

ADRIANA CARNEIRO DA SILVA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL
LEISHMANICIDA DE DERIVADOS TRIAZÓLICOS E
DERIVADOS DE BENZOFENONAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586a
2017
Silva, Adriana Carneiro da, 1983-
Avaliação *in vitro* do potencial leishmanicida de derivados
triazólicos e derivados de benzofenonas / Adriana Carneiro da
Silva. – Viçosa, MG, 2017.
xv, 98f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.73-92.

1. Leishmaniose visceral. 2. *Leishmania infantum chagasi*.
3. Triazólicos. 4. Benzofenonas. 5. Citometria de fluxo.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

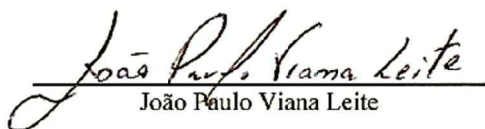
CDD 22 ed. 616.9364

ADRIANA CARNEIRO DA SILVA

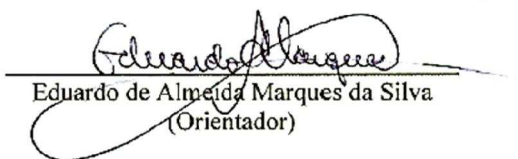
**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL
LEISHMANICIDA DE DERIVADOS TRIAZÓLICOS E
DERIVADOS DE BENZOFENONAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de julho de 2017.


João Paulo Viana Leite


Silvia Almeida Cardoso


Eduardo de Almeida Marques da Silva
(Orientador)

Dedico este trabalho ao meu marido e companheiro de todas as horas, Mariel, que sempre me apoiou: obrigada por sempre estar ao meu lado, nos bons e maus momentos. E também aos meus pais, que sempre acreditaram em mim. Obrigada por entenderem minhas muitas ausências em diversos momentos para que este trabalho pudesse ser concluído.

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes. ”

Sir Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao meu amigo, amado, esposo querido Mariel, por toda força, paciência, compreensão e estímulo. E por mais uma vez estar ao meu lado. Te amo!

Aos meus pais amados, Armindo e Otacília, pela força, orações, valores ensinados, presença constante e tão carinhosa!

A minha irmã querida: mesmo distante tão perto!

A minha querida Marieli por fazer parte da minha vida e permitir que eu faça parte da sua.

Aos meus amigos de quatro patas Max, Raja e Nina: obrigada por seu amor incondicional, por estarem sempre por perto e sempre com um abanar de cauda como incentivo.

A professor Róbson do departamento de Química da UFV e seus alunos, Wagner e Ângela, não só por fornecerem os compostos avaliados neste trabalho, mas também pela grande disponibilidade. Meu muito obrigada!

Ao professor e amigo Eduardo: obrigada pela sua orientação, ensinamentos, disponibilidade e tão boa vontade em ensinar. E pelas muitas risadas, que deixaram estes dois anos muito mais alegres. Te agradeço imensamente por isso!

Ao professor Leandro por toda contribuição para o desenvolvimento deste trabalho e por ser sempre tão disponível!

A professora Juliana Fietto por me deixar utilizar suas instalações. Sem seu consentimento, este trabalho jamais poderia ter sido realizado. Muito obrigada!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela imensa oportunidade de formação.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise – NMM da UFV.

Aos professores da Pós-graduação por toda amizade e conhecimentos compartilhados que contribuíram para meu processo de formação.

Aos professores participantes da minha banca avaliadora pela disponibilidade em participar da avaliação deste projeto. Sinto-me honrada em ter profissionais como vocês participando deste momento tão especial.

A todos que fazem parte do Laboratório de Glicobiologia e Imunoparasitologia pela agradável e divertida convivência: Sabrina, Thaís, Bianca, Wendel, Daniel, Alessandra, Patrick e a todos os afiliados que por vezes aparecem por lá e tornam o ambiente ainda mais agradável.

Aos novos parceiros e amigos do Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos, em especial ao Thiago Onofre, Luciana, Grazi e Dayse: muito obrigada pela acolhida, confiança, troca de experiências e por vários momentos e risadas maravilhosas.

A Beth, secretária do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, por sua disponibilidade.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma fizeram com que eu pudesse chegar até aqui!

ÍNDICE

Lista de Figuras -----	ix
Lista de tabelas -----	xii
Lista de siglas -----	xiii
Resumo -----	xiv
Abstract -----	xv
1 Introdução -----	01
2 Revisão da literatura -----	03
2.1 As leishmanioses -----	03
2.2 A leishmaniose visceral -----	06
2.3 O tratamento da leishmaniose visceral -----	10
2.3.1 Derivados de Triazólicos e de Benzofenonas -----	18
3 Objetivos -----	28
3.1 Objetivos gerais -----	28
3.2 Objetivos específicos -----	28
4 Delineamento Experimental -----	30
5 Materiais e métodos -----	31
5.1 Obtenção de parasitos -----	31
5.2 Cultivo de parasitos -----	31
5.3 Curva de crescimento dos parasitos -----	31
5.4 Cultivo de macrófagos -----	32
5.5 Ensaio de solubilidade dos compostos Triazólicos derivados de indan-1,3-diona e derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de derivados de Benzofenonas -----	32
5.6 Viabilidade celular – Ensaio MTT -----	32
5.7 Viabilidade celular – Citometria de fluxo -----	33

5.8 Preparo das soluções estoques dos compostos Triazólicos derivados de indan-1,3-diona e derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de derivados de Benzofenonas -----	33
5.9 Concentração dos compostos Triazólicos derivados de indan-1,3-diona e derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de derivados de Benzofenonas utilizadas nos ensaios de associações para tratamento -----	34
5.10 Determinação da IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%) em promastigotas de <i>L. infantum chagasi</i> -----	34
5.11 Ensaio de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 -----	35
5.12 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida contra formas promastigotas de <i>L. infantum chagasi</i> -----	35
5.13 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida contra formas amastigotas de <i>L. infantum chagasi</i> por contagem de parasitos intracelulares ao microscópio óptico -----	36
5.14 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida contra formas amastigotas de <i>L. infantum chagasi</i> por citometria de fluxo -----	37
5.15 Estratégia para análise de infecção de macrófagos RAW 264.7 por <i>L. infantum chagasi</i> utilizando a citometria de fluxo -----	38
5.16 Análise estatística -----	39
6 Resultados -----	39
6.1 Curva de crescimento de <i>L. infantum chagasi</i> -----	40
6.2 Ensaio de solubilidade dos compostos Triazólicos derivados de indan-1,3-diona e derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de derivados de Benzofenonas -----	41
6.3 Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 -----	42
6.4 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida em formas promastigotas da <i>L. infantum chagasi</i> -----	45
6.5 Método tradicional: microscopia óptica -----	46
6.5.1 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida de compostos Triazólicos derivados de indan-1,3-diona e derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de derivados de Benzofenonas em formas amastigotas de <i>L. infantum chagasi</i> -----	46

6.5.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida de associações de derivados de Benzofenonas selecionadas em formas amastigotas de <i>L. infantum chagasi</i> -----	49
6.6 Citometria de Fluxo -----	51
6.6.1 Atividade leishmanicida de derivados de Benzofenonas em macrófagos RAW 264.7 infectados com <i>L. infantum chagasi</i> – DNA marcado com iodeto de propídeo -----	52
6.6.2 Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade de associações de derivados de Benzofenonas selecionadas em macrófagos RAW 264.7 -----	53
6.6.3 Atividade leishmanicida de associações de derivados de Benzofenonas em macrófagos RAW 264.7 infectados com <i>L. infantum chagasi</i> -----	55
6.7 Comparação entre técnicas: microscopia óptica X citometria de fluxo -----	59
7 Discussão -----	61
8 Conclusões -----	71
9 Perspectivas -----	72
10 Referências bibliográficas -----	73
Anexo I -----	93
Anexo II -----	93
Anexo III -----	94
Anexo IV -----	97
Anexo V -----	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático de um flebotomíneo -----	04
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Leishmania sp.</i> -----	05
Figura 3: Sinais clínicos da leishmaniose -----	06
Figura 4: Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral no mundo, registrados em 2013 -----	07
Figura 5: Estrutura química da Anfotericina B -----	12
Figura 6: Estrutura química da Pentamidina -----	13
Figura 7: Estrutura química da Miltefosina -----	14
Figura 8: Estrutura química da Paromomicina -----	15
Figura 9: Estrutura química de Inadivir e Saquinavir -----	15
Figura 10: Estrutura química da Afidicolina -----	17
Figura 11: Estrutura química do Triazol -----	18
Figura 12: Estrutura química do Cetoconazol e Itraconazol -----	19
Figura 13: Estrutura química do SHC 56592 -----	20
Figura 14: Triazóis com atividade Leishmanicida -----	20
Figura 15: Triazóis derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona -----	21
Figura 16: Triazóis derivados de inda-1,3-diona -----	22
Figura 17: Estrutura química de uma isobenzofuranona -----	24
Figura 18: Estrutura química de uma indandiona -----	24
Figura 19: Estrutura química de uma benzofenona -----	25
Figura 20: Derivado de benzofenona com ação leishmanicida isolado de espécies da família Clusiaceae -----	25
Figura 21: Derivados de benzofenona contendo núcleo 1,2,3-triazólico ----	27
Figura 22: Curva de crescimento <i>in vitro</i> de <i>L. infantum chagasi</i> em meio líquido -----	40

Figura 23: Compostos derivados de benzofenonas e derivados triazólicos selecionados no ensaio de solubilidade -----	41
Figura 24: Avaliação da citotoxicidade dos derivados triazólicos em macrófagos RAW 264.7 -----	43
Figura 25: Avaliação da citotoxicidade dos compostos derivados de Benzofenonas em macrófagos RAW 264.7 -----	44
Figura 26: Avaliação da atividade leishmanicida de Triazólicos derivados de indan-1,3-diona e derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona em formas promastigotas de <i>L. infantum chagasi</i> -----	45
Figura 27: Avaliação da atividade leishmanicida de derivados de Benzofenonas em formas promastigotas de <i>L. infantum chagasi</i> -----	46
Figura 28: Avaliação da potencial leishmanicida dos compostos Triazólicos derivados de indan-1,3-diona e derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona em formas promastigotas de <i>L. infantum chagasi</i> por microscopia óptica -----	48
Figura 29: Avaliação do potencial leishmanicida dos compostos derivados de Benzofenonas em formas promastigotas de <i>L. infantum chagasi</i> por microscopia óptica -----	48
Figura 30: Percentual de inibição da infecção em macrófagos RAW 264.7 tratados com associações de derivados de Benzofenonas por 48 h -----	50
Figura 31: Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de macrófagos infectados por <i>L. infantum chagasi</i> após o tratamento <i>in vitro</i> com diferentes compostos Triazólicos derivados de indan-1,3-diona e derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de derivados de Benzofenonas -----	52
Figura 32: Avaliação da ação de derivados de Benzofenonas em macrófagos RAW 264.7 infectados com <i>L. infantum chagasi</i> por citometria de fluxo -----	53
Figura 33: Avaliação da viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 tratados com associações de derivados de Benzofenonas -----	54
Figura 34: Avaliação da viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 tratados com associações de derivados de Benzofenonas (gráficos obtidos pelo Citômetro de Fluxo) -----	55
Figura 35: Percentual de inibição da infecção em macrófagos RAW 264.7 tratados com associações de derivados de Benzofenonas por 48 h. Análise por citometria de fluxo -----	56

Figura 36: Atividade leishmanicida de associações de derivados de Benzofenonas em macrófagos RAW264.7 infectados com <i>L. infantum</i> <i>chagasi</i> -----	58
Figura 37: Comparação entre os percentuais de inibição obtidos pela técnica de citometria de fluxo e microscopia óptica -----	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura química de Antimoniais Pentavalentes empregados na clínica médica -----	11
Tabela 2: Valores de IC₁₀: Concentração Inibitória de 10% para macrófagos RAW 264.7, após 48 h de tratamento, de cada composto químico -----	42
Tabela 3: Associações entre derivados de Benzofenonas e as respectivas concentrações relativas de cada composto em cada associação utilizada para tratamento de macrófagos RAW 264.7 infectados -----	50

LISTA DE SIGLAS

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
HCL	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Concentração Inibitória
IFN-γ	Interferon gama
LC	Leishmaniose Cutânea
LDPK	Leishmaniose dérmica pós-Kalazar
LV	Leishmaniose Visceral
MS	Ministério da Saúde
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PVCLV	Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
WHO	Organização Mundial de ou da Saúde

RESUMO

SILVA, Adriana Carneiro da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Avaliação *in vitro* do potencial leishmanicida de derivados Triazólicos e derivados de Benzofenonas.** Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva.

A *Leishmania infantum chagasi* é o agente etiológico da Leishmaniose Visceral, doença que afeta milhares de pessoas no mundo. O tratamento habitual é baseado em um repertório restrito de fármacos com toxicidade e custos elevados. O desenvolvimento de novas drogas é essencial para o controle e tratamento dessa enfermidade. No cenário atual, uma possibilidade para a descoberta de novos fármacos é o emprego de compostos químicos sintéticos. Neste contexto, nos propomos a avaliar a atividade leishmanicida dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H) -ona e de indan-1,3-diona e de compostos derivados de Benzofenonas. Neste trabalho, realizamos o estudo *in vitro* da citotoxicidade destes compostos em macrófagos RAW 264.7, em formas promastigotas e em formas amastigotas de *L. infantum chagasi* internalizadas em macrófagos, utilizando metodologias convencionais, como a microscopia óptica, bem como implantação de uma nova metodologia utilizando citometria de fluxo. Após vários ensaios, os compostos derivados de Benzofenonas (AL-13, AL-16, AL-19 e B-5), cujas ações leishmanicidas se sobressaíram as demais, foram combinados em 11 diferentes associações. Estas foram testadas quanto à citotoxicidade em macrófagos e a ação leishmanicida em formas amastigotas internalizadas por macrófagos. Os resultados obtidos tanto pela microscopia óptica quanto pela citometria de fluxo apresentaram similaridades quanto à inibição da taxa de infecção em macrófagos infectados por *L. infantum chagasi*. Partindo deste pressuposto, nossos estudos sugerem que: 1) 3 (das 11 associações propostas) apresentam ação leishmanicida e merecem ser consideradas para estudos *in vivo*; 2) a grande similaridade dos resultados obtidos tanto pela técnica de avaliação do grau de infecção de *Leishmania* em macrófagos utilizando microscopia óptica quanto pela citometria de fluxo é um indicativo de que esta nova metodologia pode ser utilizada em um futuro próximo no estudo de triagens de drogas com potencial leishmanicida *in vitro*.

ABSTRACT

SILVA, Adriana Carneiro da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. ***In vitro* evaluation of the leishmanicidal potential of Triazole derivatives and Benzophenone derivatives.** Advisor: Eduardo de Almeida Marques da Silva.

Leishmania infantum chagasi is the etiologic agent of Visceral Leishmaniasis, a disease that affects thousands of people worldwide. The usual treatment is based on a restricted repertoire of drugs with high toxicity and costs. The development of new drugs is essential for the control and treatment of this disease. In the current scenario, one possibility for the discovery of new drugs is the use of synthetic chemical compounds. In this context, we propose to evaluate the leishmanicidal activity of Triazole compounds derived from 6-hydroxyisobenzofuran-1 (3H) -one and indan-1,3-dione and compounds derived from Benzophenones. In this work, we performed the *in vitro* study of the cytotoxicity of these compounds in RAW 264.7 macrophages, in promastigote and amastigotes forms of *L. infantum chagasi* internalized in macrophages, using conventional methodologies, such as optical microscopy, as well as implantation of a new methodology using flow cytometry. After several trials, the compounds derived from Benzophenones (AL-13, AL-16, AL-19 and B-5), whose leishmanicidal actions stood out the others, were combined in 11 different associations. These were tested for macrophage cytotoxicity and leishmanicidal action in amastigote forms internalized by macrophages. The results obtained by both optical microscopy and flow cytometry showed similarities regarding inhibition of infection rate in *L. infantum chagasi* infected macrophages. Based on this assumption, our studies suggest that: 1) 3 (of the 11 proposed associations) present leishmanicidal action and deserve to be considered for *in vivo* studies; 2) the great similarity of the results obtained both by the technique of evaluation of the degree of *Leishmania* infection in macrophages using optical microscopy and by the flow cytometry is an indicative that this new methodology can be used in the near future in the study of drug screenings with leishmanicidal potential *in vitro*.

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antroponose negligenciada, endêmica em todos os continentes, com exceção da Oceania. É estimado que ocorra 500.000 novos casos e 59.000 óbitos por ano (OMS, 2010). É uma doença crônica, causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, da família *Trypanosomatidae*. É transmitida ao homem durante o repasto sanguíneo das fêmeas dos flebotômíneos do gênero *Lutzomyia*, nas Américas, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (DAFTARIAN *et al.*, 2013). Os cães são o principal reservatório deste parasito (COURA-VITAL *et al.*, 2013).

A LV, também conhecida como Calazar (palavra de origem Hindi, que significa “doença negra”) é uma doença sistêmica grave, que afeta órgãos viscerais (fígado e baço) e medula óssea, podendo levar seu hospedeiro a morte (DANTAS-TORRES *et al.*, 2006). É amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais. Cerca de 90% dos casos são encontrados em regiões de pobreza (Sudão, Bangladesh, Índia, Nepal e Brasil) (MONTALVANO *et al.*, 2012). No entanto, o aumento do número de casos não se deve somente as questões econômicas, mas também a mudança de comportamento da sociedade nos últimos anos, como o convívio com áreas florestais e a expansão urbana, que contribuem e muito para o aumento do número de casos (MENEZES *et al.*, 2016).

Apesar da LV ser uma velha conhecida, o arsenal terapêutico é limitado principalmente aos Antimoniais Pentavalentes. No entanto, a sua utilização é problemática, já que são responsáveis por causar diversos efeitos colaterais e serem tóxicos, além de terem uma eficácia limitada (MISHRA *et al.*, 2013; SUNDAR; CHAKRAVARTY; 2010). Além disso, a grande quantidade de medicação e o longo tempo de terapia tornam o tratamento caro e muitas vezes incompleto, devido ao abandono por parte dos pacientes. Fato que está associado ao desenvolvimento de resistência dos parasitos ao fármaco (ROJAS *et al.*, 2006; OUELLETTE *et al.*; 2004).

Diante deste cenário, o grande desafio dos pesquisadores nos últimos tempos tem sido desenvolver novas drogas mais eficientes ou inovar em formulações de drogas já existentes. Diante desta situação, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimula a pesquisa de novos compostos sintéticos ou naturais com o objetivo de se desenvolver novas drogas mais eficazes, baratas e com baixa toxicidade para o paciente (OMS, 2010). Essa possibilidade é uma importante estratégia para se explorar o desenvolvimento de

compostos sintéticos derivados de produtos naturais, que permitam uma maior viabilidade da produção e uma redução de custos (TIUMAN *et al.*; 2011).

Pensando nisto, este trabalho propôs-se a avaliar a atividade de compostos Triazólicos (derivados da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H) – ona da indan-1,3- diona) e derivados de Benzofenonas contra parasitos *L. infantum chagasi*, uma vez que existem na literatura relatos de que estes compostos apresentam ação anti-chagásica, leishmanicida, antitumoral e antibacteriana (DE MELOS *et al.*, 2015; SANTA-CECÍLIA *et al.*, 2011).

Foram testados inicialmente 26 compostos Triazólicos e 14 derivados de Benzofenonas e, aqueles que apresentaram baixo índice de citotoxicidade para macrófagos RAW 264.7, seguiram com os testes *in vitro*. Estes foram testados individualmente e associados em formas promastigotas e amastigotas internalizadas em macrófagos, para se avaliar o potencial leishmanicida. Foram utilizadas para isso metodologias *in vitro* convencionais, tais como o ensaio de redução do sal tetrazólico (MTT) e a microscopia óptica, quanto uma nova metodologia proposta por este grupo de pesquisa, utilizando a citometria de fluxo, com o intuito de melhorar a confiabilidade e rapidez dos ensaios.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 As Leishmanioses

A leishmaniose é um complexo de doenças causadas por no mínimo 30 espécies de parasitos do gênero *Leishmania* (CROFT; COOMBS, 2003). A doença afeta cerca de 12 milhões de pessoas no mundo, com uma incidência anual de aproximadamente 2 milhões de casos e 350 milhões de indivíduos vivem sob área de risco (BERN *et al.*, 2012). As leishmanioses ocorrem em mais de 100 países e as regiões mais afetadas são aquelas localizadas em zonas tropicais e subtropicais, com destaque para as localizadas no subcontinente Indiano, Sul Europeu, Ásia Ocidental e América Sul e Central, tanto em áreas urbanas como peri-urbanas (ASHFORD *et al.*, 2000). Muitos fatores como a epidemia do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (ALVAR *et al.*, 2008), o aumento das viagens internacionais, a falta de vacinas efetivas, a dificuldade no controle dos vetores, os conflitos internacionais e o desenvolvimento de resistência às drogas existentes no mercado tendem a aumentar ainda mais o número de casos de leishmaniose (SERENO *et al.*, 2007). b

Os parasitos *Leishmania* foram descritos pela primeira vez independentemente por Willian Leishman e Charles Donovan em 1903, mas já tinham sido observados por David D. Cuningham em 1885 e por Peter Borovsky em 1989. Somente em 1903 é que o gênero *Leishmania* foi proposto por James Wright (VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002). No ano seguinte, Leonard Rogers conseguiu cultivar o parasito e, em 1907, Patton descreveu diferentes formas morfológicas (CABRERA *et al.*, 1999).

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem ciclo heteroxênico, isto é, envolve a alternância entre hospedeiros invertebrado e vertebrado. O hospedeiro invertebrado é o flebotomíneo vetor da família *Psychodidae*, sub-Família *Phlebotominae*, do gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo), popularmente conhecidos no Brasil como mosquito palha, tatuquira, cangalhinha, asa dura, ou birigui, dentre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014) (Figura 1). Estes se tornam infectados durante o repasto sanguíneo em indivíduos enfermos (ciclo antroponótico) ou em reservatórios animais (ciclo zoonótico). Interessante ressaltar que somente as fêmeas são hematófagas (KUMAR; ENGWERDA, 2014). Atualmente, 30 espécies de flebotomíneos são vetores comprovados ou suspeitos de serem transmissores de *Leishmania*, apesar de existirem cerca de 1000 espécies diferentes (DESJEUX, 2004).

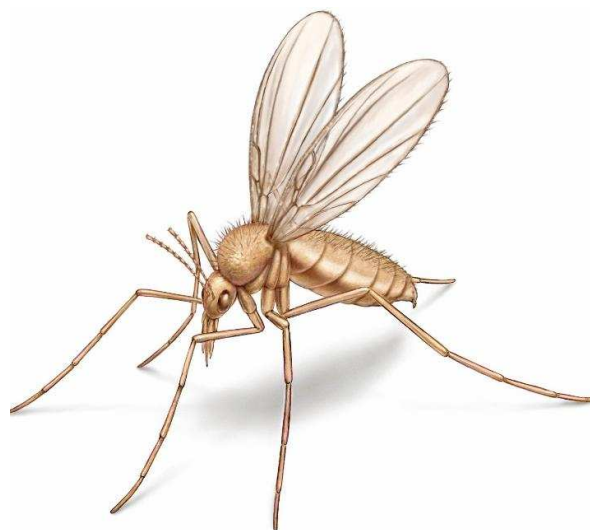


Figura 1. Desenho esquemático de flebotomíneo. Geralmente não ultrapassam 0,5 cm de comprimento. Possuem pernas longas e delgadas, o corpo densamente piloso. Quando em repouso, mantêm a posição característica, com asas entreabertas e levantadas. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014.

O ciclo de vida de *Leishmania* é marcado pela presença de duas diferentes formas características: a forma amastigota (célula imóvel, internalizada em fagócitos mononucleares de hospedeiros mamíferos) e forma promastigota (célula com flagelo, extracelular, presentes no intestino do flebotomíneo) (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). O ciclo se inicia quando o hospedeiro vertebrado é picado pela fêmea do flebotomíneo infectada, que inocula a forma infectante (promastigotas metacíclicas) durante o repasto sanguíneo (KAYE; SCOTT, 2011). A *Leishmania* é depositada por meio da glândula salivar juntamente com uma mistura de secreção salivar e uma série de proteínas, fundamentais para o processo de infecção e sobrevivência do parasito (CARREGARO *et al.*, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2005). Uma vez internalizados por macrófagos, histiócitos ou monócitos, os parasitos perdem o flagelo e se transformam em amastigotas intracelulares que se alojam em fagossomos, dando início a uma intensa multiplicação por divisão binária, que culmina com o rompimento da célula. As formas amastigotas então se disseminam pelas vias linfáticas e hematogênicas, levando a uma reação inflamatória que atrai novas células fagocíticas, gerando um ciclo vicioso (BASANO *et al.*, 2004). O flebotomíneo se infecta ao se alimentar de sangue do indivíduo doente e ingerir formas amastigotas. Estas se desenvolvem exclusivamente no intestino médio e anterior do vetor (LAINSON *et al.*, 2010), onde se diferenciam em promastigotas e, em

processo denominado metaciclo, evoluem para as formas promastigotas metacíclicas (formas infecciosas). Durante o próximo repasto sanguíneo, o flebotômio infectará um novo indivíduo (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Esta etapa de desenvolvimento no vetor é essencial para que o parasito sofra alterações bioquímicas e morfológicas para driblar o sistema imunológico do vetor e adquirir um estágio de infecciosidade essencial para a manutenção do ciclo (GARG *et al.*, 2005). A Figura 2, demonstra de forma resumida o ciclo de vida de *Leishmania*.

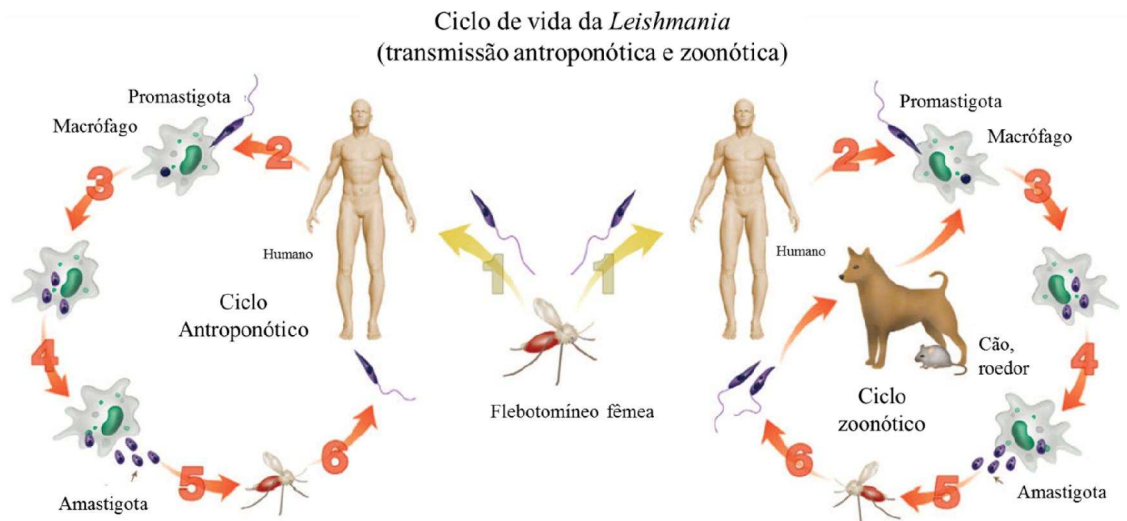


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania*. Adaptado de KUMAR; ENGWERDA, 2014.

Os macrófagos estão presentes em todos os tecidos do corpo, o que garante às formas amastigotas do parasito um fácil e seguro meio de disseminação pelo organismo do hospedeiro, causando um amplo espectro de danos corporais. Na pele, esses danos se manifestam sob a forma de lesões cutâneas (difusa ou localizadas); nas mucosas, sob a forma de leishmaniose mucocutânea. A infecção pode ainda se disseminar pelas vísceras, levando ao quadro de LV, a forma mais grave (LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006). Os parasitos também podem invadir, dentre outros, órgãos como nódulos linfáticos, medula óssea e pulmões (DUARTE *et al.*, 1989). Há estudos que relatam também a presença de parasitos no cérebro (LASKAY *et al.*, 1995). O tipo e o grau de patologia que será desenvolvida pelo hospedeiro vai depender de sua condição nutricional, imunológica, de seus fatores genéticos, das condições biológicas do vetor, além de fatores ambientais e sociais (DUARTE *et al.*, 1989; MCMAHON-PRATT, 2004). Pacientes que são

infectados por espécies diferentes de *Leishmania* apresentam manifestações clínicas diferentes, porém há pacientes que são infectadas pelo mesmo tipo de *Leishmania* e desenvolvem sintomas diferentes, inclusive com resposta ao tratamento diferenciada (BERMAN *et al.*, 1997; ZIJLSTRA, 2003). As explicações para estes achados ainda não são bem entendidas.

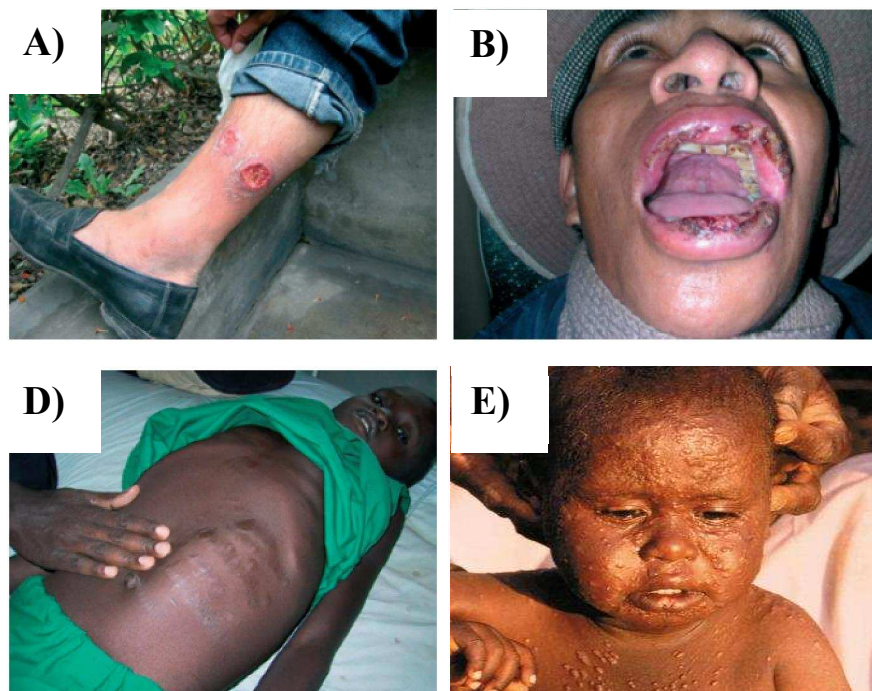


Figura 3. Sinais clínicos da Leishmaniose. A) Lesão cutânea; B) Lesão mucocutânea; C) criança com leishmaniose visceral; D) Paciente com leishmaniose dérmica pós-Kala Azar (manifestação dérmica que pode surgir em pacientes que apresentaram o quadro de Kala Azar, mesmo após 20 anos de tratamento, adequado ou não). Adaptado de CHAPPUIS *et al.*, 2007.

