

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS- ICF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PPGCF

GESSYCA GOUVEIA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E POTENCIAL LEISHMANICIDA *IN VITRO*
DE DERIVADOS 2-AMINO-ALQUIL-1,2,3-TRIAZOL-1,4-NAFTOQUINONAS

Maceió – AL

2019

GESSYCA GOUVEIA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E POTENCIAL LEISHMANICIDA *IN VITRO*
DE DERIVADOS 2-AMINO-ALQUIL-1,2,3-TRIAZOL-1,4-NAFTOQUINONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Magna Suzana Alexandre Moreira

Co-orientadora: Dr^a. Morgana Vital de Araújo

Maceió – AL

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

- O48a Oliveira, Gessyca Gouveia de.
Avaliação da citotoxicidade e potencial leishmanicida *in vitro* de derivados 2-amino-
alquil-1,2,3-triazol-1,4-naftoquinonas / Gessyca Gouveia de Oliveira. – 2019.
65 f. : il. color.
- Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.
Co-orientadora: Morgana Vital de Araújo.
Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de
Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2019.
- Bibliografia: f. 58-65.
1. *Leishmania*. 2. Leishmaniose. 3. Doenças - Tratamento. 4. Pentamidina - Tratamento
farmacológico. 5. Citotoxicidade. 6. Naftoquinonas. I. Título.

CDU: 615.3:616.993.161

GESSYCA GOUVEIA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E POTENCIAL LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE DERIVADOS 2-AMINO-ALQUIL-1,2,3-TRIAZOL-1,4-NAFTOQUINONAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Data da aprovação: 09/10/2019

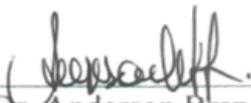
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Magna Suzana Alexandre-Moreira (Orientadora)
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – UFAL



Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo (Titular)
Instituto de Ciências Farmacêuticas – UFAL



Prof. Dr. Anderson Brandão Leite (Titular)
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – UFAL

Dedico este trabalho

à minha mãe Elizabete Gouveia e a minha irmã

Monize Gouveia, por sempre acreditarem e torcerem por mim!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me capacitado para a realização desse trabalho.

Agradeço a minha mãe Elizabete Gouveia por todo amor, carinho, paciência e compreensão e por todas palavras de motivação. A minha irmã Monize Gouveia e meu cunhado Thiago Ferreira por todo apoio e por sempre estarem presentes em minha vida. Ao meu pai Gefesson Antônio, que mesmo de longe sempre acreditou em mim e deu forças as minhas escolhas.

A todos meus familiares e amigos, obrigada por todo apoio. Agradeço ao meu namorado Arioston Moraes por estar sempre presente em minha vida e caminhada acadêmica, obrigada por toda ajuda, conselhos, apoio e confiança.

A minha orientadora Prof. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira por ter me dado a oportunidade de participar do grupo de pesquisa. Agradeço por todo conhecimento e experiência proporcionada. A minha co-orientadora Dra Morgana Vital por todo conhecimento, paciência, ajuda e apoio durante a realização dessa pesquisa.

A Prof. Dra. Eliane Aparecida Campesatto, ao Prof. Dr. Anderson Brandão Leite e ao Prof. Dr Luciano Aparecido Meireles Grillo por todo o conhecimento compartilhado e por aceitarem fazer parte da banca e contribuir assim, para essa pesquisa.

Agradeço ao Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos (LSCB/UFRPE), por ceder as substâncias utilizadas nesse trabalho. A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF-UFAL), ao secretário do PPGCF, Daniel Ricarte, por sempre estar disposto a ajudar e resolver qualquer problema administrativo.

A todos que fazem parte do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFi/UFAL) por toda troca de conhecimento e toda ajuda durante a realização desse trabalho, em especial:, Amanda, Suellen, Karoline, Kaycke, José Clementino, Flávio, Max, Alyne, Hilda, Lilyane e Shakira.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo apoio financeiro.

A todos, meu sincero carinho, e meu muito OBRIGADA!!!

Sonhos determinam o que você quer. Ação determina o que você conquista.

Aldo Novak

RESUMO

Parasitas do gênero *Leishmania* são os agentes causadores das leishmanioses em humanos, uma doença considerada negligenciada e que acomete milhões de pessoas. A terapia leishmanicida apresenta algumas limitações como alta toxicidade e efeitos adversos significantes, além de apresentarem cepas já resistentes a estas terapias. Uma das estratégias para o aperfeiçoamento da terapia contra as leishmanioses é a descoberta de novos fármacos através da síntese química. Desta forma, este trabalho visa investigar a citotoxicidade e a atividade leishmanicida *in vitro* de derivados 2-amino-alkil-1,2,3-triazol-1,4-naftoquinonas. Para isto, a citotoxicidade dos derivados foi avaliada em macrófagos da linhagem J774.A1 através do ensaio colorimétrico de MTT e a atividade leishmanicida em culturas de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* através de contagem direta em microscópio óptico. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prisma[®] 5. No ensaio de citotoxicidade os derivados LSCB 84, LSCB 85, LSCB 96, LSCB 97 e LSCB 104 não apresentaram toxicidade aos macrófagos e acredita-se que esse resultado tenha relação com a ausência do grupamento hidroxila na estrutura desses compostos, enquanto os demais derivados apresentaram toxicidade em torno de 50%, além disso todos os derivados apresentaram toxicidade inferior ao fármaco padrão pentamidina. A toxicidade dos derivados também foi avaliada *in silico* utilizando o Programa OSIRIS[®] onde foi observado através dos parâmetros, que os derivados triazol-amino-quinona demonstraram valores próximos ao fármaco padrão pentamidina. Ao investigar uma possível atividade leishmanicida, apenas os LSCB 97 e LSCB 100 não foram ativas contra *L. chagasi*. Os derivados LSCB 84, LSCB 85, LSCB 87, LSCB 88, LSCB 93, LSCB 99, LSCB 107, LSCB 109 apresentaram-se bastante ativos com eficácia que variam de 99,1±1,5% à 80,9±9,2% e CI₅₀ de 0,3±0,1µM à 8,4±0,8 µM. Em se tratando do efeito contra formas de *L. amazonensis*, os derivados LSCB 97, LSCB 104 e LSCB 101 não apresentaram atividade leishmanicida significativa, no entanto os derivados LSCB84, LSCB 85 e LSCB 93 apresentaram atividade de 83,13± 6,22% (com CI₅₀ de 32,04±18,25 µM), 77,10±8,23% (com CI₅₀ de 62,4 ± 11,95 µM) e 93,97±6,06% respectivamente. A maioria dos derivados apresentaram-se mais ativas e mais seletivas para as formas promastigotas da *L. chagasi*, e demonstraram ser moléculas promissoras quanto a sua atividade leishmanicida para ambas as espécies.

Palavras-chave: *Leishmania*. Leishmaniose. Citotoxicidade. Naftoquinonas.

ABSTRACT

Parasites of the genus *Leishmania* are the causative agents of leishmaniasis in humans, a neglected disease that affects millions of people. Leishmanicidal therapy has some limitations such as high toxicity and significant adverse effects, in addition to strains already resistant to these therapies. One of the strategies for improving leishmaniasis therapy is the discovery of new drugs through chemical synthesis. Thus, this work aims to investigate the cytotoxicity and in vitro leishmanicidal activity of 2-amino-alkyl-1,2,3-triazol-1,4-naphthoquinones derivatives. For this, the cytotoxicity of the derivatives was evaluated in J774.A1 macrophages by MTT colorimetric assay and leishmanicidal activity in *L. amazonensis* and *L. chagasi* promastigote cultures by direct counting under optical microscope. Statistical analyzes were performed using the GraphPad Prisma[®] 5 software. In the cytotoxicity assay the derivatives LSCB 84, LSCB 85, LSCB 96, LSCB 97 and LSCB 104 were not toxic to macrophages and this result is believed to be related to the absence of grouping. hydroxyl in the structure of these compounds, while the other derivatives showed toxicity around 50%, besides all the derivatives showed lower toxicity than the standard pentamidine drug. The toxicity of the derivatives was also evaluated *in silico* using the OSIRIS[®] Program where it was observed through the parameters that the triazole-amino-quinone derivatives showed values close to the standard pentamidine drug. When investigating a possible leishmanicidal activity, only LSCB 97 and LSCB 100 were not active against *L. chagasi*. Derivatives LSCB 84, LSCB 85, LSCB 87, LSCB 88, LSCB 93, LSCB 99, LSCB 107, LSCB 109 were quite active with efficacy ranging from 99.1 ± 1.5% to 80.9 ± 9, 2% and IC₅₀ from 0.3 ± 0.1 µM to 8.4 ± 0.8 µM. Regarding the effect against *L. amazonensis* forms, derivatives LSCB 97, LSCB 104 and LSCB 101 did not show significant leishmanicidal activity, however derivatives LSCB84, LSCB 85 and LSCB 93 showed activity of 83.13 ± 6.22%. (with IC₅₀ of 32.04 ± 18.25 µM), 77.10 ± 8.23% (with IC₅₀ of 62.4 ± 11.95 µM) and 93.97 ± 6.06% respectively. Most of the derivatives were more active and more selective for the *L. chagasi* promastigote forms, and showed to be promising molecules regarding their leishmanicidal activity for both species.

Keywords: *Leishmania*. Leishmaniasis. Cytotoxicity. Naphthoquinones

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Flebotomíneo, vetor da leishmaniose.....	15
Figura 2-	Micrografia das formas evolutivas da <i>Leishmania</i> : (A) promastigota e (B) amastigota intracelular.....	17
Figura 3 -	O ciclo evolutivo de parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	18
Figura 4-	Manifestações clínicas comuns da Leishmaniose Tegumentar. (A) LC, (B) LCD, (C) LMC.....	20
Figura 5-	Manifestações clínicas da LV. (A) indivíduo apresentando esplenomegalia; (B) indivíduo apresentando PKDL.....	21
Figura 6 -	Distribuição geográfica das leishmanioses no ano de 2016. (A) LT; (B) LV.....	22
Figura 7 -	Casos de leishmaniose no Brasil no período de 1980 a 2017. (A) LT; (B) LV	24
Figura 8-	Estrutura química dos antimoniais pentavalentes.....	26
Figura 9 –	Estrutura química da pentamidina.....	27
Figura 10-	Estrutura química da Anfotericina B.....	29
Figura 11-	Estrutura química da miltefosina.....	30
Figura 12-	Estrutura química da paramomicina.....	31
Figura 13-	Estrutura química da Sitamaquina.....	32
Figura 14-	Estrutura química da Quinona em posição para- e orto-	35
Figura 15-	Estrutura química do triazol-1,4-naftoquinona.....	37
Figura 16-	Síntese dos derivados triazol-amino-quinona sintetizados a partir de 1,4-NQ.	48
Figura 17-	Comparação <i>in silico</i> dos perfis “druglikeness” (A) e “drug-score” (B) para os derivados triazol-amino-quinona e pentamidina (PENTA).....	48
Figura 18-	Risco de toxicidade (efeitos tumorigênicos, irritantes e reprodutivos) para para derivados triazol-amino-quinona e pentamidina	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Estruturas químicas dos derivados triazol-amino quinona.....	38
Tabela 2-	Determinação da citotoxicidade dos derivados triazol-amino-quinona em macrófagos J774.A1.....	44
Tabela 3-	Efeito leishmanicida dos derivados triazol-amino-quinona em cultura de promastigotas de <i>L.chagasi</i>	50
Tabela 4-	Efeito leishmanicida dos derivados triazol-amino-quinona em cultura de promastigotas de <i>L.amazonensis</i>	52
Tabela 5-	Índice de seletividade das dos derivados dos derivados triazol-amino-quinona para macrófagos x <i>L. amazonensis</i> e para macrófagos x <i>L. chagasi</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Trifosfato de Adenosina” do inglês “Adenosine Triphosphate
CO₂	Gás Carbônico
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNs	Doença Tropicais Negligenciadas
e.p.m.	Erro Padrão da Média
g	Gramas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana do inglês “ Human Immunodeficiency Virus
HPAO	Policíclicos Aromáticos Oxigenados
IS	Índice de Seletividade
iNOS₂	Óxido nítrico síntese induzível tipo 2” do inglês “Nitric Oxide Synthase (inducible)”
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicanos
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MS	Ministério da Saúde
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida” do inglês “Nicotinamide adenine Dinucleotide phosphate”
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NQs	Naftoquinonas
NO	Oxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico

PKDL	Leishmaniose Dérmica Pós Calazar do inglês “ Post Kalazar Dermal Leishmaniasis
ROS	Espécie Reativas de Oxigênio
r.p.m.	Rotações por Minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro Fetal Bovino
SB	Antimonial
Sb^{III}	Antimônio trivalente
Sb^V	Antimonial pentavalente
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μmol	Micromol
1,4-NQ	1,4-naftoquinona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Histórico e Taxonomia	15
2.2	Ciclo de vida	16
2.3	Formas evolutivas	17
2.4	Leishmanioses e aspectos clínicos	18
2.5	Epidemiologia	21
2.6	Tratamento	24
2.6.1.	Antimoniais pentavalentes.....	24
2.6.2	Pentamidina.....	26
2.6.3	Anfotericina B	28
2.6.4	Miltefosina.....	29
2.6.5	Paromomicina.....	30
2.6.6	Sitamaquina.....	32
2.6.7	Terapia combinada.....	32
3	DERIVADOS 1,4 NAFTOQUINONAS	33
4	OBJETIVOS	36
4.1	Objetivo geral	36
4.2	Objetivos específicos	36
5	MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1	Obtenção dos derivados triazol-amino-quinona	37
5.2	Preparação das amostras	41
5.3	Manutenção das células	41
5.3.1	Culturas de <i>Leishmania</i>	41
5.3.2	Culturas de macrófagos	42
5.4	Ensaio <i>in vitro</i>	42
5.4.1	Determinação da viabilidade celular	42
5.4.2	Ensaio de viabilidade de promastigotas.....	43
5.5	Análise estatística	43
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÃO	57
	REFERENCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, esses parasitos se desenvolvem no interior das células, consumindo nutrientes neste processo, levando-as a morte, podendo acometer vários órgãos importantes, como pele, fígado e baço, fornecendo assim, grandes danos à saúde (SANGSHETTI et al., 2015).

É considerada uma doença tropical negligenciada (DTN), sendo a terceira mais importante doença transmitida por vetores e a segunda principal causa de morte, ficando atrás apenas da malária, apresentando alta endemicidade, morbidade e mortalidade (KEVRIC et al., 2015). É uma doença endêmica em 97 países e estima-se que ocorram anualmente cerca de 700.000 a 1 milhão de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes (WHO, 2015).

