

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



Avaliação da atividade leishmanicida de 38 derivados
chalcônicos (T1 - T51)

THAIS GABAN PASSALACQUA

Dissertação de Mestrado
2014

THAIS GABAN PASSALACQUA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE 38
DERIVADOS CHALCÔNICOS (T1 - T51)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Márcia A. S. Graminha

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

Araraquara

2013

THAIS GABAN PASSALACQUA

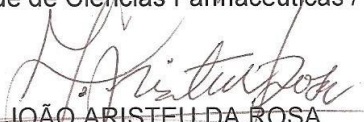
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 27 de janeiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. MÁRCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA (Orientadora)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. JOÃO ARISTEU DA ROSA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. PIO COLEPICOLO NETO
Instituto de Química / USP / São Paulo

FICHA CATALOGRÁFICA

P285a	Passalacqua, Thais Gaban Avaliação da atividade leishmanicida de 28 derivados chalcônicos (T1-T51) / Thais Gaban Passalacqua. – Araraquara : [s.n], 2014 81 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Marcia Aparecida Silva Graminha Coorientador: Luis Octavio Regasini 1. Bioquímica. 2. Chalcona. 3. <i>Leishmania</i>. 4. Proteína. I. Título.
-------	---

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

Dados Curriculares

Thais Gaban Passalacqua

1. Dados pessoais

Filiação: Armando Carlos Biagioni Passalacqua e Elisabete Maria Gaban Passalacqua

Nascimento: 15 de Abril de 1985

Carteira de Identidade: 29512734X SSP - SP - 07/08/2004

CPF: 341.674.468-39

Endereço residencial: Rua Padre Duarte, 436, São José - Araraquara

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Rodovia Araraquara/Jaú KM 1 - Araraquara

Profissão: Farmacêutica-Bioquímica

2. Formação acadêmica

- 2011-2014** Mestrado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.
Título: Avaliação de atividade leishmanicida e potencial mecanismo de ação de chalconas sintéticas.
Orientador: Marcia Aparecida Silva Graminha
Co-orientador: Luis Octavio Regasini
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2005 - 2010** Graduação em Farmácia e Bioquímica.
Universidade Paulista, UNIP, São Paulo, Brasil
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

3. Atividades de Pesquisa

3.1. Produção bibliográfica

3.1.1. Artigos completos publicados em periódicos

1. FUNARI, C.S., PASSALACQUA, T. G., RINALDO, D., NAPOLITANO, A., FESTA, M., PIACENTE, S., YOUNG, M. C. M., DURIGAN, G., SILVA, D.H.S.
Interconverting flavanone glucosides and other phenolic compounds in Lippia salviaefolia Cham. ethanol extracts. Phytochemistry. , v.72, p.2052 - 2061, 2011.

3.1.2. Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ALMEIDA, L., **PASSALACQUA, T.G.**, TORRES, F. A. E., DUTRA, L. A., REGASINI, L. O., GRAMINHA, M. Activity Against Intracellular Amastigotes of Leishmania infantum of Synthetic

Chalcones In: 5th Symposium on Biological Chemistry, Health and Medicine: Frontier and New Perspectives, 2013, Ilhabela.

5th Symposium on Biological Chemistry, Health and Medicine: Frontier and New Perspectives, 2013.

2. TORRES, F. A. E., **PASSALACQUA, T.G.**, ALMEIDA, L., PEREIRA, C. M. P., SOUZA, P. O., COLEPICOLA, P., GRAMINHA, M.

Antarctic Algae: a New Approach for Leishmaniasis Treatment In: 5th Symposium on Biological Chemistry, Health and Medicine: Frontier and New Perspectives, 2013, Ilhabela.

5th Symposium on Biological Chemistry, Health and Medicine: Frontier and New Perspectives, 2013.

3. **PASSALACQUA, T.G.**, ALMEIDA, L., SOUZA, R. A., TORRES, F. A. E., DUTRA, L. A., REGASINI, L. O., MARTINEZ, I., GRAMINHA, M.

Antileishmanial Activity of Three Synthetic Chalcone In: 5th Symposium on Biological Chemistry, Health and Medicine: Frontier and New Perspectives, 2013, Ilhabela.

5th Symposium on Biological Chemistry, Health and Medicine: Frontier and New Perspectives, 2013.

4. ALMEIDA, L., NOGUEIRA, C.T, CISTIA, M. L., **PASSALACQUA, T.G.**, TORRES, F. A. E., GRAMINHA, M.

Searching for New Antigen for Canine Visceral Leishmaniasis Serodiagnosis: Study of Lc36 gene In: III International Symposium on Drug Discovery, 2013, Araraquara.

III International Symposium on Drug Discovery, 2013.

5. **PASSALACQUA, T.G.**, MARTINEZ, I., PETRONIO, M.S, DUTRA, L. A., REGASINI, L. O., BOLZANI, V.S., GRAMINHA, M.

ANTILEISHMANIAL ACTIVITY OF SUB-2, A SEMI-SYNTHETIC MOLECULE In: BSP 50th spring meeting, 2012, Glasgow.

BSP 50th spring meeting, 2012. p.171 - 171

6. FUNARI, C. S., PASSALACQUA, T. G., RINALDO, R., YOUNG, M.C.M., NAPOLITANO, N., FESTA, M., PIACENTE, S., SILVA, D.H.S.

Four novel interconverting flavanone glucosides from *Lippia salviaefolia* cham In: XIX° SILAE Congress "Fernando Cabieses Molina", 2010, Villasimius, Cagliari - ITALY.

Four novel interconverting flavanone glucosides from *Lippia salviaefolia* cham, 2010.

7. PASSALACQUA, T. G., SILVA, D.H.S., REGASINI, L. O., AMBRÓSIO, L. D., FUNARI, C. S.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SEIS ESPÉCIES DE LIPPIA CONTRA TRYPANOSOMA CRUZI In: XXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2009, São José do Rio Preto.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SEIS ESPÉCIES DE LIPPIA CONTRA TRYPANOSOMA CRUZI, 2009.

3.2. Produção técnica

1. GRAMINHA, M., NOGUEIRA, C.T, PASSALACQUA, T. G., PETRONIO, M.S, CICARELLI, R.M.B.

Busca por fármacos para doenças negligenciadas, com ênfase em doença de Chagas e leishmanioses utilizando a biodiversidade brasileira., 2011. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional)

4. Eventos

4.1. Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **5th Symposium on Biological Chemistry, Health and Medicine: Frontier and New Perspectives, 2013. (Simpósio)**

Antileishmanial activity of three synthetic chalcone.

2. **Workshop on Drug Design and Neglected Tropical Diseases**, 2013. (Congresso)
3. **Search for New drug Targets in Trypanosomatides Using Molecular Approaches**, 2013. (Outra)
4. **2º Treinamento do Escritório Regional de Apoio à Pesquisa e Internacionalização**, 2013. (Oficina)
5. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **British Society for Parasitology: Spring Meeting and Trypanosomiasis and Leishmaniasis Seminar**, 2012. (Congresso)
Antileishmanial activity of sub-2, a semi-synthetic molecule.
6. **Search for New Drug Targets Using Molecular and Cell Biology Approaches**, 2012. (Simpósio)
7. **Workshop Fronteiras**, 2012. (Seminário)
8. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XLVII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL**, 2011. (Congresso)
ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE SEIS ESPÉCIES DE LIPPIA (VERBENACEAE) NATIVAS DO BRASIL.
9. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **II International Symposium on Drug Discovery**, 2011. (Simpósio)
Genome based drug discovery: looking for potential Leishmania major drug targets through bioinformatics tools.
10. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XIX Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina**, 2010. (Congresso)
Four novel interconverting flavanone glucosides from Lippia salviaefolia cham.
11. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XIII Jornadas Científicas de la Facultad de Farmacia**, 2010. (Congresso)
Screening for trypanocidal and cytotoxic activities of Lippia species against trypanosoma cruzi and LLCMK2 cells.
12. **Biota Fapesp International Workshop on Metabolomics in the context of Systems Biology: A Rational Approach to Search for Lead Molecules from Nature**, 2010. (Seminário)
13. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp - CIC**, 2009. (Congresso)
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SEIS ESPÉCIES DE LIPPIA CONTRA TRYPANOSOMA CRUZI.
14. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **2nd Brazilian Conference on Natural Products**, 2009. (Congresso)
TRYPANOCIDAL ACTIVITY OF SIX LIPPIA SPECIES.
15. **IV Workshop NuBBE**, 2009. (Seminário)

Organização de evento

1. COLEPICCOLO, P., GRAMINHA, M., BAPTISTA, M. S., FARREL, N., **PASSALACQUA, T.G.**, TORRES, F. A. E., ANDREGUETTI, D. X., VILLELA, L. Z., ALMEIDA, L.
5th Symposium on Biological Chemistry, Health and Medicine: Frontier and New Perspectives, 2013. (Congresso, Organização de evento).

Dedico essa conquista, primeiramente, à Deus, minha família, orientadora, amigos e colegas de trabalho pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

À Márcia, por todo o apoio, paciência, dedicação, por acreditar em mim incentivando-me e exigindo, mas também mostrando seu lado amigo.

À Bel, pela grande ajuda e os ensinamentos prestados no laboratório.

À todos os meus colegas de laboratório, os que ainda estão presentes e os que já foram, pelo incentivo e ajuda em todos os momentos.

Ao Luis Octávio, por todos os ensinamentos posteriores e por toda ajuda prestada durante essa fase da minha vida, e Luiz Antonio por fazer parte deste trabalho e pela amizade.

À seção de pós-graduação por toda atenção e gentileza que sempre demonstraram.

Às professoras Maria José Soares Mendes Giannini e Ana Marisa Fusco Almeida, por ceder os espaço e os equipamentos necessários para o experimento de proteômica e à aluna de doutorado Fernanda Sangalli pelo treinamento para realização dos experimentos de 2-DE.

À CAPES pela bolsa concedida, à FAPESP, CNPq e MCT-ProAntar, pelos equipamentos e consumíveis adquiridos.

À Deus por tudo, pela força e pelas pessoas que colocou no meu caminho para concretizar esse trabalho.

Aos meus pais, Armando e Elisabete, por terem me ajudado a ser quem eu sou hoje, por estarem sempre ao meu lado, por toda compreensão, orientação, amizade e amor.

Às minhas irmãs, Carol e Mariana, juntamente com a minha prima-irmã, Maria Lívia, que sempre me deram apoio e carinho em todos os momentos compartilhados, por estarem sempre presentes em minha vida.

Aos meus cunhados, Osvaldo e André, pelo apoio e amizade.

Aos meus sobrinhos, Arthur e Heitor, por trazerem imensa felicidade ao meu mundo.

Ao amigo Maicon por todos os anos de convivência dentro e fora do ambiente de trabalho.

Aos amigos Camila, Mayara, Fábio e Letícia por estarem sempre ao meu lado nos bons e maus momentos, me dando força e apoio.

RESUMO

As leishmanioses atingem milhões de pessoas no mundo e são consideradas uma das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) por afetar, principalmente, as populações dos países em desenvolvimento. Há poucos fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses, os quais são tóxicos e muitas vezes ineficazes devido ao surgimento de cepas resistentes; desta forma, a busca por novos compostos com atividade leishmanicida é justificada. Este trabalho iniciou-se com a triagem de 38 derivados chalcônicos, os quais foram avaliados quanto ao seu potencial leishmanicida e citotóxico. O derivado chalcônico T10 foi efetivo em ensaios utilizando formas promastigotas ($IC_{50}=3,4\ \mu M$) e em formas amastigotas intracelulares ($IC_{50}=4,7\ \mu M$), apresentando uma promissora atividade biológica e exibindo bom índice de seletividade ($SI=41,0\ \mu M$). Portanto, este foi selecionado para realização de ensaios preliminares de análise de perfil proteico (eletroforese bidimensional) para fins de compreensão de mecanismo de ação do composto. Foi possível observar mudanças mais significativas na expressão de sete *spots* diferentes após tratamento com T10, os quais tiveram suas expressões aumentadas ou diminuídas quando comparados ao controle (sem tratamento).

ABSTRACT

Leishmaniasis affects millions of people worldwide and is considered one of Neglected Tropical Diseases (NTDs) by affecting mainly the populations in developing countries. There are few drugs available for the treatment of leishmaniasis, which are toxic and often ineffective due to the emergence of resistant strains, thus the search for new compounds with leishmanicidal activity is justified. This work was initiated with the screening of 38 chalcone derivatives, which were evaluated for their leishmanicidal and cytotoxic potential. The chalcone derivative T10 was effective in assays using promastigotes forms ($IC_{50} = 3.4 \mu M$) and against intracellular amastigotes forms ($IC_{50} = 4.7 \mu M$), showing a promising biological activity and exhibiting a good selectivity index ($SI = 41.0 \mu M$). Thus, this chalcone was selected to conduct preliminary tests of protein profile analysis (two-dimensional electrophoresis) to understand the mechanism of action of the compound. It was possible to observe more significant changes in the expression of seven different *spots* after treatment with T10, which had their expression increased or decreased compared to the control (no treatment).

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reação de geral de Claisen-Schmidt para obtenção de benzalafenona (chalcona)

Esquema 2: Reação geral de Claisen-Schmidt para obtenção de chalconas mono- e diidroxiladas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial de leishmaniose cutânea em 2009

Figura 2: Distribuição mundial de leishmaniose visceral em 2009

Figura 3: Ciclo biológico de *Leishmania* sp

Figura 4: estrutura da chalcona

Figura 5: Curva de crescimento em meio LIT de *L. amazonensis* (■). O número de parasitos foi estimado pela contagem das células vivas em câmara de Neubauer, dia a dia, partindo-se de uma cultura 2×10^5 células/mL

Figura 6: Estrutura dos derivados chalcônicos utilizados nesse trabalho

Figura 7: Estrutura química da chalcona 2,3-diidroxichalcona

Figura 8: Estrutura da chalcona T1 e seus derivados sintéticos do grupo 1

Figura 9: Estrutura da chalcona T1 e seus derivados sintéticos do grupo 2

Figura 10: Estrutura da chalcona T1 e seus derivados sintéticos do grupo 3

Figura 11: Estrutura da chalcona T1 e seus derivados sintéticos do grupo 4

Figura 12: Estrutura da chalcona T1 e seus derivados sintéticos do grupo 5

Figura 13: Estrutura da chalcona T1 e seus derivados sintéticos do grupo 6

Figura 14: Estrutura da chalcona T1 e seus derivados sintéticos do grupo 7

Figura 15: Estrutura da chalcona T1 e seus derivados sintéticos do grupo 8

Figura 16: Eletroforese 2-DE. Extratos protéicos de leishmanias cultivadas apenas em meio de cultura LIT (A) ou em meio de cultura LIT com 3,4 μ M de T10 (B) foram obtidos e separados em eletroforese 2-DE, na faixa de pH 3-7, para avaliação de proteínas diferencialmente expressas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses

Tabela 2: Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) de 2,3-diidroxichalcona ($\text{DMSO}-d_6$)

Tabela 3: Atividade leishmanicida e citotóxica da chalcona (T1) e seus derivados em μM

Tabela 4: Atividade leishmanicida e citotóxica de macrófagos peritoneais da chalcona (T1) e seus derivados em μM

Tabela 5: Ensaio em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, em μM

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt – Acetato de Etila

CCDA – Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CCDP – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CC-FN – Cromatografia em Camada de Fase Normal

IC₅₀ – Concentração Inibitória necessária para matar ou inibir 50% das células em estudo

CoA – Coenzima A

DO – Densidade Ótica

Hex – Hexano

IS – Índice de Seletividade (razão entre o valor de IC₅₀ obtido no ensaio de citotoxicidade pelo IC₅₀ obtido no ensaio leishmanicida utilizando formas promastigota)

MTT – (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

m/v – relação massa/volume

PMS – Phenazine Methosulfate

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SAR – Structure-activity relationship

SDS – solution of sodium dodecyl sulfate

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. A doença	21
1.2. Epidemiologia.....	22
1.3. Morfologia e Ciclo de Vida	23
1.4. Terapêutica	25
1.4.1. Antimoniais pentavalentes.....	27
1.4.2. Anfotericina B	27
1.4.3. Miltefosina.....	28
1.4.4. Paromomicina.....	28
1.4.5. Pentamidina	28
1.5. Produtos Naturais, Derivados sintéticos e Busca de Novos Fármacos	29
1.5.1. Chalconas	30
1.6. Investigação mecanística e estudos de proteômica.....	32
2. OBJETIVOS	34
2.1. Objetivos específicos.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Síntese.....	36
3.1.1. Síntese de benzalafenona (chalcona).....	36
3.1.2. Síntese de chalconas mono- e diidroxiladas	36
3.2. Purificação	38
3.2.2. Purificação de chalconas diidroxiladas.....	38
3.3. Linhagens e manipulação de células	38
3.3.1. Linhagens	38
3.3.2. Meios de cultura	39
3.3.3. Cultura de <i>L. amazonensis</i>	39
3.3.4. Criopreservação	39
3.3.5. Curva de crescimento de <i>L. amazonensis</i>	40
3.3.6. Cultivo de macrófagos murinos J774.A1	41
3.3.7. Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss.....	41
3.3.8. Ensaio biológico para determinação de atividade leishmanicida em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	42
3.3.9. Determinação da citotoxicidade	43
3.3.10. Avaliação in vitro da atividade antiparasitária contra formas amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	44
3.3.11. Análise proteica por eletroforese bidimensional	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49

4.1. Chalconas	50
4.2. Identificação estrutural da chalcona 2,3-diidroxichalcona (T31).....	52
4.3. Avaliação da atividade leishmanicida e citotóxica.....	53
4.4. Relação estrutura-atividade	58
4.4.1. Grupo 1	58
4.4.2. Grupo 2	59
4.4.3. Grupo 3	60
4.4.4. Grupo 4	61
4.4.5. Grupo 5	61
4.4.6. Grupo 6	62
4.4.7. Grupo 7	63
4.4.8. Grupo 8	63
4.5. Proteômica comparada	65
5. CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	66
ANEXOS	72

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. A doença

As leishmanioses são doenças mundialmente difundidas e afetam, principalmente, populações pobres e marginais na América Latina, África e Ásia, negligenciadas pela indústria farmacêutica e pelos governos (Sulsen, Frank et al., 2008). O agente etiológico dessa parasitose pertence ao gênero *Leishmania* ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Cerca de 30 espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos estão divididas, de acordo com (Lainson e Shaw, 1987) em:

- (i) espécies que apresentam parte de seu desenvolvimento na porção média e anterior do tubo digestivo do flebotomíneo hospedeiro – classificadas como sub-gênero *Leishmania* (*Leishmania*);
- (ii) espécies que possuem uma fase adicional em seu desenvolvimento na porção posterior do tubo digestivo do flebotomíneo – classificadas como sub-gênero *Leishmania* (*Viannia*).