2.2 A Leishmaniose Visceral

A LV, popularmente conhecida como Kala Azar ou Calazar, é causada pela *L. infantum chagasi* no Novo Mundo e pela *L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo (KUMAR; ENGWERDA, 2014). É a forma mais severa da doença. Nesta variante, os parasitos têm preferência por infectar macrófagos de órgãos viscerais e são frequentemente encontrados no baço e fígado, causando esplenomegalia e hepatomegalia, respectivamente (CHAPPIUS *et al.*, 2007). Quando não tratada, leva à morte (CROFT; COOMBS, 2003). Cerca de 90% dos casos ocorrem no Nepal, Bangladesh, Brasil, Sudão e Índia, sendo o último onde ocorre o maior número de casos (cerca de 10.000 ao ano)

(BERN *et al.*, 2012; DESJEUX, 2004). A Figura 4 mostra a o estado epidemiológico da LV no mundo em 2013, segundo dados da OMS.

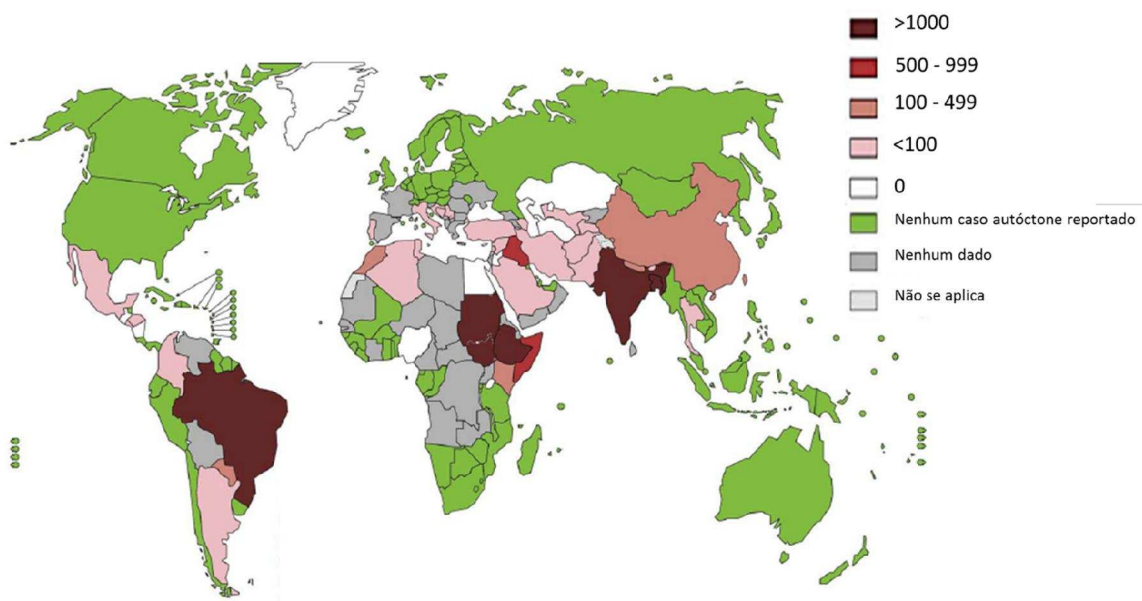


Figura 4. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral no mundo, registrados em 2013. (OMS, 2013).

As manifestações clínicas da LV são caracterizadas pelo acometimento dos órgãos viscerais, como resultado da proliferação dos parasitos em células fagocitárias do fígado, baço, medula óssea e órgão linfoides. O período de incubação é de cerca de 10 dias, podendo se estender para mais de um ano. Os sintomas iniciais incluem febre, náuseas, anorexia, perda de peso, dores abdominais, calafrio, hepato e esplenomegalia, imunossupressão e pancitopenia. A gravidade e o surgimento dos sintomas estão intimamente relacionados com as condições imunológicas e nutricionais do paciente (KEVRIC *et al.*, 2015; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Pacientes que apresentam o vírus HIV são mais susceptíveis de desenvolverem complicações relacionadas com a LV, podendo exacerbar uma infecção sintomática inicial grave ou reativar uma infecção já resolvida. Em casos onde ambas as infecções estão ativas e instaladas, é observada uma elevada taxa de replicação do vírus HIV, caracterizando um efeito sinérgico negativo em ambas as infecções. Tal fato se justifica devido as similaridades entre as células imunes alvos, o que leva a um processo crônico de estimulação do sistema imunológico (ALEMAYEHU *et al.*, 2016; LAULETTA *et al.*, 2016).

Alguns pacientes, principalmente aqueles localizados na Índia e Sudão, que são infectados por *Leishmania donovani*, podem apresentar após meses ou anos de tratamento um quadro clínico conhecido com Leishmaniose Dérmica Pós-Kalazar (LDPK) (Figura 3D), caracterizado por fulminante e progressiva proliferação de parasitos remanescentes na pele. Surgem máculas difusas e despigmentadas e lesões nodulares por toda a extensão do corpo. As biópsias das lesões demonstram a presença de macrófagos infectados por amastigotas com o mesmo perfil genético do parasito que levou ao quadro de LV (ALEMAYEHU *et al.*, 2016; HANDLER *et al.*, 2015; KEVRIC *et al.*, 2015).

A LV é causada por protozoários do complexo *donovani*: *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* no Velho Mundo e *L. infantum chagasi* no Novo Mundo (HERWALDT *et al.*, 1999; SINGH; SIVAKUMAR, 2004). Em 2006, no Irã, foi relado o primeiro caso de LV causado por *Leishmania tropica* (ALBORZI *et al.*, 2006). Nas Américas, a LV é causada pelo agente etiológico *L. infantum chagasi*, sendo que, no Brasil, 90% dos casos registrados estão relacionados a esta espécie (SILVA *et al.*, 2007). Existe uma discordância com relação à nomenclatura utilizada no meio científico com relação à espécie de *Leishmania* causadora de LV nas Américas. Para muitos o termo *L. infantum* deve ser usado como sinônimo de *L. chagasi*, como proposto por Leblois em 2011 (LEBLOIS *et al.*, 2011). Para outros, as espécies apresentam diferenças moleculares sutis, que não permitem que estas duas espécies sejam reconhecidas como idênticas. Como existem muitas questões a serem esclarecidas em relação à origem, à identidade e à epidemiologia do agente causador da enfermidade nas Américas, Shaw publicou em 2006 (SHAW, 2006), uma declaração defendendo a ideia de que deveria ser adotada a nomenclatura defendida por Dantas-Torres, a de *L. infantum chagasi* (DANTAS-TORRES *et al.*, 2006), o que justifica a nomenclatura utilizada neste trabalho.

O primeiro caso de LV no continente Americano foi descrito por Carlos Chagas em 1911, após relatar quadros de esplenomegalias em crianças da Bacia Amazônica (CHAGAS *et al.*, 1911). No Brasil, o primeiro registro da doença ocorreu em 1913, como resultado da análise de material de necrópsia de um paciente vindo de Boa Esperança, no Mato Grosso, pelo pesquisador Migone no Paraguai (MIGONE, 1913).

Até a década de 90, a LV era considerada uma doença típica de zonas rurais, principalmente no nordeste brasileiro, em municípios de baixas condições socioeconômicas. No entanto, na última década, a enfermidade se disseminou para além das fronteiras rurais, alcançando os centros urbanos (COSTA *et al.*, 2007).

O aumento dos casos de LV no Brasil cresceu consideravelmente nos últimos anos: durante os anos 80, foram registrados cerca de 1500 casos por ano, de 2003 a 2008 o número de casos subiu para 4000 casos por ano e, de 2010 a 2014, este número saltou para 17.000 casos por ano, com mais de 1.100 mortes registradas em um quarto dos municípios brasileiros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; WERNECK *et al.*, 2016). O aumento acelerado dessa parasitose está diretamente relacionado com o nível socioeconômico da população, a falhas no acesso ao tratamento e a medidas preventivas, à migração da população de áreas endêmicas para áreas não endêmicas, às condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do *Lu. Longipalpis*, ao crescimento urbano desordenado e à concomitante presença de insetos vetores com animais domésticos, além do desmatamento (BARATA *et al.*, 2014; PRADO *et al.*, 2011; SALOMÓN *et al.*, 2015). É importante ressaltar neste cenário a presença dos cães domésticos (*Canis familiaris*) como principal reservatório do parasito (SHIMOZAKO *et al.*, 2017). Mesmo os cães assintomáticos apresentam um elevado parasitismo cutâneo.

Conter as leishmanioses é uma árdua e difícil tarefa, uma vez que existe uma diversidade de agentes, reservatórios, vetores e situações epidemiológicas, unidos ao conhecimento científico insuficiente em vários aspectos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Em 2006, o Ministério da Saúde lançou o PVCLV (Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral), cujo principal objetivo é conter o avanço, a morbidade e a letalidade da doença. As medidas incluem diagnóstico e tratamento imediato dos casos humanos, redução da população de flebotomíneos com a pulverização usando inseticidas com efeito residual e a eutanásia de cães soropositivos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Mesmo com todas essas medidas, casos autóctones de LV vêm aumentando em áreas urbanas endêmicas. Segundo o Ministério da Saúde, existem diversos problemas relacionados com o cumprimento da PVCLC, tais como a descontinuidade do programa de controle, seja por falta de recursos ou por falta de interesse das autoridades locais, ou ainda pela recusa da população em receber os técnicos nas residências para o controle químico dos vetores e para o controle do reservatório canino (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; ZUBEN *et al.*, 2016).

Como exposto até o momento, há inúmeros desafios no tocante ao controle da LV. O tratamento de humanos infectados ainda é a melhor e a principal ferramenta de controle (MORAIS *et al.*, 2015). Um grande problema relacionado ao combate à LV em todo o mundo está relacionado com o crescente número de casos humanos resistentes aos Antimoniais Pentavalentes e à Anfotericina, drogas de primeira e segunda escolhas para

o tratamento, respectivamente (ROJAS *et al.*, 2006). Além disso, tem-se aumentado o uso de fármacos destinados ao tratamento humano em cães, onde o sucesso terapêutico é nulo e os parasitos permanecem após o tratamento, com grandes chances de recidivas da infecção. Isto aumentam as possibilidades dos parasitos desenvolverem resistência aos medicamentos utilizados no tratamento da LV em humanos (CLAUDIA; SILVA, 2008).

Diante do exposto, torna-se clara a necessidade de se desenvolverem novas formulações, novos fármacos e novas estratégias terapêuticas que possam ser utilizadas no combate e/ou controle da LV tanto em humanos quanto em cães (REIS *et al.*, 2010; ROATT *et al.*, 2014).

2.3 O Tratamento da Leishmaniose Visceral

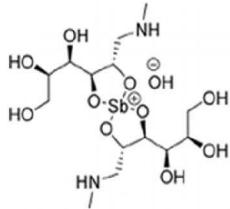
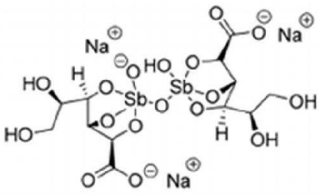
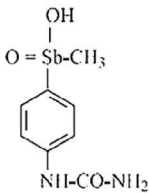
Atualmente existem aproximadamente 25 princípios farmacêuticos disponíveis em uso que mostram efeito leishmanicida, mas poucos apresentam uma boa relação custo/benefício. O tratamento de escolha para leishmaniose inclui os Antimoniais Pentavalentes. Em muitos casos, outras drogas como a Anfotericina B, a Pentamidina, a Miltefosina e Aminosídeos podem ser também usados (MONZOTE, 2009; PELISSARI *et al.*, 2011).

O grande problema relacionado ao tratamento das leishmanioses é a alta toxicidade das drogas, além dos diversos e incômodos efeitos adversos, que muitas vezes levam o paciente a abandonar o tratamento e ao surgimento de cepas resistentes (COELHO, 2016; YASUR-LANDAU *et al.*, 2016). Junte-se a isto os altos custos relacionados ao tratamento (profissionais treinados, material hospitalar, internações e etc.). A junção de todos os detalhes se torna um empecilho ao tratamento adequado.

Os **Antimoniais Pentavalentes** (Tabela 1) são as drogas de escolha para o tratamento de todas as formas clínicas de leishmaniose. Após sua administração, apresenta uma alta concentração no plasma, fígado e baço. No fígado, ele é convertido em sua forma trivalente, aparentemente a mais tóxica (FRÉZARD *et al.*, 2009; SUNDAR *et al.*, 2010). O mecanismo de ação preciso do antimoniais ainda prevalece um enigma, mas sabe-se que sua ação leishmanicida depende da sua redução *in vivo* de Sb^v para a Sb^{III} e que somente as formas amastigotas são susceptíveis (FRÉZARD *et al.*, 2009). Acredita-se que o Sb^v atue sobre vários alvos, tais como no processo bioenergético do parasito, por inibir a glicólise, na beta-oxidação de ácidos graxos e na fosforilação de ADP (OUELLETTE *et al.*, 2004). Também é sugerido que ele possa causar um bloqueio não-específico dos grupos -SH das proteínas nas formas amastigotas, causando a inibição

da DNA topoisomerase I (CHAKRABORTY; MAJUMDER, 1988). Mais recentemente, foi demonstrado que os derivados antimoniais podem alterar o potencial eletroquímico dos tiois, em ambas as formas evolutivas do parasito, por promover o efluxo ativo de tiois, glutationa e tripanotona, tornando o parasito mais susceptível ao estresse oxidativo (OUELLETTE *et al.*, 2004). O longo tempo de tratamento permite que altos níveis da droga se acumule nos tecidos, principalmente fígado e baço. O tratamento com derivados de antimônio causa uma série de efeitos adversos, tais como mialgia, náuseas, vômito, pancreatite, arritmia cardíaca e hepatite, levando muitas vezes ao término do tratamento antes do tempo estipulado (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). Atualmente, várias limitações têm reduzido o uso dos antimoniais: a eficácia variável contra Leishmaniose cutânea e LV, assim como o aumento do número de formas resistentes. A recomendação tem sido a troca de antimoniais por Anfotericina B em zonas refratárias (SINGH; SIVAKUMAR, 2004).

Tabela 1. Estrutura química de Antimoniais Pentavalentes empregados na clínica médica. Adaptado de RUTH *et al.* (2003).

Estrutura química	Nome químico / comercial
	Antimoniato de N-metilglucamina / Glucantime®; Antimoniato de Meglumina
	Gluconato de Antimônio (V) Sódico ou Estibogluconato de Sódio / Pentostam® ou Solustibosan®
	Uréia Estibamina / Estibamine®

No final da década de 1990, foram desenvolvidas novas formulações farmacêuticas visando diminuir a toxicidade da Anfotericina B. Em geral, estas formulações são bem absorvidas pelo sistema fagocítico mononuclear, no qual as formas amastigotas de *Leishmania* residem, sendo pouco absorvidas pelo rim, o órgão alvo de toxicidade do

fármaco (FILIPPIN; SOUZA, 2006; LINCOPAN *et al.*, 2005; SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004).

A **Pentamidina** (Figura 6), um derivado aromático de diaminas, apresenta atividade antitripanossomatídea, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral. É originalmente utilizada no tratamento de tripanossomatídeos na África e, desde 1939, foi demonstrado seu efeito leishmanicida. A concentração da droga mostra-se consideravelmente alta no fígado, rins e baço (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998). As diamidinas interferem na síntese de poliaminas, inibindo a utilização de S-adenosil-L-metionina por inibir enzimas como a ornitina descarboxilase e a espermidina sintetase, impedindo assim a síntese de moléculas importantes para a manutenção da vida do parasito (BACHARACH *et al.*, 1979; BASSELIN *et al.*, 1997). Além disso, elas são capazes de se ligar ao DNA em regiões ricas em sequências A – T (adenina – timina) (MISHRA *et al.*, 2007; SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004). A Pentamidina usada no tratamento da leishmaniose cutânea apresentou-se menos tóxica do que os Antimoniais Pentavalentes, embora tenham sido observados alguns efeitos adversos expressivos, como mialgia, dor no local da administração, náusea, dor de cabeça e hipotensão. Entretanto, para o tratamento da leishmaniose visceral, como é necessária a administração de altas doses de Pentamidina, os efeitos tóxicos observados são maiores do que os apresentados pelos Antimoniais Pentavalentes, havendo exacerbação dos efeitos já citados e a incidência de taquicardia e hiperglicemia (BASSELIN *et al.*, 2002). Em geral, o uso dessa droga tem declinado devido à baixa eficácia e à alta toxicidade.

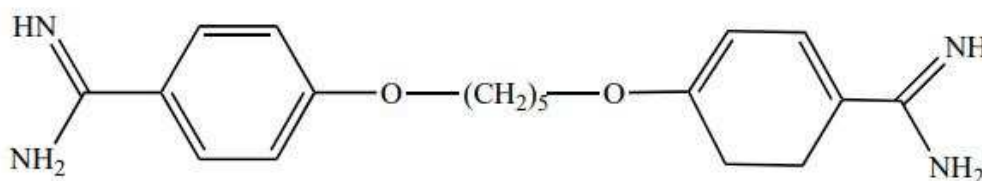


Figura 6. Estrutura química da Pentamidina. Fonte: MONZOTE, 2011.

A **Miltefosina** (Figura 7), também conhecida como Hexadecilfosfocolina, é uma alquilfosfocolina desenvolvida originalmente para o tratamento de câncer (UNGER *et al.*,

1989). O fármaco vem sendo utilizado na Índia para o tratamento de pacientes com leishmaniose refratária ao tratamento convencional com Antimoniais, apresentando resultados bastante promissores (SINDERMAN *et al.*, 2004). Atualmente, desponta como a melhor alternativa para o tratamento da LV, uma vez que o fármaco pode ser administrado por via oral, ao contrário de outros (SUNDAR *et al.*, 1998). O mecanismo de ação leishmanicida deste composto pode ser extrapolado a partir de seu efeito sobre as células de mamíferos, onde provoca a modulação de receptores de superfície celular, o metabolismo de inositol, a ativação de fosfolipases, proteínas cinases C e outras vias mitógenas que levam à apoptose (VERMA; DEY, 2004). Os efeitos adversos da Miltefosina incluem distúrbios gastrointestinais e toxicidade renal, que são reversíveis após o tratamento. O principal problema relacionado à terapia com este fármaco diz respeito aos seus efeitos teratogênicos, sendo contraindicado em gestantes (COELHO, 2016). Por outro lado, a Miltefosina tem mostrado ótimos resultados no tratamento de LV em pacientes imunodeficientes ou imunocomprometidos (SUNDAR *et al.*, 2002).

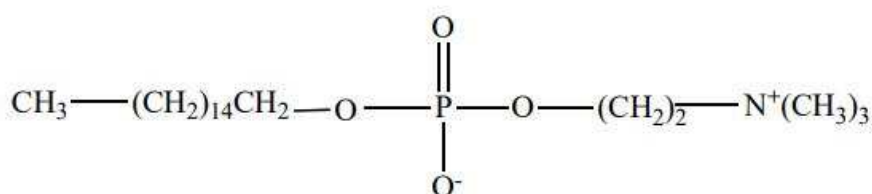


Figura 7. Estrutural química da Miltefosina. Fonte: MONZOTE, 2011.

A **Paromomicina** (aminosidina) (Figura 8) é um antibiótico aminoglicosídeo extraído de *Streptomyces rimosus*, licenciado na Europa para o tratamento parenteral de infecções bacterianas. Seu mecanismo de ação consiste na inibição de síntese proteica, por sua ligação a proteínas ribossômicas, induzindo a leitura equivocada do RNA mensageiro. Desta forma, a droga interfere no complexo de formação de peptídeos, causando ruptura dos polissomos em monossomos não funcionais. A Paromomicina é diferente da neomicina B somente na substituição de uma OH por uma amina (-NH₂) e possui um espectro de atividade parasitária que não é apresentado por outro antibiótico aminoglicosídeo (ETIT; ERO, 1997; KIM *et al.*, 2009; SOARES-BEZERRA *et al.*,

2004). Os efeitos colaterais mais comuns associados à Paromomicina são otites e disfunções hepáticas, e dependendo da formulação, alguns pacientes apresentaram também quadros de pruridos na pele (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998).

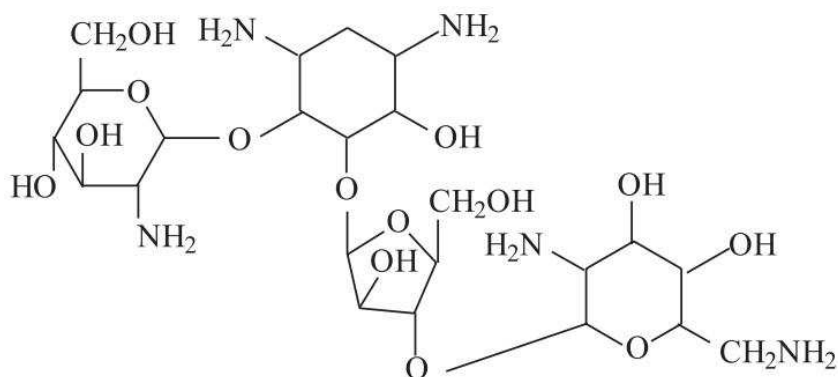


Figura 7. Estrutura química da Paromomicina. Fonte: RUTH *et al.*, 2003.

Merecem destaque também outras drogas que também são usadas clinicamente no tratamento das leishmanioses, tais como:

Drogas anti-retrovirais: utilizadas em tratamentos de pacientes que apresentam quadro de infecção pelo HIV. Foi observado que pacientes co-infectados que faziam uso de Indinavir (Figura 9A) e Saquinavir (Figura 9B), duas drogas inibidoras de proteases do HIV, apresentavam atividade farmacológica contra *L. major* e *L. infantum chagasi*. Estes achados sugerem que novos estudos devem ser realizados para se observar a ação de tais drogas sob as formas amastigotas de *Leishmania*, para validar a real contribuição das mesmas no tratamento de leishmanioses (COSTA *et al.*, 2016; DEMARCHI *et al.*, 2012; SAVOIA *et al.*, 2005).

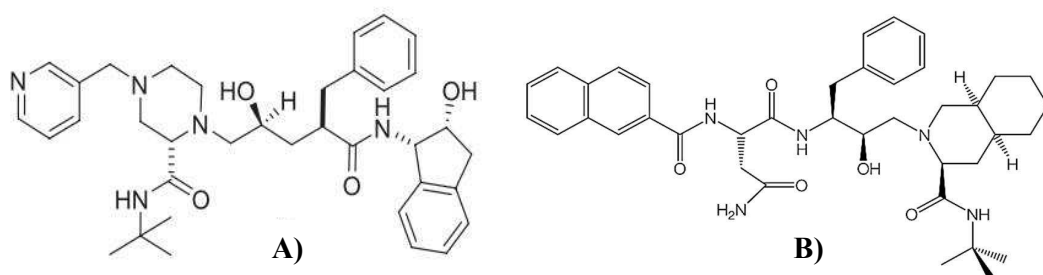


Figura 9. Estrutura química: A) Indinavir e B) Saquinavir. Fonte: SANGI, 2016.

Imunomoduladores: a cura para as leishmanioses parece depender de uma resposta imune efetiva, a qual ativa macrófagos para produzirem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio com o intuito de matar as formas amastigotas intracelulares. Porém, este processo pode ser suprimido durante a infecção.

Uma alternativa ao tratamento das leishmanioses seria a associação de drogas leishmanicidas com produtos que estimulem o sistema imunológico. A proposta é aumentar o poder da resposta imune por ativação dos macrófagos e aumentar a produção de espécies reativas para eliminar a infecção (BANERJEE *et al.*, 2004; MURRAY *et al.*, 2003). O primeiro estudo usando imunomoduladores fez a associação entre IFN- γ humano e drogas Antimoniais para a terapia de LV em pacientes no Kenia e na Índia (SUNDAR *et al.*, 1997). O grande problema relacionado aos imunomoduladores é o preço exorbitante para uma população pobre. Portanto, essa possibilidade precisa ser mais explorada a fim de se encontrar alternativas mais baratas e mais efetivas.

O aumento da ausência de resposta às muitas monoterapias dá espaço à combinação terapêutica no tratamento das leishmanioses. A combinação de drogas leishmanicidas pode reduzir o potencial tóxico, prevenir a resistência, além de aumentar o espectro de ação da terapia (SINGH *et al.*, 2016). A Paromomicina tem sido usada associada ao Estibugluconato de Sódio no tratamento de LV no Sudão, demonstrando resultados satisfatórios (MELAKU *et al.*, 2007; THAKUR *et al.*, 1992).

Nas últimas décadas tem-se observado o surgimento de um novo ímpeto para a descoberta de novas drogas leishmanicidas, seja por causa dos novos conhecimentos acerca da biologia, das vias metabólicas e do genoma do parasito, ou por causa da evolução de novas técnicas químicas, ou pelos vários avanços nas ferramentas de bioinformática. Fato é que atualmente o desenvolvimento de drogas tanto de fontes naturais quanto sintéticas tem importância relevante na pesquisa por terapias alternativas e mais eficazes.

Os produtos naturais são uma potencial fonte de uma substâncias químicas com características notáveis. Vastas informações têm-se acumulado nos últimos anos sobre produtos naturais com atividade leishmanicida e com resultados satisfatórios (ADEBAYO *et al.*, 2013; ALMEIDA, 2011; BARROS *et al.*, 2013; DAGNINO *et al.*, 2015; ISLAMUDDIN *et al.*, 2014; LAGE *et al.*, 2015; PATIL *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2015). Muitos estudos revelaram novas fontes de novos produtos em microrganismos ou em ambiente marinho, como é o caso de uma glicoproteína isolada da

espécie marinha *Pachymatisma johnstonii*, que mostra um elevado potencial leishmanicida *in vitro* contra *L. donovani*, *L. braziliensis* e *L. maxicana* (LE PAPE, 2000), e a afidicolina (Figura 10), um metabólito isolado da *Nigrospora sphaerica*, que inibe o crescimento de formas amastigotas e promastigotas de *L. donovani* (KAYSER *et al.*, 2001).

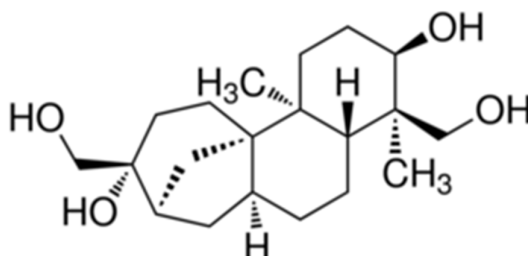


Figura 10. Estrutura química Afidicolina. Fonte: SANTOS, 2012.

Ainda assim, as plantas são a fonte mais explorada. Vários estudos mostram a validação das propriedades leishmanicidas de vários extratos de plantas de diferentes regiões geográficas, como Brasil (TEMPONE *et al.*, 2008), México (PERAZA-SANCHEZ *et al.*, 2007), Colômbia (WENIGER *et al.*, 2001) e Peru (KVIST *et al.*, 2006). Apesar de parecer promissor, muitos estudos falharam devido à alta citotoxicidade desses extratos para células de mamíferos, à complicada forma de extração ou à dificuldade de se conseguir uma via alternativa de síntese (KINGSTON; NEWMAN, 2005).

A química medicinal é uma ciência recente aplicada diretamente no desenvolvimento de novas drogas devido aos avanços tecnológicos, principalmente na áreas molecular, de biologia estrutural e de química computacional. As modificações em uma molécula original para se obter um novo composto têm sido um sucesso para o desenvolvimento de novas drogas baseado no conhecimento sobre o alvo molecular no parasito (LIÑARES *et al.*, 2006; NWAKA; HUDSON, 2006; YOSHINO *et al.*, 2015). A substituição, eliminação ou adição de um determinado grupo farmacofórico pode ajudar a aumentar ou modular as características farmacocinéticas e toxicológicas de uma determinada droga. Estes aparatos, junto com as ferramentas de bioinformática, têm possibilitado uma pesquisa virtual por novas drogas potenciais (LIÑARES *et al.*, 2006). Em paralelo, o delineamento de inibidores específicos é explorado como uma possibilidade no controle do crescimento de parasitos sem prejudicar o hospedeiro (SANTOS *et al.*, 2008). Muitos dos alvos promissores são as topoisomerases (DAS *et al.*,

2006), cinetoplastos (MOTTA, 2008), ácidos graxos e vias de esteróis (ROBERTS *et al.*, 2003), dentre outros. Muitos produtos sintetizados apresentam potencialidade como leishmanicida. Como exemplo, os azasteróis, inibidores da 24-metiltransferase, que mostram ação contra as formas promastigotas da *L. donovani* e amastigotas axênicas da *L. amazonensis* (GIGANTE *et al.*, 2009). A síntese de produtos tem sido considerada um sucesso com muitas vantagens, tais como: custo, tempo de obtenção e maior quantidade na produção (KINGSTON; NEWMAN, 2005). No entanto, as novas moléculas sintetizadas podem apresentar alta toxicidade e, ainda, poucas foram estudadas clinicamente.

2.3.1 Derivados Triazólicos e de Benzofenonas

As leishmanioses são um problema de saúde pública em muitos países do mundo. Atualmente, a quimioterapia é a principal arma para combater a infecção. Algumas drogas são comercialmente disponíveis como, por exemplo, Antimônio Pentavalente, Anfotericina B, Pentamidina e Miltefosine. No entanto, os avanços na farmacologia estão sob constante mudança devido às necessidades de se inovar. A pesquisa com base em conhecimento sobre genoma dos parasitos, informações de drogas para outras infecções ou patologias, síntese de novos compostos utilizando o conceito racional de drogas e compostos isolados a partir de novas fontes naturais podem dar uma solução mais eficiente e disponível para o tratamento da leishmaniose. Partindo deste pressuposto, este estudo buscou avaliar a citotoxicidade e o potencial efeito leishmanicida *in vitro* de diferentes derivados químicos originados de duas classes de compostos sintéticos: os Triazólicos e as Benzofenonas.

Os **derivados Triazólicos** são compostos heterocíclicos caracterizados pela presença de três átomos de nitrogênio e dois átomos de carbono presentes em sua estrutura (Figura 11). Estes têm despertado importante interesse nas comunidades científica e industrial por suas aplicações, que vão desde a síntese de agroquímicos e fármacos até a fabricação de explosivos.

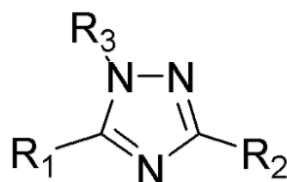


Figura 11. Estrutura química do triazol. Fonte: EICHER *et al.*, 2003.