Apesar dos efeitos colaterais e dos muitos casos de resistência, o antimonial pentavalente ainda é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose em muitos países (HENDRICKX et al., 2016). Como segunda escolha, são utilizados como tratamento a anfotericina B e suas formulações lipídicas, paromomicina, miltefosina e pentamidina (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Entretanto os tratamentos disponíveis são considerados desvantajosos devido o surgimento de resistência (MANDAL et al., 2017), efeitos colaterais incluindo alta toxicidade (ALAM, 2017), efeito teratogênico (RAHMAN et al., 2017), falta de eficácia e para formulações lipídicas, alto custo (ZULFIQAR et al., 2017). E, como não há vacina disponível atualmente contra a leishmaniose, os fármacos e as medidas de controle são ferramentas indispensáveis para o tratamento e o controle tanto da Leishmaniose Visceral (LV) quanto da Leishmaniose Tegumentar (LT).

Devido as restrições apresentadas pelos fármacos disponíveis, as leishmanioses necessitam de métodos mais efetivos e seguros para seu tratamento. Pesquisadores em todo o mundo estão em busca de novos protótipos a fármacos para leishmaniose, e estudos tem revelado que as quinonas possuem efeito contra o *Trypanosoma cruzi* (JARDIM et al., 2015), e sobre a *leishmania* (ARAUJO et al., 2017), nesse sentido estudos com derivados quinolínicos são excelentes propostas para terapia das leishmanioses.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico e Taxonomia

A Leishmaniose tem uma longa história. Em 1903, William Leishman e Charles Donovan descreveram, em relatórios distintos, o parasito *Leishmania donovani* isolado em baços de pacientes na Índia (LEISHMAN, 1903), doença conhecida atualmente como LV.

Nas Américas, cerâmicas pré-colombianas datadas de 400 a 900 anos d.C., feitas por índios do Peru foram encontradas, apresentando mutilações de lábios e narizes, características de LT (LAINSON; SHAW, 1988). Posteriormente, múmias com lesões de pele e mucosas foram descobertas. A partir de então foram descritas mais de 20 espécies e subespécies de *Leishmania* com a capacidade de causar a doença. (SANTOS; COIMBRA, 1994).

As leishmanioses são um grupo de doenças crônicas graves causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e endêmicas em países tropicais e subtropicais (CARLSEN et al., 2015). Na natureza todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas ao homem ou a outros hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo de fêmeas hematófagas infectadas. Estes insetos denominados flebotomíneos (**Figura 1**) são pertencentes ao Reino Protozoa, Filo *Sarcomastigophora*, Subfilo *Mastigophora*, Classe *Zoomastigophora*, Ordem *Kinetoplastida*, Subordem *Trypanosomatina*, Família *Trypanosomatidae*. As espécies do gênero *Leishmania* são subdivididas em dois subgêneros: *Leishmania* (*Viannia*) e *Leishmania* (*Leishmania*)

Figura 1- Flebotomíneo, vetor da leishmaniose.



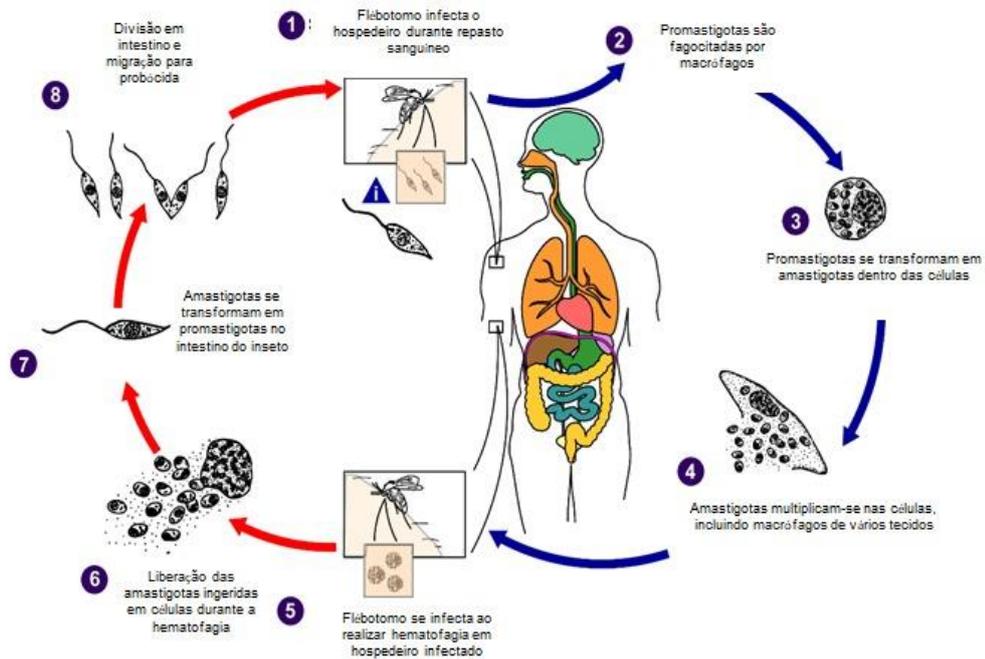
Fonte: CDC/ Frank Collins / James Gathany, 2006. Acessado em: 02/08/2019
<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=10277>

2.2 Ciclo de vida

Os hospedeiros vertebrados são infectados por formas promastigotas metacíclicas, transmitidas por fêmeas dos insetos vetores, durante o repasto sanguíneo. O vetor possui um aparelho bucal curto e rígido, adaptado para dilacerar o tecido e vasos sanguíneos do hospedeiro, isso é de suma importância para inoculação e ingestão das formas infectantes (KAYE; SCOTT, 2011). Na pele as formas promastigotas serão reconhecidas e fagocitadas por células do Sistema Fagocitário Mononuclear, sendo internalizadas em vacúolos parasitóforos. Após a internalização ocorre a fusão do vacúolo parasitóforo com lisossomos, formando o fagolisossomo onde por ação de enzimas, alterações do pH e temperatura, as formas promastigotas transformam-se em forma amastigota (ALCOLEA et al., 2010; GLUENZ; GINGER; MCKEAN, 2010). Esta forma de resistência mantém o controle das condições ambientais internas do vacúolo e passa a se replicar no interior de macrófagos até sua ruptura, passando a infectar outras células como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e mastócitos. (MAURER; DONDJE; VON STEBUT, 2009; KAYE; SCOTT, 2011).

A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre após a ingestão de formas amastigotas durante o repasto sanguíneo de um indivíduo infectado. No intestino do inseto vetor, primeiramente, ocorre a transformação das formas amastigotas em promastigotas procíclicas, após sofrerem sucessivas modificações, essa forma aderida as microvilosidades do intestino médio multiplicam-se rapidamente por divisão binária (SACKS; KAMHAWI, 2001). Após aproximadamente 5 dias, no intestino médio, os parasitos migram para as glândulas salivares e passam a ser conhecidas como promastigotas metacíclicas, tornando-se novamente infectante ao hospedeiro vertebrado, devido, principalmente, a alterações nos seus constituintes de membrana, como o alongamento da molécula de Lipofosfoglicano (LPG), e a presença de glicoproteína (GP63), principais fatores de virulência (BATES 2007; CORRALES et al., 2010). A **figura 2** ilustra o ciclo de vida das espécies *leishmania sp.*

Figura 2 - Ciclo evolutivo de parasitos do gênero *Leishmania*



Fonte: Adaptado de CDC-DPDx/Alexander J. da Silva, PhD, 2002. Acessado em:02/08/2019 <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=3400>.

A transmissão mais comum da doença ocorre através do inseto vetor no momento da hematofagia, porém pode ocorrer em casos mais raros, através de acidentes de contato com material biológico infectado. E em casos da LV, outras possíveis rotas de transmissão também foram relatadas, como a transmissão congênita, transfusão de sangue e compartilhamento de seringas entre usuários de drogas (AMEEN, 2010).

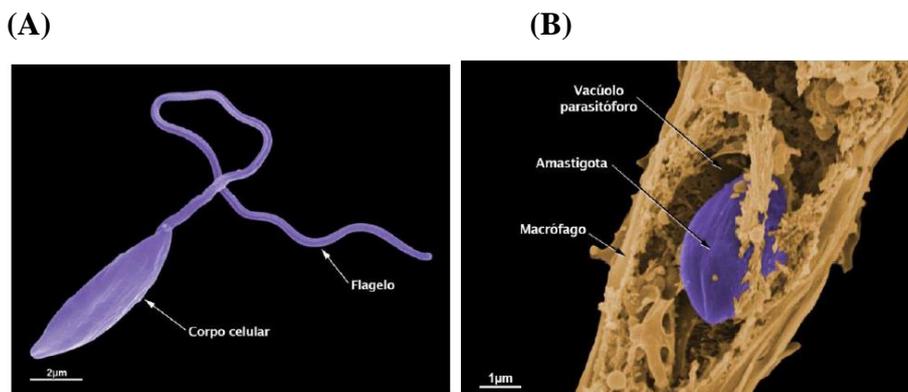
2.3 Formas Evolutivas

O gênero *Leishmania* reúne espécies de protozoários e possuem um ciclo de vida heteroxênico (digenético), em outras palavras, desenvolvem-se em dois hospedeiros distintos, e apresentam-se em duas formas evolutivas morfológicamente distintas: a forma promastigota e a forma amastigota (ALCOLEA et al., 2010).

Promastigotas (**Figura 3A**) são formas flagelada, extracelular, móvel e com corpo celular fusiforme, são encontradas no trato digestivo do inseto vetor. Seu longo flagelo emerge do corpo do parasito na porção anterior, promovendo mobilidade ao protozoário. Em sua região mediana situa-se o núcleo, e o cinetoplasmo encontra-se na porção mais anterior, próximo a bolsa flagelar. Essa forma passa por modificações bioquímicas, dentro do vetor, para atingir sua forma infectante (promastigota metacíclica) (KAYE e SCOOT, 2011). Esta forma flagelada tem maior capacidade de penetração nos tecidos do hospedeiro mamífero, e é facilitada com a vasodilatação local promovida pela saliva dos insetos (SALEI et al., 2017). A forma Amastigota (**Figura 3B**) são ovais, possuem flagelo rudimentar não exteriorizado, encontrado no interior da bolsa flagelar e localizam-se em vacúolos parasitóforos de células fagocitárias de vertebrados, principalmente macrófagos (HATAM et al., 2013).

As formas promastigotas e amastigotas multiplicam-se por divisão binária. Este processo inicia-se com a produção de um segundo flagelo, seguido pelo núcleo, cinetoplasto e divisão do corpo celular longitudinalmente no sentido ântero-posterior, produzindo assim, duas novas células (SIMPSON; KRETZER, 1997; WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011).

Figura 3-Micrografia das formas evolutivas da *Leishmania*. (A) Promastigota e (B) Amastigota.



Fonte: TEIXEIRA, et al., 2013.

2.4 Leishmanioses e aspectos clínicos

As leishmanioses são divididas clinicamente em LT, que pode ser causada pela maioria das espécies patogênicas do gênero como *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*, *L. lainsoni*, enquanto a LV, principalmente por *L. donovani* e *L. chagasi*. A forma tegumentar,

ainda, é subdividida em leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LMC). (BRASIL, 2016)

A LT é uma doença com uma grande distribuição geográfica e apresenta heterogeneidade clínica e epidemiológica, envolvendo várias espécies diferentes de parasitos do gênero *Leishmania* (ALVAR et al., 2014).

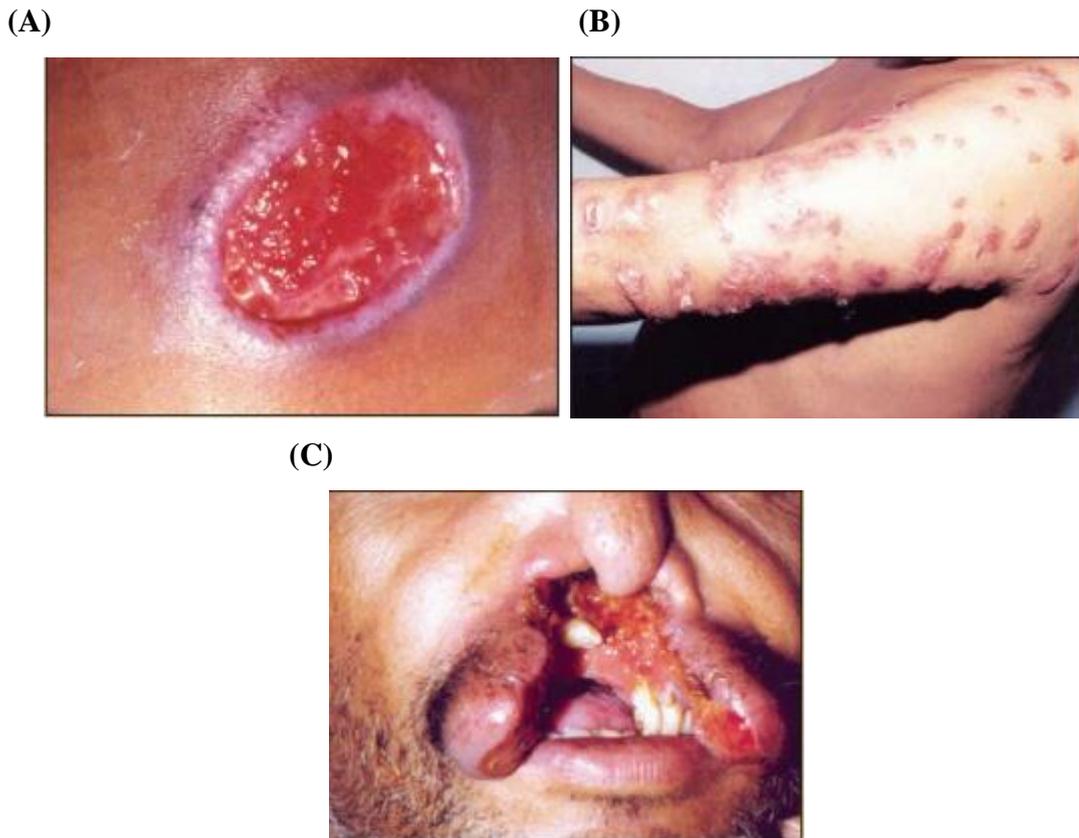
A LC é causada, no velho mundo (Índia, Etiópia, Sudão e Irã), preferencialmente por *L. aethiopica*, *L. major* e *L. tropica*. No novo mundo (países da América Central e do Sul), diversos são os agentes causadores da doença, como: *L. peruviana*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. venezuelensis* e *L. panamensis*. Cerca de 95% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Oriente Médio, Américas, Ásia Central e na Bacia do Mediterrâneo e a maioria dos casos nas Américas são relatados no Brasil. (SHOWLER; BOGGILD, 2015). É considerada a apresentação mais comum de leishmaniose e caracteriza-se por uma lesão (**Figura 4A**) com aspecto de placas, pápulas e formação de nódulos, que pode surgir em múltiplos locais e gerar lesões ulcerosas com bordas delimitadas (MACHADO et al. 2015).