As diferentes espécies desse parasito são responsáveis por manifestações clínicas e epidemiológicas diferentes e, por esse motivo, são consideradas entidades nosológicas distintas, podendo ser reunidas em quatro grupos:

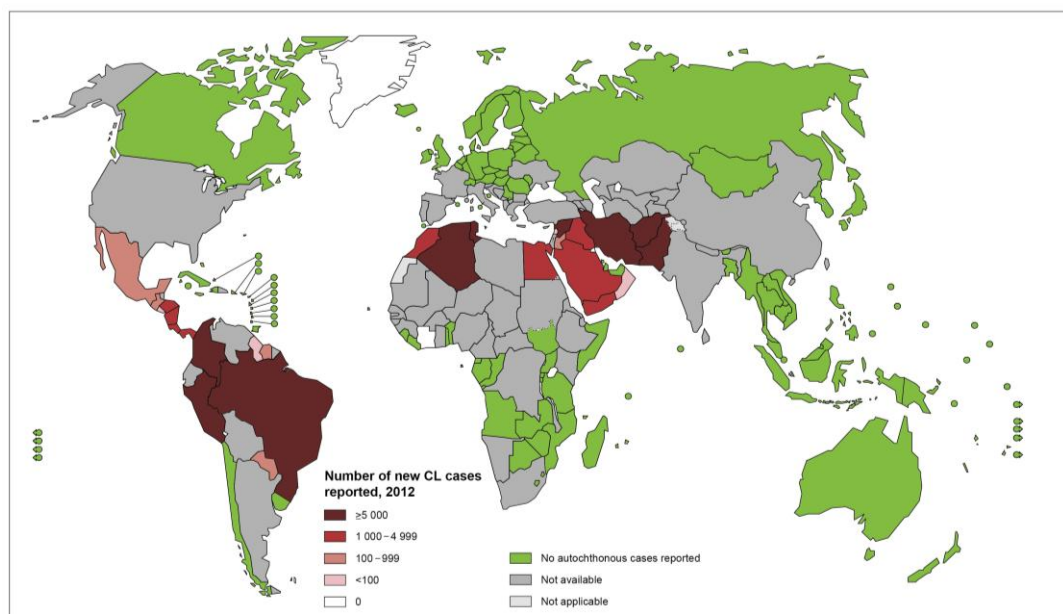
- (i) formas que produzem lesões exclusivamente cutâneas, com aparência ulcerativa arredondada, com borda emoldurada e fundo granuloso, manifestação denominada leishmaniose cutânea;
- (ii) formas tegumentares que se complicam, havendo o aparecimento de lesões destrutivas nas mucosas do nariz, palato, boca e faringe, constituindo a leishmaniose mucocutânea;
- (iii) formas que acometem as vísceras, apresentando tropismo pelo sistema monocítico fagocitário do baço, fígado, medula óssea e dos tecidos linfóides, causando hepatoesplenomegalia, constituindo a leishmaniose visceral;
- (iv) formas que produzem lesões cutâneas difusas, onde as lesões aparecem em surtos periódicos, culminando com a

presença de nódulos múltiplos e ricos em parasitos e que surgem tardiamente em pacientes infectados – essa manifestação é chamada de leishmaniose cutânea difusa.

1.2. Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial da Saúde, as leishmanioses estão distribuídas em 98 países ao redor do mundo e afetam 12 milhões de pessoas, colocando em risco outras 350 milhões aproximadamente. A forma cutânea da doença é mais amplamente distribuída ao redor do mundo, sendo Síria, Argélia, Colômbia, Afeganistão, Brasil, Irã, Sudão do Norte, Costa Rica, Etiópia e Peru os países mais afetados, representando 75% da incidência dos casos. (figura 1). No Brasil foram relatados 26 mil casos anuais entre 2003-2007, com estimativas de ocorrência anual de 72 a 119 mil casos (WHO, 2010).

Figura 1: Distribuição mundial de leishmaniose cutânea em 2012

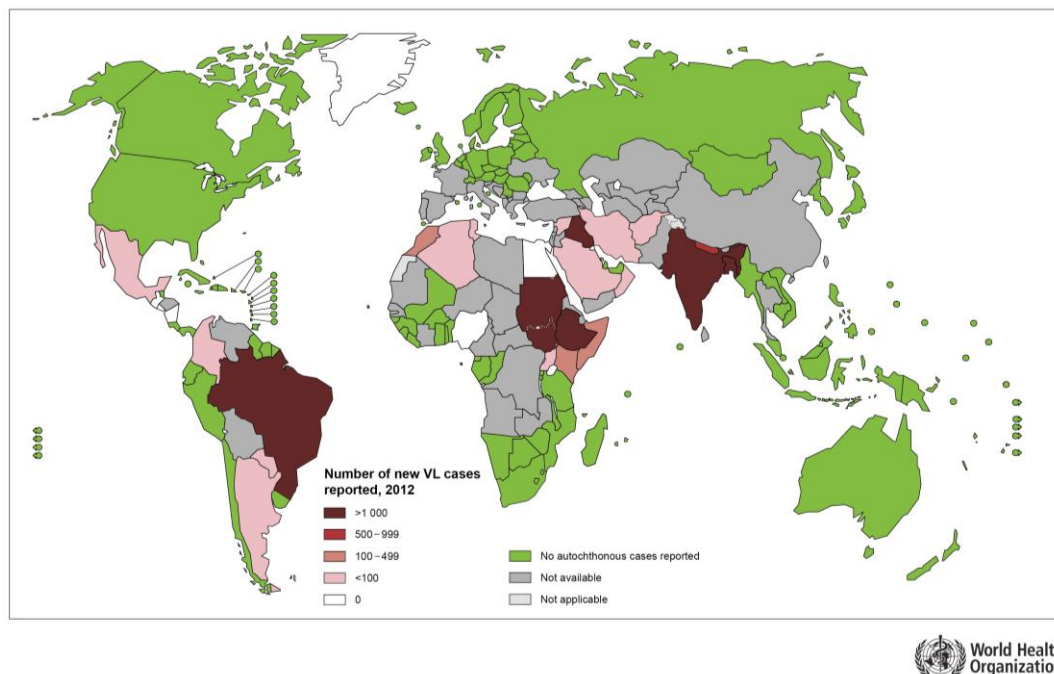


Adaptado de WHO, 2012a

No caso de leishmaniose visceral, 90% dos casos ocorrem com maior frequência em Bangladesh, Índia, Sudão, Brasil e Etiópia (WHO, 2011). Mais de 500 mil casos novos de leishmaniose visceral são relatados todos os anos

com estimativa de 59 mil mortes predominantemente na Índia, Bangladesh, Nepal e Sudão (figura 2) (Matlashewski, et al., 2011).

Figura 2: Distribuição mundial de leishmaniose visceral em 2012



Adaptado de WHO, 2012b

Além dos casos normalmente relatados, atualmente as leishmanioses pertencem ao quadro de doenças oportunistas em pacientes infectados com HIV (Santos, et al., 2013).

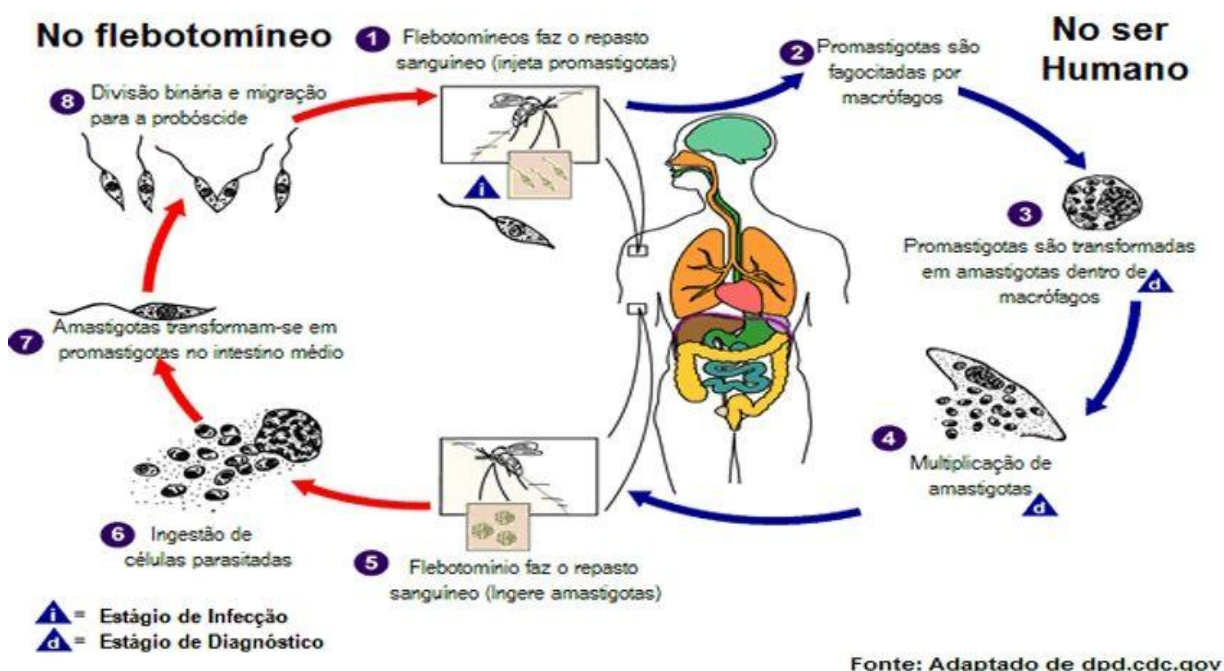
1.3. Morfologia e Ciclo de Vida

O ciclo de vida das diversas espécies de *Leishmania* é iniciado no trato digestivo de fêmeas do inseto flebotomíneo, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Formas promastigotas não-infectivas, também denominadas procíclicas, aderem-se à membrana peritrófica do trato digestivo do inseto, e diferenciam-se em formas infectivas, denominadas metacíclicas, que perdem a capacidade de aderência por modificação das moléculas de lipofosfoglicano (LPG) da superfície do parasito e, assim, migram para as glândulas salivares (figura 3) (Theodos, et al., 1991; Pimenta, et al., 1992).

Promastigotas metacíclicas são transferidas para a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado durante a picada do flebotomíneo que, ao mesmo tempo em que suga, injeta saliva que contém diversas substâncias farmacologicamente ativas de função conhecida ou não, cuja finalidade primeira é melhorar a captação do alimento por efeitos anticoagulante e de vaso dilatação local, e, indiretamente, melhorando o poder de infecção do parasito (Theodos, et al., 1991; Charlab, et al., 1999).

No hospedeiro definitivo, as formas promastigotas metacíclicas interagem com células fagocitárias, especialmente macrófagos, via receptores de membrana (CR1 e CR3) e são por eles fagocitadas de modo a evitar a explosão oxidativa. Para isso, moléculas de superfície – tais como glicoproteína gp63 e LPG – ligadas à superfície do parasito por âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), desempenham um papel fundamental no processo de adesão à célula hospedeira (Silva, et al., 1989; Wright e Silverstein, 1983). Uma vez internalizadas, as formas promastigotas dos parasitos passam a residir dentro de vacúolos parasitóforos, diferenciando-se em amastigotas. Após extensa multiplicação das formas amastigotas via divisão binária, a célula parasitada rompe-se e os parasitos são liberados e, novamente fagocitados por outros macrófagos. O ciclo de vida do parasito se completa quando um inseto ingere macrófagos parasitados (Marsden, 1979; Desjeux, 1996).

Figura 3: Ciclo biológico de *Leishmania* sp



1.4. Terapêutica

As leishmanioses são doenças que fazem parte de um grupo de condições crônicas e debilitantes que afetam milhões de pessoas nos países em desenvolvimento (Zhang et al., 2010). São consideradas doenças negligenciadas porque os investimentos em pesquisa e desenvolvimento, geralmente, não revertem em crescimento e ampliação de acesso a novos medicamentos, testes diagnósticos e vacinas (Zucca, 2013). Um aspecto adicional que contribui para a manutenção dessa situação diz respeito à baixa prioridade recebida por essas doenças no âmbito das políticas em saúde pública (Werneck et al., 2011).

O tratamento das leishmanioses depende de diferenças específicas na sensibilidade às drogas e eficácia dos medicamentos entre as áreas geográficas de ocorrência dessa parasitose (WHO, 2011). Alguns fármacos, como, por exemplo, a pentamidina, são usados somente na América do Sul (tabela 1). A seguir, serão descritos os diferentes fármacos utilizados atualmente, bem como os problemas a eles associados, demonstrando a necessidade de desenvolvimento de novas moléculas com atividade leishmanicida.

Tabela 1: Medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses

Fármaco	Propriedades e administração	Comentário
Estibogluconato de sódio (Pentostam, SSG) e antimoniato de meglumina (glucantime)	Complexos organometálicos em formas poliméricas. Pentostam contém cerca de 33% e Glucantime cerca de 28% de antimonial pentavalente, intravenoso ou intramuscular	Para LV e LC. Há resistência ao fármaco na Índia. Resposta variável em diferentes espécies que causam LC. Estibogluconato de sódio genérico (SSG) tornou tratamento mais barato
Anfotericina B (Fungizone)	Antibiótico polieno, produto de fermentação de <i>Streptomyces nodus</i> , intravenoso	Para LV, LC e formas complexas de LC, por exemplo, leishmaniose mucocutânea. Tem sido medicamento de primeira linha para a LV na Índia, onde há resistência antimonial
Amfotericina B lipossomal (AmBisome)	Lipossomo unilamelar, intravenoso	Provou ser a formulação lipídica mais eficaz para LV. Também é usado para formas complexas, como PKDL e leishmaniose mucocutânea
Miltefosina	Hexadecilfosfocolina, oral	Primeiro fármaco oral para LV. Também eficaz contra algumas espécies que causam LC. Contraindicado na gravidez, e teratogênico em ratos.
Paromomicina	Aminoglicosídeo (também conhecido como aminosidina ou monomicina), produto de fermentação de <i>Streptomyces rimosus</i> . Fornecido como sulfato. Intramuscular para VL e tópica para CL	Registrado para LV na Índia, completou ensaios de fase III para LV na África Oriental, onde é menos eficaz no Sudão. Formulação tópica (12%) com cloreto de metila disponível para LC. Tópica com gentamicina e surfactantes em fase III.
Anfotericina B formulações	Formulação lipídica, intravenoso	Outras formulações lipídicas, incluindo Abelcet, Amphocil, Amphotul e lipossomas multilamelares têm estado em estudos clínicos, principalmente para LV.
Pentamidina	Diamidina, como sal de isetionato, intravenoso	Para formas específicas de LC somente na América do Sul

LC, leishmaniose cutânea; PKDL, leishmaniose dérmica pós calazar; LV, Leishmaniose visceral

Fonte: Adaptado de Croft, 2011

1.4.1. Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes, estibogluconato de sódio (pentostam®) e antimoniato de meglumina (glucantime®), foram desenvolvidos há mais de 60 anos. Esses fármacos são tóxicos e apresentam problemas relacionados a longos períodos de tratamento, o que frequentemente causa dor local e efeitos colaterais sistêmicos como: náuseas, vômitos, fraqueza, diarreia, cólica abdominal, erupções cutâneas (Zucca, 2013). Apesar de terem sido desenvolvidos há décadas, ainda são utilizados como fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses (Croft, 2011), mesmo diante de inúmeros relatos de casos de resistência a eles (Torres, 2013; Perry, 2013; Kazemi-Rad, 2013; Fernandez, 2012). Em termos de mecanismo de ação, o composto pentavalente pode ser reduzido a um composto trivalente no interior do macrófago (Singh, 2012); outra possibilidade para explicar a ação desses compostos no parasito pode envolver a inibição da glicólise, ou o metabolismo da glutatona e tripanotona (Seifert, 2011).