Alguns compostos triazólicos são amplamente utilizados como antifúngicos na indústria farmacêutica, como é o caso do fluconazol, itraconazol e cetoconazol. Todos são drogas bem conhecidas e toleradas. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da 14- α -demetilase, enzima chave na via de síntese dos esteróis, presentes na membrana celular de fungos e também na membrana celular do parasito *Leishmania* (ZVULUNO *et al.*, 2002). Partindo deste pressuposto, desde 1980, os antifúngicos triazólicos têm sido estudados como agentes leishmanicidas (MAERTENS, 2004). O itraconazol e cetoconazol (Figura 12), por exemplo, inibem o crescimento de formas amastigotas de leishmanias *in vitro* e estudos mostram resultados significativos no tratamento da leishmaniose cutânea (DROGA *et al.*, 1996; MOMENI *et al.*, 1996). Ensaio realizado com o triazólico SCH 56592, conhecido comercialmente por Noxafil, também mostraram resultados significativos no tratamento leishmaniose cutânea e visceral em modelos murinos experimentais (ABDELY *et al.*, 1999) (Figura 13). Ferreira e colaboradores (2007) demonstrou que os 1,2,3-triazóis 12 e 13 (Figura 14) possuem atividade leishmanicida significativa contra amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

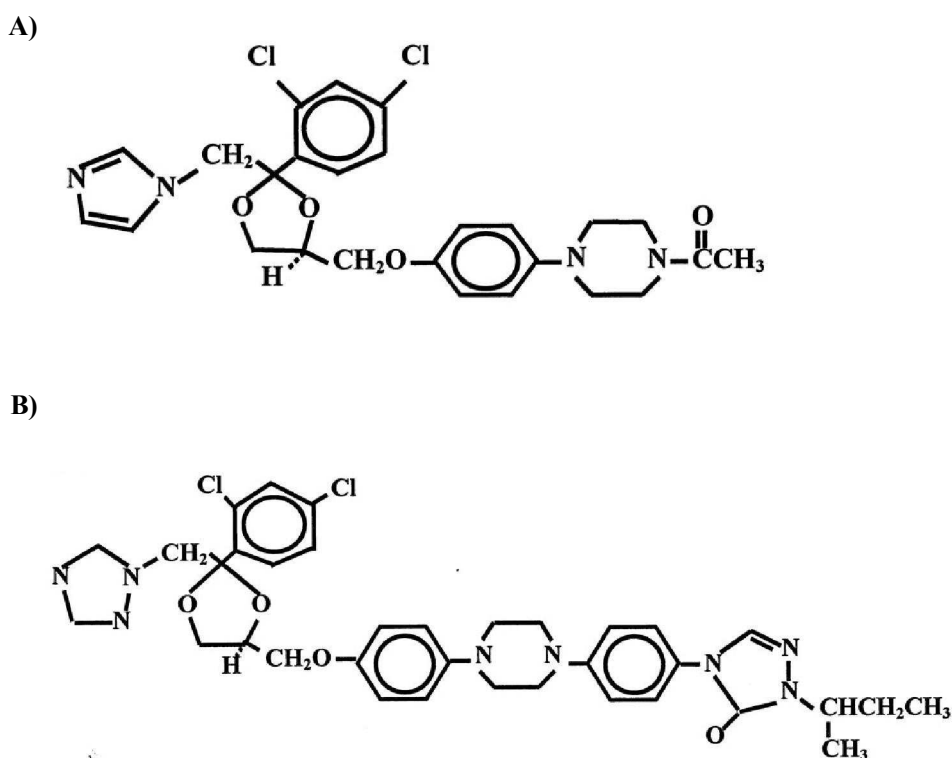


Figura 12. Estrutura química de: A) Cetoconazol; B) Itraconazol . Fonte: ABDELY *et al.*, 1999.

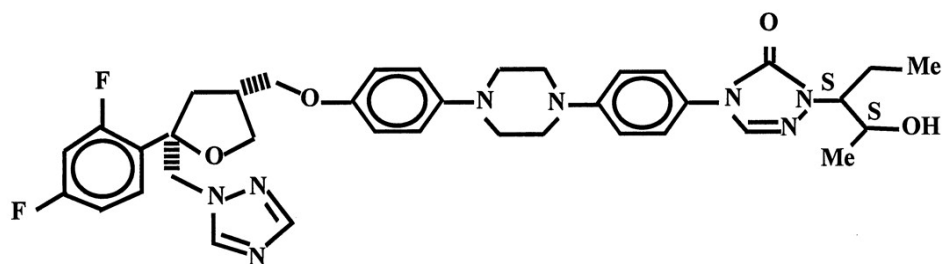


Figura 13. Estrutura química do SCH 56592. Fonte: ABDELY *et al.*, 1999.

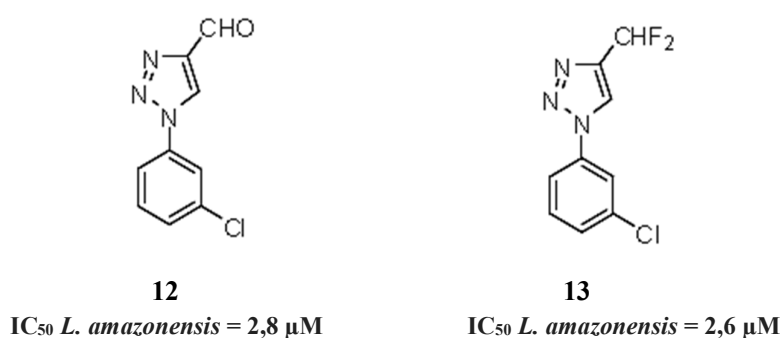


Figura 14. Triazóis com atividade leishmanicida. Fonte: FERREIRA *et al.*, 2007.

Com todas essas evidências presentes na literatura, o grupo de Agroquímica da Universidade Federal de Viçosa, liderado pelo Prof^o. Róbson Ricardo Teixeira, sintetizou um grupo de compostos triazólicos: os derivados da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H) – ona (Figura 15) e os derivados da indan-1,3- diona (Figura 16). É importante salientar que o mesmo grupo já havia sintetizado anteriormente isobenzofuranonas funcionalizadas no carbono 3 (Figura 17), e estes mesmos compostos apresentaram atividade leishmanicida significativa (PEREIRA *et al.*, 2015), além de trabalharem também com derivados de indandionas (Figura 18).

Apesar de as indandionas não apresentarem atividade leishmanicida comprovada, a versão comercial deste composto é versátil para ser utilizada em reações químicas por possuir dois hidrogênios ácidos, localizados entre as duas carbonilas. Além disso, diversas atividades biológicas são demonstradas por estes compostos: atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, através do uso de indandionas funcionalizadas (JEYACHANDRAN; RAMESH, 2011); atividade

antiproliferativa contra as linhagens celulares K562 e U937 (células leucêmicas) (TEIXEIRA *et al.*, 2013). Além disso, a indandiona pode facilmente ser funcionalizada fornecendo compostos com substituintes heterocíclicos.

A opção de reunir núcleos triazólicos, que apresentam atividade antifúngica e leishmanicida, a indandionas, gerando compostos heterocíclicos pareceu plausível para testes *in vitro* para a prospecção de novas drogas com potencial leishmanicida. O mesmo pode ser dito para os derivados triazólicos de isobenzofuranonas, onde a classe das isobenzofuranonas (STROBEL *et al.*, 2002) e a classe dos triazólicos (SHEEHAN *et al.*, 2009) apresentam atividade antifúngica e, que ambos, apresentaram de forma isolada atividade leishmanicida. São promissoras as chances de alguns desses compostos sintetizados apresentarem um potencial leishmanicida. Por isso, o interesse em se realizar os ensaios *in vitro*.

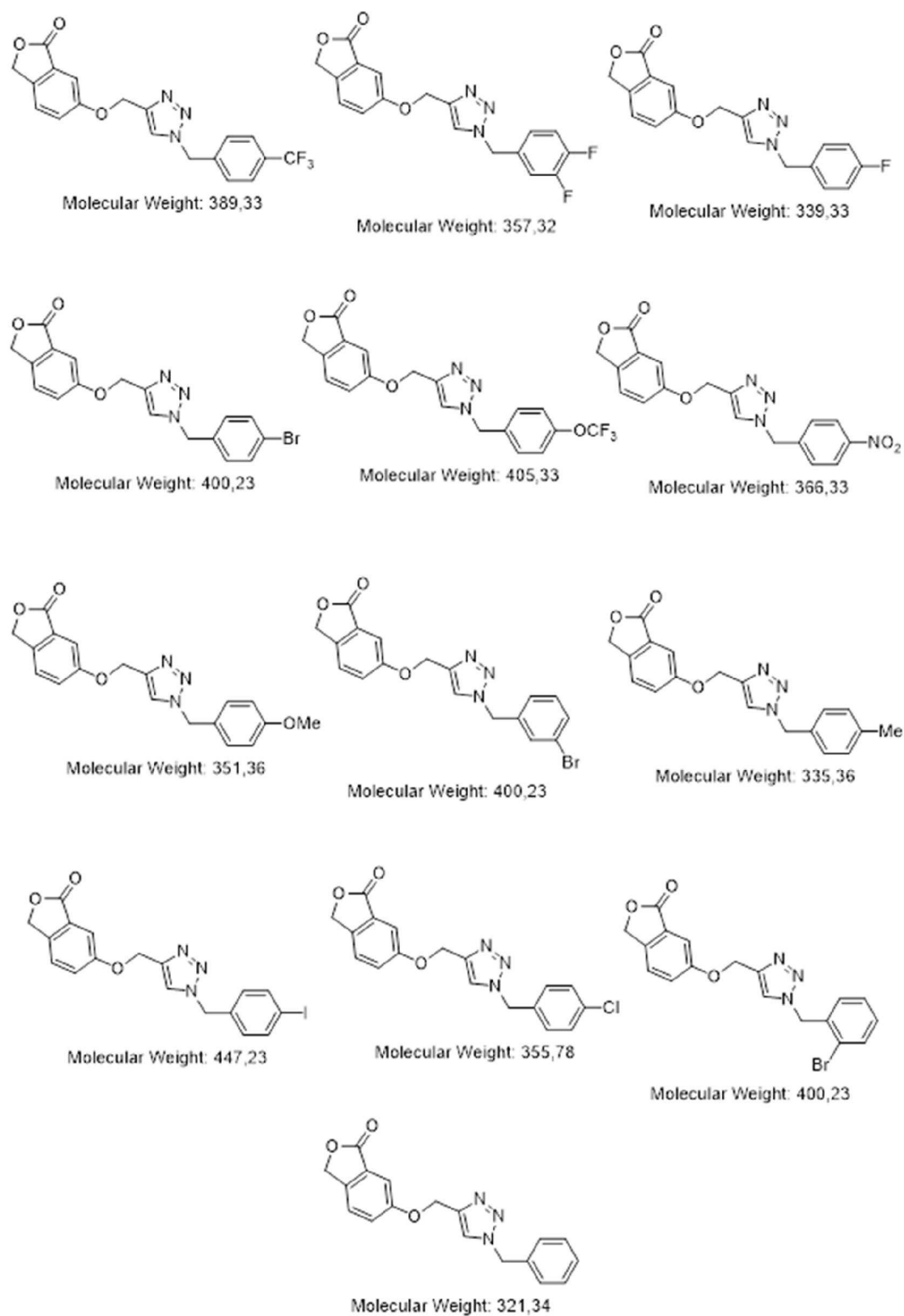


Figura 15. Triazóis derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H) – ona

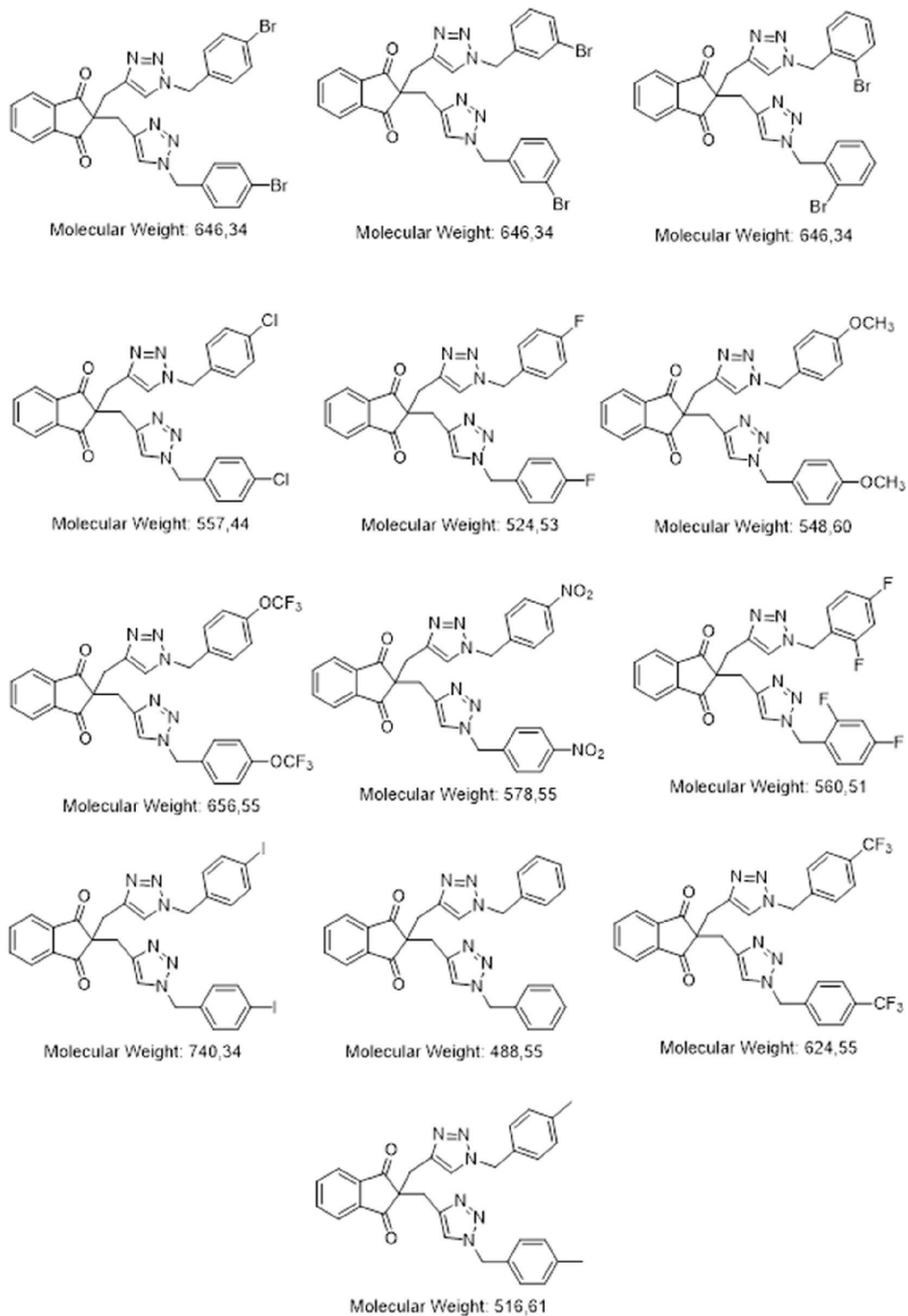


Figura 16. Triazóis derivados de indan-1,3- diona.

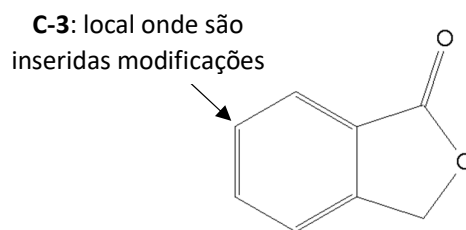


Figura 17. Estrutura química de uma isobenzofuranona . Fonte: PEREIRA *et al.*, 2015.

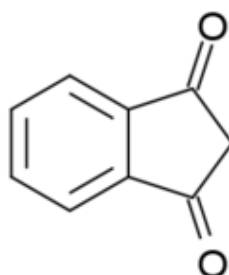


Figura 18. Estrutura química de uma indandiona. Fonte: PEREIRA, 2016.

As **Benzofenonas** (Figura 19) são cetonas aromáticas de origem natural, encontradas em flores, frutas, sementes e folhas de vegetais das famílias distintas: Clusiaceae, Hypericaceae, Olacaceae, Rosaceae, Myrtaceae, etc. (BERNARDI *et al.*, 2005). Dentre estas famílias, a Clusiaceae é a que mais se destaca, por se apresentar como uma ampla fonte de derivados naturais de benzofenonas. As benzofenonas têm sido isoladas principalmente de plantas, mas também já foram comprovadas outras fontes, como fungos (YOGANATHAN *et al.*, 2008; KRALJ *et al.*, 2006) e própolis (TRUSHEVA *et al.*, 2004).

Em sua forma básica, as benzofenonas, também denominadas difenilmetanonas, são encontradas sob a forma de cetona aromática e despertam interesse econômico e científico por apresentar inúmeras aplicações químicas e biológicas (REZENDE, 2012). Dentre suas ações biológicas se destacam: atividade antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa, anticancerígena (NAKAGAWA *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2012), antiviral, antibacteriana, antidepressiva e citotóxica (BAGGETT *et al.*, 2005;

SILVA, 2010). Já na indústria química, as benzofenonas são amplamente utilizadas como intermediários sintéticos, em cosméticos como fotoestabilizador, como protetor solar, na produção de produtos agroquímicos e farmacêuticos (TAKEMOTO *et al.*, 2002; RHODES *et al.*, 2007; REZENDE, 2012). Sua obtenção pode ser por meio sintético ou a partir de flores, frutas, folhas e sementes (HENRY *et al.*, 1999; NAKAGAWA *et al.*, 2000).

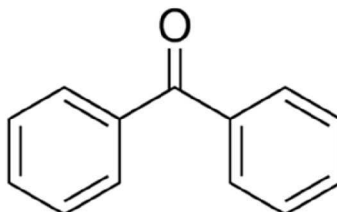


Figura 19. Estrutura química de uma benzofenona.

Na literatura, há relatos da ação leishmanicida de alguns derivados de benzofenonas (SANTA-CECÍLIA *et al.*, 2011) (Figura 20). Pereira e colaboradores (2010) isolaram benzofenonas dos frutos da *Garcinia brasiliensis*. Estes compostos apresentaram atividade significativa contra as formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis*. O interessante é que estes compostos apresentaram baixa citotoxicidade para células de mamíferos. Uma outra benzofenona, extraída das sementes de *Platonia insignis*, da família *Clusiaceae*, também demonstrou resultados significativos nos ensaios de citotoxicidade contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* (COSTA JÚNIO *et al.*, 2013).

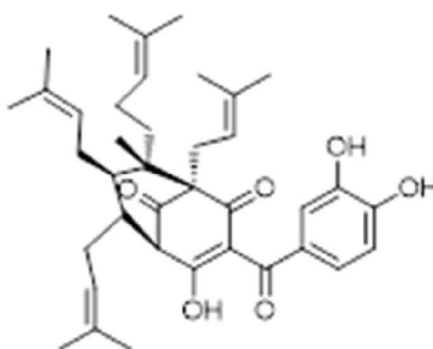


Figura 20. Derivado de benzofenona com ação leishmanicida, isolado de espécies da família Clusiaceae. Fonte: SANTA-CECÍLIA *et al.*, 2011.

Além da ação leishmanicida demonstrada por algumas benzofenonas, existem dados na literatura que comprovam a sua ação antifúngica: uma benzofenona poliprenilada, isolada de um extrato etanólico de *Cuban própolis*, apresentou relativa atividade antifúngica contra vários Actinomicetos (RUBIO *et al.*, 1999). Derivados clorados de benzofenonas, extraídos de cultura de fungos endofíticos da espécie *Pestalotiopsis adusta*, mostrou atividade significativa contra fungos da espécie *Fusarium culmorum* e *Gibbella zeae*.

Novamente, o grupo de pesquisa liderado pelo Profº. Róbson Ricardo Teixeira associou núcleos triazólicos (com ação antifúngica, mencionada anteriormente) a benzofenonas (também com ação antifúngica e leishmanicida comprovadas), com o objetivo de se produzir derivados de benzofenonas contendo núcleo 1,2,3-triazólico (Figura 21). O propósito de se avaliar o potencial efeito leishmanicida destes compostos é basicamente os mesmos apresentados pelos derivados triazólicos: contribuir com o campo da pesquisa de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses

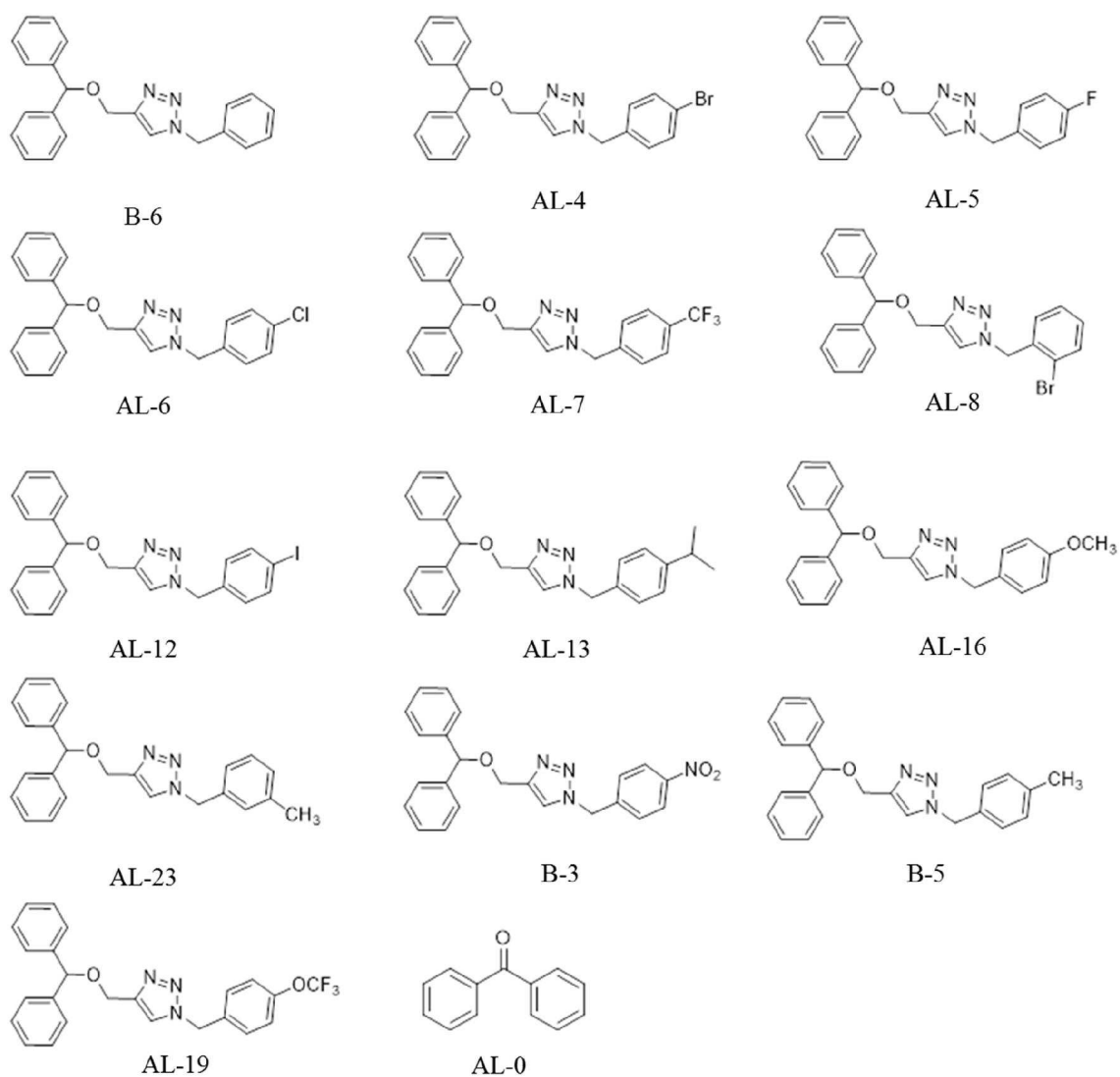


Figura 21. Derivados de Benzofenona contendo núcleo 1,2,3-triazólico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a citotoxicidade e a atividade leishmanicida *in vitro* dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e da indan-1,3-diona e de compostos derivados de Benzofenonas em macrófagos RAW 264.7 e nas formas promastigotas e amastigotas do parasito *L. infantum chagasi*.

3.2 Objetivos específicos

São divididos em duas fases:

Primeira fase: testes de drogas *in vitro* por métodos tradicionais

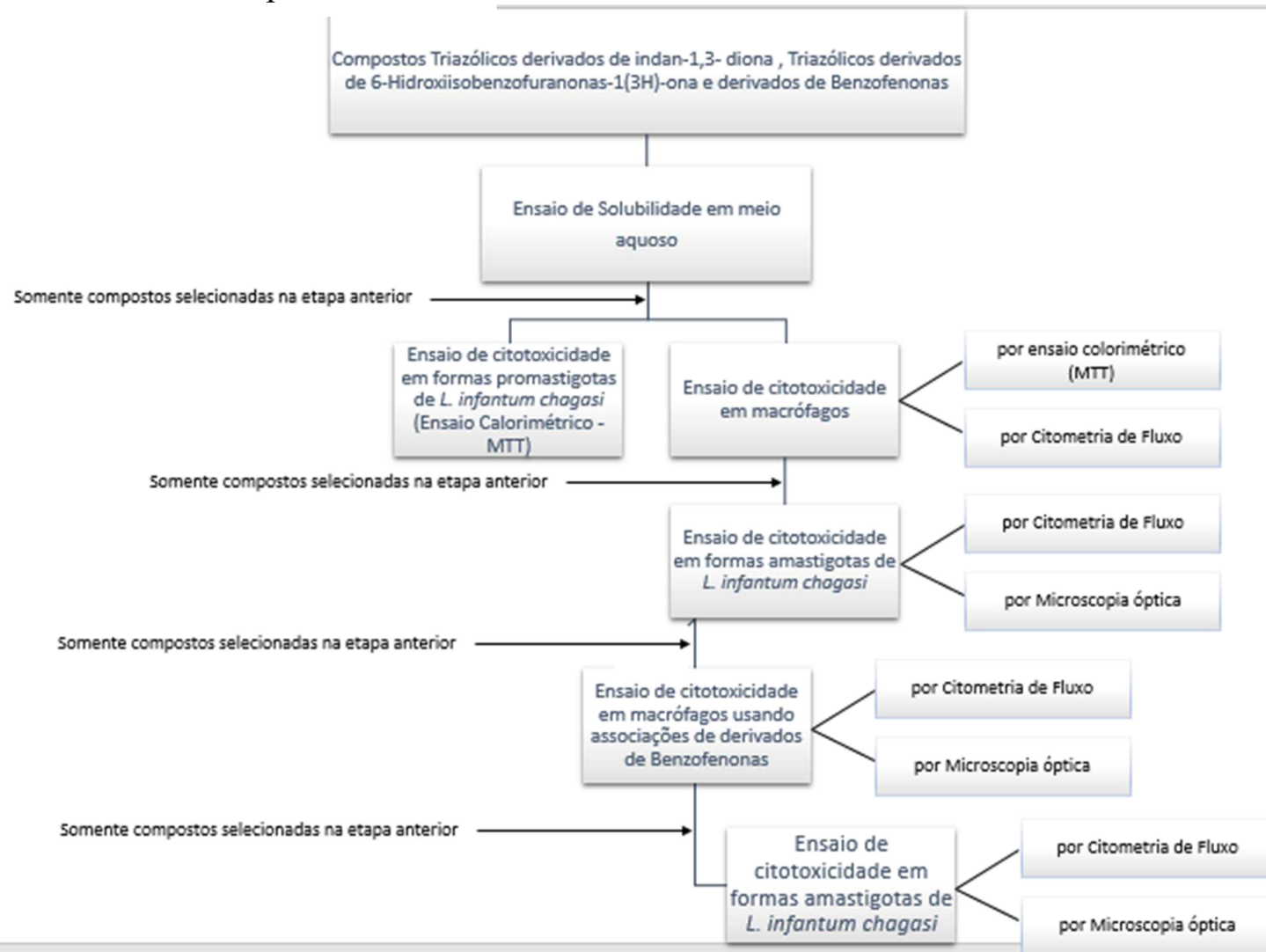
- Avaliação da solubilidade dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona e de compostos derivados de Benzofenonas em meio reacional aquoso;
- Avaliação da citotoxicidade dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona e de compostos derivados de Benzofenonas em macrófagos RAW 264.7, por ensaio com MTT;
- Avaliação do efeito leishmanicida dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona e de compostos derivados de Benzofenonas com baixa toxicidade para macrófagos RAW 264.7 contra formas promastigotas da *L. infantum chagasi*, por ensaio com MTT;
- Avaliação do efeito leishmanicida dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona e de compostos derivados de Benzofenonas, com baixa toxicidade para macrófagos RAW 264.7, contra formas amastigotas da *L. infantum chagasi* por contagem de parasitos intracelulares ao microscópio óptico; e
- Avaliação do efeito leishmanicida da associação de compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona e de compostos derivados de Benzofenonas, com baixa toxicidade para

macrófagos RAW 264.7, contra formas amastigotas da *L. infantum chagasi* por contagem de parasitos intracelulares ao microscópio óptico.

Segunda fase: teste de drogas *in vitro* por Citometria de Fluxo

- Avaliação da citotoxicidade da associação de compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona e de compostos derivados de Benzofenonas em macrófagos RAW 264.7 por Citometria de Fluxo;
- Avaliação do efeito leishmanicida da associação de compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona e de compostos derivados de Benzofenonas, com baixa toxicidade para macrófagos RAW 264.7, contra formas amastigotas da *L. infantum chagasi* por Citometria de Fluxo; e
- Validação de uma metodologia inédita, que emprega a Citometria de Fluxo para estabelecer, de forma indireta, o percentual de macrófagos infectados por *L. infantum chagasi*, em experimentos de avaliação do efeito leishmanicida durante o processo de prospecção de novas drogas.

4. Delineamento Experimental



5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção de parasitos

Formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, cepa MHOM/BR/75/M2682, mantidas em cultura em laboratório, foram inoculadas pela veia da cauda em camundongos BALB/c (1×10^7 parasitos/100 μ L em solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2). Vinte e oito dias após a infecção, os animais foram eutanasiados e deles foram retirados o baço e o fígado. Estes foram macerados e diluídos em placa de 24 poços pela técnica de diluição seriada, em meio Grace completo, composto de meio Grace (GIBCO BRL, GRAND ISLAND, N.Y., USA) suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado a 57°C/30 min (SFB; LGC BIOTECNOLOGIA, COTIA, SP, BRASIL), 10% de urina humana, L-glutamina 2 mM (GIBCO BRL), penicilina G 100 U/mL (USB CORPORATION, CLEVELAND, OH, USA) e 250 μ L de hemina bovina (SIGMA-ALDRICH, ST. LOUIS, MO, EUA), pH 6,8. A placa foi mantida em estufa a 26°C até o crescimento dos parasitos, que foram utilizados em experimentos posteriores ou estocados em nitrogênio líquido (-196°C).

