

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE E MECANISMOS DE AÇÃO LEISHMANICIDA
E/OU TRIPANOCIDA DE PRODUTOS NATURAIS E UM DERIVADO**

por

Luiza Guimarães Tunes

Belo Horizonte

Fevereiro/2015

DISSERTAÇÃO MBCM-CPqRR

L.G. TUNES

2015

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE E MECANISMOS DE AÇÃO LEISHMANICIDA
E/OU TRIPANOCIDA DE PRODUTOS NATURAIS E UM DERIVADO**

por

Luiza Guimarães Tunes

**Dissertação apresentada com vistas à obtenção
do Título de Mestre em Ciências na área de
concentração Biologia Celular e Molecular**

Orientação: Dra. Tânia Maria de Almeida Alves
Coorientação: Dra. Caryne Margotto Bertollo

Belo Horizonte
Fevereiro/ 2015

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

T926i
2015

Tunes, Luiza Guimarães.

Investigação da Atividade e Mecanismos de Ação Leishmanicida e/ou Tripanocida de Produtos Naturais e um Derivado / Luiza Guimarães Tunes. – Belo Horizonte, 2015.

XIV, 105 f: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 111 - 119

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Doença de Chagas/quimioterapia 2. Leishmaniose/quimioterapia 3. Produtos Biológicos/uso terapêutico I. Título. II. Alves, Tânia Maria de Almeida (Orientação). III. Bertollo, Caryne Margotto (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 3

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE E MECANISMOS DE AÇÃO LEISHMANICIDA
E/OU TRIPANOCIDA DE PRODUTOS NATURAIS E UM DERIVADO**

por

Luiza Guimarães Tunes

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Tânia Maria de Almeida Alves (Presidente)

Prof. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta

Prof. Dra. Carolina Paula de Souza Moreira

Suplente: Dr. Rubens Lima do Monte Neto

Dissertação defendida e aprovada em: 25/02/2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pelo amor e apoio incondicionais. A educação e incentivo que recebi deles abriu um mundo de possibilidades na minha vida.

Ao Thadeu, que me deu todo o carinho, compreensão e companheirismo que eu poderia precisar para superar os obstáculos desta fase da minha vida.

Às minhas orientadoras Dra. Tânia Alves e Dra. Caryne Bertollo, por todo o conhecimento compartilhado, pela paciência e ensinamentos que vão além da ciência.

Aos colegas de laboratório, todos vocês colaboraram de alguma forma, com ajudas, idéias, discussões e principalmente para que o dia-a-dia fosse mais divertido. Dani, um obrigada especial pra você que me ajudou muito, comemorou e sofreu por este trabalho como se fosse seu.

Às amigas do mestrado, pelo companheirismo, ajuda e momentos ótimos que passamos juntas. Vocês tornaram toda a experiência do mestrado mais leve!

À minha família e minhas amigas da PUC e da vida, pelos momentos de descontração, diversão e desabafo muito importantes durante esses dois anos.

À Dra. Nazaré Soeiro, Dr. Rubem Menna-Barreto e demais integrantes do Laboratório de Biologia Celular do IOC, a ajuda de todos vocês foi essencial! Muito obrigada por terem me recebido tão bem e me ensinado tanto! Os resultados que obtive com a ajuda de vocês foram fundamentais neste trabalho.

Ao Dr. Rubens do Monte pelas sugestões no trabalho e ajuda com o Prisma, minhas sigmóides não seriam as mesmas sem você!

À Plataforma de Ensaio Pré-Clínicos de Triagem de Drogas Anti-*Trypanosoma cruzi*, especialmente ao Policarpo, pela colaboração.

Ao Dr. Márcio Sobreira, Dra. Andrea Teixeira e Dr. Vitor Bortolo do Laboratório de Biomarcadores de Diagnósticos e Monitoração pelo auxílio e aprendizado que me proporcionaram.

Ao Dr. Mário Steindel pela colaboração.

Aos funcionários do CPqRR que contribuíram de alguma maneira para a realização deste estudo.

Ao apoio financeiro das instituições CAPES, CNPq, FAPEMIG, CPqRR, PDTIS/CPqRR, que foi fundamental para a execução deste trabalho.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE QUADROS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1 Doença de Chagas	18
3.1.1 Epidemiologia	18
3.1.2 Transmissão e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
3.1.3 Fisiopatologia da doença de Chagas	21
3.1.4 Diagnóstico	22
3.1.5 Quimioterapia.....	23
3.2 Leishmanioses	25
3.2.1 Epidemiologia	25
3.2.2 Transmissão e ciclo de vida das espécies de <i>Leishmania</i>	26
3.2.3 Fisiopatologia das leishmanioses	29
3.2.4 Diagnóstico	30
3.2.5 Quimioterapia.....	31
3.3 Desenvolvimento de fármacos – os produtos naturais bioativos (PNB).....	33
4 MÉTODOS	36
4.1 Levantamento bibliográfico	36
4.2 Amostras para bioensaios	36
4.3 Linhagem Celular e Parasitos	37
4.4 Ensaio biológico para detecção de atividade leishmanicida	38
4.5 Ensaio biológico para detecção de atividade tripanocida	40
4.6 Determinação da CI_{50} dos PNB e dPNB em diferentes modelos de <i>L. (L.) amazonensis</i>	40
4.7 Determinação do índice de seletividade	42
4.8 Ensaio de inibição da tripanotiona redutase heteróloga de <i>T. cruzi</i> (TcTR).....	43
4.9 Alteração do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	44
4.10 Análise da função mitocondrial de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> por respirometria.....	44
4.11 Análise ultraestrutural.....	45
4.12 Análises estatísticas.....	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Seleção dos PNB e dPNB.....	47
5.2 Análises de pureza e identidade das substâncias.....	48
5.3 Atividade leishmanicida dos PNB e dPNB.....	48
5.4 Atividade tripanocida dos PNB e dPNB	50
5.5 Seleção de PNB e dPNB	51
5.6 Determinação da CI_{50} do lapachol e da TNQ sobre a proliferação de <i>L. (L.) amazonensis</i> em três modelos de ensaios <i>in vitro</i>	52
5.7 Inibição da TR heteróloga de <i>T. cruzi</i>	54

5.8	Alteração do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de <i>L. (L) amazonensis</i>	55
5.9	Análise da função mitocondrial de promastigotas de <i>L. (L) amazonensis</i> por respirometria.....	57
5.10	Análise ultraestrutural	58
5.11	Resumo dos resultados	63
	Nas tabelas 9 e 10 foram sintetizados os resultados obtidos neste trabalho.	63
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÕES	78
8	ANEXOS	79
8.1	Termo de concessão de acesso a amostra componente do patrimônio genético	79
8.2	Informações da ATCC sobre a linhagem de células THP-1	82
8.3	Análises por HPLC.....	87
8.4	Análises por espectrometria de massas.....	102
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Distribuição global de casos da doença de Chagas.....	19
Figura 2 Representação esquemática da transmissão vetorial e do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	21
Figura 3 Distribuição global da leishmaniose visceral.....	25
Figura 4 Distribuição global da leishmaniose cutânea.....	26
Figura 5 Representação esquemática do ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	29
Figura 6 Esquema representativo do ensaio enzimático de inibição da TR.....	43
Figura 7 Imagens representativas de macrófagos humanos infectados por <i>L. (L.) amazonensis</i>	49
Figura 8 Estrutura química do lapachol e da TNQ.....	52
Figura 9 Curvas dose-resposta da redução da viabilidade de promastigotas e amastigotas de lesão e do número de amastigotas intracelulares de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> após tratamento com TNQ ou lapachol.....	53
Figura 10 Curvas dose-resposta da redução da viabilidade de macrófagos após tratamento com TNQ ou lapachol.....	54
Figura 11 Gráficos ilustrando o efeito induzido pelo lapachol e pela TNQ (4 h de incubação) sobre o potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de <i>Leishmania L. (L.) amazonensis</i>	56
Figura 12 Gráficos ilustrando o efeito induzido pelo lapachol e pela TNQ (24 h de incubação) sobre o potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de <i>Leishmania L. (L.) amazonensis</i>	56
Figura 13 Representação da porcentagem de redução do consumo de oxigênio após tratamento com lapachol e TNQ.....	58
Figura 14 Análises ultraestruturais de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> do grupo controle.....	60
Figura 15 Análises ultraestruturais de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	61
Figura 16 Análises ultraestruturais de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 PNB e dPNB selecionados.....	47
Tabela 2 Porcentagem de redução do número de amastigotas intramacrófago (atividade anti-amastigota) induzida pelos PNB e dPNB.....	50
Tabela 3 Representação da inibição do crescimento parasitário induzido pelos PNB e dPNB a 20 µg/mL.....	51
Tabela 4 Representação da inibição do crescimento parasitário induzido pelos PNB e dPNB a 10 µg/mL.....	51
Tabela 5 CI ₅₀ (µM) ± DP dos PNB e dPNB em diferentes modelos biológicos.....	54
Tabela 6 Porcentagem de inibição da enzima tripanotona redutase heteróloga de <i>T. cruzi</i>	55
Tabela 7 Média (%) ± DP de populações com marcação positiva para TMRE e variação da população positiva em relação ao controle após exposição ao lapachol e à TNQ por 4 e 24 h.....	57
Tabela 8 Porcentagem de redução do consumo de oxigênio pelos parasitos frente ao tratamento com metade (½ CI ₅₀) ou valor total (CI ₅₀) da concentração inibitória de 50% do lapachol e TNQ.....	58
Tabela 9 Resumo dos resultados da seleção e triagem das substâncias.....	63
Tabela 10 Resumo dos resultados dos ensaios de avaliação dos mecanismos de ação da TNQ e do lapachol.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Espécies de <i>Leishmania</i> e seus respectivos vetores e reservatórios encontrados no Brasil.....	27
Quadro 2 As principais espécies de <i>Leishmania</i> que afetam humanos.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μM - micromolar

μg - micrograma

μL - microlitro

mL - mililitro

® - marca registrada

™ - *trade mark*

°C - grau celcius

λ - comprimento de onda

At.A – antimicina A

AA - atividade anti-amastigota

ATP - trifosfato de adenosina

BOD - *biochemical oxygen demand*

CI₅₀ - concentração inibitória de 50%

CPRG - vermelho de clorofenol β-D-galactopiranosídeo

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucléico

DNDi - iniciativa medicamentos para doenças negligenciadas

DP - desvio padrão

dPNB - derivados de produtos naturais bioativos

DTN - doenças tropicais negligenciadas

ELISA - ensaio imunoenzimático

h - horas

IS - índice de seletividade

LQPN - laboratório de química de produtos naturais

MET - microscopia eletrônica de transmissão

min - minutos

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NADPH - fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

PCR - reação em cadeia da polimerase

pH - potencial hidrogeniônico
PNB - produtos naturais bioativos
Sb - antimônio
SbIII - antimônio trivalente
SbV - antimônio pentavalente
SDS - duodecil sulfato de sódio
SFB - soro fetal bovino
TMRE - etil ester de tetrametilrodamina
TR - tripanotona redutase
v - volume

RESUMO

No Brasil, a doença de Chagas e as leishmanioses têm importante impacto na saúde pública. Os fármacos usados no tratamento dessas enfermidades apresentam limitações que tornam necessária a busca por novas alternativas terapêuticas. Nesse sentido, no presente estudo foram selecionados sete produtos naturais bioativos (PNB) e um derivado de produto natural (dPNB) e suas atividades tripanocida e leishmanicida foram determinadas e/ou confirmadas. A eleuterine, a tiofenonaftoquinona (TNQ) e a aurentiacina foram descritas como leishmanicidas pela primeira vez, sendo suas atividades anti-amastigota de 99, 99 e 98 %, respectivamente. O lapachol, a chalcona 1 e a chalcona 2 tiveram o efeito leishmanicida confirmado com atividade de 85, 99 e 99 %, respectivamente. Nenhuma substância foi considerada ativa no modelo de *T. cruzi* utilizado. Devido às quantidades de substâncias disponíveis, apenas o lapachol e a TNQ tiveram seus mecanismos de ação leishmanicida estudados. As concentrações inibitórias de 50% (CI₅₀) da TNQ foram inferiores àsquelas do lapachol em promastigotas (2 e 25 µM), amastigotas recuperadas de lesão (22 e 224 µM) e amastigotas intracelulares (7,4 e 84 µM). A razão entre a CI₅₀ em amastigotas intracelulares e macrófagos foi utilizada para o cálculo do índice de seletividade, sendo este 3,8 para o lapachol e 7,7 para a TNQ. Os PNB e dPNB leishmanicida foram avaliados quanto à atividade inibitória da enzima tripanotiona redutase (TR), sendo que nenhum foi capaz de inibir a enzima. Os efeitos induzidos por TNQ e lapachol sobre a atividade mitocondrial de promastigotas foram avaliados por citometria de fluxo e respirometria. O tratamento com lapachol induziu perda do potencial de membrana mitocondrial e reduziu o consumo de oxigênio pelos parasitos. Por sua vez, a TNQ não alterou esses parâmetros. Análises de microscopia eletrônica de transmissão mostraram que o tratamento com lapachol ou TNQ induziu danos no complexo de Golgi e na bolsa flagelar, formação de vesículas e perfil de autofagia. O lapachol, mas não a TNQ, também induziu alterações ultraestruturais nas mitocôndrias das promastigotas. Em conjunto, os resultados permitem propor que a mitocôndria seja um importante alvo celular para o lapachol. Uma vez que a TNQ não causou alterações na mitocôndria dos parasitos, mas induziu danos em outras organelas, pode-se propor que seu mecanismo de ação esteja relacionado à indução de estresse oxidativo. Este trabalho reforça a importância dos PNB na descoberta de novas substâncias bioativas, as quais podem ser objeto de estudos de mecanismos de ação, a fim de se expandir o conhecimento disponível para o processo de desenvolvimento de novos fármacos usados para o tratamento de endemias que afligem milhões de pessoas como as leishmanioses e a doença de Chagas.

ABSTRACT

In Brazil, Chagas disease and leishmaniasis cause great impact on public health. The drugs currently used to treat these diseases have limitations that make necessary the search for new therapeutic alternatives. In this context, seven bioactive natural products (BNP) and one derivative (BNPd) were selected for investigations. Their trypanocidal and leishmanicidal activities were detected or confirmed. Eleutherine, naphthothiophenquinone (TNQ) and aurentiacin had their leishmanicidal activity described for the first time in this study, reducing almost 100% of the parasites growth. Lapachol, chalcone 1 and chalcone 2 had their leishmanicidal activity confirmed. None were active on *T. cruzi* intracellular amastigote and trypomastigote model. Because of the available amounts of compounds, only lapachol and TNQ had their leishmanicidal mechanism of action studied. The inhibitory concentrations of 50% of the parasite growth (IC_{50}) induced by TNQ were inferior of that of lapachol in promastigotes (2 μ M and 25 μ M), lesion derived amastigotes (22 μ M and 224 μ M) and intracellular amastigotes (7.4 μ M and 84 μ M). The ratio between the IC_{50} on macrophages and intracellular amastigotes was used to calculate the selectivity index, lapachol's was 3.8 and TNQ's was 7.7. The leishmanicidal BNP and BNPd were evaluated as to their ability to inhibit trypanothione reductase (TR) and none of the compounds were able to inhibit the enzyme. The effects induced by the compounds on promastigotes mitochondrial activity were assessed using flow cytometry and respirometry. Treatment using lapachol induced loss of mitochondrial membrane potential and reduced oxygen consumption by the parasites. On the other hand, TNQ did not alter those parameters. Transmission electron microscopy showed that lapachol and TNQ induced damage to the Golgi complex, flagellar pocket, formation of vesicles and autophagy profile. Lapachol, but not TNQ, induced ultrastructural alterations on promastigotes mitochondria. These results suggest that mitochondria are an important target for lapachol. As TNQ did not alter the parasites mitochondrial function or structure, but induced important ultrastructural alterations in other organelles, we can assume that its mechanism of action could be related to induction of oxidative stress. The present work reinforces the importance of BNP in the discovery of new active compounds that can be used for mechanism of action studies, contributing to the knowledge required for drug development to treat diseases that afflict millions of people worldwide such as leishmaniasis and Chagas diseases.

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são um grupo de infecções que ameaçam as vidas de mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo. A maioria das pessoas afetadas origina-se de populações pobres de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, constituindo um mercado pouco atraente para investimentos em pesquisa e desenvolvimento de fármacos pelo setor privado (World Health Organization, 2010b). No intuito de sustentar a luta contra o impacto global das DTN, a Organização Mundial de Saúde publicou o segundo relatório sobre DTN em 2013. São 17 doenças e dentre elas estão as leishmanioses e a doença de Chagas (World Health Organization, 2013).

A doença de Chagas é causada por infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e sua principal forma de transmissão é a vetorial. Os triatomíneos, que são os insetos vetores, defecam durante o repasto sanguíneo e o parasito presente em suas fezes penetra na pele do hospedeiro no local da picada (Rassi e Marin-Neto, 2010). A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas distintas: aguda e crônica. A fase aguda é na maioria dos casos assintomática e na fase crônica, a manifestação clínica mais importante é a cardiopatia chagásica. Aproximadamente sete a oito milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo, a maioria em áreas endêmicas da América Latina (World Health Organization, 2013). No Brasil, existem aproximadamente dois a três milhões de pessoas infectadas e seis mil óbitos são registrados todos os anos (Martins-melo et al., 2012).

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por cerca de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Estes protozoários são transmitidos para o homem através da picada de fêmeas de dípteros da subfamília Phlebotominae. As formas clínicas das leishmanioses podem ser classificadas em leishmaniose visceral, mucocutânea, cutânea e cutânea difusa. Esta variação ocorre conforme a espécie de *Leishmania* envolvida e a resposta imune do hospedeiro (Desjeux, 2004). As leishmanioses são prevalentes em cinco continentes e aproximadamente 1,3 milhões de novos casos ocorrem anualmente. São estimadas 20.000 a 40.000 mortes anuais causadas por leishmaniose visceral no mundo (World Health Organization,

2013). De 1980 a 2005 foram notificados 59.129 casos de leishmaniose visceral no Brasil (Harhay et al., 2011).

Os fármacos usados no tratamento dessas duas endemias são tóxicos, de alto custo e apresentam eficácia limitada, tornando urgente a busca por novas alternativas terapêuticas (Amato et al., 2008; Schmidt et al., 2012a). Para tanto, é necessário descobrir novas substâncias ativas em modelos *in vitro* e *in vivo*, visando ao desenvolvimento de novos fármacos (Pritchard et al., 2003). Este processo é complexo, lento e de alto custo, fatores estes que causam grande impacto quando se trata de desenvolvimento de fármacos para doenças negligenciadas. Sendo assim, de 1975 até 2010 apenas 13 novos fármacos para doenças negligenciadas foram desenvolvidos (Moran et al., 2005; Newman e Cragg, 2012).

Os produtos naturais são importantes na busca por novas substâncias bioativas, tendo sido utilizados como base para o desenvolvimento de medicamentos. Para se ter uma ideia, uma grande fração dos fármacos aprovados para consumo nos últimos 30 anos tem sua origem na natureza, principalmente nas áreas de câncer e doenças infecciosas onde mais de 60 % e 75 % destes fármacos, respectivamente, tem origem natural (Newman et al., 2003; Newman e Cragg, 2012).

Várias etapas compõem o processo de descoberta de novos fármacos (Pritchard et al., 2003) As etapas de identificação de alvos e os estudos de mecanismos de ação são muito importantes neste processo (Schenone et al., 2013). Estas informações podem contribuir para a identificação de novos alvos farmacológicos, para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Sen e Chatterjee, 2011), bem como prever a seletividade, a toxicidade e auxiliar na otimização compostos promissores (Nature, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade e o mecanismo de ação de produtos naturais visando contribuir com o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses e da doença de Chagas.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar, dentre os PNB (antitumorais, leishmanicida, tripanocida, fungicida/fungicidas) isolados e/ou seus derivados (dPNB) sintetizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) do Centro de Pesquisas René Rachou, aqueles que:
 - Possuam atividade biológica descrita;
 - Não tenham seus mecanismos de ação determinados;

- Confirmar a identidade, verificar o grau de pureza e estabilidade das substâncias;

- Determinar e/ou confirmar *in vitro* a atividade leishmanicida e/ou tripanocida dos PNB e dPNB selecionados na concentração de 20 µg/mL;

- Determinar o índice de seletividade (IS) dos PNB e dPNB selecionados.

- Determinar os mecanismos de ação dos PNB e dPNB selecionados por meio de:
 - Investigação da atividade inibitória da enzima tripanotona redutase;
 - Análise de possíveis danos mitocondriais;
 - Identificação dos alvos celulares.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Doença de Chagas

3.1.1 Epidemiologia

Estudos paleoparasitológicos relatam a presença de DNA de *T. cruzi* em múmias, demonstrando que a doença de Chagas afeta os homens há mais de 9.000 anos (Aufderheide et al., 2004). Entretanto, a patologia só foi descoberta e descrita em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Chagas (Rassi e Marin-Neto, 2010). Esta endemia era conhecida por afetar apenas as Américas, principalmente a América Latina. Vários programas de controle implementados a partir da década de 70, envolvendo países do cone sul, foram responsáveis pela eliminação do principal vetor, o *Triatoma infestans*, por meio do uso de inseticidas. Assim, a incidência de novas infecções por *T. cruzi* no continente Sul Americano diminuiu 70 % (Moncayo e Silveira, 2009; Pinto Dias, 2011).

Houve, entretanto, uma mudança de cenário nas últimas décadas. Devido à mobilidade da população, existem relatos de casos de doença de Chagas em países da América do Norte, da Europa, no Japão e na Austrália (World Health Organization, 2010b).

Assim, mais de um século após o seu descobrimento, a doença de Chagas permanece um importante problema de saúde pública, principalmente nos países da América Latina, onde a enfermidade é endêmica e responde por consideráveis taxas de morbidade e mortalidade, acometendo de 7 a 8 milhões de pessoas (Figura 1) (Moncayo e Silveira, 2009; World Health Organization, 2010).

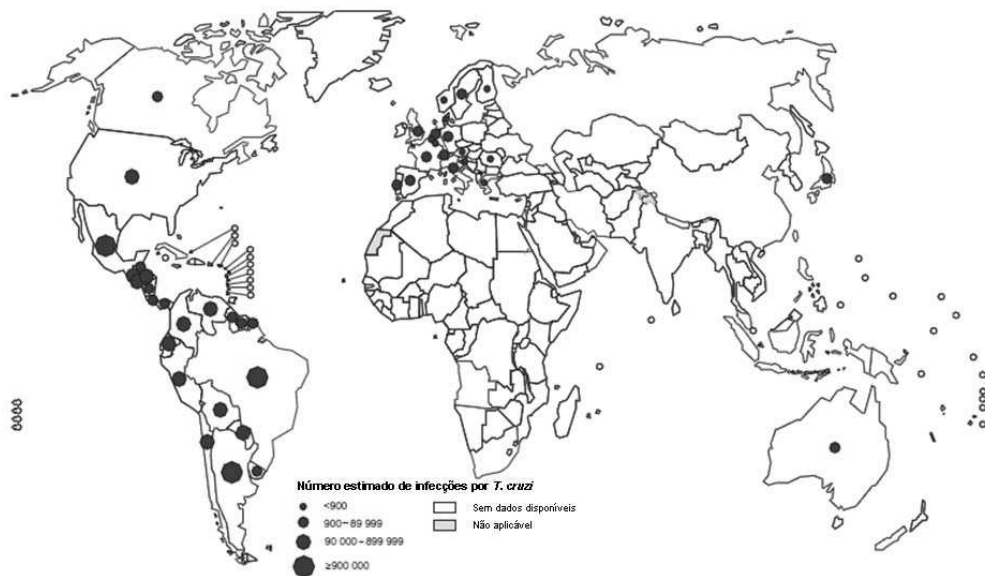


Figura 1: Distribuição global de casos da doença de Chagas, baseado em estimativas oficiais, 2006-2010. Fonte: Adaptado de Organização Mundial de Saúde, 2013 (World Health Organization, 2013)

3.1.2 Transmissão e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (Rodrigues Coura e de Castro, 2002). O *T. cruzi* é transmitido ao homem e a mais de 150 espécies de mamíferos principalmente por insetos da subfamília Triatominae. Mais de 130 espécies de triatomíneos já foram identificadas, mas apenas algumas têm capacidade vetorial. Os vetores mais importantes na transmissão do *T. cruzi* são o *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, e *Triatoma dimidiata* (Rassi e Marin-Neto, 2010). O ciclo do protozoário é mantido entre insetos e mamíferos silvestres, o que representa um risco de restabelecimento da transmissão em áreas onde atualmente esta não ocorre (Moncayo e Silveira, 2009).

Embora a transmissão vetorial da doença tenha diminuído de forma drástica no Brasil e em outros países devido à implementação de ações de controle vetorial, outras formas como a transfusional, vertical, acidental de laboratório e oral contribuem para a propagação da doença (Moncayo e Silveira, 2009; Rassi e Marin-Neto, 2010; Pinto Dias, 2011). O risco de se contaminar ao receber transfusão de um doador infectado é menor que 20%. Felizmente, na maioria dos países da América Latina a verificação da presença de *T. cruzi* no sangue de bancos de sangue é compulsória, na tentativa de

diminuir a transmissão transfusional (Moncayo e Silveira, 2009; Rassi e Marin-Neto, 2010).

Por sua vez, a transmissão oral é rara, mas geralmente responsável por surtos de casos agudos em áreas não endêmicas. A ingestão de alimento contaminado como cana de açúcar, sucos frescos, açaí, ou carne crua de animais contaminados, geralmente ocasiona uma infestação com grande número de parasitos no sangue, resultando em casos agudos graves e até a morte (Pereira et al., 2009; Rassi e Marin-Neto, 2010).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é heteroxênico. O ciclo se inicia quando o triatomíneo vetor se contamina ao fazer o repasto sanguíneo em um mamífero contaminado. As formas epimastigotas se multiplicam no intestino do inseto e ocorre a transformação para a forma tripomastigota metacíclica, que será eliminada pelas fezes no próximo repasto sanguíneo. Os parasitos presentes nas fezes entram na corrente sanguínea do mamífero através das mucosas ou de lesões na pele e podem infectar qualquer célula, onde a forma amastigota se multiplica por divisão binária (Rassi e Marin-Neto, 2010; Vega Royero e Sibona, 2014) (Figura 2).

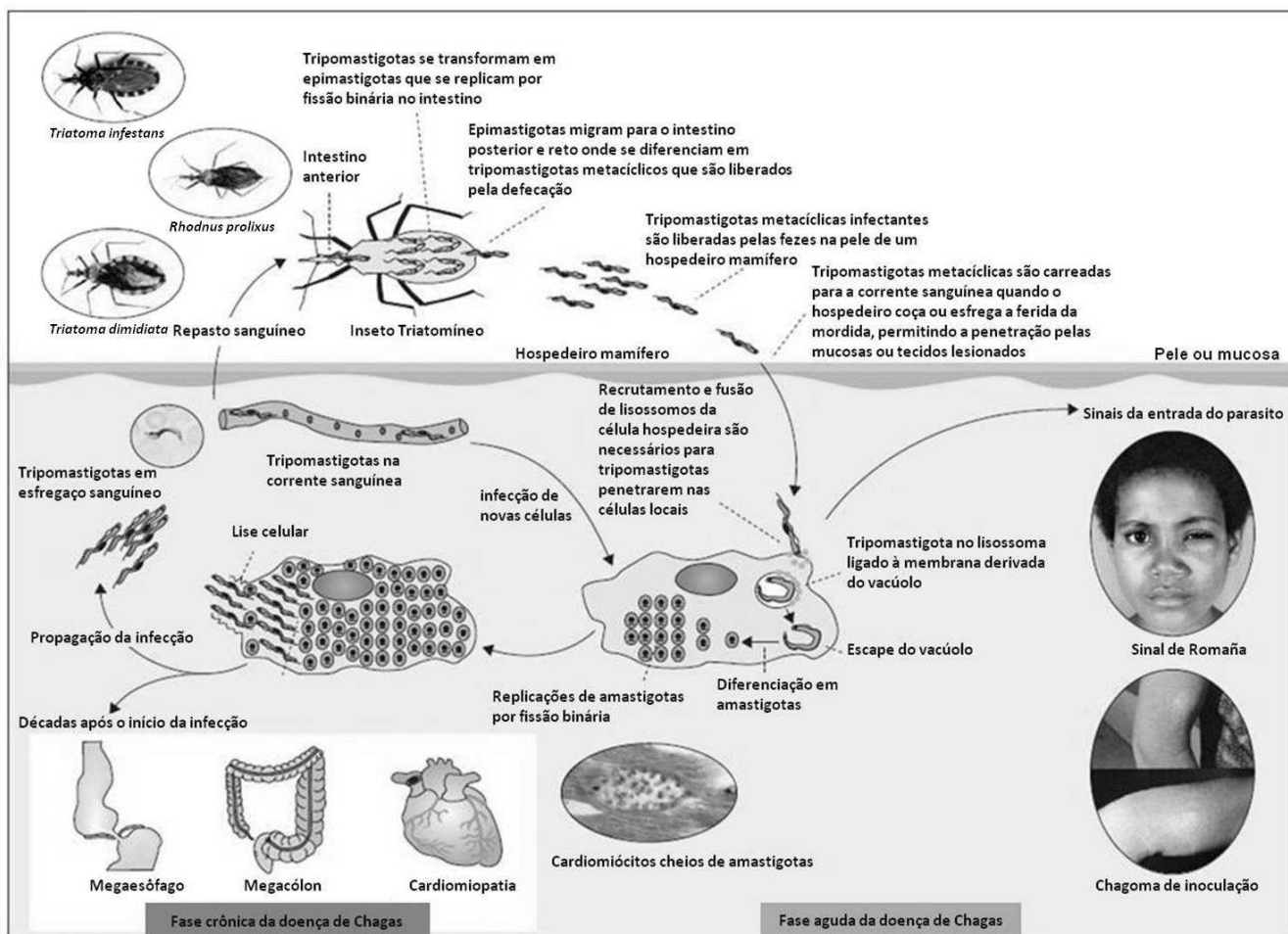


Figura 2: Representação esquemática da transmissão vetorial e do ciclo de vida do *T. cruzi*.
 Fonte: Adaptado de Rassi & Martin-Neto, 2010 (Rassi e Marin-Neto, 2010)

3.1.3 Fisiopatologia da doença de Chagas

A fase inicial da doença é denominada fase aguda e dura de quatro a oito semanas. Esta fase pode ser assintomática ou podem ocorrer sintomas que aparecem de uma a duas semanas após a infecção, como febre, dores musculares, aumento do tamanho do fígado e baço e miocardite. Geralmente há intenso parasitismo em todos os órgãos. Nesta fase, menos de 10% dos casos são diagnosticados e de 5% a 10% evoluem para morte (Maya et al., 2010; Rassi e Marin-Neto, 2010).

Cerca de 70% dos pacientes não desenvolvem a forma clínica da doença. Estes indivíduos são portadores da forma indeterminada, caracterizada pela ausência de sinais ou sintomas perceptíveis. Os outros 30 a 40% dos pacientes evoluem para a fase crônica da doença (Rassi e Marin-Neto, 2010).

A fase crônica da doença de Chagas pode ocorrer na forma cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva (Rassi e Marin-Neto, 2010). A forma cardíaca é caracterizada por insuficiência cardíaca biventricular, arritmias e tromboembolismo. Os sintomas são dores no peito, tontura, síncope e palpitações (Maya et al., 2010). A morte súbita é responsável por dois terços dos óbitos de pacientes chagásicos cardíacos (Rassi e Marin-Neto, 2010). A forma digestiva, megaesôfago ou megacólon, ocorre em 10 a 15% dos pacientes crônicos, geralmente ao sul da bacia Amazônica. Os sintomas do megaesôfago são dor epigástrica, disfagia, regurgitação, dor ao deglutir, ptialismo e má nutrição em casos graves. Os sintomas do megacólon são constipação, distensão abdominal e obstrução intestinal. A associação da forma digestiva com a forma cardíaca é a forma cardiodigestiva. A prevalência desta forma não é conhecida devido à falta de estudos (Rassi e Marin-Neto, 2010).

A lesão nos tecidos e órgãos que ocorre durante a doença de Chagas é causada pelo próprio parasito e pela resposta inflamatória que seus antígenos desencadeiam no sistema imune do hospedeiro. Durante a fase crônica, o equilíbrio entre o controle da carga parasitária pelo sistema imune e os danos causados pela inflamação determinam o curso da doença. Se a resposta imune reduzir a carga parasitária e a inflamação causar o mínimo de lesões possível, esta resposta será considerada eficiente (Rassi e Marin-Neto, 2010).