1.4.2. Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico poliênico extraído da bactéria *Streptomyces nodosus*, geralmente utilizado como fármaco de segunda escolha no tratamento das leishmanioses (Seifert, 2011). Apesar de sua eficácia, o fármaco apresenta toxicidade e efeitos colaterais como febre alta com calafrios, miocardite, hipocalcemia severa, disfunção renal e pode levar o paciente a óbito. Por esses fatores exige um acompanhamento de perto com necessidade de hospitalização (Sundar, 2006). Foram desenvolvidas formulações lipídicas (Ambisome®, Amphocil™ e Abelcit®) que se mostraram eficazes e menos tóxicas quando comparadas à anfotericina B.

O mecanismo de ação desses poliênicos pode estar relacionado com a inibição da ligação da *Leishmania* spp ao macrófago, consequência da ligação do fármaco com o ergosterol, que pode causar danos à membrana plasmática do parasito (Singh, 2012).

1.4.3. Miltefosina

Primeiramente desenvolvida na década de 80, para uso em pacientes com câncer, é o único fármaco oral para tratamento de *Leishmania* (Dorlo, 2012). Atualmente é utilizada no tratamento de leishmaniose visceral em países como Índia, Bangladesh e Nepal, e como segunda escolha na Colômbia e Bolívia. Efeitos colaterais foram observados, principalmente, no trato gastrointestinal (Croft, 2011), mas também pode causar enjojo, vômito e diarreia, esses efeitos foram observados principalmente na primeira semana de tratamento (Dorlo, 2012).

O mecanismo de ação foi identificado nos parasitos, vinculando sua atividade para apoptose e vias de sinalização, modificando células dependentes de lipídeos (Dorlo, 2012).

Uma limitação que ocorre para esse fármaco é sua contraindicação durante a gravidez, devido aos efeitos teratogênicos observados em estudos pré-clínicos (Seifert, 2011).

1.4.4. Paromomicina

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídico que pode ser usado tanto no tratamento da forma cutânea quanto na forma visceral da doença. É mais eficaz no tratamento da leishmaniose cutânea e seu uso é restrito a áreas endêmicas (Singh, 2012).

Apesar de efeitos colaterais como ototoxicidade e nefrotoxicidade terem sido relatados, esses foram baixos no tratamento da forma visceral (Seifert, 2011).

O mecanismo de ação ainda não foi elucidado, mas uma ligação com o glicocálix de *Leishmania* sugere a mitocôndria como alvo (Singh, 2012).

1.4.5. Pentamidina

A pentamidina é uma diamidina aromática usada geralmente como fármaco de segunda escolha no tratamento das leishmanioses. A preocupação para o uso desse fármaco é que pode induzir a diabetes

mellitus, dependente de insulina. Na Índia, seu uso já foi abandonado (Seifert, 2011).

Acredita-se que o fármaco consegue entrar nas formas promastigotas e amastigotas de leishmania por um processo mediado por um transportador que reconhece diamidinas com elevada afinidade. Esse fármaco pode estar envolvido na ligação e desintegração do DNA do cinetoplasto, sendo a mitocôndria do parasito um alvo importante da pentamidina. Também pode atuar como inibidor de topoisomerase I, uma enzima envolvida na modulação de energia nuclear e DNA do cinetoplasto (Coelho, et al 2008).

Em combinação com alopurinol, a pentamidina foi testada em pacientes resistentes a antimônios, e essa combinação se mostrou mais eficaz e menos tóxica (Singh, 2012).

Dessa forma, a quimioterapia das leishmanioses baseia-se, principalmente, em fármacos desenvolvidos há mais de 60 anos, tóxicos, muitas vezes ineficazes devido à circulação de cepas resistentes e, exceto para a miltefosina, são todos administrados por via parenteral, o que requer hospitalização. Faz-se necessária a busca por novos fármacos que apresentem baixa toxicidade e poucos (ou nenhum) efeitos colaterais indesejados.

Como o Brasil possui uma grande diversidade vegetal, é uma ótima fonte para busca de novos fármacos, e a partir dessas fontes naturais a obtenção de derivados sintéticos se faz possível.

1.5. Produtos Naturais, Derivados sintéticos e Busca de Novos Fármacos

O Brasil é líder em todos os níveis de biodiversidade: espécie, genética e ecossistemas. Um décimo de todas as espécies do mundo está representado na floresta amazônica (Junqueira, 2012). Entretanto, apenas 15 a 17% foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal. Dessas, apenas 8% foram avaliadas em suas propriedades terapêuticas (Phillipson, 2001). Tal diversidade de espécies vegetais tem despertado enorme interesse de indústrias e de grupos de pesquisa direcionados ao desenvolvimento de

novos produtos. Os medicamentos de origem natural formaram a base da atenção à saúde desde os primórdios da humanidade e a despeito do progresso do setor de origem sintética verificado nos últimos anos, o papel que essa fonte natural vem desempenhando é incontestável.

Dentre as diversas classes químicas, os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, sendo amplamente distribuídos no reino vegetal, sobretudo em angiospermas revelando uma enorme diversidade estrutural (Simões, 2011). Diversas funções são atribuídas aos flavonoides em plantas, tais como: proteção dos vegetais contra incidência de raios ultravioleta; proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização e inibidores enzimáticos (Harbone e Williams, 2000); além disso, esta classe de compostos apresenta uma importância farmacológica muito grande devido à grande variedade de atividades biológicas amplamente relatadas na literatura, tais como: atividade antileishmania, antifúngica, antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante, (Marín, 2013; Yazaki, 2009). Considerando os 4.200 flavonoides já identificados, esses são classificados como chalconas, flavonóis, flavonas, catequinas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides (Rodriguez, et al., 2001).

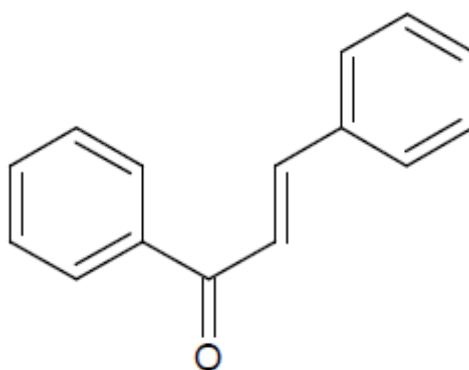
As chalconas constituem um dos mais diversos compostos com ampla distribuição entre os vegetais, sobretudo em flores de Asteraceae, Oxalidaceae e Acanthaceae, nas quais apresentam importante contribuição para pigmentação amarela. Em conjunto às auronas e diidrochalconas, as chalconas compreendem mais de 900 decorrências de todos os flavonoides descritos na literatura (Andersen, 2006).

1.5.1. Chalconas

Chalconas são compostos de cadeia aberta (figura 4), que participam da rota biossintética dos demais flavonoides, que após sua condensação a partir de unidades de p-cumaroil - CoA e três unidades de malonil – CoA sofrem uma ciclização espontânea conduzindo à formação da naringerina, um composto flavonoídico da subclasse das flavanonas (Simões, 2011).

Chalconas apresentam uma diversidade estrutural no reino vegetal e amplo espectro de atividades biológicas. Estudos realizados por Brandão e colaboradores (2010) relatam a presença de 2'-hidroxi-4',6'-dimetoxichalcona e 2',4'-diidrox-3',6'-dimetoxichalcona em extratos de *Polygonum spectabile* (Polygonaceae), para o qual apresentaram atividade antibacteriana e antiviral (Brandao, et al., 2010). Também foram observadas atividades antiprotozoárias em diversas moléculas de chalconas. Ajaiyeoba e colaboradores (2013) relataram a presença de atividade antimalárica para a chalcona extraída da planta *Cajanus cajan* (Ajaiyeoba, et al., 2013). Ramírez e colaboradores (2003) testaram a atividade de uma chalcona-flavona (2 -(4-hidroxi-3-metoxifenil) -7- (4-metoxifenil)-6 -(2-hidroxi-4, 6-dimetoxibenzoil)-furano [3,2-g] benzopirano-4-ona) em espécies de *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi* (Ramírez, 2003). Sen e Chatterjee (2011) estudaram a atividade de diversas chalconas em espécies de *Leishmania*, com destaque para a licochalcona A, extraída da planta licorice, que pode atuar na cadeia respiratória do parasita (Sen e Chatterjee, 2011).

Figura 4: estrutura da chalcona



O amplo espectro de atividades biológicas registrados em chalconas estimulou diversos estudos de síntese e modificações estruturais de inúmeros substituintes nos anéis A e B com o intuito de avaliar os efeitos que tais alterações provocam na atividade farmacológica (Cara, et al., 2009; Batovska, et al., 2009; Vogel, et al., 2010).

Tadigoppula e colaboradores (2013) testaram uma série de chalconas preniladas e cromeno chalconas com várias modificações nos anéis A e B,

para atividade antimalária, obtendo bons resultados para compostos com grupos hidroxila na posição 3 (Tadigoppula, 2013).

1.6. Investigação mecanística e estudos de proteômica

Estudos proteômicos vêm sendo utilizados para a compreensão de aspectos básicos ou aplicados referentes aos parasitos do gênero *Leishmania*. As abordagens incluem a compreensão de diferentes processos celulares, tais como diferenciação promastigota/amastigota (Rosenzweig, et al., 2008), a caracterização de antígenos imunodominantes (Dea-ayuela, et al., 2006) e mecanismos de ação e/ou resistência a drogas (Drummelsmith, et al., 2003). A possibilidade de se explorar diferentes bancos de dados com as sequências genéticas disponíveis de *Leishmania* sp e outros tripanossomatídeos (vide www.genedb.org e eupathdb.org) traz à tona informações relevantes sobre o metabolismo e de seus hospedeiros, apontando diferenças bioquímicas existentes entre ambos (genômica comparada). Essa avalanche de informações, portanto, pode revelar potenciais alvos terapêuticos para o desenvolvimento de fármacos altamente seletivos, efetivos e seguros para o tratamento das leishmanioses.

Um exemplo recente da compreensão mecanística de um fármaco anti leishmania refere-se à paromomicina, abordado no trabalho de Chawla, et al. (2011). Nesse estudo, a comparação do perfil de expressão proteica de cepas sensíveis e resistentes ao fármaco trouxe novos elementos para a proposição de um modelo de mecanismo de ação envolvendo a inibição de síntese proteica, devido à interação composto-ribossomos do parasito, com consequente aumento no processo de tradução da cepa resistente. Matrangolo e colaboradores (2013) avaliaram mecanismos de resistência ao antimônio em cepas de *Leishmania donovani* sensível e resistente e observaram que os parasitas resistentes apresentaram alterações nos níveis de proteínas associadas com vias metabólicas importantes como a via glicolítica (Matrangolo, 2013).

Desta forma a proteômica constitui-se uma possível abordagem para investigar mecanismos de ação dos compostos que apresentem alguma atividade biológica (avaliação de proteínas diferencialmente expressas)

podendo fornecer indicações sobre os mecanismos moleculares de ação do(s) composto(s) bem como possíveis inferências sobre função da(s) proteína(s) identificada(s) quando se tratar de fases abertas de leitura (ORF(s)) de função desconhecida, contribuindo, assim, para a compreensão de aspectos moleculares básicos dos organismos em estudo.

O tipo de metodologia utilizada é que vai ser responsável pela velocidade, resolução e informação dos resultados. Existem diferentes técnicas de estudos proteômicos tais como aquelas que utilizam gel, matrizes de anticorpos, ensaios de microesferas e metodologias à base de espectrometria de massas. A técnica de eletroforese bidimensional que envolve a separação de proteínas de acordo com sua massa molecular e carga (2-DE) vem sendo amplamente utilizada (Bowser, 2009).

2. OBJETIVOS

O objetivo dessa proposta for avaliar a potencial atividade leishmanicida de derivados chalcônicos; além disso, utilizando uma abordagem proteômica, iniciar estudos de mecanismo(s) molecular(es) pelo(s) qual(is) o(s) o derivado chalcônico T10 modula a atividade leishmanicida.

2.1. Objetivos específicos

1. Avaliar uma série de derivados chalcônicos quanto à atividade leishmanicida
 - a. Seleção de um derivado chalcônico com atividade leishmanicida e baixa citotoxicidade, teste de citotoxicidade em macrófagos;
 - b. Atividade leishmanicida em formas promastigotas e amastigotas intracelulares;
2. Perfil protéico (gel bidimensional 2-DE) na presença/ausência do composto sintético selecionado em 1;

MATERIAL E MÉTODOS

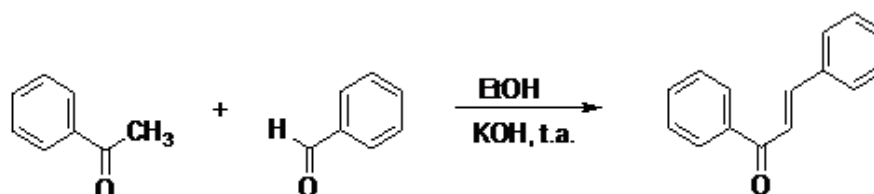
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Síntese

3.1.1. Síntese de benzalafenona (chalcona)

A síntese de benzalafenona foi realizada de acordo com a reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt, utilizando-se acetofenona, benzaldeído, etanol e hidróxido de potássio (Esquema 1) (Climent et al., 2004).

Esquema 1. Reação de Claisen-Schmidt para obtenção de benzalafenona (chalcona)

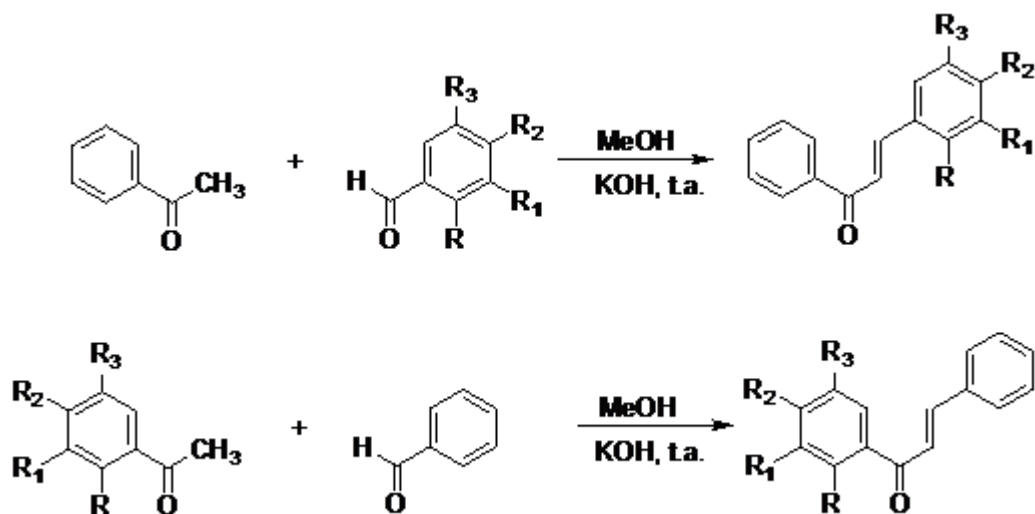


Em um balão reacional sob banho de gelo, 5,0 mL de acetofenona foram dissolvidos em 15 mL de etanol. Em seguida, 25 mL de uma solução contendo 2,5 g de KOH foi lentamente adicionado, mantendo-se agitação constante por 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 6,0 mL de benzaldeído. A reação foi mantida sob agitação por 2 horas em temperatura ambiente, e mantida a temperatura inferior a 10 °C, durante 12 horas. O precipitado formado foi lavado com água gelada e seco à temperatura ambiente.

3.1.2. Síntese de chalconas mono- e diidroxiladas

A síntese de chalconas mono e diidroxiladas foi realizada de acordo com a reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt, utilizando-se diferentes acetofenonas e benzaldeídos, metanol e hidróxido de potássio (esquema 2) (Rao et al., 2004; Satyanarayana et al., 2004).

Esquema 2. Reação geral de Claisen-Schmidt para obtenção de chalconas mono- e diidroxiladas



Em um balão reacional, 5,0 mL (20 mmol) das respectivas acetofenonas foram dissolvidos em 30 mL de metanol. Em seguida, 50 mL de uma solução de KOH 50% (m/v) foram lentamente adicionados, mantendo-se agitação constante por 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 20 mmol dos respectivos aldeídos solubilizados em 10 mL de MeOH, e a reação foi mantida à temperatura ambiente sob agitação constante durante 48 horas.