5.2 Cultivo de parasitos

Formas promastigotas de *L. infantum chagasi* foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM - SIGMA-ALDRICH) suplementado com 10% de urina humana, 1% de adenina 1 mM (SIGMA-ALDRICH), 1% penicilina G 100 U/mL (USB CORPORATION), 10% SFB (LGC BIOTECNOLOGIA) e hemina (SIGMA-ALDRICH) 0,25% em trietanolamina 50% a 0,25%, pH 6,8, a 26°C.

5.3 Curva de crescimento dos parasitos

Foram preparadas duas garrafas de cultura celular de 25 cm² (KASVI, PARANÁ, BRASIL) contendo *L. infantum chagasi* em 10 mL no meio descrito acima para cultivo dos parasitos, com quantidade inicial de 1×10^5 promastigotas/mL. Foram feitas duas contagens diárias em câmara de Neubauer durante 18 dias, com intervalos de 10 h entre cada contagem. O valor diário da população de parasitos foi obtido pelas médias aritméticas das contagens. A curva de crescimento parasitário foi construída utilizando o software *GraphPad Prism 5* (PRISM SOFTWARE, IRVINE, CA, USA). O ensaio foi feito em três experimentos independentes.

5.4 Cultivo de macrófagos

Para este trabalho foram utilizados macrófagos de linhagem RAW 264.7. Para os ensaios *in vitro*, as células foram descongeladas em temperatura ambiente e expandidas em frascos de cultura celular de 75 cm² (KASVI, PARANÁ, BRASIL), em meio DMEM (SIGMA-ALDRICH) suplementado com SFB (LGC BIOTECNOLOGIA) 10% e 1% penicilina G 100 U/mL (USB CORPORATION), pH 7,2, e mantidos a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂. Os repiques de manutenção foram feitos a cada dois dias por raspagem de células, utilizando um espalhador de células descartável (KASVI, PARANÁ, BRASIL).

5.5 Ensaio de solubilidade dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona e de derivados de Benzofenonas

Foram feitas 12 diluições seriadas em Dimetilsulfóxido (DMSO)(LABSYNTH, DIADEMA, SP), com fator de diluição 2 a partir de 1,25 µg/mL de derivados Triazólicos e 50 µg/mL de derivados de Benzofenonas. Estas diluições foram distribuídas em placas de 96 poços e mantidas em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂. Formação de cristais visíveis foi analisada ao microscópio óptico invertido trinocular (LEICA® DM IL LED) em aumento de 60X nas 1^a, 24^a, 48^a e 72^a horas. Compostos e/ou diluições que apresentaram e permaneceram com cristais durante as primeiras 48 h não foram utilizados nos experimentos. O ensaio foi realizado em duplicata, em total de três experimentos independentes.

5.6 Viabilidade celular – Ensaio de MTT

A viabilidade celular da linhagem de macrófagos RAW 264.7 e das formas promastigotas da *L. infantum chagasi* foi avaliada por ensaio colorimétrico na presença de MTT (SIGMA-ALDRICH). Este ensaio baseia-se na capacidade das células viáveis intactas reduzirem o sal de tetrazólio por ação de enzimas mitocondriais ou citoplasmáticas. Uma vez reduzido a cristais de formazan, o MTT torna-se insolúvel e com coloração púrpura no meio de cultura, sendo possível sua mensuração por meio de espectrofotometria com leitura a 570 nm, após os cristais serem solubilizados (DUTTA *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 1997). Uma vez que essa conversão depende de células viáveis, a quantidade de produtos formado é proporcional ao número de células vivas em cultura. Neste ensaio, alíquotas de 50 µL de MTT a 5 mg/mL em PBS foram preparadas e

adicionadas a cada poço contendo 5×10^4 macrófagos ou 4×10^6 promastigotas/poço. As placas foram incubadas por 2 h, a 37°C, ao abrigo da luz em estufa umidificadora contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂. Ao final desse período, foram adicionados 100 µL de SDS a 10% em HCL 0,01 M a cada poço e a placa foi mantida em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 16 h para a completa solubilização dos cristais de formazan. Em seguida, foi feita a leitura colorimétrica em espectrofotômetro (ESPECTRAMAX® M5) a 570 nm. Os dados foram representados em porcentagem e comparados ao grupo controle.

5.7 Viabilidade celular – Citometria de Fluxo

A viabilidade celular da linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi avaliada também pela Citometria de Fluxo. Após cada tratamento, as células foram desprendidas da placa pela adição de solução de tripsina de origem suína 0,5% (SIGMA- ALDRICH). Em seguida, os 500 µL de cultura desprendidos de cada poço foram transferidas para um micro tubo e o conteúdo nuclear foi marcado pela adição de 50 µL de solução de Iodeto de Propídeo 5 µg/mL (BD BIOSCIENCES®- SAN JOSE, CA). Após 5 minutos, foi feita a aquisição no Citômetro de Fluxo (BD FACSVESSE™). O programa FACSuite Software® (SAN JOSE, CA, EUA) foi utilizado para a aquisição de dados e para a análise dos resultados foi empregado o programa Flowing Software 2® (CENTRE FOR BIOTECHNOLOGY UNIVERSITY OF TURKU, FINLAND) e/ou o programa FACSuite Software®.

5.8 Preparo das soluções estoques dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona e de derivados de Benzofenonas

Foram diluídos 10 mg de cada composto em 1 mL de DMSO, perfazendo uma concentração final da solução estoque de 10 mg/mL. As soluções foram estocadas em temperatura ambiente. O DMSO foi escolhido como diluente por ser um composto anfipático muito usado como veículo de drogas terapêuticas na indústria farmacêutica (FLORÃO *et al.*, 2007), transportando-as através das membranas biológicas. Este também é utilizado com intuito de solubilizar fármacos pouco solúveis (HAUMEIL; RNAUD, 2002). Porém, a porcentagem de sobrevivência dos macrófagos diminui significativamente em concentrações de DMSO a partir de 2%, sendo que a viabilidade

celular é satisfatória na concentração 0,5-1% DMSO (CHEN; THIBEAULT, 2014). Por isso, foram utilizadas neste trabalho as concentrações de 0,25% e 0,5% de DMSO.

5.9 Concentrações dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona e de derivados de Benzofenonas utilizadas nos ensaios das associações de Benzofenonas para tratamento

Para os compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona foram avaliadas, em estudo piloto prévio, as concentrações de 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625; 0,078125; 0,0390625; 0,01953125; 0,009765625; 0,0048828125; 0,0024414063; 0,0012207031 e 0,0006103516 µg do material por mL de meio de cultura DMEM (SIGMA-ALDRICH) suplementado com SFB (LGC BIOTECNOLOGIA) 10% e 1% penicilina G 100 U/mL (USB CORPORATION), pH 7,2. Já para os compostos derivados de Benzofenonas, foram avaliadas, em um estudo prévio, as concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781; 0,391; 0,195; 0,097; 0,049 e 0,024 µg por mL de meio de cultura DMEM (SIGMA-ALDRICH) suplementado com SFB (LGC BIOTECNOLOGIA) 10% e 1% penicilina G 100 U/mL (USB CORPORATION), pH 7,2. Em ambos os estudos, o objetivo era selecionar as concentrações em que macrófagos RAW 264.7, quando tratados, apresentassem a maior taxa de viabilidade celular ($\geq 90\%$). As maiores doses preparadas tanto no grupo dos Triazólicos quanto no grupo das Benzofenonas foram escolhidas em relação à limitação do crescimento dos macrófagos na presença de elevadas concentrações de DMSO (LABSYNTH), ou seja, no grupo dos Triazólicos trabalhou-se com uma concentração de 0,25% de DMSO (LABSYNTH), que corresponde a uma dose inicial de 1,25 µg/mL, e no grupo das Benzofenonas trabalhou-se com uma concentração de 0,5% de DMSO, que corresponde a uma dose inicial do composto de 50 µg/mL.

As Benzofenonas também foram preparadas em 11 associações com todas as possíveis combinações entre os compostos AL-13, AL-16, AL-19 e B-5 obedecendo-se a regra da concentração máxima de 0,5% de DMSO (LABSYNTH).

5.10 Determinação da IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%) em promastigotas de *L. infantum chagasi*

Para cada ensaio de determinação da IC₅₀, foi feito o tratamento de promastigotas de *L. infantum chagasi* (de acordo com o descrito no item 5.12) com quatro concentrações diferentes dos compostos e uma cultura sem tratamento. O percentual de

infecção/sobrevida bem como as concentrações usadas foram lançadas no programa *GraphPad Prism 5* para o delineamento da curva e para o cálculo da IC₅₀.

5.11 Ensaio de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7

Para cada poço da placa de 96 poços, foi preparada uma solução contendo 5×10^4 macrófagos em 100 μ L de DMEM (SIGMA-ALDRICH) suplementado com SFB (LGC BIOTECNOLOGIA) 10% e 1% penicilina G 100 U/mL (USB CORPORATION), pH 7,2. A placa foi incubada a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂ *overnight* para adesão dos macrófagos. Logo após esse período, a placa foi lavada com DMEM base pH 7,2 para remoção das células não aderidas. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de DMEM (SIGMA-ALDRICH) suplementado com SFB (LGC BIOTECNOLOGIA) 10% e 1% penicilina G 100 U/mL (USB CORPORATION), pH 7,2 e 100 μ L das diluições seriadas com fator de diluição de 2 dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona ou derivados de Benzofenonas aos seus respectivos poços previamente identificados. A placa foi mantida a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂ por 48 h. Ao final, foi realizado o ensaio de viabilidade celular (MTT ou Citometria de Fluxo). Como controle foi utilizado DMSO (LABSYNTH) 0,5% ou 0,25%, dependendo do grupo de compostos testados. Para o cálculo da viabilidade celular foi feita uma correlação entre o número de macrófagos/poço X absorbância a 570 nm. A partir disto foi feita uma regressão linear, que forneceu a equação utilizada para calcular o número de macrófagos sobreviventes após o tratamento. As equações bem como os gráficos são demonstrados no anexo I. O ensaio foi realizado em duplicata, em total de três experimentos independentes.

5.12 Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L. infantum chagasi*

Para cada poço da placa de 96 poços, foi preparada uma solução contendo 4×10^6 promastigotas em 100 μ L de DMEM (SIGMA-ALDRICH) suplementado com 10% de urina humana, 1% de adenina 1 mM (SIGMA-ALDRICH), 1% penicilina G 100 U/mL (USB CORPORATION), 10% SFB (LGC BIOTECNOLOGIA) e hemina (SIGMA-ALDRICH) 0,25% em trietanolamina 50% a 0,25%, pH 6,8. Foram adicionados a cada poço 100 μ L das diluições seriadas dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona ou derivados de Benzofenonas. A placa foi vedada e mantida em estufa a 26°C por 48 h. Ao final, foi realizado o ensaio de

viabilidade celular com MTT. Como controles foram utilizados DMSO (LABSYNTH) 0,5% ou 0,25%, dependendo do grupo de compostos em análise e o fármaco Anfotericina B (SIGMA-ALDRICH) na concentração de 63,5 µg/mL. Para o cálculo da viabilidade celular foi feita uma correlação entre o número de promastigotas/poço X absorbância a 570 nm. A partir disto foi feita uma regressão linear, que forneceu a equação utilizada para calcular o número de promastigotas sobreviventes após o tratamento. As equações bem como os gráficos são demonstrados no anexo II. O ensaio foi realizado em duplicata, em total de três experimentos independentes.

5.13 Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida contra formas amastigotas de *L. infantum chagasi* por contagem de parasitos intracelulares ao microscópio óptico

Para cada poço de placa de 24 poços, foi preparada uma suspensão contendo 5×10^5 macrófagos em 500 µL de DMEM (SIGMA-ALDRICH) suplementado com SFB (LGC BIOTECNOLOGIA) 10% e 1% penicilina G 100 U/mL (USB CORPORATION), pH 7,2. Esta suspensão foi distribuída sobre lamínulas de vidro 13 mm (KNITTEL®, ALEMANHA) posicionadas no fundo de cada poço. A placa foi incubada a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂ *overnight* para adesão dos macrófagos. Logo após esse período, a placa foi lavada com DMEM (SIGMA-ALDRICH) base, pH 7,2 para remoção das células não aderidas. Em seguida, foram adicionados 500 µL de suspensão de DMEM (SIGMA-ALDRICH) suplementado com SFB (LGC BIOTECNOLOGIA) 10% e 1% penicilina G 100 U/mL (USB CORPORATION), pH 7,2 contendo 1×10^7 promastigotas por poço. A placa foi novamente incubada em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂ por 24 h. Ao final deste período, cada poço foi lavado três vezes com DMEM (SIGMA-ALDRICH) base, pH 7,2, para remoção dos parasitas não fagocitados e células não aderidas (Tanner, 1994). A placa foi novamente incubada em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂ por 24 h. Em seguida, foram adicionados 250 µL de DMEM (SIGMA-ALDRICH) suplementado com SFB (LGC BIOTECNOLOGIA) 10% e 1% penicilina G 100 U/mL (USB CORPORATION), pH 7,2 e 250 µL das diluições seriadas selecionadas dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona ou derivados de Benzofenonas a seus devidos poços previamente identificados. A placa foi mantida a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂ por 48 h. Ao final, cada poço foi lavado com DMEM (SIGMA-ALDRICH) base, pH 7,2, para remoção do meio contendo os compostos testados, as lamínulas foram retiradas e coradas com kit corante rápido (Panótico) (LABORCLIN, PARANÁ, BRASIL). Após a coloração, as

lamínulas foram montadas em lâminas histológicas, aderidas com Entellan (MERCK, DARMSTADT, ALEMANHA), e devidamente identificadas. Foi realizada a contagem do número de células infectadas e de parasitos intracelulares tanto nas lamínulas contendo células tratadas quanto naqueles referentes ao controle (não tratadas) utilizando microscópio óptico trinocular invertido em aumento de 60X. Como controles foram utilizados DMSO (LABSYNTH) 0,5% ou 0,25%, dependendo do grupo de compostos em análise e o fármaco Anfotericina B (SIGMA-ALDRICH) na concentração de 2,5 µg/mL. Para calcular a porcentagem de inibição da infecção foram contados 100 macrófagos por lâmina e foi utilizada a seguinte fórmula (TANDON *et al.*, 1991):

$$\% \text{Inibição da infecção} = 100 - \frac{PT \times 100}{PC}, \text{ onde}$$

$$PT = \frac{n^{\circ} \text{ de amastigotas}}{n^{\circ} \text{ de macrófagos infectados}} \text{ (com tratamento)}$$

$$PC = \frac{n^{\circ} \text{ amastigotas}}{n^{\circ} \text{ de macrófagos infectados}} \text{ (sem tratamento)}$$

O ensaio foi realizado em duplicata, em total de três experimentos independentes.

5.14 Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida contra formas amastigotas de *L. infantum chagasi* por Citometria de Fluxo

Para cada poço da placa de 24 poços foi preparada uma solução contendo 5×10^5 macrófagos em 500 µL de DMEM (SIGMA-ALDRICH) suplementado com SFB (LGC BIOTECNOLOGIA) 10% e 1% penicilina G 100 U/mL (USB CORPORATION), pH 7,2. A placa foi incubada a 37°C em estufa umidificadora contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂ *overnight* para adesão dos macrófagos. Logo após esse período, a placa foi lavada com DMEM (SIGMA-ALDRICH) base, pH 7,2 para remoção das células não aderidas. Em seguida, foram adicionados 500 µL de suspensão de DMEM (SIGMA-ALDRICH) suplementado com SFB (LGC BIOTECNOLOGIA) 10% e 1% penicilina G 100 U/mL (USB CORPORATION), pH 7,2 contendo 1×10^7 promastigotas por poço. A placa foi novamente incubada em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂ por 24 h. Ao final deste período, cada poço foi lavado por três vezes com DMEM (SIGMA-ALDRICH) base, pH

7,2, para remoção dos parasitos livres no meio. A placa foi novamente incubada em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂ por 24 h. Em seguida, foram adicionados 250 µL de DMEM (SIGMA-ALDRICH) suplementado com SFB (LGC BIOTECNOLOGIA) 10% e 1% penicilina G 100 U/mL (USB CORPORATION), pH 7,2 e 250 µL das diluições seriadas selecionadas dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona ou derivados de Benzofenonas em seus respectivos poços previamente identificados. A placa foi mantida a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂ por 48 h. Ao final, cada poço foi lavado com DMEM (SIGMA-ALDRICH) base, pH 7,2, para remoção do meio contendo os compostos testados. As células foram desprendidas da placa pela adição de tripsina (SIGMA-ALDRICH) 0,5%. Em seguida, as mesmas foram coletadas dos poços e transferidas para micro tubos identificados e centrifugadas a 550 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em solução de formalina 4% para fixação. Foram adicionados 50 µL de Iodeto de Propídeo 5 µg/mL para marcação do conteúdo nuclear. Após 24 h, foi feita a aquisição pelo Citômetro de Fluxo. Como controles foram utilizados DMSO (LABSYNTH) 0,5% ou 0,25%, dependendo do grupo de compostos em análise e o fármaco Anfotericina B na concentração de 2,5 µg/mL. O ensaio foi realizado em duplicata, em total de três experimentos independentes.

5.15 Estratégia para análise da infecção dos macrófagos RAW 264.7 por *L. infantum chagasi* utilizando Citometria de Fluxo

Os resultados referentes ao potencial leishmanicida dos diferentes compostos derivados Triazólicos ou derivados de Benzofenonas em formas amastigotas do parasito foram obtidos pela porcentagem de macrófagos RAW 264.7 infectados, fixados com formalina a 4% e marcados com iodeto de propídeo que apresentavam uma carga de DNA maior do que macrófagos RAW 264.7 não-infectados, também fixados e marcados com iodeto de propídeo.

Na tentativa de mensurar indiretamente o percentual de macrófagos infectados, foi calculada a diferença entre a intensidade de fluorescência dos macrófagos infectados pela de macrófagos não-infectados. O programa FACSuite Software® foi utilizado para a aquisição de dados. Para a análise dos resultados, foi empregado o programa Flowing Software 2® e/ou o programa FACSuite Software®. Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos.

5.16 Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do *software GraphPad Prism 5*, utilizando a análise de correlação entre os dados. Foi utilizado o teste *t* de Student para comparação entre as técnicas de microscopia e Citometria e análise de variância (ANOVA) para comparação entre os tratamentos e o fármaco de referência (Anfotericina B). Em ambos os casos, foram considerados estatisticamente significativas as diferenças com valores de $p < 0,05$. Para os experimentos com o uso de Citometria de Fluxo, foi utilizado o programa FACSuite Software®.

6. RESULTADOS

6.1 Curva de Crescimento de *L. infantum chagasi*

Para determinar o perfil de crescimento dos parasitos em meio líquido a 26°C, foi estabelecida a curva de crescimento conforme descrito na metodologia. De acordo com os resultados obtidos, os parasitos se encontram em fase logarítmica de crescimento até o décimo dia de cultura, passando então para a fase estacionária (Figura 22). De acordo com este experimento foi definido que todo o repique para manutenção da cultura seria realizado até o oitavo dia de crescimento, enquanto as promastigotas do início da fase estacionária (décimo primeiro dia de cultura) seriam utilizadas para a infecção de macrófagos.

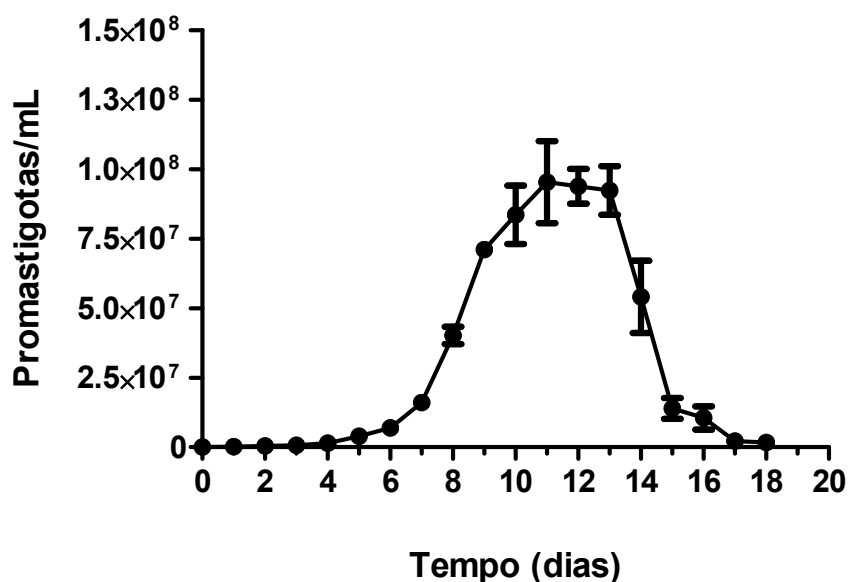


Figura 22. Curva de crescimento *in vitro* de *L. infantum chagasi* em meio líquido. Os parasitos foram cultivados na concentração inicial de 1×10^5 /mL utilizando formas promastigotas em fase logarítmica, em meio líquido, conforme descrito na metodologia. A quantificação dos parasitos foi realizada duas vezes ao dia, por 18 dias. A curva representa o resultado de três experimentos independentes em que os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

6.2 Ensaio de Solubilidade dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona e de derivados de Benzofenonas

Os compostos sintéticos pertencentes aos grupos dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona e derivados de Benzofenonas são compostos com baixa ou nenhuma solubilidade em água, sendo sua preparação da solução estoque feita em DMSO. Foi observado ao se iniciar os testes que alguns destes compostos quando em contato com água formavam cristais nas primeiras horas ou 48 h depois, sendo que alguns destes se desfaziam com o decorrer do tempo, enquanto outros permaneciam em sua forma cristalizada. Partindo deste pressuposto, foi realizado o ensaio de solubilidade, conforme detalhado na metodologia.

Foram selecionados para a etapa seguinte do trabalho somente os compostos e/ou diluições destes compostos que não se cristalizaram em momento algum ou que, se cristalizaram e os cristais se desfizeram dentro de 48 h (ver anexo III e Figura 23).

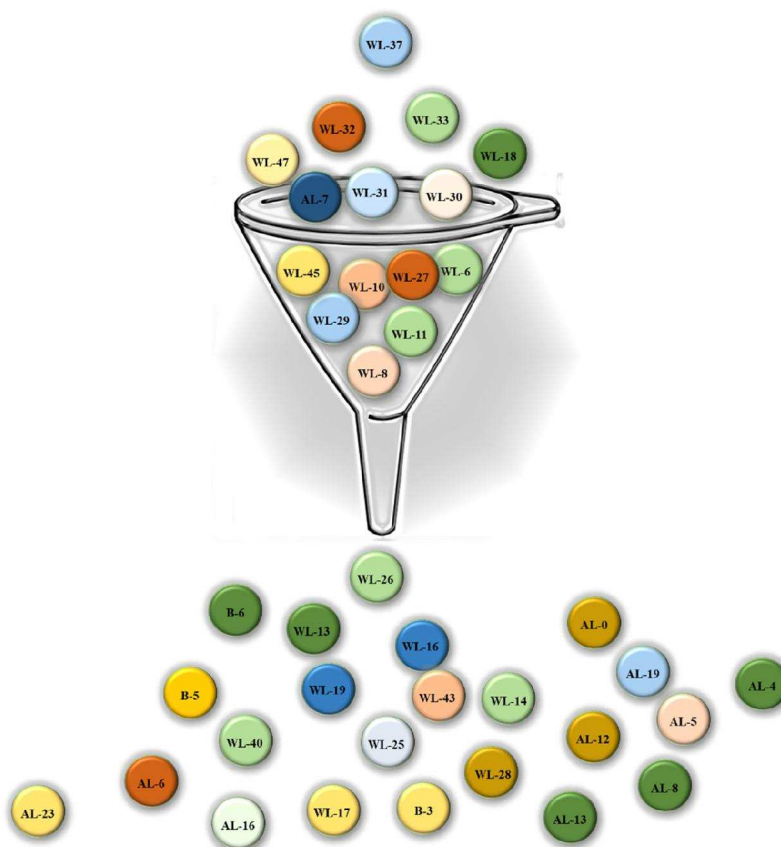


Figura 23. Compostos derivados de Benzofenonas e derivados Triazólicos selecionados no ensaio de solubilidade.

6.3 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7

As Figuras 24 e 25 mostram os resultados dos ensaios de citotoxicidade em macrófagos quando estes foram submetidos ao tratamento com os compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona ou com os derivados de Benzofenonas, conforme descrito na metodologia. Foram selecionados para a próxima etapa do trabalho (avaliação do potencial leishmanicida em amastigotas) somente os compostos que apresentaram uma citotoxicidade *in vitro* para os macrófagos de no máximo 10%, o que descrevemos como IC₁₀ (Concentração Inibitória de 10%). O ensaio de viabilidade foi feito pelo método de MTT, como descrito na metodologia. Os compostos selecionados nesta etapa, bem como suas respectivas concentrações que serão utilizados no próximo passo do trabalho estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de IC₁₀: Concentração Inibitória de 10% para macrófagos RAW 264.7, após 48 h de tratamento, de cada composto químico.

Grupos	Composto	Concentração (µg/mL)
Triazóis derivados de 6-OH-isobenzofura-1(3H)-ona	WL12	0,625
	WL13	0,3125
	WL14	1,25
	WL16	1,25
	WL17	1,25
	WL25	1,25
	WL19	1,25
	WL26	0,625
Triazólicos derivados de indan-1,3- diona	WL28	1,25
	WL40	0,3125
	WL43	0,625
Derivados de Benzofenonas	AL-0	25
	AL-4	0,024414
	AL-5	0,390625
	AL-8	0,390625
	AL-12	0,390625
	AL-13	0,78125
	AL-16	1,5625
	B-5	1,5625
	B-6	3,125
	AL-6	0,024414
	AL-19	1,5625
	AL-23	3,125
	B-3	3,125

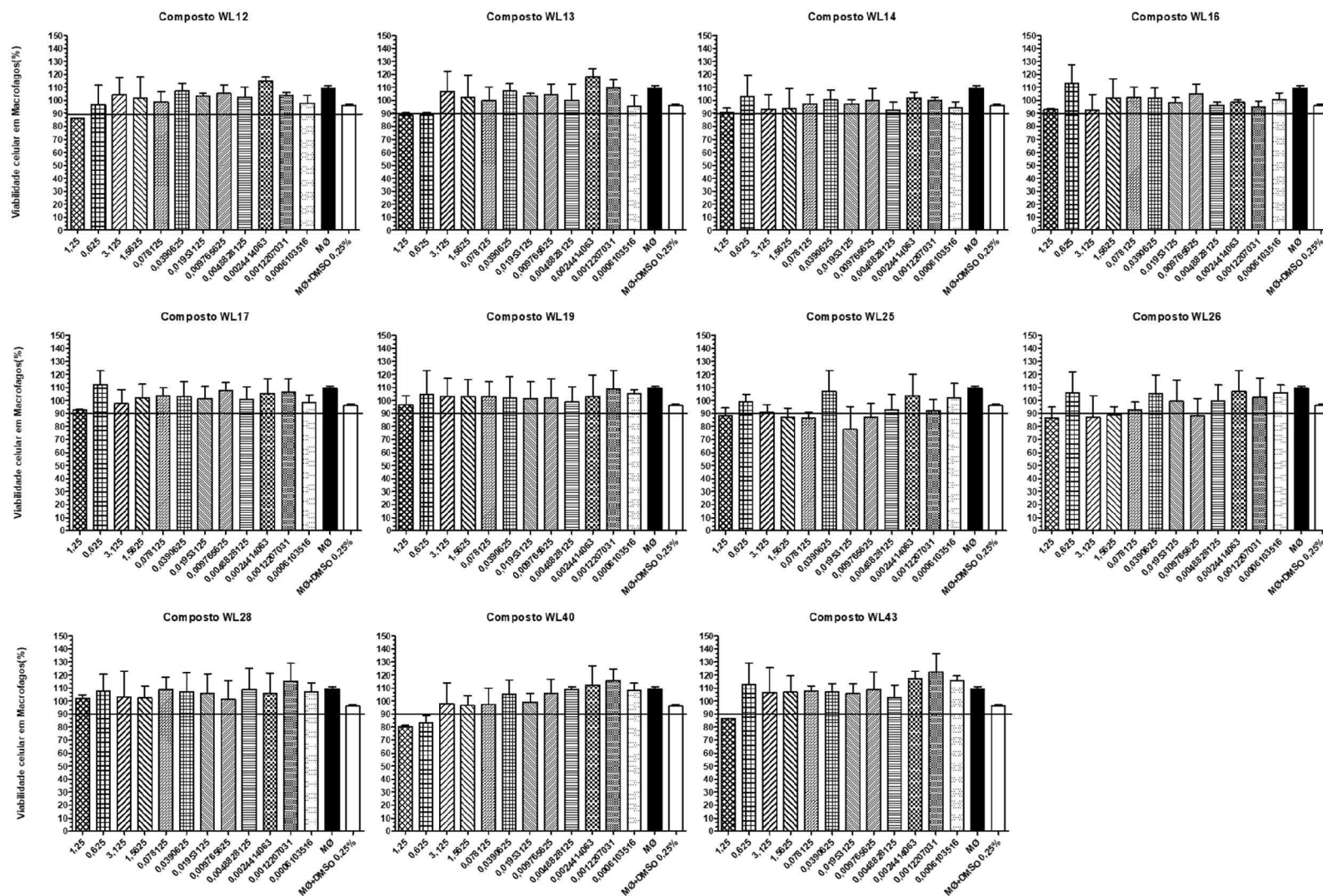


Figura 24. Avaliação da citotoxicidade de derivados Triazólicos em macrófagos RAW 264.7. Percentual de viabilidade de macrófagos RAW 264.7 tratados com diferentes concentrações de derivados Triazólicos por 48 h. A viabilidade dos macrófagos foi avaliada pelo método de degradação do MTT. Todas concentrações estão expressas em $\mu\text{g/mL}$. Cada barra representa a média + erro padrão da média de três experimentos independentes. A linha

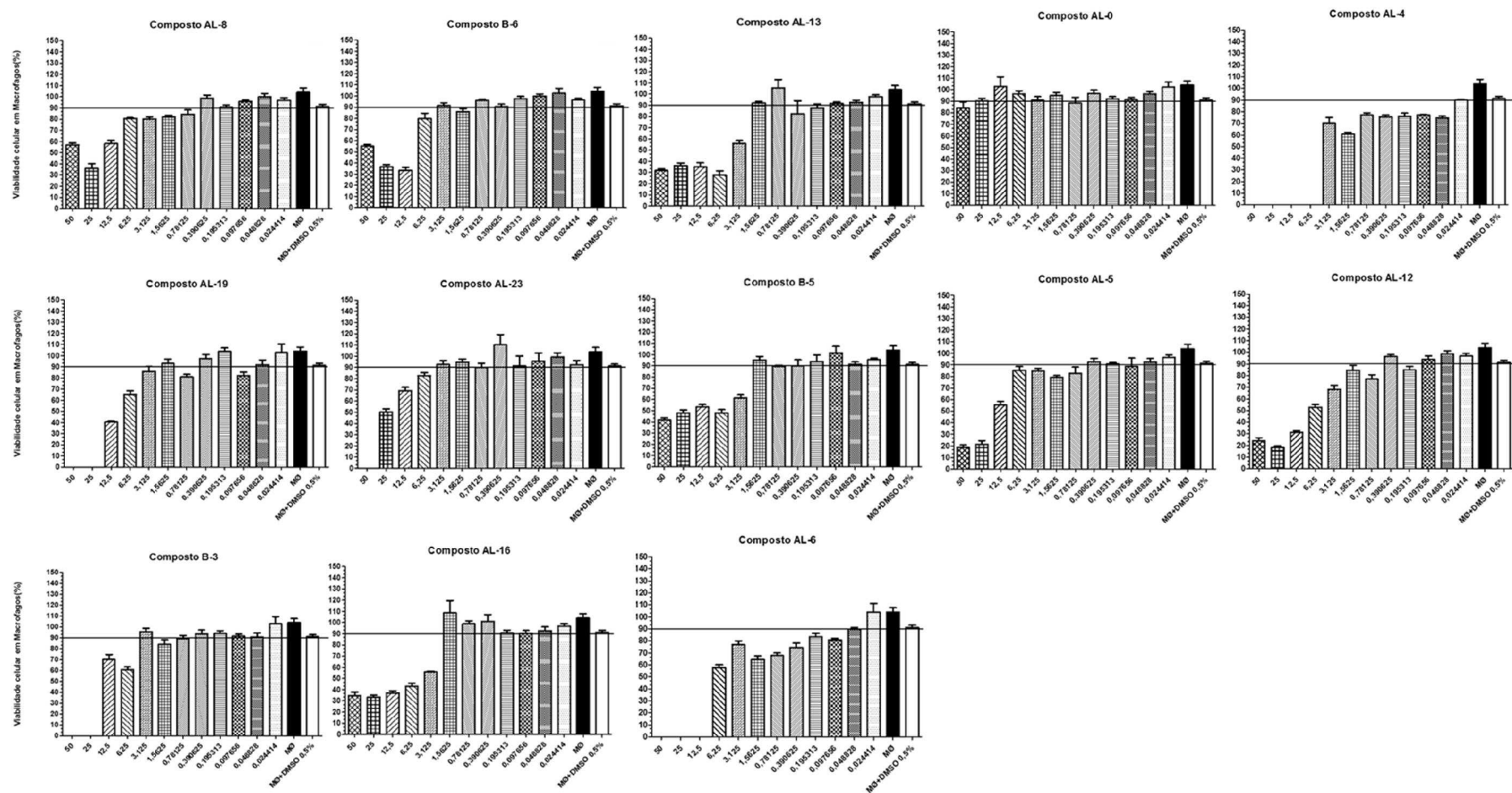


Figura 25. Avaliação da citotoxicidade dos compostos derivados de Benzofenonas em macrófagos RAW 264.7. Percentual de viabilidade de macrófagos RAW 264.7 tratados com diferentes concentrações dos compostos derivados de Benzofenonas durante 48 h de tratamento. Todas concentrações estão expressas em µg/mL. Cada barra representa a média + erro padrão da média de três experimentos independentes. A linha horizontal delimita faixa de 90% de MØs viáveis. MØ: macrófago.