3.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da fase aguda da doença é realizado pela detecção microscópica de tripomastigotas no sangue. Na fase crônica, o diagnóstico clínico é baseado em anormalidades encontradas no eletrocardiograma. Como a parasitemia é baixa, a presença de anticorpos IgG contra *T. cruzi* deve ser detectada por ao menos dois métodos sorológicos diferentes para confirmar o diagnóstico. Os métodos sorológicos mais usados são o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), a imunofluorescência indireta e a hemaglutinação direta. Em casos de sorologia inconclusiva, pode-se utilizar a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Apesar de ser uma técnica muito sensível devido à detecção do DNA do parasito no sangue do hospedeiro, a PCR não é empregada em diagnósticos de rotina devido à

necessidade de instalações específicas de laboratório (Rassi e Marin-Neto, 2010).

3.1.5 Quimioterapia

Os fármacos mais utilizados no tratamento da doença de Chagas são o nifurtimox e o benzonidazol. O tratamento é altamente recomendado em todos os casos agudos, congênitos, de reativação da infecção, em crianças e pacientes com até 18 anos de idade com a forma crônica da doença. Pacientes crônicos com 19 a 50 anos de idade sem danos cardíacos avançados também devem ser tratados. O benefício do tratamento para pacientes crônicos com mais de 50 anos de idade não foi comprovado (Rassi e Marin-Neto, 2010).

O nifurtimox teve sua comercialização descontinuada no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai desde a década de 80 (Rodrigues Coura e de Castro, 2002). Seu mecanismo de ação envolve a sua metabolização, que produz espécies reativas de oxigênio as quais são acumuladas pelo *T. cruzi*, ocasionando danos na membrana e no DNA do parasito (Maya et al., 2007). Os efeitos colaterais mais frequentes causados por este fármaco são: anorexia, perda de peso, náuseas, vômito, diarreia, excitabilidade ou sonolência e alterações psíquicas (Rodrigues Coura e de Castro, 2002).

O benzonidazol é um derivado imidazólico cujo mecanismo de ação envolve a formação de radicais livres e/ou de metabólitos eletrofílicos, que fazem ligações covalentes com várias macromoléculas do parasito (Maya et al., 2007, 2010), além de inibir a síntese de RNA e de proteínas (Polak e Richle, 1978). Embora o benzonidazol seja o principal fármaco usado no tratamento para doença de Chagas, sendo o mais seguro e eficaz disponível, ele apresenta uma taxa média de cura parasitológica de apenas 60% na fase aguda e de 5 % a 20 % na fase crônica, além de causar graves efeitos adversos como agranulocitose, neutropenia, febre, septicemia e púrpura trombocitopênica (Cançado, 2002; Rodrigues Coura e de Castro, 2002).

Alguns fármacos como o alopurinol, itraconazol e outros medicamentos em uso clínico registrados originalmente para o tratamento de hiperuricemia (alopurinol) e infecções fúngicas, respectivamente, também foram testados para tratamento da doença de Chagas. Entretanto, nenhum demonstrou ser

superior ao nifurtimox ou ao benzonidazol por diversos motivos como toxicidade, baixa solubilidade ou baixa eficácia clínica (Maya et al., 2010).

A taxa de cura parasitológica insatisfatória em pacientes chagásicos na fase crônica pode estar associada a características biológicas do parasito, localização intracelular, além de outros fatores ainda não conhecidos (Urbina e Docampo, 2003; Tarleton et al., 2007). Além disso, diferentes autores comprovaram a resistência natural ou induzida do *T. cruzi* aos derivados de nitroheterocíclicos disponíveis para uso clínico. (Filardi e Brener, 1987; Croft, 1997; Urbina e Docampo, 2003; dos Santos et al., 2012)

Os esforços para a busca de fármacos para o tratamento da doença de Chagas resultam em um grande número de novos alvos e novas substâncias ativas, porém, principalmente devido à falta de financiamento, pouco se investe em estudos posteriores para o desenvolvimento desses candidatos a fármacos (Tarleton et al., 2007).

3.2 Leishmanioses

3.2.1 Epidemiologia

As leishmanioses são endêmicas em 98 países e sua distribuição tem se expandido devido à movimentação da população (Alvar et al., 2012; World Health Organization, 2013) (Figuras 3 e 4). No Brasil, a migração em massa de pessoas para áreas urbanas mudou o perfil epidemiológico da doença. A transmissão das leishmanioses, que ocorria principalmente em zonas rurais, passou a ser registrada também em áreas urbanas (World Health Organization, 2010b). Atualmente, são notificados mais de 3400 casos de leishmaniose visceral por ano no país e o processo de urbanização da doença atingiu cidades como Teresina, Natal, Fortaleza, São Luís e Belo Horizonte (Lemos et al., 2009; Werneck, 2010; Harhay et al., 2011; Alvar et al., 2012). Em Belo Horizonte, nos anos 2013 e 2014 foram notificados 72 casos de leishmaniose visceral, dos quais 11 evoluíram para óbito (Prefeitura de Belo Horizonte, 2013 e 2014).

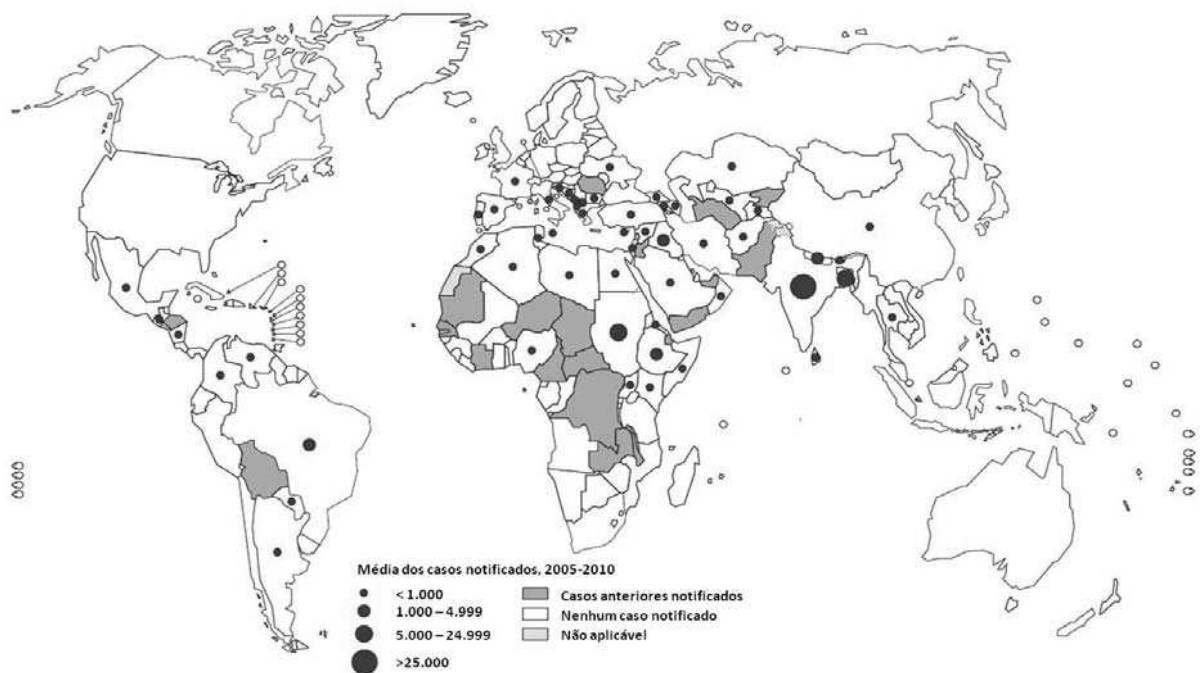


Figura 3: Distribuição global da leishmaniose visceral, 2010. Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2013 (World Health Organization, 2013)

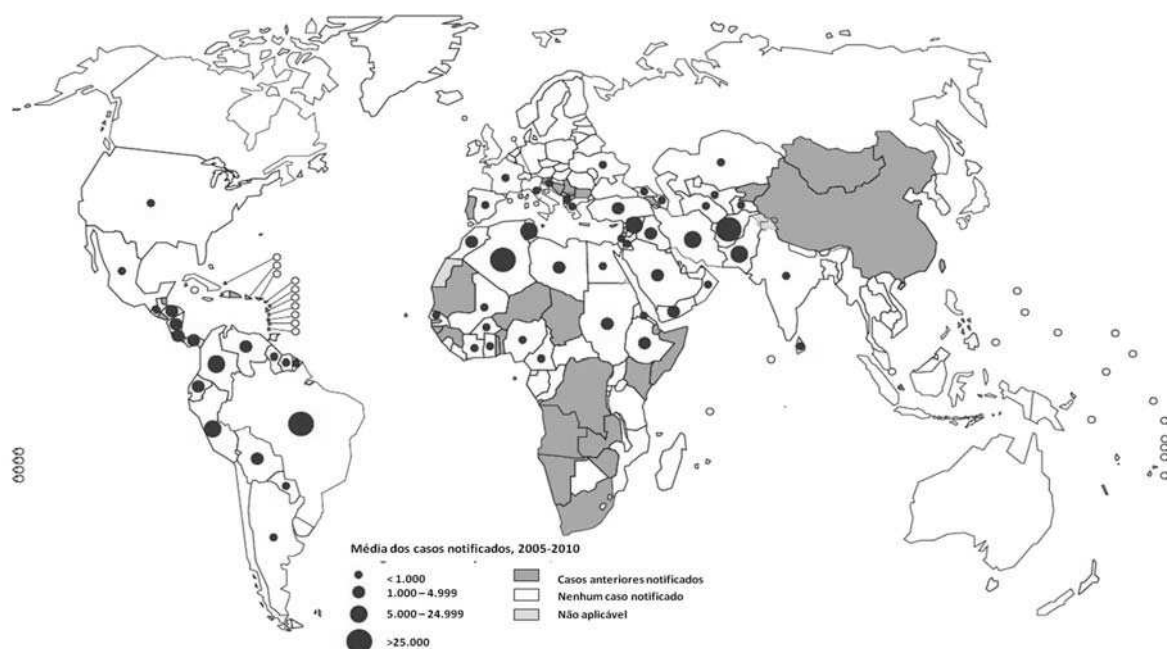


Figura 4: Distribuição global da leishmaniose cutânea, 2010. Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2013 (World Health Organization, 2013)

O real fardo econômico e social das leishmanioses é subestimado. Os estudos realizados levam em consideração apenas os gastos com o tratamento dos pacientes, enquanto a maioria das pessoas afetadas vive em áreas remotas e não busca assistência médica. As estimativas de anos vividos com incapacidades decorrentes das leishmanioses não levam em consideração as deformidades causadas pelas formas cutânea e mucocutânea, que muitas vezes geram consequências psicossociais tais como a exclusão da pessoa doente pela sociedade (World Health Organization, 2013).

Diversas formas de minimizar os impactos socioeconômicos das leishmanioses podem trazer contribuições importantes. A transmissão pode ser reduzida por meio da adoção de medidas de controle. Podem ser adotadas estratégias que visam à detecção ativa da doença, tratamento precoce de casos, controle do vetor e mobilização social (World Health Organization, 2010a).

3.2.2 Transmissão e ciclo de vida das espécies de *Leishmania*

Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos pela picada de flebotomíneos de diversas espécies dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*.

Nas Américas, as principais espécies de flebotomíneos envolvidas são *Lutzomya longipalpis* e *Lutzomya cruzi* (World Health Organization, 2004; Harhay et al., 2011). Os vetores podem ser específicos, ou seja, que suportam o crescimento de apenas uma espécie de *Leishmania*, ou permissivos, que suportam o crescimento de mais de uma espécie (Quadro 1). As diversas espécies de *Leishmania* podem ser alternativamente transmitidas por compartilhamento de seringas, transfusão de sangue e verticalmente. Entretanto, esses modos de transmissão são raros quando comparados à transmissão pela picada de flebotomíneos (World Health Organization, 2010a).

Quadro 1: Espécies de *Leishmania* e seus respectivos vetores e reservatórios encontrados no Brasil

Espécie de <i>Leishmania</i>	Espécie de <i>Lutzomya</i> vetor comprovado ou suspeito	Animal reservatório comprovado ou suspeito
<i>L. guyanensis</i>	<i>Lu. umbratilis</i> , <i>Lu. anduzei</i> , <i>Lu. whitmani</i>	<i>Choloepus</i> spp., <i>Tamandua</i> spp., <i>Didelphis</i> spp., <i>Proechimys</i> spp.
<i>L. amazonensis</i>	<i>Lu. flaviscutellata</i> , <i>Lu. longipalpis</i>	<i>Proechimys</i> spp., <i>Oryzomys</i> spp., <i>Wiedomys</i> spp.
<i>L. braziliensis</i>	<i>Lu. intermedia</i> , <i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. complexa</i> , <i>Lu. neivai</i> , <i>Lu. edwardsi</i> , <i>Lu. migonei</i>	<i>Canis lupus familiaris</i> , <i>Rattus rattus</i> , <i>Akodon arviculoides</i> , <i>Bolomys</i> spp., <i>Nectomis</i> spp., <i>Thrichomys</i> spp.
<i>L. infantum</i>	<i>Lu. longipalpis</i> , <i>Lu. cruzi</i> , <i>Lu. almerio</i> , <i>Lu. salesi</i>	<i>Canis lupus familiaris</i> , <i>Felis catus</i> , <i>Lycalopex velutus</i> , <i>Cedocyon thous</i> , <i>Didelphis albiventris</i>
<i>L. lainsoni</i>	<i>Lu. ubiquitalis</i>	<i>Agouti paca</i>
<i>L. shawi</i>	<i>Lu. whitmani</i>	<i>Cebus apella</i> , <i>Chiropotes satanus</i> , <i>Nasua nasua</i> , <i>Bradypus tridactylus</i> , <i>Choloepus didactylus</i>
<i>L. naiffi</i>	<i>Lu. squamiventris</i> , <i>Lu. paraensis</i> , <i>Lu. amazonensis</i> , <i>Lu. ayrozai</i>	<i>Dasypus novemcinctus</i>
<i>L. lindenbergi</i>	Desconhecido	Desconhecido

Fonte: Adaptado de Organização Mundial de Saúde, 2010 (World Health Organization 2010a)

O sistema ecológico que mantém uma espécie de *Leishmania* geralmente é composto por uma ou poucas espécies de flebotomíneos e uma ou mais espécies de reservatórios vertebrados. Várias espécies de mamíferos domésticos ou selvagens podem ser infectadas com *Leishmania* e podem ser considerados reservatórios, ou apenas hospedeiros. Reservatórios são aqueles indispensáveis na manutenção do ciclo do parasito no ambiente e na transmissão para o homem, hospedeiros são aqueles que podem se infectar,

mas não têm papel comprovado na manutenção do ciclo (Roque e Jansen, 2014). Os cães domésticos, raposas e outros canídeos são os principais reservatórios de *Leishmania infantum* no Brasil. Por esta razão, uma das medidas de controle utilizadas no país é a eliminação de cães soropositivos. Entretanto, essa medida não tem demonstrado resultados satisfatórios, pois seria necessário eliminar todos os cães infectados (World Health Organization, 2010a; Harhay et al., 2011).

Durante o seu ciclo de vida, os parasitos do gênero *Leishmania* são encontrados no intestino do inseto vetor na forma promastigota, que é flagelada e móvel. A forma amastigota, que é ovalada e não possui flagelo, é encontrada nos fagolisossomos de macrófagos dos hospedeiros vertebrados. Embora os macrófagos sejam o principal tipo celular a se infectar, outras células como neutrófilos, fibroblastos e células dendríticas também são susceptíveis e têm importante papel no controle da infecção, sendo os neutrófilos, as primeiras células a se infiltrarem no local da infecção (Kaye e Scott, 2011; Sen e Chatterjee, 2011; Contreras et al., 2014; Tavares et al., 2014).

Durante o repasto sanguíneo, o flebotomíneo regurgita formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro. Estas formas são fagocitadas e se transformam em amastigotas que se multiplicam por divisão binária até que a célula se rompa e libere parasitos para infectar fagócitos vizinhos. O ciclo se completa quando os fagócitos infectados e amastigotas presentes no sangue são ingeridos pelos flebotomíneos, onde as amastigotas se transformam em promastigotas novamente (Figura 5) (Kaye e Scott, 2011).

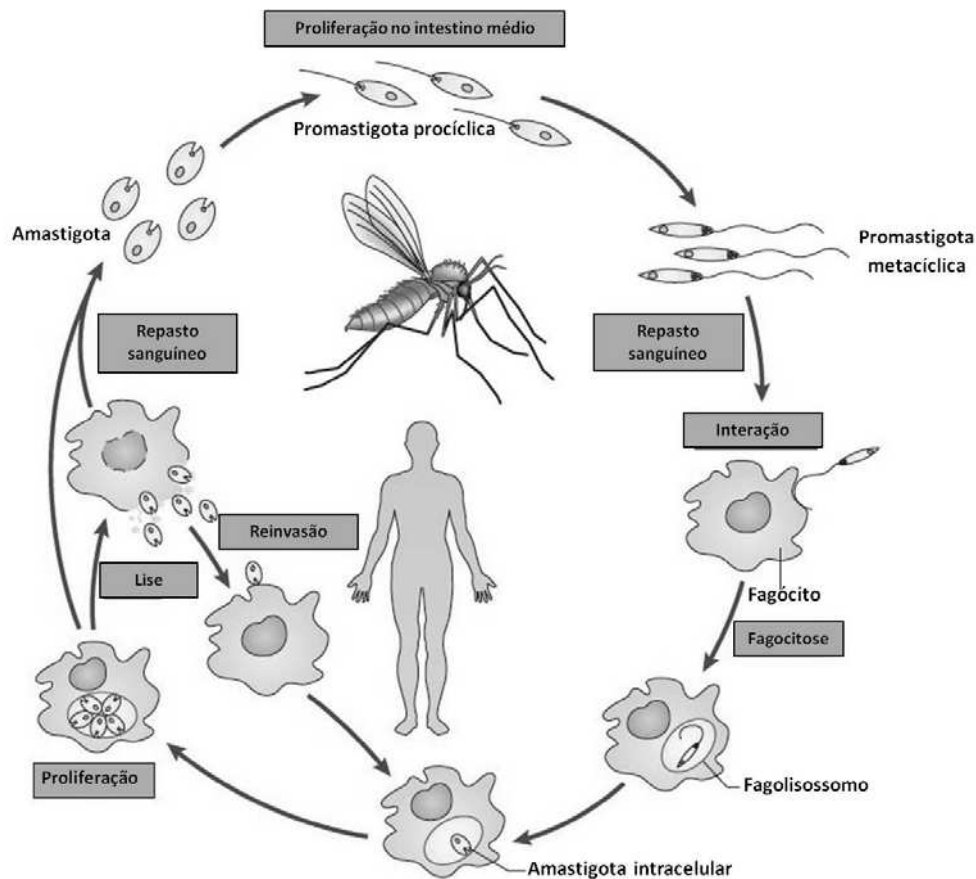


Figura 5: Representação esquemática do ciclo de vida da *Leishmania*. Fonte: Adaptado de Kaye & Scott, 2011 (Kaye e Scott, 2011)

3.2.3 Fisiopatologia das leishmanioses

As manifestações clínicas das leishmanioses dependem da espécie e virulência do parasito, bem como da resposta imune do hospedeiro (World Health Organization, 2004, 2010b). Na leishmaniose visceral, a forma mais grave da doença, os órgãos internos são acometidos e pode ocorrer febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e pancitopenia. Após o tratamento, a leishmaniose visceral pode evoluir para uma forma cutânea conhecida como leishmaniose dérmica pós-calazar. Se não tratada a leishmaniose visceral é fatal em até dois anos (World Health Organization, 2010b).

No Brasil, as formas cutâneas são as leishmanioses mais comuns. A forma cutânea clássica causa lesões tipicamente nos braços, pernas e na face. As lesões podem se desenvolver semanas, meses ou até anos após a infecção. A lesão inicial começa como uma pápula ou nódulo no local da inoculação, após pelo menos uma semana ela atinge o tamanho final e se torna uma úlcera com bordas elevadas. A forma cutânea difusa produz lesões

crônicas múltiplas e disseminadas. Podem ocorrer mais de 200 lesões e levar o indivíduo à invalidez. A forma mais desfigurante é a mucocutânea, que invade a mucosa do trato respiratório superior causando mutilações ao destruir o tecido mole do nariz, boca e garganta (World Health Organization, 2010a, 2010b) (Quadro 2).

Quadro 2: As principais espécies de *Leishmania* que afetam humanos

Principais manifestações clínicas	Espécies
Velho Mundo, subgênero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniose visceral	<i>Leishmania donovani</i> e <i>Leishmania infantum</i>
Leishmaniose cutânea	<i>Leishmania major</i> , <i>Leishmania tropica</i> e <i>Leishmania aethiopica</i>
Leishmaniose cutânea difusa	<i>Leishmania aethiopica</i>
Novo Mundo, subgênero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniose visceral	<i>Leishmania infantum</i>
Leishmaniose cutânea	<i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania mexicana</i> , <i>Leishmania pifanoi</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>
Leishmaniose cutânea difusa	<i>Leishmania mexicana</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>
Novo Mundo, subgênero <i>Viannia</i>	
Leishmaniose cutânea	<i>Leishmania braziliensis</i> , <i>Leishmania guyanensis</i> , <i>Leishmania panamensis</i> e <i>Leishmania peruviana</i>
Leishmaniose mucocutânea	<i>Leishmania braziliensis</i> e <i>Leishmania panamensis</i>

Fonte: Adaptado de Kaye & Scott, 2011 (Kaye e Scott, 2011)

3.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico das leishmanioses pode ser clínico ou feito com base em técnicas sorológicas, parasitológicas ou moleculares. A forma da doença e a disponibilidade de recursos são fatores determinantes para a seleção do método mais adequado a ser empregado (World Health Organization, 2010a).

Os sinais e sintomas da leishmaniose visceral não são específicos o suficiente para que o diagnóstico clínico seja conclusivo, testes laboratoriais são necessários para a confirmação dos casos suspeitos. As técnicas sorológicas, como ELISA e *western blotting*, apresentam elevada precisão. Porém, os anticorpos continuam detectáveis por vários anos após a cura, tornando o diagnóstico sorológico pouco confiável para recidivas. A detecção do DNA do parasito no sangue ou na medula óssea do hospedeiro por PCR é um método muito sensível, mas restrito a hospitais de referência e centros de pesquisa (World Health Organization, 2010a).

Por sua vez, o teste parasitológico permite a visualização da forma amastigota do parasito por avaliação microscópica de aspirados de tecidos sendo esta a forma clássica para confirmar do diagnóstico da infecção. Devido à sua alta especificidade, esse teste é considerado o padrão ouro para o diagnóstico diferencial das formas cutânea e cutânea difusa (World Health Organization, 2010a).

O espectro clínico das leishmanioses cutânea e cutânea difusa é muito amplo e pode ser confundido com várias outras doenças de pele. O diagnóstico parasitológico é o padrão ouro devido à sua alta especificidade e a amostra deve ser obtida por raspagem ou biópsia das lesões. Apesar de poder ser útil em estudos epidemiológicos, o diagnóstico sorológico não é muito utilizado devido a sua baixa sensibilidade (World Health Organization, 2010a).

Na forma mucocutânea da leishmaniose pode ser feito o diagnóstico clínico se as lesões forem típicas. A suspeita clínica aumenta nos pacientes com sorologia positiva por ELISA, mas o método mais sensível para a confirmação é a detecção do DNA do parasito por PCR. O diagnóstico parasitológico não é viável devido à baixa quantidade de parasitos nas lesões (World Health Organization, 2010a).

3.2.5 Quimioterapia

Os antimoniais pentavalentes (SbV), introduzidos no Brasil na década de 40, ainda hoje, são os medicamentos de primeira escolha na maior parte dos países acometidos pelas leishmanioses. Eles são comercializados na forma de antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostam®), sendo o primeiro o medicamento mais utilizado para tratar todas as formas das leishmanioses no país. O SbV, uma pró-droga, é convertido em SbIII pelos macrófagos do hospedeiro ou pela própria *Leishmania* (Wyllie et al., 2004). Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que atua nas formas amastigotas do parasito, inibindo o metabolismo da tripanotona e a ação da tripanotona redutase, comprometendo o potencial redox dos tióis intracelulares e aumentando o estresse oxidativo (Ephros e Bitnun, 1999; Wyllie et al., 2004). Estudos recentes sugerem que os antimoniais causam fragmentação do DNA da *Leishmania*, podendo ocorrer morte por processo semelhante à apoptose (Serenio et al., 2001).

No Brasil, a resposta ao tratamento com SbV varia de acordo com a forma clínica, com a atividade do sistema imune do hospedeiro e área geográfica (Croft, 1997; Teixeira e Almeida, 2001). O tratamento com SbV é longo, potencialmente tóxico e doloroso. A crescente incidência de resistência a esse medicamento tem gerado preocupação a respeito do seu uso em áreas endêmicas. Em algumas partes da Índia e do Nepal esse medicamento não é mais eficiente e foi substituído pela anfotericina B (World Health Organization, 2010b).

A anfotericina B e a pentamidina são medicamentos de segunda linha de escolha para o tratamento. Estudos relatam que a pentamidina interfere na síntese de DNA do parasito, inibe a topoisomerase mitocondrial e causa fragmentação da membrana mitocondrial. Contudo, este fármaco é altamente tóxico e já existem relatos de resistência (Singh et al., 2012). A anfotericina B interage com o ergosterol, um esteróide presente na membrana da *Leishmania*, causando aumento da porosidade e alterando a permeabilidade seletiva a cátions o que resulta na morte do parasito (Ramos et al., 1996). Apesar de sua eficácia, a anfotericina B é altamente tóxica e induz febre, calafrios e nefrotoxicidade, que frequentemente levam à interrupção do tratamento. Recentemente, a formulação lipossomal da anfotericina B, está sendo usada no tratamento das leishmanioses e, por ser menos tóxica, tornou-se uma importante alternativa terapêutica para a quimioterapia da leishmaniose visceral. Entretanto, essa formulação não pode ser amplamente utilizada devido ao seu elevado custo (Gil, ES. Paula, JR, Nascimento FRF, 2009; World Health Organization, 2010b; Singh et al., 2012).

Nos últimos dez anos, novos medicamentos foram licenciados para o tratamento das leishmanioses como a miltefosina e a paromomicina. A miltefosina é atualmente o único fármaco leishmanicida administrado por via oral. O mecanismo de ação da miltefosina ainda não foi completamente esclarecido. Sabe-se que o fármaco gera um processo de morte similar à apoptose e reduz o conteúdo lipídico da membrana das promastigotas (Paris et al., 2004; Loiseau e Bories, 2006). A segurança do uso da miltefosina é comprometida por sua longa meia vida e teratogenicidade. Por sua vez, a paromomicina inibe a síntese proteica por meio da inibição da translocação e reciclagem de subunidades ribossômicas (Singh et al., 2012).

Apesar dos avanços realizados nos últimos anos em quimioterapia das leishmanioses, os fármacos atualmente disponíveis possuem limitações como via de administração, preço, toxicidade, eficácia e resistência dos parasitos. Portanto, o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos é importante para o controle dessas doenças e deve ser uma prioridade na pesquisa sobre essas doenças (Singh et al., 2012).

3.3 Desenvolvimento de fármacos – os produtos naturais bioativos (PNB)

Inovações no campo das ciências da saúde têm resultado em um dramático aumento na capacidade de tratar doenças e melhorar a qualidade de vida da população. Neste cenário, os gastos com medicamentos cresceram mais rápido do que com outros elementos importantes do sistema de saúde desde a década de 90. O processo de descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos é, porém, uma tarefa lenta e onerosa (DiMasi et al., 2003). Para se aprovar um novo fármaco gasta-se em média 10 anos e 800 milhões de dólares, sendo que a cada 5000 *leads* apenas uma substância será aprovada para uso (Balunas e Kinghorn, 2005).

Diversos caminhos podem ser seguidos para se desenvolver um novo fármaco. O mais expressivo deles é o descobrimento e desenvolvimento de novas substâncias ativas (DiMasi et al., 2003).

A busca por novas substâncias bioativas baseada em produtos naturais é uma prática comum no desenvolvimento de medicamentos. Os produtos naturais, além de serem tradicionalmente utilizados na terapia de várias doenças, representam estruturas químicas valiosas que podem ser modelos para o desenvolvimento de fármacos (Schmidt et al., 2012a).

Os metabólitos secundários produzidos por plantas e fungos como resposta adaptativa a variações ambientais pertencem a diversas classes de substâncias e são importante fonte de PNBs (Balandrin et al., 1985; Schulz et al., 2002). Dentre estas, os terpenóides, flavonóides e quinonas se destacam por possuírem um amplo espectro de atividades biológicas, tendo contribuído com diversas substâncias ativas para doenças causadas por protozoários (Schmidt et al., 2012a, 2012b).

O isolamento e a purificação de substâncias ativas a partir de plantas medicinais foi uma das maiores forças que levou à criação da indústria farmacêutica no século 19 (Sen e Chatterjee, 2011). Atualmente, tecnologias avançadas de purificação e identificação estrutural dos PNBs facilitam o uso de plantas e microorganismos para a descoberta de novos fármacos (Mukhtar et al., 2008). Ainda com os avanços tecnológicos disponíveis atualmente, o estudo de PNBs enfrenta diversos entraves como: a dificuldade de isolamento de substâncias ativas provenientes de extratos complexos; a pequena quantidade em que estas substâncias geralmente são isoladas; o tempo que se gasta neste processo; a variabilidade das substâncias produzidas por espécimes diferentes de uma mesma espécie de planta ou microorganismo; a incompatibilidade do estudo da atividade de PNB com os ensaios biológicos de alto rendimento utilizados na indústria farmacêutica e a disponibilidade limitada de financiamento para estudos nesta área (Kingston, 2010).

Mesmo com todas as dificuldades enfrentadas, os produtos naturais representam um importante papel na busca por novas substâncias ativas. Na revisão publicada por Schmidt e colaboradores (Schmidt et al., 2012a), diversos exemplos do potencial dos produtos naturais para o desenvolvimento de fármacos contra doenças causadas por protozoários são apresentados. Sabe-se que entre os anos 1981 e 2010, cerca de 50% dos fármacos aprovados para o tratamento de doenças parasitárias e câncer foi de origem natural (Newman e Cragg, 2012). Um grande exemplo de PNB historicamente utilizado com sucesso como medicamento é o alcalóide quinina, que ainda hoje é usado no combate à malária (Achan et al., 2011).

Tendo em vista a variedade de estruturas químicas dos PNBs, estes podem interferir em processos biológicos bastante diversos. Portanto, além da identificação da atividade biológica dos produtos naturais, a investigação dos alvos celulares e mecanismos de ação relacionados à bioatividade são de grande importância (Sen e Chatterjee, 2011). Estes estudos permitem a identificação de novos alvos terapêuticos e mecanismos de ação, contribuindo com o desenvolvimento de novas abordagens para o processo de descobrimento de fármacos (Sen e Chatterjee, 2011; Schenone et al., 2013).

Quando uma nova substância promissora é identificada, estudos de toxicologia, elucidação de alvos e de mecanismos de ação podem aumentar as

chances de aprovação do fármaco, fazer com que os ensaios clínicos sejam realizados com maior segurança e eficácia, economizando tempo, dinheiro e o mais importante, a vida dos pacientes (Nature, 2010).

4 MÉTODOS

4.1 Levantamento bibliográfico

A partir dos PNB e derivados de produtos naturais bioativos (dPNB) disponíveis no LQPN, foi feito o levantamento bibliográfico para identificar quais já possuíam atividades e mecanismos de ação descritos nos modelos de interesse. Dessa forma, foram selecionados aqueles que não possuíam relatos do mecanismo de ação. Foram utilizados os bancos de dados do SciFinder® (American Chemical Society) e Web of Science™ (Thomson Reuters). Para a busca foram utilizados os nomes e as estruturas químicas das substâncias bem como as palavras chave:

- i. *Leishmania*;
- ii. *Trypanosoma cruzi*;
- iii. *mechanism*;
- iv. *mode of action*.

4.2 Amostras para bioensaios

O presente projeto foi aprovado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético para acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica (Anexo 8.1).

Para verificar o grau de pureza e a estabilidade dos PNB e dPNB selecionados, estes foram submetidos à análise de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV (HPLC-DAD) em sistema constituído de bomba Shimadzu modelo LC-10AD, fase móvel acetonitrila e água em gradientes variados com fluxo de 1mL/min, coluna Supelco Ascentis C18 com partículas de 4 µm e detector por arranjo de fotodiodos, modelo SPD-M20A. Para análises por HPLC acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) foi utilizado o sistema constituído por uma bomba Shimadzu, modelo Nexera, coluna Shimadzu Shim-pack XR-ODS III com partículas de 2,2 µm e poros de 80 Å e como fase móvel acetonitrila e água (0,1% de ácido fórmico) em gradientes variados e fluxo de 200 µL/min. Como detector utilizou-se o espectrômetro de massas Briker modelo MaXis ETD. Estas análises foram realizadas por pessoal especializado do LQPN. As substâncias foram injetadas na concentração de 1 mg/mL em um injetador Reodyne com *loop* de 20 µL (Anexo 8.3). O software utilizado (LabSolution) fornece a porcentagem da

pureza da amostra com base nos cálculos em relação à área de cada pico. Foram consideradas puras as substâncias que apresentaram grau de pureza superior a 95 %.