Após esse período, o meio reacional foi transferido para um béquer contendo aproximadamente 400 mL de gelo e 100 mL de água deionizada, sendo mantida sob agitação pouco intensa por 10 minutos. Logo, a mistura foi acidificada com HCl (pH 3). Após essa etapa, observou-se a formação de um precipitado amarelo e a mistura heterogênea foi mantida a 5 °C durante 24 horas, sendo submetida à filtração simples em papel de filtro pregueado. O precipitado formado foi seco em estufa com circulação de ar a 40 °C durante 24 horas e posteriormente purificado por meio de técnicas cromatográficas.

3.2. Purificação

3.2.1. Purificação de chalconas monoidroxiladas

Os produtos brutos foram submetidos à CC-FN, eluídos em Hex:AcOEt, obtendo-se várias frações que foram reunidas segundo o grau de pureza e o fator de retenção, segundo os seus perfis cromatográficos delineados por CCDA.

3.2.2. Purificação de chalconas diidroxiladas

Os produtos brutos foram primeiramente submetidas à CC-FN, eluídos em Hex:AcOEt, obtendo-se várias frações que foram reunidas de acordo com o grau de pureza e o fator de retenção, segundo os seus perfis cromatográficos delineados por CCDA. Após esta etapa, as frações foram submetidas à CCDP, eluídas em Hex:AcOEt de acordo com polaridade de cada substância. Os compostos foram solubilizados em DMSO no momento do uso.

3.3. Linhagens e manipulação de células

3.3.1. Linhagens

A cepa de *L. amazonensis* da linhagem MPRO/BR/1972/M1841-LV-79, foi gentilmente cedida pela Prof. Dra. Beatriz Stoff da Universidade de São Paulo – USP.

A linhagem celular J774.A1 (de macrófagos murinos) foi cedida pela Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP Araraquara.

Utilizou-se-se, também, macrófagos peritoneais extraídos de camundongos Swiss macho com idade entre 50 e 60 dias, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP).

3.3.2. Meios de cultura

- **LIT (Liver Infusion Tryptose)** – Liver Infusion Broth (BD 226920) – 9,0 g, triptose (BD 211713) – 5,0 g, NaCl- 1,0 g, Na₂HPO₄ – 8,0 g, KCl- 4,0 g, glicose – 1,0 g, soro fetal bovino inativado – 100,0 mL, hemina – 10,0 mg, água milli-Q q.s.p - 1L. pH ajustado para 7,2 e esterilizado.

- **RPMI (Gibco®)** – para um litro de meio utilizou-se, uma ampola de meio RPMI 1640 da gibco em pó, 900,0 mL de água destilada, mantida sob agitação constante. Adicionou-se 2,0 g de bicarbonato de sódio e 2,38 g de tampão Hepes. Acertou-se o pH para 7,2 em seguida o meio foi filtrado em fluxo laminar utilizando filtro com membrana de 0,22 µm. Por fim, adicionou-se 100,0 mL de soro fetal bovino e os antibióticos estreptomicina (100.000 µg/L) e penicilina (100.000 U/L).

3.3.3. Cultura de *L. amazonensis*

As culturas de *L. amazonensis* foram mantidas em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em BOD a temperaturas de 26 °C por repiques semanais. Para os ensaios biológicos, utilizou-se cepas recentemente retiradas de hamsters infectados com *L. amazonensis* (até a passagem 3, ou seja, 3 repiques após a retirada dos parasitos dos animais). Para isso, formas promastigotas foram estabelecidas em cultura a partir de aspirado da pata do hamster previamente infectado.

3.3.4. Criopreservação

Após estabelecimento da cultura a partir de hamster infectado, fez-se o congelamento da cepa recém isolada em freezer -80 °C. Para isso:

- a) A amostra isolada foi colocada em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino até alcançar a fase exponencial.
- b) Fez-se uma centrifugação, mantendo a esterilidade, a 2000 rpm por 5min.

c) Ressuspendeu-se o sedimento em meio de congelamento (Meio BHI acrescido de 30% de soro fetal bovino e 10% de glicerol).

d) Homogeneinização e distribuição do preparado nos criotubos (capacidade de 1,5 mL) devidamente identificados.

e) Os criotubos foram submetidos a uma temperatura de -20°C por cerca de 1 hora e depois à -80°C.

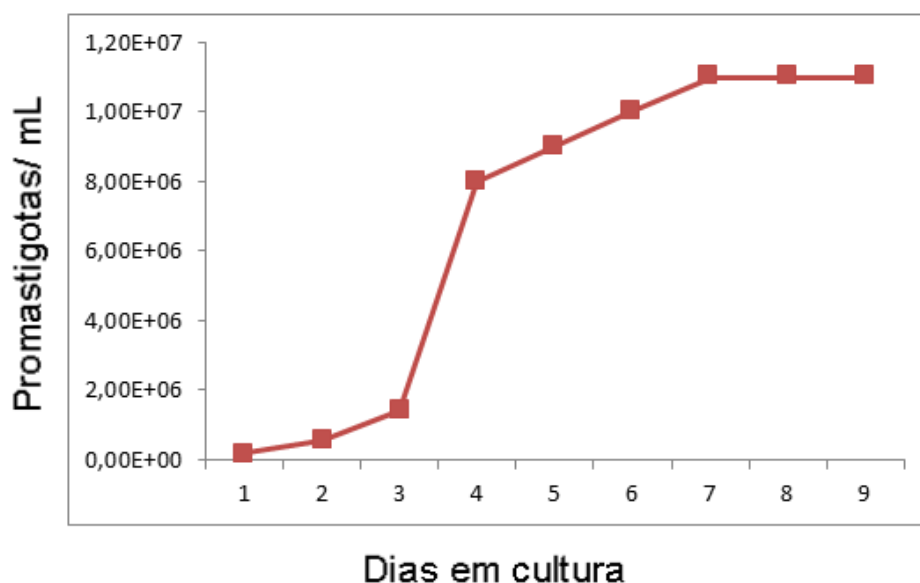
f) A seguir retirou-se um tubo do freezer e esperou-se o descongelamento em temperatura ambiente, o conteúdo do criotubo foi adicionado em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino.

3.3.5. Curva de crescimento de *L. amazonensis*

A curva de crescimento da *L. amazonensis* foi realizada no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara durante 9 dias, até chegar a fase estacionária. Partiu-se de uma cultura de 2×10^5 de leishmanias em 5,0 mL de meio LIT, até atingir a fase estacionária. O monitoramento da cultura foi realizado diariamente, no mesmo horário, utilizando-se câmara de Neubauer.

Para construção da curva, os dados obtidos (nº de promastigotas x tempo de cultivo em dias) foram inseridos no programa Origin® 6.1 (Origin Lab Corporation) para gerar o gráfico abaixo (figura 5).

Figura 5: Curva de crescimento em meio LIT de *L. amazonensis* (■). O número de parasitos foi estimado por meio de contagem das células vivas em câmara de Neubauer, dia a dia, partindo-se de uma cultura 2×10^5 células/mL



3.3.6. Cultivo de macrófagos murinos J774.A1

Os macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em garrafas de cultura celular de 25 cm² (TPP®) em meio RPMI, e mantidos em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Para os repiques e experimentos, as células foram recuperadas por raspagem e mantidas em banho de gelo até o momento do uso.

3.3.7. Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss

Camundongos foram inoculados, intraperitonealmente, com 3,0 mL de solução de tioglicolato de sódio a 3%. Depois de três dias, os animais foram eutanaziados em câmara de CO₂. Após a exposição do peritônio, injetou-se 5,0 mL de tampão fosfato estéril (pH 7,2), realizando-se leve massagem manual. As células foram coletadas do peritônio e transferidas para tubo estéril, mantidos em banho de gelo. Para o preparo da suspensão celular, centrifugou-se três vezes a 200,0 g durante 5 minutos à temperatura

ambiente. As células sedimentadas foram novamente suspensas em meio de cultura RPMI, e mantidas em gelo até o momento do uso.

3.3.8. Ensaio biológico para determinação de atividade leishmanicida em formas promastigotas de *L. amazonensis*

Com o objetivo de avaliar possível atividade leishmanicida dos compostos em estudo, realizou-se o ensaio colorimétrico do MTT. Para isso, foram colocados em placas de 96 poços TPP®, contendo 97 µl de uma suspensão de parasitos (1×10^7 promastigotas/mL) e 3,0 µl dos derivados chalcônicos em diferentes concentrações (100,0 a 0,0122 µg/mL, em diluições seriadas de 1:2). As placas foram incubadas por 72 horas a 26 °C. Ao final da incubação, foram adicionados 10,0 µl de solução MTT/PMS (MTT 2,5 mg/mL; PMS 0,22 mg/mL) em todos os poços e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 75 minutos a 28 °C. Colocou-se então 100,0 µl da solução SDS 10%, HCl 0,01N, incubando-se à temperatura ambiente por 30 minutos, também ao abrigo da luz (Muelas-Serrano *et al.*, 2000).

A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada em espectrofotômetro (leitor de Elisa – Readwell Touch / robonik) a 492nm e os resultados foram obtidos em absorbância. A porcentagem de citotoxicidade (%) foi calculada segundo a equação abaixo

$$\%C = [(Gc - Gp) / Gc] \times 100$$

$$Gc = Ac - Am$$

$$Gp = Ap - Apm$$

Sendo que, **Gc** representa o número de parasitos/mL nos poços controles e **Gp**, o número de parasitos/mL detectados em diferentes concentrações de substâncias. **Ac** corresponde ao valor de absorbância nos poços controle (na ausência de substância) com parasitos; **Am** representa o valor da absorbância nos poços controle (na ausência de substância) sem parasito; **Ap** o valor da absorbância nos testes e **Apm**, o valor da absorbância das diferentes concentrações de substâncias na ausência do parasito. Utilizamos como controle positivo pentamidina. Os resultados foram plotados em gráficos

do Microsoft Excel e o IC₅₀ de cada substância analisada foi determinado por regressão linear.

3.3.9. Determinação da citotoxicidade

3.3.9.1. Macrófagos J774.A1

Para a avaliação da citotoxicidade frente a linhagens de macrófagos J774.A1, foi realizada a remoção do meio de cultura, em seguida as monocamadas celulares foram removidas da garrafa com o auxílio de scraper, e transferidas para tubo cônico de 15 mL. A seguir, as células foram ressuspensas em 1,0 mL de meio RPMI e a concentração das células ajustadas para 1×10^5 células/mL. A viabilidade celular foi avaliada pela adição do corante vital (azul de tripan 0,02%). Duzentos microlitros da suspensão celular foram distribuídos em placas de 96 poços TPP, e incubados a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas. Descarta o sobrenadante da placa e em seguida adiciona 97 µL de RPMI e 3,0 µL dos derivados chalcônicos em concentrações decrescentes (100 a 0,0122 µg/mL, em diluições seriadas de 1:2), diluídos em água estéril, e as células mantidas a 37 °C, 5% de CO₂ por 48 horas. Como controle, foi utilizada a pentamidina. Após a incubação, foram adicionados 10 µL de uma solução de MTT/PMS e a placa novamente incubada a 37 °C, 5% de CO₂ por 75 minutos. A seguir, foram adicionados 100 µL de SDS, e os cristais de formazana solubilizados através de agitação manual. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (leitor de Elisa – Readwell Touch / robonik®) a 540 nm. Os resultados foram expressos em IC₅₀. Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

3.3.9.2. Macrófagos peritoneais

Para determinação da citotoxicidade, também utilizou-se macrófagos peritoneais. Para isso, o número de células foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer utilizando corante Azul de Tripan, sendo ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI – 1640 completo para os testes. Transferiu-se 100 µL dessa suspensão em cada poço da placa (96

poços) de poliestireno estéril. A placa foi incubada em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 4 horas, para aderência dos macrófagos na placa. Após esse período de incubação, o meio foi retirado e, em seguida, adicionou-se 97 µL de meio RPMI e 3,0 µL de cada uma das substâncias em diferentes concentrações (concentrações finais de 100 a 0,0122 µg/mL, em diluições seriadas de 1:2). Como controle foi utilizado o mesmo volume de RPMI completo. A incubação da placa foi feita durante 24 horas (37 °C, 5% de CO₂). Após esse período, 10 µL de uma solução MTT/PMS foram adicionados em cada poço, incubando-se por 75 minutos (37 °C, 5% de CO₂). Após a incubação adicionou-se 100 µL de SDS para solubilizar os cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível a 540 nm (leitor de Elisa – Readwell Touch / robonik). Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

Obs.: Todas as etapas experimentais envolvendo uso de animais estão de acordo com a Comissão de Ética número 53/2012 a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, onde foram realizados todos os experimentos.

3.3.10. Avaliação in vitro da atividade antiparasitária contra formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*

Para a avaliação da atividade antiparasitária contra formas amastigotas intracelulares, foram utilizados macrófagos murinos. A concentração de macrófagos foi ajustada para 1x10⁶ células/mL em meio RPMI suplementado com 20% de SBF. Os macrófagos foram cultivados sobre lamínulas por 4 horas a 37 °C com 5% de CO₂ para adesão das células. Após as 4 horas realizou-se 2 lavagens com PBS (NaCl, NaHPO₄.2H₂O, NaH₂PO₄.H₂O, água destilada, pH 7,2-7,4) estéril.

Formas promastigotas de *L. amazonensis*, cultivadas em meio LIT foram ajustadas para uma concentração cinco vezes maior que a de macrófagos (5:1). Adicionou-se 500 µL da cultura contendo as formas promastigotas a cada poço contendo os macrófagos, e a placa foi novamente incubada por quatro horas. Outras duas lavagens foram feitas, para remoção dos parasitos não internalizados, e 500 µL de meio RPMI foram adicionados e

a placa foi incubada a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas para multiplicação do parasito.

Ao final do período, foram adicionados aos macrófagos infectados, os derivados em concentrações de 100 a 0,3 µg/mL, seguido de incubação por 24 horas a 37 °C com 5% de CO₂ para ação dos compostos. Após as 24 horas, o meio foi removido por aspiração. Adicionou-se aos poços metanol, para fixação das células, seguindo coloração por Giemsa. O experimento foi feito em duplicata e 100 macrófagos foram contados por lamínula.

3.3.11. Análise proteica por eletroforese bidimensional

3.3.11.1. Preparo das amostras (tratamento das células e extração de proteínas)

Os parasitos foram tratados por 72 horas a 28 °C com a substância de interesse nas concentrações correspondente a metade do IC₅₀, uma vez o IC₅₀ e duas vezes o IC₅₀. Passado período de incubação, as culturas foram centrifugadas (3000xg, 5 minutos, 4 °C), o sobrenadante descartado e os *pellets* lavados 3 vezes em tampão de lavagem (100,0 mM de NaCl, 3,0 mM MgCl₂, 20,0 mM Tris-HCl, pH 7,5) para retirada do meio de cultura e, seguido de ressuspensão em 0,5 mL de tampão de lise (7,0 M Uréia, 2,0 M tiouréia, 4% CHAPS, 40 mM Tris) contendo inibidores de proteases (foi utilizado o kit Complete da Roche). A lise dos parasitos se deu por duas horas à temperatura ambiente e rotação constante. As amostras foram centrifugadas (14000xg, 10 minutos, 4 °C) para a retirada de componentes insolúveis e o sobrenadante, contendo as proteínas solúveis, foi armazenado a -80°C até o momento do uso.

3.3.11.2. Dosagem de proteínas

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e as proteínas foram submetidas à dosagem pelo método de Bradford, 1976, utilizando-se reagente Sigma Aldrich segundo as especificações do fabricante.

3.3.11.3. Eletroforese bidimensional (2-DE)

Após a dosagem das proteínas, as amostras foram submetidas à análise por eletroforese bidimensional. Para a primeira dimensão foi utilizado uma unidade de focalização isoeletrica (Ethan IPG phor 3 da GE) e a corrida das amostras foi realizada em uma fita de 13 cm com pH variando entre 3-10 (Immobiline dry strip – GE healthcare). Utilizou-se uma solução de reidratação (Uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2%, IPG buffer 0,5%, bromofenol 1%, água deionizada) para hidratação das fitas que foi deixada durante toda a noite, em seguida foi realizada a focalização isoeletrica com voltagens de 500 a 8000 V durante 6 horas. Então as fitas foram equilibradas por 20 minutos em uma solução de equilíbrio (Uréia 6 M, tris HCl pH 8,8 75 mM, glicerol 29,3%, SDS 2%, água Milli-Q) contendo 1% de DTT. A segunda dimensão, realizada para a separação das proteínas, de acordo com a massa molecular, foi realizada em gel de poliacrilamida 12,5% e em seguida foi feita a coloração por prata.

