

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE UM DERIVADO DO  
DILAPIOL OBTIDO A PARTIR DE *Piper aduncum* L.  
(PIPERACEAE)

ANGELA MARIA COMAPA BARROS

MANAUS  
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

ANGELA MARIA COMAPA BARROS

ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE UM DERIVADO DO  
DILAPIOL OBTIDO A PARTIR DE *Piper aduncum* L.  
(PIPERACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Bioanálises e Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos.

Orientador: Dr<sup>o</sup> Emerson Silva Lima

Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Antonia Maria Ramos Franco

MANAUS  
2018

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B277a Barros, Angela Maria Comapa  
Atividade antileishmania de um derivado do dilapiol obtido a partir de Piper aduncum L. (Piperaceae) / Angela Maria Comapa Barros. 2018  
107 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Emerson Silva Lima  
Coorientador: Antonia Maria Ramos Frando Pereira  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Piper aduncum. 2. éter butil dilapiol. 3. Leishmania. 4. dilapiol.  
5. in vitro. I. Lima, Emerson Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Dedico esta conquista a Deus.*

*A minha mãe Erotilde Comapa*

*A minha família pelo amor, carinho e apoio*

*Ao meu filho Felipe, pela força, entendimento, suporte emocional,*

*Mas principalmente por seu amor...*

*Ao meu orientador e as amigas Dra Antonia Franco, Dra Maricleide Naiffi e a todos que me ajudaram!!*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por ser o meu socorro, guardião e força;

Ao meu orientador Emerson Silva Lima pelo acompanhamento e apoio;

A minha coorientadora Antonia Maria Ramos Franco pelo acompanhamento, apoio e carinho;

A minha família pela torcida pelas minhas conquistas;

Ao meu filho Felipe Barros por me tornar mais forte;

As amigas Dr<sup>a</sup> Maricleide Naiffi pelos seus conselhos e carinho, Dr<sup>a</sup> Antonia Franco pelos conhecimentos científicos e estrutural, Dr<sup>a</sup> Cláudia Comandolli pela chance de ingressar na área científica, Dr<sup>a</sup> Ana Cristina pelo seu carinho e confiança;

Ao Laboratório de Leishmaniose e doença de Chagas – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia- INPA, que sempre me acolheu com muito carinho desde a minha graduação;

Ao Laboratório de Atividades Biológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UFAM (Universidade Federal do Amazonas) que me recebeu com muito carinho;

Ao Laboratório Fitophar - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UFAM (Universidade Federal do Amazonas) pela parceria

Ao Laboratório de Fitoquímica - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia- INPA pela parceira;

A todos que me ajudaram de forma direta ou indireta: Dr<sup>a</sup> Maricleide Naiffi, Lourival, Leonardo, Carolina Valentin, Patrícia Almeida, Aguyda Barbosa, Rodrigo Otávio, Bárbara Janaína.

## Resumo

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é considerada uma doença negligenciada e um problema de saúde pública. Sua incidência tem aumentado significativamente no Brasil e em todos os continentes. O tratamento atual é a base de Glucantime<sup>®</sup>, tendo como fármaco de primeira escolha, a Pentacarinat<sup>®</sup> e anfotericina B<sup>®</sup> como fármaco de segunda escolha. Esses fármacos apresentam desvantagens por serem injetáveis e possuem elevados efeitos colaterais graves, levando aos pesquisadores buscar novas alternativas farmacológicas mais eficazes, de baixo custo e menos invasivos. As plantas são fontes promissoras de compostos bioativos, e por meio de novas tecnologias que permitam modificações na estrutura química de moléculas naturais pode sintetizar novos derivados bioativos. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos antileishmania do derivado éter butil do dilapiol (EBD), extraído das folhas de *Piper aduncum*. Foi avaliado o potencial citotóxico do EBD nas concentrações seriadas de 500 a 15,62  $\mu\text{M}$  em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, por 48h e, em macrófagos RAW 264.7 por 72h, utilizando o método dose-resposta por Alamar Blue<sup>®</sup>. Para a atividade antileishmania do EBD, a 4,5  $\mu\text{M}$ , evidenciou pela inibição as formas viáveis dos promastigotas de *L. amazonensis*, incubados a 25 °C por 24, 48 e 72 horas. O potencial do EBD foi avaliada na concentração de 4,5  $\mu\text{M}$  contra as formas amastigotas interiorizado em macrófagos peritoneais de camundongos, os quais foram infectados com promastigotas numa proporção de 5:1 e incubados por 24h a 48h. Quanto ao índice de seletividade (IS), este foi determinado pelo efeito do EBD sobre os macrófagos e promastigotas, conforme uma razão matemática. Para investigar o possível mecanismo antileishmania do EBD, em macrófagos durante 24 e 48 h, foi realizada uma quantificação de óxido nítrico em macrófagos peritoneais e tratados em tempos diferentes. Para a dosagem das espécies reativas de oxigênio (EROs), em macrófagos peritoneais, utilizou-se uma concentração de 4,5  $\mu\text{M}$ , e foram incubados juntos ao DCFDA (Acetato de Diclorofluoresceína) por 1, 3, 6, e 24 horas. A taxa de infecção em macrófagos determinou-se pela contagem de 100 células infectadas em microscópio óptico (1000x). A docagem do EBD realizou-se utilizando proteína de origem do parasita (*Leishmania*) disponível no banco de dados "Protein Data Bank" (PDB). Não houve citotoxicidade celular em macrófagos peritoneais e RAW 264.7, com  $\text{CC}_{50}$  de 413  $\mu\text{M}$  e 373,5 respectivamente, quando expostos ao EBD na concentração de 500  $\mu\text{M}$  a 15,62  $\mu\text{M}$  por 24, 48 e/ou 72 horas. O EBD, inibiu as formas promastigotas de *L. amazonensis* com uma eficácia igual a Pentacarinat<sup>®</sup> por 72 horas, com uma  $\text{CI}_{50}$  de 1,6  $\mu\text{M}$  e 2,2  $\mu\text{M}$  respectivamente. O índice de seletividade (IS), demonstrou que o EBD foi mais específico, apresentando um IS de 76,5  $\mu\text{M}$  do que a Pentacarinat<sup>®</sup> com 8,7 $\mu\text{M}$ . E, às formas amastigotas, o EBD apresentou uma taxa de infecção de 17% e 12%, dilapiol de 24% e 14% e Pentacarinat<sup>®</sup> de 10% e 9%. A análise por docagem molecular do EBD, demonstrou uma ligação de energia de -7,8 pelo sítio de ação da enzima U53, melhor do que o composto de origem. Conclui-se que o derivado EBD possui atividade antileishmania, sendo um análogo de dilapiol promissor para futuros testes *in vivo*.

**Palavras-chave:** *Piper aduncum*, éter butil dilapiol, *Leishmania*

## Abstract

American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is considered a neglected disease and a public health problem. Its incidence has increased significantly in Brazil and in all continents. The current treatment is based on Glucantime<sup>®</sup>, as the first-choice drug, and Pentacarinat<sup>®</sup> and amphotericin B<sup>®</sup> as the second-choice drug. These drugs have disadvantages because they are injectable and with a high index of serious side effects, leading researchers to seek new pharmacological alternatives with more effectiveness, low cost and less invasion. Plants are promising sources of bioactive compounds and, through new technologies that allow modifications in the chemical structure of natural molecules, it is possible to synthesize new bioactive derivatives. The present study aimed to evaluate the antileishmanic effects of derivative dillapiol butyl ether (EBD), extracted from the leaves of *Piper aduncum*. The cytotoxic potential of EBD at serial concentrations of 500 to 15.62  $\mu\text{M}$  in peritoneal macrophages of BALB/c mice for 48 h, and in RAW 264.7 macrophages for 72 h using Alamar Blue<sup>®</sup> dose-response method was evaluated. The antileishmanial activity of EBD was evidenced by the inhibition of viable forms of *L. amazonensis* promastigotes incubated at 25 ° C for 24, 48 and 72 hours when tested at 4.5  $\mu\text{M}$ . The potential of EBD was evaluated at the concentration of 4.5  $\mu\text{M}$  against amastigote forms internalized in peritoneal macrophages of mice, which were infected with promastigotes in a ratio of 5:1 and incubated for 24h to 48h. Regarding the selectivity index, this was determined by the effect of EBD on macrophages and promastigotes, according to a mathematical reason. In order to investigate the possible anthelmintic mechanism of EBD in macrophages for 24 and 48 h, a quantification of nitric oxide was performed in peritoneal macrophages and treated at different times. For the determination of reactive oxygen species (ROS), in peritoneal macrophages, a concentration of 4.5  $\mu\text{M}$  was used and incubated together with DCFDA (Dichlorofluorescein Acetate) for 1, 3, 6, and 24 hours. The rate of infection in macrophages was determined by counting 100 infected cells under an optical microscope (1000x). Docking of EBD was carried out using protein of origin of the parasite (*Leishmania*) available in the database "Protein Data Bank" (PDB). There was no cellular cytotoxicity in peritoneal macrophages and RAW 264.7 with  $\text{CC}_{50}$  of 413  $\mu\text{M}$  and 373.5, respectively, when exposed to EBD at the concentration of 500  $\mu\text{M}$  to 15.62  $\mu\text{M}$  for 24, 48 and/or 72 hours. EBD inhibited promastigote forms of *L. amazonensis* with an efficacy equal to Pentacarinat<sup>®</sup> for 72 hours with an  $\text{IC}_{50}$  of 1.6  $\mu\text{M}$  and 2.2  $\mu\text{M}$ , respectively. The selectivity index (SI) showed that EBD was more specific with a SI of 76.5  $\mu\text{M}$  than Pentacarinat<sup>®</sup> with 8.7  $\mu\text{M}$ . For the amastigote forms EBD presented an infection rate of 17% and 12%, dilapiol of 24% and 14% and Pentacarinat<sup>®</sup> of 10% and 9%. Molecular docking analysis of EBD demonstrated a binding energy of -7.8 by the site of action of U53 enzyme better than the parent compound. It is concluded that EBD derivative has antileishmania activity, being a promising dilapiol analogue for future *in vivo* tests.

**Keywords:** *Piper aduncum*, dillapiol butyl ether, *Leishmania*.

## Lista de Siglas e Abreviaturas

<b>AAPH</b>	Dicloridrato de 2,2-azobis (2-amidinopropano)
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BR</b>	Brasil
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>CC</b>	Cromatografia de coluna
<b>CCDP</b>	Cromatografia em camada delgada preparativa
<b>CEP</b>	Comitê de ética pesquisa humana
<b>CEUA</b>	Comitê de ética de uso animal
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória de 50%
<b>CC<sub>50</sub></b>	Concentração citotóxica de 50%
<b>CMI</b>	Concentração mínima inibitória
<b>CR1</b>	Receptor de complemento 1
<b>CR2</b>	Receptor de complemento 2
<b>C<sub>3b</sub></b>	Complemento 3b
<b>DCFDA</b>	Acetato Diclorofluoresceína
<b>DDT</b>	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>DPM</b>	Desvio padrão médio
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EBD</b>	Éter butil dilapiol
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>EV</b>	Endovenosa
<b>Ex</b>	Exemplo
<b>GP63</b>	Glicoproteína63
<b>h</b>	Hora
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>iC<sub>3b</sub></b>	Complemento inativo 3b
<b>IDRM</b>	Intrademorreação de Montenegro
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Inteferon-gama

<b>INOS</b>	Óxido nítrico sintase induzida
<b>IL-12</b>	Interleucina doze
<b>IL-6</b>	Interleucina seis
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>IS</b>	Índice seletivo
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>LC</b>	Leishmaniose cutânea
<b>LCD</b>	Leishmaniose cutânea difusa
<b>LMC</b>	Leishmaniose mucocutânea
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LTA</b>	Leishmaniose Tegumentar Americana
<b>Max</b>	Máximo
<b>MHOM</b>	Homo sapiens
<b>MTT</b>	Brometo de (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio)
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>ND</b>	Não determinado
<b>NMG</b>	Antimoniato de N-metilglucamina
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>NNN</b>	Novy e MacNeal, Nicolle
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana da Saúde
<b>PSMC</b>	Células mononucleadas de sangue periférico
<b>PSMO</b>	Polisubstrato monooxigenase
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salina ( <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>Ph</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PTx</b>	Pentoxifilina
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>ROI</b>	Reativos intermediários de oxigênio
<b>Sb<sup>V</sup></b>	Antimonial pentavalente
<b>Sb<sup>III</sup></b>	Antimonial trivalente
<b>SC</b>	Subclínica

<b>SFBI</b>	Soro fetal bovino inativado
<b>SINAN</b>	Sistema de informação de agravo de notificação
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>TCD<sub>4</sub></b>	Célula T CD <sub>4</sub>
<b>TDR1</b>	Redutase dependente de tiol
<b>TH1</b>	Célula T help tipo 1
<b>THF</b>	Tetraidrofurano
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>UI</b>	Unidade Internacional

## Lista de Tabelas

Pg.

<b>Tabela 1.</b> Esquema terapêutico antimoniato de N-metilglucamina preconizado para as diversas formas clínicas de LTA, segundo (OPAS/OMS 2013).....	35
<b>Tabela 2.</b> Esquema terapêutico da Pentacarinat <sup>®</sup> preconizado para as diversas formas clínicas de LTA, segundo (OPAS/OMS, 2013).....	36
<b>Tabela 3.</b> Obtenção preliminar do CI <sub>50</sub> do derivado EBD, Pentacarinat <sup>®</sup> e do dilapiol em promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> em 24, 48 e 72 horas.....	66
<b>Tabela 4.</b> Obtenção do CI <sub>50</sub> do derivado EBD, Pentacarinat <sup>®</sup> e do dilapiol em promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> em 24, 48 e 72 horas.....	68
<b>Tabela 5.</b> Valores de CI <sub>50</sub> em promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> e CC <sub>50</sub> para macrófagos peritoneais e seus respectivos índices de seletividade (IS) por 48 horas.....	74

## Lista de Figuras

	Pg.
<b>Figura 1.</b> Leishmaniose tegumentar em países endêmicos nas Américas, 2001-2015. Fonte: SisLeish-OPAS/OMS: Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Vigilância. Dados disponíveis em abril de 2017.....	23
<b>Figura 2.</b> Esquema mostrando as formas amastigotas (A) e promastigotas (B) de <i>Leishmania</i> sp. Ilustração de organelas e estruturas presentes no parasita. Fonte: www.repositorio.ufpa.br.....	24
<b>Figura 3.</b> Representação do ciclo de vida da <i>Leishmania</i> sp. no inseto vetor e no hospedeiro mamífero. Fonte: Adaptado pelo próprio autor.....	27
<b>Figura 4.</b> Fórmula estrutural dos antimonias pentavalentes. <i>N</i> -metil glucamina (A) e Estibogluconato de sódio (B). Fonte: adaptado pelo próprio autor.....	34
<b>Figura 5.</b> Fórmula estrutural do isotionato de pentamidina. Fonte: adaptado pela própria autora.....	35
<b>Figura 6.</b> Fórmula estrutural da anfotericina B <sup>®</sup> . Fonte: (BARRETT; CROFT, 2012).....	36
<b>Figura 7.</b> <i>Piper aduncum</i> . Fonte: www.naturezabela.com.br.....	41
<b>Figura 8.</b> Esquema evidenciando os dois grupos farmacofóricos que foram base para obter a pterocarpanoquinona LQB-118 (CUNHA-JÚNIOR, 2011).....	43
<b>Figura 9.</b> Fórmula química do dilapiol (OLIVEIRA et al., 2005).....	45
<b>Figura 10.</b> Delineamento das atividades biológicas <i>in vitro</i> executadas com o derivado éter butil dilapiol contra <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	51
<b>Figura 11.</b> Estruturas químicas: dilapiol (1) e o derivado éter butil dilapiol (2). Fonte: (PINTO, 2008).....	52
<b>Figura 12.</b> Efeito das substâncias: Pentacarinat <sup>®</sup> , EBD e Dilapiol utilizando concentrações seriadas de 500 a 15,62 µM por 48 horas. A concentração citotóxica 50% obtidas pelas médias de (CC <sub>50</sub> ± DP) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foi obtida através de uma regressão não-linear utilizando o programa Graphpad prisma 6 <sup>®</sup> .....	60

**Figura 13.** Efeito das substâncias: Pentacarinat<sup>®</sup>, EBD, Dilapiol, utilizando concentrações seriadas de 500 a 15,62 µM por 72 horas. A concentração citotóxica 50% e médias (CC<sub>50</sub> ± DP) em macrófagos RAW 264.7 foi obtida através de uma regressão não-linear utilizando o programa Graphpad prisma 6<sup>®</sup> ..... 61

**Figura 14.** Viabilidade em Macrófagos peritoneais BALB/c quando expostos ao LPS (2 µg/mL) durante 24 e 48 horas de incubação utilizando o método MTT Brometo de (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) e as substâncias (EBD, Pentacarinat<sup>®</sup> e o dilapiol) na concentração de 4,5 µM.....62

**Figura 15.** Morfológica de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, quando expostos aos efeitos das substâncias na concentração (4,5µM); (A) Dilapiol; (B) EBD; (C) Pentacarinat<sup>®</sup>, (D) DMSO, (E) Macrófagos e meio por 24 h.....63

**Figura 16.** Morfologia de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, quando expostos aos efeitos das substâncias na concentração de (4,5µM): (A) Dilapiol; (B) EBD; (C) Pentacarinat<sup>®</sup>, (D) DMSO, (E) Macrófagos e meio por 48 h.....63

**Figura 17.** Curva do crescimento de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*-(MHOM/BR/2009/IM5584) em meio Schneider com 10% SFB, acompanhada durante cinco dias contínuos.....64

**Figura 18.** Avaliação preliminar do EBD (1) e dilapiol (2) contra as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* – quantificação as formas viáveis dos parasitas em (24, 48 e 72 horas). (\*\*\*P<0,0001)= significativo nas demais concentrações do EBD, controle negativo e dilapiol. Os resultados foram obtidos através da análise por ANOVA (two-way) e Bonferroni's com 95% de confiança através do programa GraphPad prisma 6<sup>®</sup> .....65

**Figura 19.** Avaliação da atividade do EBD (1) e dilapiol (2) contra formas de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* – quantificação as formas viáveis dos parasitas em (24, 48 e 72 horas). (\*\*\*P<0,0001)= significativo em relação as demais concentrações do EBD, controle negativo e dilapiol. Os resultados foram obtidos através da análise por ANOVA (two-way) e Bonferroni's com 95% de confiança através do programa GraphPad prisma 6<sup>®</sup> .....67

**Figura 20.** Padronização da produção do óxido nítrico através da concentração de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c por 24, 48 e 72 horas, nas concentrações de (10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>) estimulados e não estimulados por LPS a 2 µg/mL.....69

**Figura 21.** Mensuração da produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* durante 24 e 48 horas e expostos as substâncias (EBD, Pentacarinat<sup>®</sup> e dilapiol) na concentração de

4,5 µM. Os resultados foram obtidos através da análise por ANOVA (two-way) e Bonferroni's com 95% de confiança através do programa GraphPad prisma 6® .....71

**Figura 22.** Quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c na forma basal, estimulado e infectado durante as primeiras 24 h e expostos as substâncias (EBD, Pentacarinat® e dilapiol) na concentração de 4,5 µM. Resultados demonstrados nas figuras de A (1h); B (3h); C (6h) e D (24h). As  $CI_{50}$  foram obtidas por média ± DPM (desvio padrão médio) através do programa GraphPad prisma 6® .....72

**Figura 23.** Efeito da atividade das substâncias utilizadas na concentração de (4,5 µM) contra a forma amastigota de *Leishmania (L.) amazonensis* em macrófagos peritoneais durante 24 h. (A) Dilapiol, (B) EBD, (C) Pentacarinat®, (D) Macrófagos infectados, (E) DMSO, (F) Macrófagos não infectado. 1000X.....73

**Figura 24.** Efeito da atividade das substâncias utilizadas na concentração de (4,5 µM) contra a forma amastigota de *Leishmania (L.) amazonensis* em macrófagos peritoneais por 48 h. (A) Dilapiol, (B) EBD, (C) Pentacarinat®, (D) Macrófagos infectados, (E) DMSO, (F) Macrófagos não infectado.1000X.....73

**Figura 25.** Avaliação da taxa de infecção do EBD, do dilapiol e Pentacarinat® (4,5 µM) contra as formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* por 24 e 48 horas. Os resultados foram obtidos através da análise por ANOVA (two-way) e Bonferroni's com 95% de confiança, através do programa GraphPad prisma 6® . As percentagens foram calculadas pelas percentagens das médias - % CN (percentagem do valor do controle negativo).....74

**Figura 26.** Conformação padrão da Tripanotiona redutase: Inibidor padrão RDS (Energia de ligação -6,0).....76

**Figura 27.** Interação do dilapiol com o sítio da ação da enzima Tripanotiona redutase. Pose do dilapiol no sítio da ação da enzima Tripanotiona redutase ID PDB 5ebk (Energia de ligação -4,8).....77

**Figura 28.** Interação do Éter butil dilapiol com o sítio da ação da enzima Tripanotiona redutase. Pose do éter butil dilapiol no sítio da ação da enzima Tripanotiona redutase ID PDB 5ebk (Energia de ligação -5,2).....78

**Figura 29.** N-miristoil transferase: Inibidor padrão U53 (Energia de ligação -8,2).....79

**Figura 30.** Interações do dilapiol com o sítio da ação da enzima N-miristoil transferase. Pose do dilapiol no sítio da ação da enzima miristoil transferase ID PDB 5g1z (Energia de ligação -6,8).....80

**Figura 31.** Interações da Éter butil dilapiol com o sítio da ação da enzima N-miristoil transferase. Pose do Eter butil dilapiol no sítio da ação da enzima miristoil transferase ID PDB 5g1z (energia de ligação -7,8).....81

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
2.1 A Leishmaniose.....	21
2.1.1 Histórico.....	21
2.1.2 Epidemiologia .....	22
2.1.3 Agente etiológico .....	24
2.1.4 Transmissão .....	26
2.1.5 Formas clínicas.....	32
2.1.6 Tratamento .....	33
2.1.6.1 Antimonial pentavalente.....	33
2.1.6.2 Pentacarinat <sup>®</sup> .....	35
2.1.6.3 Anfotericina B <sup>®</sup> .....	36
2.1.6.4 Pentoxifilina .....	37
2.2 Plantas Medicinais .....	38
2.2.1 Gênero Piper .....	39
2.2.2 A espécie <i>Piper aduncum</i> .....	40
2.2.3 Etnoconhecimento de <i>Piper aduncum</i> .....	41
2.2.4 O dilapiol.....	44
2.2.5 Docagem molecular .....	47
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
3.1 Objetivo Geral .....	49
3.2 Objetivos Específicos.....	49
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
4.1 Informações Éticas.....	50
4.2 Fluxograma de atividades .....	51
4.3 Obtenção do material vegetal. ....	51
4.4 Preparação do EBD .....	52
4.5 Ensaio citotóxicos.....	52
4.5.1 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais e de linhagem RAW 264.7 .....	52
4.6 Obtenção e manutenção parasitária. ....	53
4.7 Curva do crescimento das formas promastigotas .....	54
4.8 Determinação da atividade antileishmania e da concentração inibitória 50% (CI <sub>50</sub> ) nas formas promastigotas. ....	54
4.9 Determinação do índice seletivo. ....	55
4.10 Quantificação de óxido nítrico. ....	55
4.11 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio.....	56

4.12	Determinação do índice de infectividade em macrófagos peritoneais infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	57
4.13	Modelagem espacial molecular.....	58
4.14	Análises estatísticas.....	58
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>60</b>
5.1	Avaliação da atividade citotóxica do éter butil dilapiol (EBD) em células primária e secundária.....	60
5.2	Avaliação morfológica da viabilidade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c sob efeito do éter butil dilapiol. ....	62
5.3	Curva do crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> (MHOM/BR/2009/IM5584). ....	63
5.4	Avaliação preliminar da atividade do EBD contra as formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> . ....	64
5.5	Avaliação da atividade do EBD contra as formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	66
5.6	Atividade antileishmania através do índice de seletividade. ....	68
5.7	Padronização do óxido nítrico por concentração celular.....	69
5.8	Mensuração da produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.....	70
5.9	Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em macrófagos peritoneais de comundongos BALB/c. ....	71
5.10	Avaliação da taxa de infecção por <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> em macrófagos peritoneais expostos ao EBD. ....	72
5.11	Simulações de inibição enzimáticas por docagem molecular. ....	75
5.11.1	Tripanodiona redutase .....	76
5.11.2	N-miristoil transferase .....	79
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>92</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>93</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses que constituem um conjunto de manifestações clínicas, e devido à diversidade epidemiológica, sócio-econômico e ao baixo interesse da indústria farmacêutica são consideradas doenças negligenciadas e um problema de saúde pública (REV. SAÚDE PÚBLICA, 2010; BRASIL, 2017). A infecção causada pelos parasitas do gênero *Leishmania* pode apresentar diversas formas clínicas, dependendo da virulência das diferentes espécies, tornando assim, mais difícil a cura (OMS, 2010).

A Leishmaniose Tegumentar está distribuída em 98 países, que abrange os cinco continentes (Américas, Europa, África, Ásia e Oceania), e apresenta um registro anual de 0,7 a 1,3 milhão de casos (OMS, 2017). No Brasil, a incidência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) tem aumentado significativamente, com registro anual de 21.161 mil casos; destes, 1.732 no Estado do Amazonas, e Manaus com 733 notificados em 2017 (SINAN, 2017), e sua ocorrência está praticamente em todos os estados da federação (BRASIL, 2017).

A doença tem aumentado exponencialmente a cada ano, devido ao crescimento das cidades e da população, gerando uma grande mudança na distribuição geográfica no Brasil e, com isso, tem propiciado a proliferação de áreas de alto risco a infecção (BRASIL, 2017).

No Estado do Amazonas, é notificada a ocorrência de quatro espécies do parasita que causam a LTA: *Leishmania (Leshmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) naiffi* e *Leishmania (V.) guyanensis*, sendo esta última com maior índice de prevalência da doença, contribuindo com mais de 80% dos casos notificados na região (GUERRA et al., 2011).

Atualmente o fármaco que ainda é aplicado na farmacoterapia dos pacientes com leishmaniose é a base de antimoniais pentavalentes ( $\text{Sb}^{\text{V}}$ ), sendo fármaco de primeira escolha, comercialmente vendido no Brasil como o Glucantime<sup>®</sup> (antimoniato de N-metilglucamina), e os fármacos de segunda escolha o Pentacarinat<sup>®</sup> e a Anfotericina B<sup>®</sup> (BRASIL, 2017). Esses fármacos apresentam desvantagens: são hepatotóxicos, nefrotóxicos e cardiotoxicos (BRASIL, 2013; DEMICHELI; FRÉZARD, 2009). Além de todos serem de administração parenteral, apresentam eficácia limitada e possuem alto custo (MACIEL SANTOS et al., 2013).