A LCD no Brasil é causada pela *L. (L.) amazonensis*, é considerada uma variação da LC com uma forma clínica rara, entretanto grave, apresenta evolução crônica progressiva, geralmente acometendo as pessoas na primeira infância, com resposta terapêutica inicial satisfatória, recidivas frequentes e caráter refratário a diversos esquemas terapêuticos propostos. É caracterizada por lesão pápulo-nodulares, tuberosas, verrucosas, formando placas (**Figura 4B**), possui evolução lenta contendo grande número de amastigotas, sem envolvimento visceral e muitas vezes ocorre episódios de relapso e resistência à quimioterapia convencional. (REITHINGER et al., 2007). Esta forma da doença ocorre em pacientes com deficiência imunológica, em que a resposta imune celular está baixa com relação aos antígenos de *Leishmania*, resultando em um estado de anergia imunológica na presença da infecção. A doença é acometida por condição crônica e progressiva por toda a vida do paciente. (REIS; GONTIJO, 2011).

A LMC é causada por *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. amazonensis* e cerca de 35.000 casos são relatados anualmente em países como Bolívia, Peru e Brasil (GUERRA et al., 2011). Descrita como a forma mais grave da LT, geralmente é causada por disseminação hematogênica dos parasitos para as mucosas nasais, orofaringe, palato, lábios, língua, laringe e,

excepcionalmente, traqueia e árvore respiratória superior, os indivíduos acometidos por esta forma clínica, desenvolvem lesões metastática (**figura 4C**) seguido de destruição progressiva dos locais atingidos (OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012).

Figura 4- Manifestações clínicas comuns da Leishmaniose Tegumentar. (A) LC, (B) LCD, (C) LMC



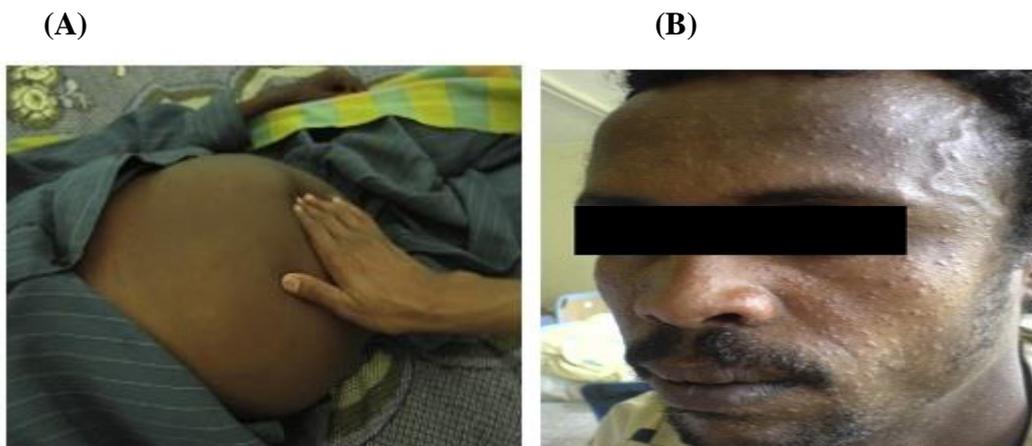
Fonte: MS/SVS, 2006.

A LV, também conhecida como calazar, é uma doença sistêmica crônica que acomete principalmente os gânglios linfáticos, o baço, o fígado e a medula óssea e, em casos menos frequentes, os rins, os pulmões e a pele. O período de incubação da doença é bastante oscilante, variando de 10 dias a 24 meses (com média entre 2 e 6 meses) e suas principais manifestações clínicas discretas ou acentuadas incluem esplenomegalia (**Figura 5A**) febre, hepatomegalia, palidez cutânea / mucosa, diarreia e perda de peso, e em estágios mais avançados da doença, pode ocorrer disfunção hepática e icterícia. (ANVERSA et al.,2017).

Em casos de LV causada por *L. (L.) donovani*, após o tratamento com êxito, a doença pode ainda reaparecer numa forma cutânea crônica (**Figura 5B**), conhecida como leishmaniose dérmica pós calazar –PKDL que se trata de uma complicação da LV caracterizada por erupções maculares, maculopapulares e nodulares, que geralmente iniciam em torno da boca e se espalham para outras partes do corpo. (VAN-GRIENSVEN; DIRO, 2012).

Quando não tratada, a LV quase sempre progride até a morte e, mesmo quando tratada, a doença pode levar a casos fatais, sendo a morte frequentemente causada por infecções bacterianas e / ou sangramento. O estado imunológico do indivíduo e a infectividade do parasito contribui para a gravidade da doença. (BHATTACHARYA; ALI, 2013)

Figura 5- Manifestações clínicas da LV. (A) indivíduo apresentando esplenomegalia; (B) indivíduo apresentando PKDL.



Fonte: VAN-GRIENSVEN; DIRO, 2012.

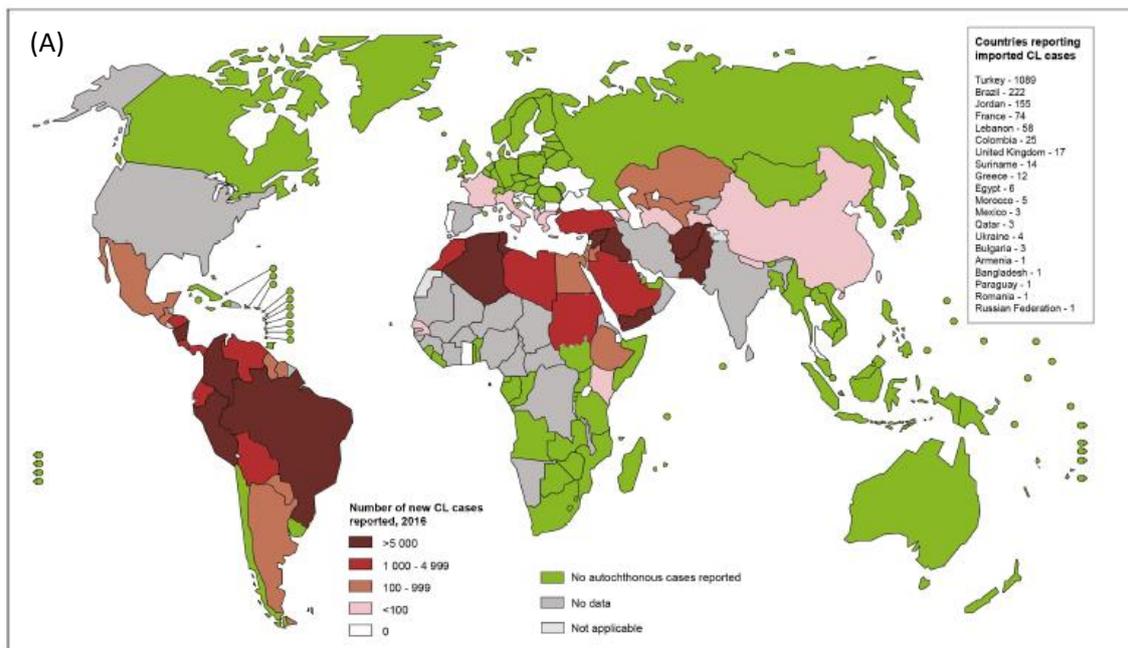
2.5 Epidemiologia

A leishmaniose é uma doença com distribuição mundial, podendo ser encontrada nos 5 principais continentes do planeta como observado na figura 6 que relata a distribuição geográfica da LT (**Figura 6A**) e da LV (**Figura6B**) no ano de 2016.

Estima-se que 12 a 15 milhões de pessoas no mundo estão infectadas, e 350 milhões estão em risco de adquirir a doença, calcula-se ainda, que cerca de 1 milhão de novos casos ocorrem a cada ano. À parte, a doença é ainda, bastante subnotificada, o que leva ao agravante da situação. (ALVAR et al., 2012; WHO, 2015).

No ano de 2017, foram notificados à OMS 22.145 novos casos, destes, 20.792 casos ocorreram nos seguintes países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO,2018). Neste mesmo ano no Brasil, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde /Ministério da Saúde (MS), foram registrados 17.528 casos novos de L.T, com um Coeficiente de incidencia de 8,44 casos/100.000 habitantes, destes casos 44,7% foram reportados da região Norte. Em relação a L.V, no mesmo ano foram registrados 4.103 novos casos, mostrando um coeficiente de incidência de 1,98 casos/100.000 habitantes, destes, 44,5% foram registrados na região nordeste.

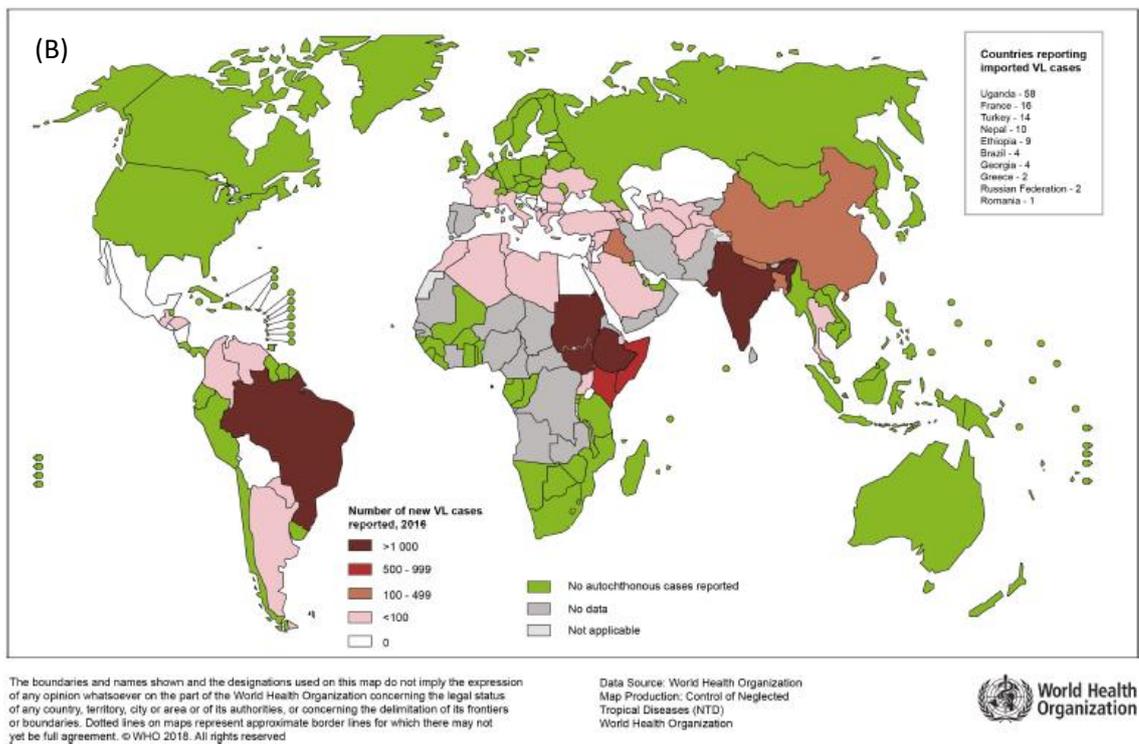
Figura 6 - Distribuição geográfica das leishmanioses no ano de 2016. (A) LC; (B) LV.



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2018. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization

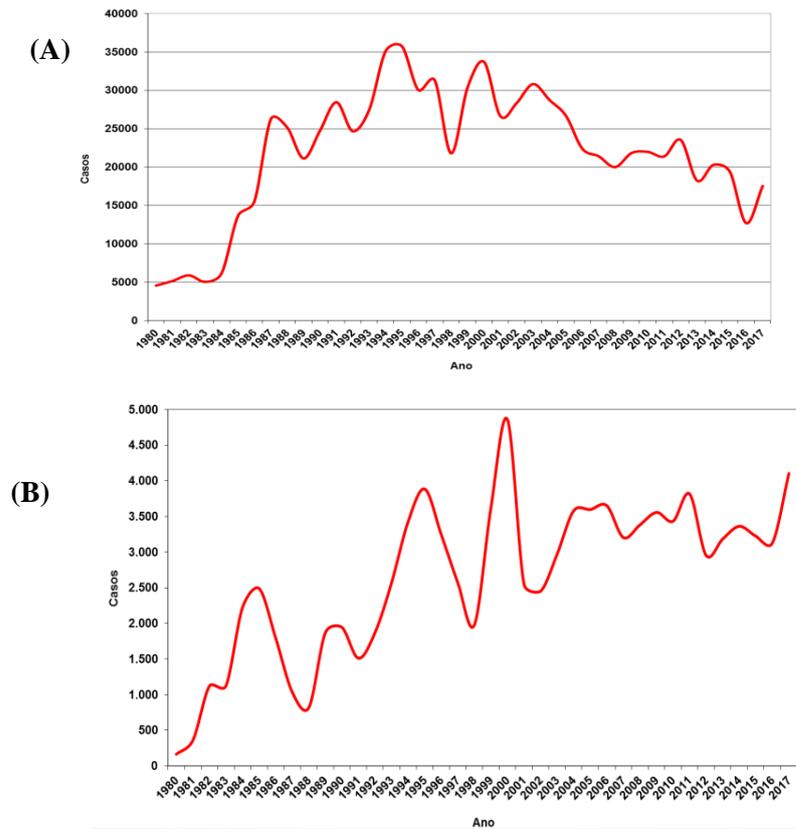




Fonte: WHO, 2018.

A figura 7 exprime os números de casos registrados pela secretaria de vigilância em saúde/MS tanto de LT (**Figura 7A**) como LV (**Figura 7B**) entre os anos de 1980 a 2017. Os casos de LT foram crescendo ao decorrer dos anos, atingindo seu pico máximo em 1994. Entre 1995 a 2016 houve um decréscimo e em 2017 apresentou um novo crescimento de casos. Os casos de LV cresceram a partir de 1980 obtendo seu pico máximo em 2000, onde também houve uma redução de casos, porém em 2003 o número de casos voltou a subir, mantendo o crescimento em 2017. Mostrando assim, que no Brasil a doença continua sem uma tendência de redução.

Figura 7 - Casos de leishmaniose no Brasil no período de 1980 a 2017. (A) LT; (B) LV



Fonte: Adaptado de SVS/MS, 2017.

As leishmanioses são de notificação compulsória, de periodicidade semanal, conforme Portaria n° 204, de 17 de fevereiro de 2016, que define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, desta forma a doença merece importante atenção dos profissionais e gestores da saúde (BRASIL, 2016).

2.6 Tratamento

2.6.1. Antimoniais pentavalentes

Antimônio (Sb) é um semimetal encontrado na natureza, e seus derivados são utilizados desde a antiguidade para diversos fins. Os compostos antimoniais sob a forma de sais trivalentes (antimônio trivalente – Sb^{III}), chamado tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio) são utilizados desde a Idade Média em formulações homeopáticas (GALLIGNANI et al., 2005).

