antioxidante, contra danos que podem ser ocasionados nas células. No tratamento em 400 μ g, podemos observar que os compostos tiveram um aumento na sua viabilidade mostrando que em grandes quantidades eles podem ter um efeito maior na proteção contra danos oxidativos nas células. Os compostos C1 e C2 tiveram uma taxa de viabilidade igual a 52% de células viáveis, já os compostos DBM e DPPB, mostraram uma viabilidade de células na média de respectivamente de 56% e 53%. No presente trabalho foi relatado pela primeira vez o potencial citoprotetor em células de macrófagos.

5.5 Curvas de crescimento dos parasitos

Como observado na figura 18, os parasitas atingiram a fase logarítmica entre os dias 2 e 5, entrando na fase estacionária do dia 6 ao 8, começando a queda dos parasitas a partir do dia 9 para frente. Essa curva mostra que a manutenção do cultivo deve ser realizada até o quinto dia e a partir do sexto dia os parasitas entram na sua fase estacionária, momento importante para realizar os experimentos para a infecção de macrófagos.

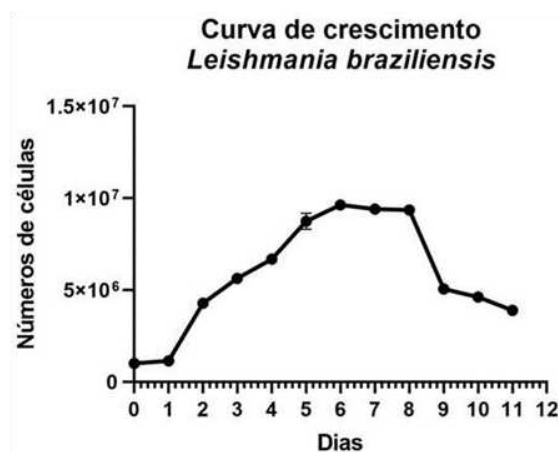


Figura 18. Curva de crescimento *in vitro* de *L. braziliensis*

5.6 Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida contra a infecção de *L. braziliensis*.

Na figura 19, pode-se observar o percentual de inibição da infecção em macrófagos RAW 264.7 em tratamento por 48h. Como controles foram utilizados os

infectados não tratados e tratados com anfotericina B em (5 μ g/mL). Em 48h de tratamento foram observados aqueles compostos que tiveram uma viabilidade de células viáveis >40%.

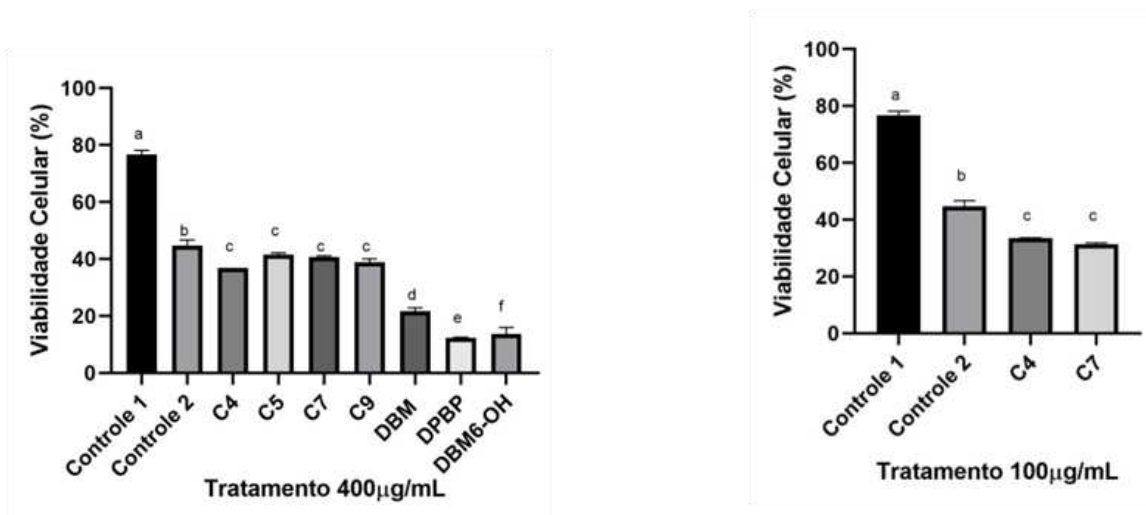


Figura 19. Percentual de inibição da infecção em macrófagos RAW 264.7 tratados com os compostos por 48h. Os macrófagos foram infectados com *L. braziliensis* e foram tratados na concentração de 400 μ g e 100 μ g/mL. O controle 1 é composto de meio+ macrófagos + *L. braziliensis* e o controle 2 é feito de Meio+ macrófagos + *L. braziliensis* e Anfotericina B. Letras diferentes expressam diferença significativa entre as amostras.