6.4 Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida em formas promastigotas de *L. infantum chagasi*

As Figuras 26 e 27 demonstram os percentuais de redução da viabilidade de formas promastigotas de *L. infantum chagasi* após 48 h de tratamento com compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona e com os derivados de Benzofenonas. As concentrações testadas para os diferentes compostos derivados de Benzofenonas foi de 50 µg/mL e para os compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona foi de 1,25 µg/mL. Estes valores foram estipulados de acordo com a concentração máxima de DMSO que poderia ser tolerada pelos macrófagos, como especificado na metodologia. Como observado, nenhum dos compostos utilizados foi suficiente para causar uma redução expressiva do número de parasitos em comparação com aqueles tratados com Anfotericina B (63,5 µg/mL).

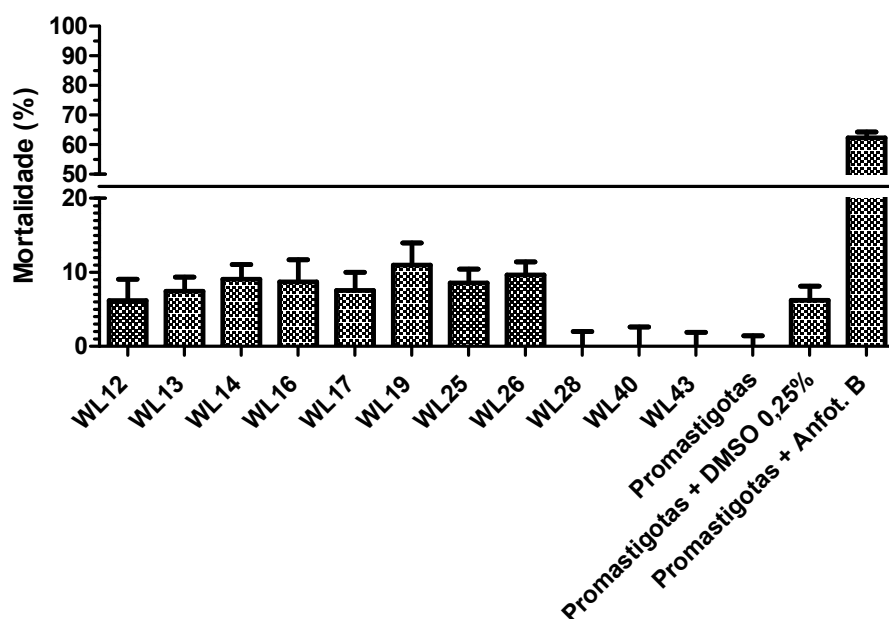


Figura 26. Avaliação da atividade leishmanicida de Triazóis derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona em formas promastigotas de *L. infantum chagasi*. Formas promastigotas de *L. infantum chagasi* foram tratadas com 1,25 µg/mL de cada composto por 48 h e a porcentagem de parasitos mortos foi calculada conforme descrito na metodologia. Para a Anfotericina B, foi utilizada uma concentração de 63,5 µg/mL. Cada barra representa a média + erro padrão da média de três experimentos independentes.

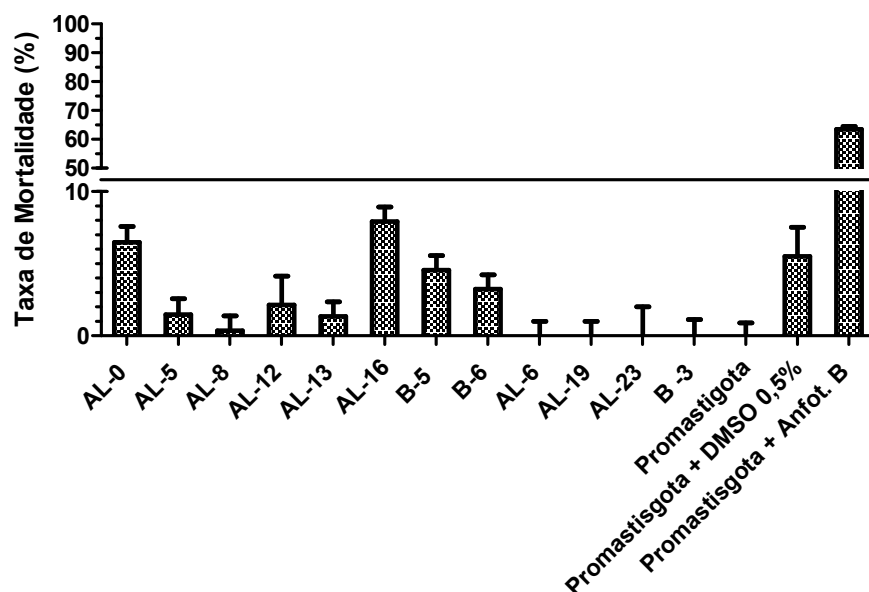


Figura 27. Avaliação da atividade leishmanicida de derivados de Benzofenonas em formas promastigotas de *L. infantum chagasi*. Formas promastigotas de *L. infantum chagasi* foram tratadas com 50 µg/mL de cada composto por 48 h e a porcentagem de parasitos mortos foi calculada conforme descrito na metodologia. Para a Anfotericina B, foi utilizada uma concentração de 63,5 µg/mL. Cada barra representa a média + erro padrão da média de três experimentos independentes.

6.5 Método tradicional: Microscopia Óptica

6.5.1 Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida de compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona e de derivados de Benzofenonas em formas amastigotas de *L. infantum chagasi*

Para avaliar o potencial leishmanicida dos diferentes compostos testados em formas amastigotas internalizadas em macrófagos RAW 264.7, após 48 de tratamento, foi feita a contagem em microscópio óptico do número de amastigotas internalizadas, do número de macrófagos infectados e dos macrófagos não infectados. O objetivo foi comparar o percentual de infecção em macrófagos expostos aos compostos químicos testados com o percentual de infecção do grupo controle (macrófagos infectados com *L. infantum chagasi* em meio de cultura e não submetidos a nenhum tratamento), bem como ao grupo de macrófagos infectados tratados com Anfotericina B (5 µg/mL).

Para o ensaio, foram utilizadas as concentrações de IC₁₀ estabelecidas previamente no ensaio inicial de citotoxicidade em macrófagos (ver tabela 2), para cada um dos diferentes compostos testados.

Os resultados obtidos após contagem das lâminas estão representados nas Figuras 28 e 29: em A está representada a razão entre o número de amastigotas internalizadas por macrófago infectado; em B, o percentual de inibição da infecção em macrófagos quando tratados com estes compostos.

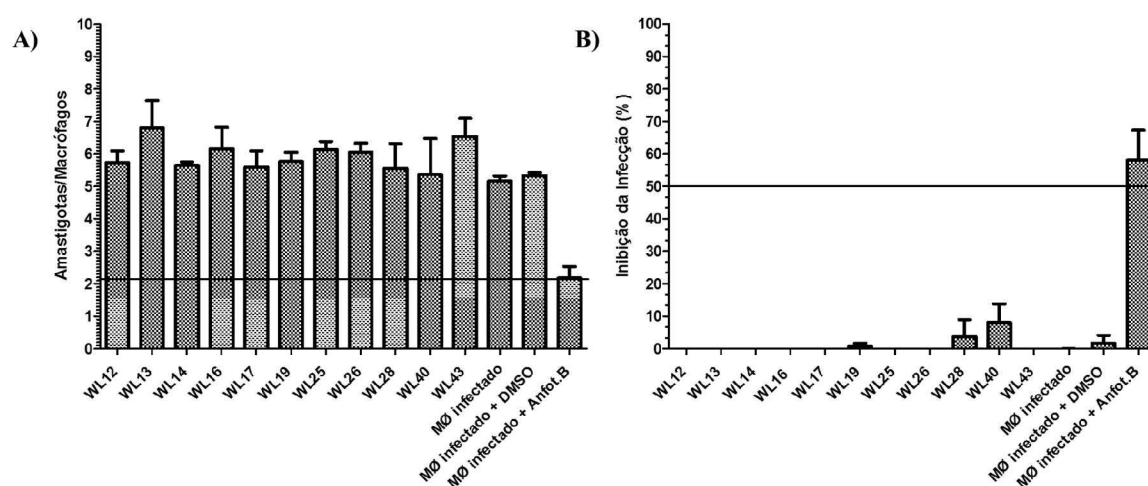


Figura 28. Avaliação do potencial leishmanicida dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona em macrófagos infectados com *L. infantum chagasi* por microscopia óptica. A) razão do número de amastigotas *L. infantum chagasi* internalizadas por macrófagos, após 48h de tratamento nas concentrações correspondentes ao valor de IC₁₀ de cada composto químico, previamente estabelecidos, comparados aos grupos controles: macrófagos infectados sem tratamento, com tratamento por Anfotericina B (5 µg/mL) e na presença de DMSO a 0,25%; **B)** Percentual de inibição da infecção de macrófagos após 48h de tratamento nas concentrações correspondentes ao valor de IC₁₀ de cada composto químico, previamente estabelecidos, comparados aos grupos controles: macrófagos infectados sem tratamento, com tratamento por Anfotericina B (5 µg/mL) e na presença de DMSO a 0,25%. Cada barra representa a média ± erro padrão de três experimentos independentes.

Como observado na Figura 28A, nenhum dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona provocaram redução expressiva

da carga parasitária dos macrófagos infectados quando comparados com aqueles tratados com Anfotericina B. O grupo controle incubado com 0,25% de DMSO também não mostrou alteração expressiva da razão entre o número de amastigotas internalizadas por macrófagos quando comparado com o grupo sem tratamento, o que demonstra que esta concentração de DMSO não é suficiente para causar danos significativos durante a infecção. Também não foi observada inibição da infecção dos macrófagos infectados em relação aos infectados tratados com Anfotericina B (Figura 28B).

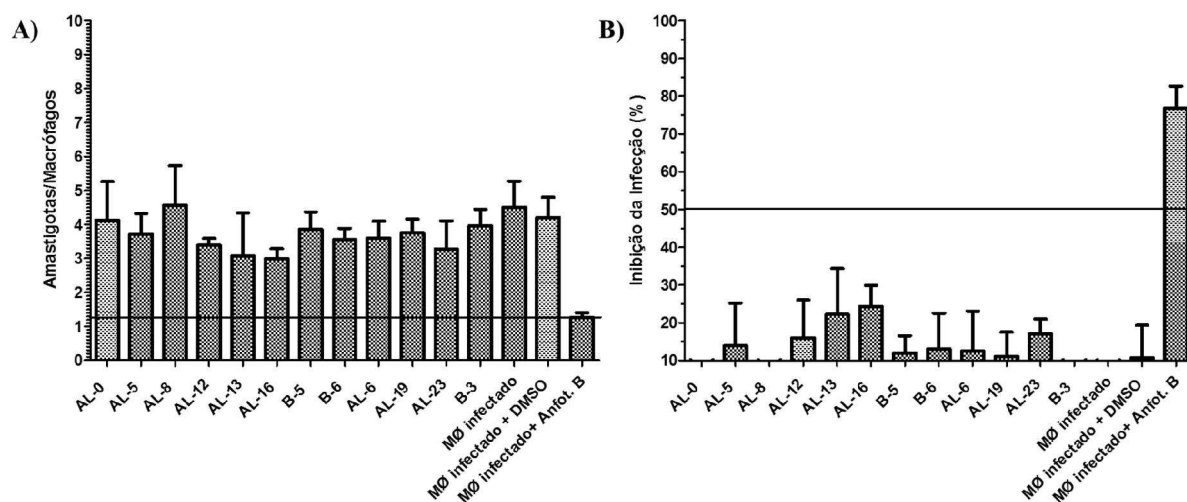


Figura 29. Avaliação do potencial leishmanicida dos compostos derivados de Benzofenonas em macrófagos infectados com *L. infantum chagasi* por microscopia óptica. A) razão do número de amastigotas *L. infantum chagasi* internalizadas por macrófagos após 48 h de tratamento nas concentrações correspondentes ao valor de IC₁₀ de cada composto químico, previamente estabelecidos, comparados com os grupos controles: macrófagos infectados sem tratamento, com tratamento por Anfotericina B (5 µg/mL) e na presença de DMSO a 0,5%; **B)** Percentual de inibição da infecção em macrófagos após 48 h de tratamento nas concentrações correspondentes ao valor de IC₁₀ de cada composto químico, previamente estabelecidos, comparados aos grupos controles: macrófagos infectados sem tratamento, com tratamento por Anfotericina B (5 µg/mL) e na presença de DMSO a 0,5%.

Na Figura 29A, também não foi observada nenhuma redução expressiva do número de amastigotas por macrófagos tratados com os diferentes compostos em comparação com o tratamento com Anfotericina B. O grupo controle incubado com 0,5% de DMSO também não mostrou alteração expressiva da razão entre o número de amastigotas internalizadas por macrófagos quando comparado ao grupo sem tratamento, o que demonstra mais uma vez que esta concentração de DMSO não é suficiente para

causar danos significativos durante a infecção. Na Figura 29B, alguns compostos se sobressaem aos demais no processo de inibição da infecção, apesar de não apresentarem uma taxa de inibição da infecção tão alta quanto a da Anfotericina B (76,9%): AL-12(16%), AL-13(22,2%), AL-16(24,3%) e AL-23(16,9%).

6.5.2 Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida de associações de derivados de Benzofenonas selecionados em formas amastigotas de *L. infantum chagasi*

A Figura 30 demonstra o percentual de inibição de infecção em macrófagos tratados com associações de derivados de Benzofenonas selecionados de acordo com os resultados encontrados em 6.5.1 e 6.6.1 (adiante), ou seja, aqueles compostos que apresentaram atividade leishmanicida tanto na técnica de microscopia quanto por citometria. As associações utilizadas, bem como as denominações e a concentração relativa de cada composto na solução estão demonstradas na Tabela 3. Em todas as associações, cada concentração é inferior à IC₁₀ para macrófagos definida anteriormente. Os macrófagos infectados com *L. infantum chagasi* foram tratados com associações de compostos por 48 h. O objetivo aqui foi verificar se a associação de compostos era capaz de apresentar sinergismo de adição ou de potenciação que fosse capaz de apresentar um efeito leishmanicida maior ou igual ao da Anfotericina B. Os resultados encontrados demonstram que dos 11 grupos de associações analisados, 4 (grupos 3, 7, 8 e 10) mostraram não apresentar diferenças com relação ao grupo controle de macrófagos infectados tratados com Anfotericina B (5 µg/mL). Com relação a carga parasitária, somente o grupo 7 não apresentou diferença quando comparado com o grupo controle de macrófagos infectados tratados com Anfotericina B.

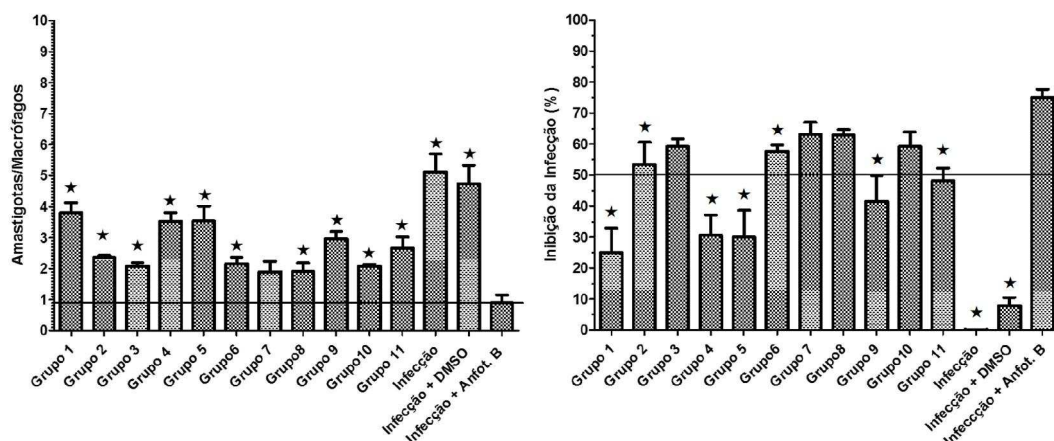


Figura 30. Percentual de inibição da infecção em macrófagos RAW 264.7 tratados com associações de derivados de Benzofenonas por 48 h (análise por microscopia óptica): **A)** razão do número de amastigotas *L. infantum chagasi* internalizadas por macrófagos, após 48 h de tratamento nas concentrações correspondentes ao valor de IC_{10ass} de cada associação de compostos, previamente estabelecidos, comparados com os grupos controles: macrófagos infectados sem tratamento, com tratamento por Anfotericina B (5 μ g/mL) e na presença de DMSO a 0,5%; **B)** Percentual de inibição da infecção em macrófagos após 48h de tratamento nas concentrações correspondentes ao valor de IC_{10ass} de cada associação de compostos, previamente estabelecidos. Cada barra representa a média + erro padrão de três experimentos independentes. Diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle tratado com Anfotericina B são indicadas pelo símbolo (*). Teste estatístico de variância ANOVA. IC_{10ass} : Concentração Inibitória de 10% das Associações.

Tabela 3. Associações entre derivados de Benzofenonas e as respectivas concentrações relativas de cada composto em cada associação utilizada para o tratamento de macrófagos RAW 264.7 infectados.

Associações	Concentrações relativas (μ g/mL)
Grupo 1 (AL-16+AL-19)	0,7812+0,7812
Grupo 2 (AL-16+B-5)	0,7812+0,7812
Grupo 3 (AL-16+AL-13)	0,7812+0,3906
Grupo 4 (AL-19+B-5)	0,7812+0,7812
Grupo 5 (AL-19+AL-13)	0,7812+0,63906
Grupo 6 (AL-13+B-5)	0,3906+0,7812
Grupo 7 (AL-16+AL-19+B-5)	0,521+0,521+0,521
Grupo 8 (AL-16+AL-19+AL-13)	0,521+0,521+0,2604
Grupo 9 (AL-16+AL-13+B-5)	0,521+0,2604+0,521
Grupo 10 (AL-19+AL-13+B-5)	0,521+0,2604+0,521
Grupo 11 (AL-16+AL-19+AL-13+B-5)	0,521+0,521+0,2604+0,521

6.6 Citometria de Fluxo

A inibição da infecção dos macrófagos tratados com diferentes compostos químicos (concentrações de IC₁₀) por Citometria de Fluxo, assim como na técnica de redução de MTT, também foi avaliada após 48 h de tratamento. Os resultados obtidos foram comparados com os grupos controles “macrófagos infectados sem tratamento” e “macrófagos infectados e tratados com a droga de referência Anfotericina B (5 µg/mL)”.

Adicionalmente, com a finalidade de comparar e confirmar os resultados obtidos pela contagem de amastigotas intracelulares pela microscopia óptica, foi traçada uma estratégia de análise por Citometria de Fluxo, baseando-se no pressuposto de que macrófagos infectados com *L. infantum chagasi* apresentariam uma quantidade de DNA marcado com iodeto de propídeo maior e proporcional à infecção quando comparados a macrófagos não infectados, ou com menos parasitos marcados com iodeto de propídeo (por apresentarem além do seu próprio DNA, o DNA também dos parasitos internalizados). Portanto, o percentual de macrófagos infectados foi calculado pela diferença entre a intensidade de fluorescência dos macrófagos infectados pela a fluorescência de macrófagos não-infectados.

A análise da porcentagem de macrófagos RAW 264.7 marcados com iodeto de propídeo foi realizada utilizando-se análise convencional em citômetro de fluxo: foi feita uma seleção da população celular de interesse, baseando-se em aspectos morfométricos utilizando gráficos de distribuição pontual de SSC (granulosidade) *versus* FSC (tamanho) (Figura 31A e C). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo macrófagos RAW 264.7, o percentual de macrófagos não-infectados e infectados, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos unidimensionais do tipo histogramas para número de eventos *versus* a fluorescência do iodeto de propídeo, como exemplificado na Figura 31B e D. A figura 31E representa a diferença entre a intensidade de fluorescência dos macrófagos infectados pela de macrófagos não-infectados. O programa FACSuite Software® foi utilizado para a aquisição de dados. Para a análise dos resultados, foi empregado o programa Flowing Software 2® e/ou o programa FACSuite Software®. Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos.

Nesta etapa do experimento, optou-se por trabalhar apenas com os derivados de Benzofenonas, já que estes apresentaram resultados melhores quando comparados aos

compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona.

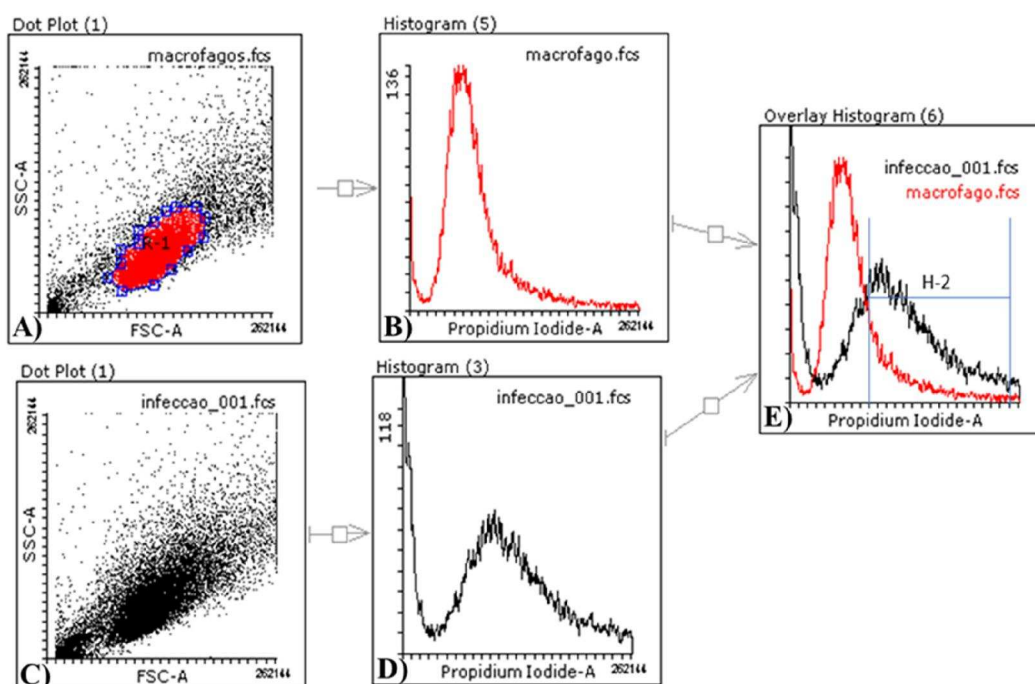


Figura 31. Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de macrófagos infectados por *L. infantum chagasi* após o tratamento *in vitro* com diferentes compostos. **A)** distribuição pontual de macrófagos não-infectados (SSC x FSC); **B)** histograma com eventos seleccionados em R-1; **C)** distribuição pontual de macrófagos infectados por *L. infantum chagasi* (SSC x FSC); **D)** histograma com todos os eventos; **E)** sobreposição de eventos de **B** e **D**. A região H-2 corresponde ao percentual de macrófagos infectados. Análise de dados obtida pelo programa Flowing Software 2®.

6.6.1 Atividade leishmanicida de derivados de Benzofenonas em macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. infantum chagasi* – DNA marcado com iodeto de propídeo

Na Figura 32 está demonstrado o percentual de inibição da infecção em macrófagos RAW 264.7 tratados com derivados de Benzofenonas por 48 h. Foram seleccionados os compostos que apresentaram alguma atividade leishmanicida no ensaio de citotoxicidade em amastigotas por microscopia óptica quando comparados com os macrófagos infectados e tratados com Anfotericina B (item 6.5.1). São eles: AL-12(16%), AL-13(22,2%), AL-16(24,3%), AL-23(16,9%), AL-19(11,12%), AL-5(13,8%), AL-6 (12,4%), B-5(11,9%) e B-6(13,0%). As concentrações testadas para estes compostos

foram as IC₁₀ determinadas previamente no ensaio de citotoxicidade em macrófagos para cada composto químico (ver Tabela 2). Como controles, foram utilizados macrófagos infectados não tratados, tratados com Anfotericina B (5 µg/mL) e infectados incubados com DMSO a 0,5%. Após 48 h de tratamento, foi observado que os compostos que melhor apresentaram atividade leishmanicida foram: AL-19 (23,3%), AL-16 (25,9%), AL-13 (22,8%) e B-5 (25,8%), quando comparados com o grupo tratado com Anfotericina B (90,7%). Os demais compostos apresentaram uma taxa de inibição de infecção inferior a 20%.

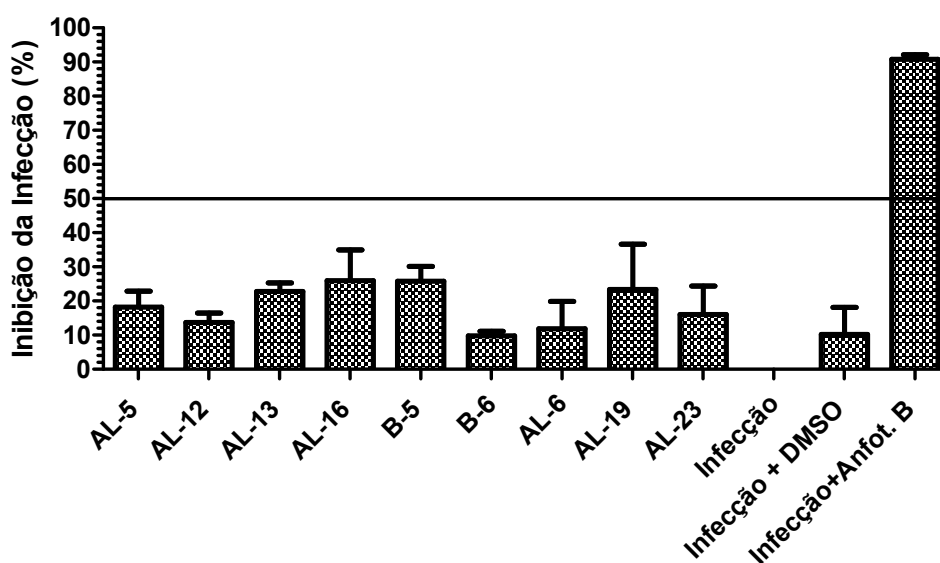


Figura 32. Avaliação da ação de derivados de Benzofenonas em macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. infantum chagasi* por Citometria de Fluxo. Percentual de inibição da infecção em macrófagos após 48 h de tratamento nas concentrações correspondentes ao valor de IC₁₀ de cada composto químico, previamente estabelecidos, comparados com os grupos controles: macrófagos infectados sem tratamento, com tratamento por Anfotericina B (5µg/mL) e na presença de DMSO a 0,5%. Cada barra representa a média + erro padrão de três experimentos independentes.

6.6.2 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de associações de derivados de Benzofenonas selecionados em macrófagos RAW 264.7

O objetivo deste experimento foi verificar se a associação de diferentes compostos derivados de Benzofenonas poderia ser tóxica aos macrófagos. As concentrações utilizadas para este ensaio estão demonstradas na Tabela 3. A avaliação da viabilidade dos macrófagos foi feita por citometria de fluxo.

Como observado na Figura 33 e 34, nenhuma das associações foram tóxicas para os macrófagos a tal ponto de comprometer sua viabilidade celular. As concentrações das associações utilizadas neste ensaio (ver Tabela 3), denominadas IC₁₀ das associações (IC_{10ass}), serão as mesmas utilizadas para se verificar o efeito leishmanicida nos ensaios em amastigotas intracelulares.