Na procura de novas alternativas para o tratamento da leishmaniose, pesquisadores têm buscado compreender melhor a diversidade química das moléculas encontradas em fontes naturais, no intuito de desenvolver novas tecnologias para serem empregadas como novos fármacos (PINTO et al., 2002). De fato, a evolução tecnológica tem sido significativa no desenvolvimento de novos medicamentos, em que precedem, desde a química computacional, a biologia molecular estrutural com a aplicação de técnicas que permitem modificações estruturais em uma ou mais moléculas para obtenção de novos derivados e, assim, a concepção de novos protótipos (AGARWAL; FISHWICK, 2010).

Podemos citar diversos estudos com diferentes derivados a partir de *Piper aduncum* L. que apresentaram efeitos promissores antileishmania em espécies causadoras das leishmanioses. PICOLO et al. (2014) demonstraram atividade antileishmania do derivado de dihidrochalcona a partir de *P. aduncum* contra as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) shawi* e *L. (L.) chagasi*.

TORRES-SANTOS et al. (1999) demonstraram através do isolado 2',6'-Dihidroxi-4'-Metoxichalcona também obtido de *P. aduncum* que este era promissor para as formas intra e extracelular de parasitas do gênero *Leishmania*. No estudo de

FARAH et al. (2010) demonstraram atividade antileishmaniana do dilapiol e isodilapiol frente *L. chagasi*. No de PARISE-FILHO et al. (2012) demonstraram atividade antileishmaniana contra as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) brasiliensis* utilizando o dilapiol e seus análogos (di- hidrodilapiol e isodilapiol).

Diante da necessidade de descobrir um protótipo com maior segurança, mais eficaz e com elevada potência, o presente estudo avaliou a atividade antileishmaniana de forma *in vitro* e *in silico* do éter butil dilapiol semissintético de *Piper aduncum* no intuito de desenvolver futuramente um fármaco para o tratamento da leishmaniose tegumentar *in vivo*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A Leishmaniose

#### 2.1.1 Histórico

A Leishmaniose é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, pois há registros centenários de descrições semelhantes de doenças às características da leishmaniose cutânea (LC) e mucocutânea (LM), em várias regiões do mundo. No Oriente Médio, a doença era conhecida por diferentes nomes, sendo o mais popular “botão do oriente”. Vários textos dos séculos XV e XVI já mencionavam o risco da exposição de trabalhadores agrícolas, pois quando estes retornavam dos Andes apresentavam úlceras cutâneas, chamadas de *uta* pelos índios do Peru, bem como o registro demonstrado em antigas peças de cerâmica originárias do Peru e do Equador, retratando os rostos humanos com deformações graves, bastante similares às causadas pela leishmaniose mucocutânea (LAINSON, 2010).

O primeiro a descobrir o agente causador do *botão do oriente* do Velho Mundo foi Wright (apud WRIGHT, 1903), mais tarde recebeu o nome de *Leishmania tropica* por (apud LÜHE, 1906). Foi observado que na região neotropical havia casos de lesões cutâneas semelhantes às aquelas encontradas no Velho Mundo, comparando-as com o parasita do gênero *Leishmania*. Contudo, somente no século XIX, foi possível demonstrar “corpúsculos de Leishman Donovan” (amastigota), quando os autores Lindenberg, Carini e Paranhos, em estudos independentes, observaram o parasita em lesões cutâneas de pacientes agricultores que trabalhavam no Estado de São Paulo, e foi chamada de “Úlcera de Bauru” (apud LINDENBERG; CARINI apud PARANHOS, 1909).

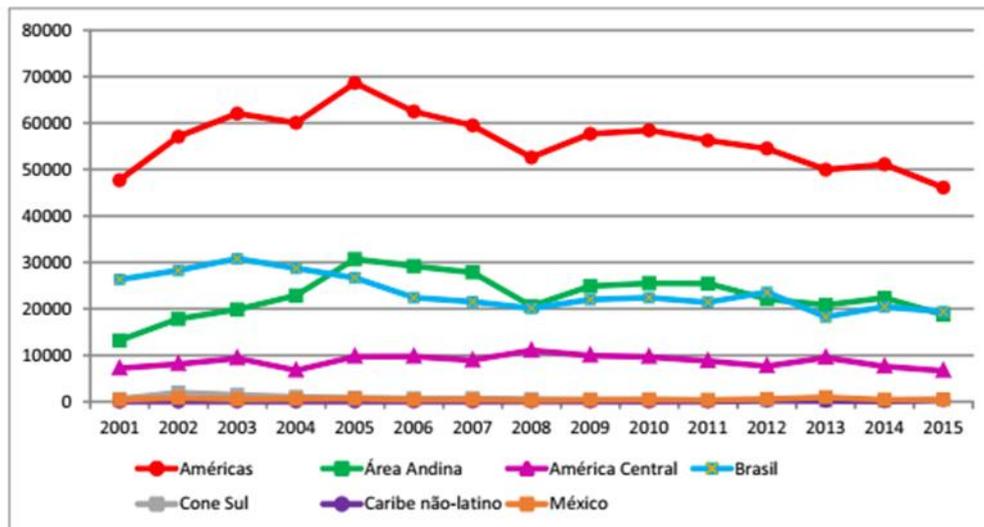
No século XX, Gaspar Vianna observou as formas amastigotas de *Leishmania* em lesões cutâneas de pacientes oriundos do Estado de Minas Gerais, dando o nome de *L. braziliensis* (apud VIANNA, 1911). Mais tarde foi denominada de *L.(V.) braziliensis* (apud MATTA, 1916).

O primeiro a cultivar *Leishmania* em meio de cultura foi Rogers, permitindo demonstrar suas várias formas de desenvolvimento até a fase flagelada, seguido posteriormente por Clatterjee, Leishman e Statham, Christophers e outros (apud ROW, 1912). Posteriormente, foi desenvolvida uma técnica de coloração de esfregaços de sangue adaptado para diagnóstico de *Leishmania* conhecido como *corante de Leishman* (apud LEISHMAN, 1901).

### 2.1.2 Epidemiologia

A leishmaniose é uma antropozoonose com diversidade epidemiológica que representa um complexo de doença com importante espectro clínico (BRASIL, 2010), considerada uma doença negligenciada (MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013), endêmica em várias regiões tropicais e subtropicais no mundo (PATHAK et al., 2011).

Segundo a OPAS/OMS (2017), foram notificados 843.931 mil de novos casos de LC e LM nas Américas, no período de 2001 a 2015, conforme mostra a figura 1, distribuídos em 17 dos 18 países endêmicos. Sendo que foi observado nos últimos cinco anos uma redução no número de casos, onde, no ano de 2015, foi registrado um decréscimo em relação a 2014.



**Figura 1.** Leishmaniose tegumentar em países endêmicos nas Américas, 2001-2015. Fonte: SisLeish-OPAS/OMS: Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Vigilância. Dados disponíveis em abril de 2017.

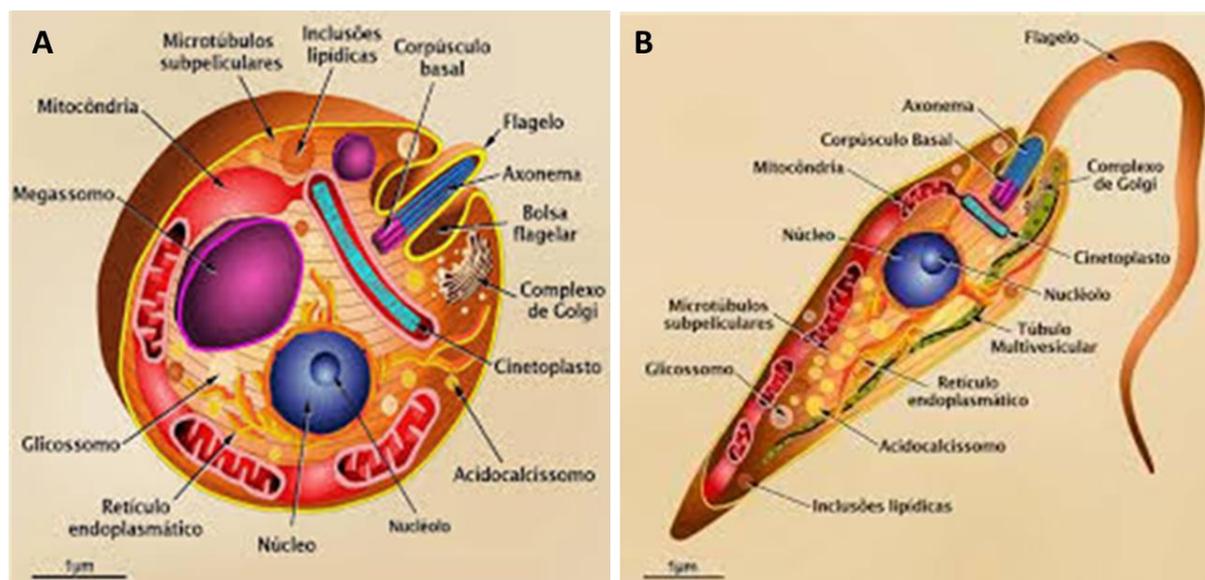
A leishmaniose tegumentar americana (LTA) constitui um problema de saúde pública no mundo, com registro anual de 0,7 a 1,3 milhão de novos casos (BRASIL, 2017). No Brasil, ocorre em todos os estados, e a incidência tem aumentado consideravelmente chegando a 21.161 mil casos no ano de 2017. No estado do Amazonas, foram notificados 1.732 casos e, no município de Manaus, com 733 em 2017 (SINAN, 2017).

No Brasil, a LTA é uma das afecções dermatológicas que merecem mais atenção, devido ao seu crescimento e complexidade, podendo causar deformações no ser humano e, com isso, o indivíduo pode vir a adquirir transtornos psicológicos e sociais (CARVALHO et al., 2012). O crescimento das cidades e da população gerou uma grande mudança na organização espacial geográfica do Brasil, e isso tem propiciado a proliferação de áreas de alto risco de infecção por leishmaniose (BRASIL, 2017).

### 2.1.3 Agente etiológico

A leishmaniose é uma doença causada por parasitas classificados no reino Protozoa, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, subgêneros *Leishmania* ou *Viannia* (LAINSON, 2010). O parasita tem como característica ser intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, apresentando duas formas: uma flagelada que vive no intestino do inseto vetor e a outra com o flagelo internalizado, encontrado no tecido no hospedeiro vertebrado (OMS, 2010).

O protozoário do gênero *Leishmania* é o eucariotos unicelulares que possuem minicírculos e maxicírculos de DNA mitocondrial, arranjados em uma estrutura muito característica, denominada de cinetoplasto, localizado no interior da mitocôndria única, conforme mostrado na figura 2. Algumas espécies de leishmânias foram identificadas como patogênicas para humanos, causando as leishmanioses cutânea, mucosa e visceral (OMS, 2010).



**Figura 2.** Esquema mostrando as formas amastigotas (A) e promastigotas (B) de *Leishmania* sp. Ilustração de organelas e estruturas presentes no parasita. Fonte: [www.repositorio.ufpa.br](http://www.repositorio.ufpa.br)

O ciclo biológico da *Leishmania* é heteroxênico (digenético), ou seja, acontece no hospedeiro vertebrado e no invertebrado. Entre os hospedeiros, incluem-se uma grande variedade de mamíferos como roedores, marsupiais, edentatos, canídeos, humanos, entre outros. E nos invertebrados dípteros, como os flebotomíneos fêmeas, que são hematófagas (ALCOLEA et al., 2010). As formas promastigotas ( nos invertebrados) e as amastigotas (no vertebrado) se multiplicam por divisão binária (MICHALICK; RIBEIRO, 2011).

O gênero *Leishmania* compreende mais de 30 espécies, das quais 20 são patogênicas para os humanos (CUPOLILLO et al., 2000; NEUBER, 2008). No Brasil, são reconhecidas sete espécies dermatrópicas de leishmânias causadoras de doença LTA: a *L.(L.) amazonensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) lainsoni*, *L.(V.) naiffi*, *L.(V.) shawi* e *L.(V.) lindenbergi* (LAINSON, 2010; BRASIL, 2013). Essas espécies possuem peculiaridades quanto às manifestações clínicas como: vetores, reservatórios, distribuição geográfica, resposta farmacoterápica, entre outros (BRASIL, 2010). Na Amazônia, as espécies mais circulantes e que causam infecção são: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) naiffi* (GUERRA et al., 2011).

*L.(L.) amazonensis* é responsável pela forma cutânea da leishmaniose, e pelos casos de leishmaniose cutânea difusa (LCD), além de ser considerada a forma mais rara, severa e de difícil tratamento da doença (BRASIL, 2017), podendo também ser capaz de causar a forma visceral em alguns casos (MARTINEZ; PERSEN, 2014).

*L. (V.) guyanensis* causa lesões ulceradas cutâneas únicas ou múltiplas, sendo que as lesões múltiplas são consequência de picadas simultâneas de vários flebotomos infectados ou metástases linfáticas secundárias (BRASIL, 2010). Além

da forma cutânea, esta espécie pode causar também a forma mucocutânea da doença no homem e contribui com mais de 80% dos casos notificados no Estado do Amazonas (GUERRA et al., 2011).

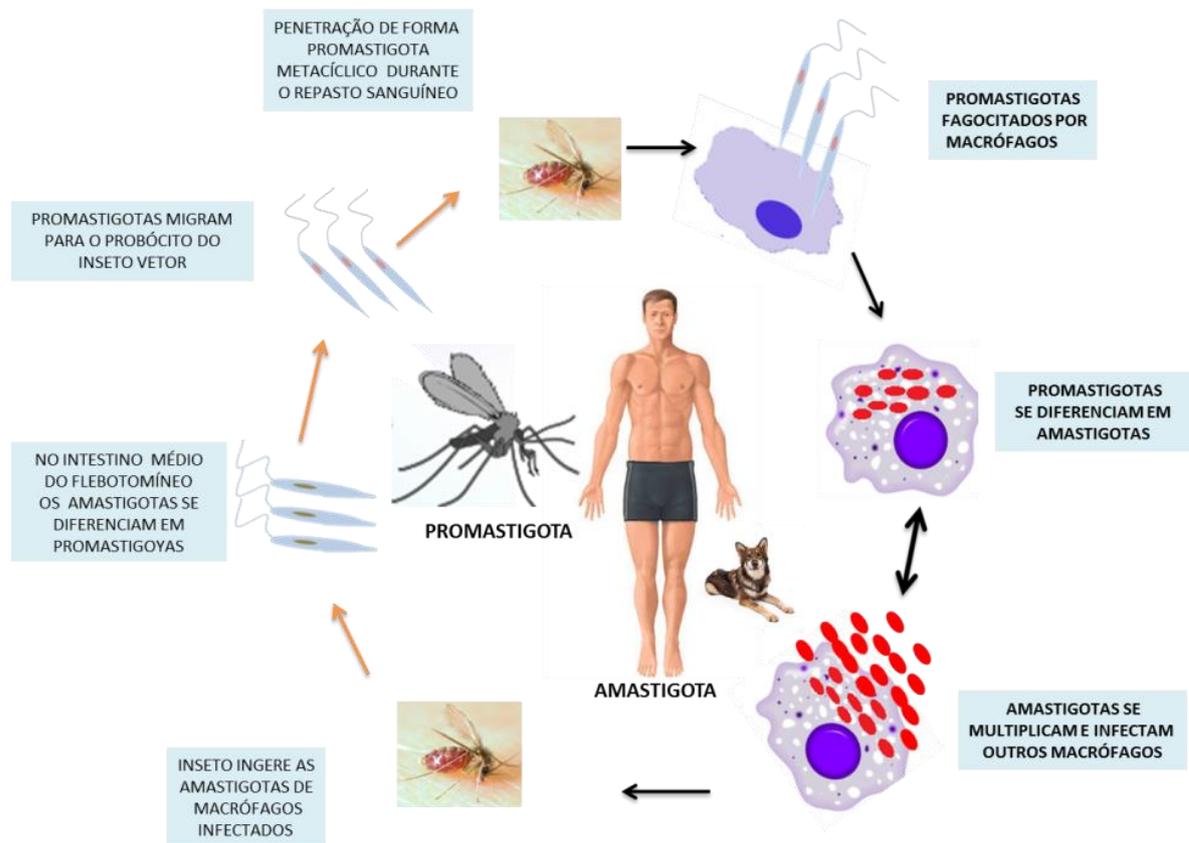
*L. (V.) braziliensis* é a espécie que possui maior distribuição geográfica no Brasil, inclusive na região Centro-Oeste. Nessa região, essa espécie está associada ao desenvolvimento das lesões mais graves da doença, com lesões cutâneas múltiplas ou extensas, que acomete as mucosas oral e nasal, tendo como características lesões destrutivas do tecido da mucosa nasofaríngea, que podem ser desfigurantes e também incapacitantes (LAINSON, 2010).

*L. (V.) naiffi* causa baixo grau de patogenicidade ao homem, estando associada apenas à forma cutânea, podendo até mesmo ocorrer cura espontânea (SILVEIRA et al., 2008; CAMPOS et al., 2008; FIGUEIRA et al., 2017).

#### 2.1.4 Transmissão

A leishmaniose nas Américas é transmitida através da picada do flebotomíneo fêmea da subfamília Phlebotominae, pertencente ao gênero *Lutzomyia*, popularmente conhecido como mosquito-palha, birigui, tatuquira, cangalha e cangalhinha (ARAUJO et al., 2014). Ao fazer o repasto sanguíneo, o inseto vetor infectado inocula as formas promastigotas de *Leishmania* na pele, que vão invadir o organismo do hospedeiro, estimulando células apresentadoras de antígenos para o local (principalmente os macrófagos). Quando conseguem entrar nos macrófagos, os promastigotas se diferenciam em amastigotas, que irão se multiplicar até lisar a célula, e assim disseminar a infecção no hospedeiro vertebrado (BRASIL, 2017). E o inseto vetor, ao fazer repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, irá

adquirir as formas amastigotas que irão se diferenciar em promastigotas no tubo digestivo do inseto vetor, completando o ciclo de vida do parasita conforme mostrado na figura 3 (MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013).



**Figura 3.** Representação do ciclo de vida da *Leishmania* sp. no inseto vetor e no hospedeiro mamífero. Fonte: Adaptado pelo próprio autor.

Quando os promastigotas são inoculados na pele, ocorre a estimulação de mecanismos de defesa através dos linfócitos T e B, macrófagos residentes, células de Langerhans, mastócitos, e assim formando um complexo específico denominado sistema imune da pele. Tal mecanismo, ainda não está totalmente esclarecido, envolve receptores e ligantes em ambas as superfícies, nos quais o parasita adere-se à superfície dos macrófagos e células de Langerhans, passando para o meio

intracelular por meio de um processo de fagocitose, mediada por receptores, em que se transforma na forma amastigota, característica do parasitismo nos mamíferos (SERAFIM et al., 2012).

Ao inocular a forma promastigota na fase metacíclica (infectante) na pele, esses parasitas são capazes de modular as resposta de defesa do hospedeiro, por apresentar um organismo mais completo, com o desenvolvimento de moléculas como glicoconjugados (LPG) e glicoproteínas (gp63) que favorecem a fixação de componentes C3b e iC3b, e se depositam na membrana do parasita e passam a atuar como ligantes dos receptores CR1 e CR2 respectivamente, facilitando sua interiorização pelos macrófagos (LIU; UZONNA, 2012). Com isso, dá-se condições para o parasita produzir fosfatase ácida com capacidade de inibir a explosão oxidativa, mecanismo que produz enzimas ácidas geradas pelo macrófago para tentar matar os parasitas (SHARMA; SINGH, 2009).

Portanto, quando os amastigotas estão dentro dos macrófagos, a infecção será dependente da resposta imune mediada por células, em que a principal célula efetora da eliminação dos amastigotas é o próprio macrófago, após ser ativado por linfócitos T (*Helper*), tornando-as capazes de destruir amastigotas, por meio da secreção de citocinas tais como, interferon-gama (INF- $\gamma$ ) e, assim, sintetizando intermediários tóxicos de oxigênio e nitrogênio como o óxido nítrico (BRASIL, 2017).

Na fisiopatogenia das leishmanioses, os macrófagos possuem várias funções, tais como: células hospedeiras, apresentadores de antígenos para o sistema imune e efector para a destruição do parasita (LIEW et al., 1990). Quanto à variabilidade genética do parasita, está associada a fatores imunológicos do hospedeiro e são fatores determinantes no desenvolvimento de formas brandas ou graves da LTA (CARVALHO et al., 2012).

Os macrófagos são provenientes da diferenciação dos monócitos e podem ser residentes ou ativados (são mais aderentes e possuem elevada resposta celular). Os residentes são encontrados em quase todos os tecidos do corpo nos quais assumem funções e fenótipos específicos. Estas células funcionam como sensores na inflamação e regeneradores de tecidos, nos quais há um aumento no reconhecimento de suas interações com outras células residentes em cada órgão (MOTA, 2009). Macrófagos teciduais são considerados sentinelas imunes devido à sua localização estratégica e sua habilidade em iniciar e modular respostas imunes, durante a infecção patogênica ou lesão do tecido, e contribuem para a manutenção da homeostase dos tecidos (CASSADO et al., 2015).

Existem diferentes formas para obter macrófagos, e uma delas é a extração através do peritônio de camundongos que contém normalmente uma grande população de células residentes, cerca da metade são fagócitos mononucleares imaturos e que constituem uma única fonte de fagócitos, não necessitando de um estímulo inflamatório peritoneal prévio. Eles servem como uma excelente população para experimentos de cultura *in vitro*, onde as características morfológicas e bioquímicas das funções dos macrófagos já foram avaliadas (COHN, 1968). A grande semelhança entre os macrófagos de camundongos e humanos faz dos macrófagos peritoneais um excelente sistema modelo para elucidar os mecanismos que regulam o metabolismo e função dos macrófagos humanos (AKOH; CHAPKIN, 1990).

No entanto, para ativar os macrófagos é essencial que eles sejam estimulados para que possam ativar suas atividades microbicidas, podendo sofrer dois tipos de ativação, a ativação clássica (M1) ou ativação alternativa (M2)

(MURAILLE et al., 2014). Apesar de serem vias bioquímicas distintas, ambas envolvem o metabolismo do aminoácido L-arginina. (COMALADA et al., 2012).

A ativação dos macrófagos da via clássica pode ocorrer tanto por estímulos de citocinas do tipo (IL-12, TNF- $\gamma$ ) do tipo Th1, ou por componentes microbianos, como o lipopolissacarídeos (LPS), os quais estimulam a ativação de enzimas (óxido nítrico sintase induzível-iNOS/NOS2), que convertem a L-arginina em OH-arginina, que produz o óxido nítrico (NO) e citrulina (LIU; UZONNA, 2012) com capacidade de produzir altos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-6) e, conseqüentemente, os reativos intermediários de oxigênio (ROI), além de apresentar alta seletividade a antígenos, essas ações leva ao aumento da capacidade microbicida dos macrófagos frente a patógenos intracelulares e, assim, favorecer a resposta dos linfócitos (TCD4+) [MURAILLE et al., 2014].

A capacidade microbicida dos macrófagos é dependente de três mecanismos: a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), a produção de óxido nítrico e de enzimas proteolíticas. Uma vez que a geração da EROs ocorre através da ação da enzima oxidase fagocitária, que é ativada por diversos estímulos, incluindo o IFN-  $\gamma$ , essa enzima reduzirá o oxigênio molecular em EROs, utilizando a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), fenômeno que ocorre durante a respiração celular, sendo chamado de explosão respiratória, promovendo o aumento do pH e da osmolaridade no interior do vacúolo celular (ABBAS et al., 2011).

Esses mecanismos geralmente ocorrem através das mitocôndrias, que é reconhecido como a fonte mais importante de espécies reativas de oxigênio (EROs) na maioria dos tipos de células eucarióticas, além de serem importantes

determinantes na função das células, participando em muitas redes de sinalização e em uma variedade de processos degenerativos (ABBAS et al., 2011).

Estudo realizado por CHANNON et al. (1984) concluiu que devido à interação *Leishmania*-macrófago, o  $O_2^-$  passa a ser rapidamente produzido pelos macrófagos, no intuito de proteção a célula hospedeira. Outro estudo conduzido por KHOURI et al., (2009) demonstraram *in vitro* que há uma associação entre capacidade leishmanicida dos macrófagos e produção elevada de  $O_2^-$  por estas células.

GUIDICE et al. (2012) observaram que apesar da produção de  $NO^\bullet$  ter coincidido com a diminuição de parasitas intracelulares em macrófagos de indivíduos com infecção subclínica (SC) na leishmaniose, não houve diferença significativa na produção desta molécula entre os pacientes com LC, LM e indivíduos com SC, assim como também foi observado para com superóxido ( $O_2^-$ ).

Estudo recente, realizado por LIMA JÚNIOR (2013), demonstrou como ocorre o mecanismo do óxido nítrico ( $NO^\bullet$ ) *in vitro* e *in vivo* para o efeito da *Leishmania* em células de defesa (macrófagos) em camundongos, desde a fagocitose da *Leishmania* até a morte pelo  $NO^\bullet$ , observando que o mecanismo de controle da infecção depende do inflamassoma e IL-1 $\beta$ . Esse processo foi demonstrado em três espécies de grande incidência no Brasil, a *L. (L.) amazonensis*, a *L.(V.) braziliensis* (causadoras de lesões cutâneas e mucosas) e a *L. infantum chagasi* (responsável pela forma visceral).

### 2.1.5 Formas clínicas

A forma cutânea localizada representa a forma mais comum da leishmaniose, com característica primária, pequena e com eritema volumoso e avermelhado que se desenvolve após um período variável. No local da inoculação, as lesões cutâneas são encontradas normalmente em várias partes do corpo externo, principalmente: na face, nos braços e pernas. Frequentemente, apresentam cronicidade e muitas vezes não respondem à tentativa de uso de antibióticos ou esteróides (DAVID; CRAFT, 2009). A LC é tipicamente causada por *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* entre outras (FRAGA et al., 2012).

No Brasil, a leishmaniose cutânea difusa é uma doença causada pela *L. amazonensis* (LAINSON, 2010). Constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Inicia de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento; evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrimdo grandes extensões cutâneas. A resposta à terapêutica é pobre ou ausente e geralmente a IDRМ apresentando-se negativa (BRASIL, 2010).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) é causada pela *L. (V.) brasiliensis* no Brasil, Peru, Equador, Colômbia e Venezuela (BRASIL, 2017). Outras espécies também podem desencadear, como a *L. (V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* (FRAGA et al., 2012). É uma doença caracterizada pelo envolvimento de tecidos do trato respiratório superior, causando erosões na cavidade oral, nasal e faríngea e desfiguração do rosto (GOTO; LINDOSO, 2010).