5- Conclusão

Os compostos que foram utilizados como tratamento tiveram uma atividade contra as cepas testadas. Os resultados foram expressos quantificando a viabilidade de parasitas presentes no meio. Comparado com o controle 1 os compostos C4, C5, C7, C9, DBM, DPBP e DBM6-OH mostraram que tiveram redução quanto a quantidade de parasitas, mostrando que o mesmo possui grande potencial para serem utilizados como tratamento para diminuição da carga parasitária. Na concentração de 100 μ g/mL, os compostos C4 e C7, foram os únicos que conseguiram inibir o crescimento dos parasitas.

A busca por novos fármacos com potencial de inibição dos parasitas é relevante. No presente estudo foi relatado pela primeira vez o potencial de inibição do crescimento dos parasitas, sendo necessárias novas metodologias para o entendimento do mecanismo de ação do composto e da inibição do parasita.

6. REFERÊNCIAS

ABRAÃO, L. S. DE O. et al. Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose tegumentar americana no estado do Pará, Brasil, entre 2008 e 2017. **Revista Pan- Amazônica de Saúde**, 11(0), 2020.

BALEKAR, N. et al. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, 141(3)817-824, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

CARLOS, L. MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

AMERICANA Brasília -DF 2013 MINISTÉRIO DA SAÚDE 2ª edição atualizada 3ª reimpressão. [s.l.: s.n.]. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana_2edicao.pdf. Acesso em: 26 set. 2022.

EBERHARDT, T. D. et al. Cicatrização de Feridas: Análise das Tendências em Teses e Dissertações. Ver. *Enferm. UFSM*, v. 5, n. 2, p. 387-395, 2015. Eberhardt, T. D., Dias, C. F. C., da Fonseca, G. G. P., Kessler, M., de Avila Soares, R. S., & de Lima, S. B. S. (2015). Cicatrização de feridas: análise das tendências em teses e dissertações. **Revista de Enfermagem da UFSM**, 5(2): 387-395.

FALCÃO, D. Q. et al. Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(1):73–76, 2006.

FELÍCIO, M. B. **Farmacocinética, atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante do 2-benzil- 1,3-difenil-1,3-propanodiona: um enfoque na doença inflamatória intestinal e no edema de pata.** 141 f. Tese-Doutorado em Bioquímica Aplicada) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2022.: [s.n.].

GONTIJO, B; CARVALHO, M. DE L. R. DE. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36(1), 2003.

Hendrickx, S., Caljon, G., & Maes, L. (2019). Need for sustainable approaches in antileishmanial drug Discovery. *Parasitology Research*.

JACKSON, K.M.; DELEON, M.; VERRET, C.R; and HARRIS, W.B. Dibenzoylmethane induces cell cycle deregulation in human prostate cancer cells. **Cancer Letters**, 178:161-165, 2002.

Jia-Ning Liu, Zi-Yi Yang, Jin-Hui Zheng, Ying Xu, Lei Fang, New monoterpenoid indole alkaloids from *Alstonia scholaris*, **Phytochemistry Letters**, 54:28-31, 2023. Pages, ISSN 1874-3900, <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2023.01.013>.

Laurenti MD, da Matta VL, Pernichelli T, Secundino NF, Pinto LC, Corbett CE, Pimenta PP. Effects of salivary gland homogenate from wild-caught and laboratory-reared *Lutzomyia longipalpis* on the evolution and immunomodulation of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Scand J Immunol**. 70(4):389-95, 2009. doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02310.x. PMID: 19751274.

LAGOUGE, M. et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. **Cell**, 127(6):1109- 1122, 2006.

LAPAMAS RUEANKHAM et al. Biological activities of extracts and compounds from Thai Kae-Lae (*Maclura cochinchinensis* (Lour.) Corner). **Molecules**, 23(1) 9, 2023.