Sua aplicação na clínica médica no tratamento da LT se deu pela primeira vez em 1912 pelo médico brasileiro Gaspar Vianna (RATH et al., 2003). Para a LV, o uso dos derivados de Sb^{III} só foi empregado em 1915 na Itália e Índia (MURRAY et al., 2005). Após a década de 40, o uso clínico do Sb^{III} foi descontinuado devido aos seus efeitos adversos e sua elevada toxicidade, dando lugar a descoberta de compostos menos tóxicos como os complexos de antimônio pentavalente Sb^V (BERMAN, 2003).

A família antimonial pentavalente (Sb^V) é recomendada pela OMS como tratamento de primeira escolha para a LT e LV e foi incluída há mais de 60 anos. Essa família de compostos, representada pelo estibogluconato de sódio (Pentostam®) e antimoniato de meglumina (Glucantime®) (**Figura 8**), continua sendo a principal terapia para o tratamento das leishmanioses na maioria das regiões do mundo, com exceção da Europa e do estado de Bihar, na Índia. Em Bihar, a resistência dos parasitos aos antimoniais causou um aumento dramático no insucesso do tratamento de até 65% entre 1980 e 1997 (HIRVE et al., 2016).

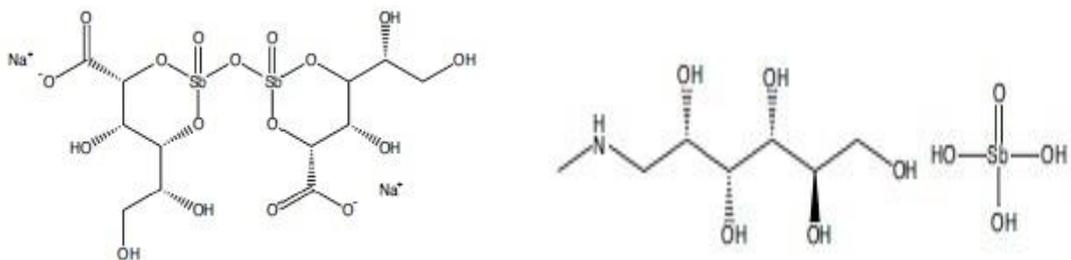
O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não está bem elucidado. Muitos estudos expõem que seus mecanismos de ação aparentam envolver diversos aspectos metabólicos do parasito. BERMAN et al., (1985) demonstraram que antimoniais pentavalentes inibem a enzima fosfofrutoquinase, envolvida na síntese de nucleotídeos trifosfatados. Em contrapartida também foi relatado que Sb^V formam complexos com ribonucleosídeos, e que essa interação poderia ter implicações no mecanismo de ação dos antimoniais (DEMICHELI et al., 2002). Sugere-se, ainda, que o antimoniato de meglumina seja um pró-fármaco, convertido no interior do macrófago em Sb^{III} , composto tóxico para as formas amastigotas de *Leishmania* spp. causando a inibição de enzimas como a tripanotiona redutase, o que interfere no processo de glicólise e β -oxidação, causando depleção de ATP, aumento do estresse oxidativo e morte dos parasitos por apoptose (ROBERTS; BERMAN; RAINEY, 1995; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

Os antimoniais são ativos tanto para LT quanto para a LV, porém apenas através de administração parenteral. A farmacocinética de antimoniais pentavalentes aponta que ao ser administrado intravenosamente cerca de 80% é eliminado entre 6-8 h. e, quando administrado por via intramuscular sua cinética pode ser dividida em três fases, sendo a fase inicial de absorção com meia vida de 0,85 h, seguida por uma fase de eliminação rápida com meia vida de 2,02 h e finalmente, uma fase de eliminação mais lenta com meia vida de cerca de 76 h (GIL

et al., 2007). Sua dose recomendada é de 20mg/kg/dia por um período de 20-30 dias, não ultrapassando o limite de 850 mg. (RATH et al., 2003; SANGSHETTI et al., 2015)

No Brasil o antimoníato de meglumina é viabilizado gratuitamente para o tratamento dos doentes pelo MS e o protocolo de tratamento varia dependendo das condições clínicas associadas a cada caso (BRASIL, 2014). A terapia baseada em antimonial possui grandes desvantagens, compreendendo um tratamento prolongado de administração parenteral com a necessidade de supervisão médica devido à alta toxicidade, o que ocasiona diversos efeitos adversos, dentre eles destacam-se: dor no local da injeção, artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastria, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, adinamia, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema, insuficiência renal aguda (BRASIL, 2014), pancitopenia, elevações das transaminases hepáticas, polineuropatia reversível, anemia hemolítica, choque e morte súbita (MARGARET et al., 2012). Além de serem contraindicados em pacientes que fazem uso de betabloqueadores e drogas antiarrítmicas, os antimoniais também são contraindicados em pacientes com insuficiência renal ou hepática (SANGSHETTI et al., 2015). Baixas dosagens e falhas na adesão ao tratamento estão associadas ao aumento na resistência, como visto em Bihar, na Índia, onde os antimoniais já não são mais utilizados (SUNDAR, 2001).

Figura 8- Estrutura química dos antimoniais pentavalentes.



Estibogluconato de sódio

Antimoniato de meglumina

Fonte: Adaptado de ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017

2.6.2 Pentamidina

A Pentamidina (isetionato ou metanossulfonato) é uma amidina aromática (**Figura 9**) e vem sendo utilizada no tratamento da leishmaniose desde 1939, assim como em outras doenças como tripanossomíase e pneumonia por *Pneumocystis carinii* desde a década de 1980

(SOARES; LEON; GENESTRA, 2004). Atualmente é um fármaco de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose e apesar de ter sido inicialmente utilizada para o tratamento da leishmaniose sua eficácia inferior à dos antimoniais e decrescente aponta surgimento de cepas resistentes (JHA et al., 1991).

O mecanismo de ação das pentamidinas, assim como nos antimoniais, não está bem elucidado, estudos mostram que esta molécula pode entrar nos parasitos por meio de transportadores de alta afinidade ligar-se ao DNA mitocondrial podendo interferir nos processos de replicação e transcrição (SOARES; LEON; GENESTRA, 2004). Também podem agir na inibição dos transportadores de poliaminas provocando uma diminuição na captação de substratos relevantes para as rotas biossintéticas dos parasitos.(DIAZ et al., 2014). Um estudo realizado por BASSELIN et al., (2002) demonstrou que a resistência à pentamidina foi gerada em formas promastigotas e amastigotas axênicas *in vitro*.

A dose recomendada para o uso do fármaco segundo o MS é de 4 mg/kg por via intravenosa, três vezes por semana, entre 5-10 semanas, com doses máxima de 240mg por dia, em dias alternados. A dose total é dependente da resposta clínica e dos efeitos adversos, onde os mais frequentes são dor, abscessos no local da aplicação, náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaleia, hipotensão, lipotimia, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia (BRASIL, 2014), assim como também pode apresentar dispnéia, taquicardia, erupções cutâneas, tromboflebite, trombocitopenia, anemia, neutropenia, elevação de enzimas hepáticas e nefrotoxicidade, toxicidade pancreática (MASMOUDI et al., 2005), alguns casos de morte súbita também foram relatos (RATH et al., 2003).

O uso de pentamidina é contraindicado em caso de gestação, *diabetes mellitus*, insuficiência renal, insuficiência hepática, doenças cardíacas e em crianças com peso inferior a 8 kg (BRASIL, 2014).

Figura 9 – Estrutura química da pentamidina



Fonte: Adaptado de ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017.

2.6.3 Anfotericina B

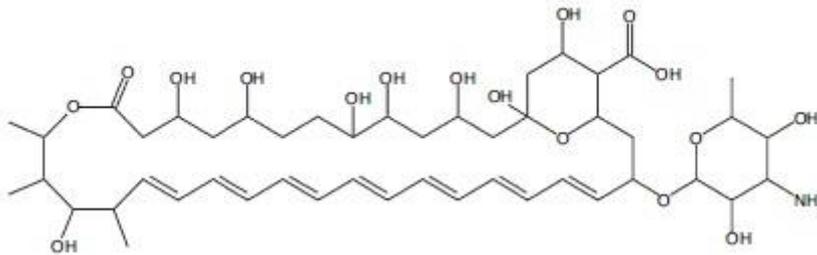
A anfotericina B estruturalmente é um macrolídeo poliênico (**Figura 10**) isolado inicialmente em 1956 de cepas de *Streptomyces nodosus*, que apresenta marcante atividade antifúngica, e por isso é o fármaco de primeira escolha no tratamento de micoses sistêmicas, com alta afinidade pelo ergosterol presente na membrana dos fungos, este fármaco também possui uma atividade leishmanicida eficaz. (BERMAN, 2015).

Seu mecanismo de ação é baseado no metabolismo de esteróis leishmaniais e fungos, que ao ligar-se ao ergosterol, o fármaco promove a formação de poros que alteram a permeabilidade da membrana por conduzir o escape descontrolado de íons, resultando na morte da célula fúngica. Por possuir baixa afinidade pelo colesterol presente nas células de mamíferos, sua ação é seletiva às células com ergosterol. Parasitos *Leishmania* também apresentam ergosterol como principal esterol de membrana, e por isso são sensíveis à anfotericina B. Desta maneira, seu mecanismo de ação é semelhante nos parasitos (SANGSHETTI et al., 2015; BERMAN, 2015).

O fármaco tem sido aplicado para o tratamento das leishmanioses, sendo uma possibilidade junto com os antimoniais ou pentamidina. Devido a sua alta toxicidade sua administração requer supervisão médica rigorosa, seu uso pode provocar febre e calafrios que apesar de diminuir com a frequência de uso, causa sérios danos ao paciente, pode ocasionar também tromboflebite e ocasionais toxicidades graves como miocardite, hipocalemia grave, disfunção renal e até morte (SUNDAR; CHATTERJEE, 2006).

Vários fatores fazem com que o uso da anfotericina B seja difícil e limitado, como, por exemplo sua baixa biodisponibilidade por via oral e distribuição irregular entre os tecidos devido à baixa lipossolubilidade acumulando-se rapidamente em órgão como os rins, causando danos que podem ser irreversíveis, esses fatores fizeram com que o fármaco fosse administrado inicialmente apenas na forma de dispersão coloidal "anfotericina B desoxicolato" (Fungizone) por via intravenosa (SANGSHETTI et al., 2015; BERMAN, 2015).

Apesar de todos os riscos a anfotericina B é o único fármaco indicado para gestantes com LV, e é a segunda escolha quando não se atingi a resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente ou ainda na impossibilidade de sua aplicação. (BRASIL, 2014).

Figura 10- Estrutura química da Anfotericina B

Fonte: Adaptado de ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017.

Com o objetivo de corrigir as falhas farmacocinéticas foram desenvolvidas outras formulações apresentando diferentes graus de eficácia e segurança, com destaque para a anfotericina B lipossomal (AmBisome), constituída por vesículas lipídicas contendo o fármaco, que apresenta melhor distribuição no organismo, maior tempo de meia-vida e menos efeitos adversos, porém o elevado custo do tratamento estreita seu uso (SANGSHETTI et al., 2015; BERMAN, 2015).

2.6.4 Miltefosina

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é um alquil fosfolípídeo (**Figura 11**) que inicialmente foi desenvolvido como um agente antineoplásico, tornando-se mais tarde o primeiro medicamento leishmanicida oral para o tratamento da LV (BERMAN, 2005). Na Índia este medicamento foi registrado e aprovado para o tratamento da LV, apresentando resultados semelhantes aos fármacos já utilizados. (CROFT et al., 2003). A mitelfosina é altamente eficiente tanto em adultos como em crianças, é bem tolerada, e continua a apresentar resultados satisfatórios clínicos para a forma cutânea da doença (MARGARET;PHILLIPS E SAMUEL;STANLEY, 2012).

Apesar dos benefícios apresentados, a miltefosina apresenta um potencial efeito teratogênico, sendo o uso em mulheres grávidas ou em mulheres com probabilidade de engravidar dentro de dois meses de tratamento rigorosamente proibido (SINDERMANN, 2006). Ainda que se trate de uma molécula simples e estável por via oral, sua eficácia depende de um tratamento prolongado, o que pode resultar em um uso indevido, e sua longa meia-vida facilita o desenvolvimento de resistência parasitária (PÉREZ-VICTORIA et al., 2006). O

2.6.5 Paromomicina

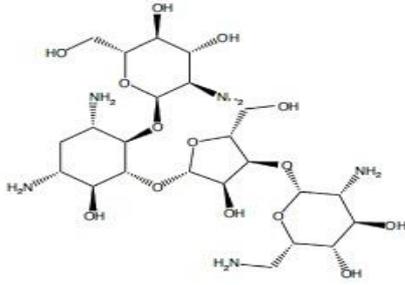
Primeiramente conhecida como aminosidina, a paromomicina (**Figura 12**) é um antibiótico aminoglicosídeo que também tem atividade antileishmanial e é produzido pelo *Streptomyces rimosus*. A atividade leishmanicida foi descoberta na década de 1960, porém o fármaco permaneceu ignorado por um período, sendo registrada para o tratamento da leishmaniose apenas em agosto de 2006, na Índia (CHAPPUIS et al., 2007). O seu uso como pomadas e injeções intramusculares vem sendo utilizado de forma eficaz contra a LT e LV, respectivamente, além disso, é um fármaco que está sendo utilizado em combinações com outros tratamentos (FERNÁNDEZ et al., 2011).

Acredita-se que a paromomicina tem como alvo os ribossomos de *Leishmania*, Julga-se que este fármaco inibe a síntese de proteínas e dessa forma, produz redução da taxa de proliferação do parasita (FERNÁNDEZ et al., 2011).

Em um estudo realizado por SUNDAR et al., (2007), mostraram que na Índia, em ensaios clínicos de fase III a paromomicina (11mg / kg / dia, intramuscularmente, por 20 dias consecutivos) não é menos eficaz à anfotericina B (1mg / kg / dia, por via intravenosa, por 30 dias consecutivos) para o tratamento da LV. Apesar de ser potencialmente nefrotóxica, podendo causar surdez irreversível, os pacientes que receberam paromomicina neste estudo, não apresentaram nefrotoxicidade, e dano reversível ao ouvido interno foi encontrado em 2% dos pacientes.

O fármaco tem maior utilização por via intramuscular, alcançando seu pico de concentração sérica em até 90 minutos. E mesmo sendo largamente distribuído para os fluidos periféricos e ser ativo na LT, é mais utilizado para a LV, porém o seu uso apresenta uma predisposição para causar resistência, o que justifica a associação com outros fármacos leishmanicidas, como estibogluconato de sódio ou anfotericina B, proporcionando resultados bastante aceitáveis (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

Figura 12- Estrutura química da paramomicina



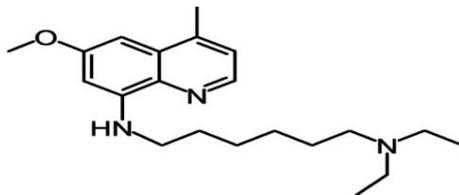
Fonte: Adaptado de ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017.