Os componentes foram primeiramente separados em gel a 10% e em gel de empilhamento a 5% de acrilamida. Para a preparação desses géis foi usada uma solução estoque com 30% por peso de acrilamida e 0,8% por peso de bis-acrilamida. Para o gel de separação a polimerização foi feita em solução com 1,5 M de Tris- HCl, pH 8,8 e 10% de SDS, em presença de 0,1% v/v de N, N,N', N'- tetrametiletilenodiamida (TEMED) e 10% de persulfato de amônio. O gel de empilhamento foi polimerizado em presença de 1,5 M de Tris-HCl pH 6,8 e 10% de SDS, além de 10% de persulfato de amônio e 0,05% v/v de TEMED. Para o preparo da amostra foi utilizado 64 µL da amostra diluído em 14 µL tampão de amostra, que é composto de 1,5 M de Tris-HCl pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,5 M de ditiotreitol e 0,002% de bromofenol. As proteínas foram dissociadas em banho-maria (56 °C) por 3 minutos. A corrida eletroforética foi realizada com tampão composto por Tris 0,075 M, glicina 0,57 M e SDS 0,1%, pH 8,3, e a voltagem utilizada foi 20 mA até a penetração no gel de separação, e a seguir a 90mA até o final do gel.

Os géis foram corados pelo nitrato de prata. Após a corrida eletroforética foi realizada a fixação do gel com ácido tricloroacético a 10% por 30 minutos a 4 °C. A seguir foram realizadas três lavagens de 10 minutos cada com solução de 10% de etanol acrescido de 5% de ácido acético. A

solução oxidante composta por dicromato de potássio e ácido cítrico foi adicionada e deixada em contato com o gel por cinco minutos. A seguir essa solução foi retirada e o gel foi lavado com água Milli-Q, seguido da adição de solução de nitrato de prata e deixada em repouso no escuro por 20 minutos, novamente o gel foi lavado com água Milli-Q por um minuto. Após essa etapa foi adicionada à solução redutora composta por carbonato de sódio e formaldeído, foi observado o aparecimento da cor e o bloqueio da coloração foi feito com solução de ácido acético a 5%. Os géis foram analisados pelo software Image Master 2D platinum V 7.0, para determinar os *spots* com perfis de expressão mais relevantes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses estão distribuídas em 98 países ao redor do mundo e afetam 12 milhões de pessoas, colocando em risco aproximadamente 350 milhões. Só no Brasil foram relatados 26 mil casos anuais entre 2003-2007, com estimativas de ocorrência anual de 72-119 mil casos (WHO, 2010). Apesar de mundialmente difundidas as leishmanioses são negligenciadas pela indústria farmacêutica e pelos governos (Sulsen, Frank *et al.*, 2008). Portanto a busca por novos fármacos se faz urgentemente necessária.

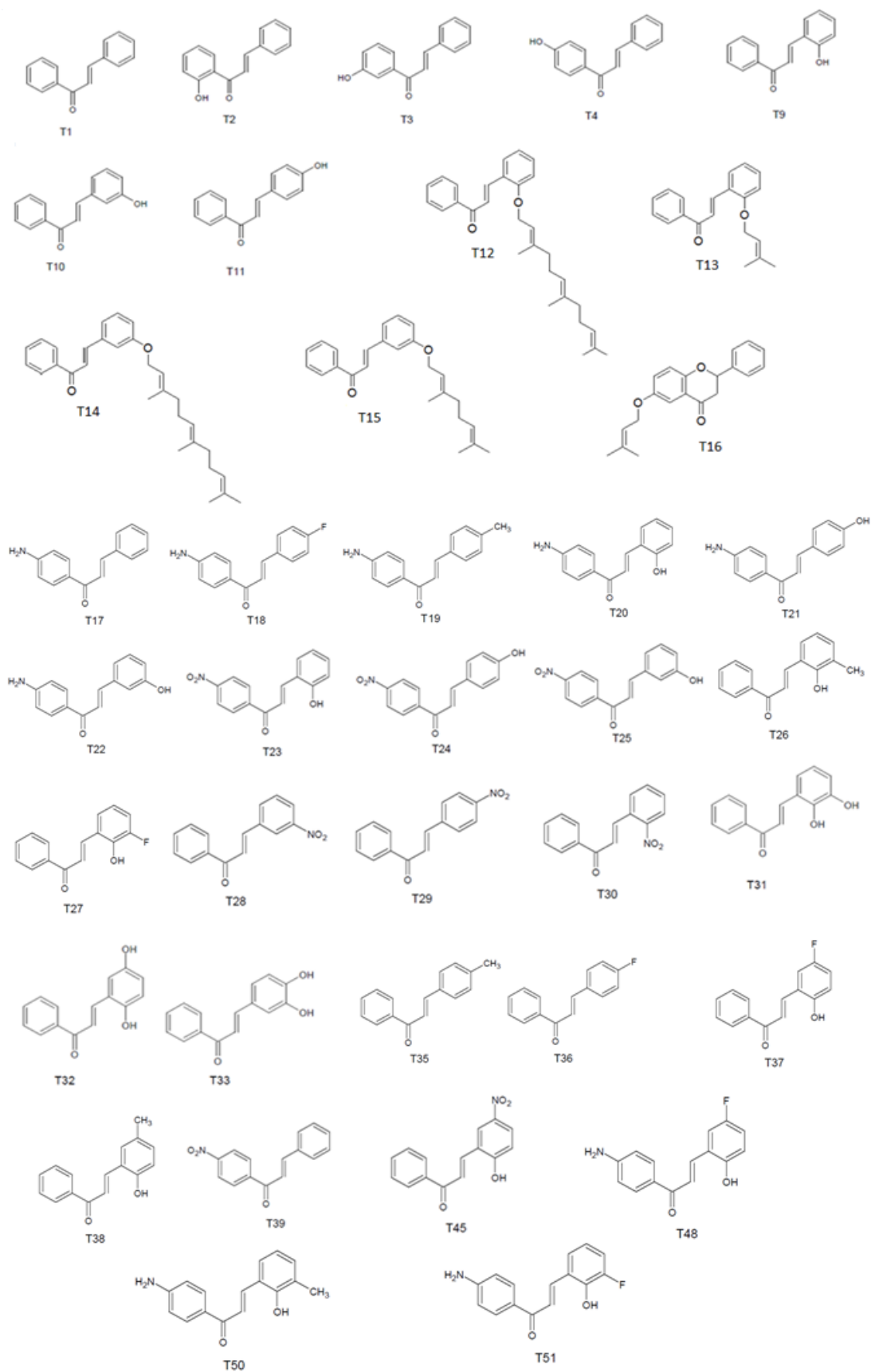
Tendo em vista a busca por novos fármacos, as chalconas apresentam um amplo espectro de atividades biológicas. Estudos realizados por Brandão e colaboradores (2010) relatam a presença de 2'-hidroxi-4',6'-dimetoxichalcona e 2',4'-diidroxi-3',6'-dimetoxichalcona em extratos de *Polygonum spectabile* (Polygonaceae), para o qual apresentaram atividade antibacteriana e antiviral (Brandao *et al.*, 2010). Também foram observadas atividades deletérias sobre protozoários em diversas moléculas de chalconas. Ajaiyeoba e colaboradores (2013) relataram a presença de atividade antimalárica para a chalcona extraída da planta *Cajanus cajan* (Ajaiyeoba, 2013). Ramírez e colaboradores (2003) testaram a atividade de uma chalcona-flavona (2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7-(4-metoxifenil)-6-(2-hidroxi-4,6-dimetoxibenzoil)-furano [3,2-g] benzopirano-4-ona) em espécies de *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi* (Ramírez, 2003). Sen e Chatterjee (2011) estudaram a atividade de diversas chalconas em espécies de *Leishmania*, com destaque para a licochalcona A, extraída da planta licorice. (Sen e Chatterjee, 2011). A literatura mostra que essa classe de compostos é promissora para o desenvolvimento de novos fármacos contra as doenças parasitárias, dessa forma, decidimos explorar uma série de chalconas modificadas estruturalmente. A síntese desses compostos, que foi realizada em parceria com o laboratório de química, proporcionou a obtenção de 38 derivados para posterior avaliação biológica contra a espécie de *Leishmania amazonensis*.

4.1. Chalconas

A chalcona originada pela reação de Claisen-Schmidt (T1) foi modificada estruturalmente dando origem a 38 derivados chalcônicos, sendo 10 inéditos (T12, T13, T14, T15, T16, T26, T27, T45, T50 e T51), com mudanças no anel A e B pela adição de diferentes grupos substituintes (T1 a T51) para avaliar potencial atividade leishmanicida. As modificações envolveram substituição nos anéis por grupos (OH), (NO₂), (NH₂), (CH₃) e/ ou (F), em diversas posições.

Esses derivados foram sintetizados e purificados pelo aluno de mestrado Luiz Antônio Dutra (FCFAR-UNESP) no laboratório de Química Orgânica (NuBBE) do Instituto de Química Unesp Araraquara, sob supervisão do Prof. Dr. Luis Octávio Regasini, exceto T31, que foi ressintetizada e purificada para este estudo, bem como a purificação das substâncias T11, T36, T37, T38, T45 e T51, por CC-FN. Para confirmação da pureza dos derivados, foram realizados experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Figura 6: Estrutura dos derivados chalcônicos utilizados nesse trabalho



4.2. Identificação estrutural da chalcona 2,3-diidroxichalcona (T31)

Identificação estrutural dos dados de RMN da síntese da chalcona diidroxilada realizada de acordo com a reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt. As substâncias foram determinadas por RMN.

Figura 7: Estrutura química da chalcona 2,3-diidroxichalcona

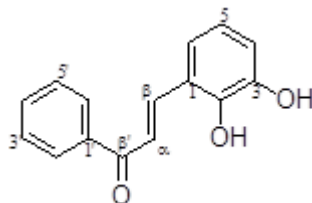


Tabela 2. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) de 2,3-diidroxichalcona ($\text{DMSO}-d_6$) (Kim et al, 2008)

Posição	δ_{C}	δ_{H} ; mult.; J (Hz)
1	118,7	–
2	145,9	–
3	145,7	–
4	117,1	6,86; dd; 1,5 e 7,5
5	121,9	6,70; dd; 7,5 e 7,5
6	119,1	7,31; dd; 1,5 e 7,5
1'	137,9	–
2' e 6'	128,7	8,07; dd; 1,5 e 7,5
3' e 5'	128,2	7,55; dd; 7,5 e 7,5
4'	132,8	7,63; dd; 1,5 e 7,5
α	120,9	8,06; d; 15,5
β	139,9	7,77; d; 15,5
β'	189,6	–
2-OH	-	9,70; sl
3-OH	-	9,13; sl

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 13 sinais, para os quais se destacam em δ_{C} 120,9, δ_{C} 139,9 e δ_{C} 189,6 atribuídos aos carbonos C- α , C- β e C- β' respectivamente. Esses três sinais juntamente com o par de

dubletos em δ_H 8,06 e δ_H 7,77, com constante de acoplamento de 15,5 Hz observados no espectro de RMN de 1H , pode-se evidenciar a presença de uma cetona α,β -insaturada, o que permite caracterizar a substância T31 como pertencente à classe das chalconas. A presença dos singletos observados em δ_H 9,70 e δ_H 9,13 são referentes as hidroxilas do C-2 e C-3, respectivamente, confirmando a obtenção da chalcona 2,3-diidroxichalcona. (Tabela 2).

4.3. Avaliação da atividade leishmanicida e citotóxica

Foram realizados quatro ensaios para triagem da chalcona (T1) e seus derivados, sendo primeiramente avaliados pelo método colorimétrico do MTT, padronizado frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, utilizando o fármaco pentamidina como controle. Os resultados estão mostrados na tabela 3;

Tabela 3: Atividade leishmanicida e citotóxica da chalcona (T1) e seus derivados em μM

Composto	<i>L. amazonensis</i> Promastigota (IC ₅₀)	Macrófagos J774.A1 (IC ₅₀)	Índice de seletividade (SI)
T1	13,2	206,7	15,6
T2	19,0	171,4	9,0
T3	3,5	154,0	44,0
T4	37,2	322,7	8,6
T9	20,0	159,4	7,8
T10	3,4	167,4	49,2
T11	29,5	2232,0	75,6
T12	6,5	233,6	86,5
T13	4,4	77,6	7,2
T14	9,2	71,4	4,4
T15	8,9	89,0	5,1
T16	68,2	285,4	7,4
T17	14,0	269,5	19,2
T18	52,0	2074,6	40,0
T19	35,5	2109,7	59,4
T20	36,0	134,8	3,7
T21	149,0	209,2	1,4
T22	68,1	2092,1	30,7
T23	19,0	28,0	1,5
T24	113,0	367,2	3,2
T25	13,3	1858,7	139,7
T26	0,2	91,0	455,0
T27	2,8	58,0	20,7
T28	0,7	1976,2	2823,1
T29	1,5	1976,3	1317,5
T30	4,7	217,1	46,1
T31	10,1	127,0	12,5
T32	13,6	82,6	6,0
T33	15,8	117,0	7,4
T35	62,1	402,1	6,5
T36	52,1	442,4	8,5
T37	15,3	136,0	8,9
T38	0,8	365,6	457,0
T39	37,4	395,5	10,5
T45	2,5	98,0	38,9
T48	16,6	267,4	16,1
T50	256,5	395,2	1,5
T51	29,6	194,5	6,5
Pentamidina	6,7	12,6	1,9

No ensaio utilizando formas promastigotas de *L. amazonensis* para determinação da atividade leishmanicida dos derivados chalcônicos (T2 a T51), tabela 3, as chalconas T3, T10, T12, T13, T26, T27, T28, T29, T30, T38

e T45 apresentaram valores de IC₅₀ menores que aquele obtido para a pentamidina (6,7uM), nas condições utilizadas neste estudo. Destaca-se os compostos T26, T28 e T38, os quais apresentaram valores de IC₅₀ submicromolares (0,2; 0,7 e 0,8uM) sendo pelo menos oito vezes mais eficazes que o fármaco controle, pentamidina.

Dando sequência ao rastreamento, foi realizado o ensaio de citotoxicidade frente à linhagem de macrófagos J774.A1. Os resultados estão apresentados na tabela 3. Todos os compostos apresentaram valores de IC₅₀ maiores que aquele da pentamidina, mostrando serem menos citotóxicos quando comparados ao controle, como pode ser exemplificado com os derivados T11, T18, T19, T22, T25, T28 e T29, os quais apresentaram valores de IC₅₀ pelo menos 147 vezes maiores quando comparados à pentamidina.

Com os resultados do ensaio utilizando formas promastigotas e citotoxicidade em macrófagos J774.A1, foi possível determinar os valores de IS (Índice de Seletividade), que consiste na razão entre o IC₅₀ para macrófagos e IC₅₀ para protozoários. O IS determina o quanto uma molécula é seletiva para o parasito, e consequentemente, apresenta baixa citotoxicidade para a célula hospedeira (tabela 3). Para este estudo, consideramos resultados promissores os que tiveram o IS > 10. Análise do IS mostrou que 17 derivados chalcônicos T3, T10, T11, T12, T17, T18, T19, T22, T25, T26, T27, T28, T29, T30, T31, T38 e T39 são mais seletivos para o parasito quando comparado à pentamidina.

Inicialmente, utilizaríamos os macrófagos J774.A1 para infecção parasitária e obtenção de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* para avaliar a atividade leishmanicida dos compostos mais promissores. No entanto, não foi possível conseguir alta taxa de infecção dessas células. Desta forma, foi necessário trabalhar com macrófagos peritoneais, mais adequados para ensaios de infecção. Assim, os compostos também foram testados em ensaio de citotoxicidade frente a essa linhagem de macrófagos. Verificou-se que os macrófagos peritoneais são mais sensíveis aos compostos quando comparados aos macrófagos J774.A1, tabela 4.

Tabela 4: Atividade leishmanicida e citotóxica de macrófagos peritoneais da chalcona (T1) e seus derivados em μM

Composto	<i>L. amazonensis</i> Promastigota (IC ₅₀)	Macrófagos Peritoneal (IC ₅₀)	Índice de seletividade
T1	13,2	9,5	0,7
T2	19,0	70,6	3,7
T3	3,5	69,7	20,0
T4	37,2	139,5	3,7
T9	20,0	143,0	7,1
T10	3,4	143,0	41,0
T11	29,5	328,2	11,1
T12	6,5	140,6	21,6
T13	4,4	111,3	25,4
T14	9,2	55,1	6,0
T15	8,9	81,9	9,2
T16	68,2	327,9	4,8
T17	14,0	34,6	2,4
T18	52,0	199,3	3,8
T19	35,5	191,3	5,3
T20	36,0	18,6	0,5
T21	149,0	37,3	0,2
T22	68,1	71,6	1,0
T23	19,0	84,4	4,4
T24	113,0	224,0	1,9
T25	13,3	213,6	16,0
T26	0,2	207,5	1013,3
T27	2,8	114,0	40,5
T28	0,7	16,2	21,0
T29	1,5	17,1	11,4
T25	4,7	109,1	23,0
T31	10,1	nd	nd
T32	13,6	51,2	3,7
T33	15,8	108,3	6,8
T35	62,1	255,9	4,1
T36	52,1	17,8	0,3
T37	15,3	163,4	10,6
T38	0,8	107,5	134,7
T39	37,4	250,0	6,6
T45	2,5	131,0	51,7
T48	16,6	62,0	3,7
T50	256,5	nd	nd
T51	29,6	nd	nd
Pentamidina	6,7	35,6	5,3

nd: não determinado

Como os macrófagos peritoneais apresentaram diferentes níveis de tolerância frente aos derivados chalcônicos, quando comparados à linhagem

J774.A1, apenas nove derivados (T3, T10, T12, T26, T27, T28, T30, T38, T45) apresentaram IC_{50} superior ao controle e $IS > 10$. Não foi possível determinar os valores de IC_{50} das chalconas T31, T50 e T51 devido a problemas experimentais.