Para o preparo das soluções estoque, os PNB e dPNB foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich) no momento do uso. As soluções foram preparadas nas concentrações de 20 ou 10 mg/mL, dependendo da solubilidade de cada substância. Diluições posteriores foram realizadas em meio de cultura, de acordo com a concentração desejada em cada ensaio.

4.3 Linhagem Celular e Parasitos

As células de origem monocítica humana da linhagem THP-1 (ATCC® TIB-202™, Anexo 8.2) foram cultivadas em frascos de cultura T75 (Sarstedt) contendo 20 mL de meio RPMI 1640 (INLAB), suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado (SFB; Gibco), penicilina (50 U/mL) e estreptomicina (50 µg/mL) (Gibco), mantidas em estufa com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C. A manutenção das culturas foi realizada a cada 3 dias e a densidade de células foi mantida entre 4 x 10⁵ e 10 x 10⁵. Para avaliação da viabilidade celular, as células foram coradas com azul de tripan (20%, Sigma-Aldrich) e visualizadas em microscópio óptico CKX41 (Olympus).

As promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (cepa IFLA/BR/67/PH-8) foram cultivadas em frascos de cultura T25 (SPL life sciences) contendo meio Schneider (Sigma-Aldrich) pH 7,2, suplementado com 10 % de SFB, penicilina (50 U/mL) e estreptomicina (50 µg/mL), mantidas a 25 °C em estufa BOD. Subculturas foram realizadas a cada 3 dias sendo feita a transferência de 10 µL da cultura de parasitos para novo frasco de cultura contendo 5 mL de meio Schneider. Os ensaios que utilizaram a cepa IFLA/BR/67/PH-8 foram realizados no LQPN do Centro de Pesquisas René Rachou, em Belo Horizonte.

Alguns ensaios foram realizados no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, onde apenas a cepa MHOM/BR/77/LTB0016 de *Leishmania* estava disponível. As amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (cepa MHOM/BR/77/LTB0016) foram obtidas de lesões de pata de camundongos Swiss infectados. Os camundongos foram submetidos à

eutanásia em câmara de CO₂, a lesão foi removida cirurgicamente e posteriormente macerada com o auxílio de bisturi. Os fragmentos de lesão foram vigorosamente homogeneizados em meio RPMI para que as células se rompessem e liberassem os parasitos. As amastigotas foram purificadas por centrifugação diferencial a 900 e 2300 rotações por minuto (min) em RPMI pH 7,2 suplementado com 5 % de SFB, penicilina (50 U/mL) e estreptomicina (50 µg/mL). Parte das amastigotas era usada para a realização de experimentos imediatamente após a sua obtenção e outra parte era usada para transformação em promastigotas por meio de cultivo em meio Schneider pH 7,2 a 29 °C em estufa BOD. Subculturas das promastigotas foram realizadas a cada 3 dias sendo feita a transferência de 500 µL da cultura de parasitos para tubo falcon (BD) contendo 30 mL de meio Schneider suplementado. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz como procedimento de rotina para obtenção de parasitos.

As culturas da cepa Tulahuen de *Trypanosoma cruzi* e da linhagem de fibroblastos de camundongo L929 (ATCC® CCL-1™), foram mantidas conforme protocolo adotado na Plataforma de Ensaios Pré-Clínicos de Triagem de Drogas Anti-*Trypanosoma cruzi* do Centro de Pesquisas René Rachou, por técnicos da referida plataforma. Células L929 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Invitrogen), suplementado com 10 % de SBF (Gibco) e glutamina 2 mM (Invitrogen), mantidas em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂. A manutenção das culturas foi realizada a cada 7 dias sendo transferidas 150.000 ou 450.000 células por garrafa (Nunc) de T25 ou T75, respectivamente. Tripomastigotas da cepa Tulahuen de *T. cruzi* foram cultivados em células L929 e eram usados em sucessivas infecções na proporção de 20:1 para a manutenção da cultura de parasitos e para realização de experimentos.

4.4 Ensaio biológico para detecção de atividade leishmanicida

Cultura de macrófagos: Para o ensaio de detecção de atividade leishmanicida foram utilizados macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* (cepa IFLA/BR/67/PH-8). Os macrófagos foram obtidos por meio da diferenciação de monócitos da linhagem THP-1 (Gebre-Hiwot et al., 1992; Siqueira-Neto et al., 2010). Essas células foram semeadas (2 x 10⁵ células/poço em 1 mL) em placas de 24 poços (Jet- Biofil) contendo lamínulas

circulares de 13 mm (Glasscyto) e incubadas por 72 horas (h) em meio RPMI suplementado contendo 12-miristato-13-acetato de forbol na concentração de 50 ng/mL (PMA; Sigma Aldrich) a 37 °C em estufa com 5 % de CO₂.

Infecção: Após o período de incubação, os macrófagos diferenciados e aderidos às lamínulas foram expostos às formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* oriundas de culturas em fase estacionária. Para isso, após a determinação da densidade de parasitos em contador automático (Beckman Coulter), os mesmos foram suspensos em volume adequado de meio RPMI suplementado para densidade final de 4 x 10⁶ parasitos/mL. Foram aplicados sobre os macrófagos 500 µL dessa suspensão (2 x 10⁶ parasitos/poço = proporção 10:1). Após 5 h de interação, o sobrenadante contendo os parasitos livres foi removido e substituído por 1 mL de meio RPMI suplementado.

Tratamento: As soluções estoque dos PNB e dPNB foram solubilizadas em meio de cultura RPMI suplementado. A concentração final dos PNB e dPNB foi de 20 µg/mL, e a concentração máxima de DMSO foi 0,5 % (v/v). A solução de anfotericina B (Cristália) preparada em meio de cultura RPMI suplementado, foi utilizada na concentração final de 1 µg/mL. As culturas foram incubadas por 72 h a 37°C em estufa contendo 5 % de CO₂.

Coloração e análise: Foi feita uma adaptação da técnica proposta por Jain e colaboradores (Jain et al., 2012). Após o período de incubação, as lamínulas foram coradas com Panótico Rápido (Laborcin) e montadas em lâminas de vidro com Entellan[®] (Merck Millipore). Cerca de 10 imagens de cada lamínula foram adquiridas em microscópio Axio Observer A1 (Zeiss) no aumento de 40 vezes. Posteriormente foi realizada a contagem de 100 células por lamínula e a quantidade de amastigotas em cada célula. Esta contagem foi realizada utilizando as imagens adquiridas de cada lamínula, com o auxílio do programa Image J (Versão 1.47, Wayne Rasband National Institutes of Health). A porcentagem de redução do número de amastigotas em 100 macrófagos foi denominada atividade antiamastigota (AA) e foi calculada por meio da equação:

$$AA = \left[1 - \left(\frac{n^{\circ} \text{ de amastigotas em } 100 \text{ macrófagos tratados}}{n^{\circ} \text{ de amastigotas em } 100 \text{ macrófagos controle}} \right) \right] \times 100$$

Os PNB e dPNB que apresentaram AA superior a 70 % foram considerados ativos.

4.5 Ensaio biológico para detecção de atividade tripanocida

Foi utilizado o ensaio desenvolvido por Buckner e colaboradores (Buckner et al., 1996), com modificações. Assim, fibroblastos de camundongos da linhagem L929 foram semeados em placas de 96 poços (TPP) em meio de cultura RPMI suplementado e incubados por 24 h a 37 °C para permitir a adesão. Em seguida, foi realizada a infecção utilizando-se 10 tripomastigotas/célula. Após 2 h, o meio contendo os parasitos não internalizados foi substituído por meio novo e a placa novamente incubada a 37 °C por 48 h. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por meio novo, contendo os PNB e dPNB a serem testados a 20 µg/mL. Após 96 h de incubação, foi adicionado o substrato vermelho de clorofenol β-D-galactopiranosídeo (CPRG, Roche), a placa foi novamente incubada a 37 °C, e a leitura realizada após 16-20 h em espectrofotômetro Spectramax 190 (Molecular Devices) utilizando um filtro de λ_{570} nm. O benzonidazol na concentração de 3,81 µM (CI₅₀) foi utilizado como controle de tratamento. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição do crescimento parasitário. Os PNB e dPNB que inibiram o crescimento do parasito em mais de 70 % foram considerados ativos. Esse ensaio foi realizado por técnicos da Plataforma de Ensaio Pré-Clínicos de Triagem de Drogas Anti-*Trypanosoma cruzi* do Centro de Pesquisas René Rachou.

4.6 Determinação da CI₅₀ dos PNB e dPNB em diferentes modelos de *L. (L.) amazonensis*

A CI₅₀ das substâncias ativas foi determinada nos modelos experimentais de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (cepa IFLA/BR/67/PH-8), macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* (cepa IFLA/BR/67/PH-8) e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* derivadas de lesão de camundongo (cepa MHOM/BR/77/LTB0016).

Para o ensaio utilizando promastigotas, parasitos oriundos de cultura em fase estacionária foram semeados em placas de 96 poços na densidade de 4×10^6 /mL em meio Schneider suplementado contendo diferentes concentrações dos PNB e dPNB e incubados a 25 °C por 48 h em estufa BOD. Para a

obtenção das concentrações desejadas, foram preparadas diluições seriadas em meio Schneider a partir das soluções estoque dos PNB e dPNB. A TNQ foi testada a 7,5; 3,75; 1,88; 0,94; 0,47; 0,23; 0,12 e 0,06 µg/mL, sendo a maior concentração de DMSO utilizada de 0,37 % (v/v). O lapachol foi testado a 100; 20; 10; 5; 2,5 e 1,25 µg/mL, sendo a maior concentração de DMSO utilizada de 0,5 % (v/v). A anfotericina B foi utilizada como controle de tratamento a 1 µg/mL.

Após 48 h de incubação com as substâncias, foram adicionados a cada poço 20 µL de solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma Aldrich) a 5 mg/mL (concentração final de 0,5 mg/mL) e a placa foi incubada por 4 h a 25 °C em estufa BOD. Posteriormente as placas foram centrifugadas a 2300 rotações por min para a sedimentação dos parasitos e cristais de formazan. Em seguida, todo o volume dos poços foi removido e os cristais de formazan foram solubilizados em solução de isopropanol e de ácido clorídrico (HCl) 0,6% (v/v). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices) em dois comprimentos de onda: λ_{570} nm e λ_{670} nm (39,40). A porcentagem de inibição do crescimento das promastigotas foi realizado com base na absorbância das amostras por meio da equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(\text{leitura do controle} - \text{leitura do tratado})}{\text{leitura do controle}} \times 100$$

A determinação da CI_{50} no modelo de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* foi realizada conforme descrito no item 4.4 e o tempo de incubação usado foi de 48 h. Para a obtenção das concentrações desejadas, foram preparadas diluições seriadas em RPMI suplementado a partir das soluções estoque dos PNB e dPNB. A TNQ foi testada a 8; 6; 5; 4; 2; 1; 0,5 e 0,25 µg/mL, sendo a maior concentração de DMSO utilizada de 0,8% (v/v). O lapachol foi testado nas concentrações de 60; 30; 15; 7,5 e 3,75 µg/mL, sendo a maior concentração de DMSO utilizada de 0,3% (v/v).

Para o ensaio com amastigotas derivadas de lesão, parasitos oriundos de lesão de pata de camundongos Swiss foram semeados em placas de 96 poços (TPP) em meio RPMI suplementado na densidade de 5×10^6 e incubados a 29 °C por 48 h com as mesmas concentrações dos PNB utilizadas no ensaio de CI_{50} em macrófagos infectados. Após o tempo de incubação a

densidade de parasitos em cada concentração das substâncias e nos controles foi determinada por contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico. A porcentagem de inibição do crescimento das amastigotas derivadas de lesão de camundongo foi calculada por meio da equação:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \left(\frac{n^{\circ} \text{ de amastigotas tratadas} \times 100}{n^{\circ} \text{ de amastigotas controle}} \right)$$

As curvas dose resposta e o cálculo da CI_{50} das substâncias em teste foram feitos por regressão não linear usando o programa GraphPad Prism 4.01 (GraphPad Software, Inc.).

4.7 Determinação do índice de seletividade

O IS é a razão entre as concentrações que reduzem em 50 % a viabilidade das células de mamíferos e do parasito. Para este fim, as CI_{50} dos PNB e dPNB foram determinadas em macrófagos. As células foram semeadas em placas de 96 poços (10^6 células/mL e 200 μ L/poço) e incubadas por 72 h em meio RPMI suplementado contendo PMA a 50 ng/mL, a 37 °C em estufa com 5 % de CO_2 . Após o período de incubação o meio de cultura foi substituído e as células tratadas com diferentes concentrações dos PNB e dPNB por 48 h. Para a obtenção das concentrações desejadas, foram preparadas diluições seriadas em RPMI suplementado a partir das soluções estoque dos PNB e dPNB. A TNQ foi testada a 30; 15; 7,5; 3,75; 1,87 e 0,93 μ g/mL, sendo a maior concentração de DMSO utilizada de 1 % (v/v). O lapachol foi testado a 1000; 500; 250; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 μ g/mL, sendo a maior concentração de DMSO utilizada de 0,5 % (v/v). Dodecil sulfato de sódio (SDS, Ludwig) a 0,1 μ g/mL foi utilizado como controle de tratamento. A incubação com MTT, diluição dos cristais de formazan, leitura em espectrofotômetro, cálculos de percentual de morte e as curvas dose resposta foram feitos conforme descrito no item 4.6.

Com os dados obtidos nos ensaios de determinação de CI_{50} foi calculado o índice de seletividade (IS) conforme equação (Romanha et al., 2010):

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ macrófago}}{CI_{50} \text{ parasito}}$$

4.8 Ensaio de inibição da tripanotona redutase heteróloga de *T. cruzi* (TcTR)

Os ensaios de inibição da tripanotona redutase heteróloga de *T. cruzi* TcTR foram realizados no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC, sob a coordenação do Dr. Mário Steindel, segundo o método descrito por Hamilton e colaboradores (Hamilton et al., 2003). O ensaio consiste em um teste colorimétrico em microplaca baseado na derivatização da tripanotona. De forma sucinta, a TcTR reduz o substrato tripanotona ($T[S]_2 \rightleftharpoons T[SH]_2$) e o DTNB (reagente de Ellman) regenera a tripanotona reduzida ($T[SH]_2 \rightleftharpoons T[S]_2$), liberando TNB, o qual gera um cromóforo amarelo que é mensurado a λ_{412} nm. Desta forma, o reagente de Ellman mantém constante a concentração do substrato e permite a linearidade da cinética enzimática.

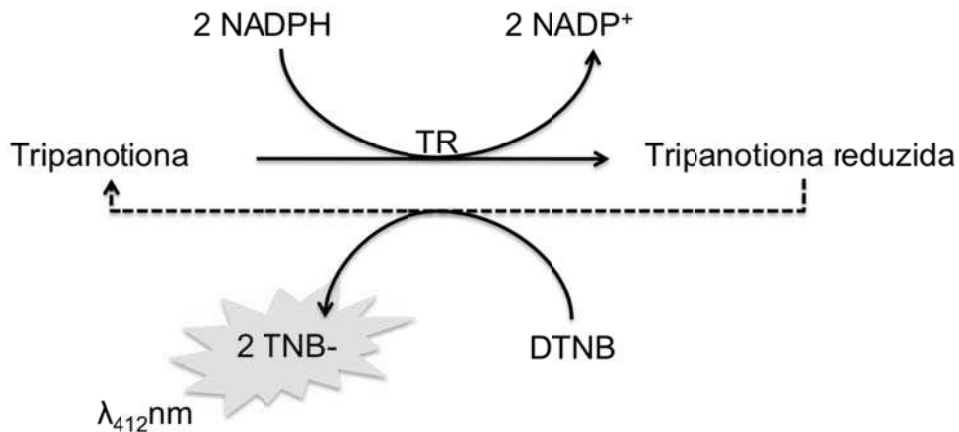


Figura 6: Esquema representativo do ensaio enzimático de inibição da TR

O ensaio enzimático foi conduzido em placas de 96 poços em um volume final de 250 μ L contendo: 40 mM de HEPES (pH 7,5), 1 mM de EDTA, 150 μ M de NADPH, 1 μ M de tripanotona (Bachem, Torrance), 25 μ M de DTNB (Sigma-Aldrich), 40 ng da enzima (TcTR) e 100 μ M dos PNB e dPNB selecionados em uma concentração máxima de 1 % de DMSO (v/v). Como controles, foram utilizados o inibidor clomipramina (Sigma-Aldrich) em diferentes concentrações e o solubilizante DMSO 1 %. Como branco, foram utilizados os PNB e dPNB a 100 μ M, incubados com todos os reagentes, menos a enzima. A mistura foi pré-incubada a 30 °C durante 30 min e a leitura iniciada após a adição de 25 μ M de DTNB em λ_{412} nm, medindo-se a inclinação da curva durante 30 min (dAbs/dt). Este valor foi comparado com o controle DMSO 1 % para fornecer o percentual de inibição da enzima. Foram realizados

três ensaios independentes em triplicata e os resultados expressos como o percentual de redução na atividade enzimática comparado ao controle DMSO.

4.9 Alteração do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. (L) amazonensis*

Para análise do possível efeito dos PNB e dPNB selecionados sobre a mitocôndria dos protozoários foi utilizado o marcador éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE, Sigma-Aldrich), que permite a análise do potencial de membrana mitocondrial. O TMRE é um fluorocromo laranja avermelhado, carregado positivamente, que penetra na célula e se acumula em mitocôndrias ativas, as quais possuem carga relativamente negativa. Populações de parasitos com a mitocôndria intacta são marcadas por TMRE e podem ser detectadas por citometria de fluxo. Por sua vez, células cujas mitocôndrias têm o potencial de membrana diminuído ou perdido, falham em manter a marcação. Parasitos (cepa MHOM/BR/77/LTB0016) na forma promastigota (20×10^6 células/mL) foram tratados com as substâncias selecionadas na concentração das respectivas CI_{50} e incubados por 4 ou 24 h. Após esse período os parasitos foram incubados com 50 μ M de TMRE à temperatura ambiente por 15 min. Como controle de tratamento os parasitos foram submetidos a um choque térmico de 56°C por 2 h (Soeiro e de Souza, 2008). A aquisição dos dados e análise dos resultados foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson), equipado com o software Cell Quest (Becton & Dickinson), utilizando o canal FL2-H. Análises posteriores foram realizadas no software SUMMIT (versão 3.1, Cytomation) (Santa-Rita et al., 2004).

Os resultados foram apresentados como porcentagem de variação da população marcada que foi calculada por meio da equação:

$$\% \text{ de variação} = \left(\frac{\% \text{ população marcada no grupo teste}}{\% \text{ população marcada no grupo controle}} \times 100 \right) - 100$$

4.10 Análise da função mitocondrial de promastigotas de *L. (L) amazonensis* por respirometria

As taxas de consumo de oxigênio de promastigotas de *L. (L) amazonensis* foram avaliadas por respirometria de alta resolução (Oxígrafo-2K; OROBOROS Instruments). Essa técnica se baseia na determinação da concentração de oxigênio no tampão por meio do uso de eletrodos presentes

no oxígrafo. Cada amostra foi incubada com 2 mL de tampão de respiração contendo sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$; 125 mM), cloreto de potássio (KCl, 65 mM), Tris-HCl (pH 7,2; 10 mM), cloreto de magnésio ($MgCl_2$; 1 mM), fosfato de potássio (K_3PO_4 ; 2,5 mM) e succinato ($C_4H_6O_4$; 5 mM) (Vercesi e Bernardes 1991), sob constante agitação, a 29 °C. Os parasitos (cepa MHOM/BR/77/LTB0016) foram adicionados nas câmaras (3×10^7 a 5×10^7 parasitos por câmara) e mantidos por 15 min para a estabilização da leitura do consumo de oxigênio. Em seguida, foi adicionada metade da CI_{50} das substâncias e os parasitos foram incubados por 20 min. Após este período, as substâncias foram adicionadas novamente, em quantidade suficiente para atingir a CI_{50} e os parasitos foram incubados por 2 h. O efeito induzido pelo veículo usado para a solubilização das substâncias (DMSO, concentração máxima 0,25 % v/v) sobre a respiração dos parasitos, foi avaliado nas mesmas condições. Os dados foram analisados com o software DatLab (OROBOROS Instruments) para determinação da concentração de oxigênio em picomol/min/mL/ 10^7 parasitos. Como controle de tratamento, foi usada a antimicina A (1,25 µg/mL), a qual foi adicionada ao final das leituras para inibir a respiração mitocondrial.

4.11 Análise ultraestrutural

Parasitos (cepa IFLA/BR/67/PH-8) não tratados ou tratados (4, 24 e 48 h) com a CI_{50} da TNQ ou do lapachol, foram lavados em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) e fixados em solução contendo 2,5 % de glutaraldeído ($C_5H_8O_2$) em tampão cacodilato de sódio (0,1 M; pH 7,2) por 60 min. Em seguida, foram pós-fixados por uma hora em solução contendo 1 % de tetróxido de ósmio (OsO_4), 0,8 % ferricianeto de potássio ($C_6N_6FeK_3$), cloreto de cálcio ($CaCl_2$; 5 mM) em tampão cacodilato 0,1 M. Após esta etapa, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, infiltradas e incluídas em epon (Fluka Analytical). Cortes ultrafinos (aproximadamente 70 nm de espessura) foram obtidos em ultramicrotomo (Leica EMUC6), contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico de transmissão JEM- 1011 (JEOL).

4.12 Análises estatísticas

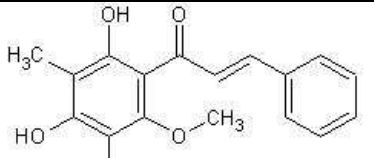
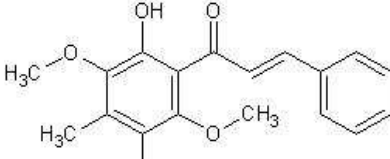
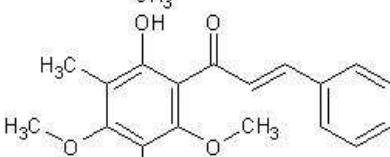
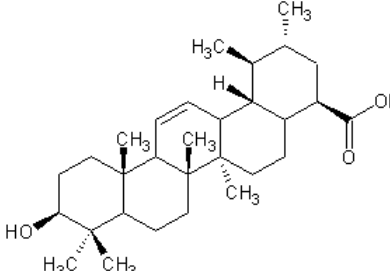
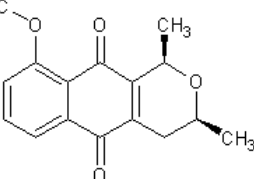
As análises estatísticas foram realizadas com o pacote GraphPad Prism 4.01 (GraphPad Software, Inc.). Para realizar comparações entre grupos utilizou-se a análise de variância ANOVA e o teste de Bonferroni. Adotou-se o limite de significância $p < 0.05$.

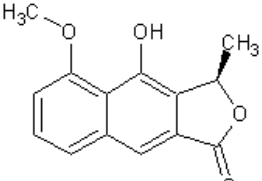
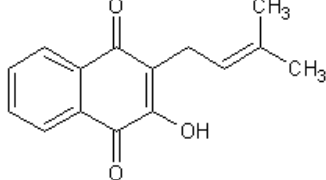
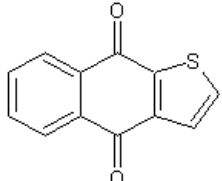
5 RESULTADOS

5.1 Seleção dos PNB e dPNB

Por meio de busca na literatura científica, foram identificados dentre os PNB e dPNB disponíveis no LQPN, aqueles com atividades leishmanicida ou tripanocida e sem mecanismo de ação descrito. Oito substâncias foram selecionadas sendo sete PNB e um dPNB (tiofenonaftoquinona). Dentre estes, encontram-se três chalconas (chalcona 1, chalcona 2 e aurentiacina (Siqueira et al., 2011), o ácido ursólico (Siqueira et al., 2011) e quatro naftoquinonas (eleuterine, eleuterol (Alves et al., 2003), lapachol e tiofenonaftoquinona (Zani et al., 1997) (Tabela 1).

Tabela 1: PNB e dPNB selecionados

PNB/dPNB	Estrutura	Massa molecular	Principais bioatividades descritas na literatura
Chalcona 1		298,33 g/mol	Antitumoral e leishmanicida (Siqueira et al., 2011)
Chalcona 2		312,15 g/mol	Antitumoral e leishmanicida (Siqueira et al., 2011)
Aurentiacina		298,33 g/mol	Antibacteriana (Amor et al., 2007)
Ácido ursólico		456,70 g/mol	Antitumoral, leishmanicida e tripanocida (Abe et al., 2002; Shishodia et al., 2003; Siqueira et al., 2011; Wang et al., 2012)
Eleuterine		272,30 g/mol	Antitumoral e fungicida (Hong et al., 2008)

Eleuterol		244,24 g/mol	Antitumoral e antioxidante (Arung et al., 2011)
Lapachol		242,27 g/mol	Antitumoral, leishmanicida e tripanocida (Hussain et al., 2007; Salas et al., 2008; Almeida, 2009)
Tiofenonaftoquinona (TNQ)		214,24 g/mol	Antiplasmodium e tripanocida (Zani et al., 1997)

5.2 Análises de pureza e identidade das substâncias

Para o desenvolvimento deste projeto de forma segura, eficaz e econômica foi necessária a garantia de que as amostras utilizadas durante os ensaios biológicos apresentassem um percentual de pureza alto. A identidade e a pureza das substâncias foram analisadas por HPLC-DAD e LC-MS/MS. Todas as substâncias apresentaram grau de pureza superior a 95 % (Anexo 8.3), mostrando que as mesmas não se encontravam degradadas e estavam em estado adequado para a realização de ensaios biológicos. A massa molecular e estrutura química das chalconas foram confirmadas e as análises podem ser encontradas no anexo 8.4.

5.3 Atividade leishmanicida dos PNB e dPNB

Com o objetivo de identificar ou confirmar a atividade leishmanicida dos PNB e dPNB, foi realizada uma triagem utilizando modelo *in vitro* de macrófagos humanos infectados por *L. (L.) amazonensis* (Figura 7). Foram considerados ativos os PNB e dPNB com AA superior a 70 % a 20 µg/ml após 72 h de incubação. Dentre as oito substâncias selecionadas, três naftoquinonas e três chalconas demonstraram atividade leishmanicida tendo AA de 85 a 99 % (Tabela 2).

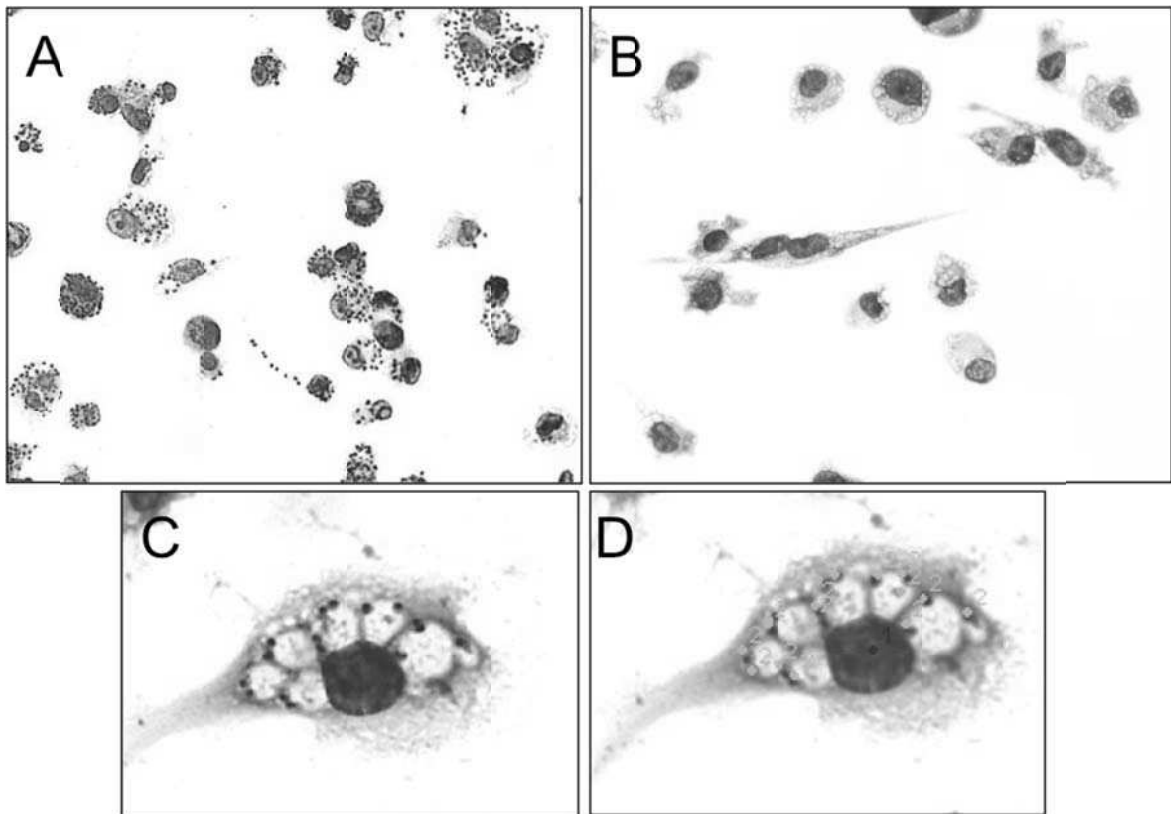


Figura 7: Imagens representativas de macrófagos humanos infectados por *L. (L.) amazonensis*, corados com panótico e observados ao microscópio Axio Observer A1 (Zeiss). (A) imagem de lâmina de macrófagos infectados sem tratamento e (B) grupo tratado com anfotericina B. (C) ampliação de um macrófago infectado. (D) representação de contagem de macrófagos e amastigotas intracelulares utilizando o programa Image J

Tabela 2: Porcentagem de redução do número de amastigotas intramacrófago (atividade anti-amastigota) induzida pelos PNB e dPNB

PNB/dPNB [μ M]	Atividade anti-amastigota a 20 μ g/mL
TNQ [93]	99%
Chalcona 1 [67]	99%
Chalcona 2 [64]	99%
Eleuterine [73]	99%
Aurentiacina [67]	98%
Lapachol [83]	85%
Ácido Ursólico [44]	55%
Eleuterol [82]	45%
Anfotericina B * [1]	99%

Legenda: * A anfotericina B foi usada a 1 μ g/mL, o que corresponde a 1 μ M

5.4 Atividade tripanocida dos PNB e dPNB

A fim de identificar ou confirmar a atividade tripanocida dos PNB e dPNB, foi utilizado o modelo *in vitro* de fibroblastos de camundongos infectados por *T. cruzi*. O critério adotado neste trabalho para classificar as substâncias como ativas foi a capacidade de inibir o crescimento parasitário em no mínimo 70 % a 20 μ g/mL. Quando os PNB e dPNB foram tóxicos para a linhagem de células L929 a 20 μ g/mL, estes foram testados a 10 μ g/mL. Na tabelas 3 e 4 estão descritas as atividades tripanocida das substâncias. Dentre os oito PNB e dPNB selecionados, a aurentiacina demonstrou atividade fraca e a TNQ atividade moderada. Entretanto, nenhum deles foi suficientemente ativo para atingir o critério supracitado.

Tabela 3: Representação da inibição do crescimento parasitário induzido pelos PNB e dPNB a 20 μ g/mL

PNB/dPNB [μ M]	Inibição do crescimento parasitário a 20 μ g/mL
Aurentiacina [67]	66%
Lapachol [83]	30%
Ácido Ursólico [44]	0%
Eleuterol [82]	0%
Benzonidazol* [3,8]	50%

Legenda: * O benzonidazol foi usado na CI_{50} (1 μ g/mL ou 3,8 μ M)

Tabela 4: Representação da inibição do crescimento parasitário induzido pelos PNB e dPNB a 10 μ g/mL

PNB/dPNB [μ M]	Inibição do crescimento parasitário a 10 μ g/mL
TNQ [47]	62%
Chalcona 1 [34]	55%
Eleuterine [37]	13%
Chalcona 2 [32]	1%
Benzonidazol* [3,8]	50%

Legenda: * O benzonidazol foi usado na CI_{50} (1 μ g/mL ou 3,8 μ M)

5.5 Seleção de PNB e dPNB

Após a identificação da atividade dos PNB e dPNB nos modelos biológicos utilizados neste trabalho, foram selecionados aqueles que teriam o mecanismo de ação estudado. Dentre as substâncias que demonstraram atividade leishmanicida, foram selecionadas aquelas que estavam disponíveis em maior quantidade (Figura 8). A tiofenonaftoquinona, o único dPNB utilizado neste estudo, reduziu em 99% a infecção por *L. (L.) amazonensis* e sua síntese é realizada com alto rendimento (Zani et al., 1997). Com o objetivo de comparar a atividade leishmanicida e o mecanismo de ação entre substâncias similares, a naftoquinona lapachol também foi selecionada. O lapachol é facilmente isolado de espécies vegetais da família Bignoneaceae e é uma substância muito estudada, portanto, permitiu a inferência de possíveis mecanismos de ação em *Leishmania* e auxiliou na definição das próximas

estratégias do estudo (Lima et al., 2004; Balassiano et al., 2005; Hussain et al., 2007; Pinto e de Castro, 2009).