MACEDO BASTOS, M. et al. Antileishmanial Chemotherapy: A Literature Review.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2007. 2ed, Brasília, DF

NEUSS, N. Indole Alkaloids. In: Pelletier, S.W., ed. Chemistry of the Alkaloids. Van Nostrand Reinhold Company (Publishers). 1970: 213-266.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia humana**. 13 Rio de Janeiro: Atheneu, 2016, 588 p.

NOGUEIRA, M.A.; MAGALHÃES, E.G.; MAGALHÃES, A.F.; BILOTI, D.N.;

LAVERDE JR, A.; PESSINE, F.B. et al. A novel sunscreen agent having antimelanoma activity. **II Farmaco**, 58(11):1163-1169, 2003.

Nukulkit, S.; Jantimaporn, A.; Poldorn, P.; Khongkow, M.; Rungrotmongkol, T.; Chang, H.-S.; Suttisri, R.; Chansrinoyom, C. Oito Alcalóides Indólicos das Raízes de *Maerua siamensis* e Seus Efeitos Inibitórios de Óxido Nítrico. **Moléculas** 2022, 27 7558. <https://doi.org/10.3390/molecules27217558>

OSSO C, AARON A. A, ARMANDI A, CAVIGLIA G P, VERNERO M, SARACCO GM, ASTEGIANO M, BUGIANESI E & RIBALDONE D G. Inflammatory Bowel Disease Nurse—Practical Messages. **Nursing Reports**. 11 (2):229-241, 2021.

Peters NC, Sacks DL. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. **Cell Microbiol**. 2009, 11(9):1290-6. doi: 10.1111/j.1462- 5822.2009.01348.x. Epub 2009 Jun 22. PMID: 19545276; PMCID: PMC3431610.

Ross, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and (2) further notes on Leishman's bodies. **Brit. Med. J**. 1903, 2: 1261-1401.

Rueankham, L., Panyajai, P., Saiai, A. et al. Atividades biológicas de extratos e compostos de Thai Kae-Lae (*Maclura cochinchinensis* (Lour.) Corner). **BMC Complement Med Ther** 23(191), 2023. <https://doi.org/10.1186/s12906-023-03979-w>

Singh, N., Kumar, M., & Singh, R.K. (2012). Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, 5, 485- 4897.

St-PIERRE, B.; VAZQUEZ-FLOTA, F. A. & De LUCA, V. (1999). Multicellular compartmentation of Catharanthus roseus alkaloids biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. **Plant Cell**. 11: 887-900.

SÁNCHEZ, Hermes Lustre. Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. **Hermes**, v. 23, n. 2, 2022.

Travel Medicine. Scand J Infect Dis. 42(8):563-70 NEUSS, N. Indole Alkaloids. In: Pelletier, S.W., ed. Chemistry of the Alkaloids. Van Nostrand Reinhold Company (Publishers). 1970: 213-266.

WU, Y.; ANTONY, S.; MEITZLER, J. L.; DOROSHOW, J. H. Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. **Cancer Lett**, v.10, n. 2, p. 164- 73, 2014.

Capítulo 2: Perfil toxicológico por Avaliação *in silico*

1. Introdução

A análise *in silico* é uma simulação teórica. A expressão não deriva de nenhuma palavra latina, mas tornou-se popular por descrever esse tipo de análise, que está se tornando corriqueira nos meios científicos através de programas computacionais que ajudam a prever análises toxicológicas de fármacos candidatos a medicamentos.

Os estudos *in silico* têm como vantagem a rapidez na sua execução, o baixo custo e a capacidade de reduzir o uso de animais em ensaios de toxicidade (ANDRADE et al., 2010). Um estudo ADME-Tox eficiente é essencial para selecionar compostos promissores que tenham maiores chances de não serem descartados na fase clínica (KADAN & ROY, 2007; GELDENUYS et al., 2006).

Abordagens *in silico* são agora amplamente utilizadas para estudar os parâmetros importantes que podem orientar o químico medicinal na avaliação das propriedades químicas e físico-químicas de um composto. A tendência de uso de software é cada vez maior, principalmente em centros de pesquisa e universidades. É importante ressaltar, porém, que as previsões *in silico* não substituem ou desqualificam os testes experimentais, e ambas devem funcionar em parceria uma com a outra (KADAN & ROY, 2007). Testes experimentais de farmacocinética *in vitro* e *in vivo* são de extrema importância para a avaliação de um novo fármaco e, portanto, imprescindíveis.