Pelo fato de amastigotas serem as formas responsáveis pela determinação da doença, constitui-se no principal alvo de ação terapêutica. Assim, para o último experimento da triagem, o ensaio para avaliar a ação das chalconas contra as formas amastigotas intracelulares, foi realizado utilizando somente as moléculas com IS acima de 10. Importante notar que algumas moléculas que não apresentaram IC_{50} menor que o controle foram, mesmo assim, avaliadas nos ensaios sobre formas amastigotas para fins de discussão de estrutura atividade das chalconas preniladas (artigo em preparação).

Tabela 5: Ensaio em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, em μM

Composto	IC_{50}	IS
T3	4,8	14,5
T10	4,7	30,4
T11	27,0	12,1
T12	2,9	48,4
T13	19,9	5,5
T14	21,8	2,5
T15	25,8	3,1
T16	76,1	4,3
T25	39,0	5,4
T26	nd	nd
T27	19,4	5,8
T28	nd	nd
T29	nd	nd
T30	nd	nd
T38	4,9	21,9
T45	nd	nd
Pentamidina	6,2	5,7

O derivado T10 apresentou uma interessante atividade leishmanicida contra formas promastigotas ($IC_{50} = 3,4 \mu M$), amastigotas intracelulares ($IC_{50} = 4,7 \mu M$) e baixa citotoxicidade ($IS = 41$). Desta forma, esta molécula foi selecionada para análise proteômica para estudos preliminares de

mecanismos de ação. Apesar da molécula T12 ter apresentado IC₅₀ menor que T10, esta não foi selecionado por haver pouca quantidade disponível.

4.4. Relação estrutura-atividade

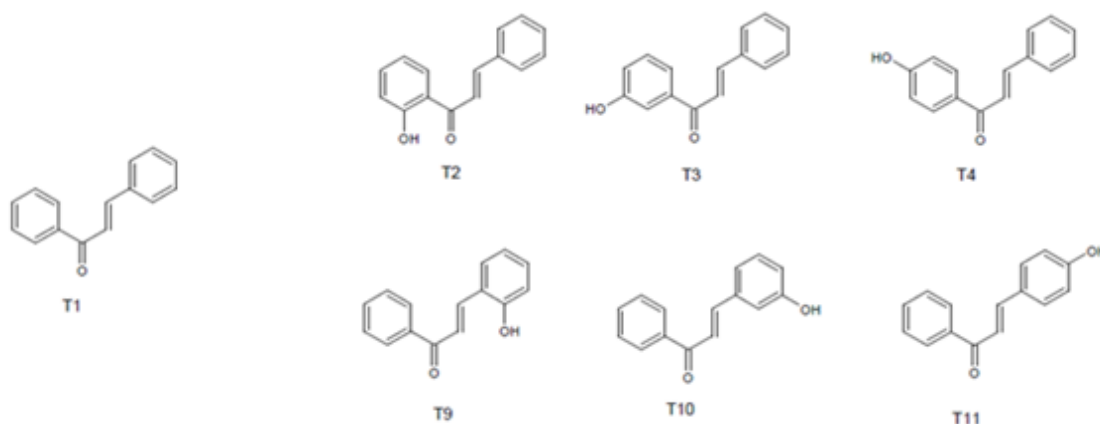
Para estudo de relação estrutura-atividade, as chalconas foram divididas em 8 grupos, de acordo com a modificação estrutural realizada nos anéis.

4.4.1. Grupo 1

As chalconas do grupo 1 são aquelas que apresentam uma hidroxila no anel A ou B, nas posições 1, 2 ou 3 (T1, T2, T3, T4, T9, T10, T11).

No ensaio contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, as chalconas T3 (hidroxila adicionada na posição 3 do anel A) e T10 (hidroxila adicionada na posição 3 do anel B) apresentaram um IC₅₀ de aproximadamente 3,4 µM, atividade cerca de 4 vezes maior que aquela obtida para a chalcona T1 (IC₅₀=13,2 µM; IS=0,7). Quando o grupo hidroxila foi adicionado na posição 2 no anel A (T2; IC₅₀=19,0 µM, IS= 3,7) ou do anel B (T9; IC₅₀=20,0 µM; IS= 7,1), ocorreu uma diminuição na atividade desses derivados de pelo menos 5 vezes em relação a T3 (IC₅₀=3,5 µM; IS=20) e T10 (IC₅₀=3,4 µM; IS=41). Esses dados sugerem que a hidroxila como substituinte na posição 3, tanto do anel A quanto do anel B pode ser responsável pela atividade observada. A síntese de um novo derivado com os substituintes na posição 3 de ambos anéis será importante para avaliar a atividade da molécula.

Figura 8: Estrutura da chalcona T1 e seus derivados sintéticos do grupo 1

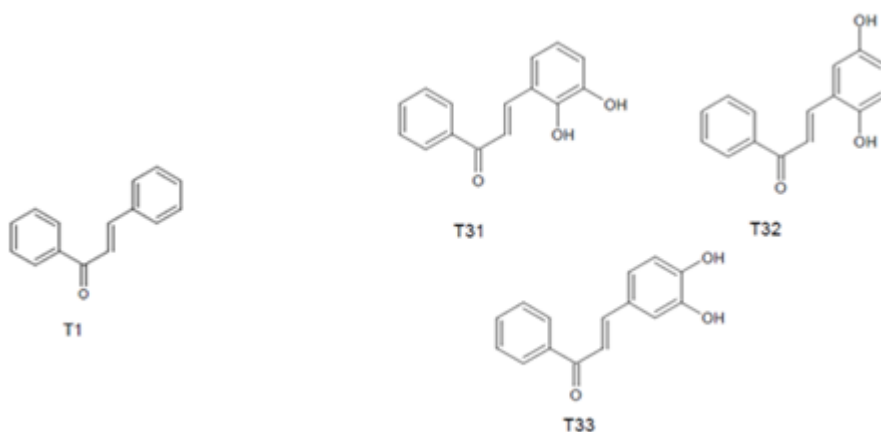


4.4.2. Grupo 2

Para as chalconas do grupo 2, foram adicionados dois grupamentos hidroxila no anel B, variando entre as posições 2 a 5.

Para a atividade das chalconas testadas sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, a adição das duas hidroxilas foi pouco efetiva para aumentar essa atividade, sendo que para as chalconas T31 ($IC_{50}=10,1 \mu M$), T32 ($IC_{50}=13,6 \mu M$; $IS=3,7$) e T33 ($IC_{50}=15,8 \mu M$, $IS=6,8$), a única que apresentou um valor de IC_{50} menor que o de T1 ($IC_{50}=13,2 \mu M$) foi a molécula T31, com os grupos hidroxila adicionados nas posições 2 e 3.

Figura 9: Estrutura da chalcona T1 e seus derivados sintéticos do grupo 2



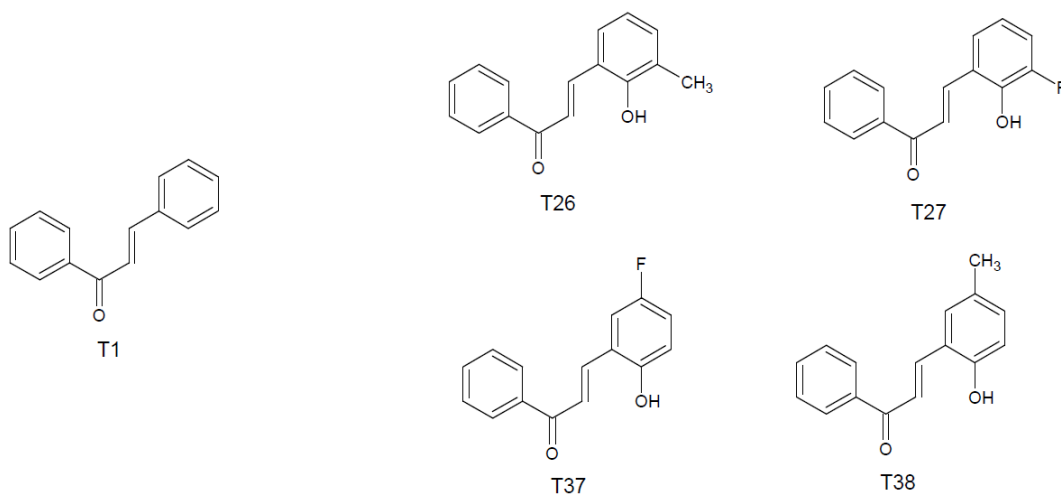
4.4.3. Grupo 3

A modificação estrutural do grupo 3 consistiu na adição de um grupo hidroxila na posição 2 do anel B nas 4 moléculas. Em duas chalconas foi adicionado um grupo F nas posições 3 e 5 e para os outros dois derivados foi adicionado um grupo CH₃, também nas posições 3 e 5.

Quando essas chalconas foram testadas contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, as moléculas com o grupo CH₃ T26 (IC₅₀=0,2 µM, IS=1013,3) e T38 (IC₅₀=0,8 µM; IS=134,7), foram as que se mostraram mais ativas, sendo a chalcona T26 – grupo CH₃ posição 3 - aquela que apresentou um valor de IC₅₀ 66 vezes mais eficaz que T1 (IC₅₀=13,2 µM).

Quando o grupo F foi adicionado na posição 3 do anel B, molécula T27 (IC₅₀=2,8 µM, IS=40,5), houve uma pequena diminuição na atividade quando comparado com T26 e T38, mas, ainda assim, a chalcona se mostrou quase cinco vezes mais efetiva que T1. Para a molécula T37 (IC₅₀=15,3 µM, IS=10,6), com o grupo F adicionado na posição 5 do anel B, a atividade foi pior que para T1.

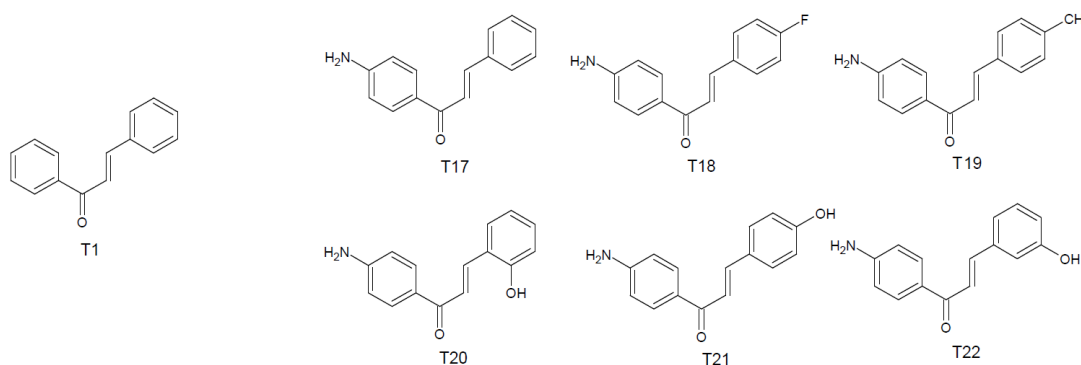
Figura 10: Estrutura da chalcona T1 e seus derivados sintéticos do grupo 3



4.4.4. Grupo 4

A adição de um grupo NH_2 no anel A da molécula chalcona, causou diminuição considerável da atividade leishmanicida desses derivados. Apenas T17 ($\text{IC}_{50}=14,0 \mu\text{M}$; $\text{IS}=2,4$) apresentou um resultado similar a T1 ($\text{IC}_{50}=13,2 \mu\text{M}$; $\text{IS}=13,2$). T21 ($\text{IC}_{50}=149,0 \mu\text{M}$) foi 11 vezes menos ativo que T1, sugerindo que a adição do grupo hidroxila na posição 4 é a responsável por essa diminuição. A baixa atividade também foi observada no grupo 1, vide derivados T4 e T11 cujo substituinte é um grupo OH também na posição 4.

Figura 11: Estrutura da chalcona T1 e seus derivados sintéticos do grupo 4



4.4.5. Grupo 5

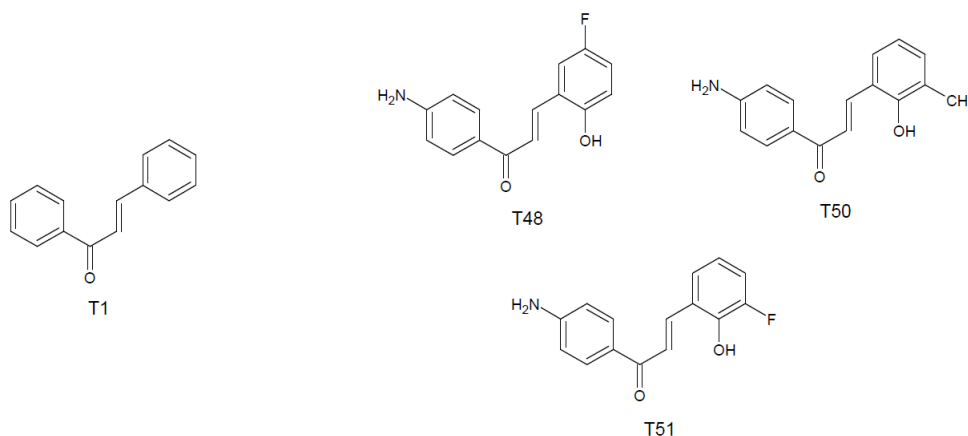
No grupo 5 foram adicionados o substituinte NH_2 no anel A na posição 4 e, no anel B, OH na posição 2; além disso, ainda no anel B, foram adicionados um grupo F, posições 3 ou 5, ou CH_3 na posição 3.

É possível que a presença do grupo NH_2 no anel A tenha levado à diminuição da atividade parasitária dos derivados T48 ($\text{IC}_{50}= 16,6 \mu\text{M}$), T50 ($\text{IC}_{50}= 256,5 \mu\text{M}$) e T51 ($\text{IC}_{50}=29,6 \mu\text{M}$) quando avaliados contra formas promastigotas de *L. amazonensis* uma vez que T26 ($\text{IC}_{50}=0,2 \mu\text{M}$), que não possui NH_2 no anel A, posição 4, apresenta atividade cerca de 1000 vezes maior que T50.

Para T48 ($\text{IC}_{50}=16,6 \mu\text{M}$) e T51 ($\text{IC}_{50}=29,6 \mu\text{M}$), a atividade também diminuiu, quando comparadas com T37 ($\text{IC}_{50}=15,3 \mu\text{M}$) e T27 ($\text{IC}_{50}=2,8 \mu\text{M}$)

respectivamente. Todas as chalconas do grupo 5 foram pelo menos uma vez menos ativas que a chalcona T1.

Figura 12: Estrutura da chalcona T1 e seus derivados sintéticos do grupo 5

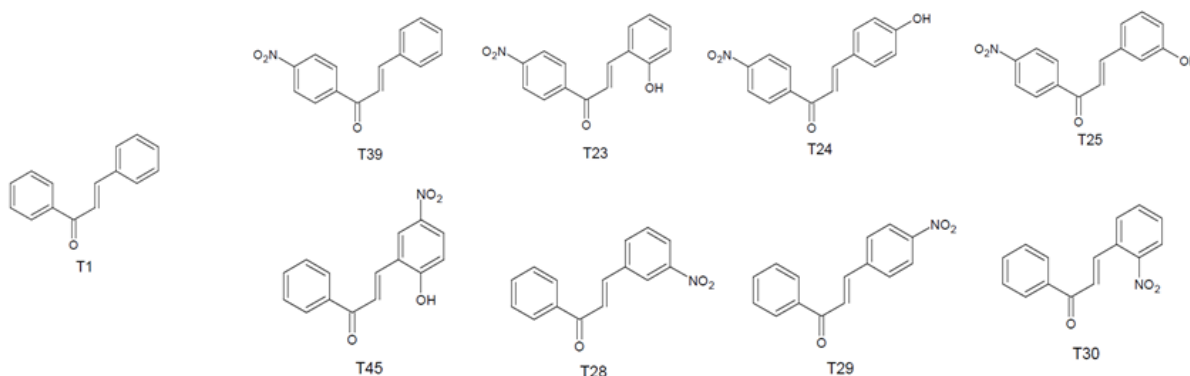


4.4.6. Grupo 6

A adição apenas do grupo NO₂ no anel B como nos derivados T28 a T30, proporcionou aumento significativo na atividade, sendo T28 (IC₅₀=0,7 μM; IS=21,0) o que apresentou melhor atividade, com o grupo nitro na posição 3. A molécula T28 apresentou IC₅₀ 18 vezes melhor que T1 (IC₅₀=13,2 μM; IS=0,7).