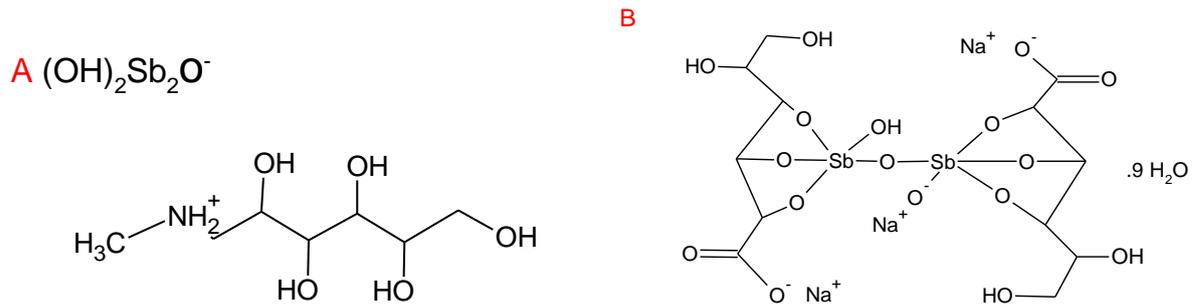
A leishmaniose mucosa está relacionada com os históricos de pacientes que tiveram leishmaniose cutânea, os quais não apresentaram uma resposta eficaz de cura ou com tratamento inadequado, apresentando lesões com características extensas, múltiplas e com mais de um ano de evolução, levando maior risco a desenvolver metástase para a mucosa (BRASIL, 2017).

### 2.1.6 Tratamento

O tratamento da LTA tem como objetivo acelerar o processo de cura, e prevenir a progressão da doença, em que a escolha do tratamento depende do tamanho e da localização da lesão, o número de lesões e o potencial de disseminação (AMEEN, 2010). As drogas comumente utilizadas no tratamento para LTA são: Glucantime<sup>®</sup> (primeira escolha), Anfotericina B<sup>®</sup> e Pentacarinat<sup>®</sup> (segunda escolha). Para a forma mucocutânea, está sendo utilizado o antimônio pentavalente associado à Pentoxifilina (adjuvante) como fármaco de primeira escolha (BRASIL, 2017).

#### 2.1.6.1 Antimônio pentavalente

No Brasil o Sb<sup>v</sup> é comercialmente vendido por antimoniato de N-metilglucamina (NMG) [Glucantime<sup>®</sup>], na América Latina e África, como estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>), utilizado em outros países (BRASIL, 2017). Esse fármaco é fornecido gratuitamente para o tratamento dos doentes pelo Ministério da Saúde e possui um protocolo de tratamento que varia dependendo das condições clínicas associadas a cada caso (BRASIL, 2013).



**Figura 4.** Fórmula química dos antimonias pentavalentes. *N*-metil glucamina (A) e Estibogluconato de sódio (B). Fonte: Adaptado pelo próprio autor.

A resposta terapêutica do paciente através do tratamento com antimonial pode variar de acordo com a espécie e cepa do parasita, além do estado imunológico do paciente e a forma clínica da doença (GUERRA et al., 2011). No Brasil, há uma resposta precária ao antimonial em pacientes infectados com *L. (V.) guyanensis*, espécie prevalente no estado do Amazonas (NEVES, 2010).

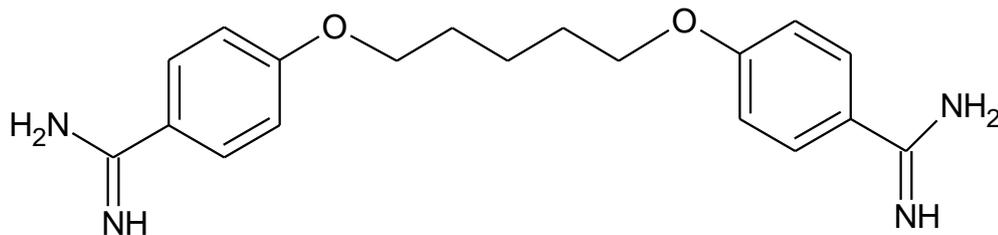
Os fármacos usados para o tratamento da leishmaniose são muito tóxicos, com efeitos adversos colaterais como: dor no local da injeção, artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, epigastralgia, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema, insuficiência renal aguda (BRASIL, 2013), pancitopenia, elevações das transaminases hepáticas, anemia hemolítica, choque e morte súbita (MARGARET et al., 2012).

**Tabela 1.** Esquema terapêutico do antimoniato de N-metilglucamina preconizado para as diversas formas clínicas de LTA, segundo (OPAS/OMS, 2013).

Forma Clínica	antimoniato de N-metilglucamina Dose	Tempo de duração mínima
Cutânea	10-20mg/Sb <sup>+5</sup> /Kg/dia (Recomenda-se 15mg/Sb <sup>+5</sup> /Kg/dia	20 dias
Difusa	20mg/Sb <sup>+5</sup> /Kg/dia	20 dias
Mucosa	20mg/Sb <sup>+5</sup> /Kg/dia- associado a Pentoxifilina 400mg/3x/dia	30 dias

### 2.1.6.2 Pentacarinat<sup>®</sup>

As Pentacarinat<sup>®</sup> são pertencentes às diamidinas aromáticas que podem ser usadas no tratamento da LTA como fármaco de segunda escolha, e em casos não responsivos ao antinoniato N- metilglucamina em áreas endêmicas do continente americano (BRASIL, 2017).



**Figura 5.** Fórmula estrutural do isotonato de pentamidina. Fonte: adaptado pelo próprio autor.

As reações adversas mais frequentes com o uso da Pentacarinat<sup>®</sup> são: dor, induração, abscessos no local da aplicação, náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaleia, hipotensão, lipotimia, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia (BRASIL, 2017). É contraindicado em caso de gestação, *diabetes mellitus*, insuficiência renal, insuficiência hepática, doenças cardíacas e em crianças com

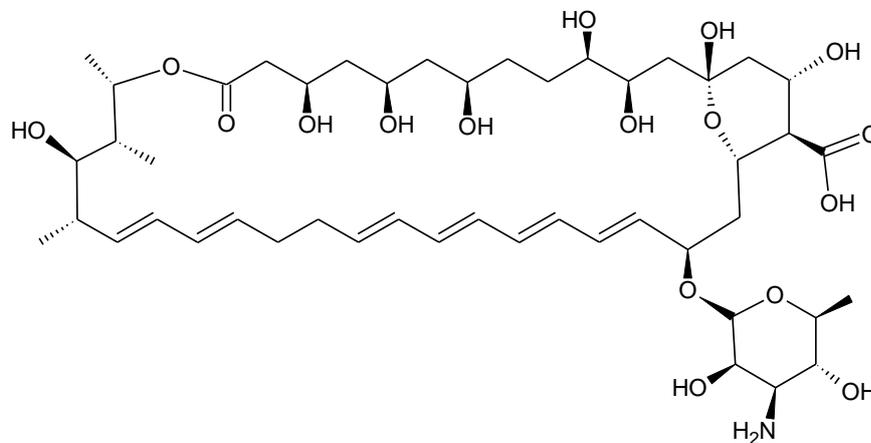
peso inferior a 8 kg, conforme esquema terapêutico na tabela abaixo (BRASIL, 2013).

**Tabela 2.** Esquema terapêutico da Pentacarinat<sup>®</sup> preconizado para as diversas formas clínicas de LTA, segundo (OPAS/OMS, 2013).

Forma Clínica	Dose	Tempo de duração mínima
<b>Cutânea</b>	4mg/Kg/dia/3x/dose Max. 300mg	Intervalos de 72h (IM)e 48h(EV)
<b>Difusa</b>	4mg/Kg/dia/	Dias alternados de 10 doses
<b>Mucosa</b>	3mg a 4mg/kg/dia	Dias alternados de 7 a 10 doses

### 2.1.6.3 Anfotericina B<sup>®</sup>

A Anfotericina B<sup>®</sup> é um antibiótico poliênico com atividade antifúngica e leishmanicida. Este fármaco é usado como segunda escolha devido aos graves efeitos adversos associados com a possibilidade de ser empregada apenas quando não se obtém uma resposta adequada ao tratamento com os antimoniais (BRASIL, 2017).



**Figura 6.** Fórmula estrutural da anfotericina B. Fonte: adaptado pelo próprio autor.

Há outra formulação mais recente na forma lipossomal da Anfotericina B, cujo uso clínico é recomendado para os casos graves de leishmanioses não responsivas ao tratamento convencional, transplantados renais ou pacientes com insuficiência renal, como também para idosos, grávidas e crianças (CALDAS et al., 2013). Porém, seu uso é limitado pelo alto custo e pela administração endovenosa o que restringe seu uso a poucos centros especializados e normalmente em âmbito hospitalar com acompanhamento médico e controle das reações adversas (MACIEL SANTOS et al., 2013).

#### *2.1.6.4 Pentoxifilina*

A Pentoxifilina é um fármaco vasodilatador periférico, sua forma farmacêutica é apresentada como comprimido revestido, de liberação prolongada contendo 400 mg de pentoxifilina, aprovado no ano de 2013, pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), utilizado como coadjuvante (imunomodulador) no tratamento da leishmaniose tegumentar mucosa, em que associado com o antimoniato *N*-metil glucamina (Glucantime®) são fármacos de primeira escolha para esta forma (BRASIL, 2017). Porém, pode apresentar algumas reações adversas como: arritmia cardíaca (ex.: taquicardia), vertigem, dores de cabeça, agitação e distúrbios do sono. Ocasionalmente, podem ocorrer também prurido, eritema e urticária. Contraindicado para menores de 12 anos de idade, gestação, lactação, histórico de hemorragia recente, hipersensibilidade à pentoxifilina (e a outras metil-xantinas ou a algum de seus excipientes), coinfeção pelo HIV, imunossuprimidos, transplantados e portadores de insuficiência renal, hepática ou cardíaca (BRASIL, 2017).

## 2.2 Plantas Medicinais

Desde os tempos mais remotos, as comunidades humanas mais primitivas já utilizavam empiricamente produtos naturais para diversos fins, dentre eles está a conservação dos alimentos e o alimentar (HERNÁNDEZ et al., 2009). Também utilizavam as plantas para fins terapêuticos ou fins profiláticos, pois ao longo dos anos essas mesmas populações foram descobrindo o potencial curativo das plantas medicinais (FARIA et al., 2012).

O Brasil é um país que apresenta uma grande biodiversidade e podemos destacar os principais biomas: a floresta amazônica, o cerrado, a mata atlântica, pantanal e caatinga, onde podemos encontrar uma fonte rica de produtos naturais terapêuticos, uma alternativa para desenvolver protótipos potenciais para novos fármacos (MELO NETO, 2011). Uma vez que a floresta Amazônica é reconhecida como um dos mais completos ecossistemas do planeta, devido à sua biodiversidade genética vegetal e animal (ZILLI; VIEIRA; NECHET, 2007).

Essas plantas medicinais produzem uma grande variedade de substâncias químicas que podem promover diversas atividades biológicas, podendo apresentar atividade terapêutica ou ser tóxica, com isso podem provocar efeitos adversos ou colaterais (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Povos da Amazônia utilizam essas plantas medicinais para vários fins como: alimentos, terapêutico e como profilaxia, um dos exemplos temos a *Zingiber officinale* Roscoe conhecida popularmente por mangarataia folha, utilizando-se o caule para o preparo de chá, xarope, e geralmente é usada para o tratamento de gripe, tosse, dor de estômago (VÁSQUEZ et al., 2014).

Portanto, estudos têm revelado novas alternativas com o uso de plantas medicinais para o tratamento de diversas patologias. De modo que grupos de pesquisas com produtos naturais veem se esforçando para desenvolver novas tecnologias para serem empregadas a novos fármacos, e assim, agregar valor à biodiversidade (PINTO et al., 2002). E o isolamento de bioativos de plantas pode permitir que o composto ativo seja obtido mais puro e, assim, tornando-os produtos medicinais mais seguros, em outros casos, podendo melhorar a substância natural, aumentando suas propriedades desejáveis e minimizando os efeitos colaterais (PERTINO et al., 2007).

### 2.2.1 Gênero *Piper*

As plantas do gênero *Piper* são ervas arbustas ou pequenas árvores, geralmente aromáticas, algumas apresentam as superfícies cobertas por pêlos simples, são dendríticas ou estreladas, com folhas alternadas e espalhadas, com inflorescência pendulada com única espiga, seu fruto é carnoso ou seco, tem semente, redondo ou angular (FERREL; RODRÍGUEZ, 2013).

Na América do Sul, principalmente no Brasil, várias espécies de *Piper* são usadas na medicina tradicional. Dentre elas, várias estão incluídas na Farmacopéia Brasileira, como a *P. angusifolium* (Pimenta matico), utilizado contra hemorragia, úlcera e tratamento de doenças urinárias (BRANDÃO et al., 2008).

As espécies do gênero *Piper* têm sido amplamente estudadas e são particularmente ricas em constituintes químicos com potencial econômico e/ou implicações ecológicas. Dentre os diferentes compostos têm sido encontrados: alcaloides/amidas, lignanas, flavonóides, neolignanas, alilfenóis, esteroides,

pironas/terpenos, chalconas, entre outros. Algumas propriedades biológicas têm sido encontradas em todas as partes da planta, incluindo folhas, caules, raízes e inflorescência (SENGUPTA; RAY, 1987; PARMAR et al., 1997; DYER et al., 2004). Tais como: atividade antimicrobiana, inseticida, anti-inflamatória, anticancerígena, antileishmania, hepatoprotetora, antioxidante entre outras (PARMAR et al., 1997).

### 2.2.2 A espécie *Piper aduncum*

*P. aduncum* é conhecida como pimenta-de-macaco, está distribuída pela América Central, Antilhas e América do Sul, com maior incidência em solos arenoargilos como os da Amazônia e Mata Atlântica. No Brasil, pode-se encontrar essa espécie nos estados do Amazonas, Amapá, Pará, Mato Grosso, Ceará, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

A espécie *P. aduncum* é utilizada para vários fins, como no reflorestamento de áreas alteradas e contribui para a biodiversidade e biomassa das florestas, e também fonte de alimento e cobertura para a vida selvagem. Além disso, é comumente utilizada como anti-inflamatório, tem sido utilizada em feridas por populares de alguns países (NICK et al., 1995). No Peru, usa-se para tratamento de diarreia, e na Jamaica para resfriado e dores estomacais (MACEDO; OVIEDO, 1987).



**Figura 7.** *Piper aduncum*. Fonte: [www.naturezabela.com.br](http://www.naturezabela.com.br)

### 2.2.3 Etnoconhecimento de *Piper aduncum*.

Por meio de alguns estudos publicados, autores demonstraram que essa espécie de planta é utilizada para diversas formulações tradicionais por povos de vários países, como adstringente, estimulante digestivo, diurético, antimalárico, sedativo, laxante, bebida refrescante e remédio para hemorróidas, gonorreia, leucorreia, hemorragias menstruais, diarreia, disenterias e dor de dente, como também contra dor de estômago e repelente de insetos (BALDOQUI et al., 1999; MAIA; ZOGHBI; ANDRADE, 2001).

Segundo SILVA (2004), demonstrou que a *P. aduncum* da Amazônia tem um alto teor de óleo essencial (2,5 a 4%) rico em dilapiol, um éter fenílico que vem sendo testado com êxito como fungicida, moluscicida, acaricida, bactericida e larvicida e com a vantagem de ser um produto biodegradável.

Estudos realizados por ACIOLE et al. (2013), utilizaram-se do óleo essencial do dilapiol demonstrando que esse composto tem ação tóxica em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

Outros estudos têm demonstrado diferentes atividades biológicas dos constituintes de *P. aduncum*, é o caso do estudo realizado por FIGUEIREDO (2014), que demonstrou, através do óleo essencial das folhas, um potencial bastante significativo no combate a larvas de *Aedes aegypti* e contra mosquitos da linhagem Quix e Rockefeller, ou seja, confirmou o potencial do óleo essencial das folhas de *P. aduncum* como biopesticida.

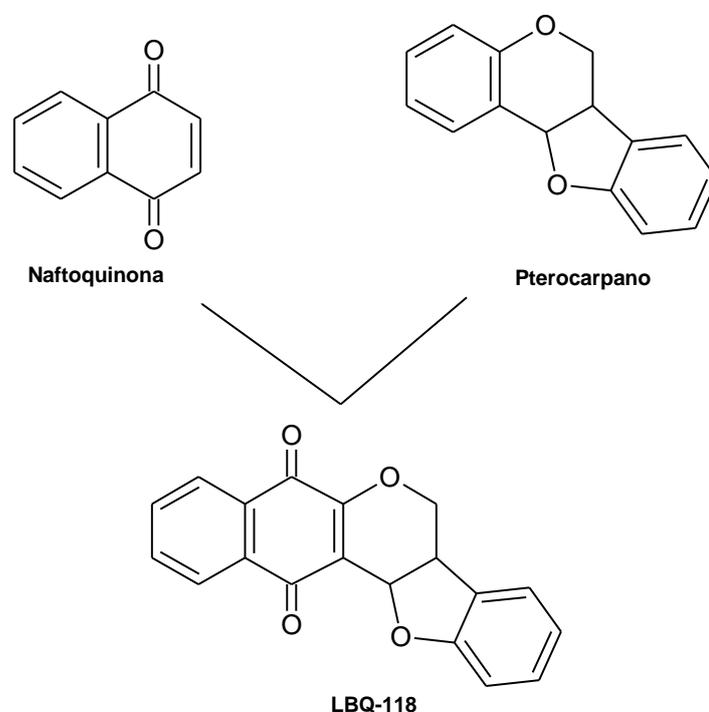
BRAGA (2007) demonstrou atividade antileishmaniana do extrato etanólico das folhas de *P. aduncum* contra as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*. Assim como, no estudo de PICOLO (2014), também demonstrou atividade antileishmaniana de extrato etanólico das folhas de *P. aduncum* contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) shawi* e um potencial contra *L. (L.) chagasi*, isolando adunchalcona, e assim potencializando a atividade contra espécies de leishmânias.

A ciência evoluiu de forma significativa em paralelo com a química medicinal, nas quais se aplicam as mais recentes tecnologias, voltadas ao desenvolvimento de novos medicamentos, já que envolvem desde a química computacional, a biologia molecular estrutural, podendo aplicar também técnicas que permitam modificações estruturais em uma molécula para a obtenção de novos derivados, uma estratégia bem-sucedida para a concepção de novos protótipos de fármaco (AGARWAL; FISHWICK, 2010).

Podemos citar como exemplo várias classes de substâncias sintéticas, derivadas ou não de produtos naturais que apresentam atividades sobre diversas

espécies de *Leishmania*, como os benzoxazóis, imidazóis, chalconas, diamidinas, nitroeterociclos, fosfolipídeos, pirimidinas, quinolinas, iminoquinonas e quinonas (SINGH et al., 2012).

Os pterocarpanos são uma classe que representam o grupo dos isoflavonóides junto com outras substâncias como: isoflavonas, isoflavanas, 3-aril-4-hidroxycumarinas, cumarocromonas, isoflavanonas, rotenóides e cumestanos (JIMÉNEZ-GONZÁLEZ et al., 2007). Algumas apresentam atividades como as das fitoalexinas, substâncias de defesa para a planta em resposta a uma agressão externa (ANDERSEN; MARKHAM, 2006). São naturais e têm demonstrado um perfil amplo de atividade como tripanossomicida (VIEIRA et al., 2008), antifúngica (JIMÉNEZ GONZÁLEZ, 2008), antibacteriana (ABDEL-KADER, 2010) e antitumoral (CAAMAL-FUENTES et al., 2013 ).



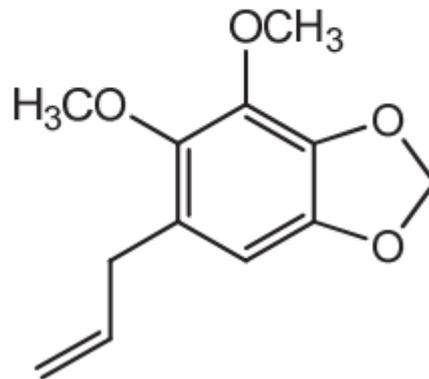
**Figura 8.** Esquema evidenciando dos dois grupos farmacofóricos que foram base para obter a pterocarpanoquinona LQB-118. (CUNHA-JÚNIOR, 2011).

Em outro estudo, com o derivado LQB-118 atua em diferentes formas clínicas da leishmaniose com ausência de sinais de toxicidade em doses terapêuticas, e o mecanismo de ação inicial da molécula sugere um efeito seletivo a nível mitocondrial do parasita, com aumento da atividade mitocondrial, da produção de ATP e de espécies reativas de oxigênio, sugerindo que o protótipo LQB-118 tem um perfil promissor e deve ser investigado como uma possibilidade terapêutica para a leishmaniose (CUNHA JÚNIOR, 2015).

Assim como, as várias classes de compostos isolados da espécie *P. aduncum* têm sido obtidos de várias partes, tais como: derivados prenilado do ácido benzoico, cromenos ou benzopiranos, flavonoides, alcaloides, amidas e fenilpropanóides segundo POHLIT; PINTO; MAUSE (2006).

#### 2.2.4 O dilapiol

É um fenilpropanóide constituído de uma estrutura fenólica com um grupo terpenóide, geralmente esses componentes são voláteis e são considerados marcadores taxonômicos para o gênero *Piper* (NAIR; SOMMERVILLE; BURKE, 1989). As *Piper* encontradas na região Amazônica apresentam “caule avermelhado” e produzem dilapiol, e espécimes ocorrentes na região Sul com “caule esbranquiçado” não apresentam dilapiol (NAVICKIENE et al., 2006).



**Figura 9.** Fórmula química do dilapiol (OLIVEIRA et al., 2005).

O dilapiol é extraído através de solvente, cromatografia ou hidrodestilação / destilação fracionada em procedimentos usuais de laboratório de química orgânica, é um óleo amarelo claro, com  $d_{27} = 1,5270$  g/L (HANDA, 1979). Esse composto apresenta várias atividades biológicas comprovadas, entre elas, a atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e negativas, inibição *in vitro* da atividade epoxidase de insetos (BERNARD et al., 1989), além de inibir o polisubstrato monooxigenase (PSMOs), enzima que transforma compostos lipofílicos em metabólitos mais hidrofílicos (LAROCQUE et al., 1999), e é inibidor do citocromo P450 (AMIGUET et al., 2006).

Diversos autores demonstraram que o dilapiol é conhecido por apresentar atividade sinérgica com inseticidas como DDT, carbaril, piretrinas e  $\alpha$ -tertienil contra o besouro-castanho (*Tribolium castaneum* Herbst), além da capacidade no controle de mosquitos, como em *Aedes atropalpus* (BELZILE et al., 2000), derivados semissintéticos do dilapiol mostraram excelentes resultados com atividade adultocida em *A. aegypti* (SANTOS et al., 2011).

DOMINGOS (2012) demonstrou, através do efeito dos derivados do dilapiol, o éter etil dilapiol (1KL39-B) e o éter n-butil dilapiol (1KL43-C) em *A. aegypti*, os

efeitos tóxicos e genotóxicos acumulativos em quatro gerações consecutivas (G1, G2, G3 e G4) causando mortalidade de 100% em altas concentrações destes produtos.

Segundo a Organização da Cooperação Econômica e Desenvolvimento (2001), o óleo de *P. aduncum* constitui-se de forma majoritária de dilapiol, que pertence à classe dos agentes xenobióticos de baixa toxicidade. Foi demonstrado por SOUZA et al. (2008) que o óleo essencial de *P. aduncum*, nas doses utilizadas ((1/20)120 mg/kg) em ratos, apresentaram uma margem elevada de segurança, com efeitos tóxicos mínimos sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Outros estudos, a partir do óleo de *P. aduncum*, demonstraram atividades biológicas para diversas espécies de *Leishmania*, como no trabalho realizado por (FIDALGO et al. 2004) contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, através da concentração mínima inibitória (CMI), apresentando resultados promissores. Estudo de (PICOLO et al. 2014) realizado com o derivado adunchalcone, a partir de *P. aduncum*, apresentou atividade antileishmania para quatro espécies de *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) brasiliensis*, *L. (V.) shawi* e *L. (L.) chagasi*.

TORRES-SANTOS et al. (1999) investigaram o efeito do isolado 2',6'-Dihidroxi-4'-Metoxichalcona a partir de *P. aduncum* frente a espécie de *L. amazonenses*, nas formas promastigotas e amastigotas, apresentando inibição com diferença estatística significativa nas duas formas.

Segundo PARISE-FILHO et al. (2012), demonstraram atividade antileishmania do dilapiol e seus análogos (di-hidrodilapiol e isodilapiol) em promastigotas de *L. amazonensis*, *L. brasiliensis*, tornando-os candidatos potenciais para novos fármacos. Assim como, estudo de FARAH et al. (2010) demonstraram efeito antileishmania do dilapiol e de seu análogo isodilapiol contra *L. chagasi*.

### 2.2.5 Docagem molecular

É um método de predição do modo de ligação de pequenas moléculas na cavidade de interação de macromoléculas (TAFT et al., 2008). É uma ferramenta computacional que permite reproduzir o comportamento intermolecular e espacial de moléculas e sistemas moleculares como: a exploração das possíveis conformações das moléculas de interesse dentro da cavidade de interação do alvo; a avaliação das interações intermoleculares responsáveis pelo processo de reconhecimento molecular; e a quantificação da energia de ligação receptor-ligante. Esses recursos permitem aumentar consideravelmente as chances de descoberta de um fármaco com elevada eficácia e potência, além da redução dos custos (LEMKE, 2002).

Observa-se que as enzimas têm sido estudadas incessantemente como potenciais alvos quimioterápicos por meio de várias rotas bioquímicas. Estudo da família Trypanosomatidae tem sido extensivamente pesquisado, devido às suas peculiaridades em processos celulares. E através do sequenciamento genômico do parasita foi possível compreender melhor o seu material genético e produtos, resultando na investigação de várias proteínas como potenciais alvos moleculares (CHOI et al., 2012).

Diante dessa nova técnica de modelagem molecular, estudos prévios identificaram a miristoil-CoA-proteína (N- miristoil transferase) como um candidato adequado ao desenvolvimento de drogas contra infecções parasitárias por protozoários, incluindo *Leishmania major*, o agente causador da leishmaniose cutânea, bem como *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma brucei*, agentes causadores da malária humana e da doença do sono africana, respectivamente (RUDNICK, et al., 1991; BOWYER et al., 2008; WRIGHT et al., 2010).