Um fator importante é a lipofilicidade e a solubilidade que são as principais propriedades moleculares na absorção de um fármaco. Esses parâmetros farmacocinéticos foram abordados teoricamente pela primeira vez em 1997, quando Lipinski e colaboradores publicaram a Regra dos Cinco (Ro5) com base no estudo das propriedades de 2.245 medicamentos do banco de dados World Drug Index (WDI) aprovados para ensaios clínicos de Fase II (LIPINSKI et al., 2001). Hoje em dia a regra de Lipinsky ainda é usada como parâmetro para averiguar se um composto tende a ser aceitável como provável fármaco. Sendo assim, o objetivo desse capítulo foi avaliar os compostos ativos à luz da regra de Lipinski e de softwares que calculam as propriedades conhecidas como ADMET.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Avaliação in silico

Avaliações teóricas in silico foram realizadas, segundo proposto por Pinheiro et al. (2012) e diferentes descritores foram analisados como o Coeficiente de Partição Octanol/Água (cLogP), Peso Molecular (PM), Volume Molecular (VM), Número de Ligações Doadoras de Hidrogênio (HBD) e Aceptora de Hidrogênio (HBA), usando a ferramenta ChemSpider (<http://www.chemspider.com>). Os compostos C4, C5, C7, DPBP e DBM6-OH também foram submetidos a análises ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade), usando a ferramenta ADMETSAR (www.admetexp.org), sendo, nesse caso, analisados os parâmetros de absorção, metabolismo, excreção e perfil toxicológico dos fármacos. Todas as ferramentas utilizadas são softwares gratuitos disponíveis na rede mundial de computadores (internet).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Alcalóides

De acordo com o programa de predição in silico pkCSM (tabela 1), o aumento da cadeia carbônica do grupo ácido diminuiu a solubilidade dos derivados em água, como esperado, pois quanto maior a cadeia carbônica maior a lipofilicidade. Em relação a absorção intestinal todos são bem absorvidos pelos tecidos pois apresentam permeabilidade para células Caco-2 maior que 10×10^{-6} cm/de absorção maior que 90% em todos os compostos (CASTILLO-GARIT & JUAN, ET AL. 2008; YEE, 1997; CHATURVEDI, ET AL., 2001; MATOS, 2016).

A glicoproteína-P (P-gp) está relacionada ao gene de multirresistência a fármacos (MDR1) responsável pelo efluxo de fármacos e xenobióticos em células de tecidos normais e em barreiras hemato-teciduals (SCHINKEL, 1999; POLLI, et al., 2001). Sendo assim todos dos compostos apresentados são substratos de P-gp, apresentando a capacidade de inibir a ação desta proteína. Muitas células apicais do trato gastrointestinal apresentam P-gp (AZEREDO, et al. 2009),

Os compostos apresentam baixos volumes de distribuição e fração livre indicando que não ficariam disponíveis após entrar na corrente sanguínea para ter sua ação terapêutica, principalmente porque a ação conjunta de P-gp e CYP são a principal barreira a drogas do intestino (CUMMINS, 2002). O conjunto de dados

apresentados faz com que a administração oral desses compostos não seja recomendada (LIN et al. 2011).

Os resultados preditos de toxicologia pelo pkCSM e o Adnetsar estão contidos na tabela 2 e estes resultados nos mostram que nenhum dos compostos têm ação tóxica no teste de AMES quanto a hepatotoxicidade.

Utilizando o software *ChemSpider* avaliamos algumas propriedades eletrônicas dos três alcalóides, para verificar se eles atenderem à “Regra dos 5” proposta por LIPINSKI (2001). Na Tabela 3 é possível observar os resultados. Os três alcalóides atendem à “Regra dos 5” e possuem características eletrônicas muito semelhantes. Dessa forma, não é possível estabelecer uma correlação direta entre as propriedades eletrônicas e as diferenças de eficácia de cada molécula.

Tabela 1. Predição das propriedades farmacocinéticas (ADMET) por pkCSM análise de similaridade.