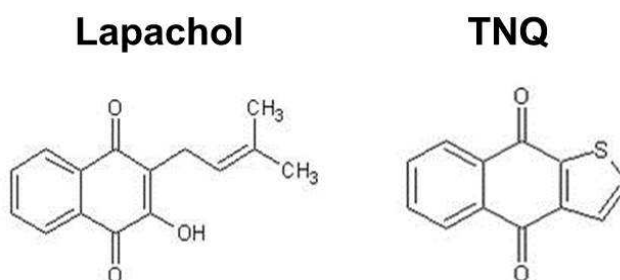


Figura 8: Estrutura química do lapachol e da TNQ

5.6 Determinação da CI_{50} do lapachol e da TNQ sobre a proliferação de *L. (L) amazonensis* em três modelos de ensaios *in vitro*

Com o objetivo de comparar a ação do lapachol e da TNQ em três formas distintas do parasito, as CI_{50} dessas substâncias foram determinadas utilizando os seguintes modelos: promastigotas, amastigotas recuperadas de lesão de camundongo e amastigotas intracelulares. Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes em duplicata ou triplicata. As curvas dose-resposta de cada substância em cada modelo estão representadas na figura 9.

Para avaliar a toxicidade e determinar o índice de seletividade dos PNB e dPNB selecionados, a CI_{50} foi também determinada em macrófagos derivados de células THP-1 (Figura 10).

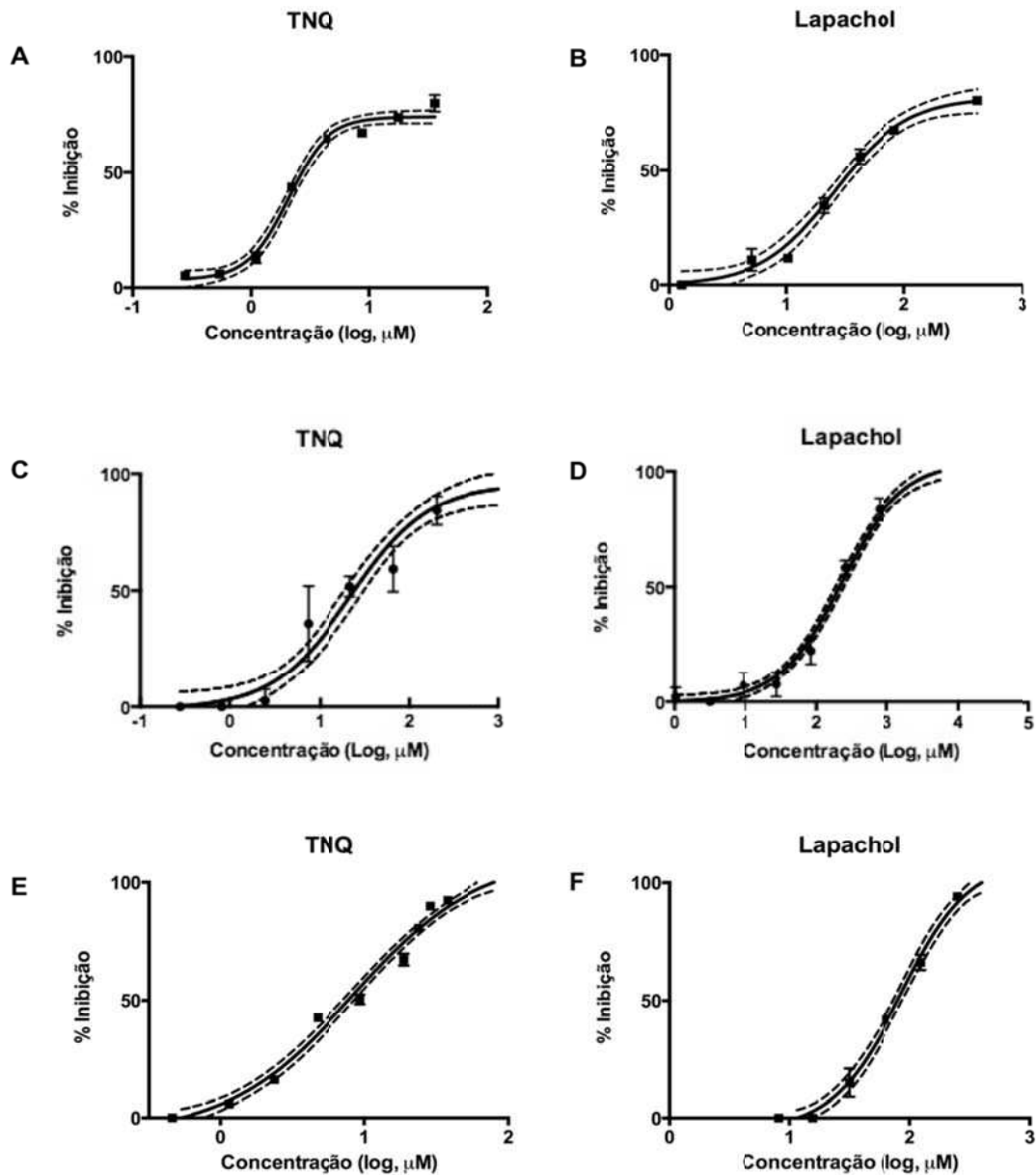


Figura 9: Curvas dose-resposta da redução da viabilidade de (A e B) promastigotas e (C e D) amastigotas de lesão e (E e F) do número de amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) amazonensis* após tratamento com TNQ ou lapachol. As linhas tracejadas representam o intervalo de 95% de confiança. Os dados foram obtidos de pelo menos dois experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata

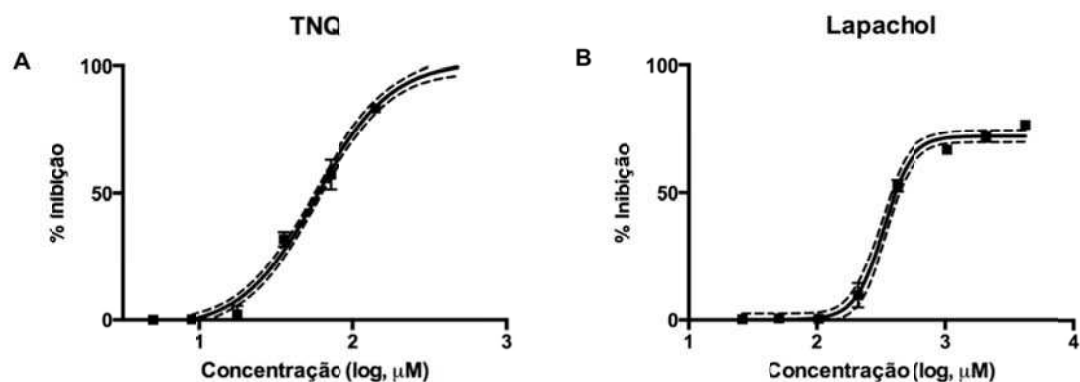


Figura 10: Curvas dose-resposta da redução da viabilidade de macrófagos após tratamento com (A) TNQ ou (B) lapachol. As linhas tracejadas representam o intervalo de 95% de confiança. Os dados foram obtidos de pelo menos dois experimentos independentes realizados em triplicata

A CI_{50} da TNQ e do lapachol (Tabela 5) é variável nas diferentes formas do parasito sendo este valor menor em promastigotas.

Tabela 5: CI_{50} (μM) \pm DP dos PNB e dPNB em diferentes modelos biológicos

PNB/dPNB	CI_{50} promastigotas	CI_{50} amastigotas de lesão	CI_{50} amastigotas intracelulares	CI_{50} macrófagos	IS (CI_{50} macrófagos/ CI_{50} amastigotas intracelulares)
TNQ	$2 \pm 0,2$	22 ± 18	$7,4 \pm 1,4$	$57 \pm 4,5$	7,7
Lapachol	25 ± 5	224 ± 85	84 ± 14	$322 \pm 26,5$	3,8

5.7 Inibição da TR heteróloga de *T. cruzi*

As substâncias que apresentaram atividade leishmanicida, foram avaliadas quanto à capacidade de inibir a enzima tripanotiona redutase. Nenhuma substância testada foi considerada ativa sobre esta enzima (Tabela 6).

Tabela 6: Porcentagem de inibição da enzima tripanotona redutase heteróloga de *T. cruzi*

Composto (100 µM)	% de inibição da TR
TNQ	19,8
Aurentiacina	10,4
Chalcona 1	8,2
Eleuterine	7,6
Lapachol	7,5
Chalcona 2	5
Clomipramina [14,45]	50

5.8 Alteração do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

A alteração no potencial de membrana mitocondrial de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi avaliada por meio da análise por citometria de fluxo de parasitos marcados com TMRE (Tabela 7).

Os parasitos do grupo sem tratamento apresentaram elevada marcação para este reagente, mostrando que estes parasitos apresentavam mitocôndrias íntegras, com potencial de membrana preservado. Por sua vez, o grupo tratado com choque térmico, apresentou fenótipo inverso após incubação por 2 h a 56 °C, mostrando que o método foi eficaz para diferenciar parasitos com danos mitocondriais. O lapachol e a TNQ não reduziram a marcação com TMRE expressivamente após 4 h de incubação (Figura 11). Após incubação por 24 h apenas o lapachol reduziu a marcação em 34 % (Figura 12).

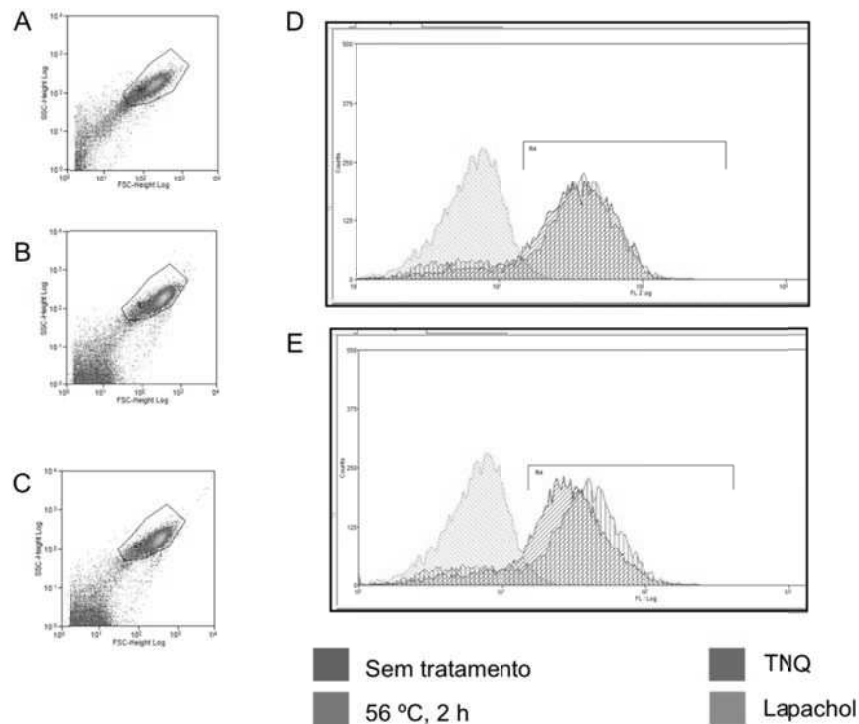


Figura 11: Gráficos ilustrando o efeito induzido pelo lapachol e pela TNQ (4 h de incubação) sobre o potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Gráficos de tamanho x granulosidade representativos da distribuição de formas promastigotas (A) sem tratamento, (B) tratadas com TNQ ou (C) lapachol. Histogramas representativos da marcação com TMRE de formas promastigotas tratadas com (D) TNQ ou (E) lapachol

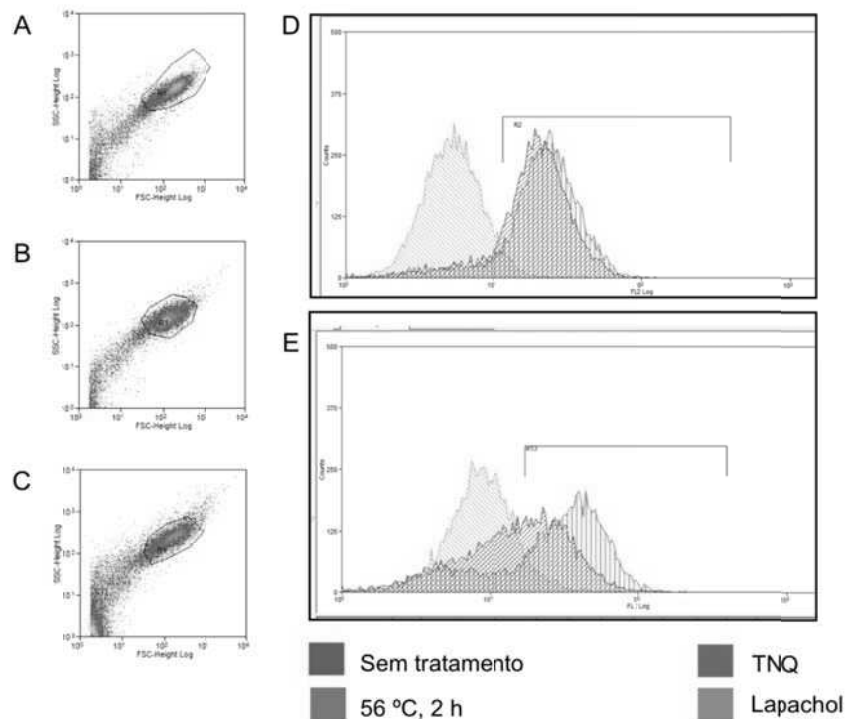


Figura 12: Gráficos ilustrando o efeito induzido pelo lapachol e pela TNQ (24 h de incubação) sobre o potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Gráficos de tamanho x granulosidade representativos da distribuição de formas promastigotas (A) sem tratamento, (B) tratadas com TNQ ou (C) lapachol. Histogramas representativos da marcação com TMRE de formas promastigotas tratadas com (D) TNQ ou (E) lapachol

Tabela 7: Média (%) \pm DP de populações com marcação positiva para TMRE e variação da população positiva em relação ao grupo sem tratamento após exposição ao lapachol e à TNQ por 4 e 24 h

	Média (%) e DP	Variação (%) da população positiva	Média (%) e DP	Variação (%) da população positiva
	4h		24h	
Sem tratamento	80 \pm 1	0	73 \pm 14	0
56 °C, 2h	8 \pm 5 ^a	-90 \pm 6	12 \pm 9 ^a	-81 \pm 17
TNQ	84 \pm 2	6 \pm 2	72 \pm 18	-1 \pm 3
Lapachol	81 \pm 2	3 \pm 2	43 \pm 6 ^a	-34 \pm 0.6

Legenda: ^a Diferença significativa em relação ao grupo sem tratamento, $p < 0,01$

5.9 Análise da função mitocondrial de promastigotas de *L. (L) amazonensis* por respirometria

Para avaliar alterações na função mitocondrial de parasitos tratados com TNQ e lapachol, realizou-se análise de respirometria. Parasitos tratados com metade da CI_{50} das substâncias por 20 min não apresentaram diminuição significativa das taxas de respiração. Após o tratamento com a CI_{50} por 2 h, os parasitos tratados com lapachol apresentaram redução de 50% no consumo de oxigênio, enquanto os tratados com TNQ permaneceram com taxas de respiração similar ao sem tratamento. Parasitos tratados com Antimicina A (At.A) apresentaram redução no consumo de oxigênio de aproximadamente 100% (Figura 13 e Tabela 8).

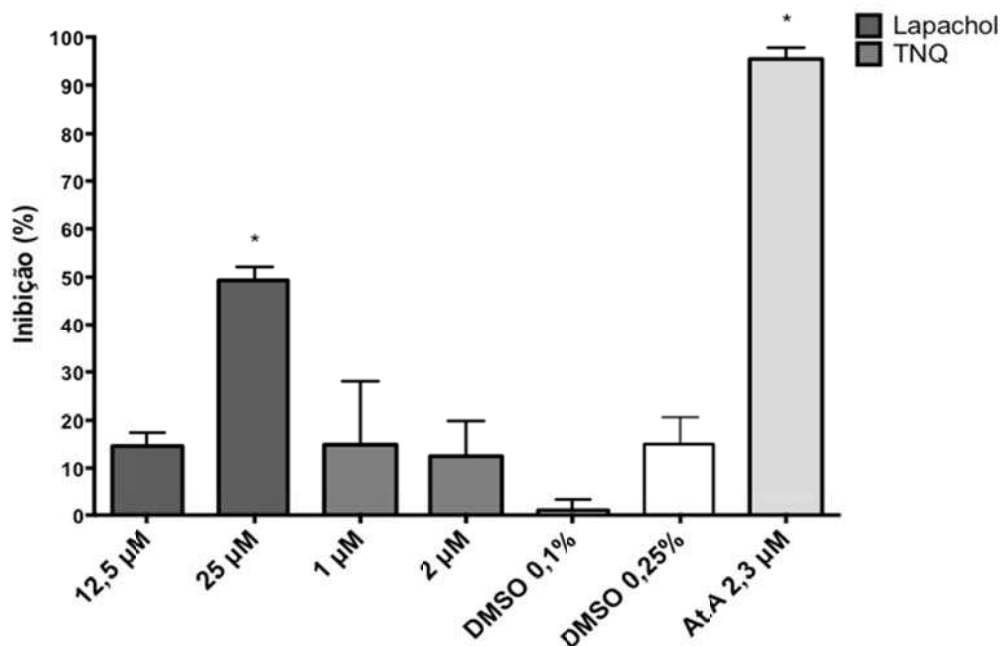


Figura 13: Representação da porcentagem de redução do consumo de oxigênio após tratamento com lapachol (12,5 µM, 20 min e 25 µM 2 h) e TNQ (1 µM 20 min e 2 µM 2 h). * representa diferença significativa em relação aos parasitos sem tratamento p < 0,001

Tabela 8: Porcentagem de redução do consumo de oxigênio pelos parasitos frente ao tratamento com metade ($\frac{1}{2} CI_{50}$) ou valor total (CI_{50}) da concentração inibitória de 50% do lapachol e TNQ

	Inibição $\frac{1}{2} CI_{50}$	Inibição CI_{50}
Lapachol	15±3	50±3*
TNQ	15±13	12,5±7

Legenda: * Diferença significativa em relação ao grupo sem tratamento, p < 0,001

5.10 Análise ultraestrutural

Com o objetivo de verificar possíveis alvos intracelulares de ação do lapachol e da TNQ, formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram incubadas na presença e ausência dessas substâncias na concentração da CI_{50} por 4, 24 e 48 h e analisadas por MET. A figura 14 mostra fotomicrografias de uma promastigota do grupo sem tratamento, incubada na presença da concentração máxima de DMSO usada no ensaio com as drogas. Os parasitos apresentaram morfologia normal, com formato alongado, mitocôndria (M), núcleo (N) e complexo de Golgi (G) sem alterações aparentes, cinetoplasto (K) íntegro e membrana plasmática (MP) trilamelar bem preservada.

Parasitos tratados com lapachol e TNQ apresentaram diferentes tipos e graus de alterações morfológicas significativas (Figuras 15 e 16). Após 4 h de incubação os parasitos tratados com as duas substâncias apresentaram

comprometimento da bolsa flagelar, a qual se apresentava disforme, dilatada exibindo frequentemente, a ruptura de membrana celular. Também foram identificadas alterações no complexo de Golgi que se mostrava com dilatação dos perfis de suas cisternas e profunda desorganização de sua morfologia. No citoplasma observou-se a presença de numerosas vesículas, muitas vezes apresentando aspectos de processo final de degradação (figuras de mielina). Observamos ainda nos parasitos tratados estruturas membranares atípicas além de perfis de retículo endoplasmático circundando grandes porções do citoplasma. Após 24 h de incubação, além das alterações mencionadas previamente, apenas os parasitos tratados com lapachol apresentaram danos mitocondriais exibindo inchaço, desorganização de cristas e mesmo área de lise da membrana mitocondrial. Os parasitos tratados com TNQ não apresentaram danos mitocondriais. Após 48 h de incubação as alterações observadas com 4 ou 24 h mostravam-se mais frequentes e foi possível observar evidências de intensas atividades exocíticas e intensiva vacuolização do citoplasma.

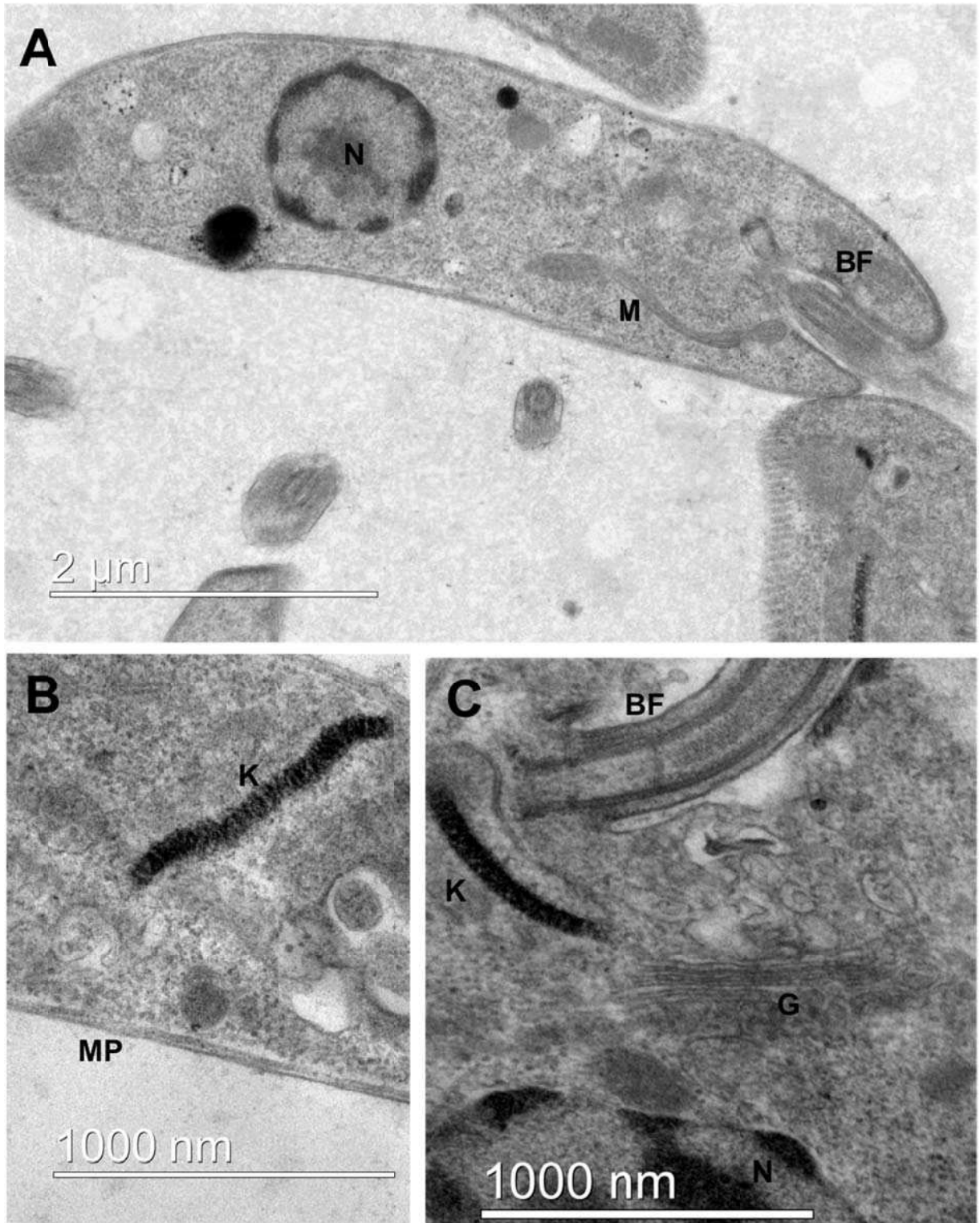


Figura 14: Análises ultraestruturais de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. (A, B e C) parasitos do grupo sem tratamento apresentando morfologia normal do núcleo (N), mitocôndria (M), bolsa flagelar (BF), cinetoplasto (K), membrana plasmática (MP) e complexo de Golgi (G)

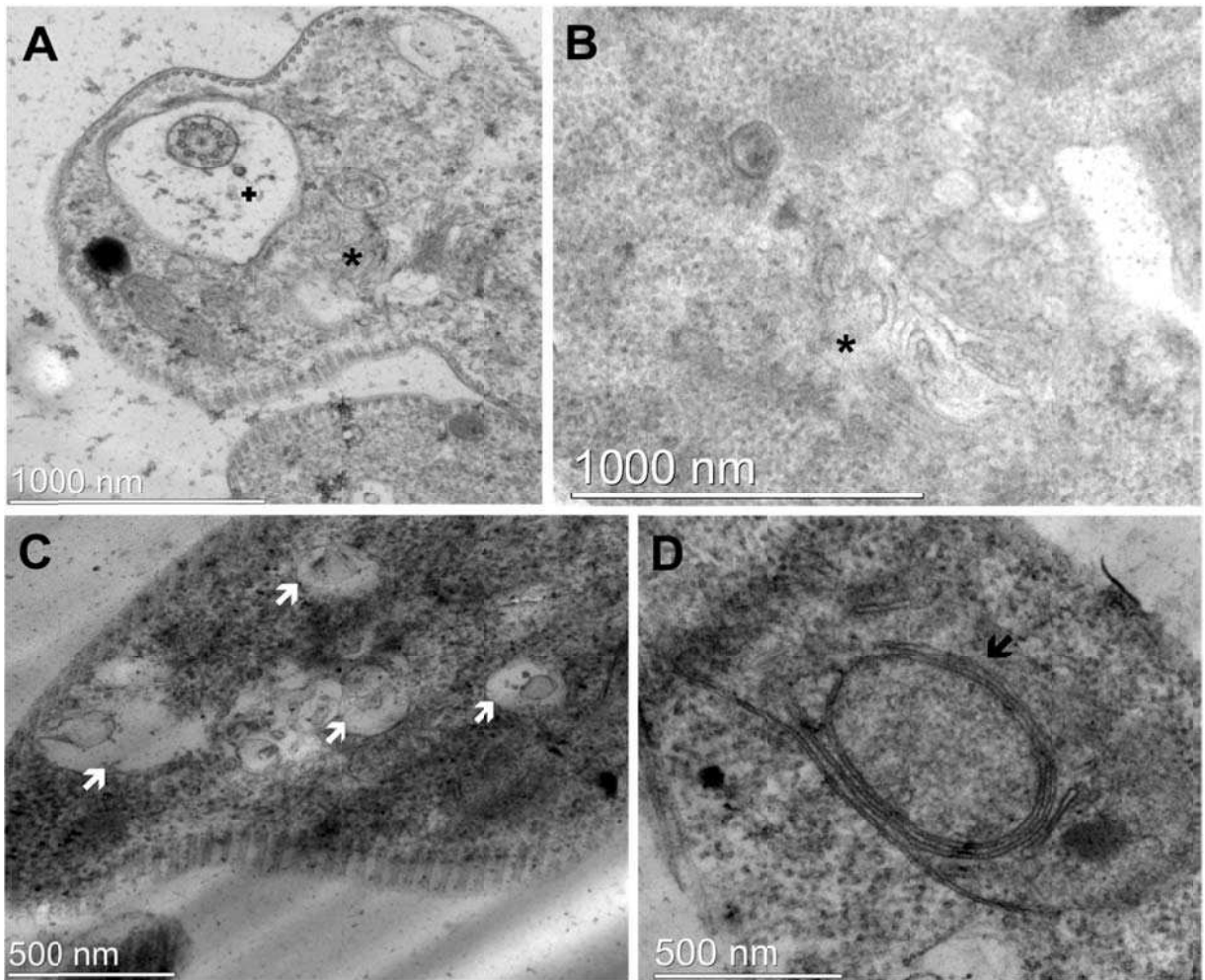


Figura 15: Análises ultraestruturais de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Em (A) pode ser observado o aumento do volume da bolsa flagelar (□) e (B) alterações morfológicas no complexo de Golgi (*) em parasitos tratados com TNQ por 4 h. (C) presença de numerosas vesículas (□) e (D) perfil de autofagosomas (↗) em parasitos tratados com lapachol por 4 h

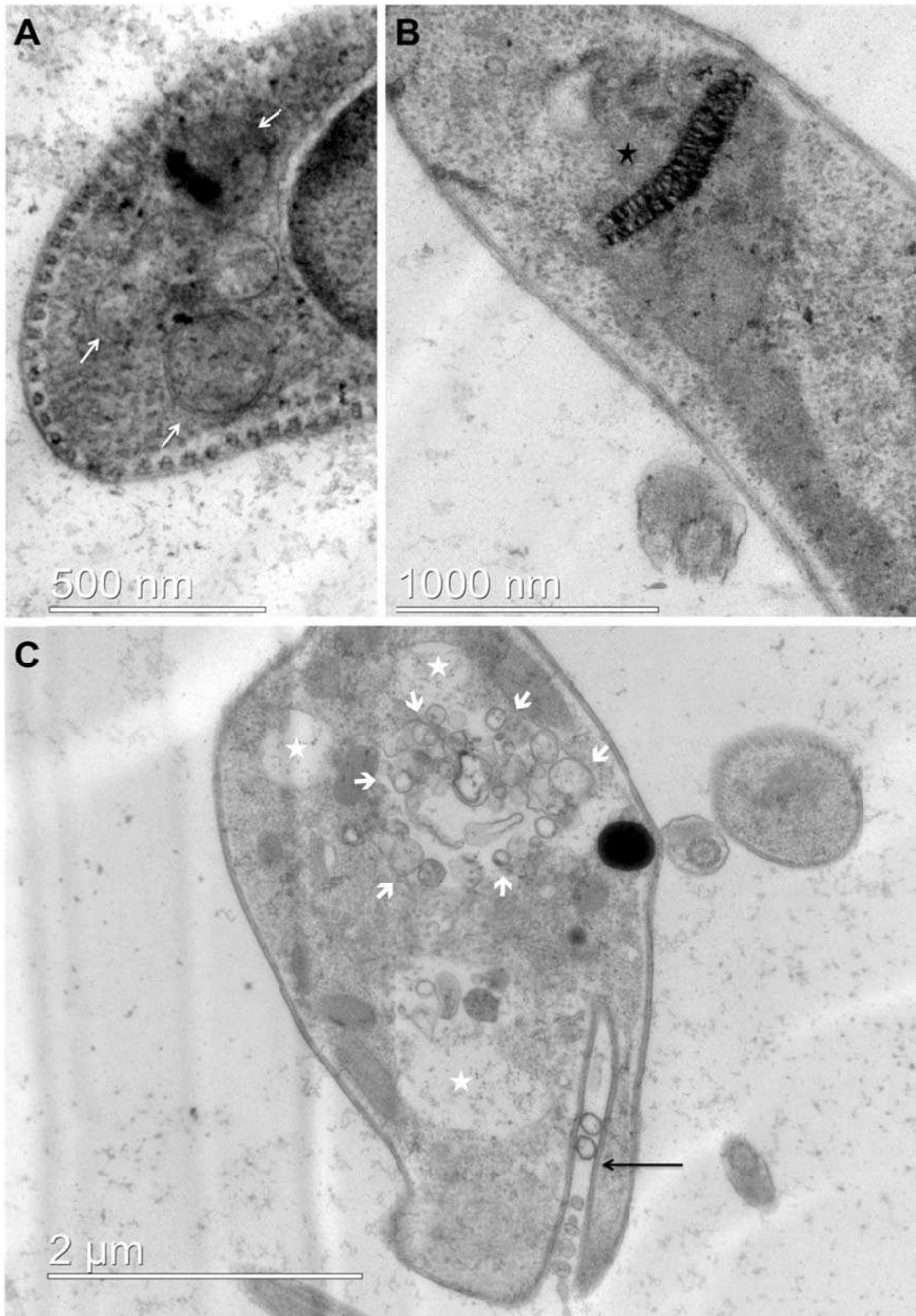


Figura 16: Análises ultraestruturais de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. (A) perfil de retículo envolvendo porções do citoplasma (→) em parasitos tratados com lapachol por 24 h. (B) danos na mitocôndria (★) em parasitos tratados com lapachol por 48 h. (C) presença de numerosas vesículas na área de bolsa flagelar (★), fenda exocítica (→) e degradação do citoplasma (→) em parasitos tratados com TNQ por 48 h

5.11 Resumo dos resultados

Nas tabelas 9 e 10 foram sintetizados os resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 9: Resumo dos resultados seleção e triagem das substâncias

	Investigados	Antileishmania	Antitripanossoma	Selecionados para estudo do mecanismo de ação
PNB/dPNB	Chalcona 1 Chalcona 2 Aurentiacina Ácido Ursólico Eleuterine Eleuterol Lapachol TNQ	Chalcona 1 Chalcona 2 Aurentiacina Eleuterine Lapachol TNQ	–	Lapachol TNQ

Tabela 10: Resumo dos resultados dos ensaios de avaliação dos mecanismos de ação da TNQ e do lapachol

PNB/dPNB	Avaliação de potencial de membrana mitocondrial (marcação por TMRE)	Respirometria	MET
TNQ	Sem alteração	Sem alteração	Danos no complexo de Golgi e bolsa flagelar, múltipla vacuolização do citoplasma, alta atividade exocítica e presença de estruturas membranares atípicas
Lapachol	↓ 34%	↓ 50%	Danos na mitocôndria, complexo de Golgi e bolsa flagelar, múltipla vacuolização do citoplasma, alta atividade exocítica e presença de estruturas membranares atípicas

6 DISCUSSÃO

No Brasil, a doença de Chagas e as leishmanioses têm importante impacto na saúde pública. Os fármacos usados no tratamento dessas doenças enfrentam diversas limitações como elevada toxicidade, baixa eficácia, existência de parasitos resistentes e alto custo, fazendo com que a busca por novas alternativas terapêuticas seja necessária (Rodrigues Coura e de Castro, 2002; Polonio e Efferth, 2008). O desenvolvimento de novos fármacos é um processo complexo e de alto custo. A identificação de substâncias promissoras requer a seleção de substâncias ativas, seletivas e que apresentem propriedades farmacocinéticas necessárias para uma substância que se destina ao uso como medicamento. Além disso, a compreensão do mecanismo de ação de candidatos a fármacos auxilia na identificação dos alvos biológicos envolvidos na bioatividade, estima a seletividade, a toxicidade e serve como base na otimização de moléculas promissoras (Nature, 2010; Schmidt et al., 2012a).