Assim como ocorre na maioria dos eucariotos, a biossíntese de ácidos graxos a esfingolípídeos é essencial para o parasita, principalmente no processo de formação da membrana. As especificidades da via parasitária podem ser exploradas no desenvolvimento de inibidores seletivos de várias enzimas como: elongase, a esfingolípídeo sintase e a N- Miristoil transferase (PAL et al., 2012).

A tripanotiona por sua vez, é uma molécula essencial que atua no sistema redox celular, responsável pela neutralização de espécies reativas de oxigênio. Sua biossíntese está ligada à vida das poliaminas através de um intermediário comum, a espermidina. Das enzimas dessa via, a tripanotiona sintase e a tripanotiona redutase são alvos para o desenvolvimento de fármacos (PAL et al., 2012).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade antileishmania e citotóxica do éter butil dilapiol obtido a partir de *P. aduncum* L..

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito citotóxico do éter butil dilapiol (EBD) em células de linhagens primária e secundária;
- Avaliar o potencial antileishmania do EBD nas formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.
- Investigar os possíveis mecanismos de ação do EBD na inibição do crescimento do parasita de *Leishmania*.

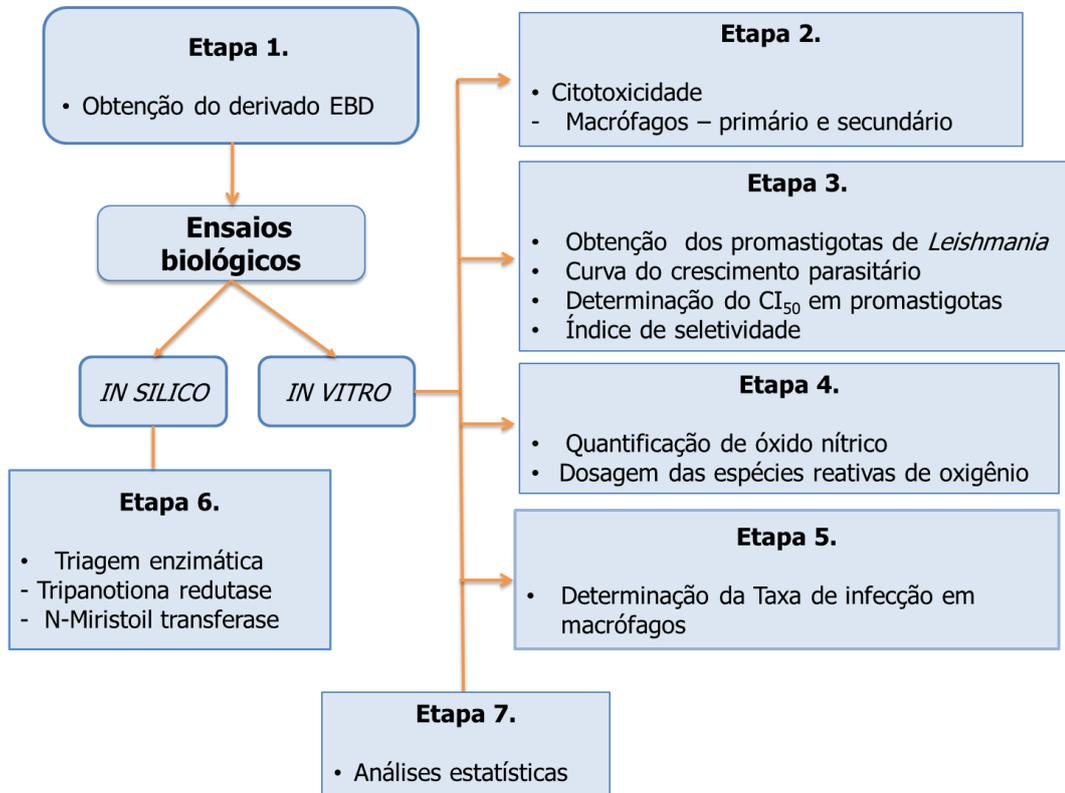
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi executado no Laboratório de atividades biológicas (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM - Universidade Federal do Amazonas) para testes biológicos, sob orientação do Prof<sup>o</sup> Emerson Silva Lima, e no Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas, na Coordenação de Pesquisas em Sociedade, Ambiente e Saúde (COSAS), no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, sob a coorientação da Dr<sup>a</sup> Antonia Maria Ramos Franco Pereira para os testes parasitológicos *in vitro*, e colaboração da Dr<sup>a</sup> Ana Cristina da Silva Pinto no Laboratório de Fitoquímica do (INPA) na semissíntese do Éter Butil Dilapiol.

### 4.1 Informações Éticas

O presente projeto faz parte do projeto guarda-chuva do Laboratório de Leishmaniose e doença de Chagas, submetido e aprovado pelo comitê de ética animal (CEUA / CEP/ INPA) Nº 014/2015.

## 4.2 Fluxograma de atividades



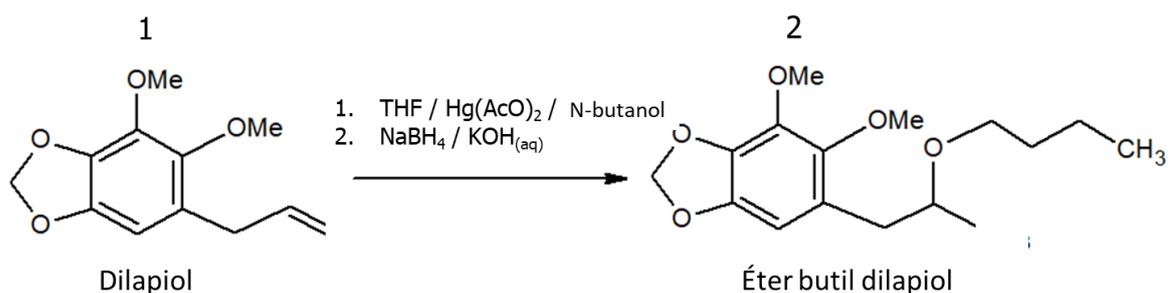
**Figura 10.** Fluxograma das atividades biológicas *in vitro* executadas com o éter butil dilapiol contra *Leishmania (L.) amazonensis*.

## 4.3 Obtenção do material vegetal.

O material vegetal da espécie *Piper aduncum* (folhas) foi coletado nos quilômetros 26, 27, 43 e 58 da Estrada Manaus-Itacoatiara AM-010 no ano de 2017. Cerca de 40 kg do material vegetal foi transportado para Fazenda Litiara, localizada em Itacoatiara, onde o material vegetal foi espalhado sobre uma lona para secagem, permanecendo por dois dias em local coberto. Após a secagem, o material foi pesado obtendo-se uma quantidade de 25 kg de planta seca.

#### 4.4 Preparação do EBD

A preparação da semissíntese do EBD foi realizada pela química Ana Cristina da Silva Pinto. A obtenção do dilapiol foi feita pela metodologia de destilação fracionada e, a partir desse composto, foi preparado o EBD, utilizando-se algumas reações já conhecidas na literatura (TOMAR, MAHESHWARI, MUKERJEE, 1979a, b), como mostrado a seguir (Figura 11). O EBD foi purificado em coluna cromatográfica *flash* e identificado por métodos através de espectroscópicos (RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , IV e EM).



**Figura 11.** Estruturas químicas: dilapiol (1) e o éter butil dilapiol (2). Fonte: (PINTO, 2008)

#### 4.5 Ensaio citotóxicos

##### 4.5.1 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais e de linhagem RAW 264.7

Para a obtenção de macrófagos peritoneais, foram utilizados dez camundongos BALB/c (*Mus musculus*), que foram anestesiados e injetado meio RPMI incompleto (sem soro fetal bovino) estéril, por via intraperitoneal, e,

posteriormente, recuperado o meio por aspiração. O lavado abdominal foi centrifugado, ressuspendido em 1mL de meio e ajustado por uma leitura em câmara de Neubauer para uma concentração de  $5 \times 10^5$  macrófagos/mL. A seguir, estes foram plaqueados em placa de 96 poços em triplicata e utilizando concentrações seriada de 500 a  $15,62 \mu\text{M}$  do derivado EBD e posteriormente incubada em estufa a  $37^\circ\text{C}$  com 5%  $\text{CO}_2$  por 48 horas.

Dando prosseguimento aos testes com macrófagos da linhagem RAW 264.7 incubados a  $37^\circ\text{C}$ , estas células foram suplementadas com 10% soro fetal bovino - SFB (GIBCONN by life technologie), e acrescentado de 50 U/mL de penicilina e 50  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina (GIBCONN by life technologie). As células foram cultivadas ajustadas para uma concentração de  $10^6$  macrófagos/mL.

A citotoxicidade foi avaliada pelo método de óxido-redução (*Alamar Blue*<sup>®</sup>) segundo NAKAYAMA et al. (1997). Como controle positivo foi utilizado Pentacarinat<sup>®</sup> (500 a  $15,62 \mu\text{M}$ ) e controle negativo somente meio RPMI mais células. Para avaliar a influência do diluente dimetilsulfoxido (DMSO), foi realizado um controle contendo DMSO (0,1%) em células. Após o período de tratamento (48h) e/ou (72h), foi adicionado 10 $\mu\text{L}$  de resazurina 0,4% (diluída 1:20). Após o tempo de metabolização do reagente, foi realizada a leitura da fluorescência em aparelho de espectrofotômetro a 560nm.

#### 4.6 Obtenção e manutenção parasitária.

Foi utilizada a espécie *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/2009/IM5584) mantida e criopreservada em nitrogênio líquido no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, INPA.

Os promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram cultivados em meio *Schneider* 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativo (SFBI), em estufa a 25 °C

#### 4.7 Curva do crescimento das formas promastigotas

Os tubos de ensaios contendo a cultura com meio NNN seguiu o protocolo adaptado de (NOVY e MACNEAL, 1904; NICOLLE, 1908). Os parasitas foram cultivados e observados à presença de promastigotas viáveis no meio de cultivo, a leitura foi feita em microscópio óptico. A seguir, uma alíquota (100 µL) foi repassada para uma garrafa de cultivo com meio *Schneider* e suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBI) e mantidos em estufa a 25 °C. Foi realizado monitoramento diário (0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas) do crescimento dos promastigotas viáveis através de uma contagem em triplicata em câmara de Neubauer.

#### 4.8 Determinação da atividade antileishmania e da concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) nas formas promastigotas.

A atividade antileishmania do derivado EBD foi avaliada pela inibição do crescimento e mortalidade das formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* nos períodos de 24, 48 e 72 horas, a 25 °C.

Para a realização do bioensaio utilizou-se o meio de cultivo *Schneider* suplementado com 10% de SFB. As formas promastigotas foram centrifugadas a 4.400 rpm/15 minutos, seguidamente diluídas e ajustadas em câmara de Neubauer para a concentração de  $2 \times 10^6$  parasitas/mL. Foi realizada, previamente, uma triagem

com concentrações a partir de (21,1 a 1,31  $\mu\text{M}$ ) de forma seriada do EBD, por 24, 48 e 72 horas; em seguida, outra curva foi realizada com concentrações de (4,5 a 0,2812  $\mu\text{M}$ ) nos mesmos tempos. O controle negativo utilizado foi apenas parasita e meio, e o DMSO para avaliar sua influência como diluente das amostras. Como controle positivo, o Pentacarinat<sup>®</sup> nas mesmas concentrações utilizadas acima. Os bioensaios foram em triplicatas e, para a avaliação da inibição parasitária, foi feita por meio do teste dose-resposta (*Alamar Blue*<sup>®</sup>), segundo protocolo adaptado de NAKAYAMA et al. (1997) com a leitura feita em espectrofotômetro.

#### 4.9 Determinação do índice seletivo.

Com o objetivo de determinar a seletividade das concentrações como atividade antileishmania em macrófagos foi determinada através do índice de seletividade (I.S.) dos mesmos, pela seguinte expressão (NAKAMURA et al., 2006):

$$IS = \frac{^1CC_{50} \text{ em macrófagos (concentração citotóxica 50\%)}}{^2CI_{50} \text{ contra promastigotas (concentração inibitória 50\%)}}$$

#### 4.10 Quantificação de óxido nítrico.

A produção de óxido nítrico foi medida pela dosagem de seus produtos em degradação, nitrito, mais estáveis, utilizando o reagente de Griess. Neste método, o nitrito, primeiramente reage com a sulfanilamida, em meio ácido, para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftiletlenodiamina (NED) formando um composto azo mais estável de coloração

púrpura, podendo assim ser quantificado espectrofotometricamente a 560 nm (GREEN et al., 1982). Para a determinação da produção de NO<sup>\*</sup>, foi obtido 50 µL do sobrenadante do cultivo celular (macrófagos peritoneais) na concentração de 10<sup>6</sup> células/mL, tratados com o derivado EBD na concentração 4,5 µM com e sem infecção, 4,5 µM de Pentacarinat<sup>®</sup> (controle positivo) e como controle negativo o parasita mais meio RPMI e DMSO a 0,1%, e um grupo estimulado por LPS (2 µg/mL) nas mesmas, por 24 e 48 horas. Para o preparo deste reagente, foram utilizadas soluções estoques de cloreto de naftiletilenodiamina (0,1%), dissolvido em H<sub>2</sub>O e de sulfanilamida a 1%, dissolvida em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (5%). Após o período de incubação de 10 minutos, as amostras foram lidas em leitor de microplacas (DTX 800, Beckman) a 560 nm.

Após a leitura do sobrenadante biológico em uma nova placa, a placa do teste foi incubada com MTT a 5 mg/mL, a 37 °C, a 5% de CO<sub>2</sub> para avaliar a viabilidade celular através da formação de sais de formazan, conforme protocolo modificado por (SIEUWERTS et al., 1995).

#### 4.11 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio.

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi adaptada de FONSECA-SILVA et al (2011). Foram utilizados macrófagos peritoneais na concentração de 6x10<sup>4</sup> cels/mL (macrófagos peritoneais) com e sem infecção com *L. amazonensis*, tratados e não tratados. O EBD foi utilizado na concentração (4,5 µM), o controle positivo a Pentacarinat<sup>®</sup> (4,5 µM), e os controles negativos (célula infectada mais meio) e DMSO a (0,1%). Usou-se como estimulador o AAPH (2,2-azobis (2-amidinopropano) dicloridrato) na concentração de 600 µM. O ensaio foi

realizado em triplicata e acompanhado nos tempos de 1, 3, 6 e 24 horas. Foi descartado o sobrenadante desse ensaio e, em seguida, foi adicionado o H<sub>2</sub>DCFDA (2'7' diacetato de diclorodiidrofluoresceína) (Invitrogen, Eugene, USA) na concentração final de 20 µM por amostra. As análises foram realizadas com excitação a 485nm e emissão a 530nm em espectrofotômetro.

#### 4.12 Determinação do índice de infectividade em macrófagos peritoneais infectados com *L. (L.) amazonensis*.

Os macrófagos peritoneais foram ajustados para uma concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL e mantidos em placas de bioensaio com 24 poços onde foram adicionados às lamínulas de vidro estéril, permanecendo em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, por 24 horas. As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram adicionadas aos macrófagos na proporção de 5:1 (promastigotas /macrófago) e incubados com o EBD, Pentacarinat<sup>®</sup> e o dilapiol na concentração de 4,5 µM, e acondicionado em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, por um período de 24h e 48h, seguindo o protocolo adaptado por MACEDO (2015).

Ao final do ensaio, as lamínulas foram coradas por kit panótico e observadas em microscópio óptico (1000x). A infectividade foi determinada pela contagem de 100 macrófagos/poço. Avaliou-se o número de macrófagos infectados e não infectados, tratados e não tratados. Foi utilizado como controle, macrófagos não tratados (infectados) e o DMSO a 0,1%, como controle diluidor das amostras (EBD e do dilapiol).

#### 4.13 Modelagem espacial molecular.

O procedimento da modelagem molecular foi realizado com a estrutura cristalográfica, utilizando proteínas de origem do parasita (*Leishmania*), disponível no banco de dados “Protein Data Bank” (PDB) [código: ID PDB 5g1z, 5ebk, 1lml], com resolução de 2,7Å. (ORLANDO & MALKOWSKI, 2016). As estruturas tridimensionais (3D) dos ligantes dilapiol e éter butil dilapiol foram obtidas a partir da estrutura 2D, com posterior conversão em 3D, utilizando software Chem 3D 15.0 (PERKIN ELMER, 2016).

A otimização geométrica de todos os ligantes foi feita através do método semi-empírico PM7 (STEWART, 2013), disponível no software MOPAC2016 (STEWART, 2016). A preparação do receptor e dos ligantes foi alcançada através do software Autodock tools (MORRIS et al., 2009), sendo o grid box definido em relação ao sítio ativo ocupado pelo ligante (U53 e KDS). O procedimento de ancoragem foi realizado através do software Autodock Vina (TROTT & OLSON, 2010). Os resultados foram processados através do software Discovery Studio (DISCOVERY STUDIO VISUALIZER, 2016). A análise foi realizada com a colaboração de Rodrigo Otávio Silva de Souza.

#### 4.14 Análises estatísticas

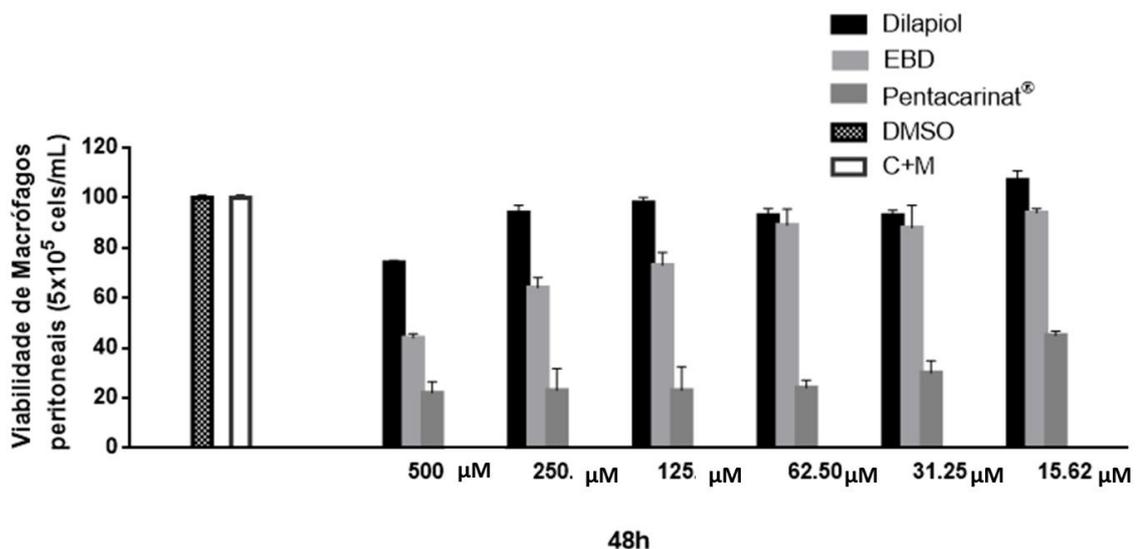
Os valores de  $CI_{50}$  e  $CC_{50}$  foram obtidos através de uma regressão não-linear por análise de inibição, e as diferenças estatísticas entre as concentrações e os controles foram analisados por ANOVA (two-way) para múltiplas comparações,

seguida do teste de Bonferroni's com 95% de confiança. As análises foram realizadas no programa GraphPad Prism 6.0.

## 5. RESULTADOS

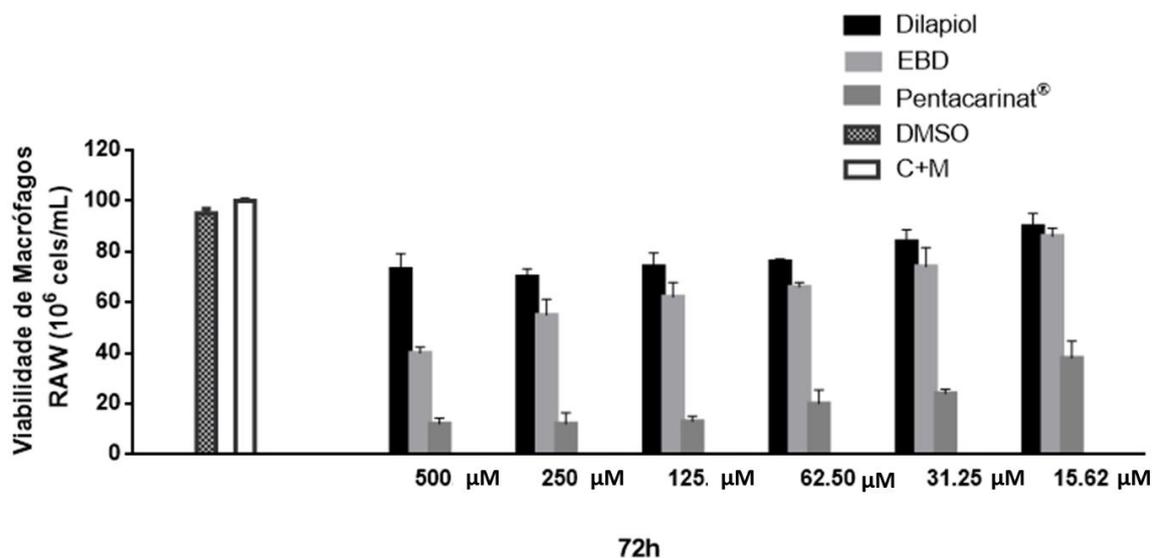
### 5.1 Avaliação da atividade citotóxica do éter butil dilapiol (EBD) em células primária e secundária.

Neste estudo, analisou-se a viabilidade celular em relação à ação das substâncias no decorrer do tempo. Observou-se que o EBD obteve uma concentração citotóxica de 50% ( $CC_{50}$ ) de  $413,3 \pm 3,1 \mu\text{M}$ , enquanto que o Pentacarinat<sup>®</sup> foi de  $15,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$  demonstrando que o EBD foi menos tóxico (26,5 vezes) do que o Pentacarinat<sup>®</sup>. Com relação ao dilapiol, não foi possível obter o  $CC_{50}$ , uma vez que o mesmo não foi tóxico às células na concentração máxima de  $500 \mu\text{M}$  e mínima de  $15,62 \mu\text{M}$  por 48h (conforme figura 12).



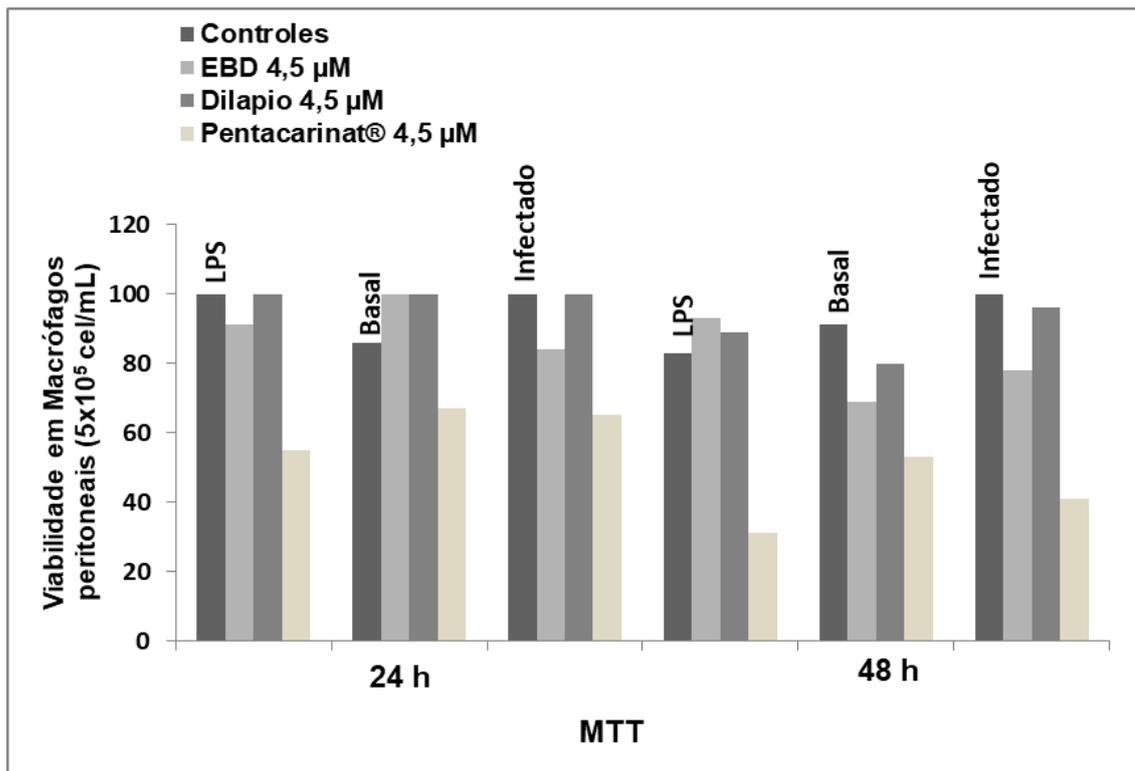
**Figura 12.** Efeito das substâncias: Pentacarinat<sup>®</sup>, EBD e Dilapiol utilizando concentrações seriadas de 500 a 15,62 μM por 48 horas. A concentração citotóxica 50% obtidas pelas médias de ( $CC_{50} \pm DP$ ) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foi obtida através de uma regressão não-linear utilizando o programa Graphpad prisma 6<sup>®</sup>.

Na figura 13, é observada a viabilidade celular de macrófagos de linhagem secundária quando expostos ao EBD, Pentacarinat<sup>®</sup> (controle positivo) e dilapiol, utilizando concentrações seriadas de 500 a 15,62  $\mu\text{M}$ , DMSO (0,1%), e macrófagos e meio RPMI como controle negativo. Demonstrou-se que o EBD obteve uma concentração citotóxica de 50% ( $\text{CC}_{50}$ ) de  $373,5 \pm 41,7 \mu\text{M}$  em macrófagos RAW 264.7, enquanto que a Pentacarinat<sup>®</sup> foi de  $14,4 \pm 7,7 \mu\text{M}$ , demonstrando que o EBD apresenta uma segurança de 25,9 vezes maior do que o fármaco padrão em relação ao tempo. Não foi possível obter o  $\text{CC}_{50}$  dilapiol devido à substância não ter matado 50% das células, pois o teste foi incubado e exposto a essas substâncias por 72 h, permitindo assim, uma melhor avaliação toxicológica em tempos mais longos.



**Figura 13.** Efeito das substâncias: Pentacarinat<sup>®</sup>, EBD, Dilapiol, utilizando concentrações seriadas de 500 a 15,62  $\mu\text{M}$  por 72 horas. A concentração citotóxica 50% e médias ( $\text{CC}_{50} \pm \text{DP}$ ) em macrófagos 264.7 foi obtida por regressão não-linear utilizando o programa Graphpad prisma 6<sup>®</sup>.