2.6.6 Sitamaquina

A sitamaquina é uma 8-aminoquinolina (**Figura 13**), um fármaco ativo alternativo para o tratamento de LV, e se encontra em ensaios clínicos de fase II, sua futura aplicação resultará em um grande impacto para o tratamento desta doença. Possui uma rápida acumulação no citoplasma dos parasitos *Leishmania* através de difusão e da possível ação de um transportador de membrana num processo facilitado por fosfolípidos aniônicos e independente de energia ou esteróis (COIMBRA et al., 2010). Apontou-se que esse fármaco inibe de forma dose-dependente a enzima mitocondrial succinato desidrogenase, que pertence ao complexo 2 da cadeia respiratória, e com os baixos níveis de ATP e a formação de radicais livres ocorre a morte do parasito por a apoptose (CARVALHO et al., 2011).

Estudos revelaram que o tratamento por via oral durante 28 dias ocasionou uma cura de mais de 80% dos pacientes com LV e poucos efeitos adversos, como toxicidade renal que nas maiores das doses testadas foram apresentados (WASUNNA et al., 2005).

Figura 13- Estrutura química da Sitamaquina



Fonte: Adaptado de COIMBRA et al., 2010.

2.6.7 Terapia combinada

O aumento da resistência do parasito aos fármacos leishmanicidas propõe o uso de terapia combinada. Essas associações almejam diminuição e prevenção do risco de resistência do parasito através de diferentes alvos farmacológicos e farmacocinéticos que os diferentes fármacos possuem, proporcionando uma maior eficácia resultante de efeitos sinérgicos, além da possibilidade da diminuição de dosagens, consequentemente aumentando a tolerância aos efeitos tóxicos dos fármacos. (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013). Outra razão importante para o uso da terapia combinada é a meia-vida dos fármacos utilizados. Acredita-se que o melhor método é usar um fármaco muito potente com uma meia-vida curta em conjunto com um segundo medicamento com uma meia-vida estendida para eliminar os parasitos resistentes, porém, outras condições como, volume de distribuição, distribuição tecidual e incorporação de fármacos macrofágicos também exercem uma grande importância na eficácia do tratamento, especialmente no caso de amastigotas intracelulares de *leishmania* localizadas nos órgãos do sistema reticuloendotelial (SINGH et al., 2016)

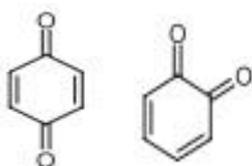
No decorrer dos anos, vários estudos em fase clínica têm certificado resultados satisfatórios utilizando terapias de combinação. No sul do Sudão, pacientes com LV apresentaram melhores índices de cura inicial e melhor prognóstico quando tratados com a associação de estibogluconato de sódio e paramomicina do que apenas com estibogluconato de sódio (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). Outras combinações incluindo fármacos com menor toxicidade, como a anfotericina B lipossomal, paramomicina e/ou miltefosina têm se mostrado eficazes, e recentemente foram incluídas nas recomendações da OMS para o subcontinente indiano. (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). Assim como Mesquita e colaboradores (2014) demonstraram em experimentais resultados promitentes, com o uso de fármacos leishmanicidas habituais com outras possíveis associações, como nitazoxanida.

No presente procura-se um tratamento específico para as leishmanioses que possua efetividade, menor efeito tóxico e consequentemente maior segurança. Neste contexto, as estratégias de associação surgem como uma alternativa que requer mais estudos, e uma necessária aplicação expandida para se obter mais respostas e resultados esperados (TRINCONI et al., 2014; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

3. DERIVADOS 1,4 NAFTOQUINONAS

As quinonas são um grupo de substâncias orgânicas geralmente coloridas e semivoláteis, bastante presentes na natureza e pertencentes à classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos oxigenados (HPAO). A estrutura das quinonas (**Figura 14**) exibe dois grupamentos carbonilas em um anel insaturado de seis átomos de carbono, situados nas posições "orto" ou "para". Elas são classificadas como benzoquinonas, naftoquinonas (NQ), antraquinonas e fenantraquinonas a depender do tipo de seu sistema aromático, (SOUZA; LOPES; ANDRADE, 2016).

Figura 14- Estrutura química da Quinona em posição para- e orto-



Fonte: adaptado de SOUZA; LOPES; ANDRADE, 2016

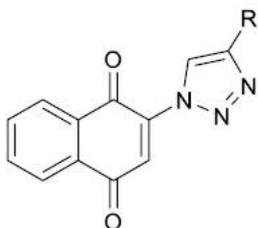
Moléculas dessa classe interagem com sistemas biológicos principalmente mediante dois mecanismos: 1) podem reagir com agentes de transferência de elétrons, como o NADPH, um agente redutor de oxigênio, gerando ROS como superóxido ou peróxido de hidrogênio, e assim aumentar o estresse oxidativo. 2) podem reagir como eletrófilos, formando ligações covalentes com grupos funcionais nucleofílicos em moléculas biológicas, como proteínas, alterando assim seu funcionamento (KUMAGAI et al., 2012).

NQs são substâncias naturais encontradas em diferentes Famílias de plantas, incluindo Bignoniaceae e Verbanaceae (SILVA et al., 2013). São compostos com propriedades que facilitam sua sintetização (DA SILVA et al., 2010) e dessa forma, a síntese de numerosas outras substâncias com potenciais atividades farmacológicas podem ser realizadas, contribuindo para o desenvolvimento de medicamentos candidatos contra vários tipos de doenças (CASTRO et al., 2013).

A molécula 1,4-NQ é um derivado orgânico do naftaleno que é a base de uma classe química amplamente distribuída da família das quinonas. Muitos compostos com metades de

1,4-NQ foram definidos para desencadear atividades biológicas, incluindo atividades anti-inflamatórias, anticâncer e antibacterianas (IM et al., 2010), Além disso, também já foi demonstrada sua atividade leishmanicida (ARAUJO et al. 2014). Estudos mostraram atividade anti-tuberculose (KUMAR et al.,2011), antiviral (XIA et al.,2007), antitumoral (WELLINGTON, 2015) e antifúngico (SANGSHETTI, 2009) para o grupamento 1,2,3 triazol. A **Figura 15** mostra o híbrido triazol -1,4-naftoquinona.

Figura 15- Estrutura química do triazol-1,4-naftoquinona



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2017.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar a atividade citotóxica e leishmanicida *in vitro* dos derivados 2-amino-alkil-1,2,3-triazol-1,4-naftoquinonas, visando a descoberta de novos candidatos a protótipos de fármacos leishmanicida.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar o potencial citotóxico dos derivados 2-amino-alkil-1,2,3-triazol-1,4-naftoquinonas para a célula hospedeira de *Leishmania* (macrófagos da linhagem J774.A1);
- Avaliar os perfis “drug-score” e “drug-likeness” no programa OSIRIS®.
- Investigar a atividade dos derivados 2-amino-alkil-1,2,3-triazol-1,4-naftoquinonas sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* em ensaio *in vitro*.
- Determinar o Índice de seletividade dos derivados 2-amino-alkil-1,2,3-triazol-1,4-naftoquinonas para macrófagos x parasitos.

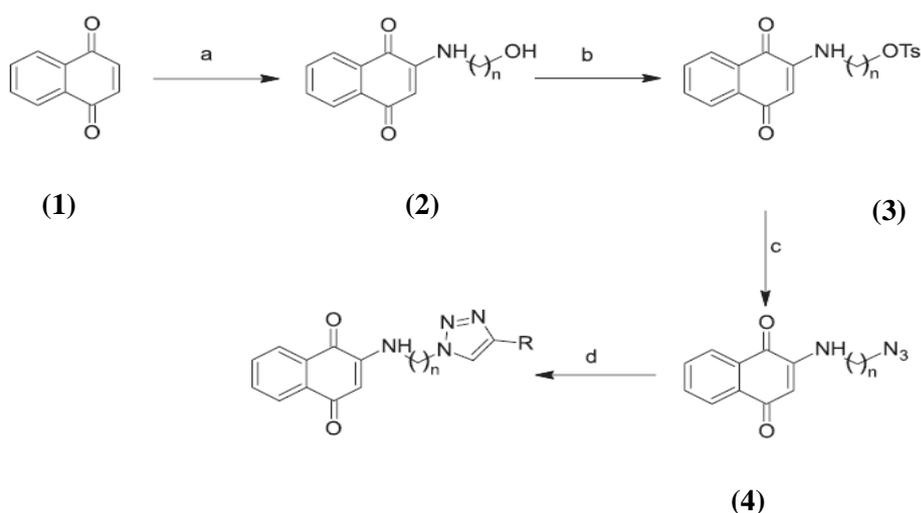
5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção dos derivados triazol-amino-quinona

Os derivados foram sintetizados e caracterizados pelo Prof. Dr. Celso de Amorim Câmara do Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos (LSCB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

A síntese dos derivados foi realizada em 4 etapas (**Figura 16**), tendo como ponto de partida a reação entre 1,4-NQ (**1**) e aminoálcoois, utilizando acetonitrila como solvente. Em seguida os derivado de alcool foram tosilados (**2**) utilizando cloreto de tossila e trietilamina em diclorometano. Depois, os derivados tosilados foram submetidos a reação de substituição nucleofílica bimolecular (SN₂) (**3**) com azida de sódio em dimetilsulfóxido como solvente. Posteriormente, foi desenvolvida uma nova rota sintética por “click chemistry” para obtenção de novos compostos aminoalquil-triazóis-naftoquinônicos através das reações de clicoadição 1,3-dipolar na presença de iodeto de cobre, trietilamina e dimetilsulfóxido como solvente (**4**) (OLIVEIRA et al., 2017).

Figura16 . Síntese dos derivados triazol-amino-quinona sintetizados a partir de 1,4-NQ

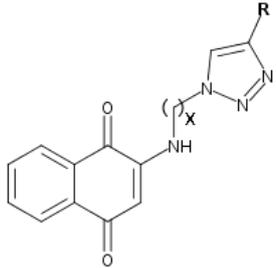
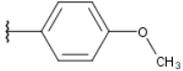
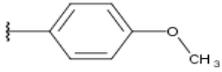
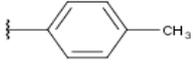


Reagentes e condições: (a) ethanolamine, MeCN, r.t., 3 h (67-73%); (b) TsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, r.t., 5 h (68-81%); (c) NaN₃, DMSO, 50 °C, 10 min; (d) RC≡CH, CuI, Et₃N, DMSO, r.t., 2-5 h (70-96%).

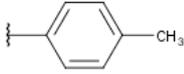
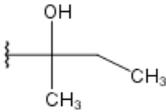
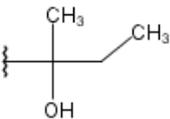
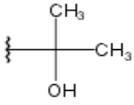
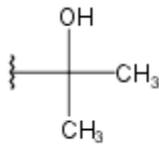
Fonte: Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2017.

Para realização dos experimentos, 14 (quatorze) substâncias derivadas de triazol-amino-quinona com diferentes substituições (**Tabela 1**) foram cedidos para o Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) para realização dos ensaios biológicos.

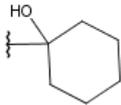
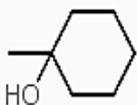
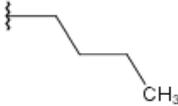
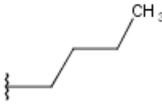
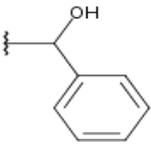
Tabela 1. Estruturas químicas dos derivados triazol-amino-quinona

Compostos	Estrutura química (X=; R=)
Estrutura básica	
LSCB 84	<p>X=2; R=</p>  <p>C₂₁H₁₈N₄O₃</p>
LSCB 96	<p>X=3; R=</p>  <p>C₂₂H₂₀N₄O₃</p>
LSCB 85	<p>X=2; R=</p>  <p>C₂₁H₁₈N₄O₂</p>

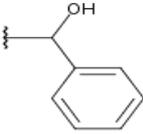
Continua

LSCB 97	<p>X=3; R=</p>  <p>$C_{22}H_{20}N_4O_2$</p>
LSCB 89	<p>X=2; R=</p>  <p>$C_{18}H_{20}N_4O_3$</p>
LSCB 101	<p>X=3; R=</p>  <p>$C_{19}H_{22}N_4O_3$</p>
LSCB 87	<p>X=2; R=</p>  <p>$C_{17}H_{18}N_4O_3$</p>
LSCB 99	<p>X=3; R=</p>  <p>$C_{18}H_{20}N_4O_3$</p>

Continua

LSCB 88	<p>X=2; R=</p>  <p>$C_{20}H_{22}N_4O_3$</p>
LSCB 100	<p>X=3; R=</p>  <p>$C_{21}H_{24}N_4O_3$</p>
LSCB 93	<p>X=2; R=</p>  <p>$C_{18}H_{20}N_4O_2$</p>
LSCB 104	<p>X=3; R=</p>  <p>$C_{19}H_{22}N_4O_2$</p>
LSCB 109	<p>X=2; R=</p>  <p>$C_{21}H_{18}N_4O_3$</p>

Continua

LSCB 107	<p>X=3; R=</p>  <p>C₂₂H₂₀N₄O₃</p>
----------	--

Fonte: Programa Marvin Suite.

5.2 Preparação das amostras

Os derivados foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) 100%, esterilizados em filtro (0,22 μm) e aliqüotadas à uma concentração de 100 mM para composição das soluções estoque, que foram armazenadas em ambiente estéril, congelado e protegido da luz até a realização dos experimentos farmacológicos *in vitro*.

5.3 Manutenção das células

5.3.1 Culturas de *Leishmania*

Culturas de promastigotas de *L. chagasi* (MCAN/BR/89/BA262) foram cedidas pela Dra. Valéria de Matos Borges do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz-BA e de *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) foram cedidas pelo Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz - RJ. As formas promastigotas dos parasitos foram mantidas *in vitro* em meio Schneider's (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 2mM de L-glutamina e 2% de urina humana masculina estéril, em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) a 27 °C. No momento do uso, os parasitos foram colocados em tubos tipo Falcon e centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos em temperatura ambiente (25°C). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspenso em meio Schneider. Posteriormente foi realizada a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, para posterior plaqueamento e realização dos experimentos.

5.3.2 Culturas de macrófagos

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em garrafas de cultura contendo 10 mL de meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, aminoácidos não essenciais e piruvato e mantidos em estufa a 37°C com 95% de umidade e 5% CO₂. Ao ser utilizada, as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado, e em seguida plaqueadas.