Produtos naturais e seus derivados representam uma importante fonte na busca por novas moléculas ativas. Diversas classes de PNB e dPNB são descritas como ativas em modelos de doenças causadas por protozoários mas pouco se investe no aprofundamento destes estudos (Schmidt et al., 2012a; Singh et al., 2014).

No presente trabalho, a coleção de substâncias isoladas ou sintetizadas no LQPN foi avaliada para que fossem selecionadas aquelas com atividade biológica descrita (leishmanicida, fungicida, anticâncer, entre outros) e mecanismos de ação não identificados em *Leishmania* e *T. cruzi*. Oito PNB e dPNB foram selecionados, quatro naftoquinonas, três chalconas e o ácido ursólico.

As naftoquinonas são uma classe de substâncias presentes em diversas famílias de plantas. Estas substâncias funcionam como agentes oxidantes e estão envolvidas em diferentes tipos de atividade biológica como: antitumoral, imunomodulatória, antimicrobiana e antiparasitária (Pinto e de Castro, 2009; Ali et al., 2011; Lezama-Dávila et al., 2012). As naftoquinonas selecionadas para este estudo foram: o lapachol, a tiofenonaftoquinona, a eleuterine e o eleuterol.

O lapachol é uma naftoquinona isolada de diferentes espécies de *Tabebuia*. Estas plantas são usadas pela medicina tradicional no nordeste do

Brasil como analgésica, diurética, anti-inflamatória e anticâncer (Hussain et al., 2007). Atualmente, o lapachol é amplamente estudado e existem relatos de suas atividades anti-inflamatória (de Almeida et al., 1990; Almeida, 2009), antiviral (Sacau et al., 2002; Almeida, 2009), antibacteriana (Nagata et al., 1999; Almeida, 2009), fungicida (Portillo et al., 2001; Breger et al., 2007; Almeida, 2009), antiparasitária (Hussain et al., 2007; Salas et al., 2008; Pinto e de Castro, 2009; Rocha et al., 2013b) e principalmente antitumoral (Trsic et al., 1998; Balassiano et al., 2005; Hussain et al., 2007; Almeida, 2009). Apesar da confirmada atividade antitumoral deste composto, o instituto nacional do câncer dos Estados Unidos concluiu, em 1974, que como as concentrações necessárias para se atingir atividade quimioterápica são muito altas, e resultam em alta toxicidade e efeitos colaterais, os estudos do lapachol como agente antitumoral deveriam ser suspensos (Hussain et al., 2007). O mecanismo de ação do lapachol em *Leishmania* não é claro, mas sabe-se que em células tumorais e em *T. cruzi* esta substância inibe a respiração celular e interfere no metabolismo de oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio (Hussain et al., 2007; Salas et al., 2008; Almeida, 2009). Quando testado *in vivo* em hamsters infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, o lapachol não preveniu o desenvolvimento de lesões, possivelmente devido à inativação dessa substância pelo organismo do hospedeiro o que resultaria em concentração no sítio da lesão abaixo daquela necessária para controle da infecção (Teixeira et al., 2001). O lapachol utilizado no presente estudo foi isolado da espécie *Tabebuia ochracea* (Zani et al., 1991).

No presente estudo, também foi testada a TNQ, um dPNB sintetizado com base em furanonaftoquinonas naturais. Originalmente, esta substância foi descrita como ativa *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi* (Zani et al., 1997).

A eleuterine e o eleuterol podem ser isolados de plantas pertencente à família botânica Iridaceae (Bianchi e Ceriotti, 1975; Ifesan et al., 2009; Li et al., 2009). Esta planta é usada na medicina tradicional com diversas funções como: tratamento de problemas intestinais (Lin et al., 2002), na menstruação (HODGE e TAYLOR, 1957), vermífuga (Schultes e Raffauf, 1990) e abortiva (Weniger et al., 1982). A eleuterine é descrita na literatura como antitumoral (Krishnan e Bastow, 2000), antibacteriana (Ifesan et al., 2009) e fungicida (Alves et al.,

2003a), sendo capaz de inibir a enzima humana topoisomerase II (Krishnan e Bastow, 2000). O eleuterol tem atividades antitumoral (Li et al., 2009), antibacteriana (Ifesan et al., 2009) e antioxidante (Arung et al., 2011) descritas. A eleuterine e o eleuterol utilizados neste estudo foram isolados da espécie *Eleutherine bulbosa* (Alves et al., 2003b).

As chalconas são uma classe de produtos naturais que possuem um amplo espectro de atividades biológicas como fungicida (Boumendjel et al., 2008; Mercader e Pomilio, 2012), antibacteriana (Mercader e Pomilio, 2012), antiviral (Mercader e Pomilio, 2012), leishmanicida (Zhai et al., 1995, 1999; Lunardi et al., 2003), antitumoral (Amor et al., 2007; Nagaraju et al., 2012; Syam et al., 2012), tripanocida (Lunardi et al., 2003) e citotóxica (Amor et al., 2007). A atividade leishmanicida de algumas chalconas já foi relacionada à inibição seletiva da função mitocondrial da *Leishmania* (Chen et al., 2001; Lunardi et al., 2003). As chalconas utilizadas neste estudo foram a aurentiacina, a chalcona 1 e a chalcona 2, todas isoladas da espécie vegetal *Blepharocalyx salicifolius*, uma espécie da família Myrtaceae endêmica da América do Sul (Siqueira et al., 2011). As chalconas 1 e 2 possuem atividades leishmanicida e antitumorais descritas (Siqueira et al., 2011) e a aurentiacina é descrita como antibacteriana (Amor et al., 2007).

O ácido ursólico é um triterpeno amplamente distribuído em espécies vegetais e é estudado por sua atividade antitumoral (Abe et al., 2002; Shishodia et al., 2003; Xavier et al., 2012). Alguns trabalhos foram publicados relatando atividades leishmanicida e tripanocida deste triterpeno. Entretanto, seu mecanismo de ação nesses parasitos não foi esclarecido (Abe et al., 2002; Ferreira et al., 2010; Sen e Chatterjee, 2011). O ácido ursólico utilizado neste trabalho foi isolado da espécie *Blepharocalyx salicifolius* (Siqueira et al., 2011).

Neste trabalho descrevemos pela primeira vez a atividade leishmanicida da aurentiacina, da eleuterine, da TNQ e confirmamos a atividade leishmanicida do lapachol e das chalconas 1 e 2. O ácido ursólico, apesar de ser descrito na literatura como substância leishmanicida com resultados similares ao encontrado por nós (Torres-Santos e Lopes, 2004), não foi considerado ativo neste trabalho pois não atingiu a linha de corte de 70 % de atividade anti-amastigota [20 µg/mL]. A descrição de novas substâncias ativas é muito importante no processo de desenvolvimento de novos fármacos.

Portanto, os PNB que tiveram a atividade leishmanicida descrita pela primeira vez neste trabalho, aurentiacina e eleuterine, deverão ser isolados em maior quantidade para que seja possível realizar estudos mais detalhados sobre os mesmos.

As chalconas 1 e 2, a eleuterine e o eleuterol não foram consideradas substâncias tripanocida neste estudo. Ainda que a aurentiacina não tenha sido classificada como ativa, houve uma atividade moderada que indica que esta substância deve ser testada em outros modelos e outras cepas de *T. cruzi* para melhor avaliar o seu efeito tripanocida.

Apesar de haverem relatos da atividade tripanocida do ácido ursólico, do lapachol e da TNQ, estes estudos usaram metodologias, cepas, formas do parasito e critérios diferentes dos adotados neste trabalho. O presente estudo aplicou o ensaio proposto por Buckner (Buckner et al., 1996) que usa células L929 infectadas com *T. cruzi* da cepa Tulahuen que expressam o gene da β -galactosidase. Desta forma, o ensaio avalia por leitura fluorimétrica a atividade das substâncias tanto em amastigotas intracelulares quanto em tripomastigotas. O ácido ursólico foi previamente testado em tripomastigotas sanguíneos das cepas Y e CL, causando a morte de 100 % dos parasitos da cepa Y na concentração de 876 μ M e da cepa CL a 3,5 mM (Leite et al., 2006). Sua ação em tripomastigotas da cepa Bolívia cultivadas em células LLCMK2 resultou em uma CI_{50} de 25 μ M (Ferreira et al., 2010) e de 17 μ M (Cunha et al., 2006). Em epimastigotas, o ácido ursólico paralisou os movimentos dos parasitos em uma concentração mínima de 88 μ M (Abe et al., 2002). A atividade da TNQ foi demonstrada em epimastigotas de cultura, resultando em uma CI_{50} de 3,7 μ M (Zani et al., 1997). O lapachol teve sua atividade avaliada em tripomastigotas sanguíneos da Cepa Y, a 0,21 mM esta substância ocasionou em 65 % de lise dos parasitos (Goulart et al., 1997) e em outro estudo usando a mesma metodologia sua CI_{50} foi de 410 μ M (da Silva Júnior et al., 2008). Em epimastigotas da cepa Tulahuen a CI_{50} do lapachol foi de 31,3 μ M, essa mesma concentração inibiu 41% do crescimento de tripomastigotas cultivados em células Vero (Salas et al., 2008). Os dados encontrados na literatura a respeito da bioatividade destas substâncias são muito variados e as discrepâncias de resultados podem ser explicadas pela diferença na

susceptibilidade das várias cepas e formas do parasito, bem como pela metabolização das substâncias pelas células hospedeiras utilizadas.

As variações metodológicas e de critérios são limitantes para a comparação de resultados gerados em laboratórios diferentes, para a compreensão dos dados e para a colaboração entre grupos de pesquisa. Como proposta de solução para este problema, a iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (*Drugs for Neglected Diseases initiative*, DNDi) publicou um manual para teste de drogas em cinetoplastídeos que propõe o trabalho em rede, de forma a harmonizar metodologias e protocolos (Ioset et al., 2009). Há também um fluxograma proposto por Romanha e colaboradores, com protocolos e critérios padronizados para ensaios *in vitro* e *in vivo*, visando a descoberta de novos fármacos tripanocida (Romanha et al., 2010). Porém, a adoção desses protocolos não é uma unanimidade e resultados de estudos anteriores às suas publicações permanecem com comparação limitada.

Ensaio para determinação do mecanismo de ação são complexos, trabalhosos e demandam quantidades de amostras que podem se tornar uma barreira para o estudo de PNB, uma vez que, na maioria das vezes eles são produzidos na natureza em pequenas quantidades (Balunas e Kinghorn, 2005). Assim, foram selecionadas duas substâncias para terem seus mecanismos de ação avaliados em *Leishmania*: o lapachol e a TNQ.

No presente estudo, para a avaliação da atividade leishmanicida e do mecanismo de ação do lapachol e da TNQ, foram usados diferentes modelos biológicos. Esses modelos tem utilidade reconhecida no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos leishmanicida. Modelos *in vitro* do parasito são desenvolvidos em formas promastigotas, amastigotas axênicas, amastigotas derivadas de lesão de camundongo e amastigotas intracelulares, sendo que cada modelo experimental utiliza formas diferentes do parasito e todas elas apresentam vantagens e desvantagens (Hodgkinson e Soong, 1997; Vermeersch et al., 2009; Freitas-Junior et al., 2012; De Rycker et al., 2013). As formas promastigotas são de fácil manutenção em laboratório, podendo ser cultivadas *in vitro* por tempo indeterminado. Não há um consenso sobre por quanto tempo os parasitos podem ser mantidos ou o número de passagens adequado, porém, para melhor reprodutibilidade dos resultados é necessário que sejam realizadas passagens periódicas em camundongos, com o objetivo

de manter o padrão de expressão de proteínas, que pode ser alterado quando o parasito é cultivado *in vitro* por longos períodos (Katakura e Kobayashi, 1985; Moreira et al., 2012; Magalhães et al., 2014). Este modelo permite a realização de ensaios rápidos e de fácil execução e por essas razões, as promastigotas, são amplamente utilizadas no processo de triagem de grandes bibliotecas de substâncias e indicadas como modelo biológico inicial em algoritmo de descoberta e desenvolvimento de fármacos leishmanicida (Siqueira-Neto et al., 2010; De Rycker et al., 2013; Grogl et al., 2013). Além disso, devido a limitações das técnicas disponíveis, diversos modelos usados na investigação de mecanismos de ação baseiam-se no uso de formas promastigotas.

Entretanto, uma vez que as promastigotas estão presentes no inseto vetor, e não no hospedeiro mamífero, ensaios realizados nesta forma podem selecionar substâncias que não afetam as amastigotas intracelulares, causadoras da doença (Freitas-Junior et al., 2012; De Rycker et al., 2013). Como alternativa, o uso de amastigotas axênicas tem a vantagem de ser mais semelhante à forma encontrada no homem, permitem a realização de ensaios rápidos e de alta produtividade, porém, são difíceis de serem obtidas e mantidas de forma estável (Callahan et al., 1997; De Almeida Rodrigues et al., 2010; De Rycker et al., 2013). Quando não é possível se estabelecer um protocolo de transformação de promastigotas em amastigotas axênicas, há a possibilidade do uso de amastigotas derivadas de lesão de camundongo. Entretanto, o isolamento de amastigotas é um processo demorado e a qualidade do material purificado é limitada, devido a contaminantes provenientes do hospedeiro. Além disso, a presença de imunoglobulinas do hospedeiro na superfície do parasito pode interferir na sensibilidade dos parasitos (Hodgkinson e Soong, 1997; De Almeida Rodrigues et al., 2010).

De maneira geral, promastigotas, amastigotas axênicas e amastigotas de lesão apresentam diferenças fisiológicas, bioquímicas e moleculares quando comparadas a amastigotas intracelulares (Siqueira-Neto et al., 2010). Em uma comparação da expressão de RNA entre amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares de *Leishmania infantum*, as amastigotas axênicas apresentaram 40 % de genes sendo expressos em maior quantidade que amastigotas intracelulares. Ademais, diferenças significativas foram encontradas em processos metabólicos como metabolismo de ácidos graxos, transporte

intracelular, proteólises e resposta ao estresse oxidativo (Rochette et al., 2009), o que pode interferir na sensibilidade a fármacos. Além disso, pró-drogas que se tornam ativas após a metabolização celular não podem ser detectadas nestes modelos (Siqueira-Neto et al., 2010). Desta forma, as amastigotas intracelulares são consideradas o modelo biológico *in vitro* que mais se assemelha às condições reais de infecção por *Leishmania* (Jain et al., 2012).

Apesar de amplamente aceito, o modelo de amastigotas intracelulares também pode apresentar variações, por exemplo, em relação aos tipos de células hospedeiras que podem ser infectadas. Macrófagos derivados de sangue periférico humano, peritonias murinos e de linhagens, são comumente usados para este fim. A obtenção, diferenciação e manutenção de monócitos humanos e murinos frescos é, todavia, limitada pela disponibilidade de amostra, apresenta alto custo e importantes questões éticas (Gebre-Hiwot et al., 1992; Jain et al., 2012). A comunidade científica internacional tem fomentado o emprego de métodos que evitem ou substituam o uso de animais experimentais quando possível (National Centre for the replacement refinement & reduction of animals in research, 2015). O uso de linhagens celulares, além de permitir um suprimento constante de células hospedeiras homogêneas, é tido como alternativa válida para substituir ou minimizar o número de animais em um estudo. Dessa maneira, o uso de macrófagos derivados da linhagem THP-1, além de aceito como modelo experimental para infecção com *Leishmania*, evita a eutanásia de camundongos (Gebre-Hiwot et al., 1992). A linhagem de células THP-1 foi derivada do sangue periférico de uma criança com leucemia monocítica aguda. Ela foi caracterizada por Tsuchiya e colaboradores em 1980 e é de fácil manutenção (Tsuchiya et al., 1980). Após a sua diferenciação em macrófagos, infecta-se com promastigotas de várias espécies de *Leishmania* e fornece resultados reprodutíveis, por isso, foi escolhida como célula hospedeira para o desenvolvimento deste trabalho (Gebre-Hiwot et al., 1992; Jain et al., 2012).

Com o objetivo de testar os PNB e dPNB no modelo considerado padrão ouro para detecção *in vitro* de atividade leishmanicida (Vermeersch et al., 2009), a CI_{50} do lapachol e da TNQ foi determinada em macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Existem duas formas principais de se detectar amastigotas intracelulares: métodos baseados na contagem direta dos

parasitos via microscópio óptico e métodos de leitura de fluorescência e luminescência que requerem parasitos transfectados ou marcados com sonda (Jain et al., 2012; De Rycker et al., 2013). Os métodos mais utilizados atualmente são os de leitura de fluorescência e luminescência, por serem práticos e automatizados. Entretanto, tais métodos podem sofrer interferência de artefatos que podem atrapalhar a leitura. As substâncias podem interferir, de maneira inespecífica, na função da proteína repórter ou do seu substrato, comprometendo a validade dos resultados. Além disso, o método de análise não permite a avaliação da porcentagem de células infectadas ou a distribuição de amastigotas por macrófagos (De Rycker et al., 2013; Rocha et al., 2013a). Por sua vez a contagem direta dos parasitos é uma tarefa muito trabalhosa e demorada, pois requer a contagem em microscópio óptico das amastigotas em pelo menos 100 macrófagos por amostra. Além disso, essa técnica pode ter a reprodutibilidade prejudicada por ser dependente do treinamento do experimentador (Rocha et al., 2013a). Apesar das desvantagens dessa técnica, ela permanece muito usada devido ao seu baixo custo, por permitir a determinação da porcentagem de células infectadas e o número de amastigotas por célula e à dificuldade de acesso e padronização de métodos baseados em fluorescência, que muitas vezes requerem parasitos transfectados e instalações apropriadas para trabalhar com organismos geneticamente modificados (De Rycker et al., 2013; Rocha et al., 2013a).

A fim de aprimorar o modelo clássico de macrófagos infectados e torná-lo mais prático e robusto, neste trabalho foi realizada uma adaptação do ensaio descrito por Jain e colaboradores. Em seu artigo original, os autores propõem a coloração das lâminas com Sybr Green, posterior aquisição de imagens em microscópio de fluorescência e contagem dos macrófagos e amastigotas com o auxílio do programa Image J (Jain et al., 2012). No presente trabalho, foram associadas a praticidade da coloração com panótico às vantagens de se realizar a contagem em imagens digitais com o auxílio de um software. Essas adequações tornam a contagem dos parasitos menos desgastante e o erro do experimentador reduzido em relação ao modelo clássico. Além disso, as imagens e contagens são documentadas, permitindo conferência posterior das mesmas áreas das lâminas observadas na contagem original. Em relação à técnica proposta por Jain e colaboradores, também podem ser citadas

vantagens. Uma vez que a coloração com panótico é estável, as lâminas podem ser armazenadas por um longo período e as imagens não precisam ser adquiridas imediatamente após a coloração, como ocorre com o fluóforo. O uso do corante panótico também permite a aquisição das imagens em microscópio óptico tornando a técnica economicamente mais acessível, uma vez que o custo dessa categoria de equipamento tende a ser inferior àquele de microscópios de fluorescência.

A fim de conhecer o efeito induzido pelas substâncias em teste sobre as diferentes formas do parasito, a CI_{50} do lapachol e da TNQ também foi determinada em promastigotas e amastigotas obtidas de lesão. Em promastigotas, as substâncias foram cerca de quatro vezes mais ativas do que em amastigotas intracelulares e cerca de dez vezes mais ativas do que em amastigotas obtidas de lesão. Esses resultados estão de acordo com dados da literatura que demonstram que as promastigotas podem ser mais sensíveis e permitir a detecção de atividades que não se reproduzem em outros modelos (De Rycker et al., 2013). Além disso, a CI_{50} foi mais elevada no modelo de amastigota obtida de lesão quando comparada a amastigotas intracelulares. Este fato pode estar relacionado à presença de proteínas e imunoglobulinas do hospedeiro na superfície das amastigotas, que podem interferir na interação do parasito com as substâncias (Mirjalili, 2003) ou ao fato de terem sido usadas cepas diferentes de *L. (L.) amazonensis* (López-Martín et al., 2008).

Em todos os modelos utilizados, a CI_{50} da TNQ foi cerca de dez vezes menor que aquela do lapachol, mostrando ser esse dPNB superior ao lapachol quanto à atividade leishmanicida. O índice de seletividade da TNQ, calculado pela razão entre a CI_{50} em macrófagos e em amastigotas intracelulares, também foi superior àquele do lapachol. Entretanto, nenhuma das substâncias alcançou o recomendado pela DNDi, que sugere IS maior que 10 para que a substância possa avançar no fluxograma de descoberta de fármacos leishmanicida (Ioset et al., 2009). Porém, os estudos de seus mecanismos de ação e alvos celulares contribuem com o conhecimento a respeito da atividade leishmanicida das naftoquinonas, podendo esse ser utilizado no processo de desenvolvimento de novas substâncias ativas.

Uma das maneiras de se investigar o mecanismo de ação de substâncias bioativas é a identificação dos alvos celulares com os quais essas

interagem, sendo que muitos alvos são enzimas. A enzima tripanotiona redutase (TR), validada como alvo terapêutico, catalisa a redução da tripanotiona (Jockers-Scherübl et al., 1989). A presença da tripanotiona na forma reduzida é importante para os tripanossomatídeos na manutenção de um ambiente celular redutor, livre do estresse oxidativo (Fairlamb e Cerami, 1992; de Molfetta et al., 2009; Singh et al., 2012). Diversas substâncias como a BCNU (Jockers-Scherübl et al., 1989), a TNQ 2 (Zani e Fairlamb, 2003), a 2,3-bis[3-(2-amidinohidrazona)-butil]-1,4-naftoquinona (Jockers-Scherübl et al., 1989) e a 8-metoxi-nafto[2,3-b]tiofen-4,9-quinona (Zani e Fairlamb, 2003), foram descritas como inibidoras desta enzima.

Dentre as seis substâncias leishmanicida estudadas neste trabalho, nenhuma foi capaz de inibir a ação da enzima TR. A substância TNQ teve atividade sobre a TR demonstrada anteriormente, apresentando 70 % de inibição a 100 μ M. (Zani et al., 1997). Este estudo, todavia, foi realizado com uma metodologia diferente da usada no trabalho de Zani e colaboradores, onde substâncias com fraca afinidade pela enzima podem ser detectadas como ativas, por serem incubadas com a TR por 30 min antes de ser adicionado o substrato. Vários estudos revelaram que naftoquinonas com atividade tripanocida, estão entre os mais potentes inibidores da TR (de Molfetta et al., 2009). Estudos de *docking* mostraram que a TNQ, assim como outras naftoquinonas com estruturas químicas muito semelhantes, são capazes de se ligar à um bolsão hidrofóbico presente na enzima, que é diferente do sitio ativo do substrato natural da mesma (de Molfetta et al., 2009). Apesar das naftoquinonas compartilharem o esqueleto quinona, suas diferenças estruturais parecem ser importantes na capacidade de inibir a TR. Estudos de relação estrutura/atividade deverão ser realizados para confirmarem esta hipótese. Além da atividade da TNQ sobre TR não ter sido confirmada neste trabalho, a concentração de TNQ necessária para inibir a atividade enzimática da TR em 70 %, segundo os dados da literatura, foi da ordem de 10 vezes superior ao IC₅₀ desta substância em amastigotas intracelulares. Portanto, pode-se inferir que a inibição da TR não seja o mecanismo responsável pela atividade leishmanicida da TNQ.

A mitocôndria única dos tripanossomatídeos apresenta características que a difere das mitocôndrias de mamíferos. A fosforilação oxidativa que ocorre

em sua membrana interna é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio, que são tóxicas para o parasito. Essas características tornam estas organelas importantes alvos para potenciais quimioterápicos (Soeiro e de Castro, 2009; Fidalgo e Gille, 2011). Como o lapachol é conhecido por sua capacidade de causar danos mitocondriais em *T. cruzi* e gerar espécies reativas de oxigênio (Hussain et al., 2007; Salas et al., 2008), foram adotadas abordagens para verificar danos mitocondriais em *Leishmania* tratada com lapachol e TNQ.

Uma das formas de se estudar a integridade das mitocôndrias é avaliando o potencial de membrana dessas organelas que está diretamente associado às suas funções fisiológicas. Durante a fosforilação oxidativa, a diferença de voltagem é mantida em aproximadamente -180 mV, através da membrana mitocondrial interna por uma rede de movimentos de cargas positivas. Esse é o componente principal da força próton-motriz na mitocôndria, utilizada para dirigir a síntese de ATP (Perry et al., 2011). A manutenção do potencial de membrana mitocondrial é essencial para este processo, assim como para a sobrevivência do parasito (de Souza et al., 2009). O tratamento com lapachol (24 h de incubação) reduziu em 34 % a população com marcação positiva para TMRE quando comparadas aos parasitos sem tratamento. Esse resultado indica ocorrência de dano na membrana mitocondrial após o tratamento com essa substância. Por sua vez, a TNQ não reduziu significativamente a marcação, sugerindo que a perda do potencial de membrana mitocondrial não está envolvida no processo de morte desencadeado por esta substância. Apesar da mitocôndria de tripanossomatídeos ser um dos principais alvos para furanonaftoquinonas, a furanonaftoquinona triazólica TN, assim como a TNQ, não causa danos ultraestruturais nem perda do potencial de membrana mitocondrial em *T. cruzi* e seu mecanismo de ação está relacionado à autofagia e estresse oxidativo gerado por espécies reativas de oxigênio (Fernandes et al., 2012).

Avaliou-se, também, se o tratamento com lapachol ou TNQ tinha impacto sobre a capacidade funcional das mitocôndrias. Para isso, foi usado o ensaio de respirometria. O lapachol, após 2 h de incubação, interfere na função mitocondrial do parasito, diminuindo o consumo de oxigênio em 50 %. Esse resultado demonstra que o efeito dessa substância sobre as mitocôndrias se

estabelece em momentos anteriores àqueles em que foi detectada redução da viabilidade celular dos parasitos. Análises de respirometria em *T. cruzi* tratado com lapachol demonstraram resultados semelhantes, indicando que a inibição da respiração é uma ação comum desta substância (Salas et al., 2008). Por sua vez, a TNQ não inibiu o consumo de oxigênio pelo parasito. Esse resultado, associado ao fato de que essa substância não altera o potencial de membrana mitocondrial, sugere que a mitocôndria não é um alvo celular desse dPNB.

Para a investigação de prováveis alvos celulares de ação dos PNB e dPNB, parasitos sem tratamento e tratados foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão. As análises ultraestruturais corroboraram os dados de respirometria e citometria de fluxo, mostrando que apenas o lapachol foi capaz de gerar danos visíveis na mitocôndria dos parasitos. Alterações mitocondriais similares foram demonstradas anteriormente por ação de naftoquinonas em *T. cruzi* (Menna-Barreto et al., 2009b) e por outras substâncias em *Leishmania* (Vannier-Santos et al., 1995; Rodrigues et al., 2002; Socorro, 2003). Uma vez que o lapachol também promoveu perda de potencial de membrana mitocondrial, evidenciado no ensaio com TMRE e induziu danos na função mitocondrial, observados no ensaio de respirometria, sugere-se que essas organelas possam ser um dos alvos celulares envolvidos na atividade leishmanicida do lapachol.

Nas análises por microscopia eletrônica de transmissão utilizando tempos curtos de exposição dos parasitos aos compostos de modo a evidenciar danos iniciais as estruturas celulares, também foi possível observar que o núcleo e o cinetoplasto dos parasitos mantinham-se íntegros, não apresentando alterações ultraestruturais. Estes dados sugerem que diferentemente de outras substâncias como a MDL28170, uma inibidora de calpaína capaz de causar morte por processo similar à apoptose em *L. (L.) amazonensis* (Marinho et al., 2014), esses componentes celulares provavelmente não são alvos primários do lapachol e da TNQ. Danos em outras estruturas como o complexo de Golgi, bolsa flagelar, intensa atividade exocítica, bem como a presença de numerosas vesículas, estruturas membranares atípicas e perfis de autofagia (envolvimento de organelas por perfis de retículo endoplasmático) foram observados nos parasitos tratados

com as duas substâncias e podem indicar alterações no tráfego intracelular, como foi observado previamente em *Leishmania* tratada com diferentes substâncias (Vannier-Santos et al., 1995; Fernandes Rodrigues et al., 2008; Guimarães et al., 2010) além de apontar para fenótipo de morte celular programada do tipo autofágica. Estudos demonstram que naftoquinonas derivadas da β -lapachona e naftoimidazóis também causam danos no complexo de Golgi de cinetoplastídeos (Pinto e de Castro, 2009; Soeiro e Dantas, 2009). Alterações ultraestruturais semelhantes, causadas por PNB em *L. (L.) amazonensis*, foram relacionadas à inibição da síntese de esteróis (Brenzan et al., 2012; Medina et al., 2012). Com a síntese de esteróis comprometida, a ausência de lipídeos essenciais pode resultar em alterações significativas nas propriedades físico-químicas das membranas dos parasitos, induzindo a desorganização e eventual destruição destas estruturas (Brenzan et al., 2012). Porém, mais estudos são necessários para avaliar a importância dessas alterações no processo de morte celular desencadeado pelo lapachol e pela TNQ em *Leishmania*.

Com relação a presença de perfis de retículo endoplasmático circundando porções do citoplasma e mesmo organelas de promastigotas tratadas com as duas substâncias, estes dados sugerem morte por processo autofágico. Essas alterações são frequentemente observadas, apresentadas por tripanossomatídeos na presença de outras substâncias antiparasitárias (Menna-Barreto et al., 2009a, 2009c; Fernandes et al., 2012). A autofagia é um mecanismo de reciclagem de organelas e estruturas celulares danificadas, visando restabelecer a homeostase celular. Porém, quando este equilíbrio não é alcançado, a autofagia pode resultar em um mecanismo de morte (Menna-Barreto et al., 2009a; Fernandes et al., 2012). Mais estudos são necessários para compreender o papel da autofagia no balanço de morte e vida dos parasitos tratados com lapachol e TNQ.

Embora estudos posteriores visando melhores esclarecimentos a respeito dos alvos celulares e tipos de morte desencadeados pelos PNB e dPNB aqui pesquisados ainda sejam necessários, nossos resultados sugerem pela primeira vez, que a ação do lapachol em *Leishmania* está associada principalmente à disfunção mitocondrial e provável aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, que levam à morte do parasito. Por sua vez, o

mecanismo de ação da TNQ parece não estar relacionado a danos mitocondriais. Pode-se propor que a inibição da enzima tripanotona redutase resulte no acúmulo de espécies reativas de oxigênio desencadeando danos a estruturas celulares e a morte dos parasitos.

Além disso, o estudo do mecanismo de ação das naftoquinonas lapachol e TNQ demonstrou que essas substâncias, apesar de pertencerem a uma mesma classe de compostos químicos, apresentam perfis de atividade e mecanismos de ação diferentes. Uma vez que estas substâncias podem servir como base para o desenvolvimento de análogos com alvos cada vez mais específicos e melhor perfil de toxicidade, o estudo dessas e de outras naftoquinonas é importante no desenvolvimento de fármacos tripanocida e leishmanicida.

7 CONCLUSÕES

Quanto à triagem das substâncias:

- Esta é a primeira vez que a atividade leishmanicida da TNQ, aurentiacina e eleuterine é descrita.
- Os diferentes protocolos e critérios para determinação de bioatividade de substâncias devem ser selecionados cuidadosamente de forma que seja possível a comparação entre os dados obtidos por grupos de pesquisas diferentes.