Nas moléculas T39, T23, T24 e T25, além do grupo NO₂ no anel A também foram adicionados um grupo OH no anel B. Para promastigotas, em relação à molécula T39 (IC₅₀=37,4 μM; IS=6,6), T23 (IC₅₀=19,0 μM; IS=4,4) e T25 (IC₅₀=13,3 μM; IS=16) tiveram atividade leishmanicida melhorada, possivelmente, em função da presença do grupo OH no anel B, posições 2 e 3; o mesmo não foi observado para T24 (IC₅₀=113,0 μM; IS=1,9) quando o OH foi adicionado à posição 4 do anel B, a atividade pode ter sido diminuída nos derivados T39, T23, T24 e T25, devido à adição do grupo nitro no anel A, e não pela adição do grupo hidroxila no anel B, pois na molécula T45 (IC₅₀=2,5 μM; IS=51,7), onde temos um grupo hidroxila na posição 2 e um nitro na posição 5 do anel B, a molécula é quase tão ativa quanto T28.

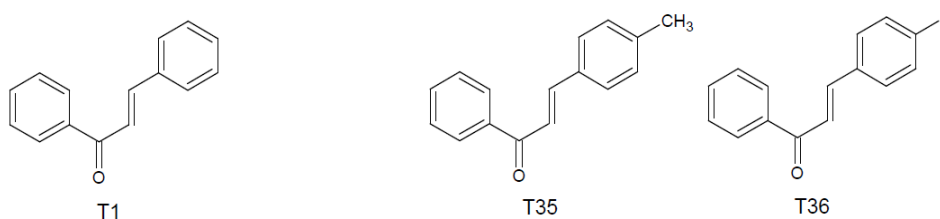
Figura 13: Estrutura da chalcona T1 e seus derivados sintéticos do grupo 6



4.4.7. Grupo 7

No grupo 7 foi adicionado à molécula um substituinte CH₃ (T35; IC₅₀=62,1 μM; IS=4,1) ou F (T36; IC₅₀=52,1 μM; IS=0,3), ambos na posição 4 do anel B. A adição desses substituintes não favoreceu a atividade da chalcona, ocorrendo uma diminuição na atividade de pelo menos 4 vezes em comparação a T1 (IC₅₀=13,2 μM; IS=0,7).

Figura 14: Estrutura da chalcona T1 e seus derivados sintéticos do grupo 7



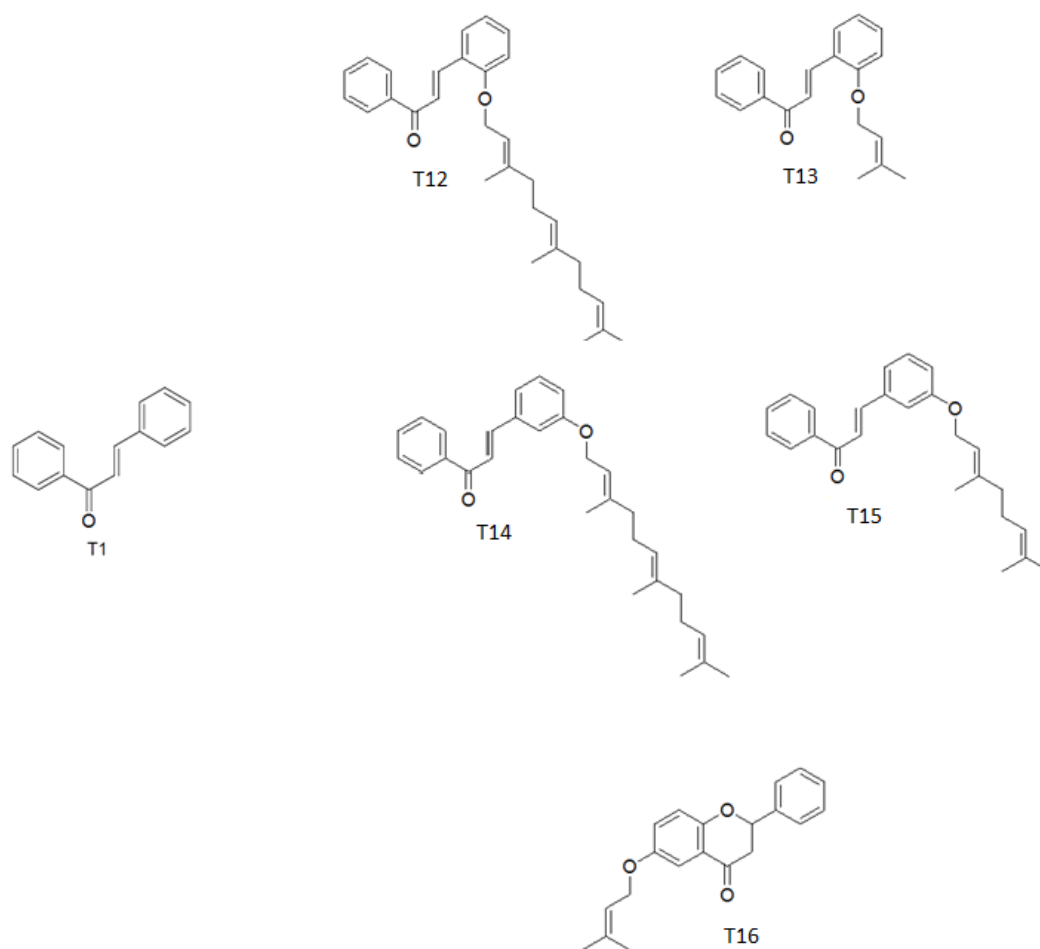
4.4.8. Grupo 8

No grupo 8 foi adicionado à molécula chalcona um grupamento *O*-prenil, variando a posição e o anel.

O grupo *O*-prenil, quando adicionado na posição 2 do anel B, mostrou melhores resultados no ensaio utilizando as formas promastigotas de *L.*

amazonensis, como pode ser visto para T12 (IC_{50} =6,5 μ M; IS=88,5) e T13 (IC_{50} =4,4 μ M; IS=10,4). Quando esse grupo foi adicionado na posição 3 (T14; IC_{50} =9,25 μ M; IS=3,4 e T15; IC_{50} =8,92 μ M; IS=4,6), a atividade piora um pouco, e por fim quando adicionado no anel A (T16; IC_{50} =68,2 μ M; IS=8,5), a atividade cai pelo menos 7 vezes em comparação com as outras duas moléculas que possuem o grupo na posição 3 do anel B e pelo menos 5 vezes em comparação com T1 (IC_{50} =13,2 μ M; IS=0,7).

Figura 15: Estrutura da chalcona T1 e seus derivados sintéticos do grupo 8



4.5. Proteômica comparada

O primeiro mapa proteômico de *Leishmania* foi publicado em 1980 (Handman, et al., 1981; Handman, et al., 1983; Saravia, et al., 1984), um pouco antes de o termo proteômica ser adotado pela comunidade científica (Wasinger, et al. 1995). Handman, 1983 bem como Saravia, 1984 e colaboradores investigaram diferenças entre espécies e fatores de virulência (Handman, et al., 1981; Handman, et al., 1983; Saravia, et al., 1984). No entanto, naquele tempo, nenhuma proteína foi identificada porque a tecnologia de espectrometria de massas ainda não havia sido desenvolvida para identificação de macromoléculas e, além disso, o genoma de *Leishmania* ainda não havia sido sequenciado. Assim, identificação de proteínas baseava-se apenas na metodologia de Degradação de Edman. Desde então, um grande número de mapas proteômicos passaram a ser produzidos. Por exemplo, Brobey e colaboradores produziram mapas protéicos com 1650 e 1530 *spots* de *L. amazonensis* e *L. major*, respectivamente, e mostraram que 4 desses *spots* estavam presentes apenas em *L. amazonensis*. (Brobey, et al., 2006). Similarmente, Gongora e colaboradores produziram um mapa 2-DE de promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) panamensis* e identificaram *spots* específicos para cada espécie. Esses *spots* foram analisados por espectrometria de massas, identificando-se duas isoformas da proteína hsp70, além da chaperonina hsp60, a proteína ribossomal S12, entre outras (Gangora, et al., 2003). No entanto, foi apenas após o sequenciamento do genoma das espécies de *L. major* (Ivens, et al., 2005), *L. infantum* e *L. braziliensis* (Peacock, et al., 2007), que foi possível avançar na identificação de *spots* de proteínas excisados de géis 2-DE. Diante do exposto, optou-se por adotar uma abordagem proteômica, baseada na técnica 2-DE para obtenção de dados que possam ajudar a compreender o mecanismo de ação dos derivados chalcônicos mais promissores para o tratamento de leishmanioses.

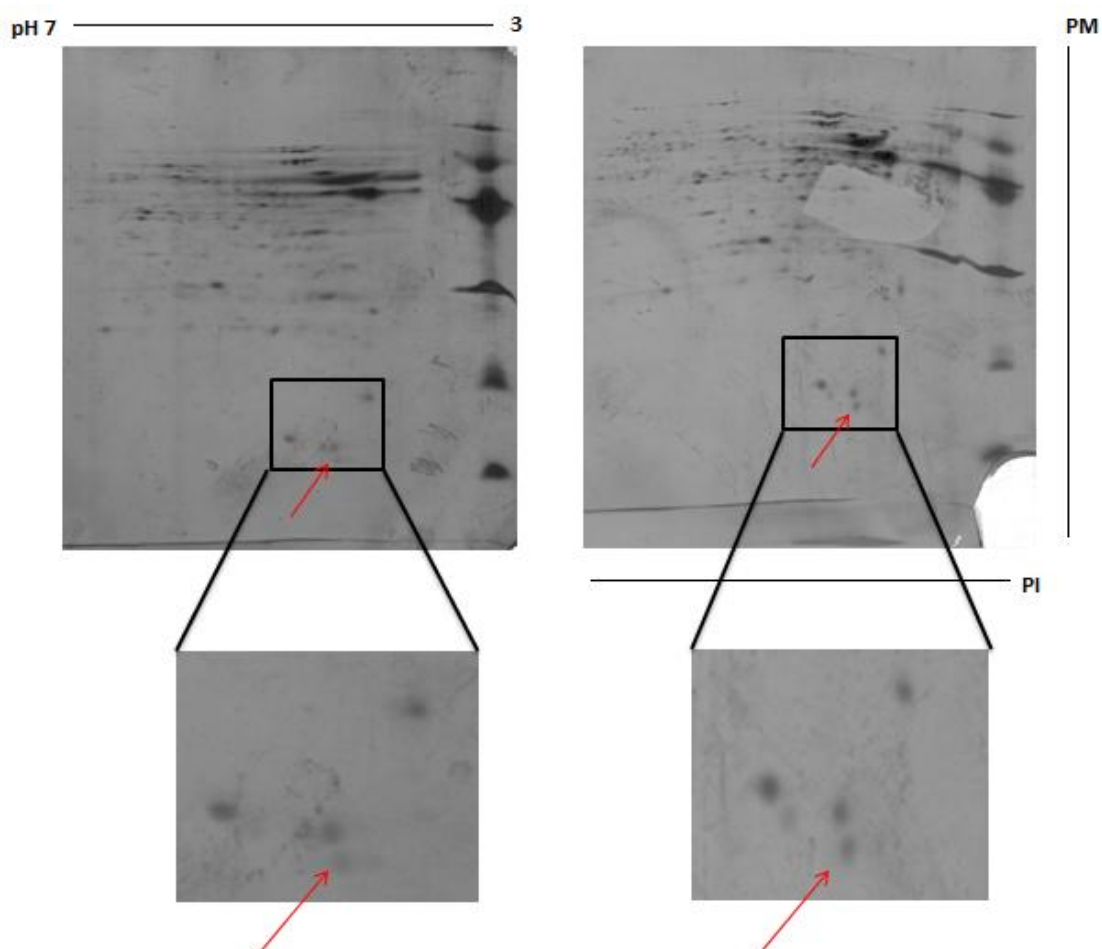
Após a avaliação da atividade leishmanicida dos diferentes derivados chalcônicos, bem como o potencial citotóxico contra células de mamíferos, selecionamos a molécula T10, que apresentou boa atividade biológica nos ensaios contra formas promastigotas ($IC_{50}=3,4 \mu M$, $IS=41$), amastigotas

intracelulares ($IC_{50}=4,7 \mu M$, $IS=30,4$) e baixa citotoxicidade, como pode ser verificado pelos valores de $IS >10$. Além disso, essa seleção foi pautada no fato desse composto, ao contrário de outros derivados que também apresentaram boa atividade antiparasitária, apresentar um bom rendimento em sua síntese. O critério rendimento é fundamental para que seja possível prosseguir no estudo desse composto em análises moleculares para estabelecimento de mecanismos de ação, bem como nos estudos futuros de avaliação da atividade leishmanicida *in vivo*.

Com a finalidade de compreender o mecanismo de ação do composto T10 ao nível molecular, iniciou-se a investigação do perfil protéico do par leishmania tratada com T10/ -não tratada com T10. Para isso, promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivados em meio LIT na presença de T10 na concentração correspondente a uma vez IC_{50} , ou seja, $3,4 \mu M$. Como controle, foi utilizado promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em LIT na ausência de T10. Os extratos proteicos preparados foram separados individualmente por 2-DE para comparação e avaliação de proteínas diferencialmente expressas em relação às células não tratadas. Para a primeira dimensão, foi usado uma faixa de pH entre 3 e 7, para tentar obter uma boa separação dos spots. A figura 16 mostra dois géis 2-DE. Em relação ao gel 2-DE obtido a partir do extrato proteico de leishmanias não tratadas (figura 16B), foi possível identificar um aumento na expressão de 33 spots nos extratos proteicos de células tratadas com $3,4 \mu M$ de T10 (Figura 16B). Para essa análise, utilizou-se o software Image Master 2D platinum V 7.0.

Para uma melhor resolução dos géis, experimentos utilizando outras faixas de pH, serão necessários, bem como posterior análise dos spots diferencialmente expressos por espectrometria de massas para identificação das proteínas. Além disso, será importante obter uma cepa de *L. amazonensis* resistente a T10 para novos estudos proteômicos comparados em relação à cepa sensível. Esta análise comparada é fundamental para que possamos avançar no(s) possível(is) mecanismos de ação dessa chalcona.

Figura 16: Eletroforese 2-DE, para avaliação de proteínas diferencialmente expressas, de extratos protéicos de leishmanias cultivadas apenas em meio de cultura LIT (A) ou em meio de cultura LIT com 3,4 μ M de T10 (B) separados na faixa de pH 3-7, seguido de posterior coloração por prata. Spots mais característicos estão indicados por uma seta.



A análise do perfil proteico pode fornecer muitas informações a respeito de onde o composto utilizado para o tratamento do parasito está atuando dentro da leishmania. Os compostos podem atuar em diversos alvos terapêuticos como:

- no metabolismo tripanotiona, formando complexos com tripanotiona redutase inibindo-a e expondo o parasito ao estresse oxidativo,
- na transdução de sinal celular, inibindo a biossíntese de fosfolípidos e esteróis,
- na biossíntese das poliaminas, inibe a enzima ornitina descarboxilase, interferindo no DNA do cinetoplasto

- na respiração microbiana, inibindo a enzima fumarato redutase, inibe a conversão de fumarato para succinato e perturba a estrutura da mitocôndria;

- na replicação do DNA, inibe a atividade catalítica da DNA topoisomerase II (Shukla et al., 2009).

As chalconas possuem um amplo espectro de atividades biológicas tais como atividade antibacteriana, anti-helmíntica, antiviral entre outras (Lunardi et al., 2003). Essas moléculas e seus derivados surgiram na década passada como uma nova classe de agentes leishmanicida, e estão sendo amplamente estudadas. Licochalcona A, uma chalcona oxigenada, isolada de raízes da planta chinesa licorice, mostrou ação inibitória no crescimento de promastigotas e amastigotas de *L. major* e *L. donovani* (Chen et al., 1993). Outros estudos revelaram que essa chalcona atua inibindo a enzima fumarato redutase desses parasitos (Chen et al., 2001).

Chalconas também foram encontradas por atuar na síntese do ergosterol, sendo o esterol o principal componente lipídico das membranas de tripanosomatídeos, e o mais importante é que células de mamíferos não produzem tal componente (Torres-Santos et al., 1999).