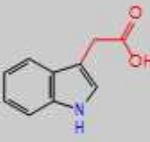
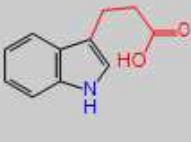
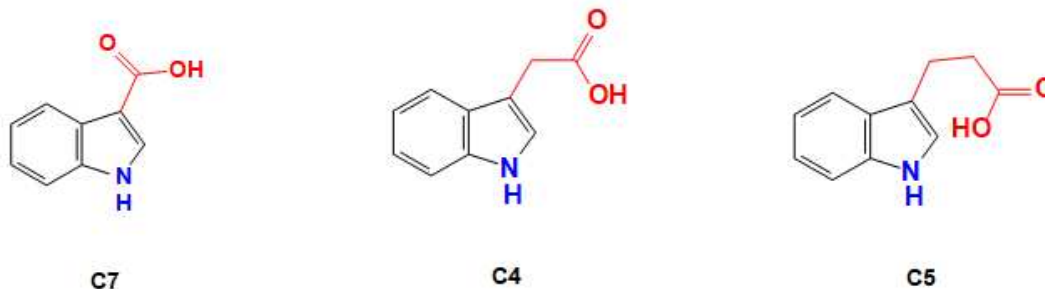
Compostos					
		C7 	C4 	C5 	
Propriedade	Nome do modelo	Valor	Valor	Valor	Unidade
Absorção	Solubilidade em água	-2.965	-2.997	-2.939	Numérico (µmol/L)
Absorção	Permeabilidade Caco2	1.184	1.118	1.22	Numérico (Papp em 10 ⁻⁴ cm/s)
Absorção	Absorção Intestinal (humano)	94.785	96.609	95.389	(% Absorvido)
Absorção	Permeabilidade na Pele	-2.735	-2.735	-2.734	Numérico (log Kp)
Absorção	Substrato Glicoproteína-P	sim	sim	sim	(Sim/Não)
Absorção	Inibidor Glicoproteína-PI	não	não	não	(Sim/Não)
Absorção	Inibidor Glicoproteína-P II	não	não	não	(Sim/Não)
Distribuição	VDss (humano)	-1.317	-1.196	-0.984	Numérico (L/kg)
Distribuição	Fração Livre (humano)	0.449	0.413	0.333	Numérico (Fu)
Distribuição	Permeabilidade BBB	0.292	0.266	0.156	Numérico (log BB)
Distribuição	Permeabilidade CNS	-2.807	-2.812	-2.24	Numérico (log PS)
Metabolismo	Substrato CYP2D6	não	não	não	(Sim/Não)
Metabolismo	Substrato CYP3A4	não	não	não	(Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor CYP1A2	não	não	não	(Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor CYP2C19	não	não	não	(Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor CYP3A4	nao	nao	nao	(Sim/Nao)
Excreção	Clearance Total	0,287	0.211	0.275	(ml/min/kg)
Excreção	Substrato OCT2 Renal	não	não	não	(Sim/Não)

Tabela 2. Predição das propriedades toxicológicas por pkCSM e AdnetSAR análise de similaridade

Compostos							
Modelo	Unidade	C7		C4		C5	
		pkCSM	AdnetSAR	pkCSM	AdnetSAR	PkCSM	AdnetSAR
Toxicidade AMES	Categórico (Sim/Não)	não	não	não	não	não	não
Hepatotoxicidade	Categórico (Sim/Não)	sim	não	sim	não	não	0.5194
Inibidor hERG I	Categórico (Sim/Não)	não	não	não	não	não	na
Toxicidade aguda oral para ratos (LD50)	Numérico (mol/kg)	2,187	na	1.907	não	1,932	na
Toxicidade crônica oral para ratos (LOAEL)	Numérico (mg/kg/dia)	2,186	na	2,799	não	2,427	na
Dose máxima tolerada (humano)	Numérico (mg/kg/dia)	1.668	não	1,075	não	0,9	não
Nefrotoxicidade	Categórico(Sim/Não)	na	não	não	não	na	não

Tabela 3. Regra de Lipinski



Fármaco	R em C3	Atividade Antimastigota (µg/mL)	Regra dos 5" Lipinski				
			CLogP	LogD*	HBA	HBD	PM
C7	COOH	400	1.860	1	1	1	161,16
C4	CH ₂ COOH	100	1.795	1	1	2	175,19
C5	C ₂ H ₄ COOH	100	2.185	1	1	2	189,21

CLogP (coeficiente de partição octanol/água); LogD (coeficiente de partição octanol/água em pH específico: *pH=7,4); HBA (Ligações Aceptoras de Hidrogênio); HBD (Ligações doadoras de Hidrogênio); PM (Peso Molecular); Regra: PM < 500, LogP ≤ 5, HBA ≤ 10, HBD ≤ 5.