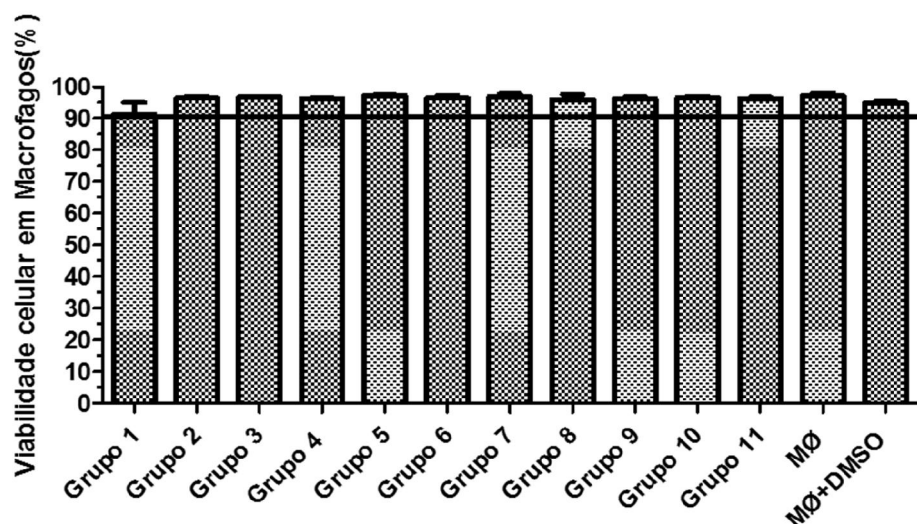


Figura 33. Avaliação da viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 tratados com associações de derivados de Benzofenonas. Percentual de viabilidade celular em macrófagos após 48 h de tratamento com associações de derivados de Benzofenonas nas concentrações correspondentes ao valor IC_{10ass} de cada associação. Cálculos feitos a partir de dados obtidos por citometria de fluxo, representados na Figura 33. **Grupo 1:** AL-16+AL-19; **Grupo 2:** AL-16+B-5; **Grupo 3:** AL-16+AL-13; **Grupo 4:** AL-19+B-5; **Grupo 5:** AL-19+AL-13; **Grupo 6:** AL-13+B-5; **Grupo 7:** AL-16+AL-19+B-5; **Grupo 8:** AL-16+AL-19+AL-13; **Grupo 9:** AL-16+AL-13+B-5; **Grupo 10:** AL-19+AL-13+B-5; **Grupo 11:** AL-13+Al-16+Al-19+B-5.

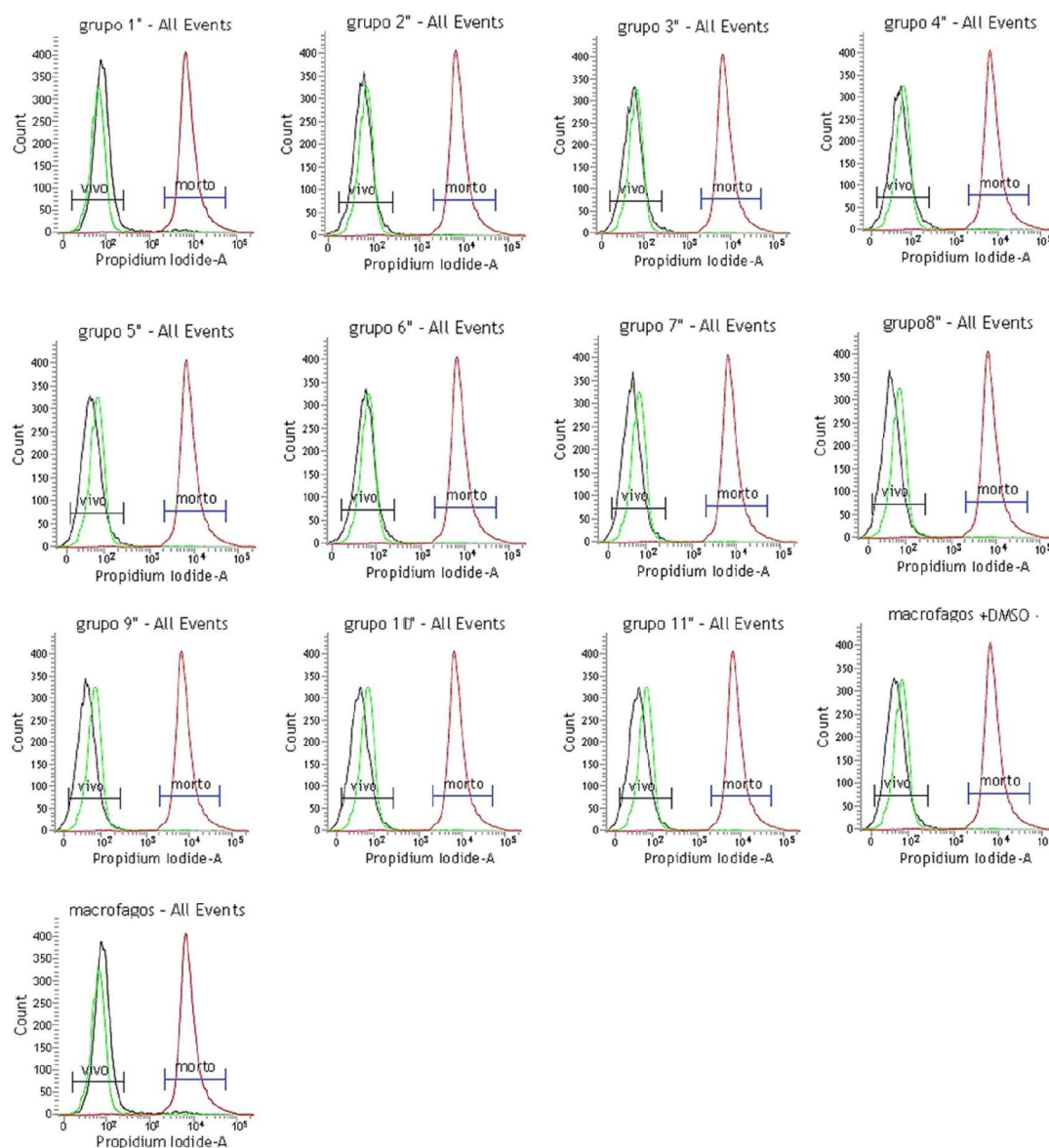


Figura 34. Avaliação da viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 tratados com associações de derivados de Benzofenonas (gráficos da citometria de fluxo): foram usados como grupos controles macrófagos vivos e mortos, ambos marcados com iodeto de propídeo. Macrófagos também incubados com 0,5% de DMSO.

6.6.3 Atividade leishmanicida de associações de derivados de Benzofenonas em macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. infantum chagasi*

O resultado da inibição da infecção nos macrófagos RAW 264.7 com *L. infantum chagasi* tratados com associações de derivados de Benzofenonas está representado na

Figura 35. As associações foram utilizadas nas concentrações estabelecidas conforme descrito na Tabela 3. Após 48 h de tratamento, os grupos 2 (64,3%), 3 (79,6%), 6 (75%), 7 (75,9%), 8 (70,3%) e 9 (61,1%) foram capazes de promover uma inibição significativa ($p<0,05$) da infecção quando comparados ao controle tratado com Anfotericina B (5 $\mu\text{g/mL}$) (92,06%). Isso demonstra a ocorrência de sinergismo entre os derivados de Benzofenonas quando associados em uma mesma solução. Os controles infectados sem tratamento ou na presença de DMSO a 0,5% não apresentaram inibição significativa da infecção quando comparados com o controle tratado com Anfotericina B ($p<0,05$).

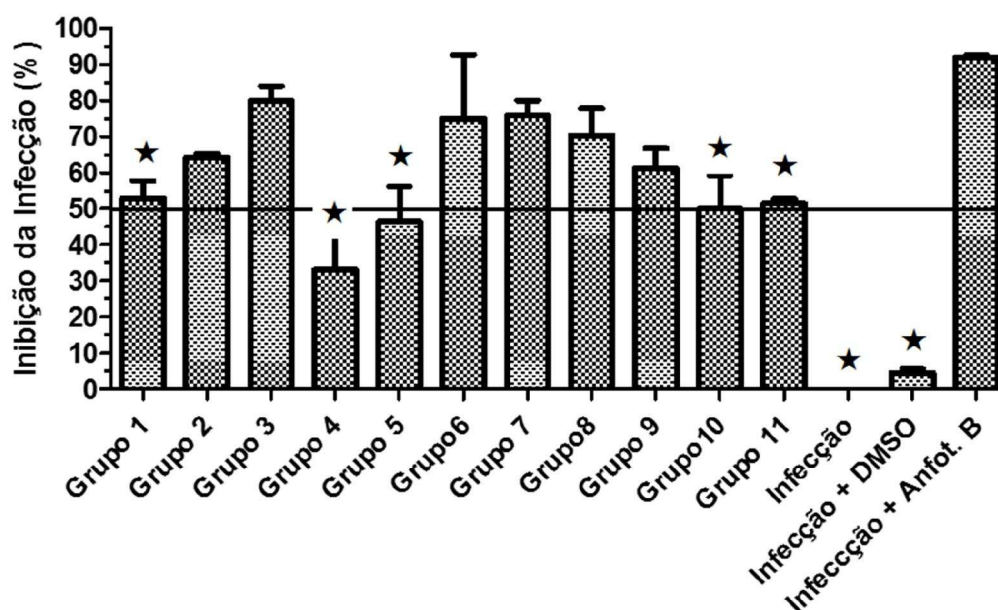


Figura 35. Percentual de inibição da infecção em macrófagos RAW 264.7 tratados com associações de derivados de Benzofenonas por 48h. Análise por citometria de fluxo. Macrófagos infectados com *L. infantum chagasi* foram tratados com as concentrações correspondentes ao valor $IC_{10\text{ass}}$ de cada associação. Foram utilizados como controles macrófagos infectados sem tratamento, macrófagos infectados tratados com Anfotericina B 5 $\mu\text{g/mL}$ e macrófagos infectados em meio contendo DMSO a 0,5%. Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão de três experimentos independentes. Diferenças significativas estatisticamente ($p<0,05$) em relação ao controle tratado com Anfotericina B são indicadas pelo símbolo (*). Teste estatístico de variância ANOVA. **Grupo 1:** AL-16+AL-19; **Grupo 2:** AL-16+B-5; **Grupo 3:** AL-16+AL-13; **Grupo 4:** AL-19+B-5; **Grupo 5:** AL-19+AL-13; **Grupo 6:** AL-13+B-5; **Grupo 7:** AL-16+AL-19+B-5; **Grupo 8:** AL-16+AL-19+AL-13; **Grupo 9:** AL-16+AL-13+B-5; **Grupo 10:** AL-19+AL-13+B-5; **Grupo 11:** AL-13+AL-16+AL-19+B-5.

Na Figura 36 estão representados os gráficos obtidos do programa FACSuite Software® durante a leitura dos testes. É interessante observar que o gráfico do controle macrófagos infectados tratados com Anfotericina B praticamente se sobrepõe ao gráfico dos macrófagos não infectados, e o gráfico dos macrófagos infectados incubados com DMSO 0,5% se sobrepõe ao gráfico dos macrófagos infectados. Isso apoia o pressuposto de que ocorre um aumento da carga de DNA proporcional a infecção.

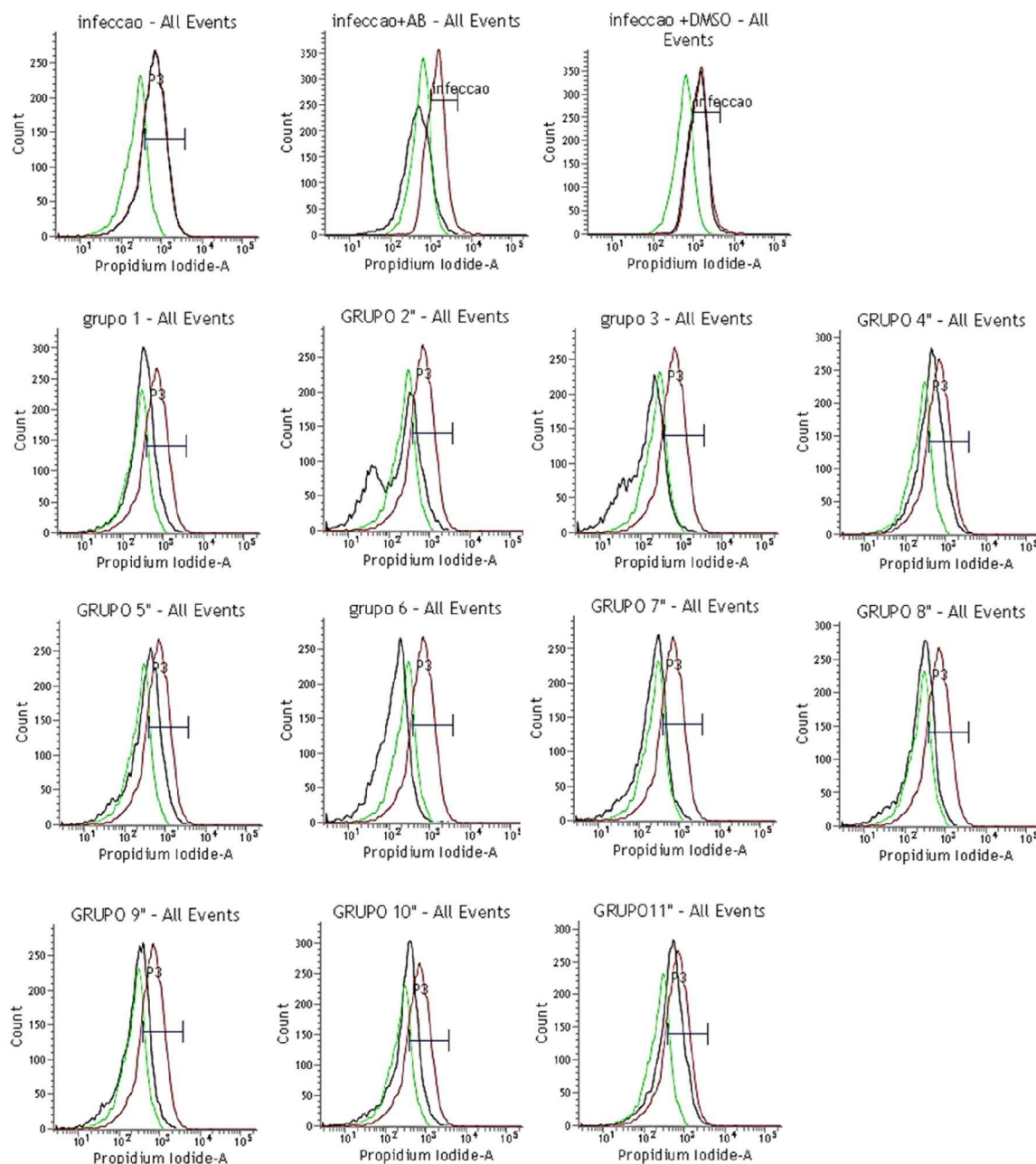


Figura 36. Atividade leishmanicida de associações de derivados de Benzofenonas em macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. infantum chagasi*. Proporção de infecção em macrófagos infectados após o tratamento com as associações de Benzofenonas comparando-os aos grupos controles macrófago sem infecção e macrófagos infectados sem tratamento. Gráficos obtidos do programa FACSuite Software®. Legenda: macrófagos sem infecção (verde); macrófagos infectados sem tratamento (vermelho); macrófagos infectados tratados com associações de Benzofenonas (preto). **Grupo1:** AL-16+AL-19; **Grupo 2:** AL-16+B-5; **Grupo 3:** AL-16+AL-13; **Grupo 4:** AL-19+B-5; **Grupo 5:** AL-19+AL-13; **Grupo 6:** AL-13+B-5; **Grupo 7:** AL-16+AL-19+B-5; **Grupo 8:** AL-16+AL-19+AL-13; **Grupo 9:** AL-16+AL-13+B-5; **Grupo 10:** AL-19+AL-13+B-5; **Grupo 11:** AL-13+AL-16+AL-19+B-5.

6.7 Comparação entre técnicas: Microscopia óptica X Citometria de Fluxo

Metodologias tradicionais, como a microscopia óptica, além de serem laboriosas carregam em si, mais do que outras técnicas, a questão do erro humano. Encontrar novas metodologias que sejam de mais fácil manuseio e com resultados mais precisos é um grande passo para acelerar o desenvolvimento de novos fármacos. Pensando nisso, foi proposto neste trabalho utilizar a Citometria de Fluxo, com outro foco, diferente dos já propostos, como uma nova ferramenta para investigação indireta de novas drogas em potencial. Os resultados encontrados nas análises comparando os dados obtidos pela microscopia óptica e pela citometria de fluxo são demonstrados na Figura 37.

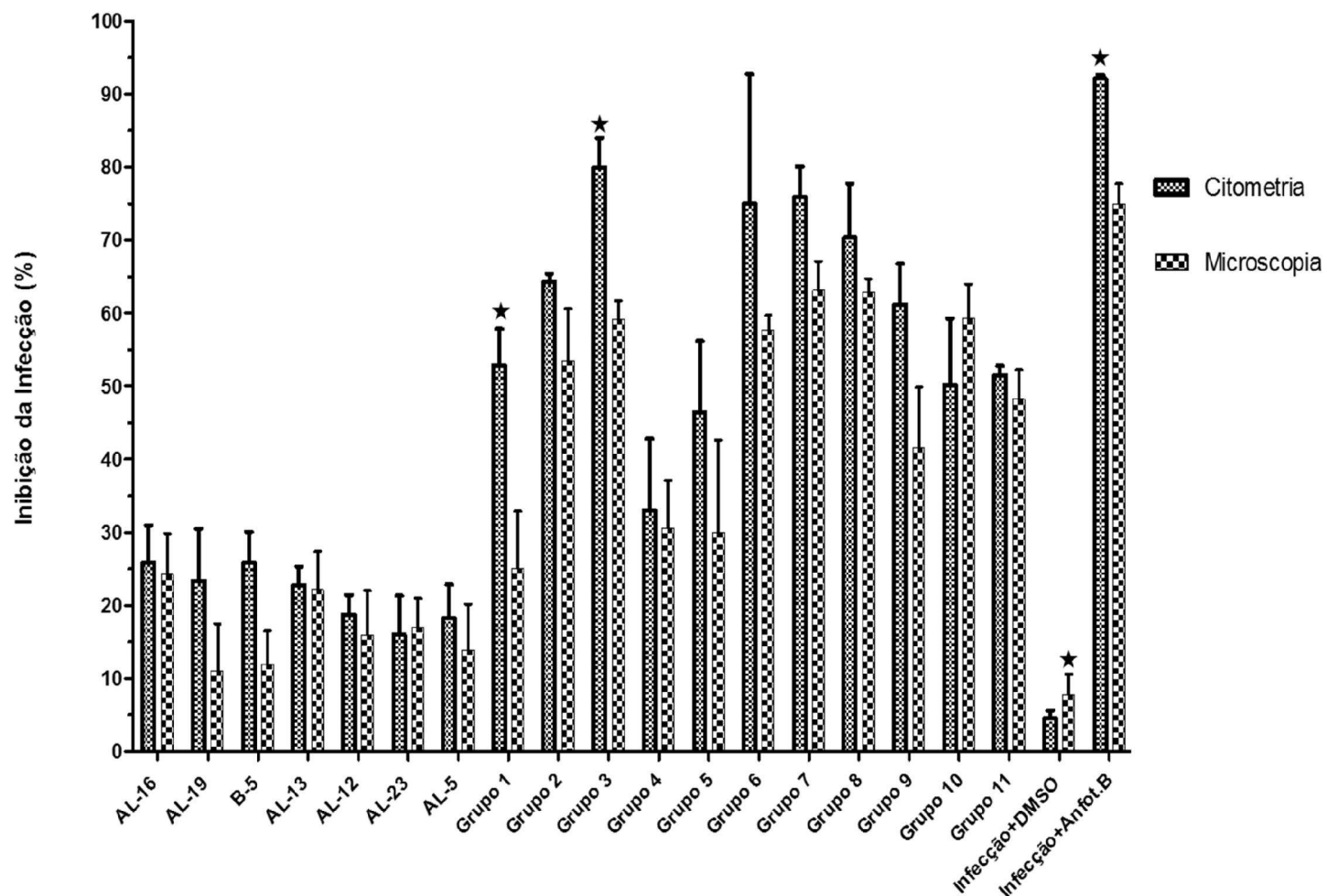


Figura 37. Comparação entre os percentuais de inibição obtidos pela técnica de Citometria de Fluxo e Microscopia óptica. Cada barra representa a média + erro padrão de três experimentos independentes. Diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$) entre outras diferentes técnicas são indicadas pelo símbolo (*). Teste estatístico de *t* de Student não pareado. **Grupo 1:** AL-16+AL-19; **Grupo 2:** AL-16+B-5; **Grupo 3:** AL-16+AL-13; **Grupo 4:** AL-19+B-5; **Grupo 5:** AL-19+AL-13; **Grupo 6:** AL-13+B-5; **Grupo 7:** AL-16+AL-19+B-5; **Grupo 8:** AL-16+AL-19+AL-13; **Grupo 9:** AL-16+AL-13+B-5; **Grupo 10:** AL-19+AL-13+B-5; **Grupo 11:** AL-13+AL-16+AL-19+B-5.

7 DISCUSSÃO

A LV é uma enfermidade de grande importância para saúde pública. É a terceira doença mais importante a ser transmitida por insetos hematófagos, sendo superada somente pela filariose e pela malária (REITHINGER *et al.*, 2002). Além disso, é a segunda enfermidade de maior relevância entre as protozooses tropicais (BASTOS *et al.*, 2015). Mais de 90% dos casos de LV ocorrem em países onde as condições socioeconômicas são precárias (Brasil, Índia, Bangladesh, Nepal e Sudão)(MONTALVO *et al.*, 2012). No Brasil, a relevância da LV reside não somente na sua ampla distribuição e alta incidência, mas também no fato de esta doença poder assumir formas graves e letais quando associada a infecções concomitantes e ao quadro de má nutrição. Segundo a OMS mesmo com todos os avanços alcançados no diagnóstico e no tratamento ocorridos nos últimos 10 anos, as leishmanioses ainda mostram taxas de morbimortalidade com grande tendência de aumento. Associado a este fato, existem ainda o problema da coinfeção do vírus HIV com a LV, que é um desafio emergente para o controle mundial da doença (GRIENSVEN *et al.*, 2014), além da resistência desenvolvida ao tratamento convencional com antimoniais, o que sugere o surgimento de cepas resistentes do parasito (HENDRICKX *et al.*, 2017; ROJAS *et al.*, 2006).

Além dos problemas da coinfeção e da resistência, existem ainda os problemas relacionados ao tratamento convencional em si: longo, com elevada toxicidade, diversos efeitos colaterais, de alto custo, com difícil administração, necessitando muitas vezes de internação hospitalar. Todos estes fatos levam, muitas vezes, ao abandono do protocolo terapêutico (CROFT *et al.*, 2006; SUNDAR, 2001).

Um grande desafio no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses são as metodologias empregadas para a triagem e a seleção de potenciais compostos com efeitos leishmanicida para ensaios *in vitro*, uma vez que estes apresentam variações consideráveis na avaliação do potencial/ação leishmanicida e na citotoxicidade das drogas mensuradas (NWAKA; HUDSON, 2006). Além disso, a falta de padronização e de um consenso sobre qual melhor ensaio a ser empregado, além da falta de reprodutibilidade nos resultados entre os grupos envolvidos são fatores a serem considerados (MAIA *et al.*, 2013). Estes fatos refletem na pouca inovação no tratamento da leishmaniose nas últimas décadas, apesar de inúmeras pesquisas serem feitas na área.

Apesar de todos os empecilhos, os testes *in vitro* são essenciais para testar novos compostos e fármacos para o uso humano, uma vez que selecionam aqueles que apresentam menor citotoxicidade para células de mamíferos e possível efeito na estrutura do parasito. Eles avaliam principalmente a viabilidade celular, a genotoxicidade (danos ao DNA) e a toxicidade e danos celulares (tanto para a célula do hospedeiro quanto a do parasito). As vantagens dos testes *in vitro* em relação aos testes *in vivo* baseiam-se no fato dos primeiros apresentarem baixo custo, rapidez nos resultados, condições experimentais sob controle, além de substituir ou diminuir o uso de animais e não precisar de aprovação de comitê de ética (CROFT *et al.*, 2006). Selecionados os compostos no processo *in vitro*, seguem-se os procedimentos *in vivo*, partindo do prelúdio de que os compostos selecionados apresentam em primeira instância uma baixa toxicidade para o hospedeiro e uma grande chance de eliminar o parasito.

Partindo do exposto até agora, este trabalho buscou avaliar o possível efeito leishmanicida *in vitro* dos diferentes compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona e compostos derivados de Benzofenonas em um modelo experimental que emprega macrófagos como modelo de células de mamíferos para estudar a citotoxicidade dos compostos, bem como *L. infantum chagasi* nas formas promastigotas e amastigotas para estudo do efeito leishmanicida. Em paralelo, foi feita uma correlação entre os resultados encontrados em técnicas tradicionais (ensaios de MTT e microscopia óptica) e uma nova metodologia proposta por nosso grupo de pesquisa, empregando a citometria de fluxo para a avaliação da carga de parasitos internalizados pelos macrófagos.

Inicialmente, foram realizados o que ficou denominado como ensaios de Solubilidade. A princípio, todo composto químico apresenta a capacidade de se arranjar em uma ou mais estruturas cristalinas diferentes. Define-se como polimorfismo a capacidade de uma substância existir no estado sólido com, no mínimo, duas estruturas cristalinas diferentes (HALEBLIAN; MCCRONE, 1969). Portanto, todo composto químico pode apresentar o fenômeno do polimorfismo. Entretanto, isso nem sempre é observado em função das barreiras cinéticas e termodinâmicas. A variação da estrutura cristalina de um sólido muitas vezes pode levar a alterações em suas propriedades físico-químicas (dureza, pressão de vapor, solubilidade, densidade, estabilidade física e química, etc.). Como resultado, muitas propriedades importantes para um fármaco podem ser alteradas, tais como a velocidade de dissolução (diretamente relacionada à

biodisponibilidade), a estabilidade física e química, a compactação e o escoamento do pó, etc. (BYRN *et al.*, 1999). Destas alterações, a questão da biodisponibilidade e solubilidade merece grande atenção. Há vários trabalhos que descrevem a importância de se estudar as diferentes formas cristalinas para a dissolução e a biodisponibilidade dos fármacos. Em 1979, foi feito um estudo mostrando uma diferença na solubilidade entre as duas formas cristalinas da fenitoína, em função do tipo de cristal que cada uma apresentava (CHAKRABARTI *et al.*, 1978). Todo o exposto até agora corrobora a atitude de abandono dos compostos químicos que se cristalizaram nas primeiras 48 h em nossos experimentos iniciais, uma vez que a falta de informação sobre estes estudos polimórficos a respeito de cada composto é um quesito de desclassificação para os mesmos, reduzindo um viés a mais em nosso trabalho. Desta forma, nesta etapa do trabalho foram selecionados para o próximo passo do estudo somente aqueles compostos e/ou diluições destes compostos que durante as primeiras 48 h não se cristalizaram ou se cristalizaram e seus cristais se desfizeram dentro destas 48 h. Portanto, os compostos selecionados dos Triazólicos derivados da indan-1,3-diona foram o WL-28, WL-40 e WL-43; dos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona foram WL-12, WL-13, WL-14, WL-16, WL-17, WL-19, WL-25 e WL-26; e os derivados de Benzofenonas foram AL-0, AL-4, AL-5, AL-6, AL-8, AL-12, AL-13, AL-16, AL-19, AL-23, B-3, B-5 e B-6.

Em seguida, os compostos selecionados acima mencionados foram utilizados em testes *in vitro* utilizando macrófagos RAW 264.7. O emprego deste tipo de célula é muito útil para este tipo de trabalho, uma vez que é menos dispendioso e mais rápido, quando comparado a culturas de células primárias, como aquelas obtidas do peritônio de camundongos. Além do mais, oferece uma fonte ilimitada de células homogêneas, que garante reprodutibilidade dos testes e tolera altas doses de fármacos, como aquelas testadas no início do trabalho (MAIA *et al.*, 2007). Nesta etapa, os compostos selecionados foram submetidos a avaliação de citotoxicidade pelo método MTT. Os macrófagos foram incubados por 48 h na presença de uma série de diluições seriadas, a fim de se determinar a IC₁₀ de cada composto químico em análise. O estudo da viabilidade *in vitro* durante a triagem de compostos é de fundamental importância para se avaliar a biocompatibilidade das substâncias em análises, além de ser possível prever o quanto determinada substância pode ser ou não tóxica para estudos *in vivo*, por intermédio da determinação da IC₁₀ (ROGERO; IKEDA, 2003).

De modo geral, os ensaios mostraram que os compostos Triazólicos derivados da indan-1,3-diona e derivados da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona apresentaram uma baixa citotoxicidade em macrófagos quando testados nas concentrações mais altas (1,25 µg/mL). Somente os compostos WL-12, WL-26, WL-40 e WL-43 apresentaram, nesta concentração, taxa de mortalidade superior a 10%. A partir da concentração 0,3125 µg/mL, todos os compostos apresentaram taxa de mortalidade inferior a 10%. Estes achados indicam um bom prognóstico para uma droga em teste, uma vez que são indicativos de que a toxicidade *in vivo* também seja baixa. Já para os derivados de Benzofenonas, a maioria dos compostos apresentaram uma taxa de mortalidade bem maior nas concentrações mais altas (50 µg/mL): AL-5, AL-8, AL-12, AL-13, AL-16, B-5 e B-6. Apenas o AL-0 apresentou uma menor toxicidade para os macrófagos nas diluições propostas (a partir da concentração 25 µg/mL, a taxa de mortalidade dos macrófagos foi inferior a 10%). Os compostos AL-4 e AL-6 foram os que apresentaram a maior toxicidade: para o AL-4, a menor taxa de mortalidade foi apresentada na menor concentração proposta (0,024414 µg/mL) e, para o AL-6, a menor taxa de mortalidade foi vista na concentração de 0,048828 µg/mL. Para os demais compostos, as taxas de mortalidade foram inferiores a 10% nas concentrações a partir de 3,125 µg/mL (B-6, B-3 e AL-23), 0,390625 µg/mL (AL-5, AL-8 e AL-12) e 1,5625 µg/mL (AL-16, AL-19, AL-13 e B-5). Estes achados deixam claro, mais uma vez, a importância de se realizar experimentos *in vitro* específicos em células que serão utilizadas em ensaios subsequentes para os testes de drogas. Desta forma, só serão utilizadas nas próximas etapas somente os compostos e/ou diluições que apresentaram taxa de mortalidade para macrófagos inferior a 10%.