A figura abaixo mostra que o LPS utilizado a 2  $\mu\text{g/mL}$  não demonstrou toxicidade quando incubado com os macrófagos peritoneais BALB/c, por 24 e 48 horas. Esses resultados foram obtidos após realização da mensuração do óxido nítrico pelo teste de oxi-redução MTT.

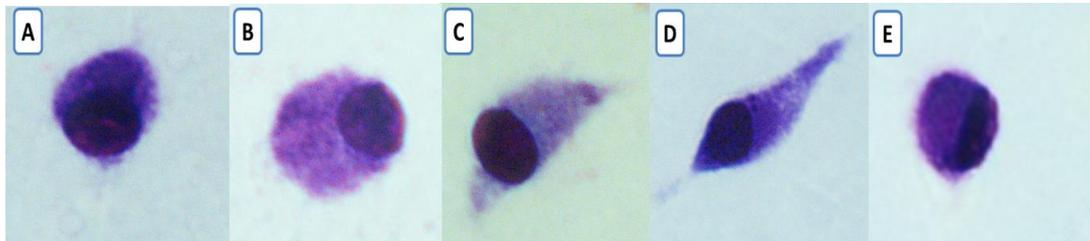


**Figura 14.** Viabilidade em Macrófagos peritoneais BALB/c quando expostos ao LPS (2  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24 e 48 horas de incubação utilizando o método MTT Brometo de (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio) e as substâncias (EBD, Pentacarinat® e o dilapio) na concentração de 4,5  $\mu\text{M}$ .

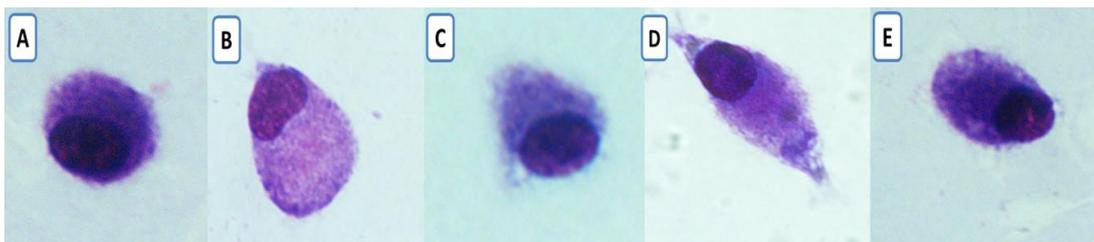
## 5.2 Avaliação morfológica da viabilidade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c sob efeito do éter butil dilapio.

As figuras 15 e 16 demonstram que os macrófagos peritoneais de camundongos, quando expostos às substâncias (EBD, Pentacarinat® e dilpaiol), apresentaram núcleo, citoplasma e membranas das células preservadas, indicando

que não houve alteração na morfologia celular na concentração utilizada de 4,5  $\mu\text{M}$ , por 24 e 48 horas.



**Figura 15.** Morfológica de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, quando expostos aos efeitos das substâncias na concentração (4,5 $\mu\text{M}$ ); (A) Dilapiol; (B) EBD; (C) Pentacarinat<sup>®</sup>, (D) DMSO, (E) Macrófagos e meio por 24 h.

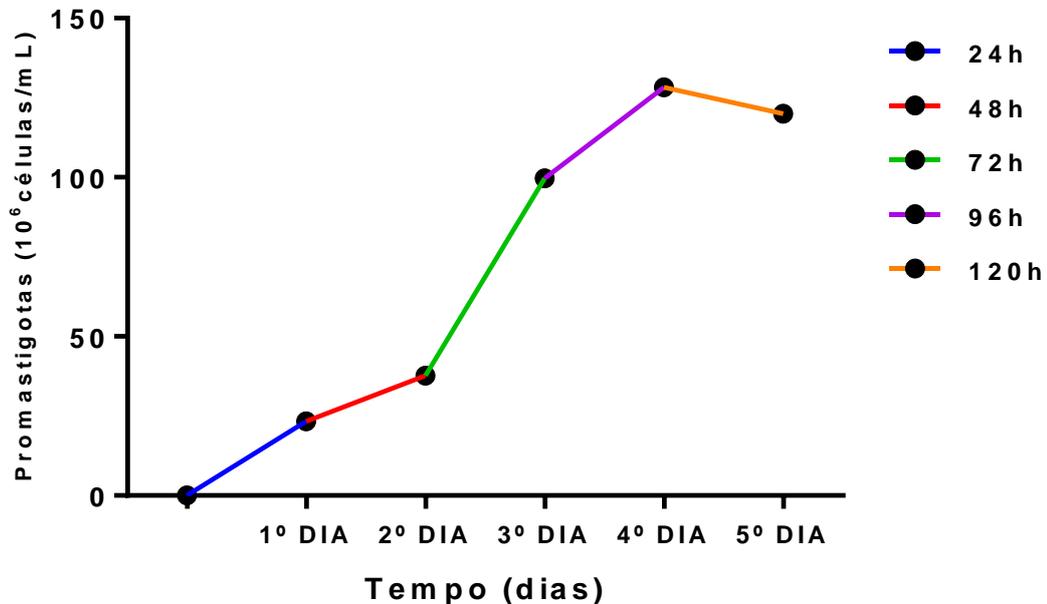


**Figura 16.** Morfologia de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, quando expostos aos efeitos das substâncias na concentração de (4,5 $\mu\text{M}$ ): (A) Dilapiol; (B) EBD; (C) Pentacarinat<sup>®</sup>, (D) DMSO, (E) Macrófagos e meio por 48 h.

### 5.3 Curva do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/2009/IM5584).

A curva do crescimento parasitário da forma promastigota de *L. (L.) amazonensis* foi determinada pela fase exponencial e a fase estacionária, em que a fase exponencial ocorreu do 1<sup>o</sup> ao 3<sup>o</sup> dia de cultivo, e a fase estacionária foi obtida no 4<sup>o</sup> dia. No 5<sup>o</sup> dia, observou-se um decrescimento parasitário. A determinação da

fase estacionária é importante para a obtenção de maior número de promastigotas infectivos (CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998).

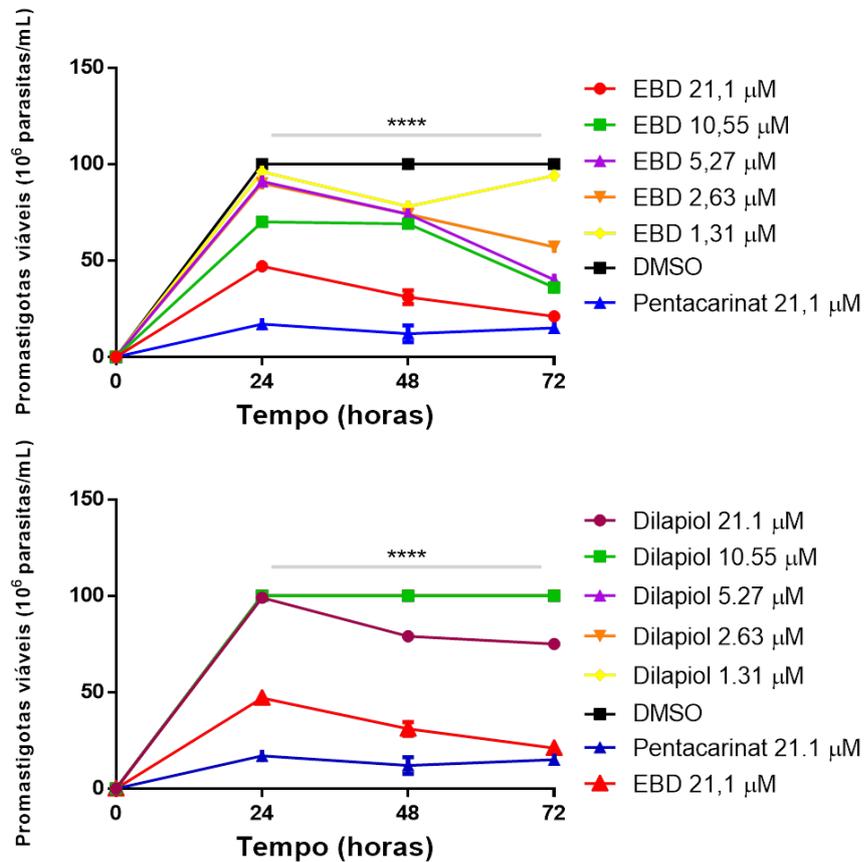


**Figura 17.** Curva do crescimento de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/2009/IM5584) em meio Schneider com 10% SFB, acompanhada durante cinco dias contínuos.

#### 5.4 Avaliação preliminar da atividade do EBD contra as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.

Os resultados obtidos do EBD contra *L. (L.) amazonenses*, nas diferentes concentrações (21,1 a 1,31), por meio de uma triagem, estão apresentadas na figura 18. Observou-se que na maior concentração (21,1  $\mu$ M) demonstrou-se uma redução na concentração dos parasitas viáveis às formas promastigotas e, com isso, apresentando diferença estatística ( $P < 0,0001$ ), em relação ao controle

negativo (DMSO) do dilapiol, e as outras menores concentrações do EBD, por 24, 48 e 72 horas.



**Figura 18.** Avaliação preliminar do EBD (1) e dilapiol (2) contra as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* – quantificação as formas viáveis dos parasitas em (24, 48 e 72 horas). (\*\*\*\*P<0,0001)= significativo nas demais concentrações do EBD, controle negativo e dilapiol. Os resultados foram obtidos através da análise por ANOVA (two-way) e Bonferroni's com 95% de confiança através do programa GraphPad prisma 6®.

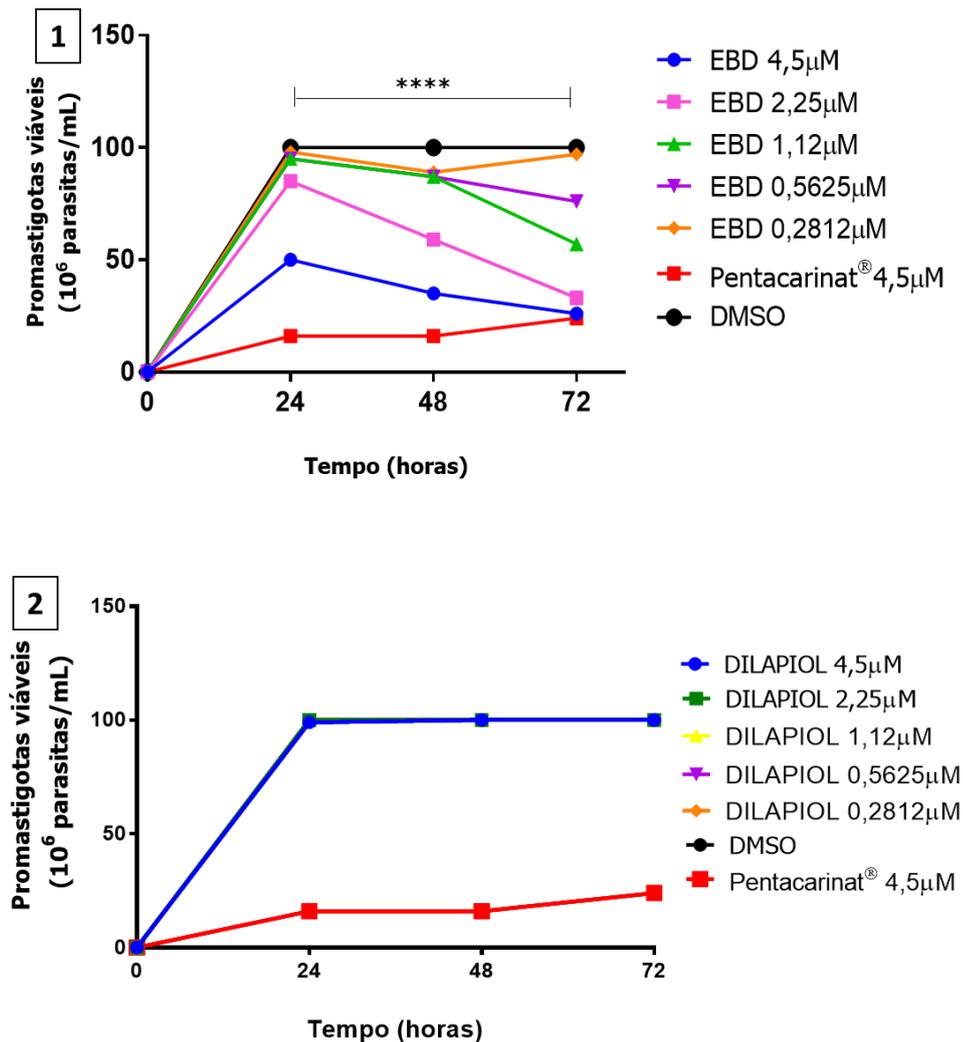
A tabela 3 demonstra os valores dos  $CI_{50}$  das substâncias obtidas através da exposição dos promastigotas as substâncias em relação ao tempo. Observou-se que o EBD apresentou uma eficácia igual ao fármaco padrão no tempo de 72 horas. Enquanto ao dilapiol não foi possível obter o  $CI_{50}$  devido o composto não conseguir inibir 50 % às formas promastigotas.

**Tabela 3.** Obtenção preliminar do  $CI_{50}$  do EBD, Pentacarinat<sup>®</sup> e do dilapiol em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em 24, 48 e 72 horas.

$CI_{50}$	24h $\mu M$	48h $\mu M$	72h $\mu M$
Dilapiol	>21,1	>21,1	ND
EBD	10,9	8,5	4,4
Pentacarinat <sup>®</sup>	3,2	2,8	3,1

### 5.5 Avaliação da atividade do EBD contra as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.

Os resultados obtidos da atividade do EBD contra *L. (L.) amazonensis* nas diferentes concentrações estão apresentados na figura 19. Neste estudo, observou-se que na maior concentração obtida a partir de uma  $CI_{50}$  de 4,5  $\mu M$  apresentou maior atividade na redução da concentração dos parasitas as formas promastigotas. Nesta mesma concentração, foram observadas diferenças estatísticas quanto às concentrações de parasitas viáveis na presença do EBD em relação ao controle negativo ( $P < 0,0001$ ), em 24, 48 e 72 horas, assim como às demais concentrações testadas e o dilapiol.



**Figura 19.** Avaliação da atividade do EBD (1) e dilapiol (2) contra formas de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* – quantificação as formas viáveis dos parasitas em (24, 48 e 72 horas). (\*\*\*\*  $P < 0,0001$ ) = significativo em relação as demais concentrações do EBD, controle negativo e dilapiol. Os resultados foram obtidos através da análise por ANOVA (two-way) e Bonferroni's com 95% de confiança através do programa GraphPad prisma 6<sup>®</sup>.

A tabela 4 demonstra os valores dos  $CI_{50}$  e os intervalos de confiança das substâncias obtidas através da exposição dos promastigotas diante das substâncias em relação ao tempo. Observou-se que o EBD apresentou uma eficácia igual ao fármaco padrão no tempo de 72 horas. Enquanto ao dilapiol não foi possível obter o  $CI_{50}$  devido o composto não ter conseguido inibir 50 % às formas promastigotas.

**Tabela 4.** Obtenção do  $CI_{50}$  do EBD, Pentacarinat<sup>®</sup> e do dilapiol em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* em 24, 48 e 72 horas.

$CI_{50}$ - $\mu M$	24h	48h	72h
Pentacarinat <sup>®</sup>	5,4 (3,6-8,0)	1,8 (1,0-2,6)	2,2 (0,001-4,5)
EBD	10,0 (7,2-14)	5,6 (2,2-8,9)	1,6 (0,8-3,3)
DILAPIOL	ND	ND	ND

ND= Não determinado

### 5.6 Atividade antileishmania através do índice de seletividade.

Neste estudo, o índice seletivo (IS) foi obtido através de uma razão entre a concentração citotóxica 50% ( $CC_{50}$ ) em macrófagos peritoneais, dividido pela concentração inibitória 50% ( $CI_{50}$ ) parasitária às formas promastigotas, durante 48 horas de incubação. Os resultados estão dispostos na Tabela 5. Observou-se que durante 48 horas foi obtido um índice de seletividade do EBD de 76,5  $\mu M$  e Pentacarinat<sup>®</sup> de 8,7  $\mu M$ , usando uma concentração de 4,5  $\mu M$  das substâncias, determinando que o EBD foi menos tóxico para as células 8,8 vezes do que o fármaco padrão (Pentacarinat<sup>®</sup>). Em relação ao dilapiol, não foi possível obter o IS devido a não obtenção do  $CI_{50}$  as formas promastigotas e em  $CC_{50}$  em macrófagos.

**Tabela 5.** Valores de  $CI_{50}$  em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e  $CC_{50}$  para macrófagos peritoneais e seus respectivos índices de seletividade (IS) por 48 horas

	Promastigotas $CI_{50}$	Macrófagos peritoneais $CC_{50}$	Índice Seletividade
Dilapiol	ND	ND	ND
EBD	5,4 $\mu M$	413,3 $\mu M$	76,5
Pentacarinat <sup>®</sup>	1,8 $\mu M$	15,6 $\mu M$	8,7

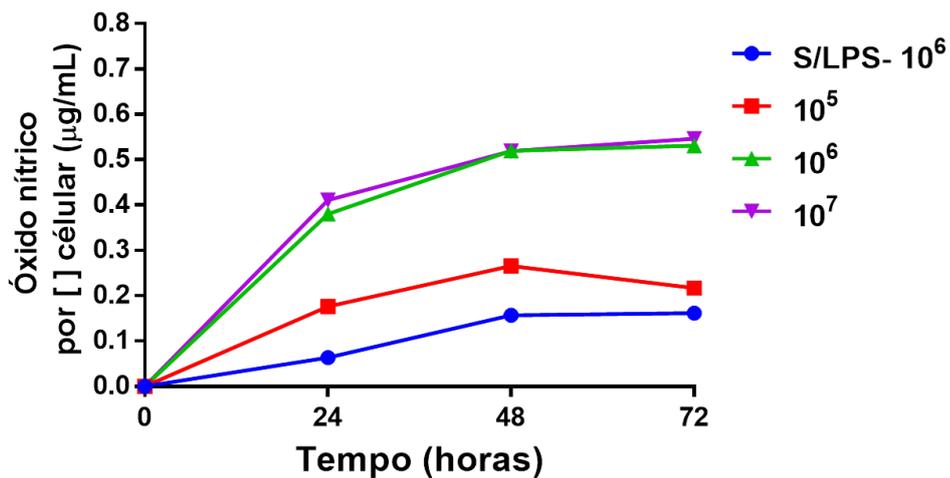
$CI_{50}$ = Concentração capaz de inibir em 50% o número de promastigotas em cultura.

$CC_{50}$ = Concentração citotóxica para 50% do tapete celular.

IS=  $CC_{50}$  Macrófagos peritoneais /  $CI_{50}$  promastigotas / ND= Não determinado

### 5.7 Padronização do óxido nítrico por concentração celular.

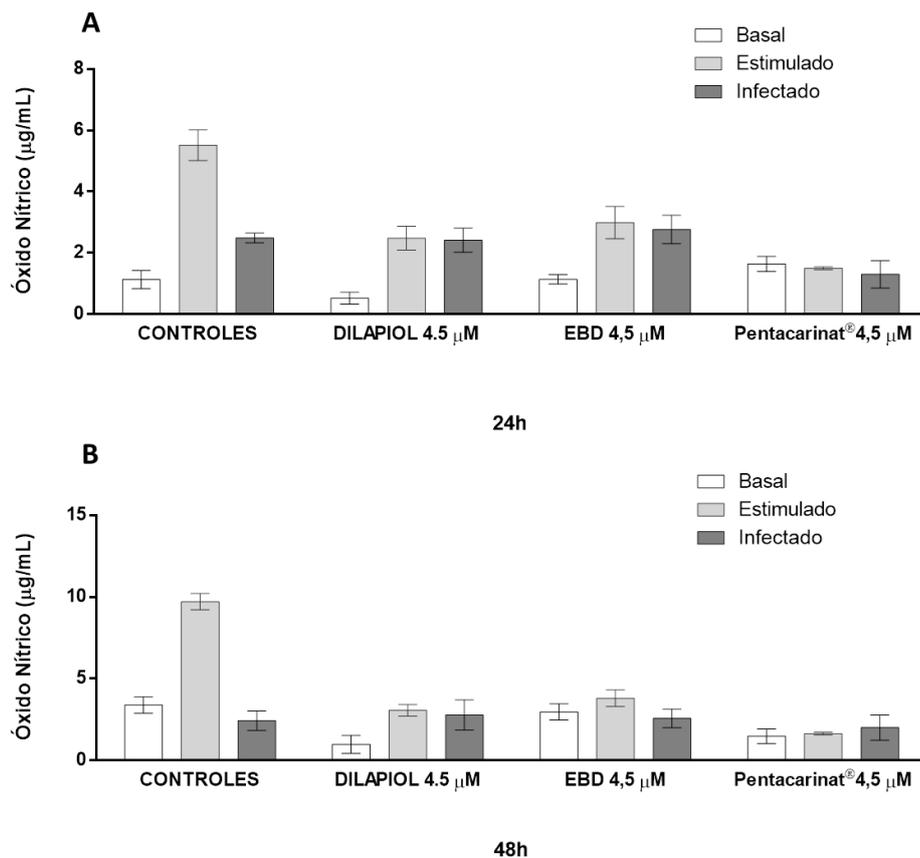
Observou-se que os macrófagos peritoneais basais na concentração de  $10^6$  células/mL produziu baixos níveis de óxido nítrico, porém quando os macrófagos foram estimulados por LPS nas concentrações de ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ) demonstrou-se uma produção elevada dos níveis de NO em relação ao tempo e da concentração celular. E por meio dos dados obtidos foi possível selecionar uma concentração celular mais adequada para o estudo ( $10^6$ ) células/mL.



**Figura 20.** Padronização da produção do óxido nítrico através da concentração de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c por 24, 48 e 72 horas, nas concentrações de ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ) estimulados e não estimulados por LPS a 2 µg/mL.

### 5.8 Mensuração da produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

A figura 21 demonstra valores variáveis da produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, quando foram expostos às substâncias (EBD, dilapiol e Pentacarinat<sup>®</sup>) na concentração de 4,5 µM, por 24 h e 48 h. Observou-se que o EBD não estimulou a produção de óxido nítrico em células do grupo basal, assim como as outras substâncias utilizadas no experimento, quando comparamos com o grupo controle basal (sem tratamento). Foi observado que o grupo infectado com *L. (L.) amazonensis* e tratado não produziu óxido nítrico em macrófagos peritoneais BALB/c de forma significativa por 24 e 48 horas e tratados, quando comparamos com o grupo infectado, sem tratamento. Outra observação foi que o grupo estimulado com LPS e tratado com as substâncias inibiu a produção de óxido nítrico em todos os tempos quando comparamos com o grupo controle estimulado com LPS e sem tratamento.



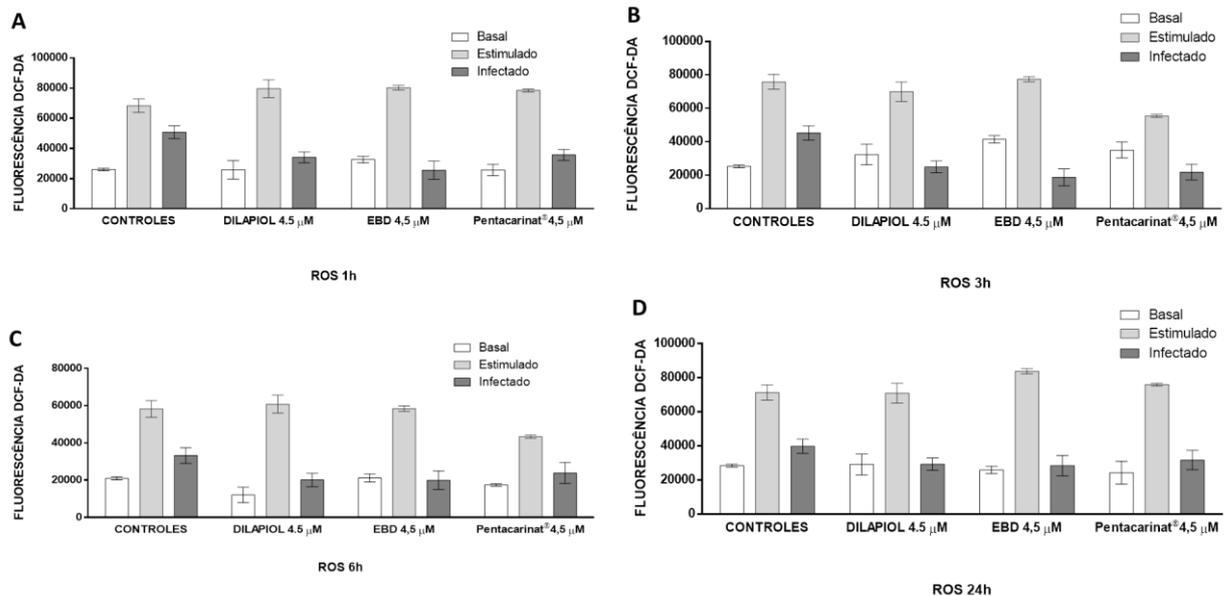
**Figura 21.** Mensuração da produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* durante 24 e 48 horas e expostos às substâncias (EBD, Pentacarinat® e dilapiol) na concentração de 4,5 µM.

Os resultados foram obtidos através da análise por ANOVA (two-way) e Bonferroni's com 95% de confiança através do programa GraphPad prisma 6®.

### 5.9 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

A figura 22 mostra que as substâncias (EBD, Pentacarinat® e o dilapiol) na concentração de 4,5 µM demonstraram uma produção relativa das EROs, nos tempos de 1h e 3 h de incubação dos grupos, utilizando macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, mas sem diferença significativa. E, quando comparamos o grupo controle basal com o grupo basal tratado, observou-se que não houve

estimulação de EROs em todos os tempos. Quanto aos outros grupos tratados com as substâncias, observamos uma normalidade biológica na quantificação das EROs, em todos os tempos. Não se obteve valores significativos.