3.2 Derivados dibenzoilmetanos

Analisando as duas estruturas dos derivados de dibenzoilmetano (tabela 4), observamos que o composto DPBP apresenta absorção intestinal por apresentar

permeabilidade para as células Caco-2 maior que 10×10^{-6} cm/s e absorção intestinal maior que 90% (CASTILLO-GARIT & JUAN et al. 2008; YEE 1997; CHATURVEDI et al., 2001; Matos, 2016). Apresenta-se também como substrato para glicoproteína-P (P-gp) está relacionada ao gene de multirresistência a fármacos (MDR1) responsável pelo efluxo de fármacos e xenobióticos em células de tecidos normais e em barreiras hemato-teciduals (SCHINKEL, 1999). É substrato de pelo menos uma CYP, indicando que esse fármaco precisa de uma dose maior para atingir a dose efetiva. O composto apresenta elevado volume de distribuição, porém menor volume de fração livre indicando que a maior parte do composto após entrar na corrente sanguínea não estará disponível para ter sua ação terapêutica, principalmente porque a ação conjunta de P-gp e CYP são a principal barreira a drogas do intestino (CUMMINS, 2002). Esses dados levam a crer que a administração oral deste composto não é recomendada (LIN et al. 2011).

Quanto ao composto DBM6-OH, este apresenta baixa permeabilidade para as células Caco-2 e elevada absorção intestinal. Não é substrato para glicoproteína-P (P-gp) está relacionada ao gene de multirresistência a fármacos (MDR1) responsável pelo efluxo de fármacos e xenobióticos em células de tecidos normais e em barreiras hemato-teciduals (SCHINKEL, 1999). Também é Substrato para a enzima CYP3A4 que é responsável pela metabolização de moléculas de volume molecular elevado, relativamente lipofílicas, estrutura com uma ou duas ligações doadoras/receptoras de hidrogênio a 5,5 7,5 A e 8-10 A do sítio de biotransformação (Gram et al., 2002). O composto também não é substrato para a CYP, portanto precisa de uma dose maior para atingir a dose efetiva. Além disso, não apresenta elevado volume de distribuição e volume de fração livre. Em suma, o composto DBM6-OH é mais apropriado para uso oral. Os resultados preditos de toxicologia pelo pkCSM e AdnetSAR são observados na tabela 5 e estes resultados nos mostram que os dois compostos de acordo com algoritmo utilizado podem ou não apresentar potencial ação tóxica tanto no teste de AMES, quanto hepatotoxicidade, porém nos estudos de Rodrigues (2019) o composto DPBP não apresentou hepatotoxicidade em teste *in vivo*.

Utilizando o software *ChemSpider* avaliamos algumas propriedades eletrônicas dos três alcalóides, para verificar se eles atenderem à “Regra dos 5” proposta por LIPINSKI (2001). Na Tabela 6 é possível observar os resultados. Os dois derivados de dibenzoilmetano atendem à “Regra dos 5”.

Tabela 4. Predição das propriedades farmacocinéticas (ADMET) por pkCSM análise de similaridade


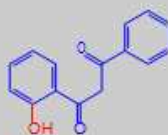
Compostos				
		 DPBP	 DBM-6OH	
Propriedade	Nome do modelo	Valor	Valor	Unidade
Absorção	Solubilidade em água	0,565	-3,334	Numérico (µmol/L)
Absorção	Permeabilidade Caco2	62,951	1,291	Numérico (Papp em 10-6 cm/s)
Absorção	Absorção Intestinal (humano)	98,055	94,781	Numérico (%Absorvido)
Absorção	Permeabilidade na Pele	-2,623	-2,857	Numérico (log Kp)
Absorção	Substrato Glicoproteína-P	Sim	Não	Categórico (Sim/Não)
Absorção	Inibidor Glicoproteína-PI	Sim	Não	Categórico (Sim/Não)
Absorção	Inibidor Glicoproteína-P II	Sim	Não	Categórico (Sim/Não)
Distribuição	VDs (humano)	1,585	-0,235	Numérico (L/kg)
Distribuição	Fração Livre (humano)	0,081	0,126	Numérico (Fu)
Distribuição	Permeabilidade BBB	-0,05	0,112	Numérico (log BB)
Distribuição	Permeabilidade CNS	-1,127	2,153	Numérico (log P S)
Metabolismo	Substrato CYP2D6	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Substrato CYP3A4	Sim	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor CYP1A2	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor CYP2C19	Sim	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor CYP2C9	Sim	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor CYP2D6	Não	Sim	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor CYP3A4	Não	Sim	Categórico (Sim/Não)
Excreção	Clearance Total	1,469	0,22	Numérico (ml/min/kg)
Excreção	Substrato OCT2 Renal	Não	Não	Categórico (Sim/Não)

Tabela 5. Predição das propriedades toxicológicas por pkCSM e AdnetSAR análise de similaridade.