Paralelamente aos ensaios de citotoxicidade dos compostos em macrófagos, foram feitos também ensaios de citotoxicidade em formas promastigotas de *L. infantum chagasi*. De maneira habitual, os ensaios em formas promastigotas do parasito estão sempre presentes na triagem inicial de compostos candidatos a drogas leishmanicidas, por serem testes baratos e simples (FUMAROLA *et al.*, 2004; LÓPEZ-ARENCIBIA *et al.*, 2015). Neste sentido, os compostos selecionados foram submetidos a avaliação da citotoxicidade em formas promastigotas pelo método MTT. As formas promastigotas foram incubados por 48 h na presença 1,25 µg/mL dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona ou de indan-1,3-diona e na presença de 50 µg/mL de derivados de Benzofenonas. O objetivo desse procedimento foi avaliar a eficácia

terapêutica *in vitro* pela verificação do potencial leishmanicida destes compostos. Os resultados mostraram que nenhum dos compostos testados foram capazes de provocar redução significativa da população de promastigotas quando comparados com o grupo controle tratado com Anfotericina B (IC₅₀ 44,43 µg/mL, ver anexo IV). É importante ressaltar que a Anfotericina B é um potente leishmanicida disponível, com estudos comprovados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, contra formas promastigotas e amastigotas do parasito do gênero *Leishmania* (CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011). Mesmo esta etapa não tendo demonstrado os resultados esperados, os ensaios em formas amastigotas da *L. infantum chagasi* foram realizados, uma vez que foi demonstrado em diversos estudos que há uma diferença na expressão gênica entre formas promastigotas metacíclicas, amastigotas intracelulares e formas axênicas (HOLZER *et al.*, 2006; LEIFSO *et al.*, 2007; VERMEERSCH *et al.*, 2009). Logo, é possível que estes compostos talvez apresentem alguma ação sobre as formas amastigotas, mesmo não tendo ação sobre as formas promastigotas.

A próxima etapa do trabalho baseou-se em avaliar o potencial leishmanicida dos compostos em formas amastigotas intracelulares. A maioria dos testes de drogas encontrados na literatura sobre as formas amastigotas emprega formas amastigotas axênicas, cultivadas *in vitro* para a avaliação do potencial leishmanicida (ROY *et al.*, 2001). Os dois modelos de triagem (ensaio em formas promastigotas e amastigotas axênicas) são válidos, apesar de não representarem de forma real o parasito encontrado em hospedeiros vertebrados, as amastigotas internalizadas em macrófagos. Para as avaliações necessárias para a verificação do efeito das drogas nas amastigotas intracelulares, optou-se por trabalhar com duas metodologias: uma tradicional, baseada na contagem de amastigotas internalizadas em macrófagos por intermédio da microscopia óptica; e uma experimental, utilizando a diferença entre a quantidade de DNA marcado por iodeto de propídeo dos macrófagos infectados e não infectados para determinar o percentual de infecção, de forma indireta, por citometria de fluxo.

Após 48 h de tratamento com Triazólicos derivados da indan-1,3-diona ou com os Triazólicos derivados da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona, não foi observada, pela técnica de microscopia óptica, nenhuma redução percentual significativa da infecção em macrófagos RAW 264.7, muito menos redução da carga parasitaria de amastigotas internalizadas em macrófagos (razão entre o número de amastigotas por macrófago infectado) em comparação com o grupo tratado com Anfotericina B (5 µg/mL), que

apresentou um percentual de inibição de 58% e uma média de carga parasitária de 2,17/macrófago. Portanto, apesar de estudos mostrarem que outros derivados Triazólicos apresentaram redução significativa da taxa de infecção em macrófagos, o mesmo não ocorre para os compostos Triazólicos utilizados em nossos experimentos (BEZERRA *et al.*, 2007; CROFT *et al.*, 2005; EUFRÂNIO *et al.*, 2012; PAPADOPOULOU *et al.*, 2012).

Para os derivados das Benzofenonas, foi possível observar um percentual de inibição da infecção em torno de 20% nos grupos tratados com os compostos AL-12, AL-13, AL-16 e AL-23 quando comparados com o grupo tratado com Anfotericina B (5 µg/mL), que apresentou um percentual de inibição da infecção de 76,9%. Para os demais compostos, o efeito foi menos expressivo na inibição da infecção.

É importante ressaltar que a microscopia óptica, apesar de ser uma metodologia consolidada para este tipo de estudo, conta com várias dificuldades operacionais para a avaliação e obtenção de resultados *in vitro* dos testes de drogas com potencial terapêutico. A contagem de parasitos em lâmina, além de ser muito trabalhosa, demanda muito tempo para a obtenção do material pronto para a análise ao microscópio óptico. Nas etapas do procedimento, muitas vezes as células podem ser perdidas ou terem sua integridade estrutural comprometida, tanto durante o processo de lavagem para retirada de células mortas e promastigotas não internalizadas por macrófagos quanto no processo de coloração (tempo de fixação, tempo de exposição ao corante, etc.). É, portanto, uma técnica que demanda trabalho, tempo e treinamento. Outro fato que deve ser levado em consideração é a questão da padronização da capacidade de volume da placa, a proporção do número de *Leishmania*/macrófago durante o processo de infecção, a quantidade de células que serão contadas ao microscópio óptico, o tipo de corante que será utilizado, bem como o tempo de exposição ao mesmo. O ideal é que todas as contagens sejam feitas, de preferência, pelo mesmo indivíduo a fim de ser reduzir o viés do observador/contador, o que às vezes se torna uma questão muito laboriosa, uma vez que o número de lâminas para contagem é muito elevado.

Pensando em todas as dificuldades demonstradas por esta técnica, optamos por uma metodologia experimental em que empregamos a citometria de fluxo para a quantificação de parasitos internalizados pelos macrófagos. Partindo do pressuposto que macrófagos infectados irão apresentar, além do seu DNA, também o DNA dos parasitos internalizados, foi formulada a hipótese de que seria possível a diferença entre a

quantidade de DNA presente em macrófagos infectados e macrófagos não infectados prever o grau de infecção de um macrófago.

Para defender esta hipótese, macrófagos infectados com *L. infantum chagasi* foram tratados por 48 h com os derivados de Benzofenonas AL-16, AL-19, AL-13, AL-12, AL-23, AL-6, B-5 e B-6.¹ Após o tratamento, os grupos tratados e não tratados foram fixados em formalina 4%, cujo objetivo foi manter a integridade estrutural da célula e ao mesmo tempo permitir o livre acesso do iodeto de propídeo pela membrana plasmática e nuclear. Uma vez em contato com o conteúdo nuclear, o iodeto de propídeo pode se intercalar ao DNA, tanto ao dos macrófagos quanto ao dos parasitos. Desta forma, quanto maior a quantidade de DNA presente na célula, maior será a fluorescência capturada pelo citômetro e maior será a taxa de infecção.

Os resultados encontrados pela análise por citometria de fluxo mostraram que os derivados de Benzofenonas AL-16, AL-19, AL-13 e B-5 inibem a infecção em torno de 25% quando comparados com o grupo tratado com Anfotericina B (5 µg/mL), que apresentou uma taxa de inibição próxima a 90%. Os demais compostos, não apresentaram resultados expressivos. É interessante notar que os compostos que se sobressaíram na análise microscópica foram os mesmos que se destacaram também na citometria (AL-16, AL-19, AL-13 e B-5). Por outro lado, pela análise por citometria houve detecção de maior inibição de infecção pela Anfotericina B em comparação com a técnica de microscopia. Isso pode ser explicado por vantagens relacionadas à técnica de citometria, uma vez que já foi demonstrado por estudos que esta técnica melhora e simplifica o procedimento de triagem de drogas (GIORGIO *et al.*, 2000; KOŁODZIEJ *et al.*, 2008), isto em decorrência da maior rapidez e sensibilidade conferidas pela metodologia, o que permite contagem de um número muito superior de células por segundo em comparação com a microscopia, onde o número de células é menor e o número de campos contados é limitado. Além do mais, a leitura no citômetro de fluxo é feita imediatamente após o tratamento, reduzindo a possibilidade de possíveis interferentes no processo com o passar do tempo.

Ainda no processo investigativo do potencial efeito leishmanicida de derivados de Benzofenonas em formas amastigotas internalizadas, foram feitas várias associações

¹ Nesta etapa do experimento, foram utilizados somente os compostos derivados de Benzofenonas que apresentaram alguma atividade leishmanicida contra as formas amastigotas internalizadas. Como os Triazólicos derivados da indan-1,3- diona e os Triazólicos derivados da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H) – ona apresentaram atividade insignificante, eles deixaram de ser testados a partir desta etapa.

entre os compostos AL-16, AL-13, AL-19 e B5. Os macrófagos infectados com *L. infantum chagasi* foram tratados por 48 h com estas associações e analisados tanto por citometria de fluxo quanto por microscopia óptica.

Antes de se iniciar o tratamento com as variadas associações em macrófagos infectados, primeiro foi feita a avaliação da citotoxicidade dessas associações em macrófagos. O objetivo foi verificar se elas seriam tóxicas para os macrófagos. Os resultados foram todos analisados por citometria de fluxo, em um ensaio de viabilidade celular. Todas as células foram marcadas com iodeto de propídeo, uma metodologia já bem descrita na literatura e rotineira no meio científico (LOPES *et al.*, 2012). Os resultados demonstraram que, em todas as associações, o percentual de morte dos macrófagos foi inferior a 10%, quando comparados aos macrófagos sem tratamento, validando, portanto, as concentrações das associações utilizadas.

O próximo passo foi a avaliação do potencial de atividade leishmanicida dessas associações em macrófagos infectados com *L. infantum chagasi* após 48 h de tratamento. Os resultados encontrados pela microscopia óptica demonstraram que as associações identificadas como grupos 3, 7, 8 e 10 não apresentaram diferenças estatísticas quanto aos percentuais de inibição da infecção (59,2%; 63,1%; 62,8% e 59,3%, respectivamente) quando comparados com o grupo tratado com Anfotericina B (74,9%). Com relação à razão entre o número de amastigotas por macrófagos, apenas o grupo 7 apresentou uma redução significativa quando comparado ao grupo tratado com Anfotericina B. No entanto, apesar de estatisticamente somente o grupo 7 ter apresentado esta redução, ao microscópio óptico é possível observar que o número de amastigotas internalizadas por macrófagos também foi reduzido no grupo 8, conforme a imagem apresentada no anexo V.

Quando os ensaios foram analisados por citometria de fluxo, foi observado que as associações identificadas como grupos 2, 3, 6, 7, 8 e 9 não apresentaram diferenças estatísticas quanto aos percentuais de inibição da infecção (64,3%; 79,6%, 75%; 75,9%, 70,3% e 61,1%, respectivamente) quando comparados com o controle tratado com Anfotericina B, cujo percentual de inibição foi de 92,06%. Partindo do pressuposto que a técnica de citometria de fluxo seja mais sensível, é possível justificar estas pequenas divergências encontradas em alguns grupos analisados. Por outro lado, nota-se que, independente da técnica utilizada, os grupos 3, 7 e 8 apresentaram um percentual de inibição da infecção significativo tanto pela microscopia óptica quanto pela citometria de

fluxo quando comparados com o controle tratado com Anfotericina B. Estes resultados associados apenas corroboram entre si e intensificam a hipótese de que a associação entre os compostos AL-16 e AL-13 (grupo 3), AL-16, AL-19 e B-5 (grupo 7) e AL-16, AL-19 e AL-13 (grupo 8) apresentam ação leishmanicida em formas amastigotas da *L. infantum chagasi* internalizadas em macrófagos RAW 264.7.

Ao se fazer a comparação dos resultados encontrados entre as duas metodologias empregadas para a avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e de indan-1,3-diona e dos compostos derivados de Benzofenonas em formas amastigotas internalizadas em macrófagos, foram observadas algumas correlações entre os resultados obtidos pelas duas técnicas. Dos 120 testes realizados, em 20% houve discordância nos resultados encontrados. Como demonstrado na Figura 36, é interessante notar a clara definição que existe entre o grupo de células que não estão infectadas e o grupo de células infectadas, cujo aumento na emissão de fluorescência é evidente, consequência direta do aumento da quantidade de DNA e, consequentemente, da quantidade de parasitos. E ainda mais interessante, é o fato de os grupos de células infectadas e tratadas se posicionarem entre estes dois limites estabelecidos previamente, de acordo com sua carga parasitária: quanto maior a eficácia do tratamento, maior a tendência do deslocamento para esquerda; quanto menor a eficácia, maior o deslocamento para a direita. Apesar dos bons resultados demonstrados, um dos fatores limitantes desta metodologia está diretamente relacionada ao volume de parasitos internalizados: se a quantidade de parasitos for muito pequena, mesmo com a sensibilidade do Citômetro de Fluxo, imagina-se que será difícil ou até mesmo impossível construir limites seguros para a análise, diminuindo o grau de confiabilidade dos resultados. Outra questão que deve ser investigada também é se está ocorrendo a formação de grumos de macrófagos. Isto poderiam levar a resultados errôneos, uma vez que proporcionalidade da fluorescência estaria relacionada ao material nuclear somente dos macrófagos e não dos parasitos. Ainda é preciso lapidar determinados parâmetros para esta metodologia, a fim de torná-la segura para o uso cotidiano, como por exemplo, estabelecer a quantidade mínima de parasitos internalizados para se obter resultados seguros, fazer novos testes utilizando drogas com eficácia já conhecida ou utilizar para a análise macrófagos infectados com outras espécies de *Leishmanias* e com *Leishmanias* que expressem proteínas fluorescentes. Dessa forma seria possível estabelecer resultados paralelos que poderiam ser comparados com os

atuais, para verificar se está ocorrendo a formação de grumos de macrófagos que estaria levando a resultados falsos.

Encontrar novas técnicas que sejam melhores, mais rápidas e confiáveis para a triagem de novas drogas é de extrema importância para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças parasitárias. Visto por este ângulo, a citometria de fluxo oferece diversas vantagens técnicas que podem contribuir para tal fato, tais como: maior rapidez e sensibilidade, permitir uma contagem de células em um espaço de tempo muito menor (milhares de células por segundo) quando comparado com a microscopia. Apesar de o procedimento para a análise em citometria ser muito semelhante àquele utilizado para a microscopia, este não exige que sejam feitos os procedimentos de fixação, coloração e montagem de lâminas, além do que os resultados são obtidos e analisados no mesmo instante em que são adquiridos pelo aparelho, de forma rápida e dinâmica (AZAS *et al.*, 1997; GIORGIO *et al.*, 2000).

Os resultados *in vitro* encontrados neste trabalho mostram que derivados de Benzofenonas isolados não apresentam atividade leishmanicida satisfatória, porém a associação entre os compostos AL-16 e AL-13 (grupo 3), AL-16, AL-19 e B-5 (grupo 7) e AL-16, AL-19 e AL-13 (grupo 8) apresentam uma ação leishmanicida em formas amastigotas da *L. infantum chagasi*, além de baixa citotoxicidade em macrófagos. Estes conjuntos de dados sugerem que estas associações aqui testadas merecem ser consideradas como candidatas aos testes *in vivo* para leishmaniose visceral. Acreditamos que os resultados encontrados abrem uma nova perspectiva para o avanço no desenvolvimento de novos fármacos no combate às leishmanioses, com base no emprego de derivados de Benzofenonas, além do uso da citometria de fluxo, sob uma nova perspectiva, para a triagem de novas drogas com potencial leishmanicida *in vitro*.

8 CONCLUSÕES

- 1) Considerando-se os resultados de citotoxicidade em formas amastigotas internalizadas, as associações entre os compostos AL-16 e AL-13 (grupo 3), AL-16, AL-19 e B-5 (grupo 7) e AL-16, AL-19 e AL-13 (grupo 8) podem ser utilizadas em pesquisa *in vivo*;
- 2) Justamente por ter apresentado similaridades tão elevadas entre as duas metodologias apresentadas (microscopia e citometria), a nova metodologia proposta, baseada em um novo enfoque por citometria de fluxo, merece e deve ser melhor avaliada, por apresentar grandes perspectivas de ser uma nova ferramenta na triagem de novas drogas com potencial leishmanicida em estudos *in vitro*.

9 PERSPECTIVAS

Os resultados encontrados neste estudo abrem novas e promissoras perspectivas no quesito estudo de drogas *in vitro* que utilizam compostos sintéticos para avaliação do potencial efeito leishmanicida em formas amastigotas e promastigotas de *L. infantum chagasi*, utilizando diferentes técnicas. A constatação de que as associações entre os compostos AL-16 e AL-13 (grupo 3), AL-16, AL-19 e B-5 (grupo 7) e AL-16, AL-19 e AL-13 (grupo 8) apresentaram resultados expressivos nas taxas de inibição da infecção de macrófagos RAW 264.7 por *L. infantum chagasi* nos permite agregar novas perspectivas que poderão contribuir para a expansão dos conhecimentos na área dos testes de drogas *in vitro*. Partindo deste pressuposto, os próximos passos da pesquisa podem se basear em:

- 1) Determinar os valores de IC_{50%} para as associações dos grupos 3, 7 e 8;
- 2) Prosseguir com os ensaios *in vivo*, utilizando para isso as associações dos grupos 3, 7 e 8, que apresentaram melhor potencial leishmanicida;
- 3) Avaliar o potencial leishmanicida das associações dos grupos 3, 7 e 8 em outras espécies de *Leishmania* (*Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, etc.) causadoras de leishmaniose tegumentar;
- 4) Fazer novos ensaios para estabelecer parâmetros seguros para a nova metodologia utilizando a citometria de fluxo, utilizando outros compostos com eficácia leishmanicida comprovada, como por exemplo, os Antimoniais;
- 5) Realizar os ensaios de citometria de fluxo utilizando também macrófagos infectados com outras espécies de *Leishmania sp.* (*L. braziliensis*, *L. amazonensis*, etc.).
- 6) Realizar os ensaios de citometria de fluxo utilizando também macrófagos infectados com outras espécies de *Leishmania sp.* que expressem proteínas fluorescentes, para se descartar a hipótese de formação de grumos de macrófagos.
- 7) Determinar o valor mínimo de infecção para que a metodologia de citometria de fluxo proposta neste estudo possa ser usada com uma boa margem de segurança.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELY, H. M.; GRAYBILL, J.R.; LOEBENBERG, D.; MELBY, M.C. Efficacy of the Triazole SCH 56592 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* in Experimental Murine Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, n.12, p.2910-2914, 1999.

ADEBAYO, O. L.; SULEMAN, D.; SAMSON, A. A. Natural Products in Antileishmanial Drug Discovery : a Review. *Journal of Asian Scientific Research*, v.3, p.157–173, 2013.

ALBORZI, A.; RASOULI, M.; SHAMSIZADEH, A. *Leishmania tropica*-isolated patient with visceral leishmaniasis in southern Iran. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.74, n.2, p.306–307, 2006.

ALEMAYEHU, M.; WUBSHET M.; MESFIN, N. Magnitude of visceral leishmaniasis and poor treatment outcome among HIV patients: metaanalysis and systematic review. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care*, v.8, p. 75-81, 2016.

ALMEIDA, I. B. Atividade protozoicida do extrato etanólico e do lupano e seus derivados semi-sintéticos isolados dos frutos de *Combretum leprosum* contra *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Trypanosoma cruzi*. 2011. 94f. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental), Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia, Rondônia. 2011.

ALVAR, J.; APARICIO, P.; ASEFFA, A.; BOER, M. D.; CANÃVATE, C.; DEDET, J.; MORENO, J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 21, n.2, p. 334-359, 2008.

ARMONE, A.; ASSANTE, G.; NASINI, G.; STRADA, S.; VERCESEI, A. Cryphonectric acid and other minor metabolites from a hypovirulent strain of

Cryphonectria parasitica. *Journal of Natural Products*, v.65, p. 48-50, 2002.

AZAS, N.; GIORGIO, C. DI; DELMAS, F.; GASQUET, M. Leishmania infantum promastigotes: flow cytometry as possible tool for assessing the effects of drugs on cellular functions, v.7, p. 1-7, 1997.

BALANÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRAÑA, J. C.; ORDENEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. *General Pharmacology*, v.30, n.4, p. 435–443, 1998.

BANERJEE, A.; DE, M.; ALI, N. Complete cure of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin B in stearylamine-bearing cationic liposomes involves down-regulation of IL-10 and favorable T cell responses. *Journal of Immunology*, v.181, n. 2, p. 1386–1398, 2008.

BARROS, N. B.; MIGLIACCIO, V.; FACUNDO, V. A.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, R. G.; NICOLETE, R.; SILVA-JARDIM, I. Experimental Parasitology Liposomal-lupane system as alternative chemotherapy against cutaneous leishmaniasis : Macrophage as target cell. *Experimental Parasitology*, v. 13, n.2, p. 337–343, 2013.

BASTOS, T.S.A. Aspectos gerais da leishmaniose visceral. 2012. 40f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos), Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

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

BASSELIN, M.; DENISE, H.; COOMBS, G. H.; BARRETT, M. P. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 12, p. 3731–3738, 2002.

BERN, C.; DESJEUX, P.; CANO, J.; ALVAR, J. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLOS one*, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

BEZERRA, J. S.; FERREIRA, S. B.; COSTA, M. S.; GENESTRA, M. S.; CANTO-

CAVALHEIRO, M. M.; KOVER, W. B.; FERREIRA, V. F. Synthesis and evaluation of new difluoromethyl azoles as antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, p. 1388–1395, 2007.

CABRERA, M.A.A. Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro - RJ : estudo de possíveis variáveis preditoras. 1999. 90f. Tese (Tese em Saúde Pública), Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

CARREGARO, V.; RIBEIRO, J. M.; VALENZUELA, J. G.; SOUZA-JÚNIOR, D. L. Nucleosides Present on Phlebotomine Saliva Induce Immunossuppression and Promote the Infection Establishment. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, p. 1–21, 2015.

CHAGAS, E.; CUNHA, A.M.; FERREIRA, L.C.; DEANE, L.; GUIMARÃES, F.N.; PAUMGARTTEN, M.J.; SÁ, B. Leishmaniose Visceral Americana: (Relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 33, n. 1, p. 89-229, 1938.

CHAKRABORTY, A. K.; MAJUMDER, H. K. Mode of action of pentavalent antimonials: Specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 152, n. 2, p. 605–611, 1988.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 11, p. S7–S16, 2007.

CHATTOPADHYAY, A.; JAFURULLA, M. A novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 416, n. 1–2, p. 7–12, 2011.

COELHO, A.C. Miltefosine Susceptibility and Resistance in *Leishmania*: From the Laboratory to the Field. *Journal of Tropical Diseases*, v. 4, n. 2, p. 2–6, 2016.

COSTA JÚNIOR, J. S.; DE ALMEIDA, A. A. C.; FERAZ, A. B. F.; ROSSATTO, R. R.; SILVA, T. G.; SILVA, P. B. N.; MILITÃO, G. C. G.; CITÓ, A. M. G. L.; SANTANA, L. C. L. R.; CARVALHO, F. A. A.; FREITAS, R. M. Cytotoxic and leishmanicidal

properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. *Nat. Prod. Res.*, v. 27, p. 470-474, 2013.

COSTA, C. H. N.; TAPETY, C. M. M.; WERNECK, G. L. Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 4, p. 415–419, 2007.

COSTA, S.; MACHADO, M.; CAVADAS, C.; SOUSA, M. C. Antileishmanial activity of antiretroviral drugs combined with miltefosine. *Parasitology Research*, 2016.

COURA-VITAL, W.; BARBOSA, A.; EDUARDO, L.; REIS, S.; LEÔNCIO, S.; MENDES, B.; CARNEIRO, M. Veterinary Parasitology Canine visceral leishmaniasis : Incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 197, n.3, p. 411–417, 2013.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, v. 21, n. 11, p. 508–512, 2005.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, v. 19, n. 11, p. 502–508, 2003.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*, v. 123, n. 3, p. 399–410, 2006.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

DAFTARIAN, P. M.; STONE, G. W.; KOVALSKI, L.; KUMAR, M.; VOSOUGHI, A.; URBIETA, M.; AGER, A. L. A Targeted and Adjuvanted Nanocarrier Lowers the Effective Dose of Liposomal Amphotericin B and Enhances Adaptive Immunity in Murine Cutaneous Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 208, p.1914–1922, 2013.

DAGNINO, A. P.; BARROS, F. M. C. DE; CCANA-CCAPATINTA, G. V.;

PROPHIRO, J. S.; POSER, G. L. VON; ROMÃO, P. R. T. Leishmanicidal activity of lipophilic extracts of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*, v. 22, n. 1, p. 71–76, 2015.

DANTAS-TORRES, F. Situação atual epidemiológica atual da leishmaniose visceral no Nordeste do Brasil. *Rev. Saúde Pública*, v. 40, n. 3, p. 537–541, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: Do not forget the law of priority. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 1, p. 117–118, 2006.

DAS, B. B.; SEN, N.; DASGUPTA, S. B.; GANGULY, A.; DAS, R.; MAJUMDER, H. K. Topoisomerase research of kinetoplastid parasite *Leishmania*, with special reference to development of therapeutics. *Indian Journal of Medical Research*, v. 123, n. 3, p. 221–232, 2006.

DAVIS, A. J.; MURRAY, H. W.; HANDMAN, E. Drugs against leishmaniasis: A synergy of technology and partnerships. *Trends in Parasitology*, v. 20, n. 2, p. 73–76, 2004.

DEMARCHI, I. G.; SILVEIRA, T. G. V.; FERREIRA, I. C. P.; LONARDONI, M. V. C. Effect of HIV protease inhibitors on New World *Leishmania*. *Parasitology International*, v. 61, n. 4, p. 538–544, 2012.

DESJEUX, P. Focus: Leishmaniasis. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 9, p. 692–693, 2004.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DOGRA, J.; SAXENA, V.N. Itraconazole and leishmaniasis: a randomised double-blind trial in cutaneous disease. *Int. J. Parasitol*, v. 26, n. 7, p. 1413–1415, 1996.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies : parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*, v. 5, p. 1–12, 2012.

DUARTE, I. S.; MATTA, V. L. R.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, D. Intertistial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. *The Royal Society of Tropical Medicine and Higyene*, v.83, p. 1–4, 1989.

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis, *Parasitology International*, v.54, p. 119-122, 2005.

EICHER, T., HAUPTMANN, S., SPEICHER, A. A Química dos Heterocíclicos: estrutura, reações, sínteses e aplicações. In: A Química dos Heterocíclicos: estrutura, reações, sínteses e aplicações , São Paulo, EICHER, 2003, Wiley-VCH, p. 207-233.

ETIT, P. A. X. A. P., ERO, M. A. R. O. In Vivo Interference of Paromomycin with Mitochondrial Activity of Leishmania. *Experimental Cell Research*, v. 348, n. 232, p. 339–348, 1997.

EUFRÂNIO, N.; JÚNIOR, S.; MELO, I. M. M. DE; DIOGO, E. B. T.; COSTA, V. A.; SOUZA, J. D. DE; CASTRO, S. L. DE. On the search for potential anti- Trypanosoma cruzi drugs : Synthesis and biological evaluation of 2-hydroxy-3-methylamino and 1 , 2 , 3-triazolic naphthoquinoidal compounds obtained by click chemistry reactions. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, p. 304–312, 2012.

FILIPPIN, F. B., SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, n. 2, p. 167–194, 2006.

FLORÃO, A.; MATTANA, F. V. R.; ROCHA, F. H.; NARDIN, J. M.; JUNIOR, J. C. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Efeitos do Dimetilsulfóxido sobre a Proliferação de Linfócitos Humanos in vitro. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, n. 2, p. 215-223, 2007.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. *Molecules*, v. 14, n. 7, p. 2317–2336, 2009.

FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONISIO, O. In vitro assays for evaluation of drug activity against Leishmania spp. *Research in Microbiology*, v. 155, n. 4, p. 224–230,

2004.

GERBAUD, E.; TAMION, F.; GIRAULT, C.; CLABAULT, K.; LEPRETRE, S.; LEROY, J.; BONMARCHAND, G. Persistent acute tubular toxicity after switch from conventional emphotericin B to liposomal amphotericin B (ambisome). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 51, n. 2, p. 473–475, 2003.

GIGANTE, F.; KAISER, M.; BRUN, R.; GILBERT, I. H. SAR studies on azasterols as potential anti-trypanosomal and anti-leishmanial agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 16, p. 5950–5961, 2009.

GIORGIO, C. D. I.; RIDOUX, O.; DELMAS, F.; AZAS, N.; GASQUET, M.; TIMON-DAVE, P. Flow Cytometric Detection of Leishmania Parasites in Human Monocyte-Derived Macrophages : Application to Antileishmanial-Drug Testing. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n. 11, p. 3074–3078, 2000.

GRIENSVEN, J. VAN; ZIJLSTRA, E. E.; HAILU, A. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection : Time for Concerted Action, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.8, n. 8, p. 1–2, 2014.

HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCHWARTZ, R. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v., n. 6, p. 911–926, 2015.

HAUMEIL, J. C. C., RNAUD, P. A. Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2 / TC7 Colon Tumor Cell Cultures. *Biol Pharm Bull*, v. 78, n. 12, p. 1600–1603, 2002.

HENDRICKX, S., GUERIN, P. J., CALJON, G., CROFT, S. L., MAES, L. Evaluating drug resistance in visceral leishmaniasis : the challenges. *Cambridge University Press - Parasitology*, v. 37, n. 8, p. 67-71, 2017.

HOLZER, T. R.; MCMASTER, W. R.; FORNEY, J. D. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes , lesion-derived amastigotes , and axenic amastigotes in

Leishmania mexicana, *Mol Biochem Parasitol.* v. 146, n. 2, p. 198–218, 2006.

HUANG, X.Z.; ZHU, Y.; GUAN, X.L.; TIAN, K.; GUO, J.M.; WANG, H.B.; FU, G.M. A Novel Antioxidant Isobenzofuranone Derivative from *Fungus cephalosporium* sp.AL031, *Molecules*, v. 17, n. 4, p. 4219–4224, 2012.

ISLAMUDDIN, M.; CHOUHAN, G.; TYAGI, M.; ABDIN, M. Z.; SAHAL, D. Leishmanicidal activities of *Artemisia annua* leaf essential oil against Visceral Leishmaniasis. *Materials and Methods*, v. 5, p. 1–15, 2014.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, v.9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; BERTELS, S.; SIEMS, K. Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 1, p. 288–292, 2001.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. *Dermatologic Clinics*, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KIM, D. H.; CHUNG, H. J.; BLEYS, J.; GHOMESTANI, R. F. Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? A meta-analysis of 14 randomized controlled trials. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, n. 2, p. 218–227 2009.

KINGSTON, D. G.; NEWMAN, D. J. Natural products as drug leads: an old process or the new hope for drug discovery? *Drugs : The Investigational Drugs Journal*, v. 8, p. 990–992, 2005.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clinical & Translational Immunology*, v. 3, n.3, p.167–173, 2014.

KRALJ, A.; KEHRAUS, S.; KRICK, A.; EGUEREVA, E.; KELTER, G.; MAURER, M.; FIEBIG, H.; KONIG, G. M. Arugosins G and H: Prenylated Polyketides from the

Marine-Derived fungus *Emericella nidulans* var. *acristata*. *J. Nat. Prod.*, v. 69, p. 995-1000, 2006.

KVIST, L. P., CHRISTENSEN, S. B., RASMUSSEN, H. B., MEJIA, K., & GONZALEZ, A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 106, n. 3, p. 390–402, 2006.