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Foram avaliadas as atividades de 38 derivados chalcônicos em formas promastigotas, macrófagos J774.A1 e macrófagos peritoneais. Dos diferentes derivados chalcônicos testados, 11 apresentaram dados de atividade leishmanicida superiores ao controle pentamidina, um dos fármacos ainda utilizado para tratamento de leishmaniose cutânea. Em ensaios para avaliação de citotoxicidade em macrófagos J77.A14, todos os compostos foram menos citotóxicos que a pentamidina, enquanto que nos ensaios baseados em macrófagos peritoneais, apenas nove derivados se mostraram menos tóxicos para as células.

As análises de estrutura atividade revelaram que as moléculas com melhor atividade leishmanicida foram: aquelas que tiveram uma hidroxila na posição 3 no anel A ou B (grupo 1: T3 e T10, respectivamente); aquelas que não apresentam F na posição 5 do anel B (grupo 3: T26, T27 e T38); aquelas que apresentam um grupo NO₂ no anel B (grupo 6: T28, T29, T30 e T45) e, finalmente, aquelas que tiveram prenilação na posição 2 do anel B (grupo 8: T12 e T13).

A partir dos valores de IS > 10, selecionou-se 16 derivados para complementar a triagem, avaliando-se a eficácia de tais compostos contra as formas amastigotas intracelulares. Os derivados T3 (IC₅₀=4,8 µM), T10 (IC₅₀=4,7 µM), T12 (IC₅₀=2,9 µM) e T38 (IC₅₀=4,9 µM) apresentaram resultados promissores com IS > 10 também para esse experimento. Escolheu-se T10 para prosseguir nos estudos proteômicos pelo fato dessa molécula apresentar um maior rendimento, além de ser de fácil obtenção.

Foi possível identificar um aumento na expressão de 33 *spots* nos extratos proteicos de células tratadas com 3,4 µM de T10, com expressão mais acentuada de sete *spots*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AJAIYEGBA, E. O. et al. Cajachalcone: an antimalarial compound from *Cajanus cajan* leaf extract. **Journal of Parasitology Research**, v. 2013, p. 1-5, 2013.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM K. R. **Flavonoids**: chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. p. 1003.
- BATOVSKA, D. et al. Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial activity was predicted. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2211-2218, 2009.
- BOWSER, R.; LACOMIS, D. Applying proteomics to the diagnosis and treatment of ALS and related diseases. **National Institute of Health**, v. 40, p. 753-762, 2009.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANDÃO, G. C. et al. Antimicrobial, antiviral, and cytotoxic activity of extracts and constituents from polygonum spectabile Mart. **Phytomedicine**, v. 17, p. 926-929, 2010.
- BROBEY, R. K. et al. Comparative two-dimensional gel electrophoresis maps for promastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, p. 1-6, 2006.
- CARA, L. C. L. et al. HYBRID alpha-bromoacryloylamido chalcones. Design, synthesis and biological evaluation. **Drugs of the Future**, v. 34, p. 64-64, 2009.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. **Topic**: parasites and health. Disponível em:
< <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/leishmaniasis.htm> >. Acesso em: 23 nov. 2013.
- CHARLAB, R. et al. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 15155-15160, 1999.
- CHAWLA, B. et al. Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin – susceptible – resistant *Leishmania donovani*. **PLoS One**, v. 6, p. 1-12, 2011.

CHEN, M. et al. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of leishmania. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 2550-2556, 1993.

CHEN, M. et al. Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2023-2029, 2001.

CLIMENT, M. J. et al. Activated hydrotalcites as catalysts for the synthesis of chalcones of pharmaceutical interest. **Journal of Catalysis**, v. 221, p. 474-482, 2004.

COELHO, A. C. et al. Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. **Experimental Parasitology**, v. 120, p. 98-102, 2008.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1478-1483, 2011.

DEA-AYUELA, M. A.; RAMA-IÑIGUEZ, S.; BOLAS-FERNANDEZ, F. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. **Proteomics**, v. 6, p. 4187-4194, 2006.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p. 417-423, 1996.

DORLO, P. C. et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2576-2597, 2012.

DRUMMELSMITH, J. et al. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 2, p. 146-155, 2003.

FERNÁNDEZ, O. et al. Novel approach to *in vitro* drug susceptibility assessment of clinical strains of *Leishmania* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p. 2207-2211, 2012.

GONGORA, R. et al. Mapping the proteome of *Leishmania Viannia* parasites using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and associated technologies. **Biomedica**, v. 23, p. 153-160, 2003.

HANDMAN, E. et al. Identification and characterization of protein antigens of *Leishmania tropica* isolates. **Journal of Immunology**, v. 126, p. 508-512, 1981.

HANDMAN, E. et al. Isolation and characterization of infective and non-infective clones of *Leishmania tropica*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 7, p. 111-126, 1983.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite. *Leishmania major*. **Science**, v. 309, p. 436-442, 2005.

JUNQUEIRA, M.; CARVALHO, P. C. Tools and challenges for diversity-driven proteomics in Brazil. **Proteomics**, v. 12, p. 2601-2606, 2012.

KAZEMI-RAD, E. et al. Identification of antimony resistance markers in *Leishmania tropica* field isolates through a cDNA-AFLP approach. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 344-349, 2013.

KIM, B. et al. Synthesis of dihydroxylated chalcones derivated with diverse substitution pattern and their scavenging ability toward DPPH free radicals. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 29, p. 1125-1130, 2008.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographic distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The leishmaniases in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. p. 100-120.

LUNARDI, F. et al. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 1449-1451, 2003.

MARÍN, M.; MÁÑEZ, S. Recent trends in the pharmacological activity of isoprenyl phenolics. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 272-279, 2013.

MARSDEN, P. D. Current concepts in parasitology - leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v. 300, p. 350-352, 1979.

MATLASHEWSKI, G. et al. Visceral leishmaniasis: elimination with existing interventions. **Lancet Infectious Diseases**, v. 11, p. 322-325, 2011.

MATRANGOLO, F. et al. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 190, p. 63-75, 2013.

MUELAS-SERRANO, S. et al. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, p. 999-1002, 2000.

PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, v. 39, p. 839-847, 2007.

PERRY, M. R. et al. Chronic exposure to arsenic in drinking water can lead to resistance to antimonial drugs in a mouse model of visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, p. 19932-19937, 2013.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.

PIMENTA, P. F. P. et al. Stage-specific adhesion of leishmania promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, v. 256, p. 1812-1815, 1992.

RAMÍREZ, I. et al. Cissampeloflavone, a chalcone-flavone dimer from *Cissampelos parreira*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 645-647, 2003.

RAO, Y. K. et al. Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2679-2686, 2004.

RODRIGUEZ, R. J. et al. Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 437-445, 2001.

ROSENZWEIG, D. et al. Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 1-13, 2008.

SANTOS, L. O. et al. Nelfinavir is effective in inhibiting the multiplication and aspartic peptidase activity of *Leishmania* species, including strains obtained from HIV-positive patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 348-353, 2013.

SARAVIA, N. G. et al. Two-dimensional electrophoresis used to differentiate the causal agents of American tegumentary leishmaniasis. **Clinical Chemistry**, v. 30, p. 2048-2052, 1984.

SATYANARAYANA, M. et al. Synthesis and antihyperglycemic activity of chalcone based aryloxypropanolamines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 883-889, 2004.

SEIFERT, K. Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 31-39, 2011.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1056-1069, 2011.

SHUKLA, A. K. et al. Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 2208-2218, 2010.

SILVA, R. P. da et al. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. **Journal of Immunology**, v. 143, p. 617-622, 1989.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Ed. UFSC, 2011. p. 577-609.

SINGH, N. et al. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, p. 485-497, 2012.

SULSEN, V. P. et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 2415-2419, 2008.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 345-352, 2006.

TADIGOPPULA, N. et al. Synthesis and insight into the structure–activity relationships of chalcones as antimalarial agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p. 31-45, 2013.

THEODOS, C. M. et al. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on leishmania infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 1592-1598, 1991.

TORRES, D. C. et al. Assessment of drug resistance related genes as candidate markers for treatment outcome prediction of cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 126, p. 132-141, 2013.

TORRES-SANTOS, E. C. et al. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1234-1241, 1999.

VOGEL, S. et al. Synthesis, cytotoxicity, anti-oxidative and anti-inflammatory activity of chalcones and influence of A-ring modifications on the pharmacological effect. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2206-2213, 2010.

WASINGER, V. C. et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v.16, p. 1090-1094, 1995.

WERNECK, G. L. et al. An overview of studies on nutrition and neglected diseases in Brazil. **Ciencia & Saude Coletiva**, v. 16, p. 39-62, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. 2010. Disponível em: < http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf >. Acesso em 25 nov. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Topic: leishmaniasis: worldwide epidemiological and drug access update.** 2011. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_worldwide_epidemiological_and_drug_access_update.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2012.** 2012a. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png>. Acesso em 29 jan. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2012.** 2012b. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_VL_2013.png>. Acesso em 29 jan. 2014.

WRIGHT, S. D.; SILVERSTEIN, S. C. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 158, p. 2016-2023, 1983.

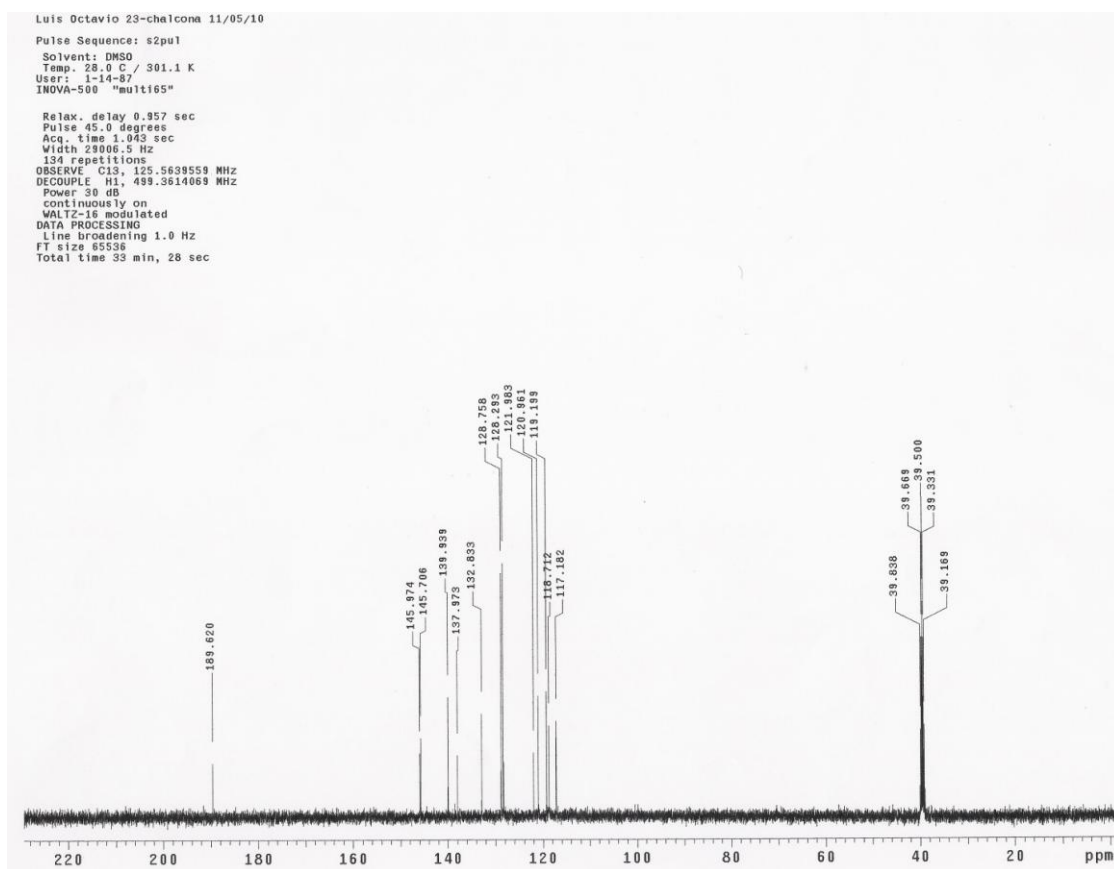
YAZAKI, K. et al. Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1739-1745, 2009.

ZHANG, Y. et al. Control of neglected tropical diseases needs a long-term commitment. **BMC Medicine**, v. 8, p. 1-9, 2010.

ZUCCA, M.; SCUTERA, S.; SAVOIA, D. New chemotherapeutic strategies against Malaria, Leishmaniasis and Trypanosomiasis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 502-526, 2013.

ANEXOS

RMN ^{13}C



Luis Octavio 23-chalcona 11/05/10

Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: DMSO

Temp. 28.0 C / 301.1 K

Users: 1-14-87

INOVA-500 "multis165"

Relax. delay 0.957 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 1.043 sec

Width 29006.5 Hz

134 repetitions

OBSERVE C13, 125.5639559 MHz

DECOUPLE H1, 499.3614069 MHz

Power 30 dB

continuously on

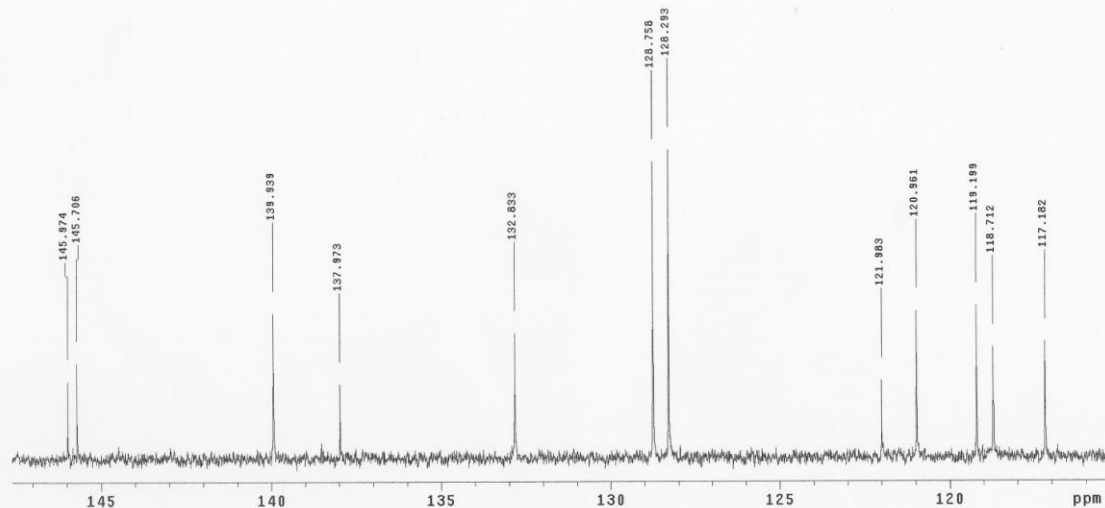
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

FT size 65536

Total time 33 min, 28 sec



Luis Octavio 23-chalcona 11/05/10

Pulse Sequence: DEPT

Solvent: DMSO

Temp. 28.0 C / 301.1 K

Users: 1-14-87

INOVA-500 "multis165"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 90.0 degrees

Acq. time 1.043 sec

Width 29006.5 Hz

200 repetitions

OBSERVE C13, 125.5639559 MHz

DECOUPLE H1, 499.3614069 MHz

Power 30 dB

on during acquisition

off during delay

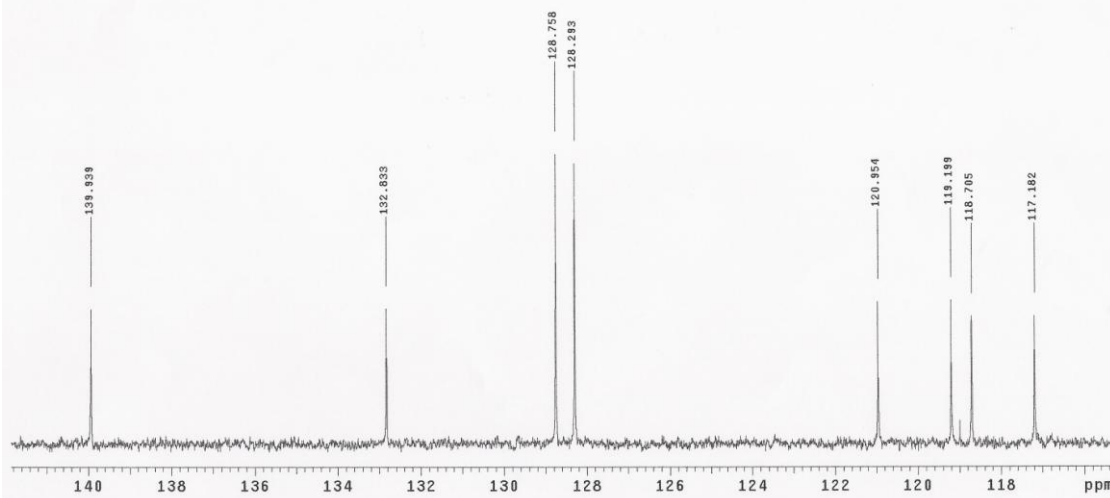
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

FT size 65536

Total time 14 min, 2 sec



RMN ¹H