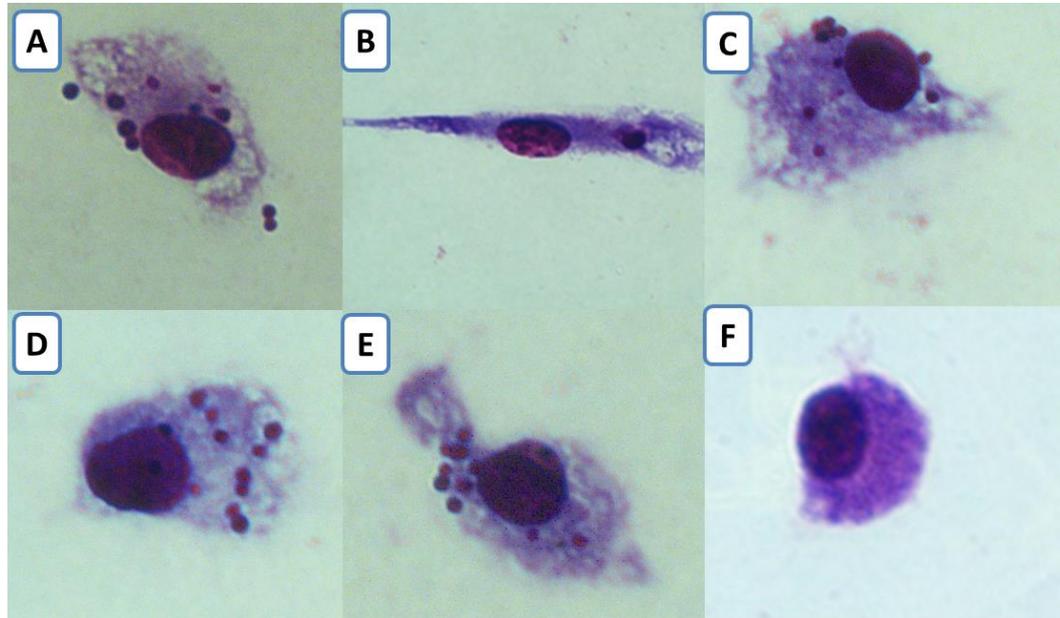


**Figura 22.** Quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c na forma basal, estimulado e infectado durante as primeiras 24 h e expostos as substâncias (EBD, Pentacarinat<sup>®</sup> e dilapiol) na concentração de 4,5 µM. Resultados demonstrados nas figuras de A (1h); B (3h); C (6h) e D (24h). As CI<sub>50</sub> foram obtidas por média ± DPM (desvio padrão médio) através do programa GraphPad prisma 6<sup>®</sup>.

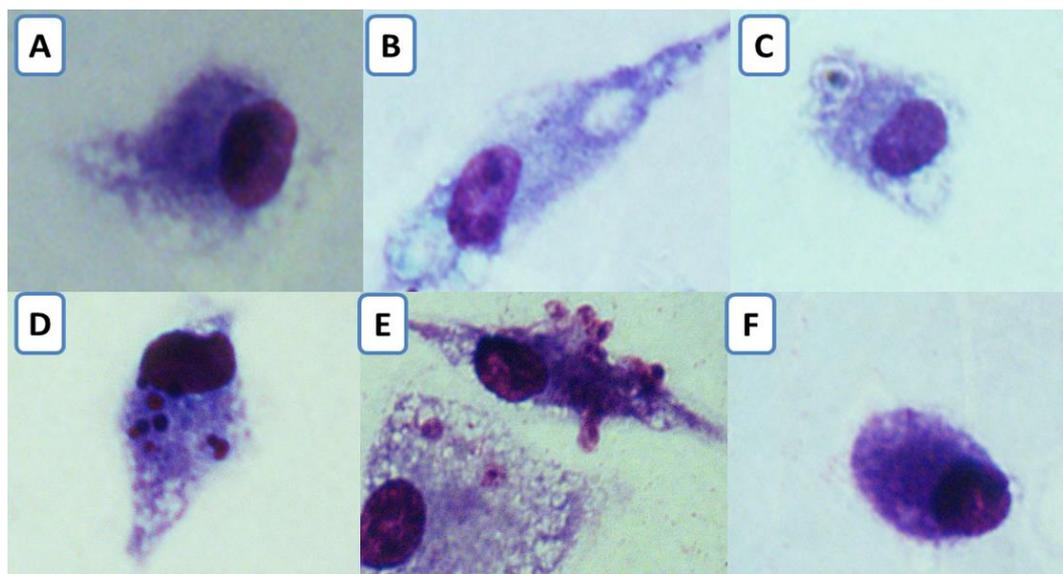
### 5.10 Avaliação da taxa de infecção por *Leishmania (L.) amazonensis* em macrófagos peritoneais expostos ao EBD.

As figuras 23 e 24 mostram a eficácia das substâncias (EBD, Pentacarinat<sup>®</sup> e dilapiol) na concentração de 4,5 µM, quando em contato com os macrófagos peritoneais infectados em relação ao tempo. Observou-se a eficácia do derivado EBD durante 24 h, o qual apresentou uma inibição às formas amastigotas apresentando vários vacúolos, e por 48 horas houve uma maior quantidade de células não infectadas quando comparadas com o grupo controle negativo

promastigotas mais macrófagos (P+M), demonstrando que o EBD tem um grande potencial antileishmania às formas intracelulares durante 24 e 48 horas.

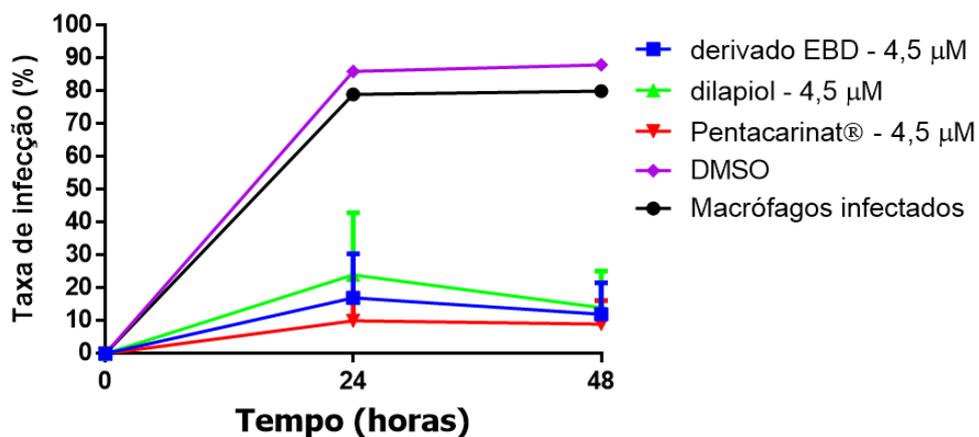


**Figura 23.** Efeito da atividade das substâncias utilizadas na concentração de (4,5  $\mu$ M) contra a forma amastigota de *Leishmania (L.) amazonensis* em macrófagos peritoneais durante 24 h. (A) Dilapiol, (B) EBD, (C) Pentacarinat<sup>®</sup>, (D) Macrófagos infectados, (E) DMSO, (F) Macrófagos não infectado. 1000X.



**Figura 24.** Efeito da atividade das substâncias utilizadas na concentração de (4,5  $\mu$ M) contra a forma amastigota de *Leishmania (L.) amazonensis* em macrófagos peritoneais por 48 h. (A) Dilapiol, (B) EBD, (C) Pentacarinat<sup>®</sup>, (D) Macrófagos infectados, (E) DMSO, (F) Macrófagos não infectado. 1000X.

Neste estudo, o gráfico 25 demonstra a taxa de infecção por *L. amazonensis* mediante o tratamento com o EBD na concentração, Pentacarinat<sup>®</sup> e dilapiol a 4,5  $\mu$ M. Observou-se que o controle negativo (DMSO) apresentou-se com uma porcentagem de infecção em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c próximo a 100% e, a partir desse dado, foi determinada a taxa de infecção através das médias de células infectadas e tratadas com os fármacos por 24 e 48 horas. Observou-se que o EBD demonstrou-se muito promissor ao inibir as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* em relação ao tempo quando comparado com a Pentacarinat<sup>®</sup>.



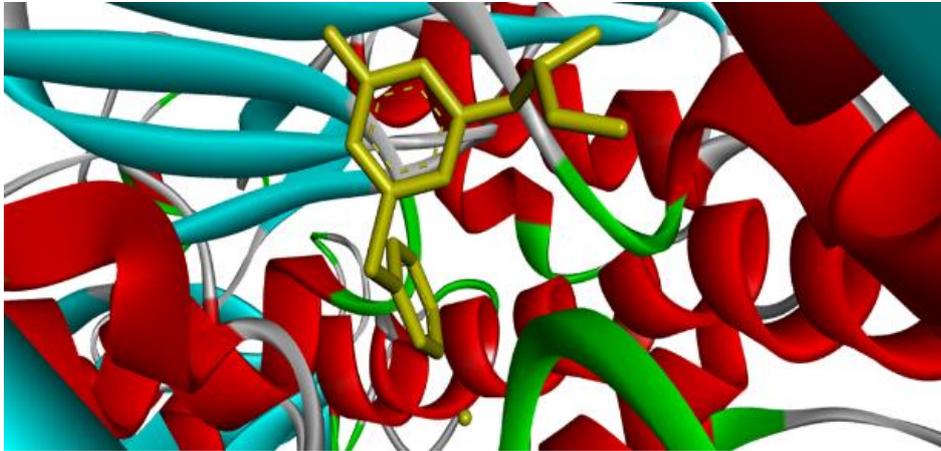
**Figura 25.** Avaliação da taxa de infecção do EBD, do dilapiol e Pentacarinat<sup>®</sup> (4,5  $\mu$ M) contra as formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* por 24 e 48 horas. Os resultados foram obtidos através da análise por ANOVA (two-way) e Bonferroni's com 95% de confiança, através do programa GraphPad prisma 6<sup>®</sup>. As porcentagens foram calculadas pelas porcentagens das médias - % CN (porcentagem do valor do controle negativo).

### 5.11 Simulações de inibição enzimáticas por docagem molecular.

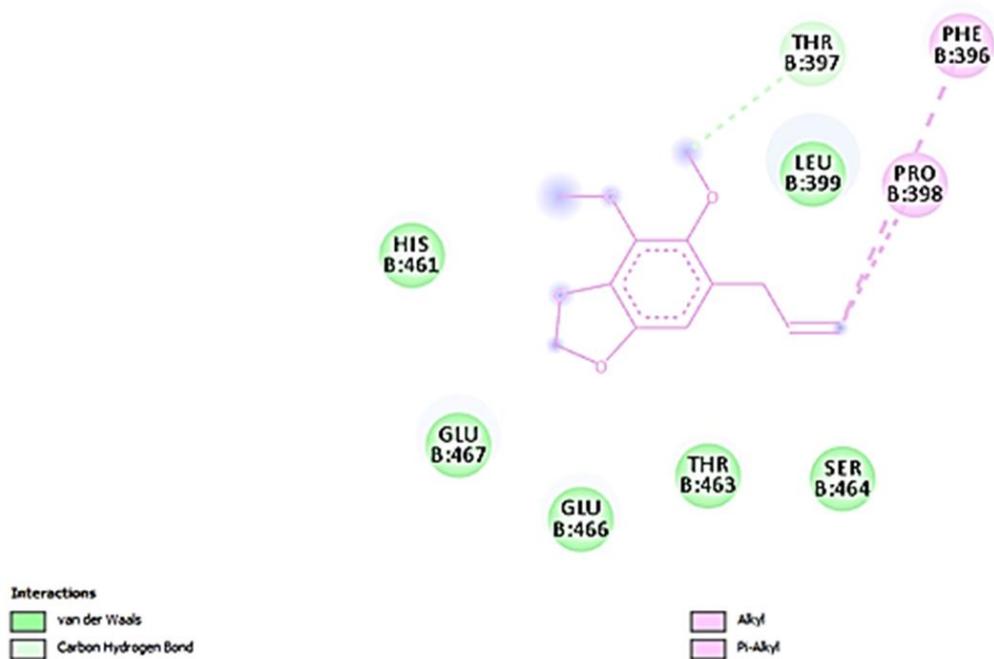
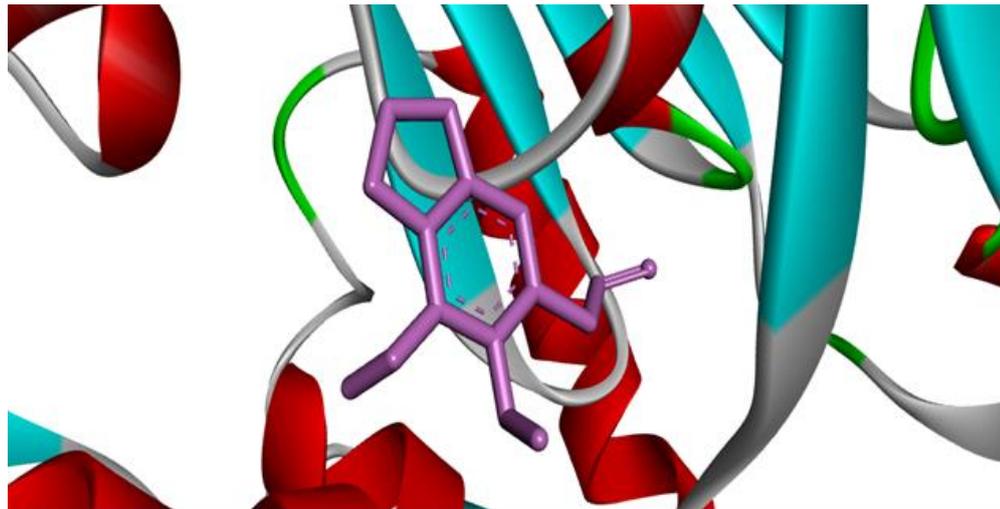
Os resultados obtidos através da ancoragem molecular vêm demonstrando uma boa concordância com os resultados experimentais e tem sido utilizado para compreender os mecanismos observados em nossos testes *in vitro* quanto à atividade antileishmania, através do derivado éter butil dilapiol. Realizou-se teste *in silico* em duas enzimas: Tripanotiona redutase (ID PDB 5ebk) e N-miristoil transferase (ID PDB 5g1z). Dentre as proteínas testadas, o derivado éter butil dilapiol apresentou maior afinidade pelo sítio ativo da enzima N-miristoil transferase, em que a energia de ligação foi -7,8; valor muito próximo ao do inibidor padrão U53. Quando comparamos com a energia de ligação do dilapiol frente ao do derivado, observou-se que o valor apresentado pelo último foi superior ao seu composto de origem.

Observou-se também que as substâncias (EBD e Dilapiol) não apresentaram uma boa interação de energia de ligação (-5,2 e -4,8), respectivamente, quando comparados com a energia de ligação do inibidor padrão RDS (-6,0), além de não apresentarem ligação de ponte de hidrogênio.

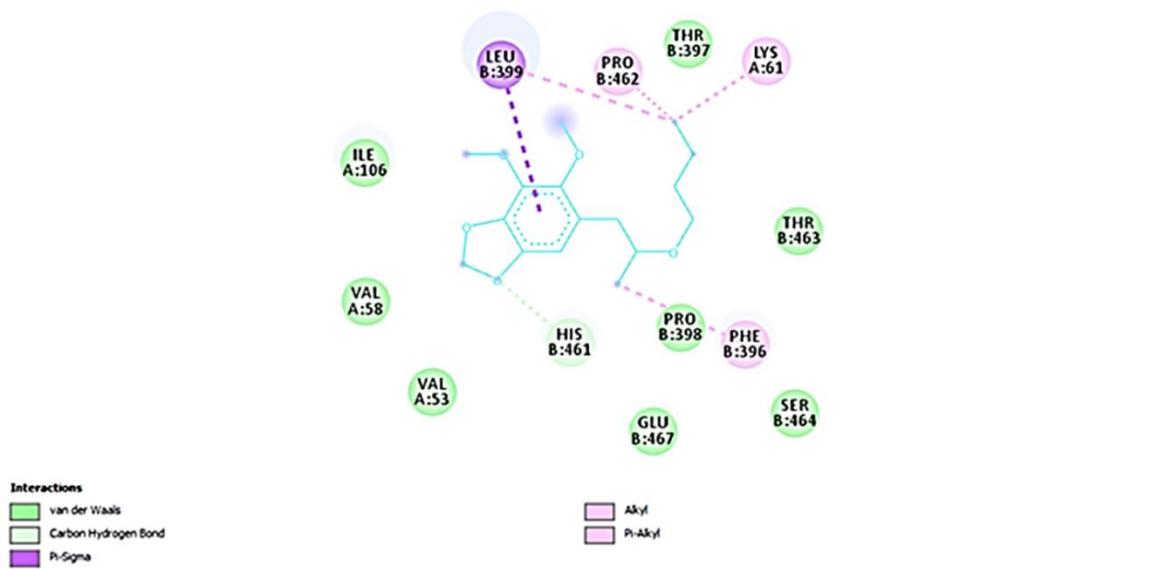
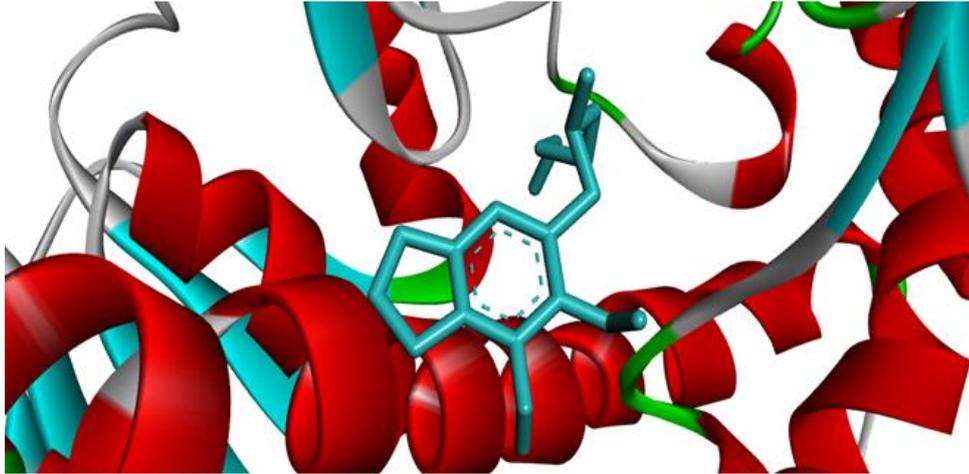
### 5.11.1 Tripanodiona redutase



**Figura 26.** Conformação padrão da Tripanodiona redutase: Inibidor padrão RDS (Energia de ligação -6,0)

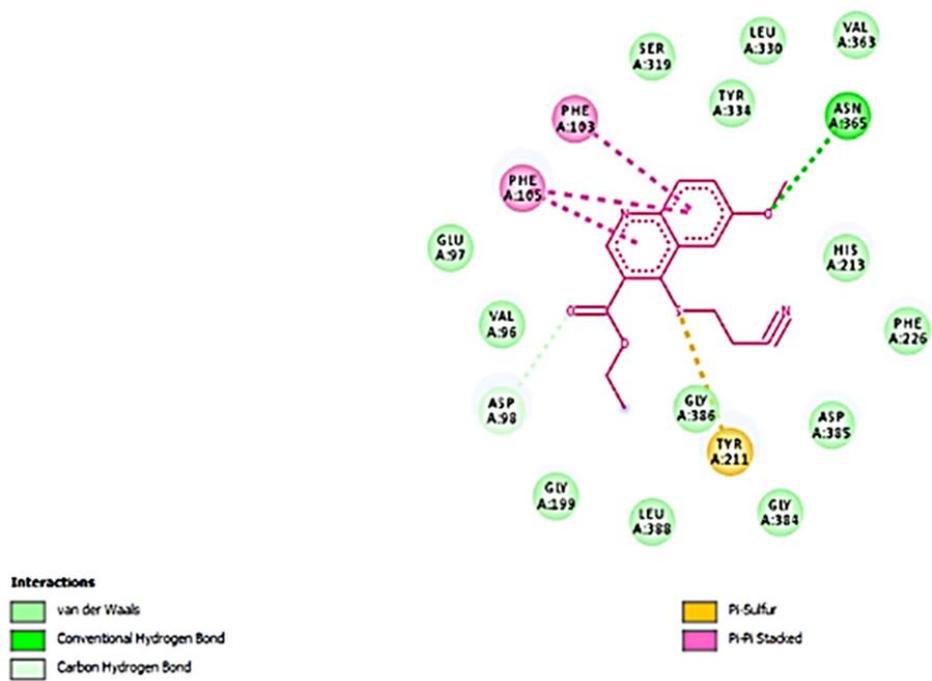
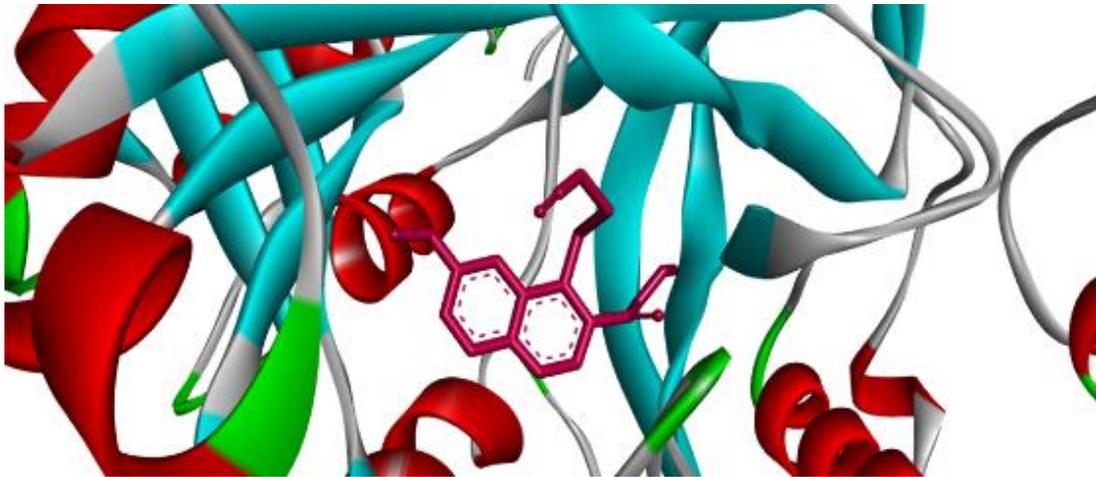


**Figura 27.** Interação do dilapiol com o sítio da ação da enzima Tripanotona reductase  
 Pose do dilapiol no sítio da ação da enzima Tripanotona reductase ID PDB 5ebk (Energia de ligação -4,8).

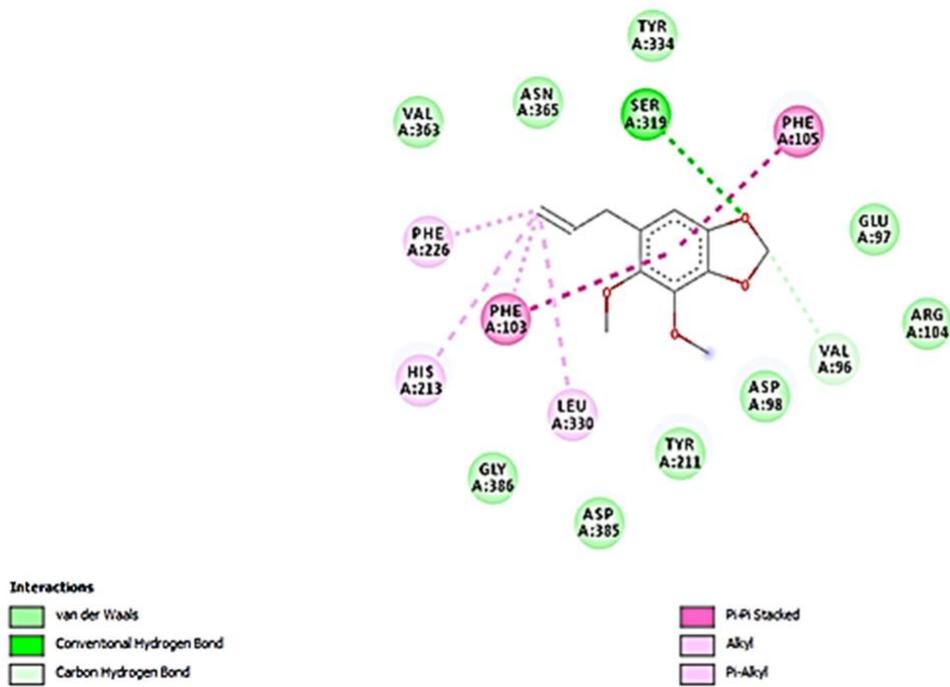
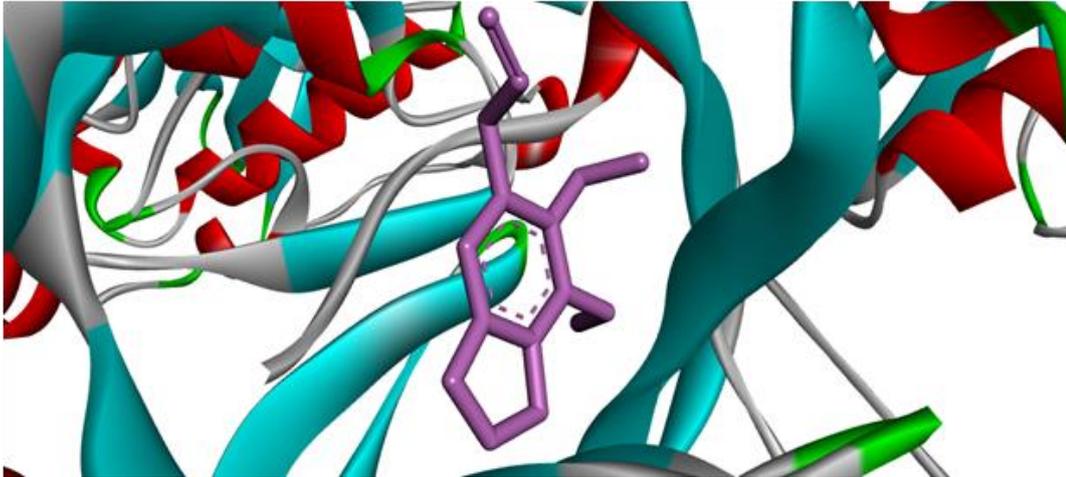


**Figura 28.** Interação do Éter butil dilapiol com o sítio da ação da enzima Tripanotona reductase  
 Pose do éter butil dilapiol no sítio da ação da enzima Tripanotona reductase ID PDB 5ebk (Energia de ligação -5,2)