LAGE, P. S., CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A., MESQUITA, J. T., MATA, L. M., FERNANDES, S. O. A., CARDOSO, V. N. COELHO, E. A. F. Antileishmanial activity and evaluation of the mechanism of action of strychnobiflavone flavonoid isolated from *Strychnos pseudoquina* against *Leishmania infantum*. *Parasitol Res*, v. 114, p. 4625-4635, 2015.

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

LASKAY, T.; RÖLLINGHOFF, M.; LASKAY, T.; DIEFENBACH, A.; ROLLINGHOFF, M. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *European Journal Immunology*, v. 25, n. 8, p. 2220–2227, 1995.

LAULETTA, J. A.; CUNHA, M. A.; QUEIROZ, I. T. Leishmaniasis – HIV coinfection : current challenges. *HIV AIDS (Auckl)*, v. 8, p.147-156, 2016.

LE PAPE, P. A Glycoprotein Isolated From the Sponge, *Pachymatisma Johnstonii*, Has Anti-Leishmanial Activity. *Cell Biology International*, v. 24, n. 1, p. 51–56, 2000.

LEBLOIS, R.; KUHL, K.; FRANÇOIS, O.; SCHÖNIAN, G.; WIRTH, T. Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. *Infection, Genetics and Evolution*, v. , n. 5, p. 1091–1095, 2011.

LEIFSO, K., COHEN-FREUE, G., DOGRA, N., MURRAY, A., & MCMASTER, W. R. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages : The *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 152, n. 1, p. 35–46, 2007.

LIN, G.;CHAN,S. S. K.; CHUNG,H.; LI,S. Chemistry and biological activities of naturally occurring phthalides. In: RAHMAN, Attar-ur. (Ed.). *Studies in natural products chemistry*. Elsevier: Amsterdam, v. 32, p. 611–669, 2005.

LIÑARES, G. E. G., RAVASCHINO, E. L., & RODRIGUEZ, J. B. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. *Current Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 3, p. 335–60, 2006.

LINCOPAN, N., MAMIZUKA, E. M., & CARMONA-RIBEIRO, A. M. Low nephrotoxicity of an effective amphotericin B formulation with cationic bilayer fragments. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 55, n. 5, p. 727–734, 2005.

LIPOLDOVÁ, M., & DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature Reviews Genetics*, v. 7, n. 4, p. 294–305, 2006.

LIU, Y., PETERSON, D. A., KIMURA, H., & SCHUBERT, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal Neurochemistry*, v. 69, n. 2, p. 581-593, 1997.

LOGRADO, L.P. L.; SANTOS, C.O.; ROMEIRO, L.A.S.; COSTAC, A.M.; FERREIRA, J.R.O.; CAVALCANTI, B.C.; MORAES,M.; COSTALOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; DOS SANTOS, M.L. Synthesis and cytotoxicity screening of substituted isobenzofuranones designed from anacardic acids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 3480-3489, 2010.

LOPES, T., REIS, A., HEWITT, C., & ROSEIRO, C. Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia*, p. 32-40, 2004.

LÓPEZ-ARENCIBIA, A., GARCÍA-VELÁZQUEZ, D., MARTÍN-NAVARRO, C. M., SIFAOUI, I., REYES-BATLLE, M., LORENZO-MORALES, J., PIÑERO, J. E. *In Vitro* Activities of Hexaazatrinaphthylenes against Leishmania spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, n. 5, p. 2867–2874, 2015.

MAIA, C., NUNES, M., MARQUES, M., HENRIQUES, S., ROLÃO, N., & CAMPINO, L. Experimental Parasitology In vitro drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs. *Experimental Parasitology*, v. 135, n. 1, p. 36–41, 2013.

MAIA, C., ROL, N., NUNES, M., GONC, L., & CAMPINO, L. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*, v. 103, p. 150–155, 2007.

MCGWIRE, B. S., SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. *Qjm*, v.107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease ? *Immunological Reviews*, v. 201, p. 206–224, 2004.

MELAKU, Y., COLLIN, S. M., KEUS, K., GATLUAK, F., RITMEIJER, K., & DAVIDSON, R. N. Treatment of Kala-Azar in southern Sudan using a 17-day regimen of sodium stibogluconate combined with paromomycin: A retrospective comparison with 30-day sodium stibogluconate monotherapy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 77, n. 1, p. 89–94, 2007.

MENEZES, J.A.; LUZ, T.C.B.; SOUSA, F.F.; VERNE. R.N.; LIMA, F. P.; MARGONARI, F. Fatores de risco peridomiciliares e conhecimento sobre leishmaniose visceral da população de Formiga, Minas Gerais, Brasil. *Rev Bras Epidemiol*, v. 19, n. 2, p. 362–374, 2016.

MISHRA, J., DEY, A., SINGH, N., SOMVANSHI, R., & SINGH, S. Evaluation of toxicity & therapeutic efficacy of a new liposomal formulation of amphotericin B in a mouse model. *Indian J Med Res*, v. 137, p. 767–776, 2013.

MISHRA, J., SAXENA, A., & SINGH, S. Chemotherapy of Leishmaniasis : Past , Present and Future. *Current Medicinal Chemistry*, v. 17, p.1153–1169, 2007.

MOMENI, A. Z., T. JALAYER, M. EMAMJOMEH, N. BASHARDOST, R. L. GHASSEMI, M. MEGHDADI, A. JAVADI, AND M. AMINJAVAHARI. Treatment of cutaneous leishmaniasis with itraconazole. Randomized double-blind study. *Arch. Dermatol.* v. 132, p. 784–786, 1996.

MONTALVO, C. A. M., FRAGA, J., MONZOTE, C. L. Diagnóstico de la leishmaniasis : de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, n. 64, n. 2, p. 108–131, 2012.

MONTEIRO, M. C., NOGUEIRA, L. G., SOUZA, A. A. A., RIBEIRO, J. M. C., SILVA, S., & CUNHA, F. Q. Effect of salivary gland extract of *Leishmania* vector , *Lutzomyia longipalpis* , on leukocyte migration in OVA-induced immune peritonitis. *European Journal of Immunology*, v. 35, p. 2424–2433, 2005.

MONZOTE, L. Current treatment of leishmaniasis: a review. *Open Antimicrob Agents J*, v. 1, p. 9-19, 2009.

MONZOTE, L. Antileishmanial Patents Antileishmanial Current Drugs and Relevant Patents. *Revista de Medicina Cubana Tropical*, v. 6, p. 1-26, 2011.

MORAIS, M. H. F., FIUZA, V. DE O. P., ARAÚJO, V. E. M. DE, MENEZES, F. C. DE, & CARNEIRO, M. Avaliação das atividades de controle da leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006-2011. *Epidemiologia E Serviços de Saúde*, v. 24, n. 3, p. 485–496, 2015.

MOTTA, M. C. M. Kinetoplast as a potential chemotherapeutic target of trypanosomatids. *Current Pharmaceutical Design*, v.14, n. 9, p. 847–854, 2008.

MURRAY, H. W., BROOKS, E. B., DEVECCHIO, J. L., & HEINZEL, F. P. Immunoenhancement combined with amphotericin B as treatment for experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 8, p. 2513, 2003.

NAKAGAWA, Y., SUZUKI, T., TAYAMA, S. Metabolism and toxicity of benzophenone in isolated rat hepatocytes and estrogenic activity of its metabolites in MCF-7 cells. *Toxicology*, v. 156, n. 1, p. 27–36, 2000.

NWAKA, S., HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v.5, p. 941–955, 2006.

OLIVEIRA, A. C.; ANTONIO, N.S., PISCCINI, A. Controle e Tratamentos Da Leishmaniose Visceral Canina . *Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária*, n.10, p. 1-5, 2008.

OUELLETTE, M., DRUMMELSMITH, J., PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: Drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates*, v.7, n. 4–5, p. 257–266, 2004.

PAPADOPOULOU, M. V, BLOOMER, W. D., ROSENZWEIG, H. S., CHATELAIN, E., KAISER, M., WILKINSON, S. R., IOSET, J. Novel 3-Nitro-1H-1,2,4-triazole-Based Amides and Sulfonamides as Potential Antitrypanosomal Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 55, p. 5554- 5565, 2012.

PEREIRA, W. L. Síntese de isobenzofuranonas e indan-1,3-dionas: aspectos estruturais e avaliação das atividades citotóxica, leishmanicida e inibitória da protease ns2b-ns3 do West Nile Virus (WNV). 2016. 244f. Tese (Doutorado em Agroquímica). Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016.

PEREIRA, I. O.; MARQUES, M. J.; PAVAN, A. L. R.; CODONHO, B. S.; BARBIÉRI, C. L.; BEIJO, L. A.; DORIGUETTO, A. C.; D’MARTIN, E. C.; DOS SANTOS, M. H. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. *Phytomedicine*, v. 17, p. 339-345, 2010.

PATIL, R. S., PATIL, M. S., KSHIRSAGAR, S. S., CHAUDHARI, P. S., BAYAS, J. P., & OSWAL, R. J. Synthetic and natural products against leishmaniasis: a review. *World J. Public Health Sci.*, v. 1, n. 1, p. 7–22, 2012.

PELISSARI, D. M., CECHINEL, M. P., SOUSA-GOMES, M. L. DE, & LIMA JÚNIOR, F. E. F. DE. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. *Epidemiologia E Serviços de Saúde*, v. 20, n. 1, p. 107–110, 2011.

PERAZA-SÂNCHEZ, S. R., CEN-PACHECO, F., NOH-CHIMAL, A., MAY-PAT, F., SIMÃ-POLANCO, P., DUMONTEIL, E., MUT-MARTÂN, M. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia*, v.78, n. 4, p. 315–318, 2007.

PRADO, P. F. DO, ROCHA, M. F., SOUSA, J. F. DE, CALDEIRA, D. I., PAZ, G. F., DIAS, E. S. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.44, n. 5, p. 561–566, 2009.

RATH, S., TRIVELIN, L. A., IMBRUNITO, T.R., TOMAZELA, D.M., JESÚS, M. N., MARZAL, P.C., Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quim. Nova*, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

READY, P.D. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral. *Dovepress*, v. 2014, n. 6, p. 147-154, 2014.

REIS, A. B., GIUNCHETTI, R. C., CARRILLO, E., MARTINS-FILHO, O. A., MORENO, J. Immunity to Leishmania and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, v. 26, n. 7, p. 341–349, 2010.

REITHINGER, R., DAVIES, C. R., REITHINGER, R. Canine leishmaniasis : novel strategies for control, *Trends in Parasitology - Cell Press*, v.18, n. 7, p. 289–290, 2002.

ROATT, B. M., AGUIAR-SOARES, R. D. DE O., COURA-VITAL, W., KER, H. G., MOREIRA, N. DAS D., VITORIANO-SOUZA, J., REIS, A. B. Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: Promising treatments for this neglected disease. *Frontiers in Immunology*, v. 5, p. 1–12, 2014.

ROBERTS, C. W., MCLEOD, R., RICE, D. W., GINGER, M., CHANCE, M. L., GOAD, L. J. Fatty acid and sterol metabolism: Potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.126, n. 2, p. 129–142, 2003.

RODRIGUES, K. A. DA F., AMORIM, L. V., DIAS, C. N., MORAES, D. F. C., CARNEIRO, S. M. P., CARVALHO, F. A. DE A. Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, v.160, p. 32–40, 2015.

ROGERO, S. O., IKEDA, T. I. Teste in vitro de Citotoxicidade : Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Mat. Res.*, v.6, n. 3, p. 317–320, 2003.

ROJAS, R., VALDERRAMA, L., VALDERRAMA, M., VARONA, M. X., OUELLETTE, M., SARAVIA, N. G. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J. Infect. Dis.*, v.193, n. 10, p. 1375–83, 2006.

ROY, T. A. N., LEMESRE, J. L., PAPADOPOULOU, B., SERENO, D., OUELLETTE, M. DNA Transformation of *Leishmania infantum* Axenic Amastigotes and Their Use in Drug Screening, *Antimicrob. Agentes Chemother*, v. 45, n.4, p. 1168–1173, 2001.

RUBIO, O.C.; CUELLAR, A.; ROJAS, N.; VELEZ CASTRO, H.; RASTRELLI, L.; AQUINO, R. A Polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. *J. Nat. Prod.*, v. 62, p. 1013-1015, 1999.

SAHA, A. K., MUKHERJEE, T., BHADURI, A. Mechanism of action of amohotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol. JF & JF - Biochem. Parasitol.*, v. 19, p. 195–200, 1986.

SALOMÓN, O. D., FELICIANGELI, M. D., QUINTANA, M. G., AFONSO, M. M. D. S., RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v.110, n. 7, p. 831–846, 2015.

SANGI, D. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. *Quim. Nova*, v. 39, n. 8, p. 995-1006, 2016.

SANTA-CECÍLIA, F. V.; FREITAS, L. A. S.; VILELA, F. C.; VELOSO, C. C.; ROCHA, C. Q.; MOREIRA, M. E. C.; DIAS, D. F.; GIUSTI-PAIVA, A.; DOS SANTOS, M. H. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7- epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 670, p. 280-285, 2011.

SANTOS, D. O., COUTINHO, C. E. R., MADEIRA, M. F., BOTTINO, C. G., VIEIRA, R. T., NASCIMENTO, S. B., CASTRO, H. C. Leishmaniasis treatment - A challenge that remains: A review. *Parasitology Research*, v. 103, n. 1, p. 1–10, 2008.

SANTOS, G. B. Semi-síntese de derivados da afidicolina: busca por novos protótipos leishmanicidas. 2012. 106f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

SAVOIA, D., ALLICE, T., TOVO, P-A. Antileishmanial activity of HIV protease inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 26, n. 1, p. 92–94, 2005.

SERENO, D., CORDEIRO DA SILVA, A., MATHIEU-DAUDE, F., OUAISSI, A. Advances and perspectives in Leishmania cell based drug-screening procedures. *Parasitology International*, v. 56, n. 1, p. 3–7, 2007.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 5, p. 577–579, 2006.

SHEEHAN, D.J., HITCHCOCK, C.A., SIBLEY, C.M. Current and Emerging Azole Antifungal Agents Pfizer Pharmaceuticals Group. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 1, p. 40-79, 1999.

SHIMOZAKO, H. J., WU, J., MASSAD, E. The Preventive Control of Zoonotic Visceral Leishmaniasis: Efficacy and Economic Evaluation. *Comput Math Methods Med.*, v. 2017, p. 21, 2017.

SIBOV, T. T., AYA, L., MIYAKI, M., MAMANI, J. B., MARTI, L. C., SARDINHA, L. R., GAMARRA, L. F. Evaluation of umbilical cord mesenchymal stem cell labeling with superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with dextran and complexed with Poly-L-lysine com Dextran e complexadas a Poli-L-Lisina, *Einstein*, v. 10, n. 2, p. 180–188, 2012.

SILVA, J. G. D. E., WERNECK, G. L., CRUZ, M. D. S. P. E., COSTA, C. H. N., MENDONÇA, I. L. DE. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 23, n. 7, p. 1715–1720, 2007.

SINDERMANN, H., CROFT, S. L., ENGEL, K. R., BOMMER, W., EIBL, H. J., UNGER, C., ENGEL, J. Miltefosine (Impavido): The first oral treatment against

leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 193, n. 4, p. 173–180, 2004.

SINGH, O. P., SINGH, B., CHAKRAVARTY, J., SUNDAR, S. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. *Infectious Diseases of Poverty*, v.5, n. 1, p. 19, 2016.

SINGH, S., SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 10, n. 6, p. 307–315, 2004.

SOARES-BEZERRA, R. J., LEON, L., GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 40, n. 2, p. 1-11, 2004.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis, *Trop Med Int Health*, v. 6, n. 11, p. 849-854, 2001.

SUNDAR, S., CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v.7, n. 12, p. 4267–4277, 2010.

SUNDAR, S., ROSENKAIMER, F., MAKHARIA, M. K., GOYAL, A K., MANDAL, A. K., VOSS, MURRAY, H. W. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet*, v.352, n. 9143, p. 1821–1823, 1998.

SUNDAR, S., SINGH, V. P., SHARMA, S., MAKHARIA, M. K., MURRAY, H. W. Response to interferon-gamma plus pentavalent antimony in Indian visceral leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, v.176, n. 4, p. 1117-1119, 1997.

TANDON, J. S., SRIVASTAVA, V., GURU, P.Y. Iridoids: A New Class of Leishmanicidal Agents from *Nyctanthes arbortristis*. *J Nat Prod.*, v. 54, n.4, p. 1102-1104, 1991.

TANNER, E. Time course and intensity of infection in vitro in the resident peritoneal macrophages of resistant and susceptible mice exposed to different doses of *Leishmania donovani* promastigotes. *Int J Parasitol.*, v.24, n. 5, p. 743-7, 1994.

TEMPONE, A. G., SARTORELLI, P., TEIXEIRA, D., PRADO, F. O., CALIXTO, I. A. R. L., LORENZI, H., MELHEM, M. S. C. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 5, p. 443–449, 2008.

THAKUR, C. P., OUIARO, P., GOTHOSKAG, S., BHOWMICK, S., CHOUDHURY, B. K., PRASADL, S., KUMAR, M. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) with aminosidine (=paromomycin)-antimonial combinations, a pilot study in Bihar, India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 86, p. 615-616 , 1992.

TIUMAN, T. S., SANTOS, A. O., DIAS, B. P., NAKAMURA, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 15, n. 8, p. 525-538, 2011.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; NAYDENSKI, H.; TSVETKOVA, I.; RODRIGUEZ, J. G.; BANKOVA, V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan própolis. *Fitoterapia*, v. 75, p. 683-689, 2004.

UNGER, C., DAMENZ, W., FLEER, E. A, KIM, D. J., BREISER, A, HILGARD, P., EIBL, H. Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue. Studies on the antineoplastic activity in vitro and in vivo. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, v. 28, n. 2, p. 213–217, 1989.

URBINA, J. A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology*, v. 114, p. 91-99, 1997.

VANNIER-SANTOS, M. A, MARTINY, A, DE SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania spp.*: invading and evading. *Current Pharmaceutical Design*, v. 8, n. 4, p. 297–318, 2002.

VERMA, N. K., DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, n. 8, p. 3010–3015, 2004.

VERMEERSCH, M., INOCE, R., TOTE, K., TIMMERMANS, J., COS, P., MAES, L. In vitro Susceptibilities of *Leishmania donovani* Promastigote and Amastigote Stages to Antileishmanial Reference Drugs : Practical Relevance of Stage-Specific Differences., *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 53, n. 9, p. 3855-3889, 2009.

WENIGER, B., ROBLEDO, S., ARANGO, G., DEHARO, E., ARAGÓN, R., MUÑOZ, V., ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombial plants. *J Ethnopharmacol*, v. 78, p. 193–200, 2001.

WERNECK, G. L. The control of visceral leishmaniasis in Brazil: end of a cycle? *Cadernos de Saúde Pública*, v. 32, n. 6, p. 1–2, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. *World Health Organization technical report series*, n. 949, p. 22–26, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Weekly epidemiological record*, v. 47, p. 521–540, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. *Second WHO report on neglected tropical diseases*, v. 39, p. 67–71, 2013.

YASUR-LANDAU, D., JAFFE, C. L., DAVID, L., BANETH, G. Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2016.

YESILSOY, C. Differential sensitivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge, *Archs Oral Bid.*, v. 30, n. 9, p. 609-613, 1985.

YOGANATHAN, K.; CAO, S.; CRASTA, S. C.; AITIPAMULA, S.; WHITTON, S. R.; NG, S.; BUSS, M. S.; BUTLER, M. S. Microsphaerins A-D, four novel benzophenone dimers with activity against MRSA from the fungus *Microsphaeropsis sp. Tetrahedron*, v. 64, p. 10181-10187, 2008.

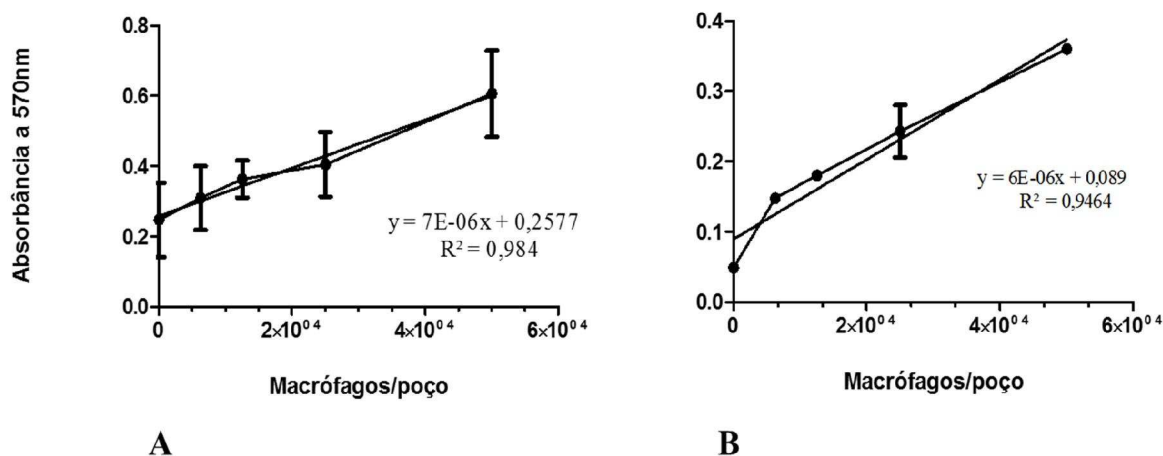
YOSHINO, R., YASUO, N., INAOKA, D. K., HAGIWARA, Y., OHNO, K., ORITA, M., SEKIJIMA, M. Pharmacophore modeling for anti-Chagas drug design using the fragment molecular orbital method. *PLoS ONE*, v.10, n. 5, p. 1–15, 2015.

ZHANG, S. Y., ZHANG, Q. H., ZHAO, W., ZHANG, X., ZHANG, Q., BI, Y. F., ZHANG, Y. B. Isolation, characterization and cytotoxic activity of benzophenone glucopyranosides from Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 22, n. 22, p. 6862–6866, 2012.

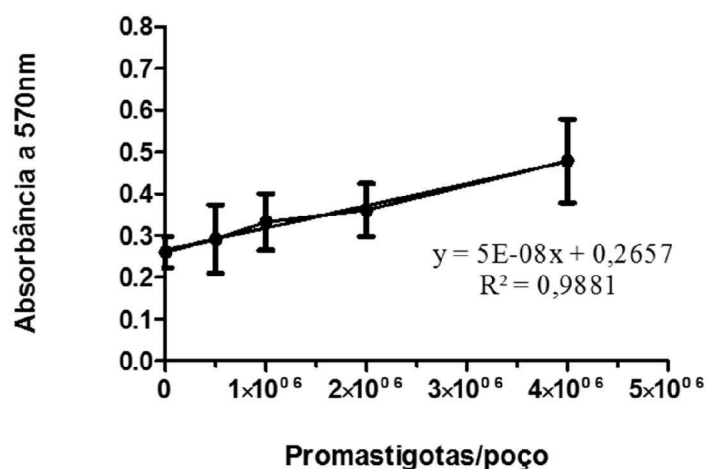
ZIJLSTRA, E. E., MUSA, A. M., KHALIL, E. A. G., & HASSAN, I. M. EL. Review Post-kala-azar dermal leishmaniasis, *Lancet Infect Dis.*, v. 3, n. 2, p. 87-98, 2003.

ZVULUNOV, A., KLAUS, S., VARDY, D. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine*, v. 347, n. 5, p. 370-371, 2002.

ANEXO I: Equações e gráficos utilizados para cálculos do número de macrófagos sobreviventes após tratamento com compostos Triazólicos, derivados Triazólicos de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona (A) e derivados de Benzofenonas (B) após 48h de tratamento. As absorbâncias foram obtidas após leitura em espectrofotômetro a 570nm.



ANEXO II: Equação e gráfico utilizado para cálculos do número de promastigotas de *L. infantum chagasi* sobreviventes após tratamento com compostos Triazólicos, derivados Triazólicos de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona e derivados de Benzofenonas após 48h de tratamento. As absorbâncias foram obtidas após leitura em espectrofotômetro a 570nm.



ANEXO III: Resultado dos ensaios de solubilidade dos compostos Triazólicos derivados de inda-1,3-diona realizados durante a 1ª, 24ª, 48ª e 72ªh, nas respectivas diluições. Legenda: C= com cristal; S/C= sem cristais

Ensaio de Cristalização dos Compostos Triazólicos																									
Compostos																									
Diluções(µg/ml)	WL-11					WL-27					WL-28					WL-29					WL-30				
	1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h	
1,25	S/C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,625	S/C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C	
3,125	S/C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C	
1,5625	S/C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,78125	S/C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,390625	S/C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,1953125	S/C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,09765625	S/C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,048828125	S/C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,024414063	S/C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,012207031	S/C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,006103516	S/C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C	

Compostos																									
Diluções(µg/ml)	WL-31					WL-32					WL-33					WL-37					WL-40				
	1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h	
1,25	C	C	C	C		S/C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,625	C	C	C	C		S/C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
3,125	C	C	C	C		S/C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
1,5625	C	C	C	C		S/C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,78125	C	C	C	C		S/C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,390625	C	C	C	C		S/C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,1953125	C	C	C	C		S/C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,09765625	C	C	C	C		S/C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,048828125	C	C	C	C		S/C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,024414063	C	C	C	C		S/C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,012207031	C	C	C	C		S/C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,006103516	C	C	C	C		S/C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	

Compostos																									
Diluções(µg/ml)	WL-43					WL-45					WL-47					WL-47					WL-47				
	1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h	
1,25	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,625	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
3,125	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
1,5625	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,78125	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,390625	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,1953125	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,09765625	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,048828125	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,024414063	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,012207031	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,006103516	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	

ANEXO III: Resultado dos ensaios de solubilidade dos compostos Triazólicos derivados de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona realizados durante a 1^a, 24^a, 48^a e 72^ah, nas respectivas diluições. Legenda: C= com cristal; S/C= sem cristais

Ensaio de Cristalização de Triázóis derivados de 6-OH-isobenzofuran-1(3H)-ona																									
Compostos																									
Diluições(µg/ml)	WL-5					WL-6					WL-7					WL-8					WL-10				
	1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h	
1,25	C	C	C	C		S/C	S/C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C		C	C	C	C	
0,625	C	C	C	C		S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		C	C	C	C		S/C	C	C	C	
3,125	C	C	C	C		S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		C	C	C	C		S/C	C	C	C	
1,5625	S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		C	C	C	C		S/C	C	C	C	
0,78125	S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		C	C	C	C		S/C	C	C	C	
0,390625	S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		C	C	C	C		S/C	C	C	C	
0,1953125	S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	C	S/C	
0,09765625	S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	C	S/C	
0,048828125	S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		C	C	S/C	S/C		S/C	S/C	C	S/C	
0,024414063	S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		C	C	S/C	S/C		S/C	S/C	C	S/C	
0,012207031	S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		C	C	S/C	S/C		S/C	S/C	C	S/C	
0,006103516	S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		S/C	S/C	C	C		C	C	S/C	S/C		S/C	S/C	C	S/C	

Compostos																									
Diluições(µg/ml)	WL-12					WL-13					WL-14					WL-16					WL-17				
	1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h	
1,25	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	
0,625	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	
3,125	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	
1,5625	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	
0,78125	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	
0,390625	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	
0,1953125	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	S/C	C	C	
0,09765625	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	S/C	C	C	
0,048828125	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	S/C	C	C	
0,024414063	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	S/C	C	C	
0,012207031	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	S/C	C	C	
0,006103516	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	S/C	C	C	

Compostos																								
Diluições(µg/ml)	WL-18					WL-25					WL-26					WL-19								
	1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h
1,25	C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C
0,625	C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C
3,125	C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C
1,5625	C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C
0,78125	C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C
0,390625	C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C
0,1953125	C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C
0,09765625	C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C
0,048828125	C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C
0,024414063	C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C
0,012207031	C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C
0,006103516	C	C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C

ANEXO III: Resultado dos ensaios de solubilidade dos compostos derivados de Benzofenonas realizados durante a 1^a, 24^a, 48^a e 72^ah, nas respectivas diluições.

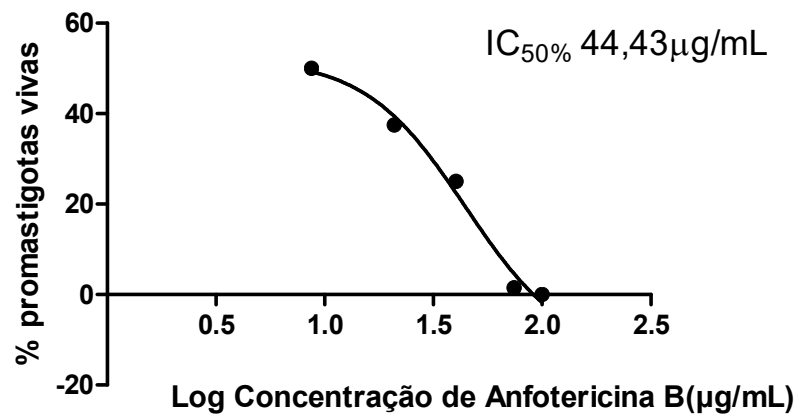
Legenda: C= com cristal; S/C= sem cristais

Ensaio de Cristalização Benzofenonas																									
Compostos																									
Diluições(µg/ml)	AL-0					AL-4					AL-5					AL-6					AL-7				
	1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h	
50	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	S/C		C	C	C	C	
25	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	S/C		C	C	C	C	
12.5	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	S/C		C	C	C	C	
6.25	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	
3.125	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	
1.5625	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	
0.78125	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	
0.390625	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	
0.195313	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	
0.097656	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	
0.048828	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	
0.024414	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	

Compostos																									
Compostos																									
Diluições(µg/ml)	AL-8					AL-12					AL-13					AL-16					AL-19				
	1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h	
50	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	
25	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C	
12.5	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
6.25	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
3.125	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
1.5625	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
0.78125	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
0.390625	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
0.195313	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
0.097656	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
0.048828	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
0.024414	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	

Compostos																									
Compostos																									
Diluições(µg/ml)	AL-23					B-3					B-5					B-6					AL-8				
	1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h		1h	24h	48h	72h	
50	S/C	S/C	C	C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
25	S/C	S/C	S/C	S/C		C	C	C	C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
12.5	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
6.25	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
3.125	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
1.5625	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
0.78125	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
0.390625	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
0.195313	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
0.097656	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
0.048828	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	
0.024414	S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C		S/C	S/C	S/C	S/C	

ANEXO IV: Determinação da IC₅₀% para formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum chagasi* neste estudo (determinado através do ensaio colorimétrico de MTT).



ANEXO V: imagens de macrófagos infectados com *L. infantum chagasi* e tratados com associações de derivados de Benzofenonas: a) macrófagos infectados sem tratamento; b) macrófagos infectados tratados com Anfotericina B (5µg/mL); c) macrófagos infectados tratados com grupo 7; d) macrófagos infectados tratados com grupo 8.