Quanto ao estudo do mecanismo de ação:

- As alterações observadas no potencial de membrana mitocondrial, no consumo de oxigênio e na ultraestrutura da mitocôndria de promastigotas de *Leishmania*, apontam esta organela como alvo celular para o lapachol.
- A ausência de efeitos significativos na mitocôndria sugerem que a TNQ não tem como alvo essa organela. Entretanto, os danos observados no complexo de Golgi e bolsa flagelar podem ser causados por ROS. Estudos posteriores deverão ser realizados para a confirmação desta hipótese.
- Substâncias da mesma classe estrutural podem ter atividades e mecanismos de ação biológica diferentes.
- Por apresentarem alvos diferentes, a associação do lapachol e da TNQ pode resultar em uma ação leishmanicida mais eficaz possibilitando a diminuição da Cl_{50} e consequentemente aumentando o IS. Hipótese esta que deve ser investigada posteriormente.

Quanto ao desenvolvimento geral do projeto:

- A adaptação do protocolo de ensaio para detecção de atividade leishmanicida tornou este ensaio mais prático e acessível.
- Este estudo poderá contribuir para a investigação de relações entre estrutura e atividade das naftoquinonas.
- Os produtos naturais são fontes de novas substâncias bioativas e a investigação dos mecanismos de ação envolvidos nesse processo, realizada de forma multidisciplinar, fundamenta o conhecimento necessário para o processo de desenvolvimento de novos fármacos.

8 ANEXOS

8.1 Termo de concessão de acesso a amostra componente do patrimônio genético



AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010302/2013-1

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 161/2010, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

CNPJ: 337.810.550/0001-35

Representante Legal: MANUELA DA SILVA

Cargo/Função: Assessora da Vice-Presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência

CPF: 123.661.178-09 **RG:** 55274304

Projeto: Investigação do mecanismo de ação de produtos naturais com atividade leishmanicida, tripanocida ou antitumoral

Coordenador do Projeto: Tânia Maria de Almeida Alves

CPF: 836.107.077-04 **RG:** 057923625 - IFP / RJ

Finalidade do projeto: Em projetos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa de Química de Produtos Naturais Bioativos, os extratos brutos de plantas foram preparados e armazenados a -70 °C para investigação química. Neste projeto pretende-se estudar cinco espécies de plantas nativas abundantes em de Minas Gerais. São elas: (Eleutherine bulbosa - Iridaceae; Blepharocalyx salicifolia - Myrtaceae; Mikania obtusata - Asteraceae; Alomia myriadenia - Asteraceae e Tabebuia ochracea - Bignoniaceae).

Amostras a serem acessadas:

Espécie(s): Eleutherine bulbosa - Iridaceae, Blepharocalyx salicifolia - Myrtaceae, Mikania obtusata - Asteraceae, Alomia myriadenia - Asteraceae, Tabebuia ochracea - Bignoniaceae

Tipo de material/quantidade de amostras: As amostras foram coletadas anteriormente de acordo com autorização de coleta emitida pelo Instituto estadual de Florestas IEF, anexo

Local de depósito de subamostra: NÃO INFORMADO

Equipe do projeto: TANIA MARIA DE ALMEIDA ALVES / CPF 836.107.077-04

ALVARO JOSE ROMANHA / CPF 132.507.606-68

FERNANDA LUIZA DE MELO FRANCISCO / CPF 015.867.716-12

SILVANE MARIA FONSECA MURTA / CPF 817.194.696-87

MARIO STEINDEL / CPF 352.443.309-00

POLICARPO ADEMAR SALES JUNIOR / CPF 541.451.983-87

CARYNE MARGOTTO BERTOLLO / CPF 083.647.087-75

LUIZA GUIMARAES TUNES / CPF 088.330.146-65

CARLOS LEOMAR ZANI / CPF 300.508.556-20

DANIELA NABAK BUENO MAIA / CPF 036.411.456-86

PAULA CRISTIANE MOTTA SALES / CPF 050.036.336-61

Validade da Autorização: 04/07/2013 a 07/06/2016

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio da Plataforma Carlos Chagas, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010302/2013-1. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGENMMA.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRM). Para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, mormente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 07 de Junho de 2013

Paulo Sergio Lacerda Beirao
Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 5425653854543928 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.

8.2 Informações da ATCC sobre a linhagem de células THP-1



Product Sheet

THP-1 (ATCC® TIB-202™)

Please read this FIRST



Storage Temp.
liquid nitrogen
vapor phase



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated RPMI-1640 Medium, Catalog No. 30-2001. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: 2-mercaptoethanol to a final concentration of 0.05 mM; fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: THP-1 (ATCC® TIB-202™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

955.638.6597 or 703.345.2700
Fax: 703.345.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 3

Description

Organism: Homo sapiens, human
Tissue:
peripheral blood
Disease: acute monocytic leukemia
Cell Type: monocyte
Age: 1 year infant
Gender: male
Morphology: monocyte
Growth Properties: suspension
DNA Profile:
Amelogenin: X,Y
CSF1PO: 11,13
D13S317: 13
D16S539: 11,12
D6S818: 11,12
D7S820: 10
TH01: 8,9,3
TPOX: 8,11
vWA: 16

Batch-Specific Information

Refer to the Certificate of Analysis for batch-specific test results.

SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.

Unpacking & Storage Instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C, preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.

Handling Procedure for Frozen Cells

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 mL complete culture medium, and spin at approximately 125 x g for 5 to 7 minutes.
4. Resuspend cell pellet with the recommended complete medium (see the specific batch information for the culture recommended dilution ratio) and dispense into a 25 cm² culture flask. It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the complete growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6). pH (7.0 to 7.6).
5. Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO₂ in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.

Handling Procedure for Flask Cultures

The flask was seeded with cells (see specific batch information), grown, and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.



Product Sheet

THP-1 (ATCC® TIB-202™)

Please read this FIRST

	Storage Temp. liquid nitrogen vapor phase
	Biosafety Level 1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated RPMI-1640 Medium, Catalog No. 30-2001. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: 2-mercaptoethanol to a final concentration of 0.05 mM; fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: THP-1 (ATCC® TIB-202™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

955.638.6597 or 703.345.2700
Fax: 703.345.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 2 of 3

1. Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination.
2. Incubate the flask in an upright position for several hours at 37°C. After the temperature has equilibrated, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 x g for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save for reuse. Resuspend the cell pellet in 10 ml of this medium.
3. From this cell suspension remove a sample for a cell count and viability. Adjust the cell density of the suspension to 4×10^5 viable cells/mL in the shipping medium.
4. Incubate the culture, horizontally, at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere. Maintain the cell density of the culture as suggested under the subculture procedure.



Subculturing Procedure

Protocol: Cultures can be maintained by the addition of fresh medium or replacement of medium. Alternatively, cultures can be established by centrifugation with subsequent resuspension at $2-4 \times 10^5$ viable cells/mL. Subculture when cell concentration reaches 8×10^5 cells/mL. Do not allow the cell concentration to exceed 1×10^6 cells/mL. Coming® T-75 flasks (catalog #431454) are recommended for subculturing this product.

Medium Renewal: Every 2 to 3 days



Cryopreservation Medium

Cryoprotectant Medium

Complete growth medium described above supplemented with 5% (v/v) DMSO. Cell culture tested DMSO is available as ATCC Catalog No. 4-X.



Comments

The cells are phagocytic (for both latex beads and sensitized erythrocytes) and lack surface and cytoplasmic immunoglobulin. Monocytic differentiation can be induced with the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA).



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this



Product Sheet

THP-1 (ATCC® TIB-202™)

Please read this **FIRST**

	Storage Temp. liquid nitrogen vapor phase
	Biosafety Level 1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated RPMI-1640 Medium, Catalog No. 30-2001. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: 2-mercaptoethanol to a final concentration of 0.05 mM; fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: THP-1 (ATCC® TIB-202™)

product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.
© ATCC 2014. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [12/29]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

952.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

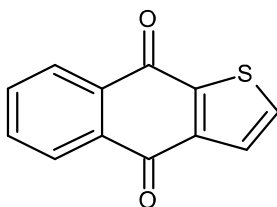
8.3 Análises por HPLC

TIOFENONAFTOQUINONA

Nome IUPAC: Nafto [2,3 - b] tiofen-4 ,9-quinona

Fórmula molecular: $C_{12}H_6O_2S$

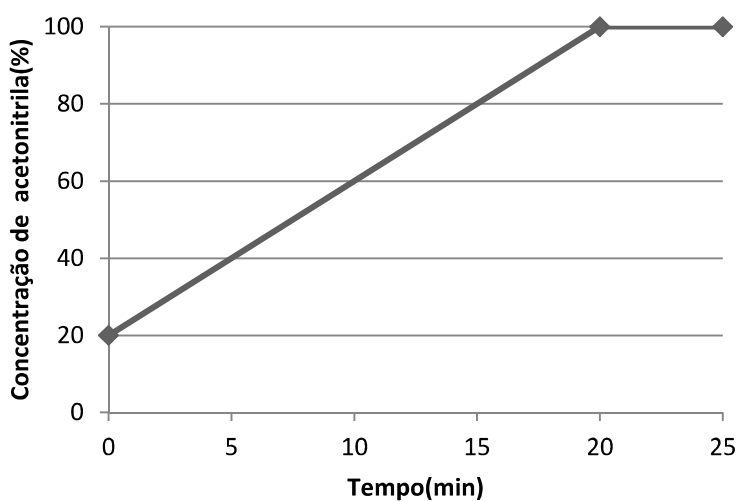
Massa molecular: 214,23984g/mol



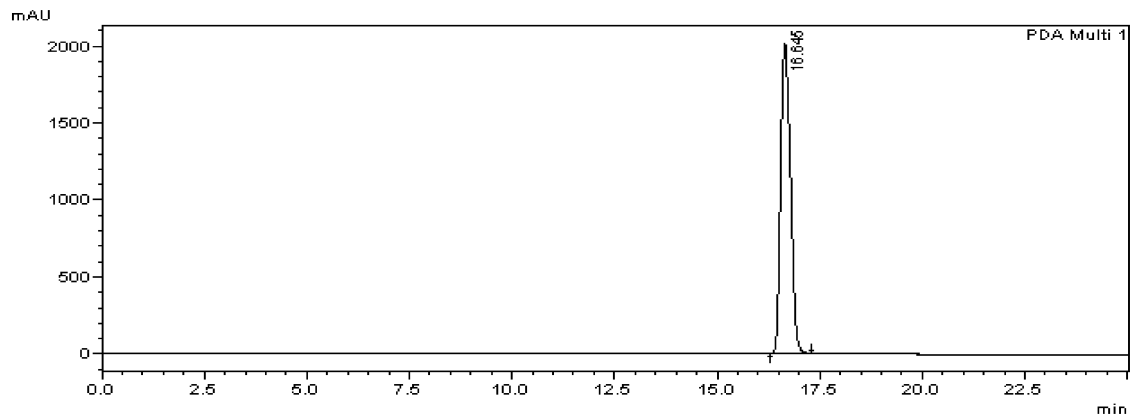
Cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado é da marca Shimadzu constituído por:

- ✓ bomba de alta pressão(LC10AD),
- ✓ detector fotodiodo(SPDM20A),
- ✓ comunicador(CBM-20A)
- ✓ injetor válvula Reodyne com loop de 20 μ L
- ✓ forno(CTO-20A): 40°C
- ✓ Fluxo: 1mL/min
- ✓ Coluna Supelco Analytical: RP-18 com dimensões 4,6x250 mm; tamanho da partícula : 5 μ m
- ✓ Fase móvel: acetonitrila e água mili-Q

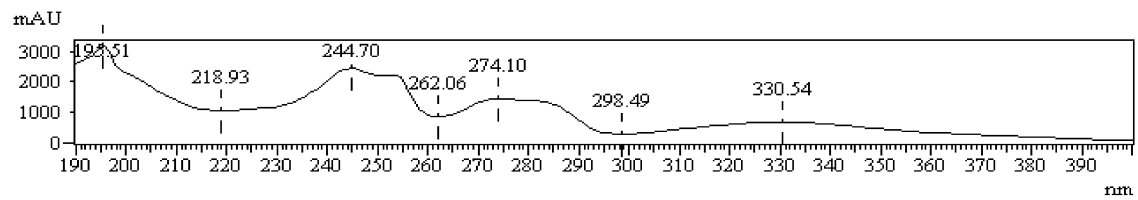
Para a análise foi utilizado o seguinte gradiente de concentração:



A amostra foi injetada com concentração de 0,05 mg/mL. No λ_{254} nm foi registrado o seguinte cromatograma e espectro no ultravioleta:



Retention Time : 16.645



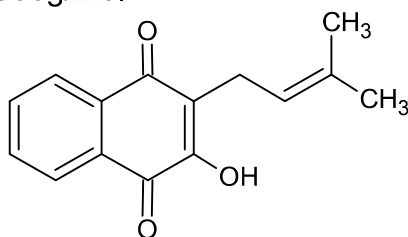
Diante disso, a tiofenonaftoquinona apresentou um grau cromatográfico de pureza acima de 99%.

LAPACHOL

Nome IUPAC: 4-Hidroxi-3-(3-metilbut-2-enil) naftaleno-1,2-diona

Fórmula molecular: $C_{15}H_{14}O_3$

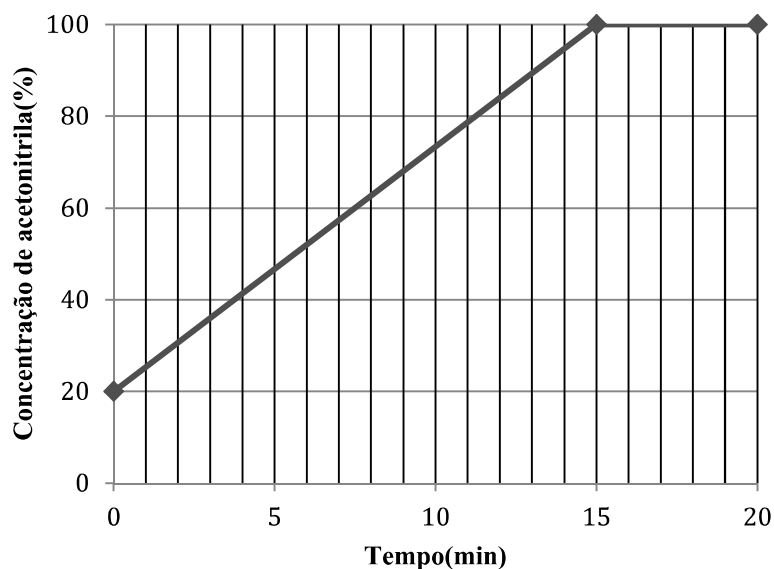
Massa molecular: 242,26986g/mol.



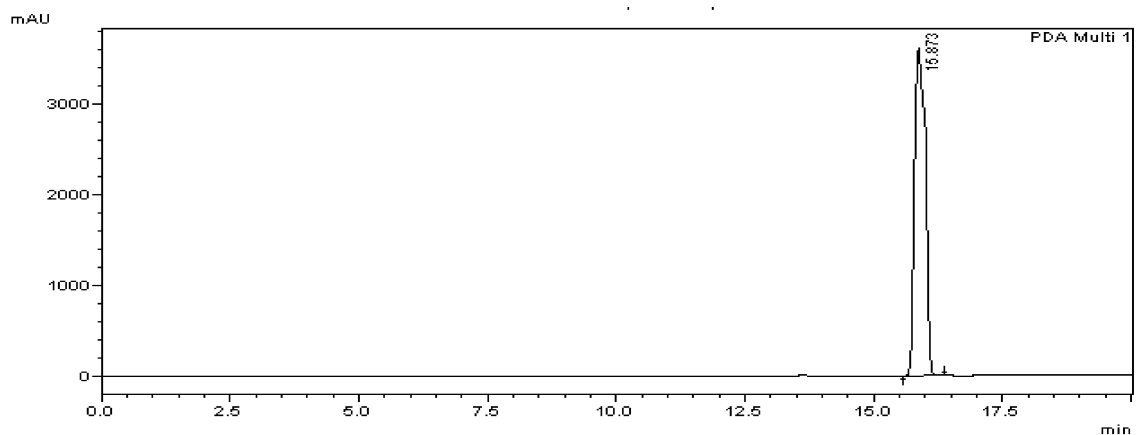
Cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado é da marca Shimadzu constituído por:

- ✓ bomba de alta pressão(LC10AD),
- ✓ detector fotodiodo(SPDM20A),
- ✓ comunicador(CBM-20A)
- ✓ injetor válvula Reodyne com loop de 20 μ L
- ✓ forno(CTO-20A): 40°C
- ✓ Fluxo: 1mL/min
- ✓ Coluna Supelco Analytical: RP-18 com dimensões 4,6x250 mm; tamanho da partícula : 5 μ m
- ✓ Fase móvel: acetonitrila e água mili-Q

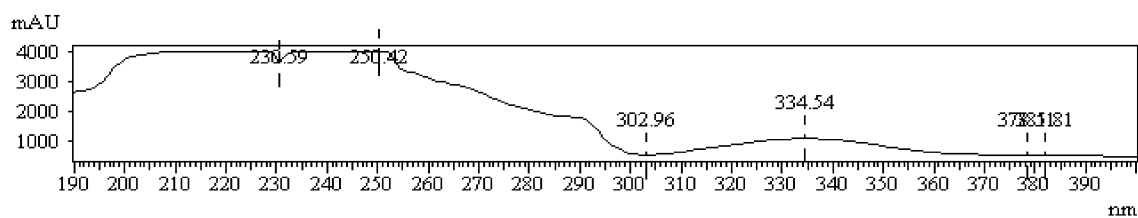
Para a análise foi utilizado o seguinte gradiente de concentração:



A amostra foi injetada com concentração de 1,0 mg/mL. No λ_{254} nm foi registrado o seguinte cromatograma e espectro no ultravioleta:



Retention Time : 15.873



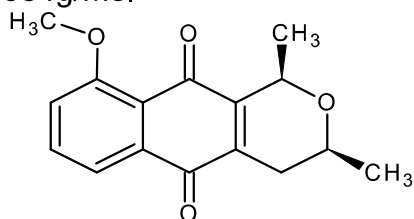
Diante disso, o Lapachol apresentou um grau cromatográfico de pureza acima de 99%.

ELEUTERINE

Nome IUPAC: 9-metoxi-1 (R), 3 (S)-dimetil-3,4-di-hidro-1H-benzo (g) isocromeno-5,10-diona

Fórmula molecular: $C_{16}H_{16}O_4$

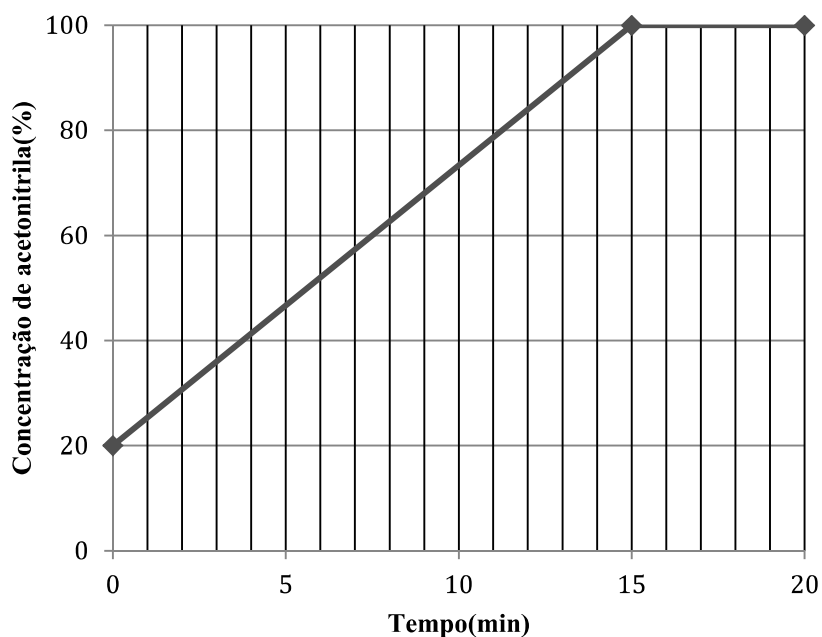
Massa molecular: 272,29584g/mol



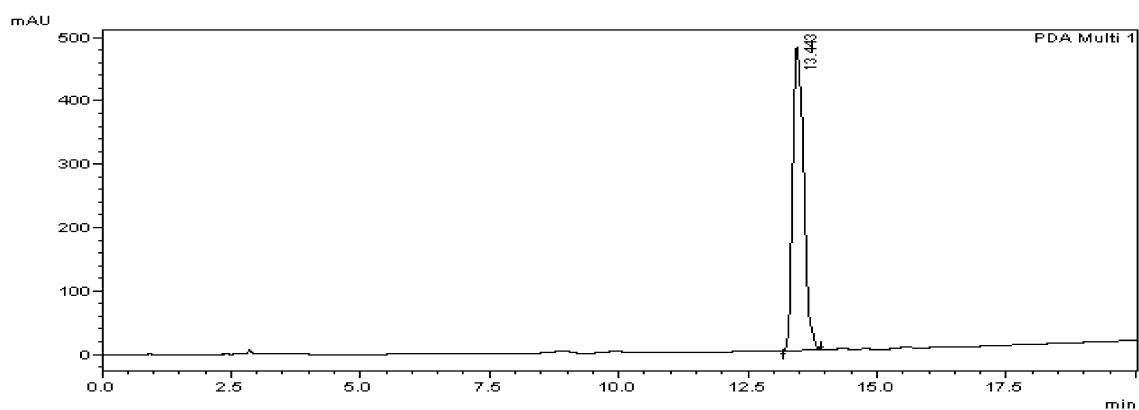
Cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado é da marca Shimadzu constituído por:

- ✓ bomba de alta pressão(LC10AD),
- ✓ detector fotodiodo(SPDM20A),
- ✓ comunicador(CBM-20A)
- ✓ injetor válvula Reodyne com loop de 20 μ L
- ✓ forno(CTO-20A): 40°C
- ✓ Fluxo: 1mL/min
- ✓ Coluna Supelco Analytical: RP-18 com dimensões 4,6x250 mm; tamanho da partícula : 5 μ m
- ✓ Fase móvel: acetonitrila e água mili-Q

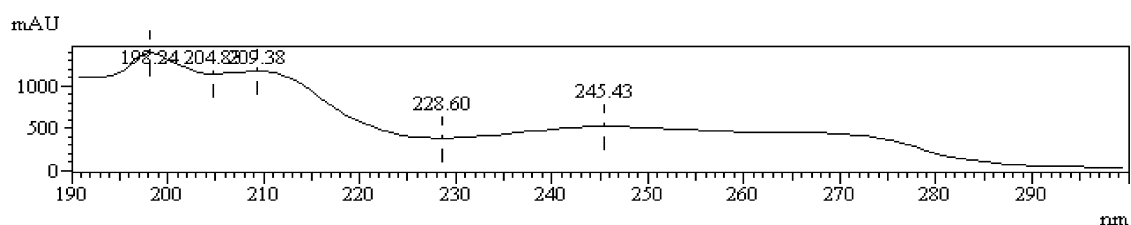
Para a análise foi utilizado o seguinte gradiente de concentração:



A amostra foi injetada com concentração de 1,0 mg/mL. No λ_{254} nm foi registrado o seguinte cromatograma e espectro no ultravioleta:



Retention Time : 13.443



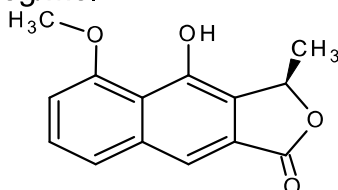
Diante disso, a Eleuterine apresentou um grau cromatográfico de pureza acima de 99%.

ELEUTEROL

Nome IUPAC: 4-hidroxi-5-metoxi-3 (R)-metil-3H-nafto (2,3-c)-furan-1-ona

Fórmula molecular: $C_{14}H_{12}O_4$

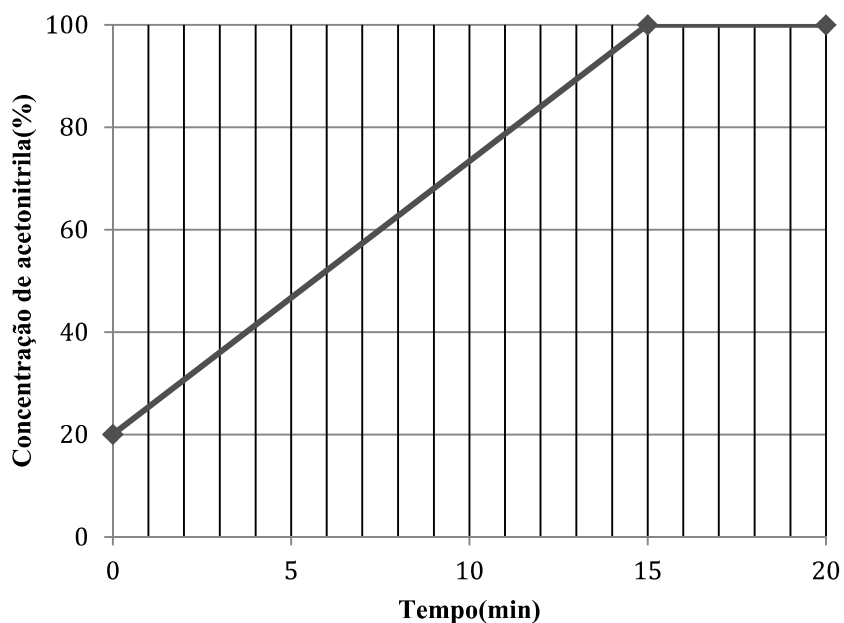
Massa molecular: 244,24268g/mol



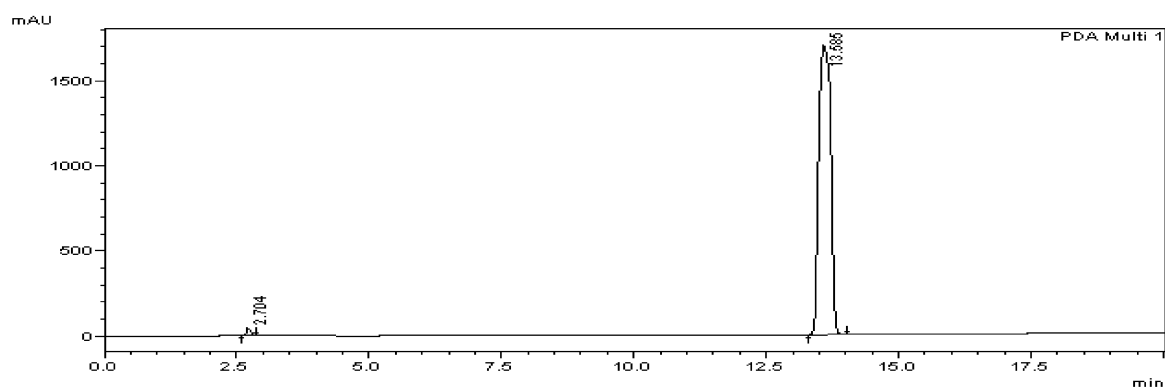
Cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado é da marca Shimadzu constituído por:

- ✓ bomba de alta pressão(LC10AD),
- ✓ detector fotodiodo(SPDM20A),
- ✓ comunicador(CBM-20A)
- ✓ injetor válvula Reodyne com loop de 20 μ L
- ✓ forno(CTO-20A): 40°C
- ✓ Fluxo: 1mL/min
- ✓ Coluna Supelco Analytical: RP-18 com dimensões 4,6x250 mm; tamanho da partícula : 5 μ m
- ✓ Fase móvel: acetonitrila e água mili-Q

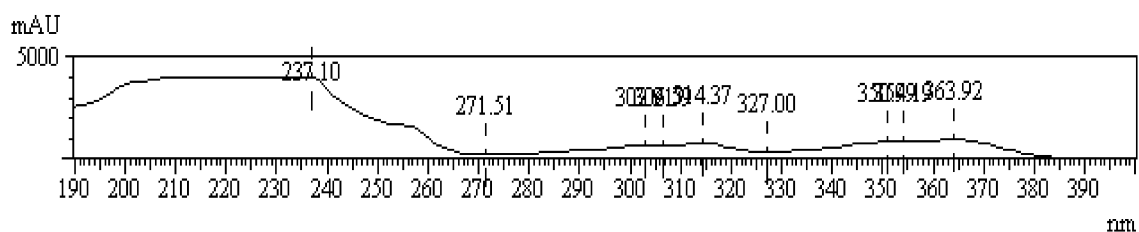
Para a análise foi utilizado o seguinte gradiente de concentração:



A amostra foi injetada com concentração de 1,0 mg/mL. No comprimento de onda 254 nm foi registrado o seguinte cromatograma e espectro no ultravioleta:



Retention Time : 13.585



Diante disso, o Eleuterol apresentou um grau cromatográfico de pureza acima de 99%.

CHALCONA 1

Fórmula molecular: $C_{18}H_{18}O_4$

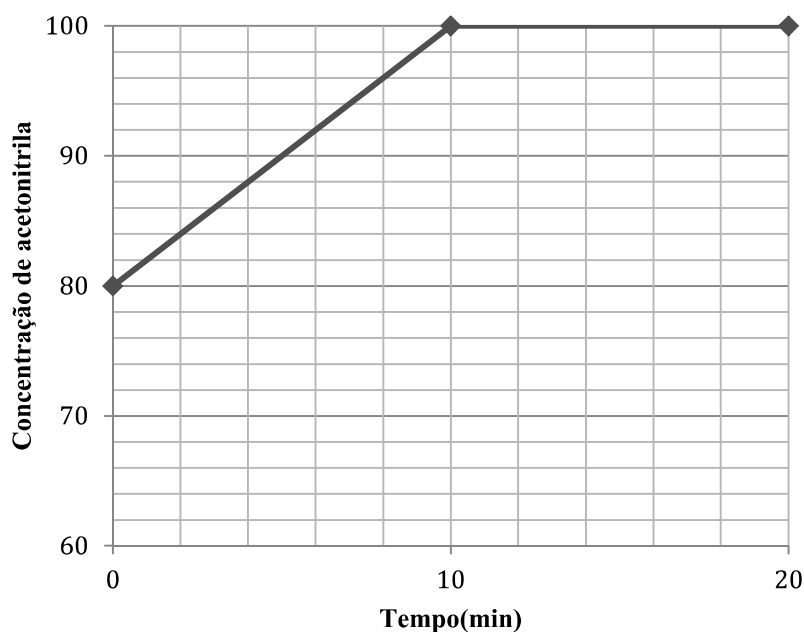
Massa molecular: 298,33312g/mol.



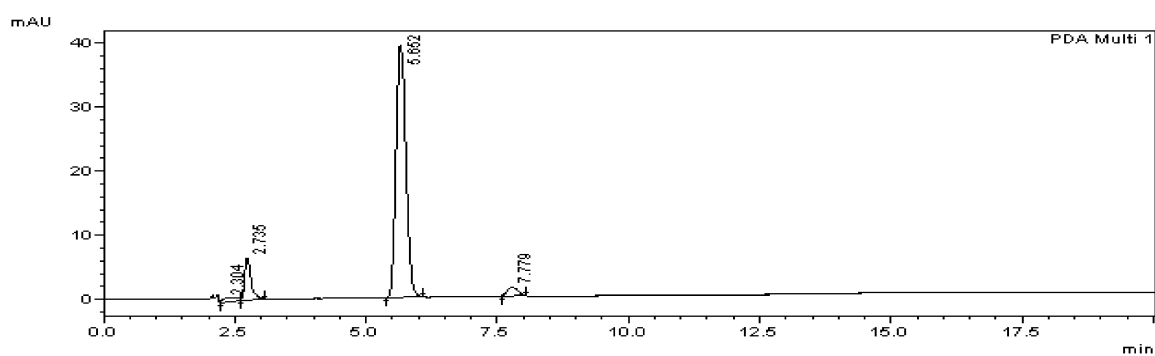
Cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado é da marca Shimadzu constituído por:

- ✓ bomba de alta pressão(LC10AD),
- ✓ detector fotodiodo(SPDM20A),
- ✓ comunicador(CBM-20A)
- ✓ injetor válvula Reodyne com loop de 20 μ L
- ✓ forno(CTO-20A): 40°C
- ✓ Fluxo: 1mL/min
- ✓ Coluna Supelco Analytical: RP-18 com dimensões 4,6x250 mm; tamanho da partícula : 5 μ m
- ✓ Fase móvel: acetonitrila e água mili-Q

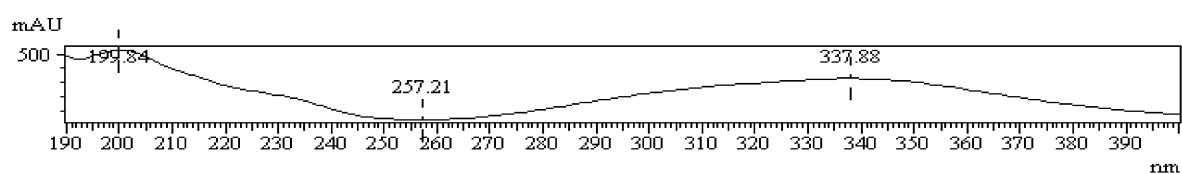
Para a análise foi utilizado o seguinte gradiente de concentração:



A amostra foi injetada com concentração de 0,05 mg/mL. No λ_{254} nm foi registrado o seguinte cromatograma e espectro no ultravioleta:



Retention Time : 5.652

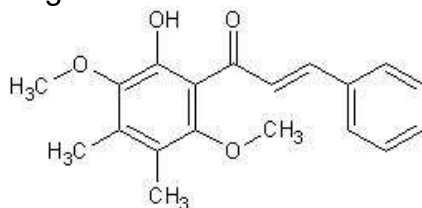


Diante disso, a Chalcona 1 apresentou um grau cromatográfico de pureza acima de 95%.