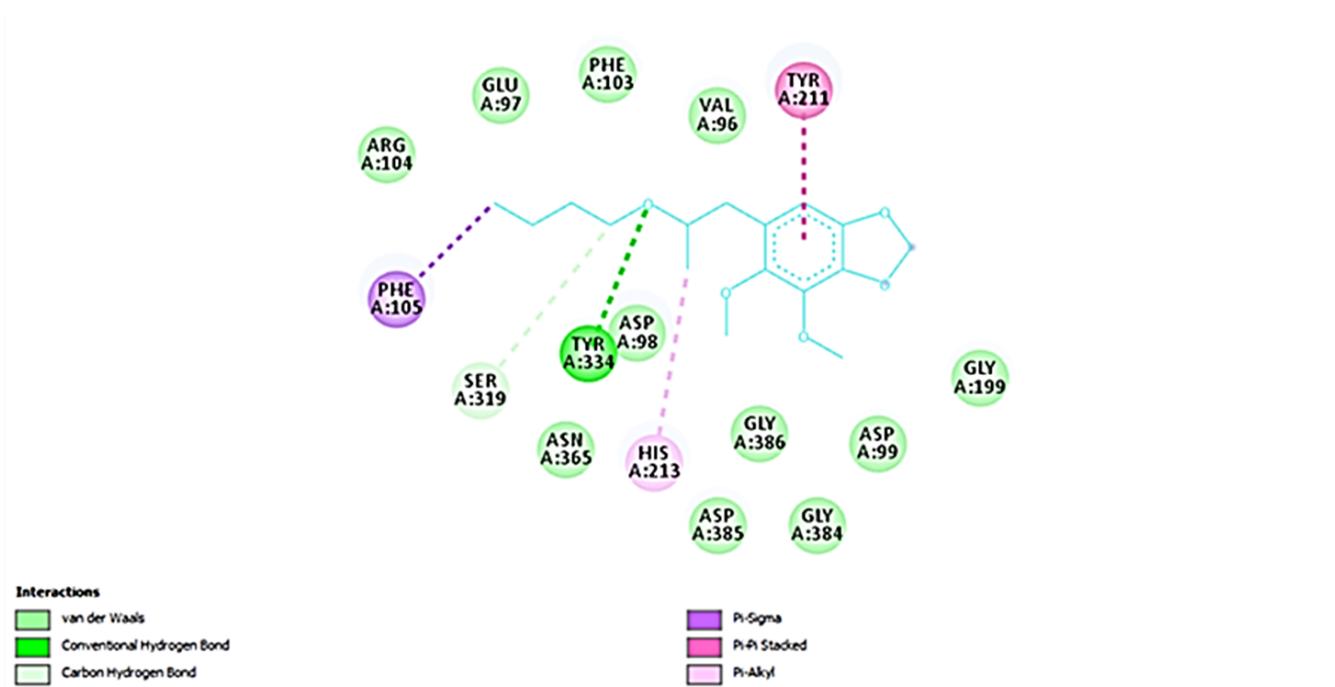
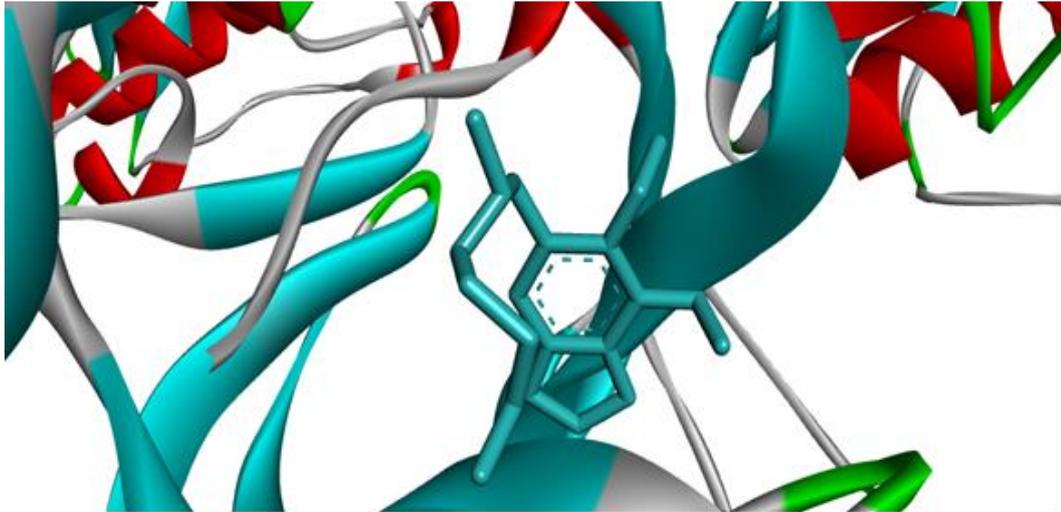
## 5.11.2 N-miristoil transferase



**Figura 29.** N-miristoil transferase: Inibidor padrão U53 (Energia de ligação -8,2)



**Figura 30.** Interações do dilapiol com o sítio da ação da enzima N-miristoil transferase  
 Pose do dilapiol no sítio da ação da enzima miristoil transferase ID PDB 5g1z (Energia de ligação -6,8)



**Figura 31.** Interações do Éter butil dilapiol com o sítio da ação da enzima N-miristoil transferase  
 Pose do Eter butil dilapiol no sítio da ação da enzima miristoil transferase ID PDB 5g1z (energia de ligação -7,8)

## 6 DISCUSSÃO

Na busca para desenvolver novos fármacos mais seguros, baratos e eficazes para o tratamento da leishmaniose, uma das alternativas são bioativos extraídos de plantas medicinais, e através de técnicas inovadoras com a capacidade de obter isolados potencialmente ativos (CARVALHO; FERREIRA, 2001). Sabe-se que o arsenal terapêutico para o tratamento das leishmanioses é limitado, invasivo e apresenta vários efeitos colaterais graves (VAN GRIENSVEN et al. 2010).

Neste estudo, foram utilizados diferentes linhagens de macrófagos, no intuito de avaliar a capacidade citotóxica das substâncias, quando expostas às células de diferentes graus de proliferação bem como os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, que se constituem de uma grande população de células residentes, sendo que a metade são fagócitos mononucleares imaturos, e possuem semelhanças muito próximas aos macrófagos humanos (COHN, 1968).

FARAH et al. (2010) demonstraram uma viabilidade elevada em macrófagos quando expostos ao dilapiol e o seu análogo isodilapiol, a partir de 50 µg/mL, por 72 horas. Dados que corroboram com nossos achados quando os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram expostos por 48 horas nas concentrações de 500 a 15,62 µM do derivado EBD e dilapiol, com isso reforçando a inespecificidade aos macrófagos.

Por outro lado, diversas linhagens de macrófagos imortalizados são frequentemente utilizados para estudos das funções dos macrófagos, já que apresentam uma resposta muito semelhante às células primárias (SEA et al., 2014). Por meio da utilização dos macrófagos de linhagem murina RAW 264.7, avaliou-se a citotoxicidade das substâncias por 72 horas, devido à sua capacidade de exibir um

fenótipo de crescimento rápido e incessante (MOFFAT, 2014). Em nossos achados observamos uma maior toxicidade nessa linhagem do fármaco padrão, enquanto que o derivado EBD não apresentou toxicidade nas mesmas concentrações utilizadas (500 a 15,62  $\mu\text{M}$ ) em relação ao tempo.

Podemos citar outros estudos com células secundárias como o de PARISE-FILHO et al. (2012) que demonstraram efeitos citotóxicos do dilapiol a partir de 25  $\mu\text{M}$  em fibroblastos 3T3 durante 24 horas de tratamento, uma vez que essa célula tem uma importância para o parasita de *Leishmania* durante a fase crônica da infecção (VAGAS-INCHAUSTEGUI et al., 2010). Em nossos resultados, observamos que tanto o dilapiol quanto o derivado EBD, utilizados na concentração de 4,5  $\mu\text{M}$ , não demonstraram ser tóxicos em macrófagos RAW 264.7, por 72 horas, apresentando uma viabilidade de 100% e 90% respectivamente. Estudo de (BUARQUE et al., 2011) demonstraram uma viabilidade de 77% em macrófagos J774, quando foram expostos ao derivado N-tasil aza-pterocarpano, na concentração de 100 $\mu\text{M}$ , durante 72 horas.

SOUSA et al. (2008) demonstraram que o óleo de *P. aduncum* apresentou uma margem elevada de segurança de (240 mg/kg e 120 mg/kg), com efeitos tóxicos mínimos sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos *in vivo*.

O isolamento de produtos naturais, em forma pura, tem sido fonte de insumos para a preparação de medicamentos. ROCHA et al. (2005) descreveram 101 plantas de diversos países com atividade leishmanicida, e 239 substâncias naturais isoladas com atividade em diferentes espécies de *Leishmania* em trabalhos publicados.

TORRES-SANTOS et al. (1999) demonstraram, através do isolado 2',6'-di-hidroxi-4'-metoxichalcona, a partir de *P. aduncum*, que se inibiu o crescimento de

promastigotas viáveis de *L. amazonensis* na concentração de 0,5 µg/mL, por 48 horas de incubação.

Já o estudo de FARAH et al. (2010) demonstraram atividade antileishmania através do derivado isodilapiol isolado de *P.aduncum*, utilizando uma concentração de 50 µg/mL em promastigotas de *L. chagasi*, por 72 horas inibindo 96% dos parasitas viáveis. No entanto, em nosso estudo, utilizamos uma concentração de 4,5 µM do derivado éter butil dilapiol, em que inibiu as formas promastigotas viáveis de *L. amazonensis* por 24, 48 e 72 horas, demonstrando ser uma molécula potencialmente ativa antileishmania.

Uma vez que *P. aduncum* apresenta atividade antileishmania através de seus bioativos, PICOLO et al. (2014) demonstraram atividade de dihidrochalcona em *L. amazonensis*, *L. brasiliensis*, *L. shawi*, *L. chagasi* nas formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, utilizando concentrações de 2, 10 e 50 µM, com uma  $CI_{50}$  de 24 µM.

PARISE-FILHO et al. (2012) demonstraram os efeitos dos análogos do dilapiol (di-hidro dilapiol e isodilapiol) em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, que apresentaram uma  $CI_{50}$  de  $99,9 \pm 10,4$  e  $122,9 \pm 13,9$  µM e  $90,5 \pm 8,6$  e  $109,8 \pm 9,5$  µM respectivamente, e o dilapiol  $69,3 \pm 4,9$  µM para *L. amazonensis* e  $59,4 \pm 4,0$  para *L. braziliensis*. Nesses resultados, mostram-se valores de  $CI_{50}$  bastante elevados quando comparados com nossos achados, em que a molécula do nosso estudo apresentou valores de  $CI_{50}$  de 10,0 (7,2-14), 5,6 (2,2-8,9), 1,6 (0,8-3,3) µM em 24, 48 e 72 horas em ordem, demonstrando que o derivado EBD foi mais potente do que o dilapiol frente à forma promastigota de *L. amazonensis* em todos os tempos.

Por outro lado, quando comparado os dados do derivado EBD com o fármaco padrão (Pentacarinat<sup>®</sup>), com  $CI_{50}$  de 5,4 (3,6-8,0), 1,8 (1,0-2,6) e 2,2 (0,001-4,5)  $\mu$ M em 24, 48 e 72 horas respectivamente, observamos que a nossa molécula de estudo mostrou-se um bioativo potente e eficaz, já que ao longo do tempo apresentou valores de  $CI_{50}$  igual a Pentacarinat<sup>®</sup>. Sabe-se que estudos demonstram que a pentamidina causa uma série de desvantagens como os graves efeitos colaterais (MURRAY et al. 2005), além dos mecanismos de resistência relacionado à adaptação genética dos parasitas de *Leishmania* (QUELLETTE, 2001).

No estudo realizado por NAKAMURA et al. (2006), demonstrou-se que frações de *P. regnellii* apresentou atividade antileishmania, calculando-se o índice de seletividade (IS) por uma razão matemática ( $CC_{50} / CI_{50}$ ), mesmo método usado neste estudo. Desta forma, conseguiu-se avaliar a sensibilidade citotóxica celular quando exposta a uma nova molécula em relação ao tempo associada à eficácia sobre o microrganismo, já que para um protótipo ser considerado promissor e um futuro fármaco, tem que apresentar um (IS) igual ou maior que 10 (CHIARADIA et al., 2007).

O éter butil dilapiol (EBD) demonstrou-se um protótipo promissor, pois apresentou um IS celular de 76,5  $\mu$ M, diante da Pentacarinat<sup>®</sup> com 8,7  $\mu$ M, demonstrando que esses resultados se diferenciam do estudo de PARISE-FILHO et al. (2012), que demonstraram que o dilapiol foi mais potente do que os seus análogos (dihidro dilapiol e isodilapiol) sobre as formas promastigotas, além de obter uma  $CC_{50}$  22  $\mu$ M utilizando fibroblastos 3T3 por 24 hora, porém obteve-se um IS de 0,3  $\mu$ M, demonstrando não ser seletivo para o parasita de *Leishmania* e tóxico para a célula.

O óxido nítrico (NO•) está envolvido em uma variedade de funções biológicas em todo o organismo (POEZE et al. 2010). Neste estudo, foi possível quantificar o NO• em macrófagos peritoneais BALB/c, e assim expor os achados neste estudo, já que o NO• pode ser utilizado de forma benéfico ou maléfico, isso vai depender da quantidade em que é produzida (PREISER et al. 2011). Avaliou-se que as substâncias analisadas não tiveram a capacidade de induzir a óxido nítrico sintase (iNOS) a produzir óxido nítrico quando se comparou com os grupos dos macrófagos basais e estimulados por LPS. Esse possível mecanismo de inibição das iNOS pode ser explicado através do efeito inibitório de um determinado composto sobre a produção de NO•, como também por sequestro do radical NO• (MIRANDA, 2012).

O estudo de IKEDA e colaboradores (2008) demonstrou a inibição do óxido nítrico pelo ácido ursólico na atenuação de óxido nítrico sintase induzida pela via NF-kB em macrófagos murinos RAW 264.7. MIRANDA (2012) mostrou um aumento gradativo da produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais basais nos tempos de 1, 6 e 24 h de incubação com diferença significativa. Já neste estudo observou-se uma pequena produção de óxido nítrico nos tempos de 24 h e 48 h de incubação, mas sem diferença significativa por grupo.

No presente estudo observou-se que as substâncias (EBD, Pentacarinat<sup>®</sup> e dilapiol) na concentração de 4,5 µM não estimularam a produção de óxido nítrico em macrófagos infectados ao decorrer do tempo. Isso pode ser explicado pelo fato de a produção de óxido nítrico depender da formação da arginina que está envolvido na defesa do organismo (HALLESMEESH et al., 2002). Outro estudo também demonstrou que os macrófagos peritoneais BALB/c infectados por *L. amazonensis* apresentaram uma diminuição na concentração de óxido nítrico após 24 h de

incubação (MIRANDA, 2012), resultados semelhantes aos encontrados neste estudo.

GENESTRA et al. (2008) demonstraram que promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* são sensíveis a ação do NO<sup>•</sup>, porém com uma citotoxicidade dose dependente, sendo que os promastigotas são mais sensíveis do que amastigotas. No estudo de MUKBEL et al. (2007), após 24h de infecção em macrófagos por promastigotas de *L. major* e *L. amazonensis* e ativados por LPS, observaram uma menor carga parasitária significativa nos macrófagos infectados por *L. major* e não em macrófagos infectados por *L. amazonensis*.

Através desses achados sugerimos que as substâncias deste estudo não influenciaram na estimulação do NO<sup>•</sup>, tanto em células basais como nas infectadas. Existem várias possibilidades de interferências na produção de óxido nítrico negativamente, como uma modulação na resposta imune do hospedeiro, e assim inibindo a produção de NO<sup>•</sup> em macrófagos peritoneais de BALB/c quando são infectados por *L. amazonensis* (OSORIO Y FORTÉA et al., 2009). Por outro lado, há estudos que demonstram que quando o óxido nítrico foi estimulado por LPS em macrófagos peritoneais de BALB/c e infectados com o parasita de *L. infantum* houve um aumento do NO<sup>•</sup> e redução do número de amastigotas, porém quando infectado com *L. amazonensis* não houve redução na carga parasitária (SOUZA et al., 2010). Neste estudo, observou-se que no grupo controle basal e infectado não foi possível induzir a produção de NO<sup>•</sup>, assim como os grupos submetidos a tratamento com os fármacos.

Observou-se que as substâncias (EBD, Pentacarinat<sup>®</sup> e dilapiol) não estimularam a produção das EROs nos tempos testados. A produção das EROs em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e tratadas com as substâncias,

apresentaram uma diminuição na produção das EROs em todos os tempos. O mecanismo de indução na ativação da enzima NADPH oxidase a produzir EROs é através do burst oxidativo. As EROs podem atuar de forma benéfica na defesa contra infecções, quanto a bactérias, fungos, parasitas com finalidade de destruir microorganismos (FERREIRA et al., 1997). FONSECA-SILVA et al. (2013) demonstraram que as EROs tem uma importante participação na inibição de *L. amazonensis* sendo comparada como substância leishmanicida.

Através do estudo de RIBEIRO et al., (2013) demonstraram que o derivado LQB-118 induziu a produção das EROs em promastigotas de *L. amazonensis* nas primeiras horas, sugerindo que este evento é um dos gatilhos de morte do parasita. Porém, em nosso estudo, sugerimos que o mecanismo de morte do parasita, quando exposto ao derivado EBD, está diretamente sobre o parasita.

Em nosso estudo, o derivado EBD a 4,5  $\mu\text{M}$  inibiu as formas intracelulares viáveis do parasita de *L. amazonensis*, exibindo uma taxa de infecção de 17% e 12% por 24 e 48 horas, respectivamente. Esses resultados determinam que a molécula do nosso estudo mostrou-se promissora, pois quando comparamos com os valores da Pentacarinat<sup>®</sup> (10% e 9%) e o dilapiol (24% e 14%), além do controle negativo que foi de 88% de infecção nos mesmos tempos, sendo que entre as substâncias não apresentaram diferença significativa estatisticamente. O estudo de MARTINS (2011) demonstrou atividade do derivado LASSBIO 1108 uma inibição de 75% as formas amastigotas de *L. major* por 24h com uma  $\text{CI}_{50}$  de 6,6  $\mu\text{M}$ , e com uma taxa de infecção de 23%, já contra *L. amazonensis* apresentou 76% de inibição parasitária, e com uma  $\text{CI}_{50}$  de 11,2  $\mu\text{M}$  por 48 h, e apresentando uma taxa de infecção de 24%.

Na busca de um possível mecanismo de ação antileishmania do derivado EBD foi realizado uma triagem com duas enzimas (triptanotona redutase e N-miristoil transferase) encontradas no parasita de *Leishmania* com funções específicas para a sobrevivência e/ou infectividade parasitária. Mediante análise *in silico* foi possível conhecer o grau de afinidade de energia do derivado éter butil dilapiol com o sítio ativo da enzima U53. PRINCE et al. (2013) observaram em *L. major*, por métodos de deleção de genes direcionados foram usados para demonstrar que o gene de NMT (N-miristoil transferase) de cópia única é essencial para a viabilidade em promastigotas de *Leishmania*, e também responsável pela virulência do parasita.

WRIGHT et al. (2015) demonstraram que a proteína N- miristoilada, conhecida por HASPB, pode ser detectada por western blot em ambos os estágios da vida do parasita de *Leishmania*. Sendo assim, esses dados preveem um efeito fortemente pleiotrópico da inibição do NMT na função celular do parasita e um evidente alvo de drogas leishmanicida.

Em particular, a proteína HASPB duplamente acilada de *L. major* é transportada para toda a superfície do parasita (DENNY et al., 2000) usando uma via não clássica para o tráfego através da membrana durante a biossíntese (MILLS et al., 2007).

Neste trabalho, foi observado que a enzima que apresentou elevada afinidade com o sítio ativo foi a N-miristoil tranferase. Tal fato deve-se pela formação de ponte de hidrogênio entre o EBD com resíduo tirosina A 334 e intreração com bolsa hidrofóbica da enzima, na qual o derivado interage através de pontes de Van Der Waals, tornando o acoplamento do derivado EBD no sítio enzimático muito mais estável.

OGUNGBE et al. (2013) realizaram uma triagem por docagem molecular de 209 moléculas de alcalóides antiparasitárias. Dentre elas, a que melhor apresentou elevada energia de ligação foram os alcalóides indólicos de ancoragem mais fortes foram os flinderóis. Estas ligações mostraram-se seletividade pelo sítio ativo da N-miristoil-transferase de *Leishmania major*, como também para pteridina redutase e t-metnil-tRNA sintase.

OLALEYE et al. (2014) demonstraram que inibidores de substrato peptídeo de NMT mostraram uma maior especificidade para NMT de *P. vivax* do que *P. falciparum*, em que no qual destacou 4 resíduos de aminoácidos diferentes: *P. vivax* ILE 102, TYR 212, SER 228 e TYR 334, e para *P. falciparum* VAL 102, PHE 212. Neste estudo, observou-se que o derivado EBD apresentou 6 ligação com resíduos de aminoácidos semelhantes ao do ligante padrão: ASP 98, ASP 385, GLY 199, GLY 384, GLY 386, VAL 96 e GLU 97, e para o dilapiol GLY 386, ASP 386, TYR 334, GLU 97 e VAL 363. Já que a NMT padrão possui 13 ligações de resíduos de aminoácidos com ligações de Van de Waals, o derivado EBD apresentou 11 e o dilapiol 9. Com isso, sugerimos que o derivado possui uma maior especificidade para a NMT do que o seu precursor.

## 7 CONCLUSÃO

- O derivado EBD, análogo do dilapiol, demonstrou-se nas concentrações avaliadas não tóxico em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, em 48 horas de incubação. Assim, também, foi observado em macrófagos secundários (RAW 264.7), durante 72 horas. O derivado EBD não alterou as características morfológicas dos macrófagos peritoneais na concentração utilizada por 24 e 48 horas de exposição;
- O EBD inibiu as formas promastigotas de *L. amazonensis* quando testado na concentração de 4,5  $\mu\text{M}$ , tendo efeito similar a Pentacarinat<sup>®</sup> e superior ao seu precursor dilapiol;
- O EBD não induziu a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais basais e infectados, demonstrando que a inibição de *L. amazonensis* não ocorreu por essa via de ação, como também não estimulou a NADPH oxidase a produzir as EROs, tanto em macrófagos basais como infectados. Conclui-se, portanto, que o mecanismo de morte deve estar relacionado com ação direta sobre o parasita;
- O EBD inibiu as formas amastigotas de *L. amazonensis* viáveis em macrófagos peritoneais por 24 e 48 horas, apresentando uma redução da taxa de infecção igual à Pentacarinat<sup>®</sup> e ao dilapiol. O EBD apresentou um índice de seletividade melhor do que a Pentacarinat<sup>®</sup>, demonstrando tropismo sobre o parasita de *Leishmania*;
- O EBD apresentou uma maior afinidade de energia de ligação ao sítio ativo da enzima U53 quando comparado com o seu precursor dilapiol.

## 8 PERSPECTIVAS

A análise *in vitro* e *in silico* possibilitou a obtenção de um análogo do dilapiol com atividade antileishmania promissor, com perspectiva de desenvolver uma formulação para ser aplicado no tratamento da leishmaniose cutânea futuramente em testes *in vivo*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS A.K; LICHTMAN A.H; PILLAI S. **Imunologia celular**. 7ª ed. Elsevier, 2011.
- ABDEL-KADER M.S. Preliminary pharmacological study of the pterocarpan macckian and trifolirhizin isolated from the roots of *Ononis vaginalis*. **Pak. J. Pharm. Sci.** 2010; 23(2):182– 7.
- ACIOLE, E. H.P, et al. Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Society of Chemical Industry**. p.563. 2013.
- AGARWAL A.K; FISHWICK C.W.G. Structure-based design of anti-infectives. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1213:20–45, 2010.
- ALCOLEA, P. J.; ALONSO, A.; GÓMEX, M. J.; SÁNCHEZ-GOROSTIAGA, M.; MORENO-PAZ, M.; GONZÁLEZ-PASTOR, E.; TORANO,V.; PARRO,A.; LARRAGA,V. Temperature Increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation In *Leishmania infantum*. **BMC Genomics**, v. 14, p. 11-31, 2010.
- AMEEN M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**. 2010; 35: 699–705.
- AMIGUET, V.T.; PETIT, P.; TA, C.A.; NUÑEZ, R.; SÁNCHEZ-VINDAS, P.; LVAREZ, L.P.; SMITH, M.L.; ARNASON, J.T.; DURST, T. Phytochemistry and Antifungal Properties of the Newly Discovered Tree *Pleodendron costaricence*. **Journal Natural Products**, v.69, n.7, p.1005-1009, 2007.
- ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R.; Chemistry, Biochemistry and Applications. p. 1212, 2006.
- AKOH, C.C; CHAPKIN, R.S. “Composition of Mouse Peritoneal Macrophage Phospholipid Molecular Species.,” **Lipids**, vol. 25, no. 10, pp. 613–617, 1990.
- ARAUJO, P. T.; FUZARI, A.A.; ANDRADE-FILHO, J.D.; PITA-PEREIRA, D.; BRITTO, C.; BRAZIL, R.P. Sandy fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an area of leishmaniasis transmission in the municipality of Rio Branco, state of Acre, Brazil. **Parasit Vectors**. 7: 360. 2014.

BALDOQUI, D.C.; KATO, M.J.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v.51, n.7, p.899-902, 1999.

BARRET, M. P; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Bristich Medical Bulletin**, v. 104, p. 175-196, 2012.

BEETHAM, J. K; DONELSON, J.E; DAHLIN, R.R. Surface glycoprotein PSA (GP46) expression during short- and long-term culture of *Leishmania chagasi*. **Mol and Bioch Parasitol**. v.131,n.2,p.109-117, 2003.

BELZILE, A.S; MAJERUS, S.L; PODESZFINSKI, C; GUILLET, G; DURST, T; ARNASON, J.T. Dillapiol derivatives as synergists: structure-activity relationship analysis. **Pestic Biochem Physiol**, 66(1): 33-40, 2000.

BERNARD, C.B.; ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; LAM, J.; WADDELL, T. Effect of lignans and other secondary metabolites of the Asteraceae on the mono-oxygenase activity of the European corn borer. **Phytochemistry**, v.28, n.5, p.1373-1377, 1989.

BRANDÃO, M.G.L.; COSENZA, G.P.; MOREIRA, R.A.; MONTE-MÓR, R.L.M. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p. 127-134, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Relatório técnico. Brasília. 2ª edição. 180 p. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**, 2ªed. atual. 3ª reimpr. - Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Relatório técnico. Brasília. 1ª edição. 2017.

BRAGA, F.G.M; BOUZADA, M.L.M; FABRI, R.L; MATOS, M.O; MOREIRA, F.O; SCIO, COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 111; 396–402. 2007.

CAMILLA, D; BUARQUE, A. B.; GARDENIA, C. G; MILITÃO, C.; DAISY, J. B; LIMA D.; LETICIA, V.; COSTA-LOTUFO, D.; CLÁUDIA, P. D.; MANOEL,O. M. D.; EDÉZIO F. CUNHA-JUNIOR. E.; TORRES-SANTOS, E. C. E.; CHAQUIP, D.; NETTO, F. B.;

PAULO, R. R. C. **Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: Synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis***. 2011.