5.4 Ensaio *in vitro*

5.4.1 Determinação da viabilidade celular

Com a finalidade de investigar a citotoxicidade dos compostos em estudo, primeiramente foi realizado o ensaio de viabilidade celular em macrófagos da linhagem J774.A1. Esse ensaio determina a atividade metabólica das células através da quantificação de produtos da redução do MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), promovida por enzimas mitocondriais como a succinato desidrogenase a partir de NADPH e NADH. A atividade ocorre através da redução do sal de tetrazólio, de cor amarela e solúvel em água, pelo sistema desidrogenase quando as células estão metabolicamente ativas (vivas) para formazan, de cor roxa insolúveis em água. A concentração de cristais de formazan é quantificada a partir de espectrofotômetro, resultante da quantidade de células viáveis e metabolicamente ativas, que são capazes de converter o sal de tetrazólio a formazan (KARAKAS; ARI; ULUKAYA, 2017; ARAUJO et al., 2017).

A partir do descrito, macrófagos da linhagem J774.A1 foram plaqueados em placas de 96 poços (1x10⁵ células/poço) e expostos aos compostos e a pentamidina (Sal Isotianato de Pentamidina) fármaco padrão, (Sigma Aldrich P0547) em concentrações de 0,1; 1,0; 10 e 100 µM por 48 horas em estufa a 37°C com 95% de umidade e 5% de CO₂. Os poços controles eram incluídos de células cultivadas somente em meio de cultura ou células cultivadas na presença do veículo dos derivados com concentração máxima de 0,1% (DMSO 0,1%). Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 100 µL da solução de MTT (0,5mg/mL). As placas foram novamente incubadas por um período de 1 hora em estufa, posteriormente foi retirado o sobrenadante, adicionado 100 µL de DMSO PA e realizada a leitura em espectrofotômetro (Thermo Plate) a 550nm. A viabilidade celular das culturas

tratadas com os derivados foi comparada ao padrão de morte nas culturas controle a partir dos valores de absorbância obtidos após a leitura.

5.4.2 Ensaio de viabilidade de promastigotas

Promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram cultivadas numa concentração de 1×10^6 parasitos/poço e volume de 100 μL /poço em placa de 96 poços com meio Schneider suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina e 2% de urina humana. Foram adicionadas em triplicatas diferentes concentrações (0,1; 1; 10 e 100 μM) dos quatorze derivados e da pentamidina, (fármaco padrão) aos poços contendo as formas promastigotas até a obtenção do volume final de 200 μL . A placa foi incubada em estufa DBO a 27°C por 48 horas. Após esse período, os parasitos de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram homogeneizados e o número de parasitos foi determinado utilizando câmara de Neubauer e microscopia óptica em aumento de 400x (Nikon Eclipse Ci) (TIUMAN et al., 2005).

5.5 Análise estatística

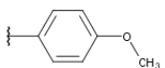
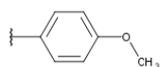
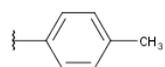
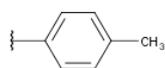
Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram verificados por Análise de Variância (One-Way ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett no programa GraphPad Prisma® 5.01 e os valores foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao diluente dos derivados DMSO 0,01%. As comparações foram realizadas considerando experimentos em triplicatas, e com um intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

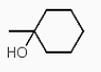
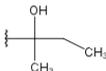
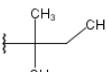
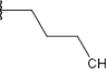
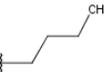
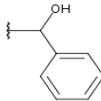
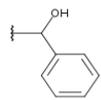
Inicialmente foi avaliada a citotoxicidade dos derivados bem como do fármaco padrão, pentamidina e observou-se citotoxicidade máxima de 100% na maior concentração testada. Além disso, foi possível calcular a concentração que inibe 50% da resposta (CI_{50}) do fármaco padrão ($CI_{50}=3,4 \pm 0,8Mm$).

Conforme os resultados apresentados (**Tabela 2**), os derivados analisados, apresentaram citotoxicidade de $43 \pm 1,6\%$, $43,7 \pm 2,9\%$, $53,1 \pm 2\%$, $46,2 \pm 2\%$, $40,3 \pm 4,1\%$, $46,6 \pm 3,1\%$, $51,8 \pm 3,12\%$, $38,3 \pm 3,4\%$, $36,7 \pm 1,3\%$ na concentração máxima testada ($100 \mu M$) para os derivados, LSCB 87, LSCB 88, LSCB 89, LSCB 93, LSCB 99, LSCB 100, LSCB 101, LSCB 107 e LSCB 109, respectivamente. Os derivados LSCB 84, LSCB 85, LSCB 96, LSCB 97 e LSCB 104 não apresentaram efeito deletério para a célula hospedeira, nas concentrações testadas, da mesma maneira que o veículo empregado para solubilizar todas os derivados (DMSO 0,1%) quando comparado com as células cultivadas apenas em meio de cultura. Logo, a toxicidade dos derivados não pode ser atribuída à presença de DMSO na cultura.

Tabela 2- Determinação da citotoxicidade dos derivados triazol-amino-quinona.

Tratamento	CI_{50} (μM) ^a	Citotoxicidade máxima (%) ^b
Pentamidina	$3,4 \pm 0,8$	$100,0 \pm 0,0^{***}$
LSCB 84 	>100	NT
LSCB 96 	>100	NT
LSCB 85 	>100	NT
LSCB 97 	>100	NT

Continua

<p>LSCB 87</p> 	>100	$43,0 \pm 1,6^{**}$
<p>LSCB 99</p> 	>100	$40,3 \pm 4,1^{**}$
<p>LSCB 88</p> 	>100	$43,7 \pm 2,9^{**}$
<p>LSCB 100</p> 	>100	$46,6 \pm 3,1^{**}$
<p>LSCB 89</p> 	$93,7 \pm 1,8$	$53,1 \pm 2^{**}$
<p>LSCB 101</p> 	$93,7 \pm 2,3$	$51,8 \pm 3,1^{**}$
<p>LSCB 93</p> 	>100	$46,2 \pm 2^{**}$
<p>LSCB 104</p> 	>100	NT
<p>LSCB 109</p> 	>100	$36,7 \pm 1,3^{**}$
<p>LSCB 107</p> 	>100	$38,3 \pm 3,4^{**}$

NT: Não tóxica à célula até a concentração de 100 mM comparada ao grupo DMSO.

^a Concentração Inibitória (CI_{50}) calculada por curvas de concentração-resposta tóxicas.

^b A citotoxicidade máxima expressa como média \pm erro padrão da média máxima de toxicidade de triplicatas de um experimento representativo. Os valores de citotoxicidade foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo DMSO.

Os derivados triazol-amino-quinona possuem o grupamento triazol ligado ao núcleo 1,4-naftoquinônico através de uma amina secundária e uma cadeia de hidrocarbonetos. Em conjunto com o núcleo 1,2,3-triazol a 1,4-NQ aparece como um importante farmacóforo, e este tipo de composto recebeu bastante atenção, considerando a sua diversas atividades (DA SILVA et al, 2012). Ainda de acordo com a com tabela 2 os derivados que não apresentaram efeito deletério à célula (LSCB 84, LSCB 85, LSCB 96, LDCB 97 e LSCB 104) exibem em suas estruturas 2 (LSCB 84 e LSCB 85) ou 3 (LSCB 96, 97 e 104) unidades de CH₂ na cadeia de hidrocarbonetos ligando o grupamento triazol ao núcleo 1,4 NQ. Dessa forma, aparentemente, a quantidade de carbono não parece interferir na toxicidade dos derivados em estudo. Curiosamente o derivado LSCB 93 apresentou toxicidade, a despeito de possuir requisitos estruturais semelhantes ao seu análogo LSCB 104. Este efeito pode ser decorrente da disposição espacial e conseqüentemente uma conformação diferente a qual pode alterar a interação com alvos específicos, por exemplo ao que está relacionado com a toxicidade.

Um outro importante fator observado foi a presença do grupamento hidroxila em todas as moléculas que apresentam toxicidade, com exceção do LSCB 93. Assim sendo, a presença do grupamento hidroxila pareceu promover toxicidade aos macrófagos.

Quando comparamos os derivados em estudo com o fármaco padrão, todos os derivados apresentaram menor toxicidade. A pentamidina apresentou CI₅₀ de 3,4± 0,8 µM e até a concentração máxima testada foi capaz de produzir a citotoxicidade máxima (100% de morte celular). Foi possível ainda calcular a CI₅₀ de dois derivados, entretanto a CI₅₀ observada foi aproximadamente 30x maior (CI₅₀ de 93,7±1,8 µM para LSCB 89 e 93,7± 2,3 µM para LSCB 101). Já para os demais derivados não foi possível calcular a IC₅₀, pois até a concentração máxima testada não provoca efeitos citotóxicos superior a 55%.

Um outro parâmetro avaliado foi a análise da “drug-likeness”, “drug-score”, assim como o risco de toxicidade (tumorigenicidade, efeitos irritantes e reprodutivos), através da análise *in silico* utilizando o Programa OSIRIS®.

Ao avaliar os derivados sob o parâmetro “druglikeness” (**Figura 17A**), foi possível observar que todos apresentaram valores negativos assim como os fármacos pentamidina e anfotericina B. O programa OSIRIS® calcula este parâmetro com base em uma lista de 5300 fragmentos de subestrutura distintas criada a partir de 3300 medicamentos comercializados e 15.000 produtos químicos disponíveis comercialmente, produzindo uma lista completa de todos

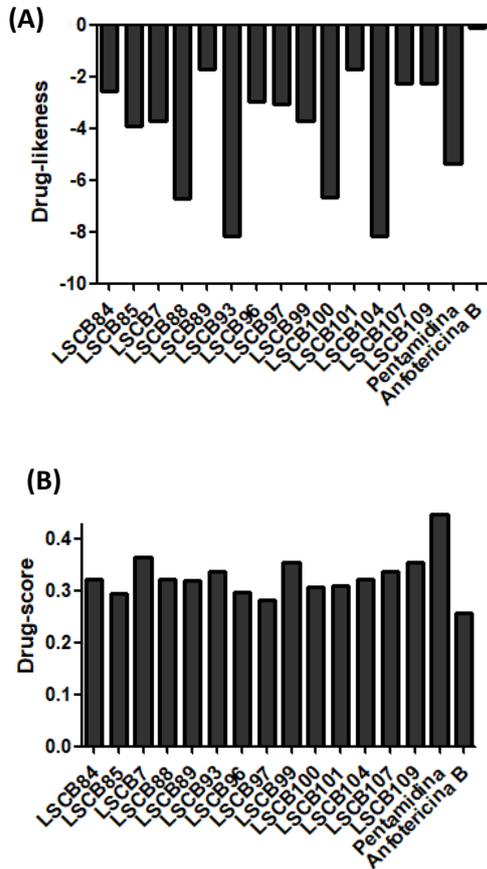
os fragmentos disponíveis associada a drug-likeness. Este parâmetro sugere que um valor positivo indica que o composto apresenta grupamentos químicos que estão frequentemente presentes em fármacos existentes no mercado. Curiosamente o grupamento presente no fármaco padrão pentamidina a despeito de estar disponível no mercado apresenta grupamentos tóxicos. Apesar de toda toxicidade essa molécula ainda é comercializada pelo simples fato de trata-se de uma doença negligenciada. Dito isso, esse parâmetro não deve ser avaliado isoladamente ainda que cerca de 80% dos medicamentos têm um valor de semelhança positivo, a grande maioria dos produtos químicos comercializados é responsável pelos valores negativos.

Os valores de “drug-score” (**Figura 17B**) combinam a soma de todas as características dos derivados em relação ao “drug-likeness”, solubilidade (quantidade máxima que uma substância pode dissolver-se em um líquido), peso molecular (soma dos pesos atômicos dos átomos [elementos] que constituem o composto) e cLogP (medida quantitativa da lipofilicidade de compostos bioativos) em um único valor que pode ser usado para avaliar o potencial geral do composto candidato a protótipo de fármaco. Segundo a avaliação do programa, pelos critérios estabelecidos, quanto mais próximo o índice de 1 maior será a probabilidade de um determinado composto se tornar um fármaco. Neste parâmetro todos os derivados apresentaram valores próximos ao fármaco padrão pentamidina e anfotericina B, corroborando dados da literatura que NQ apresentam inúmeras atividades entretando na maioria dos sistemas apresenta também relativa toxicidade, mas para doenças como as leishmanioses que oferecem riscos em nível mundial, a análise farmacológica de derivados inicialmente tóxicos é validada pela ideia de que é possível realizar modificações estruturais a fim de reduzir essa toxicidade. Este é o desafio da química medicinal.

Confrontando os resultados dos derivados com os fármacos pentamidina e anfotericina B perante a avaliação de risco de toxicidade (**Figura 18**), estes apresentaram baixo risco de toxicidade relacionada a tumorigenicidade, efeitos irritantes e reprodutivos. A toxicidade foi calculada com base em fragmentos ativos nas moléculas, no entanto essa toxicidade prevista pelo programa, não pode ser considerada totalmente confiável, nem significa que os derivados estejam totalmente livres de efeitos tóxicos, porém os dados reforçam os perfis promissores dos derivados testados somados a outros resultados como por exemplo o ensaio de MTT.

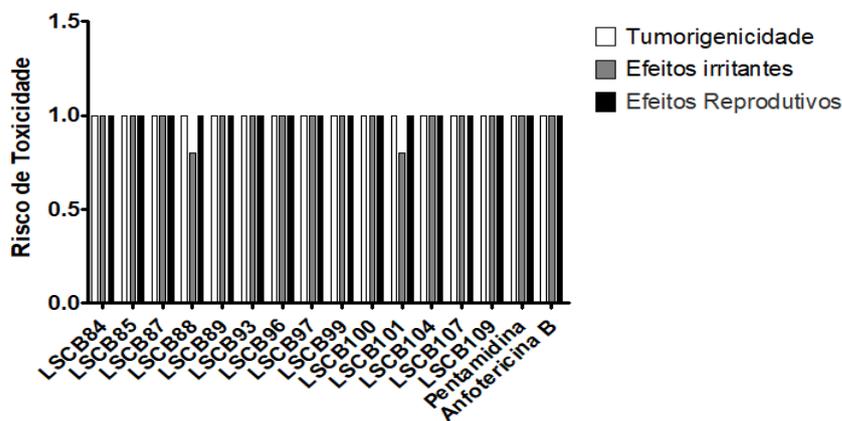
Essa etapa de avaliação teórica na fase pré-clínica inicial é importante, uma vez que é possível nesse primeiro momento traçar um perfil dos compostos, direcionando os investimentos em estudos aos protótipos mais promissores (DAVIS; RILEY, 2004).

Figura 17- Comparação *in silico* dos perfis “druglikeness” (A) e “drug-score” (B) para os derivados triazol-amino-quinona, pentamidina e anfotericina.



Fonte: Autora, 2019.

Figura 18- Risco de toxicidade (efeitos tumorigênicos, irritantes e reprodutivos) para derivados triazol-amino-quinona, pentamidina e anfotericina B.