CHALCONA 2

Fórmula molecular: $C_{19}H_{20}O_4$

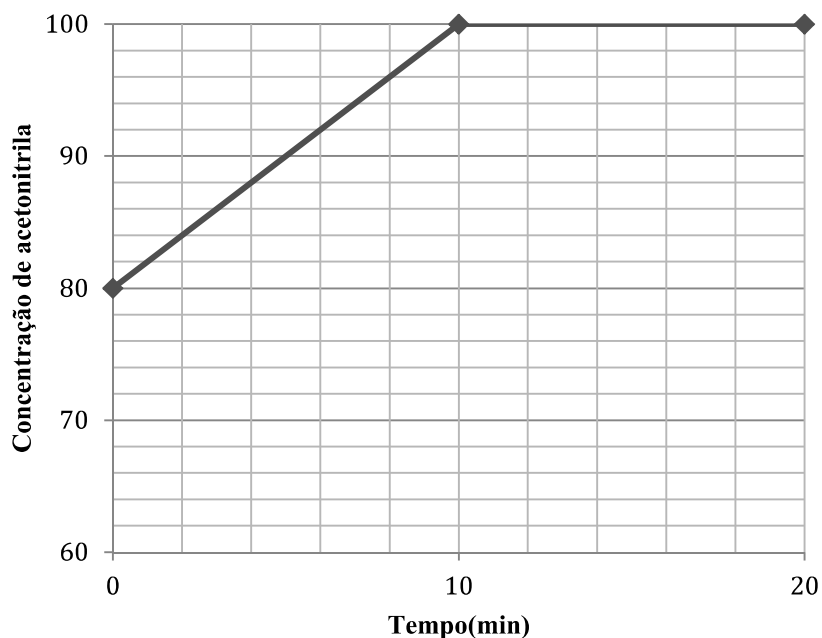
Massa molecular: 312,3595g/mol.



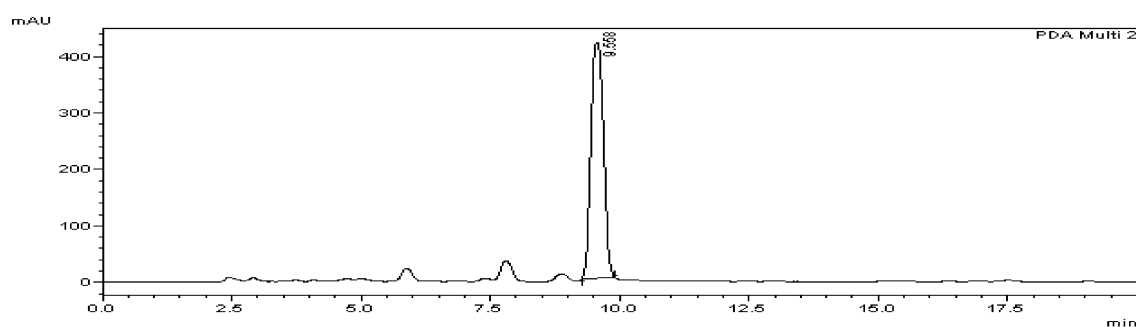
Cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado é da marca Shimadzu constituído por:

- ✓ bomba de alta pressão(LC10AD),
- ✓ detector fotodiodo(SPDM20A),
- ✓ comunicador(CBM-20A)
- ✓ injetor válvula Reodyne com loop de 20 μ L
- ✓ forno(CTO-20A): 40°C
- ✓ Fluxo: 1mL/min
- ✓ Coluna Supelco Analytical: RP-18 com dimensões 4,6x250 mm; tamanho da partícula : 5 μ m
- ✓ Fase móvel: acetonitrila e água mili-Q

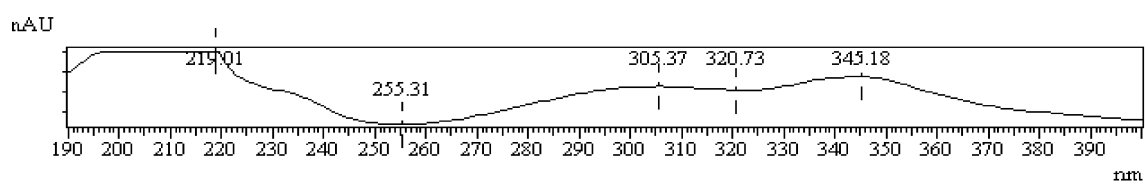
Para a análise foi utilizado o seguinte gradiente de concentração:



A amostra foi injetada com concentração de 1,0 mg/mL. No comprimento de onda 254 nm foi registrado o seguinte cromatograma e espectro no ultravioleta:



Retention Time : 9.558



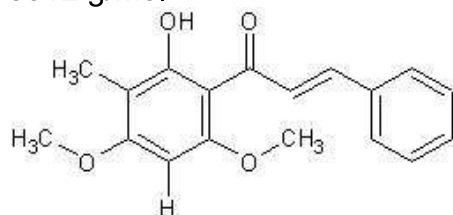
Diante disso, a Chalcona 2 apresentou um grau cromatográfico de pureza acima de 95%.

AURENTIACINA

Nome IUPAC:

Fórmula molecular: $C_{18}H_{18}O_4$

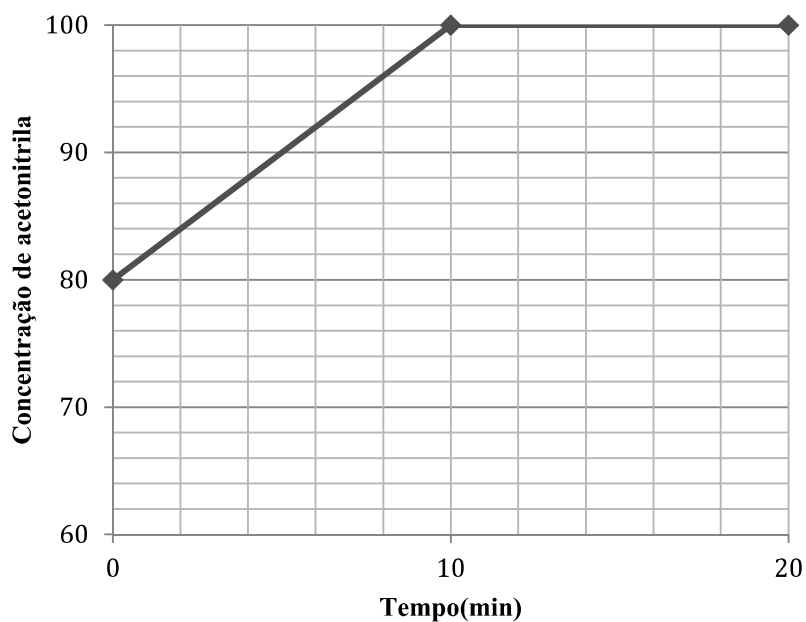
Massa molecular: 298,33312 g/mol.



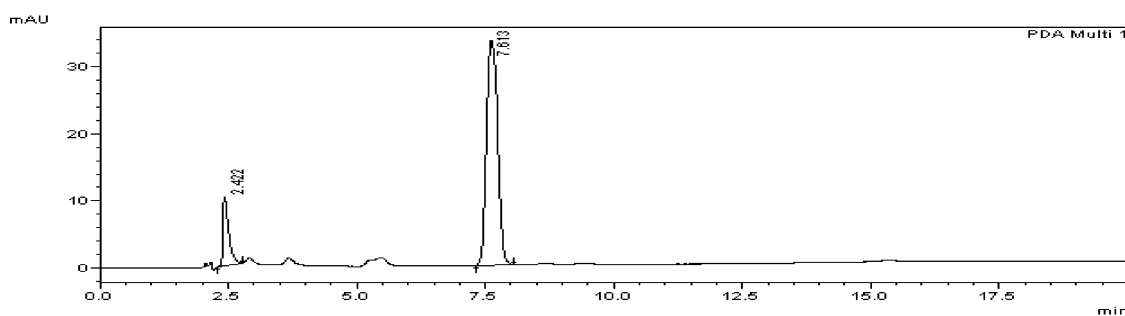
Cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado é da marca Shimadzu constituído por:

- ✓ bomba de alta pressão(LC10AD),
- ✓ detector fotodiodo(SPDM20A),
- ✓ comunicador(CBM-20A)
- ✓ injetor válvula Reodyne com loop de 20 μ L
- ✓ forno(CTO-20A): 40°C
- ✓ Fluxo: 1mL/min
- ✓ Coluna Supelco Analytical: RP-18 com dimensões 4,6x250 mm; tamanho da partícula : 5 μ m
- ✓ Fase móvel: acetonitrila e água mili-Q

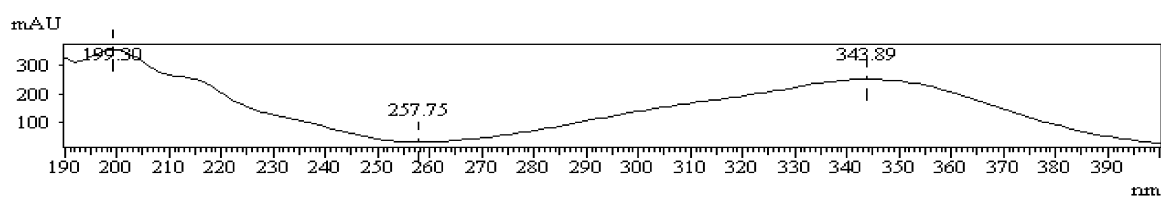
Para a análise foi utilizado o seguinte gradiente de concentração:



A amostra foi injetada com concentração de 0,05 mg/mL. No λ_{254} nm foi registrado o seguinte cromatograma e espectro no ultravioleta, sendo que o pico com tempo de retenção de 2,422 minutos corresponde ao DMSO:



Retention Time : 7.613



Diante disso, a Aurentiacina apresentou um grau cromatográfico de pureza acima de 95%.

8.4 Análises por espectrometria de massas

CHALCONA 1



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas René Rachou
 Av. Augusto de Lima, 1715 - Bairro Barro Preto
 39100-002 Belo Horizonte - MG - BRASIL
 Tel.: (31) 3349-7700 - FAX: (31) 3295-3115



Accurate Mass Report

Sample Name: Acquisition Date: 1/14/2014 11:48:20 AM
 Comment: Client: CPqRR/LQPNEzequias Instrument: maXis ETD
 Sample type: Metabolite
 Purity: single HPLC peak
 sample diluted 1:100 with 0.1% HFO in 50% MeOH

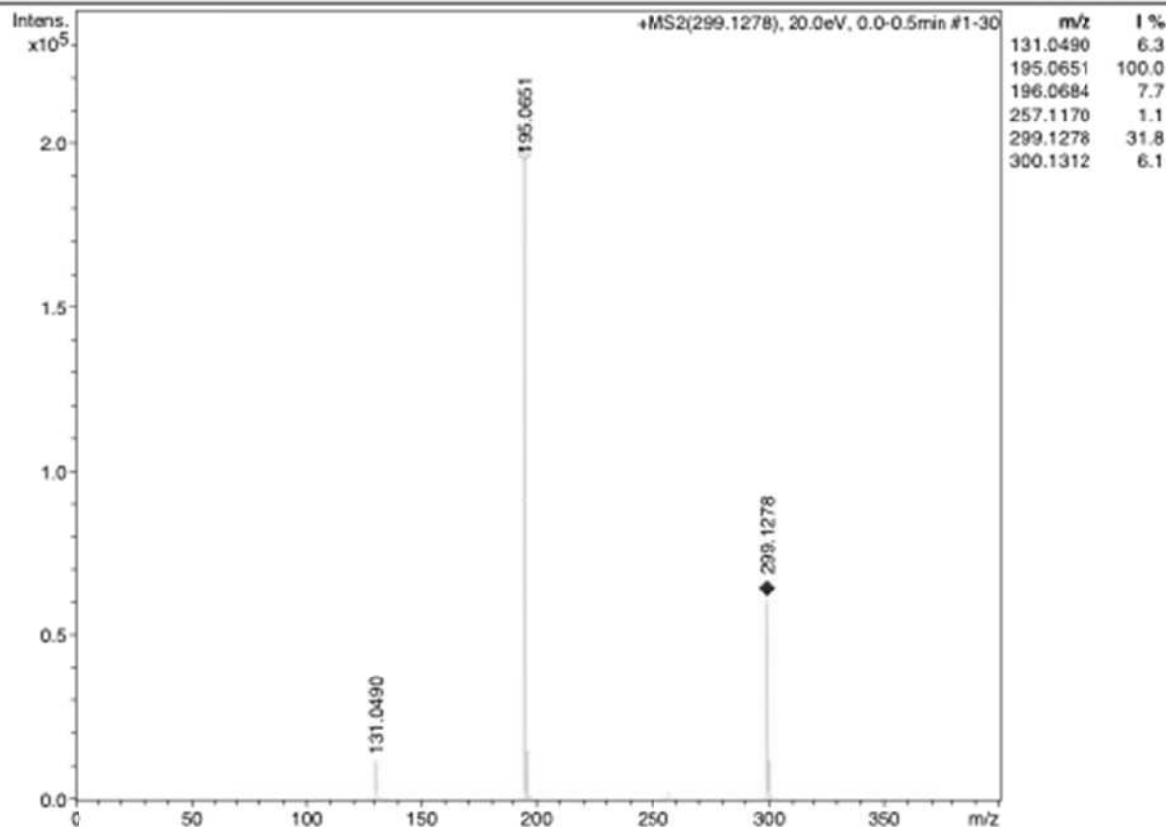
Method: mk_direkt-infusion_small-compounds_75-1000_pos.m
 Data Path: D:\Data\Clients\2014\CPqRR\LQPNEzequias\C1N\C1N_1maxis119mk_direct-MS_pos_CID(299-20eV).d

Acquisition Parameter

Ion Polarity	Positive	Scan Mode	MS/MS (MRM)	Used Reference MassList	Na Formate (pos)
Scan Begin	75 m/z	isCID Energy	0.0 eV	TOF Calibration Mode Version	Version 1
Scan End	1000 m/z	Collision Energy	20.0 eV	TOF1 Calibration Mode	Quadratic + HPC
Source Type	ESI	Set ion Cooler RF	25.0 Vpp	TOF1 Calibration Standard	0.1
Set EndPlate Offset	-500 V	Set ion Cooler Transfer Time	45.0 μ s	Deviation in PPM	
Set Capillary	4500 V	Set ion Cooler Pre Pulse	7.0 μ s	TOF2 Calibration Mode	Enhanced Quadratic
Nebulizer	0.4 Bar	Storage Time		TOF2 Calibration Standard	0.1
Dry Gas	4.0 l/min	Rolling Averages	3 Off	Deviation in PPM	
Dry Heater	180 °C				
Set Divert Valve	Waste				

Results

Meas. m/z	#	Ion Formula	Adduct	Sum Formula	Score	mSigma	m/z	err [mDa]	err [ppm]	rdB	e ⁻ Conf	N-Rule
195.0651	1	C10H11O4	M+H	C10H11O4	100.00	21.4	195.0652	-0.0	-0.2	5.5	even	ok
299.1278	1	C17H16N4Na	M+H	C17H15N4Na	100.00	11.7	299.1267	-1.1	-3.8	11.5	even	ok
	1	C17H16N4Na	M+Na	C17H16N4	100.00	11.7	299.1267	-1.1	-3.8	11.5	even	ok





Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas René Rachou
 Av. Augusto de Lima, 1715 - Bairro Barro Preto
 39100-002 Belo Horizonte - MG - BRASIL
 Tel.: (31) 3349-7700 - FAX: (31) 3295-3115



Accurate Mass Report

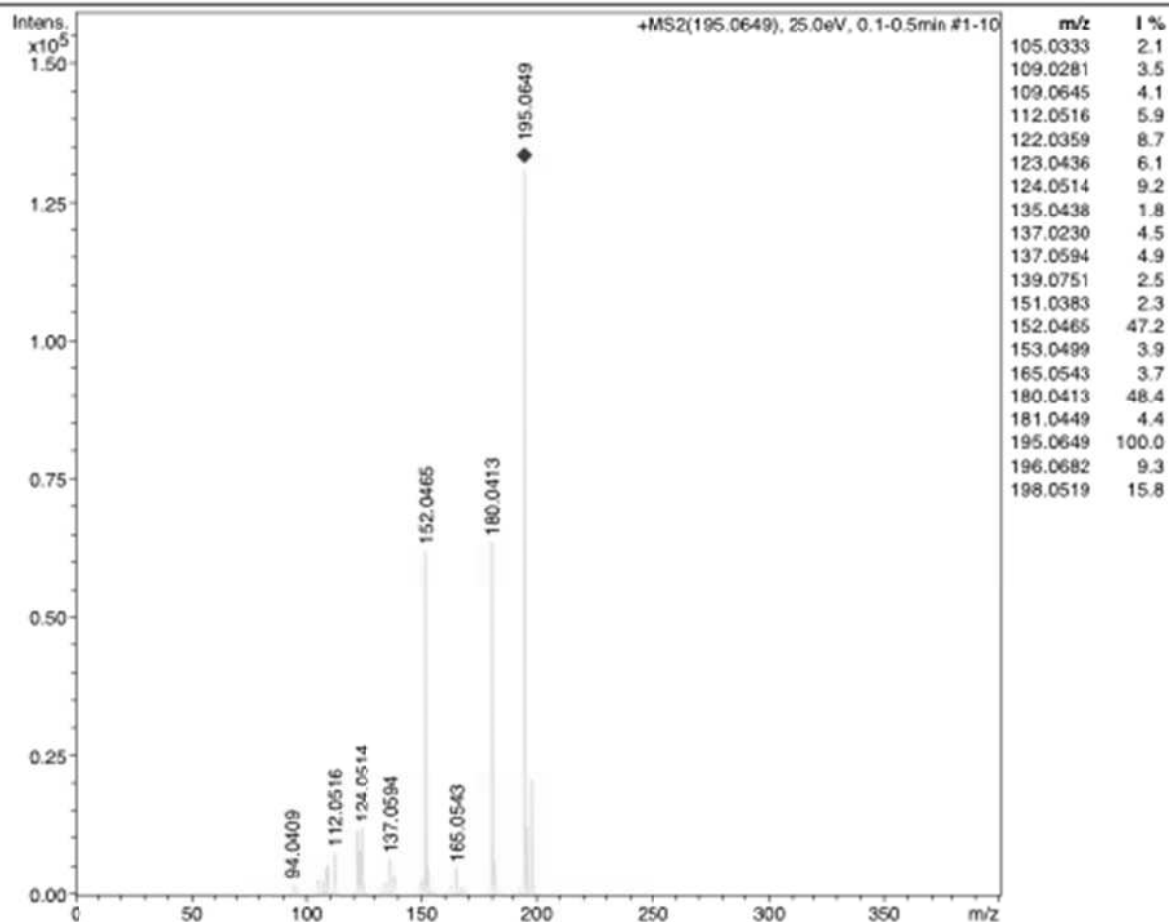
Sample Name: Acquisition Date: 1/14/2014 11:51:12 AM
 Comment: Client: CPqRR/LQPNEzequias Instrument: maXis ETD
 Sample type: Metabolite
 Purity: single HPLC peak
 sample diluted 1:100 with 0.1% HFO in 50% MeOH

Method: mk_direkt-infusion_small-compounds_75-1000_pos.m
 Data Path: D:\Data\Clients\2014\CPqRR\LQPNEzequias\C1N\C1N_1maxis119mk_direct-MS_pos_isCID-CID(195-25eV).d

Acquisition Parameter

Ion Polarity	Positive	Scan Mode	MS/MS (MRM)	Used Reference MassList	Na Formate (pos)
Scan Begin	75 m/z	isCID Energy	60.0 eV	TOF Calibration Mode Version	Version 1
Scan End	1000 m/z	Collision Energy	25.0 eV	TOF1 Calibration Mode	Quadratic + HPC
Source Type	ESI	Set ion Cooler RF	25.0 Vpp	TOF1 Calibration Standard	0.1
Set EndPlate Offset	-500 V	Set ion Cooler Transfer Time	45.0 μ s	Deviation in PPM	
Set Capillary	4500 V	Set ion Cooler Pre Pulse	7.0 μ s	TOF2 Calibration Mode	Enhanced Quadratic
Nebulizer	0.4 Bar	Storage Time		TOF2 Calibration Standard	0.1
Dry Gas	4.0 l/min	Rolling Averages	3 Off	Deviation in PPM	
Dry Heater	180 °C				
Set Divert Valve	Waste				

Results



CHALCONA 2



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas René Rachou
 Av. Augusto de Lima, 1715 - Bairro Barro Preto
 39100-002 Belo Horizonte - MG - BRASIL
 Tel.: (31) 3349-7700 - FAX: (31) 3295-3115



Accurate Mass Report

Sample Name: Acquisition Date: 1/14/2014 12:09:41 PM
 Comment: Client: CPqRR/LQPN/Ezequias Instrument: maXis ETD
 Sample type: Metabolite
 Purity: single HPLC peak
 sample diluted 1:100 with 0.1% HFO in 50% MeOH

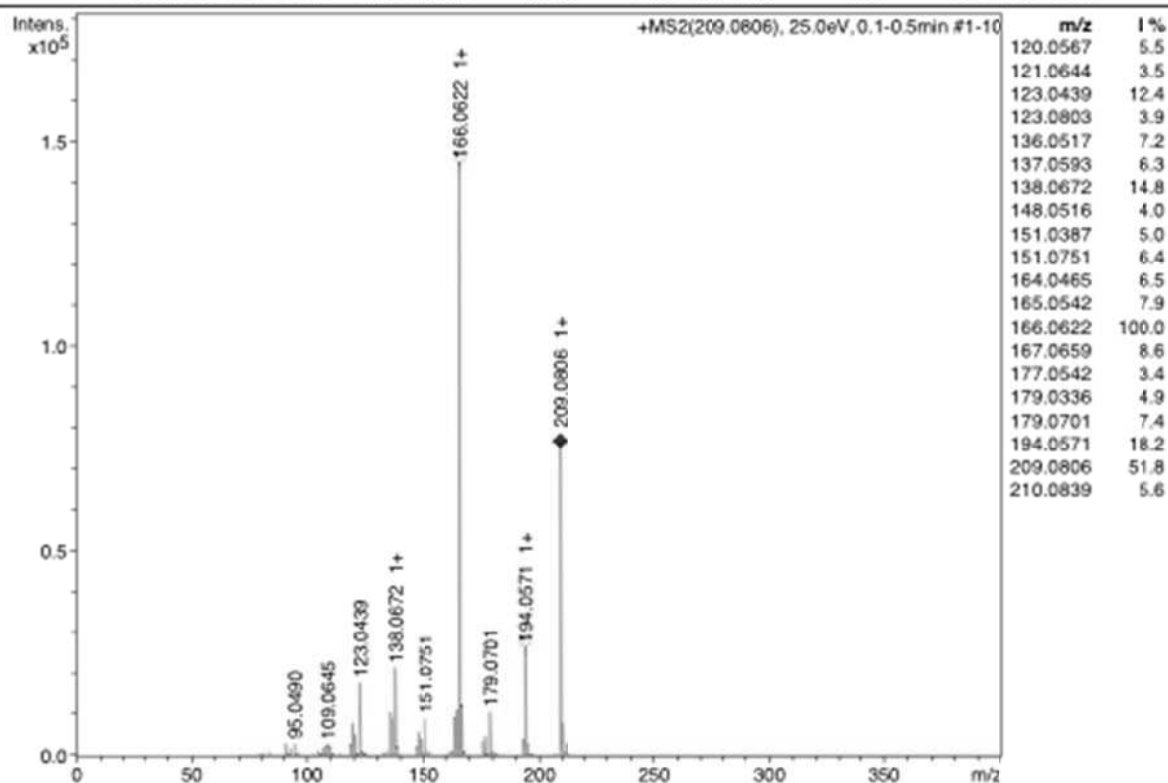
Method: mk_direkt-infusion_small-compounds_75-1000_pos.m
 Data Path: D:\Data\Clients\2014\CPqRR\LQPN\Ezequias\DMC312\DMC312_1maxis119mk_direct-MS_pos_isCID-CID(209.25eV).d

Acquisition Parameter

Ion Polarity	Positive	Scan Mode	MS/MS (MRM)	Used Reference MassList	Na Format (pos)
Scan Begin	75 m/z	isCID Energy	60.0 eV	TOF Calibration Mode Version	Version 1
Scan End	1000 m/z	Collision Energy	25.0 eV	TOF1 Calibration Mode	Quadratic + HPC
Source Type	ESI	Set Ion Cooler RF	25.0 Vpp	TOF1 Calibration Standard	0.1
Set End Plate Offset	-500 V	Set Ion Cooler Transfer Time	45.0 μ s	Deviation in PPM	
Set Capillary	4500 V	Set Ion Cooler Pre Pulse	7.0 μ s	TOF2 Calibration Mode	Enhanced Quadratic
Nebulizer	0.4 Bar	Storage Time		TOF2 Calibration Standard	0.1
Dry Gas	4.0 l/min	Rolling Averages	3 Off	Deviation in PPM	
Dry Heater	180 °C				
Set Divert Valve	Waste				

Results

Meas. m/z	#	Ion Formula	Adduct	Sum Formula	Score	mSigma	m/z	err [mDa]	err [ppm]	rdB	e ⁻ Conf	N-Rule
166.0622	1	C10H9NNa	M+Na	C10H9N	100.00	16.0	166.0627	0.5	2.9	6.5	even	ok
194.0571	1	C11H9NNaO	M+H	C11H8NNaO	100.00	6.4	194.0576	-0.6	-2.9	7.5	even	ok
	1	C11H9NNaO	M+Na	C11H9NO	100.00	6.4	194.0576	-0.6	-2.9	7.5	even	ok
209.0806	1	C10H10N4Na	M+H	C10H9N4Na	100.00	10.0	209.0798	0.8	3.9	7.5	even	ok
	1	C10H10N4Na	M+Na	C10H10N4	100.00	10.0	209.0798	0.8	3.9	7.5	even	ok





Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas René Rachou
 Av. Augusto de Lima, 1715 – Bairro Barro Preto
 39100-002 Belo Horizonte – MG – BRASIL
 Tel.: (31) 3349-7700 – FAX: (31) 3295-3115



Accurate Mass Report

Sample Name: Acquisition Date: 1/14/2014 12:09:41 PM
 Comment: Client: CPqRR/LQPNEzequias Instrument: maXis ETD
 Sample type: Metabolite
 Purity: single HPLC peak
 sample diluted 1:100 with 0.1% HFC in 50% MeOH

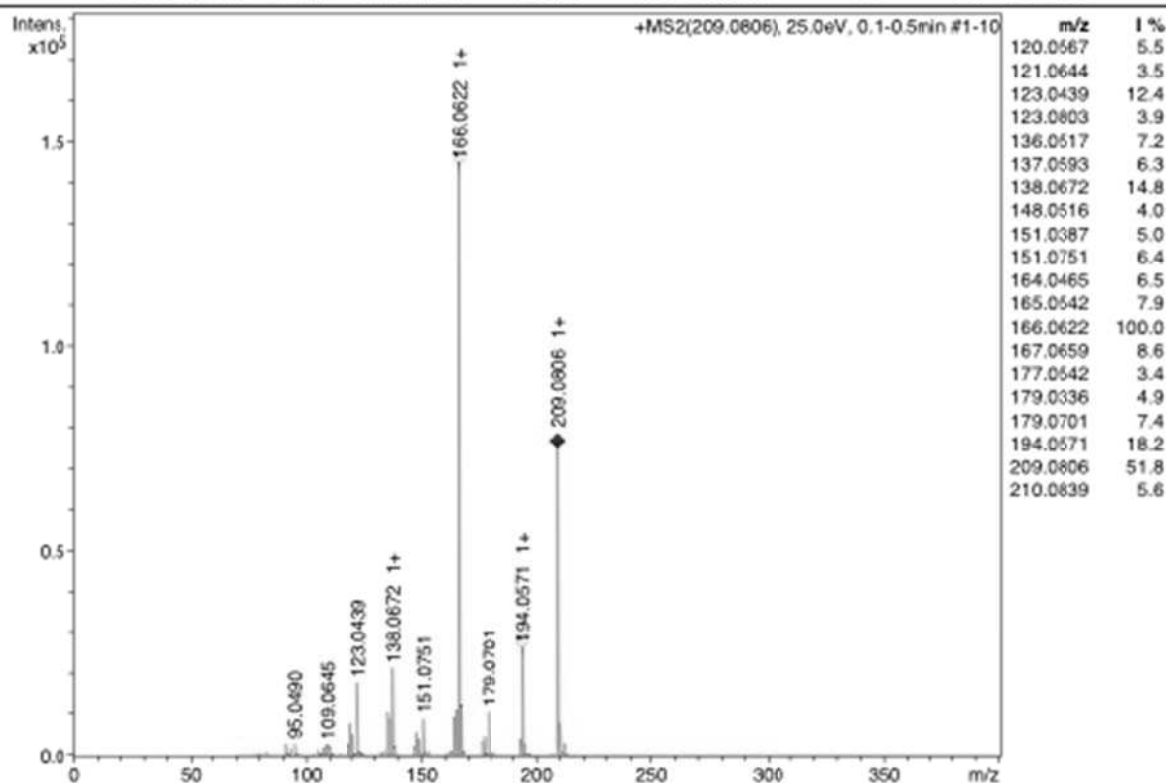
Method: mk_direkt-infusion_small-compounds_75-1000_pos.m
 Data Path: D:\Data\Clients\2014\CPqRR\LQPNEzequias\DMC312\DMC312_1maxis119mk_direct-MS_pos_isCID-CID(209-25eV).d

Acquisition Parameter

Ion Polarity	Positive	Scan Mode	MS/MS (MRM)	Used Reference MassList	Na Formate (pos)
Scan Begin	75 m/z	isCID Energy	60.0 eV	TOF Calibration Mode Version	Version 1
Scan End	1000 m/z	Collision Energy	25.0 eV	TOF1 Calibration Mode	Quadratic + HPC
Source Type	ESI	Set Ion Cooler RF	25.0 Vpp	TOF1 Calibration Standard	0.1
Set End Plate Offset	-500 V	Set Ion Cooler Transfer	45.0 μ s	Deviation in PPM	
Set Capillary	4500 V	Time		TOF2 Calibration Mode	Enhanced Quadratic
Nebulizer	0.4 Bar	Set Ion Cooler Pre Pulse	7.0 μ s	TOF2 Calibration Standard	0.1
Dry Gas	4.0 l/min	Storage Time		Deviation in PPM	
Dry Heater	180 °C				
Set Divert Valve	Waste	Rolling Averages	3 Off		

Results

Meas. m/z	#	Ion Formula	Adduct	Sum Formula	Score	mSigma	m/z	err [mDa]	err [ppm]	rdb	e ⁻	Conf	N-Rule
166.0622	1	C10H9NNa	M+Na	C10H9N	100.00	16.0	166.0627	0.5	2.9	6.5	even	ok	
194.0571	1	C11H9NNaO	M+H	C11H8NNaO	100.00	6.4	194.0576	-0.6	-2.9	7.5	even	ok	
	1	C11H9NNaO	M+Na	C11H9NO	100.00	6.4	194.0576	-0.6	-2.9	7.5	even	ok	
209.0806	1	C10H10N4Na	M+H	C10H9N4Na	100.00	10.0	209.0798	0.8	3.9	7.5	even	ok	
	1	C10H10N4Na	M+Na	C10H10N4	100.00	10.0	209.0798	0.8	3.9	7.5	even	ok	



AURENTIACINA



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas René Rachou
 Av. Augusto de Lima, 1715 - Bairro Barro Preto
 39100-002 Belo Horizonte - MG - BRASIL
 Tel.: (31) 3349-7700 - FAX: (31) 3295-3115