CAAMAL-FUENTES, E.; MOO-PUC, R.; TORRES-TAPIA, L.W.; PERAZA-SANCHEZ, SR. Pterocarpanes from the root bark of *Aeschynomene fascicularis*. **Nat. Prod. Commun.** 8(10):1421–2. 2013.

CALDAS, A.J.M.; LISBÔA L.L.C.; SILVA, P.F.; COUTINHO, N.P.S.; SILVA, T.C. Perfil das crianças com leishmaniose visceral que evoluíram para óbito, falha terapêutica e recidiva em hospital de São Luís, Maranhão. **Rev Pesq Saúde**, 14(2): 91-95, maio-agost, 2013.

CAMPOS, J. F. F. **Ação leishmanicida *in vitro* de miltefosine em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e estudo *in vivo* de sua eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade de Brasília, Brasília.

CARINI, A; PARANHOS, U. Identificação das úlceras de Bauru ao Botão do Oriente. **Rev. medica São Paulo**. S. Paulo: Rothschild;(6):15,1909.

CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E. L.; Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease-review. **Fitoterapia** 72, 599–618. 2001.

CARVALHO, A.K; SILVEIRA, F.T; PASSERO, L.F.D; GOMES, C.M.C; CORBETT, C.E.P; LAURENT. M.D. *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. **Parasite Immunol.** 2012.

CASSADO, A.D.A.; D'IMPÉRIO LIMA, M.R; BORTOLUCI, K.R. "Revisiting Mouse Peritoneal Macrophages: Heterogeneity, Development, and Function," **Front. Immunol.**, vol. 6, pp. 1–9, 2015.

CHANNON, J.Y; ROBERTS, M.B. AND BLACKWELL, J.M. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. **Immunology**, 53:345-355, 1984.

CHIARADIA, L. D.; DOS SANTOS, R.; VITOR, C. E.; VIEIRA, A. A.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Synthesis and Pharmacological Activity of Chalcones Derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in RAW 264.7 Cells Stimulated by LPS: Quantitative Structure-activity Relationships. **Bio. Med. Chem.**: v. 16, 658-667, 2007.

CHOI, C. Integrated nanobiosensor technology for biomedical application. **Nanobiosensors in Disease Diagnosis**, v. 1, 1, p. 1-4, 2012.

COMALADA, M; YERAMIAN, A; MODOLELL, M; LLOBERAS, J; CELADA, A. Arginine and macrophage activation. **Methods Mol Biol**, 2012.

COHN, Z.A. "The Structure and Function of Monocytes and Macrophages," **Adv. Immunol**, vol. 9, pp. 163–214, 1968.

CUNHA-JÚNIOR, E.F; PACIENZA-LIMA, W; RIBEIRO, G.A; NETTO, C.D; DO CANTO-CAVALHEIRO, M.M; DA SILVA, A.J.M, et al. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemother**, 66(7):1555–9, 2011.

CUNHA-JÚNIOR, E. F. **Estudos pré-clínicos da pterocarpanoquinona LQB-118: toxicidade subaguda, eficácia em leishmaniose visceral experimental e mecanismo de ação**. 2015. INSTITUTO OSWALDO CRUZ de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CUPOLILLO, E. et al. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today*, **Cambridge**, v. 16, p. 142-144, 2000.

CYSNE-FINKELSTEIN, L.; TEMPORAL, R. M.; AGUIAR ALVES, F.; AND LEON L. L. *Leishmania amazonensis*: Long-term cultivation of amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 89, p.58–62, 1998.

DAVID, C.V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatology and Therapy**, v. 22, n. 6, p. 491-502, 2009.

DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Pentavalent antimonials: from chemistry to the design of new drugs. **Drug Design Reviews**, v. 2, n. 3, p. 243-249, 2009.

DENNY, P.W.; GOKOOL, S.; RUSSELL, D.G.; FIELD, M.C.; SMITH, D.F. Acylation-dependent protein export in *Leishmania*. **J. Biol. Chem.** 275, 11017–11025. 2000.

Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Rev Saúde Pública** 2010;44(1):200-2.

DSVisualizer™ -Accelrys Software Inc. Discovery Studio Visualizer 2.0, 2.5,2016.

DOMINGOS, P.R.C. **Avaliação do Potencial Genotóxico de Dois Derivados Semi-Sintéticos do Fenilpropanóide Dilapiol Contra Núcleos de Aedes**

**(*Stegomyia*) *Aegypti* (Diptera: Culicidae)**, Manaus, Amazonas. 2012. Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva – PPG-GCBEv. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA- Manaus-AM.

DYER, L. A.; RICHARDS, J.; DODSON, C. D. Isolation, Synthesis, and Evolutionary Ecology of *Piper* Amides. In: DYER, L. .A.; PALMER, A. D. N. *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry*, **Ecology and Evolution**, p. 117-139. 2004.

FARIA, M.V.; MORALES, R.G.F.; RESENDE, J.T.V.; ZANIN, D.S.; MENEZES, C.B.; KOBORI, R.F. Desempenho agrônômico e heterose de genótipos de cebola. **Horticultura Brasileira**, v.30, n.2, p.220-225, 2012.

FARAH, D; PARISE-FILHO, R.; MAGRI, F.; BONARDO, V.;1, P FIORINO, P.; V FARAH, V.; M FONTELES, M.; DELORENZI, J. Anti-promastigote activity of dillapiole and isodillapiole against *Leishmania chagasi*. **Planta Med**; 76 - P480. 2010.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREL, A. S.; RODRÍGUEZ, C. R. Árboles y arbustos de *Piper* (“matico”) del Valle de Chanchamayo, Dp. de Junín (Perú). La Molina: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2013.

FIDALGO, L.L.M.; RAMOS, I.S.; MONTALVO, A.M.A.; LORENTE, N.G.; LOPEZ, R.S.; PAYROL, J. A. Propriedades antiprotozoários de óleos essenciais extraídos de plantas cubanos, **Rev Cubana Med Trop.** ;56 n.3. 2004.

FIGUEIRA, L.P; NAIFF JÚNIOR, R.D; VINHOTE-SILVA, A.C; SILVA, S.S; ESPIR, T.T; NAIFF, M.F; GOMES, L.H.M; MOREIRA, F.R.A.C.N; FRANCO, A.M.R. **New human case reports of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) naiffi* in the Amazon region**, Brazil. 47(1): 47 – 52. 2017.

FIGUEIREDO, P.B. **Estudo químico e atividade larvicida do óleo essencial das folhas de *Piper aduncum* L.** 2014, Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza.

FONSECA-SILVA, F; INACIO, J.D; CANTO-CAVALHEIRO, M. M et al. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS One**; 6: e 14666, 2011.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J./D.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Reactive oxygen species production by quercetin causes the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. **Journal of natural products**;76 (8):1505-8. 2013.

FRAGA J; VELAND, N; MONTALVO, A.M; PRAET, N; BOGGILD, A.K; VALENCIA, B.M, et al. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 74:142–50, 2012.

FREDDY, A. B.; ERICSSON, COY-BARRERA. In-Silico Analyses of Sesquiterpene-Related Compounds on Selected *Leishmania* Enzyme-Based Targets. **Molecules**. 2014.

FREZARD, F.; MARTINS, P. S.; BARBOSA, M. C. M. New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonite and sodium stibogluconate. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 656–665, 2008.

GENESTRA, M.; SOARES-BEZERRA, R. J.; GOMES-SILVA, L.; FABRINO, D. L.; BELLATO-SANTOS, T.; CASTRO-PINTO, D. B. et al. *In vitro* mediated toxicity towards *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. **Cell Biochem Funct**; 26:709-717. 2008.

GIUDICE, A. et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC Infect. Dis.**, v. 12, n. 1, p. 75, 2012.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n.4, p. 419-433, 2010.

GONZÁLEZ-ASEGUINOLAZA, G; ALMAZÁN, F. J.; RODRÍGUEZ, F; MARQUET, A; LARRAGA, V. Cloning of the gp63 surface protease of *Leishmania infantum* Differential post-translational modifications correlated with different infective forms. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1361, p. 92–102. 1997.

GREEN, L. C.; GREEN, D. A.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [N] Nitrate in biological fluids. **Analytical Biochem**; 126:131-138. 1982.

GUERRA, J. A; COELHO, L.I.R.C; PEREIRA, F.R; SIQUEIRA, A.M; RIBEIRO, R.L; ALMEIDA, T.M.L; LACERDA, M.V.G; BARBOSA, M.G.V; TALHARI, S. American tegumentary leishmaniasis and HIV-AIDS association in a tertiary care center in the

Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 85, p. 524–527, 2011.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. da S. **Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará**. Rodriguésia, Rio de Janeiro, n. 55, v. 84, p. 21-46, 2004.

HALLEMEESCH, M. M.; LAMERS, W. H.; DEUTZ, N. E. Reduced arginine availability and nitric oxide production. **Clin Nutr.**;21(4):273-9. 2002.

HANDA K, SATO S. Generation of free radicals of quinone group-containing anti-cancer chemicals in NADPH-microsome system as evidenced by initiation of sulfite oxidation. **Gann.**; 66:43–7, 1975.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E. et al. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw porkbatters. **Meat Science**, Barking, v. 81, n. 2, p. 410-417, Feb. 2009.

INACIO, J. D.F.; GERVAZONI, L.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. The effect of (-)-epigallocatechin 3-O--gallate *in vitro* and *in vivo* in *Leishmania braziliensis*: involvement of reactive oxygen species as a mechanism of action. **PLoS Negl. Trop. Dis.**; 8(8):3093. 2014.

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. **Mol Nutr Food Res**. v. 52, n. 1, p. 26-42, 2008.

KHOURI, R; BAFICA, A; SILVA, M.D.A. P; NORONHA, A; KOLB, J.P; WIETZERBIN, J; BARRAL, A; BARRALNETTO, M; VAN WEYENBERGH, J. IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. **The Journal of immunology**, 182(4):2525-31, 2009.

KUMAGAI, Yoshito et al. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 52, p. 221-247, 2012.

JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, L.; ÁLVAREZ-CORRAL, M.; MUÑOZ-DORADO, M.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, I. Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. **Phytochem. Rev.** 7(1):125–54. 2007.

JIMENEZ-JIMENEZ, C.; CARRERO-LERIDA, J.; SEALEY-CARDONA, M.; PEREZ, L.M.R.; URBINA. J.A.; Pacanowska, D.G. Delta (24(25))-sterol methenyltransferase: Intracellular localization and azasterol sensitivity in *Leishmania major* promastigotes over expressing the enzyme. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 160: 52-59. 2008.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Ver Pan-Amaz Saude**, v.1, p.13-32, 2010.

LAROCQUE, N.; VINCENT, C.; BÉLANGER, A.; BOURASSA, J.P. Effects of tansy essential oil from *Tanacetum vulgare* on biology of oblique-banded leafroller, *Choristoneura rosaceana*. **Journal of Chemical Ecology**, v.25, n.6, p.1319-1330, 1999.

LEISHMAN, W.B. Note on a Simple and Rapid Method of Producing Romanowsky Staining in Malarial and other Blood Films. **Br. Med. J.** 1901; 2(2125):757–8.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. **Ed. Lippincott Williams & Wilkins**. 5<sup>a</sup> ed., 2002.

LIMA JÚNIOR, D. S. **NLRP3 inflamassoma: uma plataforma molecular importante no controle da infecção por *Leishmania* spp.** 2013. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada.

LINDENBERG, A. L'ulcère de Bauru ou le bouton d'Orient au Brésil: communication préliminaire. **Bull Soc Path Exot** 1909; 2:252–4.

LIU, D; UZONNA, J.E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cel Infect Microbiol**, 2012.

LIEW, F.Y.; MILLOTT, S.; PARKINSON, C. PALMER, R.M.J. and MONCADA S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology**, 1990; 144: 4794–4797.

LOUASSINI, M.; ADROHER, F.I.; FOULQUIE, M.R.; BENITEZ. R. Investigations on the *in vitro* metacyclogenesis of a visceral and a cutaneous human strain of *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, v.70(3),: 355-368, 1998.

LÜHE, M. Die im Blute schmarotzenden Protozoen und ihre nächsten Verwandten. In: Mense C, Barth IA, editors. *Hanbuch der Tropenkrankheiten*, 1906. p. 203.

MACEDO, M. N. **Avaliação do papel de monócitos/macrófagos na leishmaniose disseminada causada por *L. braziliensis*.** 2015. Universidade Federal da Bahia-Salvador. Pós graduação em Ciências da Saúde.

MACEDO, J. C. B.; OVIEDO, G. S. El aceite esencial de *Piper aduncum* L. "matico hembra". **Bol. Soc. Quím.** Perú, Lima, v. 53, n. 4, p. 228-232, dic. 1987.

MACIEL SANTOS, M. E. S.; NOGUEIRA E. F. C.; LOPES P. H. S.; TORRES B. C. A. Leishmaniose mucocutânea facial: desafios do diagnóstico ao tratamento. **Rev. Cir. Traumatol.** Buco-Maxilo-Fac., Camaragibe v.13, n.2, p. 15-20, 2013.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. H. L.; LUZ, A. I. R.; BASTOS, C. N. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour Fragr J** 13: 269-272. 1998.

MAIA, J.G.S.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A. Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais, **1st ed. Museu Paraense Emílio Goeldi**, Belém-PA, 200 pp, 2001.

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

MARTINEZ, P. A.; CHRISTINE A. P. Chronic infection by *Leishmania amazonensis* mediated through MAPK ERK mechanisms. **Immunology** 59:153-165. 2014.

MARTINS, M. V. Avaliação da Atividade Leishmanicida de compostos Hidrazídicos. 2011. Tese (Doutorado) – UFRJ/ ICB/ **Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal**.

MATTA, A.A. Sur les leishmanioses tégumentaires. Classification générale des leishmanioses. **Bull. la Société Pathol. Exot.** 1916; 9:494–503.

MCCALL, L.I.; ZHANG, W.W.; MATLASHEWSKI. G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. **PLoS Pathog.** 9(1):e1003053, 2013.

MEDINA, L.F.C. **Avaliação das atividades bioquímicas e genotóxicas de aminonaftoquinonas**. (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Por Alegre, 2006.

MELO´NETO, G. PRÁTICAS PEDAGÓGICAS DE EDUCAÇÃO AMBIENTAL: dez anos (1999 a 2009) da Política Nacional de Educação Ambiental no Município de Catalão (GO) – CAIC São Francisco de Assis, 2011.

MICHALICK; RIBEIRO, 2011. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, F.P. et al. Parasitologia Humana 12º Ed. São Paulo. **Editores Atheneu**. Cap. 7, p. 41-47, 2011.  
MILLS, E.; PRICE, H.P.; JOHNER, A.; EMERSON, J.E., and SMITH, D.F. Kinetoplastid PPEF phosphatases: dual acylated proteins expressed in the

endomembrane system of *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 152, 22–34. (2007).

MIRANDA, M. G. **Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e índice de infecção por macrófagos peritoneais de camundongos suscetíveis ou resistentes à leishmaniose infectados *in vitro* com *Leishmania amazonensis***. 2012. Dissertação de Pósgraduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília –DF.

MOFFAT, J. G.; RUDOLPH, J.; BAILEY, D. Phenotypic screening in cancer drug discovery - past, present and future. **Nature Reviews.** v13(8), p 588-602, 2014.

MORRIS, G. M; HUEY, R AND OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. 2009.

MOTA, L.A.M. **“Macrófagos Peritoneais de Camundongo Cultivados com Soro Homólogo Apresentam Grande Número de Corpos Lipídicos e Ação Microbicida Reduzida contra o *Toxoplasma Gondii*,”** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biotecnologia) - Centro de Biotecnologia e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2009.

MURAILLE, E; LEO, O; MOSER, M. Th1/Th2 paradigm extended: macrophage polarization as na unappreciated pathogen-driven escape mechanism. **Front Immunol.**, 2014.

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

MUKBEL, R. M.; PATTEN, C. J. R.; GIBSON, K.; GHOSH, M.; PETERSEN, C.; JONES. D. E. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires oxide and superoxide. **AM J Trop Med Hyg.**; 76(4):669-75. 2007.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, O. S.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 16, p. 61-66, 2006.

NAKAYAMA, G,R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOSSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**.n.204, p.205-208, 1997.

NAIR, M.G.; SOMMERVILLE, J.; BURKE, B.A. Phenyl propenoids from roots of *Piper auritum*. **Phytochemistry**, v.28, n.2, p.654-655, 1989.

NAVICKIENE, H.M.D.; MORANDIM, A.A.; ALÉCIO, A.C.; REGASINI, L.O.; BERGAMO, D.C.B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A.J.; LOPES, M.N.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; MARQUES, M.O.M.; YOUNG, M.C.M.; KATO, M.J. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v.29, n.3, p.467-470, 2006.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana e sua expansão no território Brasileiro. **Revista Percorso - NEMO** Maringá, v. 6, n. 1, p. 147- 168, 2014.

NEUBER H. Leishmaniasis. **J. Dtsch. Dermatol. Ges.** 2008;6:754–65.

NEWMAN, D. J. **J. Med. Chem.** 2008, 51, 2589.

NEVES, L. O. **Estudo Clínico Randomizado Comparando Antimoniato e Meglumina, Pentamidina e Anfotericina B para O Tratamento da Leishmaniose Cutânea Ocasionada por *Leishmania guyanensis* em Centro de Referência de Manaus, Amazonas.** 141 f. Mestrado em Medicina Tropical [dissertação] - Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Manaus, 2010.

NICOLLE, G.L. Culture du parasite du Bouton d’Orient. **C R Acad Sci** 1908; 146:842-843.

NICK, A., RALI, T., STICHER, O. Biological screening of traditional medicinal plants from Papua New Guinea. **Journal of Ethnopharmacology** 49, 147-156. 1995.

NOVY, F.G; MCNEAL, W.J. On the cultivation of Trypanosoma brucei. **J. Infect.** 1904; 1:1-30.

OGUNGBEA, I. V; ERWINB, R. W.; SETZERB, W. N. Antileishmanial phytochemical phenolics: Molecular docking to potential protein targets terpenoids, **Molecules.** Journal of Molecular Graphics and Modelling. 2013.

OLIVEIRA, L.C.P., MAUSE, R.A., NUNOMURA, S.M. Quantitative HPLC analysis of some marker compounds of hydroalcoholic extracts of *Piper aduncum* L. **J. Braz. Chem. Soc.** 16, 1439–1442. 2005.

OMS. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniase, 2017.

OMS. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. World Health Organization. 2010.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento. Washington, D.C.: OPS, 2013.

ORGANIZATION OF ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) 2001. In: The Revised Up-and-Down Procedure: A Test Method for Determining the Acute Oral Toxicity of Chemicals. **NIH Publication** No 02-450.

OSORIO Y FORTÉA, J.; DE LA LLAVE, E.; REGNAULT, B.; COPPÉE, Y.; MILON, G.; LANG, T.; PRINA, E. Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying *Leishmania amazonensis* amastigotes. **BMC genomics**. 10:119. 2009.

OUELLETTE, M., Papadopoulou, B. (2001). Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. **Parasitology Today**, 9: 150-3.

PAL, D; BANDYOPADHYAY, U. Redox-active antiparasitic drugs. Antioxidants e Redox signaling. V.17, n.4, p.555-582, 2012.

PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of genus *Piper*. **Phytochemistry**, [London], v. 46, n.4, p. 597-673, 1997.

PATHAK, D.; YADAVA M.; SIDDIQUI N.; KUSHAWAH S. Antileishmanial Agents: An Updated Review. **Der Pharma Chemica**. 3(1): 239-249. 2011.

PARISE-FILHO, R.; PASQUALOTO, K. F. M.; MAGRI, F. M. M.; FERREIRA, A. K.; SILVA, B. A. V. G.; DAMIÃO, M. C. F. C. B. et al. Dillapiole as antileishmanial agent: discovery, cytotoxic activity and preliminary SAR studies of dillapiole analogues. **Arch Pharm** 2012; 345(12): 934-944. PMID:22996811. <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.201200212>.

PERTINO, M.; SCHMEDAHIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J.A.; THEODULOZ, C. Gastroprotective effect and citotoxicity of semisynthetic Jatropholone derivatives. **Planta Med**. v. 73, p. 1095-1100, 2007.

PICOLO, C.R.Dal; BEZERRA, M.P; GOMES, K.S; PASSERO, L.F.D; LAURENTI, M.D; MARTINS, E.G.A; SARTORELLI. P; LAGO, J.H.G. Antileishmanial activity evaluation of adunchalcone, a new prenylated dihydrochalcone from *Piper aduncum* L. **Fitoterapia**. 28–33. 2014.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; Epifânio, R. A. **Quím. Nova**, 2002.

PINTO, A.C.S. 2008. **Desenvolvimento de substâncias semi-sintéticas e bioativas a partir de 4-nerolidilcatechol e dilapiol**. Tese de Doutorado.

Biotecnologia, área de Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 296p.

POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; MAUSE, R. *Piper aduncum* L.: Planta Pluripotente e Fonte de Substâncias Fitoquímicas Importantes, 2006.

POEZE, M.; BRUINS, M. J.; LUIKING, Y. C.; DEUTZ, N. E. Reduced caloric intake during endotoxemia reduces arginine availability and metabolism. **Am J Clin Nutr.**;91(4):992-1001. 2010.

PREISER, J. C.; LUIKING, Y.; DEUTZ, N. Arginine and sepsis: a question of the right balance? **Crit Care Med.**;39(6):1569-70. 2011.

PRICE, H.P.; PAAPE, D.; HODGKINSON, M.R.; FARRANT, K.; DOEHL, J.; STARK, M.; SMITH, D.F. The *Leishmania major* BBSome subunit BBS1 is essential for parasite virulence in the mammalian host. **Mol. Microbiol.** 90, 597–611. (2013).

RIBEIRO, G. A.; CUNHA-JÚNIOR, E. F.; PINHEIRO, R. O.; DA-SILVA, S. A. G.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; DA SILVA, A. J. M.; et al. LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. **J. Antimicrob. Chemother**; 68(4):789–99. 2013.

ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R.; MACEDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine** 2005; 12:514–35.

ROW, R. *Leishmania donovani* and *Leishmania tropica*. **Br. Med. J.** 1912; 1(2674):717–8.

RUDNICK, D. A ; MCWHERTER, C. A. ; ROCQUE, W. J.; LENNON, P. J.; GETMAN, D. P.; GORDON, J. I. **Biol. Chem.**, , 266, 9732–9739. 1991.

SANTOS, S. R. L.; MELO, M.A.; CARDOSO, A.V.; SANTOS, R.L.C.; DE SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H. Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. **Chemosphere**. In press. 2011.

SERAFIM, T. D.; FIGUEIREDO, A. B.; COSTA, P. A.; et al. *Leishmania* metacyclogenesis is promoted in the absence of purines. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 6, n. 9, p. e1833, 2012.

SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of *Piper* species: a review. **Fitoterapia**, v. 58, n. 3, p. 147-166, 1987.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian J Exp Biol**, 47: 412-423. 2009.

SIEUWERTS, A. M.; KLIJN, J. G.; PETERS, H. A. and FOEKENS, J. A. "The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures *in Vitro* for the Assessment of Growth Characteristics, IC50-Values and Cell Survival.," **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, vol. 33, no. 11, pp. 813–823, 1995.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G.; SANTOS, R. M. G.; FILHO, E. R.; ELIAS, C. N. Atividade larvívica de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 37: 396-399. 2004.

SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. DA S. em *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*; Mander, L., Lui, H.-W., **Eds. Elsevier**: Oxford, v. 3, PP.95-13, 2010.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb>. Atualização dos dados em março de 2017.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R.K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pac J Trop Med** 5:485–497, 2012.

SOUSA, P.J.A.; BARROS, C.A.L.; CARLOS S, C.; ROCHA,J.C.; LIRA,S.D.; MONTEIRO, G.M.; MAIA, G.S.J. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 2008.

STEWART, J. J. P. 2013. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **J Mol Model.**, v.19, p. 1-32.

STEWART, J. J. P. 2016. Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, <HTTP://OpenMOPAC.net>.

TEIXEIRA, D. E.; BECHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P.H.; PIMENTA, P. F. P., DE SOUZA, W. **Atlas didático**: Ciclo de vida da *Leishmania*. Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, Rio de Janeiro, 1 ed., 2013.

TOMAR, S.S.; MAHESHWARI M.L.; MUKERJEE, S.K. syntheses and synergistic activity of some pyrethrum synergists from dillapiole. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43:1479-1483. 1979 a, b.

TORRES-SANTOS, E. C.; MOREIRA, D. L.; M. A. C.; M. N.; ROSSI-BERGMANN, B. **Selective Effect of 29,69-Dihydroxy-49-Methoxychalcone Isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis***. Universidade Federal do Rio de Janeiro,

and Laboratório de Ultraestrutura Celular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. 1999.

TROTT, O., & OLSON, A. J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, 31(2), 455-461.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E. S. Informações Tóxicas de Alguns Fitoterápicos Utilizados no Brasil. **Revista brasileira de Ciências Farmacêuticas** V.42, n.2, 2006.

VAN GRIENSVEN, J.; BALASEGARAM, M; MEHEUS, F; ALVAR, J; LYNEN, L; BOELAERT, M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **Lancet Infect Dis** 2010; 10:184-94.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A; HOGG, A. E; TULLIANO, G; LLANOS-CUENTAS, A; AREVALO, J; ENDSLEY, J. J; SOONG, L. CXCL10 production by human monocytes in response to *Leishmania braziliensis* infection. **Infection and immunity** 78: 301–308. 2010.

VÁSQUEZ, S.P.F.; MENDONÇA, M.S.; NODA, S.N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil, 2014.

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota preliminar). **Brazil Med.** 1911; 25:411.

VIEIRA-GONÇALVES, R.; PIRMEZ, C.; JORGE, M. E.; SOUZA, W. J.; OLIVEIRA, M. P.; RUTOWITSCH, M. S.; DA-CRUZ A. M. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. **International journal of dermatology**, 47(9): 926-932, 2008.

WRIGHT, J.H. Protozoa in a case of tropical ulcer ("Delhi sore"). **J Med Res. Dec**;10(3):472-82. 1903.

WRIGHT, M.H.; HEAL, W.P.; MANN, D.J.; and TATE, E.W. Protein myristoylation in health and disease. **J. Chem. Biol.** 3, 19–35. 2010.

WRIGHT, M. H.; PAAPE, D.; STORCK, E. M.; SERWA, R. A.; SMITH, D. F.; and TATE, E. W. **Chem. Biol.** 22, this issue, 342–354, 2015.

ZILLI, J.E.; VIEIRA, B.A.H; NECHET, K.L. Novas oportunidades para exploração da biodiversidade na Amazônia. 2007.