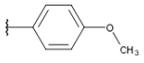
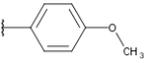
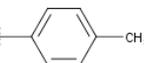
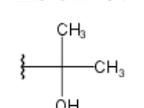
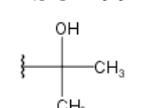
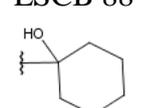
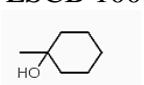
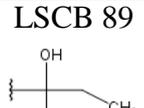
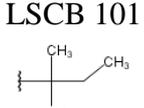
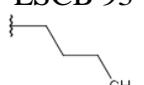


Fonte: Autora, 2019.

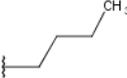
As atividades biológicas descritas na literatura para os compostos com estrutura de quinona são inúmeras, como potencial antimicrobiano (CARDOSO et al.,2010), agentes antitumorais (HERNÁNDEZ, 2016), mas é de grande importância a sua atividade contra os protozoários. A literatura expõe que derivados de quinonas investigados contra o *Trypanosoma cruzi* mostraram-se mais potentes contra tripomastigotas do que o medicamento padrão benzonidazol (JARDIM et al., 2015). Do mesmo modo há relatos de que os derivados de naftoquinonas exibiram atividade leishmanicida pronunciada em *L. amazonensis* e *L. chagasi* (ARAUJO et al. 2017). Nossos resultados corroboram com os achados da literatura.

Após a avaliação da citotoxicidade, determinamos o potencial leishmanicida *in vitro* dos derivados 2-amino-alkil-1,2,3-triazol-1,4-NQs contra formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonenses*. Em detalhe, foram investigados o efeito máximo e a potência por meio da determinação da CI_{50} dos derivados e do fármaco padrão.

Tabela 3. Efeito leishmanicida dos derivados triazol-amino-quinona em cultura de promastigotas de *L.chagasi*

Tratamento	CI ₅₀ (μM)	Efeito máximo (%)
Pentamidina	0,4 ± 0,1	100,0 ± 0***
LSCB 84 	8,4 ± 0,8	97,4 ± 4,4***
LSCB 96 	<0,1	65,4 ± 3,8**
LSCB 85 	0,6 ± 0,1	87,2 ± 2,2***
LSCB 97 	> 100	NA
LSCB 87 	0,7 ± 0,06	99,1 ± 1,5***
LSCB 99 	0,3 ± 0,1	80,9 ± 9,2***
LSCB 88 	8,0 ± 0,8	94,9 ± 2,2***
LSCB 100 	>100	NA
LSCB 89 	55,7 ± 0,3	97,7 ± 1,9**
LSCB 101 	<0,1	75,0 ± 5,1**
LSCB 93 	0,8 ± 0,03	91,7 ± 4,7***

Continua

LSCB 104 	>100	42,6 ± 4,4*
LSCB 109 	8,4 ± 1,1	87,1 ± 4,7***
LSCB 107 	8,1 ± 0,6	88,6 ± 2,3***

Efeito máximo expresso como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Diferenças com * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.01$ foram consideradas significativas em relação ao grupo DMSO 0.1%. CI_{50} é a concentração necessária para alcançar 50% de inibição; NA: compostos não foram ativos na faixa de concentração testada

Os resultados obtidos através da avaliação da atividade em promastigostas de *L. chagasi* revelaram que a pentamidina induziu um efeito máximo de 100% e uma CI_{50} de $0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$. Entre os compostos analisados, apenas os derivados LSCB 97 e LCSB 100 não apresentaram efeito estatisticamente significante nas concentrações testadas.

É importante observar que as quatorze substâncias apresentam-se em pares semelhantes, com diferença na disposição espacial (sua conformação) e pela presença de duas ou três unidades de CH_2 na cadeia de hidrocarbonetos, que liga o grupamento triazol ao núcleo 1,4-naftoquinônico. São compostos análogos: LSCB 84 e LSCB 96, LSCB 85 e LSCB 97, LSCB 93 e LSCB 104, LSCB 89 e LSCB 101, LSCB 87 e LSCB 99, LSCB 88 e LSCB 100, LSCB 107 e LSCB 109.

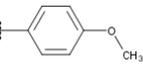
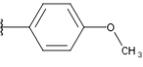
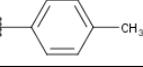
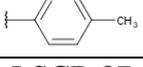
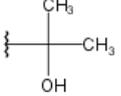
Os derivados LSCB 84, LSCB 85, LSCB 93 e LSCB 88 exibiram uma maior atividade leishmanicida que seus análogos estruturais, pois apresentam duas unidades de CH_2 na cadeia de hidrocarboneto, enquanto seus análogos apresentam uma unidade a mais. Desta forma, um número a menos de carbono e a diferente conformação entre os análogos, pareceu aumentar a eficácia desses derivados. De acordo com FERREIRA et al., (2018) por tratarem-se de ligações simples entre esses carbonos, os grupamentos podem adquirir diferentes conformações dependendo do número de carbonos na cadeia. Por exemplo, pode-se imaginar um grupamento assumindo uma conformação diferente em uma dada molécula quando ligado ora um número

ímpar ora um número par de carbonos, assim esse grupamento pode interagir ou não com um receptor.

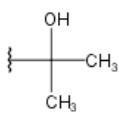
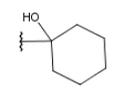
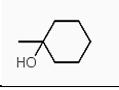
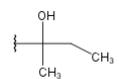
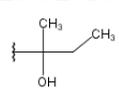
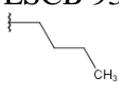
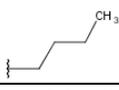
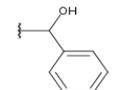
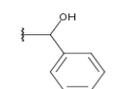
Os derivados LSCB 87 e LSCB 99 apresentaram uma eficácia de $99,1 \pm 1,5\%$ e $80,9 \pm 9,2\%$ respectivamente, com CI_{50} de $0,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$ e $0,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$. Nestes derivados a disposição espacial e o número de carbono parece não serem relevantes para eficácia contra as formas promastigotas *L.chagasi*, mostrando uma boa atividade em ambas. O mesmo podemos observar para os derivados LSCB 107 e 109 que apresentaram eficácia de $88,6 \pm 2,3\%$ (com CI_{50} de $8,1 \pm 0,6 \mu\text{M}$) e $87,1 \pm 4,7\%$ (com CI_{50} de $8,4 \pm 1,1 \mu\text{M}$) respectivamente.

Na avaliação da atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* (**Tabela 4**) a pentamidina mostrou-se 100,0% eficaz com CI_{50} de $1,1 \pm 0,43 \mu\text{M}$. Apenas os derivados LSCB 97 e LSCB 104 não apresentaram efetividade contra essas formas.

Tabela 4. Efeito leishmanicida dos derivados triazol-amino-quinona em cultura de promastigotas de *L.amazonensis*.

Tratamento	CI_{50} (μM)	Efeito máximo (%)
Pentamidina	$1,1 \pm 0,43$	$100 \pm 0,0^{***}$
LSCB 84 	$32,09 \pm 18,25$	$83,13 \pm 6,22^{***}$
LSCB 96 	>100	$33,73 \pm 6,06^{***}$
LSCB 85 	$62,4 \pm 11,95$	$77,10 \pm 8,23^{***}$
LSCB 97 	>100	N.A
LSCB 87 	>100	$57,83 \pm 9,93^{***}$

Continua

LSCB 99 	>100	38,0± 10,06***
LSCB 88 	>100	48,91± 15,46***
LSCB 100 	>100	44,0±9,23***
LSCB 89 	>100	68,19± 11,09***
LSCB 101 	31,5± 9,19	42,85± 3,44***
LSCB 93 	>100	93,97± 6,06***
LSCB 104 	>100	NA
LSCB 109 	60,83±16,28	64,76 ± 4,79***
LSCB 107 	>100	42,85±3,11***

Efeito máximo expresso como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Diferenças com *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.01 foram consideradas significativas em relação ao grupo DMSO 0.1%. CI₅₀ é a concentração necessária para alcançar 50% de inibição; NA: compostos não foram ativos na faixa de concentração testada.

De uma maneira geral ao comparar os pares semelhantes dos derivados contra as formas promastigotas da *L. amazonenses*, pode-se observar que os derivados que apresentam em sua estrutura dois átomos de carbono na cadeia de hidrocarboneto demonstraram uma atividade leishmanicida superior aos que possuem três átomos de carbono. Mostrando assim que as diferenças estruturais dos derivados podem acarretar em modificações em seu efeito.

Dentre os derivados que não induziram citotoxicidade em macrófagos, os derivados LSCB 84 e LSCB 85 mostraram atividade leishmanicida de $83,13 \pm 6,23\%$ (com CI_{50} de $32,09 \pm 18,25$) e $77,10 \pm 8,23\%$ (com CI_{50} de $62,4 \pm 11,95 \mu\text{M}$) respectivamente para *L. amazonensis*. Para a *L. chagasi* os mesmos (LSCB 84 e LSCB 85) apresentaram eficácia de $97,4 \pm 4,4\%$ (com CI_{50} de $8,4 \pm 0,8 \mu\text{M}$), $87,2 \pm 2,2\%$ (com CI_{50} de $0,6 \pm 0,1$) respectivamente.

Uma substância é considerada um protótipo promissor quando além de possuir a atividade biológica para a qual foi planejada, tenha essa atividade direcionada à célula/tecido alvo, tornando-se uma substância seletiva (FERREIRA et al., 2018). Uma forma de identificar essa seletividade é calculando o índice de seletividade (IS). O IS permite identificar o padrão de seletividade *in vitro* de uma substância em culturas de células diferentes, relacionando suas concentrações ativas. Determinar o IS também faz-se necessário para inferir a atividade sobre o sistema biológico ao organismo a ser tratado, para isso é importante determinar a citotoxicidade seletiva para microorganismos invasores, nesse caso a *leishmania*. Assim quanto mais tóxico para o parasito e menos tóxico para o macrófago maior a toxicidade seletiva. O cálculo de IS dos derivados foi realizado e seu resultado apresentada-se na **Tabela 6**. Esse índice é calculado através da razão entre as CI_{50} (frente a macrófagos) e a CI_{50} (frente a parasitos) de cada derivado, fornecendo assim um valor indicativo da possível seletividade dos derivados para o parasito.

Através do cálculo de IS (**Tabela 6**) foi possível observar que o fármaco padrão apresentou-se 3,09 vezes mais seletivo para *L. amazonensis* do que para os macrófagos e 8,4 vezes mais seletivos para *L. chagasi* que para os macrófagos.

Dentre os derivados testados, LSCB 109 apresentou seletividade possivelmente $>1,64$ para a *L. amazonensis*, quando comparada com macrófagos, como não foi possível calcular a CI_{50} dos macrófagos nessa substância o valor exato não foi determinado. A substância LSCB 89 exibiu valor $<0,94$ de seletividade para *L. amazonensis*.

O IS para *L. chagasi* em comparação aos macrófagos foi de provavelmente $>142,85$ para LSCB 87, $>12,5$ para LSCB 88, $>125,0$ para LSCB 93, $>333,33$ para LSCB 99, $>12,34$ para LSCB 107 e $>11,90$ para LSCB 109 como também não foi possível estabelecer a IC_{50} dos macrófagos até a concentração testada não foi possível calcular o valor exato do IS. A substância LSCB 89 apresentou seletividade de 1,68.

Tabela 5 - Índice de seletividade das dos derivados dos derivados triazol-amino-quinona para macrófagos x *L. amazonensis* e para macrófagos x *L. chagasi*.

Tratamento	¹ IS para <i>L. amazonensis</i>	¹ IS para <i>L. chagasi</i>
Pentamidina	3,09	8,5
LSCB 84	–	–
LSCB 85	–	–
LSCB 87	–	>142,85
LSCB 88	–	>12,5
LSCB 89	<0,94	1,68
LSCB 93	–	>125,0
LSCB 96	–	–
LSCB 97	–	–
LSCB 99	–	>333,33
LSCB 100	–	–
LSCB 101	–	–
LSCB 104	–	–
LSCB 107	–	>12,34
LSCB 109	>1,64	>11,90

Índice de Selectividade (IS) calculado a partir da razão dos valores de IC₅₀ de macrófagos e promastigotas. (-): A substância não tem um efeito deletério no macrófago ou *Leishmania*.

Os derivados parecem comportar-se de forma mais seletiva para *L. chagasi* do que para *L. amazonensis*, como por exemplo a substância LSCB 109 que apresentou possivelmente 11,90 vezes mais seletiva para a *L. chagasi*, enquanto para *L. amazonensis* apresentou ser 1,64 vezes mais seletiva.

Podemos dizer que uma substância é considerada ideal, nesse estudo, quando nas concentrações testadas, não apresentam toxicidade aos macrófagos, apresentam atividade

leishmanicida contra as espécies e quando essa atividade é apresentada em concentrações baixas e seletivas. Dentre as substâncias estudadas, as que reuniram um maior número de efeitos positivos foram as substâncias LSCB 84 e LSCB 85 que não apresentaram citotoxicidade aos macrófagos e efeito leishmanicida de $97,4 \pm 4,4\%$ (com CI_{50} de $8,4 \pm 0,8 \mu\text{M}$), $87,2 \pm 2,2\%$ (com CI_{50} de $0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$) para *L.chagasi* e um valor de $83,13 \pm 6,22\%$ (com CI_{50} de $32,09 \pm 18,25 \mu\text{M}$) e $77,10 \pm 8,23\%$ (com CI_{50} de $62,4 \pm 11,95 \mu\text{M}$) para *L. amazonensis* respectivamente.

7. CONCLUSÃO

Os derivados LSCB 84, LSCB 85, LSCB 96, LSCB 97 e LSCB 104 que não possuem o grupo hidroxila não induziram efeito tóxico em macrófagos nas concentrações testadas, deste modo, acredita-se na plausibilidade desta hipótese que o grupamento proporcionou a toxicidade dos derivados.

A avaliação *in silico* utilizando o Programa OSIRIS[®] demonstrou através dos parâmetros, que os derivados triazol-amino-quinona possuem valores próximos ao fármaco padrão pentamidina, de maneira que se esses parâmetros são toleráveis com a pentamidina provavelmente o serão para os derivados.

De acordo com os métodos utilizados nesse trabalho, verificou-se que os derivados LSCB 84 e LSCB 85, apresentaram melhores resultados, uma vez que demonstraram atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de ambas as espécies e não apresentaram citotoxicidade aos macrófagos.

Os derivados LSCB 87, LSCB 88, LSCB 93, LSCB 99, LSCB 107 e LSCB109 apresentaram maior eficácia e seletividade para as formas promastigotas da *L.chagasi*. Além disso, apresentaram toxicidade aos macrófagos inferiores ao fármaco padrão.