Accurate Mass Report

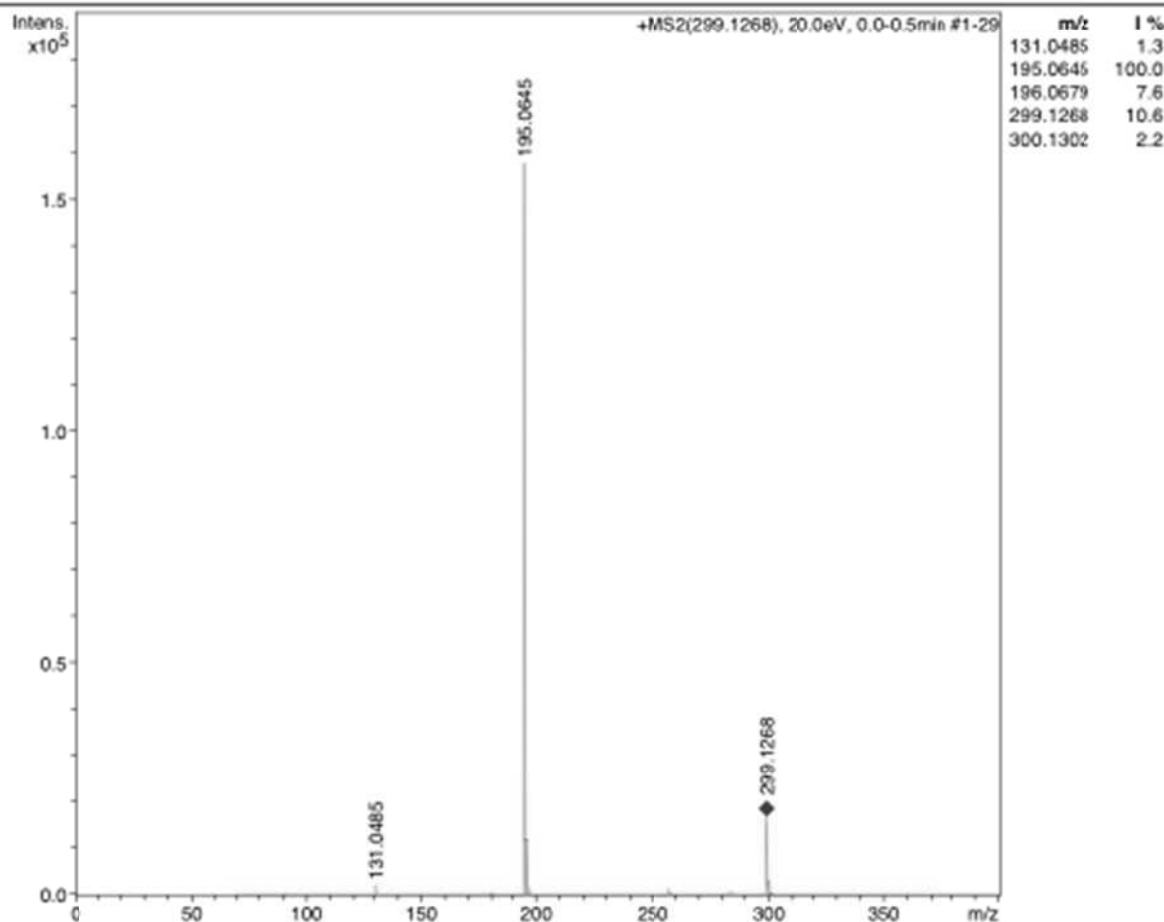
Sample Name: Acquisition Date: 1/14/2014 11:34:04 AM
 Comment: Client: CPqRR/LQPNEzequias Instrument: maXis ETD
 Sample type: Metabolite
 Purity: single HPLC peak
 sample diluted 1:100 with 0.1% HFO in 50% MeOH

Method: mk_direkt-infusion_small-compounds_75-1000_pos.m
 Data Path: D:\Data\Clients\2014\CPqRR\LQPNEzequias\C2N\C2N_1maxis119mk_direct-MS_pos_CID(299-20eV).d

Acquisition Parameter

Ion Polarity	Positive	Scan Mode	MS/MS (MRM)	Used Reference MassList	Na Format (pos)
Scan Begin	75 m/z	isCID Energy	0.0 eV	TOF Calibration Mode Version	Version 1
Scan End	1000 m/z	Collision Energy	20.0 eV	TOF1 Calibration Mode	Quadratic + HPC
Source Type	ESI	Set Ion Cooler RF	25.0 Vpp	TOF1 Calibration Standard	0.1
Set EndPlate Offset	-500 V	Set Ion Cooler Transfer Time	45.0 μ s	Deviation in PPM	
Set Capillary	4500 V	Set Ion Cooler Pre Pulse	7.0 μ s	TOF2 Calibration Mode	Enhanced Quadratic
Nebulizer	0.4 Bar	Storage Time		TOF2 Calibration Standard	0.1
Dry Gas	4.0 l/min	Rolling Averages	3 Off	Deviation in PPM	
Dry Heater	180 °C				
Set Divert Valve	Waste				

Results





Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas René Rachou
 Av. Augusto de Lima, 1715 – Bairro Barro Preto
 39100-002 Belo Horizonte – MG – BRASIL
 Tel.: (31) 3349-7700 – FAX: (31) 3295-3115



Accurate Mass Report

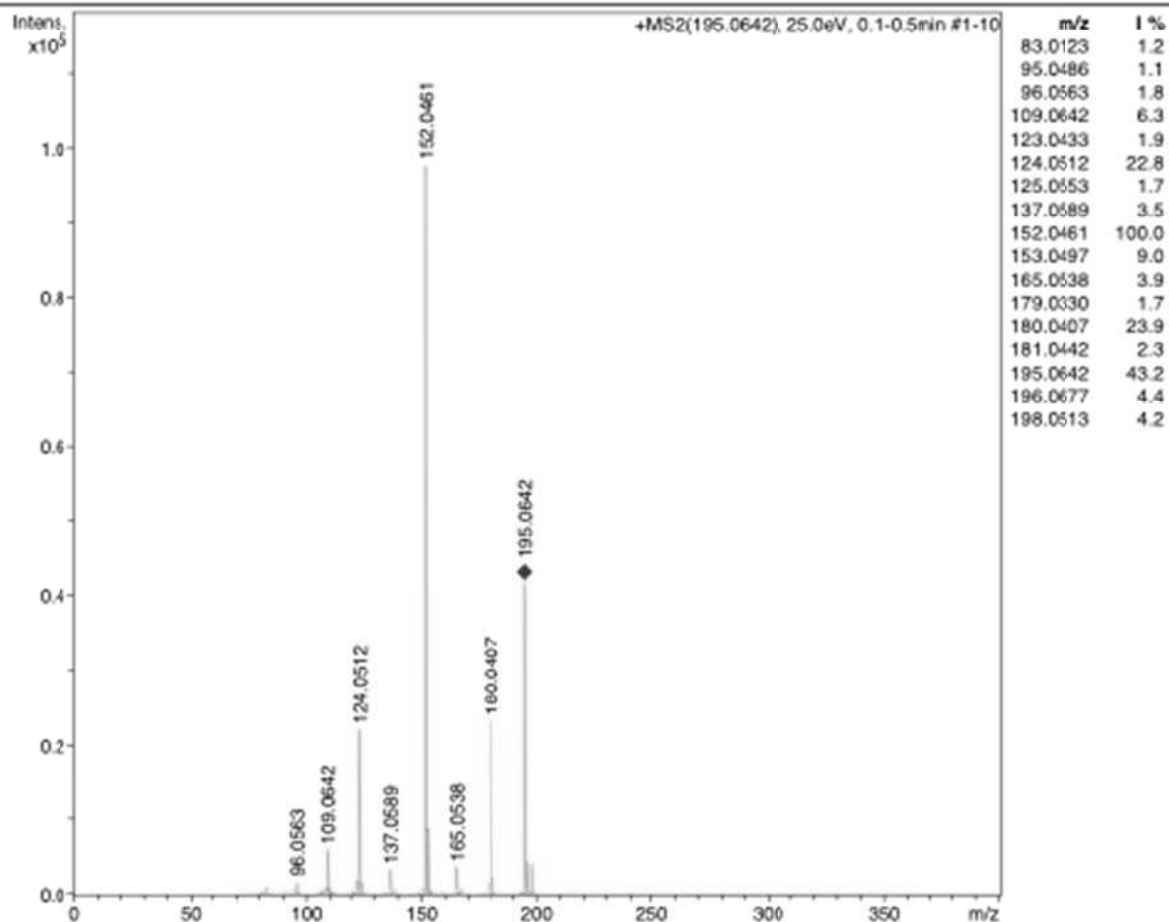
Sample Name: Acquisition Date: 1/14/2014 11:35:56 AM
 Comment: Client: CPqRR/LQPNEzequias Instrument: maXis ETD
 Sample type: Metabolite
 Purity: single HPLC peak
 sample diluted 1:100 with 0.1% HFC in 50% MeOH

Method: mk_direkt-infusion_small-compounds_75-1000_pos.m
 Data Path: D:\Data\Clients\2014\CPqRR\LQPNEzequias\C2NC2N_1maxis119mk_direct-MS_pos_isCID-CID(195-25eV).d

Acquisition Parameter

Ion Polarity	Positive	Scan Mode	MS/MS (MRM)	Used Reference MassList	Na Fomate (pos)
Scan Begin	75 m/z	isCID Energy	60.0 eV	TOF Calibration Mode Version	Version 1
Scan End	1000 m/z	Collision Energy	25.0 eV	TOF1 Calibration Mode	Quadratic + HPC
Source Type	ESI	Set Ion Cooler RF	25.0 Vpp	TOF1 Calibration Standard	0.1
Set End Plate Offset	-500 V	Set Ion Cooler Transfer	45.0 μ s	Deviation in PPM	
Set Capillary	4500 V	Time		TOF2 Calibration Mode	Enhanced Quadratic
Nebulizer	0.4 Bar	Set Ion Cooler Pre Pulse	7.0 μ s	TOF2 Calibration Standard	0.1
Dry Gas	4.0 l/min	Storage Time		Deviation in PPM	
Dry Heater	180 °C				
Set Divert Valve	Waste	Rolling Averages	3 Off		

Results



9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe F, Yamauchi T, Nagao T, Kinjo J, Okabe H, Higo H, et al. Ursolic acid as a trypanocidal constituent in rosemary. *Biol Pharm Bull.* 2002 Nov;25(11):1485–7.
- Achan J, Talisuna AO, Erhart A, Yeka A, Tibenderana JK, Baliraine FN, et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar J.* 2011;10(1):144.
- Ali A, Assimopoulou AN, Papageorgiou VP, Kolodziej H. Structure/antileishmanial activity relationship study of naphthoquinones and dependency of the mode of action on the substitution patterns. *Planta Med.* 2011;77(18):2003–12.
- Almeida ER De. Preclinical and Clinical Studies of Lapachol and Beta-Lapachone. *Open Nat Prod J.* 2009 Apr 20;2(1):42–7.
- De Almeida ER, da Silva Filho AA, dos Santos ER, Lopes CA. Antiinflammatory action of lapachol. *J Ethnopharmacol.* 1990;29(2):239–41.
- De Almeida Rodrigues I, Da Silva BA, Dos Santos ALS, Vermelho AB, Alviano CS, Do Socorro Santos Rosa M. A new experimental culture medium for cultivation of *Leishmania amazonensis*: Its efficacy for the continuous in vitro growth and differentiation of infective promastigote forms. *Parasitol Res.* 2010;106:1249–52.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012;7(5):e35671.
- Alves TMA, Kloos H, Zani CL. Eleutherinone, a novel fungitoxic naphthoquinone from *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(5):709–12.
- Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC. Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop.* 2008;105(1):1–9.
- Amor EC, Villaseñor IM, Antemano R, Perveen Z, Concepcion GP, Choudhary MI. Cytotoxic C-Methylated Chalcones from *Syzygium samarangense* . *Pharm Biol.* 2007;45(10):777–83.
- Arung ET, Kusuma IW, Kim Y-U, Shimizu K, Kondo R. Antioxidative compounds from leaves of Tahongai (*Klienhowia hospita*). *J Wood Sci.* 2011;27;58(1):77–80.
- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(7):2034–9.
- Balandrin M, Klocke J, Wurtele E, Bollinger W. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science (80-).* 1985;(21).
- Balassiano IT, De Paulo SA, Silva NH, Cabral MC, Carvalho MGC. Demonstration of the lapachol as a potential drug for reducing cancer metastasis. *Oncol Rep.* 2005;13:329–33.
- Balunas MJ, Kinghorn a D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 2005;22;78(5):431–41.
- Bianchi C, Ceriotti G. Chemical and pharmacological investigations of constituents of *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb. (Iridaceae). *J Pharm Sci.* 1975;64(8):1305–8.
- Boumendjel A, Boccard J, Carrupt PA, Nicolle E, Blanc M, Geze A, et al. Antimitotic and antiproliferative activities of chalcones: Forward structure-activity relationship. *J Med Chem.* 2008;51:2307–10.
- Breger J, Fuchs BB, Aperis G, Moy TI, Ausubel FM, Mylonakis E. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *PLoS Pathog.* 2007;3:0168–78.
- Brenzan MA, Santos AO, Nakamura C V, Filho BPD, Ueda-Nakamura T, Young MCM, et al. Effects of (-) mammea A/BB isolated from *Calophyllum brasiliense* leaves and derivatives on mitochondrial membrane of *Leishmania amazonensis*. *Phytomedicine.* 2012;19(3-4):223–30.

- Buckner FS, Verlinde CLMJ, Flamme ACLA. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(11).
- Callahan HL, Portal AC, Devereaux R, Grogl M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(4):818–22.
- Cançado J. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002;44(1):29–37.
- Chen M, Zhai L, Christensen SB, Thor G, Zhai LIN. Inhibition of Fumarate Reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by Chalcones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(7).
- Contreras I, Estrada J a, Guak H, Martel C, Borjian A, Ralph B, et al. Impact of *Leishmania mexicana* infection on dendritic cell signaling and functions. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Sep;8(9):e3202.
- Croft SL. The current status of antiparasite chemotherapy. *Parasitology.* 1997;114 Suppl:S3–15.
- Cunha WR, Crevelin EJ, Arantes GM, Crotti AEM, Andrade e Silva ML, Cardoso Furtado NAJ, et al. A study of the trypanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia species*. *Phyther Res.* 2006;478:474–8.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27(5):305–18.
- DiMasi J a, Hansen RW, Grabowski HG. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ.* 2003;22(2):151–85.
- Ephros M, Bitnun A. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(2):278–82.
- Fairlamb AH, Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol.* 1992;46:695–729.
- Fernandes MC, Da Silva EN, Pinto a V, De Castro SL, Menna-Barreto RFS. A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* 2012;139(1):26–36.
- Fernandes Rodrigues JC, Concepcion JL, Rodrigues C, Caldera A, Urbina J, de Souza W. In vitro activities of ER-119884 and E5700, two potent squalene synthase inhibitors, against *Leishmania amazonensis*: antiproliferative, biochemical, and ultrastructural effects. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(11):4098–114.
- Ferreira DDS, Esperandim VR, Toldo MPA, Saraiva J, Cunha WR, de Albuquerque S. Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. *Parasitol Res.* 2010;106(4):985–9.
- Fidalgo LM, Gille L. Mitochondria and trypanosomatids: Targets and drugs. *Pharm. Res.* 2011. p. 2758–70.
- Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(5):755–9.
- Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA, Siqueira-Neto JL. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol Drugs drug Resist.* Australian Society for Parasitology; 2012;2:11–9.
- Gebre-Hiwot A, Tadesse G, Croft SL, Frommel D. An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. *Acta Trop.* 1992;51(3-4):237–45.
- Gil, ES. Paula, JR, Nascimento FRF BJ. Produtos naturais com potencial leishmanicida. *Rev Ciências Farm Básica Apl.* 2009;29(3):223–30.

- Goulart M, Zani C, Tonholo J, Freitas LR, Abreu FC, Oliveira AB, et al. Trypanocidal Activity and Redox Potential of Heterocyclic- and 2-Hydroxy-Naphthoquinones. *Bioorganic Med Chem Lett*. 1997;7(15):2043–8.
- Grogl M, Hickman M, Ellis W, Hudson T, Lazo JS, Sharlow ER, et al. Drug discovery algorithm for cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88(2):216–21.
- Guimarães LRC, Rodrigues APD, Marinho PSB, Muller AH, Guilhon GMS, Santos LS, et al. Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabrior*, on *Leishmania (L.) amazonensis*. *Parasitol Res*. 2010;107(5):1075–81.
- Hamilton CJ, Saravanamuthu A, Eggleston IM, Fairlamb AH. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ : substrate- economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochem J*. 2003;537:529–37.
- Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol*. 2011;27(9):403–9.
- Hodge WH, Taylor D. The Ethnobotany of the Island Caribs of Dominica. *Webbia*. Taylor & Francis Group; 1957;12(2):513–644.
- Hodgkinson VH, Soong L. In vitro maintenance of *Leishmania* amastigotes directly from lesions: advantages and limitations. *J Parasitol*. 1997;83:953–6.
- Hong J-H, Yu ES, Han A-R, Nam J-W, Seo E-K, Hwang ES. Isoeleutherin and eleutherinol, naturally occurring selective modulators of Th cell-mediated immune responses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;371(2):278–82.
- Hussain H, Krohn K, Ahmad U, Miana A. Lapachol : an overview. *Arkat*. 2007;2:145–71.
- Ifesan BO, Hamtasin C, Mahabusarakam W, Voravuthikunchai SP. Assessment of antistaphylococcal activity of partially purified fractions and pure compounds from *Eleutherine americana*. *J Food Prot*. 2009;72:354–9.
- Informações sobre leishmaniose visceral 2013 e 2014 [Internet]. Disponível em: http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&lang=pt_BR&pg=5571&tax=41517
- Ioset J-R, Brun R, Wenzler T, Kaiser M, Yardley V. Drug Screening for Kinetoplastids Diseases. A Training Manual for Screening in Neglected Diseases. DNDi and Pan-Asian Screening Network; 2009. p. 1–74.
- Jain SK, Sahu R, Walker L a, Tekwani BL. A parasite rescue and transformation assay for antileishmanial screening against intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in THP1 human acute monocytic leukemia cell line. *J Vis Exp*. 2012;(70):1–14.
- Jockers-Scherübl MC, Schirmer RH, Krauth-Siegel RL. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. *Eur J Biochem*. 1989;180(2):267–72.
- Katakura K, Kobayashi A. Enhancement of infectivity of *Leishmania donovani* promastigotes by serial mouse passages. *J Parasitol*. 1985;71(3):393–4.
- Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. Nature Publishing Group; 2011;9(8):604–15.
- Kingston D. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *J Nat Prod*. 2010;74(3):496–511.
- Krishnan P, Bastow KF. Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives-eleutherin, alpha lapachone, and beta lapachone. *Biochem Pharmacol*. 2000;60(9):1367–79.
- Leite JP V, Oliveira AB, Lombardi J a, Filho JDS, Chiari E. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(11):2307–9.

- Lemos P, Moreira M, Bezerra G, César C, Freire F, Bachi S, et al. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza , Ceará , Brazil. 2009;26(6):330–3.
- Lezama-Dávila CM, Isaac-Márquez AP, Kapadia G, Owens K, Oghumu S, Beverley S, et al. Leishmanicidal activity of two naphthoquinones against *Leishmania donovani*. Biol Pharm Bull. 2012;35(10):1761–4.
- Li X, Ohtsuki T, Koyano T, Kowithayakorn T, Ishibashi M. New Wnt/beta-catenin signaling inhibitors isolated from *Eleutherine palmifolia*. Chem Asian J. 2009;4(4):540–7.
- Lima NMF, Correia CS, Leon LL, Machado GMC, Madeira MDF, Santana AEG, et al. Antileishmanial activity of lapachol analogues. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(7):757–61.
- Lin J, Puckree T, Mvelase TP. Anti-diarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. J Ethnopharmacol. 2002;79:53–6.
- Loiseau P, Bories C. Mechanisms of drug action and drug resistance in *Leishmania* as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators. Curr Top Med Chem. 2006;539–50.
- López-Martín C, Pérez-Victoria JM, Carvalho L, Castanys S, Gamarro F. Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(11):4030–6.
- Lunardi F, Guzela M, Rodrigues AT, Corrêa R, Eger-mangrich I, Steindel M, et al. Trypanocidal and Leishmanicidal Properties of Substitution-Containing Chalcones. Antimicrob. Agents Chemother. 2003, 47(4):1449-51
- Magalhães RDM, Duarte MC, Mattos EC, Martins VT, Lage PS, Chávez-Fumagalli M a, et al. Identification of differentially expressed proteins from *Leishmania amazonensis* associated with the loss of virulence of the parasites. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(4):e2764.
- Marinho F a, Gonçalves KCS, Oliveira SSC, Gonçalves DS, Matteoli FP, Seabra SH, et al. The calpain inhibitor MDL28170 induces the expression of apoptotic markers in *Leishmania amazonensis* promastigotes. PLoS One. 2014;9(1):e87659.
- Martins-melo FR, Novaes A, Jr R, Alencar CH. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. J Infect Dev Ctries. 2012;6(11):817–24.
- Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2007;146(4):601–20.
- Maya JD, Orellana M, Ferreira J, Kemmerling U, López-Muñoz R, Morello A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. Biol Res. 2010;43(3):323–31.
- Medina JM, Rodrigues JCF, De Souza W, Atella GC, Barrabin H. Tomatidine promotes the inhibition of 24-alkylated sterol biosynthesis and mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis* promastigotes. Parasitology. 2012;139(10):1253–65.
- Menna-Barreto RFS, Corrêa JR, Cascabulho CM, Fernandes MC, Pinto a V, Soares MJ, et al. Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. Parasitology. 2009 a;136(5):499–510.
- Menna-Barreto RFS, Goncalves RLS, Costa EM, Silva RSF, Pinto A V, Oliveira MF, et al. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. Free Radic Biol Med. 2009 b;47(5):644–53.

- Menna-Barreto RFS, Salomão K, Dantas AP, Santa-Rita RM, Soares MJ, Barbosa HS, et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron*. 2009 c;40(2):157–68.
- Mercader AG, Pomilio AB. 2D- and 3D-QSAR studies of flavonoids, biflavones and chalcones: antiviral, antibacterial, antifungal, and antimycobacterial activities. *Anti-Infective Agents*. 2012;10:41–54.
- Mirjalili A. Presence of Immunoglobulins on the Surface of Lesion-Derived Amastigotes of *Leishmania major* as a Tool for Isolation of Amastigote Stage from BALB/c Mice. *Iran Biomed J*. 2003;7:155–60.
- De Molfetta FA, de Freitas RF, da Silva ABF, Montanari CA. Docking and molecular dynamics simulation of quinone compounds with trypanocidal activity. *J Mol Model*. 2009;15(10):1175–84.
- Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104 Suppl:17–30.
- Moran M, Ropars A, Guzman J, Diaz J, Garrison C. The new landscape neglected disease drug development. Wellcome Trust. 2005;
- Moreira D, Santarém N, Loureiro I, Tavares J, Silva AM, Amorim AM, et al. Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6.
- Mukhtar M, Arshad M, Ahmad M, Pomerantz RJ, Wigdahl B, Parveen Z. Antiviral potentials of medicinal plants. *Virus Res*. 2008;131(2):111–20.
- Nagaraju M, Gnana Deepthi E, Ashwini C, Vishnuvardhan MVPS, Lakshma Nayak V, Chandra R, et al. Synthesis and selective cytotoxic activity of novel hybrid chalcones against prostate cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22(13):4314–7.
- Nagata K, Wada Y, Tamura T, Koyama J, Hirai KI. Antimicrobial activity of novel furanonaphthoquinone analogs. *Japanese J Chemother*. 1999;47:9–14.
- National Centre for the replacement refinement & reduction of animals in research. The 3Rs [Internet]. [citado em 27 Jan, 2015]. Disponível em: <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>
- Nature. Mechanism matters. *Nat Med*. 2010 Apr;16(4):347.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod*. 2012. p. 311–35.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*. 2003 Jul;66(7):1022–37.
- Paris C, Loiseau PM, Bories C, Bréard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(3):852–9.
- Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM a, Franco RMB, Dias VL, Passos L a C. Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot*. 2009;72(2):441–6.
- Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*. 2011;50(2):98–115.
- Pinto AV, de Castro SL. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. *Molecules*. 2009;14(11):4570–90.
- Pinto Dias JC. Os primórdios do controle da doença de Chagas (Homage to Dr . Emmanuel Dias , the pioneer of Chagas Disease control , in the year of his birth centenary). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(11):12–8.
- Polak A, Richle R. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. *Ann Trop Med Parasitol*. 1978;72(1):45–54.
- Polonio T, Efferth T. Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). *Int J Mol Med*. 2008;277–86.

- Portillo A, Vila R, Freixa B, Adzet T, Cañigueral S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 2001;76:93–8.
- Pritchard JF, Jurima-Romet M, Reimer MLJ, Mortimer E, Rolfe B, Cayen MN. Making better drugs: Decision gates in non-clinical drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(7):542–53.
- Ramos H, Valdivieso E, Gamargo M, Dagger F, Cohen BE. Amphotericin B kills unicellular *leishmania* by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *J Membr Biol.* 1996;152(1):65–75.
- Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010;375(9723):1388–402.
- Rocha MN, Corrêa CM, Melo MN, Beverley SM, Martins-Filho OA, Madureira AP, et al. An alternative in vitro drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 a;75(3):282–91.
- Rocha MN, Nogueira PM, Demicheli C, de Oliveira LG, da Silva MM, Frézard F, et al. Cytotoxicity and In Vitro Antileishmanial Activity of Antimony (V), Bismuth (V), and Tin (IV) Complexes of Lapachol. *Bioinorg Chem Appl.* 2013 b;2013(lii):961783.
- Rochette A, Raymond F, Corbeil J, Ouellette M, Papadopoulou B. Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2009;165(1):32–47.
- Rodrigues JCF, Attias M, Rodriguez C, Urbina JA, Souza W de. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a delta(24(25))-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(2):487–99.
- Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(1):3–24.
- Romanha AJ, Castro SL De, Soeiro MDNC, Lannes-Vieira J, Ribeiro I, Talvani A, et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(2):233–8.
- Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2014;3(3):251–62.
- De Rycker M, Hallyburton I, Thomas J, Campbell L, Wyllie S, Joshi D, et al. Comparison of a high-throughput high-content intracellular *Leishmania donovani* assay with an axenic amastigote assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(7):2913–22.
- Sacau EP, Estévez-Braun A, Ravelo ÁG, Ferro EA, Tokuda H, Mukainaka T, et al. Inhibitory effects of lapachol derivatives on epstein-barr virus activation. *Bioorganic Med Chem.* 2002;11:483–8.
- Salas C, Tapia RA, Ciudad K, Armstrong V, Orellana M, Kemmerling U, et al. *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and alpha- and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorg Med Chem.* 2008;16(2):668–74.
- Santa-Rita RM, Henriques-Pons A, Barbosa HS, de Castro SL. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(4):704–10.
- Dos Santos PF, Ruiz JC, Soares RPP, Moreira DS, Rezende AM, Folador EL, et al. Molecular characterization of the hexose transporter gene in benzimidazole resistant and susceptible populations of *Trypanosoma cruzi*. *Parasit Vectors.* 2012;5(1):161.
- Schenone M, Dančík V, Wagner BK, Clemons P a. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nat Chem Biol.* 2013;9(4):232–40.

- Schmidt TJ, Khalid S a, Romanha a J, Alves TM, Biavatti MW, Brun R, et al. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. *Curr Med Chem.* 2012 a;19(14):2128–75.
- Schmidt TJ, Khalid SA, Romanha AJ, Alves TM, Biavatti MW, Brun R, et al. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part II. *Curr Med Chem.* 2012 b;19(14):2176–228.
- Schultes RE, Raffauf RF. *The healing forest: medicinal and toxic plants of the Northwest Amazonia.* Dioscorides Press. Dioscorides Press; 1990. p. 218–9.
- Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert A-K, Krohn K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol Res.* 2002;106(9):996–1004.
- Sen R, Chatterjee M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine.* Elsevier GmbH.; 2011;18(12):1056–69.
- Sereno D, Holzmüller P, Mangot I. Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in *Leishmania infantum* Amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(7):2064–9.
- Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S, Aggarwal B. activation induced by carcinogenic agents through suppression of I κ B α kinase and p65 phosphorylation correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix. *Cancer Res.* 2003.
- Da Silva Júnior EN, de Souza MCB V, Fernandes MC, Menna-Barreto RFS, Pinto MDCFR, de Assis Lopes F, et al. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. *Bioorg Med Chem.* 2008;16(9):5030–8.
- Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med.* Hainan Medical College; 2012;5(6):485–97.
- Singh N, Mishra BB, Bajpai S, Singh RK, Tiwari VK. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorg Med Chem.* 2014;22(1):18–45.
- Siqueira EP, Oliveira DM, Johann S, Cisalpino PS, Cota BB, Rabello A, et al. Bioactivity of the compounds isolated from *Blepharocalyx salicifolius*. *Rev Bras Farmacogn.* 2011;21(4):645–51.
- Siqueira-Neto JL, Song O-R, Oh H, Sohn J-H, Yang G, Nam J, et al. Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(5):e675.
- Socorro SM do. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(6):1895–901.
- Soeiro M, Dantas A. Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from in vivo and in vitro studies. *Memórias do Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(i):301–10.
- Soeiro MDNC, de Souza EM. Programmed Cell Death and Trypanosomatids: A Brief Review. *Program Cell Death Protozoa.* 2008. p. 24–38.
- Soeiro MNC, de Castro SL. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13:105–21.
- De Souza W, Attias M, Rodrigues JCF. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(10):2069–80.
- Syam S, Abdelwahab SI, Al-Mamary MA, Mohan S. Synthesis of chalcones with anticancer activities. *Molecules.* 2012;17(6):6179–95.
- Tarleton RL, Reithinger R, Urbina J a, Kitron U, Gürtler RE. The challenges of Chagas Disease- grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Med.* 2007;4(12):e332.

- Tavares NM, Araújo-Santos T, Afonso L, Nogueira PM, Lopes UG, Soares RP, et al. Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection in vitro: the role of LTB4 derived from human neutrophils. *J Infect Dis.* 2014;210(4):656–66.
- Teixeira MJ, de Almeida YM, Viana JR, Holanda Filha JG, Rodrigues TP, Prata JR, et al. In vitro and in vivo Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). *Phytother Res.* 2001;15(1):44–8.
- Torres-Santos E, Lopes D, Oliveira R. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine.* 2004;114–20.
- Trsic M, Subramanian S, Ferreira MMC. A structure-activity relationship study of lapachol and some derivatives of 1,4-naphthoquinones against carcinosarcoma Walker 256. *Struct Chem.* 1998;9:47–57.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer.* 1980;26:171–6.
- Urbina J a., Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 2003;19(11):495–501.
- Vannier-Santos MA, Urbina JA, Martiny A, Neves A, Souza W. Alterations Induced by the Antifungal Compounds Ketoconazole and Terbinafine in *Leishmania*. *J Eukaryot Microbiol.* 1995;42(4):337–46.
- Vega Royero SP, Sibona GJ. Can we heal Chagas infection? *J Theor Biol.* 2014;340:23–9.
- Vercesi A, Bernardes C. Digitonin Permeabilization Does Not Affect Mitochondrial Function and Allows the Determination of the Mitochondrial Membrane Potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. *J Biol Chem.* 1991; 266:14431-34
- Vermeersch M, da Luz RI, Toté K, Timmermans J-P, Cos P, Maes L. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(9):3855–9.
- Wang J, Li Y, Wang X, Jiang C. Ursolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in human glioblastoma cell lines U251 by suppressing TGF-beta1/miR-21/PDCD4 pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2012;111(2):106–12.
- Weniger B, Haag-Berrurier M, Anton R. Plants of Haiti used as antifertility agents. *J Ethnopharmacol.* 1982;6:67–84.
- Werneck GL. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2010;26(Lv):2010.
- World Health Organization. Report of the Scientific Working Group meeting on Leishmaniasis. *World Heal Organ.* 2004.
- World Health Organization. Control of the leishmaniases. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2010 a;(949):xii–xiii, 1–186.
- World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases First WHO report on neglected tropical diseases. *WHO Press.* 2010 b.
- World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases. *WHO Press.* 2013.
- Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 2004;279(38):39925–32.
- Xavier CPR, Lima CF, Pedro DFN, Wilson JM, Kristiansen K, Pereira-Wilson C. Ursolic acid induces cell death and modulates autophagy through JNK pathway

- in apoptosis-resistant colorectal cancer cells. *J Nutr Biochem*. 2012;24(4):706–12.
- Zani CL, Chiari E, Krettli AU, Murta SMF, Cunningham ML, Fairlamb AH, et al. Antiplasmodial and anti-trypanosomal activity of synthetic naphtho[2,3-b]thiophen-4,9-quinones. *Bioorg Med Chem*. 1997;5(12):2185–92.
- Zani CL, Fairlamb AH. Non-competitive Inhibitor of Trypanothione Reductase. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:565–8.
- Zani CL, De Oliveira AB, De Oliveira (in memoriam) GG. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea*. *Phytochemistry*. 1991;30(7):2379–81.
- Zhai L, Blom J, Chen M, Christensen SB, Kharazmi A. The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(12):2742–8.
- Zhai L, Chen M, Blom J, Theander TG, Christensen SB, Kharazmi A. The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. *J Antimicrob Chemother*. 1999;43(6):793–803.