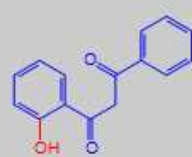
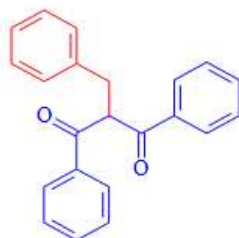
Compostos					
Modelo	Unidade	 DPBP		 DBM6-OH	
		PkCSM	AdnetSAR	pkCSM	AdnetSAR
Toxicidade AMES	(Sim/Não)	Não	Não	Sim	Não
Hepatotoxicidade	(Sim/Não)	Sim	Não	Não	Sim
Inibidor hERG I	(Sim/Não)	Não	n,a	não	n,a
Toxicidade aguda oral para ratos (LD50)	Numérico (mol/kg)	2,669	n,a	1,908	n,a
Toxicidade crônica oral para ratos (LOAEL)	Numérico (mg/kg/dia)	202,77	n,a	2,606	n,a
Carcinogênese (Ratos)	(Sim/Não)	n,a	Não	n,a,	Não
Carcinogênese (Roedores)	(Sim/Não)	n,a	Não	n,a,	Não
Carcinogênese (Camundongos)	(Sim/Não)	n,a	Não	n,a	Não
Dose máxima tolerada (humano)	(mg/kg/dia)	2,71	n,a	1,008	n,a

Tabela 6. Regra de Lipinski



DPBP



DBM6-OH

Fármaco	Atividade Antimastigota ($\mu\text{g/mL}$)	"Regra dos 5" LIPINSKI				
		CLogP	LogD*	HBA	HBD	PM
DPBP	400	4,20	4,03	2	0	314,38
DBM6-OH	400	2,85		3	1	240,26

CLogP (coeficiente de partição octanol/água); LogD (coeficiente de partição octanol/água em pH específico: *pH=7,4); HBA (Ligações Aceptoras de Hidrogênio); HBD (Ligações doadoras de Hidrogênio); PM (Peso Molecular); Regra: PM <500, LogP \leq 5, HBA \leq 10, HBD \leq 5.

3.3 Relação estrutura atividade

3.3.1 Alcalóides

Ao analisar as estruturas dos alcalóides testados verificou-se que os mais ativos foram os que apresentam substituição em **C-3** e à medida que se aumenta a cadeia carbônica do grupo ácido esta atividade aumenta (Figura 1). Por outro lado, esta atividade está limitada até um determinado tamanho, pois ao se testar o alcalóide indol ácido butírico este não se mostrou ativo.

C7	C4	C5	C6
$\mu\text{g/mL}$			
400	100	100	Não ativo

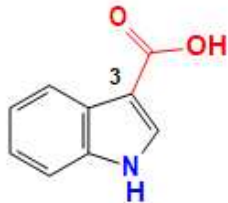

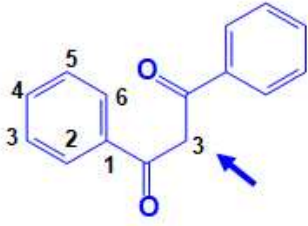
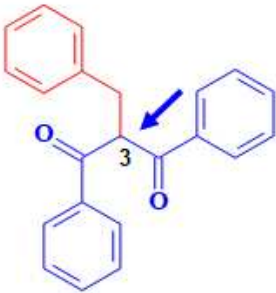
	
C7	C3
Toxicidade para macrófagos	
Sim	Não

Figura 1. Relação estrutura atividade dos alcaloides testados |

3.3.2 Derivados de dibenzoilmetanos

Em relação aos derivados de dibenzoilmetano o mesmo foi observado em relação a substituição em **C3** e **C2** no anel benzênico (Figura 2).