Observou-se que os derivados apresentam propriedades importantes e portanto, podem servir de modelo estrutural para o desenho de novos protótipos de fármacos leishmanicida. Nesse sentido, um melhor entendimento dos efeitos leishmanicidas desse derivados serão futuramente investigados sobre formas intracelulares de leishmania e determinação de seu mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

- ANVERSA L. et al., Amiodarone and itraconazole improve the activity of pentavalent antimonial in the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis. **Int. J. of Antimicrobial Agents**. V 50 159–165, 2017.
- ALAM, M.M., Leishmaniasis: a menace. **Int. J. Pharm. Biol. Arch**. v.8, 2017.
- ALCOLEA, P. J. et. al., Temperature Increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation In *Leishmania infantum*. **BMC Genomics**, v. 14, p. 11-31, 2010.
- ALVAR, J. et al., Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, p. e35671, 2012.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin. Exp. Dermatol**. v. 35, p. 699–705, 2010.
- ARAÚJO, M. V. et al. S. Synthesis, leishmanicidal activity and theoretical evaluations of a series of substituted bis-2 hydroxy-1,4-naphthoquinones. **Molecules**. V. 19(9):15180-95. 2014.
- ARAÚJO, M. V et al., Evaluation on the leishmanicidal activity of 2-N,N'-dialkylamino-1,4-naphthoquinone derivatives. **Exp Parasitol**. 176:46-51. 2017.
- BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sandflies. **Int. J. Parasitol**, v. 37 (10), p. 1097-106, 2007.
- BASSELIN, M.; DENISE, H.; COOMBS, G. H.; BARRETT, M. P. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. **Antimicro. Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 3731-38. 2002.
- BERMAN, J. D.; WADDELL, D.; HANSON, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicro. Agents and Chemotherapy**, v. 27, n. 6, p. 916-920, 1985.
- BERMAN, J. D. Current treatment approaches to leishmaniasis. **Current Opinion in Infect. Diseases**, v.16, (5), p.397-401, 2003.
- BERMAN, J. Miltefosine to treat leishmaniasis. **Expert Opin Pharmacol**. v.6, (8) p.1381, 2005.
- BERMAN, J. Amphotericin B Formulations and Other Drugs for Visceral Leishmaniasis. **The American J. of Trop. Med. and Hygiene**. v 92(3):471-73. 2015.
- BHATTACHARYA P, ALI N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**. V.46 (2): 128-34. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Editora MS, 2ª Ed.at, 2016.

BRASIL. Ministério da saúde. Gabinete do ministro. **Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016**. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências.

CARDOSO, L. F. et al., Seasonal analysis from the antimicrobial potency and flavonoid and quinone content from *Aloe arborescens* Mill., Xanthorrhoeaceae, leaf extracts. **Rev. bras. farmacogn.** V.20, (1), 2010.

CARLSEN, E. D. et al., Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clinical & Experiment. Immunol.**, v. 182, (2), p. 109-118, 2015.

CARVALHO, L. et al. The 8 aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. **Antimicrob. Agents Chemother.**..v. 55(9):4204-10. 2011.

CASTRO, F. A. V.; MARIANI, D.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. A.; PEREIRA, D. Cytotoxicity Mechanism of Two Naphthoquinones (Menadione and Plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One** .v3, (12), 2013.

COIMBRA, E. S. et al., Mechanism of interaction of sitamaquine with *Leishmania donovani*. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 65(12):2548-55. 2010.

CORRALES, R.M.; SERENO, D.; MATHIEU-DAUDÉ, F. Deciphering the *Leishmania* exoproteome: what we know and what we can learn. **FEMS Immunol. Med. Microbiol**, v. 58, (1), p. 27-38, 2010.

COSTA FILHO, A.V.; LUCAS, I.C.; SAMPAIO, R.N. Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 41, n. 4, p. 424-427, 2008.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. **Nature Reviews Microbiol.**, v. 5, p. 873-882, 2007.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; DUCHÊNE, M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. **Mol. & Biochemical Parasit.** v. 126:165-172. 2003.

DA SILVA JÚNIOR, E.N., et al .The evaluation of quinonoid compounds against *Trypanosoma cruzi*: synthesis of imidazolic anthraquinones, nor-Î –lapachone derivatives and Î –lapachone-based 1,2,3-triazoles. **Bioorg. Med. Chem.** v.18, p.3224-3230, 2010.

- DA SILVA, M. F. L. et al. Leishmania amazonensis Arginase Compartmentalization in the Glycosome Is Important for Parasite Infectivity. **Plos one**. v. 7, n. 3, e34022, 2012.
- DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F.; LECCOUVEY, M.; GARNIER-SUILLEROT, A. Antimony (V) complex formation with adenosine nucleosides in aqueous solution. **Biochimic et Biophysica Acta**, v. 1570, n. 3, p.192-198, 2002.
- DIAZ, M. V. et al., R. Pentamidine exerts in vitro and in vivo anti Trypanosoma cruzi activity and inhibits the polyamine transport in Trypanosoma cruzi. **Acta Trop**. v 134:1-9. 2014.
- DORLO, T. P. C.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H.; VRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemother**. 67(11):2676-97. 2012.
- FERNÁNDEZ, M. M., et al. Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v. 55, n. 1, p.86–93, 2011.
- FERREIRA, L G.; OLIVA, G; ANDRICOPULO, A. D. From Medicinal Chemistry to Human Health: Current Approaches to Drug Discovery for Cancer and Neglected Tropical Diseases. **An. Acad. Bras. Ciênc**. Rio de Janeiro. 2018.
- GALLIGNANI, M. et al., Flow analysis-hydride generation-gas phase derivative molecular absorption spectrophotometric determination of antimony in oral homeopathic products (“*Antimonium Tartaricum*”) formulated under alcoholic medium. **Talanta**. v 68:365-373. 2005.
- GIL, E. S. et al., Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares Vita et Sanitas, Trindade/Go, v. 1, n . 01, 2007
- GUERRA, J.A. *et al.* Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS Negl. Trop. Dis**. v.5, e980, 2011.
- GLUENZ, E.; GINGER, M.L.; MCKEAN, P.G. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. **Curr Opin Microbiol**, v. 13(4), p. 473-479, 2010.
- HATAM, G. R.; BAHRAMI, S.; RAZAVI, S. M.; ORYAN, AHMAD. Isoenzyme and ultrastructural characterization of *Leishmania tropica* axenic amastigotes and promastigotes. **Parasitology Research**, v. 112, p. 643-648, 2013.
- HENDRICKX, S. et al., Evaluating drug resistance in visceral leishmaniasis: the challenges. **Parasitology**. V. 145, 453–463. 2016.
- HERNÁNDEZ, C. I., et al., Cytotoxicity in vitro and potential of quinoid compounds as antitumor agents. **Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter** v.32 (1), 2016.
- HIRVE S. et al. Transmission Dynamics of Visceral Leishmaniasis in the Indian Subcontinent - A Systematic Literature Review. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 10(8): e0004896, 2016.

HUSSAIN, R. F.; NOURI, A. M.; OLIVER, R. T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **J Immunol Methods**. v 160(1):89-96. 1993.

IM, Y.S., et al., Apoptotic effect of Naphthoquinone derivatives on HCT116 colon cancer cells. **Genes Genom**. V.32, 592–598. 2010.

JARDIM, G.A.M., et al., On the investigation of hybrid quinones: synthesis, electrochemical studies and evaluation of trypanocidal activity. **R. Soc. Chem**. 5, 78047e78060, 2015.

JHA, S.N., SINGH, N.K., JHA, T.K. Changing response to diamidine compounds in cases of kalaazar um responsive to antimonial. **J Assoc Physicians India** v.39, 314-6, 1991

KARAKAS, D.; ARI, F., ULUKAYA, E. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. **Turkish J. Biology**, v. 41, p. 919-925, 2017.

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

KUMAR, K,K; SEENIVASAN, S.P; KUMAR, V.; DAS, T.M Synthesis of quinoline coupled [1,2,3]-triazoles as a promising class of anti-tuberculosis agents. **Carbohydr Res**. v.356 (14):2084-90, 2011.

KUMAGAI, Y.; SHINKAI, Y.; MIURA, T.; CHO, A. K. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. v 52:221-47. 2012.

KEVRIC I, CAPPEL MA AND KEELING JH. 2. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatol Clin** v.33: p.579-593, 2015.

LAINSON R, SHAW JJ. New world Leishmaniasis - The Neotropical Leishmania species. In: Topley & Wilson. **Microbiol. and Microbial Infect**. v.9 , 1988.

LEISHMAN, W .B. On the possibility of the occurs of trypanosomiasis in India. **British Medical Journal**, v.1, p. 1252-1254, 1903.

MACHADO, P.R. et al. Treatment of disseminated leishmaniasis with liposomal amphotericin B. **Clin. Infect. Dis**. v.61, 945–949, 2015.

MANDAL, G. et al., Drug Resistance in Leishmania, Antimicrobial Drug Resistance. **Springer**, v.16, 649–665. 2017.

MARGARET, A.; PHILLIPS E SAMUEL, L.; STANLEY, JR. Quimioterapia das infecções por protozoários: amebíase, giardíase, tricomoníase, leishmaniose e infecções por outros protozoários. cap. 50. In: **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. AMGH Editora. 12 ed. p. P.1419-1441, 2012.

MASMOUDI, A. et al. Glucantime injection: benefit versus toxicity. **Médecine et Maladies Infectieuses**. v. 35, p. 42-45, 2005.

MAURER, M.; DONDI, B.; VON STEBUT, E. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. **Med. Microbiol Immunol**, v. 198 (3), p.137-146, 2009.

MESQUITA, J. T.; TEMPONE, A. G.; REIMÃO, J. Q. Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime®, miltefosine and sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) infantum* intracellular amastigotes. **Acta Trop.** 130:112-6. 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. v 65(1-2):55-63. 1983.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**. v. 366, p. 1561–1577, 2005.

OLIVEIRA, C.L., BRODSKY C.L. The immunobiology of *Leishmania brasiliensis* infection. **Front. Immunol**. v.3, 145, 2012.

OLIVEIRA, R.N., et al. New Strategies for Molecular Diversification of 2-[Aminoalkyl-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)]-1,4-naphthoquinones Using Click Chemistry. **J. Braz. chem. Soc.** V.28 (4), 681-688, 2017.

PÉREZ-VICTORIA, F. J., et al. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. **Drug Resist Updat**.v 9(1-2):26-39. 2006.

RAMESH, V. et al.. Decline in Clinical Efficacy of Oral Miltefosine in Treatment of Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) in India. **PLoS Negl Trop Dis**. 9(10). 2015.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**. v 26(4):550-555. 2003.

RAHMAN, R. et al. Safety and efficacy of short course combination regimens with AmBisome, miltefosine and paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) in Bangladesh. **PLoS Neglect. Trop. Dis**. v.11, 2017

REIS, A. B. ; GONTIJO, C. M. F; 2011. Leishmaniose Tegumentar Americana.. **Parasitologia Humana**, v 12 p. 49-65, 2011.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis review. **Lancet Infect Diseases**. v. 7, p. 581–596, 2007.

ROBERTS, W. L.; BERMAN, J. D.; RAINEY, P. M. *In vitro* antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimony antimonial preparations. **Antimicrob. Agents and Chemother.** v. 39, p. 1234-1239, 1995.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector–host interactions in leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology, Palo Alto**, v. 55, p. 453–483, 2001.

SALEI, N.; HELLBERG, L.; KÖHL, J.; LASKAY, T. Enhanced survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes in the presence of apoptotic cells. **PLoS One**. v 12(2): e0171850. 2017.

SANGSHETTI, J. N.; NAGAWADE, R. R.; SHINDE, D. B.; Synthesis of novel 3-(1-(1-substituted piperidin-4-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5(4*H*)-one as antifungal agentes. **Bioorg. Med. Chem. Lett**. v19,p.3564. 2009.

SANGSHETTI, J. N. et al. Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 32376–32415, 2015.

SANTOS RV, COIMBRA JR. Saúde e Povos Indígenas. Rio de Janeiro: 1994, **Ed. FIOCRUZ**; 1994.

SHOWLER, A.J.; BOGGILD, A.K. Cutaneous leishmaniasis in travellers: a focus on epidemiology and treatment in 2015. v. 17, p.489, 2015.

SILVA, A.O., et al. Synthesis and biological activity against *Trypanosoma cruzi* of substituted 1,4-naphthoquinones. **Eur. J. Med. Chem**. v.60, p.51-56. 2013.

SIMPSON, L.; KRETZER. F. The mitochondrion in dividing *Leishmania tarentolae* cells is symmetric and circular and becomes a single asymmetric tubule in non-dividing cells due to division of the Kinetoplast portion. **Mol Biochem Parasitol**, v. 87(1), p. 71-78, 1997.

SINDERMANN H, ENGEL J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. **Trans. R Soc Trop Med**. v 1 p.17-20, 2006.

SINGH, O.P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. **Infect. Dis. Poverty** v5 (19), 2016.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. ;Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5,n. 6, p. 485-497, 2012.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Rev Bras de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, 2004.

SOUZA, E.T; LOPES, W.A., ANDRADE J.B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Quim. Nova**, v. 39(4) p.486-495, 2016

SUNDAR, S. Treatment of visceral leishmaniasis. **Med Microbiol Immunol** v.190, p.89-92, 2001.

SUNDAR, S. et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **The New England J. Med**. V.347(22):1739-46. 2002.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **Indian J. Med. Res**. v 123:345-52. 2006.

SUNDAR, S. et al. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. **N Engl J Med** v. 21, 356(25), p. 2571-2581, 2007.

SUNDAR, S. et al. Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response. **J. Glob. Infect. Dis.** v.2, p.159–166, 2012.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opin. Pharmacother.** v14 (52), p53–63, 2013.

TEIXEIRA, D. E. et al. Atlas didático: Ciclos de vida da *Leishmania*. **Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ.** 1ª edição. 64 p. 2013.

TIUMAN, T. S. et al. Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrob. Agents and Chemother.** v 49:176-182. 2005.

TRINCONI, C. T.; REIMÃO, J. Q.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; MIGUEL, D. C.; ULIANA, S. R. Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother.** 58(5):2608-13. 2014.

VAN-GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infect Dis Clin North Am.** v.26(2):309-22, 2012.

WASUNNA, M. K.; et al. A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 7:871-876. 2005.

WELLINGTON, K. W. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review. **RSC Adv.** v. 5, 2015.

WHEELER, R.J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Mol Microbiol**, v. 79(3), p. 647- 662, 2011.

WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **Third who report on neglected tropical diseases**, 2015.

WHO. Status of endemicity of cutaneous and visceral leishmaniasis, worldwide. **World Health Organization. 2018.** Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em: 10/01/2019.

WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **Third who report on negle. Trop. diseases**, 2017.

XIA, Y. E. Synthesis of bitriazolyl nucleosides and unexpectedly different reactivity of azidotriazole nucleoside isomers in the Huisgen reaction. **Org. Biomol. Chem.** v., 5, p1695, 2007.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discov Today.** v. 22(10). 2017.