	
DBM	DPBP
Inibição da infecção em macrófagos RAW 264.7	
30% de células vivas viáveis	14% de células vivas viáveis

4. CONCLUSÃO GERAL

Considerando os resultados obtidos com os alcalóides e os derivados de dibenzoilmetano, o composto **C5**, apresentou capacidade proliferativa, antioxidante, anti-inflamatória, e leishmanicida demonstrando grande potencial para ser utilizado como tratamento para Leishmaniose Tegumentar, visando a obtenção de um medicamento que pode ser utilizado ao mesmo tempo como cicatrizante e leishmanicida, tratando assim as feridas ocasionadas pelo parasita. Dentre os derivados de dibenzoilmetano, os compostos **DPBP** e **DBM6-OH** possuem grande potencial para ser um medicamento para o tratamento de leishmaniose tegumentar, já que ambos os compostos apresentaram atividade antioxidante, capacidade citoprotetora, proliferativa, anti-inflamatória e leishmanicida. De acordo com as análises in sílico, tanto os alcalóides como o derivado de dibenzoilmetano **DPBP** serão melhores na sua ação terapêutica se utilizados em formulações tópicas como pomadas, cremes, géis, loções e sprays. Para o derivado **DBM6-OH** este poderá ser utilizado tanto em formulações tópicas, quanto em formulações de uso oral.

5. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C.H.; TROSSINI, G.H.G.; FERREIRA, E.I. (2010) Modelagem molecular no ensino de química farmacêutica. *Rev. Eletr. Farm* .7:1-23.
- AZEREDO, F.J., UCHÔA, F.T., & COSTA, T.D. (2009). Papel da glicoproteína-P na farmacocinética e nas interações medicamentosas. *Rev Bras Farm*, 90: 321-326.
- CASTILLO-GARIT, J.A., MARRERO-PONCE, Y., TORRENS, F., & GARCÍA-DOMENECH, R. (2008). Estimation of ADME properties in drug discovery: Predicting Caco-2 cell permeability using atom-based stochastic and non-stochastic linear indices. *J. Pharm Sci*, 97: 1946-1976.
- CHATURVEDI, P.R., DECKER, C.J., & ODINECS, A. (2001). Prediction of pharmacokinetic properties using experimental approaches during early drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5: 452-463.
- CUMMINS, C.L., JACOBSEN, W. & BENET, L.Z. (2002). Unmasking the dynamic interplay between intestinal P-glycoprotein and CYP3A4. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300: 1036–1045.
- GELDENHUYS, W.J. GAASCH, K.E. WATSON, M. ALLEN, D.D. VAN DER SCHYF, C.J. (2006). Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. *Drug Disc. Today*, 11:127-132.
- Gram K.R.S., NEVES C.S.M., LOREDO C., KRITSKI A., GONÇALVES J.C.S. (2002). Changes in the bioavailability of CYP3 A4 substrate drugs: a risk factor for using rifampicin, herbal medication, and fruit juices. *Pulmão RJ*,12(1):36-46.
- KADAN, R.U.; ROY, N. (2007) Recent trends in drug likeness prediction: a comprehensive review of in silico methods. *Ind. J. Pharm. Sci.* 69: 609-615.
- LIN, W., HONG, J.L., SHEN, G., WU, R.T., WANG, Y.et.al.(2011).Pharmacokinetics of Dietary Cancer Chemopreventive Compound Dibenzoylmethane in Rats and the Impact of Nanoemulsion and Genetic knockout of Nrf2 on its Disposition. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 32: 65 - 75.
- LIPINSKI CA, LOMBARDO F, DOMINY BW, FEENEY PJ. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 46:3-26.
- MATOS, KARINA SILVIA. *Estudos computacionais e experimentais da permeabilidade celular de candidatos a fármacos*. Diss. Universidade de São Paulo. 2016.
- NASCIMENTO, FR. et al. New antineoplastic agent based on a dibenzoylmethane derivative: Cytotoxic effect and direct interaction with DNA. *Biophysical chemistry*,v. 239, p. 1-6, 2018.

POLLI, J.W., WRING, S.A., HUMPHREYS, J.E., HUANG, L., MORGAN, J.B., WEBSTER, L.O., & SERABJIT-SINGH, C.S. (2001). Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *J Pharmacol Exp Ther*, 299: 620-628.

SCHINKEL, A.H. (1999). P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood–brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36:179-194.

YEE, S. (1997). In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth. *Pharm Res*, 14: 763-766.